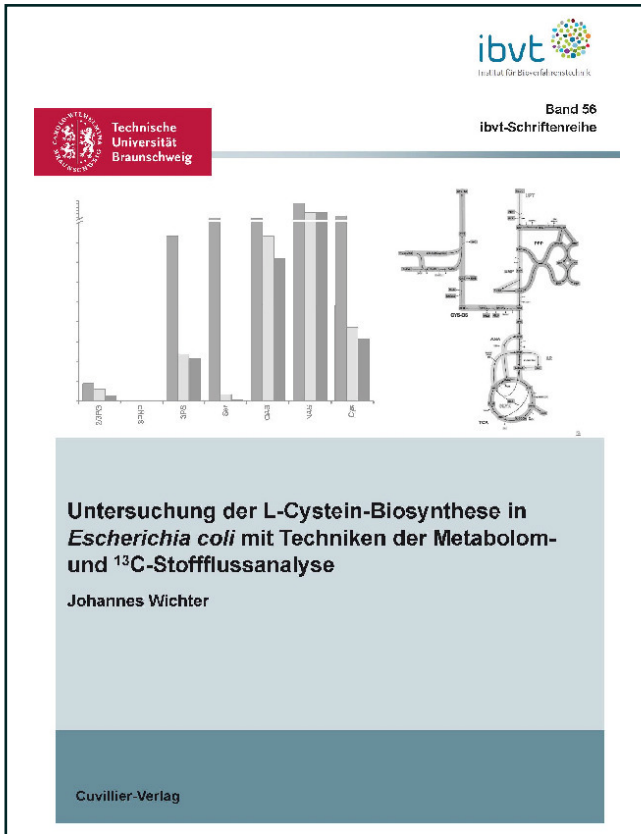




Johannes Wichter (Autor)

Untersuchung der L-Cystein-Biosynthese in *Escherichia coli* mit Techniken der Metabolom- und ^{13}C -Stoffflussanalyse



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/359>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Kapitel 1

Einleitung

Die Biotechnologie ist ein moderner Begriff für eine interdisziplinäre Wissenschaft. Sie versucht das Potential von Zellen, Gewebe und Bakterien technisch zu nutzen. Schon vor Jahrtausenden nutzten die Menschen die Stoffwechsellleistungen von Mikroorganismen zur Herstellung von Wein, Brot, Bier und bei der Verarbeitung von Milchprodukten. Dieses Wissen basierte jedoch auf der Nutzung von Erfahrungen. Heute ist diese Symbiose von Biologie und Technologie besser verstanden und findet Einsatz in der Pharma- und Futtermittelindustrie, bei der Produktion von Feinchemikalien, Lebensmitteln und Biotreibstoffen. Durch Robert Koch und Luis Pasteur konnten Ende des 19. Jahrhunderts erste Erkenntnisse über Mikroorganismen gewonnen werden. Mitte des 20. Jahrhunderts eröffneten sich mit der Entdeckung der DNA durch Watson und Crick die heutigen Möglichkeiten der Biotechnologie. Mit der Identifizierung und der Veränderung von Genen und Genabschnitten, dem Messen von Transkripten, durch das Verstehen und Messen von entstehenden Enzymen und Proteinen, die Analyse von cytoplasmatischen Metaboliten sowie das Verständnis von Produktions- und Stoffwechselflüssen ist es möglich, den gesamten Weg vom Gen zum Produkt verfolgen, verstehen und verändern zu können.

Die moderne Biotechnologie wird in verschiedene Bereiche unterteilt. Die wichtigsten Unterteilungen sind die grüne (Landwirtschaft), die rote (Pharma) und weiße (Industrie) Biotechnologie. Durch das Verständnis der Genetik konnten neue DNA-Abschnitte in einen Produktionsorganismus eingebracht werden. So konnte in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts die Produktion von Humaninsulin mit genetisch veränderten *Escherichia coli* Stämmen entwickelt werden, was als ein Meilenstein der Biotechnologie bezeichnet werden kann. Die Produktion von Massenprodukten wie Aminosäuren als Futtermittelzusatz und in der Nahrungsmittelindustrie gewinnt in den letzten

Jahren zunehmend an Bedeutung. So werden weltweit über 3 Millionen Tonnen pro Jahr produziert, die einen Marktwert von über 6 Milliarden US-Dollar haben. Die wichtigste Aminosäure ist dabei L-Glutaminsäure (Geschmacksverstärker), gefolgt von DL-Methionin und L-Lysin, die als Zusatz in Nahrungs- und Futtermittel zu Einsatz kommen. Die biotechnologischen Herstellungsverfahren haben den Vorteil gegenüber konventionellen chemischen Verfahren, dass racemisch reine L-Aminosäuren hergestellt werden können, die biologisch nutzbar sind.

Die Systembiologie als neuer interdisziplinärer Zweig der Biowissenschaften versucht biologische Systeme in ihrer Gesamtheit zu betrachten. Dazu muss ein grundlegendes Verständnis von Stoffwechselwegen vorliegen. Das Zusammenspiel von Genom, Transkriptom, Proteom, Metabolom und Fluxom muss verstanden sein, da ein zellinterner Zusammenhang zwischen diesen Ebenen besteht. Dieser ganzheitliche Ansatz hat große Vorteile gegenüber einem ungerichteten Vorgehen zur Verbesserung und Veränderung von Produktionsstämmen. Klassischerweise wurde nach dem Prinzip der Mutation und anschließender Selektion von hunderttausenden Mutanten vorgegangen. Die zuvor beschriebenen Zusammenhänge können dabei nicht berücksichtigt werden.

Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Methoden der Metabolom- und ^{13}C -Stoffflussanalyse soll ein *Escherichia coli* Produktionsstamm für die Aminosäure L-Cystein untersucht werden, um ein höheres Verständnis über die intrazellulären Vorgänge zu erlangen. Es wird zudem erwartet, dass konkrete Targets für ein gerichtetes Metabolic Engineering aufgezeigt werden können, die zu einer Verbesserung der Produktionsstämme führen.

Kapitel 2

Zielsetzung

Für die Stammentwicklung sollten konkrete Ziele zur Verbesserung eines Produktionsstammes erarbeitet werden. Die Stammcharakterisierung sollte mit den Methoden der Metabolomanalyse und ^{13}C -Stoffflussanalyse durchgeführt werden. Es wurde dabei in einem Kooperationsprojekt mit einem industriellen Partner gearbeitet.

Die Ziele für die Untersuchung einer Cystein produzierenden *E. coli* Produktionsstammes lassen sich wie folgt angeben:

- **Etablierung der Analytik von Metaboliten der Cystein-Biosynthese** – Die nicht in der Standard-Analytik (Massenspektrometrie) befindlichen Metabolite müssen ergänzt werden, um eine genaue Analyse des Cystein-Biosyntheseweges zu ermöglichen.
- **Etablierung des Kultivierungsprozesses** – Um mit dem Industriepartner vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können, soll ein industrienaher Kultivierungsprozess im Bioreaktor etabliert werden.
- **Etablierung der Metabolomanalyse** – Es soll eine reproduzierbare Probenahme- und Zellaufschlussmethode für Cystein produzierende *E. coli* Stämme etabliert werden.
- **Analyse des Metaboloms von Produktionsstämmen** – Durch die Analyse von intrazellulären Metabolitkonzentrationen verschiedener Produktionsstämme unter vergleichbaren Bedingungen mittels geeigneter LC-MS/MS-Analytik sollen potentielle Ziele für die Stammverbesserung abgeleitet werden.

-
- **Etablierung der ^{13}C -Stoffflussanalyse** – Unter industriellen Bedingungen (Prozess, Medium) soll gezeigt werden, dass eine ^{13}C -Stoffflussanalyse möglich ist. Zudem soll ein stöchiometrisches Reaktionsnetzwerk für den Zentralstoffwechsel von *E. coli* erstellt werden, das die C-Atom Transitionen abbildet.
 - **Analyse der Reaktionsraten von Produktionsstämmen** – Die Berechnung der Reaktionsraten soll von verschiedenen Produktionsstämmen erfolgen. Anhand der Ergebnisse soll ein verbessertes Verständnis der Zusammenhänge in einer Cystein produzierenden *E. coli* Zelle erzielt werden.

Kapitel 3

Theoretische Grundlagen

3.1 Biologische Grundlagen

3.1.1 L-Cystein

L-Cystein (im Folgenden mit Cystein bezeichnet) ist eine schwefelhaltige proteinogene Aminosäure. Cystein hat die Summenformel $C_3H_7NO_2S$. Die Strukturformel ist in Abbildung 3-1 zu sehen. Die molare Masse beträgt 121,16 g/mol.

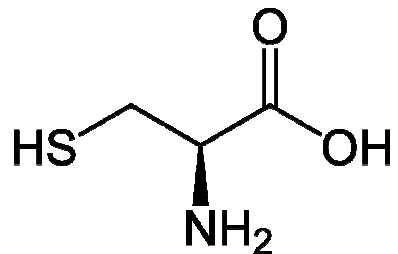


Abbildung 3-1: Chemische Strukturformel von L-Cystein.

Durch die drei funktionellen Gruppen (Thio-, Carboxyl- und Aminogruppe) in unmittelbarer Nähe zueinander kommt Cystein in Zellen eine sehr wichtige Rolle zu, als primärer Schwefel-Donor für die Biosynthese von schwefelhaltigen Zellbestandteilen wie L-Methionin, Coenzym A, Biotin oder Thiamin. In Proteinen ist Cystein an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt, die Stabilität und Struktur verleihen. Auch an aktiven Zentren von Enzymen kann Cystein beteiligt sein, in Metalloproteasen ist es bei der Koordination von Metallionen und in Thiolproteasen direkt an der Reaktion beteiligt (Wada et al. [2006]).

3.1.2 Industrielle Bedeutung von Cystein

Weltweit gibt es einen Markt für Cystein mit einer Menge von 5000 t/a, was einem Marktwert von 55 Mio. US\$ entspricht (Haas et al. [2009]). Bis zu 30 % der jährlichen Produktion von Cystein wird zur Herstellung des pharmazeutischen Wirkstoffs N-Acetylcystein eingesetzt, welches eine schleimlösende Wirkung bei bronchialen Erkrankungen aufweist (Ziment [1988]; Haas et al. [2009]). In der Lebensmittelindustrie wird Cystein als Backzusatz (Kaur et al. [1980]; Harinder et al. [1988]) eingesetzt. Cystein führt zur Reduktion der Disulfidbrücken von Gluten. Durch den Einsatz von Cystein wird der Teig knetfähiger, klebt weniger an den Verarbeitungsmaschinen und das Teigvolumen verbessert sich (Haas et al. [2009]). Auch als Grundstoff für Fleisch-Aromen (z. B. in Hundefutter) wird Cystein eingesetzt, dabei kommt es zur Reaktion der schwefelhaltigen Aminosäure mit reduzierenden Zuckern (Ledl et al. [1990]). In der kosmetischen Industrie wird Cystein in Produkten für Dauerwellen eingesetzt. Durch die stark reduzierende Wirkung werden Disulfidbrücken der Haare aufgebrochen und es ist möglich, den Haaren eine neue Struktur zu geben. Auch in Präparaten zur Hautaufhellung und in Anti-Aging Produkten findet Cystein Anwendung (Haas et al. [2009]).

3.1.3 Industrielle Herstellung von Cystein

Etwa 90 % des heute hergestellten Cysteins wird durch saure Hydrolyse aus keratinhaltigen Naturstoffen (Federn, Haaren, Schweineborsten) gewonnen; mit diesem Verfahren werden sonst nur noch sehr wenige Aminosäuren industriell hergestellt (Ikeda [2003]). Durch die Behandlung mit Salzsäure fällt das schwerlösliche L-Cystin nach Neutralisation als Präzipitat aus. L-Cystin ist ein Disulfid, welches durch Oxidation von zwei Molekülen Cystein in sauerstoffreicher Umgebung entsteht. Die Löslichkeit beträgt lediglich 190 mg/L. Durch Elektrolyse kann L-Cystin zu Cystein reduziert werden. Nachteil dieses konventionellen Verfahrens ist der hohe Verbrauch an Säure. So sind für die Herstellung von 1 kg Cystein 27 kg Salzsäure nötig, was zu einer Herausforderung in der Behandlung von Abwässern und gegebenenfalls auch zu Umweltproblemen führt (Haas et al. [2009]).

Eine biotechnologische Konversion von D,L-amino-thiazol-4-carboxylsäure zu Cystein durch *Pseudomonas* Stämme hat nur einen geringen Anteil an der Gesamtproduktion pro Jahr. Dies gilt auch für enzymatische Reaktionen, die Cystein als Nebenprodukt bilden (Daßler [2001]).

Mit 500 t/a und jährlichen Zuwächsen von 10 % gewinnt die biotechnologische Herstellung von Cystein durch Kultivierung von *E. coli* zunehmend mehr an Bedeutung. Vorteil dieses Prozesses ist, dass eine hohe Qualität mit wenigen Verunreinigungen aus nachwachsenden Rohstoffen möglich ist. Auch eine Kontamination durch BSE oder SARS kann ausgeschlossen werden, was bei der konventionellen Herstellungsweise durch den Einsatz tierischer Rohstoffe nicht möglich ist, was besonders für pharmazeutische Produkte unerlässlich ist. Das Verfahren zur biotechnologischen Produktion mit genetisch veränderten *E. coli* Stämmen wurde 2001 von der Firma WACKER AG etabliert und patentiert. Dabei wird für die Produktion von 1 kg Cystein nur 1 kg Salzsäure benötigt, welches in der Aufarbeitung des Produkts eingesetzt werden muss (Haas et al. [2009]).

3.1.4 *Escherichia coli*

Das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zum Reich der Prokaryoten und wird in die Familie der *Enterobacteriaceae* (enteron = griechisch für Darm) eingeordnet. Es ist gram negativ, nicht sporulierend, stäbchenförmig, peritrich begeißelt und 1-4 µm lang. *E. coli* wurde 1885 erstmals von dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich beschrieben (Escherich [1885]).

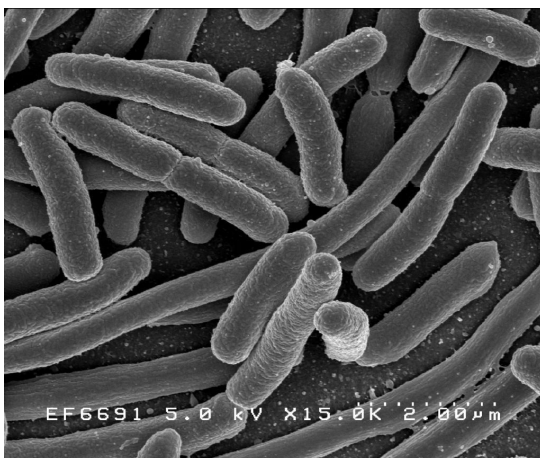


Abbildung 3-2: Rasterelektronische Aufnahme von *E. coli* Zellen (Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH).

Es ist fakultativ anaerob, Energie kann also durch Atmung, aber auch durch gemischte Säuregärung gewonnen werden (Madigan et al. [2000]).

In der Forschung ist *E. coli* sehr verbreitet als Modellorganismus und sehr gut erforscht (Römpf [1996]). Der Grund dafür sind die einfachen Kultivierungsbedingungen. Ein einfaches synthetisches Medium bestehend aus einer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und Mineralsalzen ist ausreichend für ein schnelles Wachstum. Unter optimalen Kultivierungsbedingungen wie einem pH-Wert von 6,5-7,3, einer Temperatur von 37 °C und einem komplexen Nährmedium (z.B. mit Pepton oder Hefeextrakt) werden sehr kurze Generationszeiten von nur 20 min erreicht (Schlegel [1992]).

Mit dem vergleichsweise kleinen Genom mit nur $4,65 \cdot 10^6$ Basenpaaren ist *E. coli* als einer der ersten Mikroorganismen vollständig sequenziert worden (Blattner et al. [1997]). Es sind sehr viele Informationen über diesen Modellorganismus zugänglich, in Form von Datenbanken wie EcoCyc (Keseler et al. [2005]) oder sehr weit entwickelten stöchiometrischen Netzwerkmodellen (Feist et al. [2009]). Durch biotechnologische Produkte wie Insulin hat *E. coli* auch erhebliche industrielle Bedeutung. Zudem werden auch Feinchemikalien (Aminosäuren, 1,3 Propandiol), Enzyme, heterologe Proteine (Interferon) und auch Wachstumsfaktoren durch Kultivierung von *E. coli* hergestellt (Römpf [1996]; Pühler [1999]).

3.1.5 Glucosestoffwechsel in *E. coli*

Substrataufnahme

Glucose wird über das Phosphotransferase-System (PT-System) in die Zelle aufgenommen. Der Transport von Glucose erfolgt über eine energieabhängige Phosphorylierung des Substrates. Bei dieser Reaktion entsteht Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat (PEP), einem Metabolit der Glycolyse. Diese Reaktion stellt die Energie zur Verfügung. Durch ein integrales Membranprotein wird über eine Phosphorylierungskaskade eine Phosphatgruppe von PEP auf Glucose übertragen. Es entsteht Glucose-6-Phosphat (G6P). Die Aufnahme über das glucosespezifische PT-System zeigt eine hohe Substrataffinität (K_m -Wert = 3-10 μ M) (Postma et al. [1993]; Krämer [1998]). Über andere Zucker-Aufnahme-Systeme kann Glucose ebenfalls in die Zelle transportiert werden. Das PT-System ist jedoch auch bei sehr niedrigen Glucosekonzentrationen aktiv. So wird der Transport von Glucose über das