TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Professur für Systembiotechnologie

Systematische Analyse der heterologen Expression in *Escherichia coli*

Sabine G. Wagner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktor-Ingenieurs genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Prof. Dr.-Ing. Harald Klein
Prüfer der Dissertation:	1. Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling
	2. Prof. Dr. rer. nat. Kathrin Castiglione

Die Dissertation wurde am 15.07.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 30.10.2019 angenommen.

Now this is not the end. It is not even the beginning of the end. But it is, perhaps, the end of the beginning.

Winston Churchill

Danksagung

Hiermit möchte ich mich allen voran bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling und Dr. Katharina Pflüger-Grau bedanken, die diese Arbeit betreut und korrigiert haben. Der ungewöhnlich große Freiraum und damit einhergehend das Vertrauen, dass mir entgegengebracht wurde hat mich persönlich sehr weiterentwickelt. Es ist nicht selbstverständlich unter derart guten Arbeitsbedingungen eine Doktorarbeit zu schreiben. Ich möchte auch Frau Prof. Dr. Kathrin Castiglione danken, die immer Geduld mit mir hatte und trotz vielen eigenen Projekten bereit war die Rolle als Zweitprüferin zu übernehmen. Auch bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Harald Klein möchte ich mich bedanken, dass er die Zeit gefunden hat als Prüfungsvorsitzender zu fungieren.

Danke Alberto, Hannes, Sayuri, Ingmar und Burger, dass ich immer die Möglichkeit hatte auch über beinahe aussichtslose Vorhaben mit euch zu diskutieren. Danke Christoph, dass du nicht nur fachlich immer bereit warst mich zu unterstützen, sondern auch alle hangry-Anfälle mit einer guten Portion Nudeln abgewehrt hast! Ich möchte mich auch bei wirklich allen SBT, BioVT und STTlern bedanken, dass man immer auf euch zählen und mit euch lachen und schimpfen konnte. Mit Kollegen und Freunden wie euch fühlt sich Arbeit nicht wie Arbeit an.

Bei Lukas Schmauder, Jeremy von Poschinger, Martin Ziegler, Darian O'Connor, Christoph Fraundorfer, Jan Stotz, Magdalena Bals, Lilian Göldel, Martin Knörich, Melanie Knesebeck, Tom Paturet und Simon Bramberger bedanke ich mich für die vielseitige Unterstützung im Labor. Danke, dass ihr immer bereit wart auch kritische Fragen zu stellen!

Danke auch meinen neuen Chefs, die mir die Zeit eingeräumt haben, meine Arbeit zu beenden…

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt haben. Besonders wenn es mal zäh war: ihr habt mir immer zugehört, obwohl sich der eine oder andere evtl nicht ganz so sehr mit meinen Bakterien anfreunden kann :-) Ohne euch wäre es schwer geworden!

Abstract

To accomplish biocatalytic reactions it is often necessary to introduce a multiplicity of genes into a bacterial host system as e.g. *Escherichia coli*. Such a heterologous expression can cause a competition for limited cellular resources such as ribosomes, polymerases, and other precursors.

In order to understand the cellular processes and limitations during foreign protein production, we set out to describe quantitatively the distribution of the resources between the intrinsic processes needed for maintenance and the extra load introduced by the heterologous pathway.

To this end, we analysed the cellular behaviour while varying the heterologous load systematically. Besides the process parameters, we were able to record *on-line* the transcriptional and translational rates of the heterologous protein. This was achieved by the introduction of a specifically designed plasmid into the cells, that allowed us to monitor and quantify the expression of a desired gene *in vivo*. With the developed monitor plasmid pTRA, we were able to quantify mRNA and protein dynamics, as well as stabilities. Besides the expression process, cellular fitness was monitored. To assess the cellular fitness, we investigated the cellular capacity in terms of resource distribution. Moreover, we quantified resource distributions and cellular capacity via immuno-quantification and different fluorescent monitor-systems. Essential resources which are needed for expression must also be available for cellular maintenance and growth. Besides the availability of ribosomes, the RNA-polymerase can be a limited resource, to name the most important ones. Since productivity is not only affected by the availability of resources but also of the distribution of metabolic fluxes, we tracked metabolic activity at different energetic states and process configurations as well.

Because of the easily measurable fluorescence signals, the methods developed in this thesis have the potential to be valuable tools for the systematic high-throughput analysis of pathway fine-tuning. Bottlenecks can be identified and, at the end of the day, circumvented or avoided.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung ... 1

2 Theoretische Grundlagen ... 4

2.1 Kennzahlen des Produktionsstammes *Escherichia coli* ... 4

2.1.1 Zelluläre Zusammensetzung und Ressourcen ... 4

2.1.2 Abbau und Stabilität von mRNA und Protein ... 8

2.1.3 Energiegewinnung und Metabolismus ... 9

2.1.4 Stressregulation ... 11

2.1.5 Populationsdynamiken ... 11

2.2 Herstellung von rekombinantem Protein ... 12

2.2.1 Plasmide ... 12

2.2.2 Promotoren ... 13

2.2.3 Ribosomenbindestellen ... 14

2.2.4 Das Durchschnittsprotein ... 15

2.2.5 Wechselwirkungen mit der Wirtszelle und die Metabolische Belastung ... 15

2.3 Zelluläre Dynamiken ... 18

2.4 Fluoreszenzen ... 21

2.5 Funktionsprinzip der FlowSeq-Methode ... 22

2.6 Prozessstrategien ... 23

2.6.1 Satzprozess ... 24

2.6.2 Zulaufverfahren ... 26

3 Material und Methoden ... 27

3.1 Verwendete Stämme und Plasmide ... 27

3.2 Molekularbiologische Methoden ... 29

3.2.1 Plasmidpräparation und DNA-Reinigung ... 30

3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) ... 30

3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA ... 31

3.2.4 Restriktion ... 31

3.2.5 Ligation ... 32

3.2.6 Kombinierter Restriktions und Ligationsansatz ... 32

3.2.7 Transformation in frisch-kompetente Zellen (TSS-Methode) ... 32

3.2.8 Transformation in chemisch-kompetente Zellen ... 33

3.2.9 Sequenzierung ... 33

3.2.10 Anlegen von Dauerkulturen ... 33

3.2.11 Bereitstellung einer Plasmidbibiothek ... 33

3.2.12 Genomische Integration in die *attTn7*-Plattform ... 34

3.3 Analytische Verfahren 35
3.3.1 Erstellung von Proteinstandards 35
3.3.2 BCA-Assay 36
3.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 36
3.3.4 Coomassie-Färbung 37
3.3.5 Westernblot 37
3.3.6 Densitometrische Proteinbestimmung 38
3.3.7 Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse 38
3.3.8 HPLC 39
3.3.9 FACS 39
3.3.10 NMR 40
3.4 Kultivierung 40
3.4.1 Satzkultivierung in Mikrotiterplatten 41
3.4.2 Satzkultivierung im bioREACTOR48 42
3.4.3 Satzkultivierung im Schüttelkolben 43
3.4.4 Satzkultivierung im Sartorius Bioreaktor 1.5L 43
3.4.5 Zulaufverfahren im Schüttelkolben 45
3.5 Erhebung der Dynamiken im Kultivierungssystem 45
3.5.1 Biomasse 46
3.5.2 Substrataufnahme bzw Produktbildung 46
3.5.3 RNA und Proteinbildung 46
3.5.4 Abschätzung heterologer Gleichgewichtszustände 50
3.5.5 Extraktion der grünen Fluoreszenz aus der Autofluoreszenz 50
4 Ergebnisse und Diskussion 51
4.1 Quantifizierung der heterologen Expression 51
4.1.1 Design des Messsystems 51
4.1.2 Das heterologe mRNA-Signal 54
4.1.3 Das heterologe Protein-Signal 57
4.1.4 Theoretische Betrachtung der heterologen Expression des Modelproteins 58
4.1.5 Praktische Betrachtung der Expression des Modelproteins 59
4.2 Erfassung der zellulären Kapazität 67
4.2.1 Design und Auswahl des Messsystems 67
4.2.2 Vermessung der zellulären Kapazität bei unterschiedlichen energetischen Zuständen 72
4.3 Quantifizierung zellulärer Ressourcen 76
4.3.1 RNA-Polymerase 76

4.3.2 Ribosomen 79
4.3.3 Imitation unterschiedlicher Ressourcen-Verfügbarkeit 83
4.4 Quantifizierung der metabolischen Aktivität 90
4.4.1 Vergleichende metabolische Analyse unterschiedlich belasteter Stämme 90
4.4.2 Einfluss des Kultivierungssytems auf die metabolische Aktivität 97
4.4.3 Die metabolische Aktivität bei unterschiedlichen Prozessführungen 99
4.5 Systematische Analyse der Proteinzusammensetzung 102
4.5.1 Aminosäureverfügbarkeit und native Proteomstruktur 102
4.5.2 Randomisierte Peptidbibliothek zur Analyse Metabolischer Belastung 103
4.5.3 Manueller Screen der zellulären Belastung durch Proteinzusammensetzung 105
4.5.4 dFlowSeq zur Generierung Zeit-aufgelöster Produktions und Wachstumsdaten 109
5 Zusammenfassung und Ausblick 114
5.1 Quantifizierung der heterologen Expression 114
5.2 Erfassung der zellulären Kapazität 115
5.3 Quantifizierung zellulärer Ressourcen 115
5.4 Quantifizierung der metabolischen Aktivität 116
5.5 Systematische Analyse der Proteinzusammensetzung 117
5.6 Ausblick 118
6 Literaturverzeichnis 120
Anhang 138
A.1 Variablenverzeichnis 138
A.2 Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis 140
A.3 Berechnungen und Hintergrundinformation 143
A.4 Medien und Puffer 162
A.5 Versuchsverzeichnis 166
A.6 Chemikalien und Enzyme 175
A.7 Verbrauchsgüter 176
A.8 Geräte und Software 177

1 Einleitung und Zielsetzung

Auch wenn die Biotechnologiebranche in Deutschland im Biotechnologiereport 2018 der Ernst & Young GmbH Wirtschaftsprüfungsgesellschaft als nicht-genügend innovativ im internationalen Vergleich beurteilt wird, ist in den letzten 20 Jahren nicht nur die Anzahl der Biotechnologiefirmen, sondern auch der Umsatz und der Beitrag zum Bruttoinlandsprodukt stetig gestiegen. Nach wie vor gilt im Rahmen der Hightech-Strategie der Bundesregierung die Biotechnologie als eine der sieben Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts (BMBF). Bei der Herstellung von pharmazeutischen Produkten sowie der Gewinnung von Feinchemikalien bieten sich hier Möglichkeiten, die weit über die der etablierten chemischen Prozesse hinausgehen. Recherchen der Ernst & Young GmbH Wirtschaftsprüfungsgesellschaft ergaben weiterhin, dass es allein in Deutschland 647 Unternehmen (Stand 2017) gibt, die den biotechnologischen Markt bedienen und zusammen einen Umsatz von vier Milliarden Euro erwirtschaften. Das enorme Potenzial dieses Wirtschafts- und Forschungszweiges liegt sowohl in der möglichen Produktpalette begründet als auch in der Technologie selbst, die ökonomisch, aber auch ökologisch gesehen Lösungen für viele Probleme unsere Gesellschaft bietet. Die Möglichkeiten beginnen beim Ersatz fossiler Rohstoffe und enden bei Weitem nicht mit der Herstellung noch unbekannter Wirkstoffderivate. Gerade im Bereich der Onkologie verspricht man sich deutlich verbesserte Eigenschaften dieser Derivate gegenüber den bereits zum Einsatz kommenden Substanzen. Laut dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie stammt jedes vierte pharmazeutische Produkt, das 2016 auf dem deutschen Pharmamarkt angeboten wurde aus biotechnologischer Herstellung. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Anteil weiterhin wachsen wird. Der Umsatz von Biopharmazeutika stieg von 2015 auf 2016 um 12.4 %[1] und erfreut Arbeitnehmer, Arbeitgeber und auch Anleger.

Doch gerade im Niedrigpreissegment beziehungsweise bei Bulk-Produkten scheitern viele Prozesse, die technisch möglich sind, am Sprung in die Anwendung. Ursachen hierfür können neben Instabilitäten der Bioprozesse auch geringe Ausbeuten oder generell die Entwicklungskosten sein. Im Gegensatz zu herkömmlichen chemischen Prozessen unterliegt die Produktion von Proteinen oder Molekülen in Zellen natürlichen Schwankungen, deren Ursachen aufgrund der komplexen Wechselwirkungen bisher nicht genau verstanden sind. Neben natürlicher Heterogenität in Populationen, die vom Einzeller bis zum mehrzelligen Organismus zu finden ist, kann die enorme Zusatzbelastung, die durch die gentechnische Veränderung des Produktionsorganismus hervorgerufen wird, der maßgebliche Faktor sein, der das ökonomische Ablaufen eines Prozesses verhindert. Um hierauf reagieren zu können und dieses Verhalten vorhersagbar zu machen, ist es wichtig die zellulären Abläufe in ihrer Gesamtheit zu betrachten und systematisch zu verstehen, wie und wo sich Belastungen auswirken. Die Summe dieser Auswirkungen kann als sogenannte *Metabolic Burden* beziehungsweise als Metabolische Belastung bezeichnet werden [1]. Seit geraumer Zeit gibt es einige Arbeitsgruppen, die das Phänomen der metabolischen Last evaluieren. Da Zellen Umwelteinflüssen oder Störungen auf vielen Ebenen Reaktionen entgegensetzen können, fokussieren sich bisherige Ansätze in der Regel auf einzelne Aspekte, um die Komplexität des Systems zu reduzieren. Hier konnten schon wichtige Erkenntnisse vor allem auf Stoffwechselebene und Zellzusammensetzung errungen werden [1]–[6]. Bei der Entwicklung eines biotechnologischen Produktes bis hin zur Produktion dieses bringen nicht nur verschiedene Kultivierungssysteme eine Varianz in das zu skalierende

[1] Angaben der Seite des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie entnommen (https://www.bmwi.de/Redaktion/DE/Artikel/Branchenfokus/Industrie/branchenfokus-biotechnologie.html)

System, sondern damit einhergehend auch unterschiedliche Umweltbedingungen wie Sauerstoffverfügbarkeit, Scherraten, Durchmischung oder Zelldichte. Da sich Änderungen auf mehreren Ebenen gleichzeitig abspielen, ist es oft schwer allgemeingültige Aussagen zu treffen. Die Basis hierzu muss ein ganzheitlicher Ansatz bilden, der Transkription, Translation, sowie Wachstumsraten, Kultivierungsbedingungen, Ressourcenverfügbarkeit und metabolische Aktivität berücksichtigt. Bevor jedoch diese Aspekte in ihrer Gesamtheit erfasst werden können, ist es notwendig ein Messsystem zu etablieren, welches die unabhängige Betrachtung und Auslenkung all dieser Parameter ermöglicht. Da dieses Problem in der Gänze seiner Dimensionen schwer zu erfassen ist, sollte am Ende dieses Ansatzes ein mathematisches Modell stehen, das die einzelnen Forschungsstränge zueinander bringen und verknüpfen kann. Nur so können auf lange Sicht biotechnologische Prozesse in jedem Segment der Wirtschaft den technischen Anforderungen der Prozesskontrolle genügen und mit chemischen Prozessen konkurrieren. Durch die Verknüpfung systembiologischer Herangehensweisen, synthetischer Biologie und dem Wissen um Prozessanforderungen in der industriellen Verfahrenstechnik soll diese Arbeit die Basis zur ingenieurwissenschaftlichen Beschreibung heterologer[2] Expression und biotechnologischer Prozesse bilden.

Bei biotechnologischen Produktionsprozessen werden in vielen Fällen genetisch modifizierte Organismen verwendet. Da die verwendeten Wirtszellen zusätzlich zum regulären Erhaltungsstoffwechsel und zu der Realisierung von wachstumsassoziierten Vorgängen heterologe Expressionsarbeit leisten müssen, konkurrieren diese Prozesse, wie in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt, um den Vorrat an zellinternen Beständen an Produktionsmitteln, wie Ribosomen, RNA-Polymerasen, Nukleotide, Aminosäuren und Energie. Die zur Verfügung stehenden Ressourcen und damit die Leistungsfähigkeit der Zellen kann zur sogenannten Kapazität zusammengefasst werden. Sind die Grenzen der Kapazität erreicht, kann eine häufige Folge hiervon eine unterdurchschnittliche Prozessperformance sein. Die auftretenden Effekte, wie Wachstums oder Produktionseinbruch, werden in der Literatur als Metabolische Belastung bezeichnet. Ziel dieser Arbeit war es auf unterschiedlichen Ebenen die Ausgangslage der Zelle sowie ihr Verhalten während einer heterologen Belastung systematisch zu quantifizieren und Unterschiede aufzuzeigen.

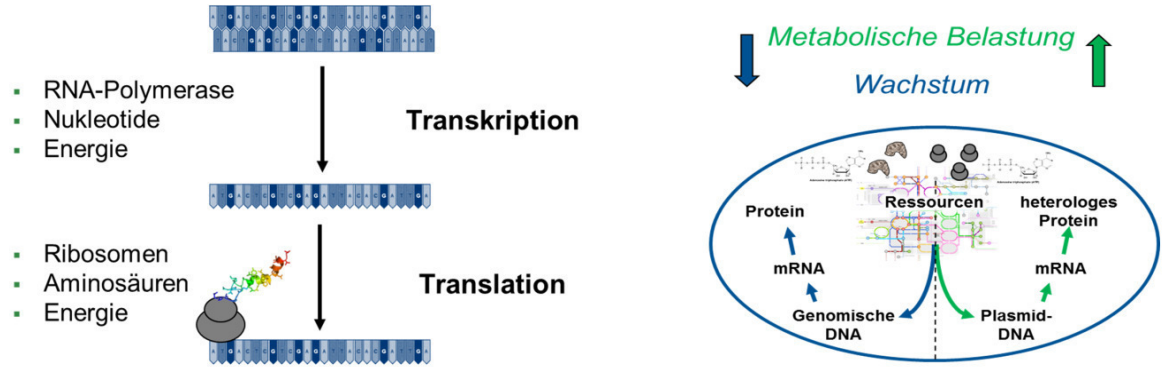


Abbildung 1.1 Die in die heterologe Expression involvierten zellulären Ressourcen lassen sich auf die links im Bild dargestellten Vorgänge der Transkription und Translation reduzieren. Wie rechts schematisch dargestellt, stehen die für die heterologe Produktion aufgewandten Ressourcen den zelleigenen Prozessen nicht mehr zur Verfügung. Diese Kontingentierung bedeutet für die Zellen eine Metabolische Belastung, die in Konkurrenz zur Biomassebildung auftritt. Eine steigende Belastung (grün) wirkt sich also negativ auf das Wachstum (blau) aus.

[2] Der Begriff heterolog beschreibt, dass die zugrunde liegende DNA nativ nicht zur Wirtszelle gehört.

In einem ersten Schritt sollte eine geeignete heterologe Beladung zur Belastung der Zellen ausgewählt werden. Aufgabe dieser Ladung war es, einen quantitativen Zugang zur heterologen Expression zu schaffen. Gerade für die Feinabstimmung heterologer Systeme sind die Promotoraktivität sowie die Regulierung der Expression von essenzieller Bedeutung. Bisher war es mit einem großen, experimentellen Aufwand verbunden die Dynamiken der Expression sichtbar zu machen und vor allem die aktuellen Konzentrationen der heterologen mRNA zu verfolgen. Hierfür sollte ein Weg gefunden werden Transkription, sowie Translation mit möglichst geringem Aufwand mit einer hohen Zeitauflösung zu verfolgen.

Um das Zusammenspiel aller Komponenten abzubilden und die auftretende zelluläre Belastung zu quantifizieren, war ein Monitorsystem zur Beschreibung der zellulären Kapazität zu etablieren. Hierfür sollte der in der Zelle zur Verfügung stehende Spielraum durch einen Fluoreszenzreporter ausgefüllt werden. Dieser Kapazitäts-Reporter sollte bei einer heterologen Belastung verdrängt werden und repräsentativ für die während der Produktion aufgewandten Ressourcen gesehen werden können.

Kann die heterologe Expression einer Kultur analysiert werden, dann stellt sich die Frage nach der Menge und der Verteilung der beteiligten Ressourcen. Insbesondere für das Proteom der Zellen, aus welchem essenzielle Ressourcen wie Ribosomen rekrutiert werden, konnte bereits gezeigt werden, dass wachstumsabhängige Änderungen in der Zusammensetzung stattfinden [7], [8]. Aus diesem Grund war es erforderlich die Verfügbarkeit der Ressourcen Ribosom und RNA-Polymerase der Zellen bei unterschiedlichen Zuständen der Belastungs sowie verschiedenen Wachstumsraten abzubilden. Neben der Verfügbarkeit sollte auch die Bildungsrate quantifiziert werden.

Aufgrund vielschichtiger Regulationsmechanismen sind Zellen in der Lage auf Bedingungen, die vom Normzustand abweichen, innerhalb eines gewissen Spielraumes zu reagieren. Metabolische Flüsse werden umgelenkt und Stoffwechselwege nach Bedarf verstärkt. Da hierbei oft kleinste Änderungen ausreichen und nicht jeder Metabolit analytisch erfasst werden kann, ist die Quantifizierung der metabolischen Aktivität mitunter der wichtigste Aspekt bei der Betrachtung heterolog-belasteter Zellen. In dieser Arbeit sollte nicht nur ein metabolisches Profil des Wildtypstammes erstellt werden, sondern auch Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Vergleich zum belasteten Stamm beleuchtet werden. Um verschiedene, energetische Zustände der Zellen abbilden zu können, sollten zunächst die Wachstumsraten variiert werden. Da industrielle Prozesse in der Regel während der Entwicklung verschiedene Kultivierungssysteme durchlaufen und prozesstechnische Parameter den Produktionsstamm beeinflussen können, gilt es den Einfluss dieser zu analysieren. Als weiteres Arbeitspaket sollten nicht nur verschiedene Kultivierungssysteme, sondern auch verschiedene Prozessführungsstrategien miteinander verglichen werden.

Da auch die Zusammensetzung des Proteins selbst Auswirkungen haben kann, sollte eine systematische Vorgehensweise erarbeitet werden, mit dieser die zelluläre Fitness in Abhängigkeit der Primärsequenz des Proteins beurteilt werden kann. Hierfür sollten nicht nur die heterologen Konstrukte entworfen werden, sondern auch Methoden zur Analyse gefunden werden.

Diese Daten sollen die Grundlage für eine prädiktive Betrachtung von Ressourcenverfügbarkeit liefern, um Vorhersagen von Engpässen in der Produktion treffen zu können und diesen letztendlich gegensteuern zu können.

2 Theoretische Grundlagen

Um die gemessenen Werte im Kontext der Gesamtzelle richtig zu beurteilen, ist es zunächst nicht nur notwendig die Eigenheiten des Produktionsstammes, sondern auch dessen Zusammensetzung näher zu betrachten. Im Folgenden wird nicht nur der Produktionsstamm an sich, sondern auch Kenndaten hinsichtlich der zellulären Ressourcen und aus der Literatur bekannte Dynamiken dargestellt. Des Weiteren werden wichtige Elemente der heterologen Ladung sowie schon bekannte Auswirkung einer heterologen Belastung auf den Produktionsstamm vorgestellt. Anschließend werden in diesem Kapitel die Hintergründe der verwendeten Prozessstrategien und Berechnungen sowie in dieser Arbeit vorkommende Methoden und Effekte zusammenfassend erläutert.

2.1 Kennzahlen des Produktionsstammes *Escherichia coli*

Auch wenn Mikroorganismen schon seit Jahrtausenden mehr oder weniger bewusst biotechnologische Anwendung finden, ist das circa 5 µm lange, Gram-negative, stäbchenförmige Bakterium *Escherichia coli* (im Folgenden *E. coli*) einer der ersten gut typisierten Prokaryoten. Da über diese Spezies von komplexen Molekülinteraktionen bis hin zu Stoffwechselmodellen sehr viele Informationen verfügbar sind, werden historisch bedingt bis heute viele Grundlagen in diesem Organismus erforscht. Gerade die biotechnologische Anwendung von Mikroorganismen bedeutet oft, dass die Zellen gentechnisch verändert werden müssen. Engstellen in der Produktion hängen dabei nicht selten mit Wechselwirkungen dieser Modifikation mit der regulären Wirtszellkonfiguration zusammen. Je mehr Hintergrundwissen daher zu einem Stamm vorliegt, desto eher können Probleme in Angriff genommen werden. Obwohl es sich das wissenschaftliche Konglomerat ‚*Earth Microbiome Project*' zur Aufgabe gemacht hat die Gesamtheit der terrestrischen Mikroorganismen systematisch und standardisiert zu erfassen [9] und mit Sicherheit herausragende Produktionsstämme in dieser Vielfalt gefunden werden können, wird vor allem von der Industrieseite nach wie vor auf etablierte Organismen gesetzt. Auch deswegen findet man *E. coli* Stämme nicht nur in der Herstellung von medizinischen Produkten, wie Insulin [10], sondern auch in der Produktion von industriell relevanten Molekülen, wie höheren Alkoholen, oder Proteinen [11]. Im Folgenden werden, neben der Zusammensetzung der Zelle, auch Moleküldynamiken, der Metabolismus, stressauslösende Reize sowie die Population an sich betrachtet.

2.1.1 Zelluläre Zusammensetzung und Ressourcen

Die zelluläre Zusammensetzung der Enterobakterien *E. coli* und *Salmonella typhimurium* wurde von Neidhardt *et al.* schon 1987 detailliert beschrieben. Die darin bestimmten Größen sind bis heute aktuell und finden vor allem in der mathematischen Modellierung Verwendung. Jedoch sind die dort angegeben Zahlen statisch und bilden daher nicht in vollem Umfang die Komplexität der straff kontrollierten Zellkomposition ab. Da die Analyse auf Einzelzellebene trotz großer Fortschritte auf diesem Gebiet noch immer nicht Stand der Technik ist, können sowohl diese als auch die in der Arbeit erhobenen Daten als Mittelwerte gesehen werden. Generell wird in der Literatur davon ausgegangen, dass ein thermodynamisches System, welches aus einem Mol Kohlenstoff besteht, sich aus $4.6 \cdot 10^{13}$ Zellen zusammensetzt [12]. Die mittlere Anzahl an Kohlenstoffatomen pro Zelle beträgt somit circa $1.3 \cdot 10^{10}$. Weiterhin wird die Größe einer Zelle mit $2.0 \cdot 10^{-12}$ cm^3 angegeben und das Gewicht einer Durchschnittszelle auf $2.0 \cdot 10^{-12}$ g angenähert [12]. Die chemische Zusammensetzung einer *E. coli* Zelle wurde von Grosz und Stephanopoulus [12] empirisch zu $C_1H_{1.77}0_{0.49}N_{0.24}$ ermittelt, wobei davon ausgegangen werden kann, dass sich diese auf Kohlenstoff normierte Summenformel aus diversen Makromolekülen und Metaboliten

zusammen setzt. Wie für hohe Wachstumsraten ($\mu > 1\ h^{-1}$) von Neidhardt [13] publiziert ist, besteht eine bakterielle Zelle bezogen auf das Trockengewicht aus circa 55.0 % Protein, 20.5 % RNA und 3.1 % DNA. Die restlichen Anteile bestehen vorrangig aus Lipiden, Glycoproteinen und Aminen und diversen anderen Molekülen. Der Anteil an Metaboliten ist mit circa 3.5 % sehr variabel in der Zusammensetzung.

Der in dieser Arbeit vorrangig verwendete, prototrophe *E. coli* Stamm HMS174(DE3) wurde vom Projektpartner als vielversprechender Kandidat zur Terpensynthese ausgewählt. Da dieser Stamm nicht nur kompatibel mit dem T7-Expressionssystem ist, sondern auch *recA*[3] defizient, ist er besonders zur Expression repetitiver Sequenzen geeignet [14]. Daher wird dieser Stamm gerne bei der Expression komplexerer Konstrukte genutzt. *E. coli* HMS174(DE3) trägt genomisch eine Rifampicin-Resistenz [15]. Die in dieser Arbeit analysierten Stämme gehen hauptsächlich auf den K-12 Stamm *E. coli* HMS174 (ATCC47011) zurück. 2014 konnte das Genom erfolgreich sequenziert werden. Dieses organisiert sich mit einer Anzahl von 4 583 580 Basenpaaren in einem zirkulären Chromosom [15]. Der Replikationsmechanismus einer Zelle steht in einem empfindlichen Gleichgewicht. In der Regel geht die Verdoppelung der Biomasse deutlich schneller vonstatten, als dies der Fall für die Verdoppelung der DNA ist [16]. Daher ist es notwendig, dass die DNA in mehreren Replikationsgabeln parallel vervielfältigt wird. Dies bedeutet, dass abhängig von der Anzahl der Replikationsgabeln die Masse an DNA variieren kann und somit auch die Kopienzahl der im Genom codierten Gene. Des Weiteren bedeutet dies, dass schnell wachsende Zellen überlappende Replikationszyklen besitzen [17]. Betrachtet man die Masse der DNA, kann daher bei höheren Wachstumsraten im Schnitt auch von einem erhöhten DNA-Gehalt ausgegangen werden [18]. Dieser Regulierung nicht unterworfen sind die Plasmide einer Zelle. Plasmide bringen in der Regel ihr eigenes Replikationssystem mit [19]. Solange ausreichend Ressourcen in einer Zelle vorhanden sind, wird die Plasmidkopienanzahl lediglich vom Replikationsursprung des Plasmides determiniert. Bei *high-copy* Plasmiden kann die Kopienanzahl bis zu 700 Plasmide pro Chromosom betragen [20]. Typische Expressionsplasmide, wie das pET28a[4], erreichen oft Größen über 5 000 Basenpaare. Daher kann die heterologe DNA auf die Masse bezogen auch Größenordnungen der zelleigenen, genomischen DNA erreichen. Es muss also davon ausgegangen werden, dass auch ohne eine zusätzliche Expression plasmidspezifische, starke Einflüsse durch die zusätzliche Replikationsarbeit zu erwarten sind.

Im Genom des Stammes HMS174 konnten - basierend auf bioinformatischen Analysen - 4 437 Gene identifiziert werden. Viele dieser Gene liegen Bakterien-typisch in sogenannten Operons organisiert vor. Dies bedeutet, dass oft regulatorisch zusammengehörige Gene zu einer mRNA transkribiert werden. Je nach Länge des Konstruktes kann die Position des Gens in dieser transkriptionellen Einheit ebenfalls eine regulierende Aufgabe übernehmen, da RNA-Polymerasen die mRNA nicht immer bis zum Ende dieser Einheiten, dem Terminator, herstellen. Auch kommt es häufig zu Überlappungen verschiedener transkriptioneller Einheiten, wenn diese unter der Kontrolle mehrerer Promotoren stehen. Obwohl die meisten Gene proteinogen sind, ist auch für *E. coli* bereits bekannt, dass es eine Vielzahl an sogenannten *non-coding* RNAs (ncRNA) gibt [21]. Diese RNAs werden nicht in Proteine translatiert und übernehmen entweder eine katalytische oder eine regulatorische Funktion. Am besten bekannt sind hier neben den tRNA-Spezies wohl die ribosomalen RNA-Moleküle, die eine katalytische Rolle übernehmen. Nach Neidhardt macht den größten Anteil an zellulärer RNA die ribosomale RNA (rRNA) mit rund 82 %

[3] Das *recA* Gen ermöglicht baktriellen Stämmen die Rekombination und Reparatur von DNA.
[4] Gängiges Plasmidsystem der Firma Novagen, welches zur Überproduktion von Proteinen verwendet wird, da über den Klonierungsprozess ein Reinigungs-Tag eingebracht werden kann.

aus [13]. Die Träger-RNA (tRNA) trägt mit circa 14 % den zweitgrößten Anteil bei [13]. Die Durchschnittszelle enthält bis zu 4 % an messenger RNA (mRNA) [13]. Das für die rRNA codierende Operon liegt in sieben Kopienanzahlen im Genom von *E. coli* vor, wird aber von jeweils unterschiedlichen Promotoren reguliert [22]. Diese Varianz sorgt zum einen für die überdurchschnittliche Präsenz von rRNA und ermöglicht zum anderen durch die auf Umweltreize reagierenden Promotoren eine feingliedrigere Regulierung [22].

Im Stamm *E. coli* HMS174 konnten 4 241 Gene identifiziert werden, die für Proteine codieren [15]. Es wird davon ausgegangen, dass pro Kubikmikrometer *E. coli* Zelle circa 10^6 Proteine zu finden sind [23]. Die Anzahl einzelner Proteine reicht von wenigen Einzelnen bis hin zu 300 000 Kopien [24]. Proteine können nach der COG-Klassifikation (*Clusters of Orthologous Groups*) je nach Aufgabe in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Es lässt sich feststellen, dass die Gruppe *Translation/ribosomale Struktur/Biogenese* prozentual zur Gesamtproteinmasse mit mehr als 20 % überproportional vertreten ist [25]. Diese und andere Gruppen liefern entscheidende Ressourcen für die Expression. Sie zeigen in vielen Fällen lineare oder auch logarithmische Abhängigkeiten vom Wachstum. Es liegt also nahe, dass ein Eingriff in diese dynamische Zusammensetzung durch eine zusätzliche heterologe Belastung zu anderen Verteilungen führen kann. Da die Zellen gerade in klassischen Satz-Kultivierungen über die Zeit Änderungen im umgebenden Medium wahrnehmen, kann man davon ausgehen, dass sich auch die den Metabolismus betreffenden Proteine im Verlauf des exponentiellen Wachstums ändern. Insbesondere die Produktion von fermentativen Nebenprodukten wie Acetat kann schon ab wenigen Millimol inhibierend wirken und die globale Stressantwort provozieren. In der Regel betrachtet man aus Gründen der Vereinfachung die makromolekulare Zusammensetzung im Verlauf des exponentiellen Wachstums als im Fließgleichgewicht. Es wird davon ausgegangen, dass Veränderungen hauptsächlich in der Medienzusammensetzung und der daraus resultierenden Wachstumsrate begründet sind [8]. Scott *et al.* gehen davon aus, dass sich das Proteom noch fragmentärer einteilen lässt. Autoregulierte *housekeeping* Gene beispielsweise, zählen zu einer wachstumsunabhängigen Fraktion, wohingegen ribosomale und translationsspezifische Proteine als wachstumsabhängig bestimmt wurden [26]. Den dritten Anteil stellen Proteine, die in den Metabolismus involviert sind [26]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zusammensetzung nicht nur abhängig von der Wachstumsrate ist [7], [27], sondern auch durch die Expression heterologer Proteine beeinflusst werden kann. Die Expression nicht notwendiger Proteine scheint insbesondere die essenziellen Proteinfraktionen, wie die der ribosomale Proteine, aber auch den Metabolismus betreffende Proteine zu verdrängen [28]. Betrachtet man das RNA-Protein-Verhältnis kann man erkennen, dass mit zunehmender Wachstumsrate mehr RNA pro Protein vorliegt [28]. Dies bedeutet, dass mit höheren Wachstumsraten mehr RNA gebildet wird, aber nicht mehr Protein gebildet werden kann, oder weniger Protein pro mRNA gebildet wird, da die aufzuwendenden Ribosomen limitierend sind [29]. Hui *et al.* konnten basierend auf phänomenologischen Beobachtungen zeigen, dass die Zusammensetzung der Proteincluster auch auf setupspezifische Parameter reagiert, wie Substratengpässe, Aminosäureknappheit oder eine Limitierung in der Ribosomenverfügbarkeit [30]. Insbesondere bei Produktionsstämmen ist die Ressourcenverfügbarkeit essenziell, da hier durch den zusätzlichen Verbrauch schneller Limitationen und damit einhergehend Änderungen in der Proteomzusammensetzung auftreten können. Zu den wichtigsten Ressourcen zählen die Proteine der Ribosomen sowie der RNA-Polymerase. Da es bei einer nicht ausreichenden Verfügbarkeit dieser zu Belastungseffekten kommen kann, soll in den folgenden Abschnitten näher auf die Struktur und Funktion eingegangen werden. Die wichtigsten Daten finden sich zusammengefasst in Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1 Wichtige Daten zur Beschreibung und Aktivität der Ressourcen Ribosomen und RNA-Polymerase. Die Informationen wurden aus verschieden, im Text ausgewiesenen Literaturstellen zusammengefasst.

Parameter	Ribosomen	RNA-Polymerasen
Anzahl	6 800-72 000 [27]	1 500-11 400 [29,49]
Zusammensetzung	53 Proteine + 3 rRNA [32]	5 Proteine+Sigmafaktor [33]
Polymerisationsgeschwindigkeit	12-18 Aminosäuren s^{-1} [34]	28-89 Nukleotide s^{-1} [35]
Größe	2.5 MDa [36]	379 kDa [33]
Gebunden an der Matrize	14-28 Codons Abstand [37]	Gleichgewicht: gebundene vs frei [38]
Aktiv	90 % [52,53]	20-30 % [39]

Die Bereitstellung von Ribosomen ist einer der energieaufwändigsten Prozesse, der von der Zelle katalysiert wird [40]. Ein einzelnes Ribosom besteht, neben der verbauten rRNA, aus 53 einzelnen Proteinen [32]. Dennoch lohnt sich die Herstellung dieser Ressourcen-verschlingenden Komplexe in großer Zahl. Ohne Ribosomen kann kein wachstumsassoziierter Prozess stattfinden. Sind im Gesamtproteom im Median 500 Kopien pro Protein und Zelle zu finden [41], reicht die in der Literatur angegebene Spanne an Ribosomenverfügbarkeit je nach Wachstumsrate von 6 800 bis 72 000 Ribosomen [27]. Damit können Ribosomen bis zu einem Drittel der Gesamtzellmasse ausmachen [42]. Überschlägt man für eine durchschnittliche Ribosomenanzahl von 39 400 Ribosomen, den Anteil am Proteom mit circa 2 360 000 Proteinmolekülen [43] bedeutet dies, dass über 88 % des Proteoms aus ribosomalem Protein bestehen muss. Dies widerspricht sich nicht nur mit der Aussage der PaxDb[5], dass das universale Stressprotein UspA 44 % der vorkommenden Proteine ausmacht, sondern es passt auch nicht ins Bild, dass für durchschnittliche Proteine eine Kopienanzahl von 500 pro Zelle gerechnet werden muss [41]. Übereinstimmend lässt sich sagen, dass Ribosomen nicht nur in großer Anzahl vorkommen, sondern auch einer straffen Regulierung unterworfen sein müssen. Die Zelle kann es sich energetisch nicht leisten kann bei diesem aufwendigen und teuren Posten verschwenderisch zu agieren. Unter normalen Bedingungen ist die noch freie Kapazität einer Wildtypzelle gering, da im Schnitt bereits über 90 % der Ribosomen aktiv in Translationsprozesse involviert sind [52,53]. Diese Polymerisationsreaktion variiert ja nach Wachstumsrate von 12 bis 18 Aminosäuren pro Sekunde und kann bei auftretenden Limitierungen sogar noch deutlich weiter sinken [34]. Befinden sich die Zellen in einem Medium, welches mit Aminosäuren supplementiert ist, können Syntheseraten von bis zu 22 Aminosäuren pro Sekunde erreicht werden [44]. Mit einem durchschnittlichen Abstand von 14 bis 28 Codons zwischen den einzelnen Ribosomen kann während der Translation von einer transkriptomweiten Ribosomendichte von 3.46 Ribosomen pro 100 Codons ausgegangen werden [37]. In wachsenden *E. coli* Zellen sind Ribosomen generell stabil, jedoch können sie in Hungerphasen oder bei Magnesiummangel abgebaut werden [45]. Ein Auslöser hierfür sind freie ribosomale Untereinheiten, die sich nicht zu ganzen Ribosomen zusammenfinden [45].

Betrachtet man die der Expression zugrunde liegenden Ressourcen, kann sich neben der verfügbaren Anzahl an Ribosomen auch die RNA-Polymerase limitierend auswirken [46]. Für RNA-Polymerasen kann mit zunehmender Wachstumsrate eine Zunahme des Anteiles am Gesamtproteom sowie ein Plus hinsichtlich der absoluten Anzahl gemessen werden [27]. Desweiteren kann zusätzlich ein Anstieg der Polymeraseaktivität sowie eine Vergrößerung des Anteils an aktiven Polymerasemolekülen pro Zelle verzeichnet werden [27]. Im Gegensatz zu Eukaryoten verfügen Prokaryoten über eine einzige RNA-Polymerase, die alle Arten von RNA herstellt. Aufgrund des verhältnismäßig hohen Molekulargewichts dieses zentralen Enzymes

[5]Protein Abundance Database Version 4.1; https://pax-db.org/species/511145 1-100

bedeutet die Herstellung der Polymerase für die Zelle eine energetische Belastung. Das *Core*-Enzym der RNA-Polymerase in *E. coli* setzt sich mit einer Gesamtmasse von 379 kDa aus fünf Untereinheiten zusammen [33] ($\alpha_2\beta\beta'\omega$, was in *E. coli* den Genen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* und *rpoZ* entspricht). In Kombination mit sogenannten σ-Faktoren wird das Core-Enzym der RNA-Polymerase zum Holoenzym. Sigmafaktoren sind der Schlüssel zur Regulation der Expression und können je nach Klasse Stressantworten wie Hitzeschock, Nährstoffmangel oder generell Reaktionen auf Umweltreize koordinieren [47]. In *E. coli* stehen sieben verschiedene Sigmafaktoren zur Verfügung [48]. Während des Wachstums ist der σ^{70}-Faktor (entspricht dem Gen *rpoD*) hauptverantwortlich für die Bindung der Polymerase an die Promotorsequenzen [47]. Weitere bekannte Beispiele für Sigmafaktoren sind die sogenannten *heat shock proteins* oder der globale Stressregulator RpoS. Hat ein Sigmafaktor an das RNA-Polymerase-*Core*-Enzym gebunden, katalysiert er die spezifische Bindung an die DNA und den Transkriptionsstart. An die DNA gebundene und freie RNA-Polymerase stehen in einem Gleichgewicht [38]. Innerhalb einer Zelle liegen im Mittel 4 600 RNA-Polymerasen vor [49]. Jedoch konnte auch für diese Ressource eine Abhängigkeit der Enzymanzahl von der Wachstumsrate gezeigt werden. In der Literatur findet man Werte im Bereich von 1 500 bis 11 400 Molekülen pro Zelle [27], [31]. Aktiv in Transkriptionsprozesse involviert sind lediglich 20 bis 30 % der RNA-Polymerasen [39]. Eine derartige Reserve scheint für die Zelle notwendig zu sein, um schnell genug auf Umweltänderungen reagieren zu können. Vergleicht man dies mit der Verfügbarkeit der Ribosomen, stehen für die Transkription deutlich weniger Ressourcen als für die Translation bereit. Wie bei der Translation variiert auch bei der Transkription die Polymerisationsgeschwindigkeit je nach Sequenz und Wachstumsrate. Die Geschwindigkeit kann jedoch auf eine Rate von 28 bis 89 Nukleotide pro Sekunde eingegrenzt werden [35]. Mit im Mittel 50 Nukleotiden pro Sekunde auf der einen Seite und rund 20 Aminosäuren pro Sekunde auf der anderen Seite, sind die Prozessierungsgeschwindigkeiten ähnlich schnell. Da pro mRNA über die Lebensdauer nicht nur mehrere Proteine hergestellt werden, sondern auch pro Transkript mehrere Gene gleichzeitig translatiert werden, ist es für die Zelle eine sinnvolle Maßnahme an dieser Stelle Einsparungen zu machen. Verglichen zur Ribosomenmenge liegt daher nur einen Bruchteil an RNA-Polymerasen vor.

2.1.2 Abbau und Stabilität von mRNA und Protein

Durch den Abbau von RNA und Protein können die bereits bestehenden und verbauten Aminosäuren und Nukleotide recycliert werden. Herstellung und Degradation stehen in einem empfindlichen Gleichgewicht. Verglichen mit Proteinen haben RNA-Moleküle im Schnitt deutlich geringere Halbwertszeiten. Sie bestehen nicht nur aus größeren Bausteinen, sondern es werden auch drei dieser Moleküle benötigt, um mittels der Translation einen Baustein des Proteins zu bilden. Aus diesem Grund ist es nicht weiter verwunderlich, dass eine Zelle lediglich 3 000 mRNA-Moleküle im Vergleich zu 3 Millionen Proteinen enthält ([50], BNID 100088 und 100064). Da auf mRNA-Ebene oft nur wenige Kopien vorliegen, reichen schon geringe Änderungen, um die Proteinproduktion komplett an- oder abzuschalten. Aus diesem Grund entscheidet gerade bei schwach transkribierten Genen oft die Stabilität der RNA über die Robustheit und das Ausmaß der Expression. Stabile und häufig vorkommende RNA wie die ribosomale RNA wird also nur nachhaltig reguliert, wenn die Änderung in der Translation von längerer Dauer ist. Aber auch diese stabilen rRNAs können in Stresssituationen, wie Nähstoffmangel instabil werden, um die Zelle präventiv vor fehlerhaften Ribosomen zu schützen [45]. Die Proteomzusammensetzung und wie schnell oder langsam ein Prozess abgeschaltet wird, kann deshalb nicht nur über die Anwesenheit von Regulatoren, sondern auch über Stabilitäten der mRNA und der Proteine gesteuert werden.

Auf mRNA-Ebene konnte in *E. coli* eine große Varianz von wenigen Sekunden bis hin zu einer Stunde an Stabilitäten gefunden werden. Jedoch bewegen sich 80 % der mRNAs mit ihrer Halbwertszeit, die auch von der Zusammensetzung der Sequenz abhängen kann, im Bereich zwischen 2.5 und 8 min [51], [52]. Das synthetische RNA-Konstrukt dBroccoli-F29[6] besitzt sogar eine Halbwertszeit von 80 min [53]. Der hohe Durchsatz an RNA trägt neben der Feinabstimmung der Regulation außerdem zu einem Erhalt der Nukleotidpools bei [29]. Der RNA-Abbau in *E. coli* erfolgt aufgrund seiner enormen Geschwindigkeit hauptsächlich aktiv durch Nukleasen. Hier muss zwischen einer Exonukleaseaktivität, welche die RNA vom Strangende her abbaut, und einer Endonukleaseaktivität, die auch Schnitte innerhalb der Sequenz einführt, unterschieden werden. Eine 5'-Exonukleaseaktivität konnte für *E. coli* noch nicht nachgewiesen werden [54], jedoch finden sich unter anderem die RNAseII, die RNAseR oder die PNPase, die 3'-Exonukleaseaktivität zeigen. Das Fehlen der Aktivität der beiden letztgenannten Enzyme kann zu schwerwiegenden Effekten wie der Akkumulation der 16S und der 23S rRNA führen [45].

Der Proteinabbau geht deutlich langsamer vonstatten als der RNA-Abbau. Da Proteine durchaus Halbwertszeiten von 24 h und mehr erreichen können, regulieren sich Proteinlevel oftmals über die Verdünnung durch Zellteilung. Hauptsächlich kritische Regulatorproteine sowie fehlgefaltete, nichtfunktionale oder beschädigte Proteinen werden aktiv abgebaut [55]. Ebenso werden Proteine, die regulär in Komplexen vorliegen, aber nicht verbaut sind, aktiv abgebaut [55]. Hier versucht die Zelle zum einen eine Fehlfunktion auszuschließen, aber auch die im Protein verbauten Vorläufermetabolite wiederzugewinnen. Die am häufigsten katalysierte Reaktion von Proteasen ist das Entfernen von Signalsequenzen, wie Membrantranslokationsignalen [56]. Der initiale Degradierungsschritt wird fast ausschließlich von ATP-abhängigen Proteasen (ClpXP) katalysiert [55]. Wie Proteine für den Abbau ausgewählt werden, ist in Prokaryoten nur marginal verstanden. Für den ClpXP abhängigen Abbau ist bekannt, dass die Arretierung von Ribosomen an beschädigter mRNA oder an Bruchstücken davon zu einer Markierung nicht-vollständig-translatierter Proteine mittels der tmRNA *ssrA*, die als Abbausignal dient, führt [57], [58]. Man geht davon aus, dass die Proteasen selbst Erkennungsmechanismen für zu degradierende Proteine besitzen [55]. Anders als beim Abbau der RNA sind Proteasen sehr spezifisch und schneiden entweder an spezifischen Erkennungssequenzen oder unter definierten Bedingungen. Aus diesem Grund findet sich auch eine beachtliche Zahl an Proteasen in *E. coli*. Trotz einer sehr hohen Anzahl an Proteaseklassen werden die meisten Proteine in einer ungestressten *E. coli* Zelle dennoch nicht aktiv abgebaut, sondern sie verdünnen sich abhängig von der Wachstumsrate [59], [60].

2.1.3 Energiegewinnung und Metabolismus

Alle diese beschrieben Prozesse benötigen Energie. Dieser zelluläre Energieverbrauch lässt sich grob in drei Gruppen gliedern: Den Energiebedarf für den nicht-wachstumsassoziierten Haushalt, den wachstumsassoziierten Energiebedarf zur Generierung von Biomasse (CDW) und ein variabler Anteil für die Produktion nicht unmittelbar notwendiger Produkte. Hierunter fallen Speicherstoffe, oder die Produktherstellung im Fall eines biotechnologischen Prozesses. Der nicht-wachstumsassoziierte Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel (NGAM) ist sehr gering. Er wird in der Literatur für K12-Wildtypstämme mit 8.39 $mmol_{ATP}\ g_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$ [98] angegeben, kann jedoch zum Beispiel für Zellen mit einem hohen Plasmidgehalt deutlich variieren. Auch das Zellvolumen selbst spielt eine entscheidende Rolle bei den Energiekosten, die

[6] Ein künstlich evolviertes RNA-Aptamer, welches in Kombination mit dem Farbstoff DFHBI-1T fluoreszente Eigenschaften aufweist.

die Zelle für ihren Erhaltungsstoffwechsel aufbringen muss [61]. Der wachstumsassoziierte Anteil (GAM) ergibt sich im Wesentlichen aus dem Biomasseausbeutekoeffizienten Y_{XS} und ist ebenfalls abhängig vom Stamm und den Kultivierungsbedingungen. Entstehen der Zelle zusätzliche Kosten durch die Produktion von Molekülen, die für das reguläre ungestresste Wachstum nicht zwingend notwendige sind, kann es schnell zu einem Einbruch im Wachstum kommen [62]. Dies ist insbesondere der Fall, wenn nicht native Mengen eines Moleküls produziert werden oder heterologe Prozesse, die Energie konsumieren, ablaufen. Die Fließgleichgewichtskonzentrationen der Nuleotide in einer Zelle lassen unterschiedlich viel Raum für eine Reaktion der Zellen auf spontane Umweltänderungen. Betrachtet man beispielhaft die intrazelluläre ATP Konzentration bei Wachstum auf dem Zucker Glucose in der exponentiellen Phase, dann beträgt diese im aeroben Fall 10 mM ([42], BNID 104704). Für anaerobes Wachstums liegt lediglich eine Konzentration von 3 mM vor ([42], BNID 101964). Hier besitzt die Zelle einen deutlich geringeren Spielraum, um auf Umweltreize reagieren zu können. Aber auch die Verwendung anderer Kohlenstoffquellen hat einen Einfluss auf die maximale ATP-Ausbeute bei der vollständigen Oxidation eines Moleküls Zucker (1 Molekül Glycerin ergibt maximal 15 Moleküle ATP, 1 Molekül Acetat lediglich 7 Moleküle ATP [63]). Da sich situationsbedingt derart essenzielle Zahlen also signifikant ändern können, ist es unabdingbar, dass beim Vergleich metabolischer Prozesse möglichst wenig Parameter zeitgleich variiert werden.

Generell wird in der Literatur davon ausgegangen, dass alle Flussverteilungen in der Zelle auf maximales Wachstum ausgelegt sind [64]. Überschreitet die Zelle mit ihrem Gesamtenergiebedarf die Durchflussleistung eines Stoffwechselweges, kann die Annahme getroffen werden, dass fermentative Stoffwechselrouten zugeschaltet werden. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen ab einer setupspezifischen kritischen Wachstumsrate, trotz aerober Verhältnisse und ausreichend Substratverfügbarkeit, fermentative Nebenprodukte generieren [2] und somit die Wege verwenden, die weniger Sauerstoff pro Glucose Molekül benötigen. Die Acetyl-CoA-Synthetase stellt hierbei eine potentielle Engstelle in der respiratorischen Energiegewinnung dar [7]. Außerdem konnte in theoretischen und praktischen Untersuchungen gezeigt werden, dass sich die begrenzte Membranoberfläche limitierend auf den Einbau des respiratorischen Proteinkomplexes auswirken kann [65]. Muss die Zelle also aufgrund derartiger Limitationen fermentative Stoffwechselwege zuschalten, treten die Nebenprodukte (Acetat, Formiat, Lactat, etc) des sogenannten *Overflow*-Metabolismus auf. Dieser liefert zwar nicht dieselbe Ausbeute an Energieäquivalenten wie die aerobe Atmung, gibt der Zelle aber die Möglichkeit zusätzliche Energie bereitzustellen bei gleichzeitig besserer ATP-Sauerstoffausbeute [66]. Szenk *et al.* konnten zeigen, dass bei der Acetatfermentation mit 15 Molekülen ATP pro Sekunde und nm^2 (ATP $(s\ nm^2)^{-1}$) sogar mehr Energie pro zellulärer Oberfläche, als bei der aeroben Atmung mit 4 ATP $(s\ nm^2)^{-1}$ bereitgestellt werden kann [65]. Mit zunehmender Wachstumsrate konnte von Basan *et al.* gezeigt werden, dass mit steigender Wachstumsrate ab einem kritischen Wert ein linearer Anstieg in der Acetatproduktionsrate vorliegt. Nicht nur die kritische Wachstumsrate, sondern auch die Steigung dieser Linien kann mit unterschiedlicher Belastung variieren [2]. Werden diese Linien durch eine Variation der Wachstumsraten mittels einer Substratlimitierung generiert, muss berücksichtigt werden, dass zusätzlich zur Substrataufnahme eine eventuell simultane Aufnahme von Sekundärmetaboliten erfolgen kann. Die gemessenen Produktionsraten für fermentative Nebenprodukte können daher unterschätzt werden. Für substratlimitiertes Wachstum konnte gezeigt werden, dass entgegen der Annahme von Katabolitrepression [67] *E. coli* ein durchaus promiskuitives Verhalten gegenüber unterschiedlichen Kohlenstoffquellen aufweist [68]. Bei der Durchführung von Fed-Batch-Prozessen konnten die simultane Verstoffwechselung von Acetat und Glucose während der Kultivierung beobachtet werden [69],

[70], [71]. Bei der Betrachtung der metabolischen Aktivität und der Produktivität von *E. coli* Stämmen ist es also wichtig ein möglichst umfassendes Spektrum der Metabolitflüsse, die über die Bilanzgrenze der Zelle transportiert werden, abzubilden. Nur so kann ein realistischer Eindruck der energetischen Situation, in der sich die Zelle befindet, geschaffen werden.

2.1.4 Stressregulation

Zellen können den verschiedensten Stresssituationen ausgesetzt sein. Die wohl globalste Antwort auf Stress in einer Zelle wird von dem Sigmafaktor RpoS vermittelt [72]. 10 % der Gene in *E. coli* werden direkt oder indirekt durch RpoS reguliert [73]. Eine Deletion dieses Genes zeigt insbesondere Auswirkungen auf den Acetatmetabolismus. Dies äußert sich neben einer erhöhten Substrat- und Sauerstoffaufnahmerate auch in einer Verdopplung der Acetatbildungsrate und damit einhergehend mit einer niedrigeren Biomasseausbeute [74]. Aufgrund des in dieser Arbeit identifizierten *rpoS*-defizienten Genotypes kann dies für die Charakterisierung des Stammes HMS174(DE3) eine entscheidende Rolle spielen.

Neben der Metabolischen Belastung, die durch zellinterne Limitationen verursachten werden kann, können selbst in einem stabilen Kultivierungsprozess einige stressverursachende Parameter nicht ausgeschlossen werden. In einem Satzverfahren kann sowohl eine Akkumulation der Sekundärmetabolite, als auch die Verringerung der Substratverfügbarkeit eine Stressantwort der Zelle auslösen. Wird das Wachstum zusätzlich über eine Substratlimiterung beschränkt, befindet sich die Zelle grundsätzlich im Hungerstress. Da das Alarmon ppGpp nicht nur bei einer Aminosäurelimitation, sondern auch bei einer Limitation einer breiten Bandweite an Nährstoffen gebildet wird [75], ist damit zu rechnen, dass die mit diesem Molekül zusammenhängende Stressantwort in einem Kultivierungsansatz mit Substratzufuhr provoziert wird. Eine Akkumulation des ppGpp führt zu einer Reduktion der Ribosomenproduktion sowie der Replikationsaktivität der Zelle [75]. Außerdem kommt es zu einer erhöhten Aminosäurebildung und einer verstärkten Proteolyse [75]. Genauso kann mit dem Vorhandensein des cAMP-CRP-Komplexes, der bei Glucosemangel auftritt und auf bis zu 275 Promotoren Einfluss nimmt, gerechnet werden [76], [77]. In Anwesenheit dieses Komplexes tritt nicht nur eine Regulation der Schlüsselenzyme der Glycolyse, sondern auch eine Änderung im Zuckertransport auf [76]. Sowohl der cAMP-CRP-Komplex, als auch ppGpp können also signifikante Änderungen in der Zusammensetzung des Proteoms hervorrufen, welche bei der Verwendung unterschiedlicher Kultivierungsstrategien bedacht werden müssen.

2.1.5 Populationsdynamiken

Bei der Analyse von Prozessen, die individuell von Zellen reguliert werden können, ist es wichtig im Blick zu behalten, dass bei den meisten Messverfahren das gemittelte Verhalten der ganzen Population betrachtet wird. Um die Überlagerung von Effekten auszuschließen, gilt es einige Dinge zu beachten. Selektionsdruck führt in der Natur zu Evolution. Aus diesem Grund gibt es eine natürliche Varianz in Zellen. Auch ohne Druck kommen Mutationen vor. In Wildtyp *E. coli* Stämmen finden Mutationen mit einer Häufigkeit 10^{-3} pro Genom und Generation statt [78]. Eine Mutation führt in der Regel nicht zu einer höheren Fitness und wird aus diesem Grund schnell ausgedünnt. In manchen Fällen können sich aber bistabile Systeme ausbilden oder Populationen hin zu einem anderen Optimum bewegen. Besonders heterolog belastete Zellen versuchen Strategien zu entwickeln, um dem Stress zu entkommen. Sogenannte *escape mutants* können

mitunter schon nach wenigen Generationszeiten auftreten. Häufige Mechanismen, die diese Zellen entwickeln, sind *gene silencing*[7] oder auch Plasmidverlust.

2.2 Herstellung von rekombinantem Protein

Da in dieser Arbeit die Metabolische Belastung, welche bei der Herstellung heterologer Protein auftritt, betrachtet werden soll, ist es wichtig einige grundlegende Aspekte der heterologen Expression zu beachten. Zunächst muss die Frage nach dem Wirtsorganismus geklärt werden. Soll das hergestellte Protein ins umgebende Medium segregiert werden, wird häufig auf *Bacillus subtilis* zurückgegriffen. Dieser Organismus kann bereits gefaltete Proteine nach außen transportieren. Sind posttranslationale Veränderungen vorzunehmen, werden eukaryotische Systeme wie CHO-Zellen oder Hefen bevorzugt. Kommen während des Prozesses Lösungsmittel zum Einsatz, empfiehlt sich die Verwendung eines lösemitteltoleranten Stammes, wie *Pseudomonas putida*. Besonders bei komplexen Stammveränderungen oder beim *Metabolic Engineering* wird in der Regel ein *E. coli* Stamm verwendet, da hier vor allem das Wissen um regulatorische Effekte und Stoffwechselwege eine Rolle spielt. Eine weitere Entscheidung, die mit der Auswahl des Stammes korreliert, ist die verwendete ‚*codon-usage*'. Jeder Stamm besitzt einen spezifischen tRNA-Pool, der - je nach Zusammensetzung - die Verwendung bestimmter Codons erleichtert oder erschwert. Auch gibt es stammspezifische Präferenzen hinsichtlich der verwendeten Stopp- und Start-Codons. Außerdem kann das Nährmedium eine entscheidende Rolle spielen. Da viele domestizierte Stämme in Aminosäurestoffwechselwegen Mutationen und somit Auxotrophien besitzen, muss das Medium gegebenenfalls supplementiert werden. Da die Verfügbarkeit der verschiedenen Nährstoffe eine entscheidende Rolle bei der Fremdgenexpression sowie beim Wachstum spielt, sind diese Aspekte abzuwägen und auf die jeweilige Zielsetzung abzustimmen. Eine weitere Entscheidung muss hinsichtlich der Integration der Fremd-DNA in das genetische Setup der Wirtszelle getroffen werden. Soll das Gen als Plasmid eingebracht werden oder ist eine genomische Insertion sinnvoll und wenn ja wo? Hier kann die Nähe zum Replikationsursprung zu einer Wachstumsabhängigkeit der Produktion führen, da wie oben bereits erwähnt die Anzahl der in der Zelle befindlichen Gen-Kopien mit der Wachstumsrate variieren kann. Bei der Etablierung von Stoffwechselwegen wird normalerweise zunächst Plasmid-basiert gearbeitet, da die bis zur Endkonfiguration notwendigen genetischen Modifikationen so schneller und flexibler untersucht werden können.

2.2.1 Plasmide

Inzwischen kann auf ein sehr breites Spektrum an Plasmiden zurückgegriffen werden. Historisch bedingt gibt es eine Vielzahl an Naturisolaten, die von Zellen zwar oft gut aufgenommen werden, aber undefinierte und nicht notwendige Komponenten enthalten. Ein klassisches Beispiel hierfür ist das pET28-System. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich auf standardisierte und synthetische Vektoren zurückgegriffen, die in der sogenannten pSEVA-Bibliothek (*Standard European Vector Architecture)* abgelegt sind. Diese Vektoren sind modular aufgebaut und ermöglichen neben der Auswahl der Antibiotikaresistenz auch die Auswahl des ‚*origin of replication*' (Ori) und damit einhergehend des spezifischen Replikationsgens [79]. Überflüssige Sequenzen wurden in dieser Bibliothek entfernt. Die Assemblierung nutzerspezifischer Plasmide erfolgt über ein definiertes Set an Schnittstellen, die innerhalb codierender Sequenzen nicht vorkommen dürfen. Neben den leeren Vektoren bietet diese Plasmidbank auch eine Vielzahl an interessanten, bereits insertierten Elementen, wie Promotoren, Fluoreszenzproteinen oder anderen Reportergenen. Die codierende

[7] Hierbei verbleibt die belastende Sequenz zwar in der Zelle, die Expression aber wird durch die Mutation stillgelegt.

Region des Plasmides von Interesse wird als Cargo-Site bezeichnet. Zur schnellen Erfassung der Plasmidstruktur dient ein hauptsächlich zahlenbasiertes Nomenklatursystem. Durch die erste Ziffer wird die Art der Resistenz spezifiziert. Die zweite Ziffer gibt Auskunft über den verwendeten Ori, währen die dritte Zahl die in der ‚*multiple cloning site*' befindliche Cargo-Site näher definiert. Der Cargo-Site kann zur genaueren Beschreibung noch ein Symbol oder Buchstabe hinzugefügt werden. Da sich in der vorliegenden Arbeit diese Cargo-Site in der Regel aus einem Promoter, sowie einem *gene of interest* (GOI) zusammensetzt, wurde hier zusätzlich zur pSEVA Nomenklatur ein zweiziffriges System eingeführt. Diese codiert mit jeweils einer Zahl für den entsprechenden Promoter und für das GOI (siehe Kapitel 3.1).

2.2.2 Promotoren

Die erste Ebene, auf der die Expression einer codierenden Sequenz reguliert sein kann, ist die Transkription. Sie wird auf sehr unterschiedliche Art und Weise über Promotoren gesteuert. Neben konstitutiven Promotoren gibt es eine Vielzahl an induzierbaren Promoterregionen. Da es bei industriellen Prozessen oftmals wünschenswert ist, keine Induktoren zu verwenden, werden konstitutive Promotoren häufig bevorzugt. Wird der Induktor über die Zeit verbraucht, kann gerade bei Satzkultivierungen von keiner konstanten Konzentration ausgegangen werden. Dies kann erhebliche Einflüsse auf die Expressionsstärke und Prozesstabilität haben. Häufig werden konstitutive Systeme auch deswegen bevorzugt, weil die Abreicherung der Induktoren während der Produktreinigung und die Induktoren selbst den Gesamtprozess deutlich teurer machen können. Sollen mehrere Gene gleichzeitig exprimiert werden, kann es sinnvoll sein ein niedriges Expressionsniveau anzustreben. Dadurch kann die Belastung für die Zellen reduziert und eine bessere Prozessperformance erhalten werden. Native, konstitutive Promotoren gelten als relativ schwach, verglichen mit synthetischen Konstrukten. Ein entscheidender Nachteil bei konstitutiven Systemen kann die Regulierung sein. Konstitutive Expression wird klassischerweise als das gleichmäßige Ablesen bestimmter Gene verstanden. Hierbei spricht man auch von sogenannten *housekeeping*-Genen, denen eine wichtige Funktion zum Erhalt der Zelle zugesprochen wird und die daher ständig exprimiert werden und unentbehrlich sind. Nicht näher definiert ist hierbei, ob diese dauernde Expression dadurch zustande kommt, dass viele Promotoren auf unterschiedliche Reize reagieren, oder die RNA-Polymerase von einem einzigen Promoter unreguliert rekrutiert wird. Der Begriff konstitutiver Promoter wird im Folgenden für unregulierte Sequenzen verwendet, die aus nur einem Promotor bestehen.

Da eine heterologe Proteinproduktion oft Hand in Hand mit stark reduziertem Wachstum geht, kann es hinsichtlich der Raum-Zeit-Ausbeute hilfreich sein, die Biomassebildung und den Produktionsprozess zu entkoppeln. Hierfür werden induzierbare Promotoren verwendet. Um einen Promotor kontrollierbar zu gestalten, gibt es verschiedene Konzepte. Induzierbare Promotoren werden in der Regel dadurch aktiviert, dass die RNA-Polymerase-Bindestelle freigegeben wird. Dies geschieht meist durch die Bindung eines Aktivator-Moleküls, was in Folge zu einer Sekundärstrukturänderung der DNA führt. Eine weitere Möglichkeit ist die Induktion durch die Entfernung eines Repressormoleküls von der RNA-Polymerase-Bindestelle. Dies kann durch die An- oder Abwesenheit der Regulatorproteine selbst gesteuert werden oder aber auch durch Konformationsänderungen des Regulators mittels Additiven. Das wohl bekannteste Beispiel für eine Induktion durch das Inaktivieren des Repressors ist die Promotorregulierung des *lac*-Operons. Hier bindet nativerweise die Lactose, aber auch die nicht verstoffwechselbare, synthetische Variante Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) an das Repressormolekül und verhindert die Blockierung der RNA-Polymerase-Bindestelle. Eine Replikationsinitiation kann aber auch durch Umweltreize wie zum Beispiel durch einen Temperaturshift katalysiert werden.

Da Zellen in ihrer natürlichen Umgebung schnell auf sich ändernde Bedingungen reagieren müssen, ist eine basale Expression der Gene notwendig und kann bei vielen dieser nativen Systeme beobachtet werden. Durch die Verwendung zellfremder oder synthetischer Systeme wird versucht diese Grundaktivität zu unterbinden. Beispiele hierfür sind das T7-Expressionssytem sowie der synthetische *tac*-Promotor. Da aber auch hier ein geringes Level an Grundexpression festzustellen ist, wurde in dieser Arbeit zur Steuerung der heterologen Ladung hauptsächlich auf das XylS/Pm-Promotorsystem zurückgegriffen. Der Pm-Promotor stammt aus dem Organismus *Pseudomonas putida* und vermittelt dort Wachstum in Anwesenheit von Benzoesäure-Derivaten [80]. Das korrespondierende Protein XylS bildet nach der Bindung eines Benzoesäure-Derivates ein Dimer aus [81]. Dieses bindet unmittelbar vor der -35-Region des Promotors Pm [82]. Dadurch wird die Bindung der RNA-Polymerase an die Promoterregion mittels der α-C-terminal Domäne der RNA-Polymerase [83] und den Sigmafaktor [81] vermittelt. Die Spezifität der RNA-Polymerase wird hierbei vor allem durch die Sigmafaktoren σ_{32} in der exponentiellen Phase und σ_{38} in der stationären Phase [84] bedingt. Die Induktion kann durch ein sehr breites Spektrum an Effektoren erfolgen, wobei die stärkste gemessene Induktion mit m-Toluylsäure (mTA) erreicht werden konnte [85], [86]. Das Regulatorprotein XylS wird nativ von zwei Promotoren exprimiert. Im Expressionsystem XylS/Pm wurde dies auf den schwachen, aber konstitutiven Promotor P2 beschränkt (Abbildung 2.1). Die Bindung der RNA-Polymerase an den P2 Promoter wird über den Sigmafaktor σ_{70} vermittelt [87]. Da es sich um einen relativ schwachen Promotor handelt, ist das Protein XylS mit nur etwa 200 Kopien pro Zelle vertreten und kann somit limitierend bei der Expression heterologer Proteine wirken [81]. Eine Überexpression zur Verstärkung heterologer Expression ist nicht sinnvoll, da ab einem bestimmten Level an XylS das Dimer autokalaytisch gebildet werden kann und somit keine gezielte Induktion mehr möglich ist [81]. Durch die ständige Anwesenheit des Aktivatormoleküles in der Zelle reagiert das System nach der Zugabe des Induktors schnell und es ist eine unmittelbare Expression möglich.

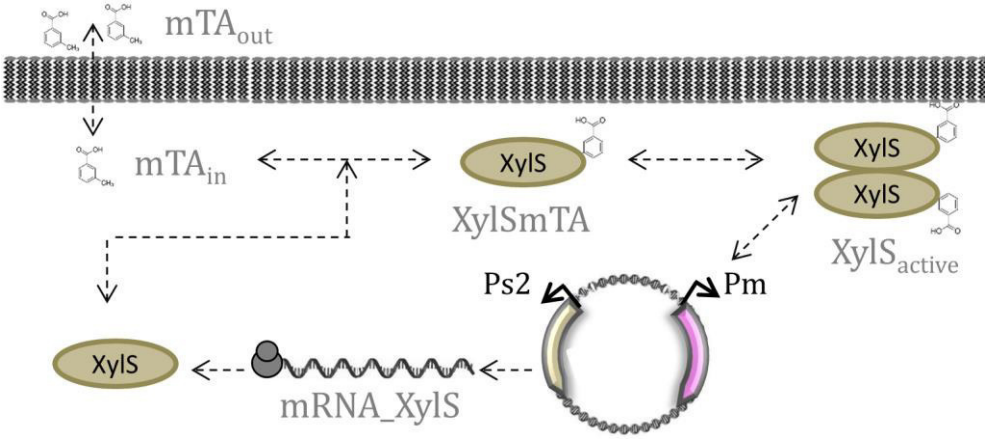


Abbildung 2.1 Induzierbare Expression durch das XylS/Pm-System. Der Pm-Promotor unterliegt einer Kontrolle durch das Regulatorprotein XylS. Dieses wird über den konstitutiven Promotor Ps2 ständig hergestellt. Nach Zugab des Induktors m-Toluylsäure (mTA), bindet dieser an das Molekül XylS und begünstigt die Ausbildung eines Dimers. Nach Anlagerung des Dimers an die Pm-Promotorregion, kann auch dort eine Bindung der RNA-Polymerase erfolgen.

2.2.3 Ribosomenbindestellen

Die Anbindung der Translationsmaschinerie einer Zelle an die codierende mRNA erfolgt an bestimmte Sequenzmuster. Circa 77 % aller beim *Gene National Center for Biotechnology Information* (NCBI) notierten Gene weisen 5-10 Nukleotide *upstream* des Startcodons eine purinreiche Shine-Dalgarno-Sequenz mit der Konsensusbasenfolge 5‘-AGGAGG-3‘ auf [88]. Für 23 % der Gene konnte keine eindeutige Ribosomenbindestelle (RBS) identifiziert werden. Je nach

Zusammensetzung der Shine-Dalgarno-Sequenz konnte für *E. coli* eine unterschiedlich effiziente Bindung der Ribosomen gefunden werden. Die Translationsstärken können hierdurch bis zu dem 3000-fachen variieren [89]. Ausschlaggebend für die Ausbildung des 30S-Initiationskomplexes sind diverse Initiationsfaktoren (IF), die Anwesenheit strukturstabilisierender Proteine sowie Proteine mit Helicasefunktion. Außerdem entscheidet die Affinität der im Ribosom liegenden 16S-rRNA über die Anbindehäufigkeit an die Sequenz der Ribosomenbindestelle [88]. Um sich die sequenzspezifische Bindestärke in synthetischen Konstrukten zunutze zu machen, konnten Salis *et al.* ein biophysikalisches Vorhersagetool entwickeln. Dieses ermöglicht es das statistisch-thermodynamische Gleichgewicht der Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit an die mRNA abzubilden [90]. Das Programm basiert auf einer Abschätzung der Translationsinitiationsrate [90]. Der sogenannte Salis-Calculator (https://salislab.net) ermöglicht es Ribosomenbindestellen mit unterschiedlich starken Bindeaffinitäten zu designen.

2.2.4 Das Durchschnittsprotein

Um den Einfluss der Zusammensetzung eines heterologen Proteins abschätzen zu können, ist es wichtig die Eigenschaften eines durchschnittlichen *E. coli*-Proteins zu kennen. Als das Protein in *E. coli* mit der längsten zusammenhängenden Sequenz gilt das Gen *lhr*, ein potentielles Mitglied der Superhelicase II Familie mit einer Größe von um die 170 kDa [91]. Viele Proteine liegen jedoch in Komplexen vor, die deutlich größer werden können. Klassifiziert man diese Proteinkomplexe, dann finden sich in *E. coli* diese mit einem Anteil von bis zu 35 % mit Abstand am häufigsten in der Proteinklasse, die dem Metabolismus zugeordnet wird [92]. 46 % der gefundenen Proteine setzen sich aus einem Vielfachen von 14 kDa zusammen [93]. Dies legt nahe, dass es sich hierbei um eine evolutionsbedingte konservierte Struktureinheit handelt [93]. Betrachtet man das Durchschnittsprotein in *E. coli,* welches aus 278 Aminosäuren [94] mit einem durchschnittlichen Aminosäuregewicht von circa 100 Da besteht, dann hat dieses ebenfalls ein Gewicht von circa 2 · 14 kDa. Je teurer eine Aminosäure in der Herstellung ist, desto seltener werden ungewöhnliche Codons dafür in der Sequenz verwendet [95]. Betrachtet man die Kosten für ein Durchschnittsprotein, variieren diese abhängig von der Kohlenstoffquelle stark. Kostet ein Aminosäurerest im Median 0.44 mol ATP pro produziertem Molekül für die Kohlenstoffquelle Glycerol sind es bei Acetat schon 5.19 mol [63]. Der Aufbau eines Ribosomes kostet die Zelle im Schnitt sogar 89 700 ATP Moleküle [96]. Die Zusammensetzung der Proteine scheint auch auf die Frequenz der Genexpression Einfluss zu nehmen. Energetisch aufwendige Aminosäuren, wie Trp, Phe, His, Cys, and Leu führen im Schnitt zu einer verminderten Produktion von Proteinen [95]. Proteine mit einer Vielzahl an günstigen Aminosäuren werden prinzipiell häufiger translatiert [95]. Im Durchschnitt können für die Herstellung eines nicht ribosomalen Proteins 1950 Moleküle ATP veranschlagt werden [96]. Bei diesen Statistiken sollte man allerdings nie außer Acht lassen, dass sich unter der Vielzahl an vorhergesagten codogenen DNA-Abschnitten etwa ein Viertel potenzieller Proteine befindet, die nicht über die Datenbank SWISS-Prot den bereits erforschten Proteinen zugeordnet werden können [97]. Auffallend ist, dass es sich hierbei insbesondere um Sequenzen in Peptidlänge (circa 100bp) handelt. Begründet liegt dieses Phänomen wohl hauptsächlich darin, dass die Detektion dieser Proteine bei 2D-PAGE Versuchen oft nicht beachtet wird und diese daher völlig unterrepräsentiert sind [97].

2.2.5 Wechselwirkungen mit der Wirtszelle und die Metabolische Belastung

Mit dem Einbringen einer heterologen Ladung geht oft eine nicht native Reaktion der Wirtszelle einher [1], [5], da die Überexpression heterologer Proteine keine in der Natur vorkommende Situation darstellt. Unter dem Begriff Metabolische Belastung werden verschiedenste Aspekte

zusammengefasst. Um diese voneinander zu trennen und Wechselwirkungen im Versuchsaufbau zu vermeiden, sollte deshalb bei einer systematischen Herangehensweise möglichst nur ein Einflussfaktor variiert werden. Faktoren, die eine Metabolische Belastung hervorrufen, finden sich auf unterschiedlichen Ebenen. Zum einen kann die Belastung durch den Einfluss des heterologen genetischen Konstruktes selbst, die Auswahl des Selektionsmarkers [98], dem Prozess beigemischte Additive [99] sowie durch Interaktionen der heterologen Ladung mit der Wirtszelle ausgelöst werden [100]. Zum anderen kann die Limitierung notwendiger Ressourcen wie die RNA-Polymerase [46], Ribosomen [28], Vorläufermolekülen oder Energie dazu führen, dass Prozesse wie Transkription und Translation nicht mehr im vollen Umfang für alle Vorgänge aufrechterhalten werden können [101]. Da viele heterologe Konstrukte keiner zellulären Regulation mehr unterworfen sind, kann vonseiten der Zelle auf eine Limitation nur eingeschränkt reagiert werden. Da die Expression selbst also nicht reguliert werden kann, werden bei der heterologen Expression Anteile der zellulären Expressionsmaschinerie, die als limitiert gilt, von Zellwachstum und Erhaltung abgezogen. Eine heterologe Ladung geht in der Regel mit einer Umverteilung der zur Verfügung stehenden Ressourcen einher [2]. Überschreitet eine Wirtszelle die ihr zur Verfügung stehende Kapazität, äußert sich dies deshalb zumeist primär in einer Reduktion des Wachstums [102]. Aber auch dies ist stark vom Genoyp der Wirtszelle abhängig [103]. Diese Wachstumsänderung wird in der Literatur oft mit den Kosten der Proteinproduktion gleichgesetzt [104], [127], [102]. Wie weiter oben schon beschrieben kann es eine langfristigere Strategie der Zelle sein sogenannte *Escape*-Mutationen einzuführen, um der Belastung zu entkommen. Dies geschieht in der Regel ungerichtet und ist eher als evolutiver Mechanismus zu betrachten [105], [106]. Werden sehr starke Expressionsysteme verwendet, kann das Fremdprotein sogar bis zu 50 % der Gesamtzellmasse ausmachen [2], [107]. Diese großen Mengen können dazu führen, dass die Zelle sich durch die Anzahl der zusätzlichen Komponenten im Cytoplasma gestört fühlt oder die Faltung der Proteine negativ beeinflusst wird. Es kann zu einer Konkurrenzsituation aufgrund des Platzbedarfes der Komponenten kommen. Dieses sogenannte *molecular crowding* ist ein wichtiger Faktor im Gleichgewicht der Zelle und kann durch zusätzliche Moleküle empfindlich gestört werden [108]–[110]. Die Überproduktion eines Proteins äußert sich häufig auch in der Ablagerung von sogenannten *inclusion bodies*[8] in der Zelle [111]. Die Auswirkungen einer Überexpression können dazu führen, dass die Zelle eine Volumenvergrößerung erfährt [112]. Ein weiterer Aspekt, der eine Metabolische Belastung hervorrufen kann, ist die Verfügbarkeit der ClpXP-Protease. Dieses Protein ist essenziell für das Recycling missgebildeter Poteine und damit auch für das Gleichgewicht der Zelle [113]. Ein derartiges Ungleichgewicht kann sich für die Zelle schnell potenzieren, da die globale RpoS-Stressantwort, die ebenfalls über den CLpXP-Abbau reguliert wird, aktiviert werden kann [106], [114]. Die bereits angesprochene Volumenvergrößerung kann außerdem zu Änderungen in der Konzentration makromolekularer Verbindungen, wie RNA und DNA führen und das Gleichgewicht der zellulären Komponenten beeinträchtigen [106]. Da Limitationen der zellulären Ressourcen auf translationaler und transkriptioneller Ebene auftreten können und diese Maschinerien zu großen Teilen aus Protein bestehen, versuchen Zellen dieser Belastung zu entkommen, indem sie ihr Volumen und die endogene Gesamtproteinmenge erhöhen [104].

Die gegebenenfalls enorme Menge an zusätzlicher DNA, die repliziert werden muss, konkurriert mit der genomischen DNA nicht nur um die Bausteine selbst, sondern greift auch massiv in den Energiestoffwechsel der Zelle ein, da unter Anderem in den verwendeten Basen Energie in Form von Phosphatbindungen gespeichert ist. Basan *et al.* konnten zeigen, dass durch die Anwesenheit

[8] Unlösliche Proteinaggregate

eines nicht notwendigen Proteins die Acetatproduktion zur Rekrutierung zusätzlicher Energie verstärkt stattfindet [2]. Auch konnte beobachtet werden, dass eine Vielzahl metabolischer Komponenten auf bisher unbekanntem Weg ins Medium exkretiert werden [115]. Generell konnte bereits gezeigt werden, dass die unproportionale Verwendung von Metaboliten zu einem Ungleichgewicht im zentralen Stoffwechsel führen kann [4], [116]. Außerdem kann dies auch zu einer Reduktion der Proteine führen, die in den Aufbau der Biomasse involviert sind [98]. Das wohl schlimmste Szenario für eine Zelle ist die Herstellung eines Proteins, das eine Interaktion mit der Zelle zeigt. Diese Interaktion kann entweder direkt geschehen, wie bei der Expression von Porinen oder Proteinen, die sich mit zu hoher Konzentration toxisch auf die Zelle auswirken, oder indirekt, wenn die Proteine in den Metabolismus eingreifen. Da das Einbringen heterologer Stoffwechselwege genau darauf abzielt, kann hier die Zelle aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Stoffflüsse in der exponentiellen Phase befinden sich in der Regel in einem stabilen Fließgleichgewicht. Eine metabolische Perturbation kann dazu führen, dass dieser stabile Zustand soweit ausgelenkt wird, dass die Zelle dieses Gleichgewicht nicht mehr erreichen kann [117]. Um diese Engpässe in einer Zelle zu beheben, kann ein Ansatz sein- ohne die heterologe Expression selbst zu beeinflussen – die Stoffflüsse in einer Zelle zu optimieren [116]. Eine gezielte Supplementierung oder auch Metabolic Engineering können an dieser Stelle eingreifen und die Belastung reduzieren [64], [118]. Flores *et al.* konnten dies durch eine Verbesserung des Pentose-Phosphat-Weges erreichen [119], aber auch eine effizientere Nutzung der Kohlenstoffquelle durch eine Verminderung von Nebenproduktbildung mittels genetischer Modifikationen [120], [121] kann zu einer verbesserten Stammperformance beitragen.

Bonomo und Gill konnten durch die Expression zweier Sequenzen, welche die häufigsten beziehungsweise seltensten Aminosäuren beinhalteten, Vergleiche hinsichtlich des Transkriptoms erstellen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* die Zusammensetzung des heterologen Proteins einen immensen Einfluss auf die globale Expression haben kann [122]. Die *codon usage* selbst konnte als einer der wichtigsten Faktoren in der prokaryotsichen Genexpression identifiziert werden [123], [124]. Insbesondere bei der Verwendung der Codoncluster AGG/AGA, CUA, AUA, CGA und CCC konnte ein Einfluss auf die Qualität und Quantität der Expression beobachtet werden [125], [126]. Um die Zelle bei der Verwendung seltener, aber unvermeidbarer Codons zu unterstützen, konnte durch eine Änderung der tRNA-Verfügbarkeit [125], aber auch durch Mediumssupplementation [127], eine Verbesserung in der Expressionleistung der Zelle erzielt werden. Des Weiteren wird von Frumkin *et al.* postuliert, dass die Aminosäurezusammensetzung der Proteine ebenfalls Auswirkungen auf die zelluläre Fitness haben kann [3]. Schon der Austausch einer einzigen Aminosäure kann eine gravierende Belastung darstellen [128]. Insbesondere hydrophobe Aminosäuren scheinen die Fitness der Zellen zu reduzieren, da sie die Neigung besitzen im Cytoplasma toxische Aggregate zu bilden, wie dies auch bei fehlgefalteten Proteinen der Fall sein kann [3]. In der Natur gibt es keine Adaption hinsichtlich heterologer Proteinexpression und somit auch keine spezifische Stressantwort für heterologen Stress. Ceroni *et al.* konnten durch Transkriptomanalysen zeigen, dass die Zellen mit einer Aktivierung nativer Promotoren, die über den Sigmafaktor σ_{32} in die Hitzeschock-Antwort involviert sind, reagieren [122], [129]. Basierend auf dieser Erkenntnis konnte ein regulatorisches Feedbacksystem erstellt werden, das bei einer stressbedingten Aktivierung zu einer Reduktion der heterologen Expressionsaktivität führt und somit die Zelle vor einer Erschöpfung der Ressourcen bewahrt [129]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Maßnahme, wie auch andere Feedback-Loops, welche die Belastung in einem bewältigbaren Rahmen halten [130], zu einer deutlich höheren Endproduktkonzentration führen [129]. Frumkin *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass ein niedrigeres mRNA-Level mit einer hohen

Translationseffizienz zu einer Reduktion der Kosten der heterologen Produktion und damit zu höheren Endkonzentrationen des Zielproduktes führt [3]. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass diese Konfiguration zu einer Bistabilität[9] in der Expression führen kann. Diese Methode muss daher für die biotechnologische Produktion als kritisch gesehen werden. Einer Erhöhung der Transkription bei einer reduzierten Translationsrate hingegen kann zu einer Reduktion im Rauschen der Expression führen [131], [132]. Innerhalb der Zelle scheint also ein Zielkonflikt zu herrschen zwischen einem kostenkünstigen Design mit wenig mRNA und anderen Anforderungen, wie kontrolliertem Rauschen und kurzen Reaktionszeiten [3]. Als Alternativen zur Kostenreduktion in heterologer Expression wurde bereits eine Expression mittels einer Geschwindigkeitsrampe[10] entlang der mRNA der Ribosomen untersucht. Eine verringerte Translationsinitiationsgeschwindigkeit mit zunehmend schnellerer Translationsrate am 5‘-Ende erwies sich in theoretischen und experimentellen Analysen als energetisch ebenso sinnvoll für die Zelle [3], [133], wie Sekundärstrukturen am Anfang des Leserasters [3].

Die Kosten, welche der Zelle während der heterologen Herstellung entstehen, können jedoch nicht direkt auf die Proteinproduktion allein zurückgeführt werden. Auch die Randbedingungen der Kultivierung spielen eine Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Nährstoffverfügbarkeit entscheidend sein kann. Insbesondere für die Phosphatverfügbarkeit konnte ein deutlicher Einfluss auf die Transkriptionskapazität gezeigt werden [104]. Die Stickstoffverfügbarkeit sowie eine Energielimiterung hingegen bedingen eine verringerte Translationskapazität [104]. Aus diesem Grund spielen nicht nur Änderungen im Stamm oder Medium, sondern auch die Kultivierungstechnik an sich eine Rolle [134].

Nicht nur eine Limitation der verfügbaren Bausteine, sondern auch der Aufbau des heterologen Konstruktes, die hergestellte Menge oder die Kultivierungsbedingungen an sich können also über den Erfolg der Expression entscheiden. Um diese Vielzahl an Effekten globaler zu verstehen, gibt es bereits einige Ansatzpunkte in der Literatur. Der Einsatz zellfreier Systeme beispielsweise, bietet die Möglichkeit den Einfluss gezielter und quantitativer Änderungen in der Expressionsmaschinerie zu untersuchen, ohne durch Wechselwirkungen mit komplexen, regulatorischen Nebeneffekten beeinflusst zu werden [135]. Auch die Verwendung eines Kapazitätsmonitors wurde zur Untersuchung der Metabolischen Belastung bereits verwendet, um die Gesamtheit aller Auswirkungen gesammelt erfassen zu können [136].

2.3 Zelluläre Dynamiken

Metabolische Belastungen können auch zelluläre Dynamiken beeinflussen. Jedoch gestaltet sich die Bewertung intrazellulärer Dynamiken oft als schwierig, da - aufgrund der Geschwindigkeit, mit der diese ablaufen - Messungen oft nur verfälscht oder zu langsam durchgeführt werden können. Bei biologischen Systemen mit mindestens einer stabilen Ruhelage stellt sich je nach Geschwindigkeit mit der die einzelnen Komponenten gebildet, abgebaut oder konsumiert werden, ein Gleichgewicht ein. Dieses Gleichgewicht bedeutet, dass sich für die im System befindlichen Komponenten jeweils eine Konzentration in einem Fließgleichgewichtszustand einpendelt.

[9] In diesem Kontext bedeutet Bistabilität, dass die Zelle je nach Regulationsmechanismus zwischen zwei Expressionszuständen wechseln kann. Als Grund hierfür kann genannt werden, dass die Translation bei wenig mRNA-Molekülen im Mittel ein stärkeres Rauschen verursacht als wenn viele mRNA-Moleküle vorliegen. Von diesem Effekt sind insbesondere positive Feedback-Regulierungen stark betroffen.

[10] Je nach Verfügbarkeiit der beladenen tRNAs können Aminosäuren unterschiedlich schnell eingebaut werden. Greift man in diese Verfügbarkeit ein, dann kann die Geschwindigkeit der Ribosomen entlang der mRNA beeinflusst werden.

Betrachtet man unterschiedliche Ebenen in einer Zelle, stellen sich Gleichgewichtszustände verschieden schnell ein [137].

Liegt der Satz an katalysierenden Enzymen eines Stoffwechselweges bereits in der Zelle vor, stellen sich die zugehörigen Metabolit-Gleichgewichtskonzentrationen nahezu sofort ein. Das Gleichgewicht für Protein und mRNA Konzentrationen wird deutlich langsamer erreicht. Da davon ausgegangen werden kann, dass in einer Wildtypzelle das Wachstum als zu maximierende Zielfunktion gilt [138], spiegelt die Wachstumsrate das innere Gleichgewicht der Zelle wider und wird ständig nachjustiert. Befinden sich die essenziellen Komponenten der Kultur in einem Fließgleichgewicht, dann wird näherungsweise davon ausgegangen, dass die Wachstumsrate konstant bleibt. Dieser Zustand ist in der exponentiellen Phase anzutreffen. Die Zelle realisiert die maximal erreichbare Wachstumsrate gemessen an den Randbedingungen [139]. Stehen intrazelluläre Metabolite im Gleichgewicht, dann kann man von einer konstanten Wachstumsrate ausgehen. Dieses Prinzip macht sich die *flux balance analysis*[11] (FBA) zu nutzen. Mittels dieser Methode ist es möglich die intrazellulären Flüsse durch das Messen der einfacher zugänglichen, extrazellulären Metabolitänderungen vorhersagbar zu machen [140]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sollen unter anderem die Grundlage dafür bereitstellen, dass in einem weiterführenden Schritt Flussverteilungen ermittelt werden können. Befinden sich diese intrazellulären Stoffflüsse im Gleichgewicht, spiegelt sich dies in einer stabilen Wachstumsrate wider. Jedoch konnte von Brunschede *et al.* gezeigt werden, dass in Satzkultivierungen nicht unbedingt von einem Gleichgewicht in der zellulären Zusammensetzung ausgegangen werden kann, da es nach einer Änderung in der Nährstoffverfügbarkeit circa 3 h dauert, um ein Gleichgewicht in der Zellzusammensetzung hinsichtlich RNA, Protein und DNA zu erreichen [141].

Betrachtet man die Transkription lässt sich dieser Prozess in Initiation, Elongation und Termination unterteilen, denen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Die Bildung des Initiationskomplexes ist hauptsächlich eine Sache von Wahrscheinlichkeiten des Aufeinandertreffens der an der Bindung beteiligten Aktivatormoleküle, der RNA-Polymerase und eines freien Promotorlocus. Da Prozesse mit geringen Molekülanzahlen mit einem stochastischen Ansatz korrekter beschrieben werden können als mit einer determinitstischen Herangehensweise [142], sollte für eine realistische Beschreibung von derart stochastischen Prozessen die Mastergleichung[12] Verwendung finden. Anstelle dieser wird hier jedoch oft auf einen deterministischen Ansatz und das Massewirkungsgesetz[13] zurückgegriffen. Man geht also näherungsweise von einem Gleichgewicht aus. Hier können über die Stöchiometrien Raten angeben werden. Wie von Kremling [143] gezeigt werden konnte, können die intrazellulären Polymerisationsreaktionen auf diese Weise abgeschätzt werden. Die in Abbildung 2.2 beispielhaft diesem Lehrbuch nachempfundene mRNA-Bildung zeigt, dass die Transkription in unterschiedliche Teilreaktionen aufgetrennt werden muss.

[11] Diese Flussanalyse fasst metabolische Reaktionen in einer stöchiometrischen Matrix S zusammen. Diese Matrix S multipliziert mit einem Ratenvektor ν, der die Raten für alle in der Matrix S befindlichen Reaktionen beinhaltet, ergibt im Gleichgewicht null. Je mehr Raten bestimmt werden, desto genauer kann der Lösungsraum auf die wahrscheinlichste Flussverteilung eingegrenzt werden.

[12] Die Mastergleichung versucht Prozesse stochastisch auf der Ebene einzelner Moleküle zu beschreiben. Sie betrachtet also im Gegensatz zu deterministischen Ansätzen die Wahrscheinlichkeiten mit der sich die Konzentrationen in einem System entwickeln.

[13] Das Massewirkungsgesetz beschreibt einen Gleichgewichtszustand, der sich abhängig von thermodynamischen Bedingungen einstellt. Hierbei können über Differenzialgleichungen explizite Raten für die entsprechende Reaktion angegeben werden.

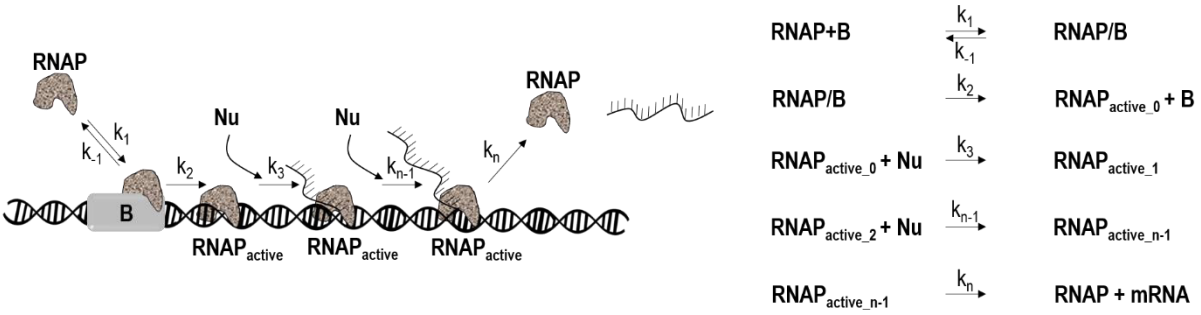


Abbildung 2.2 Die sich aus den Reaktionen k_1 bis k_n zusammensetzende Transkription (links) kann über die rechts dargestellten Gleichungen beschrieben werden. Die reversible Anbindung (k_1 bzw k_{-1}) der RNA-Polymerase (RNAP) an die Promotorbindestelle B mit einer anschließenden Promotorfreigabe (k_2) katalysiert eine mehrstufige Polymerisationsreaktion (k_3 bis k_{n-1}), die am Ende den Katalysator RNAP und die fertige mRNA freigibt (k_n).

Unter der Annahme, dass die Nukleotid-Bausteine der Polymerisationsreaktion nicht limitierend sind, ist der limitierende Schritt dieser Reaktion also die Anbindung und Verfügbarkeit der freien RNA-Polymerase. Geht man davon aus, dass es deutlich mehr RNA-Polymerasemoleküle RNAP als Bindestellen B gibt (RNAP>>B) und sich damit im Laufe der Reaktion die initiale Verfügbarkeit der RNA-Polymerasen $RNAP_0$ quasi nicht ändert ($RNAP_0 \sim RNAP$), entspricht die Bildungsrate der RNA der Frequenz, mit der die Polymerase an den Promotor bindet [143]. Die Affinität K_1 (Gleichung 2.1) der RNAP an die Bindestelle B ergibt sich aus den Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1}.

$$K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1} \tag{2.1}$$

Unter der Annahme, dass die RNAP mit einem sehr großen Überschuss vorliegt und die Polymerisationsreaktion deutlich langsamer als die Bindungsreaktion abläuft, gilt für die Änderung des RNAP/B Komplex über die Zeit folgende Gleichung 2.2-A. Am Gleichgwicht kann die RNAP/B-Menge mittels Gleichung 2.2-B bestimmt werden.

$$\dot{RNAP/B} = RNAP \cdot B \cdot k_1 - RNAP/B \cdot k_{-1} \tag{2.2-A}$$

$$RNAP/B = \frac{RNAP \cdot B}{K_1} \tag{2.2-B}$$

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass daher die Polymerisationsreaktion an sich vernachlässigt werden kann [143] und sich die Reaktionen k_2 bis k_n in einem Fließgleichgewicht befinden. Die Translationsrate lässt sich also wie folgt formulieren (Gleichung 2.3):

$$\dot{mRNA} = k_n \cdot RNAP_{active_n - 1} = k_n \cdot RNAP/B = k_n \cdot \frac{RNAP \cdot B}{K_1} \tag{2.3}$$

Da während der Transkription die Anzahl der freien Bindestellen B variiert, kann diese hier durch die insgesamt verfügbaren Bindestellen B_0 (Gleichung 2.4-A bis B) ausgedrückt werden.

$$B_0 = B + RNAP/B = B + \frac{RNAP \cdot B}{K_1} \tag{2.4-A}$$

$$B = \frac{RNAP}{K_1 + RNAP} \cdot B_0 \tag{2.4-B}$$

Hinsichtlich der mRNA-Bildungsrate (Gleichung 2.5) bedeutet dies, dass die Transkription einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt.

$$\dot{mRNA} = k_n \cdot \frac{RNAP}{K_1 + RNAP} \cdot B_0 \qquad 2.5$$

Die Bildungsrate entspricht, unter den getroffenen Annahmen, der Anbindefrequenz an den Promotor. Die RNA-Bildung hängt damit nicht mehr von der Länge des Transkriptes und der Geschwindigkeit der RNA-Polymerase ab, sondern von der Promotorfreigabe k_2 der gebunden RNA-Polymerase und der Affinität K_1 [143]. Da die RNA-Polymerase am Ende des Transkripts von der DNA abfällt und wieder unverändert zur Verfügung steht, wird der Terminationsprozess - nicht separat beschrieben. Im Fall heterolog belasteter Zellen kann die Anzahl der bereitstehenden RNAP Moleküle stark sinken. Dies kann entweder nach Gleichung 2.5 einen erheblichen Einfluss auf die mRNA-Bildungsraten haben, oder die hier getroffenen Annahmen ungültig machen. Der Prozess der Translation kann mathematisch analog beschrieben werden.

Anders als bei Eukaryoten, beginnt der Prozess der Translation in Prokaryoten noch bevor die Transkription abgeschlossen ist. Die Proteinsynthese wird durch die Bindung der 30S ribosomalen Untereinheit an die Ribosomenbindestelle der mRNA initiiert [144] und durch die Start-tRNA, welche ein N-formuliertes Methionin trägt, vermittelt. Dies wird durch die Initiationsfaktoren $IF_{1\text{-}3}$ unterstützt [145]. Nach der Rekrutierung der 50S ribosomalen Untereinheit und des Elongationsfaktors startet die eigentliche Elongation des Proteins [146]. Erreicht das Ribosom ein Stopp-Codon erfolgt die Freisetzung des Proteins. Folgt kein Terminator, kann eine Reinitiation des bereits gebundenen Ribosoms am nächsten Startcodon stattfinden [147]. Hierfür ist eine neue Ribosomenbindestelle nicht unbedingt erforderlich und kann von der Zelle als regulatorisches Element verwendet werden, da die Translation des zweiten Genes die des ersten Genes erfordert ([148], *translational coupling*). Das Stopp-Codon UAA konnte für stark exprimierte Gene als favorisiertes Stopp-Codon identifiziert werden [149]. Erreicht das Ribosom einen Terminator oder binden die Releasefaktoren [150] lösen sich die Untereinheiten von der RNA-Matrize. Um Expressionsdynamiken in einer lebenden Zelle erfassen zu können, bietet sich oftmals die Verwendung von Fluoreszenzreporten an.

2.4 Fluoreszenzen

Die Möglichkeit Fluoreszenzsingale non-invasiv in lebenden Zellsystemen zu beobachten, bietet die Chance komplexe Dynamiken *on-line* zu verfolgen und ist daher eine weit verbreitete Methode in der Zellbiologie. Als Fluoreszenz wird ein physikalisches Phänomen bezeichnet, bei dem durch die Anregung mit Licht der Wellenlänge λ_1 ein Elektron eines Moleküls auf eine höhere Schale gehoben wird. Beim Zurückfallen kann die auf diese Art gespeicherte Energie als Licht der Wellenlänge $\lambda_2 > \lambda_1$ detektiert werden. Um einem Elektron diese Fähigkeit zu verleihen ist eine bestimmte Umgebung notwendig. Diese besteht in der Regel aus einem planaren Chromophor, welches konjugierte Doppelbindungen mit überlappenden Orbitalen (π-System) aufweist [151]. Idealerweise ist es ein kleines, hydrophiles Molekül, welches neben einer langen Emissionswellenlänge einen hohen Extinktionskoeffizienten, eine große Stokes-Verschiebung[14] und eine hohen Quantenwirkungsgrad[15] besitzt [151].

[14] Der bei der Fluoreszenz auftretende Energieverlust, welcher sich in einer Vergößerung der Wellenlänge des emittierten Lichtes im Vergleich zum absorbierten Licht äußert, wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet.

[15] Der Quantenwirkungsgrad beschreibt, wie viele der absorbierten Lichtquanten wieder emittiert werden.

Die Fluoreszenz biochemischer Moleküle beruht oft auf kurzen Aminosäuresequenzabfolgen innerhalb makromolekularer Strukturen. Das wohl bekannteste Beispiel ist das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Hier konnte vom Heim *et al.* die Aminosäuretriade Ser-Tyr-Gly an den Positionen 65-67 als fluoreszenzvermittelnde Einheit identifiziert werden [152]. Die zur Ausbildung des π-System[16] notwendige Zyklisierung innerhalb des Fluorophores findet unter Verwendung molekularen Sauerstoffes statt [152]. Die Reifezeit des Proteins hängt also auch stark von der Sauerstoffverfügbarkeit ab und kann während Kultivierungen, die eine Sauerstofflimitierung aufweisen, signifikant von gut begasten Systemen abweichen. Da die Maturierung des Proteins unabhängig vom Expressionssystem ist, wird davon ausgegangen, dass es sich um eine autokatalytische Oxidation handelt [152]. Um das Absorptions- und Emissionsspektrum zu beeinflussen, wurden verschiedenste, chemische Modifikationen des Fluorophors durchgeführt [153]. Die Entdeckung weiterer natürlicher Fluoreszenzproteine, sowie die Verbesserung der Photostabilität oder der Falteigenschaften, resultierte in einer Vielzahl an Fluoreszenzproteinen. Diese stehen in großer Zahl mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften und Dynamiken für die Expression in *E. coli* zur Auswahl. Das ursprüngliche GFP mit einer Halbwertszeit von mehr als einem Tag [154] benötigt zur Reifung bis zu einer Stunde [155]. Das als Monomer vorliegende, photostabile mCherry-Protein [156], welches im Vergleich mit GFP nur mit circa 50 % an Helligkeit leuchtet (http://www.fpvis.org/FP.html), zählt zu den *fast-folder*-Proteinen und weist Reifungszeiten von nur 15 min auf [157].

Doch nicht nur Proteine, sondern auch andere Moleküle können im zellulären Kontext Signale erzeugen. Warner *et al.* konnten durch die Bindung des halogenhaltigen Chromophors DFHBI an ein RNA-Aptamer die optischen Eigenschaften dieses Moleküles so verschieben, dass in etwa die Absorptions- und Emissionssppektren von GFP erreicht werden konnten [158]. Eine Weiterentwicklung dieses Komplexes [159], [160] zum F30-2xdBroccoli mit dem fluoreszenzvermittelnden Molekül DFHBI-1T ermöglichte nicht nur ein starkes Fluoreszenzsignal, sondern auch eine effiziente Expression des Aptamers in Zellen. Desweiteren konnten für mRNA-Sequenzen mit diesem Apatmer Halbwertszeiten von 80 min gezeigt werden [53], was mit dem Vorkommen ultrastabiler Tetraloops der UNCG-Familie[17] in der Aptamersequenz zusammenhängen kann [161], [162]. Es konnte gezeigt werden, dass diese mRNA vermittelte Fluoreszenz mit einer Fluoreszenzproteinexpression kombiniert werden kann [163]. Jedoch kann es bei der Verwendung von Fluoreszenzreportern generell zu Wechselwirkungen zwischen Signalen kommen. Bei der Analyse intrazellulärer Fluoreszenzen ist zu beachten, dass insbesondere im Bereich grüner Fluoreszenz auch andere Moleküle in die Signalemission involviert sein können. Ein großer Effekt ist hier den Flavinen (FAD, FMN, und Riboflavin) zuzuschreiben [164]. Trotz dieser Fehleranfälligkeit werden Fluoreszenzmessungen insbesondere bei der Beschreibung von intrazellulären Prozessen häufig herangezogen.

2.5 Funktionsprinzip der FlowSeq-Methode

Eine Herangehensweise, um Expressionsprozesse mittels Fluoreszenzen zu kategorisieren, ist die FlowSeq-Methode. Hierbei werden durch die Verwendung eines Cellsorters, die Zellen basierend auf ihrer Fluoreszenz in verschiedene Fraktionen sortiert. Kosuri *et al.* konnten dieses Prinzip dazu nutzen, effiziente Promotor-Ribosomenbindestellen-Kombinationen aus einer Bibliothek an Expressionskonstrukten herauszufiltern [165] (Abbildung 2.3).

[16] System konjugierter Doppelbindungen
[17] Spezifische und sehr stabile Basensequenzabfolge in einem RNA-Loop

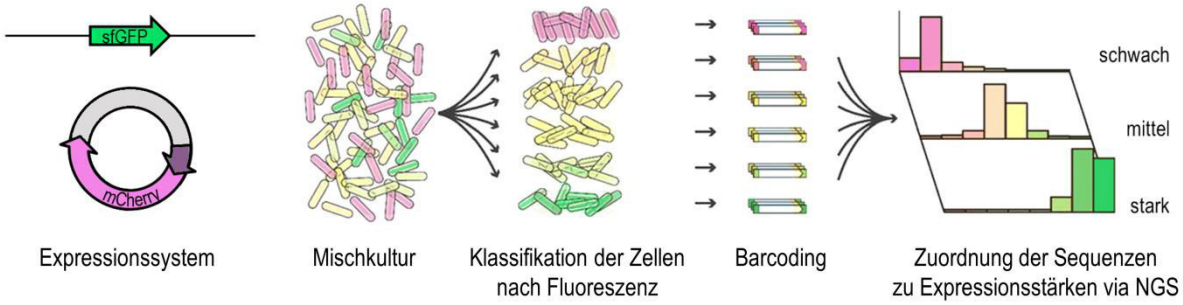


Abbildung 2.3 Um die Konstrukte in einer Bibliothek einer Expressionsstärke zuzuordnen, werden Mischkulturen mittels eines Durchflusszytometers mit Sortierfunktion in verschiedene Fluoreszenzklassen sortiert. Die genetischen Konstrukte im jeweiligen Pool erhalten mittels Polymerasekettenreaktion einen Pool-spezifischen Barcode. Über den Barcode werden die via quantitativem Next Generation Sequencing (NGS) ermittelten Sequenzen einer Expressionsstärke zugeordnet. Abbildung nach Kosuri et al. *[167]*

Nach der Extraktion der Gesamtplasmid-DNA der einzelnen sortierten Zellgruppen, werden Pool-spezifische Barcodes mittels einer Polymerasekettenreaktion angebracht. Um Rückschlüsse auf die RNA-Bildungsrate ziehen zu können, kann außerdem ein Anteil der Mischkultur via RNASeq untersucht werden. Aus jeder Fluoreszenzklasse werden die jeweiligen Plasmidgemische mit einer RT-PCR amplifiziert und über das KAPA Library Quantification Kit (Roche) das Vorkommen der Sequenzen pro Fluoreszenzklasse quantifiziert. Die Zuordnung der Sequenzenverteilungen in den jeweiligen Fluoreszenzklassen erlaubt eine Beurteilung der Expressionsstärke. Sind die Konstrukte der Bibiothek charakterisiert, dann können Rückschlüsse auf die Qualität der Konstrukte gezogen werden. In einem weiteren Schritt ist es nicht nur möglich die Regulatorstellen, sondern auch die Sequenz selbst zu beurteilen. Basierend auf diesen Informationen kann ein rationales Design zur Produktion eines heterologen Proteins durchgeführt werden.

2.6 Prozessstrategien

Ist der richtige Stamm gefunden, dann ist nicht zuletzt die Prozessführung ein wichtiger Aspekt bei der industriellen Produktion biotechnologischer Produkte. Hier muss zunächst entschieden werden, ob die Produktion in einem Satzverfahren, in einem Satz-Zulaufverfahren oder kontinuierlich gestaltet werden soll. In der *Upstream*-Entwicklung wird häufig aufgrund der besseren Parallelisierbarkeit von Versuchen im einfachen Satzprozess gearbeitet. Aus diesem Grund erleichtert die Verwendung von Satzprozessen die Skalierung in den industriellen Maßstab. Im Satzverfahren können jedoch Probleme wie Substrat- oder Produktüberschussinhibierung schnell limitierend sein und der Prozess ist zumindest durch die Substratverfügbarkeit determiniert. Ein kontinuierlicher Prozess, der sich im Fließgleichgewicht befindet, kann hingegen unter konstanten Bedingungen und Konzentrationen - ohne die für die Industrie so teuren Stillstandzeiten - gefahren werden. Allerdings entsteht hierbei ein enormer Durchfluss an Medium, welches oft hochpreisige Komponenten enthält. Außerdem können schon geringe Schwankungen in der Wachstumsrate zu Prozessinstabilitäten führen, wie zum Beispiel zur Auswaschung des Stammes. Als Kompromiss wird oftmals auf sogenannte Zulaufverfahren zurückgegriffen. Hierbei werden limitierende oder inhibierende Komponenten nach Bedarf zugegeben. Aber auch dies bringt Nachteile mit sich. So unterliegt der Prozess einer ständigen Volumenänderung, was zu deutlich komplexeren Konzentrationsberechnungen führt. Generell bringt jede Strategie Vor- und Nachteile mit sich. Daher muss individuell entschieden werden, welche Prozessführung der jeweiligen Fragestellung oder den Produktanforderungen gerecht

wird. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Analyse einer Vielzahl an Stammkonstrukten liegt, musste der technische Aufwand reduziert werden. Es bot sich deswegen an, die Prozesse nicht im kontinuierlichen Betrieb zu untersuchen, da dies langwierige Vor- und Nachbereitungen mit sich bringt und außerdem fehleranfälliger ist. Obwohl die kontinuierliche Prozessführung aufgrund der im System vorherrschenden Gleichgewichtszustände mit Sicherheit für mathematische oder modelentwickelnde Fragestellungen am besten geeignet ist, wurde ausschließlich auf Satz und Zulaufverfahren zurückgegriffen. Im Folgenden wurden vor allem die mathematischen Grundlagen dieser zusammengefasst.

2.6.1 Satzprozess

Bei Kultivierungen im Satzprozess wird eine definierte Menge an Substrat vorgelegt und so lange kultiviert, bis eine Komponente limitierend oder inhibierend wirkt. Die Generierung von Biomasse ist bei diesem Verfahren beschränkt auf das maximal bereitstellbare Substrat: Für *E. coli* Stämme konnte bereits ab 89 mM Glucose eine inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum festgestellt werden [166]. Da das Satzverfahren dem Wachstumsverhalten in einem natürlichen Habitat am nächsten kommt, reagieren die Zellen auf die sich stetig ändernde Zusammensetzung der Umwelt. Einfluss nehmen können neben der Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Glucose und Aminosäuren, auch die Gelöstsauerstoffkonzentration und Metabolite. Diese können zum Beispiel zu einer Änderung des pH-Wertes führen und somit zu einer suboptimalen Mediumsumgebung und reduziertem Wachstum [167]. Bereits ab 8 mM kann das fermentative Nebenprodukt Acetat die Wachstumsrate um bis zu 50 % verringern [168]. Diese Faktoren, aber auch andere Reize wie Zell-Zell-Kommunikation, sogenanntes *quorum sensing* [169], können zu einer Änderung der Wachstumsrate führen. Nach Monod lässt sich der typische OD-Verlauf einer Satzkultivierung in sechs Phasen gliedern [170].

Wie in Abbildung 2.4 zu sehen ist beginnen Zellen in der Regel mit einer lag-Phase (I). Während dieser Phase findet eine Adaptation ans Medium und die neuen Wachstumsbedingungen statt. Sehr niedrige Zellanfangskonzentrationen und große Veränderungen in den Kultivierungsbedingungen können zu einer ausgeprägten lag-Phase führen. Hier geht man davon aus, dass das Fehlen oder eine zu starke Verdünnung der zelleigenen Autoinduktoren zu einer inaktiven Zellform führen kann [171]. Bei einem biotechnologischen Prozess wird versucht diese Phase durch entsprechende Vorkulturen möglichst kurz zu halten. Insbesondere bei der Verwendung von Minimalmedien kann es sinnvoll sein die Adaptation an die reduzierte Nährstoffverfügbarkeit schon in der Vorkultur durchzuführen. Nach einer kurzen Übergangsphase (II), in der immer mehr Zellen mit dem Wachstum starten, befindet sich die gesamte Kultur im exponentiellen Wachstum (III). Hier befinden sich die Stoffflüsse innerhalb der Zellen im Gleichgewicht und die Kultur wächst mit der ihr möglichen maximalen Wachstumsrate. Produktionsprozesse werden oft in dieser Phase durchgeführt. Erst wenn essenzielle Nährstoffe zur Neige gehen oder inhibitorische Effekte einsetzen, durchlaufen die Zellen eine zweite Übergangsphase (IV) bevor sie in die stationäre Phase (V) übergehen.

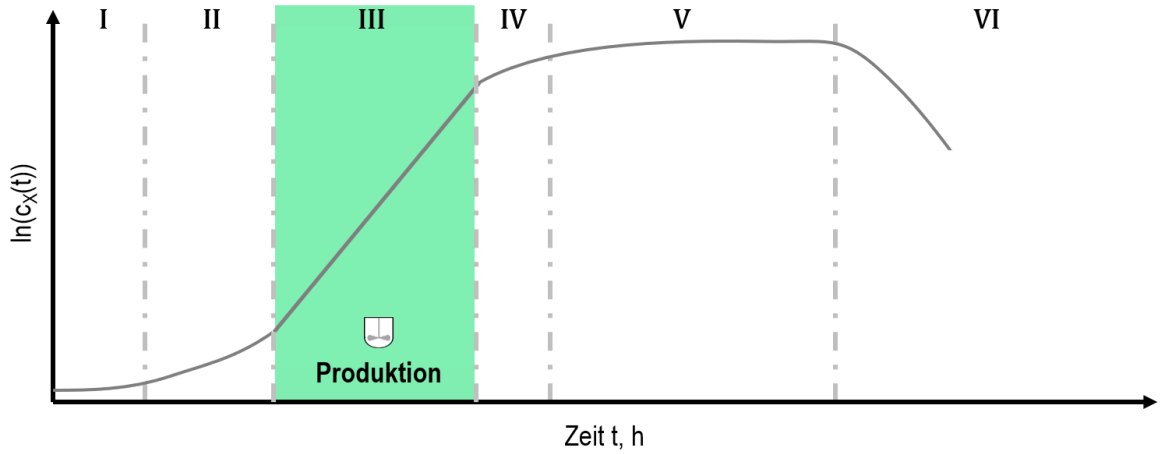


Abbildung 2.4 In einem Satzprozess durchlaufen Zellkulturen typischerweise sechs Wachstumsphasen. Nach einer unterschiedlich langen lag-Phase (I) startet die Kultur in der Übergangsphase (II) mit ihrem Wachstum. Diese geht in eine exponentielle Phase (III) über. Ist eine Limitation erreicht oder wird das Wachstum durch beispielsweise Sekundärmetabolite inhibiert, gerät die Zelle nach einer erneuten Übergangsphase (IV) in die stationäre Phase (V). Sind keine Nährstoffe mehr vorhanden und verbessern sich die Bedingungen für die Zelle nicht, kann die Kultur in eine Absterbephase (VI) übergehen.

Eine Kultivierung im Satzverfahren wird in der Regel spätestens in Phase IV abgebrochen, da die Nährstofflimitation in der Zelle dazu führen kann, dass Zielprodukte wieder verstoffwechselt werden. Diese Wachstumsstagnation kann - wie oben erwähnt - durch eine Limitation in der Substratverfügbarkeit, aber auch durch die Bildung von Sekundärmetaboliten oder Botenstoffen [172], welche im Satzprozess über die Zeit akkumulieren, hervorgerufen werden. Können die Zellen ihren Erhaltungsstoffwechsel nicht mehr aufrechterhalten oder erreichen Nebenprodukte eine toxische Konzentration, dann tritt die Kultur in die sogenannte Absterbephase (VI) ein. Da das Durchlaufen dieser Phasen eine große Varianz in den zellinternen Dynamiken bedingt, werden Produktions- und Wachstumsraten in der Regel während der exponentiellen Phase (III) betrachtet. Ist die Kultur fähig mit einer maximalen Wachstumsrate Biomasse zu generieren, kann davon ausgegangen werden, dass alle Flüsse im Fließgleichgewicht stehen und der negative Einfluss der oben aufgelisteten Parameter vernachlässigbar ist. Bei der formalkinetischen Betrachtung von Raten im biologischen System wird die Änderung der Konzentration über die Zeit analysiert. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Zelle als Kompartiment im System gewertet werden kann. Somit können berechnete Werte als Mittelwert über die gesamte Kultur angenommen werden. Betrachtet man die Konzentrationen der enthaltenen Substrate oder der gebildeten Produkte, dann ändern sich diese proportional zur Biomasse. Der zeitliche Verlauf der Biomasse $V_R \cdot c_X$ kann, wie in Gleichung 2.6-A dargestellt, durch die Zunahme der Biomasse mit der spezifischen Wachstumsrate μ über die Zeit t beschrieben werden. Durch die Integration dieses Zusammenhanges kann bei einer initialen Biomassekonzentration von c_{X0} die exponentielle Veränderung der Biomassekonzentration c_X zum Zeitpunkt t bestimmt werden (Gleichung 2.6-B).

$$\frac{d(V_R \cdot c_X)}{dt} = c_x \cdot \mu \cdot V_R \qquad \text{2.6-A}$$

$$c_x(t) = c_{X0} \cdot e^{\mu \cdot t}; \qquad \mu\text{=konstant} \qquad \text{2.6-B}$$

2.6.2 Zulaufverfahren

In einem semi-kontinuierlichen Betrieb, wie der Kultivierung im Zulaufverfahren, wird das bestehende Reaktorvolumen V_R um einen kontinuierlichen Zufluss q_{in} mit der Substratkonzentration c_{S0} im Feed erweitert. Die aktuelle Substratkonzentration c_S im Reaktionsgefäß kann mit einer Massenbilanz, die neben dem zuströmenden Substrat $\dot{V}_{in} \cdot c_{s0}$ und der Verstoffwechselung dieses Substrates $c_x \cdot q_s \cdot V_R$ [173] aufgestellt werden kann, über die Gleichung 2.7 beschrieben werden. (Für die in dieser Arbeit verwendeten Substrataufnahmeraten $q_S$wurde die Einheit $mg_{Substrat}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$ verwendet)

$$\frac{d(V_R \cdot c_s)}{dt} = q_{in} \cdot c_{s0} - c_x \cdot q_s \cdot V_R \qquad 2.7$$

Um für eine definierte Substratzugabe einen zeitabhängigen Volumenstrom zu erhalten, werden in der Literatur einige Vereinfachungen getroffen. Unter der Annahme, dass das zu dosierende Substrat sofort verbraucht wird, kann erwartet werden, dass $c_S \ll c_{S0}$ [174]. Darüber hinaus ist der Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel laut Literatur mit 8.39 $mmol_{ATP}\ g_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$ [175] sehr gering und kann daher in dieser Berechnung vernachlässigt werden [174]. Durch die Limitierung eines Substrates kann die Flussrate $q_{in}(t)$ für eine spezifische Wachstumsraten μ_{set} zeitabhängig berechnet werden, basierend auf den Parametern Biomasse-Ausbeute Y_{XS} und der initialen Biomasse c_{X0}. Unter Vernachlässigung der Volumenänderung im Bioreaktor konnte dieser Ansatz zu Gleichung 2.8 vereinfacht werden, da das über den gesamten Prozess dosierte Volumen in derselben Größenordnung anzusiedeln ist, wie das entnommene Probenvolumen über die Zeit. Die Herleitung kann dem Anhang A.3.2 entnommen werden.

$$q_{in}(t) = \frac{\mu_{set} \cdot V_R \cdot c_{x0}}{Y_{XS} \cdot c_{s0}} \cdot e^{\mu_{set} \cdot t} \qquad 2.8$$

3 Material und Methoden

Die zur Durchführung der Experimente verwendeten Chemikalien und Enzyme, sowie die Beschreibung zur Herstellung von verwendeten Medien und Puffer finden sich im Anhang. Eine genaue Oligonukleotid- und Stammauflistung, sowie Primärsequenzen können der beiliegenden Daten-CD entnommen werden.

3.1 Verwendete Stämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurden *E. coli* Stämme des K12-Types verwendet. Nachfolgende Analysen wurden hauptsächlich in den Stämmen HMS174 oder der Variante HMS174(DE3) mit integrierter T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Genomische Reporterkonstrukte konnten in die Landeplattform *attTn7*[18] insertiert werden. Die originalen pSEVA-Plasmide wurden im *recA*-defiziten Stamm CC118 gelagert. Genetische Arbeiten wurden in der Regel in DH5αλpir durchgeführt. Die in Kapitel 4.5 verwendeten Stämme basieren auf dem Stamm DH10B. Der von *Ceroni et al.* publizierte Reporterstamm ‚288' konnte als Kapazitätsmonitorstamm verwendet werden [136]. Die jeweiligen als Wildtyp bezeichneten Stämme können Tabelle 3.1 entnommen werden. Plasmid oder Reporter tragende Stämme finden sich auf der Daten-CD in der Datei ‚SW_GVOs.xlsx'. Generell wurde der Genotyp der Stämme vor der Verwendung auf annotierte Auxotrophien überprüft. Für HMS174 Stämme konnte die nicht annotierte *rpoS*-Mutation C100T identifiziert werden, welche zu einem stark trunkierten, lediglich 33-Aminosäure-langen RpoS-Fragment führt.

Tabelle 3.1 Bei der Verwendung der Stämme ist jeweils auf den Genotyp des Wildtypes zu achten, da einige der in dieser Arbeit verwendeten Varianten Auxotrophien besitzen.
**Die Mutation* rpoS *(C100T) konnte im Rahmen der studentischen Arbeit von Magdalena Bals [178] identifiziert werden.*

Name	Genotyp	Referenz
HMS174	*F- recA1 hsdR(rK12- mK12+) (Rif R) rpoS(C100T)**	[15]
HMS174(DE3)	*F- recA1 hsdR(rK12- mK12+) (DE3) (Rif R) rpoS(C100T)**	[176]
HMS174(DE3) *attTn7::lacIp-(eGFP)$_2$*	*F- recA1 hsdR(rK12- mK12+) (DE3) (Rif R) rpoS(C100T)* attTn7::lacIp-(eGFP)$_2$*	diese Arbeit
DH5αλpir	*endA1 hsdR17 glnV44 (= supE44) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 φ80dlacΔ(lacZ) M15 Δ(lacZYA-argF)U169 zdg-232::Tn10 uidA::pir+* mit und ohne *pTNS1*	[177], [178]
DH10B	*F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ-*	[179]
288	*DH10B*, (konstitutives sfGFP, kanR)::λ*attB*)	[136]
CC118	*F- araD139 del(ara leu)7697 del(lacX74) phoA del(20) galE galK thi rpsE rpoB argE(Am) recAl OmpC+ OmpF+*	[180]
HB101	*F–, thi-1, hsdS20 (rB–, mB–), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (strr), xyl-5, mtl-1.* mit pRK600	[181], [182]

[18] Eine spezifische Sequenz in der genomischen DNA, die in *E. coli* unweit des *glmS* Genes liegt. In diese Region kann sich das Tn7-Transposon des Tn7-Phagens insertieren.

Die Namensgebung der verwendeten Konstrukte basiert auf der vom pSEVA-Register verwendeten Nomenklatur. Wie in Abbildung 3.1 gezeigt besteht diese ursprünglich aus drei Ziffern. Neben der Antibiotika-Kassette an erster Stelle, ist auch der Replikationsursprung an Position zwei, sowie die funktionsgebende Cargo-Site an dritter Stelle über eine Nummer eindeutig klassifiziert. In dieser Arbeit wurde die Nomenklatur um zwei Positionen erweitert. Die ursprüngliche pSEVA-Benennung wird durch eine Ziffer für den verwendeten Promotor und eine für das korrespondierende Gen von Interesse ergänzt. Das in dieser Arbeit erstellte pSEVA-Derivat pTRA nutzt zusätzliche Indizes, welche eine nähere Beschreibung der verwendeten Tags erlaubt. Die pTRA-Nomenklatur folgt der Form ‚*Promotor-d-h-GOI-h-d*' wobei ‚*d*' für das Vorhandensein des mRNA-Tags dBroccoli codiert und ‚*h*' die Position des His-Tags näher beschreibt. Nicht verwendete Positionen wurden mit einer ‚*0*' gekennzeichnet.

	Antibiotikum	Replikationsursprung	Kopien	Promotor	Gen von Interesse
1	Ampicilin	R6K	15-30	*gyrBp*	*mCherry*
2	Kanamycin	RK2	2.4*	*helDp*	*eGFP*
3	Chloramphenicol	pBBR1	4.7*	*lacIp*	*luxCDABE*
4	Spectinomycin	ColE1/pRO1600	31.9*	*proCp*	MCS-Tag
5	Tetracyclin	RSF1010	5.2*	*xylS*/Pm	*eCFP*
6	Gentamicin	p15A	8.6*	*alkS-PalkB*	*PAmCherry*
7		pSC101	3.4*	*rpsBp*	
8		pUC	8.9*	*rplKp*	

*Abbildung 3.1 Verwendete pSEVA-basierte Plasmidkonstrukte folgen einem Nomenklaturschema, welches an drei Positionen die dem Konstrukt zugeordnete Antibiotikaresistenz, den Replikationsursprung (Ori) und die kodierende definiert (pink). Die in dieser Arbeit erweiterte Nomenklatur ordnet über eine Nummerierung der verwendeten Cargo einen Promotor, sowie ein Gen von Interesse zu. Nicht besetzte Positionen werden durch eine ‚0' gekennzeichnet. *durchschnittliche, publizierte Plasmidkopienzahl über 24 h in* E. coli *[183].*

Die in der Tabelle 3.1 gezeigten Stämme wurden mit Reporterplasmiden und Plasmiden zur Provokation einer Belastung in unterschiedlicher Zusammensetzung eingesetzt. Die verwendeten Plasmide finden sich in Tabelle 3.2. In der Regel wurde ein grün fluoreszierender Reporter mit einem pink fluoreszierenden Ladungsplasmid kombiniert. Eine genaue Auflistung der analysierten Stammvarianten und der jeweiligen Versuchsbedingungen findet sich im Anhang A.5

Tabelle 3.2 Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide basieren größtenteils auf der sogenannten pSEVA-Bibliothek. Mit pSEVA gekennzeichnete Plasmide bestehen aus einem SEVA Grundgerüst und einer Promotor-Fluoreszenzprotein-Kombination. pTRA Plasmide besitzen ebenfalls ein pSEVA-Rückgrad, die Hauptkomponente jedoch bilden Tags auf mRNA und Proteinebene. H2-basierte Plasmide enthalten eine randomisierte Belastung fusioniert mit mCherry.

Name	Funktion	Referenz
pTRA641-dhhd	Monitoring Plasmid für heterologe Expression mit MCS	diese Arbeit
pTRA641-51hd	Monitoring Plasmid für heterologe Expression: XylS/Pm und mCherry (RBS0)	[183]
pTRA641-51hd (RBS1)	Standard pTRA641-51hd mit 444%-stärkerer RBS	[183]
pTRA481-51hd	Monitoring Plasmid für heterologe Expression: XylS/Pm und mCherry (RBS0)	[184]
pTRA481-51hd (RBS1)	Standard pTRA481-51hd mit 444%-stärkerer RBS	[184]
pSEVA641-52	pSEVA Expressionsplasmid: XylS/Pm und GFP	diese Arbeit
pSEVA237R-01	pSEVA Expressionsplasmid: ohne Promotor mit mCherry	[79]
pSEVA237R-11	Kapazitätsmonitor: *gyrBp* und mCherry	diese Arbeit
pSEVA237R-21	Kapazitätsmonitor: *helDp* und mCherry	diese Arbeit
pSEVA237R-31	Kapazitätsmonitor: *laclp* und mCherry	diese Arbeit
pSEVA237R-41	Kapazitätsmonitor: *proCp* und mCherry	diese Arbeit
pSEVA237R-32	Kapazitätsmonitor: *laclp* und GFP	diese Arbeit
pSEVA237R-72	Reporter für die Ribosomenbildungsrate: *rpsBp* und GFP	[185]
pSEVA237R-82	Reporter für die RNA-Polymerasenbildungsrate: *rplKp* und GFP	[186]
H2-minimal	H2-Plasmid mit minimaler Belastung: pBAD und Glycin-mCherry	diese Arbeit
H2-1 bis 194	H2-Plasmid mit randomisierter Belastung: pBAD und 100xAminosäuren-mCherry	diese Arbeit

3.2 Molekularbiologische Methoden

Zur Erstellung der als Dauerkulturen auf -80 °C hinterlegten Plasmidkonstrukte, wurde in der Regel auf die gleiche Art und Weise verfahren. Nach einer Amplifikation der Cargo-Site wurde diese über Schnittstellen in den pSEVA-Vektor eingebracht. Die äußeren Grenzen der Cargo-Site sind definiert über die Restriktionsstellen *PacI* und *SpeI*. Die Ribosomenbindestellen, welche in der studentischen Arbeit von Martin Ziegler [183] mittels des Salis-Calculators [90] designed wurden, wurden mittels einer Overlap-Extension-Polymerasekettenreaktion mit dem mCherry-Gen fusioniert und anschließend über die Schnittstellen *EcoRI* und *SpeI* in das pTRA-51hd Konstrukt integriert. Verwendet wurden hierfür die Primer SW38-49. Bei der Overlap-Extension-PCR wurden zunächst zwei 15-20 bp überlappende Fragmente amplifiziert, die anschließend im

Verhältnis 1:1 als Matrize für das Gesamtfragment dienten. Mittels Polymerasekettenreaktion wurden die Genstücke mit Hilfe der beiden äußersten Primer zu einem Fragment fusioniert. Um die Cargo-Site in Gänze zu vervielfältigen wurde auf die Oligonukleotide SW16 und SW17 (Daten-CD unter ‚SW_Oligos.xlsx') zurückgegriffen. Für DNA-Fragmente, die *downstream* des XylS/Pm-Promotor amplifiziert werden sollten, wurde auf den *forward*-Primer SW18 zurückgegriffen. Mutationen konnten mit Gen-spezifischen Oligonukleotiden ebenfalls über eine Overlap-Extension-PCR eingebracht werden (Primer SW26-29). Promoterregionen wurden in der Regel nach einem Amplifikationsschritt über die Schnittstellen *PacI* und *PstI* integriert. Die Produktion von Proteinen, die via Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden sollten, erfolgte im pET28a-Plasmid (Novagen). Die entsprechenden Gene wurden nach einer Amplifikation über die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* ins Plasmid eingebracht. Native *E. coli* DNA-Abschnitte wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase aus HMS174-Kolonien gewonnen. Die Multiple-Cloning-Site des Ausgangs-pTRA-Konstruktes wurde von der Firma BioCat synthetisch in einem pUC19-Shuttlevektor bereitgestellt.

3.2.1 Plasmidpräparation und DNA-Reinigung

Die Plasmide wurden aus den Zellen einer 10 mL-Übernachtkultur, die bei 37 °C und 250 rpm (Multitron Schüttelinkubator, Infors) in LB-Medium herangezogen wurde, präpariert. Zellaufschluss und Plasmidreinigung wurden nach Herstellerangaben mit dem FastGene® Plasmide Extraction Kit der Firma Nippon Genetics durchgeführt. DNA-Fragmente wurden nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau von Salz, Precursor-Molekülen und Enzymen mit Hilfe des FastGene® Gel/PCR Extraction Kit ebenfalls nach Herstellerangaben gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µL auf 70 °C erwärmtem ddH_2O in sterile 1.5 mL-Eppendorfreaktionsgefäße.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden hauptsächlich mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizierter Insertionsfragmente erstellt. Als Initiationsfragmente (im Folgenden Primer) dienten Oligonukleotide, die von der Firma Eurofins synthetisch bereitgestellt wurden.

A

Komponente	Volumen, µL
DNA	~0.5 µg
5x Q5-Reaktions-Puffer	10
Forward Primer	2.5
Reverse Primer	2.5
Q5 Polymerase	0.5
10 mM dNTP-Mischung	1
ddH_2O	auf 50 µL auffüllen

B

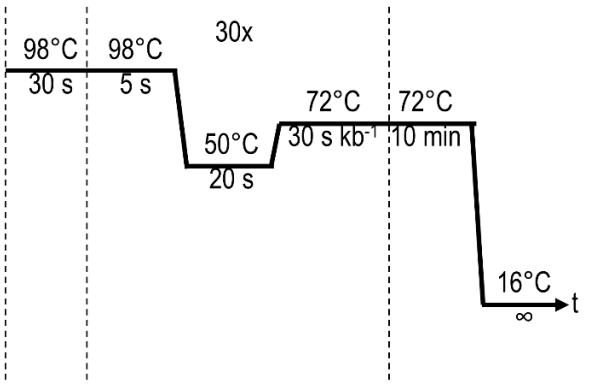


Abbildung 3.2 Zur Durchführung einer fehlerminimierten Polymerasekettenreaktion mit der Q5-Polymerase zur Amplifikation von DNA-Fragmenten konnte die in (A) gezeigte Zusammensetzung verwendet werden. Die Ansätze durchliefen das in (B) dargestellte Temperaturprofil.

Um den Fehleinbau von Basen in der Sequenz gering zu halten, wurde die Q5-High-Fidelity Polymerase (NEB) verwendet. Diese Polymerase weist - neben einer *proofreading*-

Funktion - eine 280-fach höhere Genauigkeit auf, als die genetisch unveränderte Taq-Polymerase. Die beteiligten Komponenten wurden nach dem in Abbildung 3.2-A gezeigten Verhältnis gepoolt. Die Polymerisation der Nukleotide erfolgte mittels des in Abbildung 3.2-B gezeigten Temperaturprofils im Mastercycler Gradient (Katalognummer 5331, Eppendorf).

Zur Überprüfung des Klonierungerfolgs oder zur Amplifikation genomischer Abschnitte aus *E. coli* Stämmen wurde der FastGene TaqReady Mix (Nippon Genetics) verwendet. Hier wurde eine Einzelkolonie steril mit einer Pipettenspitze der zu überprüfenden Platte entnommen, ein so genannter *Rescue*-Ausstrich auf eine neue Platte transferiert und anschließend die restliche Kolonie im vorgelegten PCR-Ansatz (Zusammensetzung Abbildung 3.3-A) resuspendiert. Um die DNA der eingesetzten Zellen als Matrix zugänglich zu machen wurde, wie in Abbildung 3.3-B dargestellt, der initiale Denaturierungsschritt des durchlaufenen Temperaturprofils auf 5 min verlängert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend gereinigt (vergleiche Kapitel 3.2.1).

A

Komponente	Volumen, µL
Fast Gene Taq Ready Mix	12.5
Forward Primer	2.5
Reverse Primer	2.5
Kolonie	1x
ddH_2O	auf 25 µL auffüllen

B

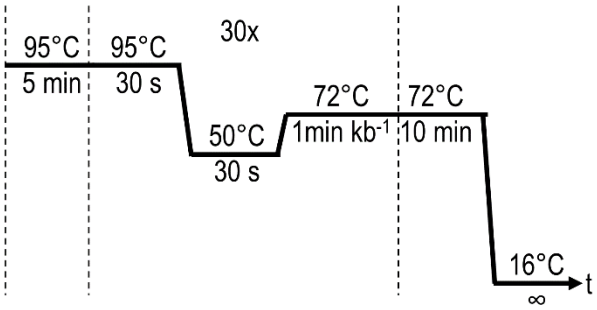


Abbildung 3.3 Eine robuste Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation ausgehend von Matrizen aus genomischer DNA, konnte mit der in (A) gezeigten Zusammensetzung gestartet werden. Die Taq-Polymerase-vermittelte Polymerisationsreaktion konnte mittels dem in (B) dargestellten Temperaturprofil durchgeführt werden.

3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Um DNA-Fragmente auf Grund ihrer Größe zu trennen wurde ein 1 % (w/v)-Agarosegel gegossen. Pro Gel wurde 1 g reine Agarose, in 100 mL TAE-Puffer in der Mirkowelle aufgekocht, 3 µL des DNA-Rückgrad-bindenden Farbstoffes Midori Green Advance (Nippon Genetics) zugegeben und luftblasenfrei in eine Gießform gefüllt. Durch die Auswahl des richtigen Kammes konnten verschieden große Ladetaschen im Gel generiert werden. Zur Analyse der DNA-Größe wurden lediglich 5 µL des zu testenden PCR-Ansatzes mit 1 µL Gel-Loading Dye, Purple (NEB, 6x, kein SDS) aufgetragen. Um Fragmente voneinander zu trennen und anschließend aus dem Gel heraus zu schneiden, wurden bis zu 50 µL pro Tasche aufgetragen. Zur Größenschätzung der DNA-Fragmente wurden 5 µL des 2-log DNA Größenstandards (NEB) als Probe hinzugefügt. Durch das Anlegen einer Spannung von 120 V (PeqPower 300; VWR, Radnor) für bis zu 60 min migrierten die negativ geladenen DNA-Fragmente unterschiedlich schnell durch das Gel. Die Banden wurden mittels des Gel iX Imagers (Intas-Science-Imaging Instruments GmbH) via UV-Licht detektiert und dokumentiert.

3.2.4 Restriktion

Die zur Erstellung neuer Konstrukte notwendigen DNA-Fragmente wurden mittels Restriktionsverdau für die Ligation mit den entsprechend kompatiblen Enden ausgestattet. Hierfür wurden pro 50 µL-Ansatz je 2 µL der Restriktionsenzyme (NEB) und 5 µL 10x Puffer NEB

CutSmart® zu 20 µl DNA gegeben. Der Ansatz wurde mit ddH_2O auf 50 µL aufgefüllt. Die Restriktionsansätze wurden zwischen 1 und 3 h bei 37°C inkubiert. Um Religationen zu vermeiden wurde 1 h vor Ende des Verdaus zu Plasmidvektoren 1 µL antarktische Phosphate (NEB), sowie 1 µL Antarktische Phosphatase Reaktion Puffer (NEB) zugegeben, um die Enden zu dephosphorylieren. Anschließend wurden die so erstellten Fragmente gereinigt.

3.2.5 Ligation

Die Ligation der kompatiblen Fragmente erfolgte mittels T4 Ligase. Hierfür wurden 7 µL des Vektors mit 3 µL des Inserts zu 2.5 µL 10x T4-Ligasepuffer und 1 µL T4-Ligase gegeben und mit ddH_2O auf 25 µL aufgefüllt. Ligiert wurde entweder für 4 h bei 16 °C oder über Nacht auf Eis.

3.2.6 Kombinierter Restriktions und Ligationsansatz

Die in Kapitel 3.2.11 und 4.5 vorgestellte Plasmidbibliothek wurde in einem integrierten Restriktions-Ligationsansatz erstellt. Hierfür wurden jeweils 4 µL des mCherry-beinhaltende Vektors, sowie des *BsaI*-flankierten, randomisierten Fragmentes mit dem Restriktionsenzym *BsaI* und der T4-Ligase wie in Abbildung 3.4-A dargestellt pipettiert und in 25 Restriktions-Ligations-Zyklen mit anschließendem Hitzeinaktivierungsschritt gleichzeitig geschnitten und ligiert (Abbildung 3.4-B). Die Ligation erfolgte nach dem *Golden-Gate*-Klonierungskonzeptes [187]

A

Komponente	Volumen, µL
Insert:Backbone	1:1
T4 Ligase	0.5
T4 Puffer	1
BsaI	0.5
ddH_2O	auf 10 µL auffüllen

B

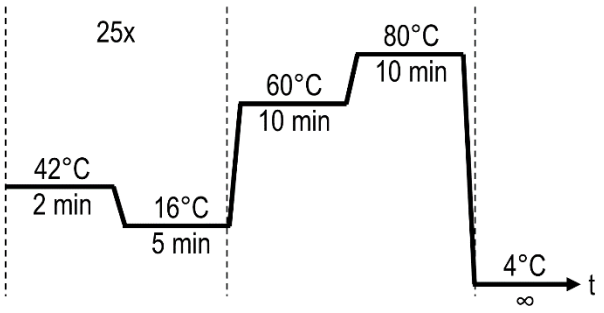


Abbildung 3.4 Die in (A) gezeigte Zusammensetzung des kombinierten Restriktion-Ligationsansatzes ermöglicht mittels des in (B) abgebildeten Temperaturprofiles simultan den Verdau und die Ligation eines Konstruktes über die Golden-Gate-Cloning *Methode* [187].

3.2.7 Transformation in frisch-kompetente Zellen (TSS-Methode)

Für einmalige Transformations-Anwendungen, wie zum Beispiel der Integration mehrere Plasmide nacheinander in eine Zelle, wurden 40 mL LB im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtkultur des jeweiligen *E. coli* Stammes angeimpft. Diese wurden bei 37° C bis zu einer OD_{600} von ~0.4-0.6 im Schüttler inkubiert und abzentrifugiert (10 min, 1 000 g, 10 °C). Um bereits integrierte Plasmide nicht zu verlieren, wurde bei diesem Schritt der entsprechende Selektionsmarker zugegeben. Die Zellen wurden in 1 mL eiskaltem TSS resuspendiert und sofort für die Transformation weiterverwendet. Frisch kompetente Zellen wurden unmittelbar vor der Verwendung hergestellt.

Jeweils 50-100 ng DNA, 25 µL eines Ligationsansatzes oder 1 µL eines bereits erstellten Plasmides wurden zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis gelagert. Der gesamte Ansatz wurde dann zu 1 mL auf Raumtemperatur vorgewärmtes TSS-Medium gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert, abzentrifugiert (10 min, 8 000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge), auf selektive Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37° C bebrütet.

3.2.8 Transformation in chemisch-kompetente Zellen

Zur Bereitstellung lagerbarer chemisch kompetenter Zellen wurden je 5 mL der benötigten *E. coli* Stämme über Nacht in LB-Medium bei 37 °C und 250 rpm herangezogen. Anschließend wurde 1 mL dieser Vorkultur in 500 mL Schüttelkolben mit jeweils 100 mL LB-Medium transferiert und für 2-4 h bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD_{600} von 0.3 bis 0.6 kultiviert. Die sich in der exponentiellen Phase befindenden Zellen wurden steril auf 50 mL Falcons aufgeteilt und in der vorgekühlten Zentrifuge für 10 min bei 4 °C und 5 000 g pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in 20 mL eiskaltem 0.1 M $CaCl_2$-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abermals für 10 min bei 4 °C und 5 000 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in bis zu 10 mL eiskaltem 0.1 M $CaCl_2$-Puffer mit 20 %(v/v) Glycerol aufgenommen, jeweils 100 µL in sterilen 1.5 mL-Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zu einem halben Jahr gelagert. Um Plasmid-DNA zu transformieren, wurden die tiefgefrorenen Zellen für circa 15 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µL der Plasmid-DNA oder bis zu 25 µL des Ligationsansatzes dazugegeben, durch leichtes Anschnippen homogen verteilt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis gelagert. Zur Revitalisierung der Zellen und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurden 900 µL SOC-Medium zum Transformationsansatz zugegeben und für 45 min bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Um ligierte Plasmide zu selektionieren wurde der Ansatz im Anschluss bei 8 000 rpm für 5 min pelletiert und der Hauptteil des Überstandes abgegossen. Die transformierten Zellen wurden im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf selektive LB-Agar-Platten plattiert. Um sichtbare Kolonien zu erhalten wurden die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.9 Sequenzierung

Bei den Sequenzierungen handelt es sich um Auftragsarbeiten, die durch die Firma Eurofins Genomics nach der Sanger Sequenziermethode durchgeführt wurden. Hierfür wurden 15 µL einer DNA-haltigen Lösung mit 2 µL eines spezifischen Oligonukleotides versetzt und der Firma Eurofins übergeben.

3.2.10 Anlegen von Dauerkulturen

Zur Aufbewahrung erstellter Plasmidkonstrukte oder Stämme wurden 1.2 mL einer LB-Übernachtkultur steril in ein 2 mL Kryo-Röhrchen überführt und mit circa 0.8 mL Glycerin (100 %) durch invertieren zu einem homogenen Gemisch vereint. Nach einer circa 10-minütigen Ruhephase auf Eis wurden die durchmischten Kulturen bei -80 °C eingefroren und bis zur Verwendung aufbewahrt. Häufiges Auftauen und Einfrieren wurde vermieden.

3.2.11 Bereitstellung einer Plasmidbibiothek

Um eine möglichst große Abdeckung an Sequenzen zu erhalten wurde die in Kapitel 4.5 verwendete, randomisierte Sequenz dreimal wie oben beschrieben in das ursprüngliche H2_lacZα_Plasmid [136] kloniert. Da die Transformation dieser Bibliothek in superkompetente DH10B-Zellen (NEB® 10-beta Elektrokompetenz *E. coli*) über Elektroporation erfolgte, wurde eine Entsalzung der DNA durchgeführt. Hierfür wurde eine 24-*well* Platte mit ddH_2O gefüllt, bis eine maximale Wölbung der Wasseroberfläche erreicht war. Anschließend wurde je ein Membranfilter (Merck, Millipore) vorsichtig auf die Wasserscheitel gelegt. Die ligierte DNA wurde ins Zentrum der Membranen pipettiert. Nach 25 min wurden die einreduzierten Tropfen vorsichtig in jeweils 20 µL ddH_2O resuspendiert. Die entsalzten Proben wurden von der Membran abgenommen und bei -80 °C gelagert. Für die Transformation in elektrokompetente Zellen

(NEB® 10-beta elektrokompetent *E. coli*) wurden 50 µL superkompetente Zellen mit 20 µL Ligationsansatz gemischt und in vorgekühlte Gene Pulser®Micropulser™ Elektroporationsküvetten (grüner Deckel) überführt. Die Zellen wurden mit dem BioRad MicroPulser ™ Electroporator elektroporiert. Hierfür wurde das Setup Ec2 (2.5 kV) verwendet. Während des gesamten Prozesses wurden die Proben so lange wie möglich auf Eis gehalten. Direkt nach der Elektroporation wurde den transformierten Zellen 950 µL LB-Medium zugesetzt. Die Regeneration der Zellen wurde eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator durchgeführt. Danach wurden den Zellen 3 mL frisches LB (Chloramphenicol: 34 µg mL^{-1}) zugesetzt und 3 Stunden bei 30 °C und 250 rpm in 50 mL Falcons kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf ein Gesamtvolumen von 20 mL verdünnt (Chloramphenicol: 34 µg mL^{-1}). Einerseits wurde dieser Verdünnungsschritt durchgeführt, um plasmidhaltige Zellen anzureichern und um einen Wachstumsstopp zu vermeiden, der durch die hohe OD der verwendeten elektrokompetenten Zellen verursacht werden kann. Andererseits sollte durch eine homogene Suspension die Antibiotikaselektion von untransformierten Zellen effizienter ablaufen. Um die Wahrscheinlichkeit für den Verlust eines Plasmides zu vermeiden, welches eine stark belastende DNA-Sequenz trägt, wurde anschließend die Temperatur der Kultivierung auf 30 °C reduziert. Die Bibliothek für weitere 2 h inkubiert.

Die transformierten Klone (3×20 mL) wurden bei 4 000 g, 4 °C und 10 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet wurde in 1 mL P1-Quiagen-Puffer gelöst. Jedes der resuspendierten Pellets wurde in zwei 2 mL-Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt. Pro 2 mL-Eppendorf-Röhrchen wurde 0.5 mL P2-Quiagen-Puffer zugegeben und fünfmal invertiert. Nach der Zelllyse wurden 700 µL N3-Quiagen-Puffer zugegeben, um Proteine und makromolekulare Komponenten auszufällen. Die 2 mL-Eppendorf-Röhrchen wurden für 10 min bei 13 000 rpm (5415D Zentrifuge, Eppendorf) zentrifugiert, um die ausgeflockte Fraktion abzutrennen. Jeder Überstand wurde in zwei EZ-10-DNA-Mini-Spin-Säulen (NBSbiologicals) in 850 µL-Portionen übertragen. Sie wurden 30 s bei 13 000 rpm (5415D Zentrifuge, Eppendorf) zentrifugiert. Jede Säule wurde zweimal mit 0.7 mL PE-Quiagen-Waschpuffer gewaschen. Um die Plasmid-Bibliothek zu eluieren, wurden 30 µL vorgewärmtes (70 °C) ddH_2O zu zwei der vier Säulen, an diese jeweils die Plasmide einer 20 mL pelletierten Kultur gebunden waren, zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 min bei Raumtemperatur wurden die Plasmide durch Zentrifugation für 1 min bei 13 000 rpm (5415D Zentrifuge, Eppendorf) eluiert. Anschließend wurden die gleichen 2x30 µL verwendet, um die Plasmidbibliothek von den anderen beiden Säulen zu eluieren. Die Produkte wurden gepoolt und bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

12.5 µL dieser klonierten Plasmidbibliothek wurden in 125 µL NEB 10-beta-elektrokompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Daher wurden die Zellen in vorgekühlte Gene Pulser® Micropulser™ Elektroporationsküvetten (grüner Deckel) wie oben beschrieben übertragen. Die Zellen wurden mit dem BioRad MicroPulser™ Electroporator Ec2-Protokoll (2.5 kV) elektroporiert. Zur Regeneration der Zellen wurden 875 µl LB zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Nach der Inkubation wurden 100 µL jeder Charge in sterile 2 mL-Röhrchen aliquotiert und mit 50 µL 50 % (v/v) Glycerin gemischt. Die Zellen wurden sofort in einem Gefrierschrank bei -80 °C (Tom Ellis Labor) gelagert. Für Experimente mit der Gesamtbibliothek wurde auf diese Aliquots zurückgegriffen.

3.2.12 Genomische Integration in die *attTn7*-Plattform

Zur Genomintegration nach Zobel *et al.* [188] wurden die Konstrukte von Interesse (in der Regel ein Promotor-Reporter-Konstrukt) in die *attTn7*-Landeplattform über den pSEVA-basierten

pTn7-M-Vektor integriert. Hierfür wurden die Konstrukte über die Schnittstellen *PacI* und *SpeI* in diesen Vektor eingebracht. Aufgrund des *λpir*-abhängigen Replikationsursprunges R6K wurden die Arbeiten mit diesem Plasmid, sowie die Stammhaltung ausschließlich in *E. coli* DH5α *λpir* ausgeführt. Zur Überführung und anschließenden Insertion in den Akzeptorstamm HMS174(DE3) wurden jeweils 200 µL einer Übernachtkultur der Stämme *E. coli* DH5α *λpir* (pTn7-Derivat-haltiger Donorstamm, [182]), *E. coli* HMS174(DE3) (Akzeptorstamm), *E. coli* HB101 pRK600 (Helferstamm, [178]) und *E. coli* DH5α pTNS1 (Integrationsstamm) bei 4 000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden in jeweils 10 µL einer sterilen $MgSO_4$-Lösung (1 mM) resuspendiert und auf LB-Agarplatten (Gentamicin, 20 µg mL^{-1}) zu einem Tropfen fusioniert aufgetragen. Die Platte wurde für 6 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Selektion des HMS174(DE3)-Stammes mittels eines Vereinzelungsausstriches auf Minimalmedium-Lactose-Platten (Lactose 20 mM, Gentamicin, 20 µg mL^{-1}) überführt. Die Integration konnte mittels einer Kolonie-PCR (Primer: SW113 und 114) verifiziert werden. Die Selektion des richtigen Stammes wurde ebenfalls über eine Kolonie-PCR (Primer: SW98 und 121) auf das Stamm-spezifische DE3-Gen überprüft. Für die Integration in der *attTn7*-Landeplattform sind in der Literatur keine Konsequenzen bekannt.

3.3 Analytische Verfahren

Da die Bestimmung der intrazellulären Dynamiken unter anderem quantitative Konzentrationsinformationen benötigt, erfolgte diese Quantifizierung mit Hilfe analytischer Methoden. Zur Charakterisierung und Quantifizierung der Prozesse auf Proteinebene wurden biochemische Analysemethoden verwendet. Um die Entwicklung der Zielproteinkonzentration über die Zeit zu verfolgen wurden in periodischen Intervallen 2 mL Proben dem Versuchssetup entnommen.

3.3.1 Erstellung von Proteinstandards

Die Herstellung spezifischer Proteinstandards zu Quantifizierungszwecken erfolgte für das Protein mCherry im 1.5 L Bioreaktor, wie im Kapitel 3.4.4 beschrieben. Das Protein RpsB konnte im Schüttelkolben, wie in der Arbeit von Knesebeck [185] dargestellt, produziert werden. Die Reinigung der beiden Proteine erfolgte in beiden Fällen über His-Tags. Diese wurden chromatographisch durch eine über immobilisierte Ni^{2+}-Ionen vermittelte Affinität vom restlichen Proteom getrennt. Hierfür wurden die Zellen nach einer Übernachtexpression des rekombinant hergestellten Zielproteins für 10 min bei 3 260 g (Rotixa 50 RS, Hettich Zentrifugen) pelletiert und anschließend in 50 mL Bindepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis mittels einer Sonotrode durch den Homogenisator Sonoplus HD2070 von Bandelin über Ultraschall aufgeschlossen. Das Falcon wurde durchgängig auf Eis gehalten und für insgesamt 5 min in 5 Zyklen aufgeschlossen, in denen jeweils 10 % der Zeit mit einer Leistung von 80 % beschallt wurde. Zur Stabilisierung wurde 1 % (v/v) des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 100 mM) zugegeben. Die Viskosität der Probe konnte durch die Zugabe von 0.1 % (w/v) DNAse reduziert werden. Die Zelltrümmer wurden mittels eines 10 minütigen Zetrifugationsschrittes bei 16 200 g entfernt. Restliche Schwebstoff wurden mit einer Ausschlussgröße von 0.2 µm via Filtration (LLG Spritzenvorsatzfiler aus CA, 0.2 µm, Lab Logistics) abgetrennt. Die Reinigung des Zielproteins erfolgte mittels einer HisTrap FF 1 mL Affinitätschromatographiesäule (Ni^{2+}-NTA, GE Healthcare) über eine ÄKTApurifier-Chromatographieanlage (GE Healthcare). Die Säule wurde mit einer maximalen Flussrate von 1 mL min^{-1} betrieben. Nach einem initialen Waschschritt mit 5 mL ddH_2O wurde die Säule mit ebenfalls 5 mL Bindepuffer equilibiriert werden. Über einen 50 mL-Superloop konnte die Probe

injiziert werden. Das an die Säule gebundene Zielprotein wurde mit weiteren 5 mL Bindepuffer gewaschen, bevor es mit Hilfe eines linearen Gradienten eluiert wurde. Der Imidazolgehalt wurde in der flüssigen Phase von 20 auf 500 mM über ein Volumen von 10 mL erhöhte. Der Durchfluss wurde über den gesammten Prozess hinweg in 1 mL-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels BCA-Assay auf ihre Konzentrationen hin vermessen. Die beiden Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an eluiertem Protein wurden gepoolt.

3.3.2 BCA-Assay

Proteinkonzentrationen wurden mittels der BCA-Nachweismethode basierend auf der Biuret-Reaktion nach Herstellerangaben quantifiziert. 50 Volumenanteile des Working-Reagenz A wurden mit einem Volumenteil Working-Reagenz B gemischt (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermofisher). 200 µL dieser Lösung wurden direkt für die Analyse von 25 µL Probenvolumen verwendet. Die in der Probe befindlichen Proteine reduzieren Cu^{2+} Ionen in dieser alkalischen Umgebung zu Cu^{1+}. Zwei der ebenfalls in der Lösung vorliegenden Bicinchoninsäuremoleküle gehen mit diesem reduzierten Kupfer einen lila-farbenen Chelatkomplex ein, der mittels eines Spektralphotometers colorimetrisch bei 562 nm detektiert werden kann. Die Farbintensität korreliert mit der Menge an reduziertem Kupfer und somit mit der in der Probe enthaltenen Proteinmenge. Um Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration ziehen zu können wurde zusätzlich zu den Proben eine BSA-Standardgerade für den Bereich 25-2 000 µg mL^{-1} erstellt. Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um eine möglichst genaue Abschätzung der Proteinkonzentration zu bekommen sollten die erhaltenen Absorptionswerte zwischen 0.1 und 2.0 liegen. Um pH- und Salz-Einflüsse der Probe zu minimieren wurden die Standardreihen im jeweiligen Probenpuffer verdünnt und analysiert.

3.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte nach Lämmli [189]. Hierfür wurden Proben mit ganzen Zellen pelletiert und mit 1x-Lämmlipuffer auf eine OD_{600} von 10 oder bei einer starken Expression auf eine OD_{600} von 5 eingestellt. Auch proteinhaltige Lösungen (zum Beispiel zur Überprüfung des Reinigungserfolges) wurden mit 20 % des Probenvolumens 5x-Lämmlipuffer verdünnt. Die mit Lämmlipuffer versetzten Ansätze wurden bei 95 °C für 10 min (Proben zur Analyse des ribosomalen Proteins RpsB für bis zu 20 min) denaturiert. Um Zelltrümmer und unlösliche Fraktionen abzutrennen wurden die Gemische anschließend bei 13 000 rpm (Mikro 20, Hettich Zentrifugen) zentrifugiert. Zur Herstellung der Natriumdodecylsulfat(/SDS)-Polyacrylamidgele wurde zuerst ein circa 66 % der Gelgröße umfassendes 12.5 %-Acrylamid-Trenngel gegossen. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe der Radikalstarter APS und TEMED katalysiert. Das 12.5 % Trenngel wurde bis zur Aushärtung mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde ein 3 %-iges Sammelgel gegossen, in welchem mittels eines Kammes Taschen zum Probenauftrag bereitgestellt wurden. Die Zusammensetzung der Gelansätze ist in Tabelle 3.3 gelistet. Nach dem Aushärten der Gele wurden jeweils 20 µL der zu analysierenden Probe und pro Gel mindestens eine Tasche mit 10 µL Just Blue Prestained Protein Marker beladen. Außerdem konnte für Quantifizierungsansätze (mCherry ~0.5 µg, RpsB 2.6 µg, 0.5 µL=$6.02*10^{11}$ Moleküle RNA-Polymerase Holoenzym 400 kDa NEB M0551S) eine definierte Menge an gereinigtem Zielprotein mitaufgetragen werden. Die Elektrophoresekammern wurden mit 1x-SDS-Laufpuffer aufgefüllt und an die Stromquelle angeschlossen. Die SDS-dekorierten, denaturierten Proteine wurden bei 40 mA pro Gel bei einer maximalen Spannung von 300 V durch die größenabhängige Migration im Gel über einen Zeitraum von circa 45 min getrennt. Die Stromquelle wurde, nach dem Erreichen des Gel-Endes

der Bromphenolblau-Lauffront, abgeschaltet. Das Sammelgel wurde bei der Entnahme der Gele entfernt.

Tabelle 3.3 Zur Fertigung eines Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgels wurde ein 3 % polymerhaltiger Sammelgelabschnitt mit nachfolgendem 12.5 % Trenngel gegossen. Die Zusammensetzung beider Komponenten findet sich in der nachfolgenden Tabelle. Durch die Zugabe der Moleküle APS und TEMED konnte die Polymerisationsreaktion des Acrylamides gestartet werden.

Komponente	3%-Sammelgel	12.5%-Trenngel
40 % Acrylamid	3 mL	12.5 mL
2x Sammelgelpuffer	20 mL	
4x Trenngelpuffer		10 mL
ddH_2O	15 mL	17.5 mL
APS	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

3.3.4 Coomassie-Färbung

Um die Gesamtheit der in den Fraktionen enthaltenen Proteine sichtbar zu machen, wurden die aufgetrennten Proteine auf den SDS-Gelen mittels der Coomassie-Methode blau angefärbt. Hierfür wurde das zu färbende Gel zunächst circa 5 min mit Fairbanks-Lösung A überschichtet. Danach wurde die Lösung A mit der Fairbanks-Lösung B ersetzt und wiederum für 5 min inkubiert. Um unspezifische Blaufärbung aus dem Gel zu entfernen, wurde das Gel unter Schwenken in angewärmter Essigsäurelösung (1 % (v/v)) für 5-15 min gelagert und anschließend in VE-Wasser gewaschen. Die endgültige Entfernung unspezifischer Farbstoffbindung erfolgte über Nacht in VE-Wasser. Anschließend wurde das Gel im Durchlicht des iX Imagers (Intas-Science-Imaging Instruments GmbH) dokumentiert. Gele, die für immunologische Nachweise erstellt wurden (siehe Kapitel 3.3.5), wurden im Duplikat erstellt. Von diesen wurde eines nicht gefärbt.

3.3.5 Westernblot

Zur immunologischen Quantifikation spezifischer Proteine im Gel wurden die Proteine zunächst aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurde das SDS-Gel luftblasenfrei zwischen zwei in Towbin-Puffer getränkte Whatmanfilterpapiere auf eine Nitrozellulosemembran der gleichen Größe gelegt. Diese wurden zur Aktivierung zuvor mit ddH_2O befeuchtet. Dieses Sandwich wurde für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran in der Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell Anlage (Bio-Rad Laboratories GmbH) für 20 min bei 15 V an der MS-3AP-PowerSupply (Major Science Saratoga) angeschlossen.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für die immunologische Detektion aus dem Sandwich entnommen. Um unspezifische Interaktionen der geblotteten Proteine mit den zur Quantifizierung zugegebenen Antikörpern zu vermeiden, wurde die Nitrozellulosemembran mit 15 mL TBS-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur unter Rotation auf Stufe 30 im Tube Revolver (NeoLab) in einem 50 mL-Falcon geblockt. Es wurden neben der Quantifizierung His-getaggter Proteine auch eine Immunoquantifikation der Proteine RpoC und RpsB durchgeführt. Über Nacht wurde der Zielprotein-spezifische Antikörper (1. AK) in der in Tabelle 3.4 gelisteten Menge zugegeben und anschließend drei Mal mit TBS-Puffer (bei Detektion des RpsB oder dem His-getaggten Protein mit TBS-Milch) gewaschen, bevor im Falle einer His- oder RpoC-Detektion der die Farbreaktion katalysierende Antikörper (2. AK) zugegeben wurde. In diesen Fällen wurde nach einer Inkubationszeit von rund 1 h abermals drei Mal mit TBS-Puffer gewaschen. Nach der Bindung des an die *Horseradish*-Peroxidase (HRP) gekoppelten Antikörpers

erfolgte die Detektion über das Opti-4CN-Detektionskit (#1708235, BioRad) nach Herstellerangaben. Die Farbreaktion wurde im HP Scanjet (5470C, Hewlett-Packard Company) farbecht dokumentiert.

Tabelle 3.4 Die Immunoquantifizierung der untersuchten Proteine erfolgte entweder spezifisch (RpoC oder RpsB) oder via eines His-Tags. Hierfür wurden nach einem initialen Blocking-Schritt die entsprechenden Antikörper (1. AK und 2. AK) an das Protein gebunden. Überschüssige Antikörper wurden mittels eines Waschschrittes entfernt. Die Proteine konnten durch eine an den letzten gebundenen Antikörper gekoppelte Horse-Radish-Peroxidase über eine Farbreaktion mit dem Opti-4CN-Kit detektiert werden.

	His-Tag	RpoC	RpsB
Blocking	15 mL TBS-Milch	15 mL TBS-Milch	15 mL TBS-Milch
1. AK	15 µL mouse anti-his antibody, Cat.No. 2-1590-001, IBA	15 µL Mouse IgG1, Purified anti *E. coli* RNA Polymerase β Prime, NT73, purified, Biolegend	3 µL rpsB Antibody, HRP conjugated, CSB-PA08644B0Rb, Cusabio
Wash	3x15 mL TBS-Milch	3x15 mL TBS-Milch	-
2. AK	2.5 µL Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076, CST	2.5 µL Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076, CST	-
Wash	3x15 mL TBS	3x15 mL TBS	3x15 mL TBS
Detection	Opti-4CN detection kit (goat anti mouse, Biorad)	Opti-4CN detection kit (goat anti mouse, Biorad)	Opti-4CN detection kit (goat anti mouse, Biorad)

3.3.6 Densitometrische Proteinbestimmung

Die Menge an produziertem Protein konnte via der Software ImageJ aus den Intensitäten der Farbbanden aus dem Westerblot abgeschätzt werden, da die Entwicklung der Farbreaktion, wie unter anderem in der Arbeit von Melanie Knesebeck [185] gezeigt werden konnte, eine lineare Abhängigkeit von der Proteinkonzentration besitzt. Zur Quantifizierung wurde jeweils ein Standard mit bekannter Konzentration des Proteins von Interesse auf dem Gel mitgeführt und auf diesen referenziert.

3.3.7 Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 12x50 mL Minimalmedium in 250 mL Schüttelkolben aus einer Vorkultur mit 0.8 mL Vorkultur inokuliert. Je drei Kolben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten für 10 min bei 10 °C 4 500 rpm (Standzentrifuge Rotixa 50 RS, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) in 50 mL Falcons pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Pellet in circa 1 mL Restmedium resuspendiert und in ein 1.5 mL-Eppendorfreaktionsgefäß (nummeriert, 3 Tage bei 80 °C ausgedampft und gewogen) transferiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei 13 000 rpm (Mikro 20, Hettich Zentrifugen) für 10 min zentrifugiert und anschließend die Flüssigkeit vollständig entfernt. Die Biomasse wurde 3 Tage bei 80°C getrocknet und anschließend gravimetrisch vermessen. Wie in Abbildung 3.5-A gezeigt konnte eine Korrelation zwischen der Biotrockenmasse und der gemessenen OD_{600} im Tecan Platereader des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik (Tecan 2) erstellt werden. Da die

ODs messgerätspezifische Unterschiede aufweisen kann wurde für Messungen im Tecan Platereader der Professur für Systembiotechnologie eine Korrelation zum anderen Messgerät hergestellt (Abbildung 3.5-B).

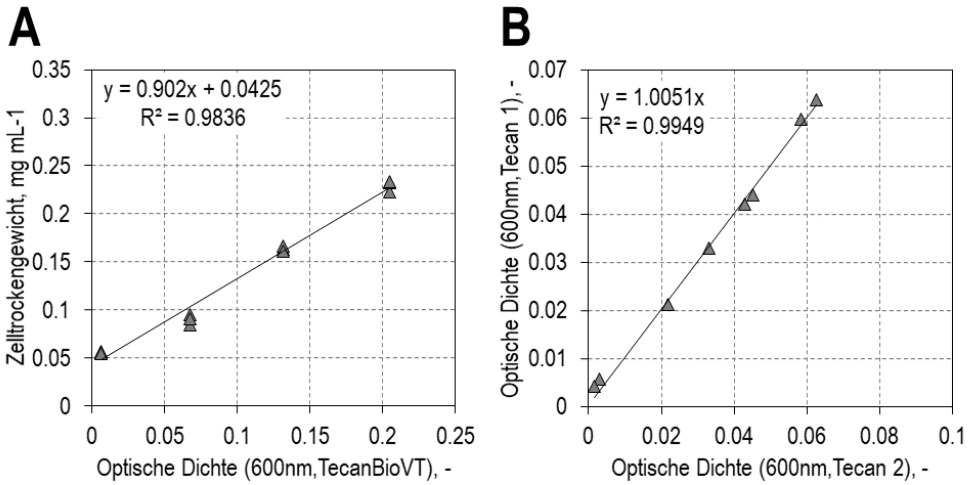


Abbildung 3.5 Um durch Messungen der OD Rückschlüsse auf das Zelltrockengewicht ziehen zu können, wurde eine Korrelation zwischen der Biotrockenmasse und der OD_{600} Messung des Tecan Plattenlesegerätes des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik (Tecan 2) erstellt (A). Zur Erfassung Messgerätspezifischer Abweichung in der Optischen Dichte wurde außerdem die beiden in dieser Arbeit verwendeten Tecan Plattenlesegeräte der Professur für Systembiotechnologie (Tecan 1) und der Professur für Bioverfahrenstechnik (Tecan 2) korreliert (B).

3.3.8 HPLC

Zur Quantifizierung extrazellulärer Metabolite über *high performance liquid chromatography* (HPLC) wurden je 1 mL Zellkulturprobe bei 8 000 g und 4 °C (Centrifuge 5418 R, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend mit 1 µL mL^{-1} EDTA (10 % (w/v)) versetzt. Vor der Analyse mittels des Agilent 1100 HPLC-Systems (Agilent) und der anschließenden Detektion per Brechungsindex wurden die Proben mit der Ausschlussgröße 0.22 µm sterilfiltirert. Proben, die nicht unmittelbar vermessen werden konnten, wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL. Die Auftrennung der Moleküle erfolgte entlang einer auf 30 °C temperierten Ionenaustausch-Säule (Shodex SH-1011; Phenomenex) bei einer Flussrate von 0.45 mL min^{-1} mit 0.5 mM H_2SO_4 als mobile Phase. Die Aufnahme der Spektren im Brechungsindexdetektor (RID) wurde bei 50 °C durchgeführt. Die isokratische Tennung der Moleküle erfolgte über einen Zeitraum von 60 min. die Peakflächen der erhaltenen Spektren konnten mit Hilfe der Software ChemStation (Agilent) händisch ausgewertet werden.

3.3.9 FACS

Die in Kapitel 4.5 verwendete Analyse intrazellulärer Fluoreszenzproteine wurde mittels des Durchflusszytometers BioRad 3S durchgeführt. Die Proben wurden in Corning™ Falcon™ Round-Bottom Polystyrene Röhrchen transferiert und auf Eis gehalten, um den Einfluss von Verzögerungen während des Messens zu minimieren. Vor den eignetlichen Messungen musste das Instrument einem 20-minütigem Aufwärmprozess, sowie eine Qualitätskontrolle durchlaufen. Nach dem Start der ProSort™ Software wurde der Initationsprozess durch den *Start-up-Button* aktiviert. Der Qualitätstest wurde in regelmäßigen Abständen durchgeführt, um die Qualität des Sortierprozesses zu sichern. Hierfür wurden 8 Tropfen der ProLine™ Universal Calibration Beads (#1451086) geladen und durch Aktivieren des QC-Buttons der

Kalibrierungsprozess gestartet. Um eine hochwertige Messung zu erhalten sollte eine maximale Partikelmenge von 5 000 Events pro Sekunde nicht überschritten werden.

Tabelle 3.5 Volteinstellungen zur Partikelanalyse im BioRad 3S Cell-Sorter.

Parameter	Spannung, V
FSC	506
SSC	288
FL1	721
FL2	522
FL3	610
FL4	383

Um den Fokus auf die zu analysierenden Zellen zu legen wurden in dieser Arbeit Partikelverunreinugungen durch die Verwendung eines Schwellenwertes von der Analyse ausgeschlossen. Hierfür konnte der Parameter FSC (*forward scatter*), der hauptsächlich durch die Größe der Partikel beeinflusst wird, herangezogen werden. Das zu verursachende Minimalsignal wurde auf einen Wert von 1.47 gesetzt. Außerdem wurde, um ein sauberes Messsignal zu erhalten, das Medium vor der Kultivierung mit einer Ausschlussgröße von 0.22 µm steril filtriert. Zur Vermessung der Partikel wurde das Spannungsfeld im Messgerät mit den in Tabelle 3.5 gelisteten Einstellungen für jeden Analysekanal justiert. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 0.5 bis 1 mL. Die sortierten Zellen wurden in 0.5 mL sterilem PBS gesammelt. Nach dem Einschub des Probenfachs in die Startposition, wurden Bereiche mit Zieleigenschaften definiert. In dieser Arbeit konnten Zellen mit der Zugehörigkeit zu zwei Bereichen sortiert werden (Gate R1: FL3-Height [$4 \cdot 10^1$; 10^2], sortiert nach links; Gate R2: FL3-Height [$3 \cdot 10^2$; $2 \cdot 10^3$], sortiert nach rechts). Die entsprechenden Konditionen des Sortierprozesses wurden durch den *sort-logic-Button* ausgewählt. Um eine zu große Zellmenge zu vermeiden, wurde außerdem die Auswahl ‚*prevent overflow*' getroffen. Maximal 50 000 Zellen wurden pro Röhrchen sortiert. Als Fokus der Sortierung wurde der Modus ‚*purity*' gewählt.

3.3.10 NMR

Die in Kapitel 4.4.1 analysierten extrazellulären Metabolite wurden via H-NMR von der Arbeitsgruppe METASYS unter der Leitung von Fabien Letisse am INSA in Toulouse vermessen. Die Proben wurden unmittelbar nach der Probennahme bei 4 °C und 8 000 g für 10 min (Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S-R) zentrifugiert, sterilfiltriert (0.2 µm) und der Überstand auf -80 °C bis zum Versand gelagert. Der Versand erfolgte über die Firma FedEx mit Trockeneis.

3.4 Kultivierung

In dieser Arbeit wurde die Anzucht der verwendeten Inokula, sowie die Vermehrung von Zellen zum Zweck der Plasmidherstellung in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, Anhang A.4) durchgeführt. Die SOC-Variation des Mediums wurde zur Unterstützung stark beanspruchter Zellen mit den in Anhang A.4 gelisteten Medienkomponenten supplementiert. Für alle definiert durchgeführten Kultivierung im Minimalmedium wurde auf ein gleiches Prozedere zurückgegriffen. Jeweils eine Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes von Interesse wurde für circa 8 h in 5 mL Luria-Betani (LB) Medium bei 37 °C herangezogen. Antibiotika wurden in jedem Kultivierungsschritt plasmidspezifisch zugesetzt. 50 µL dieser exponentiell wachsenden Zellen wurden in 5 mL Minimalmedium überimpft. Um die Kulturen, die unterschiedlich lange lag-Phasen aufweisen können zu synchronisieren, wurden diese Zwischenkulturen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Um eine vitale Vorkultur zu erhalten wurden abermals 5 mL frisches Minimalmedium

mit einer OD_{600} von 0.05 der adaptieren Zwischenkulturen inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm bei 5 cm Exzentrizität kultiviert. Ausgehend von dieser Starterkultur konnten Kultivierungen in den Maßstäben 200 µl, 12 mL, 50 mL und 1.5 L durchgeführt werden. Für Satzkultivierungen wurde standardmäßig eine Glucosekonzentration von 20 mM im Reaktionsgefäß vorgelegt.

3.4.1 Satzkultivierung in Mikrotiterplatten

Um einen höheren Durchsatz zu erreichen, konnten Kultivierungen in 96-well Mikrotiterplatten (F-bottom, schwarz mit transparentem Boden, BRANDplates® pureGrade™S) durchgeführt werden. Sämtliche in dieser Arbeit gezeigten Daten, welche das dBroccoli-vermittelete RNA-Signal betrachten, wurden in diesem Maßstab durchgeführt. Hierfür wurde eine initiale OD_{600} von 0.04 in Minimalmedium eingestellt. Jeweils 100 µL dieser Verdünnung wurden zu 100 µL vorgelegtem Medium, in welchem die gewünschten Kultivierungsadditve wie DFHBI-1T (dBroccoli-Farbstoff, Endkonzentration 200 µM in DMSO) oder Antibiotikum bereits zugesetzt waren, zugegeben. Um Ungenauigkeiten zu minimieren wurde diese farbstoffhaltiges Medienvorlage in einem Masteransatz gemischt und auf die Wells verteilt. Effekte des Lösemittels DMSO konnten im direkten Vergleich durch die Zugabe von reinem DMSO an Stelle des Farbstoffes mit einbezogen werden. Nach einer kurzen Beobachtungsphase (in der Regel 2h) um zum einen den Eintritt in die exponentielle Phase sicherzustellen und zum anderen den Einfluss der Induktion auf das Wachstum zu analysieren, wurden alle Wells mit 1.5 mM Induktor (m-Toluylsäure, p-Toluylsäure oder 3-Chlorobenzoesäure gelöst in DMSO) oder einem äquivalenten Volumen an Lösungsmittel induziert. Wachstum und Fluoreszenz wurden danach weiter vermessen. Die Kulturen wurden im Plattenlesegerät Infinite 200 (Tecan) bei 37 °C in den Wells der Mikrotiterplatten inkubiert und wurden in 10-Minuten-Intervallen hinsichtlich Fluoreszenz[19] und OD[20] vermessen. Nach jeder Messung wurde die Platte für 240 s geschüttelt (Modus: Orbital, Amplitude: 3 mm, Frequenz: 44.3 rpm). Im Falle der in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Abbruchversuche wurde vor dem Erreichen der stationären Phase 2 µL einer 2 mg mL^{-1} haltigen Thiolutinlösung (gelöst in DMSO) mit einer Endkonzentration von 0.2-20 µg mL^{-1} Thiolutin oder 68 µg mL^{-1} Chloramphenicol zugegeben.

Für Wachstumsversuche mit der bei Tom Ellis erstellten Bibliothek wurden die Vorkulturen mit der jeweiligen Temperatur (30 °C und 37 °C) und dem jeweiligen Zucker (Glycerin und Fructose) in 5 mL M9-Medium (0.34 mg mL^{-1} Thiamin, 0.2 % (w/v) Casaminosäuren, 5×M9-Salz [Merk], 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.4 % (w/v) C-Quelle, 34 µg mL^{-1} Chloramphenicol) über Nacht angezogen. Da der pAraBAD-Promotor durch einige Substrate beeinflusst werden kann, wurde Fructose als Standardzucker verwendet. Um die Stämme unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wurde Glycerin als alternatives Substrat verwendet. Nach erreichen der stationären Phase wurde 1 mL vorgewärmtes M9-Medium mit 20 µL der Übernachtkulturen inokuliert. Die Zellen wurden in einem Schüttelinkubator eine Stunde bei der jeweiligen Temperatur mit 250 rpm inkubiert. Danach wurden 2x200 µL pro Kultur in die inneren Wells einer 96-Well-Platte transferiert (die äußeren Reihen wurden mit M9 gefüllt, um Veersunstungseffekten entgegenzuwirken). Ein interner Fluoreszenzstandard (10 nM Fluorescine) wurde jeweils in der Vertiefung G12 mitgeführt. Die Platten wurden mit einer Breathe-Easy® Dichtungsmembran (Z380059, Sigma) verschlossen. Um zu verifizieren, dass sich Zellen in der exponentiellen Phase

[19] grün: 485/520 nm, rot: 585/619 nm, Exzitations-Bandbreite: 9 nm, Emissions-Bandbreite: 20 nm, Lesemodus: Top, Verzögerungszeit: 0 µs, Integrationszeit: 20 µs, Anzahl an Auslesen: 25, Verweilszeit: 0 ms, Verstärkungswert: 100

[20] Wellenlänge: 600 nm, Bandbreite: 9 nm, Anzahl an Auslesen: 25, Verweilzeit: 0 ms

befinden, wurde die Platte eine Stunde lang im Bio-Tek Synergy HT-Plattenlesegerät gemessen. Die Proben wurden alle 10 Minuten mit einer normalen Lesegeschwindigkeit gemessen[21]. Nach der Messung folgte eine 5-minütige, langsame Schüttelzeit. Nach dieser Stunde wurde jede Vertiefung mit 4 µL einer 10 %-igen (w/v) Arabinoselösung induziert, erneut verschlossen und für weitere 4 Stunden gemessen.

3.4.2 Satzkultivierung im bioREACTOR48

Im bioREACTOR48 konnten bis zu 48 Kultivierungen mit optimalem Sauerstoffeintrag unter Verwendung von Einwegbioreaktoren (PreSens, Regensburg, Deutschland, Abbildung 3.6-C) aus Polystyrol mit Strömungsbrechern durchgeführt werden. Zur *on-line* Analyse des pH-Wertes sowie der Gelöstsauerstoffkonzentration befinden sich jeweils ein optisch auslesbarer pH- sowie ein O_2-Sensor am Boden dieser Miniaturreaktoren. Die Begasung wurde durch eine Hohlachse, auf welcher die gasinduzierten Rührorgane gelagert sind, gewährleistet [190]. Der Leistungseintrag erfolgte bei 2800 rpm. Die Rührorgane sind mit zwei magnetisch induktiven Kernen ausgestattet und werden über ein Magnetfeld angetrieben.

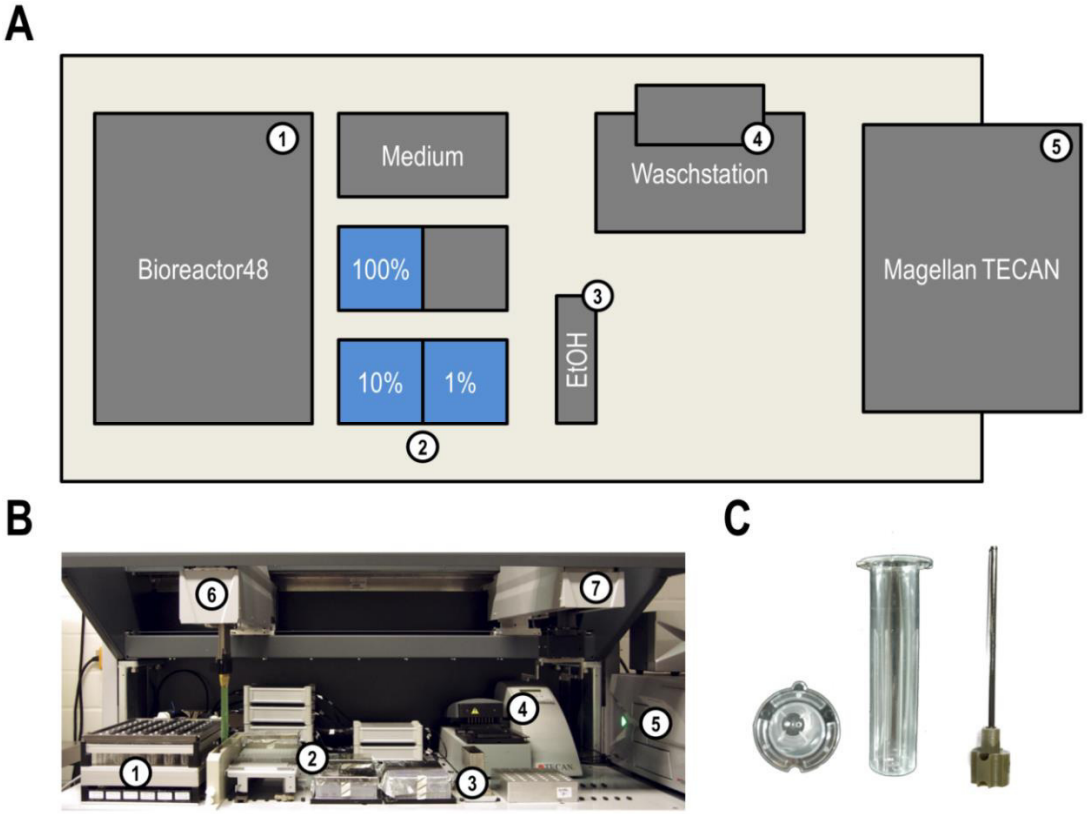


Abbildung 3.6 Kultivierungen im bioREACTOR48 (1) wurden mittels des Laborroboters Genesis Workstation 150 (TECAN, Männedorf, Schweiz) automatisiert. Die Probennahme erfolgte über den Pipettierarm (6). Über diesen konnten die Proben im Vorlagebehälterbereich (2), in verschiedenen Verdünnungsstufen aufbereitet werden, welche in der schematischen Darstellung (A) in blau dargestellt sind. Wie im Foto (B) zu sehen, konnten über den Greifarm (7) die probenhaltigen Mikrotiterplatten zum Messgerät (5) transportiert und anschließend in der Waschstation (4) für eine erneute Probenname zur Verfügung gestellt werden. Der Pipettierarm (6) wurde nach jeder Probennahme in der Waschstation (3) desinfiziert. Kultiviert wurde in Einwegbioreaktoren mit Strömungsbrechern (C). Der Leistungseintrag erfolgte über Gas-induzierte Rührorgane (C).

[21] Wellenlängen: 600, 700; Anregung: 485/20, Emission: 528/20, Optik: Unten, Verstärkung: 60; Anregung: 590/20, Emission: 645/40 , Optik: Unten, Verstärkung: 60

Die Probennahme der skalierbaren Kultivierungen wurden mit Hilfe des Laborroboters Genesis Workstation 150 (TECAN, Männedorf, Schweiz) automatisiert. Die Integration des Blockes, sowie die Bereitstellung der Probenbehälter und die individuelle Ansteuerung des Pipettier- und Greifarmes erfolgte über die TECAN Software Gemini™. Die Prozesskomponenten wurden, wie schematisch in Abbildung 3.6-A und B dargestellt, organisiert. Die Prozesskontrolle, die Dokumentation und die Probennahmen wurden von der Prozessleitsoftware FedBatch XP koordiniert. Das Arbeitsvolumen in den Reaktionsgefäßen, welche eine Höhe von 86 mm und einen leicht konisch zulaufenden Innendurchmesser von 22.6 mm am Boden des Gefäßes haben, betrug 12 mL. Vorgelegt wurden 10.8 mL Minimalmedium mit 0.1 % Antischaum (Antifoam 204, Sigma-Aldrich). Induktoren, Antibiotika und Farbstoffe wurden nach Bedarf mit vorgelegt. Induziert wurde mit 1.2 mL der in Kapitel 3.4 eingangs beschriebenen Vorkultur. Begast wurde mit Luft und einer Rate von 228 L h^{-1} (4.75 L h^{-1} pro Reaktor). Um Verdunstungseffekte zu minimieren wurde zum einen die Luft durch ein Wasserreservoir geführt und mit Feuchtigkeit gesättigt, zum anderen betrug die Temperatur im Kopfraum lediglich 20 °C. Die Manteltemperierung erfolgte auf 37 °C. Die Probennahme wurde in periodischen Intervallen von 1.5 h durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 800 µL aus den Reaktoren entnommen. Die Vermessung der mit 1x-Minimalmediumsalzen verdünnten Proben erfolgte im Tecan 2 Plattenlesegerät für die Verdünnungsstufen 10 % und 1 %. Bestimmt wurde neben der Fluoreszenz[22] auch die OD[23]. 200 µL der Proben wurden für HPLC-Analysen (Kapitel 3.3.8) aufbereitet. Um derart geringe Volumina zu vermessen wurde das Fassungsvermögen der Analysegefäße (Macherey-Nagel, Vial N9-1.5, GW, k, 11.6x32, flach, SF, Art-Nr: 702283) mittels eines Einsatzes (Macherey-Nagel, Insert weite Ö-0.3, k, 6x31, flach, Art-Nr: 702825) reduziert.

3.4.3 Satzkultivierung im Schüttelkolben

Kultivierungen im Schüttelkolben wurden standardmäßig in 250 mL DURAN® Kulturkolben (Erlenmeyerform, #2177136, Duran) ohne Strömungsbrecher mit einem Füllstand von 50 mL, um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag zu gewährleisten, durchgeführt. Die Start OD_{600} betrug 0.05, wobei die Induktion mit 1.5 mM Induktor von Beginn an erfolgte. Die Stämme wurden bei 37 °C und 250 rpm bei 5 cm Exzentrizität im Infors Multitron Schüttler kultiviert. Die Probennahme erfolgte in periodischen Intervallen von 1.5 h. Entnommen wurden jeweils 1.5 mL, von denen 200 µL zur Analyse der optischen Eigenschaften[24] der Kultur im Tecan Plattenlesegerät herangezogen wurden. Der Überstand von 1 mL der Kultur wurde hinsichtlich extrazellulärer Metabolite via HPLC untersucht. Probenahmen zu Zwecken der Immunoquantifizierung umfassten ein Volumen von 2 mL.

3.4.4 Satzkultivierung im Sartorius Bioreaktor 1.5L

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme im 1.5 L-Maßstab erfolgte in den parallel betreibbaren Twin-Fermentern der Firma Sartorius. Da das verwendete Minimalmedium (mit 0.1 % Antischaum, Antifoam 204, Sigma-Aldrich) - um einem Ausfallen der Salze vorzubeugen - nicht erhitzt werden konnte, wurden die im Autoklav (Systec VX-150) sterilisierten Reaktoren unter der Sterilbank mit den Medienkomponenten befüllt. Die Temperierung erfolgte über einen beheizten

[22] grün: 485/520 nm, rot: 585/619 nm, Exzitations-Bandbreite: 9 nm, Emissions-Bandbreite: 20 nm, Lesemodus: Top, Verzögerungszeit: 0 µs, Integrationszeit: 20 µs, Anzahl an Auslesen: 25, Verweilszeit: 0 ms, Verstärkungswert: 100

[23] Wellenlänge: 600 nm, Bandbreite: 9 nm, Anzahl an Auslesen: 25, Verweilzeit: 0 ms

[24] Fluoreszenz grün: 485/520 nm, Fluoreszenz rot: 585/619 nm, Exzitations-Bandbreite: 9 nm, Emissions-Bandbreite: 20 nm, Lesemodus: Top, Verzögerungszeit: 0 µs, Integrationszeit: 20 µs, Anzahl an Auslesen: 25, Verweilszeit: 0 ms, Verstärkungswert: 100; OD: Wellenlänge: 600 nm, Bandbreite: 9 nm, Anzahl an Auslesen: 25, Verweilzeit: 0 ms

Wasserkreislauf im Mantel der Reaktoren bei 37 °C. Die Reaktorkerntemperatur wurde über einen externen Temperaturfühler, der über ein Blindrohr (Abbildung 3.7-A) in den Reaktor eingebracht wurde, ermittelt. Zur Regulierung des pH-Wertes auf 7.4 wurden Salpetersäure (HNO_3) sowie 25 %-ige Ammoniaklösung (NH_3) mit dem in Abbildung 3.7-E gezeigten Anschlussstutzen über Steril-Kupplungen angeschlossen. Die entsprechenden Schläuche wurden in die im Bioreaktor integrierten Schlauchpumpen eingebracht. Um das Totvolumen der Schläude zu eliminieren wurden die Lösungen bis an das Schlauchende vorgepumpt.

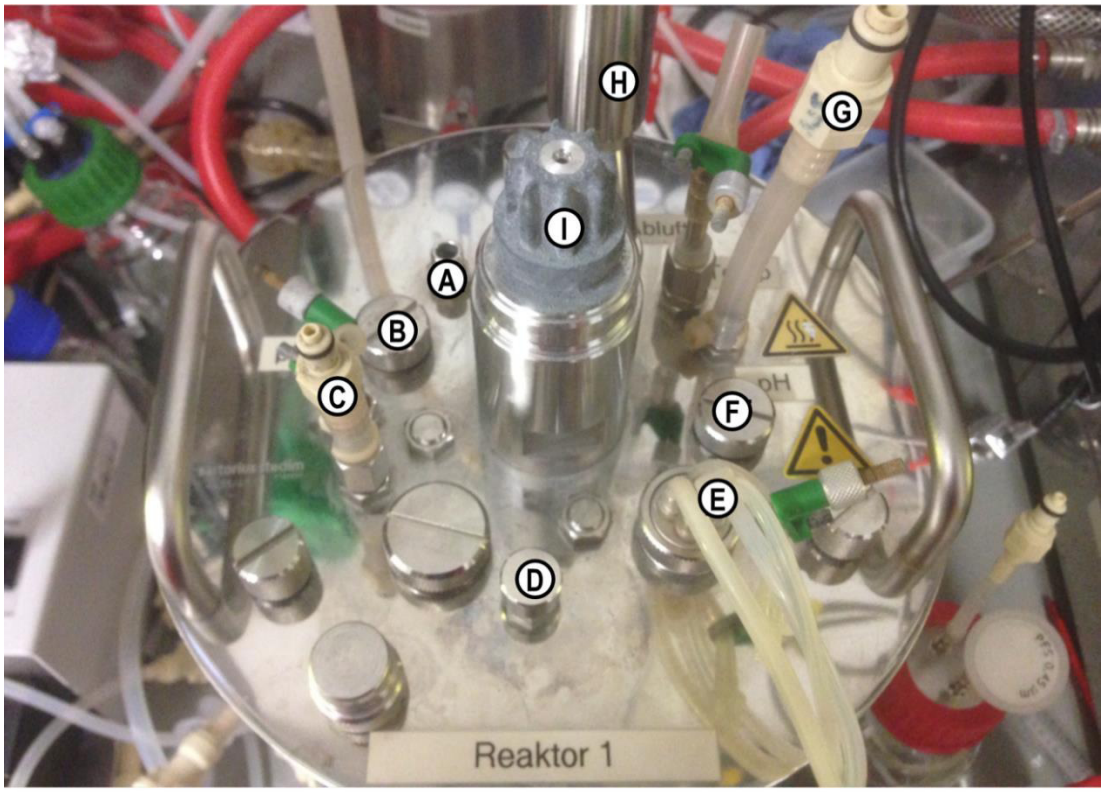


Abbildung 3.7 Der Sartorius Twin-Reaktor BIOSTAT-B verfügt über eine Vielzahl an Anschlüssen. Die in dieser Arbeit verwendeten Schnittstellen für das Thermometer (A), die pO2 Sonde (B), das Probenahmeventil (C), das Septum (D), den Säure- und Basefeed (E), die pH Sonde (F), die Zuluft (G), die Abluftkühlung (H), sowie die Motorwelle (I) können der Abbildung nach von Poschinger [190] und Stotz [191] entnommen werden

Die pH-Sonden (Abbildung 3.7-F) und die pO_2-Sonden (Abbildung 3.7-B) wurden mit 70 %-igem Ethanol sterilisert, in den Reaktor eingebaut und über die Prozessleitsoftware kalibriert. Als Zuluft wurde die normale Raumluft mit einer Begasungsrate von 2.64 L min^{-1} über einen Sterilfilter und ein Wasserreservoir zur Minimierung von Verdunstungseffekten über den in Abbildung 3.7-G gezeigten Anschluss eingebracht. Der CO_2-Gehalt der Abluft wurde mittels einer der Abluftkühlung (Abbildung 3.7-H) und einer Schaumfalle nachgeschalteten Abgasanalytik ermittelt. Der Sechsblatt-Rushton-Impeller wurde von einem auf die Motorwelle (Abbildung 3.7-I) aufgesetzten Motorblock bei 800 rpm betrieben. Additive, wie Induktoren oder zusätzliches Antischaummittel, aber auch das Inokulum konnten während des Prozesses über das Septum (Abbildung 3.7-D) zugegeben werden. Die *on-line* Datenerhebung wurde mittels der Software BioPAT MFCS (Sartorius) protokolliert. Die Proben wurden in 1.5 h Intervallen über ein an das Probenahmenventil angebrachtes T-Schlauchkonstrukt entnommen werden. Das T-Stück bestand aus mit einem Ventil, welches sowohl an eine Probennahmespritze als auch an eine über einen Sterilfilter gekoppelte, zweite Spritze an den Reaktor angeschlossen war. Durch das sterile Einbringen von Luft über die zweite Spritze konnte das Ansaugen der Probe sowie eine

Rückentleerung des Totvolumes in den Reaktor durchgeführt werden. Inokuliert wurde mit einer OD_{600} von 0.05. Die Induktion erfolgte wie im Schüttelkolben von Beginn der Kultivierung an. 5-10 mL Probe wurden zu einer optischen Analyse im Tecan 1 Plattenlesegerät sowie zur Bestimmung der extrazellulären Komponenten im Überstand verwendet.

3.4.5 Zulaufverfahren im Schüttelkolben

Um im Schüttelkolben unterschiedliche Wachstumsraten zu realisieren wurde ein System implementiert, welches die exponentielle Zugabe von Substrat ermöglicht. Diese LEGO Mindstorms basierte Spritzenpumpe [191] ermöglicht das Einstellen des Wachstums über eine gezielte Kohlenstofflimitierung. Die im Folgenden beschriebene Herleitung zur Erstellung eines exponentiellen Dosierprofiles ist in der Veröffentlichung [191] ebenfalls nachzuvollziehen.

Zur Berechnung des dosierten Gesamtvolumens V_F zum Zeitpunkt t konnte mittels einer Integration der Flussrate $q_{in}(t)$ die Gleichungen 3.1-A erhalten werden. Als Alternative kann dies im Falle der Spritzenpumpe außerdem als die Anzahl an Grad-Gesamtumdrehungen rot des Motors formuliert werden (Gleichung 3.1-B, Herleitung der Gleichungen in Anhang A.3.2). Zur Umrechnung werden die Übersetzung gdf, die Rotation pro mm-Strecke r_l und die spritzenspezifische Strecke pro Volumen l_V benötigt.

$$V_F(t) = \int_0^t q_{in}\,(t)dt = \frac{V_R \cdot c_{X0}}{Y_{XS} \cdot c_{S0}} \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1) \qquad 3.1\text{-A}$$

$$rot = \frac{V_R \cdot c_{X0}}{Y_{XS} \cdot c_{s0}} \cdot (e^{\mu_{set} \cdot t} - 1) \cdot gdf \cdot r_l \cdot l_V \qquad 3.1\text{-B}$$

Wie im Manuskript [191] gezeigt, wurde die Substratdosierung mittels eines oszillierenden Feeding-Profils durchgeführt. Da die Abweichungen der Rotation vom Sollwert allerdings durch das MATLAB-Skript innerhalb von Sekunden korrigiert wurden, ist anzunehmen, dass diese Pulsation in der Medienbereitstellung vernachlässigbar ist, da Anpassungen des zellulären Metabolismus in einer größeren Zeitspanne stattfinden.

Die Dosiereinheit wurde wie in [191] näher beschrieben mit drei Spritzen bestückt, welche die C-Quelle Glucose enthielten. Zur Steuerung des Profils wurde ein MATLAB-Skript (Anhang A.3.3) verwendet, um die Prozessparameter in Rotation und folglich in dosiertes Substrat zu übersetzen. Die Kultivierung erfolgte wie im Satzverfahren in 250 mL DURAN® Kulturkolben (Erlenmeyerform, #2177136, Duran) ohne Strömungsbrecher mit einem Füllstand von 50 mL. Die Kolben wurden mit einem Cellulosestopfen verschlossen. Die Stopfen wurden mit je zwei Kanülen (Luer-Lock-Anschluss, 1.0x200 mm, neoLab) durchstochen, mit Alufolie abgedeckt und autoklaviert. Die beiden Kanülen ermöglichen zum einen das geförderte Substrat unmittelbar ins Medium zu dosieren und zum anderen eine einfache Probennahme. Die sterilen Reaktionsgefäße wurden mit 50 mL Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle befüllt und zu einer OD_{600} von 0.05 inokuliert. Die Dosiereinheit wurde im Schüttelinkubator fixiert und das Substrat wurde über die Kanülen direkt in das Medium dosiert. Es wurden Wachstumsraten von 0.1 bis 0.4 h^{-1} eingestellt, die durch eine Beprobung in 1.5 h-Intervallen verifiziert wurden. Auch hier wurden die Proben im Tecan 1 und via HPLC vermessen.

3.5 Erhebung der Dynamiken im Kultivierungssystem

Konzentrationsänderungen über die Zeit bezeichnet man als Raten. Um die verschiedenen Dynamiken als solche zu erfassen, ist es wichtig nicht nur die Einflussfaktoren auf den Parameter zu kennen, sondern auch die Komponenten auf einer Zeitskala einordnen zu können. Die zeitliche

Entwicklung eines Systems kann über Differenzialgleichungen ausgedrückt werden. Im Folgenden werden die Kinetiken der Hauptkomponenten zellulärer Abläufe als gewöhnliche Differenzialgleichungen näher beschrieben.

3.5.1 Biomasse

Die Beschreibung der Biomasseentwicklung über die Zeit t besitzt eine Abhängigkeit von der aktuellen Zellmasse m_X und der spezifischen Wachstumsrate μ. Mit dieser Rate wird neue Zellmasse generiert beziehungsweise bei konstantem Volumen eine andere Biomassekonzentration c_X. Löst man die zugehörige Differenzialgleichung 3.2-A, dann kann die Wachstumsrate der Steigung der logarithmierten Biomasse über die Zeit entnommen werden (Gleichung 3.2-B), wenn diese als konstant angenommen wird.

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \qquad 3.2\text{-A}$$

$$\mu = \frac{\ln c_X - \ln c_{X0}}{t - t_0} \qquad 3.2\text{-B}$$

3.5.2 Substrataufnahme bzw Produktbildung

Betrachtet man zellexterne Metabolitkonzentrationen, dann hängen die Änderung der Konzentrationen über die Zeit von der Menge der zur Verfügung stehenden Enzyme und der Geschwindigkeit der Reaktionen ab. Da es sich bei zellexternen Metaboliten in der Regel um stabile Endprodukte handelt, kann der Abbau vernachlässigt werden. Befinden sich die katalysierenden Enzyme im Gleichgewicht, dann kann die Reaktion abhängig von der Biomasse c_X und der Bildungsrate r_A betrachtet werden (Gleichung 3.3-A). Da sich in diesem Fall über die Zeit nicht nur der die Konzentration des Metabolites c_A ändert, sondern auch die Biomasse selbst, muss dies bei der Berechnung der Produktionsrate berücksichtigt werden. Hier kann anstelle des Parameters c_X die Gleichung 3.2-A verwendet werden (Gleichung 3.3-B). Löst man die Differenzialgleichung, kann die Rate r_A als Steigung der Änderung der Metabolitkonzentration über die Biomasse multipliziert mit der Wachstumsrate ausgedrückt werden (Gleichung 3.3-C) [64].

$$\frac{dc_A}{dt} = r_A \cdot c_x \qquad 3.3\text{-A}$$

$$\frac{dc_A}{dt} = r_A \cdot \frac{1}{\mu} \cdot \frac{dc_x}{dt} \qquad 3.3\text{-B}$$

$$r_A = \frac{dc_A}{dt} \cdot \frac{dt}{dc_x} \cdot \mu = \frac{dc_A}{dc_x} \cdot \mu \qquad 3.3\text{-C}$$

3.5.3 RNA und Proteinbildung

Die Betrachtung zellinterner Prozesse gestaltet sich in der Regel komplexer. Hier lassen sich die Dynamiken aller Komponenten in der stöchiometrischen Matrix S zusammenfassen. Die Änderung aller Konzentrationen $\underline{c}$ über die Zeit t können über diese Matrix S und den Ratenvektor $\underline{r}$ beschrieben werden. Kann die Verdünnung $\mu \cdot \underline{c}$ nicht vernachlässigt werden, lässt sich die Gesamtstöchiometrie zu Gleichung 3.4 zusammenfassen.

$$\frac{d\underline{c}}{dt} = S \cdot \underline{r} - \mu \cdot \underline{c} \qquad 3.4$$

Betrachtet man eine einzelne Molekülspezies P, dann müssen aus dem Gesamtnetzwerk neben der Produktionsrate $k_{(P+)}$ auch der konzentrationsabhängige Abbau $(k_{(P-)} \cdot P)$ und die

Verdünnung des Moleküls P durch die Zellteilung beim Wachstum beachtet werden ($\mu \cdot P$) (Gleichung 3.5).

$$\frac{dP}{dt} = k_{(P+)} - k_{(P-)} \cdot P - \mu \cdot P \qquad 3.5$$

Im Falle intrazellulärer Metabolite laufen diese Reaktionen sehr schnell ab, insbesondere die Auf- und Abbauraten des Primärstoffwechsels befinden sich in einer ähnlichen Größenordnung. Befinden sich die Zellen in der exponentiellen Phase, lassen sich hinsichtlich der Metabolite sehr schnell keine absoluten Änderungen über die Zeit hinsichtlich der Konzentration messen. Dies führt dazu, dass bei mathematischen Betrachtungen die Annahme eines Fließgleichgewichts getroffen werden kann ($\frac{dP}{dt} = 0$). Betrachtet man die Moleküle mRNA, oder auch Protein, findet der Abbau langsamer, oder im Fall von Fluoreszenzproteinen im betrachteten Zeitraum auch gar nicht statt. Da die Produktion dieser Moleküle dennoch deutlich schneller abläuft als die Zellteilung kann zunächst mit einer Akkumulation der Moleküle gerechnet werden. Danach ist aber dennoch ein Gleichgewichtszustand zu erwarten.

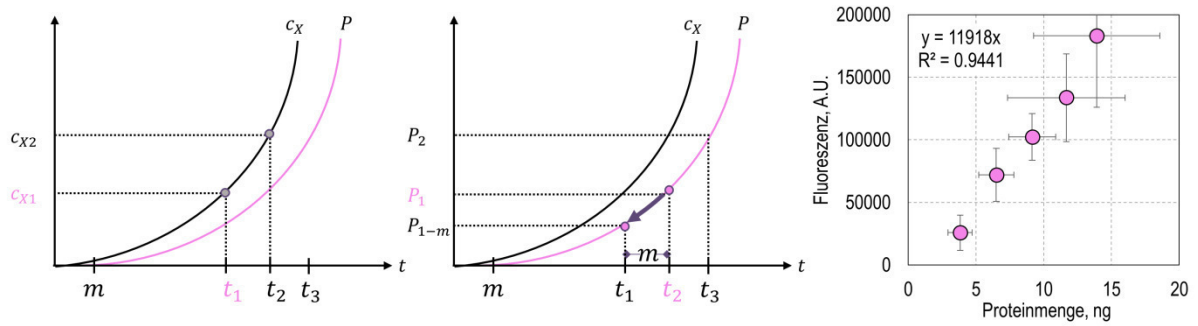


Abbildung 3.8 Die Entwicklung der Fluoreszenz P über die Zeit t kann, um die Reifungszeit m versetzt, beobachtet werden. Die zur Fluoreszenz P_1 am Zeitpunkt t_2 korrespondierende Biomasse c_{x1} muss daher aus der Entwicklung der Biomasse über die Zeit zurückgerechnet werden (links). Eine via Immunoquantifikation erstellte Korrelation ermöglicht die Umrechnung der Fluoreszenz in Proteinmenge.

Ein weiterer Aspekt bei der Proteinbildung kann die Reifungszeit sein. Im Falle fluoreszenter Proteine zum Beispiel tritt die fluoreszente Eigenschaft erst nach der vollständigen Faltung auf. Trifft man die Annahme, dass das zugehörige Proteinsignal P_1 der Biomasse c_{X1} erst um die Reifungszeit m (der für mCherry in dieser Arbeit bestimmte Wert beträgt 23.5 min) verschoben zum Zeitpunkt t_2 auftritt (Gleichung 3.6-A), muss für jedes Fluoreszenzsignal basierend auf der Wachstumsrate und der aktuellen Biotrockenmasse das Zelltrockengewicht zum Proteinbildungszeitpunkt berechnet werden(Abbildung 3.8).

$$t_2 = t_1 + m \qquad 3.6\text{-A}$$

$$c_{X1} = c_{x0} \cdot e^{\mu \cdot t_1} \qquad 3.6\text{-B}$$

$$t_1 = ln\frac{c_{X1}}{c_{x0}} \cdot \frac{1}{\mu} \qquad 3.6\text{-C}$$

Drückt man t_1, wie in Gleichung 3.6-A bis C gezeigt als Funktion des Zellgewichtes c_{X1}aus, dann lässt sich in einem nächsten, Schritt (Gleichung 3.7-A bis C) das zum Zeitpunkt der Proteinbildung tatsächliche Zellgewicht c_{X1} durch das Zellgewicht c_{X2} am analysierten Zeitpunkt t_2 ausdrücken.

$$c_{X2} = c_{x0} \cdot e^{\mu \cdot t_2} = c_{x0} \cdot e^{\mu \cdot (t_1 + m)} = c_{x0} \cdot e^{\mu \cdot \left(ln\frac{c_{X1}}{c_{x0}} \cdot \frac{1}{\mu} + m\right)} \qquad 3.7\text{-A}$$

$$c_{X2} = c_{x0} \cdot e^{\mu \cdot \left(ln\frac{c_{X1}.1}{c_{x0}\ \mu}\right)} \cdot e^{\mu \cdot (m)} = c_{x0} \cdot \frac{c_{X1}}{c_{x0}} \cdot e^{\mu \cdot m} \qquad 3.7\text{-B}$$

$$c_{X1} = c_{X2} \cdot (e^{\mu \cdot m})^{-1} \qquad 3.7\text{-C}$$

Bei den in dieser Arbeit analysierten Versuchsansätzen für Fluoreszenzdynamiken wurde die Biomassekonzentration vor einer weiteren Betrachtung durch die Gleichung 3.7-C korrigiert. Die Umrechnung des Fluoreszenzsignales in Proteinmenge erfolgte, wie in Abbildung 3.8 (rechts) gezeigt, über einen mittels Westernblot bestimmten Korrelationsfaktor von 11918 A.U. ng^{-1}.

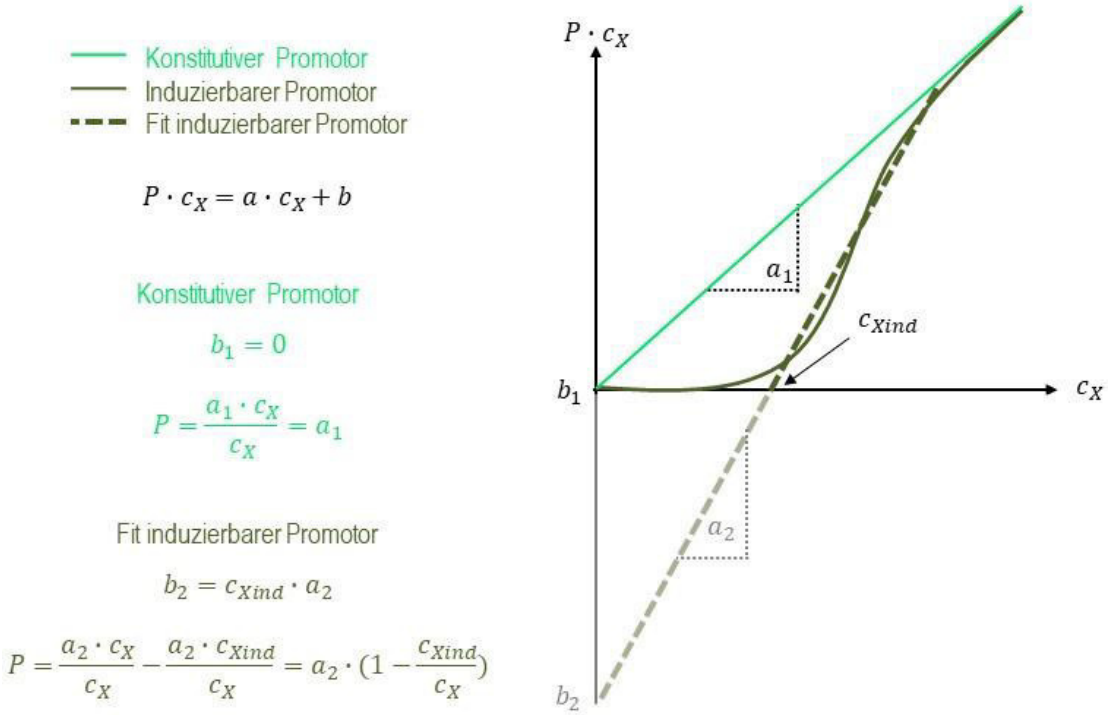


Abbildung 3.9 Die annähernd lineare Entwicklung der Gesamtfluoreszenz $P \cdot c_X$ über die Biotrockenmasse c_X kann je nach Promotor unterschiedlich beschrieben werden. Für konstitutive Promotoren kann die Molekülmenge pro Zelle P direkt als Steigung a_1 beschrieben werden (hell grün). Induzierbare Promotorsysteme können bis zum Erreichen des Fließgleichgewichtes über eine lineare Funktion, welche die x-Achse bei c_{Xind} schneidet näherungsweise beschrieben werden (dunkel grün).

Analysiert man nun die Entwicklung des Gesamtsignals des Fluoreszenzproteins P in der Kultur ($P \cdot c_x$), dann muss mit steigender Zellmasse differenziert werden, welche Art von Promotor analysiert wird. Bei der Betrachtung eines konstitutiven Promotors, kann wie in Abbildung 3.9 in hell grün gezeigt, davon ausgegangen werden, dass sich die Produktion von Versuchsbeginn an im Gleichgewicht befindet ($\frac{dP}{dt} = 0$, Gleichung 3.8-A).

$$0 = k_{(P+)} - k_{(P-)} \cdot a_1 - \mu \cdot a_1 \qquad 3.8\text{-A}$$

$$k_{(P+)} = k_{(P-)} \cdot a_1 + \mu \cdot a_1 \qquad 3.8\text{-B}$$

Außerdem kann angenommen werden, dass sich die Menge an insgesamt produziertem Protein *P* proportional zur Zellmenge verhält, die Steigung also der Menge an Protein pro Zelle entspricht (Abbildung 3.9). Basierend auf diesen Bedingungen kann für die Proteinproduktionsrate die in Gleichung 3.8-B gezeigte Abhängigkeit formuliert werden. Da bei Fluoreszenzprotein von sehr langen Halbwertszeiten bis zu 24 h und mehr [192] ausgegangen werden kann, wurde in dieser

Arbeit zur Berechnung der Proteinproduktionsrate k_{P+} die Wachstumsraten mit der Steigung a_1 multipliziert und der Abbauterm $k_{(P-)} \cdot a_1$ vernachlässigt. Analysiert man induzierbare Promotorsysteme ist zu beachten, dass davon ausgegangen wird, dass sich erst nach circa fünf Verweilzeiten τ_{hyd} in einem biologischen System ein Gleichgewicht zu erwarten ist. In der Zelle mit Wachstumsraten im Bereich bis 0.3 ($\tau_{hyd} = 1/\mu$) entspricht dies einer Dauer von 16.7 h. Um dennoch Proteinbildungsraten berechnen zu können wurde der Signalanstieg nach der Induktion, wie in Abbildung 3.9 gezeigt, durch eine lineare Funktion approximiert. Der Gültigkeitsbereich dieser Annahme umfasst den Verlauf von der Biomasse c_{Xind} am Induktionszeitpunkt bis zum Erreichen der Gleichgewichtskonzentration. Setzt man den in Abbildung 3.9 hergeleiteten Zusammenhang in die generelle Differenzialgleichung 3.5 ein (Gleichung 3.9), lässt sich die Konzentration des Moleküls P substituieren.

$$\frac{dP}{dt} = k_{(P+)} - k_{(P-)} \cdot a_2 \cdot (1 - \frac{c_{Xind}}{c_X}) - \mu \cdot a_2 \cdot (1 - \frac{c_{Xind}}{c_X}) \qquad 3.9$$

Durch das Ableiten des in Abbildung 3.9 betrachtet Zusammenhanges für induzierbare Promotoren, findet sich für den zeitlichen Verlauf der Konzentration $\frac{dP}{dt}$ die in Gleichung 3.10 gezeigte Dynamik.

$$\frac{dP}{dt} = a_2 \cdot \frac{c_{Xind}}{{c_X}^2} \cdot \frac{dc_X}{dt} = a_2 \cdot \frac{c_{Xind}}{c_X} \cdot \mu \qquad 3.10$$

Setzt man auch diese Information (Gleichung 3.10) in die Gleichung 3.5 ein (siehe Gleichung 3.11-A), dann lassen sich für $k_{(P+)}$ die in Gleichung 3.11-B und C gezeigten Zusammenhänge formulieren.

$$a_2 \cdot \mu \cdot \frac{c_{Xind}}{c_X} = k_{(P+)} - k_{(P-)} \cdot a_2 \cdot (1 - \frac{c_{Xind}}{c_X}) - \mu \cdot a_2 \cdot (1 - \frac{c_{Xind}}{c_X}) \qquad 3.11\text{-A}$$

$$k_{(P+)} = a_2 \cdot \mu \cdot \frac{c_{Xind}}{c_X} + k_{(P-)} \cdot a_2 \cdot \left(1 - \frac{c_{Xind}}{c_X}\right) + \mu \cdot a_2 \cdot (1 - \frac{c_{Xind}}{c_X}) \qquad 3.11\text{-B}$$

$$k_{(P+)} = k_{(P-)} \cdot a_2 \cdot \left(1 - \frac{c_{Xind}}{c_X}\right) + \mu \cdot a_2 \qquad 3.11\text{-C}$$

Für Proteine mit großen Halbwertszeiten geht der Term $k_{(P-)} \cdot a_2 \cdot \left(1 - \frac{c_{Xind}}{c_X}\right)$ gegen Null. In diesem Fall lässt sich die Proteinbildungsrate $k_{(P+)}$ bis zum Erreichen des Gleichgewichts ebenfalls als Produkt der Wachstumsrate μ und der Steigung a_2 berechnen. Je größer jedoch die Abbaurate $k_{(P-)}$ wird, desto mehr Gewicht bekommt die zum Zeitpunkt der Induktion vorliegende Biomasse. In dieser Arbeit wurde aufgrund der hohen Halbwertszeiten zur Berechnung der Bildungsraten ausschließlich auf die vereinfachte Gleichung 3.12 zurückgegriffen, die sich lediglich aus der Wachstumsrate μ und der Steigung a berechnet.

$$k_{(P+)} = \mu \cdot a \qquad 3.12$$

Generell lassen sich diese Berechnungen auch auf mRNA-Dynamiken übertragen. Da der mRNA-Abbau in der Regel deutlich schneller von statten geht, als der Proteinabbau, ist bei induzierten Systemen der Induktionszeitpunkt nicht zu vernachlässigen. In dieser Arbeit wurden vermittelt durch den RNA-Tag allerdings nicht nur sehr große Halbwertszeiten für Proteine, sondern auch für die heterologe mRNA selbst betrachtet. Aus diesem Grund konnten Bildungsraten auch ohne dass ein Gleichgewichtszustand erreicht wurde bestimmt werden.

3.5.4 Abschätzung heterologer Gleichgewichtszustände

Das Erreichen des Gleichgewichtzustandes und die Dynamik des Abbaus wurde, wie in Abbildung 3.10 gezeigt, in Abhängigkeit der Raten beschrieben. Für das Erreichen des Gleichgewichtes kann unter Berücksichtigung der Auf- und Abbauraten (k_{M+}, k_{M-}) sowie der Verdünnung durch das Wachstum (μ) gefolgert werden, dass sich die Molekülkonzentration M dem Gleichgewichtswert $(k_{(M+)}/(k_{(M-)} + \mu))$ annähert. Es konnte gezeigt werden, dass das Erreichen des Halbmaximalen-Sättigungszeitpunktes mit zunehmender Halbwertszeit τ immer mehr von der Wachstumsrate abhängt. Eine ausführlichere Betrachtung dieses Zusammenhanges findet sich in Anhang A.3.5.

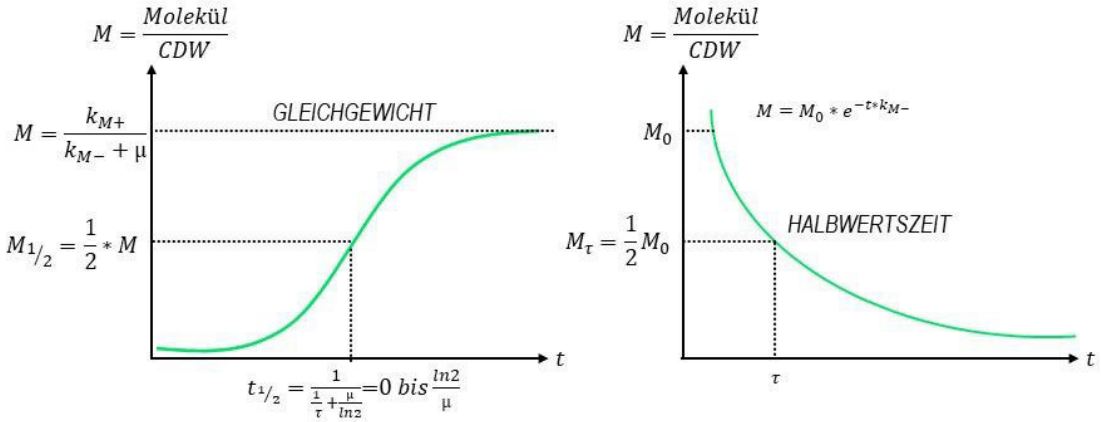


Abbildung 3.10 Betrachtet man die intrazellulären Dynamiken der RNA- sowie Proteinbildung kann für beide Gleichgewichtszustände unter Berücksichtigung des Aufbaus k_{M+}, Abbaus k_{M-} und der Verdünnung durch μ eine Abhängigkeit des Gleichgewichts M von diesen Raten gefunden werden (links). Bezieht man den Abbau der Moleküle (rechts) in diese Betrachtungen mit ein, kann aus der Halbwertszeit τ geschlossen werden, dass mit steigender τ hauptsächlich eine Abhängigkeit des Halbmaximalen-Sättigungszeitpunktes $t_{1/2}$ von der Wachstumsrate besteht.

3.5.5 Extraktion der grünen Fluoreszenz aus der Autofluoreszenz

Da für Wellenlängen im Bereich der grünen Fluoreszenz eine Signalkontamination durch zelluläre Komponenten auftritt, muss diese Autofluoreszenz aus dem Gesamtsignal entfernt werden. Sowohl für die durch den dBroccoli-mRNA-Tag vermittelte grüne Fluoreszenz (Anhang A.3.8) als auch für das GFP-Signal (Anhang A.3.6) wurde ein MATLAB-Skript zur Signalextraktion erstellt. In beiden Fällen wurde der OD-Fluoreszenzverlauf basierend auf einer Stammvariante ohne das dBroccoli- beziegungsweise GFP-Signal mit einer doppelt exponentiellen Funktion beschrieben. Mittels dieser so angenäherten Funktion wurde eine Vorhersage der reinen Autofluoreszenz zur jeweiligen OD und zum jeweiligen Wachstumszustand getroffen. Die Differenz zwischen der Vorhersage und der tatsächlichen Fluoreszenz wurde als dBroccoli- beziehungsweise GFP-Signal angenommen. Eine nähere Beschreibung des in dieser Arbeit erstellten MATLAB-Skriptes findet sich in Kapitel 4.1.2 und der Publikation [193].

4 Ergebnisse und Diskussion

Um die Auswirkungen der heterologen Proteinexpression auf den Organismus *E. coli* beurteilen zu können, wurde in dieser Arbeit eine heterologe Belastung, deren einzelne Komponenten (wie zum Beispiel die Antibiotikaresistenz) modular variierbar sind, ausgewählt und charakterisiert. Mittels dieses Setups konnte ein standardisiertes Expressionssystem geschaffen werden, welches es ermöglicht, die verschiedenen Einflussgrößen eines biotechnologischen Prozesses sowie die Auswirkungen der genetischen Konfiguration unabhängig voneinander zu analysieren. Hierfür wurde ein Messsystem entwickelt, welches die Dynamiken der heterologen Expression auf Transkriptions- und Translationsebene *on-line* messbar macht. Außerdem wurden Fluoreszenz-Reporterstämme erstellt, durch welche die Verfügbarkeit zellulärer Ressourcen und die generelle Kapazität des *E. coli* Stammes HMS174(DE3) visualisiert werden konnten. Des Weiteren konnte eine vergleichende, reaktionstechnische Untersuchung zur Auswirkung der Belastung auf den Metabolismus bei unterschiedlichen Prozessführungsstrategien durchgeführt werden. Nach der systemischen Beurteilung der Ausgangsstämme, wurde der Einfluss verschiedener Expressionsstärken und Proteinzusammensetzungen evaluiert.

4.1 Quantifizierung der heterologen Expression

Um heterologe Expression vergleichbar zu machen, ist ein zuverlässiges und definiertes Expressionssystem notwendig. Hierbei wurden -neben der Auswahl des Vektors- auch die verwendeten Bausteine wie die Promotorsequenz, die Ribosomenbindestelle sowie das exprimierte Protein selbst sorgfältig aufeinander abgestimmt.

4.1.1 Design des Messsystems

Da viele etablierte Plasmidsysteme wie pET28 auf Umweltisolaten basieren, sind darin oft nicht notwendige Sequenzelemente enthalten. Um die davon ausgehende Belastung zu reduzieren und eventuelle Wechselwirkungen auszuschließen, wurde in dieser Arbeit auf die synthetische Plasmidbibliothek pSEVA [79] zurückgegriffen. Diese Bibliothek ermöglicht - neben einer Auswahl an Antibiotikaresistenzen - die Verwendung unterschiedlicher Replikationsursprünge und damit einhergehend verschiedener Plasmidkopienzahlen. Um die heterologe Expression erfassen und verfolgen zu können, ist es nicht nur wichtig einen Eindruck der Transkription, sondern auch der Translation zu bekommen. Da es sich vor allem auf RNA-Ebene um schnelllebige Prozesse handelt, verbessert eine direkte und engmaschige Datenerhebung die Qualität der erhaltenen Messungen. Je nach Fragestellung können etablierte Vorgehensweisen wie qPCR oder RNASeq zwar quantitative Aussagen treffen, allerdings leidet in der Regel die Zeitauflösung unter der komplexen Probenvorbereitung und Durchführung der Experimente. Hinzu kommt, dass gerade für mRNA-Dynamiken das fehleranfällige Quenching[25] der Proben, sowie die Probenaufarbeitung zum *casus knacksus* werden können. Um zeitaufgelöste Daten zu bekommen, empfiehlt es sich daher eine *on-line* Methode zu finden, deren Auslesen nur geringfügigen Aufwand bedeutet. Das Mittel der Wahl, um Zellen nicht-invasiv beim sogenannten ‚*live cell imaging*' zu beobachten, ist in der Regel die Verwendung von Fluoreszenzreportern. Auf Proteinebene konnte schon von Chalfie *et al* [194] 1994 gezeigt werden, dass es möglich ist, den Expressionprozess durch die Verwendung von Fluoreszenzproteinen zu verfolgen. Bereits 2011 wurde von Paige *et al.* publiziert, dass RNA-Aptamere ein Fluoreszenzsignal emittieren können ohne eine zytotoxische Wirkung oder relevante Wechselwirkungen mit dem zellulären Umfeld zu

[25] Der Zustand der Probe muss möglichst sofort konserviert werden, da insbesondere kurzlebige RNAs oder die Expression stressbedingter Gene zu einer Verschiebung der RNA-Präsenz führen kann.

zeigen [195]. Filonov *et al* konnten 2014 eine RNA-Sequenz evolvieren, welche die Fluoreszenz des GFPs imitiert [160]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in dieser Arbeit das Expressions-Monitoringsystem pTRA designed [193]. Wie Abbildung 4.1 dargestellt, resultiert das pTRA Plasmid aus dem Vorläufer pSEVA641. Dieses Plasmid besitzt den pRO1600/ColE1 Replikationsursprung (*oriV*) pBR322.

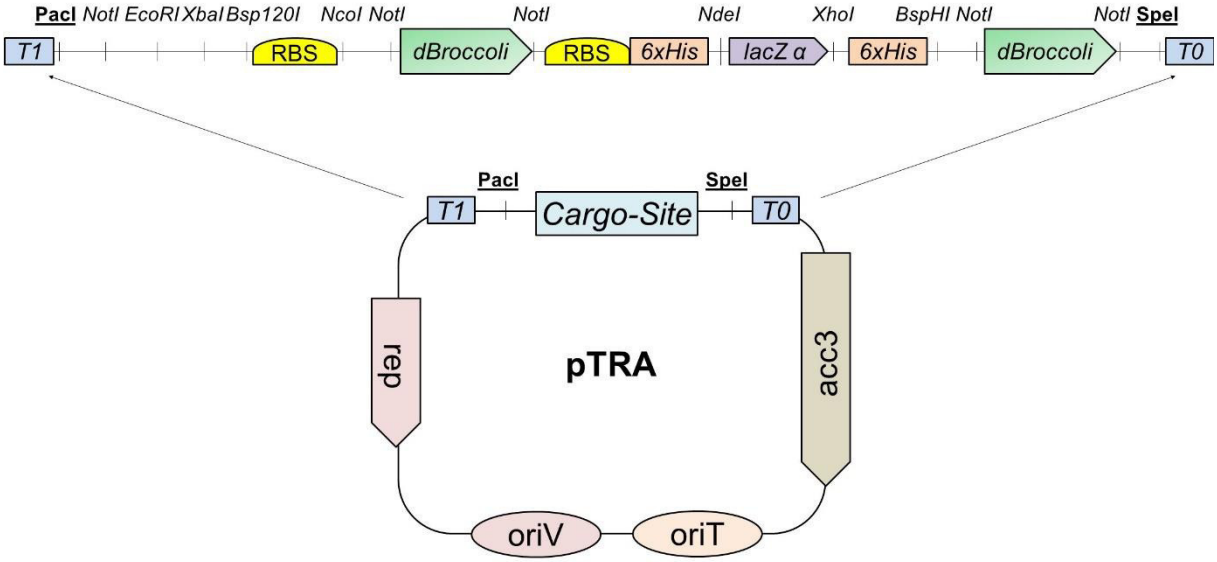


Abbildung 4.1 Das Plasmid pTRA beinhaltet in der Cargo-Site eine Multiple-Cloning-Site*. Eine spezifische Insertion des Gens von Interesse an dieser Stelle ermöglicht eine Visualisierung der Expression. Neben den Standard-Plasmidkomponenten, wie Replikationsursprung und Antibiotikaresistenz, kann ein Zielgen - je nach Insertionsort - am 5‘ oder 3‘-Ende der RNA mit einem dBroccoli-Tag versehen werden, beziehungsweise am N- oder C-Terminus des Proteins mit einem His-Tag. Durch die Ab- oder Anwesenheit des* lacZα*-Gens kann der Klonierungserfolg in* lacZα*-defizienten Stämmen mittels eines einfachen blau-weiß-Screenings überprüft werden (Abbildung nach* [193]*).*

Für pSEVA-Plasmide dieser ori-Klasse konnte nicht nur eine besonders hohe Expression, sondern auch eine geringe Varianz in der Population bezüglich der Plasmidkopienzahl über die Zeit festgestellt werden [196]. Als *Cargo-Site* wurde die in dieser Arbeit designte *Multiple-Cloning-Site* (MCS) insertiert. Diese enthält wie in Abbildung 4.1 aufgeschlüsselt neben einem auf Proteinebene N-und C-terminal-fusionierbarem His-Tag die Sequenz für den auf mRNA-Ebene 5‘- und 3‘ transkribierbaren mRNA-Tag F30-2xdBroccoli [53], [159] (im Folgenden dBroccoli). Wie in Anhang A.3.4-A dargestellt kann das GOI in sieben verschiedenen Konfigurationen mittels einer einfachen Restriktion (jeweilige dafür zu verwendende Enzyme sind hervorgehoben) über eine Vielzahl an Schnittstellkombinationen mit diesen mRNA- und Protein-Tags versehen werden. Da bei einer erfolgreichen Klonierung des GOI in das pTRA-Plasmid das Genfragment *lacZα* aus dem Plasmid entfernt wird, kann die Selektion der positiven Konstrukte über ein klassisches Blau-Weiß-Screening erfolgen[26]. Die mRNA-Tags werden auf Grund eines vorgeschalteten Stopp-Codons nicht zu Protein translatiert. Es empfiehlt sich den 234 bp langen mRNA-Tag am 3‘-Ende des Konstruktes zu wählen, da auf Grund der Sekundärstruktur eine sterische Interaktion mit der Promotorsequenz oder den Ribosomenbindestellen nicht ausgeschlossen werden kann. Das Einbringen der Promotorsequenz erfolgte je nach Zielsetzung. Über den in Anhang A.3.4-B

[26] Klonierungs-negative Kolonien *lacZα*-defizienter Stämme, die durch das Plasmid-codierte LacZα komplementiert werden, können dies durch die Hydrolyse von Gal-X zum blauen Farbstoff 5-bromo-4-chloro-indoxyl anzeigen. Klonierungs-positive Stämmen fehlt hierfür das LacZα.

abgebildeten BioBrick-Assemblierungsstandard[27] ist es möglich, mehrere heterologe Gene zu Stoffwechselwegen zu organisieren. Das Einbringen einer Promotorsequenz über die Schnittstellen *PacI* und *EcoRI* erlaubt das Arrangement der einzelnen Konstrukte in einer polycistronischen Art und Weise. Promotorsequenzen, die sich zwischen den Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *Bsp120I* befinden, können monocistronisch angeordnet werden. Für das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt wurde die Promotorsequenz XylS/Pm über die Restriktionenzyme *PacI* und *EcoRI* eingebracht. Dieser Promotor wurde auf Grund seiner schnellen Dynamik und der niedrigen, basalen Expression ausgewählt [197], [198]. Des Weiteren ist es beim XylS/Pm Promotorsystem möglich, die Expressionsstärke über die Art des Induktors zu variieren.

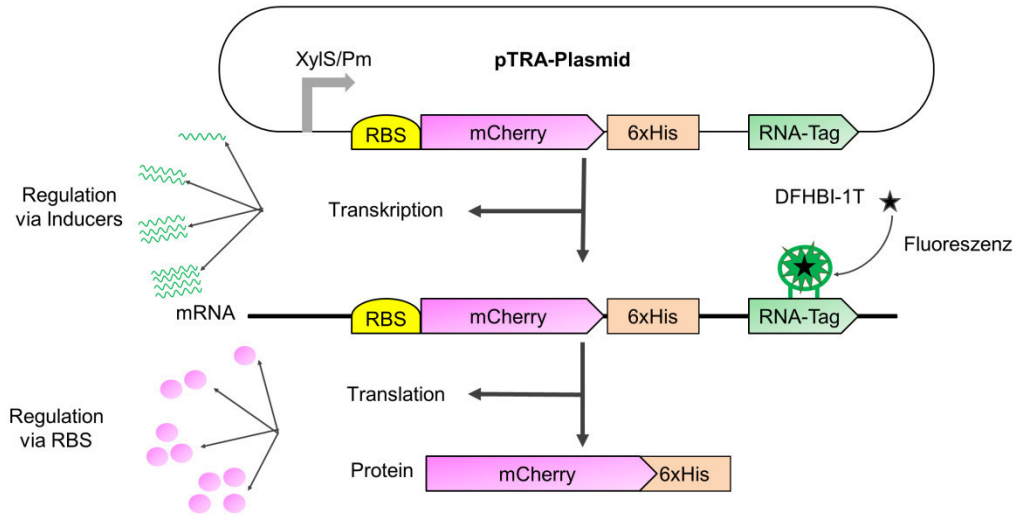


Abbildung 4.2 Das in dieser Arbeit zur systematischen Belastung hauptsächlich verwendete Plasmid pTRA-51hd setzt sich aus dem induzierbaren XylS/Pm Promotorsystem, sowie dem mit einem C-terminalen His-Tag versehenen Fluoreszenzprotein mCherry zusammen. Der dBroccoli mRNA-Tag wurde am 3'-Ende der mRNA platziert. Dieser bildet im Zusammenspiel mit dem Farbstoff DFHBI-1T ein GFP-artiges Fluoreszenzsignal aus. Die Belastung kann auf Transkriptionsebene durch die Auswahl unterschiedlicher Induktoren, oder auf Translationsebene durch die Verwendung verschiedener Ribosomenbindestellen variiert werden (Abbildung entnommen aus [193]).

Um die Dynamik der Proteinbildung zu visualisieren, wurde als repräsentatives GOI das Fluoreszenzprotein mCherry ausgewählt und via der Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* in das pTRA-Plasmid eingebracht. Eine Variation auf Translationsebene wurde durch fünf unterschiedliche Ribosomenbindestellen ermöglicht. Wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt, konnte so ein ganzheitliches, fluoreszenzbasiertes Messsystem zur Erfassung der transkriptionellen, sowie translationalen Aktivität einer Zelle erstellt werden. Neben der Quantifizierung der Proteinmenge mittels immunologischem Nachweis des His-Tags, konnte an das Standardkonstrukt - bestehend aus einem induzierbaren Promotorsystem und dem Fluoreszenzprotein mCherry - ein RNA-Tag angebracht werden, der in Kombination mit dem zellmembrangängigen Farbstoff DFHBI-1T [159]

[27] Die Kombination der Schnittstellenabfolge *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* und *PstI* ermöglicht die repetitive Aneinanderreihung genetischer Konstrukte durch die Auslöschung der Schnittstellen nach der Ligation. Nähere Informationen unter http://parts.igem.org/Main_Page

ebenfalls ein Fluoreszenzsignal emittiert. Eine nähere Beschreibung des Plasmides pTRA als Reporter für intrazelluläre Dynamiken wurde im Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht [193].

4.1.2 Das heterologe mRNA-Signal

Um das DFHBI-1T vermittelte, mRNA-Signal des dBroccoli-Tags zu quantifizieren wurden die Proben im Plattenlesegerät (Infinite 200, Tecan) analysiert. Die Experimente wurden standardmäßig mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 485 nm angeregt und das von der Probe emittierte Licht bei 520 nm erfasst. Die Auswahl der Wellenlängen erfolgte in der Absicht, nicht nur die Hintergrundfluoreszenz im Medium zu minimieren, sondern auch um das gleiche Mess-Setup für GFP-basierte Reporter verwenden zu können. Fluoreszenz-beeinflussende Variablen wie Temperatur oder pH konnten während der Messungen annähernd konstant gehalten werden. Änderungen innerhalb des Setups wurden auf die Zellkonzentration oder auf die Stammkonfiguration beschränkt. Da nicht nur eine starke Autofluoreszenz der Zellen, sondern auch eine Eigenfluoreszenz des Farbstoffes DFHBI-1T festgestellt werden konnte, wurde die Interaktion des Farbstoffes mit *E. coli* HMS174(DE3) Wildtyp Zellen überprüft. Außerdem wurde das Autofluoreszenzverhalten verschiedener Stammkonfigurationen hinsichtlich ihrer Varianz bewertet.

Um Wechselwirkungen zwischen der Zellkonzentration und dem Farbstoff aufdecken zu können, wurden verschiedene Verdünnungsstufen einer exponentiell wachsenden Wildtyp *E. coli* HMS174(DE3) Kultur mit und ohne Farbstoff hinsichtlich ihrer Autofluoreszenz vermessen. Wie in Abbildung 4.3-A gezeigt, konnte bei Zellen ohne Farbstoff eine nicht lineare Korrelation zwischen dem Zelltrockengewicht und der Autofluoreszenz gemessen werden. Bei Zugabe des Farbstoffes DFHBI-1T (Konzentration 400 µM) wurde eine generelle Erhöhung des Signals beobachtet. Mit zunehmender Zellmenge wird dieses Plus an Farbstofffluoreszenz allerdings gequencht (Abbildung 4.3-A). Bis zu einer OD von circa 0.1 konnte beobachtet werden, dass die Abnahme der Fluoreszenz durch das Quenching größer war, als die Zunahme der Autofluoreszenz. Ab einer OD von 0.1 kehrt sich dieser Effekt um. Wie in Abbildung 4.3-B dargestellt, wurden die Verläufe der Fluoreszenz pro Zelltrockengewicht über die Zeit über drei biologische Replikate des mit dem pTRA-Plasmid beladenen Stammes gemittelt. Es wurde die Autofluoreszenz induzierter und uninduzierter Kulturen - sowohl mit als auch ohne Farbstoff - im Tecan 1 verglichen. Bei Kulturen ohne zusätzlichen Farbstoff konnte eine leichte Zunahme der Fluoreszenz pro OD über die Zeit beobachtet werden. Dies lässt sich durch den in Abbildung 4.3-A gezeigten, nicht-linearen Verlauf der OD-Fluoreszenz-Korrelation erklären. Eine Kontamination der grünen Fluoreszenz durch das exprimierte rot-fluoreszierende mCherry-Protein konnten nicht beobachtet werden. Im uninduzierten Fall der mit Farbstoff versetzen Kultur konnte über die Zeit eine Annäherung an das OD-Fluoreszenz-Signal der Kulturen ohne Farbstoff gemessen werden. Die Beobachtung deckt sich mit dem in Abbildung 4.3-A gezeigten Quenchingeffekt, durch welchen sich mit steigender OD die Kultur mit Farbstoff der Kultur ohne Farbstoff annähert. Die DFHBI-1T-haltige Kultur mit induzierter heterologer Expression des pTRA-Plasmides, zeigte im Vergleich zum uninduzierten Stamm die gewünschte erhöhte Fluoreszenz durch den dBroccoli-Tag. Um den in Abbildung 4.3-A an einer Probe mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen gezeigten Effekt auch über das Wachstum hinweg zu bestätigen wurde der Wildtypstamm im sechsfachen biologischen Replikat mit DFHBI-1T-haltigem Medium mit und ohne den Induktor m-Toluylsäure (mTA, 1.5 mM) kultiviert. Wie in Abbildung 4.3-C dargestellt, konnte auch für eine wachsende Kultur die Abschwächung des Fluoreszenzsignals durch die ansteigende Zellmasse gezeigt werden. Dies äußert sich durch den nicht linearen Verlauf der OD-Fluoreszenz-Korrelation, welcher um eine OD von 0.1 zunächst eine negative Steigung aufweist.

Innerhalb einer Mikrotiterplatte konnten auch sehr geringe biologische Varianzen vermessen werden. Die Autofluoreszenz der induzierten Stämme lag leicht unter der Fluoreszenz der uninduzierten Kultur. Dies ist vermutlich auf die leichte Zytotoxizität des Induktors mTA zurückzuführen.

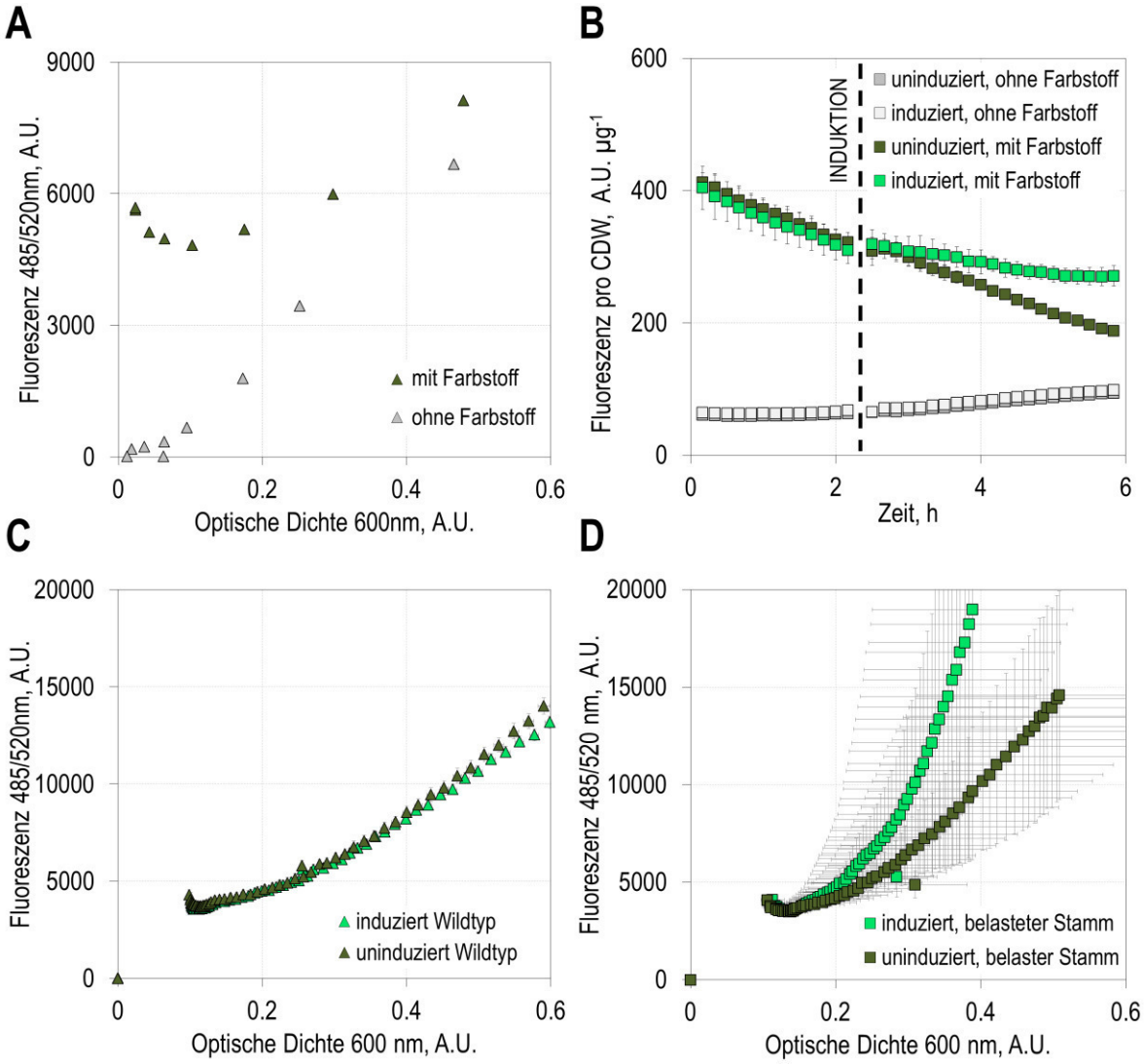


Abbildung 4.3 Bei der on-line *Vermessung des entstandenen mRNA-Signals spielen Autofluoreszenzeffekte der Zellen sowie die Fluoreszenz des Farbstoffes DFHBI-1T eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Abbildung (A) zeigt die Fluoreszenz mit und ohne Farbstoff für unterschiedliche* E. coli *HMS174(DE3) Verdünnungsstufen. Abbildung (B) betrachtet die Fluoreszenz 485/520 nm des pTRA-51hd-tragenden Stammes (belastet) im Triplikat in An- und Abwesenheit des Farbstoffes DFHBI-1T sowie im induzierten und uninduzierten Fall. Außerdem wurde die Entwicklung der Fluoreszenz über die OD - im induzierten sowie uninduzierten Fall - mit Farbstoff in sechs biologischen Triplikaten für HMS174(DE3) (Wildtyp, C) und den pTRA-51hd-tragenden Stamm (belastet, D) gezeigt.*

Im Zuge der Zugabe des Induktors beziehungsweise des Lösungsmittels DMSO konnte ein, bei der in Abbildung 4.3 gewählten Skalierung nicht zu erkennender, sprunghafter Anstieg der Fluoreszenz pro OD beobachtet werden. Dieser Anstieg kann auf eine erhöhte Permeabilität der Membran infolge der Detergenzwirkung des Lösungsmittels DMSO zurückzuführen sein. Die Autofluoreszenz der Zellen im Einzugsbereich der gemessenen Wellenlänge von 520 nm wird bis zu 80 % durch Flavine (FMN, FAD oder Riboflavin) erzeugt [164]. Die intrazellulären

Konzentrationen dieser energetisch aufwändigen und essenziellen Komponenten der Zelle können - insbesondere unter Belastung - schwanken. Daher wurden nicht nur der Wildtyp, sondern auch pTRA-51hd beladene *E. coli* HMS174(DE3) Zellen über die Zeit hinsichtlich ihrer Autofluoreszenz untersucht. In Abbildung 4.3-D dargestellt ist die Fluoreszenz pro OD für sechs biologische Replikate des belasteten Stammes HMS174(DE3) pTRA-51hd im induzierten sowie uninduzierten Fall in DFHBI-1T-haltigem Medium. Auch hier kann man die vom dBroccoli verursachte zusätzliche mRNA-Fluoreszenz erkennen. Allerdings fällt im Vergleich zum Wildtypstamm Abbildung 4.3-C die immense Standartabweichung sofort ins Auge. Obwohl visuell ein Unterschied zwischen dem induziertem und dem uninduzierten Stamm zu erkennen ist, führen diese Standardabweichungen im Mittel dazu, dass kein signifikanter Unterschied messbar ist. Wie in [193] und in Kapitel 4.1.5 gezeigt, ergeben sich diese Standardabweichungen aus klonspezifischen Abweichungen in der Autofluoreszenz und der Expression.

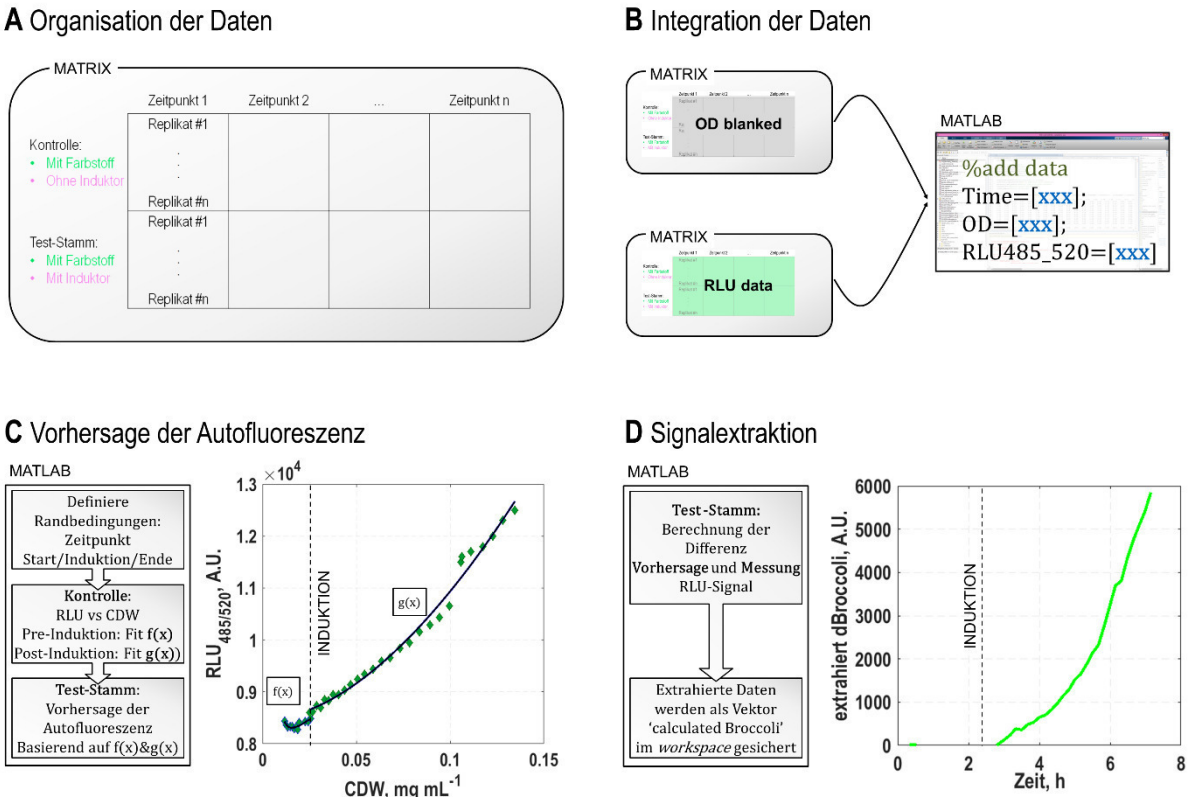


Abbildung 4.4 In dieser Abbildung wird das Vorgehen zur Extraktion des dBroccoli-Signals beschrieben. (A) Um die Dynamik des mRNA Signals von den Nebenfluoreszenzen trennen zu können, wurden gemessene Daten zunächst in eine Matrixstruktur gebracht. Diese Datenmatrizen organisieren die vermessenen Stämme in Zeilenform. Jede Spalte repräsentiert einen Zeitpunkt. Die uninduzierten Replikate fungieren als Kontrollen in den oberen Spalten. Die induzierten Replikate werden in gleicher Reihenfolge in den unteren Spalten organisiert. (B) Diese Datenstruktur kann sowohl für die OD als auch für die Rohfluoreszenzdaten in das MATLAB-Skript integriert werden. Wie in (C) dargestellt findet dieses Programm zunächst passende Funktionen f(x) und g(x), welche den Verlauf der Fluoreszenzdaten über das Zelltrockengewicht für den uninduzierten Stamm beschreiben. (D) Anschließend wurde über diese Funktionen die Autofluoreszenz des induzierten Stammes basierend auf der OD des Kontrollstammes ermittelt. Abschließend wurde über die Differenz zu den tatsächlich gemessenen Daten das mRNA-Signal extrahiert.

Um den beobachteten Effekten Rechnung zu tragen, wurde für die Analyse des dBroccoli-Signals ein Protokoll zur Signalextraktion erstellt. Auf Grund der hohen Varianz bei belasteten Stämmen

wurden die Vorkulturen aller Test-Stämme zu Beginn des Versuches gesplittet und beide Hälften separat analysiert. Die eine Hälfte der Kultur wurde induziert, die andere wurde mit DMSO versetzt und fungierte als Kontrollstamm. Zur Auswertung der mRNA-Fluoreszenz wurden die Daten zunächst in Matrixschreibweise organisiert. Wie in Abbildung 4.4-A gezeigt wurden jeweils die Stämme als Zeilen und die Zeitpunkte als Spalten notiert. Die Kontrollen und Teststämme wurden so gruppiert, dass in den ersten Zeilen die Replikate 1 bis n der Kontrollen gelistet wurden, gefolgt von den Replikaten 1 bis n der Teststämme. Diese Datenstruktur wurde für die Werte der bereinigten OD, sowie für die Rohfluoreszenzdaten angewandt. Diese Matritzen konnte anschließend in Kombination mit dem zugehörigen Zeitvektor in das zur Auswertung erstellte MATLAB-Skript (Anhang A.3.8) eingespeist werden (Abbildung 4.4-B). Experimentell bestimmte ODs wurden von diesem Skript mit dem gerätespezifischen Korrelationsfaktor (Tecan 1: 0.897 mg mL^{-1}) in Zelltrockengewicht umgewandelt. Die Daten wurden klonspezifisch analysiert. Nach der Angabe des zu analysierenden Zeitraums, konnten die Abschnitte vor ($f(x)$) und nach ($g(x)$) der DMSO-Zugabe zum Kontrollstamm separat gefitted werden (Abbildung 4.4-C). Diese Trennung in zwei Funktionen erfolgte aufgrund sprunghafter Änderungen, die durch die Zugabe des Induktors beziehungsweise des Lösemittels DMSO ausgelöst wurden. Da sich das Autofluoreszenzsignal hauptsächlich aus den Komponenten Quenching-Effekt und OD-abhängige Zellfluoreszenz zusammensetzt, wurden die Datenverläufe durch eine doppelt-exponentielle Funktion angenähert. Diese zweiphasige Gleichung ermöglicht eine Beschreibung von Daten, welche durch zwei unterschiedlich schnelle Faktoren beeinflusst werden, und wurde bereits von Lee *et al* zur Beschreibung von Fluoreszenzen verwendet [199]. Auf diesen Funktionen f(x) und g(x), die auf dem Kontrollstamm ohne Induktor beruhen, konnte nun über die OD des Teststammes dessen Autofluoreszenz vorhergesagt werden. Aus der Differenz dieser berechneten Fluoreszenz und der tatsächlichen Fluoreszenz konnte der Anteil an dBroccoli-vermittelter mRNA-Fluoreszenz bestimmt werden (Abbildung 4.4-D).

4.1.3 Das heterologe Protein-Signal

Um das heterologe Transkript zu quantifizieren, wurde das Protein von Interesse, wie in Anhang A.3.4 gezeigt C-Terminal mit einem His-Tag fusioniert. Dieser Tag bietet die Möglichkeit die Menge an hergestelltem Protein mittels Immunodetektion zu quantifizieren. In Abbildung 4.5-A ist repräsentativ die Zunahme des Proteinsignales auf einem Westernblot, der mit einem Horse-Reddish-Peroxidase(HRP)-gekoppelten Antikörper entwickelt wurde, während der exponentiellen Phase (1.5 bis 7.5 h) zu sehen. Alle Proben wurden auf eine OD von 5 normiert. Die erhaltenen Bandenintensitäten, welche ein Maß für die Proteinmenge pro Zelltrockengewicht darstellen, wurden via ImageJ ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung der Bandenintensitäten über einen Proteinstandard bekannter Menge durchgeführt (vergleiche auch Kapitel 3.3.6). Wie in Abbildung 4.5-B zu sehen ist, konnte für das Protein keine Gleichgewichtskonzentration erreicht werden.

Betrachtet man den Anstieg über die Zeit kann eine Akkumulation von 1.87 ng μg_{CDW}^{-1} h^{-1} in Bezug auf die Proteinmenge pro Zelltrockengewicht und Zeit beobachtet werden. Um auch *on-line* eine Quantifizierung durchführen zu können, wurde zusätzlich zur Proteinmenge pro Zelltrockengewicht über die Zeit die Korrelation der erhaltenen Fluoreszenz pro Zelltrockengewicht über die Zeit bestimmt (Abbildung 4.5-C). Im Fluoreszenzsignal konnte ebenfalls ein Anstieg von 21.50 A.U. ng_{CDW}^{-1} h^{-1} gemessen werden. Im Unterschied zu den Messungen der Proteinmenge ist im Fall der Fluoreszenz zu sehen, dass das erste Fluoreszenzsignal erst nach 23.2 Minuten auftrat. Hierbei handelt es sich um die Reifungszeit des Proteins mCherry in *E. coli* HMS174(DE3). Hinsichtlich der Bestimmung der Expressionsraten

und für eine weitere Quantifizierung muss - aufgrund dieser Reifungszeit - die Verschiebung des Signals bezogen auf die Zellmenge beachtet werden (siehe Kapitel 3.5.3).

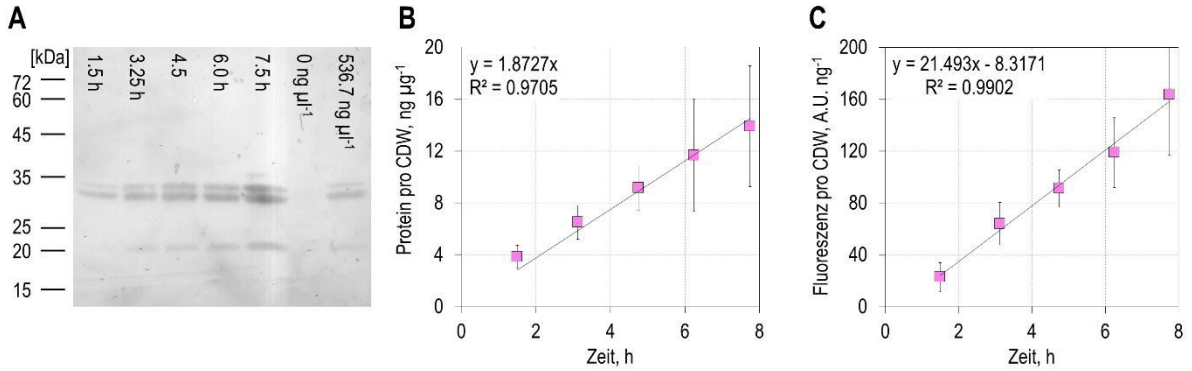


Abbildung 4.5 Die Menge an heterologem Protein konnte mittels Westernblot bestimmt werden. (A) Die Quantifizierung der mCherry-Menge mit His-Tag bei 10 µL einer OD von 5 zeigt während der exponentiellen Phase einen Anstieg in der Bandenintensität. (B) Rechnet man diese Bandenintensität mittels des Standards in Spur 1 in Proteinmenge pro Zelltrockengewicht um, dann kann dieser Anstieg über die Zeit beobachtet werden. (C) Betrachtet man die jeweilige Fluoreszenz pro Zelltrockengewicht, ist dieser Trend auch hier zu erkennen.

4.1.4 Theoretische Betrachtung der heterologen Expression des Modelproteins

Da die Dynamiken für die native mRNA in der Regel im Minutenbereich liegen, ist beim extrahierten heterologen mRNA-Signal bezogen auf das Zelltrockengewicht bereits nach kurzer Zeit ein Gleichgewichtszustand zu erwarten. Auch für Proteine stellt sich in der Regel nach einigen Stunden eine Gleichgewichtskonzentration ein [200]. Wie aus Abbildung 4.3-B und der nicht linearen Zunahme in Abbildung 4.3-D abgeschätzt werden kann, ist dies für das dBroccoli-Signal nicht der Fall. Erklären lässt sich dieser Effekt auf zwei verschiedene Arten. Es besteht die Möglichkeit, dass heterologe mRNA, da sie keiner zellinternen Regulierung unterworfen ist, generell langsamer abgebaut wird, als native *E. coli* mRNA. Für den langsameren Abbau spricht auch, dass sich der dBroccoli-Tag am 3‘-Ende der mRNA, der eine Haarnadelstruktur ausbildet, stabilisierend auf das Konstrukt auswirken kann. Ein Grund dafür kann sein, dass die in *E. coli* vorkommenden RNAsen hauptsächlich als 3' Exonucleasen auftreten[29], [201]. Eine RNA kann über verschiedene Wege abgebaut werden [202], [203]. Welcher Weg gewählt wird richtet sich hauptsächlich nach der Zugänglichkeit der RNA für die abbauenden Enzyme [204]. Die Stabilität einer RNA kann aber auch durch verschiedene Faktoren erhöht werden. Dies geschieht zum Beispiel durch intramolekular gebildete Strukturen, wie die UNCG-loop Familie [161]. Eine derartige Struktur ist auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten dBroccoli zu finden. Zusätzlich muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass lediglich der stabile dBroccoli-Tag zurückbleibt und bei der Vermessung des Fluoreszenzsignals zusätzlich zur intakten mRNA mit gemessen wird, da in *E. coli* RNA auch über Endonukleasen abgebaut werden kann. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass bei dem Vorhandensein einer 3‘-Stemloopstruktur die vom 3‘-Ende ausgehende Degradation nicht stattfinden kann, und die initiale Spaltung durch eine Endonuklease vonstattengeht [29]. Wie in [193] gezeigt werden konnte bedingt die Verwendung des dBroccoli-Tags auch eine Zunahme der Proteinproduktion. Dies spricht für die gesamtheitliche Stabilisierung der mRNA und gegen ein zurückbleiben des Tags. Für das Fluoreszenzprotein mCherry konnte ebenfalls eine stetige Zunahme der Fluoreszenz pro Zelltrockengewicht beobachtet werden (Abbildung 4.5). Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die außergewöhnlich lange Halbwertszeit einen Effekt auf das Gleichgewicht haben kann.

Geht man also für die in dieser Arbeit betrachteten heterologen Fluoreszenzsignale davon aus, dass die Halbwertszeit τ gegen unendlich geht (also quasi kein Abbau stattfindet), dann wird nach der Zeit $t_{1/2} = \frac{ln2}{\mu}$ die Halbmaximale-Sättigung erreicht (siehe Kapitel 3.5.4). Die nähere mathematische Beschreibung dieser Zusammenhänge findet sich im Anhang unter Anhang A.3.5. Betrachtet man unter der Vorraussetzung, dass quasi kein Abbau stattfindet, realistische Wachstumsraten für im Minimalmedien heterolog-exprimierende Zellen von circa 0.30 h^{-1}, kann die Halbmaximale-Sättigung erst nach circa 2.3 h erreicht werden. Dies liefert die Erklärung dafür, dass für sehr große Halbwertszeiten der RNA, sowie des Proteins sich innerhalb des beobachteten Zeitrahmens nach der Induktion kein Gleichgewicht findet. Die hier getroffenen Annahmen konnten bestätigen, dass sich für den Zustand ‚kein Abbau' ($k_{R-} = 0$) die Dynamik der RNA auf der Zeitskala in eine Dimension verschieben, die normalerweise Proteindynamiken vorbehalten ist.

4.1.5 Praktische Betrachtung der Expression des Modelproteins

Schon in Vorversuchen konnte eine sehr große Varianz in der Proteinexpression beobachtet werden. Da durch das pTRA Plasmid die Möglichkeit besteht neben der Translation auch die Transkription zu visualisieren, soll geklärt werden, ob diese Abweichungen auf Proteinebene oder schon auf der RNA-Ebene verursacht werden. Hierfür wurden drei biologische Replikate nach der Induktion mit dem Standardinduktor mTA über 5 Stunden hinweg analysiert. Betrachtet man das (wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben) extrahierte RNA-Signal (Abbildung 4.6-A), dann ist für alle drei Replikate zunächst festzustellen, dass zwar zum Induktionszeitpunkt geringfügige Abweichungen in der Startzellmasse vorhanden waren, aber für die in der Steigung resultierenden Koeffizienten a der RNA-Bildung keine gravierenden Unterschiede gemessen werden konnten. Betrachtet man das Proteinsignal in Abbildung 4.6-B konnte bei einem von drei Klonen eine deutlich erhöhte Proteinproduktion beobachtet werden. Dies spiegelt sich ebenfalls in der in Abbildung 4.6-C dargestellten Translationsrate (Proteinmenge pro mRNA-Signal) wider. Bei den zwei gleichmäßig und moderat ansteigenden Proteinsignalen der Replikate I und II konnte Protein und RNA in einem nahezu konstanten Verhältnis hergestellt werden. Replikat III erreichte diesen Zustand nicht. Hier wurde eine stetige Zunahme der Translationsrate beobachtet. Die Vorkulturen für alle drei Replikate wurden nach dem gleichen Prozedere hergestellt.

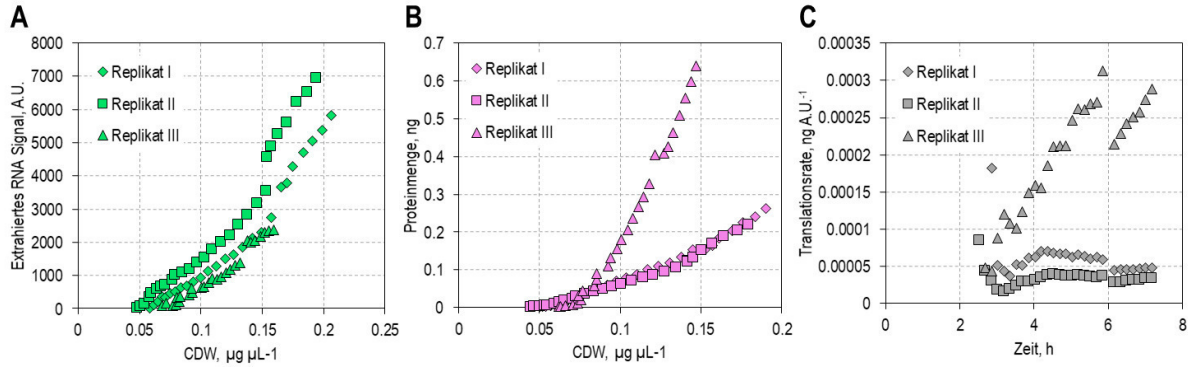


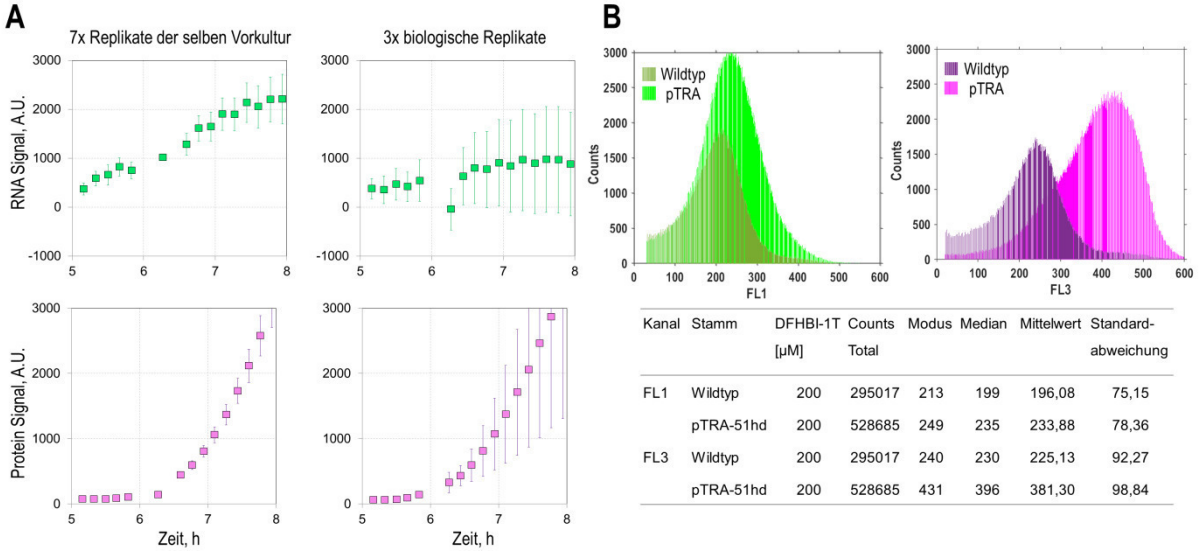
Abbildung 4.6 Um die Ursache der hohen biologischen Variabilität des verwendeten Expressionssystems E. coli *HMS174(DE3) pTRA648-51hd zu analysieren, wurde für die biologischen Replikate I-III nicht nur das heterologe mRNA-Signal pro Zelltrockengewicht CDW (A) extrahiert, sondern es wurde auch die Proteinmenge über das Zelltrockengewicht gemessen (B). Zusätzlich wurde die aus dem Protein- pro mRNA-Signal resultierende Translationsrate über die Zeit analysiert (C).*

Es wurde keine lag-Phase beobachtet. Für die Replikate I und II konnte eine Wachstumsrate von 0.35 h^{-1} gemessen werden. Verglichen mit diesen uniform produzierenden Replikaten wurde für das Replikat III eine deutliche Reduktion des Wachstums von circa 0.35 h^{-1} auf 0.20 h^{-1} beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diese Messungen legen nahe, dass Schwankungen in der Expression auf Proteinebene hervorgerufen werden und mit dem Wachstum vor allem um die Ressource Ribosomen, Energie und/oder Aminosäuren konkurrieren. Bei dieser Beobachtung kann es sich um eine stochastische Entscheidung der Zellen handeln, die ihre Ressourcen zwischen den energetisch-aufwändigen Prozessen Wachstum und Produktion aufteilen müssen. Allerdings konnte beobachtet werden, dass dieser Effekt lediglich bei biologischen Replikaten auftritt, nicht jedoch bei technischen Replikaten. Die Unterschiede scheinen sich also schon in der Vorkultur zu etablieren. Nach dem Aufteilen der Vorkultur in verschiedene Reaktionssysteme (7 Replikate) mit unabhängiger Induktion konnte - wie in Abbildung 4.7-A dargestellt - gezeigt werden, dass Schwankungen auf RNA-Ebene und auf Proteinebene bei Zellen aus derselben Vorkultur geringer ausfallen als bei drei biologischen Replikaten.

Da beim Wechsel von Vollmedium auf Minimalmedium in der Vorkultur zum Teil lag-Phasen von bis zu 24 Stunden auftraten, muss in Betracht gezogen werden, dass es sich hierbei um eine Anpassung des Stammes durch eine Mutation oder einen Plasmidverlust handeln kann. Da Genomsequenzierungen in diesem Umfang nicht möglich waren, wurden die Stämme nach der Kultivierung in Minimalmedium für circa 12 h erneut in LB-Vollmedium transferiert. Da bei einer anschließenden, nochmaligen Überimpfung in Minimalmedium erneut exzessive lag-Phasen auftraten (Daten nicht gezeigt), wurde davon ausgegangen, dass es sich eher um einen reversiblen Adaptationseffekt als um eine genetische Mutation handelt. Da die im Tecan Plate-Reader gemessenen Fluoreszenzsignale aus einer Kultivierung im 200 µL Maßstab stammen, müssen die gemessenen Werte als Mittelwerte der Kultur betrachtet werden. Dies kann dazu führen, dass Schwankungen auch durch Änderungen in der Kulturzusammensetzung entstehen. Schwankungen in der Plasmidkopienzahl bis hin zum Plasmidverlust sind Effekte, die seit langem in der Biotechnologie bekannt sind. In Abbildung 4.7-B konnte gezeigt werden, dass für die Fluoreszenzen FL1 (grün) und FL3 (rot) auch noch in der späten exponentiellen Phase eine unimodale Verteilung (sowohl beim Wildtyp, als auch bei den plasmidtragenden Kulturen) gemessen werden konnte. Im Falle eines Plasmidverlustes oder einer Mutation wäre eine Subpopulation, welche sich zurück zum Wildtyp verschiebt, zu erwarten gewesen. Da sich die auftretende Varianz also weder durch eine Mutation noch durch einen Plasmidverlust erklären lässt und bei technischen Replikaten nicht auftritt, muss die bei biologischen Replikaten beobachtete Entscheidung zwischen Wachstum und Produktion bereits in der Vorkultur fallen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die im Minimalmedium auftretenden lag-Phasen ohne erkennbaren Auslöser zu Ende gehen. Daher erreichen die Kulturen unterschiedlich schnell die stationäre Phase. Die Vorkulturen sind der stationären Phase und den darin entstehenden Sekundärmetaboliten folglich unterschiedlich lange ausgesetzt.

Da *E. coli* Zellen in Stresssituationen wie zum Beispiel der stationären Phase oder bei pH und Hungerstress mit Hilfe des globalen Regulators RpoS Gegenmaßnahmen ergreifen, sollten Umweltbedingungen im Regelfall keine Langzeitwirkungen auf die Zelle besitzen. Für den verwendeten *E. coli* Stamm HMS174(DE3) zeigte sich, dass dieser lediglich eine trunkierte Form des Sigmafaktors RpoS trägt. Das durch die Mutation C100T entstandene Stopp-Codon verkürzt das an sich hoch konservierte Protein von 330 auf 33 Aminosäuren. Zwar kann dadurch von einem vollständigen Verlust der nativen regulatorischen Funktion ausgegangen werden, jedoch können andere Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden (nähere Informationen in der

Bachelorarbeit von Magdalena Bals [205], im Rahmen der Arbeit von Jan Stotz konnte das Gen *rpoS* genomisch in den Stamm HMS174(DE3) insertiert werden [206]).



Kanal	Stamm	DFHBI-1T [µM]	Counts Total	Modus	Median	Mittelwert	Standard-abweichung
FL1	Wildtyp	200	295017	213	199	196,08	75,15
	pTRA-51hd	200	528685	249	235	233,88	78,36
FL3	Wildtyp	200	295017	240	230	225,13	92,27
	pTRA-51hd	200	528685	431	396	381,30	98,84

Abbildung 4.7 Plot (A) zeigt das RNA-Signal und das Proteinsignal des induzierten Stammes HMS174(DE3) pTRA641-51hd für jeweils 3 biologische Replikate (3 Vorkulturen, je 1 Ansatz) sowie für 7 technische Replikate (1 Vorkultur, 7 Ansätze) verfolgt. (B) Um einen Plasmidverlust auszuschließen, wurden HMS174(DE3) Wildtypzellen sowie induzierte, pTRA641-51hd-tragende Stämme in der späten exponentiellen Phase im direkten Vergleich im Cell-Counter analysiert. Zum einen wurden für den induzierten Wildtyp HMS174(DE3) und den induzierten, plasmidtragenden Stamm HMS174(DE3) pTRA51-hd Histogramme der Fluoreszenzen FL1 (grün) und FL3 (rot) erstellt. Zum anderen wurden die zugehörigen Lageparameter (Modus, Median, Mittelwert) bei einer Farbstoffkonzentration (DFHBI-1T in DMSO) von 200 µM tabellarisch erfasst (nach [193]*).*

Um prinzipielle Zusammenhänge zwischen der zellulären Reaktion und dem heterologen Konstrukt aufzudecken, wurden verschiedene Aspekte der Kultivierung variiert. Als Standard wurde jeweils der Stamm HMS174(DE3) pTRA641-51hd verwendet und im Triplikat mit 1.5 mM mTA induziert. Zunächst wurde durch den Einsatz verschiedener Induktoren die Stärke der Expression bei drei biologischen Triplikaten des Stammes *E. coli* HMS174(DE3) pTRA641-51hd verändert (Abbildung 4.8-A). Bei den verwendeten Induktorkonzentrationen von 1.5 mM wurde kein signifikanter Unterschied im Wachstum gemessen. Neben den schon angesprochenen hohen Standardabweichungen bei biologischen Replikaten, konnten wachstumsunabhängige Unterschiede in der Expression gezeigt werden. Das Benzoesäurederivat p-Toluylsäure (pTA) zeigte sowohl auf mRNA-Ebene und daraus resultierend auch auf Proteinebene die schwächsten induzierenden Eigenschaften. Die in der Literatur als Standardinduktor verwendete und als besonders effizient geltende mTA ([85], [86]) unterschied sich nicht signifikat vom Induktor 3-Chlorbenzoesäure (3CBA).

Da in biotechnologischen Anwendungen aus einer großen Auswahl an Expressionsplasmiden gewählt werden kann, wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer unterschiedlichen Plasmidkonfiguration untersucht (Abbildung 4.8-B). Das pTRA-Plasmid basiert auf dem Replikationsursprung pRO1600/ColE1, der eine mittlere Plasmidkopienzahl von um die 30 Plasmide pro Zelle besitzt, und dem Antibiotikum Gentamicin [196]. Mittels des modularen Aufbaus der pSEVA-Plasmide konnte das als Standard gewählte pSEVA641-Backbone[28] (in Abbildung 4.8-B als ‚641' bezeichnet) des pTRA Plasmides gegen das Backbone pSEVA481 (in Abbildung 4.8-B als ‚481' bezeichnet) ausgetauscht werden. Dieses ‚481' beinhaltet, neben einer

[28] Plasmid-Rückgrat, welches neben dem Replikationsursprung auch den Selektionsmarker beinhaltet

Streptamycin-Resistenzkassette, das häufig eingesetzte pUC-Replikationssystem. Eigentlich ist der pUC-Replikationsursprung für seine außerordentlich hohe Plasmidkopienzahl von bis zu 700 Kopien pro Zelle bekannt. Für die pSEVA-Plasmide konnte allerdings gezeigt werden, dass in Anwesenheit dieses Systems initial nur 15 Plasmidkopien vorliegen, mit abnehmender Tendenz nach der Induktion [196].

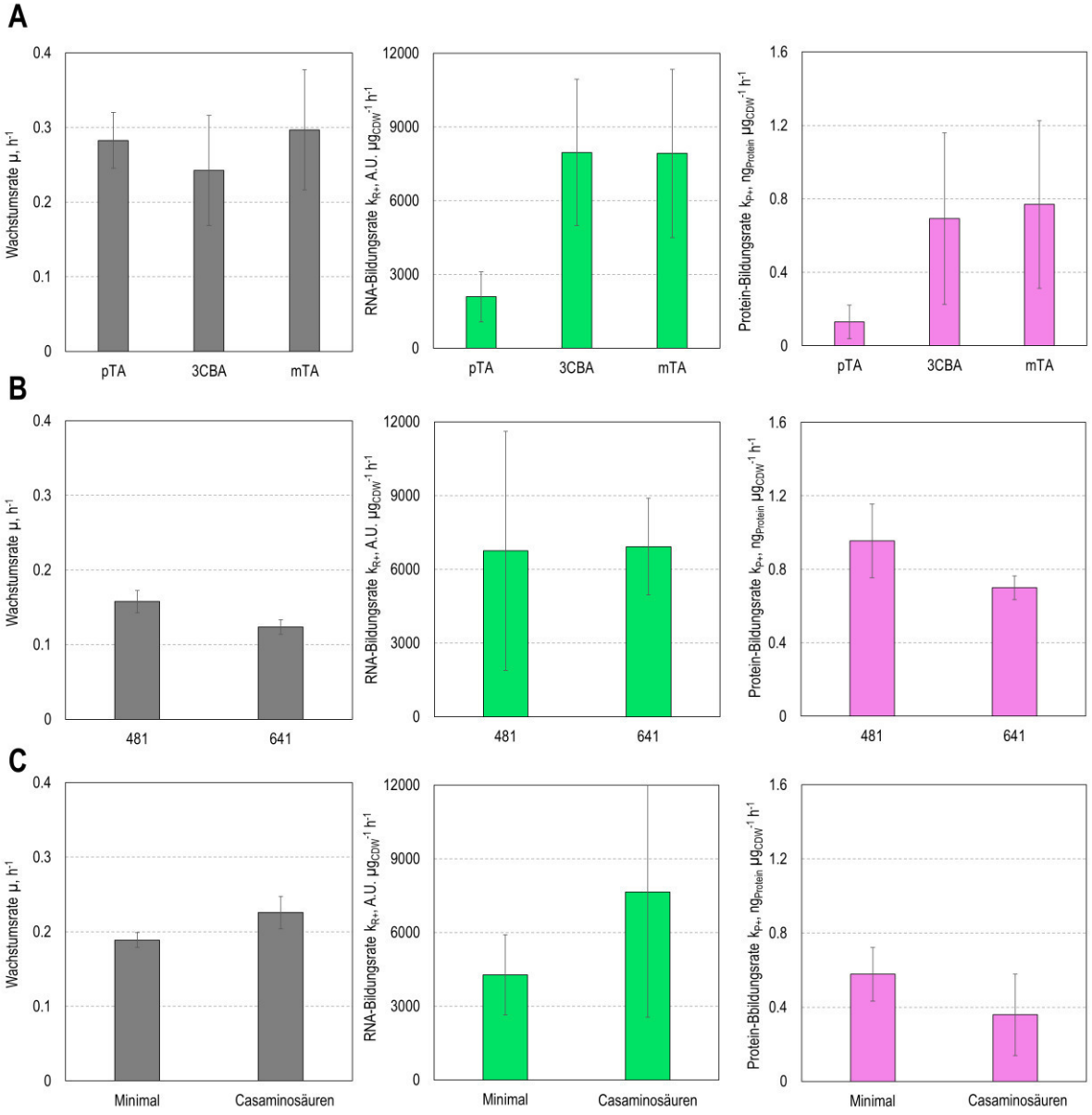


Abbildung 4.8 Analysiert wurden induzierte HMS174(DE3) pTRA-51hd Stämme, die das Protein mCherry plasmidbasiert exprimieren. Die entsprechende mRNA-Bildung konnte über den dBroccoli-Tag bestimmt werden. Gemessen wurden jeweils die Wachstumsrate sowie die RNA- und Proteinbildungsrate im biologischen Triplikat. Als Referenz wurde jeweils der Stamm E. coli *HMS174(DE3) pTRA641-51hd im Triplikat mit 1-5 mM mTA induziert. Variiert wurden die Induktoren pTA, 3CBA und mTA (1.5 mM, A) sowie die Plasmid-Backbones pSEVA641 und pSEVA481 (‚641' und ‚481', 8 Replikate des ‚481', B). Außerdem wurden mit mTA induzierte und pTRA641-51hd tragende Stämme im Minimalmedium und mit Casaminosäuren (8 Replikate) gegenübergestellt (C).*

In Abbildung 4.8-B konnte das 641-basierte Standardsystem im Triplikat mit dem System 481 als achtfaches Replikat verglichen werden. Beide Varianten wurden mit dem Induktor mTA induziert. Trotz deutlich verringerter Wachstumsraten der Standardvariante ‚641' im Vergleich zu Abbildung 4.8-A konnten für die in Abbildung 4.8-B untersuchten ‚641'-Stämme sowohl die

mRNA-Bildungsrate k_{R+}, als auch die Proteinbildungsrate k_{P+} aus Abbildung 4.8-A im Rahmen der Standardabweichung reproduziert werden. Vergleicht man die zwei Plasmidtypen ‚481' und ‚681' lässt sich festhalten, dass trotz unterschiedlicher Kopienzahlen die gleiche Größenordnung an mRNA-Bildungsraten erreicht werden konnten. Diese waren jedoch speziell für das achtfach vermessene ‚481' mit sehr großen Standardabweichungen belegt. Ein Grund hierfür könnte die Plasmidinstabilität sein, welche für diesen Replikationsursprung bereits gezeigt werden konnte [196]. Hinsichtlich der Wachstumsrate, sowie der Proteinbildungsraten konnten in den ‚481' Stämmen tendenziell höhere Werte gemessen werden. Da, wie in Abbildung 4.7 gezeigt, die auftretenden Standardabweichungen klonspezifisch und vorkulturbedingt zu sein scheinen, wurde überprüft, ob die von der Nährstofflimitierung im Minimalmedium ausgehende Belastung der Zellen einen Beitrag zur Varianz der Expression leistet. Aus diesem Grund wurde versucht die Belastung der Zellen über eine höhere Nährstoffverfügbarkeit durch die Zugabe von Casaminosäuren ins Minimalmedium zu reduzieren. Acht Replikate der Stammes HMS174(DE3) pTRA-51hd (‚641') wurden einem Medium mit und drei Replikate einem Medium ohne zusätzliche Nährstoffe mit 1.5 mM mTA induziert. Wie in Abbildung 4.8-C dargestellt konnte gezeigt werden, dass für die supplementierten Stämme tendenziell höhere Wachstums-, sowie RNA-Bildungsraten erreicht werden konnten. Die Proteinbildungsrate der mit Casaminosäuren kultivierten Stämme blieb im Mittel hinter der Rate der unsupplementierten Stämme zurück. Dies kann damit erklärt werden, dass die Zellen angeregt durch die bessere Nährstoffverfügbarkeit mehr RNA produzieren. Die damit verbundene Belastung, die durch eine höhere Wachstumsrate noch verstärkt wird, kann zu einem Defizit in der Proteinproduktion führen. Aber auch hier machen die hohen Standardabweichungen eine signifikante Aussage unmöglich. Die ursprüngliche Fragestellung, ob eine erhöhte Nährstoffverfügbarkeit die Varianz verringert muss mit einem klaren Nein beantwortet werden.

Schlüsselt man die einzelnen Replikate aus Abbildung 4.8 nach ihren Raten auf, dann kann generell beobachtet werden, dass weder für verschiedene Nährstoffverfügbarkeiten (Abbildung 4.9-A) noch für verschiedene Plasmidkonfigurationen (Abbildung 4.9-C) eine signifikante Abhängigkeit der RNA-Bildungsraten von der Wachstumsrate besteht. Vergleicht man die supplementierten Stämme in Abbildung 4.9-A mit den in Minimalmedium gewachsenen Stämmen, dann konnten für die mit Casaminosäuren supplementierten Kultivierungen Ausreißer mit deutlich erhöhten RNA-Produktionsraten gefunden werden. Dies gilt ebenfalls für die ‚481'-tragenden Stämme in Abbildung 4.9-C. Im Mittel für alle Setups scheinen die RNA-Produktionsraten jedoch um den Wert 5000 A.U. $\mu g_{CDW}^{-1}\, h^{-1}$ zu schwanken. Analysiert man die Proteinproduktionsraten, dann wurde beobachtet, dass mit steigender Proteinproduktion die Wachstumsrate tendenziell abnahm. Die Nährstoffverfügbarkeit konnte zwar die Wachstumsrate positiv beeinflussen, einhergehend damit konnten allerdings eine niedrigere Translationaktivität gemessen werden (Abbildung 4.9-B). Auf Grund der niedrigeren Proteinproduktion pro Wachstumsrate, kann angenommen werden, dass das Standardplasmid pTRA-51hd ‚641' eine größere Belastung als die Variation - ‚481'-Plasmid - darstellt (Abbildung 4.9-D).

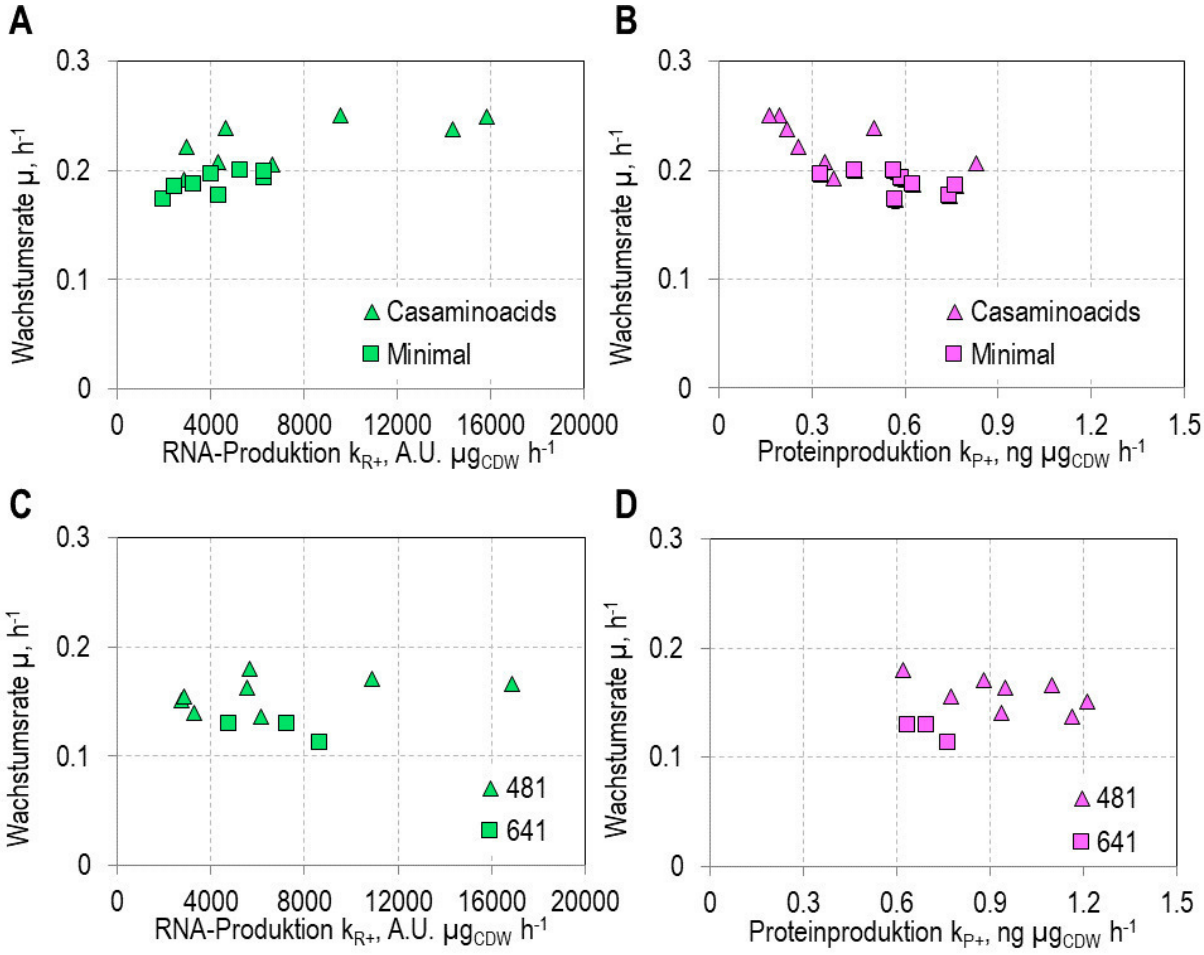


Abbildung 4.9 Verglichen wurden unterschiedliche Kultivierungssetups des Stammes E. coli *HMS174(DE3) mit und ohne Casaminosäuren (A und B) sowie die pTRA Backbones 641 und 481 (C und D). Die mRNA Bildungsraten wurde in Korrelation mit dem Wachstum analysiert (A und C). Verglichen wurden auch die Proteinproduktionsraten der unterschiedlichen Setups mit der Wachstumsrate (B und D). Betrachtet man die Proteinproduktion scheint, anders als bei der Gabe zusätzlicher Nährstoffe (B), bei der Verwendung des Plasmidrückgrates 641 ein größerer Einfluss auf das Wachstum als bei dem Vektor 481 zu bestehen (D).*

Um die gemessenen Proteinproduktionsraten zu beurteilen, wurden theoretische Betrachtungen durchgeführt. Da das Protein mCherry eine Molare Masse von 28.8 kDa aufweist, wiegt ein Molekül mCherry $4.78 \cdot 10^{-11}$ ng. Bei einer Proteinbildungsrate von durchschnittlich 0.6 $ng_{Protein}\ \mu g_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$ und einem Zellgewicht von $2 \cdot 10^{-6}$ µg pro Zelle bedeutet dies rein rechnerisch eine Bildung von 6.9 Molekülen mCherry pro Zelle und Sekunde. Geht man von einem maximalen Ribosomenbesatz von einem Ribosom pro 9 Nukleotiden bzw 3 Aminosäuren aus, kann sobald das erste Ribosom das Ende der mRNA erreicht hat alle 0.15 Sekunden ein Protein produziert werden, also von 6.7 Ribosomen pro Sekunde und mRNA. Im Fall der mCherry Produktion würde dies bedeuten, dass unter optimaler Auslastung die gemessene Proteinmenge von lediglich einer mRNA produziert werden kann. Im Mittel befinden sich 0.56 Kopien pro nativer mRNA Moleküle pro Zelle [207]. Da durch das pTRA-51hd Plasmid das heterologe GOI mit circa 30 Genkopien vorliegt sind bis zu 16.8 RNA-Kopien pro Zelle nicht unwahrscheinlich. 76 % der natürlich vorkommenden mRNA besitzen eine Ribosomenbesatzdichte von bis zu 25 Ribosomen [208]. Fasst man diese Zahlen zusammen, bedeutet dies bei einem 1500-Basenpaar-langen Konstrukt, dass alle 60 Basenpaare ein Ribosom zu finden ist. Bei einer Lesegeschwindigkeit von 20 Aminosäuren pro Sekunde kann davon ausgegangen werden, dass jede Sekunde eine Proteinkette pro RNA fertiggestellt werden kann. Folglich können theoretisch

im Mittel 16.8 Proteinmoleküle pro Sekunde und Zelle fertiggestellt werden. Dies bedeutet, dass es nicht nur bei einer maximalen Ribosomenbesatzdichte von einem Ribosom pro 9 Nukleotiden selbst für nur ein mRNA Molekül durchaus möglich ist die gemessenen Proteinbildungsraten von 0.6 $ng_{Protein}\ \mu g_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$ zu erreichen. Aber auch bei einer durchschnittlichen Ribosomenbesatzdichte von 25 Ribosomen pro mRNA, kann die gemessene Produktionsrate von 6.9 mCherry Molekülen pro Zelle und Sekunde im Rahmen der durchschnittlichen Aktivität einer Zelle gewährleistet werden. Die in diesem Kapitel gemessenen Proteinbildungsraten liegen also mit einer Spanne von circa 0.15 bis 1.2 $ng_{Protein}\ \mu g_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$ in einer realistischen Größenordnung.

Je mehr Ribosomen und RNA-Polymerasen für die heterologe Expression im Einsatz sind, desto belasteter ist also die Zelle und desto weniger reproduzierbar scheint der heterologe Prozess zu sein. Betrachtet man für unterschiedliche Expressionsansätze (Backbone pSEVA481 und pSEVA648, supplementiertes Medium und Minimalmedium, Ribosomenbindestellen 10-444% Stärke) die Qualität der jeweiligen Signale, dann kann für die RNA-Bildungsrate (Abbildung 4.10-A), aber auch für die Proteinproduktion (Abbildung 4.10-B) ein linearer Anstieg der Standardabweichung mit zunehmender heterologer Expression pro Zelltrockengewicht gemessen werden. Dies bedeutet, dass unabhängig vom verwendeten Expressionsetup die Streuung über die Zeit in stark exprimierenden Kulturen stärker ist, als in schwach exprimierenden Ansätzen. Mit steigender Belastung durch erhöhte Proteinproduktion scheint also die Varianz der RNA und Proteinmenge pro Zellmenge innerhalb einer Kultivierung größer zu werden. Für die heterologe Expression ist es daher wichtig, gut ausbalanciert zu sein. Es muss für jedes Konstrukt das richtige Maß an Expressionsstärke gefunden werden, die ein noch ausreichendes Wachstum für einen stabilen Prozess ermöglicht.

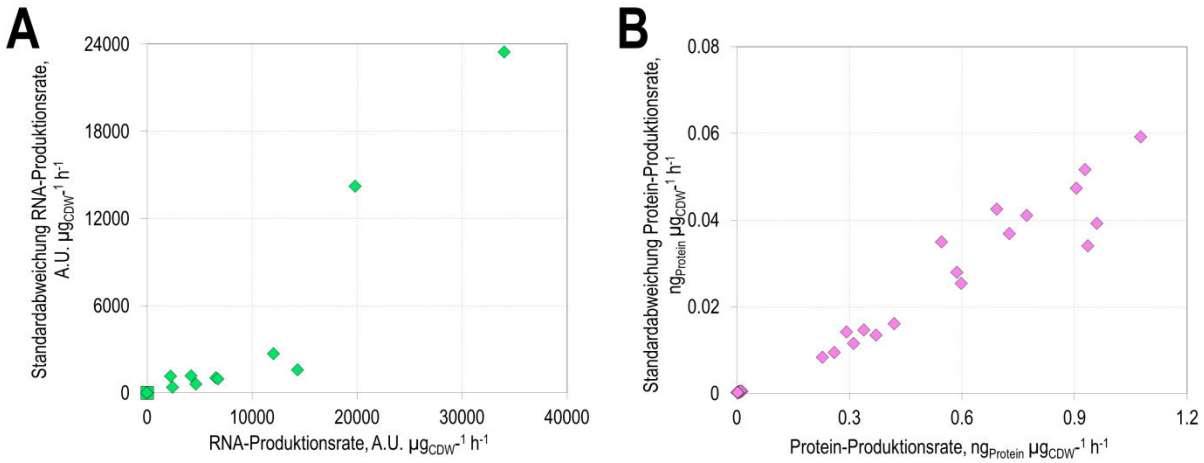


Abbildung 4.10 Korreliert wurden die gemessenen Werte für RNA- (A) beziehungsweise Proteinbildungsrate (B) für HMS174(DE3) Stämme mit den Standardabweichungen der entsprechenden Messreihe im 200 µL Maßstab. Die Stämme enthielten nicht nur verschiedene pTRA-Plasmidvarianten (648-51hdRBS0, 648-51hdRBS1, 481-51hdRBS0, 481-51hdRBS1) sondern wurden auch unterschiedlich induziert (1.5 mM mTA oder pTA).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Expression des Proteins mCherry durch das pTRA-51hd-Plasmid große Schwankungen detektiert werden konnten. Diese Schwankungen scheinen sich bereits in der Vorkulturphase zu etablieren. Da die Varianz weder durch eine Mutation noch durch eine zu hohe Belastung durch Nährstoffmangel hervorgerufen zu werden scheint, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Heterogenität handelt, die durch Sekundärmetabolite vermittelt wird. Diese Heterogenität scheint auf Grund von unterschiedlichen Verweilzeiten in der stationären Phase aufzutreten. Ein Grund für die

nachhaltige Störung des Verhaltens kann darin liegen, dass im Stamm HMS174(DE3) das globale Stressregulationssystem RpoS defekt ist. Außerdem ist für das Expressionssystem XylS bekannt, dass nur circa 200 Moleküle des Regulatorproteins pro Zelle vorkommen und dieses als Dimer agiert [81]. Bei circa 30 Plasmiden pro Zelle bedeutet dies, dass etwa 3 Moleküle pro Plasmid zur Aktivierung der Expression vorliegen. Dies kann eine Erklärung dafür liefern, dass auch bei verbesserten Bedingungen die RNA-Produktion limitiert ist und es basierend auf stochastischen Effekten nur vereinzelt zu erhöhter Produktion kommen kann. Da die Zugabe von Aminosäuren nicht zu einer Reduktion der Schwankungen auf Proteinebene führte, scheint die Varianz maßgeblich auf das Dilemma der Zelle zurückzuführen zu sein, dass die Ressourcen Ribosomen und Energie zwischen Wachstum und Translation aufgeteilt werden müssen. Da schon in der Literatur beschrieben ist, dass in Prokaryoten bis zu 50 % des zellulären Energiekonsums auf die heterologe Translation zurückzuführen sind [209], ist eine Wachstumsabhängigkeit der Proteinproduktion also nicht weiter verwunderlich.

4.2 Erfassung der zellulären Kapazität

Zellen arbeiten nach dem Prinzip der Parsimonie[29]. Aus diesem Grund sind - wie in Abbildung 4.11 schematisch dargestellt - die verfügbaren Ressourcen limitiert. In einer Wildtypzelle wird ein großer Teil dieser Ressourcen bereits für die Realisierung des Erhaltungsstoffwechsels und des Wachstums aufgewandt (siehe Kapitel 2.1.1). Um auf Umweltreize reagieren zu können, besitzen Zellen jedoch einen metabolischen Spielraum. Dieses noch verfügbare Leistungsvermögen stellt die Kapazität der Zelle dar und kann für heterologe Expression genutzt werden [136]. Überschreitet der Ressourcenbedarf der heterologen Prozesse die Kapazität, dann wird von dem Zustand der Metabolischen Belastung oder *metabolic burden* gesprochen [1], [6], [128], [210]. Eine typische und offensichtliche Reaktion hierauf ist eine Verringerung des Wachstums. Der Grad der Wachstumsreduktion spiegelt wider, wie viele Ressourcen vom Wachstum abgezogen werden [8]. Der Verbrauch freier Ressourcen aus dem metabolischen Spielraum kann jedoch nicht erfasst werden. Um diesen Kapazitätsbedarf einzelner Konstrukte sichtbar zu machen, wurde im Folgenden zunächst ein Reportersystem erstellt, welches es ermöglicht die Kapazität der Zellen bei verschiedenen energetischen Zuständen zu analysieren.

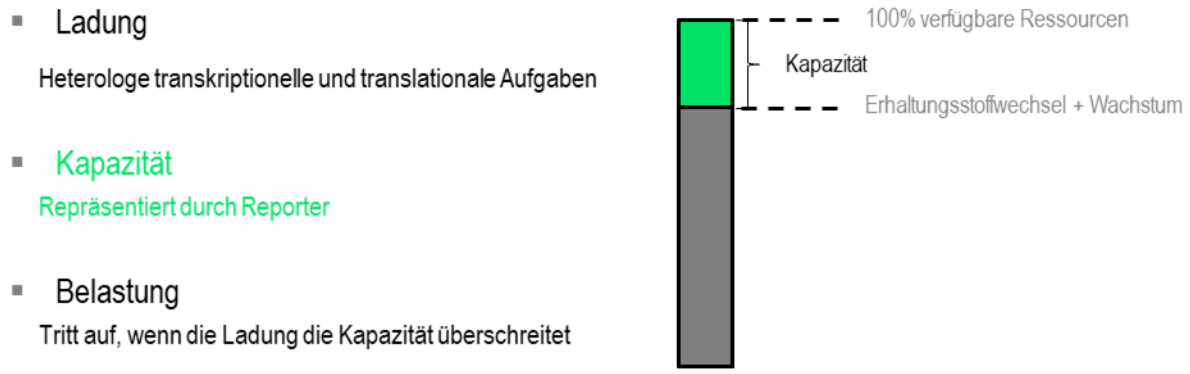


Abbildung 4.11 Unter der Annahme, dass der Großteil der verfügbaren Ressourcen in einer Zelle bereits konsumiert wird, verfügt die Zelle noch über einen metabolischen Spielraum. Dieser Spielraum kann als zelluläre Kapazität betrachtet werden, die mit Hilfe eines Reporters visualisiert werden kann. Bringt man zusätzliche transkriptionelle und translationale Aufgaben als Ladung in einen Produktionsorganismus ein, dann kann bei einer Überschreitung der Kapazität das Phänomen der sogenannten Metabolischen Belastung auftreten.

4.2.1 Design und Auswahl des Messsystems

Heterologe Belastung kann durch eine Vielzahl an Störfaktoren entstehen, die unter Umständen auch miteinander wechselwirken. Da sich diese, je nach Art der Belastung, auf unterschiedliche Art und Weise auf die Zelle auswirken können, ist es schwer, die Belastung an sich zu quantifizieren. In der Regel wird davon ausgegangen, dass Zellen während der exponentiellen Phase versuchen, ein größtmögliches Wachstum zu generieren [139]. Die Reduktion der Wachstumsrate im Vergleich zum Wildtyp kann ein Maß sein, um die Belastung zu beschreiben. Ein Problem hierbei ist, dass sich mit der Wachstumsrate auch die Verfügbarkeit der Ressourcen verändern kann, da viele der essenziellen und limitierenden Bestandteile wie Ribosomen wachstumsgekoppelt hergestellt werden [31], [211]. Um das Potential der Zellen in seiner Gesamtheit abbilden zu können, muss also neben der Wachstumsrate auch die Kapazität der Zellen betrachtet werden [136]. Die Kapazität ist ein Maß für die Verfügbarkeit dieser Ressourcen und das Potential der Zelle, damit zusätzliche Expressionsarbeit zu leisten. Um die verwendete Kapazität sichtbar zu machen, kann nun der metabolische Spielraum durch die Expression eines

[29] So viel wie nötig, so wenig wie möglich.

Reportes ausgefüllt werden [136]. Wie bereits erwähnt, bietet die Verwendung von Fluoreszenzreportern auf Grund der *on-line* Auslesbarkeit nicht nur die Möglichkeit die Signale hochgradig zeitaufgelöst, sondern auch ohne Probenaufarbeitung beobachten zu können. Um die Evaluation des Reporterkonstrukts in dieser Arbeit zu erleichtern, wurde auf Grund der geringen Seiteneffekte und Nebenfluoreszenzen zunächst das Fluoreszenzprotein mCherry verwendet. Da dieses Protein allerdings deutlich weniger Lichtquanten aussendet als das Protein GFP und eine Kompatibilität mit der heterologen Last pTRA-51hd gewährleisten werden soll, wurden die systematischen Studien mit eGFP als Reporter durchgeführt.

Eine wichtige Entscheidung bei der Wahl des Reportes war, ob dieser plasmidbasiert oder genomisch integriert verwendet werden soll. Da eine Genomintegration durch die Verringerung der Kopienanzahl nicht nur mit einer immensen Abschwächung des Signals einhergeht, sondern auch je nach Integrationsort zu einer starken Wachstumsabhängigkeit[30] oder anderen Effekten [212] führen kann, wurde in dieser Arbeit auf ein plasmidbasiertes System zurückgegriffen. Ein weiterer Vorteil von plasmidbasierten Systemen ist die flexible Verwendung in unterschiedlichen Stämmen. Auch hier wurde als Grundgerüst ein Plasmid der pSEVA-Bibliothek gewählt. Das verwendete Plasmid pSEVA-237R, welches neben einer Kanamycin-Resistenz über den Replikationsursprung pBBR1 verfügt, gewährleistet auch über längere Kultivierungen eine konstante Anzahl von 4-5 Kopien pro Zelle [196]. Die Verwendung eines plasmidbasierten Reportes bedingt zwar das Vorhandensein einer Grundlast, jedoch können so auch kleine Effekte, die vom metabolischen Spielraum der Zelle ansonsten abgepuffert werden, erfasst werden. In Vorversuchen wurde für Stämme, die dieses Reporterplasmid tragen, im Vergleich zum Wildtyp kein Einbruch im Wachstum festgestellt. Hieraus wurde gefolgert, dass es aufgrund des Reporters zu keiner Überschreitung der zellulären Kapazität kommt.

Der entscheidende Aspekt beim Design des Reportes für zelluläre Kapazität ist die Auswahl des Promotorsystems. Da der zelluläre Spielraum von Beginn der Experimente an betrachtet werden soll, ist die Verwendung eines konstitutiven Promotors sinnvoll und ermöglicht, dass sich der Reporter bereits im Gleichgewicht befindet. Wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, ist dies für eine induzierbare, heterologe Ladung nicht der Fall. Ein sehr ähnliches Setup findet man auch bei dem in der Literatur bereits beschriebenen GFP-basierten Reportersystem von Ceroni *et al* [136]. Nicht zuletzt, weil es sich bei diesem publizierten System um einen genomintegrierten Reporter handelt, ist hier eine Wachstumsabhängigkeit zu beachten, obwohl der verwendete Promotor BBa_J23100 ein synthetisches und unreguliertes Konstrukt aus der Anderson Promoter-Bibliothek ist (http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson). Mit dem von Ceroni *et al* [136] erstellten Reporterstamm ist es möglich, die sich mit der Wachstumsrate ändernde Kapazität einer Zelle abzubilden. Die Varianz in der Autofluoreszenz und der Ressourcenverfügbarkeit erschweren es jedoch die tatsächlichen Kosten einer heterologen Ladung zu beschreiben. Da der in dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stamm HMS174(DE3) nicht nur bei unterschiedlichen Wachstumsraten, sondern auch mit unterschiedlichen Beladungszuständen charakterisiert werden soll, war es wichtig die konstitutive Genexpression konstant und wachstumsunabhängig zu gestalten. Nur für eine Expression mit einer definierten und gleichbleibenden Rate, kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob und in welchem Ausmaß Ressourcen von der Zelle umverteilt werden.

[30] Je näher das Gen am Replikationsursprung liegt, desto häufiger die Anzahl an Replikationsgabeln. Dies führt zu einer Erhöhung der Genkopienanzahl. Dieser Effekt wird mit zunehmender Wachstumsrate verstärkt.

Es wurde die Verwendung eines *housekeeping* Promotors angestrebt. Verglichen zu einem synthetischen Konstrukt bietet ein nativer Promotor, der ein derartig gleichförmiges Expressionsverhalten zeigt, auch die Option in späteren *omics*-Anwendungen als Referenz dienen zu können. Hierfür wurden vier vielversprechende Sequenzen ausgewählt (Abbildung 4.12). Um den Ansprüchen einer konstanten Expression gerecht zu werden, wurde ein normalisiertes Expressionsarray aus dem Kompendium Carrera *et al* [213] herangezogen. Diese Publikation analysiert zusammenfassend die Aktivität von 4189 Genen in insgesamt 2198 Microarrays. Dieses Datenset wurde zum einem mit Hilfe des Analysetools ‚Normfinder'[31] hinsichtlich des Stabilitätswertes der einzelnen Expressionen verglichen. Stabilitätswerte setzen sich aus der Varianz innerhalb der ausgewählten Expressionsraten eines Promotors und der Varianz der Expression anderer Gene zusammen. Sie können als Maß für den systematischen Fehler, der durch natürliche Varianz in der Expression entsteht, gesehen werden [214].

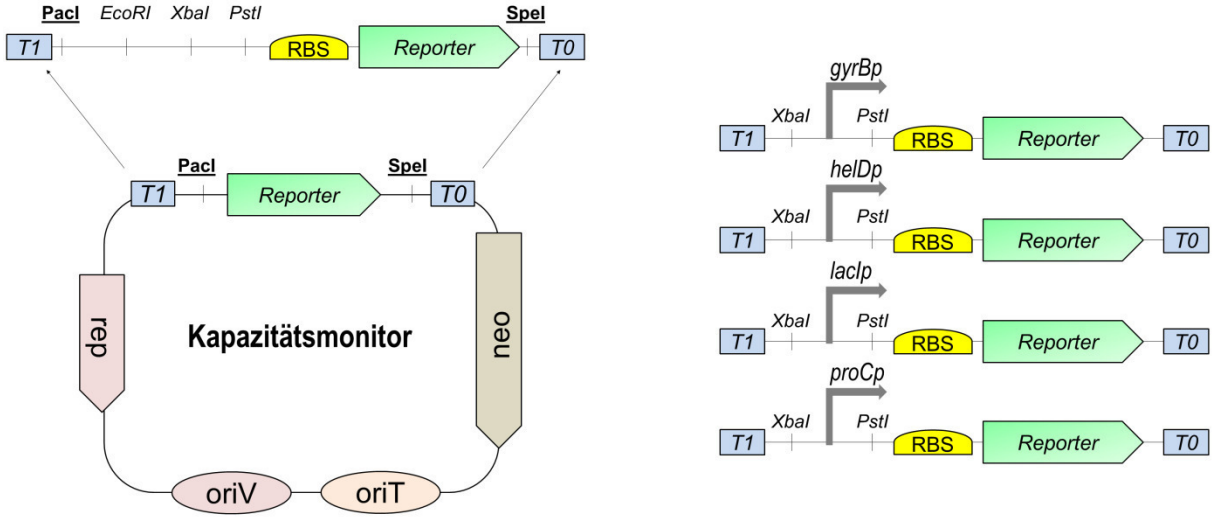


Abbildung 4.12 Um die zelluläre Kapazität mittels eines Fluoreszenzproteins visualisieren zu können, wurde das auf pSEVA 237R basierende Kapazitätsmonitorkonstrukt (links im Bild) bereitgestellt. Über die Schnittstellen XbaI *und* PstI *konnte die zu testenden konstitutiven Promotoren* gyrBp, helDp, lacIp *und* proCp *in die Cargo-Site eingebracht werden. Die resultierenden Konstrukte finden sich im rechten Teil der Abbildung.*

Aus dem Expressionsarray wurden die 5 % aller Gene selektiert, welche mit einem Stabilitätswert von unter 0.05 am uniformsten über die in diesem Kompendium analysierten Bedingungen exprimiert wurden. Des Weiteren wurde die Standardabweichung der normierten Expression über alle Bedingungen gebildet. Die 1 % Gene mit der geringsten Standardabweichung wurden in die nähere Auswahl genommen. Als vielversprechende Kandidaten, die potenziell als Promotor für das Reporterkonstrukt fungieren können, wurden Gene ausgewählt, die sowohl beiden Auswahlkriterien entsprachen als auch keiner bekannten Regulierung unterworfen sind. Um die Wahrscheinlichkeit für unbekannte Regulationseffekte zu minimieren, wurden Promotorregionen mit nur einem Promotor ermittelt, für welche außerdem im Optimalfall keine Spezifität hinsichtlich Sigmafaktoren bekannt ist. Basierend auf diesen Kriterien wurde der Promotor *helDp* in das Reporterkonstrukt eingebracht (Abbildung 4.12). Dieser ist für die niedrige Expression des Proteins DNA Helicase IV, welches für die Viabilität der Zelle nicht notwendig ist, verantwortlich [215]. Als ein zweiter Promotor, für den diese Einschränkungen gelten, wurde *proCp* identifiziert (Abbildung 4.12). Dieser Promotor steuert die Expression des Proteins, welches die letzte Stufe der Prolin-Biosynthese katalysiert. Kontrolliert wird diese

[31] https://moma.dk/normfinder-software

Reaktion ausschließlich auf Enzymebene und ist daher ebenfalls –soweit bekannt- unreguliert [216]. Dieses Gen findet in der Literatur bereits Verwendung als Referenzgen [217]. Als ein weiterer potentieller Kandidat wurde der Promotor *gyrBp* analysiert, welches ebenfalls ein gängiges *housekeeping*-Gen ist [218]–[220]. Die zugehörige Repressorbindestelle wurde für diese Studien nicht mit kloniert. Als letzter Testkandidat wurde der Promotor des gut bekannten LacI-Repressors des *lac*-Operons verwendet. Die äußerst robuste Expression dieses Gens ist lediglich einer Regulation auf Grund der genomischen Lokalität unterworfen [221]. Diese konnte durch die Entnahme aus dieser Umgebung eliminiert werden. Alle verwendeten Konstrukte wurden schematisch in Abbildung 4.12 dargestellt. Die in das Konstrukt insertierten Promotorsequenzen können in Anhang A.3.1 gefunden werden.

In einem nächsten Schritt wurden die erstellten Konstrukte hinsichtlich ihrer Konstanz in der Reportergenexpression evaluiert. Wie in Abbildung 4.13-A dargestellt, wurden nicht nur die Wachstumsraten des *E. coli* Stammes HMS174 durch die Verwendung unterschiedlicher C-Quellen variiert, sondern es wurde neben der Kultivierung im 250 mL Schüttelkolben auch eine Kultivierung im bioREACTOR48 durchgeführt. Hierbei konnte der Bereich an Wachstumsraten von 0.21 h^{-1} bis zu 0.49 h^{-1} analysiert werden. Im glucoseenthaltenden Standardmesssetup wurden trotz Reporterplasmid die -für das gewählte Minimalmedium- maximalen Wachstumsraten des Wildtypes erreicht (Daten nicht separat gezeigt). Da das Plasmid keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme zeigte, konnten pro Zucker im Schüttelkolben je zweimal nicht nur der Wildtyp, sondern auch das Leerplasmid und die vier Reportervarianten (*gyrBp*, *helDp*, *lacIp* und *proCp*) zu einer Wachstumsrate zusammengefasst werden (entspricht zwölf Replikaten pro Rate im Schüttelkolben). Für den bioREACTOR48 konnten jeweils das Leerplasmid, sowie die vier Varianten des Reporterstammes in Triplikaten zusammengefasst werden (entspricht 15 Replikaten pro Rate). Die in der Graphik dargestellten Wachstumsraten aus dem Schüttelkolben konnten im bioREACTOR48 reproduziert werden. Allerdings führten Schwankungen in der Temperatur, sowie Rührerausfälle bei der Kultivierung im bioREACTOR48 zu deutlich höheren Standardabweichungen, als im Schüttelkolbenformat. Da trotz der besseren Sauerstoffversorgung im bioREACTOR48 keine höheren Wachstumsraten erzielt werden konnten, wurde eine Sauerstofflimitierung für die im Batchbetrieb erreichten Zellmassen im 250 mL-Schüttelkolben ausgeschlossen.

Betrachtet man in Abbildung 4.13-B die korrespondierenden Reporterbildungsraten[32] ist zwar wiederrum eine größere Varianz im bioREACTOR48 zu erkennen, generell konnte für die mittlere Reportergenexpression bei allen Konstrukten keine Abhängigkeit vom Kultivierungssystem beobachtet werden. Im Schüttelkolbenformat scheint daher auch für die Ausbildung der Fluoreszenz keine Limitation in der Sauerstoffverfügbarkeit zu herrschen. Die mittleren Schwankungen über alle Bedingungen in der Genexpression sind mit circa 20 % als eine konstitutive Expression zu bewerten. Um die Ursache der Standardabweichungen zu finden, wurden in Abbildung 4.13-C die im Schüttelkolben gemessenen Raten nach den verwendeten Kohlenstoffquellen aufgeschlüsselt. Hier zeigt sich, dass sich der Hauptanteil der Standardabweichung auf versuchsbedingte Schwankungen zurückführen lässt: Für die Kohlenstoffquellen Acetat und Lactose konnte für alle Konstrukte eine überproportionale Expressionsrate verzeichnet werden, wohingegen für Fructose und Galactose eine unterdurchschnittliche Promotorperformance festgestellt werden konnte. Da diese Effekte auf

[32] Im Schüttelkolben wurden die sechs verwendeten Zuckerquellen jeweils im Duplikat betrachtet (entspricht 12 Replikaten), für den Reaktorblock wurden vier verschiedene Zuckerquellen im Triplikat (ebenfalls 12 Replikate) analysiert.

alle getesteten Promotorsysteme Wirkung zeigten, handelt es sich vermutlich um Schwankungen, deren Ursache im jeweiligen Versuchsansatz selbst und nicht in regulatorischen Effekten auf die Promotoren zu suchen sind.

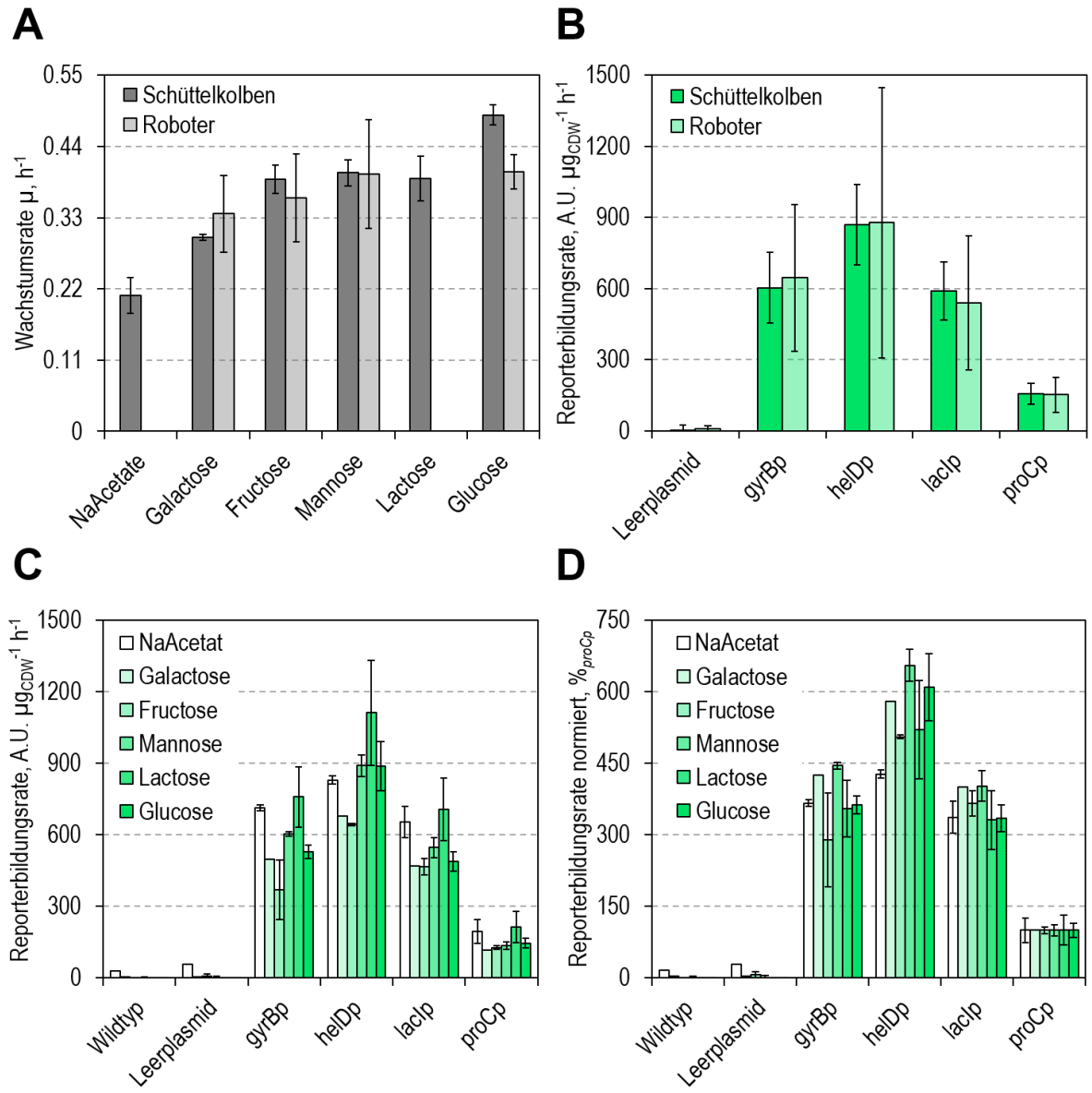


Abbildung 4.13 (A) Die erstellten Reporterkonstrukte (gyrBp, helDp, lacIp und proCp), der Wildtyp HMS174, sowie ein Stamm mit Leerplasmid (pSEVA237R) wurden sowohl im 250 mL Schüttelkolben, als auch im bioREACTOR48 (Roboter) mittels verschiedener Kohlenstoffquellen bei Wachstumsraten zwischen 0.21 h-1 bis zu 0.49 h-1 kultiviert. Die Wachstumsraten aller Stammkonfigurationen wurden für jeden Zucker im Duplikat (Schüttelkolben) beziehungsweise Triplikat (bioREACTOR48) zu einer Wachstumsrate zusammengefasst[32]. (B) Für die in (A) beschriebenen Experimente wurde bei beiden Kultivierungssystemen nach Stämmen unterschieden und die Reporterproteinproduktion je Zucker zusammengefasst. Auf diese Art und Weise wurden die Reporterproteinbildungsraten hinsichtlich der Varianz, die durch das Wachstum entsteht, verglichen. (C) Unterteilt man die in (B) gezeigten Balken zusätzlich nach den verwendeten Kohlenstoffquellen (jeweils im Duplikat), dann lassen sich neben der generellen Streuung zuckerspezifische Tendenzen, die promotorübergreifend auftreten, erkennen. (D) Um diese versuchsbedingten Seiteneffekte von tatsächlichen Reporterschwankungen trennen zu können, wurden alle Raten jeweils auf die Rate des proCp-Konstruktes normiert.

Aus diesem Grund wurden die Promotoraktivitäten auf den Promotor *proCp* mit der geringsten Standardabweichung normiert[33]. Wie in Abbildung 4.13-D gezeigt, verringert sich nach dieser Normierung für alle Konstrukte der Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Expression deutlich. Für den Promotor *helDp* konnte ein leichter Anstieg der Aktivität mit zunehmender Wachstumsrate gefunden werden. Dieser Promotor wurde daher als Reporter für die Analyse der zellulären Belastung ausgeschlossen. Trotz der sehr uniformen Produktionsrate wurde auch der Promotor *proCp* von weiteren Versuchen ausgenommen, da das sehr niedrige Expressionslevel die Signalspanne, in der die zelluläre Kapazität gemessen werden kann, stark einschränken würde. Sowohl der Promotor *lacIp*, als auch *gyrBp* wurden in Bezug auf die getesteten Bedingungen als sehr konstant beurteilt. Die geringere Gesamtstandardabweichung, sowie das Vorhandensein eines größeren Wissens um die Regulierung des *lac*-Operons gaben den Ausschlag für die Verwendung des *lacIp*-beinhaltenden Konstruktes. Resultierend aus der kultivierungsspezifischen Schwankung der Expression sollten Studien hinsichtlich des Kapazitätsverbrauchs immer in prozentualer Änderung bezogen auf den unbelasteten Stamm durchgeführt werden. Das *lacIp*-Fluoreszenzprotein-Konstrukt wurde in nachfolgenden Versuchen - plasmidbasiert als pSEVA237R-31 (auch 31; mCherry) und pSEVA237R-32 (auch 32; eGFP) oder genomisch-insertiert (in der attTn7-Landeplattform) - als Kapazitätsmonitor eingesetzt.

4.2.2 Vermessung der zellulären Kapazität bei unterschiedlichen energetischen Zuständen

Um den Einfluss einer heterologen Ladung auf die zelluläre Kapazität quantifizieren zu können, wurden im Folgenden die Abnahme des Wachstums sowie die Änderungen in der Expression des Kapazitätsmonitors systematisch untersucht. Hierfür wurde der verwendete Reporter mCherry durch eGFP ersetzt, um ein stärkeres Signal zu erhalten und um das System kompatibel zum Ladungsplasmid pTRA-51hd zu gestalten. Analysiert wurde nicht nur der Einfluss heterologer Last, sondern auch die Auswirkung unterschiedlicher energetischer Zustände. Um diese energetischen Zustände zu erreichen, wurde mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und damit einhergehend mit unterschiedlichen Wachstumsraten im 200 µL-Maßstab kultiviert. Verglichen mit anderen Kultivierungssystemen, besitzen Kultivierungen in der Mikrotiterplatte deutlich abweichende Strömungsdynamiken[34] in der Flüssigkultur. Nicht nur der Sauerstoffeintrag, sondern auch Verdunstungseffekte oder der pH können sich in derart kleinen Maßstäben deutlich von größervolumigen Kultivierungen unterscheiden und einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen haben. Aus diesem Grund ist es bei Kultivierungen im 200 µL-Maßstab empfehlenswert direkte Vergleiche nur innerhalb eines Versuchssetups durchzuführen. Da in einer derartigen Kultivierung außerdem nicht mit absoluten Raten gerechnet werden sollte, wurden Vergleiche zwischen normierten Daten gezogen. Analysiert wurde der Wildtypstamm HMS174(DE3) mit und ohne den Kapazitätsmonitor 32 sowie mit und ohne der heterologen Ladung pTRA641-51hd. Die Kulturen wurden mit 1.5 mM mTA induziert, beziehungweise im uninduzierten Fall mit der entsprechenden Menge an DMSO versetzt. Um die Autofluoreszenz des Stammes aus dem grünen Signal zu eliminieren, wurde das emittierte Signal - ähnlich wie für den mRNA-Tag dBroccoli - mit dem Ausgangsstamm ohne Kapazitätsmonitor abgeglichen (zum Beispiel ‚HMS174(DE3)+pTRA-51hd ind' *versus* ‚HMS174(DE3)+32+pTRA-51hd ind'; siehe Kapitel 3.5.5 beziehungsweise

[33] Die Reporterbildungsrate des Promotors *proCp* wurde für alle Zuckern als 100 % festgesetzt. Alle anderen Konstrukte wurden je nach Kohlenstoffquelle auf den entsprechenden *proCp*-Wert normiert.

[34] Bei Kultivierungen im Schüttelkolben kommt es durchaus zu turbulenter Strömung und daher zu einer besseren Durchmischung als in einer 200 µL-Kultivierung. Im 200 µL-Maßstab gewinnt auch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit einen großen Einfluss und verschlechtert die Durchmischung.

Anhang A.3.6). Da im Fall des Kapazitätsmonitors keine zusätzlichen Lösungsmittel oder Fluoreszenzen in das System eingebracht wurden (wie im Fall der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen dBroccoli-Messungen), konnten damit verbundene Autofluoreszenzänderungen minimiert werden. Änderungen in der Autofluoreszenz durch eine Einflussnahme des Kapazitätsmonitors selbst wurden vernachlässigt.

Wie in Abbildung 4.14-A dargestellt, wurde die Annahme getroffen, dass der Wildtypstamm HMS174(DE3) für jede Kohlenstoffquelle die jeweils maximalmögliche Wachstumsrate erreicht (100 %). Die prozentual erreichten Wachstumsraten wurden mit und ohne Ladungsplasmid pTRA-51hd im induzierten Fall im Triplikat mit und ohne den Kapazitätsmonitor 32 für verschiedenen Kohlenstoffquellen (Galactose, Fructose, Mannose, Glucose) bestimmt. Die Anwesenheit des Kapazitätsmonitors allein führte zu keiner signifikanten Beeinflussung des Wachstums (Wildtyp *versus* Reporter ‚32'). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Erhaltung des Kapazitätsmonitors von der Zelle innerhalb des metabolischen Spielraumes bewerkstelligt werden kann. Gemessen an der Abnahme der Wachstumsrate, scheinen Belastungseffekte ausschließlich auf das Ladungsplasmid pTRA-51hd und die analysierten Bedingungen rückführbar zu sein. Generell konnten in Abbildung 4.14-A Einbußen hinsichtlich der Wachstumsrate in Anwesenheit des zweiten Plasmides um circa 40 % festgestellt werden (Wildtyp *versus* Wildtyp+pTRA-51hd sowie Reporter ‚32' *versus* Reporter ‚32'+pTRA-51hd). Betrachtet man das Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, dann kann ein Trend erkannt werden: Die hochwertigeren (gemessen an der Wachstumsrate) Kohlenstoffquellen Mannose und Glucose führen im Mittel prozentual zu einem geringeren Verlust an Wachstum, als die weniger Energie liefernden Kohlenstoffquellen Galactose und Fructose. Dies deutet darauf hin, dass bei den energetisch besseren Kohlenstoffquellen genügend Ressourcen mobilisiert werden können oder bereits im Rahmen des metabolischen Spielraumes bereitstehen, so dass das Konkurrieren mit den wachstumsassoziierten Prozessen um die Kapazität geringer gehalten werden kann.

Analysiert man in Abbildung 4.14-B die Produktion der Ladung mCherry, dann kann kein signifikanter Unterschied zwischen dem Stamm mit und ohne Kapazitätsmonitor festgestellt werden. Auch die Qualität der Kohlenstoffquelle scheint auf die heterologe Produktion selbst keinen Einfluss zu haben. Die Produktionsrate schwankt in allen Fällen im Mittel zwischen 1.0 und 2.1 ng μg_{CDW}^{-1} h^{-1}. Da bei den schlechteren Substraten anteilsmäßig größere Einbußen in der Wachstumsrate gemacht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die analysierten HMS174(DE3) Zellen zunächst versuchen der heterologen Belastung durch Einsparungen im zelleigenen Haushalt zu begegnen, da heterloge Prozesse entkoppelt von der Zellregulation verlaufen und deshalb nicht ohne weiteres zurückgeschraubt werden können.

Für die aus Triplikaten gemittelten Kapazitätsmonitor tragenden Stämme (Reporter ‚32' und Reporter ‚32'+pTRA-51hd) mit und ohne Induktor (ind. und unind., mTA 1.5 mM), wurde der jeweilige Referenzstamm ohne Kapazitätsmonitor (Wildtyp und Wildtyp+pTRA-51hd, ind. und unind.) als Mittelwert aus Triplikaten zur Autofluoreszenzanalyse herangezogen. Für jeden Stamm wurden die Fluoreszenzbildungsraten des Kapazitätsmonitors im Mittel berechnet. Betrachtet man die in Abbildung 4.14-C dargestellten Unterschiede in der Produktionsrate des Kapazitätsmonitors, kann gezeigt werden, dass der Kapazitätsmonitorstamm ohne Zugabe des Induktors mTA (32 unind.) die höchste Reporterproduktion und damit die größte Kapazität besitzt. Schon die Zugabe des Induktors mTA, der die Beladung mCherry induziert, führt in fast allen Fällen bereits zu einer leichten Reduktion des Kapazitätsignals (‚32 ind' *versus* ‚32 unind' und ‚32+pTRA-51hd ind' *versus* ‚32+pTRA-51hd unind'). Auch das Hinzufügen des

Ladungsplasmides pTRA-51hd führt - außer bei Mannose - zu einem Rückgang in der Reporterexpression (‚32' *versus* ‚32+pTRA-51hd').

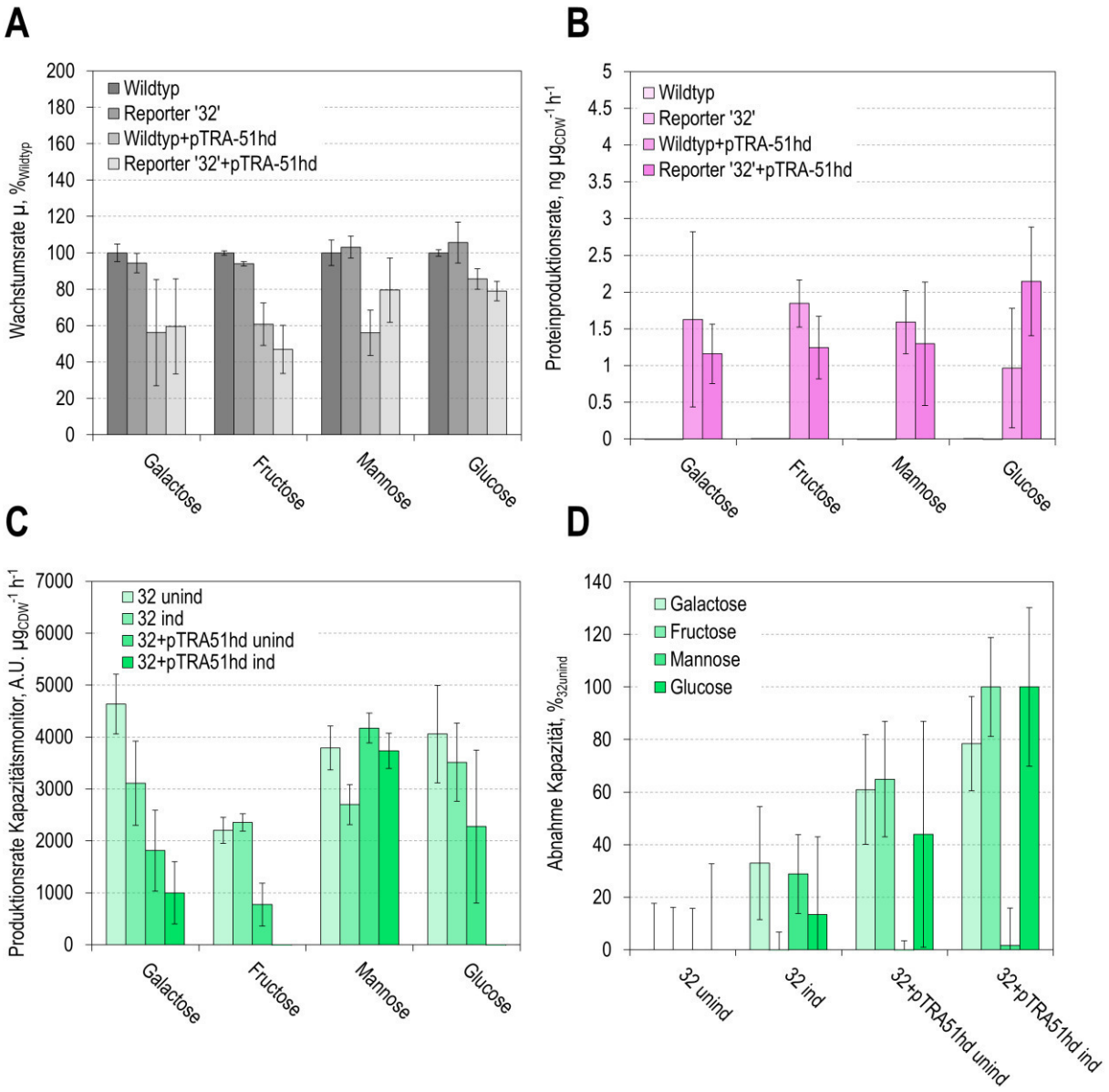


Abbildung 4.14 Verglichen wurden der Einfluss unerschiedlicher Beladungen auf das Wachstum, die Proteinproduktion sowie die Kapazität der Zelle. In (A) wurden induzierte (1.5 mM mTA) HMS174(DE3) Stämme mit und ohne Kapazitätsmonitor (‚Wildtyp' versus *‚32') ebenso wie mit und ohne Ladungsplasmid (‚+pTRA-51hd') vermessen. Analysiert wurden die prozentualen Wachstumsänderungen verglichen mit dem Stamm HMS174(DE3) (‚Wildtyp') für verschiedene Kohlenstoffquellen. (B) Die mittels des Ladungsplasmides pTRA-51hd integrierte Proteinproduktion zeigte weder in Bezug auf den Kapazitätsmonitors 32, noch hinsichtlich der verwendeten Kohlenstoffquelle einen signifikanten Unterschied in der Produktionsrate. In (C) dargestellt ist die autofluoreszenzbereinigte Produktionsrate des Kapazitätsmonitors für pTRA-51hd-belastete, sowie unbelastete Stämme im induzierten und uninduzierten Fall. Außerdem wurde die Kapazitätsmonitorexpression für unterschiedliche energetische Zustände (Variation der Kohlenstoffquelle) der Zelle im Triplikat charakterisiert. (D) Um die Auslastung der Zelle zu beschreiben, wurde die auf den uninduzierten Kapazitätsmonitorstamm (‚32 unind') normierte Differenz der Kapazitätsmonitorexpression in Bezug auf Kohlenstoffquelle und Belastung verglichen.*

Da - wie in Abbildung 4.13-C schon gezeigt - tagesbedingte Effekte wie Raumtemperatur oder Schwankungen in der Handhabung zu einer Varianz der Fluoreszenz führen können, wurden die Abnahmen innerhalb einer 96-well Platte auf die Bildungsrate für den Kapazitätsmonitor des uninduzierten Monitorstammes (‚32 unind') normiert. Die prozentualen Abnahmen in der zellulären Kapazität, welche durch Induktion, Plasmid und Proteinproduktion hervorgerufen wird, wurde (wie in Abbildung 4.14-D dargestellt) verglichen. Es wurde bei verschiedenen energetischen Zuständen (Galactose, Fructose, Mannose, Glucose) beurteilt, wie viel Kapazität durch den Induktor (‚ind') beziehungsweise die heterologe Belastung (‚pTRA-51hd') belegt wurde: Im Mittel führte allein die Zugabe des Induktors zu einer Verringerung der Kapazität um rund 20 % (Abbildung 4.14-D, ‚32 unind' *versus* ‚32 ind'). Die Anwesenheit des Ladungsplasmids pTRA-51hd reduzierte die Kapazität im Mittel um circa 50 % (Abbildung 4.14-D, ‚32 unind' *versus* ‚32+pTRA-51hd unind'). Unter mCherry produzierenden Bedingungen wurde die Kapazität der Zelle bis zu 100 % belegt (Abbildung 4.14-D, ‚32 unind' *versus* ‚32+pTRA-51hd ind'). Eine Ausnahme bildet der Zucker Mannose. Hier konnte nahezu kein Kapazitätsverbrauch festgestellt werden. Da weder das Wachstumsverhalten noch die Proteinproduktion eine Abweichung zeigen, lässt sich vermuten, dass es sich hierbei um Ausreißer handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe des Kapazitätsmonitorkonstruktes 32 eine Abnahme der Kapazität mit zunehmender Ladung beobachtet werden konnte. Zwar konnte auch ein deutlicher Effekt auf das Wachstum gemessen werden, jedoch wurde für die Kapazität eine graduelle Abnahme mit einer Zunahme der Ladung vermessen. Der Einbruch im Wachstum um bis zu 40 % wurde hauptsächlich durch das Ladungsplasmid an sich verursacht und steht in einem Zusammenhang mit dem energetischen Zustand der Zelle. Das induzierte Plasmid pTRA-51hd scheint die Kapazität der Zelle völlig auszuschöpfen. Hier ist der Zustand einer Metabolischen Belastung zu erwarten.

.

4.3 Quantifizierung zellulärer Ressourcen

Dass *E. coli* viele intrazelluläre Prozesse in Abhängigkeit der Wachstumsrate reguliert, ist physiologisch sinnvoll. Auch die Bildung der mitunter wichtigsten Ressourcen - der RNA-Polymerasen und der Ribosomen - ist wachstumsabhängig. Laut Literatur nimmt die Verfügbarkeit dieser Ressourcen mit zunehmender Wachstumsrate kontinuierlich zu [27]. Da diese Dynamik bereits beschrieben wurde [31], [211], ist es möglich das Verhalten von Wildtypzellen basierend auf diesen Zusammenhängen vorherzusagen. Für den Fall einer heterologen Belastung können jedoch natürlich vorhandene Gleichgewichtszustände empfindlich gestört werden. Eine mögliche Reaktion der Zelle auf eine heterologe Last wurde beispielhaft im Anhang A.3.9 vorgezeichnet. Um die tatsächliche Reaktion der Zellen zu untersuchen und um die Dynamiken der für die Produktion wichtigsten Ressourcen Ribosomen und RNA-Polymerase abschätzen zu können, wurden für diese beiden Zellbestandteile Konzepte entwickelt, welche es ermöglichen die Verfügbarkeit bei unterschiedlichen zellulären Zuständen zu analysieren. Zum einen wurde versucht über Immunoquantifizierung einen Zugang zur absoluten Anzahl der Moleküle zu finden, zum anderen wurden auch hier Reportersysteme etabliert, welche es ermöglichen die Dynamik der Expression der Ressourcen Ribosomen sowie RNA-Polymerasen *on-line* zu erfassen.

4.3.1 RNA-Polymerase

Trotz unterschiedlicher Konzentration sind die notwendigen Gene für Ribosomen und RNA-Polymerasen häufig zusammen in Operons organisiert. Lediglich die kleine ω-Untereinheit (RpoZ) der RNA-Polymerase ist in einem Transkript mit Genen verschiedenster anderer Aufgaben zusammengefasst. Alle weiteren Bestandteile des RNA-Polymerase Core-Enzyms, welches aus fünf Proteinen ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) aufgebaut ist, befinden sich in transkriptionellen Einheiten mit ribosomalen Proteinen. Die beiden größten Proteine RpoB und RpoC, die zwei Drittel des Molekulargewichts der RNA-Polymerase ausmachen, werden als zusammenhängende Einheit transkribiert. Da dieser signifikante Anteil der RNA-Polymerase dem in Abbildung 4.15 gezeigten DNA-Abschnitt entstammt, ist diese Region von besonderem Interesse. In diesem Bereich regulieren vier Promotoren die Transkription. In dieser Arbeit wurde zur Charakterisierung der RNA-Polymeraseexpression auf den Promotor *rplKp* zurückgegriffen (Konstrukt aus der Bachelorarbeit von Lilian Göldel [186]). Dieser Promotor deckt alle für diese Gene bekannten regulatorischen Effekte ab (negative Autoregulation durch RplA, sowie Repression bei Nährstoffmangel durch die Anwesenheit des DksA-ppGpp-Komplexes). Außerdem besitzt er den Vorteil, dass die Herstellung der großen ribosomalen Untereinheit ebenfalls analysiert werden kann. Da das Transkript im Vergleich zu den anderen Promotoren alle Gene umfasst, die in Abbildung 4.15 dargestellt sind, sind nämlich auch vier Proteine aus der großen ribosomalen Untereinheit enthalten. Nicht nur RplL, eines der häufigsten Proteine in *E. coli* Zellen[35], sondern auch die ß-Untereinheit RpoB, welche limitierend für die RNA-Polymerase-Verfügbarkeit ist [27], sind dem gleichen Promotor unterstellt. Daher liegt es nahe, dass die Feinabstimmung in der intrazellulären Konzentration der Expressionsmaschinerie hauptsächlich über die Ribosomenbindestellen und Proteinstabilitäten gesteuert werden und nicht über den Promotor. Diese unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Proteine in der Zelle (6 800-72 000 Ribosomen [27] *versus* 1 500-11 400 RNA-Polymerasen [29,49]) können weder durch die vorliegende Regulation erklärt werden noch durch die Position der Gene im Operon, auch wenn die Translationseffizienz zum 3'-Ende abnimmt.

[35] Laut Protein Abundance Database Version 4.1; https://pax-db.org/species/511145

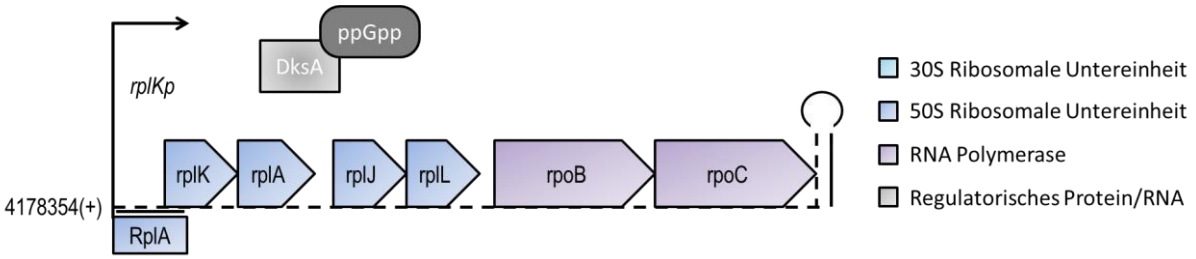


Abbildung 4.15 Zur Charakterisierung der RNA-Polymeraseverfügbarkeit wurde repräsentativ das Gen rpoC ausgewählt. Dieses Gen ist nicht nur mit der RNA-Polymerase Untereinheit RpoB zu einer transkriptionellen Einheit organisiert, sondern auch mit vier Genen aus der großen ribosomalen Untereinheit. Die hier gezeigte transkriptionelle Einheit wird als Ganzes vom Promotor rplKp *kontrolliert. Dieser Promotor hat nicht nur eine negative Autoregulation durch RplA, sondern wird auch bei Nährstoffmangel durch die Anwesenheit des DksA-ppGpp-Komplexes reprimiert. Somit kann* rplKp *stellvertretend als Monitor für die regulatorischen Einflüsse genutzt werden. (Abbildung nach EcoCyC)*

Um ein repräsentatives Gen für die RNA-Polymeraseverfügbarkeit auszuwählen, war es wichtig, dass die Produktion dieses Zielproteins in etwa die Verfügbarkeit des gesamten RNA-Polymerasekomplexes widerspiegelt. Zwar ist bei der RNA-Polymerase-Bildung die ß-Untereinheit (RpoB) das limitierende Protein [27], jedoch ist für die ß‘-Untereinheit RpoC bereits bekannt, dass zum einen die Polymerase trotz einer Fusion mit einem Fluoreszenzprotein funktional bleibt und zum anderen ein Antikörper (Klon NT73, purified anti *E.coli* RNA Polymerase β Prime) für die Immunoquantifizierung verfügbar ist. Daher wurde, neben dem Promotor *rplKp,* das Protein RpoC stellvertretend für die RNA-Polymerase-Konzentration analysiert.

Für Abbildung 4.16-A wurden die im 50 mL-Maßstab kultivierten HMS174(DE3) Stämme mit (hd) und ohne (WT) pTRA-51hd Plasmid hinsichtlich der RNA-Polymerasen-Anzahl mit unterschiedlichen Substraten nach 3.5 und 6.5 Stunden verglichen (induziert mit 1.5 mM mTA). Die Anzahl der RNA-Polymerasen wurde basierend auf der Immunoquantifikation des Proteins RpoC über eine densitometrische Auswertung der Westernblot-Banden angenähert. Zunächst ließ sich feststellen, dass vor allem beim pTRA-51hd belasteten Stamm (‚hd‘) - verglichen mit den Messungen nach 3.5 h - nach 6.5 h ein Trend zu einer erhöhten Anzahl an RNA-Polymerasen zu erkennen ist. Anders als beim zentralen Stoffwechsel in der exponentiellen Phase, scheint hier kein Gleichgewicht erreicht zu werden. Betrachtet man die Qualität der Kohlenstoffquellen, kann kein eindeutiger Einfluss auf die absolute Anzahl beobachtet werden. Quantifiziert man hingegen die Anzahl der RNA-Polymerasemoleküle bei unterschiedlich belasteten Stämmen (‚WT‘ *versus* ‚hd‘), lässt sich für den pTRA-51hd beladenen Stamm (‚hd‘) feststellen, dass im Mittel ein Trend zu mehr RNA-Polymerasemoleküle als im Wildtypstamm zu beobachten ist. Ein Grund hierfür kann im Regulon gefunden werden: Anders als bei Wildtypzellen mit freien Ribosomen fehlt bei einer entsprechenden Auslastung der Zelle ohne Nährstofflimitation die negative Rückkopplung durch das Protein RplA, welches in die große Untereinheit der Ribosomen verbaut wird. Ist dieses Protein in Translationsprozesse involviert, dann steht es nicht für die Repressorbindestelle zur Verfügung.

Zur Erfassung der Promotoraktivität wurde der in Abbildung 4.15 beschriebene Promotor mittels dem Reporterkonstrukt pSEVA237R-82 (‚82‘) in den HMS174(DE3) Stamm mit und ohne das pTRA-51hd Plasmid (‚hd‘) eingebracht und im 200 µL-Maßstab kultiviert. Induziert wurde mit 1.5 mM mTA. Die hier vermessene, grüne Fluoreszenz wurde ebenfalls, wie in Anhang A.3.6

beschrieben, aus dem Gesamtsignal herausgelöst. Die plasmidbasierte Reporterexpression des fluoreszierenden GFP-Proteins unter der Kontrolle des *rplKp*-Pomotors (Abbildung 4.16-B) wurde auf die Aktivität des jeweiligen Wildtypstammes (‚82 unind') normiert. Hierdurch konnten wachstumsratenspezifische Effekte eliminiert werden und die Auswirkung unterschiedlicher Belastung untersucht werden. Übereinstimmend zur bereits beschriebenen Dynamik kann in Anwesenheit des uninduzierten Plasmides (Abbildung 4.16-B) eine erhöhte Bereitstellung des *rplKp*-kontrollierten Transkriptes beobachtet werden. Stieg mit der Induktion die Belastung konnte nur noch für hochwertige Kohlenstoffquellen wie Glucose eine Erhöhung der *rplKp* kontrollierten Expression gemessen werden. Die zusätzliche Bereitstellung zellulärer Ressourcen im moderat belasteten Fall für alle Zuckerquellen konnte schon in Abbildung 4.14 gezeigt werden. Im stark belasteten Fall kann dies nur noch für die energetisch hochwertigeren Zucker gewährleistet werden. Dies kann auch darin begründet liegen, dass bei Stress die sogenannte *stringent response* durch das Alarmon ppGpp ausgelöst werden kann. Dies kann zu einem negativen Effekt auf die Herstellung der Expressionsmaschinerie führen [222].

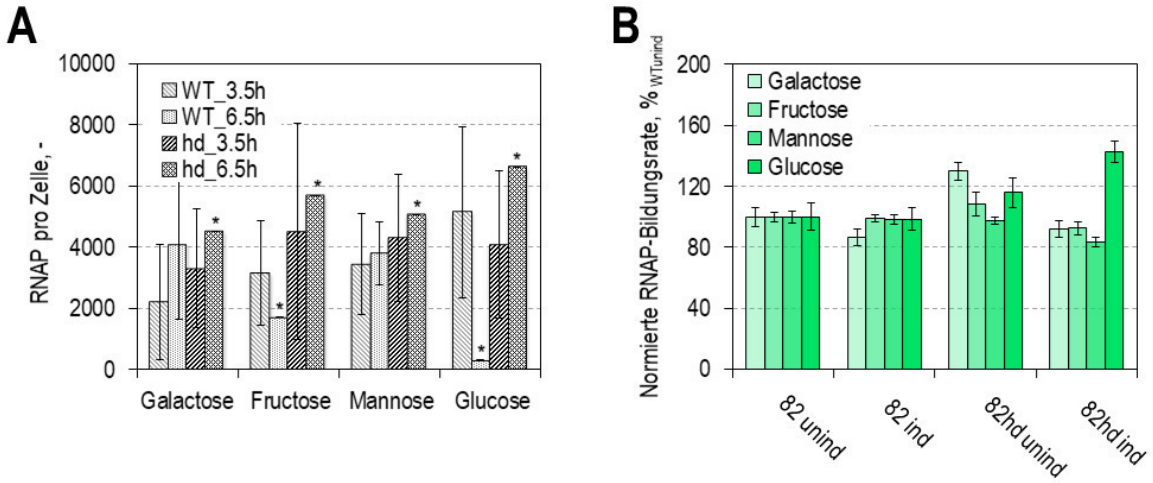


Abbildung 4.16 Die RNA-Polymerase Menge pro Zelle sowie die Bildungsrate konnten für unterschiedliche Belastungen für die Kohlenstoffquellen Galactose, Fructose, Mannose und Glucose analysiert werden. (A) Die Anzahl der RNA-Polymerasen (RNAP) pro Zelle konnte mittels Immunoquantifizierung basierend auf der Annahme, dass ein RpoC-Molekül einem RNA-Polymerasekomplex entspricht, für E. coli *HMS174(DE3) Zellen mit (‚hd') und ohne (‚WT') dem Plasmid pTRA-51hd näherungsweise geschätzt werden. Einfachbestimmungen sind hier mit einem Stern (*) gekennzeichnet und unter Vorbehalt zu bewerten. Die jeweiligen Proben wurden nach 3.5 und 6 h Kultivierung im 50 mL-Maßstab untersucht. (B) Analysiert wurde außerdem die Aktivität des Promotors* rplKp*. Die Reporterplasmid pSEVA237R-82 (‚82') tragenden Stämme konnten im 200 µL-Maßstab kann nach einer Normierung auf den uninduzierten Wildtypstamm (‚82 unind') verglichen werden. Bewertet wurden sowohl HMS174(DE3) ‚82' mit und ohne der Ladung pTRA-51hd (‚hd') als auch induzierte (‚ind') und uninduzierte (‚unind') Stämme.*

Werden die mittels des Reporterkonstruktes ermittelten RNA-Polymerase-Bildungsraten hinsichtlich der korrespondierenden Wachstumsraten analysiert lässt sich eine starke Korrelation feststellen. Wie in Abbildung 4.17 gezeigt, wurden in Anwesenheit des Reporters für RNA-Polymerase-Expression (‚pSEVA237R-82' beziehungsweise ‚82') zwei Populationen identifiziert. Bei Stämmen mit integriertem pTRA-51hd Plasmid wurde - unabhängig ob induziert oder nicht - generell eine erhöhte RNA-Polymerase-Bildungsrate beziehungsweise eine erhöhte Aktivität des *rplKp*-Promotors beobachtet. Dies deute darauf hin, dass Zellen in der Lage sind bei einer Metabolischen Belastung mit einer vermehrten Bereitstellung von RNA-Polymerase zu reagieren. Da gerade hinsichtlich der bereits erwähnten Regulierung bei Stress davon ausgegangen werden muss, dass sich dieser Zusammenhang an den Randbereichen in einer

anderen Dynamik verhält, ist neben einem Sättigungswert eher ein sigmoidaler Verlauf zu erwarten.

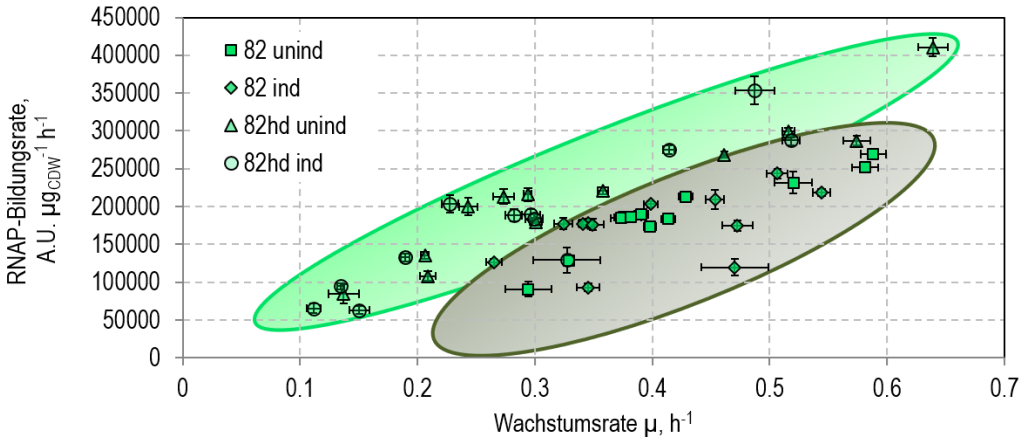


Abbildung 4.17 Betrachtet man die mittels des Reporterplasmids pSEVA237R-82 (‚82') ermittelten RNA-Polymerase-Bildungsraten für induzierte (‚ind') und unindzuierte (‚unind') HMS174(DE3) Stämme mit und ohne pTRA-51hd Plasmid, dann kann hinsichtlich der korrespondierenden Wachstumsraten eine eindeutige Korrelation festgestellt werden. Der Bereich, in welchem sich pTRA-51hd belastete Stämme (‚82 hd') finden wurde grün hinterlegt. Stämme die ausschließlich den rplKp *-Reporter und kein Ladungsplasmid (‚82') tragen, finden sich im grauen Bereich.*

4.3.2 Ribosomen

Die wachstumsabhängige Variation in den publizierten Werten für die Ribosomenzahl pro Zelle (6 800-72 000) [27] deutet darauf hin, dass hier je nach Kohlenstoffquelle und Belastung mit immensen Schwankungen zu rechnen ist. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Ruhelagen stark vom aktuellen Zustand der Zelle abhängen können. Da in der Regel sowohl bei Promotorstudien als auch bei immunologischen Nachweisen der Fokus der Untersuchungen auf ein Gen gelegt wird, wurde auch in dieser Studie eine repräsentative Kombination aus Protein und Promotor ausgewählt.

Um die ribosomale Dynamik in einer Zelle via immunologischen Nachweis sowie über Promotordynamiken abbilden zu können, müssen einige Kriterien erfüllt sein. Zunächst einmal sollte das Protein limitierend sein, um zu gewährleisten, dass die Anzahl dieses die Verfügbarkeit des Multienzymkomplexes widerspiegelt. Drei der acht häufigsten Proteine (RplE, RplY und RplL) in einer Zelle sind laut paxDb[36] Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit. Die Auswahl eines Proteins aus der kleinen 30S-Untereinheit wurde als sinnvoll beurteilt, da die hier vorkommenden Proteine im Schnitt in geringerem Ausmaß produziert werden, als die der großen Untereinheit. Außerdem sollte das Protein eine regulatorische Funktion bei der Ribosomensynthese aufweisen. Eine weitere Anforderung war die Verfügbarkeit eines passenden Antikörpers sowie die Zugänglichkeit des Epitops. Mit Blick auf potenzielle Tagging-Studien in Folgearbeiten, wurde die Möglichkeit dieses Protein ohne Funktionsverlust mit einem Fluoreszenzprotein zu fusionieren als wünschenswert eingestuft. In Bezug auf den Promotor wurde darauf geachtet, dass es sich um einen einzeln agierenden Promotor handelt, dessen Regulatorstellen bereits bekannt sind. Um die Wahrscheinlichkeit für unerwartete Effekte zu

[36] Laut Protein Abundance Database Version 4.1; https://pax-db.org/species/511145

minimieren, wurde darauf Wert gelegt, dass die Transkriptionsinitiation über den σ^{70} Faktor, der generell dafür bekannt ist essentielle *housekeeping*-Gene zu kontrollieren [223], erfolgt.

Um die Größenordnungen der Ribosomenanzahl pro Zelle beurteilen zu können, wurde das innerhalb des Ribosomes singulär auftretende Protein RpsB repräsentativ für das RNA-Protein-Konglomerat, aus welchem das Ribosom zusammengesetzt ist, ausgewählt. Es wurde die Annahme getroffen, dass die Anzahl der in der Zelle vorliegenden RpsB-Moleküle der Menge an Ribosomen entspricht. Der immunologische Nachweis wurde auf das Protein RpsB, das Bestandteil der 30S ribosomalen Untereinheit ist und stöchiometrisch nur einmal pro Ribosom vorkommt, mittels des HRP[37]-getaggten, polyclonalen Antikörpers CSB-PA08644B0Rb durchgeführt.

RpsB – soweit bekannt – ist eines der wenigen ribosomalen Proteine, das lediglich durch einen Promotor pro Operon reguliert wird, wenige andere Gene pro Transkript hat und außerdem über eine negative Autoregulation der Expression verfügt (Abbildung 4.18). Diese Eigenschaften können sich stabilisierend auf die Expression des Proteins auswirken [224]. Außerdem deutet die negative Autoregulation darauf hin, dass RpsB auch ein Kontrollelement in der Ribosomenverfügbarkeit sein kann [225]. Auf Grund der ppGpp-Interaktion ist *rpsBp* in die *stringent response* für Nährstoffverfügbarkeit - insbesondere bei Aminosäureknappheit - involviert, was einen großen Effekt bei der heterologen Proteinproduktion haben kann [225], [226]. Da der Promotor *rpsBp* in γ-Proteobakterien hoch konserviert vorliegt, kann dieser ein gutes Ziel auch für speziesübergreifende Analysen sein [225]. In Hinsicht auf zukünftige Versuche, konnte bereits von Bakshi *et al* [49] gezeigt werden, dass die Funktionalität der Ribosomen durch eine Fusion des RpsB-Proteins an ein Fluoreszenzprotein nicht beeinträchtigt wird.

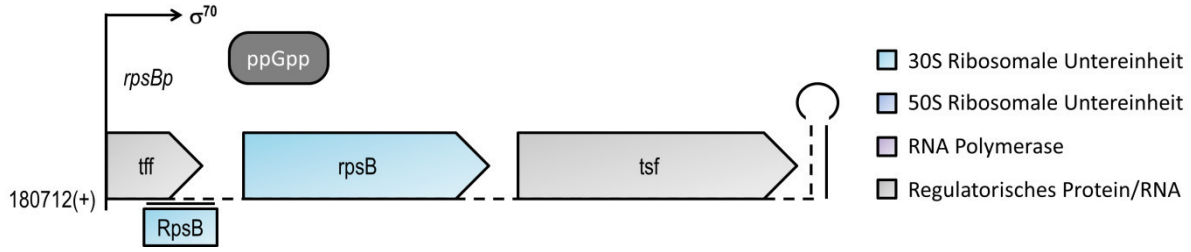


Abbildung 4.18 Die zur Charakterisierung der Ribosomenverfügbarkeit herangezogene transkriptionelle Einheit unter der Kontrolle des Promotors rpsBp *umfasst neben dem für die kleine, ribosomale Untereinheit kodierenden 726 bp lange Gen* rpsB *auch die putativ-regulatorische kurz RNA* tff*, sowie den Elongationsfaktor* tsf*. Neben einer negativen Autoregulation wird die Transkriptionsinitiation durch das Nährstofflimitation-anzeigende Molekül ppGpp kontrolliert, wobei σ^{70} als Sigmafaktor dient. (Abbildung nach EcoCyc)*

Da die Wachstumsrate in direkter Abhängigkeit zur Ribosomenverfügbarkeit steht, wurden auch hier durch den Einsatz verschiedener Kohlenstoffquellen unterschiedliche, energetische Zustände simuliert. Neben dem Wildtypstamm HMS174(DE3) wurde ein durch das pTRA-51hd belasteter Stamm in 250 mL Schüttelkolben im 50 mL-Maßstab kultiviert. Beiden Stämmen wurde zur Induktion von Beginn an 1.5 mM mTA zugesetzt. Die Proben für die immunologische Quantifizierung des Proteins RpsB wurden in der Mitte der exponentiellen Phase entnommen. Zur Verifikation der Fließgleichgewichtsannahme wurden pro Ansatz zwei Analysen im Abstand von

[37] Die Horse-Raddish-Peroxidase (HRP) ist ein Enzym, welches im Rahmen der Immuno-Quantifizierung eine Farbreaktion katalysiert.

1.5 h durchgeführt (nach 4 und 5.5 h). Die RpsB-Menge wurde bezogen auf den RpsB-Standard mittels einer densitometrischen Bestimmung über die Bandenintensitäten des Westernblotes quantifiziert. In Abbildung 4.19-A (die hier gezeigten Daten wurden in Zusammenarbeit mit Melanie Knesebeck erhoben und finden sich auch in der entsprechenden Bachelorarbeit [185]), wurde gezeigt, dass sowohl der Wildtypstamm als auch der belastete Stamm nach 4 h die gleiche Größenordnung an Ribosomenanzahl aufwies wie nach 5.5 h. Der Quantifizierungsprozess selbst bringt - begonnen mit einer stammspezifischen Variabilität über die Probenaufarbeitung bis hin zur Quantifizierung in ImageJ - eine große Varianz mit. Im Mittel kann jedoch die Annahme getroffen werden, dass sich innerhalb der exponentiellen Phase eine Gleichgewichtsflussverteilung einstellt. Generell liegen die in Abbildung 4.19-A ermittelten Werte bei Größenordnungen von bis zu 260 000 Ribosomen pro Zelle. Dieser Wert erscheint verglichen mit Literaturwerten als deutlich zu hoch. Analysiert man dennoch die Verhältnisse der Proben zueinander, dann kann für die Zucker Fructose und Mannose eine deutliche Erhöhung der Anzahl an Ribosomen im belasteten Stamm (‚hd') im Gegensatz zum unbelasteten Stamm (‚WT') gemessen werden. Für belastete Zellen scheint es eine optimale Wachstumsrate zu geben. Anders als beim energetisch ungünstigen Substrat Galactose sollte am Optimum genügend Energie für Wachstum und Produktion bereitstehen. Der Bedarf an Ribosomen sollte durch eine hohe Wachstumsrate jedoch nicht bis an die Grenzen ausgereizt werden, wie es bei der Kohlenstoffquelle Glucose der Fall ist. Basierend auf dieser Datenlage empfiehlt es sich durch eine Reduktion der Wachstumsrate etwas unterhalb von μ_{max} den produzierenden Zellen die Möglichkeit zu geben bei heterologer Belastung zusätzliche Ressourcen zu rekrutieren.

Betrachtet man die Aktivität des korrespondierenden Promotors *rpsBp* anhand der Expression des Reporterproteins eGFP (Reporterplasmid ‚pSEVA237R-72' beziehungsweise ‚72'), dann kann die Bildungsrate dieses Proteins als stellvertretend für die Herstellung der Ribosomen gesehen werden. Bei einer Normierung der analysierten Stämme auf jeweils den unbelasteten, uninduzierten Wildtypstamm (‚72 unind', Abbildung 4.19-B), zeigt sich im direkten Vergleich der Zuckerquellen, dass die Qualität des Zuckers unter Belastung (‚72hd') eine Rolle bei der Frage wie viele Ribosomen bereitgestellt werden können spielt. Vor allem für den energetisch wenig ergiebigen Zucker Galactose konnte mit zunehmender Belastung gezeigt werden, dass die Produktion der Ribosomen nicht aufrechterhalten werden konnte. Mit zunehmender Qualität der Zuckerquellen fiel dieser Effekt schwächer aus. Außer für Galactose konnte bei der Belastung durch heterologe Replikation (‚72hd unind') im Mittel eine leicht erhöhte Aktivität in der Ribosomenbereitstellung gemessen werden. Wie schon mittels der Immunoquantifizierung via Westerblot zu sehen war, ist die Zelle abseits der Extrembedingungen (zum Beispiel starke Belastung oder energetisch ungünstige Kohlenstoffquelle, sowie maximales Wachstum) in der Lage zusätzlich Ribosomen bereit zu stellen. Einhergehend mit hohen Wachstumsraten findet eine stärkere Verdünnung zellinterner Moleküle statt. Aus diesem Grund ist es möglich, dass eine höhere absolute Menge an Ribosomen bei niedrigeren Wachstumsraten und schlechterer Kohlenstoffquellen quantifizierbar ist. Obwohl also die Ribosomenproduktion bei Glucose prozentual am wenigsten Einbußen zeigt, kann die Gesamtanzahl an Ribosomen niedriger sein als bei den schlechteren Kohlenstoffquellen.

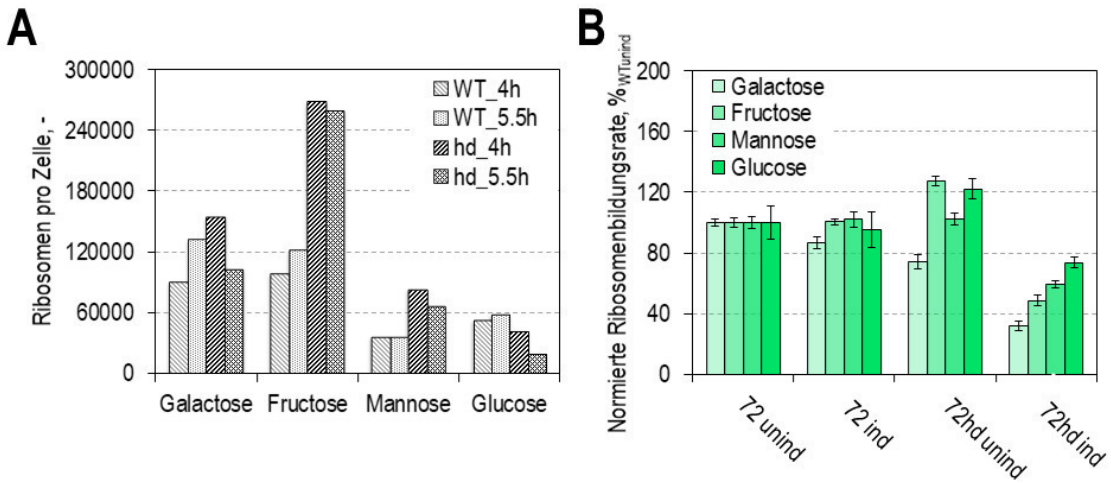


Abbildung 4.19 Die Ribosomenverfügbarkeit sowie die Produktionsrate wurden für unterschiedliche Kohlenstoffquellen (Galactose, Fructose, Mannose und Glucose) analysiert. (A) Die absolute Anzahl an Ribosomen pro Zelle konnte via Immunoquantifikation des repräsentativen, ribosomalen Proteins RpsB für den Wildtypstamm HMS174(DE3) (‚WT') und den mit dem pTRA-51hd beladenen Stamm (‚hd') analysiert werden. Hierfür wurden Proben aus einer 50 mL Kultivierung nach 4 und 5.5 h untersucht. (B) Betrachtet man die Promotoraktivität des korrespondierenden Promotors rpsBp normiert auf die Expression des uninduzierten Reporterstammes (‚72 unind'), dann lässt sich in Anwesenheit des Plasmides pTRA-51hd (‚hd') eine starke Varianz in der Aktivität erkennen. Analysiert wurden die Stammvarianten ‚72' und ‚72hd' im induzierten (‚ind') und uninduzierten (‚unind') Fall.

In Abbildung 4.20 wurden die Bildungsraten des Fluoreszenzreporters mit den entsprechenden Wachstumsraten korreliert. Es wurde die schon beschriebene Wachstumsabhängigkeit beobachten. Für Wachstumsraten zwischen 0.1 und 0.4 h^{-1} konnte ein nahezu linearer zunehmender Verlauf der Ribosomenbildungsrate beobachtet werden (Abbildung 4.20-A). Stämme, die zusätzlich mit dem pTRA-51hd-Plasmid beladene waren (‚72hd'), zeigten generell sowohl eine Reduktion im Wachstum als auch in der Ribosomenbildungsrate (Abbildung 4.20, grün hinterlegt). Für uninduzierte, plasmidtragende Stämme (‚72hd unind') wurde verglichen mit den unbelasteten ‚72' Reporterstämmen (grau hinterlegt) eine überdurchschnittliche Ribosomenbildungsrate gemessen. Für induzierte, belastete Stämme (‚72hd ind') konnte lediglich eine Verringerung der Wachstumsrate beobachtet werden. Verglichen mit dem unbelasteten Reporterstamm konnte jedoch für den ‚72hd ind' keine erhöhte Aktivität des Reporters festgestellt werden.

Zusammenfassen lässt sich also sagen, dass im vorliegenden Setup für moderat belastete Stämme (‚72hd unind') ein Plus an Ribosomen bereitgestellt werden konnte. Ausgelastete Zellen (hohe Wachstumsrate, heterologe Belastung, schlechtes Substrat, induzierte Proteinexpression) konnten keine zusätzlichen Ressourcen bereitstellen und reagierten hauptsächlich mit einer Reduktion im Wachstum. Für Modellierungszwecke empfiehlt es sich trotzdem auch für heterologbelastete Zellen auf gängige Methoden zurückzugreifen und die Ribosomenverfügbarkeit aufgrund der Wachstumsrate abzuschätzen.

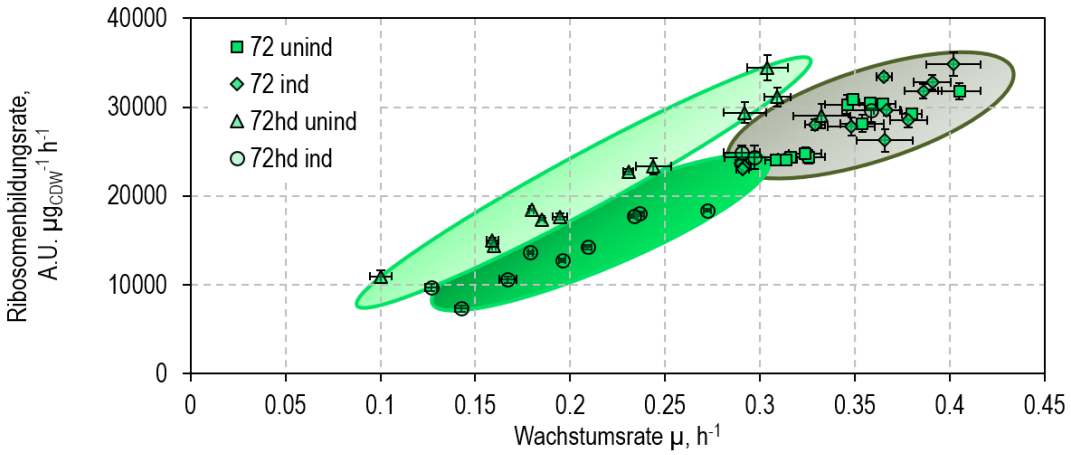


Abbildung 4.20 Betrachtet man die mittels des Reporterplasmids pSEVA237R-72 (‚72') ermittelten Ribosomen-Bildungsraten für induzierte (‚ind') und unindzuierte (‚unind') HMS174(DE3) Stämme mit und ohne pTRA-51hd Plasmid (‚hd'), dann kann hinsichtlich der korrespondierenden Wachstumsraten eine eindeutige Korrelation festgestellt werden. Der Bereich, in welchem sich pTRA-51hd belastete Stämme (‚72hd') finden wurde grün (hellgrün: ‚unind', dunkelgrün: ‚ind') hinterlegt. Stämme die ausschließlich den rplKp-Reporter und kein Ladungsplasmid (‚72') tragen, finden sich im grauen Bereich.

4.3.3 Imitation unterschiedlicher Ressourcen-Verfügbarkeit

Vor allem für Glucose konnten Unterschiede in der Ressourcen-Bereitstellung beobachtet werden. Daher wurde im Folgenden für das Substrat Glucose mittels Inhibitoren die Verfügbarkeit der RNA-Polymerase-Moleküle, sowie die der Ribosomen während der heterologen Produktion reduziert. Hierdurch sollte künstlich eine Situation, ähnlich dem Effekt fehlender Ressourcen, imitiert werden und der Einfluss auf die Proteinproduktion simuliert werden. Bei einem angenommenen Zellvolumen von $2.0*10^{-12}$ cm^3 beziehungsweise $2.0*10^{-9}$ µL wurde – verglichen mit den mittleren Konzentrationen an Ressourcen pro Zelle – ein Überschuss an Inhibitor zugegeben. Da die zeitliche Auflösung von Proteomdaten limitiert ist, wurde - anstelle der generellen Expressionsaktivität einer Zelle - repräsentativ das zelluläre Wachstum analysiert. Die heterologe Expression konnte mittels des Plasmids pTRA-51hd *on-line* beobachtet werden. Die in Abbildung 4.21 gezeigten Daten umfassen jeweils Verhalten der Zelltrockenmasse (linke Spalte), sowie des extrahierten heterologen mRNA-Signals (mittlere Spalte) und des heterologen Proteinsignals (rechte Spalte) über die Zeit. Es konnte nicht nur ein Transkriptionsabbruch (oberste Reihe), sondern auch ein Translationsabbruch (mittlere Reihe) realisiert werden. Um sowohl eine Limitation der Ribosomen als auch der RNA-Polymerasen zu erreichen wurden zwei Inhibitoren gleichzeitig (untere Reihe) eingesetzt.

Für den *E. coli* Stamm CA8000 (GK19) konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von 20 µg mL^{-1} Thiolutin zu einer sofortigen, 95%-igen Reduktion der RNA-Synthese führt [227]. Zwar handelt es sich bei der Bindung um eine reversible Inaktivierung, die nach dem Entfernen des Inhibitors aus dem Medium nach circa 10 Minuten die RNA-Polymeraseaktivität nicht länger beeinträchtigt [227][228], jedoch liegt aufgrund der schnelleren Bindungsreaktion das Gleichgewicht auf Seiten der inhibierten RNA-Polymerase. Bei einer Endkonzentration des Inhibitormoleküls Thiolutin von umgerechnet 105 520 Molekülen pro Zelle, kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Mehrzahl der bis zu 11 400 (Literaturwert, siehe Kapitel 2.1.1) in der Zelle befindlichen RNA-Polymerase-Moleküle durch die Bindung von Thiolutin direkt nach der Zugabe als inaktiv vorliegen. Pelechano *et al* konnten für Hefen zeigen, dass die Zugabe von Konzentrationen zwischen 3 und 20 µg mL^{-1} Thiolutin sich generell stabilisierend auf die mRNA

auswirken kann [229]. Besonders von diesem Effekt zu profitieren schienen auch ribosomale Proteine [229]. Wie in Abbildung 4.21 in der oberen Reihe (links) gezeigt, wurde nach der Inhibitorzugabe eine sofortige Stagnation des Wachstums beobachtet. Die Bereitstellung des ins Wachstum involvierten Proteoms scheint also völlig unterbrochen worden zu sein. Das Inhibitorlösemittel DMSO verursacht, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, eine sprunghafte Änderung in der OD sowie im mRNA-Signal. Betrachtet man das nach Kapitel 4.1.2 extrahierte mRNA-Signal kann nach der Zugabe des Inhibitors (gestrichelte Linie) eine stetige Abnahme des Signals über den betrachteten Zeitraum von circa zwei Stunden beobachtet werden. Für mRNA wird in der Regel jedoch von einem Abbau im Minutenbereich ausgegangen. Wie in Kapitel 4.1 diskutiert, bestätigt die langsame Abnehme des mRNA-Signals, dass für mRNA mit dBroccoli-Tag von längeren Halbwertszeiten ausgegangen werden muss, als es im Mittel für *E. coli* angenommen wird. Wirft man einen Blick auf das heterologe Proteinsignal, dann kann sogar eine Zunahme der Translation beobachtet werden. Da die Halbwertszeit zelleigener mRNAs kürzer ist als die der heterologen mRNA des pTRA-51hd Plasmides und keine neuen mRNAs mehr nachproduziert werden können, ist eine mögliche Erklärung, dass sich die in der Zelle befindlichen Ribosomen aus Mangel an Konkurrenzprozessen auf die Herstellung heterologer Proteine fokussieren. Dieser Effekt könnte durch die oben bereits beschriebene positive Auswirkung des Thiolutins auf die ribosomalen Proteine verstärkt werden. Herrscht also ein Mangel an RNA-Polymerasen, dann kann davon ausgegangen werden, dass sich die Proteinherstellung zu Gunsten von Genen mit stabilerer mRNA - wie die der heterologen mRNA mit dBroccoli-Tag - verschiebt. Ob eine Änderung in der Abbaurate - wie von Pelechano *et al* postuliert [229] - stattfindet, konnte mit diesem Experiment nicht endgültig beurteilt werden.

Nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern auch auf Translationsebene kann eine Ressourcenknappheit artifiziell herbeigeführt werden. In der Regel geht man von bis zu 72 000 Ribosomen pro Zelle (siehe Kapitel 2.1.1) aus. Als Inhibitor wurde das Antibiotikum Chloramphenicol verwendet, das zu Selektionszwecken mit einer Konzentration von 34 µg mL^{-1} eingesetzt wird und bei nicht resistenten Zellen zu einer vollständigen Inhibition des Wachstums führt. Basan *et al* konnten bereits zeigen, dass eine sublethale Dosis an Chloramphenicol zu einer Umverteilung des Proteoms hin zu einer größeren Fraktion an ribosomalem Protein führt [2]. Hierbei wurden Konzentrationen von 2-8 µM eingesetzt. Zellen können über regulatorische Maßnahmen in Stresssituationen nicht nur die Menge an ribosomalem Protein nachjustieren, sondern auch generelle Reaktionen wie die RpoS-vermittelte Antwort, der mehrere hundert Gene unterstellt sind, auslösen. Aus diesem Grund muss bei einem Einsatz von inhibierenden Konzentrationen von signifikanten Veränderungen im Proteom ausgegangen werden. Daher ist es schwer die Ressourcenverfügbarkeit beziehungsweise -aktivität bei derart niedrigen Konzentrationen Inhibitor zu analysieren. Um den jeweiligen setupspezifischen, zellulären Zustand zu fixieren, wurde in dieser Studie die wachstumsinhibierende Konzentration von 34 µg mL^{-1} überschritten. Da auch bei deutlich höheren Ribosomenkonzentrationen als in der Literatur beschrieben, mindestens ein Molekül Inhibitor pro Ribosom bereitgestellt werden sollte, wurde diese Konzentration auf 68 µg mL^{-1} verdoppelt und überstiegt somit die von Basan *et al* verwendete Menge um zwei Zehnerpotenzen (circa 210 µM). Eine derartige Menge an Chloramphenicol bedeutet rein stöchiometrisch 253 454 Moleküle Chloramphenicol pro Zelle und stellt sicher, dass theoretisch jedes Ribosom blockiert werden kann. Wie in Abbildung 4.21 (mittlere Reihe, links) gezeigt führt die Zugabe einer derart hohen Konzentration, wie schon bei der Zugabe von Thiolutin, zu einem sofortigen Wachstumsstopp. Betrachtet man das heterologe mRNA-Signal (Abbildung 4.21, mittlere Reihe, mitte), dann kann im Gegensatz zum Transkriptionsabbruch erkannt werden, dass nach der Inhibitorzugabe über den analysierten

Zeitraum keine Änderung im mRNA-Signal mehr auftritt. Für Translationsinhibitoren wie Chloramphenicol konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Zugabe wie im Falle von Nährstoffunterversorgung oder auch in der stationären Phase stabilisierend auf alle mRNAs auswirkt [45], [230].

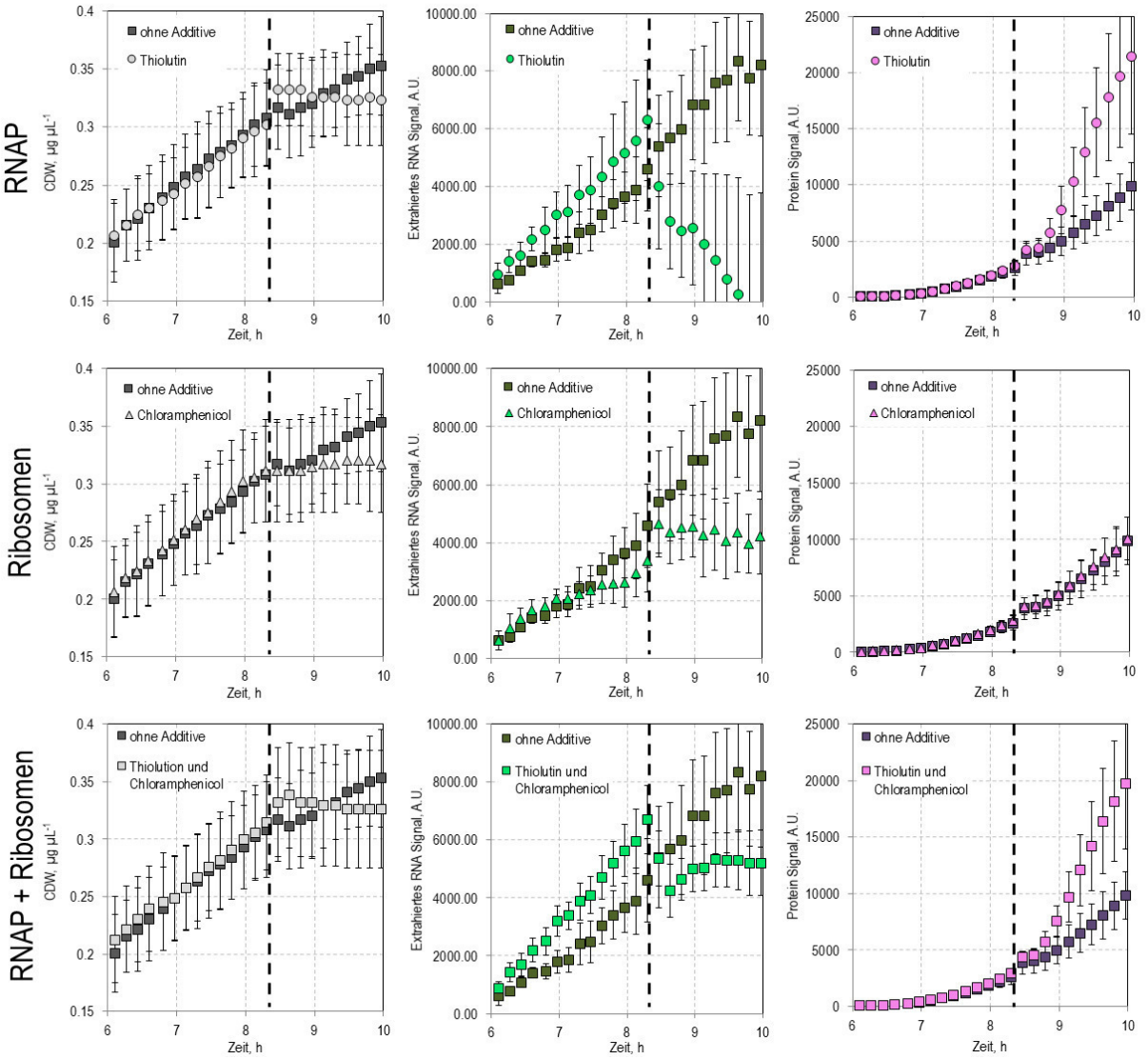


Abbildung 4.21 Die Verfügbarkeit der Ressourcen RNA-Polymerase (obere Reihe) und Ribosomen (mittlere Reihe) wurde mittels der Inhibitoren Thiolutin (20 µg mL^{-1}) oder Chloramphenicol (68 µg mL^{-1}), oder der Zugabe beider gleichzeitig (untere Reihe) beschränkt (gestrichelte Linie). Die untersuchten Stämme wurden bei einer OD600 von 0.2 mit 1.5 mM mTA induziert. Vergleicht man jeweils die abgebrochenen Triplikate (helle Symbole) mit den unabgebrochenen Referenz-Stämmen (dunkle Quadrate), dann kann nicht nur eine unmittelbare Stagnation des Wachstums (linke Spalte), sondern auch ein Abbruch in der Bildung des extrahieren mRNA-Signals (mittlere Spalte) beobachtet werden. In Anwesenheit des Transkriptionsinhibitors Thiolutin konnte ein Anstieg des Proteinsignals (rechte Spalte) gemessen werden.

Lopez *et al* [230] konnten beweisen, dass dieser Effekt unter anderem durch die Inaktivierung der RNAseE verursacht wird, der bevorzugt an unstrukturierten A-U-reichen Regionen gesetzt wird [231], und somit der initiale mRNA Verdau nicht mehr stattfinden kann. Dies liefert eine mögliche Erklärung für die Unterschiede im Verhalten der heterologen mRNA Dynamik zwischen der Zugabe des Inhibitors Thiolutin und dem Inhibitor Chloramphenicol. Zum einen ist bekannt, dass ohne eine RNAseE-Aktivität die rRNA-Synthese um ein Vielfaches ansteigt, zum anderen, dass

zugleich die rRNA selbst instabiler wird [230]. Dies bedeutet einen höheren Turnover im Ribosomenpool. Basan *et al* [2] konnten einen Anstieg im Anteil ribosomaler Proteine am Gesamtproteom messen. In Kombination mit dieser Beobachtung lässt sich vermuten, dass die Zelle im Rahmen der zellulären Kapazität versucht die Abweichung im Wachstum vom möglichen Soll-Zustand durch eine Nachjustierung der Ribosomenkonzentration auszugleichen. Betrachtet man das absolute Proteinsignal, dann kann keine Abweichung zur nicht-inhibierten Translation festgestellt werden (Abbildung 4.21, mittlere Reihe, rechts). Im Fall einer totalen Ribosomenblockade, wäre zunächst für den Zeitraum der Reifung des Proteins von circa 21 Minuten keine Änderung im Signal zu erwarten. Danach wäre mit einer Stagnation des Signals zu rechnen gewesen. Da Fluoreszenzproteine über sehr lange Zeitspannen stabil sind, ist mit keiner Abnahme über den beobachteten Zeitraum zu rechnen. Da das Proteinsignal verglichen mit der nicht-inhibierten Proteinbildung trotz konstanter Zellmasse und stagniertem mRNA Signal im gleichen Ausmaß unbeeinflusst weiter ansteigt, muss dieses mit einer höheren Rate gebildet werden. Geht man von einer stabilen Menge an mRNA aus kann dieses Phänomen durch mehrere Effekte erklärt werden. Diese basieren auf der Annahme, dass durch zellinterne Gegenmaßnahmen die heterologe Proteinherstellung verstärkt stattfindet. Durch die enge Kopplung von Transkription und Translation kann die Zugabe von Chloramphenicol auch die RNA-Polymerase in ihrer Aktivität hindern [232]. Durch die vergleichsweise hohe Stabilität der heterologen mRNA kann diese, wie auch schon beim Transkriptionsabbruch, mit den verbleibenden freien Ribosomen verstärkt abgelesen werden. Da Chloramphenicol reversibel im katalytischen Zentrum der Ribosomen bindet, kann der höhere Durchsatz im Ribosomen-Auf- und Abbau dazu führen, dass die Wirksamkeit des Inhibitors Chloramphenicol abnimmt. Hinsichtlich der Zunahme in der rRNA-Synthese kann außerdem ein von Dai *et al* [233] beobachteter Effekt zum Tragen kommen: Steigt das RNA-Protein-Verhältnis, dann hat dies eine Zunahme der Proteinsyntheserate zur Folge. Speziell für den Translationsinhibitor Chloramphenicol konnte bereits gezeigt werden, dass sich mit steigender Inhibitorkonzentration das RNA-Protein-Verhältnis verschiebt, was vor allem für niedrige Wachstumsraten eine höhere Elongationsrate zur Folge hat [233]. Gegen diese Erklärungsansätze im Einzelnen spricht vor allem, dass für jedes der gemessenen Triplikate exakt die gleiche Menge an Proteinsignal wie im nicht-inhibierten Fall hergestellt werden konnte. Es handelt sich also vermutlich nicht um eine undefinierte Verstärkung der Expression, sondern um ein definiertes Nachjustieren. Der gemessene Anstieg in der Expression scheint den Wegfall des Wachstums exakt zu kompensieren. Aufgrund des in Abbildung 4.20 gezeigten Zusammenhanges zwischen Wachstumsrate und Ribosomenbildungsrate und dem bereits beschriebenen RNAseE vermittelten Effekten, liegt nahe, dass von der Zelle wahrgenommen werden kann, wenn nur ein Bruchteil des Wachstums realisiert wird, welches der Nährstoffverfügbarkeit und den Randbedingungen nach eigentlich möglich wäre. Eine Folge hiervon kann sein, dass Ribosomen proportional zum Wachstumseinbruch nachproduziert werden. Da der heterologe Prozess keiner Regulation unterworfen ist und außerdem die heterologe mRNA stabiler ist, wird mittels dieser ausgleichenden Menge an Ribosomen die heterologe Expression priorisiert weitergeführt und die Zelle generiert an Stelle von Wachstum im gleichen Ausmaß heterologes Protein.

Inhibiert man sowohl Transkription als auch Translation, dann konnte nach dem DMSO-vermittelten, sprunghaften Anstieg in der OD auch hier kein weiteres Wachstum beobachtet werden (Abbildung 4.21, unten, links). Das extrahierte mRNA-Signal scheint zunächst demselben Abbau-Effekt zu unterliegen, der bei der Zugabe von ausschließlich Thiolutin auftritt. Nach circa einer Stunde pendelt sich aber auch hier ein stabiles Signal ein (Abbildung 4.21, unten, mitte). Für das Proteinsignal kann ein Anstieg im selben Ausmaß wie nach der Thiolutinzugabe beobachtet

werden (Abbildung 4.21, unten, rechts). Einzeln verwendet wirkt sich der Transkriptionsinhibitor positiv auf die Bildung des heterologen Proteins aus. Der Translationsinhibitor scheint zusätzlich die heterologe mRNA zu stabilisieren. Diese beiden Effekte lassen sich auch bei der hier gezeigten Kombination der zwei Inhibitoren wiederfinden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich bei einer Verknappung der RNA-Polymerase die Proteinproduktion hin zu stabilen mRNAs zu verlagern scheint. Limitiert man die Verfügbarkeit der Ribosomen, dann scheint sich neben einer Stabilisierung der mRNA auch eine Zunahme in der Translationsaktivität zu manifestieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass unter Ressourcenknappheit im Rahmen der zellulären Belastbarkeit die Menge an Ribosomen proportional zum Wachstumsdefizit nachrekrutiert werden kann. Außerdem scheinen von der Autoregulation unabhängige Prozesse wie die heterologe Translation mit höherer Priorität durchgeführt zu werden.

Um einen näheren Zugang zum Zusammenhang zwischen den verfügbaren Ressourcenmengen, den Wachstumseinbußen und der heterologen Expression zu erhalten, wurden Thiolutinkonzentrationen von 0 bis 20 µg mL^{-1} (Abbildung 4.22, zunehmende Konzentration durch dunkler werdende Symbole dargestellt) zu den mit mTA induzierten Kulturen (HMS174(DE3) mit pTRA51-hd) im Triplikat zugegeben. Wie in Abbildung 4.22-A über die Zeit gezeigt, konnte mit zunehmender Konzentration eine graduelle Abnahme im Wachstum festgestellt werden. Auch im extrahierten mRNA-Signal in Abbildung 4.22-B konnte diese Abnahme festgestellt werden. Da es sich bei den hier gezeigten Daten um Mittelwerte aus drei sehr unterschiedlich gewachsenen Triplikaten handelt, führt die in Abbildung 4.6 bereits demonstrierte biologische Variabilität im Mittel zu einem stark verrauschten Signal. Daher wurde das mRNA-Signal im Folgenden nicht näher betrachtet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden auch die zugehörigen Standardabweichungen nicht eingezeichnet (Abbildung 4.22, A bis C). Der Anstieg im zugehörigen Proteinsignal nimmt mit steigender Transkriptionsinhibitormenge zu (Abbildung 4.22-C).

In Abbildung 4.22-D und -E wurden die drei gemessenen Replikate jeweils auf den nicht-inhibierten Stamm normiert. Die prozentualen Änderungen im Wachstum (Abbildung 4.22-D) und in der Proteinexpression (Abbildung 4.22-E) wurden bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (kenntlich gemacht durch eine steigende Farbintensität der Datenpunkte) analysiert. Die dargestellten Standardabweichungen entsprechen der Standardabweichung des jeweiligen Fits. Es lässt sich erkennen, dass der Anstieg der OD über die Zeit mit zunehmender Inhibitorkonzentration schwächer ausfällt. Dieser Zusammenhang ist nicht linear. Die prozentuale Abnahme schein für niedrigere Inhibitorkonzentrationen stärker zu sein. Im Schnitt kann bei circa 10 µg mL^{-1} beobachtet werden, dass der Wachstumseinbruch in die Sättigung geht (Abbildung 4.22-D). Dies entspricht einer Inhibitormenge von 52 760 Molekülen pro Zelle. Ist diese Bindung irreversibel, dann kann davon ausgegangen werden, dass die Menge an Inhibitor bei einer totale Blockade der RNA-Polymerasen der Größenordnung an verfügbaren RNA-Polymerasen entspricht. Interessant hierbei ist, dass es im Laufe der Zeit zu keiner zusätzlichen Bildung von RNA-Polymerasen zu kommen scheint. Ein komplementäres Bild lässt sich für die Zunahme in der Proteinsignalbildung finden. Hier scheint ab einer Thiolutinmenge von circa 5 µg mL^{-1} keine gravierende Zunahme in der Proteinbildungsrate mehr möglich zu sein. Bei dem in Abbildung 4.22-F dargestellten, direkten Vergleich dieser beiden prozentualen Veränderungen konnte bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen bis 2 µg mL^{-1} Thiolutin gezeigt werden, dass sich die Abnahme des Wachstums linear zur Zunahme der Expression verhält. Ist eine Konzentration an Inhibitormolekülen erreicht, die alle RNA-Polymerasen bindet, dann sollte

in der Theorie nach einigen Minuten, in welchen die bereits produzierte, zelleigene mRNA abgebaut wird, das Wachstum sowie die Zunahme der Proteinbildungsrate stagnieren. Für den Fall, dass die vorliegende heterologe mRNA bereits gesättigt an Ribosomen ist und keine weitere Umverteilung erfolgen kann, kann die heterologe Expression schon bei geringeren Konzentrationen an Inhibitor stagnieren. Mit zunehmender Inhibitorkonzentration konnte dieser Effekt in den in Abbildung 4.22 gezeigten Daten zwar vermessen werden, aber auch hier findet man die zum wiederholten Male beobachtete biologische Variabilität zwischen den verwendeten Triplikaten I bis III (einzeln dargestellt in Abbildung 4.22, D bis F). Betrachtet man Abbildung 4.22-E, dann kann man feststellen, dass für Stamm I entweder eine erhöhte Menge an mRNA oder an Ribosomen zur Verfügung stehen muss. Dieses Replikat konnte - verglichen mit Replikat II und III - nicht nur schneller Biomasse generieren, sondern auch mehr extrahiertes mRNASignal pro OD generieren (Daten nicht gezeigt). Da sich dieser Effekt sich aber nicht im Signal Protein pro OD widerspiegelt, liegt der Verdacht nahe, dass den Stämmen eine unterschiedliche RNA-Polymerase-Verfügbarkeit zugrunde liegt. Ins Bild passt auch, dass die Zugabe des RNA-Polymerase-Inhibitors bei Stamm I deutlich geringere Wachstumseinbrüche zur Folge hat (Abbildung 4.22-D).

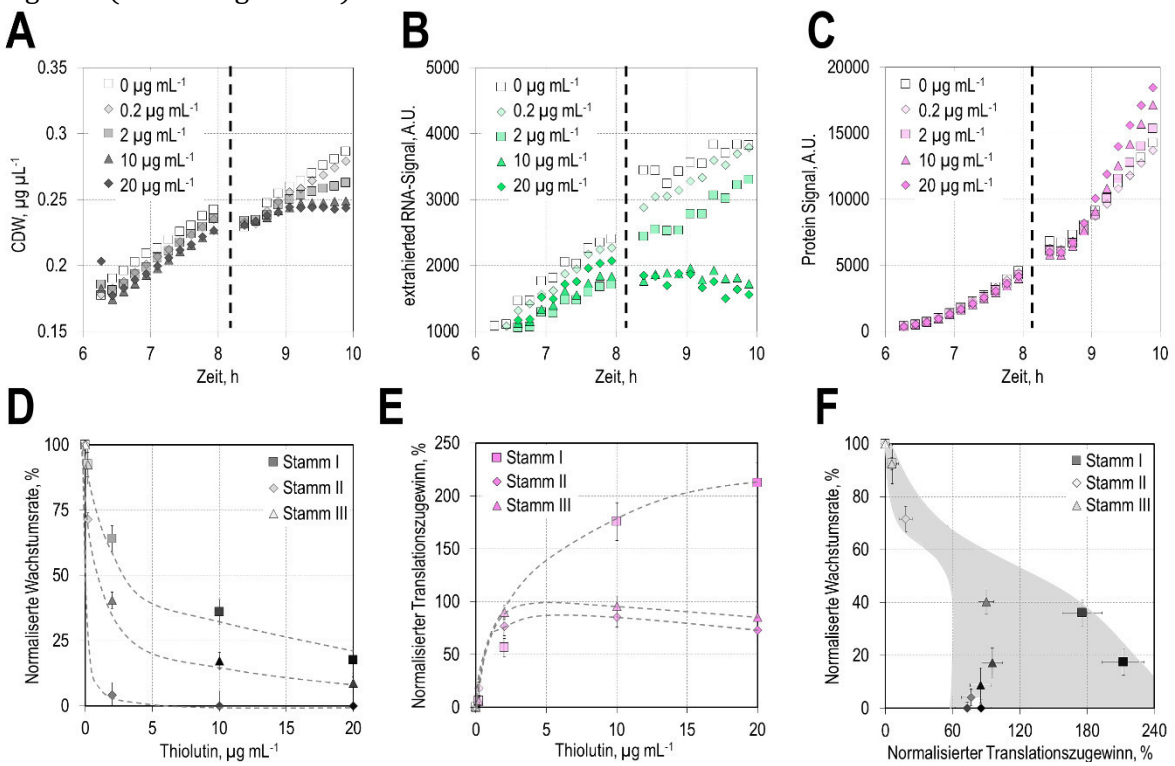


Abbildung 4.22 Bei der Zugabe unterschiedlicher Mengen des RNA-Polymeraseinhibitors Thiolutin konnte nicht nur der Einfluss auf das Zelltrockengewicht (A), sondern auch auf das heterologe mRNA-Signal (B) und das heterologe Proteinsignal (C) über die Zeit erfasst werden. Jedes Setup (HMS174(DE3) mit pTRA-51hd, induziert mit 1.5 mM mTA) konnte im Triplikat vermessen werden. Das Wachstumsverhalten nach dem Transkriptionsabbruch (gestrichelte Linie in A-C) konnte auf den nicht-inhibierten Stamm normalisiert werden. Wie in Graphik (D) dargestellt, sinkt das Wachstum bei allen Replikaten (Samm I-III) mit steigender Inhibitorkonzentration auf bis zu 0 %. Betrachtet man den korrespondierenden Translationszugewinn normalisiert auf den nicht-inhibierten Stamm konnte, wie in (E) gezeigt, zunächst ein Anstieg der Expression verzeichnet werden, der aber mit zunehmnder Thiolutinmenge in die Sättigung geht. In (F) wurden die in (D) und (E) gezeigten Größen Wachstumsrate und Translationszugewinn für alle drei Stämme korreliert. Die zunehmende Inhibitorkonzentration wurde mit zunehmenden Farbintensitäten der Datenpunkte kenntlich gemacht.

Geht man nun im Mittel davon aus, dass eine maximale Expressionssteigerung von 120 % stattgefunden hat, dann kann basierend auf einer durchschnittlichen Expressionsrate von 0.6 ng μg_{CDW}^{-1} h^{-1} (Beispielwert aus Kapitel 4.1.5) von einer Translationsaktivität von 1.3 ng μg_{CDW}^{-1} h^{-1} beziehungsweise 0.009 ng μg_{CDW}^{-1} pro 25 s ausgegangen werden (bei einer Translationsrate von 20 Aminosäuren pro Sekunde, besitzt ein Transkript der Länge 1500 bp eine Polymerisationszeit von 25 s). Dies bedeutet, dass $1.8 \cdot 10^{-8}$ ng Protein pro Zelle (Zellmasse $2 \cdot 10^{-6}$ µg) und Polymerisationsintervall hergestellt werden. Bei einem Gewicht von $4.78 \cdot 10^{-11}$ ng pro Molekül mCherry (28.8 kDa) werden alle 25 Sekunden 376 Moleküle polymerisiert. Bei einem maximalen Ribosomenbesatz von ein Ribosom pro 9 Nukleotiden kann pro mRNA maximal alle 0.15 Sekunden ein neues Protein entstehen. Werden in 25 Sekunden also insgesamt 376 Proteine hergestellt, können davon bei einem dichtestem Ribosomenbesatz nur 166 Moleküle von einer mRNA produziert werden. Es liegen also mindestens 3 heterologe mRNAs pro Zelle vor.

4.4 Quantifizierung der metabolischen Aktivität

In der Regel sind zelluläre Stoffwechselprozesse gut ausbalanciert und für optimales Wachstum ausgelegt. Erfährt die Zelle zusätzlich zum eigentlichen Zellerhalt und der Generierung von Biomasse eine Belastung, dann kann dieses empfindliche Gleichgewicht gestört werden. Geht man davon aus, dass Komponenten wie Mineralstoffe und Spurenelemente im Überschuss vorliegen, lässt sich bei einem Stamm wie *E. coli* HMS174(DE3) ohne Auxotrophien erwarten, dass bei einer Kultivierung im Minimalmedium lediglich die Kohlenstoffquelle oder der Sauerstoff zu limitierten Substraten werden können. Aber auch innerhalb einer Zelle können - trotz dem Vorhandensein ausreichender Substrate - die katalytischen Prozesse selbst den Organismus einschränken. Aufgrund zeitlicher und räumlicher Limitation kann es in der Zelle nicht nur hinsichtlich der bereits angesprochenen Ressourcen der Expressionsmaschinerie, sondern auch in der Bereitstellung der Metabolite zu einem Engpass kommen. Hier versuchen Zellen durch die Regulation der Proteomzusammensetzung und einer Neujustierung der Wachstumsrate eine Flussumverteilungen vorzunehmen [2], [7]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch andere fermentative Stoffwechselwege sich charakteristisch hinsichtlich zunehmender Belastung verhalten, um den Energiebedarf der heterologen Expression zu decken. Außerdem wurde analysiert, ob die metabolische Aktivität durch das Kultivierungssystem beeinflusst wird. Es stellt sich die Frage, ob die Verstoffwechselung der Kohlenstoffquelle durch die Prozessführungsstrategie beeinflusst werden kann und ob sich dadurch ein Effekt auf die Verteilung der Kohlenstoffatome ergibt. Neben der klassischen Batch-Kultivierung wurde hierfür auf eine substratlimitierte Feedingstrategie zurückgegriffen.

4.4.1 Vergleichende metabolische Analyse unterschiedlich belasteter Stämme

Die Biomasseausbeute Y_{XS} entspricht dem Verhältnis zwischen dem generierten Wachstum und dem dafür aufgenommenen Substrat. In der Literatur wird generell davon ausgegangen, dass sich diese Größen linear zueinander verhalten und die Steigung den Energiebedarf des wachstumsassoziierten Erhaltungsstoffwechsels widerspiegelt [139], [234]–[236]. Wie in Anhang A.3.10-A schematisch dargestellt, nimmt also die Substrataufnahmerate mit steigender Zellteilungsrate zu. Der nicht-wachstumsassoziierte Energiebedarf einer Zelle (NGAM) hingegen bleibt konstant und kann in der Regel auf Grund seines geringen Anteiles vernachlässigt werden. Werden Nebenprodukte produziert, dann reduziert sich der Anteil an Kohlenstoffatomen, der in die Biomasse fließt. Daraus kann gefolgert werden, dass die Steigung Y_{XS} bei einer Bildung von Nebenprodukt nicht im vollen Ausmaß aufrechterhalten werden kann. Im Falle heterologer Produktion muss der Organismus sogar noch zusätzlich Energie für die Herstellung zellfremder Proteine aufwenden. In der Theorie äußert sich dies ebenfalls in einer Abnahme der Biomasseausbeute, da mit derselben Substrataufnahmerate weniger Wachstum erzeugt werden kann (Anhang A.3.10-A). Das Konzept der Acetat-Linien beruht darauf, dass auf Grund zellinterner Limitationen ab einem bestimmten Energiebedarf (zusätzlich zur regulären Zellatmung) Prozesse zugeschaltet werden, die eigentlich der Energiebereitstellung unter Sauerstofflimitation dienen. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass dies ab einer kritischen Wachstumsrate der Fall ist (Anhang A.3.10-B) [2]. Die Produktion von Acetat kann nicht im selben Maß ATP generieren wie eine Verstoffwechselung der Kohlenstoffquelle über den Citratzyklus. Hier kann die Annahme getroffen werden, dass es zu einem Abknicken der Steigung der Biomasseausbeute kommt. Diese Knicks sind abhängig von den korrespondierenden, kritischen Wachstumsraten (Anhang A.3.10). Im Fall heterologer Belastung ist damit zu rechnen, dass diese kritischen Wachastumsraten bereits früher erreicht werden.

Die Wachstums-, Substrataufnahme- und Acetatproduktionsraten wurden in zwei biologischen Replikaten für die HMS174(DE3) Stämme (Abbildung 4.23) im 50 mL-Maßstab über einen Zeitraum von 7.5 h (induziert mit 1.5 mM mTA) erhoben. Aus Abbildung 4.23-A kann gefolgert werden, dass es unterhalb der Wachstumsrate von 0.2 h^{-1} zu einer Änderung in der Steigung kommen muss. Dies ist der Fall, da ohne Substrataufnahme kein Wachstum realisiert werden kann und es daher einen Schnittpunkt mit der x-Achse größer 0 geben muss. Auf Grund der großen Streuung der mittels HPLC- und TECAN-Plattenleser ermittelten Raten, kann keine genaue Aussage über den exakten Verlauf der Biomasseausbeute getroffen werden. Für die Reporterstämme mit genomintegriertem Kapazitätsmonitor *attTn7*::*lacIp-(eGFP)*$_2$, mit und ohne Ladungsplasmid pTRA-51hd (untersucht und erstellt in der Masterarbeit von Lukas Schmauder [184]) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem beladenen und unbeladenen Stamm vermessen werden. Da die Variation der Wachstumsraten durch den Einsatz unterschiedlicher Kohlenstoffquellen (Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Sorbitol) erzielt wurde, kann auf Grund unterschiedlicher Energiebilanzen der Zucker, trotz der Tatsache, dass jede Kohlenstoffquelle über die Glycolyse Eingang in den Energiestoffwechsel findet, eine Abweichung nicht ausgeschlossen werden.

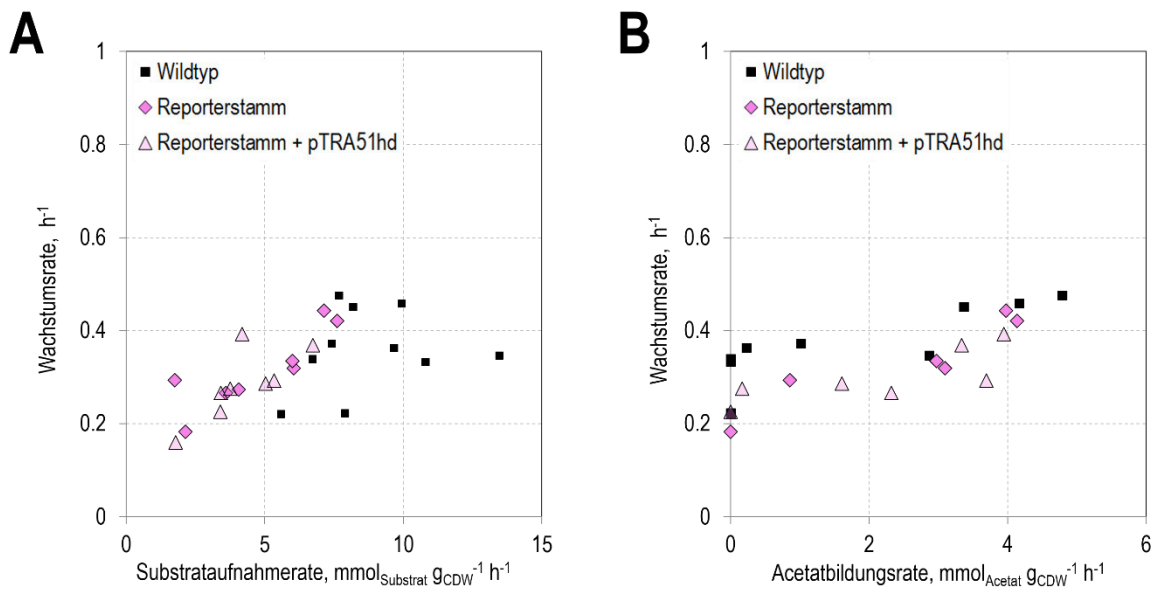


Abbildung 4.23 Die Wachstumsraten für Kultivierungen im 50 mL-Maßstab wurde für induzierte Stämme (1.5 mM mTA) sowohl mit der Substrataufnahmerate als auch mit der Acetatbildungsrate korreliert. Wie in (A) gezeigt, wurde der Verlauf der Biomasseausbeute für den Wildtyp HMS174(DE3) sowie den Reporterstamm HMS174(DE3) attTn7::lacIp-(eGFP)$_2$ *mit und ohne das Plasmid pTRA-51hd verglichen. In (B) ist der Verlauf der Acetatbildungsrate der jeweiligen Stämme mit den entsprechenden Wachstumsraten dargestellt.*

Betrachtet man jedoch die resultierenden Acetatlinien (Abbildung 4.23-B), dann kann der zu erwartende Trend beobachtet werden. Für den Reporterstamm HMS174(DE3) *attTn7::lacIp(eGFP)*$_2$ mit und ohne das Plasmid pTRA-51hd konnte alleine durch die zusätzliche Expression des Kapazitätsmonitorproteins eGFP eine annähernd parallele Verschiebung der Acetatlinie von einer kritischen Wachstumsrate von circa 0.35 h^{-1} hin zu einer niedrigeren Rate von circa 0.3 h^{-1} gemessen werden. Auch hier konnte eine relativ breite Streuung der Raten festgestellt werden. Da die gemessenen Raten mit einem sehr großen Bestimmtheitsmaß berechnet werden konnten, können Abweichungen von diesen theoretischen Verläufen auch durch die altersbedingt sinkende Qualität der HPLC-Säulen oder einem nicht ausreichenden Auflösungsvermögen verursacht werden. Hier ist vor allem die Balance zu finden zwischen einer

Verdünnung der Proben, um die Säule durch die Kohlenstoffquelle nicht zu überladen, und einer Nebenproduktkonzentration über dem Detektionslimit. Da für den verwendeten Stamm bereits eine große biologische Variabilität festgestellt werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass im Falle einer metabolischen Limitation auch im Stoffwechsel eine Varianz unter den biologischen Replikaten auftritt. Neben der Acetatbildung wurde sporadisch die Bildung weiterer Produkte wie Formiat und Lactat beobachtet.

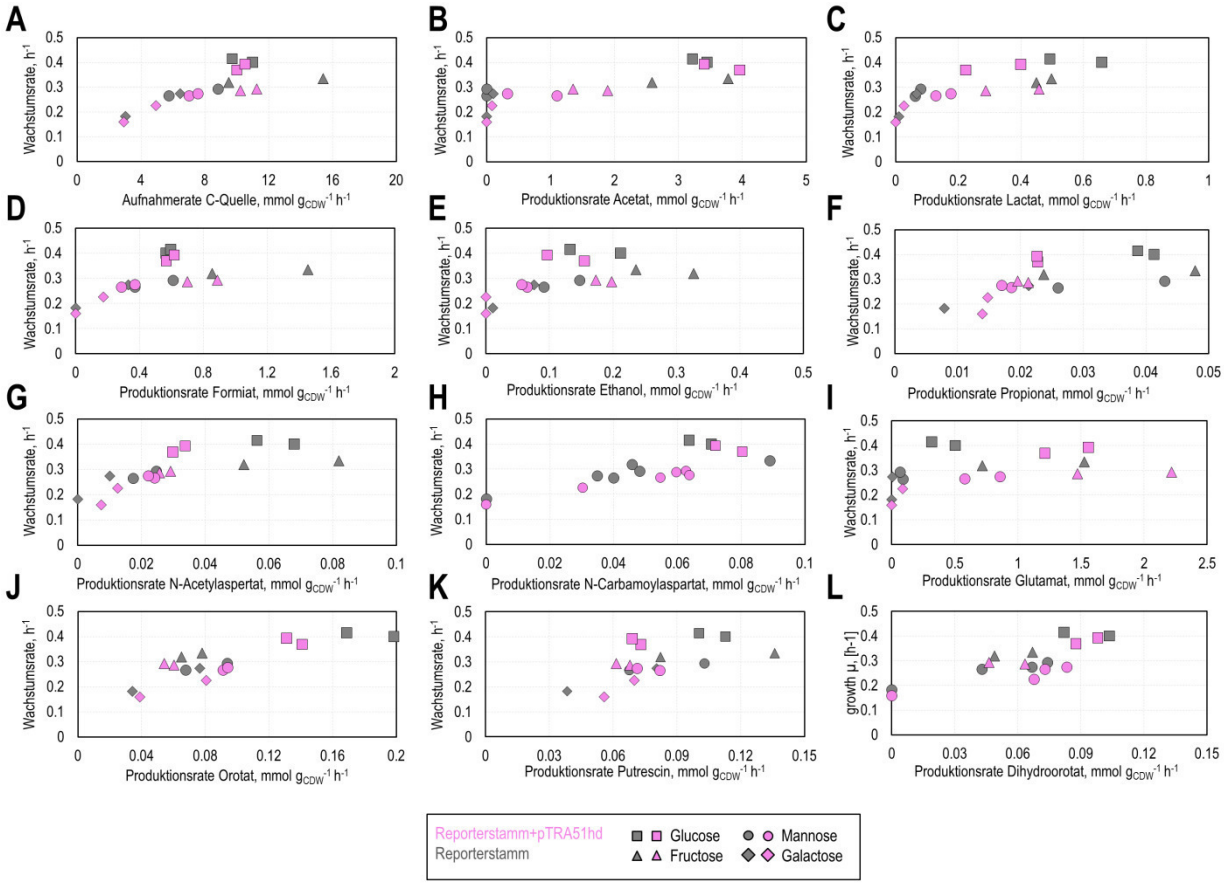


Abbildung 4.24 Die Substrataufnahmeraten (A), sowie die Produktionsraten der im Überstand befindlicher Metabolite (B-J) des Reporterstammes HMS174(DE3) attTn7::lacIp-(eGFP)$_2$ *mit (pink) und ohne (grau) das Ladungsplasmid pTRA-51hd konnten via NMR (Messungen wurden von der Arbeitsgruppe „METASYS" unter der Leitung von Fabien Letisse durchgeführt am INSA, Toulouse,) bestimmt werden. Durch die Verwendung der Zucker Glucose (Quadrate), Fructose (Dreiecke), Mannose (Kreise) und Galactose (Rauten) konnte ein breites Spektrum an Wachstumsraten im Minimalmedium abgedeckt werden. Korreliert man diese Wachstumsraten mit den vermessenen Aufnahme- beziehungsweise Produktionsraten, dann kann zum einen die Biomasseausbeute (A), aber auch das Verhalten hinsichtlich der Nebenproduktbildung im Minimalmedium beobachtet werden. Nicht nur die Bildung fermentativer Nebenprodukte wie Acetat (B), Lactat (C), Formiat (D), und Ethanol (E), sondern auch die Exkretion von Zwischenprodukten aus dem Aminosäurestoffwechsel wie Propionat (F), N-Acetylaspartat (G), N-Carbamoylaspartat (H), Glutamat (I), Orotat (J), Putrescin (K) und Dihydroorotat (L) konnte mit den Wachstumsraten korreliert werden.*

Um auszuschließen, dass verschiedene metabolische Routen zum regulären, aeroben Stoffwechsel aktiv werden, wurden die in Abbildung 4.23 analysierten Reporterstämme zu einer genaueren Analyse via NMR ans INSA (Toulouse, „METASYS" Fabien Letisse) übersandt. Dort konnten, wie in Abbildung 4.24 dargestellt, für sowohl den Plasmid pTRA-51hd beladenen (pinke Symbole), als auch für den unbeladenen (hellgraue Symbole) Reporterstamm HMS174(DE3) *attTn7::lacIp-(eGFP)$_2$* weitere Metabolite identifiziert werden. Wie der Abbildung 4.24-A

entnommen werden kann, wurde für beide Stämme eine starke Korrelation zwischen Wachstumsrate und Substrataufnahmerate gezeigt. Auch hier lässt sich bestätigen, dass es sich um keine lineare Abhängigkeit handelt. Vergleicht man die Kohlenstoffquellen Glucose (Quadrate) und Fructose (Dreiecke) zeigt sich, dass mit derselben Aufnahme an Glucose mehr Wachstum generiert werden kann und somit eine höhere Biomasseausbeute erzielt werden konnte als mit dem Substrat Fructose. Für eine nähere Analyse der Nebenproduktbildung empfiehlt es sich daher neben Galactose und Mannose das Substrat Fructose zu analysieren, da diese Substrate die untersuchten Stammtypen stärker zu belasten scheinen und interessante Effekte verstärkt auftreten können. Betrachtet man die Aufnahme- und Produktionsraten für diese Zucker bei beiden Stämmen, dann lässt sich in allen Fällen eine Sättigung in der Wachstumsrate erkennen (Abbildung 4.24). Im verwendeten Kultivierungssetup (250 mL Kolben, 50 mL Minimalmedium) scheinen Wachstumsraten von circa 0.5 h^{-1}, trotz einem weiteren Anstieg der Aufnahmerate, nicht überschritten zu werden. Bei einer Wachstumsrate von circa 0.3 h^{-1} kann ein starkes Abflachen der Steigung beobachtet werden (Abbildung 4.24-A). Korrespondierend damit konnte ab einer Wachstumsrate von circa 0.3 h^{-1} ein nahezu linearer Anstieg in der Acetatbildungsrate beobachtet werden (Abbildung 4.24-B). Als weitere Nebenprodukte konnten Lactat (Abbildung 4.24-C), Formiat (Abbildung 4.24-D), Ethanol (Abbildung 4.24-E), Propionat (Abbildung 4.24-F), N-Acetylaspartat (Abbildung 4.24-G), N-Carbamoylaspartat (Abbildung 4.24-H), Glutamat (Abbildung 4.24-I), Orotat (Abbildung 4.24-J), Putrescin (Abbildung 4.24-K) und Dihydroorotat (Abbildung 4.24-L) gemessen werden. Außerdem konnten von den Projektpartnern am INSA zwei weitere für den Aminosäureaufbau relevante Metabolite identifiziert werden (Daten auf Wunsch der Projektpartner nicht gezeigt). Bei allen Metaboliten wurde eine Wachstumsabhängigkeit festgestellt. Außerdem wurde gezeigt, dass deren Bildung bereits unter der kritischen Wachstumsrate für die Acetatbildung einsetzt. Aus diesem Grund kann die Bildung dieser Metabolitvielzahl für Änderungen in der in Abbildung 4.24-A gezeigten Steigung unter 0.3 h^{-1} verantwortlich gemacht werden.

Analysiert man hierzu die schematische Darstellung der involvierten Stoffwechselwege in Abbildung 4.25, dann zeigt sich schnell, dass der Dreh- und Angelpunkt für die Nebenproduktbildung im Citratzyklus zu suchen ist: Dieser Zyklus unterliegt innerhalb der Zelle einer strengen Kontrolle. Entstehende Nebenprodukte entstammen hauptsächlich dem Citratzyklus direkt vorgeschalteten Metaboliten oder von Intermediaten direkt aus dem Zyklus. Dies deutet auf einen suboptimalen Durchfluss hin. Insbesondere die Teilschritte der α-Ketoglutarat-Bildung und die Bildung des Succinyl-CoA werden über eine negative Rückkopplung durch den Elektronencarrier NADH sowie durch ATP reguliert [237]. Im Fall energetisch intensiver Prozesse, wie der heterologen Expression, fehlt ein Teil dieses negativen Feedbacks: Da für *E. coli* bereits bekannt ist, dass die Atmungskette das limitierende Glied in der aeroben Energiegewinnung darstellt, akkumuliert das generierte NADH [69]. Das entstehende ATP jedoch wird in hohem Ausmaß verbraucht und liefert so keine Feedbackinhibierung [238]. Wird das entstehende α-Ketoglutatrat nicht weiterverarbeitet, dann kann eine Folge hiervon sein, dass es über Glutamat in den Aminosäurestoffwechsel eingeht. Um dem Rückstau des Acetyl-CoAs zu begegnen kann die Zelle auch mittels der Pyruvatcarboxylase Pyruvat zu Oxalacetat umwandeln. Auch dieses kann im Falle eines Stoffwechselstaus über Aspartat im Aminosäure- und Basenstoffwechsel verwertet werden [239]. Ist es der Zelle aufgrund energetischer Limitierungen nicht möglich die entstehenden Aminosäuren als Proteine zu verbauen, kann sie über diverse Abbaumechanismen versuchen ihre energetische Situation zu verbessern, beispielsweise indem der Pool an Purinen und Pyrimidinen erhöht wird. Einige Schritte im Aminosäureabbau erzeugen sogar direkt ATP, wie der Umbau von Threonin zu Propionat. In der Regel wird dieser Schritt von

der Propionatkinase TdcD unter anaeroben Bedingungen katalysiert [240], [241]. Aber auch hier scheint die Zelle diese Reaktion aerob zu Gunsten des Energiegewinnes umzusetzen (Abbildung 4.24-F). Kann der Fluss durch den Citronensäurezyklus nicht weiter erhöht werden, durchläuft die Zelle auch im aeroben Fall alle Schritte der gemischten Säurefermentation um zusätzliche Energie zu akquirieren. Eine Analyse der Zellatmung hinsichtlich CO_2-Fixierung durch eine entsprechende Abgasanalytik könnte hier in weiteren Studien über die Aktivität des Citronensäurezyklus Aufschluss geben.

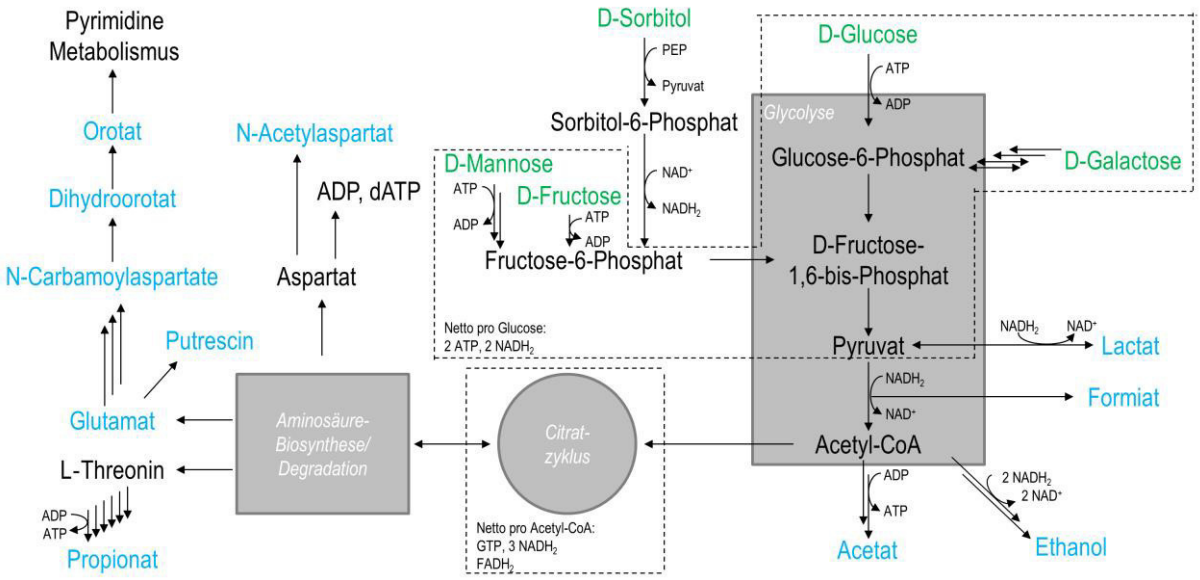


Abbildung 4.25 Um die Verteilung der Kohlenstoffatome zu erfassen, wurde die Zuflüsse der verwendeten Kohlenstoffquellen (grün) sowie die Herkunft der gemessenen Nebenprodukte (blau) schematisch dargestellt. Die Zusammenhänge wurden der KEGG-Datenbank entnommen. Hauptstoffwechselwege wurden grau hinterlegt zusammengefasst. Die aus den jeweiligen Routen entstehenden Reduktions- und Energieäquivalente wurden den Reaktionen zugeordnet.

Da, wie der Abbildung 4.25 zu entnehmen ist, neben den Produkten, welche in der gemischten Säuregärung auftreten, vor allem Metabolite, die einen Bezug zum Aminosäurestoffwechsel haben, im Überstand detektiert werden konnten, stellt sich die Frage, warum Zellen derart wertvolle Stoffe gerade unter belastenden Bedingungen sekretieren. In der Literatur wurde bereits speziesübergreifend das Vorkommen signifikanter Mengen an intrazellulären Metaboliten im Medium analysiert [115]. Dieser Exometabolit-Fußabdruck kann von Stamm zu Stamm eine starke Variation zeigen. Gerade die bei der gemischten Säuregärung erzeugten Produkte können mit steigender Konzentration cyctotoxische Effekte haben und müssen aus diesem Grund ins umgebende Medium abgegeben werden. Da die gefundenen Metabolite allerdings hauptsächlich in Zusammenhang mit dem Aminosäuremetabolismus stehen, kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich um typische Endprodukte handelt. Gerade im Zusammenhang mit der Exkretion von Aminosäurederivaten muss vom sogenannten ‚*overflow*'-Metabolismus ausgegangen werden, der nicht nur im Fall von Substrat und Energieüberschuss auftritt, sondern vor allem auch im Fall von Nährstoffmangel oder ineffizient regulierter Substrataufnahme zu einer unnatürlich hohen Intermediat-Akkumulation führt [242]. Damit einhergehend kann es zur Sekretion durch Diffusion oder aus osmotischen Gründen kommen, es muss aber auch ein sekundärer Transport der Moleküle in Betracht gezogen werden [242]. Für Carbamoylaspartat, Acetylaspartat, Dihydroorotat, Orotat und Putrescin konnte bereits gezeigt werden, dass die Produktion dieser Metabolite einen immensen Einfluss auf die metabolische Effizienz einer Zelle besitzen[243]. Mittels einer Mutation im Substrataufnahmesystem sowie im *rpoC*-Gen des

untersuchten *E. coli* K12-Stammes MG1655 konnte durch eine Reduktion dieser Nebenprodukte ein positiver Einfluss auf die energetische Ladung der Zelle verzeichnet werden [243]. Außerdem wurde eine deutliche Steigerung der Wachstumsrate erzielt [243]. Da die Expression dieser Intermediate im in dieser Arbeit untersuchten Stamm HMS174(DE3) mit zunehmendem, energetischem Bedarf immer weiter steigt und es sich ebenfalls um einen K12-Stamm handelt, kann diese genetische Veränderung ein Ansatz zur Verringerung Metabolischer Belastung auch in *E. coli* HMS174(DE3) sein.

Die in Abbildung 4.26-A gezeigte Darstellung der C-Bilanz verdeutlicht, dass trotz der intensiven Detektion der Nebenprodukte lediglich bis zu maximal 68% der in Form von Substrat zugeführten Kohlenstoffatome beim Wildtypstamm im Medium wiedergefunden werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass der Hauptanteil der fehlenden Kohlenstoffatome in Form von CO_2 zu finden ist. Um die Kohlenstoffbilanz schließen zu können, sollte eine Abgasanalytik verwendet werden. Zieht man für den verwendeten Stamm Vergleiche zur Literatur, lassen sich für einen uninduzierten pET30aSOD-beladenen HMS174(DE3) [244] mit ähnlicher Medienzusammensetzung und Glucose als Substrat Kohlenstoffanteile von 43.4 % in der Biomasse finden. Dieser Wert liegt zwischen dem in dieser Arbeit bestimmten Wert für den unbeladenen Wildtypstamm HMS174(DE3) mit einem Anteil von 49% und dem belasteten und induzierten Stamm HMS174(DE3) pTRA-51hd mit einem Anteil von 31%. Geht man davon aus, dass mit zunehmender Belastung eine Abnahme in der Biomasseausbeute zu erwarten ist, dann können die ermittelten Werte als sinnvoll erachtet werden. Auch der von Marisch *et al* [244] ermittlete CO_2-Anteil von 46.9% passt rein rechnerisch ins Bild. Auffällig ist, dass im Falle des Reporterstammes HMS174(DE3) *attTn7::lacIp*(*eGFP*)$_2$ unabhängig von der Qualität der Kohlenstoffquelle verglichen mit dem Wildtypstamm HMS174(DE3) eine Reduktion der Biomasseausbeute festgestellt werden konnte. Vergleicht man beladene und unbeladene Stämme, dann kann kein eindeutiger Trend hinsichtlich der Biomasse gefunden werden. Analysiert man jedoch die Nebenproduktbildung, dann kann für die Klasse der gemischten Säuregärung (Acetat, Lactat, Formiat und Ethanol, Abbildung 4.26-B) in ihrer Gesamtheit ein Trend hin zu einer geringeren Bildung mit abnehmender Wachstumsrate, wie in Abbildung 4.24 schon für die einzelnen Komponenten gezeigt, verzeichnet werden. Deutliche Unterschiede zwischen den beladenen und unbeladenen Stämmen äußern sich jedoch in der Gesamtheit der in den Aminosäurestoffwechsel involvierten, segregierten Nebenprodukte (Putrescin, Orotat, Dihydroorotat, N-Acetylaspartat, N-Carbamoylaspartat, Glutamat, Intermediat 1, Intermediat 2, Propionat) (Abbildung 4.26-C). Hier ist für alle Kohlenstoffquellen ein deutlicher Unterschied zwischen den belasteten und unbelasteten Stämmen zu erkennen. Insbesondere die Bildung von Glutamat sticht im belasteten Stamm hervor. Die bis zu 1.2 ng μg_{CDW}^{-1} h^{-1} generierte Masse an heterologem Protein kann im Rahmen dieser Kohlenstoffbilanz zwar an sich vernachlässigt werden, sie scheint jedoch einen erheblichen Beitrag zur Umorganisation im Stoffwechsel beizutragen. Betrachtet man für die belasteten Stämme HMS174(DE3) *attTn7::lacIp*(*eGFP*)$_2$ pTRA-51hd zu wieviel Prozent die Kohlenstoffbilanz geschlossen werden kann (Abbildung 4.26-D), dann fällt auf, dass mit zunehmender Wachstumsrate auch der Anteil an fehlenden Kohlenstoffatomen geringer wird. Da der Hauptanteil der nicht wiedergefunden Atome als CO_2 von der Zelle ausgeschieden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass also im Fall belasteter Zellen mit zunehmender Wachstumsrate - verglichen zur Nebenproduktbildung - die aus regulärer Zellatmung stammende Energie einen immer kleiner werdenden Anteil einnimmt. Schließt man daraus, dass ein belastender Anstieg im Energieverbrauch durch Nebenproduktbildung zu einer ineffizienteren Kohlenstoffausbeute führt, dann stellt sich die Frage, ob es sinnvoll ist einen Produktionsprozess bei reduzierten Wachstumsraten ablaufen zu

lassen. Diese Maßnahme könnte dazu führen, dass ein möglichst großer Teil der notwendigen Energie über den regulären Stoffwechsel bereitgestellt werden kann.

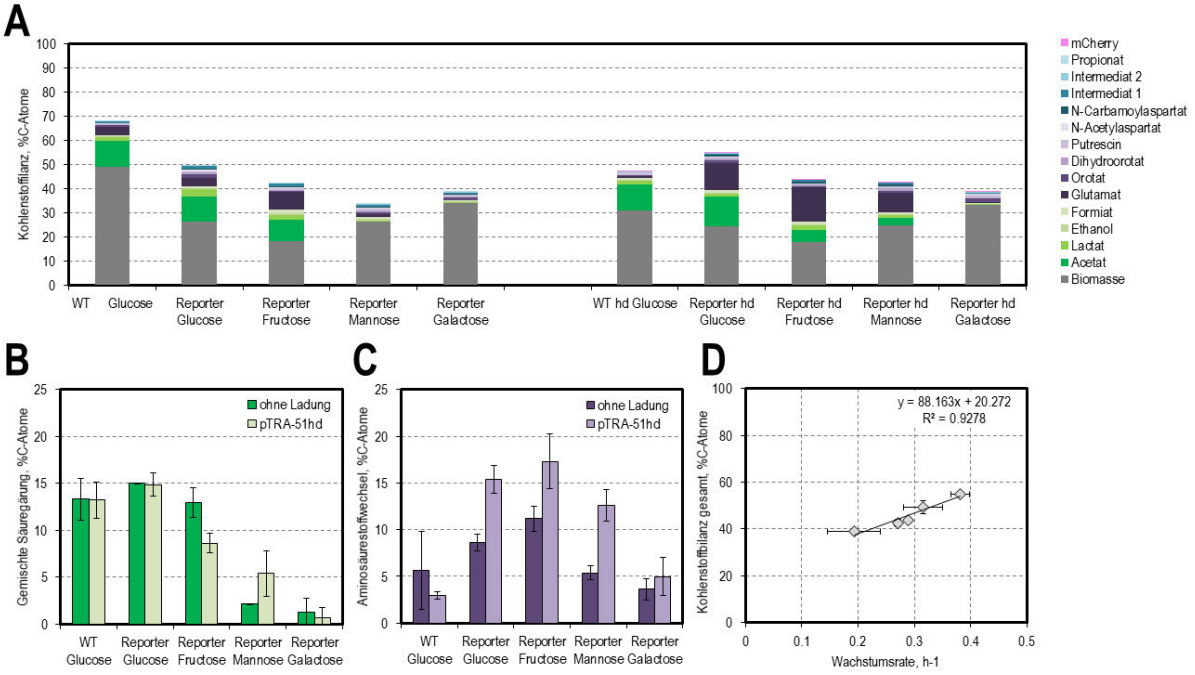


Abbildung 4.26 Die Änderung der Substrate (Glucose, Fructose, Mannose und Galactose) und Metabolite wurde via NMR (Messungen wurden von der Arbeitsgruppe „METASYS" unter der Leitung von Fabien Letisse durchgeführt am INSA, Toulouse) in biologischen Duplikaten analysiert. (A) Verglichen wurde die Kohlenstoffbilanz des Wildtypstammes HMS174(DE3) ('WT') beziehungsweise des Reporterstammes HMS174(DE3) attTn7::lacIp(eGFP)$_2$ *('Reporter') im unbelasteten und dem pTRA-51hd Plasmid belasteten ('hd') Fall. Die detektieren Nebenprodukte wurden für alle untersuchten Kohlenstoffquellen in Prozent aufgeschlüsselt. Für alle untersuchten Bedingungen konnten zwei große Stoffgruppen (gemischte Säuregärung in grünlicher Farbgebung und Aminosäurestoffwechsel-relevante Produkte in lila-blau) als Nebenprodukte neben der Biomasse (grau) identifiziert werden. Wie in Abbildung (B) dargestellt kann für belastete ('pTRA-51hd'), sowie unbelastete ('ohne Ladung') Stämme eine Abnahme der aus der gemischten Säuregärung stammenden Produkte mit abnehmender Qualität der Kohlenstoffquelle beobachtet werden. Betrachtet man die Aminosäurestoffwechsel-relevanten Produkte zeigt sich ein Anstieg der Produktbildung mit der zellulären Belastung (C). Um indirekte Rückschlüsse auf die CO2-Bildung zu ziehen, wurde der wiedergefundene Anteil der Kohlenstoffatome für die belasteten Stämme hinsichtlich der Wachstumsrate analysiert (D).*

Um ein ganzheitlicheres Bild der Kapazität einer Zelle zu bekommen, wurde die Reporterbildungsrate des plasmidtragenden Kapazitätsmonitorstammes HMS174 pSEVA237R-31 mit den entsprechenden Wachstumsraten korreliert. Wie in Abbildung 4.27-A gezeigt, wurde für den unbelasteten Stamm über den gesamten Bereich der analysierten Wachstumsraten eine Reporterbildungsrate zwischen 500 und 750 A.U. mg_{CDW}^{-1} h^{-1} gemessen (grauer Bereich, Vergleich auch Abbildung 4.13-C). Insertiert man das Plasmid pSEVA648-52 in den Kapazitätsmonitorstamm, dann kann - trotz der recht starken Streuung des Reportersignales im unbelasteten Fall - eine starke Abhängigkeit der Kapazität von der Wachstumsrate im belasteten Fall erkannt werden. Kann eine Zelle also während der heterologen Produktion eine hohe Wachstumsrate aufrechterhalten, dann korreliert dies mit einer höheren Kapazität. Ein Anstieg der Kapazität scheint sowohl mit der Acetatbildung (Abbildung 4.27-B), aber auch der heterologen Proteinproduktion selbst (Abbildung 4.27-C) zu korrelieren.
Zusammenfassend lässt sich deshalb sagen, dass zwar mit zunehmender Wachstumsrate ein Anstieg an diversen Nebenprodukten wie zum Beispiel Acetat zu verzeichnen ist, jedoch

hinsichtlich des zellulären Produktionsvermögens und der Kapazität höhere Wachstumsraten bevorzugt werden sollten. Die Wachstumsrate sollte also gekoppelt an die Anforderungen des Produktionsprozesses gestaltet werden. Sind ein möglichst vollständiger Substratumsatz und hohe Produktausbeuten gewünscht, dann sind langsamere Wachstumsraten zu bevorzugen. Ist es für den Prozess wichtig in kurzer Zeit große Mengen an Produkt zu erreichen, dann sind höhere Wachstumsraten von Vorteil.

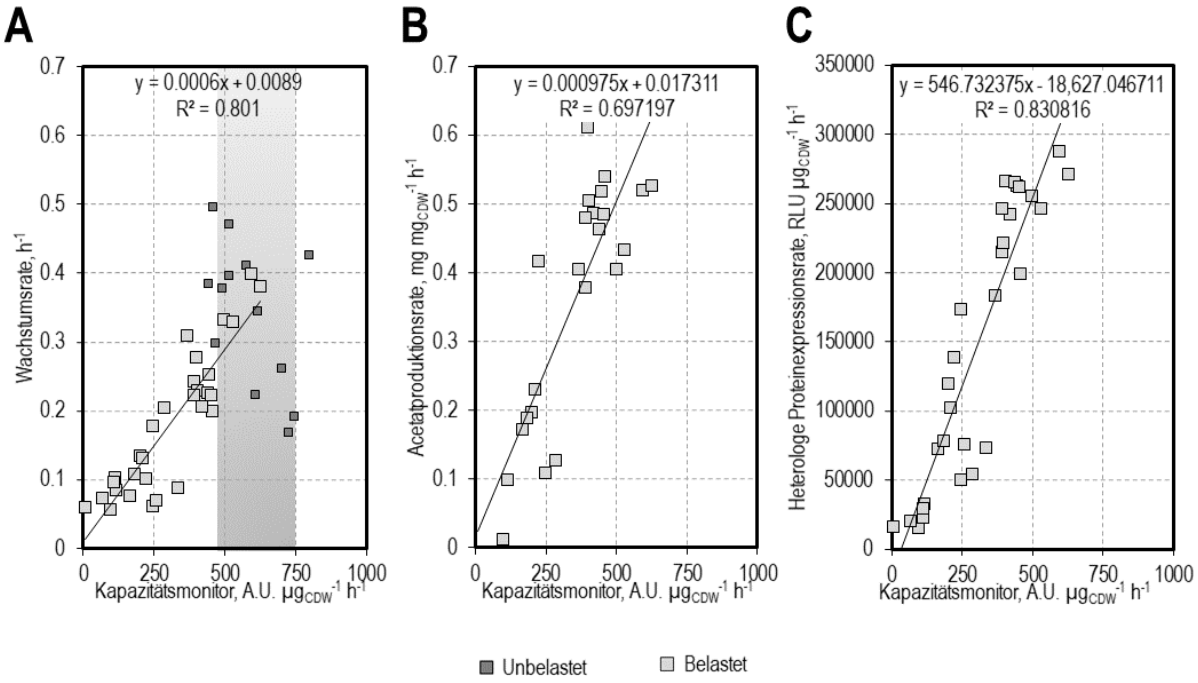


Abbildung 4.27 Korreliert man die Wachstumsrate (A), die Acetatbildungsrate (B), sowie die heterologe Proteinbildungsrate (C) des mit dem Plasmid pSEVA648-52 belasteten (hellgraue Symbole) Kapazitätsmonitor-Stammes HMS174 pSEVA237R-31 mit der jeweiligen Expression des Kapazitätsmonitors, lässt sich für alle Daten ein linearer Zusammenhang erkennen. Für den unbelasteten Reporterstamm HMS174 pSEVA237R-31 (dunkelgraue Symbole) konnte eine annähern konstante Expression des Reporters (grauer Bereich) über die vermessenen Wachstumsraten aufgezeichnet werden (A).

4.4.2 Einfluss des Kultivierungssytems auf die metabolische Aktivität

In der Regel findet die initiale Entwicklung biotechnologischer Prozesse in Schüttelkolben statt. Dort können im Vergleich zur Produktion in Bioreaktoren (Daten wurden im Rahmen der studentischen Arbeiten von Poschinger [245] und Stotz [206] erhoben) jedoch Bedingungen, wie pH-Änderung, Sauerstoffeintrag, veränderte Scherraten und ähnliches unkontrolliert variieren. Deshalb stellt sich die Frage, ob die erhobenen Messdaten durch das Kultivierungssystem beeinflusst werden, oder ob mittels Daten, die im Schüttelkolben erhoben wurden, auch Aussagen über das Verhalten im Bioreaktor getroffen werden können. Um Rückschlüsse für Flussoptimierungen via Metabolic Engineering ziehen zu können, ist es von essenzieller Bedeutung, dass die gebildeten Nebenprodukte aufgrund zellinterner Limitationen segregiert werden und nicht aufgrund von Effekten, die vom Kultivierungssetup herrühren. Insbesondere eine Sauerstofflimitation, wie sie im Schüttelkolben vorkommen kann, muss als Ursache für Nebenproduktbildung minimiert werden. Analysiert wurde zu diesem Zweck der Wildtypstamm HMS174(DE3), im unbeladenen (Abbildung 4.28, grau) sowie im mit dem Plasmid pTRA-51hd beladenen Zustand (Abbildung 4.28, pink). Getestet wurde neben der Kultivierung in Schüttelkolben auch das Verhalten der Stämme im 1.5 L-Maßstab im gerührten Sartorius-Bioreaktor, sowie im 12 mL-Miniatursystem des bioREACTOR48 hinsichtlich Wachstumsrate

(Abbildung 4.28, A und B), Substrataufnahmerate (Abbildung 4.28, C und D) und Acetatproduktionsrate (Abbildung 4.28, E und F).

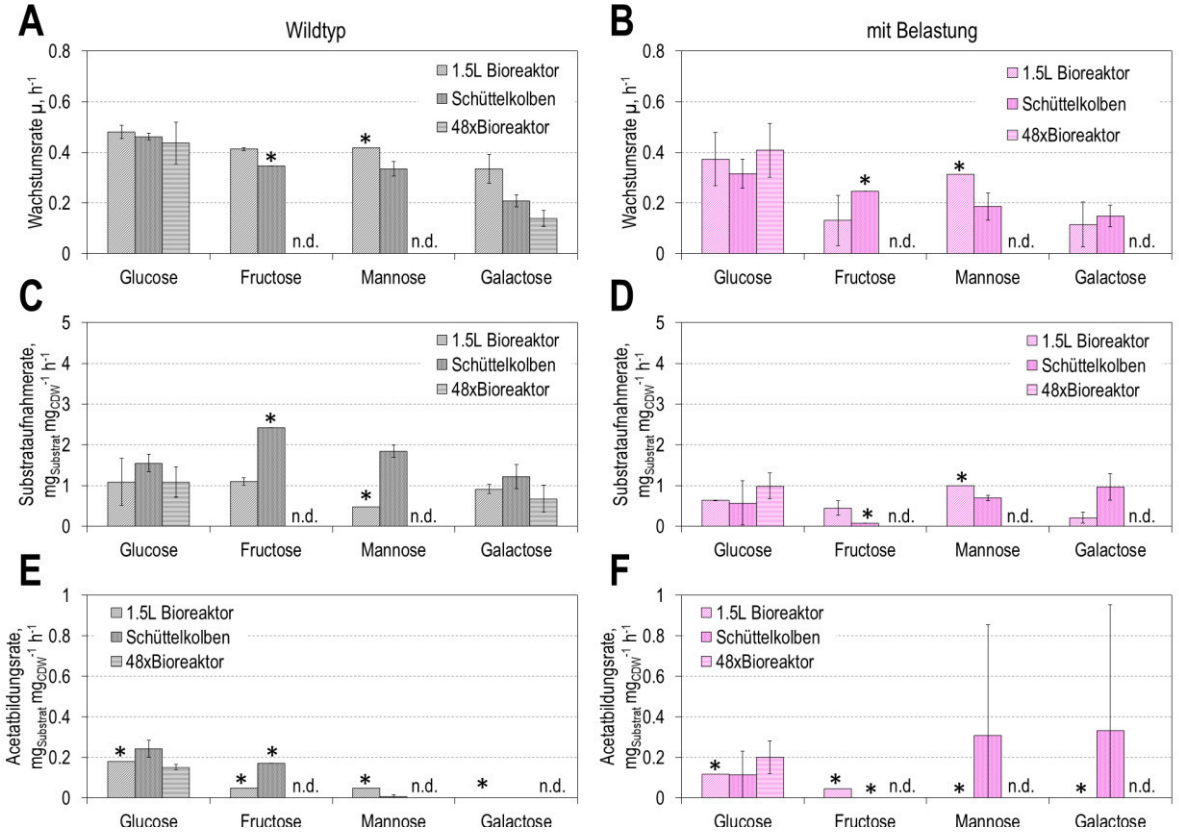


Abbildung 4.28 Die Kultivierung des Stammes HMS174(DE3) (induziert mit 1.5 mM mTA) zeigte im unbeladenen (A,C,E; grau) sowie im mit dem Plasmid pTRA-51hd belasteten Fall (B,D,F; pink) in den unterschiedlichen Kultivierungssystemen 1.5 L Bioreaktor, Schüttelkolben (50 mL in 250 mL Flaschen) und dem miniaturisierten parallelen BioREACTOR48-System (12 mL) hinsichtlich der Wachstumsrate (A, B), der Substrataufnahmerate (C, D) und der Acetatbildungsrate (E, F) ein vergleichbares Verhalten. Um unterschiedliche Wachstumsraten einstellen zu können, wurden jeweils auf die Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose, Mannose und Galactose eingesetzt. Einfach erhobene Raten sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Um unterschiedliche energetische Zustände der Zellen betrachten zu können, wurden die Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose, Mannose und Galactose verwendet. Betrachtet man die gemessenen Raten für den energetisch hochwertigsten Zucker Glucose, dann konnte in keinem der Fälle ein signifikanter Unterschied durch die Verwendung verschiedener Kultivierungssysteme erfasst werden (Abbildung 4.28-A bis -F). Für den schnell wachsenden, unbeladenen Wildtypstamm (Abbildung 4.28-A, -C, -E) konnte im Schüttelkolben verglichen mit dem 1.5 L Bioreaktor bei allen Zuckern ein leichter Trend zu reduziertem Wachstum und erhöhter Aufnahmerate mit gleichzeitig erhöhter Acetatbildungsrate vermessen werden. Dies kann ein Hinweis für eine geringfügige Sauerstoffunterversorgung sein. Verglichen mit den gemessenen Varianzen bewegt sich diese potenzielle Sauerstoffunterversorgung aber in einem vernachlässigbaren Rahmen. Es muss jedoch beachtet werden, dass dies dazu führen kann, dass die Nebenproduktbildungsrate auf Grund von Limitationen im Energiestoffwechsel leicht überschätzt wird. Wie schon an Abbildung 4.24 diskutiert, scheinen Effekte bei den energetisch schlechter verwertbaren Zuckern Fructose, Mannose und Galactose stärker auszufallen, als bei dem hochwertigen Zucker Glucose. Im Allgemeinen konnten besonders im Fall des beladenen Stammes eine größere Varianz beobachtet werden. Dieses Verhalten deckt sich mit den durchweg in dieser Arbeitet beobachteten Schwankungen in allen untersuchten Parametern des belasteten

Stammes. Generell scheinet die Wahl des Kultivierungssystems zumindest für die Erhebung metabolischer Daten bei Zelldichten, die zu keiner Sauerstofflimitation führen, keine Rolle zu spielen.

4.4.3 Die metabolische Aktivität bei unterschiedlichen Prozessführungen

Wie in Kapitel 4.4.2 bereits analysiert, waren die Ergebnisse für die Kohlenstoffquelle Glucose am besten aus dem Schüttelkolben in einen kontrollierten Biorekator übertragbar. Da es bei der Verwendung unterschiedlicher Zucker nicht auszuschließen ist, dass eine Änderung in der metabolischen Aktivität und im Enzymsetup hervorgerufen wird, empfiehlt es sich daher Kultivierungen mit nur einer Kohlenstoffquelle durchzuführen, um direkte Vergleiche zu ziehen und Aussagen über den Stoffwechsel treffen zu können.

Um auf diese Art und Weise unterschiedliche Wachstumsraten erzeugen zu können, muss das Wachstum über einen der notwendigen Nährstoffe limitiert werden. Eine gängige Vorgehensweise hierbei ist es, die Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle zu begrenzen. Begründet in der exponentiellen Vermehrung der Zellen, muss diese folglich auch exponentiell zugeführt werden. Um die erforderlichen Substrate zu dosieren, werden regulier- und ansteuerbare Pumpsysteme benötigt. In einer Bioreaktorstation sind derartige Dosiereinheiten in der Regel fest verbaut. Auf Grund hoher Kosten findet dieses Setup normalerweise für Versuche, die auf einer Vielzahl von Ansätzen beruhen, keine Verwendung. Für multi-parallele Ansätze wird oft auf Schüttelkolbenkultivierungen zurückgegriffen.

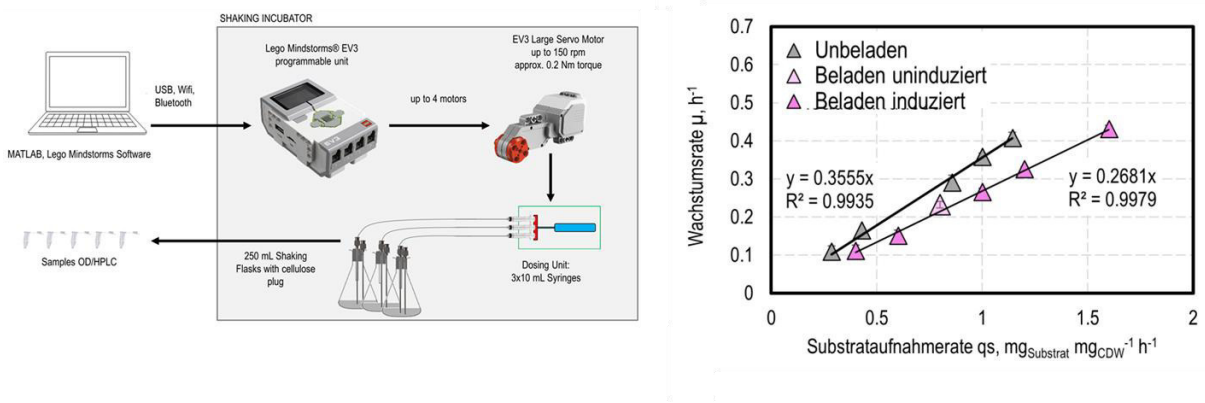


Abbildung 4.29 Um eine exponentielle Substratzufuhr zu ermöglichen, wurde eine mit MATLAB ansteuerbare Dosiereinheit bereitgestellt. Diese basiert auf LEGO-Technik. Über die Dosiereinheit wurden bis zu drei Schüttelkolben pro Wachstumsrate mit dem limitierenden Substrat versorgt (links). Es konnten nicht nur für den unbeladenen Wildtypstamm HMS174(DE3) (grau) sondern auch für den mit dem Plasmid pTRA-51hd beladenen Stamm im induzierten (pink), sowie uninduzierten Fall (hellrosa) über die Bereitstellung einer limitierenden Glucosemenge die Substrataufnahmerate q_S und damit einhergehend die Wachstumsrate μ festgesetzt werden (rechts). Abbildung nach [191].

Kommerziell erhältliche, ansteuerbare Pumpen sind teuer und daher nicht gut parallelisierbar. Oft besitzen sie auch keine Möglichkeit zur Realisierung exponentieller Profile. Aus diesem Grund gab es für die Kultivierung im Schüttelkolben mit verschiedenen Prozesstrategien bisher eher unzureichende Lösungsansätze. Um dieses Problem zu adressieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mit MATLAB flexibel ansteuerbare Spritzenpumpe für die Bereitstellung einer exponentiellen Glucosezufuhr erstellt [191]. Wie in Abbildung 4.29 (links) dargestellt, wurden mit diesem System bis zu drei Ansätze parallel pro Wachstumsrate realisiert. Es wurden durch die Reduktion der Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle auf eine Menge, die unter der maximalen

Aufnahmerate lag, unterschiedliche Wachstumsraten eingestellt. Betrachtet man die derart vorgegebenen Substrataufnahmeraten, wurde im Vergleich zu den Abbildung 4.23 und Abbildung 4.24 ein eindeutig lineares Verhältnis der beiden Größen Wachstumsrate und Substrataufnahmerate beobachtet (diese Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Jeremy von Poschinger erhoben [245]). In Abbildung 4.29 (rechts) konnte auch für Wachstumsraten über der für die Acetatproduktion kritischen Wachstumsrate von 0.3 h^{-1} keine Änderung der Steigung beziehungsweise der Biomasseausbeute beobachtet werden. Für den Plasmid-tragenden Stamm HMS174(DE3) (‚beladen'; induziert und uninduzert mit 1.5 mM mTA) wurde im Vergleich zum unbeladenen Wildtypstamm (‚unbeladen'; uninduziert) eine Abnahme der Steigung von 0.36 $mg_{CDW}\ mg_{Substrat}^{-1}$ auf 0.27 $mg_{CDW}\ mg_{Substrat}^{-1}$ gemessen. Wie in Gleichung 4.1 berechnet (siehe Anhang A.3.7), wurde die notwendige Substrataufnahmerate zum Erhalt und zur Expression der verwendeten heterologen Ladung pTRA-51hd auf circa 33 % der für das Wachstum notwendigen Aufnahmerate $q_{S,\mu}$ bestimmt. Dies entspricht einem Anteil von rund 25 % des insgesamt aufgenommenen Substrates.

$$q_{S,load} = q_{S,\mu} \cdot \frac{Y_{XS,WT} - Y_{XS,loaded}}{Y_{XS,loaded}} = q_{S,\mu} \cdot \frac{0.3555 - 0.2681}{0.2681} = q_{S,\mu} \cdot 0.33 \qquad 4.1$$

Außerdem wurde gezeigt, dass für das verwendete Plasmid pTRA-51hd der Hauptanteil des heterologen Energiebedarfs durch das Plasmid selbst verbraucht wurde: Im uninduzierten Fall wurde (Abbildung 4.29; rechts, hellrosa), verglichen mit dem induzierten Fall (Abbildung 4.29; rechts, pink), nahezu keine Änderung in der Biomasseausbeute beobachtet.

Im Fall von Nebenproduktbildung wäre zwangsläufig eine Änderung in der Biomasseausbeute zu erwarten gewesen. Da dies nicht beobachtet werden konnte, wurde zum einen die Glucoseaufnahme auf Vollständigkeit hin überprüft und zum anderen die Nebenproduktbildung im Kulturüberstand analysiert. Wie in Abbildung 4.30-A gezeigt, wurden exemplarisch die Triplikate des Wildtypstammes HMS174(DE3) jeweils im Satz- und im kohlenstofflimitierten Zulaufverfahren kultiviert. Diese wurden hinsichtlich der sich im Medium befindenden Bestandteile bei annähernd gleichen Wachstumsraten von circa 0.47 h^{-1} verglichen. Betrachtet man den in Abbildung 4.30-B gezeigten Verlauf der detektieren Metabolite des Satzverfahrens, dann kann mit steigender Biomasse eine lineare Abnahme des Substrates beobachtet werden (1.50 $mg_{Glucose}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$). Da die Wachstumsrate über der für dieses Setup bestimmten, kritischen Wachstumsrate von 0.3 h^{-1} lag, konnte außerdem ein linearer Anstieg der Acetatkonzentration (0.25 $mg_{Acetat}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$) gemessen werden. Im Fall der substratlimitierten Kultivierung in Abbildung 4.30-C wurde ein vollständiger Glucoseverbrauch über die Zeit beobachtet. Eine Nebenproduktbildung konnte - trotz annähernd maximaler Wachstumsrate - lediglich im mg-Bereich detektiert werden.

Unter der Annahme, dass insbesondere die Acetatbildung durch eine Limitation in der Atmungskette hervorgerufen wird, muss im Fall einer Nebenproduktbildung, wie in Kapitel 4.4.1 bereits dargelegt, eine Änderung in der Biomasseausbeute erfolgen. Da diese Produkte im Wildtypstamm während einer exponentiellen Substratzufuhr nicht akkumulieren (Abbildung 4.30-C), obwohl Wachstumsraten über der kritischen Wachstumsrate von 0.3 h^{-1} analysiert wurden, gibt es für dieses Verhalten bei exponentieller Substratzufuhr zwei Erklärungen. Zum einen wäre es möglich, dass die Limitation in der Atmungskette nicht, oder später auftritt. Da laut Literatur die Membranoberfläche der limitierende Faktor der Atmungskette ist, würde dies bedeuten, dass eine Änderung der Morphologie der Zellen in Zulaufkultivierungen auftritt. Zum anderen kann es sein, dass zwar Acetat gebildet wird, dieses

jedoch entgegen der regulären Katabolitrepression simultan verstoffwechselt wird, wie es bei niedrigern Wachstumsraten auch der Fall ist.

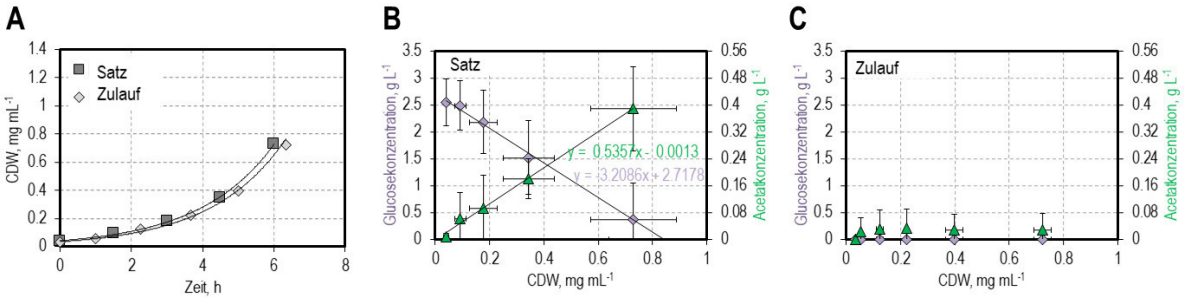


Abbildung 4.30 Der Wildtypstamm HMS174(DE3) wurde jeweils im Triplikat mittels einer Satzkultivierung sowie über ein kohlenstofflimitiertes Zulaufverfahren im Bereich der maximalen Wachstumsrate von rund 0.47 h-1 im 50 mL-Maßstab kultiviert. (A) Sowohl für den Satzprozess als auch für den Ansatz mit exponentieller Substratzufuhr wurde eine ähnliche Zunahme in der Biotrockenmasse erzielt. (B) Für den betrachteten Satzprozess konnte mit steigender Zelltrockenmasse (CDW) eine lineare Abnahme der Glucosekonzentration (lila) sowie eine Zunahme für Acetat (grün) gemessen werden. (C) Bei der Kultivierung im Zulaufverfahren wurde bei derselben Wachstumsrate weder eine Akkumulation des Substrates noch eine des Nebenproduktes Acetat gemessen.

Koolaee *et al* konnten zeigen, dass in Zulaufkultivierungen, bedingt durch die zu erreichenden höheren Zelldichten, Zellen eine sphärische Form aufweisen und dadurch eine geringere Membranoberfläche pro Volumen besitzen [246]. Da sich in den in dieser Arbeit betrachteten Prozessen die Zelldichten allerdings in derselben Größenordnung befinden, ist dieser Effekt eher unwahrscheinlich. Zwar wird in der Literatur davon berichtet, dass die Zellform abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit sein kann, im Fall von Glucose als limitierendes Substrat allerdings die Änderung ausschließlich von der Wachstumsrate abhängt [247]. Dies kann eine Erklärung liefern, warum es bei schnellem Wachstum verstärkt zur Nebenproduktbildung kommt, aber nicht, warum diese im Falle der exponentiellen Glucose zufuhr nicht mehr akkumulieren. Die wahrscheinlichere Variante ist, dass Nebenprodukte wie Acetat zwar gebildet werden, aber diese gleichzeitig verstoffwechselt werden können. Auch hier finden sich Beispiele in der Literatur. In Satzprozessen wird in Anwesenheit von Glucose die Verstoffwechselung anderer Kohlenstoffquellen regulatorisch unterdrückt. Studien zeigen jedoch, dass in *E. coli* W3110, einem dem in dieser Arbeit verwendeten HMS174 genetisch sehr nahe stehnenden Stamm [15], bei Zulaufprozessen eine gleichzeitige Aufnahme und Wiederverwendung von Glucose und Acetat stattfinden kann [140]. Die Linearität der Biomasseausbeute (Abbildung 4.29, rechts) deutet außerdem darauf hin, dass es sich nicht um eine auf Nebenproduktaufnahme spezialisierte Subpopulation handelt, sondern dass die Gesamtheit der Population an der Aufnahme beteiligt ist. Würden Nebenprodukte entstehen, wäre hier mit den initial erläuterten ‚Knicken' zu rechnen.

Die in der Literatur vorherschende Definition des ‚*overflow*'-Metabolismus beschreibt also nicht vollständig das Phänomen. Es handelt sich nicht vorrangig um eine Erscheinung, die daraus resultiert, dass Glucose im Überfluss vorliegt. Die Zelle geht nicht so sehr verschwenderisch mit dem Substrat um, sondern es handelt sich vielmehr um eine Reaktion, die abhängig vom Energiebedarf der Zelle ist und sowohl bei Substrat-limitierten Prozessen, aber auch bei Satzverfahren auftreten kann. Bei geringen Glucosekonzentrationen im Medium, werden die sogenannten Überflussprodukte also zwar gebildet, aber gleichzeitig auch als alternative Kohlenstoffquelle wieder aufgenommen, so dass sie effektiv nicht in Bilanzen erscheinen.

4.5 Systematische Analyse der Proteinzusammensetzung

Die Proteinzusammensetzung kann - wie im Fall des Tryptophan-Operons - durchaus eine regulatorische Rolle übernehmen [248]. In manchen Fällen wird die Lesegeschwindigkeit der Ribosomen signifikant beeinflusst [249]. Dies kann sogar zu Translationsabbruch führen [250]. Daher ist es wichtig die Zusammensetzung heterologer Einzelproteine oder auch ganzer metabolischer Routen für die Zelle möglichst wenig belastend zu gestalten. Um einen Eindruck zu bekommen welche Aminosäuresequenzabfolgen zu ungünstigen Effekten in der Zelle führen können, wurde zunächst eine Analyse der Zusammensetzung von unbelasteten *E. coli* Wildtypzellen durchgeführt. Anschließend wurde mittels einer randomisierten DNA-Sequenz der Einfluss der Zusammensetzung heterolog exprimierter Proteine auf die Belastung und Kapazität einer Zelle untersucht. Da hierfür eine Vielzahl an verschiedenen DNA-Sequenzabfolgen betrachtet werden muss, wurde zur Erhöhung der Abdeckung die Hochdurchsatzmethode dFlowSeq (dynamische Flusszytometrische Sequenzenzanalyse) zur Analyse der Wachstums- und Produktionsraten entworfen.

4.5.1 Aminosäureverfügbarkeit und native Proteomstruktur

Um einen Einblick in die native Proteinzusammensetzung einer *E. coli* Zelle zu bekommen und beurteilen zu können, wann man von einer Abweichung von der Norm sprechen kann, wurde zunächst eine Literaturrecherche hinsichtlich der in die Proteinbildung involvierten Faktoren durchgeführt. Tabelle 4.1 fasst die hierzu in der Literatur bereits bekannten Werte für *E. coli* zusammen. Für die proteinogenen Aminosäuren findet man nicht nur die zur Verfügung stehenden Codons und deren Verwendung, sondern auch Parameter wie der jeweilige gesamtenergetische Syntheseaufwand (in Anzahl an nötigen Phosphatbindungen), die durchschnittliche Verfügbarkeit pro Zelle, oder die Menge an entsprechenden tRNA-Molekülen.

Tabelle 4.1 Für die links gelisteten Aminosäuren wurde, neben der Anzahl der verfügbaren Codons und dem prozentualen Anteil an den insgesamt verfügbaren Codons, das von E coli *bevorzugt verwendete Triplet aufgeführt. Desweiteren wurden die Energiekosten als Anzahl an Phosphatbindungen, der prozentuale Anteil am Gesamtaminosäurevorkommen einer* E. coli *Zelle und die Anzahl der tRNA-Moleküle pro Zelle zusammengefasst. Im rechten Teil der Tabelle finden sich die Aminosäuren jeweils den Gruppen polar, unpolar, sauer und basisch zugeordnet.*

Aminosäure			Verfügbare native Codon-Kombinationen #	[a] Bevorzugt	%	[b] Energiekosten	[c] Vorkommen, %	[d] tRNAs pro Zelle	unpolar	polar	sauer	basisch
Alanin	Ala	A	4	GCG	6.56	11.7	9.6	4000	X	-	-	-
Arginin	Arg	R	6	CGC	9.84	27.3	5.53	2480	-	-	-	X
Asparagin	Asn	N	2	AAC	3.28	14.7	4.5	1230	-	X	-	-
Asparaginsäure	Asp	D	2	GAT	3.28	12.7	4.5	3670	-	-	X	-
Cystein	Cys	C	2	TGC	3.28	24.7	1.71	2000	-	X	-	-
Glutamin	Gln	Q	2	CAG	3.28	16.3	4.93	730	-	X	-	-
Glutaminsäure	Glu	E	2	GAA	3.28	15.3	4.93	880	-	-	X	-
Glycin	Gly	G	4	GGC	6.56	11.7	11.45	4370	-	X	-	-
Histidin	His	H	2	CAT	3.28	38.3	1.78	1900	-	-	-	X
Isoleucin	Ile	I	3	ATT	4.92	32.3	5.43	4930	X	-	-	-
Leucin	Leu	L	6	CTG	9.84	27.3	8.42	5330	X	-	-	-
Lysin	Lys	K	2	AAA	3.28	30.3	6.42	4300	-	-	-	X
Methionin	Met	M	1	ATG	1.64	34.3	2.87	4020	X	-	-	-
Phenylalanin	Phe	F	2	TTT	3.28	52	3.46	1830	X	-	-	-
Prolin	Pro	P	4	CCG	6.56	20.3	4.14	2620	X	-	-	-
Serin	Ser	S	6	AGC	9.84	11.7	4.04	6270	-	X	-	-
Threonin	Thr	T	4	ACC	6.56	18.7	4.74	4700	-	X	-	-
Tryptophan	Trp	W	1	TGG	1.64	74.3	1.06	790	X	-	-	-
Tyrosin	Tyr	Y	2	TAT	3.28	50	2.58	1030	-	X	-	-
Valin	Val	V	4	GTG	6.56	23.3	7.91	7910	X	-	-	-

a)Nakamura et al. [251] *b) Akashi* et al. [95] *c) Weickert* et al. [252] *d) Jakubowski* et al. [253]

Um feststellen zu können, ob *E. coli* eine bestimmte Zusammensetzung an Protein bevorzugt, wurde beispielhaft die Proteinsequenz des Methylerythritol-Phosphat-Wegs (MEP, 2384 Aminosäuren Abbildung 4.31-B) untersucht. Es konnte eine sichtbare Übereinstimmung der Zusammensetzung dieses Stoffwechselweges mit der generellen Verfügbarkeit von Aminosäuren in *E. coli* gefunden werden (Abbildung 4.31-A und -B). Setzt man die prozentualen Anteile der Aminosäuren am Stoffwechselweg (2384 Aminosäuren pro Enzymsatz) mit der prozentualen Verfügbarkeit der Aminosäuren ins direkte Verhältnis, dann korrelieren diese mit einem Bestimmtheitsmaß von 0.79. Zwar zeigt jedes der beteiligten Enzyme an sich niedrigere Bestimmtheitsmaße hinsichtlich der Sequenzzusammensetzung, jedoch findet man für heterolog eingebrachte Proteine wie dem fluoreszierende Protein GFP (232 Aminosäuren pro Enzym, Abbildung 4.31-C) eine deutlich stärkere Abweichung. Vergleicht man die Verfügbarkeit der Aminosäuren prozentual mit der Zusammensetzung des heterologen GFPs, dann wird lediglich ein Bestimmtheitsmaß von nur noch 0.42 erreicht. Hier kann von keiner Korrelation mehr gesprochen werden.

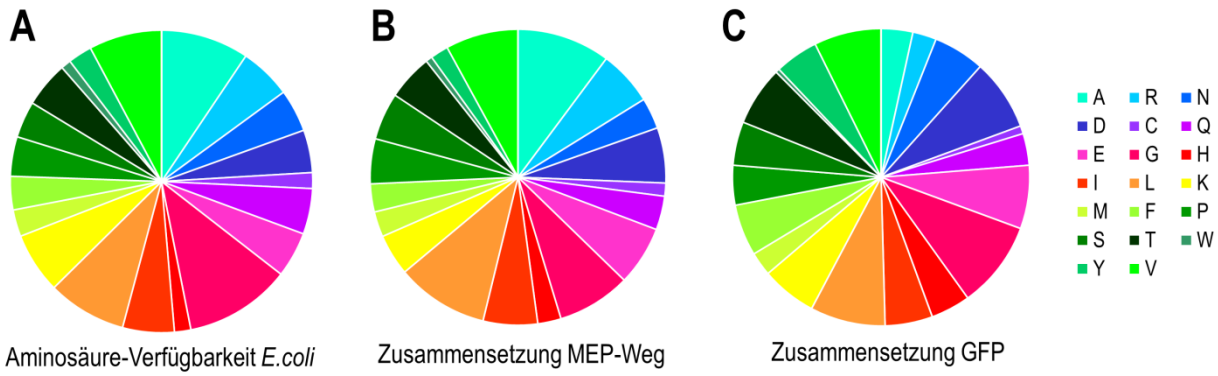


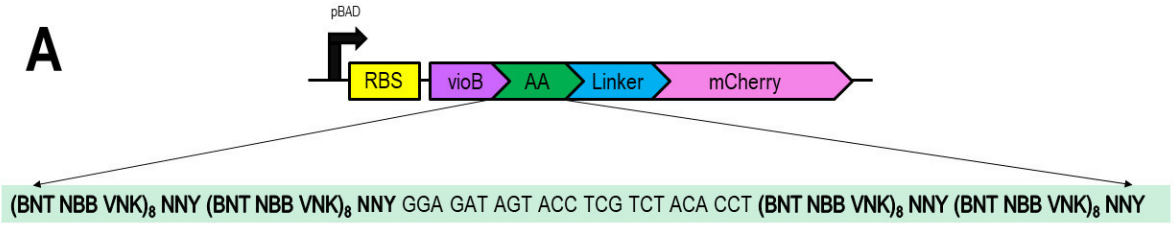
Abbildung 4.31 Die prozentuale Verteilunge der insgesamt in einer E. coli *Zelle vorliegenden Aminosäuren (A) korreliert sehr stark mit der Zusammensetzung des Beispiel Stoffwechselwegs Methylerythritol-Phosphat-Weg (MEP, B), der in* E. coli *zur Isoprenoid Synthese genutzt wird. Vergleicht man die Aminosäureverteilung eines heterologen Proteins wie GFP, können deutliche Unterschiede in der Aminosäureverteilung erkannt werden (C).*

Da sich auch intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen während der exponentiellen Phase in einem Fließgleichgewicht befinden, stellt sich die Frage, ob eine unverhältnismäßige Entnahme aus diesem Aminosäurepool die Stabilität des Systems gefährden kann. Da gerade in der Aminosäuresynthese Engpässe wie die Methionin-Synthase [7] auftreten, kann es bei der heterologen Überexpression zu einer Erschöpfung einer der Komponenten aus dem Aminosäurepool kommen. Dies würde unweigerlich zu einer Stagnation der Proteinproduktion führen, wovon auch essenzielle Enzyme des Stoffwechsels betroffen sein können.

4.5.2 Randomisierte Peptidbibliothek zur Analyse Metabolischer Belastung

Um den Einfluss der Aminosäurezusammensetzung auf die zelluläre Kapazität systematisch untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Plasmidbibiothek erstellt. Diese ermöglicht es den Einfluss der Proteinzusammensetzung auf die Zelle ohne andere Nebeneffekte zu analysieren. Hierfür wurde basierend auf dem high-copy Plasmidvektor pSB1C3 ein Standardplasmid gestaltet. Dieses enthält neben einem arabinoseinduzierbaren Promotor und einer starken RBS das Fluoreszenzprotein mCherry. Wie in Abbildung 4.32-A dargestellt, wurde ein 56 Basenpaar langes Fragment des in *E. coli* funktionslosen Genes *vioB* als Translationsstart eingebracht und über eine Linkerregion mit mCherry verbunden. Hierdurch wurden Sequenzwechselwirkungen mit der Ribosomenbindestelle vermieden. Im Minimalplasmid

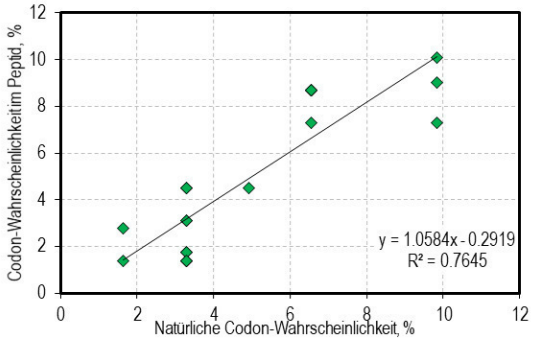
befindet sich anstelle der Zufallssequenz lediglich die Aminosäure Glycin. Stämme mit diesem Plasmid wurden als minimal belasteter Expressionstamm verwendet. Über sogenanntes *Golden Gate Cloning* wurde mittels des Restriktionsenzyms *BsaI* das Glycin durch eine 324 Basenpaar lange Zufallspeptidsequenz ersetzt (Abbildung 4.32-A). Diese Sequenz bestand aus zwei Bausteinen mit jeweils 50 randomisierten Triplets. Aus Synthesegründen wurden diese Bausteine über ein acht-Aminosäure-langes, konstantes Bindeglied verbunden. Die Codons für die 100 randomisierten Aminosäuren wurden auf eine Art und Weise designed, die das natürliche Spektrum an Aminosäuren im Zufalls-Peptid-Tag wiedergeben konnte.



B

IUPAC für degenerierte Basen	Mögliche Basen im DNA-Code
B	T, C, G
N	A, T, G, C
T	T
V	A, C, G
K	T, G
Y	T, C

C



D

		Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Degenerierte Codons	32xBNT	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
	32xNBB	3	1	0	0	2	0	0	3	0	2	4	0	1	2	3	4	3	1	0	3
	32xVNK	2	3	1	1	0	1	1	2	1	1	2	1	1	0	2	1	2	0	0	2
	4xNNY	2	2	2	2	2	0	0	2	2	2	2	0	0	2	2	4	2	0	2	2
Kombinations-möglichkeiten	#	200	168	40	72	104	32	32	200	72	104	232	32	64	104	200	208	168	32	40	200
	%	8.7	7.3	1.7	3.1	4.5	1.4	1.4	8.7	3.1	4.5	10.1	1.4	2.8	4.5	8.7	9	7.3	1.4	1.7	8.7

Abbildung 4.32 Das hier gezeigte, arabinoseinduzierbare Konstrukt wurde zur systematischen Analyse sequenzbedingter Belastungen entworfen. (A) Basierend auf dem Plasmidbackbone pSB1C3 wurde eine Zufallspeptid aus 100 Aminosäuren mittels eines Linkers an das Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert. (B) Die gelistete IUPAC-Nomenklatur der verwendeten, degenerierten Basen dient als Platzhalter für mögliche insertierte Basen in der DNA-Sequenz. (C) Die Wahrscheinlichkeit, dass die in der Ausgangssequenz vorliegenden degenerierten Triplets für eine spezifische Aminosäure codieren, wurde im rechten Graphen mit der Wahrscheinlichkeit, dass ein Codon natürlicherweise auftritt korreliert. (D) Die theoretisch möglichen Kombinationen der im synthetischen Konstrukt vorkommenden Aminosäuren wurden in Tabellenform analysiert.

Hierfür wurde eine Kombination an degenerierten Codons verwendet, die alle Aminosäuren in einer ähnlichen Größenordnung abdeckt wie es durch die native Codon-Usage der Fall ist

(Abbildung 4.32-C und -D). Verwendet wurden die degenerierten Basen B, N, T, V, K und Y. Wie in Abbildung 4.32-B gezeigt, codieren diese für die natürlichen Basen und fanden in Form der Codons BNT, NBB, VNK und NNY Eingang in die randomisierte Sequenz. Die Auswahl dieser degenerierten Codons verhinderte den Einbau von Stopp-Codons. Unter der Annahme, dass das Vorkommen der Codons lediglich von den kombinatorischen Möglichkeiten abhängt, konnte die degenerierte Sequenz so zusammengestellt werden, dass die Wahrscheinlichkeit für den Einbau einer Aminosäure im synthetischen Konstrukt mit einem Bestimmtheitsmaß von 0.76 des theoretischen Codonvorkommens in der Natur entspricht (Abbildung 4.32-D). Die Codonpräferenz wurde in dieser Berechnung vernachlässigt.

4.5.3 Manueller Screen der zellulären Belastung durch Proteinzusammensetzung

Die auf dem in Kapitel 4.5.2 vorgestellten Plasmid beruhende Plasmidbibliothek wurde in den von Ceroni *et al.* [136] beschriebenen *E. coli* Stamm ‚288' (DHB10B-Derivat) transferiert. Der in der *attB*-Region des Stammes integrierte Kapazitätsmonitor konnte mittels grüner Fluoreszenz beobachtet werden. Die untersuchten Kriterien waren neben dieser zellulären Kapazität (Abbildung 4.33, grün) auch die Wachstumsrate (Abbildung 4.33, grau) sowie die Produktionsrate des Peptid-mCherry-Konstruktes (Abbildung 4.33, pink). Da die hier verwendeten DH10B Stammderivate eine Leucin-Auxotrophie besitzen, wurde das Minimalmedium der im 200 µL-Maßstab durchgeführten Kultivierungen mit 0.2 % (w/v) Casaminosäuren supplementiert. Zur Erhöhung der Kapazität wurden der Kultur zusätzlich 0.34 mg mL^{-1} Thiamin zugesetzt. Da eine höhere Kapazität mit einer stärkeren Kapazitätsmonitorexpression gleichzusetzen ist, kann mit einer höheren Auflösung der unter Umständen auch geringen Effekte auf die Kapazität gerechnet werden Die heterologe Plasmidproduktion wurde mit Arabinose induziert (siehe Kapitel 3.4.1). Die gezeigten Messungen wurden unter Verwendung des Substrates Glycerol bei 37 °C erhoben.

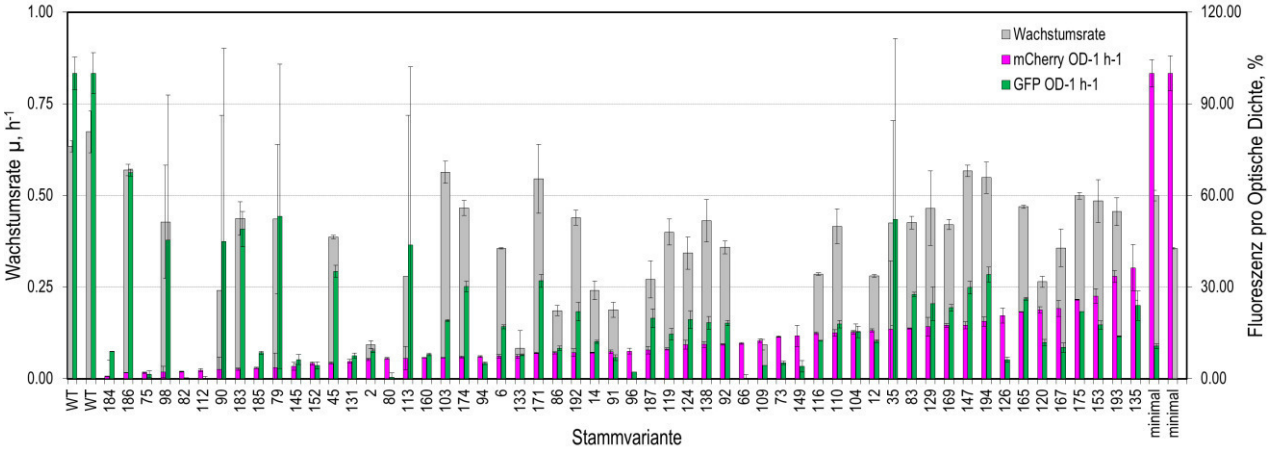


Abbildung 4.33 Einfluss des Zufallspeptid-Tags auf die Wachstumsrate (grau), die Proteinproduktionsrate (pink) und die Kapazitätsmonitorexpression (grün). Die hier gezeigten Raten wurden für den Stam 288 (DH10B-Derivat mit genomisch integriertem Kapazitätsmonitor) erhoben. Dieser enthielt 56 unterschiedliche Plasmide der randomisierten Plasmidbibliothek und wurde bei 37 °C mit dem Substrat Glycerol kultiviert wurde. Induziert wurde mit 4 µL einer 10 %-igen Arabinoselösung.

Mittels eines manuellen Screens wurden 194 unterschiedliche Stämme (*E. coli* 288: DH10B-Derivat mit genomisch integriertem Kapazitätsmonitor plus randomisierte Plasmidbibliothek) in Duplikaten analysiert. Auf Grund einer fehlerbehafteten Sequenzsynthese, sowie einer limitierten Screening-Kapazität konnten aus dieser Auswahl lediglich 56 verschiedene Stämme mit

korrekten Sequenzen in der richtigen Länge und ohne Stopp-Codon identifiziert und näher beschrieben werden. Von diesen wurden 46 Stämme jeweils in Duplikaten mit den Zuckern Glycerin und Fructose bei 37 °C sowie bei 30 °C charakterisiert (Wachstum, Kapazität und heterologe Expression). Um die ermittelten Raten auch zwischen verschiedenen Mikrotiterplatten unmittelbar vergleichen zu können, wurden die Signale der zellulären Kapazität auf die grüne Fluoreszenz des jeweils mitgeführten Wildtypstammes 288 (‚WT') normiert. Dieser besitzt die maximale freie Kapazität, da er unbelastet ist. Es wurde die Annahme getroffen, dass die Zelle ohne die zusätzliche Belastung durch den Zufallspeptid-Tag in der Lage ist maximal viel mCherry-Protein zu generieren. Daher wurde das Signal aller mCherry-Konstrukte auf das Signal des minimalen mCherry-Proteins des zugehörigen minimal-belasteten Stammes (‚minimal') normiert. Dieser wurde ebenfalls auf allen Mikrotiterplatten mitgeführt. Es konnte eine unerwartet große Bandbreite an Proteinproduktionsraten gefunden werden. Sortiert man diese, wie in Abbildung 4.33 gezeigt, dann verhalten sich weder die Wachstumsraten noch die Kapazitäten in Korrelation zur Expression. Die beobachteten Änderungen lassen sich also nicht einfach auf eine Umverteilung der Ressourcen zurückführen, sondern müssen durch komplexere Regulationen der Zelle erklärte werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, einen Zusammenhang der gemessenen Raten (Wachstum, Kapazität und heterologe Expression) zu möglichen Limitationen in der Translation herzustellen.

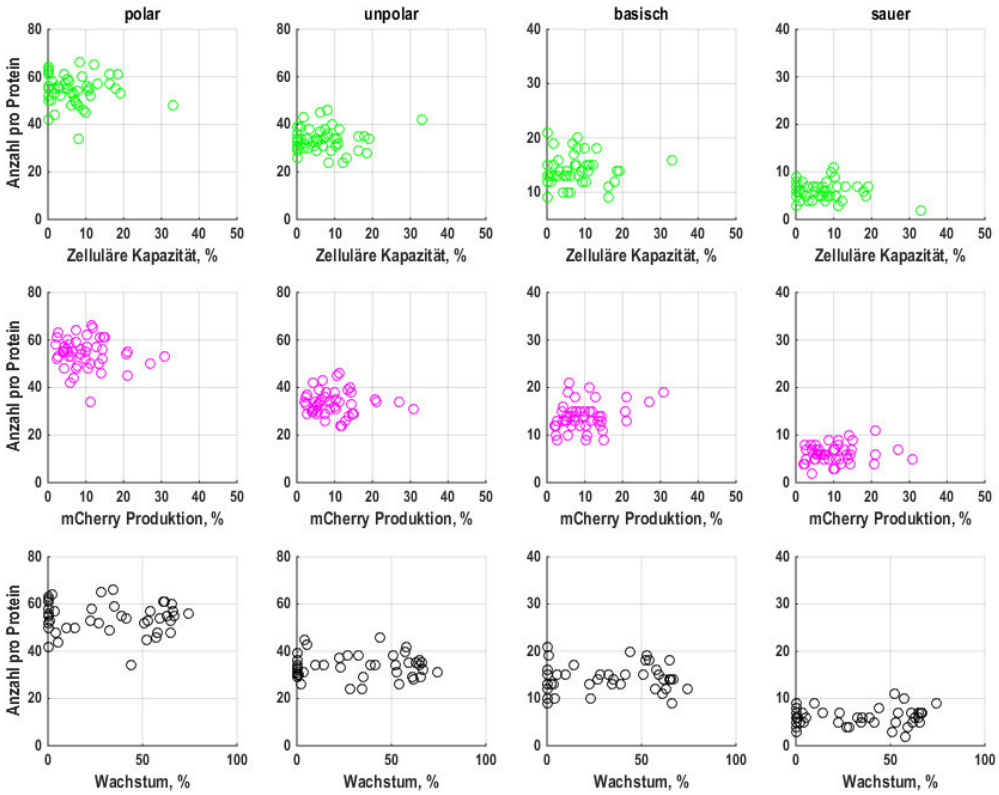


Abbildung 4.34 Die Einflussnahme der Eigenschaften der verbauten Aminosäuren wurde mit den normierten Parametern zelluläre Kapazität (oberste Reihe, grün), heterologe Proteinproduktion des Fusionsproteins Peptid-mCherry (mittlere Reihe, pink) und Wachstumsrate (untere Reihe, schwarz) verglichen. Diese drei Raten lassen eine Beurteilung der Zellperformance zu. Das Vorkommen der unterschiedlichen Eigenschaften der Aminosäuren (polar, unpolar, basisch und sauer) im Zufallspeptidtag wurde mit den im 200 µL-Maßstab erhobenen Raten korreliert.

Hierfür wurden die Faktoren Aminosäure- und tRNA-Verfügbarkeit, aber auch die Summe der Energiekosten für die Gesamtheit der im heterologen Zufallspeptid-Tag verwendeten Aminosäuren aus Tabelle 4.1 untersucht (Anhang A.3.11). Es konnte kein direkter Zusammenhang zwischen diesen Parametern und den Änderungen in den gemessenen Raten gezeigt werden. Auch die Häufigkeit, mit der Aminosäuren einer speziellen Eigenschaft (polar, unpolar, beziehungsweise sauer und basisch) im heterologen Zufallspeptid-Tag verbaut wurden, zeigte keine Korrelation mit den vermessenen Raten (Abbildung 4.34). Lediglich fiel auf, dass der Anteil an sauren Aminosäuren am geringsten war, wohingegen die polaren Aminosäuren einen großen Anteil von rund 60 % stellten.

In einem nächsten Schritt wurde die Aminosäureverfügbarkeit in *E. coli* (Abbildung 4.35-A) mit der Zusammensetzung der Zufallspeptid-Tags zweier sehr unterschiedlich belasteter Stämme (#98, Abbildung 4.35-B; #193, Abbildung 4.35-C) verglichen. Die Kriterien Wachstumsrate, Kapazität und heterologe Expression der beiden Stämme finden sich in Abbildung 4.33. Für beide Peptide wurde eine starke Abweichung von der durchschnittlichen Aminosäurezusammensetzung in *E. coli* gezeigt. Es lässt sich folgern, dass sich die entstehende Belastung also nicht auf einzelne Faktoren wie tRNA-Verfügbarkeit, Aminosäureeigenschaft, Energiebedarf oder Aminosäureverfügbarkeit zurückführen lässt. Da diese Faktoren dennoch eine Rolle spielen müssen, ist anzunehmen, dass starke Wechselwirkungen zwischen diesen Parametern auftreten. Diese Wechselwirkungen führen dazu, dass keine Korrelationen bei der Einzelbetrachtung sichtbar sind. Jedoch zeigen verglichen mit der nativen Aminosäureverfügbarkeit auch gut exprimierende Konstrukte - wie die Sequenz 193 - eine sehr starke Verschiebungen im Aminosäurevorkommen. Daher kann man die Annahme treffen, dass die unterschiedliche Expressionsleistung der Konstrukte in großen Teilen auf die DNA-Sequenzabfolge zurückzuführen ist, die beispielsweise Verzögerungen in der Translation hervorrufen kann.

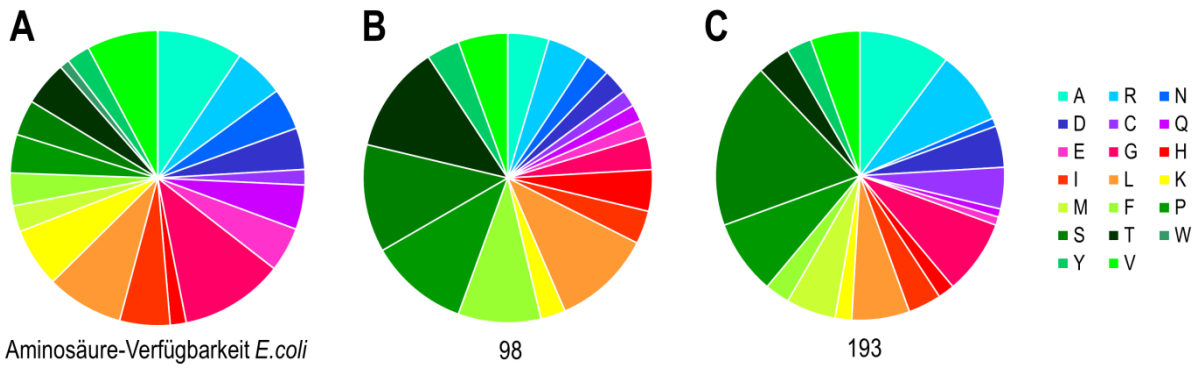


Abbildung 4.35 Analysiert wurden die Anteile der proteinogenen Aminosäuren. Die Zusammensetzung zweier beispielhafter Zufallspeptide (B: ‚98' mit schlechter Expression, C: ‚193' mit starker Expression) wurde mit der Aminosäureverfügbarkeit in E. coli *verglichen (A).*

Es stellt sich die Frage, ob bestimmte Sequenzen einen Vor- oder Nachteil bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen (Temperatur: 30 °C und 37 °C; Kohlenstoffquelle: Fructose und Glycerol) besitzen. Hier wurde zunächst die Annahme getroffen, dass – falls kein Vorteil oder Nachteil durch eine Bedingung entsteht – kein Einfluss auf die relative Verteilung der untersuchten Konstrukte auftritt. Dies bedeutet, dass die Leistung für die analysierten Parameter Wachstum, Kapazität und Proteinbildung prozentual gleichbleibt. Unbeeinflusste Stämme sollten sich daher in der Nähe der Basislinie (Abbildung 4.36, grün gestrichelt) wiederfinden. Zur Orientierung wurden die Parameter einiger ausgewählter, vor allem im Wachstum stark

abweichender Konstrukte, farbig hervorgehoben. Untersucht wurden basierend auf dieser Randbedingung die Parameter Wachstum, zelluläre Kapazität und Proteinexpression bei unterschiedlichen Temperaturen (30 °C und 37 °C, Abbildung 4.36-A bis -C). Es konnte bei 30 °C für alle drei Parameter eine verhältnismäßig bessere Leistung als bei 37 °C erzielt werden. Der stärkste Einfluss der Zufallspeptid-Sequenz konnte auf das Wachstum verzeichnet werden. Insbesondere die Sequenzen 165 und 113 konnten bei 30 °C trotz Belastung ein deutlich höheres Wachstum realisieren als bei 37 °C (Abbildung 4.36-A). Analysiert man die Leistung der Stämme bei verschiedenen Kohlenstoffquellen (Fructose und Glycerin, Abbildung 4.36-D bis -F), konnte lediglich für einige Konstrukte (zum Beispiel 98 oder 90) durch den Einsatz des Zuckers Glycerol anstelle von Fructose ein prozentual besseres Wachstum, sowie eine höhere zelluläre Kapazität vermessen werden (Abbildung 4.36-D und -E). Auf die Proteinbildung konnte allerdings kein Einfluss erzielt werden (Abbildung 4.36-F). In den Kapiteln 4.2 und 4.3 wurde gezeigt, dass ein schnelleres Wachstum einen positiven Einfluss auf die Ressourcenverfügbarkeit hat. In Abbildung 4.36 konnte jedoch demonstriert werden, dass die Reduktion der Wachstumsraten und Reaktionsgeschwindigkeiten durch eine niedrigere Temperatur generell einen positiven Effekt auf die Auswirkungen der heterologen Belastung haben kann. Auch die Art des Substrates selbst kann für einige Sequenzen die auf den Produktionsstamm wirkende Belastung reduzieren, ohne jedoch die Proteinproduktion selbst zu verändern.

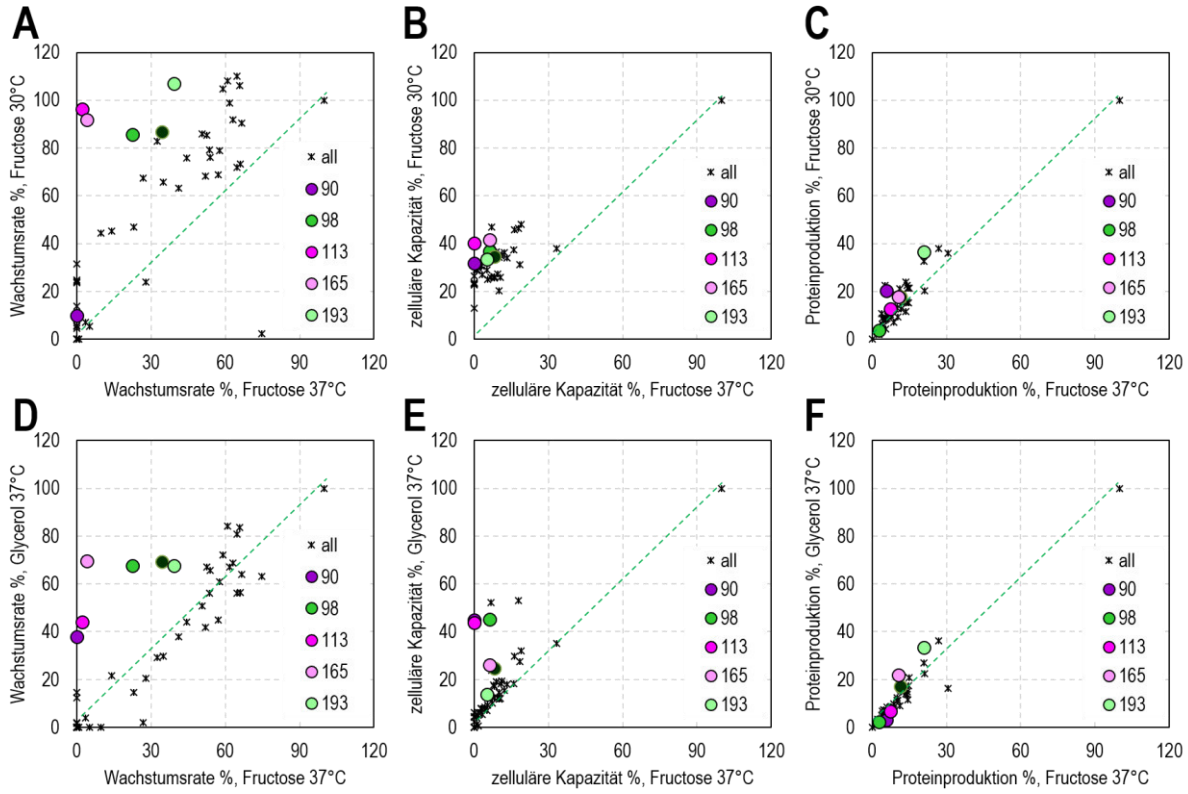


Abbildung 4.36 Die Leistungsfähigkeit der Stämme, die mit Plasmiden aus der Zufallspeptid-Tag-Bibliothek belastet wurden, wurde auf die jeweiligen Raten des Wildtypstammes normiert. Die analysierten Kriterien Wachstumsrate (A und D), zelluläre Kapazität (B und E) und Proteinexpressionsrate (C und F) wurde für die Temperaturen 30 °C und 37 °C (A-C) und für die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen Fructose und Glycerin (D-F) verglichen. Einige Stämme (90, 98, 113, 165, 193) wurden beispielhaft hervorgehoben.

4.5.4 dFlowSeq zur Generierung Zeit-aufgelöster Produktions und Wachstumsdaten

Da gerade bei komplexen Zusammenhängen mit vielen Einflussparametern, wie in Kapitel 4.5.3 gezeigt, eine Betrachtung einer großen Anzahl an Individuen erforderlich ist, wurde das Verfahren dFlowSeq (Dynamische Durchflusszytometrische Sequenzierung) entworfen. Diese Methode soll die Analyse der drei Parameter Proteinproduktion, zelluläre Kapazität und Wachstumsrate im Hochdurchsatz ermöglichen. Hierfür wurde als Ausgangspunkt die von der Gruppe um George Church entwickelte Hochdurchsatzmethode FlowSeq (siehe Kapite 2.5) weiterentwickelt. Da die bereits etablierte Methode zwar Rückschlüsse auf das Verhalten der Konstrukte hinsichtlich der Expressionsstärke zulässt, jedoch die zeitliche Komponente nicht berücksichtigt wird, können keine Aussagen, über die Expressionsraten getroffen werden. Ein heterologes Konstrukt in einem schnell wachsenden Stamm, kann daher trotz höherer Expressionsleistung im Vergleich zu einem langsam wachsenden Stamm mit niedriger Expression auf Grund des größeren Verdünnungsterms schlechter abschneiden. Um diese zeitliche Auflösung zu erhalten, war es das Ziel die Methode FlowSeq dynamisch zu gestalten.

Hierfür wurde zunächst die Sortiergenauigkeit des Sorters, sowie die Überlebensrate der sortierten Zellen überprüft. Um die Qualität des Sortierprozesses zu bewerten, wurde 6 h nach der Induktion eine Mischkultur aus 2 Stämmen mit einem BioRad S3 Cell-Sorter analysiert. Einer der Stämme war der stark exprimierende Stamm 288 ‚mm', der neben dem genomisch integrierten, grün fluoreszierenden Kapazitätsmonitor das minimal belastende Plasmid aus Kapitel 4.5.2 trug. Als zweiter Stamm wurde ein DH10B Wildtypstamm mit dem randomisierten ‚66'-Plasmid zugemischt. Dieser exprimiert das ‚66'-mCherry-Fusionsprotein aufgrund einer hohen Belastung lediglich basal (Daten siehe Abbildung 4.33). Beide Stämme der Mischkultur im 50 mL-Maßstab konnten bei der Analyse im Cell-Sorter als deutlich trennbare Einzelpeaks im roten Kanal (FL3) identifiziert werden (Abbildung 4.37-A).

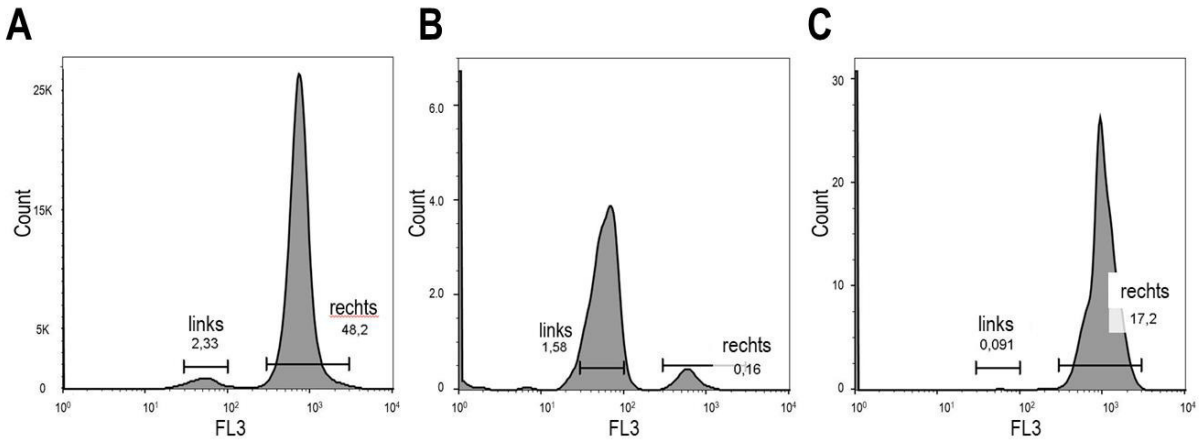


Abbildung 4.37 Eine Mischkultur aus den Stämmen 288 ‚mm' und DH10B ‚66' konnte im Cell-Sorter aufgrund ihrer roten Fluoreszenz analysiert werden. (A) Im Histogramm des roten Fluoreszenzkanals FL3 konnten die Subpopulationen DH10B ‚66' mit einer geringen mCherry-Bildungsrate deutlich von der Population 288 ‚mm' mit einer deutlich höheren mCherry Bildungsrate visuell getrennt werden. Nach dem Sortierprozess in die Kategorien geringe Fluoreszenzintensität (30-100) nach links oder (C) hohe Fluoreszenzintensität (300-3000) nach rechts konnten für beide Populationen der Hauptanteil der tatsächlich sortierten Zellen als Zielzellen aus (A) identifiziert werden. Die nach links sortierten Zellen DH10B ‚66' (B, links), aber auch die nach rechts sortierten 288 ‚mm' Zellen (C, rechts) stellten in einer erneuten Populationsmessung über 90 % der entsprechenden Fraktion.

Die Mischkultur wurde in zwei Fraktionen eingeteilt, wobei Zellen mit einer Fluoreszenzintensitäten im Bereich 30 bis 100 in ein Gefäß links und im Bereich von 300 bis 3000 in ein Gefäß nach rechts sortiert wurden. Das schon in Abbildung 4.33 gezeigte, schlechte Wachstum des Stammes DH10B ‚66' zeigte sich auch in den lediglich 2.33 % der im linken Peak enthaltenen Zellfraktion im Vergleich zu den 48.2 % gezählten Zellen des dominierenden Stammes im rechten Fenster (Abbildung 4.37-A). In einer zweiten Runde wurden die sortierten Fraktionen nochmals vermessen. Wie in Abbildung 4.37-B gezeigt konnten nach einem Sortierprozess ins linke Gate 90.8 % der sortierten Zellen als Zielpopulation DH10B ‚66' identifiziert werden. Die nach rechts sortierten Zellen zeigten sich sogar zu 99.47 % als Zielzellen 288 ‚mm' (Abbildung 4.37-C). Zusätzlich konnte die Identität der Zellen, wie in Anhang A.3.12-A gezeigt, über eine visuelle Trennung im Cell-Sorter mittels des genomisch integrierten sfGFP in den Stamm 288 ‚mm' verifiziert werden.

Werden Zellen nach dem Sortierprozess für eine Sequenzanalyse pelletiert, verbleibt die DNA fragmentierter Zellen potenziell im Überstand und wird nicht erfasst. Daher ist zu überprüfen, ob ein außreichend großer Teil der Zellen den Sortierprozess als Ganzes übersteht. Aus diesem Grund wurde die Überlebensrate der sortierten Zellen in vier unabhängigen Sortierprozessen bestimmt. Hierfür wurden die sortierten Zellen auf eine theoretische Countanzahl von 100 Zellen pro 100 µL verdünnt und auf selektive LB-Agar-Platten (34 µg µL^{-1} Chloramphenicol) plattiert. Der Anteil an koloniebildenden Zellen betrug lediglich 44 ± 12 %. Um eine adequate Abdeckung der zu analysierenden Konstrukte zu gewährleitsten sollte eine möglichst große Zahl an Zellen sortiert werden. Eine Abdeckung der gesamten Bibliothek ist in diesem Versuchssetup aufgrund der hohen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten nicht möglich.

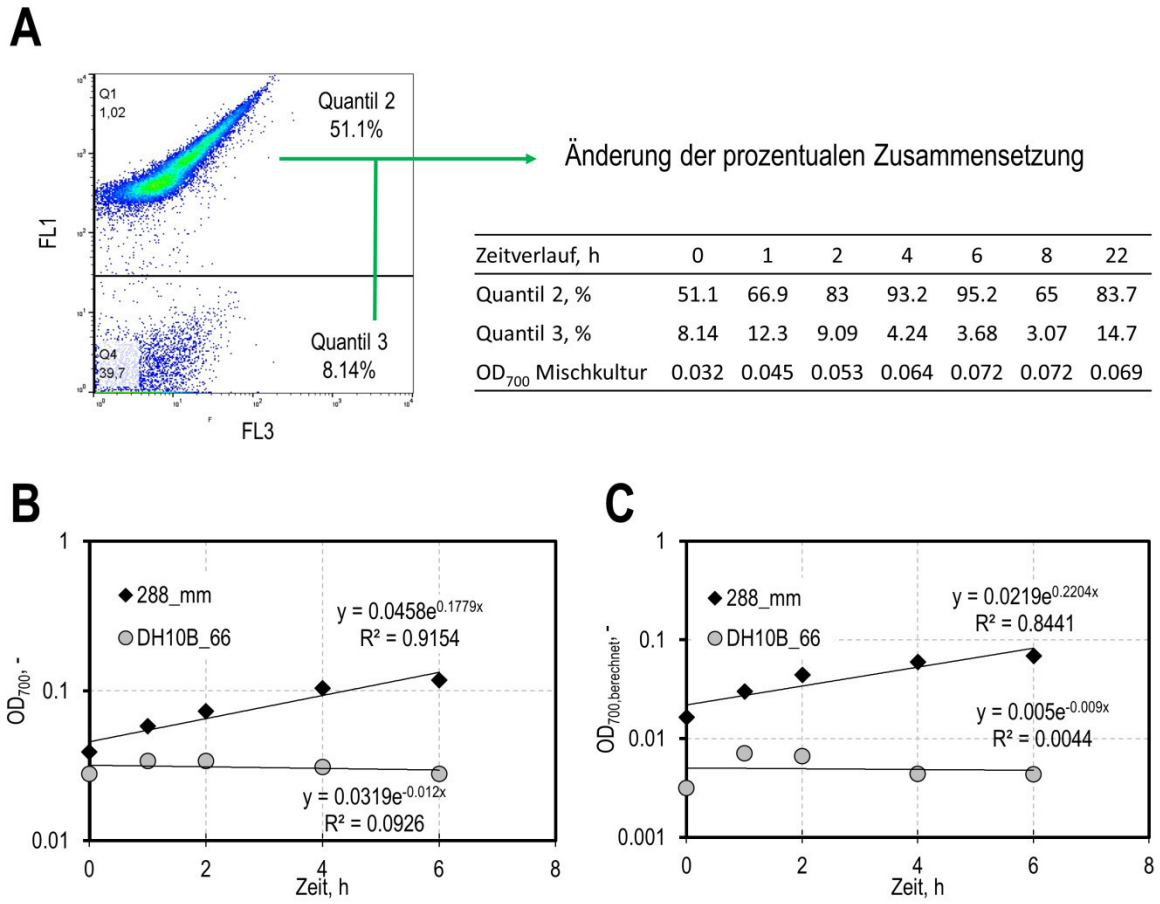
Um Rückschlüsse auf die Wachstums- und Expressionsraten ziehen zu können, wurden Sequenzierungen ausgehend von den aus der sortierten Fraktion extrahierten Plasmiden durchgeführt. Es wurde die Annahme getroffen, dass die Anzahl an Reads[38], Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Population erlaubt. Der zeitaufgelöste dFlowSeq-Ansatz geht also davon aus, dass die Sequenzierung der extrahierten Plasmid-DNA den Anteil der Zellen an der Gesamtpopulation und somit über die Zeit die Wachstumsrate repräsentiert. Daher wurde - anstelle der Gesamtbibliothek - die bereits gezeigte Mischkultur repräsentativ daraufhin überprüft, ob sich das schnelle Wachstum des Stammes 288 ‚mm' in einer Akkumulation der Sequenz widerspiegelt. Hierfür wurden für jeden analysierten Zeitpunkt jeweils 500 µL der Mischkultur pelletiert, eine Kolonie-PCR durchgeführt und das Vorkommen der Sequenz über die Reinheit[39] des Sequenziersignales bewertet. Wie in Anhang A.3.12-D gezeigt, konnte über die Zeit ein immer deutlicher werdendes Sequenzsignal des schnell wachsenden Stammes 288 ‚mm' erfasst werden. Die Plasmidpräsenz lässt also Rückschlüsse auf die Wachstumsrate zu und spiegelt sich im Sequenzierergebnis wider. Als *proof-of-concept* wurde die Entwicklung des prozentualen Anteils zweier Stämme in der Mischkultur über die Zeit verfolgt. In einem tatsächlichen dFlowSeq-Prozess würde eine quantitativen Sequenzanalyse und - daraus resultierend - eine prozentuale Verteilung der Stämme erhalten werden. Hier wurde der Anteil der Stämme an der Mischkultur wie in Anhang A.3.12 über den grünen Fluoreszenzkanal (FL1) des Cell-Sorters getroffen. Die Zellen des Stammes 288 ‚mm' finden sich aufgrund der grünen Fluoreszenz in Quantil 2, die Zellen des Stammes DH10B ‚66' in Quantil 3 wieder. Wie in Abbildung 4.38-A gezeigt, konnte die Gesamt-OD ($OD_{700,h,total}$) zum Zeitpunkt h der Mischkultur

[38] Ein Read entspricht einem einzelnen, durchgängig-sequenzierten DNA-Abschnitt
[39] Die bei einer Sequenzierung auftretenden Basensignale können durch andere Sequenzen kontaminiert sein. Ergebnis ist ein Rauschen, das mit zunehmender Reinheit einer Sequenz kleiner wird.

prozentual nach dem jeweiligen Anteil der Zellen ($\#cells_{h,k}$) des Stammes k an der Gesamtheit der gezählten Partikeln ($\#cells_{h,total}$) aufgeteilt werden (Gleichung 4.2).

$$OD_{700,h,total} \cdot \frac{\#cells_{h,k}}{\#cells_{h,total}} = OD_{700,h,k} \quad 4.2$$

Das resultierende Wachstum aus den Einzelkultivierungen (Abbildung 4.38-B) der Stämme 288 ‚mm' und DH10B ‚66' wurde mit den jeweiligen prozentual ermittelten Werten $OD_{700,h,k}$ aus der Mischkultur (Abbildung 4.38-C) verglichen. Für den Stamm 288 ‚mm' konnten sehr ähnliche Wachstumsraten in der Einzelkultivierung (0.18 h^{-1}, Abbildung 4.38-B) sowie in der Mischkultur (0.22 h^{-1}, Abbildung 4.38-C) berechnet werden. Der Stamm DH10B ‚66' zeigte in beiden Kultivierungen kein Wachstum. Ob über die Berechnung mittels der Sequenzanteile in der dFlowSeq Methode ein größerer systematischer Fehler entsteht, bleibt zu überprüfen. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass zumindest die Größenordnung der Wachstumsrate, wie in diesem Pilotexperiment gezeigt, aus einer Mischkultur abgeschätzt werden kann.



Zeitverlauf, h	0	1	2	4	6	8	22
Quantil 2, %	51.1	66.9	83	93.2	95.2	65	83.7
Quantil 3, %	8.14	12.3	9.09	4.24	3.68	3.07	14.7
OD_{700} Mischkultur	0.032	0.045	0.053	0.064	0.072	0.072	0.069

Abbildung 4.38 Gemessen wurde die Zellzahlen pro Quantil im Cell-Sorter. (A) Die gemessenen OD der Mischkultur wurde nach dem prozentualen Anteil der Stämme in der Kultur aufgeteilt. In diesem Beispiel handelt es sich um eine Mischkultur aus dem Stamm 288 ‚mm' mit genomintegrierter, grüner Fluoreszenz (Quantil 2) und dem Stamm DH10B ‚66' ohne grüne Fluoreszenz (Quantil 3). Die jeweiligen Wachstumsraten, welche in einer Einzelkultivierung der jeweiligen Stämme (B) verifiziert wurden, wurden aus der Entwicklung dieser prozentualen Werte über die Zeit rekonstruieren (C).

Um Rückschlüsse auf die Expessionsraten ziehen zu können, wurde die Bewegung der Stämme durch das Fluoreszenzhistogrammes der Mischkultur über die Zeit verfolgt. Die Analyse erfolgte nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h. Da keine Sequenzierung durchgeführt wurde, lag auch hier keine

Information über die Anzahl der randomisierten Sequenzen in der Kultur vor. Die Verteilung der jeweiligen Konstrukte wurden daher ebenfalls ersatzweise mittels der genomisch-integrierten, grünen Fluoreszenz verfolgt. Beide Stämme in der Mischkultur stellen heterolog das Protein mCherry her. Die Variante ‚66' enthält zusätzlich einen Zufallspeptid-Tag anstelle eines initialen Glycins, wie der ‚mm' Stamm. Um die heterologe Expression in der Mischkultur für beide Stämme gleichzeitig zu quantifizieren, wurde mittels des Histogrammes nach der Intensität der roten Fluoreszenz[40] in i Klassen $FL3_i$ sortiert (Beispiel: $FL3_1$= 5 I Zelle^{-1}, $FL3_2$=50 I Zelle^{-1}, $FL3_3$=500 I Zelle^{-1} und $FL3_4$=5000 I Zelle^{-1}; Abbildung 4.39-A, Mitte). Um die Gesamtfluoreszenzintensität des jeweiligen Stammes k zu erhalten, wurden alle Zellen $\#cells_{k,i,h}$ einer Fraktion i zum Zeitpunkt h mit der mittleren Fluoreszenz der entsprechenden Intensitätsklasse $FL3_i$ gewichtet (Abbildung 4.39-A). Um die Gesamtfluoreszenzintensität der Mischkultur $sumFL3_h$ zum Zeitpunkt h zu erhalten, wurden die Fluoreszenzintensitäten alle Stämme k zum Zeitpunkt h summiert (siehe Gleichung 4.3).

$$\sum_1^k \sum_{i=1}^4 \#cells_{k,i,h} \cdot FL3_i = sumFL3_h \qquad 4.3$$

Dies bedeutet für den Messzeitpunkt 0 h, dass die 10 437 Zellen des Stammes 288 ‚mm' ($\#cells_{288_{mm},1,0h}$) in $FL3_1$ einen mittleren Anteil zur Gesamtfluoreszenzintensität von 52 185 I leisten, in $FL3_2$ leuchten die Zellen zusammen 326 450 I und so weiter. Betrachtet man die Fluoreszenzintensität nicht für die gesamte Mischkultur, sondern nur für den Stamm k zum Zeitpunkt h, so kann der prozentuale Beitrag $FL3_{h;k}$ an der Gesamtfluoreszenzintensität $sumFL3_h$ berechnet werden (Gleichung 4.4).

$$\frac{\sum_{i=1}^4 \#cells_{k,i,h} \cdot FL3_i}{sumFL3_h} = FL3_{h;k} \qquad 4.4$$

Liefert der Stamm 288 ‚mm' also zu Zeitpunkt 0 h in Summe der Kategorien $FL3_1$ bis $FL3_4$ einen Anteil an der gemittelten Gesamtfluoreszenz von 96.4 % und der Stamm DH10B ‚66' 3.6 %, dann kann der Beitrag beider Kulturen zur gemessene Gesamtfluoreszenz $F_{total,h}$ der Mischkultur von 336 A.U. - wie in Gleichung 4.5 gezeigt - aufschlüsselt werden. Der Stamm 288-mm besaß zum Zeitpunkt 0 h also eine Fluoreszenz $F_{0h,288_mm}$ von 324 A.U..

$$F_{total,h} \cdot FL3_{h,k} = F_{h,k} \qquad 4.5$$

Diese Berechnung wurde für jeden Stamm zu den Zeitpunkten 0 bis 4 h durchgeführt. Die Entwicklung des Signals pro OD aus der Einzelkultivierung (Abbildung 4.39-B) konnte auf diese Weise mit der dFlowSeq berechneten Fluoreszenz pro OD aus der Mischkultur (Abbildung 4.39-C) verglichen werden. Für den besser exprimierenden Stamm 288 ‚mm' wurde auf diese Weise eine Steigung von 152 151 A.U. OD^{-1} bestimmt. Vergleicht man dies mit der in der Einzelkultur gemessenen Steigung von 154 822 A.U. OD^{-1} kommt die Abschätzung der Fluoreszenzbildungsraten in der Mischkultur über die dFlowSeq Methode den tatsächlich gemessenen Dynamiken sehr nahe. Auch die Fluoreszenzbildung des Stammes DH10B ‚66' befand sich in der richtigen Größenordnung. Ob die insgesamt verringerte Fluoreszenz auf eine Ungenauigkeit der Methode zurückzuführen ist, oder ob die Stämme in der Mischkultur einen Nachteil gegenüber der Einzelkultivierung haben bleibt zu klären. Generell gilt, dass diese Methode an Genauigkeit gewinnt, in je mehr Fluoreszenz-Klassen die Kultur aufgeteilt werden kann und je mehr Zeitpunkte analysiert werden. Es ist jedoch zu beachten, dass sogenannte

[40] Hier muss unterschieden werden zwischen der Fluoreszenzintensität des Stammes k zum Zeitpunkt h $FL3_{h;k}$ (Einheit: I), die im Cell-Sorter ermittelt wurde und der absoluten Fluoreszenz $F_{h;k}$ (Einheit: A.U.) aus dem Tecan Plattenlesegerät.

escape-Mutanten, die in diesem Setup nach bereits 4 h einen Anteil von bis zu 6.8 % der Zellen ausmachten, die Bestimmung der Raten stark beeinflussen können.

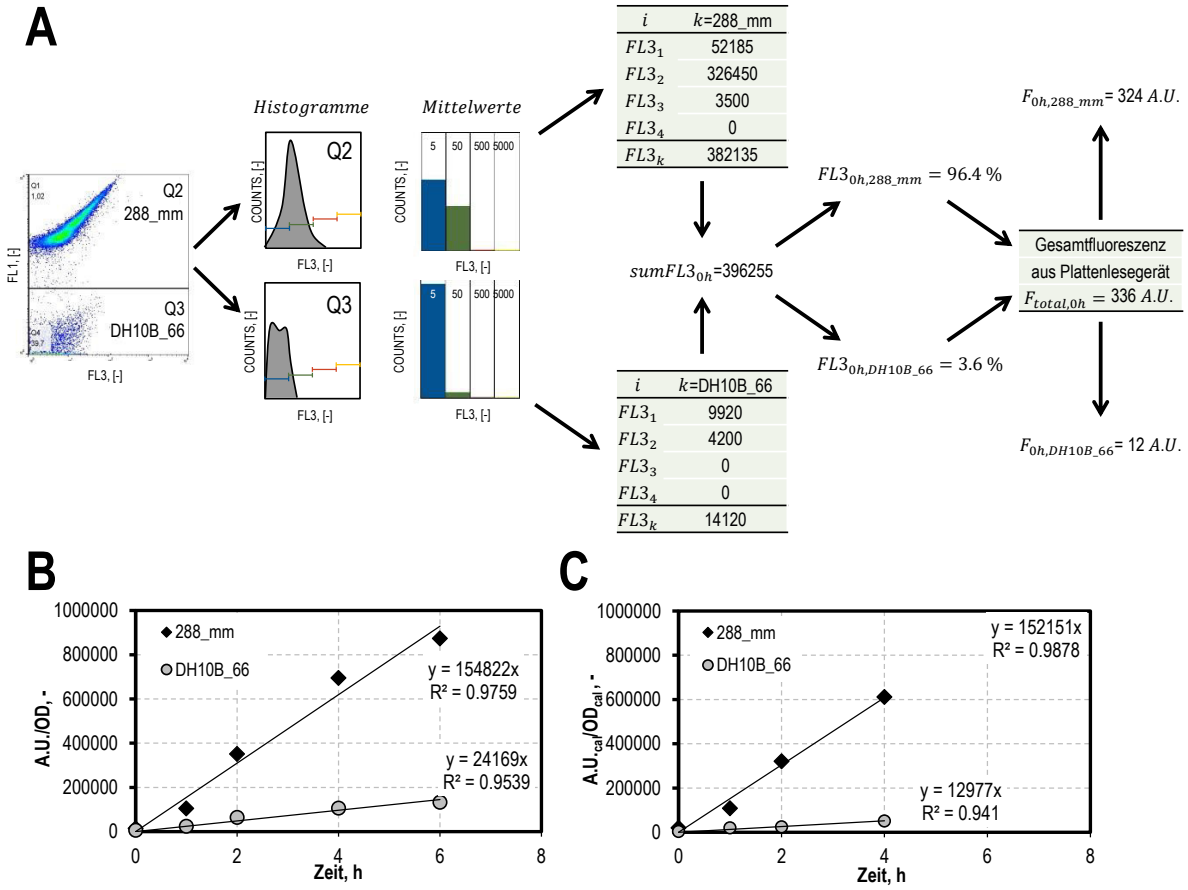


Abbildung 4.39 Mittels der dFlowSeq-Methode wurden Fluoreszenzbildungsraten für die Stämme in einer Mischkultur im 50 mL-Maßstab bestimmt. Als proof-of-concept wurden die unterschiedlich exprimierenden Stämme 288 ‚mm' sowie DH10B ‚66' im 50 mL-Maßstab kultiviert. (A) Zu jedem analysierten Zeitpunkt wurden die Zellen basierend auf den Histogrammen in Fluoreszenzintensitäten (Cell-Sorter spezifische Werte) der Kategorien 1 bis 4 eingeteilt. Jede Zelle, die einer Kategorie zugeordnet wurde, konnte auf diese Weise mit einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität gewichtet werden. Die im Plattenlesegerät gemessene Gesamtfluoreszenz der Mischkultur konnte über die prozentualen Anteile auf die jeweiligen Stämme verteilt werden. Die in Einzelkultivierungen ermittelten Zunahmen der Fluoreszenz pro OD über die Zeit (B) können so auch aus der Mischkultur gewonnen werden (C).

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Quantifizierung der heterologen Expression

Zur Erfassung und Quantifizierung heterologer Expression wurde in dieser Arbeit das pSEVA-basierte, BioBrick-kompatible Plasmid pTRA erstellt. Dieses Plasmid erlaubt eine *on-line* Erhebung der Transkriptions und Translationsdynamiken in einer sehr hohen Zeitauflösung. Die Bereinigung des grün-fluoreszierenden mRNA-Signales aus einer Reihe von variablen, zelleigenen Autofluoreszenzsignalen konnte mittels einer MATLAB-basierten Methode etabliert werden. Neben der *on-line* Signalerfassung der Translationsdynamik, wurde eine Quantifizierung der Menge an heterologem Protein über einen immunologischen Nachweis durchgeführt. Desweiteren wurde die Reifungszeit des verwendeten mCherry-Proteins auf 23.2 Minuten bestimmt.

In theoretischen und experimentellen Betrachtungen wurde beobachtet, dass sich im Fall langer Halbwertszeiten über einen Zeitraum von bis zu 7.5 h weder ein Gleichgewicht auf Transkriptionsebene noch auf Translationsebene der heterologen Expression einstellt. Außerdem wurde berechnet, dass sich bei quasi keinem Abbau und einer Wachstumsrate von 0.3 h^{-1} das Endprodukt von Interesse erst nach 2.3 h am Halbmaximalengleichgewicht $t_{1/2}$ befindet. Beim Vergleich der Signalbildung auf mRNA und Proteinebene wurde eine erhöhte Varianz auf Seiten der Proteinproduktion, einhergehend mit Schwankungen in der Wachstumsrate, festgestellt. Die Messungen legen nahe, dass Schwankungen in der Expression auf Proteinebene hervorgerufen werden. Die hetrologe Expression konkurriert also mit dem Wachstum vor allem um die Ressource Ribosomen, Energie und/oder Aminosäuren. Es wurde gezeigt, dass sich die entstehenden Schwankungen bereits in der Vorkultur etablieren. Außerdem konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Varianzen in einer Heterogenität begründet liegen. Abweichungen scheinen die Gesamtpopulation zu betreffen, da ausschließlich unimodale Verteilungen der exprimierenden Zellen im Flusszytometer gefunden werden konnten.

Für das Konstukt pTRA-51hd wurde nach der Induktion eine mCherry-Produktionsrate k_{P+} von bis zu 1.2 $ng_{Protein}\ \mu g_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$ gemessen. Durch die Zugabe von Nährstoffen konnte das durchschnittliche mRNA-Signal zwar erhöht werden, die korrespondierende Proteinproduktionsrate jedoch nicht. Dies deutet darauf hin, dass die RNA-Produktion energetisch aufwändiger ist und die zusätzliche Energie von der Zelle primär dazu genutzt wird, um ihre Expressionsmaschinerie zu erweitern. Dies äußerte sich in einem leichten Zugewinn im Wachstum. Mit steigender Proteinproduktion konnte unabhängig vom Konstrukt eine Abnahme im Wachstum beobachtet werden. Berechnet man anhand der in der Literatur veröffentlichten Werte eine theoretische Proteinbildungsrate, dann können in diesem Setup Raten von bis zu 1.5 $ng_{Protein}\ \mu g_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$ erreicht werden. Die limitierte Verfügbarkeit des XylS-Proteins im XylS/Pm Promotorsystem kann eine Erklärung dafür liefern, dass durch unterschiedliche Setups nur ein geringer Einfluss erreicht werden konnte. Dies kann außerdem eine Rolle bei der großen Varianz in der Expression spielen.

Generell konnten mit zunehmender Transkriptions- und Translationsaktivität eine Zunahme in der Standardabweichung festgestellt werden. Diese fand sich jedoch nicht zwangsläufig auf der jeweils anderen Ebene wieder. Um ein stabiles Expressionssystem zu erhalten empfiehlt sich demnach eine Induktor-RBS-Rückgrat-Kombination, die möglichst geringe Schwankungen verursacht. Diese Kombination kann aber bisher nicht vorhergesagt werden und muss empirisch ermittelt werden.

5.2 Erfassung der zellulären Kapazität

Um die zelluläre Kapazität in ihrer Gesamtheit zu erfassen, wurde ein plasmidbasiertes Konstrukt - bestehend aus einem konstitutiven Promotor und einem Fluoreszenzreporter - designed. Als geeignete konstitutive Promotoren wurden die vier Kandidaten *gyrBp*, *helDp*, *lacIp* und *proCp* identifiziert und charakterisiert. Sie weisen eine uniforme, unregulierte Expression auf, ohne dabei durch das Wachstum oder die Messumgebung beeinflusst zu sein. Der Promotor *lacIp* mit seinem stabilen Expressionsverhalten und guter Signalstärke konnte als geeingnetster Reporter für die Analyse zellulärer Kapazität bestimmt werden. Die über den Reporter (pSEVA237R-32) abgebildete zelluläre Kapazität wurde in nahezu allen Versuchen in durch die Zugabe des Induktors um rund 20 % reduziert. Die Anwesenheit des uninduzierten Plasmides pTRA-51hd verursachte ebenfalls eine Abnahme in der Kapazitätsmonitorexpression um circa 50 %, im induzierten Fall sogar bis zu 100 %. Betrachtet wurde als weiteres Maß für die Kapazität auch das Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. In Anwesenheit des Plasmides pTRA-51hd wurden für energetisch ungünstige Kohlenstoffquellen Wachstumseinbußen von bis zu 40 % gemessen. Bei der Verwendung der hochwertigen Kohlenstoffquelle Glucose beschränkte sich diese Reduktion der Wachstumsrate auf lediglich 20 %. Die Verwendung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen, ebenso wie die Anwesenheit des Reporterplasmides, zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinbildungsrate. Bei den verwendeten Konstrukten konnte beobachtet werden, dass eine Änderung in der heterologen Belastung sich zunächst im Wachstum bemerkbar macht und dann im Kapazitätsmonitor.

5.3 Quantifizierung zellulärer Ressourcen

Die Produktion zellulärer Ressourcen ist wachstumsabhängig. Da heterolog exprimierende Stämme zusätzliche Ressourcen belegen, wurde untersucht, welchen Effekt dies auf die Verfügbarkeit der wichtigsten Ressourcen RNA-Polymerase und Ribosomen hat. Zur Analyse der RNA-Polymeraseverfügbarkeit wurde mittels des Promotors *rplKp* und eGFP ein Reporterkonstukt erstellt. Dieses generiert ein *on-line* verfolgbares Fluoreszenzsignal, welches die Bildung der RNA-Polymerase repräsentiert. In Anwesenheit des uninduzierten pTRA-51hd Plasmides wurde eine erhöhte Aktivität dieses *rplKp*-kontrollierten Transkriptes beobachtet. Mit einem Anstieg der Belastung durch die Induktion konnte nur noch für hochwertige Kohlenstoffquellen eine Erhöhung der *rplKp* kontrollierten Expression gemessen werden. Desweiteren wurde das Protein RpoC als Maß für die RNA-Polymeraseverfügbarkeit immunologisch quantifiziert. Auch hier konnte gezeigt werden, dass im Falle belasteter Stämme ein Trend zu mehr RNA-Polymerasen beobachtet werden konnte. Außerdem wurde gezeigt, dass während der exponentiellen Phase nach 6.5 h im Schnitt mehr Polymerasen als nach 3.5 h detektiert werden konnten, die Zelle sich also hinsichtlich der Anzahl an Polymerasen in keinem Gleichgewichtszustand befand.

Um die Verfügbarkeit der Ribosomen bei unterschiedlichen Belastungszuständen evaluierbar zu machen, wurde ein Konstrukt aus dem Promotor *rpsBp* und dem Fluoreszenzprotein eGFP erstellt. Die analysierte *rpsBp*-Promotoraktiviät zeigt, dass die Qualität der Zuckerquelle insbesondere bei hoher Belastung eine Rolle spielt. Bei der Betrachtung der absoluten Raten konnte eine deutliche Abhängigkeit der Ribosomenbildung von der Wachstumsrate festgestellt werden. Anders als bei der RNA-Polymerase, konnte lediglich für moderat belastete Stämme ein Zugewinn an *rpsBp*-Promotoraktiviät gezeigt werden. Für stark belastete Stämme führte die verringerte Wachstumsrate zu einem Einbruch in der Ribosomenbereitstellung. Zusätzlich wurde die Menge des ribosomalen Proteins RpsB - repräsentativ für die Anzahl der in der Zelle

vorliegenden Ribosomen - via Immunodetektion quantifiziert. Die densitometrisch ausgewertete Anzahl an Ribosomen blieb, anders als bei der Ressource RNA-Polymerase, während der exponentiellen Phase konstant. Neben höherer Absolutzahlen an Ribosomen im Falle energetisch schlechterer Kohlenstoffquellen, konnte für hochwertigere Zucker eine erhöhte Anzahl an Ribosomen im belasteten Fall gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass für eine optimale Balance zwischen Produktion und Ressourcenverfügbarkeit eine schnelle, aber nicht maximale Wachstumsrate von der Zelle bevorzugt wird.

Um die Auswirkung einer Limitation auf Transkriptions bzw Translationsebene zu untersuchen, wurden die Ressourcen Ribosomen und RNA-Polymerase mittels Inhibitoren der Zelle entzogen. Sowohl die Zugabe des Transkriptionsinhibitors Thiolutin als auch des Translationsinhibitors Chloramphenicol führten zu einem sofortigen Wachstumsabbruch. Die Transkriptionsblockade konnte ebenfalls demonstrieren, dass das heterologe mRNA-Signal einem deutlich langsameren Abbau unterworfen ist als die native mRNA. Durch das Wegfallen der nativen mRNA wurde ein deutlicher Anstieg in der heterologen Translationsaktivität beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Proteinherstellung bei einem Mangel an RNA-Polymerasen zu Gunsten von Genprodukten mit stabilerer RNA verschiebt. Die Inhibierung der Ribosomen führte neben einem Arrest im Wachstum, zu einer Stabilisierung des mRNA-Signales. Außerdem scheint die Zelle die inhibierten Ribosomen proportional zum Wachstumseinbruch nachzuproduzieren. Insgesamt wurde die in dieser Arbeit gezeigte, nicht-native Proteinexpression mit einer höheren Priorität und zu Lasten der wachstumsassoziierten Prozesse durchgeführt.

Um verschiedene Ressourcenverfügbarkeiten in einer Zelle zu simulieren, wurden Konzentrationen von bis zu 20 $\mu g\,mL^{-1}$ Thiolutin zugegeben. Zwischen der Abnahme im Wachstum und der Zunahme in der heterologen Proteinherstellung konnte ein inverser Zusammenhang gefunden werden. Eine Inhibitormenge ab 10 $\mu g\,mL^{-1}$ (52760 Moleküle) bewirkte eine Blockade der Translationstätigkeit. Theoretischen Annahmen zufolge konnten bei einer Ressourcenumverteilung, welche im Mittel zu einer 120 %-igen Erhöhung der heterologen Expression führte, im Maximalfall alle 25 Sekunden 376 heterologe Proteine durch 376 Ribosomen gleichzeitig prozessiert werden. Anhand dieser Zahlen kann bei einer genaueren Kenntnis der Affinitäten und Ribosomenbesatzdichte die Anzahl der verfügbaren Ribosomen abgeschätzt werden. Außerdem konnte eine stark schwankende RNA-Polymeraseverfügbarkeit bei biologischen Replikaten gezeigt werden.

5.4 Quantifizierung der metabolischen Aktivität

Ab einer kritischen Wachstumsrate führt die Produktion fermentativer Nebenprodukte, welche zusätzlich zur Zellatmung Energie bereitstellen kann, zu einer Reduktion der Biomasseausbeute. Aufgrund des Verlaufes der Biomasseausbeutelinie wurde geschlossen, dass es gerade bei niedrigen Wachstumsraten unter 0.2 h^{-1} zu sehr starken Änderungen in der Ausbeute kommen muss. Die exakten Verläufe der Acetatlinien, die ab einer kritischen Wachstumsrate auftreten, konnten für die untersuchten Stämme nicht bestimmt werden. Jedoch wurde eine deutliche Abnahme der kritischen Wachstumsrate für den Reporterstamm im Gegensatz zum Wildtyp von 0.35 h^{-1} auf circa 0.3 h^{-1} gemessen. Neben der Bildung von Acetat konnte auch noch für eine Reihe von Metaboliten aus der gemischten Säuregärung (Ethanol, Formiat, Lactat) sowie für 9 weitere in den Aminosäuremetabolismus involvierte Produkte (Propionat, N-Acetylaspartat, N-Carbamoylaspartat, Glutamat, Orotat, Putrescin, Dihydroorotat und zwei weitere Produkte) eine wachstumsabhängige Bildungsrate im Exometabolom identifiziert werden. Diese treten schon deutlich unterhalb der kritischen Wachstumsraten für Acetat durch einen Rückstau im

Zitronensäurezyklus auf. Die Metabolite stellen daher eine mögliche Ursache für die starken Änderungen in der Biomasseausbeute bei niedrigen Wachstumsraten dar. Da die Kohlenstoffbilanz zu maximal 68 % geschlossen werden konnte, ist davon auszugehen, dass der fehlende Anteil großteils zu CO_2 verstoffwechselt wurde. Für den uninduzierten Wildtypstamm konnten 49 % der Kohlenstoffatome in der Biomasse wiedergefunden werden, für den induzierten pTRA-51hd beladenen Stamm lediglich 31 %. Die mit steigender Wachstumsrate benötigte Energie scheint durch die Nebenproduktbildung in der gemischten Säuregärung gewonnen zu werden. Bei einer heterologen Belastung wurde eine nicht wachstumsabhängige, signifikante Zunahme der Nebenprodukte, die für den Aminosäurestoffwechsel relevant sind, beobachtet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass im Fall der belasteten Stämme der durch aerobe Zellatmung erzeugte Anteil an Energie mit steigender Wachstumsrate abnimmt, jedoch das zelluläre Produktionsvermögen zunimmt. Für die in dieser Arbeit analysierten Zelldichten konnte keine Sauerstofflimitation im Schüttelkolben festgestellt werden. Weder im belasteten noch im unbelasteten Fall traten signifikante, metabolische Änderungen durch den Einsatz unterschiedlicher Kultivierungssysteme (bioREACTOR48, 1.5L-Bioreaktor und Schüttelkolben) auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wachstumsrate abhängig von den Anforderungen des Produktionsprozesses gestaltet werden sollte. Um einen vollständigen Substratumsatz und hohe Produktausbeuten zu erreichen, sollte mit niedrigen Wachstumsraten kultiviert werden. Für hohe Raum-Zeit-Ausbeuten sind große Wachstumsraten von Vorteil.

Um die metabolische Aktivität unterschiedlich belasteter Stämme bei verschiedenen Prozessführungsstrategien und Wachstumsraten zu vergleichen, wurde für den Schüttelkolbenmaßstab eine LEGO-basierte Spritzenpumpe zur Realisierung eines substratlimitierten Zulaufprofiles konstruiert. Sowohl für den belasteten als auch für den unbelasteten Stamm konnten - anders als beim Satzverfahren mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen zur Realisierung verschiedener Wachstumsraten - ein stammspezifisches und lineares Verhalten der Biomasseausbeute über den gesamten untersuchten Wachstumsbereich festgestellt werden. Für den heterolog-belasteten Stamm konnte gezeigt werden, dass 25 % der aufgenommen Kohlenstoffquelle zum Erhalt des Plasmides pTRA-51hd aufgebracht werden musste. Da im Zulaufverfahren eine gleichzeitige Verstoffwechselung der fermentativ gebildeten Nebenprodukte stattfand, konnten insbesondere belastete Zellen im Zulaufverfahren höhere Kohlenstoffausbeuten erreichen.

5.5 Systematische Analyse der Proteinzusammensetzung

Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäurezusamensetzung der Proteine nativer Stoffwechselwege im Schnitt, anders als zum Beispiel das Fluoreszenzprotein eGFP, mit der Aminosäureverfügbarkeit in *E. coli* korreliert. Um den Einfluss der Aminosäurezusammensetzung auf die zelluläre Kapazität zu untersuchen, wurde eine Plasmidbibliothek erstellt. Diese Bibliothek exprimierte ein Konstrukt, welches aus einem Zufallspeptid mit 100 Aminosäuren und dem Fluoreszenzprotein mCherry bestand. In einem manuellen Screen wurden 56 verschiedene Zufallspeptide gefunden und hinsichtlich Expressionsstärke, Einfluss auf die Kapazität und Wachstumsrate bei unterschiedlichen Prozessparametern charakterisiert. Weder die relevanten Größen tRNA-Verfügbarkeit, Aminosäurevorkommen oder Herstellungskosten für ATP, noch die Eigenschaften der verwendeten Aminosäuren (polar/unpolar, sauer/basisch) zeigten einen eindeutigen Zusammenhang mit der vom jeweiligen Konstrukt ausgehenden Belastung und Expressionsleistung. Hinsichtlich der zellulären Fitness (Kapazität und Wachstum) konnte für alle Konstrukte ein positiver Effekt bei der Kultivierung auf 30 °C gegenüber einer Temperatur von 37 °C gezeigt werden. Die Art der Kohlenstoffquelle nahm lediglich auf die Kapazität und

Wachstumsrate einzelner Konstrukte Einfluss. Die heterologe Expression blieb für die getesteten Parameter bei allen Konstrukten weitestgehend unbeeinflusst. Der in einem manuellen Screen erreichte Durchsatz an Sequenzen konnte jedoch nicht genügend Daten zur Verfügung stellen, um Zusammenhänge aufzudecken. Daher wurde die dFlowSeq Methode entworfen. In einem repräsentativen Beispiel wurde demonstriert, dass die Ermittlung der konstruktspezifischen Wachstum- und Expressionsraten der Fluoreszenzreporter mittels dFlowSeq für die gesamte Bibliothek im Hochdurchsatz durchgeführt werden kann.

5.6 Ausblick

Um genauere Informationen zur Quantität des in dieser Arbeit erhobenen mRNA-Signales zu erlangen, sollten die Signale mit bereits etablierten Techniken wie qPCR, aber auch neuerer Methoden, wie RATE-seq [254] verifiziert werden. Auch die Analyse der generellen, zellulären Antwort auf heterologe Expression mittels qPCR kann interessante Informationen liefern.

Im hier verwendeten Stamm HMS174(DE3) konnte nachgewiesen werden, dass das Gen *rpoS* lediglich in einer trunkierten Form vorliegt. Da dieser globale Stressregulator unter anderem signifikant in den Acetatstoffwechsel involviert ist, kann versucht werden mit einer komplementierten Variante (liegt vor [206]) des Stammes eine bessere Prozessperformance zu erreichen. Es sollte überprüft werden, ob durch diese Modifikation in der globalen Stressantwort außerdem eine geringere Klon-zu-Klon-Varianz erzeugt werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Metabolitflüsse stark von der Prozessführungsstrategie beeinflusst werden. Die dem Stoffwechsel zugrunde liegenden Proteom- und Transkriptom-Unterschiede können wertvolle Informationen über prozessspezifische Vorgänge liefern. In der Literatur wurden bisher - soweit bekannt - Transkriptionsstudien lediglich für unterschiedliche heterologe Konstrukte durchgeführt [255]. Hier sollte ein Vergleich zwischen der Prozessführung im Satzverfahren und einer kohlenstofflimitierten Kultivierung mit exponentiellem Substratzulauf angestellt werden.

Wie sich außerdem gezeigt hat, schlagen sich heterologe Belastungen in der Kohlenstoffbilanz nieder. Um diese zum einen schließen zu können und zum anderen wichtige Informationen über die Aktivität der Atmungskette und eventuelle Rückstaus im Zitronensäurezyklus zu erlangen, sollten Kultivierungen mit einer Abgasanalytik durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit gelegten Grundlagen sollten für eine ganzheitliche Analyse heterolog exprimierender Zellen in einem weiterführenden Projekt durch eine theoretische Betrachtung der involvierten Prozesse ergänzt werden. Wie in Abbildung 5.1 dargestellt, sollte dabei eine Kompartmentalisierung der beiden Einheiten zelluläre Ressourcen und heterologe Ladung in Betracht gezogen werden. Als wichtigste Faktoren an der Schnittstelle konnten in dieser Arbeit die verfügbaren RNA-Polymerasen sowie die Anzahl an Ribosomen identifiziert werden. Neben der Signalausbildung der heterologen mRNA sowie des Proteins, ist es für ein Modell sinnvoll, den Induktionsprozess, der eine wesentliche Rolle spielen kann, ebenfalls zu betrachten. Eine Anwendung kann es sein, die Verteilung zur Verfügung stehender Ressourcen zu verstehen und die Menge dieser abschätzen zu können. Basierend auf diesen Informationen könnten Design-Vorschläge für heterologe Konstrukte erstellt werden. Auch eine Kopplung dieses Ressourcenmodelles mit klassischen FBA-Ansätzen (*Flux Balance Analysis*) kann sinnvoll sein. Hierdurch können mittels Flussoptimierungen Limitationen aufgedeckt und potenzielle Ziele für ein Metabolic Engineering und damit einer verbesserten Prozessleistung identifiziert werden.

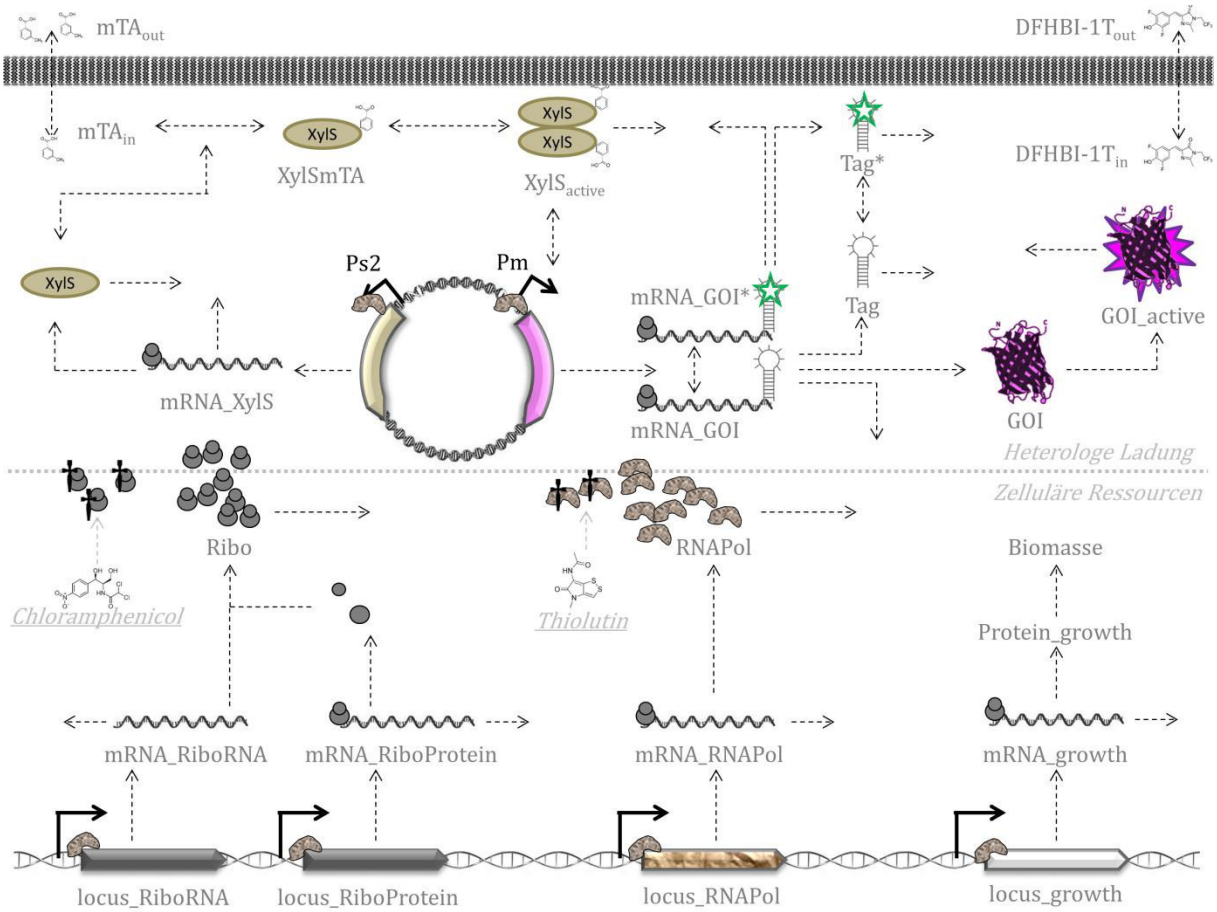


Abbildung 5.1 Modellierungsansatz einer Ganzzellbetrachtung. Ein derartiges Model könnte in die zwei Kompartimente zelluläre Ressourcen (unten) und heterologe Ladung (oben) unterteilt sein. Die Sektion der zellulären Ressourcen beinhaltet neben der Bildung der Ribosomen, auch die Herstellung der RNA-Polymerase, die letztendlich zur Generierung von Biomasse verwendet werden. Muss die heterologe Expression als zusätzliche Ladung der Zelle betrachtet werden, kann dieser Prozess nach den Dynamiken der Induktion (oben, links) sowie der heterologen Expression selbst (oben, rechts) unterteilt werden.

6 Literaturverzeichnis

[1] B. R. Glick, "Metabolic load and heterologous gene expression," *Biotechnology Advances*, vol. 13, no. 2. pp. 247–261, 1995.

[2] M. Basan *et al.*, "Overflow metabolism in Escherichia coli results from efficient proteome allocation," *Nature*, vol. 528, no. 7580, pp. 99–104, 2015.

[3] I. Frumkin *et al.*, "Gene Architectures that Minimize Cost of Gene Expression," *Mol. Cell*, vol. 65, no. 1, pp. 142–153, Jan. 2017.

[4] D. S.-W. W. Ow, P. M. Nissom, R. Philp, S. K.-W. W. Oh, and M. G.-S. S. Yap, "Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in Escherichia coli DH5?? during batch fermentation," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 3, pp. 391–398, Jul. 2006.

[5] W. E. Bentley, N. Mirjalili, D. C. Andersen, R. H. Davis, and D. S. Kompala, "Plasmid-encoded protein: The principal factor in the 'metabolic burden' associated with recombinant bacteria," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 35, no. 7, pp. 668–681, Mar. 1990.

[6] S. K. Bhattacharya and A. K. Dubey, "Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant Escherichia coli overexpressing target gene," *Biotechnol. Lett.*, vol. 17, no. 11, pp. 1155–1160, 1995.

[7] K. Peebo, K. Valgepea, A. Maser, R. Nahku, K. Adamberg, and R. Vilu, "Proteome reallocation in Escherichia coli with increasing specific growth rate," *Mol. BioSyst.*, vol. 11, no. 4, pp. 1184–1193, 2015.

[8] M. Scott, S. Klumpp, E. M. Mateescu, and T. Hwa, "Emergence of robust growth laws from optimal regulation of ribosome synthesis," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 747–747, 2014.

[9] J. A. Gilbert, J. K. Jansson, and R. Knight, "Earth Microbiome Project and Global Systems Biology.," *mSystems*, vol. 3, no. 3, 2018.

[10] N. A. Baeshen *et al.*, "Cell factories for insulin production.," *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, p. 141, Oct. 2014.

[11] A. L. Demain and P. Vaishnav, "Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms," in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 2011.

[12] R. Grosz and G. Stephanopoulos, "Statistical mechanical estimation of the free energy of formation of E. coli biomass for use with macroscopic bioreactor balances," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 25, no. 9, pp. 2149–2163, 1983.

[13] H. E. U. Frederick C. Neidhardt , John L. Ingraham , Boris Magasanik , K. Brooks Low , Moselio Schaechter, *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium. Cellular and Molecular Biology, Volume 1*. 1988.

[14] D. M. Kurnit, "Escherichia coli recA deletion strains that are highly competent for transformation and for in vivo phage packaging," *Gene*, vol. 82, no. 2, pp. 313–315, Oct. 1989.

[15] J. Mairhofer, P. M. Krempl, G. G. Thallinger, and G. Striedner, "Finished Genome

Sequence of Escherichia coli K-12 Strain HMS174 (ATCC 47011).," *Genome Announc.*, vol. 2, no. 6, Nov. 2014.

[16] M. Wallden, D. Fange, E. G. Lundius, Ö. Baltekin, and J. Elf, "The Synchronization of Replication and Division Cycles in Individual E. coli Cells," *Cell*, vol. 166, no. 3, pp. 729–739, 2016.

[17] S. Wold, K. Skarstad, H. B. Steen, T. Stokke, and E. Boye, "The initiation mass for DNA replication in Escherichia coli K-12 is dependent on growth rate.," *EMBO J.*, vol. 13, no. 9, pp. 2097–2102, 1994.

[18] S. Cooper and C. E. Helmstetter, "Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli," *J. Mol. Biol.*, vol. 31, no. 3, pp. 519–540, 1968.

[19] K. Nordström and S. Dasgupta, "Copy-number control of the Escherichia coli chromosome: A plasmidologist's view," *EMBO Reports*, vol. 7, no. 5. pp. 484–489, 2006.

[20] M. P. Mayer, "A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript," *Gene*, vol. 163, no. 1, pp. 41–46, 1995.

[21] A. Peer and H. Margalit, "Evolutionary patterns of Escherichia coli small RNAs and their regulatory interactions.," *RNA*, vol. 20, no. 7, pp. 994–1003, 2014.

[22] M. Maeda, T. Shimada, and A. Ishihama, "Strength and Regulation of Seven rRNA Promoters in Escherichia coli," *PLoS One*, vol. 10, no. 12, 2015.

[23] R. Milo, "What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values," *BioEssays*, vol. 35, no. 12, pp. 1050–1055, 2013.

[24] B. Soufi, K. Krug, A. Harst, and B. Macek, "Characterization of the E. coli proteome and its modifications during growth and ethanol stres," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. FEB, 2015.

[25] A. Schmidt *et al.*, "The quantitative and condition-dependent Escherichia coli proteome," *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 1, pp. 104–110, 2016.

[26] M. Scott and T. Hwa, "Bacterial growth laws and their applications," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, no. 4, pp. 559–565, Aug. 2011.

[27] P. P. Dennis and H. Bremer, "Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates," *EcoSal Plus*, vol. 3, no. 1, Sep. 2008.

[28] M. Scott, C. W. Gunderson, E. M. Mateescu, Z. Zhang, and T. Hwa, "Interdependence of cell growth and gene expression: Origins and consequences," *Science (80-.).*, vol. 330, no. 6007, pp. 1099–1102, 2010.

[29] M. P. Hui, P. L. Foley, and J. G. Belasco, "Messenger RNA degradation in bacterial cells.," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 48, pp. 537–59, 2014.

[30] S. Hui *et al.*, "Quantitative proteomic analysis reveals a simple strategy of global resource allocation in bacteria.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 11, no. 1, p. 784, Feb. 2015.

[31] S. Klumpp and T. Hwa, "Growth-rate-dependent partitioning of RNA polymerases

in bacteria.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 51, pp. 20245–50, Dec. 2008.

[32] L. Lindahl and J. M. Zengel, "Ribosomal Genes in Escherichia Coli," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 20, no. 1, pp. 297–326, Dec. 1986.

[33] R. D. Finn, E. V Orlova, B. Gowen, M. Buck, and M. van Heel, "Escherichia coli RNA polymerase core and holoenzyme structures.," *EMBO J.*, vol. 19, no. 24, pp. 6833–44, Dec. 2000.

[34] M. Zhu, X. Dai, and Y.-P. Wang, "Real time determination of bacterial in vivo ribosome translation elongation speed based on LacZα complementation system.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 20, p. e155, Nov. 2016.

[35] U. Vogel and K. F. Jensen, "The RNA chain elongation rate in Escherichia coli depends on the growth rate.," *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 10, pp. 2807–13, May 1994.

[36] L. B. Jenner, N. Demeshkina, G. Yusupova, and M. Yusupov, "Interaction of bacterial ribosomes with mRNA and tRNA as studied by X-ray crystallographic analysis," in *Ribosomes*, Vienna: Springer Vienna, 2011, pp. 45–55.

[37] M. Siwiak and P. Zielenkiewicz, "Transimulation - Protein Biosynthesis Web Service," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e73943, Sep. 2013.

[38] M. Patrick, P. P. Dennis, M. Ehrenberg, and H. Bremer, "Free RNA polymerase in Escherichia coli," *Biochimie*, vol. 119, pp. 80–91, Dec. 2015.

[39] G. Churchward, H. Bremer, and R. Young, "Transcription in bacteria at different DNA concentrations.," *J. Bacteriol.*, vol. 150, no. 2, pp. 572–81, May 1982.

[40] H. Ledford, "How cells save their energy," *Nature*, May 2008.

[41] Y. Ishihama *et al.*, "Protein abundance profiling of the Escherichia coli cytosol," *BMC Genomics*, vol. 9, no. 1, p. 102, Feb. 2008.

[42] R. Milo and R. Phillips, "Cell Biology By the Numbers," *Curr. Opin. Plant Biol.*, no. June, p. 1, 2014.

[43] R. Milo, "What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values.," *Bioessays*, vol. 35, no. 12, pp. 1050–5, Dec. 2013.

[44] H. Bremer and P. Dennis, "Feedback control of ribosome function in Escherichia coli," *Biochimie*, vol. 90, no. 3, pp. 493–499, Mar. 2008.

[45] S. Sulthana, G. N. Basturea, and M. P. Deutscher, "Elucidation of pathways of ribosomal RNA degradation: an essential role for RNase E.," *RNA*, vol. 22, no. 8, pp. 1163–71, 2016.

[46] A. Gyorgy *et al.*, "Isocost Lines Describe the Cellular Economy of Genetic Circuits.," *Biophys. J.*, vol. 109, no. 3, pp. 639–46, Aug. 2015.

[47] M. S. Paget, "Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution.," *Biomolecules*, vol. 5, no. 3, pp. 1245–65, Jun. 2015.

[48] R. R. Burgess, "Sigma Factors," *Encycl. Genet.*, pp. 1831–1834, Jan. 2001.

[49] S. Bakshi, A. Siryaporn, M. Goulian, and J. C. Weisshaar, "Superresolution imaging of ribosomes and RNA polymerase in live Escherichia coli cells.," *Mol. Microbiol.*, vol. 85, no. 1, pp. 21–38, Jul. 2012.

[50] F. Neidhardt, *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 1996.

[51] J. A. Bernstein, A. B. Khodursky, P.-H. Lin, S. Lin-Chao, and S. N. Cohen, "Global analysis of mRNA decay and abundance in Escherichia coli at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 15, pp. 9697–702, Jul. 2002.

[52] H. Chen, K. Shiroguchi, H. Ge, and X. S. Xie, "Genome-wide study of mRNA degradation and transcript elongation in Escherichia coli.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 11, no. 1, p. 781, Jan. 2015.

[53] G. S. Filonov, C. W. Kam, W. Song, and S. R. Jaffrey, "In-gel imaging of RNA processing using broccoli reveals optimal aptamer expression strategies.," *Chem. Biol.*, vol. 22, no. 5, pp. 649–60, May 2015.

[54] M. P. Deutscher, "E. coli RNases: Making sense of alphabet soup," *Cell*, vol. 40, no. 4, pp. 731–732, Apr. 1985.

[55] S. Gottesman, "PROTEASES AND THEIR TARGETS IN *ESCHERICHIA COLI*," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 30, no. 1, pp. 465–506, Dec. 1996.

[56] R. E. Dalbey, "Leader peptidase," *Mol. Microbiol.*, vol. 5, no. 12, pp. 2855–2860, Dec. 1991.

[57] Y. Yamamoto, T. Sunohara, K. Jojima, T. Inada, and H. Aiba, "SsrA-mediated trans-translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs.," *RNA*, vol. 9, no. 4, pp. 408–18, Apr. 2003.

[58] C. M. Farrell, A. D. Grossman, and R. T. Sauer, "Cytoplasmic degradation of ssrA-tagged proteins," *Mol. Microbiol.*, vol. 57, no. 6, pp. 1750–1761, Sep. 2005.

[59] M. Hintsche and S. Klumpp, "Dilution and the theoretical description of growth-rate dependent gene expression.," *J. Biol. Eng.*, vol. 7, no. 1, p. 22, Sep. 2013.

[60] K. Nath and A. L. Koch, "Protein degradation in Escherichia coli. I. Measurement of rapidly and slowly decaying components.," *J. Biol. Chem.*, vol. 245, no. 11, pp. 2889–900, Jun. 1970.

[61] C. P. Kempes, P. M. van Bodegom, D. Wolpert, E. Libby, J. Amend, and T. Hoehler, "Drivers of Bacterial Maintenance and Minimal Energy Requirements.," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 31, 2017.

[62] A. Dotsch, J. Severin, W. Alt, E. A. Galinski, and J.-U. Kreft, "A mathematical model for growth and osmoregulation in halophilic bacteria," *Microbiology*, vol. 154, no. 10, pp. 2956–2969, Oct. 2008.

[63] C. Kaleta, S. Schäuble, U. Rinas, and S. Schuster, "Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*," *Biotechnol. J.*, vol. 8, no. 9, pp. 1105–1114, Sep. 2013.

[64] M. A. Valderrama-Gomez, S. G. Wagner, and A. Kremling, "Computer-Guided

Metabolic Engineering," Springer, Berlin, Heidelberg, 2015, pp. 153–184.

[65] M. Szenk, K. A. Dill, and A. M. R. de Graff, "Why Do Fast-Growing Bacteria Enter Overflow Metabolism? Testing the Membrane Real Estate Hypothesis," *Cell Syst.*, vol. 5, no. 2, pp. 95–104, Aug. 2017.

[66] R. Carlson and F. Srienc, "FundamentalEscherichia coli biochemical pathways for biomass and energy production: Identification of reactions," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 85, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2004.

[67] Y. Zhou *et al.*, "Carbon catabolite repression correlates with the maintenance of near invariant molecular crowding in proliferating E. coli cells," *BMC Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. 138, Dec. 2013.

[68] J. Ihssen and T. Egli, "Global physiological analysis of carbon- and energy-limited growing Escherichia coli confirms a high degree of catabolic flexibility and preparedness for mixed substrate utilization," *Environ. Microbiol.*, vol. 7, no. 10, pp. 1568–1581, Oct. 2005.

[69] G. W. Luli and W. R. Strohl, "Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of Escherichia coli strains in batch and fed-batch fermentations.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 4, pp. 1004–11, Apr. 1990.

[70] B. Enjalbert, P. Millard, M. Dinclaux, J.-C. Portais, and F. Létisse, "Acetate fluxes in Escherichia coli are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway.," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 42135, 2017.

[71] D. O'Beirne and G. Hamer, "The utilisation of glucose/acetate mixtures by Escherichia coli W3110 under aerobic growth conditions," *Bioprocess Eng.*, vol. 23, no. 4, pp. 375–380, Oct. 2000.

[72] A. Battesti, N. Majdalani, and S. Gottesman, "The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 189–213, Oct. 2011.

[73] H. Weber, T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch, and R. Hengge, "Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in Escherichia coli: S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 5, pp. 1591–1603, Mar. 2005.

[74] M. Rahman, M. R. Hasan, T. Oba, and K. Shimizu, "Effect ofrpoS gene knockout on the metabolism ofEscherichia coli during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 3, pp. 585–595, Jun. 2006.

[75] L. U. Magnusson, A. Farewell, and T. Nyström, "ppGpp: a global regulator in Escherichia coli," *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 5, pp. 236–242, May 2005.

[76] T. Shimada, N. Fujita, K. Yamamoto, and A. Ishihama, "Novel Roles of cAMP Receptor Protein (CRP) in Regulation of Transport and Metabolism of Carbon Sources," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, p. e20081, Jun. 2011.

[77] C. You *et al.*, "Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP

signalling," *Nature*, vol. 500, no. 7462, pp. 301–306, Aug. 2013.

[78] H. Lee, E. Popodi, H. Tang, and P. L. Foster, "Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 41, pp. E2774–E2783, 2012.

[79] R. Silva-Rocha *et al.*, "The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. Database issue, pp. D666-75, Jan. 2013.

[80] J. L. Ramos, S. Marqués, and K. N. Timmis, "TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF THE *PSEUDOMONAS* TOL PLASMID CATABOLIC OPERONS IS ACHIEVED THROUGH AN INTERPLAY OF HOST FACTORS AND PLASMID-ENCODED REGULATORS," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 51, no. 1, pp. 341–373, Oct. 1997.

[81] P. Domínguez-Cuevas, P. Marín, S. Busby, J. L. Ramos, and S. Marqués, "Roles of effectors in XylS-dependent transcription activation: intramolecular domain derepression and DNA binding.," *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 9, pp. 3118–28, May 2008.

[82] M. M. González-Pérez, S. Marqués, P. Domínguez-Cuevas, and J. L. Ramos, "XylS activator and RNA polymerase binding sites at the Pm promoter overlap," *FEBS Lett.*, vol. 519, no. 1–3, pp. 117–122, May 2002.

[83] R. Ruiz and J. L. Ramos, "Residues 137 and 153 of XylS Influence Contacts with the C-Terminal Domain of the RNA Polymerase α Subunit," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 287, no. 2, pp. 519–521, Sep. 2001.

[84] S. Marques, M. Manzanera, M.-M. Gonzalez-Perez, M.-T. Gallegos, and J. L. Ramos, "The XylS-dependent Pm promoter is transcribed in vivo by RNA polymerase with sigma32 or sigma38 depending on the growth phase," *Mol. Microbiol.*, vol. 31, no. 4, pp. 1105–1113, Feb. 1999.

[85] A. Gawin, S. Valla, and T. Brautaset, "The XylS/ *Pm* regulator/promoter system and its use in fundamental studies of bacterial gene expression, recombinant protein production and metabolic engineering," *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 4, pp. 702–718, Jul. 2017.

[86] H. C. Winther-Larsen, K. D. Josefsen, T. Brautaset, and S. Valla, "Parameters Affecting Gene Expression from the Pm Promoter in Gram-Negative Bacteria," *Metab. Eng.*, vol. 2, no. 2, pp. 79–91, Apr. 2000.

[87] M. T. Gallegos, S. Marqués, and J. L. Ramos, "Expression of the TOL plasmid xylS gene in Pseudomonas putida occurs from a alpha 70-dependent promoter or from alpha 70- and alpha 54-dependent tandem promoters according to the compound used for growth.," *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 8, pp. 2356–61, Apr. 1996.

[88] D. Omotajo, T. Tate, H. Cho, and M. Choudhary, "Distribution and diversity of ribosome binding sites in prokaryotic genomes.," *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, p. 604, Aug. 2015.

[89] D. Barrick *et al.*, "Quantitative analysis of ribosome binding sites in E.coli.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 7, pp. 1287–95, Apr. 1994.

[90] H. M. Salis, E. A. Mirsky, and C. A. Voigt, "Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 27, no. 10, pp. 946–50, Oct. 2009.

[91] N. B. Reuven, E. V. Koonin, K. E. Rudd, and M. P. Deutscher, "The gene for the longest known Escherichia coli protein is a member of helicase superfamily II," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 19, pp. 5393–5400, 1995.

[92] A. J. Reid, J. A. G. Ranea, and C. A. Orengo, "Comparative evolutionary analysis of protein complexes in *E. coli* and yeast," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 79, pp. 1–16, 2010.

[93] M. A. Savageau, "Proteins of Escherichia coli come in sizes that are multiples of 14 kDa: domain concepts and evolutionary implications," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 5, pp. 1198–1202, 1986.

[94] L. Brocchieri and S. Karlin, "Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 10, pp. 3390–3400, 2005.

[95] H. Akashi and T. Gojobori, "Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of Escherichia coli and Bacillus subtilis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 6, pp. 3695–3700, Mar. 2002.

[96] A. Maitra and K. A. Dill, "Bacterial growth laws reflect the evolutionary importance of energy efficiency.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 2, pp. 406–11, Jan. 2015.

[97] M. Skovgaard, L. J. Jensen, S. Brunak, D. Ussery, and A. Krogh, "On the total number of genes and their length distribution in complete microbial genomes," *Trends in Genetics*, vol. 17, no. 8. pp. 425–428, 2001.

[98] a. Rozkov *et al.*, "Characterization of the metabolic burden on Escherichia coli DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 88, no. 7, pp. 909–915, Dec. 2004.

[99] P. Dvorak *et al.*, "Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in Escherichia coli BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway.," *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, p. 201, Dec. 2015.

[100] D. W. Zabriskie and E. J. Arcuri, "Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 8, no. 12, pp. 706–717, Dec. 1986.

[101] A. Martinez *et al.*, "Biosynthetic Burden and Plasmid Burden Limit Expression of Chromosomally Integrated Heterologous Genes (pdc, adhB) in Escherichia coli," *Biotechnol. Prog.*, vol. 15, no. 5, pp. 891–897, Oct. 1999.

[102] C. G. Kurland and H. Dong, "Bacterial growth inhibition by overproduction of protein," *Mol. Microbiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–4, Jul. 1996.

[103] S. Cardinale, M. P. Joachimiak, and A. P. Arkin, "Effects of Genetic Variation on the E. coli Host-Circuit Interface," *Cell Rep.*, vol. 4, no. 2, pp. 231–237, Jul. 2013.

[104] M. Kafri, E. Metzl-Raz, G. Jona, and N. Barkai, "The Cost of Protein Production," *Cell*

Rep., vol. 14, no. 1, pp. 22–31, Jan. 2016.

[105] S. C. Sleight and H. M. Sauro, "Visualization of Evolutionary Stability Dynamics and Competitive Fitness of Escherichia coli Engineered with Randomized Multigene Circuits," *ACS Synth. Biol.*, vol. 2, no. 9, pp. 519–528, Sep. 2013.

[106] O. Borkowski, F. Ceroni, G.-B. Stan, and T. Ellis, "Overloaded and stressed: whole-cell considerations for bacterial synthetic biology," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 33, pp. 123–130, Oct. 2016.

[107] K. Graumann and A. Premstaller, "Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems," *Biotechnol. J.*, vol. 1, no. 2, pp. 164–186, Feb. 2006.

[108] A. Vazquez and Z. N. Oltvai, "Macromolecular crowding explains overflow metabolism in cells.," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 31007, 2016.

[109] M. Golkaram, S. Hellander, B. Drawert, and L. R. Petzold, "Macromolecular Crowding Regulates the Gene Expression Profile by Limiting Diffusion.," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 12, no. 11, p. e1005122, Nov. 2016.

[110] S. Klumpp, M. Scott, S. Pedersen, and T. Hwa, "Molecular crowding limits translation and cell growth.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 42, pp. 16754–9, Oct. 2013.

[111] J. G. Thomas and F. Baneyx, "Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant Escherichia coli cells overexpressing Heat-shock proteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 19, pp. 11141–7, May 1996.

[112] M. Basan *et al.*, "Inflating bacterial cells by increased protein synthesis.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 11, no. 10, p. 836, Oct. 2015.

[113] N. A. Cookson *et al.*, "Queueing up for enzymatic processing: correlated signaling through coupled degradation.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. 561, Dec. 2011.

[114] T. Schweder, H. Lin, B. Jürgen *et al.*, "Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in Escherichia coli," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 58, no. 3, pp. 330–337, Mar. 2002.

[115] N. Paczia, A. Nilgen, T. Lehmann, J. Gätgens, W. Wiechert, and S. Noack, "Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms," *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 1, p. 122, Sep. 2012.

[116] S. Carneiro, E. C. Ferreira, and I. Rocha, "Metabolic responses to recombinant bioprocesses in Escherichia coli," *J. Biotechnol.*, vol. 164, pp. 396–408, 2013.

[117] D. A. Oyarzún and G.-B. V Stan, "Synthetic gene circuits for metabolic control: design trade-offs and constraints.," *J. R. Soc. Interface*, vol. 10, no. 78, p. 20120671, Jan. 2013.

[118] G. Wu, Q. Yan, J. A. Jones, Y. J. Tang, S. S. Fong, and M. A. G. Koffas, "Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 8, pp. 652–664, Aug. 2016.

[119] S. Flores, R. de Anda-Herrera, G. Gosset, and F. G. Bolívar, "Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the

pentose-phosphate pathway," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 87, no. 4, pp. 485–494, Aug. 2004.

[120] A. R. Lara, C. Vazquez-Limón, G. Gosset, F. Bolívar, A. López-Munguía, and O. T. Ramírez, "EngineeringEscherichia coli to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, no. 6, pp. 1164–1175, Aug. 2006.

[121] M. A. Eiteman and E. Altman, "Overcoming acetate in Escherichia coli recombinant protein fermentations," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 11, pp. 530–536, Nov. 2006.

[122] J. Bonomo and R. T. Gill, "Amino acid content of recombinant proteins influences the metabolic burden response," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 90, no. 1, pp. 116–126, 2005.

[123] C. Gustafsson, S. Govindarajan, and J. Minshull, "Codon bias and heterologous protein expression," *Trends Biotechnol.*, vol. 22, no. 7, pp. 346–353, Jul. 2004.

[124] G. Boël *et al.*, "Codon influence on protein expression in E. coli correlates with mRNA levels," *Nature*, vol. 529, no. 7586, pp. 358–363, Jan. 2016.

[125] J. F. Kane, "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 6, no. 5, pp. 494–500, Jan. 1995.

[126] B. Aguirre-López, N. Cabrera, M. T. de Gómez-Puyou, R. Perez-Montfort, and A. Gómez-Puyou, "The importance of arginine codons AGA and AGG for the expression in E. coli of triosephosphate isomerase from seven different species.," *Biotechnol. reports (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 13, pp. 42–48, Mar. 2017.

[127] H. Chen *et al.*, "Genome-Wide Quantification of the Effect of Gene Overexpression on Escherichia coli Growth.," *Genes (Basel).*, vol. 9, no. 8, Aug. 2018.

[128] N. Rahmen, A. Fulton, N. Ihling, M. Magni, K.-E. Jaeger, and J. Büchs, "Exchange of single amino acids at different positions of a recombinant protein affects metabolic burden in Escherichia coli," *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, no. 1, p. 10, Jan. 2015.

[129] F. Ceroni *et al.*, "Burden-driven feedback control of gene expression," *Nat. Methods*, vol. 15, no. 5, pp. 387–393, Mar. 2018.

[130] M. Dragosits, D. Nicklas, and I. Tagkopoulos, "A synthetic biology approach to self-regulatory recombinant protein production in Escherichia coli," *J. Biol. Eng.*, vol. 6, no. 1, p. 2, Dec. 2012.

[131] H. Maamar, A. Raj, and D. Dubnau, "Noise in Gene Expression Determines Cell Fate in Bacillus subtilis," *Science (80-.).*, vol. 317, no. 5837, pp. 526–529, Jul. 2007.

[132] E. M. Ozbudak, M. Thattai, I. Kurtser, A. D. Grossman, and A. van Oudenaarden, "Regulation of noise in the expression of a single gene," *Nat. Genet.*, vol. 31, no. 1, pp. 69–73, May 2002.

[133] T. Tuller *et al.*, "An Evolutionarily Conserved Mechanism for Controlling the Efficiency of Protein Translation," *Cell*, vol. 141, no. 2, pp. 344–354, Apr. 2010.

[134] F. Moser *et al.*, "Genetic Circuit Performance under Conditions Relevant for

Industrial Bioreactors," *ACS Synth. Biol.*, vol. 1, no. 11, pp. 555–564, Nov. 2012.

[135] O. Borkowski, F. Ceroni, G.-B. Stan, and T. Ellis, "Overloaded and stressed: whole-cell considerations for bacterial synthetic biology," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 33, pp. 123–130, Oct. 2016.

[136] F. Ceroni, R. Algar, G.-B. Stan, and T. Ellis, "Quantifying cellular capacity identifies gene expression designs with reduced burden," *Nat. Methods*, vol. 12, no. 5, pp. 415–418, May 2015.

[137] D. Segrè, D. Vitkup, and G. M. Church, "Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 23, pp. 15112–7, Nov. 2002.

[138] R. Schuetz, L. Kuepfer, and U. Sauer, "Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in Escherichia coli.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 3, p. 119, 2007.

[139] A. M. Feist and B. O. Palsson, "The biomass objective function.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 344–9, Jun. 2010.

[140] A. Varma and B. O. Palsson, "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type Escherichia coli W3110.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 10, pp. 3724–31, Oct. 1994.

[141] H. Brunschede, T. L. Dove, and H. Bremer, "Establishment of exponential growth after a nutritional shift-up in Escherichia coli B/r: accumulation of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and protein.," *J. Bacteriol.*, vol. 129, no. 2, pp. 1020–33, Feb. 1977.

[142] R. Marathe, V. Bierbaum, D. Gomez, and S. Klumpp, "Deterministic and stochastic descriptions of gene expression dynamics," Jul. 2012.

[143] A. Kremling, *Systems biology : mathematical modeling and model analysis*. Wiesbaden: CRC Press, 2013.

[144] J. Shine and L. Dalgarno, "The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 71, no. 4, pp. 1342–6, Apr. 1974.

[145] B. S. Laursen, H. P. Sørensen, K. K. Mortensen, and H. U. Sperling-Petersen, "Initiation of protein synthesis in bacteria.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 69, no. 1, pp. 101–23, Mar. 2005.

[146] M. V. Rodnina *et al.*, "GTPase Mechanisms and Functions of Translation Factors on the Ribosome," *Biol. Chem.*, vol. 381, no. 5–6, pp. 377–87, Jan. 2000.

[147] M. R. Adhin and J. van Duin, "Scanning model for translational reinitiation in eubacteria," *J. Mol. Biol.*, vol. 213, no. 4, pp. 811–818, Jun. 1990.

[148] A. Andrè, A. Puca, F. Sansone, A. Brandi, G. Antico, and R. A. Calogero, "Reinitiation of protein synthesis in Escherichia coli can be induced by mRNA cis-elements unrelated to canonical translation initiation signals.," *FEBS Lett.*, vol. 468, no. 1, pp. 73–8, Feb. 2000.

[149] P. M. Sharp and M. Bulmer, "Selective differences among translation termination codons.," *Gene*, vol. 63, no. 1, pp. 141–5, 1988.

[150] C. E. Aitken, A. Petrov, and J. D. Puglisi, "Single Ribosome Dynamics and the Mechanism of Translation," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 39, no. 1, pp. 491–513, Apr. 2010.

[151] W. Bannwarth and B. Hinzen, *Combinatorial chemistry : from theory to application*. Wiley-VCH, 2006.

[152] R. Heim, D. C. Prasher, and R. Y. Tsien, "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 26, pp. 12501–4, Dec. 1994.

[153] D. M. Shcherbakova and V. V Verkhusha, "Chromophore chemistry of fluorescent proteins controlled by light.," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 20, pp. 60–8, Jun. 2014.

[154] J. B. Andersen, C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov, and S. Molin, "New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 6, pp. 2240–6, Jun. 1998.

[155] E. Hebisch, J. Knebel, J. Landsberg, E. Frey, and M. Leisner, "High variation of fluorescence protein maturation times in closely related Escherichia coli strains.," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e75991, 2013.

[156] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, and R. Y. Tsien, "A guide to choosing fluorescent proteins," *Nat. Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 905–909, Dec. 2005.

[157] E. L. Snapp, "Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide.," *Trends Cell Biol.*, vol. 19, no. 11, pp. 649–55, Nov. 2009.

[158] K. D. Warner *et al.*, "Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 21, no. 8, pp. 658–663, Aug. 2014.

[159] G. S. Filonov and S. R. Jaffrey, "RNA Imaging with Dimeric Broccoli in Live Bacterial and Mammalian Cells.," *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–28, Mar. 2016.

[160] G. S. Filonov, J. D. Moon, N. Svensen, and S. R. Jaffrey, "Broccoli: Rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 46, pp. 16299–16308, Nov. 2014.

[161] M. Molinaro, I. Tinoco, and Jr, "Use of ultra stable UNCG tetraloop hairpins to fold RNA structures: thermodynamic and spectroscopic applications.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 23, no. 15, pp. 3056–63, Aug. 1995.

[162] S. Bottaro, P. Banáš, J. Šponer, and G. Bussi, "Free Energy Landscape of GAGA and UUCG RNA Tetraloops," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 20, pp. 4032–4038, Oct. 2016.

[163] G. Pothoulakis and T. Ellis, "Using Spinach Aptamer to Correlate mRNA and Protein Levels in Escherichia coli," *Methods Enzymol.*, vol. 550, pp. 173–185, Jan. 2015.

[164] I. Mihalcescu, M. Van-Melle Gateau, B. Chelli, C. Pinel, and J.-L. Ravanat, "Green autofluorescence, a double edged monitoring tool for bacterial growth and activity

in micro-plates," *Phys. Biol.*, vol. 12, no. 6, p. 066016, Dec. 2015.

[165] S. Kosuri *et al.*, "Composability of regulatory sequences controlling transcription and translation in Escherichia coli.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 34, pp. 14024–9, Aug. 2013.

[166] D. Kazan, A. Çamurdan, and A. Hortaçsu, "The effect of glucose concentration on the growth rate and some intracellular components of a recombinant E. coli culture," *Process Biochem.*, vol. 30, no. 3, pp. 269–273, Jan. 1995.

[167] K. A. Presser, D. A. Ratkowsky, and T. Ross, "Modelling the growth rate of Escherichia coli as a function of pH and lactic acid concentration.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 6, pp. 2355–2360, Jun. 1997.

[168] A. J. Roe, C. O'Byrne, D. McLaggan, and I. R. Booth, "Inhibition of Escherichia coli growth by acetic acid: A problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity," *Microbiology*, vol. 148, no. 7, pp. 2215–2222, 2002.

[169] B. A. Zohar and I. Kolodkin-Gal, "Quorum sensing in escherichia coli: Interkingdom, inter- and intraspecies dialogues, and a suicide-inducing peptide," in *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with no end in Sight*, 2015, pp. 85–99.

[170] J. Monod, "The Growth of Bacterial Cultures," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 371–394, 1949.

[171] M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, and O. Adachi, "Growth Stimulating Substance for Microorganisms Produced by *Escherichia coli* Causing the Reduction of the Lag Phase in Microbial Growth and Identity of the Substance with Pyrroloquinoline Quinone," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 48, no. 12, pp. 3099–3107, Dec. 1984.

[172] X. Carbonell, J. L. Corchero, R. Cubarsí, P. Vila, and A. Villaverde, "Control of Escherichia coli growth rate through cell density," *Microbiol. Res.*, vol. 157, no. 4, pp. 257–265, 2002.

[173] C. Syldatk and H. Chmiel, *Bioprozesstechnik*. 2011.

[174] B. Kick, S. Hensler, F. Praetorius, H. Dietz, and D. Weuster-Botz, "Specific growth rate and multiplicity of infection affect high-cell-density fermentation with bacteriophage M13 for ssDNA production," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 114, no. 4, pp. 777–784, 2017.

[175] A. M. Feist *et al.*, "A genome-scale metabolic reconstruction for Escherichia coli K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 3, 2007.

[176] J. L. Campbell, C. C. Richardson, and F. W. Studier, "Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 75, no. 5, pp. 2276–80, May 1978.

[177] R. Platt, C. Drescher, S.-K. Park, and G. J. Phillips, "Genetic System for Reversible Integration of DNA Constructs and lacZ Gene Fusions into the Escherichia coli Chromosome," *Plasmid*, vol. 43, no. 1, pp. 12–23, Jan. 2000.

[178] K.-H. Choi *et al.*, "A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system," *Nat. Methods*, vol. 2, no. 6, pp. 443–448, Jun. 2005.

[179] T. Durfee *et al.*, "The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse.," *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 7, pp. 2597–606, Apr. 2008.

[180] C. Manoil and J. Beckwith, "TnphoA: a transposon probe for protein export signals.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. 23, pp. 8129–33, Dec. 1985.

[181] D. M. Glover and B. D. Hames, *DNA cloning : a practical approach*. IRL Press, 1994.

[182] B. Kessler, V. de Lorenzo, and K. N. Timmis, "A general system to integratelacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of thePm promoter of theTOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy," *Mol. Gen. Genet. MGG*, vol. 233, no. 1–2, pp. 293–301, May 1992.

[183] M. Ziegler, "On-Line in vivo Quantifizierung spezifischer mRNAs durch dBroccoli-vermittelte Fluoreszenz," 2016.

[184] L. Schmauder, "Systematische Untersuchung der zellulären Ressourcen in Escherichia coli während der heterologen Proteinherstellung," 2017.

[185] M. Knesebeck, "Auswirkung unterschiedlicher Transkriptions- und Translationslevel bei der heterologen Proteinherstellung in Escherichia coli auf die Ribosomen-Verfügbarkeit," 2017.

[186] L. Göldel, "Charakterisierung der RNA Polymerase Verfügbarkeit unter metabolischer Belastung in Escherichia coli," 2017.

[187] C. Engler, R. Kandzia, and S. Marillonnet, "A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability," *PLoS One*, vol. 3, no. 11, p. e3647, Nov. 2008.

[188] S. Zobel, I. Benedetti, L. Eisenbach, V. de Lorenzo, N. Wierckx, and L. M. Blank, "Tn7-Based Device for Calibrated Heterologous Gene Expression in *Pseudomonas putida*," *ACS Synth. Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. 1341–1351, Dec. 2015.

[189] U. K. Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970.

[190] R. Puskeiler, K. Kaufmann, and D. Weuster-Botz, "Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD)," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 89, no. 5, pp. 512–523, Mar. 2005.

[191] S. G. Wagner *et al.*, "An automated and parallelised DIY-dosing unit for individual and complex feeding profiles: Construction, validation and applications," *PLoS One*, vol. 14, no. 6, p. e0217268, Jun. 2019.

[192] E. M. Ransom, C. D. Ellermeier, and D. S. Weiss, "Use of mCherry Red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in Clostridium difficile.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 5, pp. 1652–60, Mar. 2015.

[193] S. G. Wagner, M. Ziegler, H. Löwe, A. Kremling, and K. Pflüger-Grau, "pTRA – A

reporter system for monitoring the intracellular dynamics of gene expression," *PLoS One*, vol. 13, no. 5, p. e0197420, May 2018.

[194] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, "Green fluorescent protein as a marker for gene expression.," *Science*, vol. 263, no. 5148, pp. 802–5, 1994.

[195] J. S. Paige, K. Y. Wu, and S. R. Jaffrey, "RNA mimics of green fluorescent protein," *Science (80-.).*, vol. 333, no. 6042, pp. 642–646, 2011.

[196] M. Jahn, C. Vorpahl, T. Hübschmann, H. Harms, and S. Müller, "Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and Droplet Digital PCR.," *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 1, p. 211, Dec. 2016.

[197] T. E. Vee Aune, I. Bakke, F. Drabløs, R. Lale, T. Brautaset, and S. Valla, "Directed evolution of the transcription factor XylS for development of improved expression systems.," *Microb. Biotechnol.*, vol. 3, no. 1, pp. 38–47, Jan. 2010.

[198] D. Binder *et al.*, "Comparative Single-Cell Analysis of Different E. coli Expression Systems during Microfluidic Cultivation," *PLoS One*, vol. 11, no. 8, p. e0160711, Aug. 2016.

[199] K. C. B. Lee *et al.*, "Application of the Stretched Exponential Function to Fluorescence Lifetime Imaging," *Biophys. J.*, vol. 81, no. 3, pp. 1265–1274, Sep. 2001.

[200] H. Brunschede, T. L. Dove, and H. Bremer, "Establishment of exponential growth after a nutritional shift-up in Escherichia coli B/r: accumulation of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and protein.," *J. Bacteriol.*, vol. 129, no. 2, pp. 1020–33, Feb. 1977.

[201] J. E. Mott, J. L. Galloway, and T. Platt, "Maturation of Escherichia coli tryptophan operon mRNA: evidence for 3' exonucleolytic processing after rho-dependent termination.," *EMBO J.*, vol. 4, no. 7, pp. 1887–91, Jul. 1985.

[202] G. A. Mackie, "RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 1, pp. 45–57, Jan. 2013.

[203] G. A. Coburn, X. Miao, D. J. Briant, and G. A. Mackie, "Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase.," *Genes Dev.*, vol. 13, no. 19, pp. 2594–603, Oct. 1999.

[204] M. P. Deutscher, "Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 2, pp. 659–666, Jan. 2006.

[205] M. Bals, "Charakterisierung des globalen Stressmarkerproteins RpoS unter metabolischer Belastung in Escherichia coli," 2017.

[206] Jan Stotz, "Prozesstechnische Charakterisierung unterschiedlich belasteter Escherichia coli Stämme während der heterologen Proteinherstellung," 2017.

[207] A. Bartholomäus *et al.*, "Bacteria differently regulate mRNA abundance to specifically respond to various stresses.," *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 374, no. 2063, p. 20150069, Mar. 2016.

[208] X. Yan, T. A. Hoek, R. D. Vale, and M. E. Tanenbaum, "Dynamics of Translation of

Single mRNA Molecules In Vivo.," *Cell*, vol. 165, no. 4, pp. 976–89, May 2016.

[209] G.-W. Li, D. Burkhardt, C. Gross, and J. S. Weissman, "Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources.," *Cell*, vol. 157, no. 3, pp. 624–35, Apr. 2014.

[210] D. S.-W. Ow, P. M. Nissom, R. Philp, S. K.-W. Oh, and M. G.-S. Yap, "Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in Escherichia coli DH5α during batch fermentation," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 3, pp. 391–398, Jul. 2006.

[211] E. Bosdriesz, D. Molenaar, B. Teusink, and F. J. Bruggeman, "How fast-growing bacteria robustly tune their ribosome concentration to approximate growth-rate maximization.," *FEBS J.*, vol. 282, no. 10, pp. 2029–44, May 2015.

[212] J. A. Englaender, J. A. Jones, B. F. Cress, T. E. Kuhlman, R. J. Linhardt, and M. A. G. Koffas, "Effect of Genomic Integration Location on Heterologous Protein Expression and Metabolic Engineering in *E. coli*," *ACS Synth. Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 710–720, Apr. 2017.

[213] J. Carrera, R. Estrela, J. Luo, N. Rai, A. Tsoukalas, and I. Tagkopoulos, "An integrative, multi-scale, genome-wide model reveals the phenotypic landscape of Escherichia coli.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 10, no. 7, p. 735, Jul. 2014.

[214] C. L. Andersen, J. L. Jensen, and T. F. Ørntoft, "Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data : A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization , Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets," pp. 5245–5250, 2004.

[215] V. M. Mendonca, K. Kaiser-Rogers, and S. W. Matson, "Double helicase II (uvrD)-helicase IV (helD) deletion mutants are defective in the recombination pathways of Escherichia coli.," *J. Bacteriol.*, vol. 175, no. 15, pp. 4641–51, Aug. 1993.

[216] J. J. Rossi, J. Vender, C. M. Berg, and W. H. Coleman, "Partial purification and some properties of delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase from Escherichia coli.," *J. Bacteriol.*, vol. 129, no. 1, pp. 108–14, Jan. 1977.

[217] S. S. J. Heng, O. Y. W. Chan, B. M. H. Keng, and M. H. T. Ling, "Glucan Biosynthesis Protein G Is a Suitable Reference Gene in Escherichia coli K-12.," *ISRN Microbiol.*, vol. 2011, p. 469053, 2011.

[218] K. W. Yun, D. S. Kim, W. Kim, and I. S. Lim, "Molecular typing of uropathogenic Escherichia coli isolated from Korean children with urinary tract infection.," *Korean J. Pediatr.*, vol. 58, no. 1, pp. 20–7, Jan. 2015.

[219] S. Chattopadhyay, S. Paul, D. I. Kisiela, E. V Linardopoulou, and E. V Sokurenko, "Convergent molecular evolution of genomic cores in Salmonella enterica and Escherichia coli.," *J. Bacteriol.*, vol. 194, no. 18, pp. 5002–11, Sep. 2012.

[220] A. F. Maheux, D. K. Boudreau, M. G. Bergeron, and M. J. Rodriguez, "Characterization of *Escherichia fergusonii* and *Escherichia albertii* isolated from water," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 117, no. 2, pp. 597–609, Aug. 2014.

[221] S. Oehler, "Feedback regulation of Lac repressor expression in Escherichia coli.," *J.*

Bacteriol., vol. 191, no. 16, pp. 5301–3, Aug. 2009.

[222] K. Tedin and H. Bremer, "Toxic effects of high levels of ppGpp in Escherichia coli are relieved by rpoB mutations.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 4, pp. 2337–44, Feb. 1992.

[223] T. M. Gruber and C. A. Gross, "Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, no. 1, pp. 441–466, Oct. 2003.

[224] A. Singh, "Negative Feedback Through mRNA Provides the Best Control of Gene-Expression Noise," *IEEE Trans. Nanobioscience*, vol. 10, no. 3, pp. 194–200, Sep. 2011.

[225] L. V Aseev, A. A. Levandovskaya, L. S. Tchufistova, N. V Scaptsova, and I. V Boni, "A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the rpsB-tsf expression in vivo.," *RNA*, vol. 14, no. 9, pp. 1882–94, Sep. 2008.

[226] L. V. Aseev, L. S. Koledinskaya, and I. V. Boni, "Dissecting the extended '-10' Escherichia coli rpsB promoter activity and regulation in vivo," *Biochem.*, vol. 79, no. 8, pp. 776–784, Aug. 2014.

[227] G. G. Khachatourians and D. J. Tipper, "Inhibition of messenger ribonucleic acid synthesis in Escherichia coli by thiolutin.," *J. Bacteriol.*, vol. 119, no. 3, pp. 795–804, Sep. 1974.

[228] G. G. Khachatourians and D. J. Tipper, "In vivo effect of thiolutin on cell growth and macromolecular synthesis in Escherichia coli.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 6, no. 3, pp. 304–10, Sep. 1974.

[229] V. Pelechano and J. E. Pérez-Ortín, "The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast," *Yeast*, vol. 25, no. 2, pp. 85–92, Feb. 2008.

[230] P. J. Lopez, I. Marchand, O. Yarchuk, and M. Dreyfus, "Translation inhibitors stabilize Escherichia coli mRNAs independently of ribosome protection.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 11, pp. 6067–72, May 1998.

[231] C. Jain, "Degradation of mRNA in Escherichia coli," *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)*, vol. 54, no. 6, pp. 315–321, Dec. 2002.

[232] R. Kohler, R. A. Mooney, D. J. Mills, R. Landick, and P. Cramer, "Architecture of a transcribing-translating expressome.," *Science*, vol. 356, no. 6334, pp. 194–197, Apr. 2017.

[233] X. Dai *et al.*, "Reduction of translating ribosomes enables Escherichia coli to maintain elongation rates during slow growth.," *Nat. Microbiol.*, vol. 2, p. 16231, Dec. 2016.

[234] N. Goyal, M. Padhiary, I. A. Karimi, and Z. Zhou, "Flux measurements and maintenance energy for carbon dioxide utilization by Methanococcus maripaludis.," *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, p. 146, Sep. 2015.

[235] S. J. Pirt, "Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth.," *Arch. Microbiol.*, vol. 133, no. 4, pp. 300–2, Dec. 1982.

[236] S. J. Pirt, "The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures," *Proc. R. Soc. B*

Biol. Sci., vol. 163, no. 991, pp. 224–231, 1965.

[237] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, "Entry to the Citric Acid Cycle and Metabolism Through It Are Controlled," 2002.

[238] B. J. Koebmann, H. V Westerhoff, J. L. Snoep, D. Nilsson, and P. R. Jensen, "The glycolytic flux in Escherichia coli is controlled by the demand for ATP.," *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 14, pp. 3909–16, Jul. 2002.

[239] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

[240] K. Jantama, X. Zhang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, S. A. Svoronos, and L. O. Ingram, "Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 101, no. 5, pp. 881–893, Dec. 2008.

[241] C. Hesslinger, S. A. Fairhurst, and G. Sawers, "Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in Escherichia coli that degrades L-threonine to propionate," *Mol. Microbiol.*, vol. 27, no. 2, pp. 477–492, Feb. 1998.

[242] R. Krämer, "Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 13, no. 1, pp. 75–93, Jan. 1994.

[243] K.-K. Cheng *et al.*, "Global metabolic network reorganization by adaptive mutations allows fast growth of Escherichia coli on glycerol," *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 3233, Dec. 2014.

[244] K. Marisch, K. Bayer, M. Cserjan-Puschmann, M. Luchner, and G. Striedner, "Evaluation of three industrial Escherichia coli strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production.," *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, p. 58, Jun. 2013.

[245] J. von Poschinger, "Vergleichende metabolische Analyse eines E. coli – Stammes bei heterologer Belastung," 2018.

[246] Seyedeh Marjan Varedi Koolaee; Seyed Abbas Shojaosadati; Valliollah Babaeipour; Nasser Ghaemi, "Physiological and Morphological Changes of Recombinant E. coli During Over-Expression of Human Interferon-g in HCDC," *Iran. J. Biotechnol.*, vol. Volume 4, no. Issue 4, pp. 230–238, 2006.

[247] T. E. Shehata and A. G. Marr, "Effect of nutrient concentration on the growth of Escherichia coli.," *J. Bacteriol.*, vol. 107, no. 1, pp. 210–6, Jul. 1971.

[248] G. Zurawski, D. Elseviers, G. V Stauffer, and C. Yanofsky, "Translational control of transcription termination at the attenuator of the Escherichia coli tryptophan operon.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 75, no. 12, pp. 5988–92, Dec. 1978.

[249] S. Pechmann, J. W. Chartron, and J. Frydman, "Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 21, no. 12, pp. 1100–5, Dec. 2014.

[250] S. P. Navon *et al.*, "Amino acid sequence repertoire of the bacterial proteome and the occurrence of untranslatable sequences.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113,

no. 26, pp. 7166–70, Jun. 2016.

[251] Y. Nakamura, T. Gojobori, and T. Ikemura, “Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, p. 292, Jan. 2000.

[252] M. J. Weickert and I. Apostol, “High-fidelity translation of recombinant human hemoglobin in Escherichia coli.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 5, pp. 1589–93, May 1998.

[253] H. Jakubowski and E. Goldman, “Quantities of individual aminoacyl-tRNA families and their turnover in Escherichia coli.,” *J. Bacteriol.*, vol. 158, no. 3, pp. 769–76, Jun. 1984.

[254] B. Neymotin, R. Athanasiadou, and D. Gresham, “Determination of in vivo RNA kinetics using RATE-seq.,” *RNA*, vol. 20, no. 10, pp. 1645–52, Oct. 2014.

[255] A. K. Sharma, S. Mahalik, C. Ghosh, A. B. Singh, and K. J. Mukherjee, “Comparative transcriptomic profile analysis of fed-batch cultures expressing different recombinant proteins in Escherichia coli.,” *AMB Express*, vol. 1, no. 1, p. 33, Oct. 2011.

[256] A. Y. Mitrophanov and E. A. Groisman, “Positive feedback in cellular control systems.,” *Bioessays*, vol. 30, no. 6, pp. 542–55, Jun. 2008.

[257] C. Tan, P. Marguet, and L. You, “Emergent bistability by a growth-modulating positive feedback circuit.,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 11, pp. 842–8, Nov. 2009.

[258] J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3*, vol. 18. 2001.

[259] D. Riesenberg, “High-cell-density cultivation of Escherichia coli,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 2, no. 3, pp. 380–384, 1991.

[260] J. Hiller, E. Franco-Lara, and D. Weuster-Botz, “Metabolic profiling of Escherichia coli cultivations: evaluation of extraction and metabolite analysis procedures,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, no. 8, pp. 1169–1178, Jul. 2007.

Anhang

A.1 Variablenverzeichnis

Variable	Bedeutung	Einheit
$\#cells_{k,i,h}$	Anzahl der Zellen des Stammes k, die zum Zeitpunkt h in die Fluoreszenzintensitätsklasse i sortiert wurden	-
$\#cells_{h,k}$	Anzahl der Zellen des Stammes k zum Zeitpunkt h	-
$\#cells_{h,total}$	Gesamtanzahl der Zellen in der Kultur zum Zeitpunkt h	-
q_{in}	Eingehender Volumenstrom	mL h^{-1}
μ_{Set}	Vorgegebene Wachstumsrate	h^{-1}
μ_{WT}	Wachstumsrate des Wildtypstammes	h^{-1}
μ_{loaded}	Wachstumsrate des beladenen Stammes	h^{-1}
B_0	Insgesamt verfügbare RNA-Polymerase-Bindestellen	-
$F_{h,k}$	Fluoreszenz im Plattenlesegerät des Stammes k zum Zeitpunkt h	A.U.
$FL3_{h;k}$	prozentualer Beitrag des Stammes k an der Gesamtfluoreszenzintensität zum Zeitpunkt h	I
$FL3_i$	Intensität der Fluoreszenz in Klasse i	I
$F_{total,h}$	gemessene Gesamtfluoreszenz im Plattenlesegerät der Mischkultur zum Zeitpunkt h	A.U.
K_n	Affinität der Reaktion n	-
$OD_{\lambda,h,k}$	OD des Stammes k gemessen bei der Wellenlänge λ zum Zeitpunkt h	-
$OD_{\lambda,h,total}$	Gesamt-OD der Kultur gemessen bei der Wellenlänge λ zum Zeitpunkt h	-
$RNAP_{active_n}$	Translatierende RNA-Polymerase an der Position n	-
V_F	Dosiertes Gesamtvolumen	mL
V_F	Zudosiertes Volumen zum Zeitpunkt t	mL
V_R	Reaktorvolumen	mL
$Y_{ATP/C}$	ATP-Ausbeute pro Kohlenstoff	-
$Y_{ATP/O2}$	ATP-Ausbeute pro Sauerstoff	-
$Y_{XS,WT}$	Biomasseausbeute des Wildtypstammes	$mg_{CDW}\ mg_{Substrate}^{-1}$
$Y_{XS,loaded}$	Biomasseausbeute des beladenen Stammes	$mg_{CDW}\ mg_{Substrate}^{-1}$
Y_{XS}	Biomasseausbeutekoefffizient	$mg_{CDW}\ mg_{Substra}$
a_n	Anzahl des Moleküls n pro Zelle	-
b_n	Initiale Anzahl des Moleküls n pro Zelle	-
$\underline{c}$	Alle Konzentrationen im System	$mg\underline{c}\ mL^{-1}$
c_A	Konzentration des Moleküls A	$mg_A\ mL^{-1}$
c_S	Substratkonzentration im Reaktor	$mg_{Substrat}\ mL^{-1}$
c_{S0}	Anfangskonzentration des Substrates im eingehenden Volumenstrom	$mg_{Substrat}\ mL^{-1}$
c_X	Biomasse	mg_{CDW}
c_{X0}	Initiale Biomasse	mg_{CDW}
c_{Xind}	Biomasse zum Induktionszeitpunkt	mg_{CDW}
c_{Xn}	Biomasse zum Zeitpunkt n	mg_{CDW}

$k_{(P-)}$	Abbaurate des Makromoleküls P	h^{-1}
$k_{(P+)}$	Bildungsrate des Makromoleküls P	h^{-1}
k_n	Geschwindigkeitskonstante Rückreaktion der Reaktion n	-
k_{-n}	Geschwindigkeitskonstante Hinreaktion der Reaktion n	-
l_V	Spritzenspezifische Strecke pro Volumen	$mm\ mL^{-1}$
m_S	Masse des Substrats im Reaktor	$mg_{Substrat}$
num_{Cell}	Anzahl der Zellen	-
num_{Gen}	Anzahl der Gene	-
$q_{S,\mu}$	Wachstumsspezifische Substrataufnahmerate	$mg_{Substrate}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$
$q_{S,load}$	Ladungsspezifische Substrataufnahmerate	$mg_{Substrate}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$
$q_{S,total}$	Gesamtsubstrataufnahmerate	$mg_{Substrat}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$
q_S	Substrataufnahmerate	$mg_{Substrat}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$
$\underline{r}$	Ratenvektor	h^{-1}
r_A	Rate der Bildung oder Abnahme des Moleküls A	h^{-1}
r_l	Rotation pro mm Strecke	$° \cdot mm^{-1}$
t_0	Zeitpunkt des Versuchsstarts	h
t_n	Zeitpunkt n	h
$v_{Transkription}$	RNA-Polymerasegeschwindigkeit	$bp\ s^{-1}$
$v_{Translation}$	Ribosomengeschwindigkeit	$aa\ s^{-1}$
φ_{Ribo}	Ribosomendichte	bp^{-1}
μ	Wachstumsrate	h^{-1}
μ	Wachstumsrate	h^{-1}
λ	Wellenlänge	nm
B	Freie RNA-Polymerase-Bindestellen	-
I	Intervallgröße der Analyse	s
P	Konzentration des Makromoleküls P	$mg_P\ mL^{-1}$
$Protein$	Proteinmoleküle	-
$RNAP$	RNA-Polymerasen	-
S	stöchiometrischen Matrix	-
gdf	Übersetzung	-
i	Fluoreszenzintensitätsklasse	-
k	Stamm k	-
$length$	Genlänge	bp
m	Reifungszeit des Proteins	min
$mRNA$	mRNA-Moleküle	-
rot	Anzahl an Grad-Gesamtumdrehungen	°
$sumFL3_h$	Gesamtfluoreszenzintensität der Mischkultur zum Zeitpunkt h	I
t	Zeitpunkt	h
τ	Halbwertszeit	h
τ_{hyd}	Hydraulische Verweilzeit	h

A.2 Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese
3CBA	3-Chlorobenzoesäure
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BioVT	Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BNID	*BioNumber identification number*
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum albumin
CDW	Biotrockenmasse
CHO	*Chinese hamster ovary*
COG	Clusters of Orthologous Groups
d	F30-2xdBroccoli
ddH_2O	Bidestilliertes Wasser
DE3	T7-RNA-Polymerase
dFlowSeq	Dynamische Analyse einer Expressionsbibliothek
DGL	Differentialgleichung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	*Escherichia coli*
eGFP	*enhanced* grün-fluoreszierendes Protein
et al.	*et alii*
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBA	*Flux balance analysis*
FL1	Grünes Fluoreszenzsignal im Cell-Sorter
FL3	Rotes Fluoreszenzsignal im Cell-Sorter
FlowSeq	Methode zur Analyse einer Promotorbibliothek
FMN	Flavinmononucleotid
FSC	forward scatter
Gal-X	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
GAM	Wachstums-assoziierter Energiebedarf
GFP	Grün fluorezierendes Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GOI	Gen von Interesse
GVO	Gentechnisch Veränderte Organismen
h	His-tag
hd	pTRA-Plasmid mit His-Tag und dBroccoli mRNA-Tag
H-NMR	Protonen NMR
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
HRP	*Horseradish*-Peroxidase
IF	Initiationsfaktoren
INSA	*l'Institut National des Sciences Appliquées*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranos
LB	Luria-Bertani
$M_{ATP.1-4}$	Route 1-4 der Oxidation der Kohlenstoffquelle
MCS	*multiple cloning site*‘
mRNA	*Messenger RNA*
mTA	m-Toluylsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	*Gene National Center for Biotechnology Information*

ncRNA	*Non-coding RNA*
NEB	*New England Biolabs*
NGAM	nicht-Wachstums-assoziierte Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel
NGS	*Next generation sequencing*
NMR	Kernspinresonanz Methode
OD_{xxx}	Optische Dichte gemessen bei der Wellenlänge xxx
Ori	*origin of replication*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PaxDB	*Protein Abundance Database*
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Wasserstoffionenexponenten / *potentia hydrogenii*
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO2	Sauerstoffpartialdruck
pSEVA	*Plasmid of Standard European Vector Architecture*
pTA	p-Toluylsäure
pTRA	Plasmid für Transkriptions- und Translationsmonitoring
QC	Qualitätskontrolle
qPCR	Quantitative PCR
RBS	Ribosomenbindestelle
RID	Brechungsindexdetektor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNASeq	Methode zur quantitativen Erfassung des Transkriptoms
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	*Real-time PCR*
SBT	Professur für Systembiotechnologie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
sRNA	*Small RNA*
T7	T7-Phage
TBS	*Tris buffered saline*
Tecan 2	Tecan Plattenlesegerätes des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik
Tecan 1	Tecan Plattenlesegeräte der Professur für Systembiotechnologie
TEMED	Tetramethylethylenediamine
tmRNA	*transfer-messenger-RNA*
tRNA	Träger-RNA
TSS	*Transformation and storage solution*
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	Vollenionisiertes Wasser
WT	Wildtypstamm

Einheit	Bedeutung
%	Prozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
°	Grad Rotation
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
aa	Aminosäure
A.U.	Arbitrary unit
bp	Basenpaar
cm^3	Kubikzentimeter
Da	Dalton
g	Gram
g	Erdbeschleunigung
g_x	Gram des Stoffes x
h	Stunde
I	Intensität
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
M	Molar, entspricht Mol pro Liter
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
mg_X	Milligram des Stoffes x
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar, entspricht Millimol pro Liter
mm	Millimeter
$mmol_X$	Millimol des Stoffes x
mol	Mol
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar, entspricht Nanomol pro Liter
nm	Nanometer
nm^2	Quadratnanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
V	Volt

A.3 Berechnungen und Hintergrundinformation

1. Promotorsequenzen für Kapazitätsmonitorkonstrukte

Transkriptionsstart durch Großbuchstaben gekennzeichnet, -10 und -35 Regionen zur Anbindung der RNAPolymerase sind grau hinterlegt.

Promotor	Sequenz	σ-Faktor
lacIp	gaatgg**c**gcaaaacctttcgcggtatggcat**g**atagcgccc**G**gaagagagtcaattcagggtggtg	
gyrBp	aa**ttcgaagatg**tttaccgtggaa**aagggtaaaat**aacggat**T**aacccaagtataaatgagcgagaa	σS,σ70
proCp	cgcgct**t**ttgccttccggcatagttctgttt**a**tgcttctgcc**A**gcgattatcaaaacaatgaatttc	
helDp	ttt**t**gggctggagcacgttttctctga**c**ggttacactg**A**taagaaataatttcgtgtggatct	

2. Herleitung der Zulauffunktion für eine Kultivierung mit exponentiellem Feed

Folgende Herleitung wurde der Veröffentlichung ‘An automated and parallelised DIY-dosing unit for individual and complex feeding profiles: Construction, validation and applications’ entnommen [191]. Mit der hier gezeigten Zulauffunktion können Wachstumsraten mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten LEGO-Spritzenpume eingestellt werden.

Parameter:

$t = Zeitpunkt\ von\ Interesse$, h
$V_R = Reaktorvolumen\ zum\ Zeitpunkt\ t$, mL
$q_{in} = Volumetrische\ Flussrate;\ Zustrom$, mL h^{-1}

$c_s = Substratkonzentration\ im\ Reaktor\ zum\ Zeitpunkt\ t$, $mg_{Substrat}$ mL^{-1}
$c_{s0} = Substratkonzentration\ im\ Zulauf$, $mg_{Substrat}$ mL^{-1}
$m_S = Masse\ des\ Substrats\ im\ Reaktor\ zum\ Zeitpunkt\ t$, $mg_{Substrat}$
$q_S = Substrataufnahmerate$, $mg_{Substrat}$ mg_{CDW}^{-1} h^{-1}
$Y_{XS} = Biomasseauasbeute$, mg_{CDW} $mg_{Substrate}^{-1}$
$\mu = Wachstumsrate$, h^{-1}
$c_X = Biomassekonzentration\ im\ Reaktor\ t$, mg_{CDW} mL^{-1}
$c_{X0} = Biomassekonzentration\ zum\ Zeitpunkt\ t$, mg_{CDW} mL^{-1}

$V_F = Zudosiertes\ Volumen\ zum\ Zeitpunkt\ t$, mL
$gdf = Übersetzung$, -
$l_V = Spritzenspezifische\ Strecke\ pro\ Volumen$, mm mL^{-1}
$r_l = Rotation\ pro\ mm\ Strecke$, ° mm^{-1}
$rot = Rotation$, °

Mathematischer Ansatz:

$$m_S = V_R \cdot c_S$$

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{XS}}$$

$$m_x = m_{x0} \cdot e^{\mu * t}$$

$$set_rotation(t) = V_F(t) \cdot l_V \cdot r_l \cdot gdf$$

Annahmen:

- $\frac{d(m_S)}{dt} \rightarrow 0$ und $c_S \rightarrow 0$, da es sich um einen Substrat-limitierten Prozess handelt
- Konstantes Reaktorvolumen, da Zulauf und Probennahme in Summe vernachlässigt werden können

$$c_x = c_{x0} \cdot e^{\mu * t}$$

$$\frac{d(V_R \cdot c_S)}{dt} = \frac{d(m_S)}{dt} = (q_{in} \cdot c_{S0} - c_x \cdot q_S \cdot V_R)$$

$$0 = (q_{in} \cdot c_{S0} - c_x \cdot q_S \cdot V_R)$$

$$q_{in} = \frac{c_x \cdot q_S \cdot V_R}{c_{S0}} = \frac{c_x \cdot \mu \cdot V_R}{Y_{XS} \cdot c_{S0}}$$

$\frac{dc_x}{dt}$ ist zeitabhängig=> $c_x = c_{x0} \cdot e^{\mu \cdot t}$;

$$V_F(t) = \int_0^t q_{in}(t)\, dt = \left| \frac{1}{\mu} \cdot \frac{\mu \cdot V_R \cdot c_{X0}}{Y_{XS} \cdot c_{S0}} \cdot e^{\mu \cdot t} \right|_0^t$$

$$V_F(t) = \frac{V_R \cdot c_{X0}}{Y_{XS} \cdot c_{S0}} \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1)$$

Das dosierte Gesamtvolumen kann mittels der folgenden Dosierfunktion in Rotationen transformiert werden. Im MATLAB-Script wird die Zeit in Sekunden verfolgt. Aus diesem Grund ist darauf zu achten, dass entweder μ oder t in der Einheit angepasst werden muss:

$$set_rotation(t) = \frac{V_R \cdot c_{X0}}{Y_{XS} \cdot c_{S0}} \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1) \cdot gdf \cdot l_v \cdot r_l$$

Bestimmung der Biomasseausbeute

Y_{XS} wurde für den Wildtypstamm HMS174(DE3) mittels eines Satzprozesses unter den gleichen Rahmenbedingungen wie für das Zulaufverfahren mit einer initialen Substratkonzentration von 20 mM Glucose bestimmt.

Zeit, h	CDW, mg mL^{-1}	C-source, mg mL^{-1}
0	0.046666	2.187584
1.5	0.101678	2.082808
3	0.212959	1.752081
4.5	0.418738	1.013999
6	0.819527	0

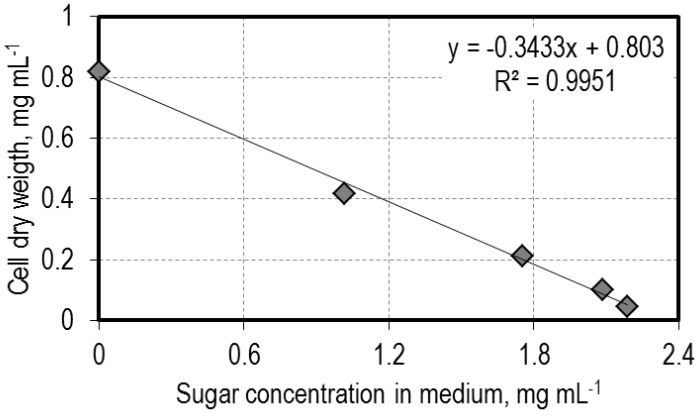


Fig A1: Die Verstofwechselung der Kohlenstoffquelle wurde mit zunehmender Biotrockenmasse analysiert. Das resultierende Verhältnis dieser beiden Größen wird als Biomasseausbeute Y_{XS} bezeichnet.

3. MATLAB-Protokoll zur Durchführung einer Zulaufkultivierung

Folgendes MATLAB-Skript zur Durchführung einer Zulaufkultivierung wurde dem Manuskript ‘An automated and parallelised DIY-dosing unit for individual and complex feeding profiles: Construction, validation and applications’ entnommen [191].

1. Speichere die Funktion ‘set_rotation.m‘ als ein separates MATLAB file und passe die Parameter von Interesse an:

```
function y = set_rotation (tt,mue)

%%% PARAMETERS MUST BE ADJUSTED %%%
mue = 0.5;  % 1/h, set growth rate
cs0 = 18;    % mg/ml, substrate concentration
cx0 = 0.04;  % mg/ml, starting cell concentration
lv = 8;      % mm/ml, length per 146olume for syringe
rl = 90;     % degree/mm rotation in degrees per length
gdf = 576;   % -, gear-down factor (slow down)
VR= 50;      % ml, starting volume
Yxs = 0.35;  % g(x)/g(s), cell yield

y =(cx0*VR/(Yxs*cs0))*(exp(mue*(tt./3600))-1)*lv*rl*gdf;%°,rotation
end
```

2. Nach der Installation des MATLAB Support Package for LEGO-MINDSTORMS EV3 Hardware muss der EV3-Stein mit dem MATLAB-Programm verbunden werden.

   Hierfür sind drei Optionen verfügbar:

```
% Wifi connection:
myev3 = legoev3('wifi','IP address,'BrickID');
% Bluetooth connection:
myev3 = legoev3('Bluetooth','portname');
% USB connection:
myev3 = legoev3 ('USB');
```

3. Anschließend müssen die Servomotoren den LEGO-Eingängen zugeordnet werden.

```
Mymotor = motor(myev3,'A'); % connection ports A,B,C or D
```

   Um mehr als einen Motor verbinden zu können, müssen die Motoren benannte warden und die Nomenklatur im gesamten Skript angepasst werden:

```
mymotorA = motor(myev3,'A'); % connection ports A,B,C or D
mymotorB = motor(myev3,'B'); % connection ports A,B,C or D
```

4. Wähle die Wachstumsrate sowie die Prozessdauer. Führe das Programm aus. Dieses wird den Motor starten und die Motorleistung durch einen ständigen Vergleich der geforderten Rotation mit der tatsächlichen Rotation anpassen:

```
%%% PARAMETERS MUST BE ADJUSTED %%%
mue = 0.5;              % 1/h, set growth rate
t_end = 10;             % min process time
mymotor.Speed = 5;       % initial motorspeed

%start values
resetRotation(mymotor)  % set rotation counter to zero
tic                     %start counter
tt = toc;
rotation = 0;
I = 1;
% plot
m_rot = zeros(floor(t_end*1.1),1);
plot(0:100:6000, set_rotation(0:100:6000,mue));
```

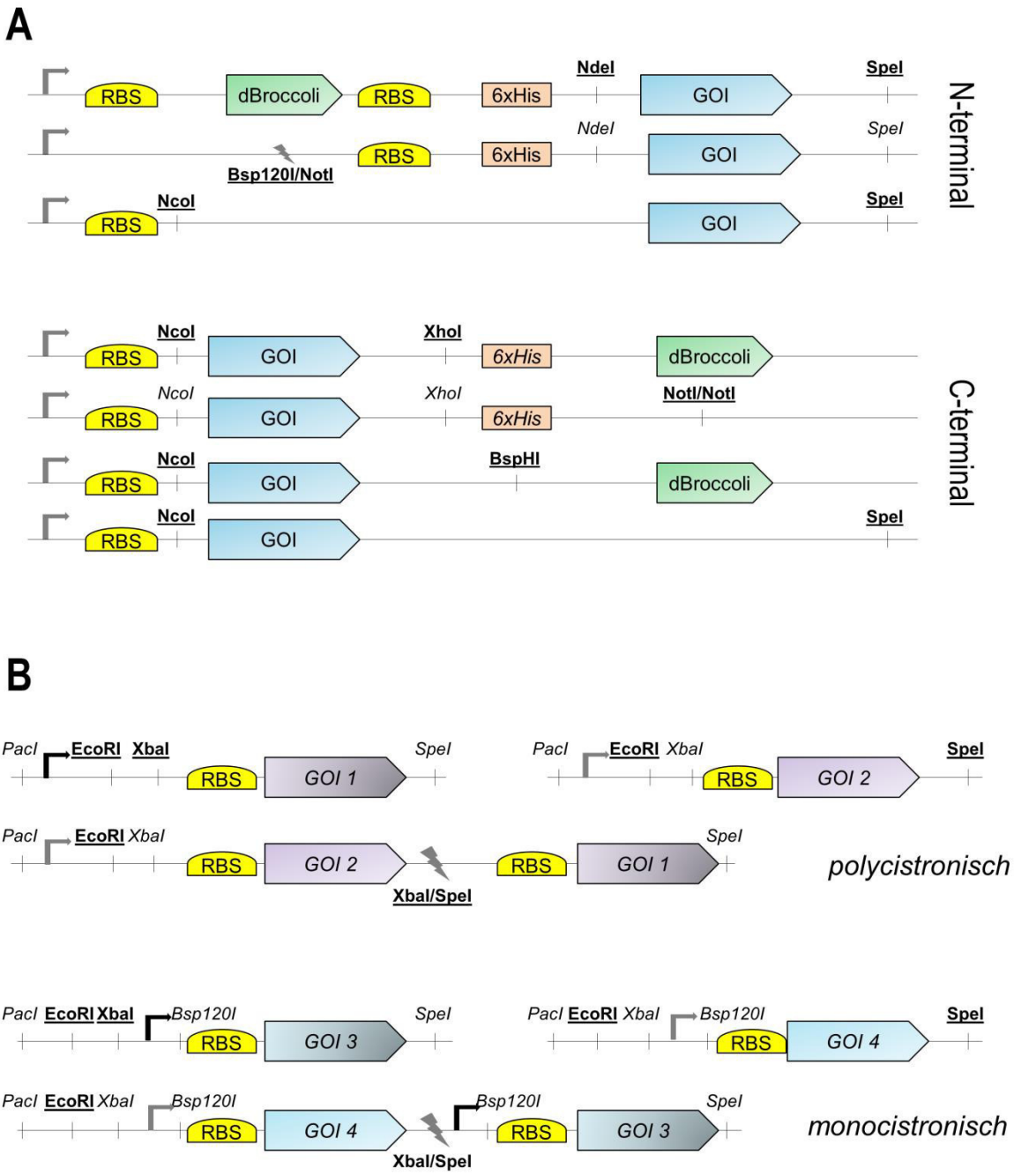
```
Fig
axis([0 (t_end+1)*60 0 set_rotation((t_end+1)*60, mue) ]);
xlim([0 (t_end+1)*60]);
ylim([0 set_rotation((t_end+1)*60,mue)]);
hold on
plot(gca,0, 0, 'ro', 0, 0, 'bs');
hold on

% process loop
while(tt < t_end*60)
    m_rot(i) = mymotor.Speed;
    I = i+1;
    start(mymotor);%Start
    pause(27);
    stop(mymotor);
    pause(3);
    rotation = readRotation(mymotor);
    tt = toc;
    plot(gca,tt, rotation, 'ro', tt, set_rotation (tt,mue), 'bs');
    hold on

%%% adjust motor-speed %%%
    if(rotation > set_rotation (tt,mue))
        if(mymotor.Speed <= 5)
             mymotor.Speed = 0;
        else mymotor.Speed = mymotor.Speed-1;
        end
    else mymotor.Speed = mymotor.Speed+1;
        if(mymotor.Speed >= 90)
           mymotor.Speed = 90;
        end
    end
end
stop(mymotor);
```

4. Mögliche Plasmidkofigurationen des pTRA-Konstruktes

Abbildung wurde der Publikation ‘pTRA – A reporter system for monitoring the intracellular dynamics of gene expression’ entnommen [193]. Die hier gezeigten Konstukte ermöglichen das Gen von Interesse (GOI) unterschiedlich auf mRNA und Proteinebene zu markieren (A). Außerdem können mit der in (B) gezeigten Klonierungsstrategie mehrere Gene oder Pathways untersucht werden.



5. Berechnung der Dynamik des Gleichgwichtszustandes

Um vor allem die Auswirkung von Halbwertszeiten auf den Gleichgewichtszustand der intrazellulären mRNA und Proteine untersuchen zu können wurden folgende Betrachtungen durchgeführt:

Die Konzentration eines Moleküls P unterliegt folgender Dynamik:
$\xrightarrow{k_{P+}} P \xrightarrow{k_{P-}\&\mu}$

Dies lässt sich als Differentialgleichung (DGL) formulieren:
$\dot{P} = k_{(P+)} - k_{(P-)} \cdot P - \mu \cdot P$

Am Gleichgewicht $\dot{P} = 0$ gilt
$0 = k_{(P+)} - k_{(P-)} \cdot P - \mu \cdot P$
$k_{(P+)} = k_{(P-)} \cdot P + \mu \cdot P$
Die Molekülkonzentration im Gleichgewicht ist also eine Funktion der Raten:

$$P = \frac{k_{P+}}{k_{P-} + \mu}$$

Bringt man die DGL in die Form $y' + g(x) \cdot y = h(x)$ mit der Vereinfachung $k = k_{(P-)} + \mu$:
$\dot{P} + k \cdot P = k_{(P+)}$
Dann lautet die inhomogene Lösung der Gleichung:

$$y = c(x) * y_h = y_h * \int h(x)/y_h \, dx + D$$

Übertragen auf die Betrachtete Moleküldynamik P lässt sich folgende Lösung der Gleichung finden:

$$P = C * e^{-k*t} * \left[\int k_{p+}/(C * e^{-k*t}) \, dt + D\right] = e^{-k*t} * \left[\frac{k_{p+}}{k} * e^{k*t} + C * D\right] = \frac{k_{p+}}{k} + e^{-k*t} * C * D$$

$$P = \frac{k_{p+}}{k} + e^{-k*t} * C * D$$

Um die Konstanten zu definieren wurde der Zeitpunkt $t = 0$ betrachtet:
$P(0) = \frac{k_{p+}}{k} + e^{-k*0} * C * D = \frac{k_{p+}}{k} + C * D$
$C * D = -\frac{k_{p+}}{k}$

Für die Molekülkonzentration P am Zeitpunkt t gilt also:

$$P(t) = \frac{k_{p+}}{k} + e^{-k*t} * (-\frac{k_{p+}}{k})$$

Betrachtet man zur Verifizierung die Lösung der Differenzialgleichung im Unendlichen, dann erhält man die bereits oben gezeigte Molekülkonzentration am Gleichgewicht:
$P(\infty) = \frac{k_{p+}}{k} + e^{-k*\infty} * (-\frac{k_{p+}}{k}) = \frac{k_{p+}}{k} = \frac{k_{p+}}{k_{(P-)} + \mu}$
Für die Halbmaximalesättigung $P_{1/2}$ bedeutet dies eine Molekülkonzentration von:

$$P_{1/2} = \frac{1}{2} * \frac{k_{P+}}{k_{P-} + \mu}$$

Es kann also berechnet werden zu welchem Zeitpunkt eine bestimmte Molekülkonzentration vorliegt:

$$t = \frac{1}{k} * ln\frac{1}{1 - P(t) * \frac{k}{k_{P+}}} = \frac{1}{k} * [\ln(1) - \ln\left(1 - P(t) * \frac{k}{k_{P+}}\right) = -\frac{\ln\left(1 - P(t) * \frac{k}{k_{P+}}\right)}{k}$$

Geht man bei der Abbaudynamik von einem exponentiellen Verfall aus, dann ergibt sich die Gleichung:

$P = P_0 * e^{-t*k_{P-}}$

Betrachtet man den Zeitpunkt τ, an welchem die Hälfte der Moleküle P zerfallen ist, findet sich folgender Zusammenhang:

$P_\tau = P_0 * \frac{1}{2}$

$P_0 * \frac{1}{2} = P_0 * e^{-\tau*k_{P-}}$

$$\frac{1}{2} = e^{-\tau*k_{P-}} \quad \Rightarrow \quad k_{P-} = \frac{ln2}{\tau}$$

Für die Halbmaximalesättigung $P_{1/2}$ bis zum Erreichen des Gleichgewichts einer Reaktion gilt dann:

$$P_{1/2} = \frac{1}{2} * \frac{k_{P+}}{k_{P-} + \mu} = \frac{1}{2} * \frac{k_{P+}}{\frac{ln2}{\tau} + \mu}$$

- Dies bedeutet bei τ gegen ∞, dass $t_{1/2}$ vom Verhältnis $\frac{k_{P+}}{\mu}$ abhängt
- Dies bedeutet bei τ gegen 0 dass $t_{1/2}$ gegen 0 geht

Für mit Hilfe der oben gezeigten Gleichung kann der Zeitpunkt $t_{1/2}$ des Erreichens der Halbmaximale Sättigung $P_{1/2}$ berechnet werden:

$$t_{1/2} = -\frac{\ln\left(1 - \frac{1}{2} * \frac{k_{P+}}{k} * \frac{k}{k_{P+}}\right)}{k} = -\frac{\ln\left(\frac{1}{2}\right)}{k} = \frac{ln2}{k} = \frac{ln2}{k_{(P-)} + \mu}$$

Für $k_{P-} = \frac{ln2}{\tau}$ gilt

$$t_{1/2} = \frac{ln2}{k_{(P-)} + \mu} = \frac{ln2}{\frac{ln2}{\tau} + \mu}$$

- Dies bedeutet bei τ gegen ∞, dass $t_{1/2}$ sich $\frac{ln2}{\mu}$ annähert
- Dies bedeutet bei τ gegen 0 dass $t_{1/2}$ sich 0 annähert

6. Extraktion des grünen Fluoreszenzsignals aus der Autofluoreszenz

Folgendes MATLAB-Skript wurde aus der Publikation ‘pTRA – A reporter system for monitoring the intracellular dynamics of gene expression’ [197] für die Extraktion einer grünen Fluoreszenz aus der zellulären Autofluoreszenz adaptiert.

1. Füge die Rahmenbedingungen hinzu:

```
%order of data (dye,inducer):
number_of_replicates=xxx;%replicates
position_of_control=xxx;%control=(+,-)
position_of_test_strain=xxx;%test strain=(+,+)

start_point=xxx;%first time point of interest [h]
induction_time_point=xxx;%first time point after induction [h]
end_point=xxx;%last time point of interest [h]
clone_number=xxx;%choose replicate that should be analysed
```

2. Gib die gemessenen Daten ein. MATLAB orientiert sich nach dem Starten des Programmes nach den unter 1. vorgegebenen Parametern:

```
%add data
%avoid matrix dimension mismatch and replace 'overflow' with NaN
Time=[xxx]
OD=[xxx]
RLU485_520=[xxx]

%identification of relevant position in data matrix
i=number_of_replicates-clone_number;
%control w/o dye w/o induction
control=[position_of_control*number_of_replicates-i];
%data with dye with induction
dataset=[position_of_test_strain*number_of_replicates-i];

x=find(Time>=start_point,1);
y=find(Time>=induction_time_point,1);
z=find(Time>=end_point,1);

%add your CDW-OD correlation CDW [mg mL-1]=a*OD+b
%to use OD values write CDW=OD
CDW=OD
```

3. Die grüne Fluoreszenz wird von autofluoreszenz und Quenchingsignalen bereinigt

```
%%GREEN FLUORESCENCE CAUSED BY AUTOFLUORESCENCE AND QUENCHING%%
calculated_Broccoli= RLU485_520(dataset,x:z)
%uninduced
    %f(x) = a*exp(b*x) + c*exp(d*x)
    f = fit(CDW(control,x:y-1)', RLU485_520(control,x:y-1)',
'exp2');
    [fitresult, gof]=fit(CDW(control,x:y-1)',
RLU485_520(control,x:y-1)',f );
    %Fit model to data
    %Parameters of fit
```

```
    f1=f.a;
    f2=f.b;
    f3=f.c;
    f4=f.d;
calculated_Autofluorescence=f1*exp(f2*CDW(dataset,x:y-
1))+f3*exp(f4*CDW(dataset,x:y-1));
calculated_Broccoli(1:y-x))=(calculated_Broccoli(1:y-x))-
calculated_Autofluorescence);

%induced
    %f(x) = a*exp(b*x) + c*exp(d*x)
    g = fit(CDW(control,y:z)', RLU485_520(control,y:z)', 'exp2');
    [fitresult, gof] = fit( CDW(control,y:z)',
RLU485_520(control,y:z)',f);
    % Fit model to data
    %Parameters of fit
    g1=g.a;
    g2=g.b;
    g3=g.c;
    g4=g.d;
calculated_Autofluorescence=
g1*exp(g2*CDW(dataset,y:z))+g3*exp(g4*CDW(dataset,y:z));
calculated_Broccoli(y-x+1:z-x+1)=(calculated_Broccoli(y-x+1:z-
x+1)-calculated_Autofluorescence)
```

4. Das berechnete Signal wird visualisiert

```
%calculated Broccoli signal over time
figure
plot(Time(x:z), calculated_Broccoli);
xlabel('Time, [h]');
ylabel('calculated Broccoli, [a.u.]');
%export_fig 'path\name.filetype' -nocrop -transparent

%fit of autofluorescence
figure
plot(f, CDW(control,x:y), RLU485_520(control,x:y));
xlabel('CDW, [mg mL-1]');
ylabel(,RLU485/520, [a.u.]');
hold
plot(g, CDW(control,y:z), RLU485_520(control,y:z));
xlabel('CDW, [mg mL-1]');
ylabel(,RLU485/520, [a.u.]');
%export_fig 'path\name.filetype' -nocrop -transparent

%solution can be found in workspace as 'calculated_Broccoli'
%Figures can be exported via the plug-in export_fig
```

7. Berechnung des Energiebedarfs des Plasmides

Folgende Berechnung findet sich ebenfalls im Manuskript 'An automated and parallelised DIY-dosing unit for individual and complex feeding profiles: Construction, validation and applications' [191].

Unterschiedliche Biomasseausbeuten ergeben sich aus dem Ressourcenbedarf. Im Fall heterolog belasteter Zellen, werden Ressourcen für zusätzliche Aufgaben rekrutiert und stehen daher für Wachstumsprozesse nicht mehr zur Verfügung. Die Berechnungen für den Energiebedarf der heterologen Ladung wurden vereinfacht durch die Annahme, dass die Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel $q_{S,maintenance}$ deutlich kleiner ist als die Substrataufnahme für wachstumsassoziierte Prozesse $q_{S,\mu}$ und daher vernachlässigt werden kann. Auch die Nebenproduktbildung wurde in diesen Berechnungen nicht einbezogen, da diese, wie in Kapitel 4.4.3 gezeigt, in Substrat-limitierten Prozessen deutlich reduziert stattfindet.

Parameter

$q_{S,total} = Gesamtsubstrataufnahmerate$, $mg_{Substrat}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$
$\mu_{WT} = Wachstumsrate\ des\ Wildtypstammes$, h^{-1}
$Y_{XS,WT} = Biomasseausbeute\ des\ Wildtypstammes$, $mg_{CDW}\ mg_{Substrate}^{-1}$
$q_{S,\mu} = Wachstumsspezifische\ Substrataufnahmerate$, $mg_{Substrate}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$

$\mu_{loaded} = Wachstumsrate\ des\ beladenen\ Stammes$, h^{-1}

$Y_{XS,loaded} = Biomasseausbeute\ des\ beladenen\ Stammes$, $mg_{CDW}\ mg_{Substrate}^{-1}$

$q_{S,load} = Ladungsspezifische\ Substrataufnahmerate$, $mg_{Substrate}\ mg_{CDW}^{-1}\ h^{-1}$

Herleitung

Im Allgemeinen kann die Wachstumsrate μ durch eine konstante Biomasseausbeute Y_{XS} und eine spezifische Substrataufnahmerate $q_{S,total}$ beschrieben werden:

$$\mu = Y_{XS} * q_{S,total}$$

Im Falle eines uninduzierten heterolog beladenen Stammes ist die Replikation des Plasmides Teil des zellulären Wachstums. Aus diesem Grund beinhaltet die Gesamtsubstrataufnahmerate $q_{S,total}$ den ladungsspezifischen Bedarf $q_{S,load}$ zusätzlich zum wachstumsspezifischen Bedarf $q_{S,\mu}$. Basierend auf den in Abbildung 5.33 gezeigten Daten, wurde die Annahme getroffen, dass der dem Plasmid zugrunde liegende Energiebedarf in einem linearen Zusammenhang mit der Wachstumsrate steht.

$$q_{S,total} = q_{S,\mu}(+q_{S,load})$$

Für Wildtypstämme mit der Wachstumsrate μ_{WT} kann die Gesamtaufnahmerate $q_{S,total}$ näherungsweise als wachstumsspezifische Substrataufnahmerate $q_{S,\mu}$ beschrieben werden. Um das Wachstum μ_{loaded} mit dieser wachstumsspezifischen Aufnahmerate in beladenen Stämmen zu beschreiben, muss die ladungsspezifische Aufnahmerate $q_{S,load}$ ebenfalls miteinbezogen werden.

$$\mu_{WT} = Y_{XS,WT} * q_{S,\mu}$$

$$\mu_{loaded} = Y_{XS,loaded} * (q_{S,\mu} + q_{S,load})$$

Bei der Betrachtung der Stämme bei gleichen Wachstumsraten $\mu_{WT} = \mu_{loaded}$ basierend auf den bestimmten Biomasseausbeuten $Y_{XS,WT}$ und $Y_{XS,loaded}$ kann der Ladungspezifische Substratbedarf $q_{S,load}$ berechnet werden.

$$Y_{XS,WT} * q_{S,\mu} = Y_{XS,loaded} * q_{S,\mu} + Y_{XS,loaded} * q_{S,load}$$

$$q_{S,load} = q_{S,\mu} * \frac{Y_{XS,WT} - Y_{XS,loaded}}{Y_{XS,loaded}}$$

By adding the slopes, measured in Fig 9B an energy demand $q_{S,load}$ for the plasmid of 33 % $q_{S,\mu}$ was calculated.

$$q_{S,load} = q_{S,\mu} * \frac{0.36 - 0.27}{0.27} = q_{S,\mu} * 0.33$$

8. Extraktion des dBroccoli-Signals

Folgendes MATLAB-Skript wurde in der Publikation ‘pTRA – A reporter system for monitoring the intracellular dynamics of gene expression’ veröffentlicht [193].

```
clear all; close all;

%order of data (dye,inducer):
number_of_replicates=xxx;%replicates
position_of_control=1;%control=(+,-)
position_of_test_strain=2;%test strain=(+,+)

start_point=xxx;%first time point of interest [h]
induction_time_point=xxx;%first time point after induction [h]
end_point=xxx;%last time point of interest [h]
clone_number=xxx;%choose replicate that should be analysed

%add data
%avoid matrix dimension mismatch and replace ‘overflow’ with NaN
Time=[xxx];
OD=[xxx];
RLU485_520=[xxx];

%identification of relevant position in data matrix
i=number_of_replicates-clone_number;
%control w/o dye w/o induction
control=[position_of_control*number_of_replicates-i];
%data with dye with induction
dataset=[position_of_test_strain*number_of_replicates-i];

x=find(Time>=start_point);
y=find(Time>=induction_time_point);
z=find(Time>=end_point);

%add your CDW-OD correlation CDW [mg mL-1]=a*OD+b
%to use OD values write CDW=OD
CDW=OD

%%%GREEN FLUORESCENCE CAUSED BY AUTOFLUORESCENCE AND QUENCHING%%%
calculated_Broccoli= RLU485_520(dataset,x:z)

%uninduced
    %f(x) = a*exp(b*x) + c*exp(d*x)
    f = fit(CDW(control,x:y)', RLU485_520(control,x:y)', 'exp2');
    [fitresult, gof]=fit(CDW(control,x:y)', RLU485_520(control,x:y)',f );
    %Fit model to data
    %Parameters of fit
    f1=f.a;
    f2=f.b;
    f3=f.c;
    f4=f.d;

calculated_Autofluorescence=f1*exp(f2*CDW(dataset,x:y))+f3*exp(f4*CDW(datas
et,x:y));
```

```
calculated_Broccoli(x:y)=(calculated_Broccoli(x:y)-
calculated_Autofluorescence);

%induced
    %f(x) = a*exp(b*x) + c*exp(d*x)
    g = fit(CDW(control,y:z)', RLU485_520(control,y:z)', 'exp2');
    [fitresult, gof] = fit( CDW(control,y:z)', RLU485_520(control,y:z)',f);
    % Fit model to data
    %Parameters of fit
    g1=g.a;
    g2=g.b;
    g3=g.c;
    g4=g.d;
    calculated_Autofluorescence=
g1*exp(g2*CDW(dataset,y:z))+g3*exp(g4*CDW(dataset,y:z));
calculated_Broccoli(y:z)=(calculated_Broccoli(y:z)-
calculated_Autofluorescence)

%calculated Broccoli signal over time
figure
plot(Time(x:z), calculated_Broccoli);
xlabel('Time, [h]');
ylabel('calculated Broccoli, [a.u.]');
%export_fig 'path\name.filetype' -nocrop -transparent

%fit of autofluorescence
figure
plot(f, CDW(control,x:y), RLU485_520(control,x:y));
xlabel('CDW, [mg mL-1]');
ylabel('RLU485/520, [a.u.]');
hold
plot(g, CDW(control,y:z), RLU485_520(control,y:z));
xlabel('CDW, [mg mL-1]');
ylabel('RLU485/520, [a.u.]');
%export_fig 'path\name.filetype' -nocrop -transparent

%solution can be found in workspace as 'calculated_Broccoli'
%Figures can be exported via the plug-in export_fig
```

9. Mögliche Schwankungen in der Ressourcenverfügbarkeit

Wie in Abbildung A.3-A vereinfacht am Beispiel der Ribosomen dargestellt, wird der Pool an verfügbaren Ressourcen durch eine positive Rückkopplung von der Wachstumsrate μ gesteuert. Generell spielen positive Rückkopplungsschleifen eine tragende Rolle in der Genregulation [256]. Ein wichtiger Aspekt dieser Art von Genregulation ist, dass Bistabilität vermittelt werden kann und viele Schlüsselprozesse im Zellzyklus hierüber kontrolliert werden. Gerade bei über die Population gemittelten Werten wie der Wachstumsrate kann es sein, dass bei einer konstanten teilungsinaktiven Population diese Bistabilität beziehungsweise Heterogenität innerhalb einer Probe nicht wahrgenommen wird.

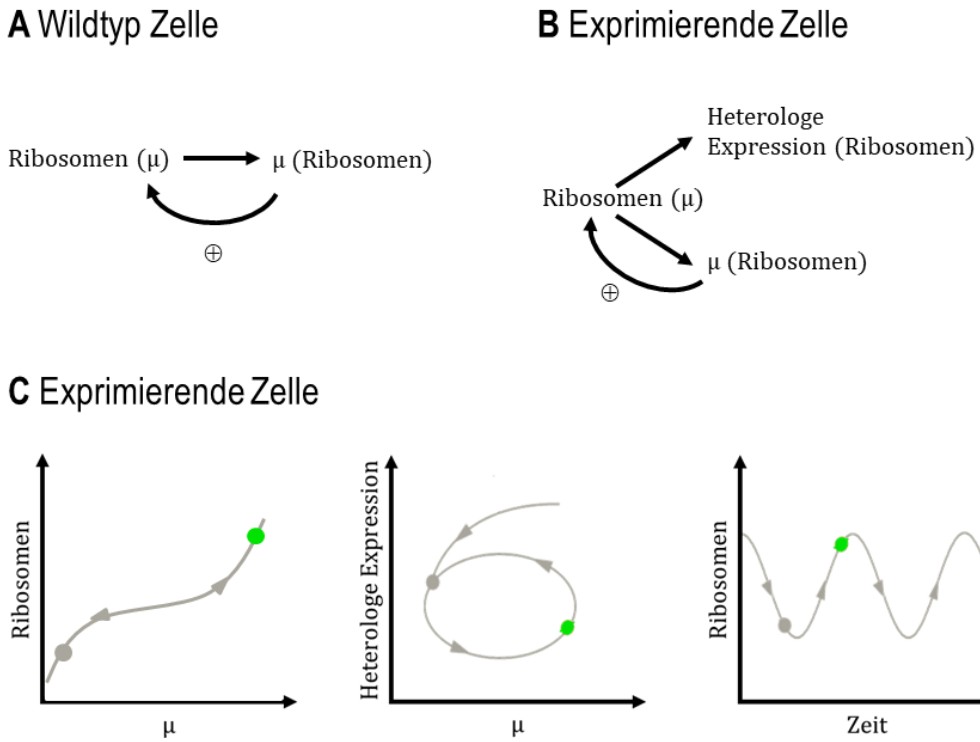


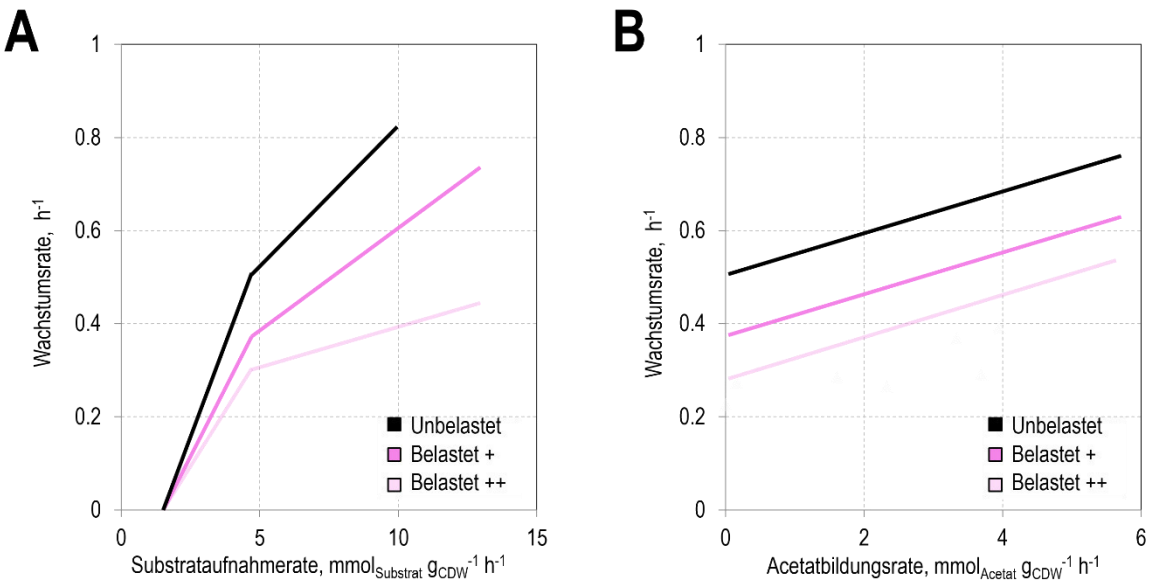
Abbildung A.3 Essenzielle zelluläre Ressourcen, wie beispielsweise Ribosomen, bedingen nicht nur das Wachstum, sondern sind auch wachstumsabhängig. Die Regulierung dieses Wachstumsraten-Ribosomen-Verhältnisses für Wildtypzellen lässt sich reduzieren zu dem in (A) gezeigten Regulationsschema. (B) In genetisch veränderten Organismen muss in dieses Bild zusätzlich der Faktor heterologe Expression eingebracht werden. (C) Die sich daraus ergebenden Beziehung zwischen der absoluten Ribosomenzahl und der Wachstumsrate pro Zelle bleibt in der prinzipiellen Dynamik unverändert (C, links). In der Theorie sind daher auch innerhalb der exponentiellen Phase bei hohen (grüner Punkt) beziehungsweise niedrigen Wachstumsraten (grauer Punkt) unterschiedliche Ausprägungen der Parameter zu erwarten. Anstelle einer einfachen Ruhelage ist es für die Zielgrößen heterologe Expression und Wachstumsrate μ möglich, dass ein periodischer Verlauf auftritt (C, mitte). Für den Parameter Ribosomenzahl wäre dann pro Zelle über die Zeit mit einem oszillierenden Verlauf zu rechnen (C, rechts).

Bezogen auf das Wachstum ist eine Möglichkeit, dass eine derartige Heterogenität in den Umschaltprozess von der lag-Phase zur exponentiellen Phase involviert sein kann. Ist dies der Fall wird - sobald ein bestimmter Schwellenwert an Ribosomen überschritten wird - das Wachstum auf das Maximalmögliche hochgefahren. Im Fall heterolog-belasteter Zellen beinhaltet dieser Prozess eine Dimension mehr (Abbildung 5.18-B). Wird das in Abbildung A.3-A beschriebene Regulationsschema durch eine Metabolische Belastung perturbiert, können sich nicht nur

Bistabilitäten ausbilden [257], sondern die Zellen bewegen sich unter Umständen nicht länger bis zur Ruhelagen auf diese zu. Sind mehrere interagierende Komponenten beteiligt, können die Dynamiken periodisch sogenannte Grenzzyklen durchlaufen (Abbildung A.3-C, mitte). Eine periodische Änderung der Wachstumsraten würde dazu führen, dass auch die Anzahl der Ribosomen um die zugehörige Ruhelage oszilliert (Abbildung A.3-C, rechts). Ist mehr als eine Ruhelage vorhanden, können sich die Zellen einer Population auf unterschiedlichen Grenzzyklen um diese Ruhelagen bewegen.

10. Erwartete Verläufe der Biomasseausbeuten und Acetatlinien

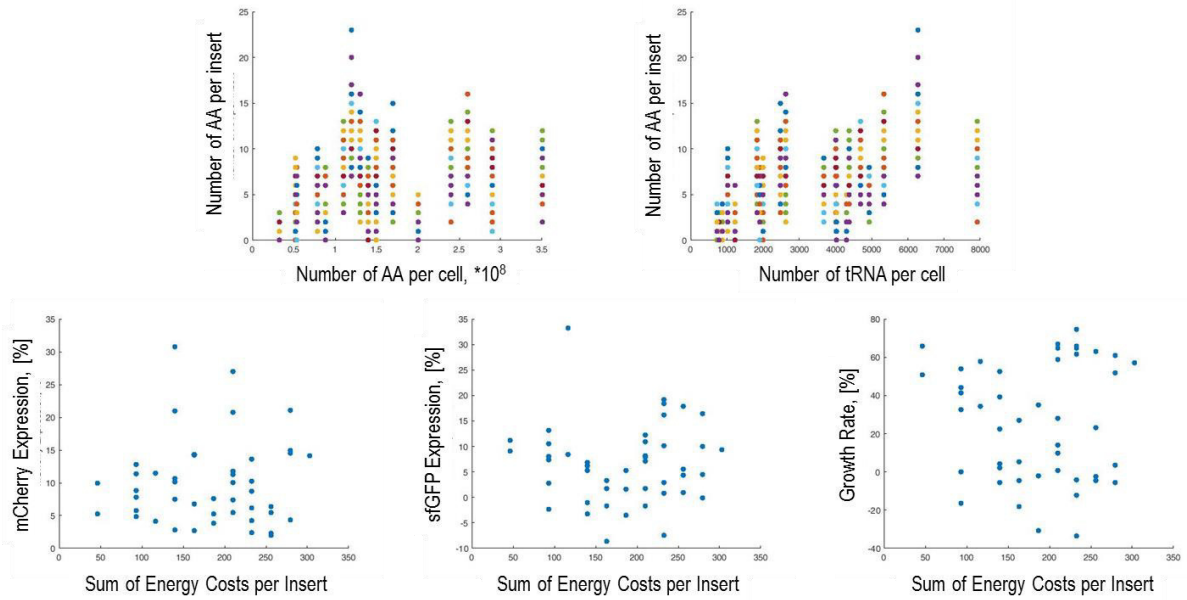
Skizziert man die theoretisch erwarteten Verläufe des Zusammenhanges Substrataufnahme und Wachstum (A) beziehungsweise Acetatbildungsrate und Wachstum (B) wäre folgendes Bild zu erwarten: Mit steigender Substrataufnahmerate kann von der Zelle mehr Wachstum realisiert werden. Unbelastete Zellen können im Vergleich mit heterolog belasteten Zellen jedoch aus derselben Aufnahmerate mehr Wachstum generieren. Dies ist darin begründet, dass heterolog produzierende Zellen zusätzliche Aufgaben mit der aufgenommenen Kohlenstoffquelle bewältigen müssen. Kann die Energiegewinnung durch aerobe Atmung nicht weiter gesteigert werden, da ein Engpass im Stoffwechselweg auftritt, muss ab dieser kritischen Wachstumsrate die gemischte Säuregärung zugeschaltet werden. Dies bedingt jedoch eine geringere Biomasseausbeute und damit ein Abflachen der in (A) gezeigten Steigung.



11. Zusammensetzung und Kosten der randomisierten Sequenzen

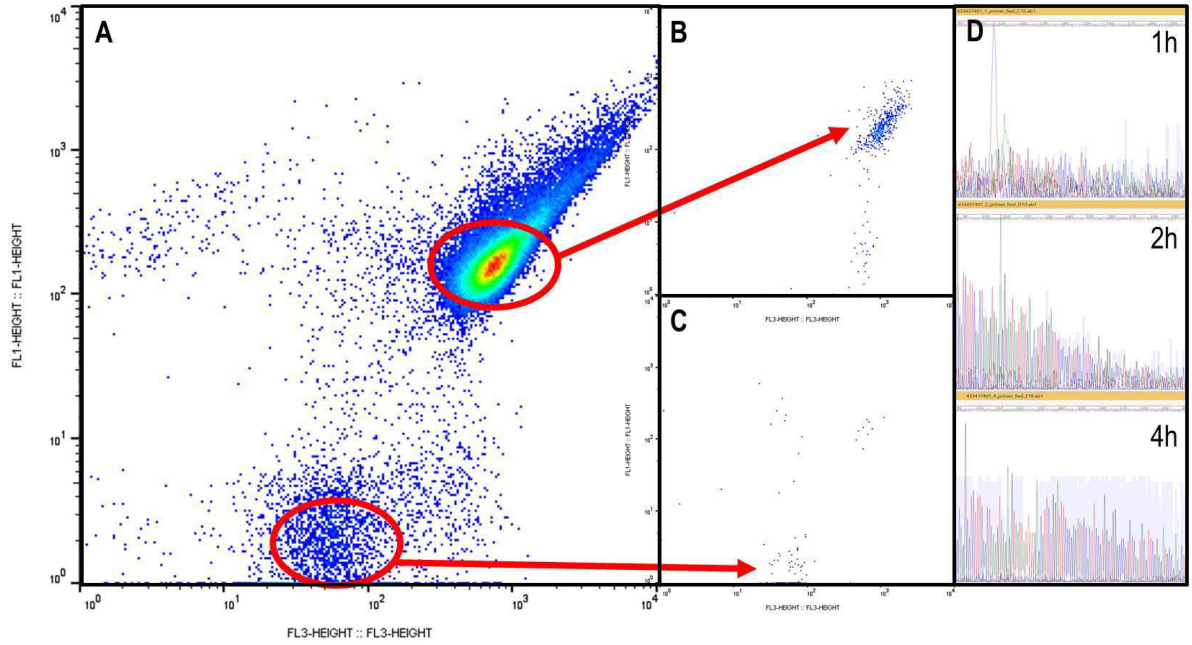
Obere Zeile:
Nach der Identifizierung und Sequenzierung von 56 unterschiedlichen Klonen aus der Zufallspeptidbibliothek, konnten die Stämme auf verschiedene Korrelationen hin getestet werden. Analysiert wurden zum einen, ob die Anzahl der Aminosäuren pro Insert in einem Zusammenhang mit der Aminosäureverfügbarkeit pro Zell oder auch der tRNA-Verfügbarkeit pro Zelle in Zusammenhang steht. Hier konnte keine Korrelation festgestellt werden.

Untere Zeile
Außerdem wurden überprüft, ob die gemessenen Leistungsindikatoren heterologe Expression, Kapazität und Wachstum mit zunehmenden Energiekosten der Insertherstellung abnehmen. Dies konnte nicht bestätigt werden.



12. Entwicklung der Mischkulturzusammensetzung über die Zeit

Eine Mischkultur aus zwei Stämmen mit unterschiedlichen Expressionraten des heterologen mCherry-Konstruktes wurde basierend auf dem Histogramm der roten Fluoreszenz in zwei Klassen sortiert. Parallel wurde der Sortiererfolg im FL1-FL3-Plot überprüft. (A) Die FL1-FL3-Auftragung der Mischkultur nach 6 Stunden Induktion zeigt eine klare Trennung von Stamm 288 ‚mm' und DH10B ‚66'. (B) Der Hauptanteil der sich nach dem Sortierverfahren im rechten Sortierfenster befindenen Zellen konnte als Stamm 288 ‚mm' identifiziert werden. Dies wurde anhand des exprimierten sfGFPs überprüft. (C) Die nach links sortierten Zellen enthielten hauptsächlich den nicht FL1-fluoreszierenden Stamm DH10B ‚66'. (D) Die mit der Mischkultur durchgeführte Sequenzierung zeigte über die Zeit für den dominierenden Stamm 288 ‚mm' eine Zunahme der Sequenzreinheit, die als Maß für die Präsenz des jeweiligen Konstruktes genommen werden kann.



A.4 Medien und Puffer

LB-Medium

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Hefeextrakt	5 g L^{-1}
NaCl	10 g L^{-1}
Pepton aus Casein	10 g L^{-1}

Optional für LB-Agar Platten wurde 15 g L-1 Agar-Agar zugegeben und sofort nach dem Sterilisationsprozess in Petrischalen portioniert. Die Antibiotikazugabe erfolgte nach dem Abkühlen auf Handwärme

SOB

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Hefeextrakt	5 g L^{-1}
KCl	2.5 mM
NaCl	0.5 g L^{-1}
Trypton	20 g L^{-1}

Ein pH von 7.0(25 °C) wurde mit NaOH eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 10 mM sterilfiltriertes $MgCl_2$ zugesetzt.

SOC

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
SOB	-
Glucose	20 mM

Minimalmedium

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
10x Salzlösung	100 mL L^{-1}
$MgSO_4$ 1 M	2 mL L^{-1}
500x Spurenelementlösung	2 mL L^{-1}
Kohlenstoffquelle	20 mM

Alle Vorkulturen wurden initial in Luria-Bertani (LB) Medium kultiviert [258]. Das verwendete Minimalmedium bestand aus einer mit Spurenelementen angereicherten Salzlösung und 20 mM Kohlenstoffquelle. Der pH konnte durch die Zugabe von 2.4 g L^{-1} NaOH auf 7.4 (25 °C) zu der Salzlösung ($(NH_4)_2HPO_4$ 4 g L^{-1}, KH_2PO_4 13.3 g L^{-1}) eingestellt werden [259]. Falls es notwendig war wurde der pH zusätzlich mit NaOH nachtitriert. Die Spurenelemente ohne Kohlenstoffquelle konnten nach Hiller *et al.* [260] mit Abweichungen in den Konzentrationen $CaCl_2$ (0.168 mM) und $MgSO_4$ (2 mM) präpariert werden.

Alle Lösungen wurden einzeln autoklaviert, um ein Ausfallen der Komponenten zu vermeiden. Außerdem wurde aus diesem Grund ein Aufeinandertreffen hoher lokaler Salzkonzentrationen vermieden.

10x Salze Minimalmedium

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
$(NH_4)_2HPO_4$	40 g L^{-1}
KH_2PO_4	133 g L^{-1}
NaOH	24 g L^{-1}

Es wurde ein pH von 7.4 (25 °C) mit NaOH eingestellt und die Lösung autoklaviert.

500x Spurenelemente

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5 g L^{-1}
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25 g L^{-1}
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.125 g L^{-1}
$MnSO_4 \cdot 1H_2O$	1.25 g L^{-1}
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.875 g L^{-1}
H_3BO_3	0.0625 g L^{-1}
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	1.25 g L^{-1}
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25 g L^{-1}
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	9.15 g L^{-1}

Die Komponenten wurden einzeln gelöst und in möglichst guter Durchmischung vereinigt um hohe lokale Salzkonzentrationen zu vermeiden. Eine Ansäuerung mit HCL kann helfen die Komponenten in Lösung zu halten.

Supplementiertes Minimalmedium

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
5x M9 Salz BD Difco™	0.2 mL mL^{-1}
Thiamin	0.34 mg mL^{-1}
Casaminosäuren	0.2 % (w/v)
$MgSO_4$	2 mM
$CaCl_2$	0.1 mM
Kohlenstoffquelle	0.4 % (w/v)

TSS

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
LB pH 6.5	825 mL L^{-1}
PEG6000	100 g L^{-1}
DMSO	50 mL L^{-1}
$MgCl_2$	50 mM

10x PBS

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
NaCl	1.37 M
KCl	27 mM
Na_2HPO_4	100 mM
KH_2PO_4	18 mM

Es wurde ein pH von 7.4 (25 °C) mit HCl eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

10x TAE-Puffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Tris	400 mM
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	20 mM
Acetat	200 mM

5xLämmlipuffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Tris-HCL	300 mM
Glycerin	50 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
ß-Mercaptoenthanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0.05 % (w/v)

10x SDS-Laufpuffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
10 x SDS-PAGE Puffer (Roth, Produktnummer: 3060)	10 % (v/v)
Tris	250 mM
Glycin	1.92 M
SDS	1 % (w/v)

2x Sammelgel-Puffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Tris-HCl	250 mM
SDS	0,4 % (w/v)

4x Trenngel-Puffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Tris-HCl	1.5 M
SDS	0,8 % (w/v)

Fairbanks A

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Isopropanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blau R250	0.05 % (w/v)

Fairbanks B

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Isopropanol	10 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blau R250	0.095 % (w/v)

TBS-Puffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Tris	20 mM
NaCl	150 mM

pH 7.5

Towbin-Puffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Tris	25 mM
Glycin	192 mM

pH 8.3

Binde-Puffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Na_2HPO_4	10 mM
$NaH_2PO_4 * 2 H_2O$	10 mM
NaCl	49.5 mM
Imidazole	20 mM

pH 7.4

Elutions-Puffer

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Na_2HPO_4	10 mM
NaH_2PO_4 * 2 H_2O	10 mM
NaCl	49.5 mM
Imidazole	500 mM

pH 7.4

Quiagen P1

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
EDTA	10 mM
Tris-HCl	50 mM
RNAseA	100 µg mL^{-1}

pH 8.0

Quiagen P2

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

pH 8.0

Quiagen N3

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Guanidiniumchlorid CH_6ClN_3	4.2 M
CH_3CO_2K	
SDS	1 % (w/v)

pH 4.8 mit Eisessig

Quiagen PE

Inhaltsstoff / Chemikalie	Finale Konzentration
Tris-HCl	10 mM
Ethanol	80 % (v/v)

Wenn nicht explizit anders erwähnt wurde der Stamm HMS174(DE3) mit dem Ladungsplasmid pTRA641-51hd induziert mit 1.5 mM mTA als Standardmessetup verwendet. Uninduzierte Stämme wurden mit der gleichen Menge des Lösemittels DMSO versetzt.

Kapitel 4.1

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.1		pTRA641-dhhd			Leerplasmid zur Transkriptions- und Translationsanalyse basierend auf pSEVA641
4.2		pTRA641-51hd			Beispielplasmid, welches neben dem XylS/Pm Promotor ein His-getaggtes mCherry (C-terminal) sowie die dBroccoli-Sequenz (3'-Ende der mRNA) enthält
4.3-A	HMS174(DE3)	- (Wildtyp)	MTP; 200 µL	1	Vergleich der Autofluoreszenz mit und ohne Farbstoff
4.3-B	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	3	Fluoreszenz pro OD mit und ohne Farbstoff induziert und uninduziert
4.3-C	HMS174(DE3)	- (Wildtyp)	MTP; 200 µL	6	Entwicklung der Fluoreszenz mit steigender OD im induzierten und uninduzierten Fall
4.3-D	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	6	Entwicklung der Fluoreszenz mit steigender OD im induzierten und uninduzierten Fall
4.4	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	1	Abgleich der Fluoreszenz des induzierten und uninduzierten Stammes
4.5	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	3	Quantifizierung der heterologen Proteinmenge via Westernblot
4.6	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	3	Variabilität biologischer Replikate
4.7-A	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	3 biologische Replikate 7 technische Replikate mit unabhängiger Induktion	Variabilität ist nicht Messsetupbedingt, sondern rein biologisch
4.7-B	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	Je 1 Kultur	Keine Populationsbildung durch Plasmidverlust oder Ähnliches
4.8-A	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	Je 3	Einfluss des Induktors

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.8-B	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd; pTRA481-51hd	MTP; 200 µL	pTRA641-51hd * 3; pTRA481-51hd * 8	Einfluss des Plasmidrückgrades
4.8-C	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	Minimalmedium * 3; Casaminosäuren * 8	Einfluss der Aminosäureverfügbarkeit
4.9-A	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	Minimalmedium * 3; Casaminosäuren * 8	Korrelation Wachstumsrate und RNA-Produktion
4.9-B	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	Minimalmedium * 3; Casaminosäuren * 8	Korrelation Wachstumsrate und Protein-Produktion
4.9-C	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	pTRA641-51hd * 3; pTRA481-51hd * 8	Korrelation Wachstumsrate und RNA-Produktion
4.9-D	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP; 200 µL	pTRA641-51hd * 3; pTRA481-51hd * 8	Korrelation Wachstumsrate und Protein-Produktion
4.10-A	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pTRA641-51hd (RBS0) pTRA641-51hd (RBS1) pTRA481-51hd (RBS0) pTRA481-51hd (RBS1)	MTP, 200 µL	3	Standardabweichung mit zunehmender RNA-Produktionsrate für uninduzierte Stämme sowie mit 1.5 mM mTA oder 1.5 mM pTA induzierte Stämme
4.10-B	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pTRA641-51hd (RBS0) pTRA641-51hd (RBS1) pTRA481-51hd (RBS0) pTRA481-51hd (RBS1)	MTP, 200 µL	3	Standardabweichung mit zunehmender Proteinproduktionsrate für uninduzierte Stämme sowie mit 1.5 mM mTA oder 1.5 mM pTA induzierte Stämme

Kapitel 4.2

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.11		Kapazitätsmonitor			Visualisierung der Kapazität
4.12		pSEVA237R-xy			Ausgangsplasmid des Kapazitätsmonitors
4.13-A	HMS174	- (Wildtyp) pSEVA237R-01 (Leerplasmid) pSEVA237R-11 (*gyrBp*) pSEVA237R-21 (*helDp*) pSEVA237R-31 (*laclp*) pSEVA237R-41 (*proCp*)	bioREACTOR48; 12 mL 250 mL Schüttelkolben; 50 mL	Je 3* pro Zucker für 5 Stämme; Je 2* pro Zucker für 6 Stämme	Wachstumsraten für die jeweilige Zuckerquelle als Mittelwert aller Stämme für den bioREACTOR48 sowie im 50 mL Maßstab

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.13-B	HMS174	pSEVA237R-01 (Leerplasmid) pSEVA237R-11 (*gyrBp*) pSEVA237R-21 (*helDp*) pSEVA237R-31 (*laclp*) pSEVA237R-41 (*proCp*)	bioREACTOR48; 12 mL 250 mL Schüttelkolben; 50 mL	bioREACTOR48: Je 3* pro Zucker für 5 Stämme; Schüttelkolben: Je 2* pro Zucker für 6 Stämme	Wachstumsraten für die jeweilige Zuckerquelle als Mittelwert aller Stämme für den bioREACTOR48 sowie im 50 mL Maßstab
4.13-C	HMS174	- (Wildtyp) pSEVA237R-01 (Leerplasmid) pSEVA237R-11 (*gyrBp*) pSEVA237R-21 (*helDp*) pSEVA237R-31 (*laclp*) pSEVA237R-41 (*proCp*)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	Je 2* pro Zucker	Gleichmäßigkeit der Expression bei unterschiedlichen Zuckern als Kohlenstoffquelle
4.13-D	HMS174	- (Wildtyp) pSEVA237R-01 (Leerplasmid) pSEVA237R-11 (*gyrBp*) pSEVA237R-21 (*helDp*) pSEVA237R-31 (*laclp*) pSEVA237R-41 (*proCp*)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	Je 2* pro Zucker	4.12-C normiert auf *proCp*
4.14-A	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pSEVA237R-32 pTRA641-51hd pTRA641-51hd + pSEVA 237R-32	MTP, 200 µL	3	Einfluss der Expression auf die Wachstumsrate bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen
4.14-B	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pSEVA237R-32 pTRA641-51hd pTRA641-51hd + pSEVA237R-32	MTP, 200 µL	3	Einfluss der Kohlenstoffquelle und des Reporters auf die Expression
4.14-C	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pSEVA237R-32 pTRA641-51hd pTRA641-51hd + pSEVA237R-32	MTP, 200 µL	3	Einfluss der Kohlenstoffquelle und der Expression auf die Kapazität
4.14-D	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pSEVA237R-32 pTRA641-51hd pTRA641-51hd + pSEVA237R-32	MTP, 200 µL	3	Abnahme der Kapazität bei verschiedenen Stämmen und Kohlenstoffquellen

Kapitel 4.3

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.15	*E. coli* K12				*rplKp* Regulon
4.16-A	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	3	Mittels Westernblot abgeschätzte Anzahl an RNA-Polymerasen bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen nach 3.5 und 6.5 h
4.16-B	HMS174(DE3)	pSEVA237R-82 pSEVA237R-82 + pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3	Bildungsrate der RNA-Polymerase abgeschätzt mittels des Reporterplasmides 237R-82 für induzierte und uninduzierte Stämme mit und ohne Belastung
4.17	HMS174(DE3)	pSEVA237R-82 pSEVA237R-82 + pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3, Standardabweichung durch Ratenberechnung	Abhängigkeit der RNA-Polymerasebildung von der Wachstumsrate für Stämme, die das pTRA-Plasmid tragen bzw nicht tragen
4.18	*E. coli* K12				*rpsBp*-Regulon
4.19-A	HMS174(DE3)	- (Wildtyp) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	3	Mittels Westernblot abgeschätzte Anzahl an Ribosomen bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen nach 4 und 5.5 h
4.19-B	HMS174(DE3)	pSEVA237R-72 pSEVA237R-72 + pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3	Bildungsrate der Ribosomen abgeschätzt mittels des Reporterplasmides 237R-72 für induzierte und uninduzierte Stämme mit und ohne Belastung
4.20	HMS174(DE3)	pSEVA237R-72 pSEVA237R-72 + pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3, Standardabweichung durch Ratenberechnung	Abhängigkeit der Ribosomenbildung von der Wachstumsrate für Stämme, die das pTRA-Plasmid tragen bzw nicht tragen
4.21	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3	Verhalten des CDW, des heterologen mRNA-Signals sowie des heterologen Proteinsignals bei Zugabe von Thiolutin, Chloramphenicol oder beiden Expressionsinhibitoren gleichzeitig
4.22-A	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3, Standardabweichung nicht eingezeichnet	Effekt des RNA-Polymeraseinhibitors (0 bis 20 µg mL^{-1})Thiolutin auf das Wachstum

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.22-B	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3, Standardabweichung nicht eingezeichnet	Effekt des RNA-Polymeraseinhibitors (0 bis 20 µg mL^{-1})Thiolutin auf die heterologe mRNA-Bildung
4.22-C	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3, Standardabweichung nicht eingezeichnet	Effekt des RNA-Polymeraseinhibitors (0 bis 20 µg mL^{-1})Thiolutin auf die heterologe Proteinbildung
4.22-D	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3, Standardabweichung durch Ratenberechnung	Normalisierte Wachstumsrate der einzeln gezeigten Triplikate bei verschiedenen Thiolutinmengen
4.22-E	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3, Standardabweichung durch Ratenberechnung	Normalisierter Translationszugewinn der einzeln gezeigten Triplikate bei verschiedenen Thiolutinmengen
4.22-F	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	MTP, 200 µL	3, Standardabweichung durch Ratenberechnung	Normalisierte Wachstumsrate und korrespondierender, normalisierter Translationszugewinn der einzeln gezeigten Triplikate bei verschiedenen Thiolutinmengen

Kapitel 4.4

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.23-A	HMS174(DE3) HMS174(DE3) *attTn7::lacIp-(eGFP)$_2$*	- (Wildtyp) - (Reporterstamm) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	2, einzeln aufgetragen	Vergleich der Biomasseausbeuten (Wachstumsrate *versus* Substrataufnahmerate) unterschiedlich belasteter Stämme
4.23-B	HMS174(DE3) HMS174(DE3) *attTn7::lacIp-(eGFP)$_2$*	- (Wildtyp) - (Reporterstamm) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	2, einzeln aufgetragen	Vergleich der ‚Acetatlinien (Wachstumsrate *versus* Acetatbildungsrate) unterschiedlich belasteter Stämme
4.24-A	HMS174(DE3) *attTn7::lacIp-(eGFP)$_2$*	- (Reporterstamm) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	2, einzeln aufgetragen	Vergleich der Biomasseausbeuten (Wachstumsrate *versus* Substrataufnahmerate) des Kapazitätsmonitor-Stammes mit und ohne Ladungsplasmid

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.24-B-L	HMS174(DE3) *attTn7::laclp-(eGFP)$_2$*	- (Reporterstamm) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	2, einzeln aufgetragen	Korrelation von Produktionsraten unterschiedlicher Nebenprodukte mit den Wachstumsraten des Kapazitätsmonitor-Stammes mit und ohne Ladungsplasmid
4.25	*K12*				Herkunft der Nebenprodukte
4.26-A	HMS174(DE3) *attTn7::laclp-(eGFP)$_2$*	- (Reporterstamm) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	2	Kohlenstoffbilanz der gefunden Nebenprodukte des Kapazitätsmonitor-Stammes mit und ohne Ladungsplasmid bei verschiedenen Kohlenstoffquellen
4.26-B	HMS174(DE3) *attTn7::laclp-(eGFP)$_2$*	- (Reporterstamm) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	2	Kohlenstoffbilanz der Produkte aus der gemischten Säuregärung des Kapazitätsmonitor-Stammes mit und ohne Ladungsplasmid
4.26-C	HMS174(DE3) *attTn7::laclp-(eGFP)$_2$*	- (Reporterstamm) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	2	Kohlenstoffbilanz der für den Aminosäurestoffwechsel relevanten Produkte des Kapazitätsmonitor-Stammes mit und ohne Ladungsplasmid
4.26-D	HMS174(DE3) *attTn7::laclp-(eGFP)$_2$*	pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	2	Gesamtkohlenstoffbilanz des Kapazitätsmonitor-Stammes mit Ladungsplasmid zur ermittlung des CO_2-Anteiles
4.27-A	HMS174	pSEVA237R-31 pSEVA237R-31 + pSEVA641-52	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	37 Einzelmessungen unbelasteter Stamm 13 Einzelmessungen belasteter Stamm	Es wurde die Korrelation der Wachstumsrate und der Kapazität für den belasteten sowie unbelasteten Reporterstamm analysiert. Variiert wurden Kohlenstoffquelle, Antibiotikumskonzentration und Medienzusätze
4.27-B	HMS174	pSEVA237R-31 + pSEVA641-52	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	37 Einzelmessungen unbelasteter Stamm	Es wurde die Korrelation der Acetatproduktion und der Kapazität für den belasteten Reporterstamm analysiert. Variiert wurden Kohlenstoffquelle, Antibiotikakonzentration und Medienzusätze

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.27-C	HMS174	pSEVA237R-31 + pSEVA641-52	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	37 Einzelmessungen unbelasteter Stamm	Es wurde die Korrelation der heterologen Proteinproduktion und der Kapazität für den belasteten Reporterstamm analysiert. Variiert wurden Kohlenstoffquelle, Antibiotikakonzentration und Medienzusätze
4.28-A	HMS174(DE3)	- (Wildtyp)	1.5 L Bioreaktor; 1.5 L bioREACTOR48; 12 mL 250 mL Schüttelkolben; 50 mL	System:Glu, Fru, Man, Gal 1.5 L: 4, 2, 1, 2 12 mL: 9, -, -, 2 250 mL: 3, 1, 3, 3	Wachstumsrate in unterschiedlichen Kultivierungssystemen bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen
4.28-B	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	1.5 L Bioreaktor; 1.5 L bioREACTOR48; 12 mL 250 mL Schüttelkolben; 50 mL	System:Glu, Fru, Man, Gal 1.5 L: 4, 2, 1, 2 12 mL: 5, -, -, - 250 mL: 3, 1, 3, 3	Wachstumsrate in unterschiedlichen Kultivierungssystemen bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen
4.28-C	HMS174(DE3)	- (Wildtyp)	1.5 L Bioreaktor; 1.5 L bioREACTOR48; 12 mL 250 mL Schüttelkolben; 50 mL	System:Glu, Fru, Man, Gal 1.5 L: 4, 2, 1, 2 12 mL: 9, -, -, 2 250 mL: 3, 1, 3, 3	Substrataufnahmerate in unterschiedlichen Kultivierungssystemen bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen
4.28-D	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	1.5 L Bioreaktor; 1.5 L bioREACTOR48; 12 mL 250 mL Schüttelkolben; 50 mL	System:Glu, Fru, Man, Gal 1.5 L: 4, 2, 1, 2 12 mL: 5, -, -, - 250 mL: 3, 1, 3, 3	Substrataufnahmerate in unterschiedlichen Kultivierungssystemen bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen
4.28-E	HMS174(DE3)	- (Wildtyp)	1.5 L Bioreaktor; 1.5 L bioREACTOR48; 12 mL 250 mL Schüttelkolben; 50 mL	System:Glu, Fru, Man, Gal 1.5 L: 1, 1, 1, 1 12 mL: 9, -, -, - 250 mL: 3, 1, 3, 3	Acetatbildungsrate in unterschiedlichen Kultivierungssystemen bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen
4.28-F	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	1.5 L Bioreaktor; 1.5 L bioREACTOR48; 12 mL 250 mL Schüttelkolben; 50 mL	System:Glu, Fru, Man, Gal 1.5 L: 1, 1, 1, 1 12 mL: 5, -, -, - 250 mL: 3, 1, 3, 3	Acetatbildungsrate in unterschiedlichen Kultivierungssystemen bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen
4.29	HMS174(DE3)	- (unbeladen) pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL mit exponentieller Substratzufuhr	Einzelmessungen: 5 unbeladen induziert 1 beladen uninduziert 5 beladen induziert	Wachstumsrate *versus* Substrataufnahmerate bei mit pTRA641-51hd beladenen und unbeladenen Stämme zur Bestimmung der Plasmidkosten

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.30-A	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL mit und ohne exponentieller Substratzufuhr	Je 3	Entwicklung der Biotrockenmasse über die Zeit im Bereich der maximalen Wachstumsrate
4.30-B	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	3	Entwicklung der Acetat- und Glucosekonzentration im Medium über die Biotrockenmasse während des Satzprozesses
4.30-C	HMS174(DE3)	pTRA641-51hd	250 mL Schüttelkolben; 50 mL mit exponentieller Substratzufuhr	3	Entwicklung der Acetat- und Glucosekonzentration im Medium über die Biotrockenmasse während des Zulaufprozesses

Kapitel 4.5

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.31-A-C	*divers*				Sequenzzusammensetzung unterschiedlicher Proteine
4.32	Synthetische Sequenz	H2 randomisiert			Die synthetische Sequenz bildet die Wahrscheinlichkeit eines Aminosäureeinbaus in *E. coli* ab
4.33	('288')	- (Wildtyp) H2-minimal H2-1 bis H2-194 (randomisiert)	MTP, 200 µL	2	Einfluss einer 100 Aminosäure langen Zufallssequenz auf Wachstum, Kapazität und heterologe Expression
4.34	('288')	H2-xy (46 Konstrukte)	MTP, 200 µL	2	Einfluss der Aminosäurezusammensetzung auf Wachstum, Kapazität und heterologe Expression
4.35-A-C	Synthetische Sequenz	H2-98 H2-193			Sequenzzusammensetzung der randomisierten Proteine im Vergleich zur *E coli* Zusammensetzung
4.36-A	288	H2-xy (46 Konstrukte)	MTP, 200 µL	2	Einfluss des Parameters Temperatur (30 und 37 °C) auf das Wachstum
4.36-B	288	H2-xy (46 Konstrukte)	MTP, 200 µL	2	Einfluss des Parameters Temperatur (30 und 37 °C) auf die Kapazität

Abbildung	Stamm	Plasmid	Kultivierungssystem	Replikate	Beschreibung
4.36-C	288	H2-xy (46 Konstrukte)	MTP, 200 µL	2	Einfluss des Parameters Temperatur (30 und 37 °C) auf die heterologe Proteinproduktion
4.36-D	288	H2-xy (46 Konstrukte)	MTP, 200 µL	2	Einfluss des Parameters Kohlenstoffquelle (Fructose und Glycerol) auf das Wachstum
4.36-E	288	H2-xy (46 Konstrukte)	MTP, 200 µL	2	Einfluss des Parameters Temperatur (30 und 37 °C) auf die Kapazität
4.36-F	288	H2-xy (46 Konstrukte)	MTP, 200 µL	2	Einfluss des Parameters Kohlenstoffquelle (Fructose und Glycerol) auf die heterologe Proteinproduktion
4.37-A	DH10B 288	H2-66 H2-minimal („mm“)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	1	Die rote Fluoreszenz (FL3) der Mischkultur ermöglicht eine Trennung der beiden Stämme nach Fluoreszenzintensität
4.37-B	288	H2-minimal („mm“)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	1	In FL3=30-100 einsortierte Zellen
4.37-C	DH10B	H2-66	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	1	In FL3=300-3000 einsortierte Zellen
4.38-A	DH10B 288	H2-66 H2-minimal („mm“)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	1	Mischkultur: Beprobung wurde über die Zeit im FACS hinsichtlich Zell-Counts analysiert
4.38-B	DH10B 288	H2-66 H2-minimal („mm“)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL		Einzelkultivierungen: beide Stämme wurden jeweils im Photometer vermessen
4.38-C	DH10B 288	H2-66 H2-minimal („mm“)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	1	Mischkultur: die Gesamt-OD wurde über in A) erhobene Anteile auf Einzelstämme verteilt
4.39-A	DH10B 288	H2-66 H2-minimal („mm“)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	1	Mischkultur: die Zellen wurden im FACS Fluoreszenzklassen zugeordnet und die Fluoreszenz wurde mit einem Mittelwert gewichtet
4.39-B	DH10B 288	H2-66 H2-minimal („mm“)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL		Einzelkultivierungen: beide Stämme wurden jeweils im Plattenlesegerät vermessen
4.39-C	DH10B 288	H2-66 H2-minimal („mm“)	250 mL Schüttelkolben; 50 mL	1	Mischkultur: die Gesamtfluoreszenz wurde über in A) erhobene Anteile auf Einzelstämme verteilt

A.6 Chemikalien und Enzyme

Antibiotika	Anmerkung	Stock-Konzentration, mg mL^{-1}	Arbeitskonzentration, µg mL^{-1}
Ampicilin		100	100
Chloramphenicol	In EtOH	34	34
Gentamicin		20	10
Kanamycin		30	30
Streptomycin		100	100
Tetracyclin	Vor Licht schützen, in EtOH	5	50

Die Wirksamkeit von Tetracyclin wird durch Magnesiumionen herabgesetzt. Außerdem tragen DH5α-Stämme in der Regel eine Tetracyclinresistenz.

Additive	Anmerkung	Stock-Konzentration,	Arbeitskonzentration,	Hersteller
3-Chlorobenzoesäure	In DMSO	1.5 M	1.5 mM	Sigma-Aldrich
Antischaum 204		10%	0.1 %	Sigma-Aldrich
DFHBI-1T	In DMSO	40 mM	400 µM	Abcam
m-Toluylsäure	In DMSO	1.5 M	1.5 mM	Sigma-Aldrich
p-Toluylsäure	In DMSO	1.5 M	1.5 mM	Sigma-Aldrich
Thiolutin	In DMSO	20 mg mL^{-1}	20 µg mL^{-1}	Tocris

Bei der Zugabe von Additiven wurde darauf geachtet, dass in Vergleichskulturen die entsprechende Menge des jeweiligen Lösemittel zugegeben wurde.

Antikörper	Stock-Konzentration	Arbeits-konzentration	Hersteller
Mouse anti-his antibody, Cat.No. 2-1590-001	1 mg mL^{-1}	1:1000	IBA
Mouse IgG1, Purified anti *E. coli* RNA-Polymerase β' NT73	1 mg mL^{-1}	1:1000	Biolegend
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076		1:6000	CST
rpsB Antibody, HRP conjugated, CSB-PA08644B0Rb	1 mg mL^{-1}	1:5000	Cusabio

Chemikalien	Anmerkung	Hersteller
2-log DNA-Größenstandard		NEB
40 % Acrylamid		Carl Roth
5x M9 Salze		Merck
APS		Carl Roth
Arabinose		Carl Roth
$CaCl_2$		Sigma-Aldrich
Casaminosäuren		Carl Roth
DMSO		Carl Roth
DNA-Modifizierende Enyzme		NEB
EDTA		Carl Roth
FastGene TaqReady Mix		Nippon Genetics
FastGene® Gel/PCR Extraction Kit		Nippon Genetics
FastGene® Plasmide Extraction Kit		Nippon Genetics
Fluorescine		Zeus
Fructose		Carl Roth
Gel-Loading Dye, Purple	6x, kein SDS	NEB
Glucose		Carl Roth
Glycerin		Sigma Aldrich
H_2SO_4		Carl Roth
Hefeextreakt		Carl Roth
HNO_3		Carl Roth
Imidazol		Carl Roth
Isopropanol		Carl Roth

Just Blue Prestained Protein Marker		NEB
Lactose		Carl Roth
Mannose		Carl Roth
Membranfilter		Merck, Millipore
$MgSO_4$		Carl Roth
Midori Green Advance		Nippon Genetics
NaCl		Carl Roth
Natriumacetat		Carl Roth
Natriumdodecylsulfat		Carl Roth
NEB® 10-beta elektrokompetent E. coli		NEB
NH_3		Carl Roth
Oligonukleotide		Eurofins
Opti-4CN-Detektionskit, #1708235		Bio-Rad Laboratories GmbH
Pepton		Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid		Carl Roth
Pierce BCA Protein Assay Kit		Thermofisher
ProLine™ Universal Calibration Beads	Lot#1451086	BioRad
RNA-Polymerase Holoenzym 400 kDa	M0551S	NEB
Synthetische DNA-Sequenz		BioCat
TEMED		Carl Roth
Thiamin		Carl Roth

Die in dieser Arbeit für Medien und Puffer zusätzlich verwendeten Chemikalien, welche sich hier nicht gelistet finden, wurden vorrangig von Sigma-Aldrich und der Firma Carl Roth bezogen.

A.7 Verbrauchsgüter

Name	**Anmerkung**	**Hersteller**
1.5mL-Eppendorfreaktionsgefäße		Eppendorf
2 mL Kryo-Röhrchen		Semadeni
24-well Platte		stemcell
50 mL Falcons		Greiner
8-strip PCR-tubes		starlab
96-well Mikrotiterplatten, F-bottom	schwarz- transparent	BRANDplates, pureGrade™S
Analysegefäße Vial N9-1.5, flach, SF	#702283	Macherey-Nagel
Breath-Easy dichtungsmembran	Z380059	Sigma Aldrich
Einsatz für Analysegefäß Ö-0.3, flach	#702825	Macherey-Nagel
Einwegbioreaktoren 12mL	Polystyrol	PreSens
Einwegspritzen Omnifix	Gleitringdichtung, Luer-Lock	Braun
Elektroporationsküvetten	grüner Deckel	Gene Pulser®Micropulser™
EZ-10-DNA-Mini-Spin-Säulchen		NBSbiologicals
Kanülen 1.0x200mm	Luer-Lock	NeoLab
Membranfilter		Merck Millipore
Nitrozellulosemembran		Protran
Pierce BCA Protein Assay Kit		Thermofisher
Round-Bottom Polystyrene Röhrchen		Corning™ Falcon™
Spritzenvorsatzfiler aus CA	0.2 µm	LLG, Lab Logistics
Whatmanfilterpapier		GE-healthcare

A.8 Geräte und Software

Name	Anmerkung	Hersteller
1.5L Bioreaktor BIOSTAT-B	Twin-Fermener	Sartorius
250 mL Schüttelkolben	#2177136, Erlenmeyer	Duran
50 mL Superloop		GE Healthcare
Zentrifuge 5415D		Eppendorf
Agilent 1100 HPLC-Systems		Agilent
Äkta purifier		GE Healthcare
Autoklav VX-150		Systec
bioREACTOR 48		2mag
Brutschrank		Memmert
Cell-Sorter 3S		BioRad
Durchflusszytometer CyFlow SL		Partec
Gel iX Imagers		Intas-Science-Imaging Instruments GmbH
Gelkammer Mini-SUB		BioRad
HisTrap FF 1 mL	Ni2+-NTA	GE Healthcare
Homogenisator Sonoplus HD2070		Bandelin
HP Scanjet 5470C		Hewlett-Packard Company
Laborroboter Genesis		Tecan
LEGO Mindstorms EV3		LEGO
Mastercycler Gradient 5331		Eppendorf
MicroPulser ™ Electroporator		Bio-Rad Laboratories GmbH
Mikro 20		Hettich Zentrifugen
MS-3AP-PowerSupply		Major Science Saratoga
Multifuge 1S-R		Heraeus
Multitron Schüttelinkubator	5cm Exzentrizität	Infors
PeqPower 300		VWR, Radnor
Zenrifuge Rotixa 50 RS		Hettich Zentrifugen
Shodex SH-1011-Säule		Phenomenex
Synergy HT-Platereader		BioTek
Tecan Magellan Infinite 200		Tecan
Thermoschüttler		Eppendorf
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell		Bio-Rad Laboratories GmbH
Tube Revolver		NeoLab
Tischwaage		Kern
Analysenwaage		Sartorius
Zentrifuge 5418R		Eppendorf

Name	Anmerkung	Hersteller
Ape Plasmid Editor	DNA-Analyse	SoftSea
BioPAT MFCS	Bioreaktorsteuerung	Sartorius
ChemStation	HPLC-Analyse	Agilent
Excel	Datenprozessierung	Microsoft
FedBatch XP	Prozessleitsoftware	DASGIP
FlowJo	FACS Auswertetool	LLC
Gemini	Liquidhandlersteuerung	Tecan
ImageJ	Bildanalysetool	NIH
LEGO Digital Designer	3D Zeichentool	LEGO
MATLAB	Modellierungssoftware	MathWorks
ProSort™ Software	Sortiergerätsoftware	BioRad