

**Dissertation: „Zellheterogenität am Beispiel der Expression des  
*Escherichia coli lac Operons*“**

Dipl.-Biol. Anja Marbach

Zusammenfassung:

Alle Bakterien einer klonalen Population verfügen über das gleiche Erbgut. Dennoch ist die Reaktion einzelner Bakterien auf einen Reiz nicht immer identisch. Ein Beispiel hierfür ist das bimodale Induktionsverhalten des *lac*-Operons in *E. coli*, welches in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wurde.

Um die *lac*-Operon-Expression in einzelnen Zellen nachweisen zu können, wurden verschiedene Fusionen aus *lac*-Promotor und einem Fluoreszenzgen kloniert. Dabei zeigte sich, dass die Gfp-Variante Gfp(LVA) aufgrund einer zu geringen Fluoreszenzintensität nicht als Reporterprotein geeignet war. Im Gegensatz dazu wies der Stamm AM1 mit dem Reporter gen *gfp(mut3.1)* in Abhängigkeit der Zugabe eines Induktors gut detektierbare Fluoreszenzsignale auf. Durch den Vergleich der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und der Fluoreszenz beim Wachstum von AM1 auf den Kohlenstoffquellen Arabinose oder Glukose in Gegenwart von IPTG konnte zudem eine gute Korrelation zwischen der Bildung des Original- und des Reporterproteins festgestellt werden. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich jedoch, dass bei der Verwendung von Succinat oder Acetat als Kohlenstoffquelle größere zeitliche Verschiebungen zwischen dem maximalen  $\beta$ -Galaktosidase-Gehalt der Zellen und der Fluoreszenz auftraten und dass die Fluoreszenzintensitäten beim Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen nicht miteinander verglichen werden können. Da der Induktionszustand des *lac*-Operons dennoch korrekt angezeigt wurde, konnte mit dem Stamm AM1 das Verhalten auf Einzelzellebene näher bestimmt werden. In Übereinstimmung mit Literaturangaben wurde in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 20  $\mu$ M TMG eine bimodale Expression des *lac*-Operons nachgewiesen. Auch die Zugabe des Induktors IPTG führte zu einer bimodalen Verteilung, jedoch bei einer etwa zehnfach geringeren Konzentration. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die Transacetylase in Abhängigkeit von der Zelldichte das Zellverhalten beeinflussen kann. Zudem wurde mit einer Laktose-Permease-Mutante gezeigt, dass die Expression aufgrund des wegfallenden Feedback-Mechanismus unimodal erfolgt. Weiterhin wurden auch mit dem natürlichen Induktor Laktose Hinweise auf eine heterogene Induktion des *lac*-Operons gefunden.

In der vorgestellten Arbeit wurde die *lac*-Operon-Induktion auf Einzelzellebene systematisch untersucht und es konnten wichtige Erkenntnisse für den Einsatz des *lac*-Promoters in der Biotechnologie, Molekularbiologie und in der synthetischen Biologie abgeleitet werden.

**Dissertation: „Zellheterogenität am Beispiel der Expression des  
*Escherichia coli lac* Operons“**

Dipl.-Biol. Anja Marbach

Abstract:

All the bacteria in a clonal population have the same genetic material. Nevertheless, the reaction of individual bacteria to a stimulus is not always the same. An example is the bimodal induction behavior of the *E. coli lac* operon, which was characterized within this study.

To examine gene expression in individual cells different fusions of the *lac* promoter and a gene encoding the green fluorescent protein were cloned. It was shown that the Gfp variant Gfp(LVA) was not suited for the construction of a reporter strain because of a low fluorescence intensity level. In contrast, the reporter strain AM1 with the reporter gene *gfp(mut3.1)* showed detectable fluorescence signals in response to the addition of inducer. Furthermore a good correlation between the activity of the  $\beta$ -galactosidase encoded in the original *lac* operon and the Gfp fluorescence intensity was shown if the strain grew on either glucose or arabinose as a carbon source in the presence of IPTG. However, in further experiments it could be demonstrated that there was a delay between the appearance of the maximal  $\beta$ -galactosidase activity and the appearance of the maximal value of fluorescence if succinate or acetate were used as carbon sources and that the absolute fluorescence intensities could not be compared if the strain grew on different carbon sources. Because the induction state of the *lac* operon was reported correctly apart from the delay in time the reporter strain was used to determine the bimodal induction behavior. In agreement to published data, a bimodal response of the cells could be observed if the TMG concentration was in the range of 5 to 20  $\mu$ M. IPTG evoked bimodal induction behavior too, but at a ten- to twentyfold lower concentration than TMG. Furthermore it could be demonstrated that in dependence of the cell density the transacetylase can influence cell behavior and that the induction behavior in a *lacY* deletion strain was unimodal because the feedback mechanism was deleted. Moreover, experiments with the natural inducer lactose indicated that this induction behavior is heterogeneous, too.

In the study presented the *lac* operon induction was studied systematically on single cell level. As a result advice could be given for the usage of the *lac* promoter in biotechnology, molecular biology and synthetic biology.