

Die Hydroxylierung von Ectoin und
Derivaten durch die Hydroxylase EctD
aus Halomonas elongata

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrea Meffert

aus Neuwied

Bonn, 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Erwin A. Galinski
2. Gutachterin: apl. Prof. Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 21.12.2011

Erscheinungsjahr: 2012

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungen und Trivialnamen.....	VIII
I. Einleitung.....	1
1. Leben unter extremen Bedingungen.....	1
2. Halophile und halotolerante Mikroorganismen.....	3
3. Anpassung an hyperosmotische Bedingungen (Osmoadaptation).....	4
3.1. „High-salt-in“-Strategie	4
3.2. „Organic-solutes-in“-Strategie	5
4. Übersicht kompatibler Solute.....	6
5. Osmoadaptation von <i>Halomonas elongata</i>	9
5.1. Die Ectoinhydroxylase EctD	11
6. Osmoadaptation von <i>Escherichia coli</i>	13
6.1. Transportsysteme für kompatible Solute in <i>E. coli</i>	14
7. <i>E. coli</i> als heterologes Expressionssystem.....	16
7.1. <i>E. coli</i> als Ganzzellbiokatalyse-System.....	16
7.2. <i>E. coli</i> als heterologes System zur Ectoin-Produktion	18
8. Nutzen, Bedeutung und Anwendung kompatibler Solute	19
8.1. Nutzen und Bedeutung von Hydroxyectoin und hydroxylierten Soluten	21
8.2. Industrielle Produktion von Hydroxyectoin.....	22
9. Inkompatible Solute	23
10. Zielsetzung der Arbeit.....	24
II. Material und Methoden.....	26
1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	26
2. Nährmedien	27
2.1. Medien zur Anzucht von <i>H. elongata</i> und <i>E. coli</i>	27
2.2. Medium zur Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.3. Medien zur Herstellung chromosomaler Mutationen bei <i>H. elongata</i>	29
3. Medienzusätze.....	29
3.1. Antibiotika	29
3.2. Vitaminlösung (VA-Lösung; Imhoff und Trüper, 1977).....	30
3.3. TES Spurenelementlösung (L ⁻¹) (Claus <i>et al.</i> , 1983).....	30
3.4. IPTG und X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion	30
3.5. Selektion von Doppel-Cross-Over Mutanten mit Saccharose	31
3.6. Solute für <i>in vivo</i> Hydroxylierungen	31
3.7. Induktionsreagenzien IPTG und AHT	32
4. Puffer und Lösungen.....	32
4.1. Puffer und Lösungen für die Analytik	32
4.1.1. Lösungen für die isokratische HPLC	32
4.1.2. Lösungen für die FMOC/ADAM-HPLC	32
4.2. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	33
4.2.1. Puffer und Lösungen für die DNA-Isolierung und Lagerung.....	33
4.2.2. Puffer und Lösungen für die Plasmidisolierung	33
4.2.3. Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	33
4.3. Lösung für die Transformation	33

4.4. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Versuche.....	33
4.4.1. Puffer und Lösungen für die Gesamtzellproteinaufreinigung.....	33
4.4.2. Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung.....	33
4.4.3. Puffer und Lösungen für den BCA-Test	33
4.4.4. Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.....	33
5. Synthese der zwitterionischen Guanidiniumverbindung Guanidino-Ectoin	34
6. Anzucht- und Kultivierungsverfahren.....	34
6.1. Bakterienstammhaltung.....	34
6.2. Allgemeine Bakterienanzucht und Zellernte	35
6.3. Anzucht von <i>H. elongata</i> -Stämmen zur Untersuchung der Hydroxyectoin- Produktion.....	36
6.4. Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen als Ganzzellbiokatalyse-System	36
6.4.1. Ganzzellbiokatalyse mit <i>E. coli</i> DH5 α VIBO (pETectD_promA)	37
6.4.2. Ganzzellbiokatalyse mit <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis	37
6.5. Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen zur heterologen Produktion von Ectoin und Hydroxyectoin	37
6.6. Anzucht von <i>H. elongata</i> WUB02 pWUB_ectD_Hel	38
6.7. Fermentation im 4 L-Maßstab.....	38
6.7.1. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion von <i>H. elongata</i> Δ ectB::ectD.....	38
6.7.2. Hydroxylierung von Gd-Ectoin mit <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis	39
6.8. Minifermentation	39
6.9. Mikrotiterversuche zur Untersuchung des Wachstums von <i>E. coli</i>	40
6.10. Bestimmung der spezifischen Produktivität.....	40
7. Analytische Methoden	41
7.1. Gefriertrocknung und SpeedVac	41
7.2. Glucose-Test	41
7.3. HPLC (<i>high performance liquid chromatography</i>).....	42
7.3.1. Mikroextraktion des Zellmaterials (Bligh und Dyer, 1959).....	42
7.3.2. Isokratische HPLC zur Bestimmung des Solutegehalts.....	43
7.4. FMOC/ADAM-HPLC zur Bestimmung von Aminosäuren.....	44
7.4.1. Probenaufbereitung für FMOC/ADAM-HPLC	44
7.4.2. FMOC/ADAM-HPLC-Messung	44
7.5. ¹³ C-NMR-Spektroskopie	45
7.5.1. Probenaufbereitung für ¹³ C-NMR-Spektroskopie	46
7.5.2. NMR-Messung.....	46
8. Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von DNA.....	47
8.1. Isolierung von Gesamt-DNA (Marmur, 1961).....	47
8.2. Isolierung von genomischer DNA mit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit.....	47
8.3. Isolierung von Plasmid-DNA (<i>no column plasmid miniprep</i>)	48
8.4. Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	48
8.5. Quantifizierung von DNA.....	48
8.5.1. Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	48
8.5.2. Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung von DNA mit Hilfe eines DNA- Größenstandards.....	49
9. Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
9.1. Standard-PCR mit <i>Phusion</i> -DNA-Polymerase	50
9.2. Standard-PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase	51
9.3. SOE-PCR (<i>splicing by overlap extention</i>).....	51
9.4. PCR an ganzen Zellen mit <i>Taq</i> -Polymerase	52
9.5. Primer	53
10. Agarosegelelektrophorese	53
11. Enzymatische Modifikation von DNA	54
11.1. Restriktionsverdau von DNA	54
11.2. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	54

11.3. Ligation	55
12. Transformation von <i>E. coli</i>	55
12.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach der CaCl ₂ -Methode (Dagert und Ehrlich, 1979).....	55
12.2. Transformation CaCl ₂ -behandelter kompetenter Zellen.....	56
13. Bakterielle Konjugation	56
14. Herstellung chromosomaler Mutationen in <i>H. elongata</i>	58
15. Proteinbiochemische Methoden.....	59
15.1. Verwendete Expressionssysteme	59
15.2. Gewinnung des Gesamtzellproteins.....	59
15.3. Überexpression und Aufreinigung von EctDHis durch Nickelchelat-Affinitätschromatographie	60
15.4. Proteinquantifizierung mittels BCA	61
15.5. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (SDS-PAGE).....	61
15.6. <i>In vitro</i> Tests zur Untersuchung der Aktivität von EctDHis	63
16. Verwendete Chemikalien	63
III. Ergebnisse	67
1. Austausch des <i>ectB</i> -Gens durch das <i>ectD</i> -Gen zur Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion in der Δ <i>ectD</i> -Mutante MaKu03 und im Wt	68
1.1. Konstruktion von <i>H. elongata</i> MaKu03 Δ <i>ectB::ectD</i> und <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i>	68
1.2. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion der Δ <i>ectB::ectD</i> -Mutanten	70
1.2.1. <i>H. elongata</i> MaKu03 Δ <i>ectB::ectD</i> im Vergleich zur <i>ectD</i> -Deletionsmutante	70
1.2.2. <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> im Vergleich zum Wt.....	71
1.2.3. Fermentation von <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> zur Überprüfung der Hydroxyectoin-Produktion in Abhängigkeit der Wachstumsphase	73
1.2.4. Untersuchung des Gesamtzellproteins von <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> im Vergleich zum Wt.....	75
2. Erhöhung des EctD-Gehalts in <i>H. elongata</i> durch pPromEct_ectD.....	75
2.1. Konstruktion des Plasmids pPromEct_ectD	76
2.2. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion in <i>H. elongata</i> Wt ⁺ (pPromEct_ectD) .	77
2.3. Komplementierung von <i>H. elongata</i> MaKu03.....	79
3. <i>H. elongata</i> und die Promotorregion <i>promKB1</i>	80
3.1. Konstruktion von <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> Δ <i>promectD::promKB1</i>	81
3.2. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion von <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> Δ <i>promectD::promKB1</i>	83
4. Einfluss der Temperatur auf die Hydroxylierung von Ectoin.....	85
4.1. Anzucht bei dem Temperaturmaximum von 45 °C	85
4.2. Anzucht bei einem „Hitzeschock“ von 37 °C auf 50 °C.....	87
4.3. Fermentation von <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> bei einem „Hitzeschock“	89
5. <i>E. coli</i> als Ganzzellbiokatalyse-System zur Hydroxylierung von Soluten.....	93
6. <i>E. coli</i> DH5 α VIBO als Ganzzellbiokatalyse-System	94
6.1. Hydroxylierung von 2 mM Ectoin	94
6.2. Hydroxylierung von 10 mM Ectoin	95
7. <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pETectDHis als Ganzzellbiokatalyse-System.....	96
7.1. Konstruktion von pETectDHis zur Expression des <i>ectD</i> -Gens.....	97
7.2. Überprüfung der Expression von EctDHis	98
7.3. Hydroxylierung von 2 mM Ectoin	100
7.3.1. Hydroxylierung von 10 mM Ectoin.....	101
7.4. Die Substratspezifität von EctD	104

8. Hydroxylierung des inkompatiblen Soluts Guanidino-Ectoin (Gd-Ectoin)	106
8.1. Chemische Synthese von Gd-Ectoin	106
8.2. Wachstum von <i>E. coli</i> bei Anzucht mit Gd-Ectoin	107
8.3. Untersuchung zur Hydroxylierung von Gd-Ectoin	108
8.4. Fermentation zur Überprüfung der Hydroxylierung von Gd-Ectoin	110
8.5. Einfluss von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	111
8.6. <i>H. elongata</i> WUB02 (Δ ectAC) pWUB_ectD_Hel als Alternative zum Ganzzellsystem.....	113
9. <i>In vitro</i> Untersuchungen der Ectoinhydroxylase EctD aus <i>H. elongata</i>	116
9.1. Aufreinigung von EctD ^{His} mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie	116
9.2. Aktivitätstests mit aufgereinigtem EctD ^{His}	117
9.3. Konstruktion von pASKectD ^{Strep} zur Expression des Fusionsproteins EctD ^{Strep}	118
9.4. Gesamtproteinaufreinigung von <i>E. coli</i> DH5 α pASKectD ^{Strep} zur Überprüfung der Expression	119
10. Untersuchungen an <i>E. coli</i> DH5 α pAKECT1 zur heterologen Produktion von Ectoin.....	120
10.1. Ectoin-Produktion des trehalosedefizienten Stammes <i>E. coli</i> BKA-13 pAKECT1.....	122
10.2. Konstruktion von pAKECT1-tacectD zur heterologen Hydroxyectoin-Produktion in <i>E. coli</i>	124
10.3. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion in <i>E. coli</i> DH5 α pAKECT1-tacectD...	125
IV. Diskussion	128
1. Austausch des <i>ectB</i> -Gens durch <i>ectD</i> zur Erhöhung des EctD-Gehalts und der Hydroxyectoin-Produktion.....	129
1.1. Konstruktion der <i>ectB::ectD</i> -Austauschmutanten	130
1.2. Die Δ ectB:: <i>ectD</i> -Mutanten zeigten eine höhere Hydroxyectoin-Produktion.....	130
1.3. Fermentation von <i>H. elongata</i> Δ ectB:: <i>ectD</i> zur Überprüfung der Hydroxyectoin- Produktion in Abhängigkeit der Wachstumsphase.....	132
1.4. Untersuchung des Gesamtzellproteins von <i>H. elongata</i> Δ ectB:: <i>ectD</i> im Vergleich zum Wt.....	134
2. Erhöhung des EctD-Gehalts in <i>H. elongata</i> durch pPromEct_ectD.....	134
3. Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion durch Verwendung der Promotorregion <i>promKB1</i>	137
3.1. Konstruktion von <i>H. elongata</i> Δ ectB:: <i>ectD</i> Δ promectD:: <i>promKB1</i> zur Erhöhung der Hydroxyectoin-Produktion	139
3.2. Hydroxyectoin-Produktion in <i>H. elongata</i> Δ ectB:: <i>ectD</i> Δ promectD:: <i>promKB1</i>	140
4. Einfluss der Temperatur auf die Hydroxylierung von Ectoin.....	142
4.1. Wachstum der <i>Halomonas</i> -Stämme bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C	143
4.2. Hydroxyectoin-Produktion bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C und mögliche Regulationsmechanismen	145
4.3. Sauerstoff als limitierender Faktor der Hydroxylierungsreaktion.....	148
5. <i>E. coli</i> als Ganzzellbiokatalyse-System zur Hydroxylierung von Soluten.....	150
5.1. <i>E. coli</i> DH5 α VIBO als Ganzzellbiokatalyse-System	152
5.1.1. Akkumulation der hydroxylierten Verbindung im Medium	152
5.1.2. Hydroxylierung von 10 mM Ectoin.....	153
5.2. <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pETectD ^{His} als Ganzzellbiokatalyse-System	155
5.3. Hydroxylierung von 10 mM Ectoin	156
5.4. EctD ist nicht substratspezifisch	158
6. Hydroxylierung des inkompatiblen Soluts Guanidino-Ectoin.....	160
6.1. Effekt von Gd-Ectoin auf das Wachstum von <i>E. coli</i> MC4100	160
6.2. Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch EctD	161
6.3. Fermentation zur Untersuchung der Hydroxylierung von Gd-Ectoin	162

6.4. Einfluss von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	163
6.5. <i>H. elongata</i> WUB02 pWUB_ectD_Hel als Alternative zum Ganzzellsystem	164
6.6. OH-Gd-Ectoin, eine bislang unbekannte Substanz.....	166
7. <i>In vitro</i> Untersuchungen der Ectoinhydroxylase EctD aus <i>H. elongata</i>	166
8. Heterologe Totalsynthese von Ectoin und Hydroxyectoin in <i>E. coli</i>	168
8.1. Ectoin-Produktion des trehalosedefizienten Stammes <i>E. coli</i> BKA-13 pAKECT1.....	169
8.2. pAKECT1-tacectD zur heterologen Hydroxyectoin-Produktion in <i>E. coli</i>	171
9. Vergleich der Hydroxyectoin-Produktion von <i>H. elongata</i> und <i>E. coli</i> mit anderen Systemen.....	172
10. Ausblick.....	176
V. Zusammenfassung.....	180
VI. Literaturverzeichnis	183
Anhang	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Ausgewählte Vertreter von kompatiblen Soluten	7
Abb. 2 Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese in <i>H. elongata</i>	10
Abb. 3 Hydroxylierung von Ectoin durch die Ectoinhydroxylase EctD	13
Abb. 4 Bereits etablierte Vektoren für die Ganzzellbiokatalyse	17
Abb. 5 pAKECT1 zur heterologen Expression der Ectoin-Gene in <i>E. coli</i>	18
Abb. 6 Die inkompatiblen Solute Kreatin und Guanidino-Ectoin im Vergleich zu Glycinbetain und Ectoin.....	24
Abb. 7 Solute für die Supplementierung.....	31
Abb. 8 Reaktionsgleichung der Synthese von Guanidino-Ectoin	34
Abb. 9 Genetische Organisation der ursprünglichen und konstruierten <i>Halomonas</i> -Stämme ..	70
Abb. 10 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von <i>H. elongata</i> MaKu03 und <i>H. elongata</i> MaKu03 Δ ectB::ectD.....	71
Abb. 11 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von <i>H. elongata</i> Wt und <i>H. elongata</i> Δ ectB::ectD ..	72
Abb. 12 Fermentation von <i>H. elongata</i> Δ ectB::ectD in MM63-10.....	74
Abb. 13 SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung von <i>H. elongata</i> Wt und Δ ectB::ectD	75
Abb. 14 Klonierungsstrategie zur Konstruktion von pPromEct_ectD	77
Abb. 15 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von <i>H. elongata</i> Wt ⁺ im Vergleich zu Wt und Δ ectB::ectD	78
Abb. 16 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von <i>H. elongata</i> MaKu03 ⁺ und MaKu03 ⁻	79
Abb. 17 SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteine von <i>H. elongata</i> WUB02 pWUB_ectD_Hel	81
Abb. 18 Genetische Organisation von <i>H. elongata</i> Δ ectB::ectD Δ promectD::promKB1	83
Abb. 19 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von <i>H. elongata</i> Δ ectB::ectD Δ promectD::promKB1 im Vergleich zu Wt und Δ ectB::ectD	84
Abb. 20 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt der <i>Halomonas</i> -Stämme nach Anzucht bei 45 °C ..	86
Abb. 21 Wachstum der <i>Halomonas</i> -Stämme beim „Hitzeschock“ von 37 °C auf 50 °C	87
Abb. 22 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt der <i>Halomonas</i> -Stämme beim „Hitzeschock“ auf 50 °C.....	88
Abb. 23 Fermentation von <i>H. elongata</i> Δ ectB::ectD bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C.....	90
Abb. 24 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt im Vergleich zu pO ₂ während der Fermentation von <i>H. elongata</i> Δ ectB::ectD.....	91
Abb. 25 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt der Zellextrakte und des Mediums von <i>E. coli</i> DH5 α VIBO	94
Abb. 26 Hydroxylierung von 10 mM Ectoin durch <i>E. coli</i> DH5 α VIBO	96
Abb. 27 Klonierungsstrategie zur Konstruktion von pETectDHis	98
Abb. 28 SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung der Expression von EctDHis....	99
Abb. 29 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis und <i>E. coli</i> BL21 pET-22b(+)	100
Abb. 30 Hydroxylierung von 10 mM Ectoin durch <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis.....	102
Abb. 31 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis mit Glutamat als C-Quelle	103
Abb. 32 Hydroxylierung von Prolin durch <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis	105
Abb. 33 Bislang hydroxylierte Substanzen der Ectoinhydroxylase EctD	106
Abb. 34 ¹³ C-NMR-Spektrum von Gd-Ectoin.....	107
Abb. 35 Einfluss von Gd-Ectoin auf das Wachstum von <i>E. coli</i> MC4100.....	108
Abb. 36 Gd-Ectoin und OH-Gd-Ectoin-Gehalt von <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis und pET-22b(+)	109
Abb. 37 Fermentationsverlauf von <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis nach Gd-Ectoin- Supplementierung	111
Abb. 38 Effekt von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von <i>E. coli</i> BL21 pETectDHis.....	112

Abb. 39 Gd-Ectoin und OH-Gd-Ectoin-Gehalt in den Zellen von <i>H. elongata</i> WUB02 pWUB_ectD_Hel	113
Abb. 40 ¹³ C-NMR-Spektren der Zellextrakte von <i>H. elongata</i> WUB02 pWUB_ectD_Hel	115
Abb. 41 SDS-Polyacrylamidgel des Aufreinigungsverlaufs von EctDHis mittels Nickelchelat- Affinitätschromatographie	116
Abb. 42 Klonierungsstrategie zur Konstruktion von pASKectDStrep	119
Abb. 43 SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung von <i>E. coli</i> DH5α pASKectDStrep	120
Abb. 44 Intrazellulärer Solutegehalt von <i>E. coli</i> DH5α und <i>E. coli</i> DH5α pAKECT1 bei verschiedenen Salinitäten	122
Abb. 45 Fermentationsverlauf und Ectoin-Produktion von <i>E. coli</i> BKA-13 pAKECT1.....	123
Abb. 46 Konstruktion von pAKECT1-tacectD.....	125
Abb. 47 Intrazellulärer Solutegehalt von <i>E. coli</i> DH5α pAKECT1-tacectD bei verschiedenen Salinitäten	126
Abb. 48 Sequenzierung des <i>promKB1-ectD</i> Bereiches von <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> Δ <i>promectD::promKB1</i>	141
Abb. 49 Aminosäuresequenzvergleich verschiedener potentieller EctD-Proteine mit EctD aus <i>H. elongata</i>	147
Abb. 50 DNA-Sequenz der <i>ectADC</i> -Region von <i>H. elongata</i> MaKu03 Δ <i>ectB::ectD</i> und <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i>	II
Abb. 51 DNA-Sequenz der <i>promA</i> -Promotorregion und des <i>ectD</i> -Gens auf dem Plasmid pPromEct_ectD	III
Abb. 52 DNA-Sequenz der <i>promKB1-ectD</i> Region von <i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> Δ <i>promectD::promKB1</i>	IV

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verwendete <i>Halomonas elongata</i> -Stämme	26
Tab. 2 Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme	26
Tab. 3 Verwendete Plasmide	26
Tab. 4 Antibiotikaresistenzen und Konzentrationen der Nährmedien	29
Tab. 5 Zeitprofil zur Trennung der FMOC-derivatisierten Aminosäuren	44
Tab. 6 Zusammensetzung eines <i>Phusion</i> -DNA-Polymerase PCR-Ansatzes	50
Tab. 7 PCR-Programm mit der <i>Phusion</i> -DNA-Polymerase	50
Tab. 8 Zusammensetzung eines <i>Taq</i> -DNA-Polymerase PCR-Ansatzes.....	51
Tab. 9 PCR-Programm mit der <i>Taq</i> -Polymerase.....	51
Tab. 10 Verwendete Primer	53
Tab. 11 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen	62
Tab. 12 Zusammensetzung eines EctD-Aktivitätstests.....	63
Tab. 13 Verwendete Primer und PCR-Produkte zur Konstruktion von pK18 <i>mobSacB_ectD</i>	69
Tab. 14 Verwendete Primer und PCR-Produkte zur Konstruktion von pK18 <i>mobSacB_promKB1</i>	82
Tab. 15 Sequenzidentitäten der Ectoinhydroxylase EctD aus <i>H. elongata</i> mit potentiellen EctD-Proteinen aus verschiedenen Organismen	146
Tab. 16 spezifische Produktionsrate von Hydroxyectoin der verschiedenen <i>H. elongata</i> - Stämme bei 10 % und 15 % NaCl und Kultivierung bei einem Hitzeschock auf 50 °C. 173	

Abkürzungen und Trivialnamen

μ	Wachstumsrate
Abb.	Abbildung
ADAM	1-Aminoadamantan
AHT	Anhydrotetracyclin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	4,4'-Bichinolin-2,2'-Dicarbonsäure
Betain	Glycinbetain
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
C	Celsius
Carb	Carbenicillin
CIAP	(Kalbs-) intestinale Phosphatase
Cm	Chloramphenicol
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-terminal	Carboxyterminal
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DHMICA	(<i>RS</i>)-2-Methyl-4,5-Dihydro-Imidazol-4-Carbonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
<i>ectA</i>	Gen der L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase aus <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T
EctA	L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase
<i>ectB</i>	Gen der L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase aus <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T
EctB	L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase
<i>ectC</i>	Gen der L-Ectoinsynthese aus <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T
EctC	L-Ectoinsynthese
<i>ectD</i>	Gen der Ectoinhydroxylase aus <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T
EctD	Ectoinhydroxylase
EctDHis	Ectoinhydroxylase mit C-terminalem His ₆ -tag
EctDStrep	Ectoinhydroxylase mit C-terminalem Strep-tag
Ectoin	(<i>S</i>)-2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carbonsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FastAP	alkalische Phosphatase
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gd-Ectoin	Guanidino-Ectoin
h	Stunde(n)
H ₂ O _{demin.}	demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hydroxyectoin	(<i>S-S</i>)-2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carbonsäure

IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
L	Liter
<i>lysC</i>	Gen der Aspartokinase aus <i>H. elongata</i> oder <i>C. glutamicum</i>
LysC	Aspartokinase aus <i>H. elongata</i> oder <i>C. glutamicum</i>
M	Molar
MaKu03	<i>ectD</i> -Deletionsmutante
MaKu03 ^{+/-}	<i>ectD</i> -Deletionsmutante (+: mit pPromEct_ectD/ -: mit pPromEct)
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Multiple Klonierungsstelle)
mg/g TG	Milligramm pro Gramm Trockengewicht
min	Minute(n)
NaCl	Natriumchlorid
Na-TMSP	Natrium-Trimethylsilylpropionat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanzspektroskopie)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OH	Hydroxy
%	Prozent
% (v/v)	prozentualer Volumenanteil
% (w/v)	prozentualer Massenanteil pro Volumeneinheit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppm	<i>parts per million</i>
pPromEct	Bezeichnung des Plasmids, in das die Promotorregion der Ectoin-Gene aus <i>H. elongata</i> (<i>promA</i>) eingefügt wurde (Brüning, 2005)
<i>promA</i>	Promotor der Ectoin-Gene aus <i>H. elongata</i> oder <i>M. halophilus</i> (vor <i>ectA</i>)
<i>promKB1</i>	Promotor, der in <i>H. elongata</i> KB1 durch die Deletion von <i>ectA</i> vor <i>ectB</i> entsteht (bestehend aus <i>ectA</i> -Promotor mit optimaler RBS)
pWUB	pPromEct, bei dem <i>promA</i> durch <i>promKB1</i> ausgetauscht wurde
RBS	Ribosomenbindestelle
RI	<i>refractive index</i> (Brechungsindex)
RNase A	Ribonuklease A
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SOE	<i>splicing by overlap extension</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
VA	Vitaminlösung nach Imhoff und Trüper, 1977
Wt	Wildtyp
Wt ⁺	Wildtyp mit pPromEct_ectD
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

I. Einleitung

1. Leben unter extremen Bedingungen

„*Life on earth is almost everywhere*“ (Zaccai, 2011). Noch vor wenigen Jahrzehnten hätte diese Aussage kaum jemand getroffen. Heute wissen wir, dass Leben auch an Orten möglich ist, die der Mensch als lebensfeindlich bezeichnet. Lebensräume, die aus menschlicher Sicht als extrem und unmöglich empfunden werden, werden von Extremophilen als „normal“ angesehen und besiedelt. Der Begriff „extremophil“ (*philos*: griechisch für liebend) wurde 1974 von MacElroy eingeführt. Darunter werden Organismen zusammengefasst, die an den unwirtlichsten und ursprünglichsten Milieus der Erde leben und perfekt daran angepasst sind. Zu den Extremophilen zählen neben den Bakterienarten aus den Domänen *Archaea* und *Bacteria* auch Vertreter der Domäne *Eukarya* (Seckbach *et al.*, 2007). Entweder sind sie physikalischen Extremen wie Temperatur, Druck und Strahlung oder geochemischen Extremen wie pH-Wert und Salinität ausgesetzt (Rothschild und Mancinelli, 2001). Um einen Eindruck über die Eigenschaften und die Vielfalt der Extremophilen zu erhalten, werden nachfolgend die Begriffe zur Unterscheidung an einigen Beispielorganismen aufgeführt:

Ein Leben bei hoher Umgebungstemperatur sowie die Anpassung daran wird als **Thermophilie** bezeichnet. Bei *Pyrolobus fumarii* handelt es sich z. B. um einen hyperthermophilen Organismus mit einem optimalen Wachstum bei 106 °C, der aber auch noch bei Temperaturen von 113 °C wachsen kann (Prieur, 2007). Der vorläufig als *Geogemma barossii* bezeichnete „Stamm 121“, der aus einem 300 °C heißen vulkanischen Schlot am Grund des Pazifiks (*black smoker*) isoliert wurde, kann sich sogar noch bei Temperaturen oberhalb von 121 °C reproduzieren und löste *P. fumarii* als Hitzerekordhalter ab (Kashefi und Lovley, 2003). Im Gegensatz dazu können **psychrophile** Organismen, die man u. a. in gefrierenden Gewässern oder Permafrostgebieten Sibiriens findet, noch Temperaturen bis -20 °C Stand halten (Rivkina *et al.*, 2000). Die Tiefsee stellt einen perfekten Lebensraum für **barophile** Organismen dar, die sich an einen hohen hydrostatischen Druck angepasst haben. Kato *et al.* entdeckten 1998 zwei obligat barophile Arten im Challengertief, einem südwestlichen Teil des Marianengrabs, in 10.898 m Tiefe, die bei einem Druck von 80 MPa noch wachsen können. **Acidophile** Mikroorganismen leben an Standorten mit

extrem sauren pH-Werten, wie z. B. das eisenoxidierende Archaeon *Ferroplasma acidarmanus*, das bei einem pH-Wert von 0 noch Wachstum zeigt (Edwards *et al.*, 2000). Das gegenteilige Extrem, die **alkaliphilen** Organismen, bevorzugen Standorte mit hohen pH-Werten. Die obere Wachstumsgrenze für *Alkaliphilus transvaalensis* liegt bei einem pH-Wert von 12,5, wobei sein physiologisches Optimum ein pH-Wert von 10 ist (Takai *et al.*, 2001). Auch Mischformen dieser beschriebenen extremen Gruppen sind möglich, was als Polyextremophilie bezeichnet wird. *Deinococcus radiodurans* (Anderson *et al.*, 1956), welcher zu den widerstandsfähigsten Mikroorganismen auf der Erde zählt, kann nicht nur ionisierender Strahlung von bis zu 20 kGy standhalten, sondern übersteht zudem noch Vakuum, Kälte und oxidativen Stress (Makarova *et al.*, 2001).

Eine besondere Rolle in der vorliegenden Arbeit spielen die **halophilen** Organismen, die an Standorte mit hohen Salzkonzentrationen angepasst sind. Ein kürzlich entdecktes halophiles Bakterium aus der Familie der *Halomonadaceae* ist *Halomonas titanicae*, das auf einem Stück Rost der Titanik in 3.800 m Meerestiefe im Nordatlantik entdeckt wurde und vermutlich beim Abbau von Eisen unter Wasser involviert ist (Sanchez-Porro *et al.*, 2010). Dieses Bakterium ist in der Lage, bei Salzkonzentrationen von bis zu 25 % NaCl zu wachsen, wobei die optimalen Wachstumsbedingungen bei Salinitäten zwischen 2-8 % NaCl liegen. Auch der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *Halomonas elongata* stammt aus der Familie der *Halomonadaceae*. *Halomonas elongata* DSM 2581^T ist ein halophiles, Gram-negatives γ -Proteobakterium, das aus einer Salzgewinnungsanlage auf der Insel Bonaire (niederländische Antillen) isoliert wurde und bei Salinitäten von bis zu 25 % NaCl wächst, wobei sein Wachstumsoptimum bei 3 % NaCl liegt (Vreeland *et al.*, 1980).

Um unter den genannten extremen Bedingungen überleben zu können, haben extremophile Organismen eine Reihe von Strategien entwickelt. Die Anpassungen können z. B. durch Modifikation der Zellwand und Zytoplasmamembran sowie durch Veränderungen der zellulären Enzyme erfolgen. Eine Strategie der halophilen Organismen ist die intrazelluläre Akkumulation von Extremolyten (organischen Osmolyten), die die Zellen vor dem Austrocknen und Makromoleküle vor externen Stresseinflüssen schützen (Lentzen und Schwarz, 2006; Abschnitt I. 4). Die halophilen

Organismen sowie deren Anpassungsstrategien an erhöhte Salinitäten bzw. hyperosmotische Bedingungen werden im Folgenden näher beschrieben.

2. Halophile und halotolerante Mikroorganismen

Die Bezeichnung des Toten Meeres, in dem Salzkonzentrationen von bis zu 34 % erreicht werden können (Gavrieli, 1997), zeigt, dass große Mengen an Salz anfangs nicht mit Leben in Einklang gebracht werden konnte (Empadinhas und da Costa, 2008). Unter den extremophilen Mikroorganismen gibt es jedoch eine Gruppe, die in salzhaltiger Umgebung wachsen und leben kann – die Gruppe der Halophilen und Halotoleranten.

Eine klassische Einteilung der Definitionen „Halophilie“ und „Halotoleranz“ wurde bereits 1978 von Kushner erstellt, der halophile Organismen einer Gruppe zuordnete, die ohne Salz unfähig ist zu wachsen. Dabei unterschied er moderat halophile Organismen wie *H. elongata*, die optimal zwischen 3 bis 5 % NaCl wachsen, von extrem halophilen Organismen, die ein Wachstumsoptimum zwischen 15 bis 30 % NaCl besitzen. Als halotolerante Organismen klassifizierte er solche, die sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Salz wachsen können, im Fall von extremen Halotoleranten bis zu einer Salinität von über 15 % NaCl. Allerdings ist eine solch scharfe Abgrenzung der Begriffe schwierig, da das Salzminimum, -optimum und -maximum des jeweiligen Organismus auch vom Kultivierungsmedium und der Wachstumstemperatur abhängig ist (Oren, 2008). Zur Vereinfachung bezeichnete Oren daher alle Organismen als halophil, die oberhalb einer Salzkonzentration von 10 % gut wachsen können. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Halotoleranten um Organismen, die ein Optimum unter 3 % NaCl aufweisen und bei einer Salzkonzentration von über 10 % nicht mehr wachsen.

Sowohl halophile als auch halotolerante Organismen sind in allen drei Domänen des Lebens, also unter den *Archaea*, *Bacteria* und *Eukarya*, bekannt (Oren, 2002; Butinar *et al.*, 2005). Generell sind sie an Standorten mit erhöhter Salinität bis hin zu gesättigten NaCl-Lösungen zu finden. Neben natürlichen salzhaltigen Umgebungen wie Meerwasser (3,5 %) oder dem Toten Meer (bis 34 %) kommen auch künstlich erzeugte saline und hypersaline Biotope wie Salzgewinnungsanlagen oder Pökelfleisch als Lebensraum in Frage (Avron, 1986; Galinski und Trüper, 1994; Ventosa *et al.*, 1998;

Nevo *et al.*, 2003). In manchen Ökosystemen leben diese Mikroorganismen in einer solch großen Anzahl, dass sie mit bloßem Auge ohne Zuhilfenahme eines Mikroskops erkannt werden können. Die Salzgewinnungsanlagen oder Verdunstungsbecken von Meerwassersalinen sind oft rötlich bis pink gefärbt, verursacht durch z. B. *Archaea* (*Halobacteriales*), *Bacteria* (*Salinibacter*) oder *Eucarya* (*Dunaliella salina*) (Ma *et al.*, 2010).

3. Anpassung an hyperosmotische Bedingungen (Osmoadaptation)

Um an salinen oder hypersalinen Standorten überleben zu können, müssen die Mikroorganismen Anpassungsstrategien entwickelt haben, denn eine Umgebung erhöhter Salinität ist verknüpft mit einer niedrigen Wasseraktivität (a_w). Die freie Verfügbarkeit von Wasser ist für eine Zelle jedoch unabdingbar, um all ihre zellulären Vorgänge aufrecht zu erhalten. Da die Zytoplasmamembran von Mikroorganismen semipermeabel ist, kann Wasser frei über die Membran diffundieren, während Ionen bzw. große organische Moleküle zurückgehalten werden (Bovell *et al.*, 1963). Bei der Osmose, einem elementaren Prozess in der Natur, diffundiert Wasser von einer Region mit niedriger Konzentration an gelösten Stoffen in Bereiche mit einer höheren Konzentration, sofern dies über eine semipermeable Membran möglich ist (Madigan *et al.*, 2001). Bei Mikroorganismen, die erhöhter Salinität und somit niedriger Wasseraktivität ausgesetzt sind, besteht daher die Gefahr, dass sie aufgrund des osmotischen Drucks Wasser an die Umgebung verlieren, der Turgordruck zusammenbricht und sie dehydrieren bzw. sterben (Koch, 1983; da Costa *et al.*, 1998). Um diesem Wasserverlust entgegenzuwirken, haben halophile und halotolerante Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, die das intrazelluläre chemische Potential des Wassers erniedrigen, bis sich zwischen Zytoplasma und umgebendem Milieu ein osmotisches Gleichgewicht einstellt (Csonka, 1989). Dies kann durch zwei unterschiedliche Strategien der Osmoadaptation erfolgen: entweder durch die Akkumulation von anorganischen Salzen („*high-salt-in*“) oder aber durch Anhäufung von organischen Soluten („*organic-osmolyte-in*“; Oren, 2008).

3.1. „High-salt-in“-Strategie

Bei der von da Costa *et al.* (1998) als „*salt-in*“ bezeichneten Strategie werden in der Regel K^+ und Cl^- -Ionen in hohen Konzentrationen in der Zelle akkumuliert. Dadurch

wird die intrazelluläre Wasseraktivität erniedrigt und das Zytoplasma isoosmotisch zum Außenmedium gehalten. Einige *Halobacterium*-Arten können K^+ -Ionen sogar bis zu einer Konzentration von 5 M in den Zellen anhäufen (Martin *et al.*, 1999). Aufgrund der hohen Akkumulation an KCl bezeichnete Oren (2008) diese Form der Anpassung auch als „*high-salt-in*“-Strategie. Obwohl diese Strategie energetisch relativ kostengünstig ist, ist sie nicht weit verbreitet in den verschiedenen phylogenetischen und physiologischen Gruppen der Halophilen. Vertreter dieser „*high-salt-in*“-Strategie sind nur auf drei unterschiedliche Gruppen beschränkt: auf die extrem halophilen *Archaea* der Familie der *Halobacteriaceae*, auf die anaeroben *Bacteria* der Ordnung *Haloanaerobiales* sowie auf das extrem halophile Eubakterium *Salinibacter ruber* (Galinski und Trüper, 1994; Anton *et al.*, 2002; Oren *et al.*, 2002).

Die Akkumulation hoher zytoplasmatischer Konzentrationen von geladenen Ionen erfordert eine Anpassung der gesamten intrazellulären enzymatischen Maschinerie. So besitzen z. B. die meisten Proteine einen großen Anteil an sauren Aminosäuren (Glutamat, Aspartat). Die negative Ladung dieser bindet die in den Zellen vorhandenen K^+ -Ionen, was in einer Stabilisierung der nativen Konformation resultiert. Im Gegensatz dazu führt ein Fehlen hoher intrazellulärer K^+ -Konzentrationen zur gegenseitigen Abstoßung der negativ geladenen Reste und somit zur Denaturierung der Proteine (Lanyi, 1974; Mevarech *et al.*, 2000; Oren, 2002). Daher sind die Vertreter dieser Gruppe zwar sehr erfolgreich bei der Anpassung an extreme Salzkonzentrationen, aber auch relativ unflexibel, was sie auf Lebensräume mit konstant und gleichbleibend hohen Salinitäten beschränkt (Ventosa *et al.*, 1998).

3.2. „*Organic-solutes-in*“-Strategie

Weiter verbreitet in der Natur ist die zweite Strategie der Osmoadaptation, die auf der Akkumulation von organischen osmoregulatorischen Soluten beruht („*organic-solutes-in*“; Oren, 2008). Zellen, die diese Form der Anpassung nutzen, akkumulieren zwar oft als erste Antwort auf einen hyperosmotischen Schock anorganische Ionen wie K^+ , diese werden allerdings im weiteren Verlauf der Stressanpassung durch niedermolekulare organische Solute mit osmotischem Potential ersetzt (Galinski, 1995; Ventosa *et al.*, 1998). Die intrazelluläre Akkumulation dieser organischen Solute geschieht entweder durch Aufnahme über entsprechende Transportsysteme aus der Umgebung oder durch *de novo* Synthese, wobei die Aufnahme energetisch kostengünstiger ist und so der *de*

novo Synthese vorgezogen wird (Oren, 1999). Da diese Solute in hohen Konzentrationen (> 0,5 M) im Zytoplasma angereichert werden können, ohne einen negativen Einfluss auf die Zellfunktionen auszuüben, werden sie als kompatible Solute bezeichnet (Brown, 1976).

Diese Form der Strategie ist weit verbreitet bei *Bacteria* und *Eucarya* und auch bei einigen methanogenen *Archaea* (Lai *et al.*, 1991; von Blohn *et al.*, 1997; Hohmann, 2002; Oren, 2002). Auch die beiden in dieser Arbeit untersuchten Organismen, *Halomonas elongata* und *Escherichia coli*, wenden diese Form der Osmoadaptation an und reagieren auf osmotischen Stress entweder durch Aufnahme von in der Umgebung vorhandener kompatibler Solute oder durch *de novo* Synthese (Abschnitt I. 5 und 6; Galinski, 1995; Ventosa *et al.*, 1998).

Da die kompatiblen Solute unter hypoosmotischen Bedingungen durch entsprechende Transport- oder Effluxsysteme aus der Zelle freigesetzt werden können und die zellulären Proteinkomponenten nicht abhängig von konstant hohen Salzkonzentrationen sind, ermöglicht die „*organic-solutes-in*“-Strategie den Mikroorganismen eine hohe Flexibilität und ein Überleben an Standorten mit schwankenden Salinitäten (Ventosa *et al.*, 1998).

4. Übersicht kompatibler Solute

Bei den durch die „*organic-solutes-in*“-Strategie akkumulierten kompatiblen Soluten handelt es sich um niedermolekulare, polare, gut wasserlösliche Verbindungen, die bei physiologischem pH-Wert meist ladungsneutral oder zwitterionisch vorliegen und mit dem Zellstoffwechsel kompatibel sind (Galinski und Trüper, 1994; Galinski, 1995; Grant, 2004). Die Vielfalt an kompatiblen Soluten ist groß, sie können jedoch in verschiedene chemische Kategorien oder Stoffklassen eingeordnet werden: (1) Aminosäuren (α -Glutamat, β -Glutamat, Glutamin, Alanin, Prolin), (2) Aminosäurederivate (Glycinbetain, Ectoin, Hydroxyectoin), (3) N-acetylierte Diaminosäuren (Ornithin, Lysin), (4) Zucker sowie deren Derivate (Trehalose, Saccharose, Mannosylglycerat), (5) Polyole (Glycerol, Arabitol, Mannitol) und (6) Schwefelverbindungen (Dimethylsulfoniopropionat) (Galinski, 1995; da Costa *et al.*, 1998; Grant, 2004). Einige Beispiele kompatibler Solute sind mit ihrer Strukturformel in Abb. 1 dargestellt.

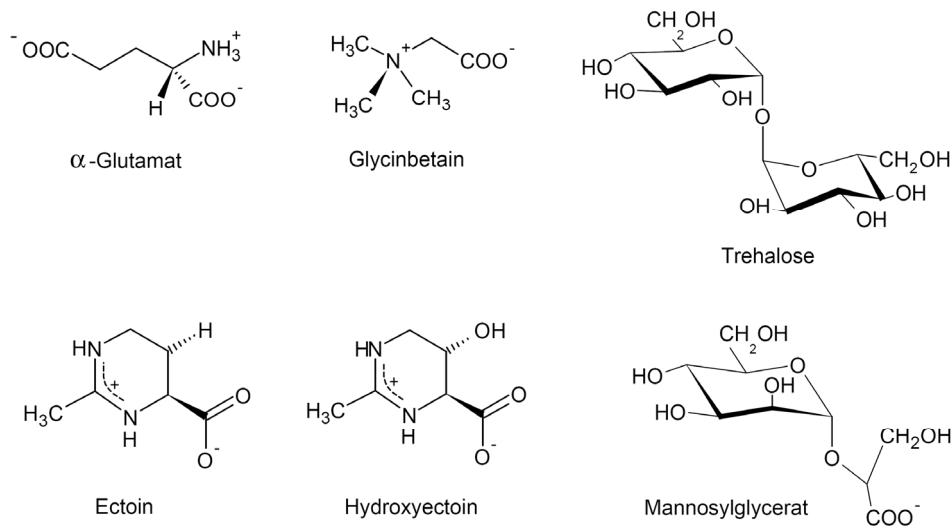


Abb. 1 Ausgewählte Vertreter von kompatiblen Soluten

Dargestellt sind zum einen die Strukturformeln kompatibler Solute, die von *E. coli* und *H. elongata* akkumuliert oder *de novo* synthetisiert werden. α -Glutamat wird als erste Antwort auf hyperosmotische Bedingungen als Gegenion zu K^+ synthetisiert und im Zuge der Stressanpassung durch Trehalose (*E. coli*) bzw. Ectoin und Hydroxyectoin (*H. elongata*) ersetzt. Glycinbetain wird von beiden Organismen über entsprechende Transportsysteme aus dem Medium aufgenommen. Zum anderen ist das aus thermophilen Organismen stammende Solut Mannosylglycerat abgebildet, das neben der Funktion als Osmolyt die Zellen vor Hitzeeinflüssen schützt.

Kompatible Solute, wie α -Glutamat, Glycinbetain und Trehalose, sind in der Natur weit verbreitet, während andere ausschließlich in spezifischen Gruppen von Organismen vorhanden sind. α -Glutamat wird in vielen Mikroorganismen, wie *E. coli* und *H. elongata*, als erste Antwort auf einen hyperosmotischen Schock als Gegenion zu K^+ synthetisiert, bevor das K^+ -Glutamat Ionenpaar durch andere ungeladene kompatible Solute ersetzt wird (Dinnbier *et al.*, 1988; Kraegeloh und Kunte, 2002). Das β -Isomer (β -Glutamat) hingegen wurde bislang nur bei einigen mesophilen und thermophilen methanogenen *Archaea* und bei Actinomyceten wie *Nocardiopsis halophila* nachgewiesen (Robertson *et al.*, 1992; Roberts, 2005). Bei dem Zuckerderivat Mannosylglycerat handelt es sich um ein typisches kompatibles Solut thermophiler und hyperthermophiler Organismen. Während mesophile Mikroorganismen meist neutrale oder zwitterionische Solute akkumulieren, sind die bei (hyper)thermophilen Bakterien vorkommenden kompatiblen Solute hauptsächlich negativ geladen (Martins *et al.*, 1996; Santos und da Costa, 2002). Hier kompensieren die negativ geladenen Solute häufig die hohen intrazellulären K^+ -Konzentrationen (Martin *et al.*, 1999; Roberts, 2000).

Neben dem Vorkommen bestimmter kompatibler Solute in spezifischen Organismen ist auch der Salinitätsbereich von Bedeutung. Das aus der Gruppe der Zucker stammende Solut Trehalose ist typisch für Organismen mit einer niedrigen Salztoleranz (Galinski und Trüper, 1994). *E. coli* synthetisiert unter hyperosmotischen Bedingungen dieses nichtreduzierende Disaccharid und kann dadurch eine Salinität von ca. 3,8 % NaCl im Minimalmedium ohne Zusatz anderer Solute tolerieren (Larsen *et al.*, 1987) (Abschnitt I. 6).

Für eine Anpassung an höhere Salinitäten sind die Solute aus der Gruppe der Aminosäurederivate von größerer Bedeutung. Die vorwiegend in halophilen *Bacteria* akkumulierten kompatiblen Solute sind Glycinbetain und das zyklische Aminosäurederivat Ectoin (Roberts, 2005; Oren, 2008). Glycinbetain, falls im umgebenden Milieu (z. B. Komplexmedium) vorhanden, wird von den meisten chemoheterotrophen *Bacteria*, wie auch *E. coli* und *H. elongata*, über entsprechende Transportsysteme aufgenommen. Nur wenige Organismen sind hingegen zur *de novo* Synthese aus Glycin befähigt (Nyyssölä *et al.*, 2000). *E. coli* und der mit *H. elongata* nah verwandte Stamm *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T sind allerdings in der Lage, aus dem Medium aufgenommenes Cholin in zwei Schritten zu Glycinbetain zu oxidieren (Landfald und Strøm, 1986; Canovas *et al.*, 1998).

Weiter verbreitet ist die Synthese des zyklischen Aspartat-Derivats Ectoin, das von vielen aeroben chemoheterotrophen *Bacteria*, wie *H. elongata*, als Hauptsolut akkumuliert wird und daher auch als Marker für halophile und halotolerante Organismen herangezogen werden kann (Galinski *et al.*, 1985; Severin *et al.*, 1992; Roberts, 2005). Unter Stressbedingungen wird Ectoin allein oder in Verbindung mit anderen Soluten, wie z. B. mit dem hydroxylierten Derivat Hydroxyectoin, synthetisiert (Abb. 1; Galinski, 1995). Ectoin ((S)-2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carbonsäure) wurde vor mehr als 25 Jahren von Galinski *et al.* (1985) in dem Gram-negativen, extrem halophilen, phototrophen Schwefelbakterium *Halorhodospira halochloris* (früher: *Ectothiorhodospira halochloris*) entdeckt. Das hydroxylierte Derivat 5-Hydroxyectoin ((S,S)-2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carbonsäure) wurde wenige Jahre später in dem Gram-positiven Bodenbakterium *Streptomyces parvulus* nachgewiesen (Inbar und Lapidot, 1988) und wird hauptsächlich von Gram-positiven halophilen und halotoleranten Organismen wie *Streptomyces griseolus*, *Brevibacterium*

linens, *Marinococcus* sp. M52 oder *Virgibacillus salexigens* (früher: *Salibacillus salexigens*) akkumuliert (Severin *et al.*, 1992; Frings *et al.*, 1995; Bursy *et al.*, 2007). Während der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *H. elongata* als Hauptsolut Ectoin und erst unter Hochsalzbedingungen und Hitzestress Hydroxyectoin akkumuliert, konnte in anderen Organismen wie *M. halophilus* oder *V. salexigens* eine Hydroxyectoin-Synthese hauptsächlich in der stationären Wachstumsphase beobachtet werden (Wolfarth *et al.*, 1990; Frings *et al.*, 1995; Bursy *et al.*, 2007).

Neben der Funktion als osmoregulatorische Schutzsubstanzen zur Aufrechterhaltung des Turgors besitzen kompatible Solute wie Ectoin und Hydroxyectoin auch stabilisierende Eigenschaften unter verschiedenen Stresseinflüssen. Bevor dieser Schutz auf Makromoleküle wie Proteine und DNA sowie auf ganze Zellen beschrieben wird (Abschnitt I. 8), wird im Folgenden die Osmoadaptation der in dieser Arbeit untersuchten Organismen *H. elongata* und *E. coli* sowie die Nutzung von *E. coli* als heterologes Expressionssystem beschrieben.

5. Osmoadaptation von *Halomonas elongata*

Ein Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Hydroxyectoin-Synthese in *H. elongata* DSM 2581^T zur Optimierung eines Hydroxyectoin-produzierenden Stammes. Die Biosynthese von Ectoin bzw. Hydroxyectoin wurde bislang in mehreren Spezies untersucht (Louis und Galinski, 1997; Canovas *et al.*, 1997; Göller *et al.*, 1998; Kuhlmann und Bremer, 2002; Reshetnikow *et al.*, 2004; Bursy, 2005). Ausgehend von L-Aspartat wird durch die Aktivität der beiden Enzyme Aspartokinase (LysC) und Aspartat- β -semialdehyd-Dehydrogenase (Asd) L-Aspartat- β -semialdehyd gebildet (Abb. 2). Dieses Zwischenprodukt ist nicht nur Ausgangssubstrat für die Synthese der Aminosäuren der Aspartatfamilie (Lysin, Methionin und Threonin), sondern auch für die Ectoin-Biosynthese, die durch drei enzymatisch katalysierte Reaktionen mit Hilfe der Enzyme EctABC erfolgt. Die kodierenden Gene sind als Operon im Genom von *H. elongata* organisiert und liegen unter Kontrolle eines osmoregulierbaren Promotors (vgl. dazu Abb. 9; Peters *et al.*, 1990; Göller *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 1999).

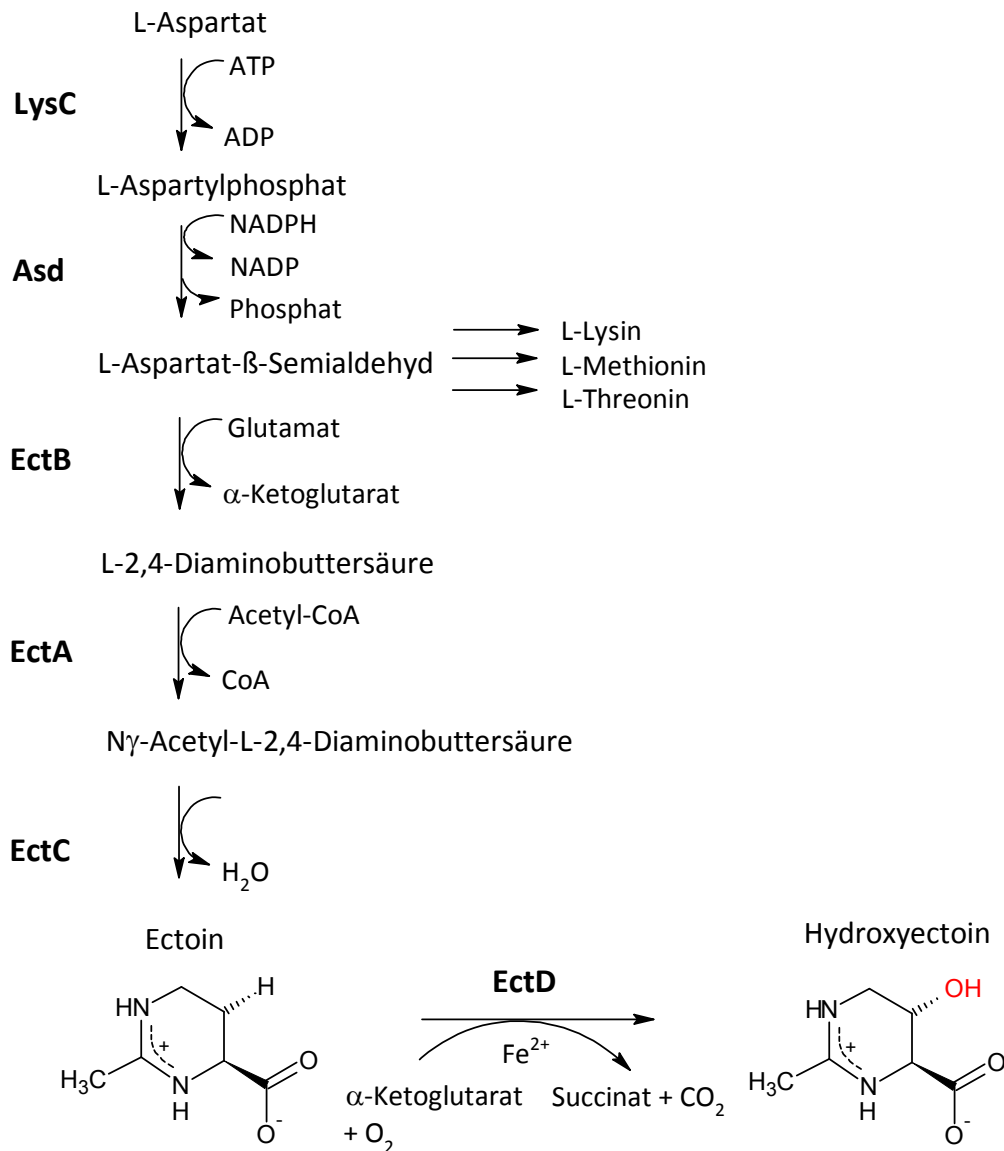


Abb. 2 Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese in *H. elongata*

Dargestellt ist die Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese in *H. elongata*. Ausgehend von L-Aspartat, das durch die Aktivitäten der Aspartokinase **LysC** und der Aspartat- β -semialdehyd-Dehydrogenase **Asd** über L-Aspartylphosphat zu Aspartat- β -semialdehyd umgewandelt wird, beginnt die Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Biosynthese mit Hilfe der Enzyme EctABCD. **EctA**: L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase; **EctB**: L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase; **EctC**: L-Ectoinsynthase; **EctD**: Ectoinhydroxylase.

Untersuchungen an anderen Gram-negativen und Gram-positiven *Bacteria* haben gezeigt, dass Ectoin mit Hilfe dieses evolutionär konservierten *ectABC*-Clusters synthetisiert wird. In vielen Organismen beinhaltet dieses Gencluster ein weiteres Gen, das für eine putative Aspartokinase (Ask) kodiert, die eine spezifische Rolle in der Ectoin-Biosynthese spielen könnte (Lo *et al.*, 2009; Schwibbert *et al.*, 2010).

H. elongata besitzt jedoch keine solche Aspartokinase und ist somit auf die Aktivität der Aspartokinase LysC angewiesen.

Die Enzyme der Ectoin-Biosynthese aus *H. elongata* wurden von Ono *et al.* (1999) aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Im ersten Schritt der eigentlichen Ectoin-Biosynthese wird L-Aspartat- β -Semialdehyd durch die L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase (EctB) zu L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA) umgesetzt, wobei Glutamat als Aminogruppendonor dient (Abb. 2). Anschließend wird durch die L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (EctA) katalysierte Reaktion Acetyl-CoA auf DABA übertragen, so dass N γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure (ADABA) entsteht. Der Ringschluss zum Ectoin wird durch die L-Ectoinsynthase (EctC) unter Wasserabspaltung katalysiert. Unter bestimmten Stressbedingungen, wie hohe Salinitäten und Temperaturen, konvertiert *H. elongata* Ectoin zu 5-Hydroxyectoin (Wolfarth *et al.*, 1990). Diese Reaktion wird durch die Ectoinhydroxylase (EctD, Abschnitt I. 5.1) katalysiert.

Erst kürzlich wurde die Genomsequenz von *H. elongata* veröffentlicht (Acc. Nr.: FN869568.1). Das über 4 Mbp große Genom (Vorhersage von 3473 Proteinkodierenden Genen) mit einem hohen GC-Gehalt von 63,6 % enthält einen neu entdeckten Stoffwechselweg, der für den Abbau von Ectoin zu Aspartat verantwortlich ist (Schwibbert *et al.*, 2010). Die verantwortlichen Gene wurden als *doeABCD* (*degradation of ectoine ABCD*) bezeichnet. Der Abbau von Ectoin erfolgt durch Hydrolyse von Ectoin durch die Aktivität der Ectoin-Hydrolase (DoeA) zu N α -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure, gefolgt von der Deacetylierung zu DABA durch die N α -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure Deacetylase (DoeB). DABA kann dann entweder durch die Diaminobuttersäure Transaminase (DoeD) und die Aspartat-Semialdehyd Dehydrogenase (DoeC) zu L-Aspartat umgewandelt werden oder tritt wieder in den Ectoin-Biosyntheseweg ein. Somit ist in *H. elongata* ein Zyklus von Ectoin-Synthese und Abbau durch Acetylierung und Deacetylierung von DABA und N α -Ac-DABA gegeben, der ein schnelles Reagieren auf verändernde Umweltbedingungen möglich macht.

5.1. Die Ectoinhydroxylase EctD

Die Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* ist verantwortlich für die Hydroxylierung von Ectoin. Bereits in vorangegangenen Arbeiten konnten Enzyme mit entsprechender Funktion aus verschiedenen Organismen identifiziert werden. So wurde von Grammel

(2000) die Ectoinhydroxylase ThpD aus *Streptomyces chrysomallus* identifiziert, die die α -Ketoglutarat-abhängige Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin katalysiert und deren kodierendes Gen direkt stromabwärts des Ectoin-Genclusters liegt. Bislang sind weitere Ectoinhydroxylasen aus Organismen wie *Virgibacillus salexigens* und *Chromohalobacter salexigens* beschrieben und charakterisiert (Bursy, 2005; García-Estapa *et al.*, 2006).

Das Gen der Ectoinhydroxylase *ectD* aus *H. elongata* wurde von Ures (2005) mittels verschiedener PCR-Techniken und anschließender Sequenzierung identifiziert. Durch *in frame* Deletion des *ectD*-Gens in *H. elongata* konnte gezeigt werden, dass EctD für die Hydroxylierung von Ectoin verantwortlich ist, da die *ectD*-Deletionsmutante *H. elongata* MaKu03 nicht mehr in der Lage war, Hydroxyectoin zu synthetisieren. Das *ectD*-Gen (999 bp) kodiert für ein 332 Aminosäure großes Enzym mit einem Molekulargewicht von 37,4 kDa. Während bei vielen Organismen das *ectD*-Gen Teil des *ectABC*-Gencluster ist, liegt *ectD* in *H. elongata* unabhängig von diesem Cluster vor und enthält einen möglichen Promotor, der Sequenzähnlichkeiten mit σ^S -abhängigen Promotoren aufweist. Der σ^S -Faktor (auch σ^{38}), der vom *rpoS*-Gen kodiert wird, ist für die Expression von Genen bei einer generellen Stressantwort verantwortlich. So ist σ^S bei der Zellantwort von Stressfaktoren wie Nährstoffmangel beim Übergang in die stationäre Phase, osmotischem Stress, Kälte- oder Hitzeschock oder bei saurem pH-Wert beteiligt (Loewen und Hengge-Aronis, 1994; Hengge-Aronis, 1996).

Bei EctD handelt sich um eine Nicht-Häm-Fe(II)- α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenase (Ures, 2005; Bursy *et al.*, 2007). Das während des Zitratzyklus gebildete Intermediat α -Ketoglutarat dient als Kofaktor für die Hydroxylierungsreaktion. Mit Hilfe von molekularem Sauerstoff wird Hydroxyectoin synthetisiert. Während der Hydroxylierungsreaktion wird α -Ketoglutarat oxidativ decarboxyliert, wobei ein Atom des molekularen Sauerstoffs ins Substrat Ectoin eingebaut wird und die Hydroxylgruppe bildet, während das andere Sauerstoffatom auf den Kofaktor α -Ketoglutarat übertragen und Succinat sowie CO₂ freigesetzt werden (Abb. 3).

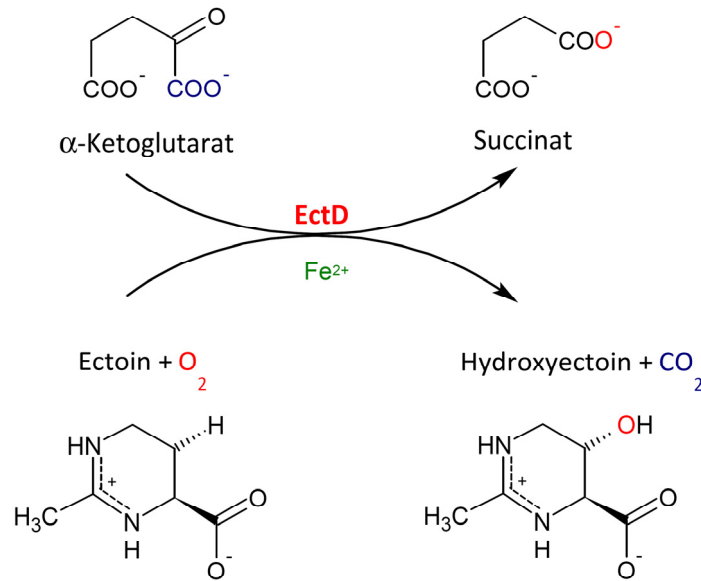


Abb. 3 Hydroxylierung von Ectoin durch die Ectoinhydroxylase EctD

Schematische Darstellung der Hydroxylierung von Ectoin durch die Ectoinhydroxylase EctD. Der Kofaktor der Hydroxylierungsreaktion α -Ketoglutarat wird oxidativ decarboxyliert, wobei ein Atom des molekularen Sauerstoffs auf das Substrat Ectoin übertragen wird und die Hydroxylgruppe bildet, während das andere Sauerstoffatom in den Kofaktor integriert und als Succinat freigesetzt wird.

Für die Aktivität von EctD ist weiterhin Fe^{2+} notwendig, das im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden ist (Myllylä *et al.*, 1992). Das an der Fe^{2+} -Bindung beteiligte konservierte Motiv (2-His-1-Carboxylat-Triade, H-X-D-X₉₈₋₁₀₀-H) ist auch in der Proteinsequenz von EctD aus *H. elongata* vorhanden (Bursy *et al.*, 2007; vgl. Abschnitt IV. 4.2, Abb. 49). Im ruhenden Zustand liegt Fe^{2+} im aktiven Zentrum koordiniert mit der 2-His-1-Carboxylat-Triade vor, während die anderen drei Koordinationsstellen mit Wasser besetzt sind. Nach der Bindung von α -Ketoglutarat und O_2 entsteht ein Fe(III)-Superoxid-Radikal-Anion, das durch einen nukleophilen Angriff α -Ketoglutarat decarboxylieren kann. Ein daraus resultierendes hochenergiereiches Oxo-Fe(IV)-Intermediat führt zur Abspaltung des Wasserstoffatoms im Substrat Ectoin und der anschließenden Übertragung der Hydroxylgruppe ins Substrat (Price *et al.*, 2003; Hausinger, 2004; Bursy, 2005; Clifton *et al.*, 2006).

6. Osmoadaptation von *Escherichia coli*

Neben der Untersuchung der Hydroxyectoin-Synthese in dem moderat halophilen Organismus *H. elongata* wurde in der vorliegenden Arbeit *Escherichia coli* als

heterologes System zur Produktion von kompatiblen Soluten wie Ectoin, Hydroxyectoin und anderen hydroxylierten Verbindungen genutzt. Bei diesem Organismus handelt es sich um ein Gram-negatives, halotolerantes, fakultativ anaerobes γ -Proteobakterium aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, das bei Salinitäten bis zu knapp 4 % NaCl Wachstum zeigt (Larsen *et al.*, 1987).

Als initiale Stressantwort unter hyperosmotischen Bedingungen akkumuliert *E. coli* α -Glutamat als Gegenion zu dem ebenfalls akkumulierten und über spezifische Transportsysteme aufgenommenem K^+ (Dinnbier *et al.*, 1988). Im weiteren Verlauf der Osmoadaptation wird das K^+ -Glutamat Ionenpaar durch *de novo* synthetisierte Trehalose ersetzt (Larsen *et al.*, 1987). Die Enzyme für die Biosynthese von Trehalose werden durch die Gene *otsA* (Trehalose-6-Phosphat-Synthase) und *otsB* (Trehalose-6-Phosphatase) kodiert, welche im Genom als *otsAB* Operon unter Kontrolle eines σ^S -abhängigen Promotors organisiert vorliegen (Giaever *et al.*, 1988; Hengge-Aronis *et al.*, 1991; Strøm und Kaasen, 1993; Kaasen *et al.*, 1994). Die osmoregulierte Trehalose-Synthese beginnt mit der Kondensation von UDP-Glucose und Glucose-6-Phosphat zu Trehalose-6-Phosphat, katalysiert durch das Enzym OtsA, dessen Aktivität durch K^+ -Glutamat aktiviert wird (Giaever *et al.*, 1988). In einem zweiten Schritt wird Trehalose-6-Phosphat durch OtsB zu Trehalose dephosphoryliert. Aufgrund dieser *de novo* Synthese ist *E. coli* zu einem Wachstum in Minimalmedium bis zu einer Salinität von 3,8 % NaCl befähigt (Larsen *et al.*, 1987).

6.1. Transportsysteme für kompatible Solute in *E. coli*

Neben der Synthese des kompatiblen Soluts Trehalose kann *E. coli* auch in der Umgebung vorhandene kompatible Solute über spezifische Transportsysteme aufnehmen, was dem Organismus eine Osmotoleranz von bis zu 1 M NaCl (5,8 %) verleiht (Gouesbet *et al.*, 1994). Bei dem Transport von Soluten über die Zytoplasmamembran sind in *E. coli* vor allem die Transporter ProP und ProU von Bedeutung (Culham *et al.*, 1993; Lucht und Bremer, 1994). Ursprünglich wurden sie als Aufnahmesystem für Prolin identifiziert, mittlerweile ist jedoch gezeigt worden, dass ProP und ProU ein breites Spektrum an kompatiblen Soluten ins Zytoplasma transportieren, wobei Glycinbetain und Prolinbetain mit einer hohen Affinität transportiert werden (Csonka und Epstein, 1996). Daneben ist die Aufnahme weiterer

Solute wie z. B. Ectoin, Pipicolinsäure und Cholin bestätigt (Jebbar *et al.*, 1992; Kempf und Bremer, 1998).

Obwohl beide Transporter ein ähnliches Substratspektrum besitzen, unterscheiden sie sich wesentlich voneinander. Bei ProP handelt es sich um ein singuläres Transmembranpeptid mit einer niedrigen Substrataffinität. Der Transporter gehört zur Klasse der sekundären Transportsysteme aus der *major facility superfamily* (MFS), der die protonenmotorische Kraft (Symport von Ionen/Kationen) nutzt, um die Solute ins Zytoplasma zu transportieren (Cairney *et al.*, 1985; MacMillan *et al.*, 1999; Wood, 1999). Die Expression von *proP* steht unter der Kontrolle zweier Promotoren, die osmotisch bzw. σ^S -abhängig reguliert werden (Mellies *et al.*, 1995; Xu und Johnson, 1997). Die Transportaktivität wird mit steigender Osmolarität erhöht, weshalb ProP auch als Osmosensor und -regulator bezeichnet werden kann (Milner *et al.*, 1988; Culham *et al.*, 1993).

ProU hingegen ist ein osmotisch induzierbares Multikomponentensystem des primären Transportsystems mit hoher Substrataffinität. ProU gehört der ABC-Superfamilie (*ATP-binding cassette*) an und besteht aus der zytoplasmatischen, membranassoziierten ATPase ProV, dem integralen Membranprotein ProW und dem periplasmatischen Bindeprotein ProX (Kempf und Bremer, 1998; Wood, 1999). Im Gegensatz zu ProP wird beim Transport der Solute über ProU ATP verbraucht. Außerdem besitzt ProU eine größere Substratspezifität als ProP, was durch die spezifische Bindung des Bindeproteins ProX an die Substrate Glycinbetain und Prolin gegeben ist (Gouesbet *et al.*, 1994; Haardt *et al.*, 1995).

Mit Hilfe von ProP und ProU ist *E. coli* befähigt, unter hyperosmotischen Bedingungen kompatible Solute aus dem umgebenden Milieu aufzunehmen. Die größte Osmotoleranz erhält *E. coli* durch Aufnahme von Ectoin, Glycinbetain, Prolinbetain oder Cholin, das intrazellulär zu Betain oxidiert werden kann (Le Rudulier *et al.*, 1984; Landfald und Strøm, 1986; Larsen *et al.*, 1987; Canovas *et al.*, 1998). Da *E. coli* Ectoin im Zytoplasma akkumuliert, das Solut jedoch nicht metabolisiert, wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten *E. coli* als Ganzzellbiokatalyse-System genutzt, um Ectoin zu Hydroxyectoin umzuwandeln (Ures, 2006, unveröffentlicht; Vielgraf, 2008).

7. *E. coli* als heterologes Expressionssystem

7.1. *E. coli* als Ganzzellbiokatalyse-System

Unter der Ganzzellbiokatalyse oder Ganzzellbiotransformation versteht man eine enzymatisch katalysierte Stoffumwandlung von Substraten, die in die Zelle aufgenommen wurden, ohne vorherige Aufreinigung des entsprechenden konvertierenden Enzyms. So werden für die Stoffumwandlung ganze Zellen als Katalysator eingesetzt. Diese Methode dient zur Gewinnung spezieller Produkte, vor allem zur Produktion stereospezifischer Verbindungen durch entsprechende Enzyme (Bertau, 2002; Bommarius und Riebel, 2004). So können neuartige Substanzen produziert und aufwendige Aufreinigungsschritte z. B. bei der Trennung von Racematen umgangen werden.

Ein häufig als heterologes Expressionssystem genutzter Organismus ist *E. coli*. Seine Handhabung, Transformation und Kultivierung ist einfach und er ist genetisch und biochemisch sehr gut charakterisiert. In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Ganzzellbiokatalyse-Systeme in *E. coli* entwickelt und untersucht. Ziel war es, Ectoin mit Hilfe von EctD aus *H. elongata* zu Hydroxyectoin umzuwandeln sowie neue hydroxylierte Verbindungen zu produzieren. Grammel (2000) zeigte, dass die Ectoinhydroxylase ThpD aus dem Gram-positiven *Streptomyces chrysomallus*, trotz der nahen Verwandtschaft zu Prolinhydroxylasen, Prolin nicht als Substrat erkannte und zu seinem Hydroxyderivat umsetzte. Zur Überprüfung, ob EctD aus *H. elongata* unspezifischer ist und daher weitere Substrate als Ectoin erkennt, wurden folgende Ganzzellsysteme in *E. coli* entwickelt:

Ures (2006, unveröffentlicht) nutzte *E. coli* BL21 (DE3) als Expressionssystem. Dieser Stamm wurde speziell für die Überexpression von heterolog exprimierten Genen konstruiert (Studier und Moffatt, 1986). Das Gen der hochselektiven T7-RNA-Polymerase aus dem Bacteriophagen λ (DE3 *lysogen*) liegt in diesem Stamm unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Dieser Stamm dient als Wirt für pET-Vektoren (Novagen, Madison, USA), die den T7-Promotor besitzen, hinter den das gewünschte Zielgen kloniert werden kann. Ures klonierte das *ectD*-Gen aus *H. elongata* in den Vektor pET-22b(+) und transformierte *E. coli* BL21 mit dem Konstrukt pETectDcyt. (Abb. 4).

Durch Austausch des T7-Promotors auf dem Plasmid pETectDcyt. gegen den salzinduzierbaren Promotor der Ectoin-Gene (*promA*) aus dem Gram-positiven moderat halophilen Organismus *Marinococcus halophilus* wurde ein weiteres Vektorkonstrukt für die Ganzzellbiokatalyse generiert (Abb. 4, Vielgraf, 2008). Durch Zugabe von NaCl konnte somit die heterologe Expression des *ectD*-Gens in dem resultierenden Stamm *E. coli* DH5 α VIBO induziert werden.

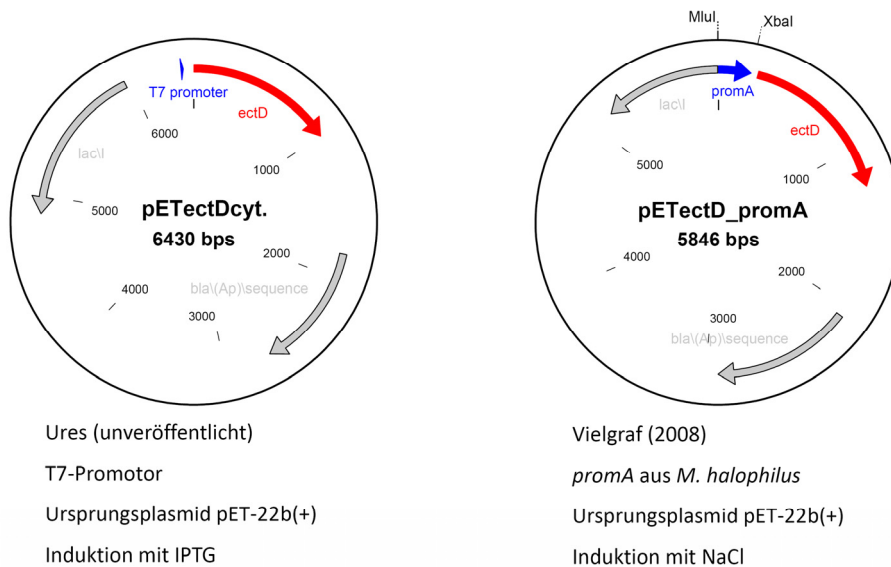


Abb. 4 Bereits etablierte Vektoren für die Ganzzellbiokatalyse

Schematische Darstellung zweier Vektoren, die in vorangegangenen Arbeiten für die Ganzzellbiokatalyse konstruiert wurden. Bei pETectDcyt. handelt es sich um einen pET-22b(+) basierten Vektor, in den das *ectD*-Gen aus *H. elongata* hinter den IPTG-induzierbaren T7-Promotor inseriert wurde (Ures, 2006, unveröffentlicht). Für die Konstruktion von pETectD_promA wurde der T7-Promotor gegen den salzinduzierbaren *promA*-Promotor aus *M. halophilus* ausgetauscht (Vielgraf, 2008).

Mit Hilfe dieser beiden Ganzzellbiokatalyse-Systeme wurde das Substratspektrum der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* untersucht. Dazu wurden die *E. coli*-Stämme in Minimalmedium angezogen, mit dem zu hydroxylierenden Substrat (z. B. Ectoin, Prolin) supplementiert, die Expression des *ectD*-Gens induziert und ein Salzschock durchgeführt, der zur Aufnahme der Solute und im Fall des pETectD_promA tragenden Stammes auch zur Induktion der Expression des *ectD*-Gens führte. Da EctD neben Ectoin weitere Substrate hydroxylierte (vgl. Abschnitt III. 7.4), wurde das Verfahren der Ganzzellbiokatalyse durch die Universität Bonn und die bitop AG (Witten) patentrechtlich geschützt (Galinski *et al.*, 2007, DE 10 2007 052 900 A1).

7.2. *E. coli* als heterologes System zur Ectoin-Produktion

Neben der Ganzzellbiokatalyse, bei der das zu hydroxylierende Substrat der Zelle von außen angeboten werden muss, kann *E. coli* auch als heterologes System zur eigenständigen Ectoin-bzw. Hydroxyectoin-Produktion genutzt werden. Durch Einbringen des Plasmids pAKECT1, in dem die Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* aus *M. halophilus* unter Kontrolle des eigenen salzinduzierbaren Ectoin-Promotors (*promA*) sowie das Gen einer deregulierten Aspartokinase (*lysC*) aus *C. glutamicum* MH20-22B unter Kontrolle eines *tac*-Promotors vorliegen, konnte in *E. coli* eine Ectoin-Produktion optimiert werden (Bestvater *et al.*, 2008). Da nach Sequenzanalysen festgestellt wurde, dass das Plasmid pAKECT1 nicht mehr der Originalsequenz entsprach, wurde es im Zuge der vorliegenden Arbeit wieder hergestellt (Abb. 5).

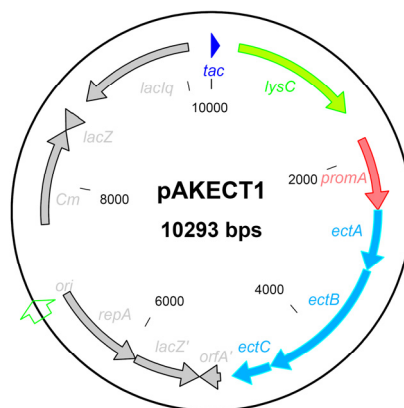


Abb. 5 pAKECT1 zur heterologen Expression der Ectoin-Gene in *E. coli*

Dargestellt ist der Vektor pAKECT1. Neben den Ectoin-Genen (*ectA*, *ectB*, *ectC*) aus *M. halophilus* unter Kontrolle des eigenen salzinduzierbaren *promA*-Promotors trägt der Vektor zusätzlich das Gen einer deregulierten Aspartokinase *lysC* unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors.

Bestvater *et al.* (2008) zeigten, dass die heterologe Ectoin-Produktion in *E. coli* einem metabolischen Flaschenhals unterliegt. Dieser limitierende Schritt wird durch die Reaktion der Aspartokinase verursacht. L-Aspartat wird durch die Aktivität der Aspartokinase über eine ATP-abhängige Phosphorylierung zu L-Aspartylphosphat umgewandelt, welches anschließend durch die Aktivität einer Aspartat- β -semialdehyd-Dehydrogenase zu L-Aspartat- β -semialdehyd konvertiert wird (Abb. 2). Dieses Intermediat stellt sowohl einen Ausgangspunkt für die Aminosäuren der Aspartat-Familie (Methionin, Threonin und Lysin) sowie für die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin im Metabolismus dar. *E. coli* besitzt drei verschiedene Aspartokinasen-

Isoenzyme: die Aspartat-Kinase-Homoserin-Dehydrogenase I (ThrA), die Aspartat-Homoserin-Dehydrogenase II (MetL) und die Aspartat-Kinase III (LysC). Neben der transkriptionellen Regulation unterliegen diese Aspartokinasen einer negativen Feedback-Regulation (Patte, 1996). Da das Ausgangssubstrat der Ectoin-Biosynthese L-Aspartat- β -Semialdehyd zugleich also auch Ausgangspunkt der Synthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie ist und diese Aminosäuren die *E. coli*-eigenen Aspartokinasen negativ regulieren, steht in *E. coli* nicht genügend Substrat für die Ectoin-Synthese zur Verfügung. Durch gleichzeitige Expression einer durch Punktmutation deregulierten Aspartokinase aus *C. glutamicum*, die ihre Sensitivität gegenüber Threonin und Lysin verloren hat (Cremer *et al.*, 1991), konnte der metabolische Flaschenhals der Ectoin-Produktion in *E. coli* umgangen und die Ectoin-Konzentration in den Zellen erhöht werden (Bestvater *et al.*, 2008). Die weitere Untersuchung der heterologen Ectoin- sowie Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* war Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

8. Nutzen, Bedeutung und Anwendung kompatibler Solute

Neben ihrer Wirkung als osmoregulatorische Solute zur Aufrechterhaltung des Turgors (Abschnitt I. 3) besitzen kompatible Solute noch weitere stabilisierende Eigenschaften auf Makromoleküle wie Enzyme und DNA sowie auf ganze Zellen gegen bestimmte Stresseinflüsse wie Hitze, Kälte, Trocknung, denaturierende Chemikalien und UV-Strahlung. Bereits 1992 zeigten Lippert und Galinski, dass kompatible Solute empfindliche Modellenzyme wie die Lactatdehydrogenase und Phosphofruktokinase *in vitro* gegen Stressfaktoren wie Hitze und Gefriertrocknung schützen. Auch in zahlreichen weiteren Arbeiten konnte belegt werden, dass kompatible Solute eine stabilisierende Wirkung auf Proteine haben (Göller und Galinski, 1999; Knapp *et al.*, 1999; Andersson *et al.*, 2000). Die Wirkungsweise der Solute ist bislang nicht vollständig verstanden, oft wird das von Arakawa und Timasheff (1985) postulierte Modell der „*preferential exclusion*“ herangezogen. Dabei steigert das kompatible Solut die Oberflächenspannung der Lösung und wird so aus den Hydrathüllen des Proteins ausgeschlossen. Das Protein wird in eine möglichst kompakte Konformation gedrängt, die Denaturierung aufgrund thermodynamischer Effekte erschwert und so der native Zustand stabilisiert. Neben der positiven Wirkung kompatibler Solute auf Proteine konnte eine stabilisierende Wirkung auf Nukleinsäuren beobachtet werden, z. B. durch

Schutz der DNA vor enzymatischem Abbau (Malin *et al.*, 1999). Aufgrund dieser schützenden Eigenschaften finden kompatible Solute Anwendung in Form der BioStab-Serie (bitop AG, Witten), wobei es sich um gebrauchsfertige Stabilisierungslösungen für Enzyme, Antikörper und Nukleinsäuren handelt.

Das Tetrahydropyrimidin Ectoin nimmt im Vergleich zu anderen kompatiblen Soluten eine Sonderstellung ein, da es in den letzten Jahren in zahlreichen Untersuchungen eingesetzt und protektive Eigenschaften nachgewiesen wurden. So zeigte Ectoin einen schützenden und stabilisierenden Effekt auf Membranen und ganze Zellen gegen verschiedene Stresseinflüsse wie Detergenzien oder Radikale (Bünger *et al.*, 2001; Graf *et al.*, 2008). Außerdem wurde bei Vorbehandlung menschlicher Keratinozyten mit Ectoin die Freisetzung von Entzündungsfaktoren (wie Ceramide, AP-2, ICAM-1) nach UVA-Bestrahlung reduziert (Bünger und Driller, 2004). Auch die bei der Immunantwort wichtigen epidermalen Langerhans-Zellen wurden durch Ectoin nach UV-Behandlung geschützt (Beyer *et al.*, 2000; Bünger *et al.*, 2001). In menschlichen Keratinozyten, die einem Hitzeschock ausgesetzt wurden, führte eine Ectoin-Behandlung zu einer beschleunigten Bildung sogenannter Hitzeschockproteine, die eine große Rolle beim Zellschutz und der Reparatur von Zellen und Geweben spielen (Morimoto und Santoro; 1998; Buommino *et al.*, 2005). Aufgrund dieser positiven Eigenschaften ist Ectoin mittlerweile Bestandteil von über 200 Produkten, vor allem von Kosmetikprodukten und Sonnenschutzmitteln. Als wirkungsvoller Feuchtigkeitsspender oder Moisturizer wird Ectoin für die Pflege von trockener und empfindlicher Haut eingesetzt (Graf *et al.*, 2008).

Auch in der humanmedizinischen Forschung findet Ectoin ein immer breiteres Anwendungsspektrum. Bei der neurodegenerativen Erkrankung Alzheimer bilden sich im Gehirn der betroffenen Patienten sogenannte Plaques, die durch eine Fehlfaltung des β -Amyloid-Peptids verursacht werden. Kanapathipillai *et al.* (2005) zeigten, dass Ectoin und Hydroxyectoin die Aggregation des β -Amyloid-Peptids *in vitro* inhibierten und so die durch die Fehlfaltung verursachte Toxizität reduzierten. Die Inhalation von Nanopartikeln kann Entzündungsvorgänge in den Atemwegen und der Lunge auslösen, die auch das Herz-Kreislauf-System schädigen können (Donaldson *et al.*, 2005). Sydlík *et al.* (2009) zeigten, dass durch Zugabe von Ectoin diese Entzündungsreaktion,

verursacht durch Nanopartikel-induzierte Signalübertragungswege, in Rattenlungen *in vitro* und *in vivo* inhibiert wurde.

Sogar in der Landwirtschaft ist der Einsatz von kompatiblen Soluten wie Ectoin vielversprechend. Durch Insertion der Biosynthesegene kompatibler Solute kann die Resistenz der Pflanzen gegenüber Salzstress erhöht werden. Erfolgreiche Versuche wurden bereits an Modellpflanzen wie Tabak durchgeführt. Nach Expression der Ectoin-Gene in *Nicotiana tabacum* konnte aufgrund des gebildeten Ectoins die Toleranz gegenüber hyperosmotischen Bedingungen gesteigert werden (Nakayama *et al.*, 2000).

8.1. Nutzen und Bedeutung von Hydroxyectoin und hydroxylierten Soluten

Die protektiven Eigenschaften von Ectoin und kompatiblen Soluten machen sie sehr interessant für die Biotechnologie und die Anwendung in verschiedenen Produkten. Obwohl sich Ectoin und Hydroxyectoin in nur einer funktionellen Gruppe, der Hydroxylgruppe am C₅-Atom, unterscheiden, konnte in verschiedenen Untersuchungen beobachtet werden, dass sich die protektiven Effekte zwar überschneiden, aber nicht identisch sind. So untersuchten Borges *et al.* (2002) den Effekt verschiedener kompatibler Solute auf die Stabilisierung der Lactatdehydrogenase (LDH) bei Hitzestress. Während Ectoin keinen signifikanten Schutz bei der Hitzestabilisierung zeigte, konnte mit Hydroxyectoin nach einer 30-minütigen Hitzebehandlung bei 50 °C eine Restaktivität der LDH von 80 % nachgewiesen werden. Hydroxyectoin zeigte sogar einen besseren Schutz als das aus einem thermophilen Organismus stammende Mannosylglycerat (Abb. 1) und deutet so auf die Wirkungsweise eines Thermo-stabilisators hin. Dies bestätigten auch frühere Untersuchungen von Lippert und Galinski (1992) und Canovas *et al.* (1999), die zeigten, dass Hydroxyectoin der beste Hitzestabilisator für die Modellenzyme LDH und Phosphofruktokinase war. Auch bei Gefriertrocknungsprozessen zeigte Hydroxyectoin den besten Schutz vor Dehydrierung der verwendeten Modellenzyme. Nach Einfrieren der Enzyme in flüssigem Stickstoff, anschließender 24-stündiger Gefriertrocknung und Rehydrierung in H₂O_{demin.} konnte mit Hydroxyectoin als Supplement die höchste Restaktivität der beiden Enzyme (ca. 70 %) erzielt werden. Dieses Phänomen ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Hydroxylgruppe besser mit polaren Gruppen von Proteinen interagieren kann und

Wasser ersetzt, wodurch es zu einer Stabilisierung der nativen Konformation kommt (Lippert und Galinski, 1992).

Nicht nur die beschriebenen Modellenzyme, auch ganze Zellen wie *E. coli* K12 zeigten nach Gefriertrocknung in Anwesenheit von Hydroxyectoin eine höhere Überlebensrate als mit Ectoin behandelte Zellen (Louis *et al.*, 1994). Diese Beobachtung kann durch die „*water replacement hypothesis*“ (Clegg *et al.*, 1982) erklärt werden. Durch Wechselwirkung der Hydroxylgruppe mit Zellbestandteilen kann das Solut bei trocknungsbedingtem Wasserentzug die Hydrathüllen ersetzen und so die Strukturen, wie die Lipiddoppelschicht, stabilisieren. Kürzlich zeigten Harishchandra *et al.* (2010), dass Ectoine die Lipid-Einzel- und Doppelschicht als Modellsysteme für Membranen stabilisierten. In Ectoin-haltiger Lösung sind die hydrophilen Interaktionen der Membranen durch die Ectoin-Wasser Komplexe erhöht, was in einem Anstieg der Mobilität der Lipide und daher der Fluidität resultierte. Beim Vergleich von Ectoin und Hydroxyectoin zeigte die hydroxylierte Variante einen verstärkten Effekt, da die Hydroxylgruppe eine zusätzliche Möglichkeit bietet, Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen zu bilden. Außerdem kann eine stärkere Interaktion mit der Lipidkopfgruppe erwartet werden.

Ein weiterer Unterschied betrifft die Schmelztemperatur der DNA. Während Hydroxyectoin die Schmelztemperatur der DNA leicht erhöhte, führte die Anwesenheit von Ectoin zu einer Erniedrigung dieser (Schnoor *et al.*, 2004). Durch Einführung einer einzigen neuen funktionellen Gruppe in ein Solut können somit neue Eigenschaften und Wirkungen erzielt werden. Da Ectoin mittlerweile Bestandteil vieler Produkte, vor allem Hautpflege- und Kosmetikprodukte, ist, könnte Hydroxyectoin auch für diese Anwendungsmöglichkeiten eine ökonomische Bedeutung haben. Somit besteht für die Industrie ein großer Bedarf in der Produktion von Hydroxyectoin, aber auch anderer neuer hydroxylierter Verbindungen.

8.2. Industrielle Produktion von Hydroxyectoin

Dem kompatiblen Solut Hydroxyectoin wird immer mehr Beachtung geschenkt, da es dem Ectoin, wie in Abschnitt I. 8.1 beschrieben, in vielen Anwendungen überlegen ist. Für die Produktion wurde in der Vergangenheit der Stamm *Marinococcus* sp. M52 verwendet, der in der stationären Phase Ectoin zu Hydroxyectoin umwandelt (Frings *et al.*, 1995). Allerdings ist dieser Stamm nicht für das von Sauer und Galinski (1998)

entwickelte „Bakterienmelk“-Verfahren geeignet, da die Solute nach einem hypoosmotischen Schock nicht aus den Zellen geschleust werden, so dass Hydroxyectoin aus den Zellen aufgereinigt werden musste. Aufgrund dessen wurde das Produktionsverfahren für Hydroxyectoin auf den Stamm *H. elongata* umgestellt, der bei Anzucht unter Hochsalzbedingungen und hohen Temperaturen (11 % NaCl, 43 °C) ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 in den Zellen synthetisiert (bitop AG, persönliche Mitteilung). Dieser Stamm ist zum „Bakterienmelken“ befähigt. Nach Anzucht unter hyperosmotischen Bedingungen und der intrazellulären Akkumulation von Ectoin und Hydroxyectoin werden die Zellen einer Umgebung mit niedrigerer Salinität ausgesetzt, was zum Ausscheiden der Ectoine ins umgebende Medium führt. Die Solute können anschließend aus dem Medium aufgereinigt werden. Um Hydroxyectoin von dem ebenfalls akkumulierten Ectoin abzutrennen, sind allerdings chromatographische Aufreinigungsmethoden notwendig, was den Prozess der Hydroxyectoin-Produktion verlängert und zudem kostenintensiv macht.

9. Inkompatible Solute

Neben der Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion spielt ebenfalls die Untersuchung der Hydroxylierung des sogenannten inkompatiblen Soluts Guanidino-Ectoin (Gd-Ectoin) in der vorliegenden Arbeit eine Rolle. Inkompatible Solute sind Substanzen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu kompatiblen Soluten aufweisen, aber im Gegensatz zur protektiven Eigenschaft dieser einen negativen Effekt ausüben. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Kreatin, das eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem kompatiblen Solut Glycinbetain aufweist (Abb. 6), von *E. coli* mit Glycinbetain „verwechselt“ und über spezifische Transportsysteme in die Zellen aufgenommen wurde (Mann, 2008; Sell, 2009). Im Unterschied zur schützenden Funktion von Glycinbetain führte die Akkumulation von Kreatin in den Zellen allerdings zu einer Wachstumshemmung. Die dem Glycinbetain entgegengesetzte Wirkung beruht vermutlich auf der Guanidiniumgruppe des Kreatins, die die Trimethylammoniumgruppe von Glycinbetain ersetzt (Abb. 6, rot eingekreist). Von Arginin und Guanidiniumchlorid ist bekannt, dass sie denaturierend auf Proteine wirken (Waldmann, 2005). Auch eine Hemmung von Guanidiniumgruppen-tragenden Substanzen auf Natrium/Protonen-Antiporter konnte gezeigt werden (Pinner *et al.*, 1993; Dibrov *et al.*, 2005). Die Wirkungsweise oder das mögliche Target von Kreatin in

bakteriellen Zellen ist bislang noch nicht eindeutig identifiziert. Da die Guanidiniumgruppe aber eine wichtige hemmende Funktion auszuüben schien, wurde zur weiteren Untersuchung ein Guanidino-Derivat von Ectoin chemisch synthetisiert. Durch den Austausch der Methylgruppe von Ectoin durch eine Aminogruppe entstand Gd-Ectoin, das ebenfalls einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von *E. coli* und andere *Enterobacteriaceae* ausübte (Sell, 2009, Abb. 6). Als bevorzugtes Aufnahmesystem für Gd-Ectoin sowie für Kreatin in *E. coli* wurde ProU identifiziert (Sell und Galinski, 2011; VAAM Poster). Die weitere Aufklärung der Wirkungsweise inkompatibler Solute ist ein wichtiger Forschungsaspekt, da z. B. eine mögliche Anwendung in der Lebensmittelindustrie zur Hemmung potentieller krankheits-erregender Bakterien besteht.

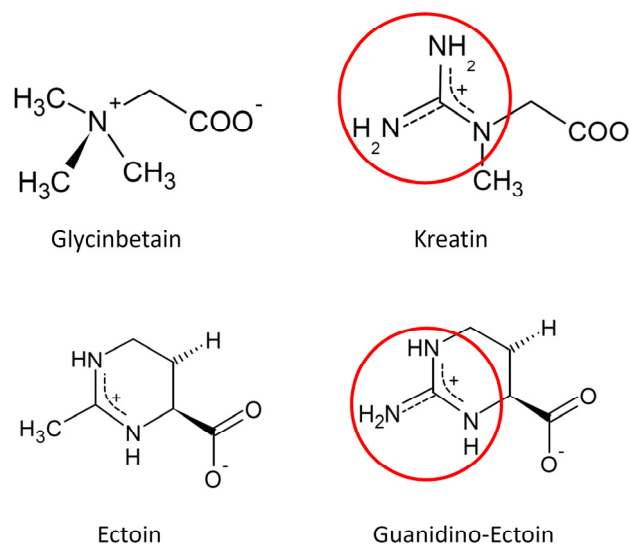


Abb. 6 Die inkompatiblen Solute Kreatin und Guanidino-Ectoin im Vergleich zu Glycinbetain und Ectoin

Dargestellt sind die Strukturformeln von Kreatin im Vergleich zu Glycinbetain und von Guanidino-Ectoin im Vergleich zu Ectoin. Die Guanidiniumgruppen der inkompatiblen Solute sind rot umrandet.

10. Zielsetzung der Arbeit

Kompatible Solute wie Ectoin und Hydroxyectoin sind in den letzten Jahren stark ins Interesse der biotechnologischen Forschung gerückt. Neben ihrer Funktion als osmoregulatorische Solute üben sie wichtige Schutzfunktionen für die Zelle sowie für Makromoleküle aus (Abschnitt I. 8). Aufgrund dieser protektiven Eigenschaften besteht eine große Nachfrage der Industrie, die kompatiblen Solute zu produzieren, vermarkten und in verschiedenen Produkten anzuwenden. Ectoin wird bereits

größentechnisch von der Firma bitop AG (Witten) mit Hilfe des „Bakterienmelk“-Verfahrens aus *H. elongata* gewonnen. Das Hydroxyderivat (5-Hydroxyectoin) wird durch Kultivierung von *H. elongata* DSM 2581^T unter Hochsalzbedingungen bei hohen Temperaturen gewonnen, wobei ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 erzielt wird (bitop AG, persönliche Mitteilung). Dies wiederum zieht chromatographische Auftrennungsmethoden nach sich, welche die Hydroxyectoin-Produktion kostenintensiv machen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Hydroxylierung von Ectoin und Derivaten mit Hilfe der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata*. In einem ersten Schritt sollte die Hydroxyectoin-Produktion in dem moderat halophilen Stamm *H. elongata* untersucht und optimiert werden. Mittels physiologischer und gentechnischer Methoden sollte ein Stamm konstruiert werden, der idealerweise ausschließlich Hydroxyectoin produziert. Nach Anwendung geeigneter Kultivierungsverfahren sollte so ein Hydroxyectoin-Produzent entstehen, der in Zukunft industriell eingesetzt werden könnte.

In einem weiteren Schritt sollte ein Ganzzellbiokatalyse-System zur Hydroxylierung von Ectoin und (in)kompatiblen Soluten in *E. coli* etabliert werden. Nach Durchführung eines Salzschocks und Expression des *ectD*-Gens aus *H. elongata* in *E. coli* sollten von außen angebotene Substrate in die Zelle aufgenommen und zum Hydroxyderivat umgewandelt werden. Durch Vergleich der Umsatzraten mit dem zuvor untersuchten Organismus *H. elongata* sollte dann ein effizienter Produktionsstamm identifiziert werden. Außerdem sollte die Hydroxylierung des inkompatiblen Solut Gd-Ectoin durch EctD zu OH-Gd-Ectoin, einer bisher nicht verfügbaren Verbindung, untersucht werden.

In einem dritten Teil sollte die heterologe Totalsynthese von Ectoin bzw. Hydroxyectoin in *E. coli* untersucht werden. Basierend auf den Ergebnissen von Bestvater *et al.* (2008), der eine Ectoin-Biosynthese in *E. coli* durch Koexpression der Ectoin-Gene *ectA-C* aus *M. halophilus* und einer deregulierten Aspartokinase *lysC* aus *C. glutamicum* nachweisen konnte, sollte das Gen der Ectoinhydroxylase *ectD* zusätzlich heterolog exprimiert werden, um Hydroxyectoin völlig unabhängig von der Zugabe des benötigten Substrats Ectoin zu akkumulieren.

II. Material und Methoden

1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Halomonas*- und *Escherichia coli*-Stämme sind in Tab. 1 und Tab. 2 aufgeführt. In Tab. 3 sind die verwendeten Plasmide dargestellt.

Tab. 1 Verwendete *Halomonas elongata*-Stämme

<i>H. elongata</i> -Stämme	Genotyp	Referenz
<i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T	Wildtyp	Vreeland <i>et al.</i> , 1980
<i>H. elongata</i> MaKu03	$\Delta ectD$	Ures, 2005
<i>H. elongata</i> MaKu03 $\Delta ectB::ectD$	$\Delta ectD, \Delta ectB::ectD$	diese Arbeit
<i>H. elongata</i> $\Delta ectB::ectD$	$\Delta ectB::ectD$	diese Arbeit
<i>H. elongata</i> $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$	$\Delta ectB::ectD,$ $\Delta promectD::promKB1$	diese Arbeit
<i>H. elongata</i> WUB02	$\Delta ectA, \Delta ectC$	Witt <i>et al.</i> , 2011

Tab. 2 Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stämme	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>supE44, recA1, endA1, relA1, hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺), <i>gyrA96, λ, thi-1, $\Delta lacU169$</i> ($\Phi 80lacZ\Delta M15$)	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> S17-1	RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn 7) chromosomal integriert; Sm ^R <i>pro, thi, recA</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> MC4100	<i>araD139_(argF-lac) U169 deoC1</i> <i>flbB5301relA 1 rpsL 150 ptsF25 rsrR</i>	Casabadan, 1976
<i>E. coli</i> BKA-13	MC4100 $\Delta(putPA)101, \Delta(proP)2,$ $\Delta(proU)608, betTIBA, Spc^R, \Delta otsB$	Burdziak, 2006
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>dcm, ompT, hsdSB (rB⁻ mB⁻), gal, $\lambda,$</i> (DE3)	Studier und Moffatt, 1986

Tab. 3 Verwendete Plasmide

Plasmide	Eigenschaften	Referenz
pK18 <i>mobSacB</i>	Km ^R , <i>lacZ'</i> , <i>mob, sacB, ori pMB1</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18 <i>mobSacB_ectD</i>	pK18 <i>mobSacB</i> mit SOE-PCR-Produkt <i>up-ectD-down</i> zur $\Delta ectB::ectD$ - Herstellung	diese Arbeit
pK18 <i>mobSacB_promKB1</i>	pK18 <i>mobSacB</i> mit SOE-PCR-Produkt <i>up-promKB1-down</i> zur $\Delta promectD::promKB1$ -Herstellung	diese Arbeit
pPromEct	pBBR1MCS mit <i>ectA</i> -Promotor (<i>promA</i>) aus <i>H. elongata</i>	Brünig, 2005

Plasmide	Eigenschaften	Referenz
pPromEct_ectD	pPromEct mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i>	diese Arbeit
pWUB	pPromEct mit <i>ectB</i> -Promotor (<i>promKB1</i>) aus <i>H. elongata</i> KB1	Witt, unveröffentlicht
pWUB_ectD_Hel	pWUB mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i>	Witt, unveröffentlicht
pET-22b(+)	Amp ^R , T7lac, <i>pelB</i> , (His) ₆ -tag	Novagen, Madison, USA
pETectDcyt.	pET-22b(+) mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i> ohne His-tag und leader	Ures, 2006 unveröffentlicht
pETectD_promA-kz	pETectDcyt., T7-Promotor wurde gegen <i>promA</i> (~ 204 bp-Fragment) aus <i>Marinococcus halophilus</i> ausgetauscht	Vielgraf, 2008
pETectDHis	pET-22b(+) mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i> mit His-tag, ohne leader	diese Arbeit
pASK-IBA3	Amp ^R , f1-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , <i>t_{pp}</i> , <i>tet</i> -Repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, <i>Strep</i> -tag® II	IBA, Göttingen
pASKectDStrep	pASK-IBA3 mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i> mit <i>Strep</i> -tag	diese Arbeit
pAKECT1	pHSG575, Gencluster <i>ectABC</i> aus <i>Marinococcus halophilus</i> mit 725 bp Promotorregion vor <i>ectA</i> , <i>lysC</i> aus <i>Corynebacterium glutamicum</i> aus pRK1, <i>lacI</i> ^q	Bestvater <i>et al.</i> , 2008
pAKECT1-tacectD	pAKECT1 mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i> unter Kontrolle des <i>tac</i> -Promotors	diese Arbeit

2. Nährmedien

Alle Medien wurden mit H₂O_{demin.} angesetzt. Je nach Bedarf wurden unterschiedliche Konzentrationen an NaCl (w/v) eingesetzt. Der prozentuale Gehalt an NaCl ist der Medienbezeichnung mit einem Bindestrich nachgestellt. Das Minimalmedium MM63-10 enthält somit 10 % NaCl. Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 2 % Agar zugesetzt. Alle Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.1. Medien zur Anzucht von *H. elongata* und *E. coli*

AB-Medium (Antibiotic broth medium No. 3) (L⁻¹)

Antibiotic broth medium	17,5 g
NaCl	variabel %
pH 7,2	

Dieses Komplexmedium diente u. a. zur Stammhaltung der Mikroorganismen auf Agarplatten sowie zur Anzucht von Stämmen zur Isolierung genomischer DNA.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) (L⁻¹) (Bertani, 1951)

Caseinhydrolysat (Trypton)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	variabel %
pH 7,2	

Dieses Medium diente der Anzucht von *E. coli*-Stämmen zur Isolierung von Plasmiden. Für Überexpressionsversuche der Ectoinhydroxylase EctD wurden dem Medium zusätzlich 2 g/L Glucose zugesetzt.

Minimalmedium MM63 (L⁻¹) (Miller, 1972; modifiziert nach Larsen *et al.*, 1987)

KH ₂ PO ₄	13,61 g	
KOH	4,21 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0011 g	(1 mL Stammlösung (1000x))
NaCl	variabel %	

pH 7,1 (mit KOH eingestellt)

Glucose x H₂O 5 g (25 mM)

Dieses Medium diente der Untersuchung der akkumulierten Solute von *H. elongata* und *E. coli* sowie der Selektion während Konjugationsexperimenten. Die Glucose wurde in einem Teilvolumen getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium zugegeben. Für thiaminauxotrophe Stämme wurde dem Medium zusätzlich 1 mL/L Vitaminlösung (VA-Lösung, Abschnitt II. 3.2) und für plasmidtragende Stämme das entsprechende Antibiotikum (Abschnitt II. 3.1) zugefügt.

2.2. Medium zur Transformation von *E. coli***2xYT-Medium (L⁻¹) (Sambrook *et al.*, 1989)**

Caseinhydrolysat (Trypton)	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
pH 7,2	

2xYT-Medium wurde zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen und zur Regeneration dieser während der Transformation verwendet (Abschnitt II. 12).

2.3. Medien zur Herstellung chromosomaler Mutationen bei *H. elongata*

LBG Medium (L⁻¹)

Caseinhydrolysat (Trypton)	10 g
Hefeextrakt	5 g
Glucose x H ₂ O	2 g
NaCl	2-4 %
pH 7,2	

Dieses Medium wurde im Zuge der Herstellung chromosomaler Mutationen von *H. elongata* eingesetzt und diente dabei dem zweiten Rekombinationsprozess, der zur Ausgliederung von Derivaten des Vektors pK18*mobSacB* aus dem Genom führte (Abschnitt II. 14).

LBG 22 % Saccharose (L⁻¹)

LBG-Medium + Saccharose	220 g
Agar	2 %
pH 7,2	

Dieses Medium diente der Selektion von *H. elongata*-Stämmen, bei denen der zweite Rekombinationsprozess stattgefunden hat (Abschnitt II. 3.5).

3. Medienzusätze

3.1. Antibiotika

Tab. 4 Antibiotikaresistenzen und Konzentrationen der Nährmedien

Antibiotikaresistenzen der entsprechenden Plasmide	Endkonzentration zur Selektion (µg/mL)
Kanamycin (Km) - pK18 <i>mobSacB</i> -Derivate	300
Chloramphenicol (Cm) - pPromEct- und pWUB-Derivate - pAKECT1-Derivate	50
Carbenicillin (Carb) - pET-22b(+)-Derivate - pASK-IBA3-Derivate	100

Die sterilfiltrierten Stammlösungen der Antibiotika (100 mg/mL in H₂O_{reinst} bzw. Chloramphenicol in 98 %igem Ethanol) wurden in Aliquots bei -20 °C gelagert. Chloramphenicol wurde dem Medium vor dem Autoklavieren zugegeben. Alle anderen Antibiotika wurden erst nach dem Autoklavieren dem handwarmen Medium zugefügt.

3.2. Vitaminlösung (VA-Lösung; Imhoff und Trüper, 1977)

Nicotinsäureamid	0,35 g
Ca-DL- Pantothenat	0,1 g
Thiamin x HCl	0,3 g
Biotin	0,1 g
p-Aminobenzoessäure	0,2 g
Pyridoxalchlorid	0,1 g
Cyanocobalamin	0,05 g

Die sterilfiltrierte Vitaminlösung (VA-Lösung) wurde bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Zur Anzucht des thiaminauxotrophen *E. coli* DH5 α sowie der *E. coli* MC4100-Derivate wurde 1 mL dieser Lösung zu einem Liter Minimalmedium gegeben.

3.3. TES Spurenelementlösung (L⁻¹) (Claus *et al.*, 1983)

Titriplex	1,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3 g
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,18 g
NaCl	1 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01 g
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,002 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025 g

pH 7,2 (mit KOH eingestellt)

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. 1 mL TES-Lösung wurde einem Liter Medium zugefügt.

3.4. IPTG und X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion

Das in dieser Arbeit für die Mutagenese an *H. elongata* verwendete pK18*mobSacB*-Plasmid ermöglicht die Blau-Weiß-Selektion von *E. coli* DH5 α -Transformanten. pK18*mobSacB* trägt ein *lacZ'*-Fragment, das für das α -Peptid der β -Galaktosidase kodiert. Das entsprechende Gen ist in *E. coli* DH5 α deletiert. *E. coli* DH5 α -Zellen, die nach der Transformation das Plasmid pK18*mobSacB* tragen, exprimieren eine funktionelle β -Galaktosidase. Innerhalb des *lacZ'*-Fragments befindet sich allerdings eine multiple Klonierungsstelle (MCS), so dass es durch Insertion von Fremd-DNA zu einer Inaktivierung von *lacZ'* und so der β -Galaktosidase kommt. Durch Zugabe des Induktors IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktopyranosid) und des Substrates X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Galaktopyranosid), das von der β -Galaktosidase zu einem blauen Indolfarbstoff umgesetzt wird, kann aufgrund der Blaufärbung zwischen nicht-

rekombinanten blauen und rekombinanten weißen Klonen unterschieden werden. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden pro Agarplatte 10 µL einer IPTG-Stammlösung (0,1 M) und 50 µL einer X-Gal-Stammlösung (0,05 M in DMSO) zusammen mit den transformierten Zellen ausplattiert.

3.5. Selektion von Doppel-Cross-Over Mutanten mit Saccharose

Zur Selektion der *H. elongata*-Austauschmutanten, die das zuvor über homologe Rekombination ins Genom integrierte rekombinante Derivat des Vektors pK18*mobsacB* nach einem Doppel-Cross-Over wieder verloren haben, wurde LBG-Medium mit 22 % Saccharose verwendet. Der Ausschluss des pK18*mobSacB*-Vektors aus den Zellen beruht darauf, dass der Vektor ein modifiziertes *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*, das für eine Laevan-Saccharase kodiert, trägt (Schäfer *et al.*, 1994). Die Expression dieses Gens ist für Gram-negative Bakterien wie *H. elongata* ab einer Saccharose-Konzentration von 20 % letal und kann daher für den positiven Nachweis von Doppel-Cross-Over-Mutanten genutzt werden (Göller, 1999). Zellen, die auf LBG-Medium mit 22 % Saccharose wachsen, haben somit das Plasmid nach einem Doppel-Cross-Over verloren, wobei entweder der Ursprungsstamm oder die gewünschte Mutante entsteht (Abschnitt II. 14).

3.6. Solute für *in vivo* Hydroxylierungen

Für *in vivo* Hydroxylierungsversuche wurden neben Ectoin weitere Solute getestet, die von der Ectoinhydroxylase EctD als mögliches Substrat erkannt werden (Abb. 7).

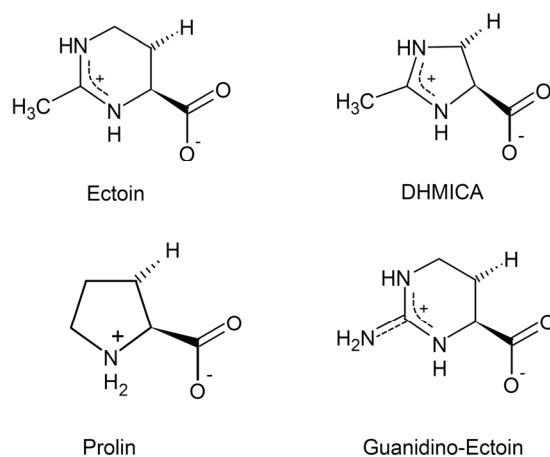


Abb. 7 Solute für die Supplementierung

Dargestellt sind die Strukturformeln der kompatiblen Solute Ectoin, DHMICA und Prolin sowie des inkompatiblen Soluts Gd-Ectoin, die bei *in vivo* Hydroxylierungsversuchen verwendet wurden.

Hierbei handelte es sich um Prolin sowie das Ectoin-Derivat DHMICA ((*RS*)-2-Methyl-4,5-Dihydro-Imidazol-4-Carbonsäure). Die Lagerung der sterilfiltrierten Stammlösungen der einzelnen Solute (200 mM) erfolgte bei -20 °C. Das inkompatible Solut Guanidino-Ectoin (Gd-Ectoin) wurde aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser unter Hitzeeinwirkung in einer Stammlösung von nur 50 mM angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

3.7. Induktionsreagenzien IPTG und AHT

Zur Induktion der Expression des Ectoinhydroxylase-Gens *ectD* im Stamm *E. coli* BL21 pETectDHis, des deregulierten Aspartokinase-Gens *lysC* auf dem Plasmid pAKECT1 und des *ectD*-Gens auf dem Plasmid pAKECT1-*tacectD* wurde IPTG verwendet. Als Stammlösung wurden 100 mg/mL in H₂O_{reinst} gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. IPTG wurde dem Medium in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugesetzt. Für die Koexpression von *lysC* und *ectD* auf dem Plasmid pAKECT1-*tacectD* wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt. Die Expression des *ectD*-Gens, das hinter den plasmidkodierten *tet*-Promotor in pASKectDStrep geschaltet war, wurde durch 0,2 µg/mL AHT (Anhydrotetracyclin, in DMF) induziert. Als Stammlösung wurden 2 mg/mL angesetzt und bei 4 °C gelagert.

4. Puffer und Lösungen

4.1. Puffer und Lösungen für die Analytik

4.1.1. Lösungen für die isokratische HPLC

Bligh und Dyer-Lösung	Methanol:Chloroform:H ₂ O _{reinst} (10:5:4, v/v)
Laufmittel	Acetonitril (80 %, v/v) in H ₂ O _{reinst}

4.1.2. Lösungen für die FMOC/ADAM-HPLC

Boratpuffer	0,5 M Borsäure in H ₂ O _{reinst} , pH 7,7 (mit 1 N NaOH)
FMOC-Reagenz	1 mM FMOC in Aceton
ADAM-Reagenz	40 mM ADAM in Boratpuffer, 1:1 mit Aceton versetzt
Na-Acetat-Puffer	50 mM Na-Acetat, pH 4,2
Laufmittel A	79,5 % Na-Acetat-Puffer (v/v), 20 % Acetonitril (v/v), 0,5 % Tetrahydrofuran (v/v)
Laufmittel B	20 % Na-Acetat-Puffer (v/v), 80 % Acetonitril (v/v)

4.2. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

4.2.1. Puffer und Lösungen für die DNA-Isolierung und Lagerung

TES-Puffer	50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8
SDS-Lösung	20 % SDS in H ₂ O _{reinst} (w/v)
Natriumacetat-Puffer	3 M Na-Acetat, pH 4,8

4.2.2. Puffer und Lösungen für die Plasmidisolierung

Puffer P1	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A, pH 8
Puffer P2	200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v), pH 12,5
Puffer P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

4.2.3. Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,6 % Eisessig (v/v), pH 8,0
Probenpuffer (6x)	60 mM EDTA, 0,09 % Bromphenolblau (w/v), 60 % Glycerin (v/v), pH 8
Ethidiumbromid-Lösung	10 µg/mL in H ₂ O _{demin.}
GelRed TM -Lösung	3 x in H ₂ O

4.3. Lösung für die Transformation

Salzlösung	70 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 20 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O (getrennt autoklaviert)
------------	--

4.4. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Versuche

4.4.1. Puffer und Lösungen für die Gesamtzellproteinaufreinigung

Resuspensionspuffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8
Lysozym-Stammlösung	100 mg/mL in H ₂ O _{reinst}
SDS-Lösung	10 % SDS in H ₂ O _{reinst} (w/v)
MgCl ₂ -Stammlösung	50 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O
DNase-Stammlösung	10 mg/mL in H ₂ O _{reinst}

4.4.2. Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung

Lysispuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,5
Waschpuffer 1	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,5
Waschpuffer 2	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8,5
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,5
Aktivitätspuffer	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5

4.4.3. Puffer und Lösungen für den BCA-Test

BSA-Stammlösung	0,5 mg/mL
-----------------	-----------

4.4.4. Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
----------------	------------------------

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Acrylamid-Mix	9,8 mL Acrylamid (40 %), 4 mL Bisacrylamid (2 %), H ₂ O _{reinst} (ad 20 mL)
SDS-Lösung	10 % SDS in H ₂ O _{reinst} (w/v)
APS-Lösung	10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O _{reinst} (w/v)
Probenpuffer (4xRSB)	45 % Sammelgelpuffer, 50 % Glycerin, 5 % SDS (w/v), 3,86 % DTT (w/v), Spatelspitze Bromphenolblau
Laufpuffer für SDS-PAGE	1 x Tris/Glycin/SDS Puffer (BioRad, Hercules, USA)
Färbelösung	Page Blue TM Protein Staining Solution (Fermentas, St. Leon-Rot)

5. Synthese der zwitterionischen Guanidiniumverbindung Guanidino-Ectoin

Die für Hydroxylierungsversuche verwendete Guanidiniumverbindung Guanidino-Ectoin (Gd-Ectoin) wurde chemisch synthetisiert (Abb. 8). Die Reaktionsbedingungen wurden von Galinski und Stein in vorangegangenen Arbeiten entwickelt und optimiert (unveröffentlicht). In einer Einschrittreaktion entsteht dabei aus den Ausgangssubstanzen O-Methylisoharnstoff und L-2,4-Diaminobuttersäure das gewünschte Produkt. Der Erfolg der Gd-Ectoin-Synthese wurde mittels HPLC und NMR überprüft (Abschnitte II. 7.3.2 und II. 7.5).

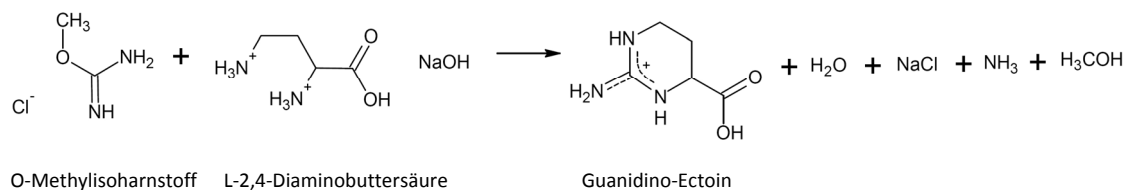


Abb. 8 Reaktionsgleichung der Synthese von Guanidino-Ectoin

O-Methylisoharnstoff und L-2,4-Diaminobuttersäure werden in einer Einschrittreaktion zu Gd-Ectoin umgesetzt, wobei als Nebenprodukte NaCl, NH₃, H₃COH und H₂O entstehen.

6. Anzucht- und Kultivierungsverfahren

6.1. Bakterienstammhaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, die zur Langzeitlagerung in der Stammsammlung des IfMB in Kryokulturen bei -70 °C gehalten werden, wurden zur Reaktivierung auf AB-Platten mit der für den jeweiligen Organismus optimalen NaCl-Konzentration ausgestrichen und bei der entsprechend optimalen

Wachstumstemperatur inkubiert. *H. elongata*-Stämme wurden meist auf AB-3 Medium und *E. coli*-Stämme auf AB-1 Medium (beide ggf. mit Antibiotikum) gehalten, für zwei Monate bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und anschließend auf frische Agarplatten überimpft.

6.2. Allgemeine Bakterienanzucht und Zellernte

Die Anzucht von Übernachtskulturen zur Isolierung genomischer oder Plasmid-DNA (Abschnitte II. 8.1 bis II. 8.3) und von Vorkulturen erfolgte in 25-50 mL Flüssigmedium. Die Kulturen wurden mit frischem Zellmaterial von der Platte beimpft und über Nacht bzw. mehrere Tage angezogen. Die Hauptkulturen wurden dann 2-5 %ig oder bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600} gegen Luft) von mindestens 0,05 mit der angewachsenen Vorkultur inokuliert.

Die Anzucht von Bakterienstämmen als Hauptkultur erfolgte in sogenannten OD-Kolben, bei denen es sich um modifizierte Weithals-Erlenmeyerkolben handelt. Über das seitlich angebrachte Glasrohr wurde die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) in einem Photometer (Novaspec II, Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden) verfolgt. Das Volumen der Hauptkulturen betrug jeweils 100 mL. Die Wachstumsraten der Kulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt.

Größere Volumina (bis 250 mL) wurden in einer Sorvall Avanti™ J-20 XP Zentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld) mit JA-10-Rotor für 20 min bei 8.500 rpm (12.785 g) und 20 °C geerntet. Vom Überstand wurde jeweils 1 mL bis zur weiteren Analyse mittels HPLC oder FMOC/ADAM-HPLC eingefroren und der Rest verworfen. Das Pellet wurde zunächst auf Glasfilterpapier (GF/C, Schleicher und Schuell MicroScience GmbH, Dassel) ausgestrichen, in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt, für mindestens eine Stunde (-20 °C) eingefroren und anschließend durch Gefriertrocknung getrocknet (Abschnitt II. 7.1). Kulturen, die zur Überexpression des *ectD*-Gens dienten, wurden wie beschrieben, geerntet. Die Zentrifugation erfolgte allerdings bei 4 °C und das Pellet wurde direkt, ohne vorheriges Ausstreichen auf Filterpapier, eingefroren.

Kleinere Volumina (2-10 mL) wurden in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Hamburg) für 5 min bei 10.000 rpm (9.300 g) und RT abgeerntet, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eingefroren. Pellets aus 2 mL-

Proben wurden nach quantitativem Entfernen des Restüberstandes mit 250 μ L Bligh und Dyer-Lösung versetzt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Behandlung eingefroren (Abschnitt II. 7.3.1). Pellets aus 10 mL-Proben wurden auch bis zur weiteren Verwendung der Gesamtproteinaufreinigung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren (Abschnitt II. 15.2).

6.3. Anzucht von *H. elongata*-Stämmen zur Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion

H. elongata DSM 2581^T und die in dieser Arbeit konstruierten Mutanten wurden zur Überprüfung der Hydroxyectoin-Produktion in Minimalmedium (ggf. mit Antibiotikum) angezogen. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei verschiedenen Salinitäten (5 %, 10 % und 15 % NaCl) und Temperaturen (30 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$, 42 $^{\circ}\text{C}$ und 45 $^{\circ}\text{C}$) bei 180 rpm im Thermoschüttler (Scientific innova 4230, Fa. New Brunswick, Edison, USA; Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Bei den sogenannten „Hitzeschockversuchen“ wurden die *H. elongata*-Kulturen zunächst bei einer Temperatur von 37 $^{\circ}\text{C}$ bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen und anschließend wurde die Temperatur auf 50 $^{\circ}\text{C}$ erhöht. Der Wachstumsverlauf aller Kulturen unter oben genannten Bedingungen wurde unverdünnt im OD-Kolben gemessen. Die Kulturen wurden alle in der stationären Phase durch Zentrifugation geerntet.

6.4. Anzucht von *E. coli*-Stämmen als Ganzzellbiokatalyse-System

Die Untersuchung des Substratspektrums der Ectoinhydroxylase EctD mit Hilfe der Ganzzellbiokatalyse in *E. coli* wurde, wenn nicht anders angegeben, in OD-Kolben mit 100 mL MM63-1 (und entsprechendem Antibiotikum) angesetzt. Bei *E. coli* DH5 α wurde dem Medium zusätzlich VA-Lösung zugesetzt (wird im Folgenden dem Medium in Klammern nachgestellt). Die Induktion der *ectD*-Expression, die Zugabe der Solute und der Salzschock wurden den Versuchsbedingungen des jeweils verwendeten Stammes angepasst (Abschnitte II. 6.4.1 und II. 6.4.2). Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 180 rpm im Thermoschüttler. Im Verlauf des Versuchs wurden jeweils 2 mL-Proben entnommen, geerntet und das Pellet sowie das Medium mittels HPLC oder FMOC/ADAM-HPLC analysiert (Abschnitte II. 7.3 und II. 7.4). Abschließend wurden die Kulturen in der stationären Phase geerntet und das Pellet auf den Gesamtsolutegehalt hin untersucht.

6.4.1. Ganzzellbiokatalyse mit *E. coli* DH5 α VIBO (pETectD_promA)

Zur Untersuchung der Hydroxylierung von Ectoin durch den Stamm *E. coli* DH5 α VIBO wurde dieser in MM63-1/100Carb (VA) bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, mit 2 mM Ectoin supplementiert und ein Salzschock auf 2 bis 4 % NaCl durchgeführt, der zur Aufnahme des Solut in die Zellen und zur Expression des *ectD*-Gens diente. Zur Untersuchung der Hydroxylierung von 10 mM Ectoin wurde der Stamm wie beschrieben bis in die exponentielle Wachstumsphase angezogen, mit Ectoin gefüttert und ein Salzschock auf 3 % NaCl durchgeführt. In der stationären Phase wurde zur Bereitstellung des Kofaktors α -Ketoglutarat mit 25 mM Glucose nachgefüttert.

6.4.2. Ganzzellbiokatalyse mit *E. coli* BL21 pETectDHis

Zur Untersuchung der Hydroxylierung von Ectoin, Prolin, DHMICA und Gd-Ectoin mit dem Ganzzellsystem *E. coli* BL21 pETectDHis wurde der Stamm in MM63-1/100Carb angezogen und die Expression des *ectD*-Gens bei Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 mit 0,5 mM IPTG induziert. 30 min nach Induktion wurde das entsprechende Solut in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben und wiederum 30 min später ein Salzschock auf 4 % NaCl durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden *E. coli* BL21 pET-22b(+) sowie eine nicht induzierte Kultur von *E. coli* BL21 pETectDHis eingesetzt.

Zur Hydroxylierung von 10 mM Ectoin wurde der Stamm wie beschrieben angezogen, mit Ectoin supplementiert und auf Salinitäten von 3 bis 5 % NaCl geschockt. Zu Untersuchungen der Optimierung der Hydroxylierung wurde *E. coli* BL21 pETectDHis zusätzlich mit 25 mM Glucose oder α -Ketoglutarat nachgefüttert. Weiterhin wurde eine Anzucht in Medium mit 50 mM Glycerin bzw. 50 mM Glutamat als C-Quelle durchgeführt.

6.5. Anzucht von *E. coli*-Stämmen zur heterologen Produktion von Ectoin und Hydroxyectoin

Für die Untersuchung der heterologen Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Produktion wurden die mit dem Plasmid pAKECT1 bzw. pAKECT1-*tacectD* transformierten *E. coli* DH5 α -Zellen in MM63-x/50Cm (VA) bei 37 °C angezogen (x: 1 bis 4 % NaCl). Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde die Expression der deregulierten Aspartokinase LysC mit 0,5 mM IPTG induziert. Im Fall der Koexpression von EctD auf dem Plasmid pAKECT1-*tacectD* wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet.

6.6. Anzucht von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel

Zur Analyse der Hydroxylierung des inkompatiblen Solut Gd-Ectoin wurde *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel in MM63-2/50Cm angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur mit 2 mM Gd-Ectoin supplementiert und ein Salzschock auf 5 % NaCl durchgeführt, der zur Expression des *ectD*-Gens und zur Aufnahme des Solut in die Zellen führte. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen sowie in der stationären Phase geerntet und die Zellextrakte mittels HPLC und ¹³C-NMR-Spektroskopie auf die Hydroxylierung von Gd-Ectoin hin untersucht (Abschnitte II. 7.3 und II. 7.5).

6.7. Fermentation im 4 L-Maßstab

6.7.1. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion von *H. elongata* Δ ectB::*ectD*

Um die Hydroxyectoin-Produktion von *H. elongata* Δ ectB::*ectD* in Abhängigkeit der Wachstumsphase zu untersuchen, wurden zwei Fermentationen in einem Laborfermenter des Typs ALF (Bioengineering AG, Wald, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 4 L durchgeführt. Zur Messung und Prozesskontrolle enthielt der Fermenter folgende Mess- und Regeltechnik: Temperatur-Sonde (Pt 100, Bioengineering AG, Wald, Schweiz), pH-Sonde (Mettler-Toledo GmbH, Gießen), pO₂-Sonde (Mettler-Toledo GmbH, Gießen) und Sonde zur Trübungsmessung (Aquasant Messtechnik AG, Bubendorf, Schweiz). Der Fermenter wurde mit allen Sonden, Schlauchverbindungen und Filtereinheiten zusammengebaut und nach Angaben des Herstellers mit H₂O_{demin.} sterilisiert. Das separat autoklavierte Medium MM63-10 wurde anschließend durch eine sterile Anstechtechnik in den Fermenter eingefüllt und die im gleichen Medium angezogene Vorkultur (200 mL) über einen sterilen Zugang in den Fermenter geleitet. Die Kultivierungstemperatur wurde über einen externen Heizkreislauf eingestellt. Das Wachstum wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung der OD₆₀₀ in Küvetten verfolgt und bei einer OD₆₀₀ von über 0,4 mit dem entsprechenden Medium verdünnt. Eine während der Fermentation auftretende Schaumbildung wurde durch Zugabe von Antischaummittel (Dehysan Z 2111, Cognis, Düsseldorf) unterdrückt. Kam es während der Fermentation in dem gepufferten Medium zu pH-Schwankungen, wurde der pH-Wert automatisch mit steriler Säure (HCl) oder Lauge (NaOH) über regelkreisgesteuerte Peristaltikpumpen reguliert. Die Dokumentation der Parameter Temperatur, pH, pO₂ und Trübung erfolgte mit Hilfe der BioLogics Software 1128-08/D BA (Bioengineering AG, Wald, Schweiz).

Die Hydroxyectoin-Produktion des Stammes *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ wurde zum einen bei konstant gehaltener Temperatur von 37 °C und zum anderen bei einer Temperaturerhöhung auf 50 °C in der exponentiellen Phase untersucht. In regelmäßigen Abständen wurden 50-100 mL Kultur geerntet und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

6.7.2. Hydroxylierung von Gd-Ectoin mit *E. coli* BL21 pETectDHis

Zur Untersuchung der Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch *E. coli* BL21 pETectDHis wurde eine Fermentation in 3 L MM63-1/100Carb durchgeführt. Der Fermenter wurde wie unter Abschnitt II. 6.7.1 beschrieben zusammengebaut und sterilisiert. Die Expression des *ectD*-Gens wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 0,5 mM IPTG induziert. 30 min nach Induktion wurde die Kultur mit 1,5 mM Gd-Ectoin supplementiert und nach weiteren 30 min ein Salzschock zur Aufnahme des Solut in die Zellen auf 4 % NaCl durchgeführt (Abschnitt II. 6.4.2). Um den Verlauf der Hydroxylierung von Gd-Ectoin zu untersuchen, wurden in regelmäßigen Abständen nach dem Salzschock jeweils 100 mL Kultur entnommen, geerntet und das Medium und Pellet bis zur Gefriertrocknung und weiteren Analyse bei -20 °C eingefroren.

6.8. Minifermentation

Um die Ectoin-Produktion von *E. coli* BKA-13 pAKECT1 zu untersuchen, wurde das Minifermentationssystem der Firma DASGIP AG (Jülich) genutzt. Bei dem verwendeten Kultivierungsgefäß (stirrer-pro™) handelt es sich um einen miniaturisierten Rührkessel mit einem maximalen Kulturvolumen von 300 mL (minimales Arbeitsvolumen: 150 mL). Zur Prozesskontrolle wurde der Fermenter mit einer pH-Sonde (Ferm Probe® pH Electrode, Broadley-James Corporation, Irvine, USA) und einer Sauerstoffsonde (In Pro® 6800 series O₂ sensors, Mettler-Toledo GmbH, Gießen) versehen. Die Temperaturmessung erfolgte über die in die pO₂-Sensoren integrierten NTC-Sensoren. Zur Belüftung wurde sterile Luft in den Fermenter geleitet und mit einem Sinterglas-Sparger als Luftblasen verteilt. Die Inokulation des Mediums, Probenentnahme, Einstellung des pH-Wertes mit steriler Säure (HCl) oder Lauge (NaOH) und die Zugabe von Antischaummittel erfolgte über drei mit Schraubdeckeln verschließbare Öffnungen. Die Temperierung des Minifermentationssystems erfolgte mit Hilfe eines speziell dafür entwickelten Wasserbades. Zur Steuerung und Überwachung der Fermentation wurden die Sonden über einen Server mit der Software DASGIP-Easy

Access verbunden, die eine graphische Aufzeichnung des Fermentationsverlaufes ermöglichte.

250 mL steriles MM63-1/50Cm (VA) Medium wurden in das Kultivierungsgefäß gefüllt und mit der im gleichen Medium gewachsenen Vorkultur *E. coli* BKA-13 pAKECT1 angeimpft. Das Wachstum wurde durch Messung der OD₆₀₀ im Photometer verfolgt. Die Expression des *lysC*-Gens wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,4 durch 0,5 mM IPTG induziert. Zur Expression der Ectoin-Gene wurde ein Salzschock auf 3 % NaCl durchgeführt (Abschnitt I. 7.2). In regelmäßigen Abständen wurden 2 mL-Proben entnommen, geerntet und das Pellet sowie der Überstand bis zur weiteren Analyse mittels HPLC bei -20 °C eingefroren. Die Abnahme des Glucose-Gehaltes im Medium wurde mit Hilfe eines enzymatischen UV-Tests überprüft (Abschnitt II. 7.2). Nach Verbrauch der C-Quelle Glucose wurde mit 2,5 g/L Glucose nachgefüttert.

6.9. Mikrotiterversuche zur Untersuchung des Wachstums von *E. coli*

Zur Bestimmung der Wachstumsraten im kleinen Maßstab wurden Flüssigkulturen in Mikrotiterplatten (96-well Platten) inkubiert. Dazu wurden die einzelnen Wells mit 200 µL entsprechendem Medium befüllt und mit 10 µL Vorkultur angeimpft. Die Platte wurde mit einer Folie (Acetat-Folie, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht) abgeklebt, in die zur besseren Sauerstoffversorgung ein Loch in jedes Well gestochen wurde. Die Inkubation erfolgte in einem Plattenleser (infinite M200 Nano Quant, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei 37 °C, wobei das Wachstum bei einer OD₆₀₀ in Abständen von 15 min automatisch verfolgt wurde. Um dem Absetzen der Zellen während der 15-minütigen Inkubation entgegenzuwirken, wurde die Platte in Intervallen von 5 min für 30 sec geschüttelt.

Unter Verwendung der Mikrotiterplatten wurde das Wachstumsverhalten von *E. coli* MC4100 und BL21 pETect*DH*is in Abhängigkeit von Gd-Ectoin untersucht. Dazu wurde das Minimalmedium MM63-x (x: 1 bis 3 % NaCl) mit verschiedenen Konzentrationen an Gd-Ectoin (1, 2 und 5 mM) supplementiert.

6.10. Bestimmung der spezifischen Produktivität

Die Bestimmung der spezifischen Produktionsraten ($\text{mg (g TG}^{-1}) \text{ h}^{-1}$) ergibt sich aus dem Gehalt an Solut (in mg/g TG) multipliziert mit der Wachstumsrate (h^{-1}). Zur Bestimmung der spezifischen Umsatzraten von im Medium akkumulierter Solute

wurde der Umsatz (Solut pro Stunde) auf das Trockengewicht bezogen, wobei eine reale OD₆₀₀ von 1 einem Trockengewicht von 0,5 g entspricht (Dr. Kurz, persönliche Mitteilung). Die reale OD₆₀₀ von in Nasenkolben durchgeführten Messungen wurde durch die Dalgaard-Korrektur (Dalgaard *et al.*, 1994) ermittelt:

$Y = X + A * X^B$, wobei für *E. coli* in MM63 gilt: A = 0,15 und B = 3,5.

7. Analytische Methoden

7.1. Gefriertrocknung und SpeedVac

Bei der Gefriertrocknung oder Lyophilisation handelt es sich um ein Verfahren, bei dem das Wasser des gefrorenen Zellmaterials schonend durch Sublimation entfernt wird. Die bei -20 °C eingefrorenen Pellets wurden bei einem Druck von unter 0,05 mbar bei einer Heizflächentemperatur von 20-30 °C für bis zu 24 Stunden in der Gefriertrocknungsanlage (Alpha I-6, Heraeus-Christ, Osterode) getrocknet.

Die Pellets der Kulturproben, die bei höheren Salinitäten angezogen worden waren, waren teilweise nach einer 24-stündigen Gefriertrocknung noch nicht vollständig vom Wasser befreit. Daher wurden die geöffneten Reaktionsgefäße in den Rotor einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac savant ISS110 SpeedVac-Concentrator, Thermo Fisher, Waltham, USA) überführt und für mindestens 8 h unter Vakuum bei 25 °C zentrifugiert und nachgetrocknet.

7.2. Glucose-Test

Zur Bestimmung des Glucose-Gehaltes im Medium während der Minifermentation von *E. coli* BKA-13 pAKECT1 wurde der D-Glucose-Enzym-Test der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet. Das Prinzip des enzymatischen UV-Tests beruht darauf, dass D-Glucose durch das Enzym Hexokinase zu D-Glucose-6-phosphat phosphoryliert wird, welches in Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch NADP zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert wird. Das in der letztgenannten Reaktion gebildete NADPH ist der D-Glucose-Menge äquivalent und kann aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt werden. Der Enzym-Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

7.3. HPLC (*high performance liquid chromatography*)

Die HPLC, eine Flüssigkeitschromatographie, wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um das Solutespektrum der durch Mikroextraktion unterzogenen Proben sowie der Medienproben zu bestimmen und zu quantifizieren. Die hocheffiziente Trennung gelöster, niedermolekularer Substanzen mit Hilfe der HPLC beruht auf einer extrem dichten Packung des Chromatographiesäulenmaterials (stationäre Phase), über die die in der mobilen Phase gelösten Stoffe mit hohem Druck gepumpt werden. Die auf die Säule aufgetragenen Substanzen interagieren z. B. in Abhängigkeit ihrer Hydrophobizität unterschiedlich stark mit der stationären Phase. Diese Wechselwirkung bewirkt einen verzögerten Transport der einzelnen Komponenten und das Eluat benötigt eine charakteristische Zeit, die Retentionszeit, um die Trennsäule zu verlassen. Die Elution der Substanzen wird schließlich über nachgeschaltete Detektoren verfolgt. Mit Hilfe von Standardsubstanzen bekannter Konzentration können die aufgetrennten Substanzen dann verglichen und quantifiziert werden. Die Extraktion und Vorbereitung der Proben wird im Folgenden beschrieben.

7.3.1. Mikroextraktion des Zellmaterials (Bligh und Dyer, 1959)

Die von Bligh und Dyer (1959) entwickelte und nach Galinski und Herzog (1990) modifizierte Extraktionsmethode trennt die Inhaltsstoffe der Zellen je nach Löslichkeit in eine untere hydrophobe Chloroform- und in eine obere hydrophile Methanol/Wasser-Phase. Makromolekulare Bestandteile und Zelltrümmer werden an der Grenzschicht zwischen Wasser und Chloroform ausgefällt.

Bligh und Dyer-Extraktion von gefriergetrockneten Pellets

30 mg gefriergetrocknetes und gemörsertes Zellmaterial wurden mit 500 µL Bligh und Dyer-Lösung (Methanol:Chloroform:H₂O_{reinst}, 10:5:4 (v/v)) versetzt und für mindestens 10 min bei RT auf einem Schüttler (IKA-Vibrax-VXR, Aufsatz VX2E, Janke und Kunkel, Staufen) inkubiert. Nach Zugabe von 130 µL Chloroform und 130 µL H₂O_{reinst} wurde der Ansatz für weitere 10 min geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde die Probe für 5 min bei 10.000 rpm (9.300 g) in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Hamburg) zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren wurde.

Bligh und Dyer-Extraktion von Pellets aus 2 mL-Proben

Die mit 250 µl Bligh und Dyer-Lösung versetzten eingefrorenen Pellets der 2 mL-Verlaufproben (Abschnitt II. 6.2) wurden für 5 min im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex TK52, Bandelin electronic, Berlin) behandelt, gemischt und nochmals kurz beschallt. Nach 10-minütigem Schütteln wurden sie mit 65 µL Chloroform und 65 µL H₂O_{reinst} versetzt und weitere 10 min geschüttelt. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm (9.300 g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung mittels HPLC bei -20 °C gelagert.

7.3.2. Isokratische HPLC zur Bestimmung des Solutegehalts

Mit Hilfe der isokratischen HPLC-Methode wurden die in den Zellextrakten und Medienproben enthaltenen Solute bestimmt und quantifiziert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Brechungsindex- und eines UV-Detektors. Als stationäre Phase diente eine Reversed-Phase-Kieselgelmatrix, an deren Hydroxylgruppen über hydrophobe Abstandshalter (Propylketten) polare endständige Aminogruppen gebunden sind. Als mobile Phase wurde 80 %iges Acetonitril (v/v in H₂O_{reinst}) verwendet. Die Zellextraktproben wurden mit Acetonitril 1:4 bis 1:10 und die Medienproben 1:10 bis 1:100 verdünnt. Die Trennung der Substanzen erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min bei RT. Mit Hilfe von Standardsubstanzen in Konzentrationen von 2-5 mM und der Software ChromQuest 4.2.34 (Version 3.1.6, Thermo Quest Cooperation) konnten die aufgetrennten Substanzen zugeordnet und quantifiziert werden. Die HPLC-Apparatur gliederte sich in folgende Bestandteile:

- Entgaser Spectra System SCM1000 (Thermo scientific)
- Pumpe Spectra System P100 (Thermo Separation Products)
- Probenaufgabe Rheodyne Injector Nr. 7125 (Probenschleife 20 µL; Rheodyne Inc.)
- Vorsäule LiChrospher 100-NH₂, 5 µm, (Merck)
- Trennsäule CC 125/4 Nucleosil 100-3 NH₂ (Macherey-Nagel)
- UV-Detektor - Spectrasystem UV 1000, 210 nm (Thermo Separation Products)
- Accela PDA detector (Thermo scientific)
- RI-Detektor Shodex RI-71 (Showa Denko K.K.)

7.4. FMOC/ADAM-HPLC zur Bestimmung von Aminosäuren

Die FMOC/ADAM-HPLC zur Bestimmung von Aminosäuren wurde in modifizierter Form nach Betnér und Földi (1988) durchgeführt. Der Nachweis erfolgt über die Fluoreszenzdetektion der zuvor mit FMOC (9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid) derivatisierten und chromatographisch aufgetrennten Aminosäuren in der HPLC. Im Gegensatz zur isokratischen HPLC wurde bei der Bestimmung von Aminosäuren eine Gradiententrennung durchgeführt, bei der im Verlauf der Elution das Lösungsmittelgemisch verändert wurde (Tab. 5).

7.4.1. Probenaufbereitung für FMOC/ADAM-HPLC

Mit Hilfe der FMOC/ADAM-HPLC wurde die Hydroxylierung von Prolin verfolgt. Die Zellextrakte wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ 1:20 und die Medienüberstände 1:100 verdünnt. Danach wurde eine Vorsäulenderivatisierung der Proben durchgeführt, die zur Kopplung von FMOC an N-reaktive Verbindungen führte.

Dazu wurden 40 μL Boratpuffer, der mit dem internen Standard Norvalin (25 μM) versetzt war, mit 40 μL Zellextrakt- oder Medienprobe und 80 μL FMOC-Reagenz versetzt und für 45 sec geschüttelt. Anschließend wurden 100 μL ADAM-Reagenz zugefügt und wieder für 45 sec geschüttelt. Zum Schluss wurden 140 μL Laufmittel A zugeetzt und die Probe mittels Gradienten-HPLC aufgetrennt. Als Standardsignal zur Quantifizierung wurde Prolin in einer Endkonzentration von 25 μM in die Vorsäulenderivatisierung eingesetzt.

7.4.2. FMOC/ADAM-HPLC-Messung

Zur Auftrennung der vorderivatisierten Zellextrakt- und Medienproben wurde ein Lösungsmittelgradient aus Laufmittel A und B angelegt (Tab. 5).

Tab. 5 Zeitprofil zur Trennung der FMOC-derivatisierten Aminosäuren

Zeit (min)	Laufmittel B (%)
0	0
15	9
30	30
40	60
42	100
47	100
49	0
51	0

Die Trennung der Substanzen erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,25 mL/min. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors und die Auswertung mit der Software ChromQuest (Version 2.51, Thermo Quest Cooperation).

Die HPLC-Apparatur gliederte sich in folgende Bestandteile:

- Entgaser Spectra System SCM1000 (Thermo scientific)
- Pumpe Spectra System P2000 (Thermo Separation Products)
- Probenaufgabe Autosampler Spectra Systems AS3000 (Probenschleife 100 μ L, Probenvolumen 10 μ L, Probenhalter 4 °C; Thermo Separation Products)
- Trennsäule Merck Superspher 60 RP-8, 4 μ m, 125x4 mm, LiChrocart-System (Alltech Grom GmbH)
- Fluoreszenzdetektor Spectra System FL2000 (254 nm (exc.), 315 nm (em.), Thermo Separation Products)

7.5. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) ist eine Technik mit atomarer Auflösung, die eine Hauptanwendung in der Strukturaufklärung von Molekülen darstellt. Sie basiert auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments eines Atomkerns mit einem äußeren magnetischen Feld. Magnetisch aktive Kerne besitzen eine ungerade Anzahl an Protonen oder Neutronen, wobei bei der Strukturanalyse von Substanzen die Atome ^1H mit einer natürlichen Häufigkeit von 99,98 % und ^{13}C mit einer natürlichen Häufigkeit von 1,108 % eine bedeutende Rolle spielen (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die Atomkerne verhalten sich so, als würden sie sich um ihre eigene Achse drehen. Dieser Eigendrehimpuls wird auch als Kernspin bezeichnet und die Drehbewegung eines Protons erzeugt ein magnetisches Moment. Durch Anlegen eines äußeren Magnetfelds kann dieses Moment in eine bestimmte Orientierung gebracht werden, d. h. das magnetische Feld kann zwei Spinzustände einnehmen: parallel zum äußeren Feld (α -Zustand) oder antiparallel dazu (β -Zustand). Diese beiden Ausrichtungen besitzen auch unterschiedliche Energieniveaus (Stryer, 2003). Um vom energieärmeren (α) in den energiereicheren Zustand (β) zu gelangen, muss dem Kern exakt die Energiedifferenz, die zwischen diesen Niveaus liegt, zugeführt werden. Durch Absorption von Radiofrequenzen, deren Energie der Differenz zwischen den beiden Zuständen

entspricht, wird also eine Resonanz (Spinumkehr) erzielt. Der energiereiche Spinzustand relaxiert anschließend, indem er die entsprechende Energiemenge in Form einer bestimmten Frequenz abgibt, die detektiert wird. Diese Resonanzfrequenz ist abhängig von der chemischen Umgebung des Kerns und spiegelt sich in der chemischen Verschiebung wieder, die in *ppm* (*parts per million*) bezogen auf eine Standardsubstanz (Na-Trimethylsilylpropionat) angegeben wird. Das sich ergebende Signalmuster kann mit zuvor gemessenen Standardsubstanzen verglichen oder es können über die chemischen Verschiebungen funktionelle Gruppen ermittelt werden.

7.5.1. Probenaufbereitung für ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die Probenvorbereitung von Zellmaterial für die NMR-Spektroskopie entspricht der Mikroextraktion, wie unter Abschnitt II. 7.3.1 beschrieben wurde. Dazu wurden bis zu 0,5 g gefriergetrocknetes Zellmaterial eingesetzt. Der wässrige Überstand der Mikroextraktion wurde eingetrocknet und in 1 mL D_2O (Deuteriumoxid) aufgenommen. Als interner Standard diente Na-Trimethylsilylpropionat (Na-TMSP). Als Kontrollsignal wurde zusätzlich Acetonitril (100 %, v/v) zugegeben. Das Gemisch wurde gut durchmischt und in ein spezielles NMR-Probenröhrchen überführt.

Zur Analyse des Synthesererfolges von Gd-Ectoin wurden 28 mg der synthetisierten Substanz (Abschnitt II. 5) in 1 mL D_2O gelöst und im Wärmeschrank bei 60 °C über Nacht bis zur vollständigen Lösung inkubiert. Als interner Standard wurden 5 mg Na-TMSP und als Kontrollsignal 10 μL Acetonitril (100 %) zugefügt.

Zur Untersuchung der Hydroxylierung von Gd-Ectoin mittels *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel (Abschnitt II. 6.6) wurde in der späten exponentiellen und in der stationären Phase geerntetes Zellmaterial eingesetzt und wie oben beschrieben behandelt.

7.5.2. NMR-Messung

Die NMR-Messung wurde im pharmazeutischen Institut der Universität Bonn mit einem NMR-Spektrometer Bruker Avance 300DPX durchgeführt. Die Messfrequenz betrug 75,46 MHz für den ^{13}C -Kanal und 300 MHz für den ^1H -Entkopplungskanal. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm WIN-NMR (Bruker).

8. Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von DNA

8.1. Isolierung von Gesamt-DNA (Marmur, 1961)

In der vorliegenden Arbeit wurde DNA aus *H. elongata* für anschließende PCR-Reaktionen isoliert. Dazu wurde *H. elongata* über Nacht in Komplexmedium (AB-3) angezogen (37 °C, 180 rpm). Anschließend wurden 3-4 mL der Kultur in einem 2 mL-Reaktionsgefäß geerntet (Biofuge fresco, Heraeus, 9.500 g, 5 min). Der Überstand wurde quantitativ entfernt, das Zellpellet in 1 mL TES-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 800 µL TES-Puffer resuspendiert. Zur Lyse wurden 20 µL SDS-Lösung (20 %) hinzugefügt. Nach leichtem Schwenken wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Das Zelllysate wurde mit 300 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) versetzt und kräftig geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation (16.000 g, 4 °C) wurde die wässrige Oberphase vorsichtig abgenommen, in 300 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung überführt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis keine Zwischenphase mehr erkennbar war. Zur Fällung der DNA wurde die gewonnene Oberphase mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 1 Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt und für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Der Ansatz wurde für 5-10 min bei 9.500 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µL eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet im Trockenschrank (Typ UT 6060, Heraeus Instruments, Hanau) bei 60 °C für 10 min getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 50 µL H₂O_{reinst} resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

8.2. Isolierung von genomischer DNA mit E.Z.N.A.[®] Bacterial DNA Kit

Zur Isolierung von Gesamt-DNA aus *H. elongata*, die nach einer PCR-Amplifizierung für Sequenzierungsreaktionen diente, wurde das DNA-Isolierungskit E.Z.N.A.[®] Bacterial DNA Kit (Omega bio-tek, Norcross, USA) verwendet. Dabei wird die Gesamt-DNA nach der Zelllyse mit Lysozym, dem Abbau von Proteinen (Proteinase K) und RNA (RNase) an einem HiBind DNA-Säulchen gebunden und letztlich mit 50 µL H₂O_{reinst} von der Säule eluiert. Die DNA-Isolierung und Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

8.3. Isolierung von Plasmid-DNA (*no column plasmid miniprep*)

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse. Es wurden 3-6 mL der in Komplexmedium (AB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) angezogenen Übernachtskulturen in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß bei 9.500 *g* für 30 sec geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µL Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A, pH 8) durch Vortexen resuspendiert. Nach Hinzufügen von 200 µL Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS, pH 12,5), vorsichtigem Mischen des Reaktionsgefäßes und anschließendem Hinzufügen von 200 µL Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurde der Ansatz bei 16.060 *g* für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches mit 500 µL Chloroform gefülltes Reaktionsgefäß überführt, kräftig geschüttelt und wieder unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand in 500 µL Isopropanol aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µL eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und die Plasmid-DNA für 20 min im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µL H₂O_{reinst} aufgenommen und die Plasmid-DNA im Wasserbad bei 70 °C für 10 min gelöst. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20 °C.

8.4. Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder hydrolysierter DNA wurden diese zunächst in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid oder GelRedTM gefärbt und unter schwachem UV-Licht betrachtet (Abschnitt II. 10). Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA mittels peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei wird die gelöste DNA reversibel an eine PerfectBind-Silikamembran gebunden und nach mehreren Waschschritten mit H₂O_{reinst} eluiert.

8.5. Quantifizierung von DNA

8.5.1. Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration und Reinheit von DNA kann spektralphotometrisch über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Eine Lösung, die 50 µg/mL doppelsträngige DNA enthält, besitzt – bei Verwendung einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm – einen Absorptionswert von 1. Zur

Reinheitsbestimmung der DNA-Probe wurde die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren, gemessen und der Quotient A_{260}/A_{280} ermittelt. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen A_{260}/A_{280} -Wert zwischen 1,7 und 1,9. Ein Quotient unter 1,7 deutet auf Verunreinigung mit Proteinen, ein Quotient über 1,9 auf Verunreinigung mit RNA hin. Die Absorptionen wurden im UV-Spektralphotometer (Specord 210, Analytik Jena AG, Jena) in einer Quarzglas-Halbmikroküvette gemessen. Zunächst wurde der Leerwert mit H_2O_{reinst} bestimmt, dann wurden die DNA enthaltenden Proben 1:20 mit H_2O_{reinst} verdünnt und die entsprechenden Absorptionen gemessen.

8.5.2. Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung von DNA mit Hilfe eines DNA-Größenstandards

Die Konzentration der DNA in einer Probe kann auch im Agarosegel mit Hilfe eines DNA-Größenstandards durch den Vergleich von Fluoreszenzintensitäten abgeschätzt werden. Dazu wurde eine zu quantifizierende DNA-Probe zusammen mit einem Größenstandard (GeneRuler™ 1 kb oder 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach anschließender Färbung mit Ethidiumbromid bzw. GelRed™ konnte die Probe dann mit dem DNA-Marker verglichen und die Konzentration der DNA in der Probe anhand der Leuchtintensität von ähnlich großen Fragmenten im Größenstandard abgeschätzt werden. Diese Methode wurde vor allem bei der Abschätzung der DNA-Konzentration für eine anschließende Ligation verwendet.

9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von Mullis *et al.* (1986) entwickelte PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur selektiven Amplifizierung von Nukleinsäuren. Als Matrize dient ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit der zu amplifizierenden Sequenz. Ein PCR-Zyklus untergliedert sich normalerweise in drei sich wiederholende Schritte: in die Denaturierung, die Anlagerung der Primer (Annealing) und die Elongation. Dadurch entstehen zwei neue, doppelsträngige DNA-Moleküle. Durch eine vielfache Wiederholung des oben genannten Reaktionszyklus kann eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht werden (Mullis und Faloona, 1987).

Für die PCR wurden unterschiedliche thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt. Für Test- und Kolonie-PCRs (Abschnitt II. 9.4) wurde die *Taq*-Polymerase, eine aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase I, verwendet. Für Klonierungsreaktionen, bei denen eine höhere Fehlerkorrekturrate erforderlich war, wurde die *Phusion*-DNA-Polymerase benutzt. Bei der *Phusion*[®] High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) handelt es sich um eine modifizierte *Pyrococcus*-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Neben der Genauigkeit und Schnelligkeit generiert die *Phusion*-DNA-Polymerase infolge der PCR-Reaktion *blunt-ends*. Dieser Eigenschaft wurde sich bei der Klonierung des Plasmids pAKECT1-*tacctD* bedient.

9.1. Standard-PCR mit *Phusion*-DNA-Polymerase

Für PCR-Reaktionen wurden die in Tab. 6 beschriebenen Komponenten in einem 200 µL PCR-Reaktionsgefäß auf Eis zusammenpipettiert. Zur Amplifizierung wurde ein Thermocycler (MyCycler, BioRad, Hercules, USA; Primus, MWG Biotech, Ebersberg) mit in Tab. 7 beschriebenem Programm verwendet:

Tab. 6 Zusammensetzung eines *Phusion*-DNA-Polymerase PCR-Ansatzes

Komponenten	Menge
DNA-Matrize (20-100 ng/µL)	1 µL
5x <i>Phusion</i> HF Buffer	10 µL
Betain (5 M)	10 µL
Primer 5' (<i>forward</i>) (50 pmol/µL)	1 µL
Primer 3' (<i>reverse</i>) (50 pmol/µL)	1 µL
dNTPs (2 mM oder 10 mM)	5 µL oder 1 µL
<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase (2 U/µL)	0,5 µL
H ₂ O _{reinst}	ad 50 µL

Tab. 7 PCR-Programm mit der *Phusion*-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initialdenaturierung	98 °C	30 sec
2. Zyklus (30x)		
▪ Denaturierung	98 °C	5-10 sec
▪ Anlagerung	T _m + 3 °C	10-30 sec
▪ Elongation	72 °C	15-30 sec/kb
3. verlängerte Elongation	72 °C	10 min
4. Kühlung und Lagerung	4 °C	∞

Die verwendete Anlagerungstemperatur hing von der jeweiligen Schmelztemperatur (T_m) der eingesetzten Primer ab, die vom Hersteller angegeben wurde. Für die Amplifizierung unter Verwendung der *Phusion*-DNA-Polymerase wurde die Anlagerungstemperatur der Primer 3 °C höher gewählt als die niedrigere Schmelztemperatur des Primerpaares.

9.2. Standard-PCR mit *Taq*-Polymerase

Für PCR-Reaktionen mit der *Taq*-Polymerase wurde der in Tab. 8 beschriebene Ansatz verwendet. Anschließend wurde das in Tab. 9 aufgeführte Programm gestartet:

Tab. 8 Zusammensetzung eines *Taq*-DNA-Polymerase PCR-Ansatzes

Komponenten	Menge
DNA-Matrize (20-100 ng/ μ L)	1 μ L
<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (10x)	5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1,5-3 μ L
Primer 5' (<i>forward</i>) (50 pmol/ μ L)	1 μ L
Primer 3' (<i>reverse</i>) (50 pmol/ μ L)	1 μ L
dNTPs (2 mM oder 10 mM)	5 μ L oder 1 μ L
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/ μ L)	1 μ L
H ₂ O _{reinst}	ad 50 μ L

Tab. 9 PCR-Programm mit der *Taq*-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initialdenaturierung	95 °C	3 min
2. Zyklus (30x)		
▪ Denaturierung	95 °C	30 sec
▪ Anlagerung	$T_m - 5$ °C	30-45 sec
▪ Elongation	72 °C	1 min/kb
3. verlängerte Elongation	72 °C	10 min
4. Kühlung und Lagerung	4 °C	∞

9.3. SOE-PCR (*splicing by overlap extention*)

Bei der SOE-PCR lassen sich DNA-Moleküle ohne Verwendung von Restriktionsendonukleasen und Ligasen miteinander verknüpfen (Horton *et al.*, 1989). Diese Methode wurde für die Gewinnung von DNA-Fragmenten, die für die Konstruktion der drei genomischen *Halomonas*-Austauschmutanten (*H. elongata* MaKu03 Δ *ectB::ectD*, Δ *ectB::ectD* und Δ *ectB::ectD* Δ *promectD::promKB1*, Abschnitt II. 14) benötigt wurden, eingesetzt. Dafür wurden die DNA-Bereiche, die den auszutauschenden Genbereich

flankieren, amplifiziert und mit dem neu zu inserierenden Gen fusioniert. Die drei zu verbindenden Fragmente wurden zunächst in getrennten PCR-Reaktionen vervielfältigt und aufgereinigt (Abschnitte II. 9.1 und II. 8.4). Dafür wurden sechs Primer konstruiert. Mit dem einen Primerpaar wurde der DNA-Bereich stromaufwärts (*up*) und mit dem anderen der DNA-Bereich stromabwärts (*down*) des auszutauschenden Genabschnittes amplifiziert. Das neu zu inserierende Gen wurde mit dem dritten Primerpaar vervielfältigt. Die jeweils inneren Primer, die bei der Fusion eine wichtige Rolle spielen, setzten sich aus komplementären DNA-Sequenzen zusammen, die in einer nächsten PCR hybridisierten und als Primer fungierten. Die äußeren Primer dienten der Vervielfältigung des Fusionsproduktes und enthielten Restriktionsschnittstellen für anschließende Klonierungsschritte. Das Produkt der SOE-PCR war ein DNA-Fragment aus *up*-Gen-*down*-Bereich, welches nach der Restriktion in den Vektor pK18*mobSacB* kloniert werden konnte. Die SOE-PCR wurde mit der *Phusion*-DNA-Polymerase durchgeführt. Außerdem wurde diese Methode zur Fusion des *tac*-Promotors mit dem *ectD*-Gen zur Konstruktion des Plasmids pAKECT1-*tacectD* genutzt.

9.4. PCR an ganzen Zellen mit *Taq*-Polymerase

Die PCR an ganzen Zellen (Kolonie-PCR) wurde zur Überprüfung der genetischen Identität der genomischen Mutanten sowie zur Stammkontrolle nach Konjugationsexperimenten verwendet. Bei dieser Methode werden intakte bakterielle Zellen ohne vorherige DNA-Isolierung in die PCR-Reaktion eingesetzt (Joshi *et al.*, 1991). Dazu wurde mit einem Zahnstocher etwas Zellmaterial von der Agarplatte aufgenommen, auf eine frische Platte überimpft und anschließend in 20 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert. Von dieser Suspension wurden dann 0,5 μL in die PCR-Reaktion, wie sie unter Abschnitt II. 9.2 beschrieben ist, eingesetzt. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurde die Initialdenaturierung auf 10 min erhöht, wobei die *Taq*-Polymerase erst nach dem Zellaufschluss hinzugefügt wurde. Um eine größere Anzahl von Kolonien zu testen, wurde Zellmaterial von 10 Kolonien in 50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert und gleichermaßen verfahren.

9.5. Primer

Tab. 10 Verwendete Primer

Dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer mit ihren Sequenzen und Schmelztemperaturen. Restriktionsschnittstellen sind rot hervorgehoben und erwähnt. Die zur SOE-PCR genutzten komplementären Sequenzbereiche zusammengehöriger Primerpaare sind gleichfarbig dargestellt.

Primerbezeichnung	Sequenz [5'-3']	T _M [°C]	Merkmal
<i>H. elongata</i> (MaKu03)			
<i>ΔectB::ectD</i>			
ectDup_for	AAG TCC TGC AGG CCT CTC GAC GTC AAT TCC	70,9	<i>Pst</i> I
ectDup_rev	TGT CTG CAC TGA CAT TGC GAC CTC CTG TGG	70,9	
ectD_for	CCA CAG GAG GTC GCA ATG TCA GTG CAG ACA	70,9	
ectD_rev	GCA CCT CAG GCG ATC AGC CAT CCG GCG A	73,9	
ectDdown_for	TCG CCG GAT GGC TGA TCG CCT GAG GTG C	73,9	
ectDdown_rev	GTC GTA AGC TTC GTC GGC AGG TGC GTA GGA	72,2	<i>Hind</i> III
ectR_rev	GAA GCA CTG CGT CAC CGA CCT CGA GC	71,1	Kolonie-PCR
pPromEct_ectD			
ectDProm_for2	AGG TAT TCC ATG GCA GTG CAG ACA TCG T	66,6	<i>Nco</i> I
ectDProm_rev2	CTG GTG GCA AGC TTG ATG AAC AGC AAC	66,5	<i>Hind</i> III
<i>H. elongata ΔectB::ectD</i>			
<i>ΔpromectD::promKB1</i>			
promectDup_for	AAG TCC TGC AGC ATG ATC ACG GGC ACA GTC	70,9	<i>Pst</i> I
promectDup_rev	CCC TGG ATG ATC TAG TGA TCG GCA TCG GTC	70,9	
promKB1_for	GAC CGA TGC CGA TCA CTA GAT CAT CCA GGG	70,9	
promKB1_rev	TGT CTG CAC TGA CAT GTC GAC CTC CTG TGG	70,9	
ectDdown_for2	CCA CAG GAG GTC GAC ATG TCA GTG CAG ACA	70,9	
ectDdown_rev2	GTC TGA AGC TTG TTG ATG CGC GAC TGA TGG	69,5	<i>Hind</i> III
HelpromKB1_Sequ	GAG TCG ATG TCC GGC GAG TA	61,4	Sequenzierung
pETectDHis			
ectDHis_for	GGA GGT ATC ATA TGT CAG TGC AGA CAT CGT	66,8	<i>Nde</i> I
ectDHis_rev	AAT AAG CTT GCC ATC CGG CGA CCA CG	68,0	<i>Hind</i> III
pASKectDStrep			
EctDStrep_for	ATG GTA GGT CTC AAA TGT CAG TGC AGA CAT CG	68,2	<i>Bsa</i> I
EctDStrep_rev	ATG GTA GGT CTC AGC GCT GCC ATC CGG CGA	73,6	<i>Bsa</i> I
pAKECT1-tacectD			
pAKECTtac_1	GGC CAA TCG CGA TGA AAT GAG CTG TTG ACA ATT	68,2	
pAKECTtac_2	TGT CTG CAC TGA CAT CTT TGT GCA CCT TTC	66,8	
pAKECTectD_3	GAA AGG TGC ACA AAG ATG TCA GTG CAG ACA	66,8	
pAKECTectD_4	TTC TCG CGA TCT ACC CCC GAG TCA GCC	71	

10. Agarosegelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen wurden Gelkammern der Firma Gibco BRL (Horizon 58[®], Maryland, USA, Gelvolumen 26 mL) verwendet. Die

Agarose wurde in Elektrophoresepuffer (1x TAE-Puffer) in einer Konzentration von 0,7-1,5 % (je nach Größe des aufzutrennenden Fragmentes) durch Erhitzen gelöst und in den Gelträger gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde dieses vollständig mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x Probenpuffer versetzt. Zur Bestimmung der Bandengröße wurde zusätzlich ein Größenstandard aufgetragen (GeneRuler™ 1 kb oder 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 60-90 Volt (Electrophoresis Power Supply Consort E122, Sci-Plas Limited, Southham, Großbritannien). Zur Dokumentation der Auftrennung wurde das Gel für 5 min in Ethidiumbromid (10 µg/mL) gefärbt und anschließend für 5 min in H₂O_{demin.} entfärbt. Die DNA-Banden konnten dann im UV-Durchlicht (Videosystem Intas, Göttingen) betrachtet werden. Aus präparativen Gelen wurde die DNA-Bande unter schwachem UV-Auflicht (365 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Eine Alternative zur Färbung mit Ethidiumbromid stellte der fluoreszierende Farbstoff GelRed™ (Biotium, Hayward, Kalifornien) dar. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 15 min in der GelRed-Färbelösung inkubiert, kurz in H₂O_{demin.} getaucht und wie oben beschrieben unter UV-Licht betrachtet.

11. Enzymatische Modifikation von DNA

11.1. Restriktionsverdau von DNA

Für Klonierungsexperimente und Restriktionsanalysen wurde DNA mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Die Hydrolyse von Plasmid- und Insert-DNA (bis 10 µg) für anschließende Ligationsreaktionen erfolgte in einem Gesamtvolumen von 40 µL, der Verdau von Konstrukten für Restriktionsanalysen hingegen in einem Volumen von 20 µL. Je nach Bedarf wurden unterschiedliche Enzyme (5-10 U) verwendet, wobei für die Wahl der Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur) die Angaben des Herstellers berücksichtigt wurden. Die Ansätze wurden für 2-5 h im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Erhitzen bei 65-80 °C für 10-20 min abgestoppt.

11.2. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern und die Klonierung der Insert-DNA zu begünstigen, wurde die Vektor-DNA dephosphoryliert. Die Reaktion

wurde 2 h nach Beginn der Hydrolyse der Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 U CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) bzw. 1 U FastAP (*thermosensitive alkaline phosphatase*) zum Ansatz gestartet. Danach wurde der Reaktionsansatz im Fall der Dephosphorylierung mit CIAP für weitere 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Mit FastAP genügte eine Inkubation bei 37 °C für 10 min. Die Dephosphorylierung wurde durch Hitzeinaktivierung bei 80 °C für 15-20 min (CIAP) bzw. bei 75 °C für 5 min (FastAP) abgestoppt.

11.3. Ligation

Die bei der Restriktion entstandenen kohäsiven Enden können nach ihrer Zusammenlagerung mit Hilfe der T4-DNA-Ligase verknüpft werden. Nach der Konzentrationsbestimmung von Vektor- und Insert-DNA (Abschnitt II. 8.5.2) wurden beide Komponenten in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:4 in die Ligation eingesetzt, wobei mindestens 50-100 ng Vektor-DNA zur Verfügung stehen mussten. Die Reaktion wurde in dem mitgelieferten Puffer für die T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µL durchgeführt. Bei der Ligation glatter Enden (Konstruktion von pAKECT1-*tacectD*) wurden dem Ansatz zusätzlich 2 µL PEG 4000 (50 %) zugesetzt. Nach Hinzufügen von 2 U T4-DNA-Ligase wurde der Ansatz dann entweder bei 4 °C im Kühlschrank oder bei 16 °C im Thermocycler (MyCycler, BioRad, Hercules, USA) über Nacht inkubiert. Die Reaktion wurde am nächsten Tag für 10 min bei 65 °C abgestoppt. Die Ligationsansätze wurden danach zur Transformation in *E. coli* DH5α eingesetzt.

12. Transformation von *E. coli*

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier DNA (z. B. Plasmid-DNA) durch eine Bakterienzelle (Cohen *et al.*, 1972). Da dieser Vorgang natürlicherweise sehr ineffizient abläuft muss Kompetenz durch geeignete Labormethoden künstlich erzwungen werden.

12.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der CaCl₂-Methode (Dagert und Ehrlich, 1979)

70 mL 2xYT-Medium wurden 1 %ig mit der entsprechenden *E. coli*-Kultur angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert (30 °C, 180 rpm) und die Zellen anschließend in sterilen Zentrifugenröhrchen geerntet (5000 g, 6 min, 4 °C). Das Pellet wurde in

10,5 mL eiskalter Salzlösung vorsichtig resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (5000 *g*, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 3,5 mL Salzlösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 875 µL sterilem Glycerin versetzt, durchmischt, in 1,5 mL-Reaktionsgefäße zu je 200 µL aliquotiert und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -70 °C.

12.2. Transformation CaCl₂-behandelter kompetenter Zellen

200 µL der kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 5-20 µL des Ligationsansatzes bzw. des zu transformierenden Plasmids gemischt und 30 min im Eiswasserbad inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec, der durch 2-minütige Inkubation auf Eis abgestoppt wurde. Zur Regeneration der Zellen wurden dem Transformationsansatz 500 µL vorgewärmtes 2xYT-Medium zugefügt und der Ansatz für mindestens 1,5 h bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase wurden 100 µL Zellsuspension auf Selektionsmedium ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden kurz bei 16.060 *g* abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig im restlichen Medium resuspendiert und anschließend auch auf Selektionsmedium ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

13. Bakterielle Konjugation

Die bakterielle Konjugation bezeichnet den horizontalen Austausch genetischen Materials durch die Übertragung eines Plasmids von einer Donor- auf eine Rezipientenzelle. Zur Übertragung sind *tra*- und *mob*-Gene sowie die für den Transfer erforderliche Replikationsstelle (*oriT*) notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Konjugation Derivate zweier nicht konjugativer, jedoch mobilisierbarer Plasmide eingesetzt.

pK18*mobSacB* (Schäfer *et al.*, 1994) wurde für die Herstellung genomischer *H. elongata*-Austauschmutanten benutzt. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein pBR322-Derivat, das neben der Mobilisierungsregion (*mob*-site) die notwendige Replikationsstelle *oriT* trägt, nicht jedoch die notwendigen Transferegene (*tra*-Gene). Zur Selektion trägt das Plasmid eine Kanamycin-Resistenz (Km^R). Als weiteres mobilisierbares Plasmid wurden Derivate des Vektors pPromEct verwendet (Brünig,

2005). Bei diesem Plasmid handelt es sich um den Vektor pBBR1-MCS (Kovach *et al.*, 1994), in dessen multiple Klonierungsstelle die Promotorregion der Ectoin-Gene (*promA*) aus *H. elongata* eingefügt wurde. Als Selektionsmarker verfügt pPromEct über eine Chloramphenicol-Resistenzkassette (Cm^R). Da die für die Konjugation erforderlichen *tra*-Gene auf beiden Plasmiden nicht vorhanden sind, müssen diese durch den Spenderorganismus bereitgestellt werden. In *E. coli* S17-1 liegen diese *tra*-Gene für den konjugativen Transfer von Plasmiden der RK2/RP4-Gruppe (Inkompatibilitätsgruppe P) ins Genom integriert vor (Simon *et al.*, 1983). Ein weiterer Nutzen von *E. coli* S17-1 als Donorstamm liegt in seiner Prolin-Auxotrophie. Bei Verwendung von Mineralsalzmedium MM63 kann somit nach erfolgreicher Konjugation auf *Halomonas*-Stämme selektiert werden.

Der konjugative Plasmidtransfer zwischen *E. coli* S17-1 und *H. elongata* erfolgte in modifizierter Form nach der von Kunte und Galinski (1995) entwickelten Methode:

Der Rezipientenstamm *H. elongata* wurde über Nacht in 50 mL AB-2 Medium bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,9 angezogen. Außerdem wurde eine Übernachtskultur von dem plasmidtragenden Donorstamm *E. coli* S17-1 in AB-1 Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) angezogen (37 °C; 180 rpm). Anschließend wurde der Donorstamm *E. coli* S17-1 in frisches Medium überimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen. 2 mL Donor- und 1 mL Rezipienten-Suspension wurden in einem sterilen 2 mL-Reaktionsgefäß nacheinander für 1 min bei 13.000 rpm (16.060 g) in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Hamburg) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 2 %iger NaCl-Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und auf sterile Nitrocellulosefilter (0,45 µm) übertragen, die auf vorgewärmten Inkubationsplatten (AB-2) lagen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet. Nach der Inkubation wurde der Filter mit einer sterilen Pinzette von der Agarplatte genommen und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit 1 mL NaCl-Lösung (2 %) durch Vortexen vom Filter gespült und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 10^{-1} bis 10^{-3} verdünnt. Je Verdünnungsstufe wurden 100 µL auf Selektionsmedium (MM63-2 oder MM63-5 mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert und für 48 h bei 37 °C inkubiert.

14. Herstellung chromosomaler Mutationen in *H. elongata*

Zur Herstellung von Mutationen in *H. elongata* ($\Delta\text{ectB}::\text{ectD}$ und $\Delta\text{promectD}::\text{promKB1}$) wurde der Vektor pK18*mobSacB* verwendet (Schäfer *et al.*, 1994). Neben der Eigenschaft eines mobilisierbaren Plasmids enthält pK18*mobSacB* ein pMB1 Replikon (Sutcliffe, 1979). Dieses Replikon, das zu einer engen Wirtsspezifität in *E. coli* und nah verwandten Gattungen führt, ist dafür verantwortlich, dass *H. elongata* pK18*mobSacB* durch homologe Rekombination chromosomal integrieren muss, um den positiven Selektionsmarker, die Km-Resistenz (aus Tn5), auszuprägen. Nach dem konjugativen Transfer (Abschnitt II. 13) wurden die Transkonjuganten daher auf Km-haltigem (300 µg/mL) MM63 Medium (2 bis 5 % NaCl) selektioniert. Die gewachsenen Kolonien haben in einem ersten Prozess homologer Rekombination pK18*mobSacB* mit der integrierten Fremd-DNA (Abschnitt II. 9.3) in das Genom integriert.

Als negativen Selektionsmarker trägt pK18*mobSacB* ein modifiziertes *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*. Dieses kodiert für eine Laevan-Saccharase, welche die Spaltung von Saccharose und Bildung von Laevan ([Fructose]_n) katalysiert. Für *H. elongata* ist die Bildung dieses Enzyms ab einer Saccharosekonzentration von 20 % letal und kann somit zur Selektion von „Doppel-Cross-Over“ Mutanten genutzt werden. Zellen, die auf Saccharose-haltigem Medium gewachsen sind, müssen also das Plasmid durch einen zweiten Cross-Over-Prozess aus dem Genom entfernt haben. Dieser Prozess stellt entweder den Wildtyp wieder her oder führt zum Austausch der ursprünglichen genomischen DNA-Sequenz gegen das rekombinante DNA-Konstrukt. Die Durchführung des zweiten Cross-Over-Prozesses erfolgte wie folgt:

Einzelne Km^R-Kolonien von *H. elongata* wurden in LBG-2-Medium (ohne Km) über Nacht bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Die LBG-Kulturen wurden 10⁻¹ bis 10⁻⁸ mit frischem Medium verdünnt und je 100 µL von allen Verdünnungsstufen auf LBG-2 (bzw. LBG-4) Medium mit 22 % Saccharose ausplattiert. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die gewachsenen Kolonien wurden zur Kontrolle des Plasmidverlustes auf AB-2/100Km Platten und auf AB-2 Platten überimpft. Die Kolonien, die keine Km-Resistenz mehr besaßen, wurden zur Überprüfung der genetischen Identität in eine Kolonie-PCR eingesetzt (Abschnitt II. 9.4).

15. Proteinbiochemische Methoden

15.1. Verwendete Expressionssysteme

Für die heterologe Expression der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* wurden verschiedene Expressionssysteme verwendet.

Zum einen wurde *E. coli* als System genutzt, der mit Vektoren aus der pET- und pASK-IBA-Familie transformiert wurde. Beim pET-System dient *E. coli* BL21 (DE3) als Wirt. Dieser Stamm enthält im Genom das Gen für die hochselektive T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotors (λ DE3 lysogen). Im pET-Vektor wurde das *ectD*-Gen hinter den starken T7-Promotor kloniert, so dass nach IPTG-Induktion die Transkription des Zielgens durch die exprimierte T7-RNA-Polymerase induziert wurde (Studier und Moffat, 1986). Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pET-22b(+) ermöglichte außerdem eine C-terminale Fusion mit einem His₆-tag.

Bei dem pASK-IBA-System diente *E. coli* DH5 α als Wirt. In dem Vektor wurde das *ectD*-Gen hinter den Anhydrotetracyclin-induzierbaren *tet*-Promotor geschaltet. pASK-IBA3 ermöglichte weiterhin die Fusion von *ectD* mit einem C-terminalen Strep[®]-tag.

Neben *E. coli* wurde *H. elongata* als Expressionssystem genutzt. Die *Halomonas*-Stämme wurden mit den Vektoren pPromEctD bzw. pWUB transformiert, bei denen das *ectD*-Gen unter die Kontrolle eines osmoregulierbaren Promotors geschaltet wurde. Die Expression des *ectD*-Gens wurde daher durch NaCl induziert.

15.2. Gewinnung des Gesamtzellproteins

Zur Gewinnung des Gesamtzellproteins wurden die Kulturen bei 37 °C und 180 rpm angezogen. *E. coli* BL21 pETectDHis wurde in LBG-0,5/100Carb inkubiert und die Expression des *ectD*-Gens bei einer OD₆₀₀ von 0,4 mit 0,5 mM IPTG induziert. *E. coli* DH5 α pASK-ectDStrep wurde in AB-0,5/100Carb angezogen und in der exponentiellen Phase mit 0,2 μ g/mL AHT induziert. *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel wurde in MM63-2/50Cm inkubiert. Es wurden jeweils vor sowie ein bis drei Stunden nach der Induktion bzw. in verschiedenen Wachstumsphasen 10 mL-Proben geerntet, eingefroren und eine Gesamtproteinaufreinigung nach folgendem von Brünig (2005) modifizierten Protokoll durchgeführt:

Die eingefrorenen Zellpellets aus den 10 mL-Proben wurden auf Eis aufgetaut und in 200 µL Resuspensionspuffer durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 2 µL Lysozymstammlösung und gründlichem Durchmischen wurden die Ansätze für 30 min auf Eis inkubiert und zwischendurch durch Invertieren gemischt. Nach Zugabe von 10 %iger SDS-Lösung erfolgte eine erneute 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Proben mit 1 µL MgCl₂-Stammlösung und 2 µL DNase-Stammlösung versetzt und weitere 1-2 h auf Eis inkubiert, bevor sie für mindestens 30 min bei -20 °C eingefroren wurden. Der Zellaufschluss erfolgte im eisgekühlten Ultraschallwasserbad für 45 min und wiederholtem Durchmischen. Durch Zentrifugation in einer vorgekühlten Tischzentrifuge (13.000 g, 30 min, 4 °C) wurde das Zellysate von unlöslichen Proteinen und Zelltrümmern getrennt. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung (Abschnitt II. 15.4) bei -20 °C eingefroren.

15.3. Überexpression und Aufreinigung von EctDHis durch Nickelchelataffinitätschromatographie

Zur Überexpression und anschließenden Aufreinigung von EctDHis mit dem System *E. coli* BL21 pETectDHis wurden 300-500 mL Kultur in Komplexmedium LBG-x/100Carb (x: 1 bis 4 % NaCl), teilweise unter Zusatz der TES Spurenelementlösung sowie von 1 mM FeSO₄, bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Die Expression des *ectD*-Gens wurde in der exponentiellen Phase mit 0,5 mM IPTG induziert. Drei bis vier Stunden nach der Induktion wurde die Kultur geerntet und das Pellet bis zur anschließenden Ultraschallbehandlung eingefroren.

Das eingefrorene Pellet wurde in 6 mL vorgekühltem Lysispuffer aufgetaut und resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall (Sonifier cell disruptor B15, Branson, Dietzenbach; Pausenzeitintervall von 50 %, 1 min/mL) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (13.000 g, 30 min, 4 °C) wurden die Zelltrümmer und unlöslichen Proteine abgetrennt und der Überstand (Lysat) für eine Aufreinigung mittels Nickelchelataffinitätschromatographie eingesetzt. Dafür wurde das Lysat mit 0,5-1 mL Ni-NTA-Agarose (Ni-NTA His-Bind® Superflow™, Novagen, Madison, USA) versetzt, für 1 h bei 4 °C geschüttelt und in eine Polypropylen-Durchflusssäule mit Fritte (Qiagen, Hilden) überführt. Zur Entfernung von unerwünschten Proteinen wurde die Matrix mit 10 mL Lysispuffer und anschließend mit jeweils 10 mL Waschpuffer (20 und 50 mM Imidazol) gewaschen. Die einzelnen Fraktionen wurden für eine Analyse mittels SDS-

PAGE aufgefangen. Die Elution von EctDHis erfolgte mit 500 μL Elutionspuffer (250 mM Imidazol). Zur Beseitigung der hohen Imidazolkonzentration wurde ein Pufferwechsel mit Hilfe von Microcons (YM-10, Millipore, Bedford, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. EctDHis wurde anschließend in 200 μL Aktivitätspuffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

15.4. Proteinquantifizierung mittels BCA

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte mit dem BCA-Assay-Protein-Kit der Firma Uptima (Montluçon, Frankreich). Diese von Smith *et al.* (1985) entwickelte Methode ist eine Kombination aus der Biuret-Reaktion und der Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure). Bestimmte Aminosäuren (wie Cystein, Tyrosin und Tryptophan) sowie die Peptidbindung können Cu^{2+} zu Cu^{+} reduzieren (Wiechermann *et al.*, 1988). Das reduzierte Cu^{+} wiederum bildet mit BCA einen violetten Farbkomplex, der einen empfindlichen, kolorimetrischen Nachweis von Proteinen ermöglicht. Da die Farbbildung proportional zur Proteinkonzentration ist, kann dieser Test für eine Quantifizierung von Proteinen herangezogen werden.

Die Bestimmung der Proteinproben erfolgte in Mikrotiterplatten. Zur Kalibrierung der Messung wurden BSA-Lösungen mit definierten Konzentrationen (50-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mitgemessen. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die Gesamtzellproteinproben 1:50 bzw. 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ verdünnt wurden. Die Absorption der Proben wurde in einem Plattenlesegerät (infinite M200 Nano Quant oder Sunrise, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Anhand der aus den Proteinstandards berechneten Eichgerade wurden anschließend die Proteinkonzentrationen in den analysierten Proben berechnet.

15.5. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der größenabhängigen Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld. Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamidmolekülen, die durch Einsatz des Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS) eine Polymerisation zu langen Ketten durchführen. Als Quervernetzer der Acrylamid-Ketten dient N,N'-Methylen-Bisacrylamid, wobei die Vernetzung über die Methylengruppen verläuft. Als Katalysator dieser gesamten Reaktion dient TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin). Um die Einflüsse der Eigenladung und der

Tertiärstruktur von Proteinen auf das Wanderungsverhalten im Polyacrylamidgel zu verringern, werden denaturierende (Sodiumdodecylsulfat, SDS) und reduzierende Verbindungen (Dithiothreitol, DTT) zugesetzt (Laemmli, 1970). Die diskontinuierliche SDS-PAGE, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, dient der starken Fokussierung der Proteinbanden. Die Proben werden dabei zunächst in einem Sammelgel (pH 6,8) fokussiert und anschließend in einem höher konzentrierten Trenngel (pH 8,8) gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Die Zusammensetzung der Gele erfolgte wie in Tab. 11 beschrieben. Das Trenngel wurde bis zur vollständigen Polymerisation mit 70 %igem Ethanol überschichtet. Die SDS-PAGE erfolgte in Kammern der Firma BioRad (Hercules, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers.

Tab. 11 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen

Trenngel (T = 13 %)		Sammelgel (T = 4 %)	
Trenngelpuffer	2,5 mL	Sammelgelpuffer	1,25 mL
Acrylamid-Mix	6,5 mL	Acrylamid-Mix	1,0 mL
SDS (10 %)	0,1 mL	SDS (10 %)	0,05 mL
H ₂ O _{reinst}	0,9 mL	H ₂ O _{reinst}	2,7 mL
für die Polymerisation			
APS (10 %) 50 µL			
TEMED 5 µL			

Die Proteinkonzentration der Gesamtzellproteinproben wurde zunächst mittels BCA-Test (Abschnitt II. 15.4) bestimmt und das Volumen so gewählt, dass 20 µg Protein auf das Gel aufgetragen wurden. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proteinproben mit einem Volumen reduzierendem und denaturierendem Probenpuffer (4 x RSB) versetzt und für 5-10 min bei 70-100 °C erhitzt. Die einzelnen Fraktionen der Proteinaufreinigungen von EctDHis (Abschnitt II. 15.3) wurden ohne vorherige Quantifizierung eingesetzt.

Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 60 V (Electrophoresis Power Supply PS 3002, Gibco BRL, Maryland, USA), die Auftrennung im Trenngel wurde bei 100 V durchgeführt.

Zum Nachweis der Proteine auf dem Gel wurde das Gel für 60 min in Coomassie-Färbelösung (Page BlueTM Protein Staining Solution, Fermentas, St. Leon-Rot) unter

leichtem Schütteln (IKA Vibrax, VWR, Staufen) inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel dann durch mehrere Waschschrirte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ über Nacht behandelt.

Zur Aufbewahrung und Dokumentation wurden die Gele auf Whatman-Papier mit Hilfe eines Vakuumtrockners (Gel Dryer MGD-4534, VWR, Staufen) bei 80 °C für mindestens 2 h getrocknet.

15.6. *In vitro* Tests zur Untersuchung der Aktivität von EctDHis

Zur Bestimmung der Ectoinhydroxylase-Aktivität im Zellextrakt von *E. coli* BL21 pETectDHis oder mit dem aufgereinigtem Enzym EctDHis wurden folgende Komponenten zusammen gegeben:

Tab. 12 Zusammensetzung eines EctD-Aktivitätstests

Komponenten	Menge
Substrat Ectoin	10 mM
Kofaktor α -Ketoglutarat	10 mM
FeSO_4	1 mM
Tris-HCl Puffer	0,1 M, pH 7,5

Je 30 μL dieses Ansatzes wurden mit 10 μL aufgereinigtem EctDHis oder Zellysate versetzt und bei geöffnetem Reaktionsgefäß 30 min bei 30 °C in einem Thermomixer bei 700 rpm geschüttelt, um den Ansatz mit O_2 zu versorgen. Die Hydroxylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 30 μL Acetonitril (100 %, v/v) und anschließender Zentrifugation bei 10.000 g für 10 min gestoppt. Der Überstand wurde anschließend mittels HPLC auf Hydroxyectoin hin analysiert (Abschnitt II. 7.3.2).

16. Verwendete Chemikalien

Nährböden/Nährbödenzusätze	Reinheitsgrad	Firma
Antibiotic broth medium No. 3		Oxoid LTD (Hampshire, England)
Caseinhydrolysat (Trypton)		Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt		Roth (Karlsruhe)
Saccharose	$\geq 99,5 \%$	Roth (Karlsruhe)
Select Agar		Gibco BRL (Paisly, Schottland)
Medien/Medienzusätze		
Anhydrotetracyclin (AHT)		IBA (Göttingen)
Biotin	99 %	Sigma (Deisenhofen)

Ca-DL- Pantothenat (Vitamin B ₅)	≥ 98 %	Sigma (Deisenhofen)
Carbenicillin (Carb)	≥ 90 %	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol (Cm)	≥ 98 %	Roth (Karlsruhe)
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	≥ 97 %	Merck (Darmstadt)
D-Glucose x H ₂ O	≥ 99 %	Merck (Darmstadt)
Glutamat (Natrium-L-glutamat-Monohydrat)	98 %	Sigma (Deisenhofen)
Glycerin	≥ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	≥ 99 %	Fermentas (St. Leon-Rot)
Kanamycinsulfat (Km)	≥ 99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Nicotinsäureamid	≥ 99,5 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
p-Aminobenzoessäure (Vitamin H ₁)	≥ 99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Pyridoxalchlorid (Vitamin B ₆)	≥ 99,5 %	Merck (Darmstadt)
Thiamin x HCl (Vitamin B ₁)	> 99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galaktopyranosid (X-Gal)	≥ 99 %	Fermentas (St. Leon-Rot)
α-Ketoglutarat	≥ 99 %	Roth (Karlsruhe)

Solute

Ectoin	≥ 96 %	bitop AG (Witten)
Hydroxyectoin	≥ 95 %	bitop AG (Witten)
L-Prolin	≥ 99,5 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
DHMICA	> 97 %	Synthese (Voß, 1998)
Guanidino-Ectoin		eigene Synthese
Trehalose x 2 H ₂ O	≥ 99 %	Sigma (Deisenhofen)

Salze

(NH ₄) ₂ SO ₄	≥ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	≥ 99,5 %	Merck (Darmstadt)
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	≥ 99 %	Roth (Karlsruhe)
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	≥ 99 %	Merck (Darmstadt)
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	≥ 99,5 %	Merck (Darmstadt)
H ₃ BO ₃	≥ 99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
HCl	37 %	Roth (Karlsruhe)
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	≥ 99 %	Merck (Darmstadt)
KCl	≥ 99,5 %	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	≥ 99 %	Roth (Karlsruhe)
KOH	≥ 85 %	Roth (Karlsruhe)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	≥ 98 %	Merck (Darmstadt)
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	≥ 99,5 %	Merck (Darmstadt)
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	≥ 99 %	Merck (Darmstadt)
MnSO ₄ x H ₂ O	≥ 99 %	Merck (Darmstadt)
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	≥ 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
NaCl	≥ 99,5 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
NaH ₂ PO ₄	≥ 99 %	Merck (Darmstadt)
NaOH	≥ 99 %	Merck (Darmstadt)
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	≥ 98 %	Roth (Karlsruhe)
Tritriplex III (Na-EDTA)	≥ 99 %	Merck (Darmstadt)
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	≥ 99,5 %	Fluka (Buchs, Schweiz)

Pufferzusätze

Bromphenolblau	ACS	Merck (Darmstadt)
Eisessig	≥ 99,8 %	Merck (Darmstadt)
Imidazol	99 %	Sigma (Deisenhofen)
Kaliumacetat	≥ 99 %	Sigma (Deisenhofen)
Na-Acetat x 3 H ₂ O	≥ 99,5 %	Sigma (Deisenhofen)
PIPES	≥ 99 %	Roth (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	≥ 99 %	Serva (Heidelberg)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	≥ 99,9 %	Roth (Karlsruhe)

Lösungsmittel

Aceton	≥ 99,8 %	Merck (Darmstadt)
Acetonitril	≥ 99,9 %	Merck (Darmstadt)
Chloroform	≥ 99,8 %	Merck (Darmstadt)
Ethanol	≥ 99,8 %	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	≥ 99,95 %	Merck (Darmstadt)
Methanol	100 %	Roth (Karlsruhe)
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	≥ 99,9 %	Merck (Darmstadt)
Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol		Roth (Karlsruhe)

Chemikalien für die Analytik

1-Aminoadamantan (ADAM)	≥ 99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC)	97 %	Sigma-Aldrich (München)
Deuteriumoxid (D ₂ O)	≥ 99,9 %	Merck (Darmstadt)
L-2,4-Diaminobuttersäure x 2 HCl	≥ 97 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Na-Trimethylsilylpropansulfonsäure (Na-TMSP)	≥ 98 %	Merck (Darmstadt)
Norvalin	≥ 99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
O-Methylisoharnstoff Hydrogensulfat	99 %	Sigma-Aldrich (München)
Tetrahydrofuran (THF)	≥ 99,9 %	Merck (Darmstadt)

Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten

1 kb Plus DNA Ladder #SM0321		Fermentas (St. Leon-Rot)
100 bp Plus DNA Ladder #SM0311		Fermentas (St. Leon-Rot)
Agarose GTQ (gentechnische Qualität)		Roth (Karlsruhe)
Betain	> 98 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
DMSO	≥ 99,9 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
dNTP-Mix (2 mM)		Fermentas (St. Leon-Rot)
Ethidiumbromid		Fluka (Buchs, Schweiz)
GelRed		Biotium, Hayward, Kalifornien
PEG 4000		Fermentas (St. Leon-Rot)

Chemikalien für Proteinbiochemie

Acrylamid	40 %ige Lösung	Merck (Darmstadt)
-----------	----------------	-------------------

Ammoniumpersulfat (APS)	100 %	BioRad (Hercules, USA)
Bisacrylamid	2 %ige Lösung	Merck (Darmstadt)
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)		Uptima (Montluçon, Frankreich)
Dithiothreitol (DTT)	> 99 %	Sigma (Deisenhofen)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	99 %	Roth (Karlsruhe)
Ni-NTA His-Bind Superflow		Qiagen (Hilden)
Page Blue™ Protein Staining Solution		Fermentas (St. Leon-Rot)
Prestained™ Protein Marker #SM0671		Fermentas (St. Leon-Rot)
Tris/Glycin/SDS Puffer (10x)		BioRad (Hercules, USA)

Enzyme

<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i> (CIAP)		Fermentas (St. Leon-Rot)
DNase		Fermentas (St. Leon-Rot)
Lysozym		Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Phusion</i> ® High-Fidelity DNA-Polymerase		Finnzymes (Espoo, Finnland)
Restriktionsendonukleasen		Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A		Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase		Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Taq</i> -DNA Polymerase		Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Thermosensitive alkaline phosphatase</i> (FastAP)		Fermentas (St. Leon-Rot)

Kits

BCA-Assay Protein Quantification Kit		Uptima (Montluçon, Frankreich)
E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit		Omega bio-tek (Norcross, USA)
PeqGOLD Gel Extraction Kit		Peqlab (Erlangen)

III. Ergebnisse

Kompatible Solute, vor allem Ectoin und Hydroxyectoin, sind in den letzten Jahren immer mehr ins Interesse der Industrie gerückt, welche diese Substanzen aufgrund ihrer vielfältigen protektiven Eigenschaften (Abschnitt 1.8) produzieren und vermarkten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Hydroxylierung von Ectoin und Derivaten mit Hilfe der Ectoinhydroxylase EctD aus *Halomonas elongata*. Die Arbeit gliedert sich in drei Hauptteile. Zum einen wurden Versuche an dem moderat halophilen Organismus *H. elongata* durchgeführt. Mittels physiologischer und gentechnischer Methoden sollte die Hydroxyectoin-Produktion untersucht und optimiert werden. Bislang wird zur Produktion von Hydroxyectoin in industriellem Maßstab *H. elongata* DSM2581^T eingesetzt. Mit diesem Stamm wird ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 erzielt, was chromatographische Aufreinigungsmethoden nach sich zieht und somit kosten- bzw. zeitintensiv ist. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Konstruktion und Optimierung eines bakteriellen Produktionsstammes für das kompatible Solut Hydroxyectoin. Nach Einsatz geeigneter Kultivierungsverfahren sollte ein Stamm entstehen, der bestenfalls ausschließlich Hydroxyectoin synthetisiert und in Zukunft industriell eingesetzt werden könnte.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich überwiegend mit Untersuchungen an *Escherichia coli*. Durch Etablierung eines heterologen Ganzzellbiokatalyse-Systems sollten Hydroxyectoin sowie neue hydroxylierte Verbindungen synthetisiert werden und die Umsatzrate mit der von *H. elongata* verglichen werden, um zu überprüfen, welcher Stamm ein geeigneterer Produzent ist. Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen – basierend auf den Ergebnissen von Bestvater *et al.* (2008) – an der heterologen Expression von Ectoin bzw. Hydroxyectoin in *E. coli* durchgeführt. Im Gegensatz zum Ganzzellbiokatalyse-System, bei dem die zu hydroxylierenden Substrate der Zelle von außen angeboten werden müssen, kann *E. coli* aufgrund der Expression der Ectoin-Gene *ectA-C* aus *Marinococcus halophilus* das Ausgangssubstrat eigenständig synthetisieren. Durch Koexpression des Ectoinhydroxylase-Gens *ectD* sollte anschließend eine Hydroxyectoin-Akkumulation erfolgen.

Ergebnisse (Teil I: Hydroxyectoin-Produktion in *Halomonas elongata*)

1. Austausch des *ectB*-Gens durch das *ectD*-Gen zur Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion in der Δ *ectD*-Mutante MaKu03 und im Wt

1.1. Konstruktion von *H. elongata* MaKu03 Δ *ectB::ectD* und *H. elongata* Δ *ectB::ectD*

H. elongata DSM 2581^T produziert unter Salzstress als Hauptsolut Ectoin. Bei einer Salinität von 15 % NaCl und einer Temperatur von 20 °C liegt ausschließlich Ectoin als osmoregulatorisches Solut in den Zellen vor. Erst mit steigender Temperatur steigt auch die Hydroxyectoin-Produktion (Wolfarth *et al.*, 1990; Ures, 2005). Zur industriellen Gewinnung von Hydroxyectoin nutzt die Firma bitop AG eine Salinität von 11 % NaCl und eine Anzuchttemperatur von 43 °C, wobei ca. 50 % des gebildeten Ectoins in Hydroxyectoin umgewandelt wird (bitop AG, persönliche Mitteilung). Die nachfolgende Trennung von Ectoin und Hydroxyectoin mittels chromatographischer Methoden ist zeitaufwendig und kostspielig. Daher sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ein Produktionsstamm für Hydroxyectoin konstruiert werden, der bestenfalls nur Hydroxyectoin synthetisiert.

Basierend auf den Ergebnissen von Göller (1999), die zeigten, dass eine Deletion des *ectB*-Gens in *H. elongata* keine Auswirkungen auf die Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Synthese hat, wurde in einem ersten Schritt der offene Leserahmen des *ectD*-Gen gegen den offenen Leserahmen des *ectB*-Gens *in-frame* ausgetauscht. Somit sollte die Expression des *ectD*-Gens in gleicher Abhängigkeit wie die Ectoin-Biosynthesegene induziert und die Hydroxyectoin-Produktion, auch unter einfachen Bedingungen, verbessert werden.

Als Ausgangsstämme für die genomischen Insertionsmutanten dienten *H. elongata* MaKu03 (Δ *ectD*) und *H. elongata* Wt. Im Gegensatz zu *H. elongata* Wt ist MaKu03 aufgrund einer *ectD*-Deletion nicht mehr dazu in der Lage, Hydroxyectoin zu synthetisieren und diente als Negativkontrolle (Ures, 2005). Zur Herstellung der beiden Mutanten wurde zunächst das Plasmid pK18*mobSacB_ectD* konstruiert. Dazu wurden die stromauf- und stromabwärts Bereiche des *ectB*-Gens und das *ectD*-Gen in getrennten PCR-Reaktionen anhand genomischer DNA von *H. elongata* amplifiziert und anschließend mittels SOE-PCR fusioniert (Tab. 13, Abschnitt II. 9.3).

Tab. 13 Verwendete Primer und PCR-Produkte zur Konstruktion von pK18*mobSacB_ectD*

Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Primer sowie die amplifizierten PCR-Produkte und ihre Größe zur Herstellung des Vektors pK18*mobSacB_ectD*. Die Bereiche *up*, *ectD* und *down* wurden in drei getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert und anschließend mittels SOE-PCR fusioniert. Das komplette Fusionsprodukt B (*up-ectD-down*) wurde in den Vektor pK18*mobSacB* ligiert.

Primerpaare	amplifiziertes Produkt	Größe (bp)
ectDup_for und ectDup_rev	stromaufwärts Bereich von <i>ectB</i> bis zum Startkodon (<i>up</i>)	532
ectD_for und ectD_rev	<i>ectD</i> -Gen	1027
ectDdown_for und ectDdown_rev	stromabwärts Bereich von <i>ectB</i> (<i>down</i>)	506
ectDup_for und ectD_rev	Fusionsprodukt A (<i>up-ectD</i>)	1529
ectDup_for und ectDdown_rev	Fusionsprodukt B (<i>up-ectD-down</i>)	2007

Das SOE-PCR-Produkt *up-ectD-down* wurde anschließend über die Schnittstellen *PstI* und *HindIII* in den mit den gleichen Restriktionsenzymen hydrolysierten Vektor pK18*mobSacB* ligiert, so dass als finales Konstrukt pK18*mobSacB_ectD* resultierte, das für den genomischen Austausch des *ectB*-Gens durch das *ectD*-Gen diente. Dieser Vektor wurde durch Konjugation von *E. coli* S17-1 auf *H. elongata* MaKu03 sowie auf *H. elongata* Wt übertragen (Abschnitt II. 13). Alle weiteren Schritte zur homologen Rekombination bzw. zur Integration von *ectD* anstelle von *ectB* erfolgten wie in Abschnitt II. 14 beschrieben. Mit Hilfe der Kolonie-PCR und der Primer ectDup_for und ectR_rev konnten dann positive Insertionsmutanten (Δ *ectB::ectD*) vom Wildtyp bzw. der *H. elongata* MaKu03-Mutante unterschieden werden (Abb. 9).

Die beiden konstruierten Stämme zeigen also folgende genetische Eigenschaften: Bei beiden Mutanten liegt das *ectD*-Gen jetzt anstelle des *ectB*-Gens unter Kontrolle des osmoregulierbaren *ectA*-Promotors (P1-3, in Zukunft als *promA* bezeichnet) bzw. eines potentiellen *ectB*-Promotors vor (Calderon *et al.*, 2004; Witt, unveröffentlicht). Während *H. elongata* Δ *ectB::ectD* noch das *ectD*-Gen am natürlichen Standort im Genom unter Kontrolle des putativen stressinduzierbaren σ^S -abhängigen Promotors besitzt, fehlt *H. elongata* MaKu03 Δ *ectB::ectD* selbiges (Abb. 9). Die DNA-Sequenz der *ectADC*-Region von *H. elongata* MaKu03 Δ *ectB::ectD* und *H. elongata* Δ *ectB::ectD* ist im Anhang aufgeführt (Abb. 50).

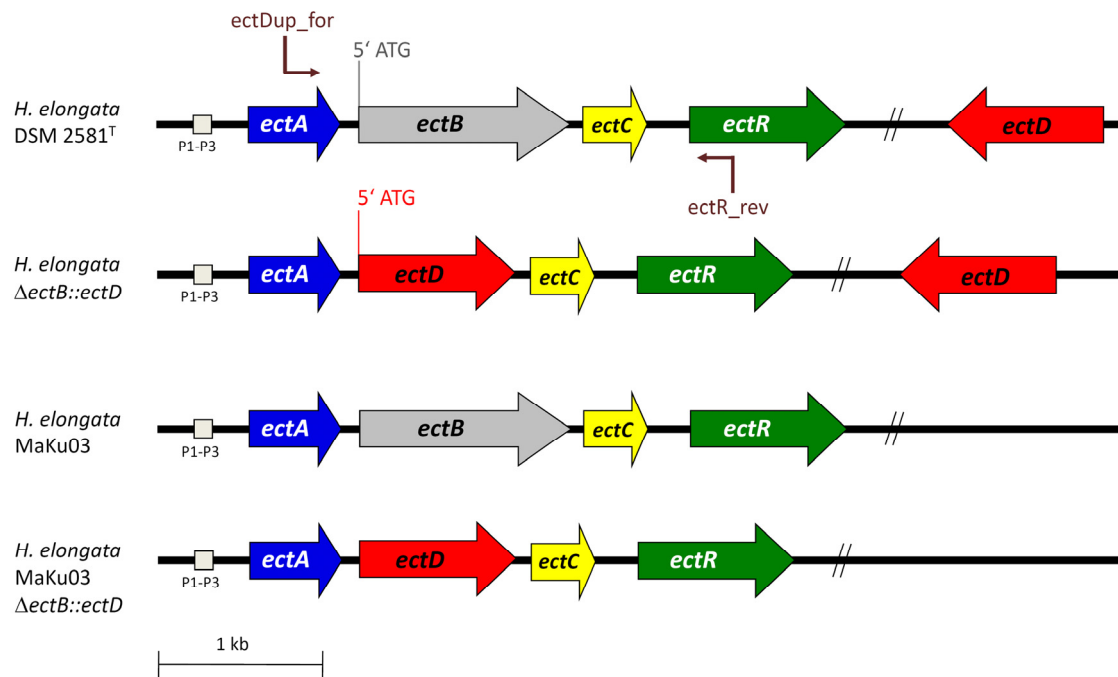


Abb. 9 Genetische Organisation der ursprünglichen und konstruierten *Halomonas*-Stämme

Dargestellt ist die genetische Organisation der Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Biosynthesegene von *H. elongata* Wt (DSM 2581^T) und MaKu03 (Δ ectD) sowie der beiden Austauschmutanten, bei denen *ectB* *in frame* gegen *ectD* ausgetauscht wurde (Δ ectB::ectD). Die eingezeichneten Gene kodieren für folgende Enzyme: **ectA**: Diaminobuttersäure-Acetyltransferase; **ectB**: Diaminobuttersäure-Transaminase; **ectC**: Ectoinsynthese; **ectR**: potentieller Transkriptionsregulator der Ectoinsynthese (AraC Familie) (Stumpfe, 2003; Schilz, 2005; Schwibbert *et al.*, 2010); **ectD**: Ectoinhydroxylase; **P1-P3**: potentielle Promotorelemente der Ectoin-Gene (σ^S , σ^{70} und „gearbox“) (nach Göller, 1999; Burdziak, 2006 und Schwibbert *et al.*, 2010). Mit den Primern ectDup_for und ectR_rev wurden mittels Kolonie-PCR positive Austauschmutanten identifiziert.

1.2. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion der Δ ectB::ectD-Mutanten

1.2.1. *H. elongata* MaKu03 Δ ectB::ectD im Vergleich zur *ectD*-Deletionsmutante

Zur ersten Untersuchung, ob durch den Austausch von *ectB* gegen *ectD* eine Expression des *ectD*-Gens erreicht wurde und die *ectD*-Deletionsmutante *H. elongata* MaKu03 wieder Hydroxyectoin synthetisierte, wurde der Stamm bei verschiedenen Salinitäten und Temperaturen in Minimalmedium angezogen und der Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt mit *H. elongata* MaKu03 verglichen.

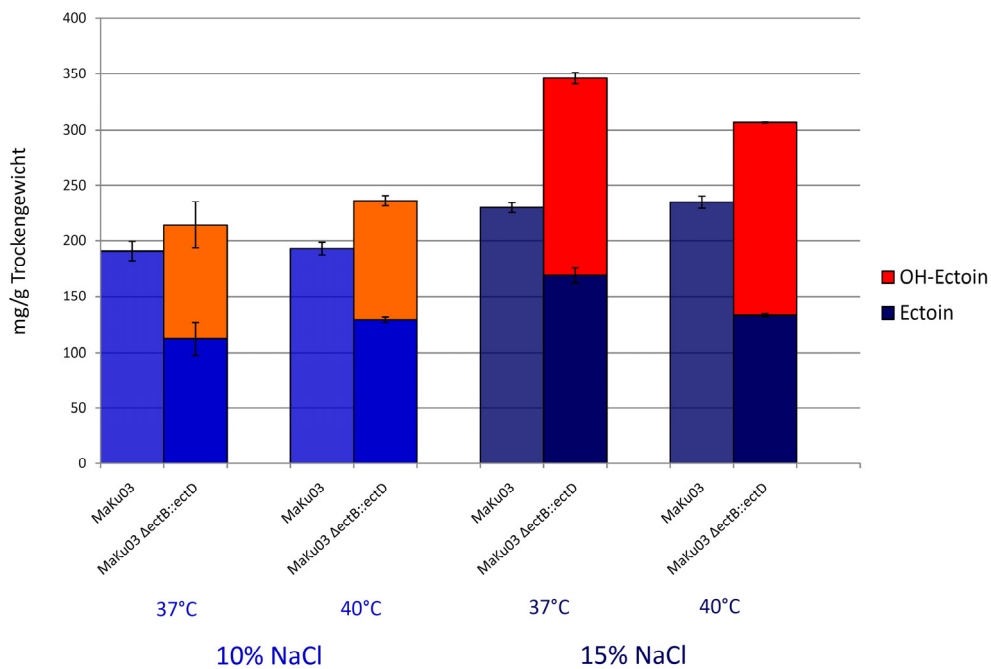


Abb. 10 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von *H. elongata* MaKu03 und *H. elongata* MaKu03 Δ ectB::ectD

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (■) und Hydroxyectoin (■) von *H. elongata* MaKu03 (transparentere Balken) und *H. elongata* MaKu03 Δ ectB::ectD (gefüllte Balken). Beide Stämme wurden in Doppelbestimmung in Minimalmedium bei verschiedenen Salinitäten (10 % und 15 % NaCl) und Temperaturen (37 °C und 40 °C) angezogen, in der stationären Phase geerntet und die Zellextrakte nach Gefriertrocknung des Pellets und Bligh und Dyer-Behandlung mittels HPLC analysiert.

Anhand Abb. 10 wurde deutlich, dass die konstruierte Mutante trotz Deletion von *ectB* noch Ectoin bzw. Hydroxyectoin synthetisierte. Während in den Zellextrakten von *H. elongata* MaKu03 nur Ectoin akkumuliert wurde, konnte in der Δ ectB::ectD-Austauschmutante wieder Hydroxyectoin detektiert werden. Bei Salinitäten von 10 % und 15 % NaCl und Temperaturen von 37 °C und 40 °C wurden ca. 50 % des zellulären Ectoins in Hydroxyectoin umgewandelt. Somit konnte durch alleinigen Austausch von *ectB* gegen *ectD* ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 in den Zellen erreicht werden, welches *H. elongata* Wt erst bei höheren Temperaturen als die hier verwendeten erlangt, wie im nächsten Abschnitt deutlich wird.

1.2.2. *H. elongata* Δ ectB::ectD im Vergleich zum Wt

Da der Austausch von *ectB* durch *ectD* zu einer Hydroxyectoin-Synthese führte, wurde im Folgenden mit *H. elongata* Δ ectB::ectD weitergearbeitet. Bei diesem Stamm ist das *ectD*-Gen zweifach im Genom, unter Kontrolle des σ^S -abhängigen *ectD*-Promotors und des osmoregulierbaren *ectA*- bzw. *ectB*-Promotors, vorhanden (Abb. 9). Im Hinblick auf

einen Hydroxyectoin-Produktionsstamm sollte dies gegenüber *H. elongata* MaKu03 $\Delta ectB::ectD$ von Vorteil sein. *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ wurde daher im Vergleich zu *H. elongata* Wt bei verschiedenen Salinitäten und Temperaturen in Minimalmedium angezogen, in der stationären Phase geerntet und die Blich und Dyer-Extrakte der Zellen mittels HPLC auf den Anteil an Ectoin und Hydroxyectoin analysiert.

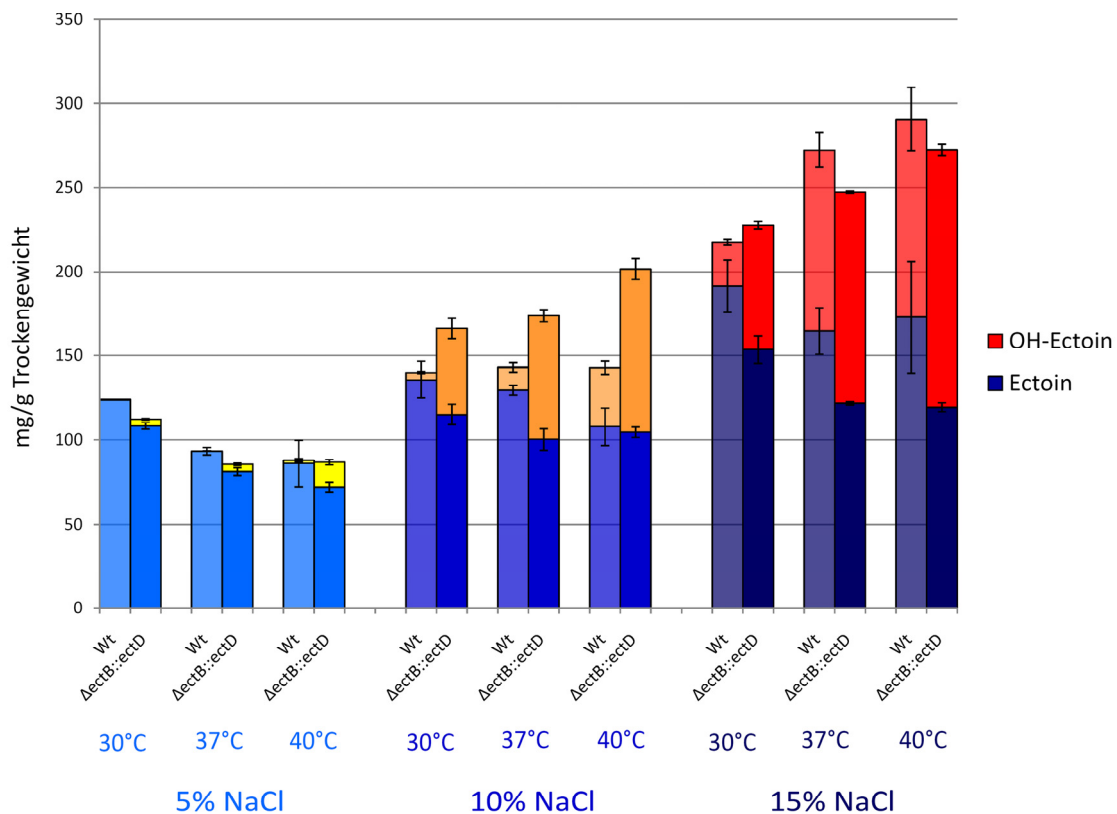


Abb. 11 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von *H. elongata* Wt und *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (■) und Hydroxyectoin (■) von *H. elongata* Wt (transparentere Balken) und *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ (gefüllte Balken). Beide Stämme wurden mindestens in Doppelbestimmung in Minimalmedium bei verschiedenen Salinitäten (5 %, 10 % und 15 % NaCl) und Temperaturen (30 °C, 37 °C und 40 °C) angezogen, in der stationären Phase geerntet und die Zellextrakte nach Gefriertrocknung des Pellets und Blich und Dyer-Behandlung mittels HPLC analysiert.

Nach HPLC-Untersuchungen der Zellextrakte wurde zunächst deutlich, dass der Gesamtsolutegehalt in den Zellen mit steigender Salinität zunahm. Beim Vergleich des Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalts konnte beobachtet werden, dass bei Anzucht in Minimalmedium bei einer Salinität von 5 % NaCl sowohl beim Wt als auch bei der $\Delta ectB::ectD$ -Mutante hauptsächlich Ectoin in den Zellen vorlag (ca. 100 mg/g TG). Die Austauschmutante akkumulierte aber bereits etwas mehr Hydroxyectoin in den Zellen als der Wt bei entsprechender Anzucht. Mit steigender Salinität und Temperatur stieg

der Hydroxyectoin-Gehalt in den Zellen, sowohl beim Wt, wie bei 15 % NaCl und 37 °C bzw. 40 °C deutlich wurde, als auch bei der $\Delta ectB::ectD$ -Mutante. Unter diesen Kultivierungsbedingungen wurde im Wt ein Hydroxyectoin-Anteil von ca. 40 %, bei der $\Delta ectB::ectD$ -Mutante über 50 % am Gesamtsolutegehalt detektiert. Bei einer Salinität von 10 % NaCl war der Unterschied zwischen Wt und $\Delta ectB::ectD$ -Mutante am deutlichsten. Während bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C der Anteil an Hydroxyectoin im Wt bei nur 10 % lag, wurden in der $\Delta ectB::ectD$ -Insertionsmutante bereits über 40 % akkumuliert. Im Vergleich zu *H. elongata* MaKu03 $\Delta ectB::ectD$ konnten keine signifikanten Unterschiede im Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis beobachtet werden (Abb. 10). Durch den Austausch von *ectD* gegen *ectB* konnte die Hydroxylierung im Vergleich zum Wt gesteigert werden. Ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von annähernd 1:1, das beim Wt erst bei hohen Salinitäten und Temperaturen erreicht wird, konnte mit der Mutante bereits bei niedrigeren Salzkonzentrationen und Temperaturen erzielt werden.

1.2.3. Fermentation von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ zur Überprüfung der Hydroxyectoin-Produktion in Abhängigkeit der Wachstumsphase

Um die Hydroxyectoin-Produktion von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ in Abhängigkeit von der Wachstumsphase zu untersuchen, wurde eine Fermentation im 4 L-Maßstab durchgeführt. Der Stamm wurde in Minimalmedium bei 10 % NaCl und 37 °C angezogen, da unter diesen Bedingungen ein großer Unterschied in der Hydroxyectoin-Synthese zwischen der Mutante und dem Wt zu beobachten war (Abb. 11). Während der Fermentation wurde der Wachstumsverlauf durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm manuell in einer Küvette überprüft und regelmäßig Proben von 50 bis 100 mL entnommen, deren Blich und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC auf Ectoin und Hydroxyectoin hin untersucht wurden.

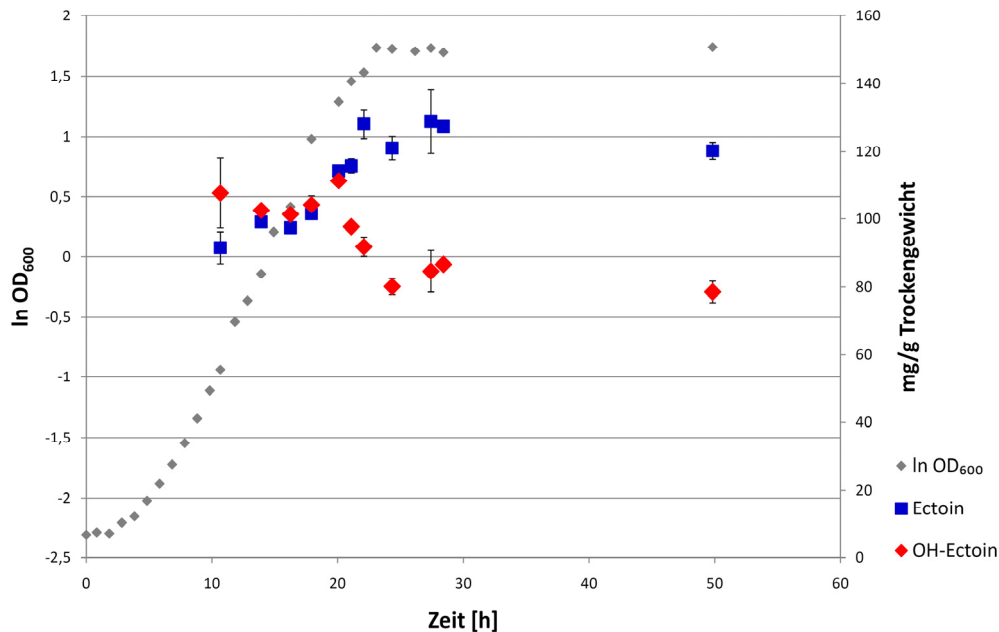


Abb. 12 Fermentation von *H. elongata* Δ *ectB::ectD* in MM63-10

Dargestellt ist der Fermentationsverlauf von *H. elongata* Δ *ectB::ectD* bei Anzucht in MM63-10 bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm in einem Photometer bestimmt (grau: $\ln OD_{600}$). Zur Bestimmung des Ectoin- (blau) und Hydroxyectoin-Gehalts (rot) in den Zellen (in mg/g TG) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, die mit Hilfe der HPLC analysiert wurden. Die Wachstumsrate betrug $\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$.

Wie in Abb. 12 dargestellt, zeigte sich, dass *H. elongata* Δ *ectB::ectD* nach einer kurzen lag-Phase in exponentielles Wachstum und nach 23 h in die stationäre Phase überging. Es wurde eine End- OD_{600} von ca. 5,7 ($\ln OD_{600}$: 1,7) erreicht. Während der exponentiellen Phase war das Verhältnis von Ectoin und Hydroxyectoin in den Zellen etwa gleich mit jeweils 100 mg/g TG. Beim Übergang in die stationäre Phase sank der Hydroxyectoin-Gehalt auf einen Wert von 80 mg/g TG ab, während Ectoin auf einen Wert von 120 mg/g TG stieg. Das Verhältnis von Ectoin/Hydroxyectoin am Ende der Fermentation war somit vergleichbar mit dem in Abb.11 dargestellten Schüttelkolbenversuch unter gleichen Anzuchtbedingungen. Da sich das Verhältnis beim Übergang in die stationäre Phase zugunsten von Ectoin verschob, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die unvollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin auf einem verminderten intrazellulären EctD-Gehalt beruht.

1.2.4. Untersuchung des Gesamtzellproteins von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ im Vergleich zum Wt

Das Gesamtzellprotein von *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ wurde in verschiedenen Wachstumsphasen isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 13).

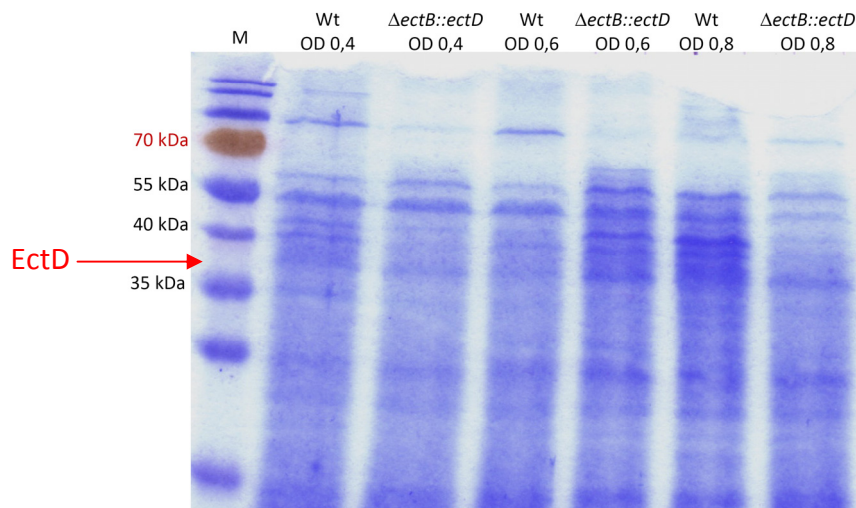


Abb. 13 SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung von *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$

Durch SDS-PAGE wurde das Gesamtzellprotein von *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ in verschiedenen Wachstumsphasen aufgetrennt. Die Stämme wurden in MM63-10 bei 37 °C angezogen, je 10 mL-Proben in verschiedenen Stadien des Wachstums geerntet und nach der Gesamtproteinaufreinigung und Quantifizierung mittels BCA-Test 20 µg Protein nebeneinander auf einem 13 %igen SDS-Gel aufgetrennt.

Eine schwache Bande bei ca. 37 kDa, die EctD mit einem Molekulargewicht von 37,4 kDa entsprach, konnte detektiert werden. Ein Unterschied in der Stärke der Expression zwischen *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ war jedoch nicht zu erkennen. In einem nächsten Schritt sollte der intrazelluläre EctD-Gehalt durch plasmidvermittelte Expression des *ectD*-Gens verstärkt und so die Hydroxyectoin-Produktion erhöht werden.

2. Erhöhung des EctD-Gehalts in *H. elongata* durch pPromEct_ectD

Zur Umgehung des Problems eines zu geringen EctD-Gehalts wurde in einem nächsten Schritt *ectD* zusätzlich plasmidkodiert in *H. elongata* Wt gebracht. Anlehnend an die Arbeiten von Prabhu *et al.* (2004) sollte somit eine höhere Kopienzahl von *ectD* in der Zelle vorhanden sein, was gleichzeitig in einer verstärkten Hydroxyectoin-Produktion resultieren sollte. Prabhu *et al.* schalteten das Ectoinhydroxylase-Gen *thpD* aus dem Gram-positiven Organismus *Streptomyces chrysomallus* auf einem selbstreplizierenden

Plasmid für *Chromohalobacter salexigens*, welches eine Fusion aus dem pUC-Derivat pSP72 und dem kryptischen Plasmid pHE1 darstellte, hinter den *ectA*-Promotor aus *H. elongata* DSM 3043 (heute *C. salexigens*). Nach Transfer dieses Konstrukts in *C. salexigens* wurde bei einer Salinität von 10 % NaCl und 37 °C und einem anschließenden hypoosmotischen Schock ausschließlich Hydroxyectoin im Überstand detektiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Ausgangsvektor ein Derivat des pBBR-MCS1-Vektors, pPromEct, verwendet (Brünig, 2005), da in vorangegangenen Arbeiten mit Hilfe dieses Plasmids bereits zahlreiche Gene erfolgreich in *H. elongata* exprimiert werden konnten (Burdziak, 2006; Meffert, 2007; Lange, 2009). Der Vektor pPromEct enthält neben der Promotorregion der Ectoin-Gene aus *H. elongata* (*promA*, ca. 480 bp), welche in die multiple Klonierungsstelle von pBBR-MCS1 eingefügt wurde, im Bereich des Startkodons des *ectA*-Gens eine *Bsp*LU11I-Schnittstelle zu Klonierungszwecken (Abb. 14; Brünig, 2005).

2.1. Konstruktion des Plasmids pPromEct_ectD

Für die plasmidvermittelte Expression des *ectD*-Gens in *H. elongata* wurde der Vektor pPromEct_ectD konstruiert, bei dem das *ectD*-Gen hinter den salzinduzierbaren Promotor der Ectoin-Gene (*promA*) aus *H. elongata* kloniert wurde. Dazu wurde das *ectD*-Gen mit Hilfe der Primer *ectDProm_for2* und *ectDProm_rev2* amplifiziert und mit *Nco*I und *Hind*III hydrolysiert. Anschließend wurde es in den mit *Bsp*LU11I und *Hind*III hydrolysierten und dephosphorylierten Vektor pPromEct ligiert (Abb. 14).

Das fertige Konstrukt wurde durch Konjugation von *E. coli* S17-1 auf *H. elongata* Wt übertragen, so dass der Stamm *H. elongata* pPromEct_ectD (im Folgenden als *H. elongata* Wt⁺ bezeichnet) entstand.

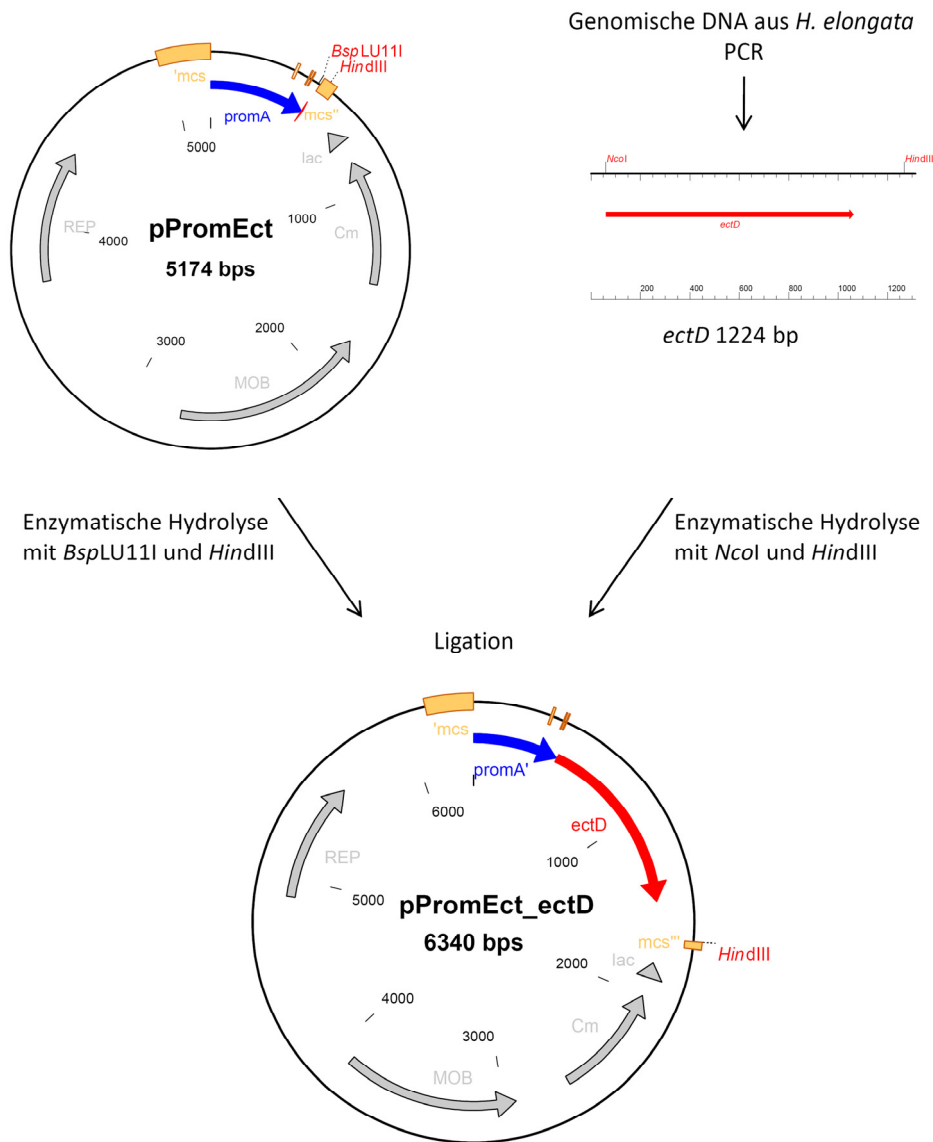


Abb. 14 Klonierungsstrategie zur Konstruktion von pPromEct_ectD

Dargestellt ist das Klonierungsschema zur Herstellung des Vektors pPromEct_ectD. Abgebildet ist das Ausgangsplasmid pPromEct mit integriertem *ectA*-Promotorbereich (*promA*) aus *H. elongata* und das *ectD*-Gen aus *H. elongata*. Letzteres wurde per PCR mit den Primern *ectDProm_for2* und *ectDProm_rev2* amplifiziert und mit *NcoI* und *HindIII* hydrolysiert. *NcoI* bildet nach einem Restriktionsverdau kompatible Enden zu *BspLU11I*. Somit konnte *ectD* über die Schnittstellen in den mit *BspLU11I* und *HindIII* hydrolysierten und dephosphorylierten Vektor pPromEct ligiert werden. Als Vektorkonstrukt entstand pPromEct_ectD mit einer Größe von 6340 bp.

2.2. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion in *H. elongata* Wt⁺ (pPromEct_ectD)

Zur Überprüfung des Hydroxyectoin-Gehaltes in den Zellextrakten von *H. elongata* Wt⁺ wurde dieser Stamm in Minimalmedium bei verschiedenen Salinitäten und

Temperaturen angezogen, in der stationären Phase geerntet und die Hydroxyectoin-Produktion mit *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ verglichen.

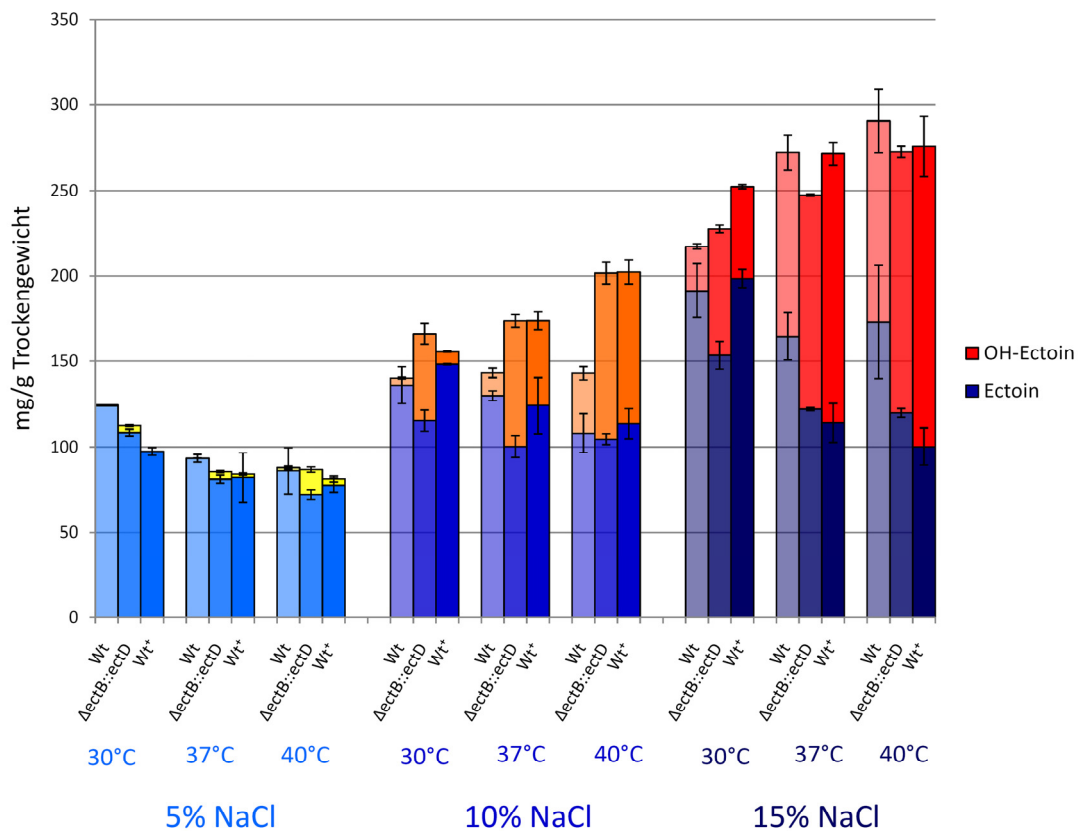


Abb. 15 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von *H. elongata* Wt⁺ im Vergleich zu Wt und $\Delta ectB::ectD$

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (■) und Hydroxyectoin (■) von *H. elongata* Wt⁺ (gefüllte Balken) im Vergleich zu *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ (transparentere Balken, vgl. Abb. 11). *H. elongata* Wt⁺ wurde in Doppelbestimmung in Minimalmedium (+ Cm) bei verschiedenen Salinitäten (5 %, 10 % und 15 % NaCl) und Temperaturen (30 °C, 37 °C und 40 °C) angezogen, in der stationären Phase geerntet und die Zellextrakte nach Gefrierdrying des Pellets und Bligh und Dyer-Behandlung mittels HPLC analysiert.

Anhand der in Abb. 15 dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass durch Einbringen von pPromEct_ectD die Hydroxyectoin-Produktion im Vergleich zu *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ nicht gesteigert werden konnte. Bei Anzucht in 5 %igem Medium und Temperaturen von 30 °C, 37 °C und 40 °C lag fast ausschließlich Ectoin in den Zellen von *H. elongata* Wt⁺ vor. Somit unterschieden sich Wt und Wt⁺ kaum voneinander. Mit steigender Salinität und Temperatur stieg auch der Hydroxyectoin-Gehalt in den Zellen von Wt⁺ an. Bei einer Salinität von 15 % NaCl und Anzucht bei 40 °C wurden in den Zellen über 60 % Hydroxyectoin akkumuliert. Mit Ausnahme der Anzucht bei 10 % bzw. 15 % NaCl und 30 °C ähnelte die Hydroxyectoin-Produktion der von *H. elongata*

$\Delta ectB::ectD$. Somit konnte durch zusätzliche plasmidvermittelte Expression des *ectD*-Gens der Hydroxyectoin-Gehalt im Vergleich zum Wt zwar gesteigert werden, eine Verbesserung gegenüber der genomischen Austauschmutante *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ war allerdings nicht signifikant.

2.3. Komplementierung von *H. elongata* MaKu03

Um die Funktionalität des Vektors pPromEct_ectD näher zu überprüfen, wurde in einem nächsten Schritt die *ectD*-Deletionsmutante *H. elongata* MaKu03 mit dem Konstrukt komplementiert. Nach Konjugation von pPromEct_ectD in *H. elongata* MaKu03 wurde der Stamm (*H. elongata* MaKu03⁺) bei 10 % NaCl und 37 °C in Minimalmedium angezogen und in der stationären Phase geerntet. Als Negativkontrolle diente der Stamm *H. elongata* MaKu03, der mit dem Plasmid pPromEct konjugiert wurde (*H. elongata* MaKu03⁻).

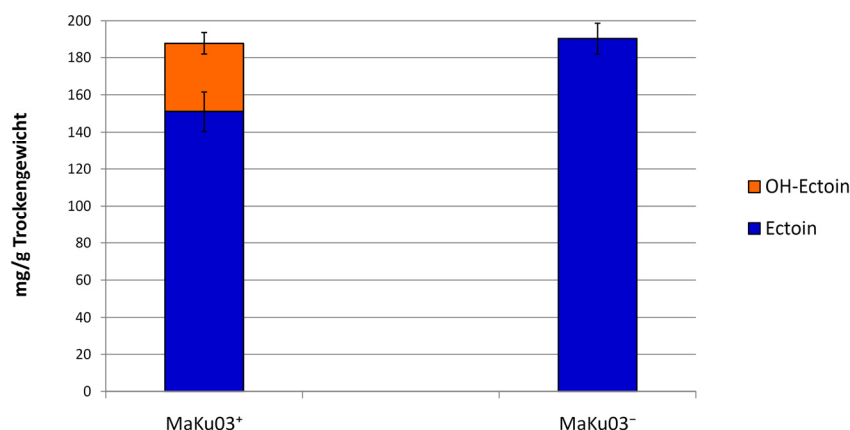


Abb. 16 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von *H. elongata* MaKu03⁺ und MaKu03⁻

Dargestellt ist der Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von *H. elongata* MaKu03⁺ (pPromEct_ectD) und MaKu03⁻ (pPromEct als Negativkontrolle). Beide Stämme wurden in Doppelbestimmung in MM63-10/50Cm bei 37 °C angezogen und die Kulturen in der stationären Phase geerntet. Der zelluläre Gehalt an Ectoin und Hydroxyectoin (in mg/g TG) wurde mittels HPLC bestimmt.

Anhand Abb. 16 lässt sich zeigen, dass die Negativkontrolle *H. elongata* MaKu03⁻ (pPromEct) ca. 190 mg Ectoin/g TG als Antwort auf den Salzstress akkumulierte. *H. elongata* MaKu03⁺ wandelte davon durch Einbringen von pPromEct_ectD in ca. 40 mg Hydroxyectoin/g TG um. Dieser Versuch zeigte also, dass die *ectD*-Deletionsmutante mit pPromEct_ectD komplementiert werden konnte. Allerdings wurden nur ca. 1/5 an Ectoin hydroxyliert. Dies lässt vermuten, dass es sich bei *promA*

um einen relativ schwachen Promotor handelt und nur wenig *ectD*-Genprodukt in den Zellen vorhanden ist. Diese Thematik wird im folgenden Abschnitt weiter behandelt.

3. *H. elongata* und die Promotorregion *promKB1*

Wie in Abschnitt III. 2 beschrieben, handelt es sich bei *promA* um einen vermutlich schwachen Promotor, so dass trotz plasmidvermittelter Expression nur wenig EctD-Produkt in den Zellen vorhanden ist. Für eine verstärkte Hydroxyectoin-Produktion ist das Plasmid pPromEct_ectD daher nur bedingt geeignet.

Witt (unveröffentlicht) zeigte, dass in der von Gramman (2000) erzeugten genomischen Mutante *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$) durch Deletion des *ectA*-Gens eine Veränderung der Promotorregion vor dem *ectB*-Gen auftrat, die zu einer verstärkten Expression des Gens *ectC* führte. Nach Analyse der Promotorregion stellte sich heraus, dass es sich um den *ectA*-Promotor *promA* handelte, hinter den durch die Deletion von *ectA* die zu *ectB* gehörige Ribosomenbindestelle (RBS) gerückt ist. Da *H. elongata* KB1 verstärkt *ectC* exprimiert, tauschte Witt (unveröffentlicht) die *promA*-Promotorregion im Plasmid pPromEct gegen diesen optimierten Promotorbereich (im Folgenden zur Vereinfachung als *promKB1* zusammengefasst) aus, was in der Konstruktion des Plasmids pWUB resultierte. Nach anschließender Klonierung des *ectD*-Gens hinter *promKB1* und Konjugation von pWUB_ectD_Hel in *H. elongata* Wt konnte der zelluläre Solutegehalt stark zugunsten von Hydroxyectoin verschoben werden, was Witt auf einen erhöhten EctD-Gehalt in den Zellen aufgrund transkriptioneller sowie translationaler Effekte zurückführte.

Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Mit Hilfe des Vektors pWUB_ectD_Hel konnte über SDS-PAGE eine Expression des *ectD*-Gens nachgewiesen werden. Nach Anzucht von *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectAC$) pWUB_ectD_Hel (vgl. Abschnitt III. 8.6) und einer Gesamtproteinaufreinigung in verschiedenen Wachstumsphasen konnte eine verstärkte Expressionsbande zwischen 35 kDa und 40 kDa beobachtet werden, die EctD mit einem Molekulargewicht von 37,4 kDa entsprach (Abb. 17).

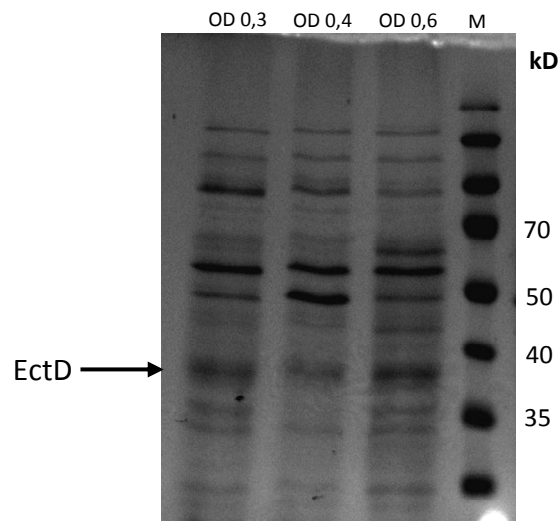


Abb. 17 SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteine von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel

Dargestellt ist ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel. Der Stamm wurde in MM63-2/50Cm Medium bei 37 °C angezogen und 10 mL-Proben für die Gesamtproteinaufreinigung bei verschiedenen OD₆₀₀ entnommen. Jeweils 20 µg Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. EctD besitzt ein Molekulargewicht von 37,4 kDa. M: Proteinmarker.

Aufgrund der von Witt (unveröffentlicht) gezogenen Erkenntnisse und der Beobachtung, dass es mit Hilfe des Vektors pWUB_ectD_Hel zu einer verstärkten Expression des *ectD*-Gens kam, wurde im Folgenden versucht, den σ^S -abhängigen *ectD*-Promotor gegen den optimierten, salzinduzierbaren Promotorbereich (*promKB1*) in *H. elongata* genomisch auszutauschen.

3.1. Konstruktion von *H. elongata* Δ *ectB*::*ectD* Δ *promectD*::*promKB1*

Im Zuge der Optimierung eines Produktionsstammes für das kompatible Solut Hydroxyectoin wurde im folgenden Abschnitt der optimierte, osmoregulierbare *promKB1*-Promotorbereich gegen den natürlichen σ^S -abhängigen *ectD*-Promotor ausgetauscht.

Zur Herstellung dieser genomischen Mutante wurde zunächst das Plasmid pK18*mobSacB_promKB1* konstruiert. Dazu wurden die stromauf- und stromabwärts-Bereiche des *ectD*-Promotors und die *promKB1*-Promotorregion in getrennte PCR-Reaktionen eingesetzt. Als Ausgangsmaterial zur Amplifizierung der beiden Flanken (*up* und *down*) wurde genomische DNA von *H. elongata* und zur Amplifizierung des *promKB1*-Promotors das Plasmid pWUB_ectD_Hel (Witt, unveröffentlicht) benutzt.

Mittels SOE-PCR wurden die drei Bereiche nacheinander miteinander fusioniert (Tab. 14).

Tab. 14 Verwendete Primer und PCR-Produkte zur Konstruktion von pK18mobSacB_promKB1

Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Primer, die amplifizierten PCR-Produkte und deren Ausgangs-DNA sowie die Größe der Fragmente zur Herstellung des Vektors pK18mobSacB_promKB1. Die Bereiche *up*, *promKB1* und *down* wurden in drei getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert und anschließend mittels SOE-PCR fusioniert. Das komplette Fusionsprodukt B (*up-promKB1-down*) wurde in den Vektor pK18mobSacB ligiert.

Primerpaare	amplifiziertes Produkt	verwendete DNA	Größe (bp)
promectDup_for und promectDup_rev	stromaufwärts Bereich des <i>ectD</i> -Promotors (up)	<i>H. elongata</i>	527
promKB1_for und promKB1_rev	<i>promKB1</i> -Bereich	pWUB_ectD_Hel	500
ectDdown_for2 und ectDdown_rev2	<i>ectD</i> -Gen (down)	<i>H. elongata</i>	515
promectDup_for und promKB1_rev	Fusionsprodukt A (<i>up-promKB1</i>)		997
promectDup_for und ectDdown_rev2	Fusionsprodukt B (<i>up-promKB1-down</i>)		1494

Das SOE-PCR-Produkt *up-promKB1-down* wurde anschließend über die Schnittstellen *PstI* und *HindIII* in den mit den gleichen Restriktionsenzymen hydrolysierten Vektor pK18mobSacB ligiert, so dass als fertiges Konstrukt pK18mobSacB_promKB1 resultierte, welches für den genomischen Austausch des *ectD*-Promotors durch die *promKB1*-Promotorregion diente. Dieser Vektor wurde durch *E. coli* S17-1 auf *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ übertragen und die homologe Rekombination und Selektion wie unter Abschnitt II. 14 beschrieben durchgeführt. Mit Hilfe der Kolonie-PCR und der Primer promectDup_for und ectDdown_rev2 wurde eine Austauschmutante (*H. elongata* $\Delta ectB::ectD \Delta promectD::promKB1$, Abb. 18) von dem Ursprungsorganismus unterschieden. Für *H. elongata* Wt konnte in der vorliegenden Arbeit keine Austauschmutante identifiziert werden (für weitere Erläuterungen wird auf die Diskussion verwiesen, Abschnitt IV. 3.1).

Somit entstand die Mutante *H. elongata* $\Delta ectB::ectD \Delta promectD::promKB1$, bei der *ectD* zum einen unter Kontrolle des *ectA*- bzw. *ectB*-Promotors liegt und zum anderen an seinem natürlichen Standort im Genom unter Kontrolle der optimierten salzinduzierbaren *promKB1*-Promotorregion (Abb. 18).

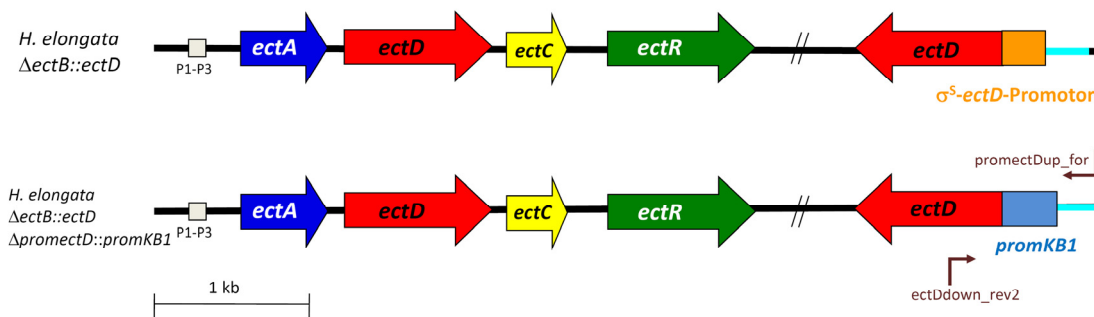


Abb. 18 Genetische Organisation von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$

Dargestellt ist die genetische Organisation der genomischen Mutante *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ sowie der neu konstruierten Mutante *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$. Die Bezeichnung der eingezeichneten Gene ist in Abb. 9 beschrieben. Der σ^S -abhängige natürliche *ectD*-Promotor wurde in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ gegen den optimierten, salzinduzierbaren *promKB1*-Promotorbereich durch homologe Rekombination ausgetauscht. Mit den Primern *promectDup_for* und *ectDdown_rev2* wurde mittels Kolonie-PCR eine positive Austauschmutante identifiziert.

Die Sequenzierung des Promotorbereichs wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt. Dazu wurde der Promotorbereich *promKB1* mittels PCR mit den Primern *promectDup_for* und *ectDdown_rev2* amplifiziert und die gewonnene DNA aufgereinigt. Zusammen mit dem Sequenzierungsprimer *HelpromKB1_Sequ* (hybridisiert stromaufwärts von *promKB1*) wurden der Promotorbereich sowie der Anfangsbereich des *ectD*-Gens mittels der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977) sequenziert. Die Sequenzierung wurde anschließend mit dem Online-Tool MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; Stand 11.05.2011) mit der theoretisch vorausgesagten Sequenz verglichen. Neben drei Basenaustauschen, die bereits Gramman (2000) beschrieben hatte, wobei eine Punktmutation den kürzlich publizierten σ^{38} -abhängigen Promotor betrifft (Schwibbert *et al.*, 2010, Witt, unveröffentlicht), konnte kurz vor der Ribosomenbindestelle eine Deletion der Base Cytosin festgestellt werden (Abschnitt IV. 3.2, Abb. 48). Die vollständige *promKB1-ectD* DNA-Sequenz von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ ist im Anhang aufgeführt (Abb. 52).

3.2. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$

Zur Überprüfung, ob der Austausch des natürlichen σ^S -abhängigen *ectD*-Promotors gegen den optimierten, osmoregulierbaren *promKB1* zu einer Verbesserung der Hydroxyectoin-Produktion führte, wurde der Stamm in Minimalmedium bei

verschiedenen Salinitäten und Temperaturen angezogen, in der stationären Phase geerntet, die Bligh und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC analysiert und mit *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ verglichen.

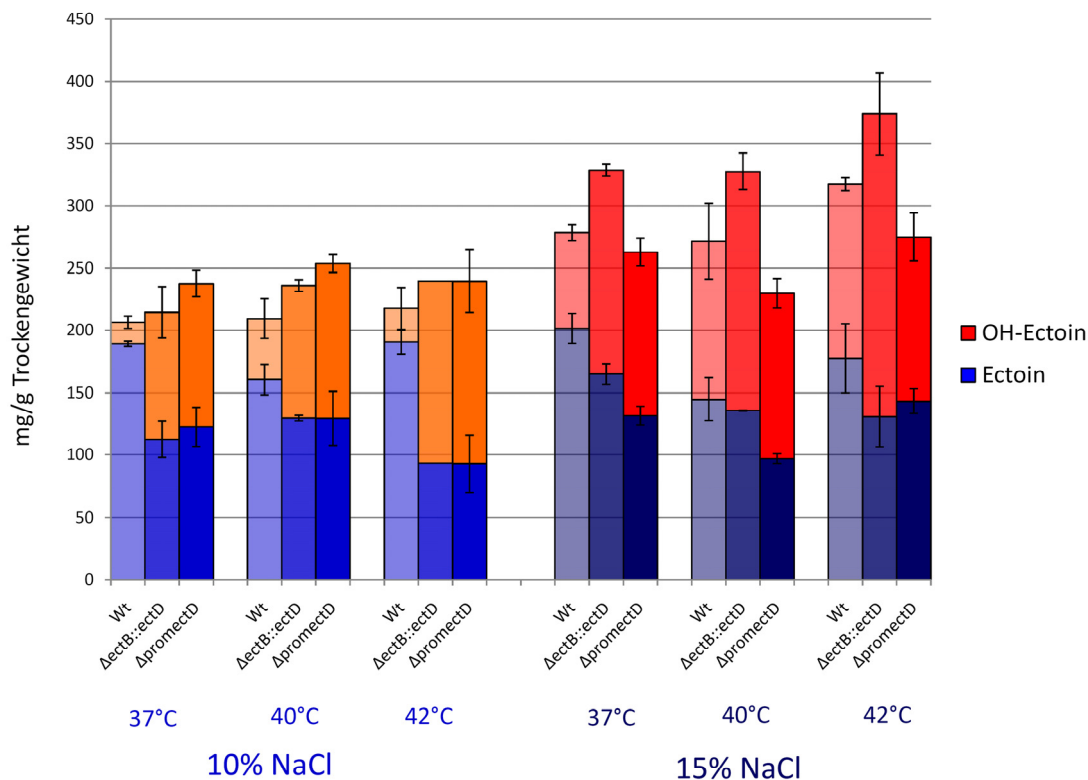


Abb. 19 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ im Vergleich zu Wt und $\Delta ectB::ectD$

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (■) und Hydroxyectoin (■) von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ (gefüllte Balken, als $\Delta promectD$ bezeichnet) im Vergleich zu *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ (transparentere Balken). Alle Stämme wurden in Doppelbestimmung in Minimalmedium bei verschiedenen Salinitäten (10 % und 15 % NaCl) und Temperaturen (37 °C, 40 °C und 42 °C) angezogen, in der stationären Phase geerntet und die Zellextrakte nach Gefriertrocknung des Pellets und Bligh und Dyer-Behandlung mittels HPLC analysiert.

In Abb. 19 wird deutlich, dass bei Anzucht in 10 % NaCl der Hydroxyectoin-Gehalt der neu konstruierten Mutante *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ im Vergleich zum Wt gesteigert werden konnte. Während *H. elongata* Wt beispielweise bei 10 % NaCl und 42 °C nur knapp 30 mg Hydroxyectoin/g TG synthetisierte, produzierte *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ bereits ca. 150 mg Hydroxyectoin/g TG. Im Vergleich zu *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ gab es jedoch kaum einen signifikanten Unterschied im zellulären Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis. Allerdings fiel auf, dass bei einer Salinität von 15 % NaCl beim Wt und der $\Delta ectB::ectD$ -Mutante eine

temperaturabhängige Erhöhung des Hydroxyectoin-Gehalts zu verzeichnen war. Während der Anteil von Hydroxyectoin am Gesamtsolutegehalt von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ bei 37 °C ca. 50 % ausmachte, erhöhte dieser sich auf 65 % bei einer Anzucht bei 42 °C. Im Gegensatz dazu war diese Temperaturabhängigkeit bei *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ nicht mehr gegeben. Bei den drei untersuchten Temperaturen blieb das Verhältnis von Ectoin/Hydroxyectoin in den Zellen relativ gleich mit rund 50 %.

Insgesamt ist festzustellen, dass durch Konstruktion der drei genomischen Mutanten und von *H. elongata* Wt⁺ (pPromEct_ectD) der Hydroxyectoin-Anteil in den Zellen im Vergleich zum Wt gesteigert werden konnte. Ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 wurde bereits bei niedrigeren Salinitäten und Temperaturen erreicht als es für den Wt notwendig ist. Somit konnte die Hydroxyectoin-Produktion allein durch Austausch von *ectB* durch *ectD* bzw. durch plasmidvermittelte Expression von *ectD* verbessert werden, eine vollständige Hydroxylierung mit diesen Stämmen wurde allerdings nicht erzielt.

4. Einfluss der Temperatur auf die Hydroxylierung von Ectoin

Wie bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben (Ures, 2005) und in der vorliegenden Arbeit bestätigt, kommt es durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur zu einer Erhöhung der Hydroxyectoin-Ausbeute. Da durch Konstruktion der verschiedenen Mutanten und der anschließenden Untersuchung der Zellextrakte bei Anzucht unter verschiedenen Salinitäten und Temperaturen (vgl. Abschnitte III. 1 bis 3) jedoch keine vollständige Hydroxylierung von Ectoin erreicht werden konnte, wurde im folgenden Kapitel dieser Arbeit der Einfluss der Temperatur auf die Hydroxyectoin-Synthese näher untersucht.

4.1. Anzucht bei dem Temperaturmaximum von 45 °C

Nach Vreeland *et al.* (1980) liegt das Temperaturmaximum, bei dem *H. elongata* noch wächst und sich reproduziert, bei 45 °C. Daher wurden die zuvor konstruierten genomischen Mutanten im Vergleich zum Wt und der *ectD*-Deletionsmutante MaKu03 bei dieser maximalen Kultivierungstemperatur angezogen und die Bligh und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC auf Ectoin und Hydroxyectoin hin analysiert.

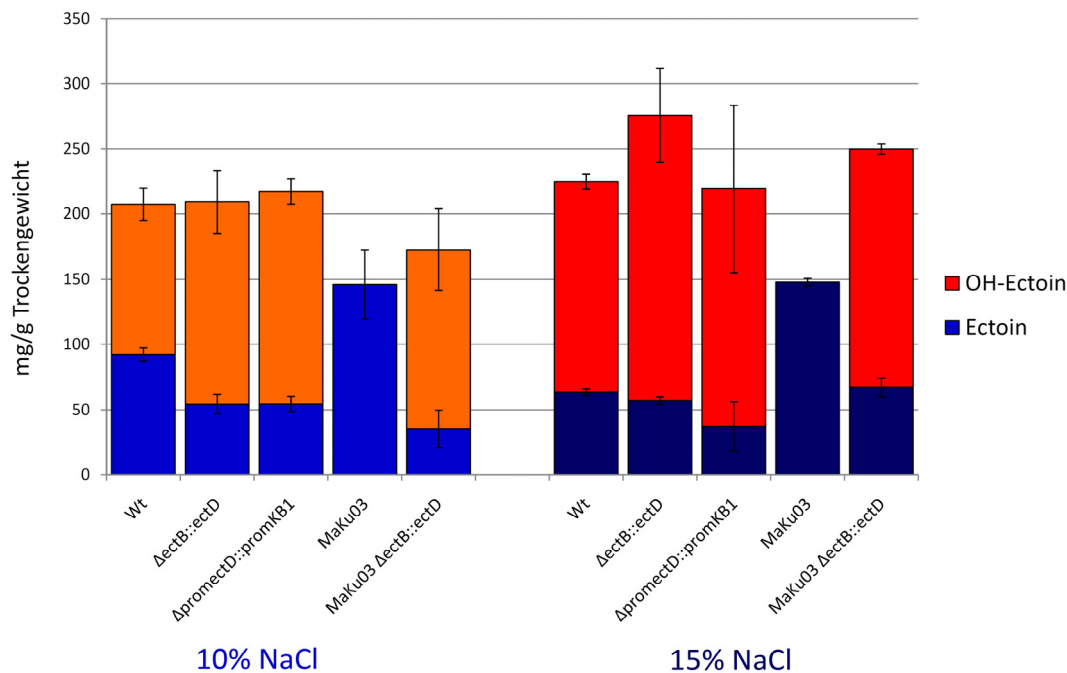


Abb. 20 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt der *Halomonas*-Stämme nach Anzucht bei 45 °C

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (■) und Hydroxyectoin (■) der verschiedenen *Halomonas*-Stämme. Alle Stämme wurden in Doppelbestimmung in Minimalmedium bei verschiedenen Salinitäten (10 % und 15 % NaCl) und der in der Literatur beschriebenen maximalen Wachstumstemperatur von *H. elongata* (45 °C) angezogen, in der stationären Phase geerntet und die Zellextrakte nach Gefrierdrehung des Pellets und Blich und Dyer-Behandlung mittels HPLC analysiert.

Wie in Abb. 20 dargestellt, akkumulierte die *ectD*-Deletionsmutante MaKu03 nur Ectoin in den Zellen. Auch der Gesamtsolutegehalt mit ca. 150 mg/g TG war im Vergleich zum Wt und den genomischen konstruierten Mutanten deutlich geringer. *H. elongata* Wt erreichte bei einer Salinität von 10 % NaCl ein zelluläres Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von ca. 1:1, was sich bei einer Salinität von 15 % NaCl noch weiter zugunsten von Hydroxyectoin verschob. Der Anteil an Hydroxyectoin in den Zellen der drei genomischen Mutanten unter angegebenen Anzuchtbedingungen war noch höher. So konnte mit den in Abschnitten III. 1 und III. 3 konstruierten Stämmen ein Anteil von 75-80 % Hydroxyectoin am Gesamtsolutegehalt in den Zellen detektiert werden. Während der Hydroxyectoin-Anteil in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ bei einer Salinität von 15 % NaCl und Kultivierungstemperatur von 42 °C noch 65 % ausmachte (Abb. 19), stieg er bei einer Anzucht von 45 °C auf 80 %. Durch einfache Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf das Temperaturmaximum von *H. elongata* wurde somit eine deutliche Verschiebung des Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnisses zugunsten von Hydroxyectoin erreicht.

4.2. Anzucht bei einem „Hitzeschock“ von 37 °C auf 50 °C

Da die Temperatur also einen entscheidenden Einfluss auf die Hydroxylierung von Ectoin ausübte, wurde im nächsten Teil der Arbeit versucht, durch weitere Erhöhung der Kultivierungstemperatur eine vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin zu erzielen. Allerdings zeigten Vorkulturen, die bei Temperaturen oberhalb von 45 °C über Nacht geschüttelt wurden, kein Wachstum. Deshalb wurden die verschiedenen *Halomonas*-Stämme zunächst bei einer Temperatur von 37 °C angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen dann einer Temperaturerhöhung auf 50 °C ausgesetzt.

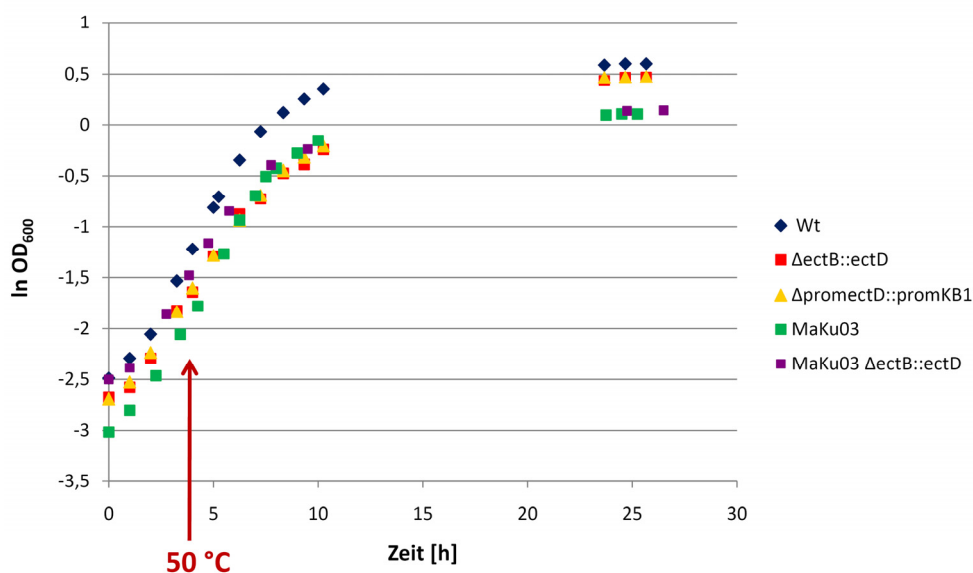


Abb. 21 Wachstum der *Halomonas*-Stämme beim „Hitzeschock“ von 37 °C auf 50 °C

Gezeigt ist das Wachstum von *H. elongata* Wt (◆), $\Delta ectB::ectD$ (■), $\Delta ectB::ectD \Delta promectD::promKB1$ (▲), MaKu03 (■) und MaKu03 $\Delta ectB::ectD$ (■) beim Wachstum in Minimalmedium (MM63-10) bei zunächst 37 °C. In der exponentiellen Phase wurden die Kulturen einem „Hitzeschock“ auf 50 °C ausgesetzt (roter Pfeil). Die Wachstumsraten betragen nach dem Hitzeschock: μ (Wt): 0,39 h⁻¹; μ ($\Delta ectB::ectD$): 0,32 h⁻¹; μ ($\Delta ectB::ectD \Delta promectD::promKB1$): 0,3 h⁻¹; μ (MaKu03): 0,38 h⁻¹; μ (MaKu03 $\Delta ectB::ectD$): 0,34 h⁻¹.

Es wurde deutlich, dass die Kulturen, nachdem sie bei einer Temperatur von 37 °C bis in die exponentielle Wachstumsphase angezogen wurden, nach einer anschließenden Temperaturerhöhung auf 50 °C ohne sichtbare Einschränkung weiter wuchsen. Außerdem wird in Abb. 21 deutlich gemacht, dass die beiden Stämme, denen *ectD* am natürlichen Standort im Genom fehlt (MaKu03-Stämme) eine geringere End-OD₆₀₀ erreichten als die drei übrigen Stämme. Die drei Stämme, bei denen *ectB* durch *ectD* ausgetauscht wurde (*H. elongata* MaKu03 $\Delta ectB::ectD$, *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ und

H. elongata $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$), zeigten ein leicht verringertes Wachstum im Vergleich zu Wt und MaKu03. Während *H. elongata* Wt eine Wachstumsrate von $0,39 \text{ h}^{-1}$ und MaKu03 eine von $0,38 \text{ h}^{-1}$ aufwies, lag die Wachstumsrate der $\Delta ectB$ -Austauschmutanten zwischen $0,3 \text{ h}^{-1}$ und $0,34 \text{ h}^{-1}$ (Abb. 21).

Zur Untersuchung des zellulären Solutegehalts wurden die Kulturen in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC analysiert.

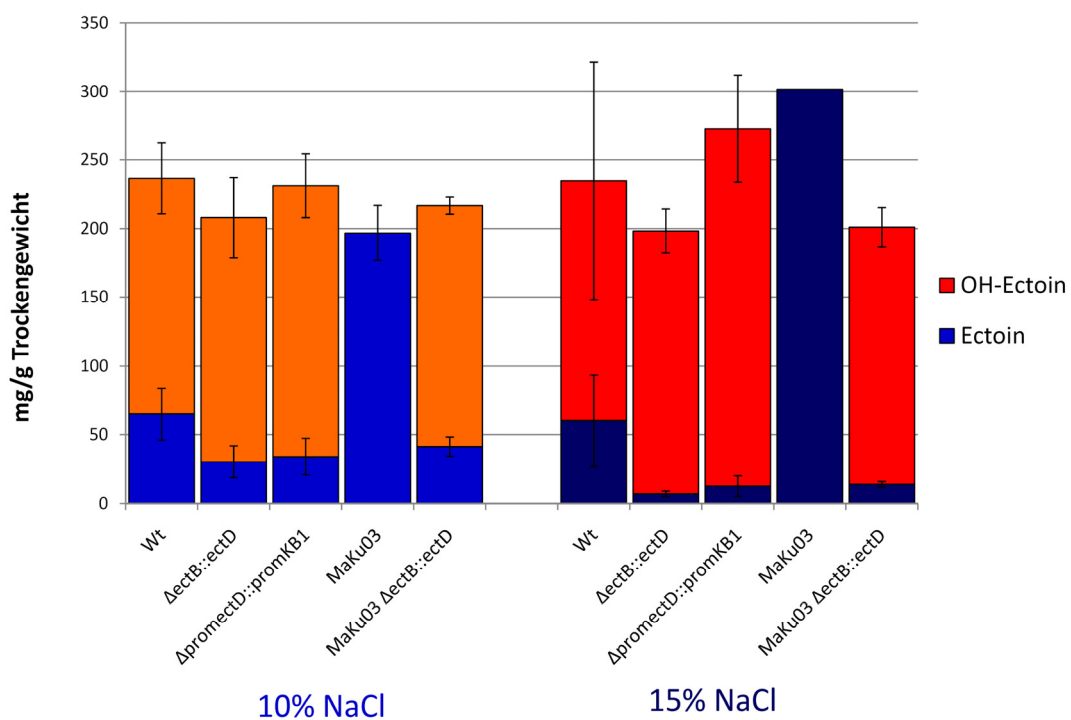


Abb. 22 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt der *Halomonas*-Stämme beim „Hitzeschock“ auf 50 °C

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (■) und Hydroxyectoin (■) der verschiedenen *Halomonas*-Stämme. Alle Stämme wurden in Minimalmedium bei verschiedenen Salinitäten (10 % und 15 % NaCl) und 37 °C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase auf eine Kultivierungstemperatur von 50 °C geschockt. Die Kulturen wurden, mit Ausnahme einer Kultur von *H. elongata* Wt (15 % NaCl), in der spät-stationären Phase geerntet und die Zellextrakte nach Gefriertrocknung des Pellets und Bligh und Dyer-Behandlung mittels HPLC analysiert.

Anhand Abb. 22 wird gezeigt, dass die *ectD*-Deletionsmutante *H. elongata* MaKu03 nur Ectoin in den Zellen akkumulierte. Bei allen anderen *Halomonas*-Stämmen verschob sich das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis stark zum Vorteil von Hydroxyectoin. *H. elongata* Wt produzierte bei 10 % NaCl bereits 170 mg Hydroxyectoin/g TG. Somit lagen über 70 % Hydroxyectoin in den Zellen vor. Bei den genomischen Austauschmutanten wurde bei dieser Salinität ein Hydroxyectoin-Anteil von über 80 %

am Gesamtsolutegehalt detektiert. Bei einer Anzucht in 15 % NaCl konnte dieser Anteil nochmals gesteigert werden. In den Zellen der genomisch konstruierten Mutanten lag fast ausschließlich Hydroxyectoin vor. Der Hydroxyectoin-Anteil machte zwischen 93 % und 96 % aus. Aber auch *H. elongata* Wt zeigte unter angegebenen Kultivierungsbedingungen eine starke Akkumulation von Hydroxyectoin in den Zellen. Die große Fehlerrate bei einer Salinität von 15 % NaCl ist dadurch zu erklären, dass die Kulturen der Doppelbestimmung in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet wurden (früh-stationär und spät-stationär, vgl. Abschnitt III. 4.3).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 50 °C die Hydroxyectoin-Produktion stark gesteigert werden konnte. Bei einer Salinität von 15 % NaCl wurden in den genomischen Mutanten über 93 % Hydroxyectoin in den Zellen akkumuliert. Aber auch in *H. elongata* Wt wurde das zelluläre Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis stark zugunsten von Hydroxyectoin verschoben.

4.3. Fermentation von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ bei einem „Hitzeschock“

Um die Hydroxyectoin-Produktion in Abhängigkeit der Wachstumsphase bei einem Hitzeschock auf 50 °C näher zu untersuchen, wurde mit *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ eine Fermentation durchgeführt. Der Stamm wurde in 4 L MM63-10 bei 37 °C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase die Temperatur des beheizbaren Fermenteraußenmantels auf 50 °C manuell erhöht (Abb. 23).

In Abb. 23 ist gezeigt, dass *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ kurz nach dem Animpfen in exponentielles Wachstum überging. Nach etwa 6-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Temperatur des geregelten Heizkreislaufes (Fermenteraußenmantel) auf 50 °C erhöht. Im Fermenter selbst wurde nur eine Temperatur zwischen 47 °C und 48,4 °C erreicht. Das Wachstum der Kultur erhöhte sich zunächst nach der Temperaturerhöhung von $\mu = 0,21 \text{ h}^{-1}$ auf $\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$ und sank anschließend auf einen Wert von $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$ ab. Nach ca. 50-stündiger Fermentation erreichte die Kultur eine End-OD₆₀₀ von 5,2.

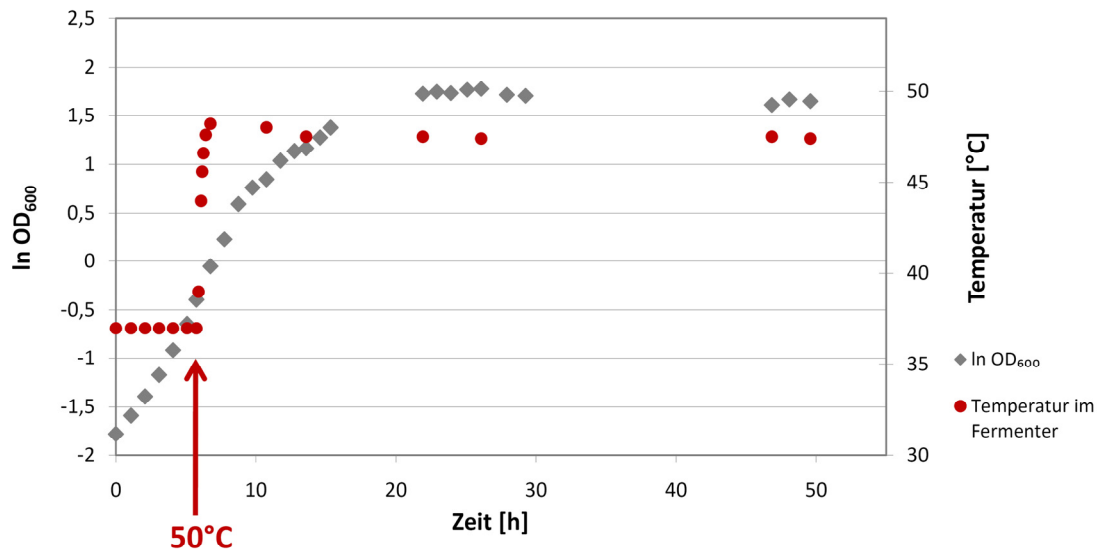


Abb. 23 Fermentation von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C

Dargestellt ist der Fermentationsverlauf von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ bei Anzucht in MM63-10 Medium. Die Kultur wurde zunächst bei 37 °C angezogen. In der exponentiellen Phase wurde die Temperatur des Fermenteraußenmantels auf 50 °C hochreguliert (roter Pfeil). Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm in einem Photometer bestimmt (grau: $\ln OD_{600}$). Die Temperatur im Fermenter wurde mit Hilfe eines Thermometers abgelesen. Die Wachstumsrate betrug vor dem „Hitzeschock“ $\mu = 0,21 \text{ h}^{-1}$, erhöhte sich anschließend kurzfristig auf $\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$ und verringerte sich dann wieder auf $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$.

Zur Bestimmung des intrazellulären Solutegehalts wurden während der Fermentation in verschiedenen Wachstumsphasen 50 bis 100 mL Kultur geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC auf Ectoin und Hydroxyectoin untersucht.

Wie in Abb. 24 dargestellt, lag vor der Temperaturerhöhung auf 50 °C ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 in den Zellen vor (jeweils etwa 90 mg/g TG), wie es auch schon in Abschnitt III. 1.2.3 gezeigt werden konnte. Nach dem „Hitzeschock“ stieg der Hydroxyectoin-Gehalt in den Zellen schnell auf 150 mg/g TG an, während der Ectoin-Gehalt auf ca. 30 mg/g TG sank. Im weiteren Verlauf der Fermentation stellte sich das Verhältnis wieder auf 1:1 ein. Erst beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase stieg der Hydroxyectoin-Gehalt wieder leicht an und der Ectoin-Gehalt sank auf unter 10 mg/g TG.

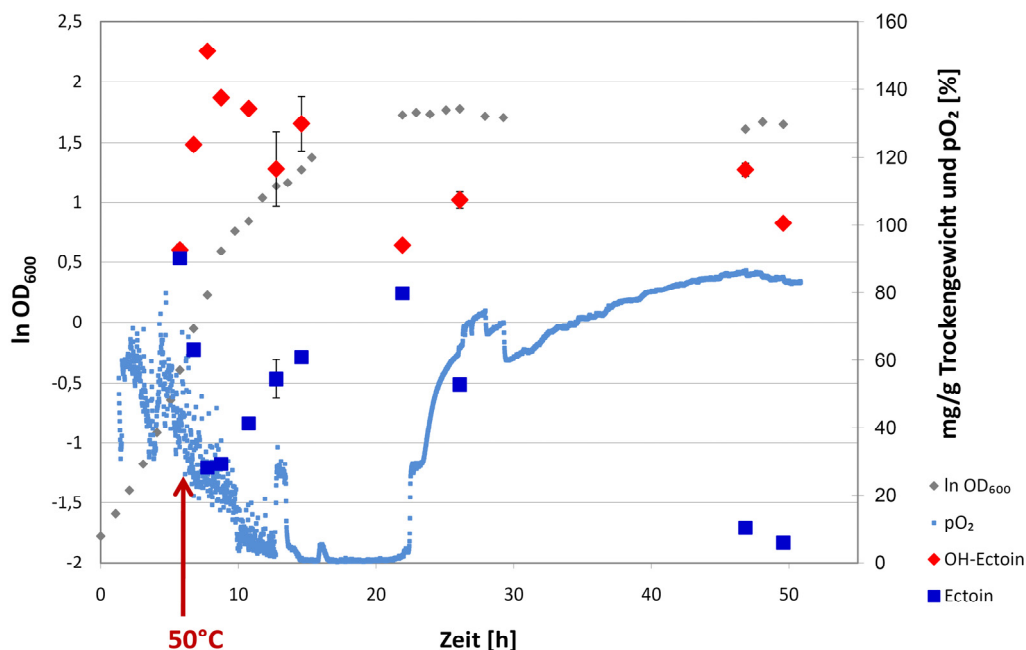


Abb. 24 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt im Vergleich zu pO_2 während der Fermentation von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (blau) und Hydroxyectoin (rot) während der Fermentation von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$. Weiterhin sind der Wachstumsverlauf (grau: $\ln OD_{600}$) sowie der Sauerstoffpartialdruck in % (hellblau: pO_2) abgebildet. Nach etwa 6-stündiger Anzucht bei 37 °C wurde die Temperatur auf 50 °C erhöht (roter Pfeil).

Bei Betrachtung des Sauerstoffpartialdrucks im Fermenter wurde deutlich, dass die Hydroxylierung stark von diesem abhing. Während der exponentiellen Phase sank der pO_2 -Wert auf 0 % ab, was mit einer Reduzierung des Hydroxyectoin-Gehalts einherging. Erst in der stationären Phase stieg der pO_2 -Wert im Fermenter wieder auf 80 % an und das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis kehrte sich fast vollständig zugunsten von Hydroxyectoin um. Am Ende der Fermentation war der intrazelluläre Gesamtsolutegehalt zwar im Vergleich zum Startzeitpunkt auf etwa 100 mg/g TG gesunken, es konnte jedoch ein Hydroxyectoin-Anteil von ca. 94 % in den Zellen detektiert werden. Somit konnte eine fast vollständige Hydroxylierung von Ectoin durch die Durchführung eines „Hitzeschocks“ über das von *H. elongata* beschriebene Temperaturmaximum hinaus erzielt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die drei konstruierten genomischen Mutanten *H. elongata* MaKu03 $\Delta ectB::ectD$, *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ und *H. elongata* $\Delta ectB::ectD \Delta promectD::promKB1$ untereinander kaum einen Unterschied in der Hydroxylierung von Ectoin aufwiesen. Deutlicher war allerdings der Effekt zwischen den Mutanten und

dem Wt. Ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 konnte bereits bei niedrigeren Salinitäten und Temperaturen erzielt werden, als es für den Wt notwendig ist. Während *H. elongata* Wt Salinitäten von 15 % NaCl und Temperaturen oberhalb von 40 °C benötigte, um einen Hydroxyectoin-Gehalt von 50 % am Gesamtsolutegehalt in den Zellen zu akkumulieren, reichten den konstruierten Mutanten bereits 10 % NaCl und Temperaturen von 37 °C dazu aus. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Hitze ein entscheidender Faktor bei der Hydroxylierungsreaktion ist. Bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C zeigte nicht nur *H. elongata* Wt eine Akkumulation von bis zu 75 % in den Zellen, mit den genomisch konstruierten Austauschmutanten konnte eine fast vollständige Hydroxylierung von Ectoin nachgewiesen werden. Im besten Fall wurde durch *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ und *H. elongata* $\Delta ectB::ectD \Delta promectD::promKB1$ ein Hydroxyectoin-Anteil von 96 % bei einer Anzucht in 15 % NaCl erzielt (Abb. 22). Neben der hohen Kultivierungstemperatur ist das Vorhandensein von Sauerstoff ein weiterer essentieller Parameter der Hydroxylierungsreaktion.

Da der Hydroxyectoin-Gehalt in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ bei Fehlen von Sauerstoff abnahm, ist davon auszugehen, dass *H. elongata* über einen bislang unbekanntes Hydroxyectoin-Abbauweg verfügt. Daher wurden im nächsten Abschnitt der vorliegenden Arbeit Untersuchungen an *Escherichia coli* durchgeführt, da dieser Organismus im Gegensatz zu *H. elongata* keinen solchen Abbauweg besitzt.

Ergebnisse (Teil II: Hydroxylierung von Ectoin und anderen Verbindungen mit Hilfe der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata*)

Neben den Untersuchungen der Hydroxyectoin-Produktion in dem industriell angewandten Organismus *H. elongata* sollten im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Substratspezifität der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* durchgeführt werden. Ein Ziel war es, ein Ganzzellbiokatalyse-System in *Escherichia coli* zur stereospezifischen Hydroxylierung von Ectoin und anderen Verbindungen zum Hydroxyderivat zu etablieren. Die Hydroxylierung von Ectoin sollte dann mit der von *H. elongata* verglichen werden, um Aussagen über einen möglichen Produktionsstamm liefern zu können. Daneben sollten auch Untersuchungen an der Hydroxylierung des inkompatiblen Soluts Guanidino-Ectoin durchgeführt werden. Neben der Etablierung

eines Ganzzellsystems wurden auch *in vitro* Tests mit aufgereinigtem EctD durchgeführt.

5. *E. coli* als Ganzzellbiokatalyse-System zur Hydroxylierung von Soluten

Unter Ganzzellbiokatalyse versteht man eine enzymatisch katalysierte Stoffumwandlung von bestimmten in den Zellen vorhandenen Substraten ohne vorherige Aufreinigung dieser oder des entsprechenden Enzyms. Für die Etablierung eines Ganzzellbiokatalyse-Systems sind verschiedene Faktoren notwendig. Zum einen muss die Aufnahme der Substrate, die umgewandelt werden sollen, in die Zelle gewährleistet sein. Desweiteren muss es zu einer stabilen Expression des konvertierenden Enzyms in den Zellen kommen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Ectoinhydroxylase EctD stabil exprimiert werden, so dass eine Umwandlung zum Hydroxyderivat stattfinden kann. Weiterhin muss eine Regeneration von α -Ketoglutarat als Kofaktor für die Hydroxylierungsreaktion in der Zelle gegeben sein. Aus diesen Gründen wurde *E. coli* als Ganzzellbiokatalyse-System gewählt. Dieser Organismus besitzt zum einen Aufnahmesysteme für kompatible Solute und es konnte gezeigt werden, dass unter Salzstress eine Vielzahl von Soluten in der Zelle akkumuliert werden (Kempf und Bremer, 1998; Vielgraf, 2008). Zum anderen handelt es sich bei *E. coli* um ein geeignetes heterologes Expressionssystem, für das eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Vektoren angeboten wird, die eine Überexpression gewünschter Proteine erlauben. Die Regeneration von α -Ketoglutarat in *E. coli* verläuft über einen intakten Zitratzyklus oder über Glutamat als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle.

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits zwei Ganzzellbiokatalyse-Systeme entwickelt (vgl. Abschnitt I. 7.1, Abb. 4). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Untersuchungen mit dem salzinduzierbaren System *E. coli* DH5 α VIBO durchgeführt, da mit dem zweiten System *E. coli* BL21 pETectDcyt., vor allem bei der Expression des *ectD*-Gens und der Hydroxylierung in größerem Maßstab, Probleme auftraten (persönliche Mitteilung, Stein; Vielgraf, 2008).

6. *E. coli* DH5 α VIBO als Ganzzellbiokatalyse-System

6.1. Hydroxylierung von 2 mM Ectoin

Zur Untersuchung der Hydroxylierung von 2 mM Ectoin wurde *E. coli* DH5 α VIBO zunächst in MM63-1/100Carb (VA) angezogen und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 mit 2 mM Ectoin supplementiert. Anschließend wurden die Kulturen auf eine Salinität von 2 %, 3 % und 4 % NaCl geschockt. Dieser Salzschock führte zum einen zur Aufnahme des Solute Ectoin in die Zellen und zum anderen zur Induktion der Expression des *ectD*-Gens. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und der Bligh und Dyer-Zellextrakt und das Medium auf den Gehalt an Ectoin bzw. Hydroxyectoin hin untersucht.

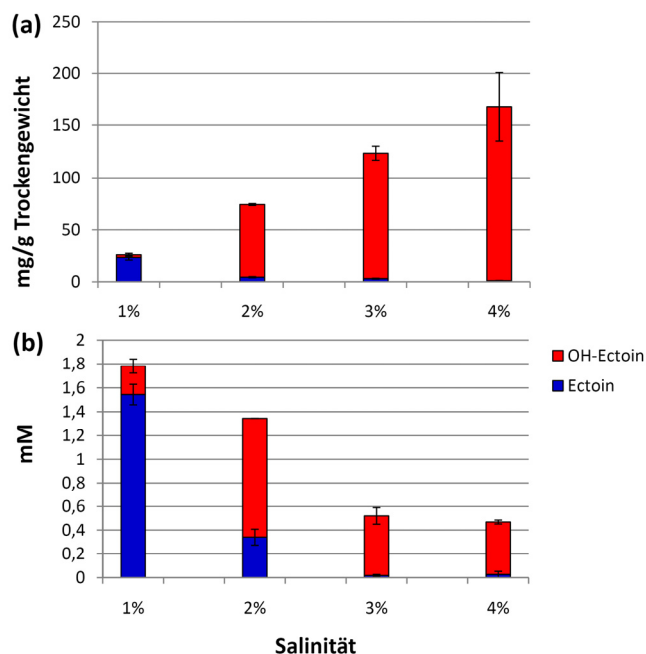


Abb. 25 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt der Zellextrakte und des Mediums von *E. coli* DH5 α VIBO

Dargestellt ist (a) der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (blau) und Hydroxyectoin (rot) von *E. coli* DH5 α VIBO sowie (b) die Konzentration der Solute im Medium (in mM). Der Stamm wurde zunächst in MM63-1/100Carb (VA) bei 37 °C angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase mit 2 mM Ectoin supplementiert und ein Salzschock auf 2 %, 3 % und 4 % NaCl durchgeführt. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte sowie der Medienüberstand mittels HPLC analysiert.

In Abb. 25 (a) wird deutlich, dass es zu einer salinitätsabhängigen Akkumulation der Solute in den Zellen von *E. coli* DH5 α VIBO kam. Während der Gesamtsolutegehalt bei einer Salinität von 1 % NaCl nur bei ca. 25 mg/g TG lag, wurden bei 4 % NaCl über 150 mg/g TG in den Zellen akkumuliert. Weiterhin zeigte sich, dass das den Zellen

angebotene Ectoin ab einer Salinität von 2 % NaCl fast vollständig zu Hydroxyectoin umgewandelt wurde. Die Untersuchung des Kulturüberstandes (Abb. 25 (b)) ergab im Gegensatz zu den Zellextrakten eine salzabhängige Abnahme des Gesamtsolutegehalts. Bei einer Salinität von 1 % NaCl fanden sich noch 1,8 mM Ectoin und Hydroxyectoin im Medium, während bei 4 % NaCl nur noch etwas mehr als 0,4 mM vorlagen. Weiterhin wurde deutlich, dass bei einer Salinität von 1 % NaCl noch über 1,5 mM Ectoin im Medium vorlag, erst bei höheren Salinitäten wurde fast ausschließlich Hydroxyectoin im Medium akkumuliert. Anhand dieses Versuchs wurde deutlich, dass mit dem Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* DH5 α VIBO Ectoin in einer Konzentration von 2 mM zu seinem Hydroxyderivat umgesetzt werden konnte und sich die hydroxylierte Version im Medium anreicherte.

6.2. Hydroxylierung von 10 mM Ectoin

In einem nächsten Versuch wurde untersucht, ob mit Hilfe des Ganzzellsystem höhere Konzentrationen an Ausgangssubstrat umgesetzt werden können. Dazu wurde *E. coli* DH5 α VIBO in MM63-1/100Carb (VA) angezogen, bei einer OD₆₀₀ von 0,4 mit 10 mM Ectoin supplementiert und auf eine Salinität von 3 % NaCl geschockt. Zur Bereitstellung von α -Ketoglutarat als Kofaktor für die Hydroxylierungsreaktion wurde in der stationären Phase nochmals 25 mM Glucose zugefügt (Abb. 26 (a)). Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von Hydroxyectoin im Medium wurde mittels HPLC analysiert (Abb. 26 (b)).

Die Analyse der Kulturüberstände ergab, dass Hydroxyectoin im Medium akkumuliert wurde (Abb. 26 (b)). Bereits 1,5 h nach der Ectoin-Zugabe und Durchführung des Salzschocks fand sich neben Ectoin Hydroxyectoin im Medium. 17,5 h nach dem Salzschock lag ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 im Medium vor, das sich im Zuge der stationären Phase nicht mehr änderte. Nach der Glucose-Supplementierung verschob sich das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis nach weiterer über Nacht-Inkubation zugunsten von Hydroxyectoin, so dass am Ende der Kultivierung neben 6,5 mM Hydroxyectoin nur noch weniger als 1 mM Ectoin im Medium zu finden war. Zum Zeitpunkt der Zellernte wurden 55 mg/g TG Gesamtsolutegehalt in den Zellen detektiert, wovon nur ca. 70 % Hydroxyectoin ausmachten (hier nicht dargestellt). Eine vollständige Umsetzung zum Hydroxyderivat konnte unter gegebenen Bedingungen nicht erzielt werden.

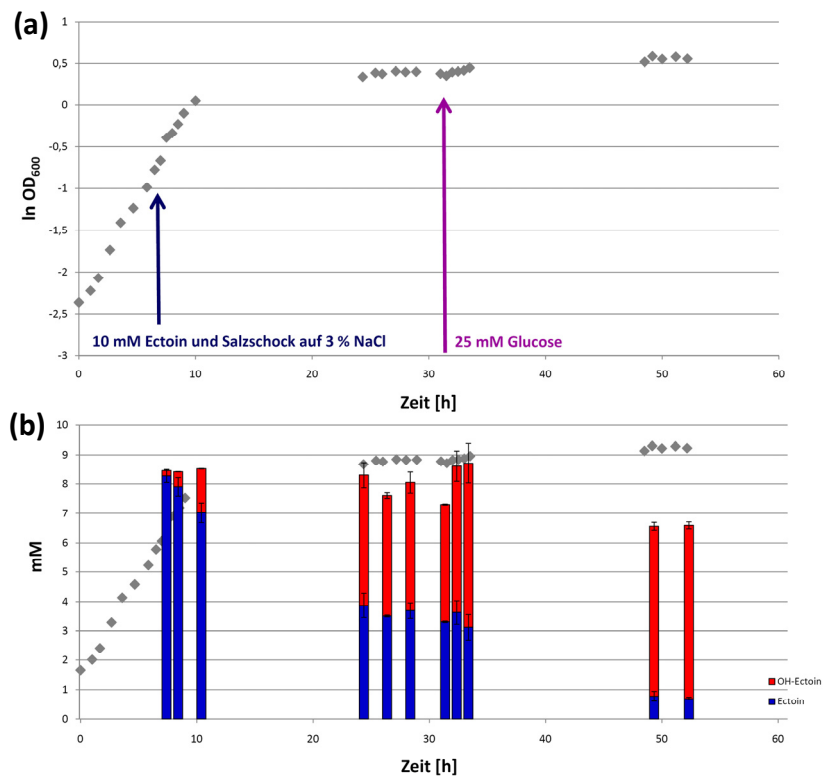


Abb. 26 Hydroxylierung von 10 mM Ectoin durch *E. coli* DH5 α VIBO

Dargestellt sind (a) der Versuchsablauf der Hydroxylierung von 10 mM Ectoin (blau) durch das Ganzzellsystem *E. coli* DH5 α VIBO und (b) der zeitliche Verlauf der Akkumulation von Hydroxyectoin (rot) im Medium. Der Stamm wurde in MM63-1/100Carb (VA) angezogen, bei einer OD₆₀₀ von 0,4 mit 10 mM Ectoin supplementiert und auf 3 % NaCl geschockt. Die Wachstumsrate betrug $\mu = 0,26 \text{ h}^{-1}$. In der stationären Phase wurde die Kultur mit 25 mM Glucose nachgefüttert. Während der Kultivierung wurden 2 mL-Proben geerntet, deren Überstände mittels HPLC auf den Gehalt an Ectoin und Hydroxyectoin hin untersucht wurden.

Auch eine dreimalige Glucose-Nachfütterung (jeweils 25 mM) in der stationären Phase brachte keine Verbesserung der Hydroxylierung (nicht dargestellt). Die spezifische auf die Biomasse bezogene Umsatzrate von Ectoin zu Hydroxyectoin mit diesem System wurde auf $158 \text{ mg (g TG}^{-1}) \text{ h}^{-1}$ geschätzt. Da die Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin mit Hilfe von *E. coli* DH5 α VIBO unvollständig verlief, u. a. vermutlich aufgrund einer zu geringen Expression des *ectD*-Gens, wurde ein alternativer Weg der Ganzzellbiokatalyse verfolgt.

7. *E. coli* BL21 (DE3) pETectDH_{is} als Ganzzellbiokatalyse-System

In einem nächsten Schritt sollte ein Ganzzellsystem basierend auf *E. coli* BL21 (DE3) etabliert werden, welches zu einer erhöhten intrazellulären Expression des *ectD*-Gens

und somit zu einer hohen Umsatzrate und vollständigen Hydroxylierung von Ectoin führen sollte. In einer früheren Arbeit wurde zwar bereits ein solches System entwickelt (vgl. Abschnitt I.7.1, pETectDcyt.), allerdings sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit zudem versucht werden, EctDHis über Nickelchelat-Affinitätschromatographie aufzureinigen und *in vitro* Tests durchzuführen (Abschnitt III.9).

7.1. Konstruktion von pETectDHis zur Expression des *ectD*-Gens

Zur Etablierung eines solchen Ganzzellsystems wurde zunächst ein Plasmid – basierend auf dem pET-System – konstruiert, in welches das *ectD*-Gen aus *H. elongata* inseriert wurde. Dazu wurde *ectD* mittels PCR und der Primer ectDHis_for und ectDHis_rev amplifiziert und über die Schnittstellen *Nde*I und *Hind*III in den mit den gleichen Restriktionsenzymen hydrolysierten Vektor pET-22b(+) ligiert (Abb. 27).

Bei dem fertigen Konstrukt pETectDHis liegt *ectD* somit unter Kontrolle des T7-Promotors. Nach erfolgreicher Konstruktion wurde pETectDHis in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Durch IPTG-Induktion, die zur Expression der hochselektiven T7-RNA-Polymerase führt, sollte eine starke Expression des *ectD*-Gens in der Zelle gewährleistet sein. Im Gegensatz zu dem von Ures (2006, unveröffentlicht) konstruierten Plasmid pETectDcyt. wurde in der vorliegenden Arbeit das *ectD*-Gen zusätzlich mit einem carboxyterminalen His₆-tag versehen.

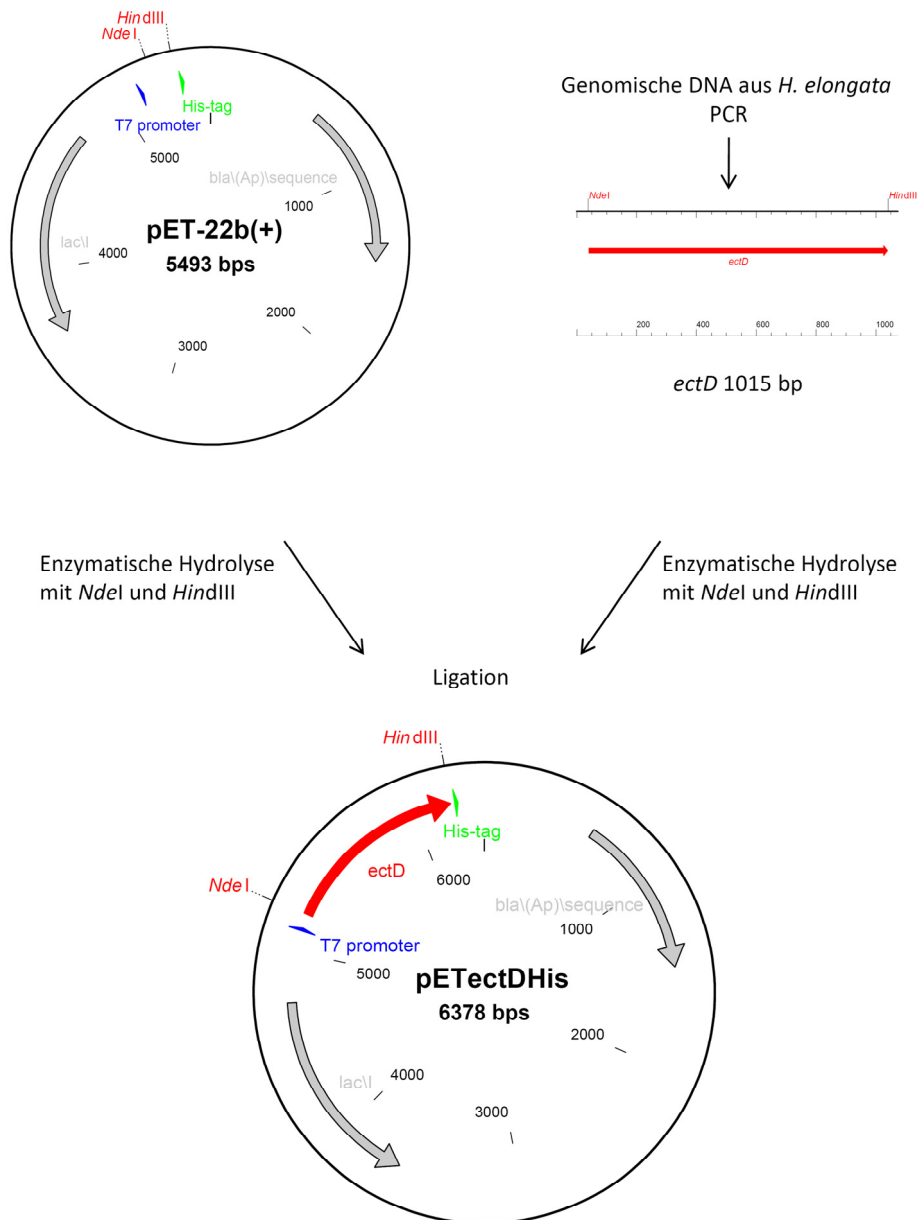


Abb. 27 Klonierungsstrategie zur Konstruktion von pETectDHis

Dargestellt ist das Klonierungsschema zur Herstellung des Vektors pETectDHis. Abgebildet ist neben dem Ausgangsplasmid pET-22b(+) das *ectD*-Gen aus *H. elongata*, was per PCR mit den Primern *ectDHis_for* und *ectDHis_rev* amplifiziert wurde. Nach der enzymatischen Hydrolyse mit *NdeI* und *HindIII* wurde *ectD* in den mit den gleichen Enzymen hydrolysierten und dephosphorylierten Vektor pET-22b(+) ligiert. Als Vektorkonstrukt entstand pETectDHis mit einer Größe von 6378 bp, bei dem das *ectD*-Gen unter Kontrolle des T7-Promotors liegt und C-terminal mit einem His-tag versehen ist.

7.2. Überprüfung der Expression von EctDHis

Wie bereits erwähnt, kam es mit dem von Ures (2006, unveröffentlicht) konstruierten System (*E. coli* BL21 pETectD_{cyt}) zu Problemen während der Hydroxylierungsreaktion. Wie Vielgraf (2008) zeigte, konnte z. B. keine Überexpressionsbande von EctD auf

einem SDS-Polyacrylamidgel beobachtet werden. Da für die Etablierung eines Ganzzellbiokatalyse-Systems neben der Aufnahme der Substrate in die Zelle eine stabile heterologe Expression des *ectD*-Gens gewährleistet sein muss, wurde in einem nächsten Schritt überprüft, ob EctDHis mit dem im vorangegangenen Abschnitt konstruierten System exprimiert wird. Dazu wurde das Gesamtzellprotein von *E. coli* BL21 pETectDHis vor und nach der Induktion mit IPTG isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 28).

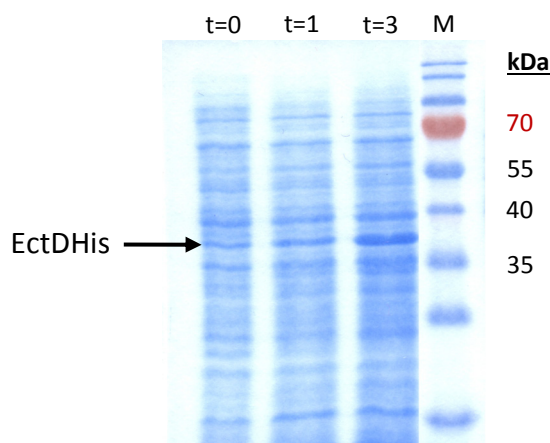


Abb. 28 SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung der Expression von EctDHis

Abgebildet ist ein 13 %iges SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung von *E. coli* BL21 pETectDHis. Der Stamm wurde in LBG-0,5/100Carb angezogen und die Expression von EctDHis bei einer OD_{600} von 0,4 mit 0,5 mM IPTG induziert. Es wurden 10 mL-Proben für die Gesamtproteinaufreinigung vor ($t=0$) sowie eine ($t=1$) und drei Stunden ($t=3$) nach der Induktion gezogen. Jeweils 20 μ g Gesamtprotein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. EctDHis besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 38,9 kDa. M: Proteinmarker

Nach www.expasy.org (Stand 11.05.2011) besitzt EctDHis ein theoretisches Molekulargewicht von 38,9 kDa. Wie in Abb. 28 erkennbar, konnte bereits vor der Induktion mit IPTG eine Bande zwischen 35 kDa und 40 kDa beobachtet werden, deren Stärke nach der Induktion zunahm (vgl. $t=3$). Die zu beobachtende Proteinbande lag zwar etwas unterhalb der vorausgesagten Größe, in weiteren Versuchen (Abschnitt III. 9.1) konnte aber gezeigt werden, dass es sich bei dieser Bande um EctDHis handelt. Durch *E. coli* BL21 pETectDHis war eine heterologe Expression von EctDHis also garantiert, so dass im Folgenden getestet werden konnte, ob sich dieser Stamm als Ganzzellbiokatalyse-System eignet.

7.3. Hydroxylierung von 2 mM Ectoin

Nachdem gezeigt werden konnte, dass EctDHis in den Zellen von *E. coli* BL21 exprimiert wird, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die C-terminale Fusion von EctD mit dem His-tag Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms hat. Dazu wurde *E. coli* BL21 pETectDHis in MM63-1/100Carb angezogen, die Expression des *ectD*-Gens in der exponentiellen Wachstumsphase mit IPTG induziert, anschließend wurde die Kultur mit 2 mM Ectoin supplementiert und ein Salzschock auf 4 % NaCl durchgeführt (Abb. 29, ind.). Als Negativkontrolle diente zum einen *E. coli* BL21 mit dem Leervektor pET-22b(+). Eine weitere Negativkontrolle war *E. coli* BL21 pETectDHis, dessen *ectD*-Expression nicht mit IPTG induziert wurde (Abb. 29, unind.). Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte und Medienüberstände mittels HPLC auf Ectoin und Hydroxyectoin hin überprüft.

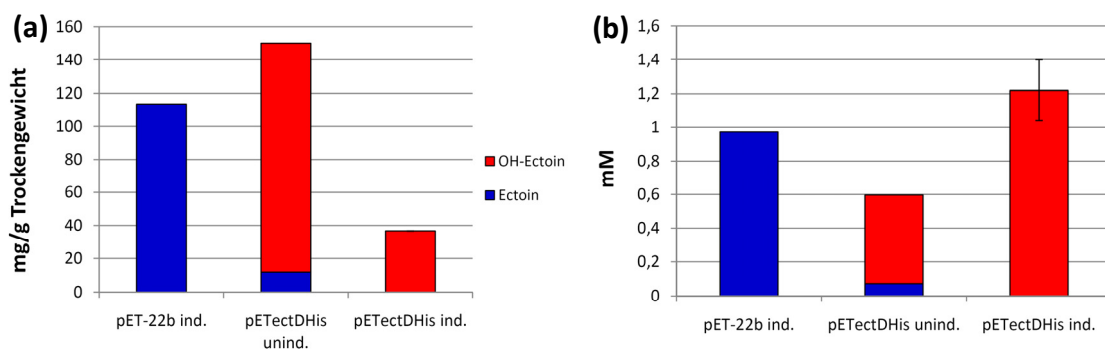


Abb. 29 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von *E. coli* BL21 pETectDHis und *E. coli* BL21 pET-22b(+)

Dargestellt ist (a) der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (blau) und Hydroxyectoin (rot) von *E. coli* BL21 pET-22b(+) und *E. coli* BL21 pETectDHis (unind.: ohne IPTG Induktion; ind.: mit IPTG Induktion). Weiterhin abgebildet ist (b) der Solutegehalt der drei Kulturen im Medium (in mM). Die Stämme wurden in MM63-1/100Carb angezogen (Negativkontrollen in Einfachbestimmung), in der exponentiellen Wachstumsphase ggf. mit 0,5 mM IPTG induziert, 30 min später mit 2 mM Ectoin supplementiert und wiederum 30 min später auf 4 % NaCl geschockt. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte und Medienüberstände mittels HPLC analysiert.

In den Zellen der Negativkontrolle *E. coli* BL21 pET-22b(+) wurden über 110 mg Ectoin/g TG akkumuliert (Abb. 29 (a)). Auch im Medienüberstand befand sich nur Ectoin (Abb. 29 (b)). Die zweite Negativkontrolle *E. coli* BL21 pETectDHis, deren *ectD*-Expression nicht mit IPTG induziert wurde, konvertierte das den Zellen angebotene Ectoin zu Hydroxyectoin. Neben 12 mg Ectoin/g TG konnten am Ende der Kultivierung über 135 mg Hydroxyectoin/g TG im Zellextrakt detektiert werden. Im Medium war auch eine Akkumulation von Hydroxyectoin erkennbar, allerdings wurde noch Ectoin in

einer Konzentration von ca. 0,08 mM nachgewiesen. Erstaunlicherweise befand sich in den Zellen der induzierten Kultur *E. coli* BL21 pETectDHis weniger Hydroxyectoin als in den beiden Negativkontrollen (ca. 40 mg/g TG). Dieses Ergebnis konnte in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen beobachtet werden. Am Ende der Kultivierung lag ausschließlich die hydroxylierte Version im Medium in einer Konzentration von 1,2 mM vor.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass Ectoin mit Hilfe des Ganzzellsystems *E. coli* BL21 pETectDHis zu Hydroxyectoin umgewandelt wurde. Die Fusion von *ectD* mit einem C-terminalen His₆-tag hatte keine Auswirkungen auf die Aktivität von EctD, so dass in weiteren Schritten untersucht werden konnte, wie hoch die Umsatzrate dieses Systems ist.

7.3.1. Hydroxylierung von 10 mM Ectoin

Zur Untersuchung der Hydroxylierung größerer Mengen an Substrat wurde *E. coli* BL21 pETectDHis in MM63-1/100Carb angezogen, die Expression des *ectD*-Gens bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 mit IPTG induziert, die Kultur mit 10 mM Ectoin supplementiert und anschließend auf eine Salinität von 3 % NaCl geschockt. Zur Bereitstellung von ausreichend α -Ketoglutarat für die Hydroxylierungsreaktion wurde in der stationären Phase nochmals 25 mM Glucose zugesetzt (Abb. 30 (a)). Der zeitliche Verlauf der Akkumulation von Hydroxyectoin im Medium wurde mittels HPLC analysiert.

In Abb. 30 (b) wird deutlich, dass durch *E. coli* BL21 pETectDHis 10 mM Ectoin fast vollständig hydroxyliert und im Medium akkumuliert wurden. Bereits 30 min nach Durchführung des Salzschocks konnte die hydroxylierte Version im Medium detektiert werden. Am Ende der Kultivierung lagen nur noch 0,3 mM Ectoin im Überstand vor, stattdessen wurden 6,5 mM Hydroxyectoin nachgewiesen. Damit machte Hydroxyectoin einen Anteil von über 95 % der im Medium akkumulierten Solute aus. Im Vergleich zu *E. coli* DH5 α VIBO (Abb. 26) erfolgte die Umsetzung zu Hydroxyectoin mit diesem System nicht nur fast vollständig, sondern auch effektiver. Die auf die Biomasse-bezogene spezifische Umsatzrate von Ectoin zu Hydroxyectoin lag bei 320 mg (g TG⁻¹) h⁻¹.

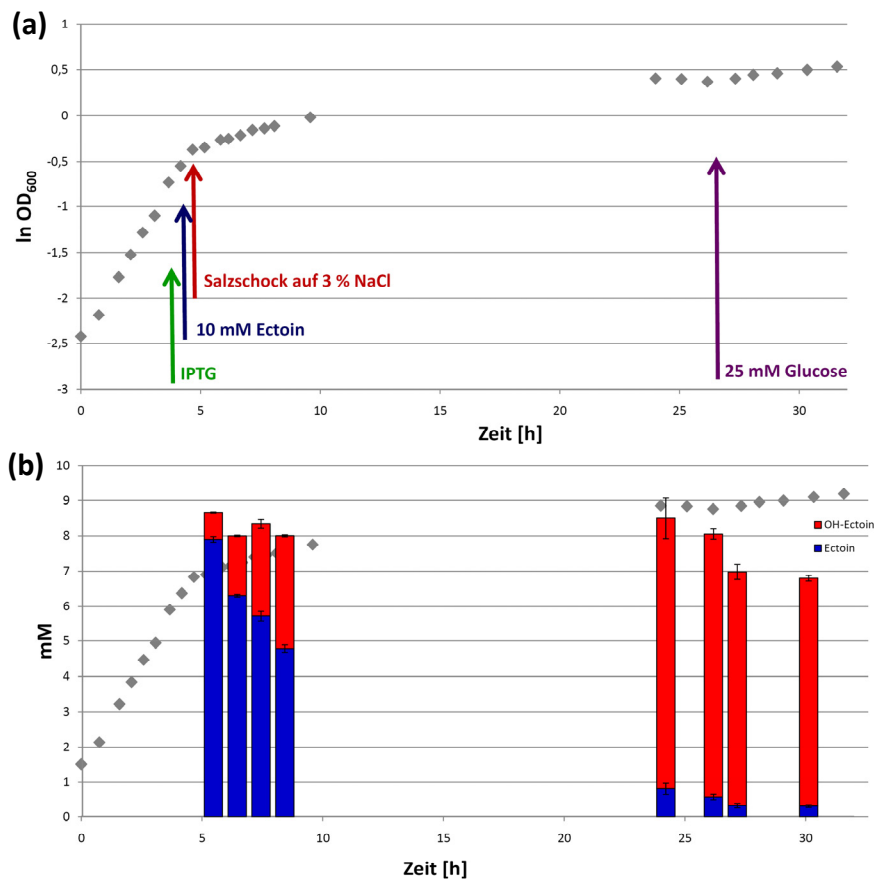


Abb. 30 Hydroxylierung von 10 mM Ectoin durch *E. coli* BL21 pETectDHis

Dargestellt ist (a) der Versuchsablauf und (b) der Zeitverlauf der Hydroxylierung von 10 mM Ectoin (blau) durch das Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* BL21 pETectDHis. Der Stamm wurde in MM63-1/100Carb angezogen und die Expression des *ectD*-Gens in der exponentiellen Phase mit 0,5 mM IPTG induziert. 30 min später wurde die Kultur mit 10 mM Ectoin supplementiert und wiederum 30 min später auf 3 % NaCl geschockt. Die Wachstumsrate nach dem Salzschock betrug $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$. In der stationären Phase wurde mit 25 mM Glucose nachgefüttert (a). In Abb. 30 (b) ist die Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin (rot) im Medium von *E. coli* BL21 pETectDHis in mM gezeigt.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob die Hydroxylierung von Ectoin optimiert werden konnte, da im Medium unter oben genannten Bedingungen noch Ectoin vorhanden war. Dazu wurde *E. coli* BL21 pETectDHis in MM63-1/100Carb angezogen und auf höhere Salinitäten von 4 % und 5 % NaCl geschockt. Auch hier verblieben bis zu 0,5 mM Ectoin im Medium, so dass eine Limitierung des Ganzzellbiokatalyse-Systems in der Wiederaufnahme von Ectoin bestehen könnte.

Um auszuschließen, dass der Kofaktor der Hydroxylierungsreaktion α -Ketoglutarat ein limitierender Faktor ist, wurden *E. coli* BL21 pETectDHis in der stationären Wachstumsphase zusätzlich 25 mM α -Ketoglutarat zugesetzt. Hier lagen zum Ende der Kultivierung ebenfalls noch 0,5 mM Ectoin im Medium vor (nicht dargestellt).

Eine Anzucht in Glycerin anstelle von Glucose als C-Quelle erbrachte auch keine Verbesserung der Hydroxylierung. Es sollte zum einen eine durch Glucose verursachte Katabolit-Repression vermieden werden (Grossman *et al.*, 1998). Zum anderen eignet sich Glycerin für eine industrielle Nutzung dieses Systems besser als C-Quelle. Allerdings befanden sich nach Kultivierung in MM63-1/100Carb (50 mM Glycerin) und einem Salzschock auf 3 % NaCl immer noch ca. 2 mM Ectoin im Überstand (nicht dargestellt).

Erst eine Anzucht mit Glutamat als C-Quelle führte zu einer vollständigen Hydroxylierung von 10 mM Ectoin (Abb. 31). *E. coli* BL21 pETectDH_{is} wurde in MM63-1/100Carb (50 mM Glutamat) angezogen, bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Expression des *ectD*-Gens mit IPTG induziert, die Kultur wurde mit 10 mM Ectoin supplementiert und auf eine Salinität von 3 % NaCl geschockt. Im Vergleich zur Anzucht mit Glucose als C-Quelle war die *lag*-Phase von *E. coli* BL21 pETectDH_{is} verlängert. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und nach HPLC-Analysen des Bligh und Dyer-Zellextraktes wurde deutlich, dass Hydroxyectoin einen Anteil von über 97 % am Gesamtsolutegehalt ausmachte (Abb. 31). Im Medienüberstand fanden sich neben nur noch 0,08 mM Ectoin über 9 mM Hydroxyectoin.

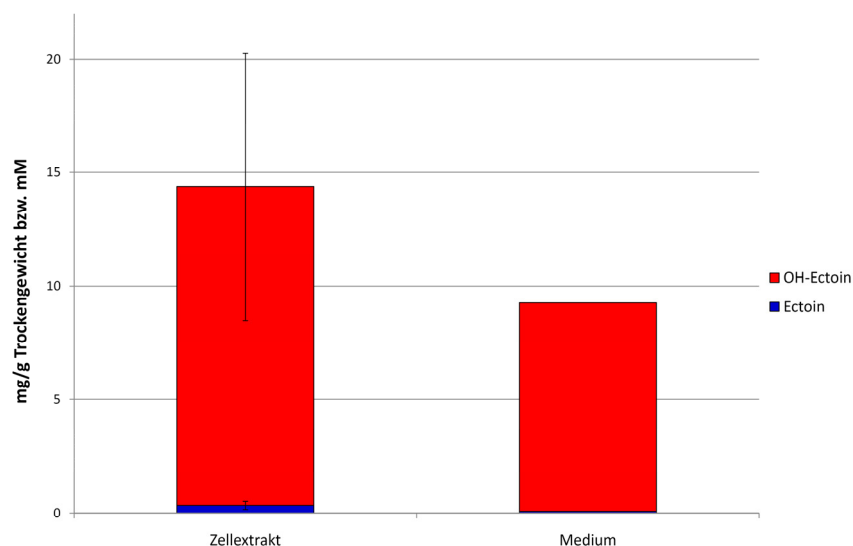


Abb. 31 Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt von *E. coli* BL21 pETectDH_{is} mit Glutamat als C-Quelle

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Ectoin (blau) und Hydroxyectoin (rot) und die Konzentration der im Medium vorhandenen Solute (in mM) von *E. coli* BL21 pETectDH_{is} nach Anzucht mit Glutamat als einziger C-Quelle. Der Stamm wurde in MM63-1/100Carb (50 mM Glutamat) angeimpft, bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mit IPTG induziert, anschließend mit 10 mM Ectoin supplementiert und auf 3 % NaCl geschockt. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und der Bligh und Dyer-Zellextrakt und das Medium mittels HPLC analysiert.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde ein Ganzzellbiokatalyse-System in *E. coli* etabliert, mit dem Ectoin bis zu einer Konzentration von 10 mM zu Hydroxyectoin umgesetzt werden konnte. Supplementierungen höherer Konzentrationen an Ectoin (20 mM) resultierten in der Akkumulation von 10 mM hydroxyliertem Produkt im Medium, auch nach Zusatz von 25 mM α -Ketoglutarat (nicht dargestellt).

In einem nächsten Abschnitt wurde mit Hilfe dieses etablierten Ganzzellsystems die Substratspezifität von EctD untersucht.

7.4. Die Substratspezifität von EctD

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* neben dem natürlichen Substrat Ectoin weitere zyklische Verbindungen hydroxyliert (Stein *et al.*, 2008, VAAM-Poster; Vielgraf, 2008). Im folgenden Abschnitt wurde mittels des Ganzzellbiokatalyse-Systems *E. coli* BL21 pETectDH_{is} die Hydroxylierung von Prolin und DHMICA durch EctD untersucht. Dazu wurde der Stamm in MM63-1/100Carb angezogen, die Expression des *ectD*-Gens in der exponentiellen Phase mit IPTG induziert, die Kultur mit 2 mM Prolin bzw. DHMICA supplementiert und die Zellen einem Salzschock auf 4 % NaCl ausgesetzt (Abb. 32 (a) am Beispiel von Prolin).

Mittels FMOC/ADAM-Gradienten-HPLC konnte gezeigt werden, dass Prolin von *E. coli* BL21 pETectDH_{is} zu seinem Hydroxyderivat umgesetzt wurde (Abb. 32 (b)). 30 min nach Durchführung des Salzschocks wurde bereits OH-Prolin im Medium detektiert. Am Ende der Kultivierung lag ausschließlich die hydroxylierte Version in einer Konzentration von 1 mM im Medium vor. In den Zellextrakten fanden sich nur Spuren der hydroxylierten Variante (nicht abgebildet).

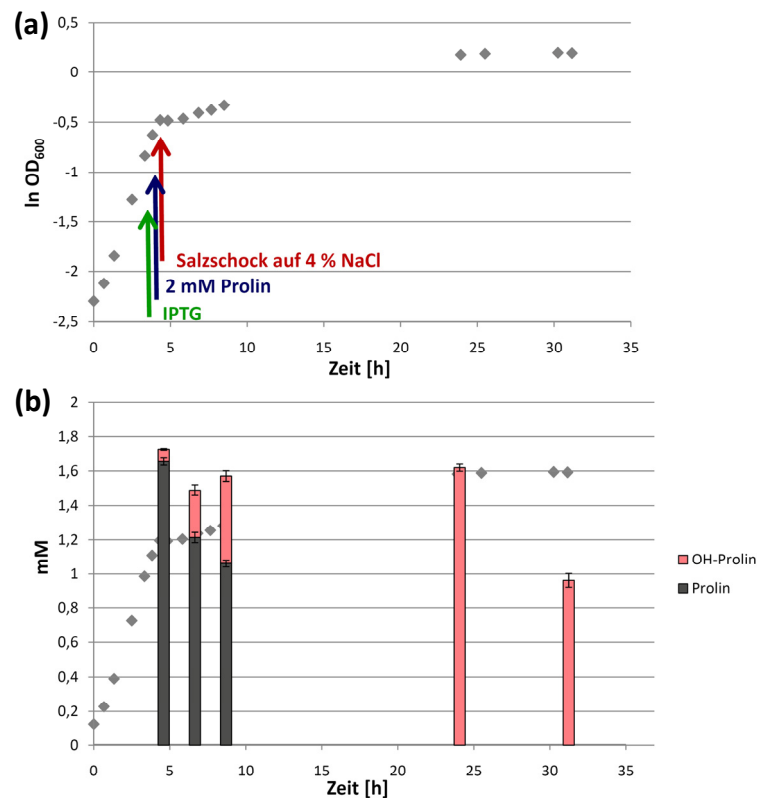


Abb. 32 Hydroxylierung von Prolin durch *E. coli* BL21 pETectDHis

Dargestellt ist (a) der Versuchsablauf und (b) der Zeitverlauf der Hydroxylierung von 2 mM Prolin (grau) durch das Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* BL21 pETectDHis. Der Stamm wurde in MM63-1/100Carb angezogen und die Expression des *ectD*-Gens in der exponentiellen Phase mit 0,5 mM IPTG induziert. 30 min später wurde die Kultur mit 2 mM Prolin supplementiert und wiederum 30 min später ein Salzschock auf 4 % NaCl durchgeführt. Abb. 32 (b) zeigt den zeitlichen Verlauf der Akkumulation von OH-Prolin (rosa) im Medium (in mM). Die Analyse der Medienüberstände erfolgte mittels FMOC/ADAM-Gradienten-HPLC.

Die Untersuchung der Hydroxylierung von DHMICA mittels HPLC ergab, dass das DHMICA-Signal im Verlauf der Kultivierung abnahm, allerdings wurde kein weiteres Signal, das OH-DHMICA zugeordnet werden konnte, mit Hilfe der isokratischen HPLC-Methode detektiert. Bei der hydroxylierten Version handelte es sich daher vermutlich um ein instabiles Zwischenprodukt. Für weitere Erläuterungen wird auf die Diskussion verwiesen.

Die durch EctD bislang hydroxylierten Solute können wie in Abb. 33 dargestellt zusammengefasst werden:

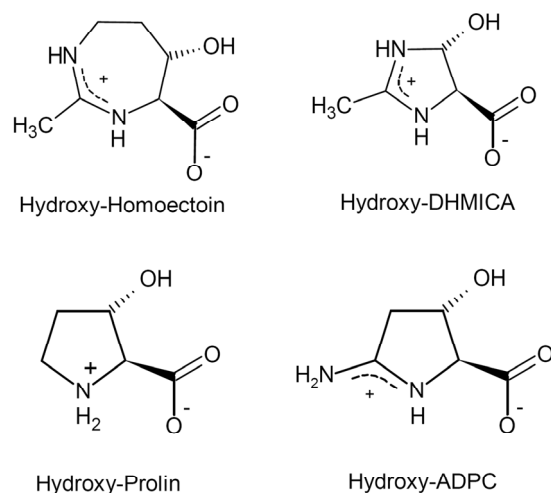


Abb. 33 Bislang hydroxylierte Substanzen der Ectoinhydroxylase EctD

Dargestellt sind die bislang durch EctD hydroxylierten Verbindungen. Neben Ectoin wurde die Hydroxylierung von Homoectoin, Prolin und ADPC nachgewiesen (Stein *et al.*, 2008, VAAM-Poster; Vielgraf, 2008; diese Arbeit). Die Hydroxylierung von DHMICA wurde ebenfalls vermutet.

Neben Ectoin, dem natürlichem Substrat der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata*, wurde das Ectoinderivat Homoectoin (4,5,6,7-Tetrahydro-2-Methyl-1H-(1,3)-Diazepin-4-Carbonsäure) sowie Prolin hydroxyliert. Weiterhin wurde die Verbindung ADPC (5-Amino-3,4-Dihydro-2H-Pyrrolin-2-Carbonsäure) als Substrat von EctD erkannt (Stein *et al.*, 2008, VAAM-Poster). Die Hydroxylierung von DHMICA (4,5-Dihydro-2-Methyl-Imidazol-4-Carbonsäure) wurde nach Analysen der vorliegenden Arbeit vermutet, allerdings zu einem instabilen Produkt.

8. Hydroxylierung des inkompatiblen Soluts Guanidino-Ectoin (Gd-Ectoin)

Da das Substratspektrum von EctD nicht nur auf Ectoin begrenzt war, sondern gezeigt werden konnte, dass weitere zyklische Verbindungen hydroxyliert wurden, sollte im nächsten Abschnitt untersucht werden, ob EctD das inkompatible Solut Guanidino-Ectoin als Substrat erkennt und hydroxyliert.

8.1. Chemische Synthese von Gd-Ectoin

Da Gd-Ectoin nicht im Handel erhältlich ist, wurde die Substanz chemisch synthetisiert. Die Reaktionsbedingungen für die Synthese wurden von Galinski und Stein in vorangegangenen Arbeiten entwickelt und optimiert (unveröffentlicht). In einer

Einschrittreaktion entsteht dabei aus den Ausgangssubstanzen L-2,4-Diaminobuttersäure und O-Methylisoharnstoff das gewünschte Produkt Gd-Ectoin (Abschnitt II. 5, Abb. 7). Der Erfolg der Synthese wurde mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestätigt (Abb. 34).

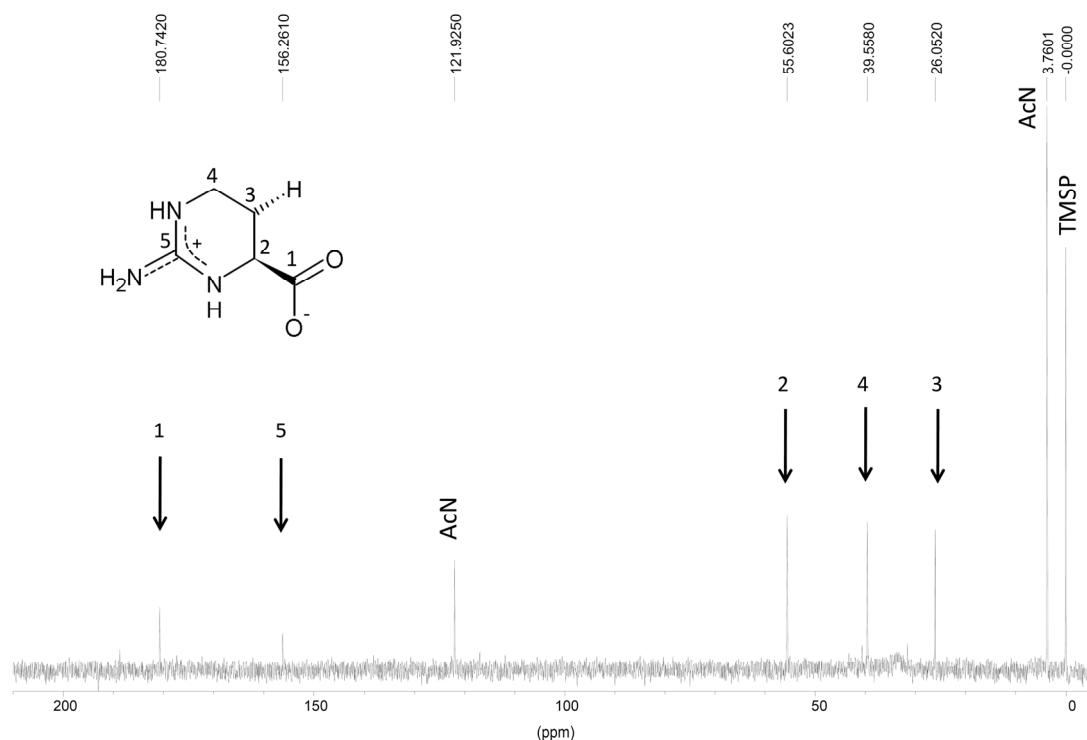


Abb. 34 ^{13}C -NMR-Spektrum von Gd-Ectoin

Abgebildet ist das ^{13}C -NMR-Spektrum der chemisch synthetisierten Verbindung Gd-Ectoin. Neben den Signalen für Gd-Ectoin (schwarze Pfeile) sind der interne Standard Na-Trimethylsilylpropionat (TMS) sowie Acetonitril (AcN) zu erkennen.

Das NMR-Spektrum zeigte neben den Signalen der internen Standards Acetonitril und Na-TMS fünf Signale (180,74 ppm, 156,26 ppm, 55,6 ppm, 39,55 ppm und 26,05 ppm), die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung der Substanz Gd-Ectoin zugeordnet werden konnten.

8.2. Wachstum von *E. coli* bei Anzucht mit Gd-Ectoin

Zunächst wurde untersucht, wie sich Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* auswirkt. Sell (2009) zeigte bereits, dass die relative Wachstumsrate von *E. coli* K12 bei einer Salinität von 3 % NaCl und Supplementierung von 4 mM Gd-Ectoin auf ca. 60 % im Vergleich zur Kontrolle verringert war. Zur Bestätigung dieses hemmenden Effekts wurde *E. coli* MC4100 in Minimalmedium bei Salinitäten von 1-3 % NaCl unter

Supplementierung verschiedener Konzentrationen Gd-Ectoin bei 37 °C in Mikrotiterplatten angezogen und die relative Wachstumsrate im Vergleich zu Kontrollzellen, die ohne Solut angezogen wurden, bestimmt (Abb. 35).

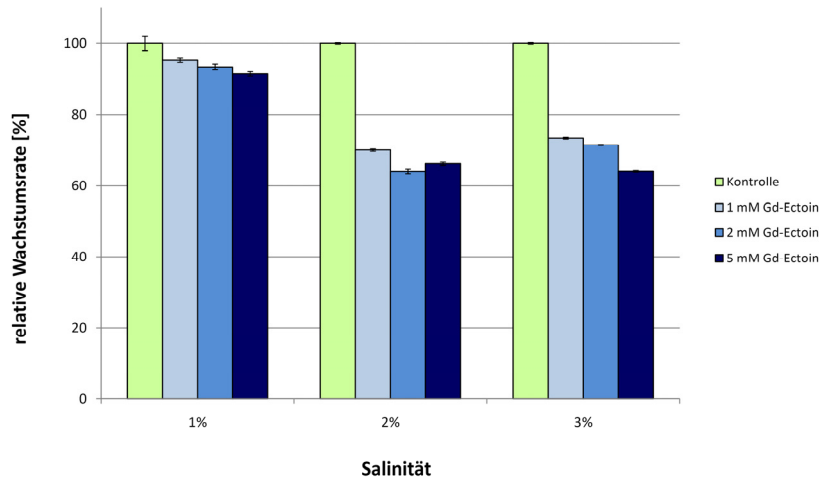


Abb. 35 Einfluss von Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* MC4100

Dargestellt ist die relative Wachstumsrate (in %) von *E. coli* MC4100 nach Anzucht bei verschiedenen Salinitäten und unterschiedlichen Gd-Ectoin-Konzentrationen. Der Stamm wurde in Minimalmedium bei Salinitäten von 1 bis 3 % NaCl und Gd-Ectoin-Konzentrationen von 1 mM, 2 mM und 5 mM in Mikrotiterplatten bei 37 °C angezogen. Die Wachstumsrate wurde in der exponentiellen Phase bestimmt und in Relation zur Kontrolle, die ohne Solut angezogen wurde, gesetzt.

In Abb. 35 wird gezeigt, dass der hemmende Effekt von Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* MC4100 bestätigt werden konnte. Während bei einer Salinität von 1 % NaCl die relative Wachstumsrate durch Gd-Ectoin nur leicht abnahm, zeigte sich ab einer Salinität von 2 % eine verstärkte Hemmung. Die relative Wachstumsrate bei einer Salinität von 2 % und 3 % NaCl verringerte sich auf ca. 60-70 % im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz zu dem verschlechterten Wachstum durch Gd-Ectoin konnte nach Supplementierung mit dem kompatiblen Solut Ectoin eine deutliche Wachstumsverbesserung beobachtet werden (nicht gezeigt).

8.3. Untersuchung zur Hydroxylierung von Gd-Ectoin

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch Erzeugung einer Guanidiniumgruppe in dem kompatiblen Solut Ectoin eine Substanz entstand, die wachstumshemmend auf *E. coli* wirkte und somit einen gegenteiligen Effekt als kompatible Solute ausübte, wurde anschließend getestet, ob die Ectoinhydroxylase EctD das inkompatible Solut Gd-Ectoin hydroxyliert. Dazu wurde zunächst das in Abschnitt III. 7 konstruierte Ganzzellsystem *E. coli* BL21 pETectDHis genutzt, da gezeigt werden konnte, dass mit

diesem System neben Ectoin weitere zyklische Solute hydroxyliert wurden. Als Negativkontrolle diente *E. coli* BL21 pET-22b(+), welcher den leeren Vektor ohne das *ectD*-Gen enthielt. Als weitere Kontrolle wurde *E. coli* BL21 pETectDHis eingesetzt, wobei die Expression des *ectD*-Gens nicht mit IPTG induziert wurde. Die drei Stämme wurden in MM63-1/100Carb angezogen, im Fall der induzierten Kulturen mit 0,5 mM IPTG versetzt, mit 2 mM Gd-Ectoin supplementiert und auf eine Salinität von 4 % NaCl geschockt. Die Bligh und Dyer-Zellextrakte und Medienüberstände wurden mittels HPLC analysiert.

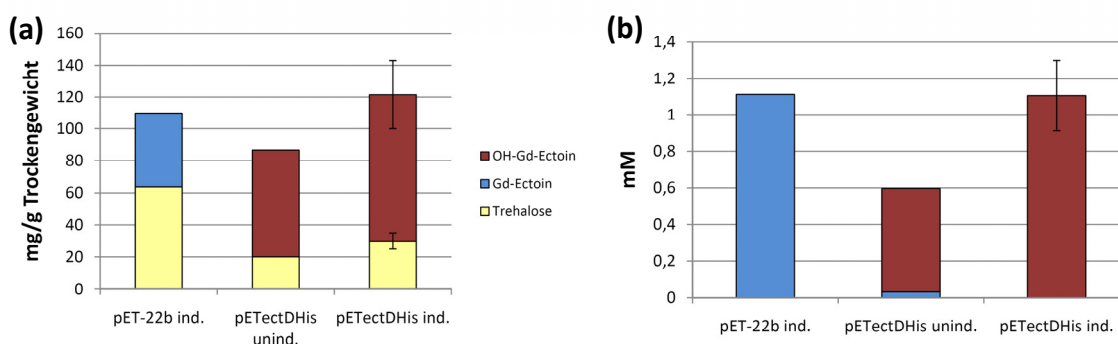


Abb. 36 Gd-Ectoin und OH-Gd-Ectoin-Gehalt von *E. coli* BL21 pETectDHis und pET-22b(+)

Dargestellt ist (a) der zelluläre Gehalt (in mg/g TG) an Gd-Ectoin (■), OH-Gd-Ectoin (■) und Trehalose (■) von *E. coli* BL21 pET-22b(+) und *E. coli* BL21 pETectDHis (unind.: ohne IPTG Induktion; ind.: mit IPTG Induktion). Weiterhin wurde (b) der Solutegehalt im Medium (in mM) der drei Kulturen bestimmt. Die Kulturen wurden in MM63-1/100Carb angezogen (Negativkontrollen in Einfachbestimmung), im Fall von *E. coli* BL21 pETectDHis ind. mit 0,5 mM IPTG induziert, mit 2 mM Gd-Ectoin supplementiert und auf 4 % NaCl geschockt. Die Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte und die Medienüberstände mittels HPLC analysiert.

Wie in Abb. 36 (a) zu erkennen, akkumulierte die Negativkontrolle *E. coli* BL21 pET-22b(+) neben 60 mg Trehalose/g TG als Osmolyt 40 mg Gd-Ectoin/g TG. *E. coli* BL21 pETectDHis akkumulierte neben Trehalose (30 mg/g TG) ausschließlich OH-Gd-Ectoin (90 mg/g TG). Mittels HPLC konnte also eine Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch EctD beobachtet werden. In Abschnitt III. 8.6 wird gezeigt, dass die Hydroxylierung auch mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestätigt werden konnte. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die uninduzierte Kultur neben Trehalose auch ausschließlich die hydroxylierte Version akkumulierte. Die Analyse der Medienüberstände ergab eine Akkumulation an hydroxyliertem Gd-Ectoin in einer Konzentration von bis zu 1,1 mM für *E. coli* BL21 pETectDHis (Abb. 36 (b)), wie es auch schon für Hydroxyectoin und Prolin beobachtet werden konnte (Abschnitte III. 7.3, III. 7.4). Im Medienüberstand der

Negativkontrolle mit dem leeren pET-22b(+) Vektor befand sich nur unhydroxyliertes Gd-Ectoin, während der Überstand der uninduzierten Kultur neben Spuren von Gd-Ectoin auch nur OH-Gd-Ectoin aufwies.

8.4. Fermentation zur Überprüfung der Hydroxylierung von Gd-Ectoin

Da gezeigt werden konnte, dass durch *E. coli* BL21 pETectDHis Gd-Ectoin hydroxyliert und die hydroxylierte Version im Medium akkumuliert wurde, wurde in einem nächsten Schritt eine Fermentation durchgeführt, um die Hydroxylierung in Abhängigkeit von der Wachstumsphase zu untersuchen und um zu testen, ob das Ganzellsystem in größerem Kulturmaßstab einsetzbar ist. Dazu wurde *E. coli* BL21 pETectDHis in 3 L MM63-1/100Carb angezogen, die Expression des *ectD*-Gens in der exponentiellen Wachstumsphase mit IPTG induziert, die Kultur mit 1,5 mM Gd-Ectoin supplementiert und ein Salzschock auf 4 % NaCl durchgeführt. Während der Fermentation wurde der Wachstumsverlauf durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm manuell in einer Küvette überprüft und Proben von 50 bis 100 mL geerntet, deren Bligh und Dyer-Extrakte und Medienüberstände mittels HPLC auf Gd-Ectoin und OH-Gd-Ectoin untersucht wurden (Abb. 37 (a) und (b)).

In Abb. 37 wird gezeigt, dass nach dem Salzschock auf 4 % NaCl das Wachstum von *E. coli* BL21 pETectDHis einbrach. In den Zellen lag bereits 30 min nach dem Schock ausschließlich OH-Gd-Ectoin mit ca. 160 mg/g TG vor (Abb. 37 (a)). Außerdem wurde gezeigt, dass Trehalose als Osmolyt synthetisiert wurde und der Gehalt während des Fermentationsverlaufs auf 40 mg/g TG anstieg. Zum Zeitpunkt der Ernte lagen 130 mg OH-Gd-Ectoin/g TG und 40 mg Trehalose/g TG in den Zellen vor.

Im Medium wurden bis zu 2,5 h nach Durchführung des Salzschocks neben OH-Gd-Ectoin noch geringe Mengen der unhydroxylierten Version detektiert (Abb. 37 (b)). Bereits 5,5 h nach dem Schock lag ausschließlich die hydroxylierte Form im Medium in einer Konzentration von nur 0,4 mM vor. Aus zeitlichen Gründen konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit die hydroxylierte Verbindung nicht mehr aus dem Medium aufgereinigt werden. Eine erste Untersuchung zum Effekt von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* wurde im nächsten Abschnitt durchgeführt.

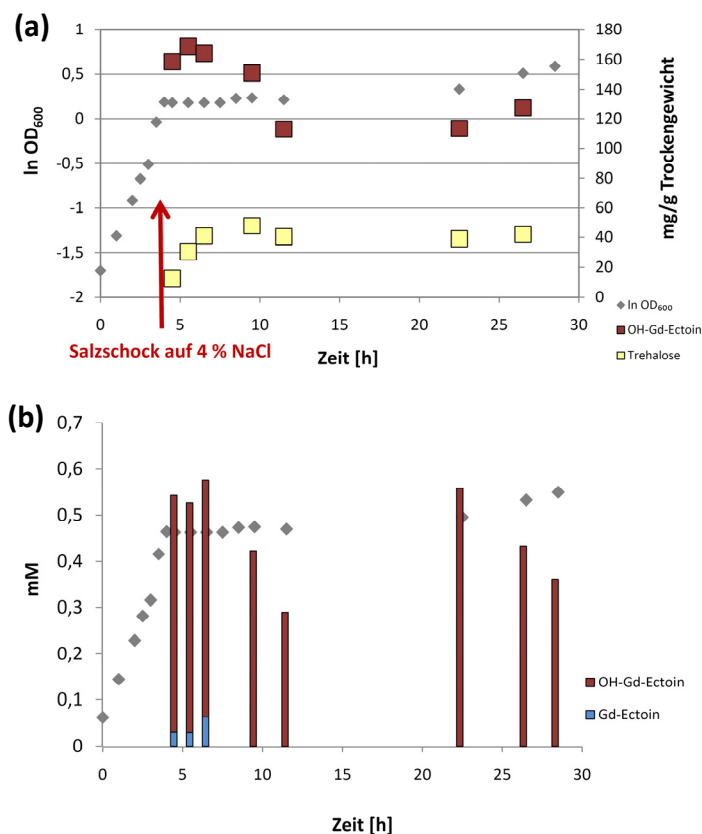


Abb. 37 Fermentationsverlauf von *E. coli* BL21 pETectDHis nach Gd-Ectoin-Supplementierung

Dargestellt ist (a) der Fermentationsverlauf der Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch *E. coli* BL21 pETectDHis. Der Stamm wurde in MM63-1/100Carb angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase die Expression des *ectD*-Gens mit 0,5 mM IPTG induziert. Anschließend wurde die Kultur mit 1,5 mM Gd-Ectoin supplementiert und auf eine Salinität von 4 % NaCl geschockt. Zur Bestimmung des Solutegehalts (a) in den Zellen (in mg/g TG) und (b) im Medium (in mM) wurden nach dem Salzschock Proben entnommen, die mit Hilfe der HPLC analysiert wurden.

8.5. Einfluss von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli*

Um zu überprüfen, ob OH-Gd-Ectoin ebenfalls einen negativen Effekt auf das Wachstum von *E. coli* ausübt, wurde *E. coli* BL21 pETectDHis in Minimalmedium unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen Gd-Ectoin bei Salinitäten 1-3 % NaCl angezogen und die relative Wachstumsrate im Vergleich zu Kontrollkulturen, die ohne Solut angezogen wurden, bestimmt (Abb. 38). Da die hydroxylierte Version von Gd-Ectoin noch nicht rein vorlag, in Abschnitt III. 8.3 aber gezeigt werden konnte, dass *E. coli* BL21 pETectDHis auch ohne IPTG-Induktion Gd-Ectoin hydroxyliert, wurde dieses System genutzt, um einen ersten Hinweis über den Einfluss von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* zu erhalten. Durch intrazelluläre Umwandlung von Gd-Ectoin zu OH-Gd-Ectoin konnte so indirekt der Effekt der hydroxylierten Verbindung überprüft werden.

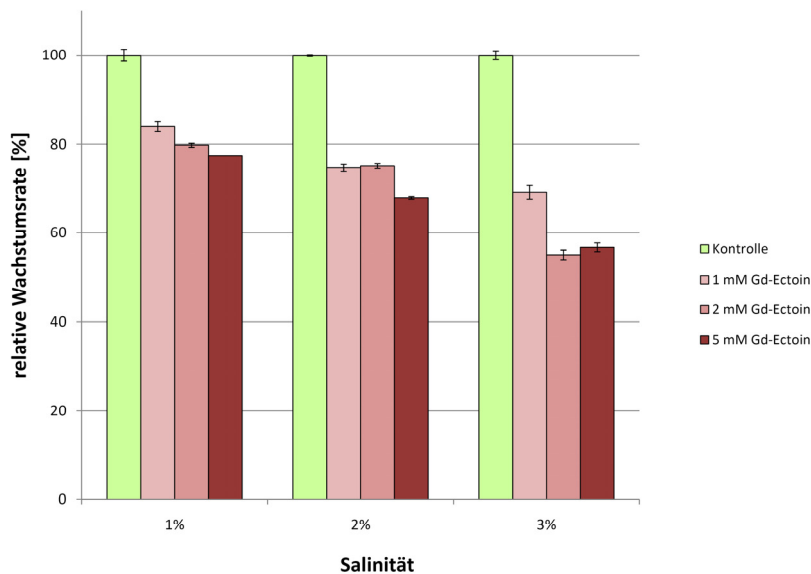


Abb. 38 Effekt von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* BL21 pETectDHis

Dargestellt ist die relative Wachstumsrate von *E. coli* BL21 pETectDHis nach Anzucht in Minimalmedium bei verschiedenen Salinitäten und Gd-Ectoin-Konzentrationen. Dazu wurde der Stamm bei Salinitäten von 1 % bis 3 % NaCl und Gd-Ectoin-Konzentrationen von 1 mM, 2 mM und 5 mM in Mikrotiterplatten bei 37 °C angezogen. Da die Basalexpression des *ectD*-Gens in diesem System ausreichte, um Gd-Ectoin innerhalb von *E. coli* BL21 pETectDHis zu hydroxylieren, wurde der Stamm ohne IPTG-Induktion angezogen. Die Wachstumsrate wurde in der exponentiellen Phase bestimmt und in Relation zur Kontrolle, die ohne Solut angezogen wurde, gesetzt.

Nach Bestimmung der relativen Wachstumsraten zeigte sich, dass nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Gd-Ectoin das Wachstum von *E. coli* BL21 pETectDHis gehemmt wurde. Bereits bei einer Salinität von 1 % NaCl sank die relative Wachstumsrate auf 80 % im Vergleich zur Kontrolle, die ohne Solut angezogen wurde. Bei einer Anzucht in 2 %igem Medium verringerte sich die relative Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle auf einen Wert von ca. 70 %, bei einer Salinität von 3 % NaCl und Supplementierungen mit 2 mM und 5 mM Gd-Ectoin auf unter 60 %.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe des Ganzzellbiokatalyse-Systems *E. coli* BL21 pETectDHis eine neue hydroxylierte Substanz (OH-Gd-Ectoin) biosynthetisiert werden konnte, die nach ersten Untersuchungen ebenfalls einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* ausübt.

8.6. *H. elongata* WUB02 (Δ ectAC) pWUB_ectD_Hel als Alternative zum Ganzzellsystem

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Ganzzellbiokatalyse-System in *E. coli* ein Stamm konstruiert, der eine Aufreinigung der hydroxylierten Verbindungen aus den Zellen ermöglichen könnte. Dazu wurde die von Witt *et al.* (2011) konstruierte Doppelmutante *H. elongata* WUB02 genutzt, bei der es durch Deletion des *ectA*- und *ectC*-Gens zu keiner Akkumulation von kompatiblen Soluten wie Ectoin oder ADPC kommt. Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid pWUB_ectD_Hel konjugiert, in dem das *ectD*-Gen unter Kontrolle des optimierten, osmoregulierbaren Promotorbereichs *promKB1* liegt und mit dem eine deutliche Expression des *ectD*-Gens gezeigt werden konnte (Abschnitt III. 3, Abb. 17). Zur Untersuchung der Hydroxylierung von Gd-Ectoin wurde dieser Stamm in MM63-2/50Cm angezogen, bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 2 mM Gd-Ectoin supplementiert und ein Salzschock auf 5 % NaCl durchgeführt, der zur Aufnahme des Solut in die Zellen und zur Expression des *ectD*-Gens führte. In der exponentiellen und in der stationären Phase wurden jeweils zwei Kulturen geerntet und auf ihren Solutegehalt mittels HPLC und ¹³C-NMR-Spektroskopie untersucht (Abb. 39 und Abb. 40).

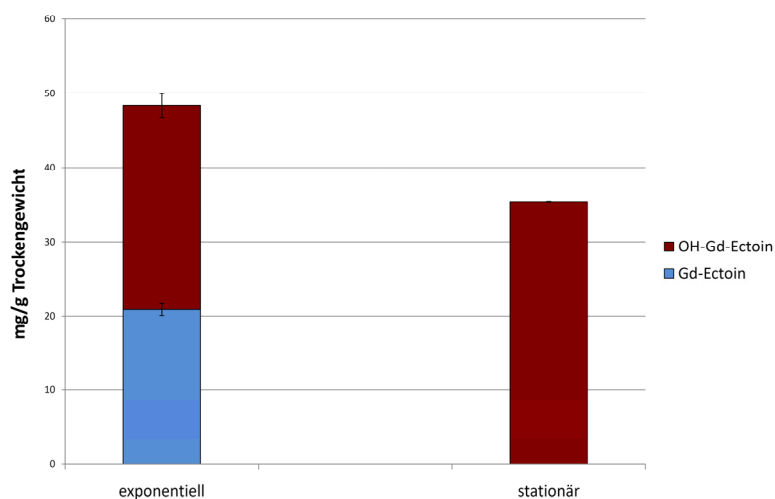


Abb. 39 Gd-Ectoin und OH-Gd-Ectoin-Gehalt in den Zellen von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel

Dargestellt ist der zelluläre Solutegehalt (in mg/g TG) von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel nach Supplementierung mit Gd-Ectoin und Durchführung eines Salzschocks. Der Stamm wurde in MM63-2/50Cm angezogen, bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 2 mM Gd-Ectoin supplementiert und auf eine Salinität von 5 % NaCl geschockt. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen und in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Extrakte mittels HPLC analysiert.

Die in der späten exponentiellen Phase geernteten Zellen wiesen neben Gd-Ectoin (20 mg/g TG) bereits OH-Gd-Ectoin in den Zellen auf (30 mg/g TG). Bei den stationär geernteten Zellen sank der Gesamtsolutegehalt auf ca. 35 mg/g TG, allerdings lag hier nur noch die hydroxylierte Version vor. Eine Konvertierung zum Hydroxyderivat mit diesem Stamm war also erfolgreich.

Die Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch EctD konnte auch mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Das Spektrum der exponentiell geernteten Kultur zeigte Signale, die Gd-Ectoin sowie OH-Gd-Ectoin zugeordnet werden konnten (Abb. 40 (a)). Durch Hydroxylierung von Gd-Ectoin kam es zu einer chemischen Verschiebung der Gd-Ectoin typischen Signale. Außerdem wurde deutlich, dass *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel neben diesen beiden Soluten zusätzlich Glutamat und Glutamin als osmoregulatorische Solute in den Zellen akkumulierte. Das ^{13}C -NMR-Spektrum der stationär geernteten Zellen zeigte nur noch Signale, die der hydroxylierten Version von Gd-Ectoin entsprachen (Abb. 40 (b)). Neben Glutamat und Glutamin konnten weitere Signale im Bereich zwischen 70 und 100 ppm detektiert werden, die auf verbleibende Glucose aus dem Zellzwischenwasser deuteten.

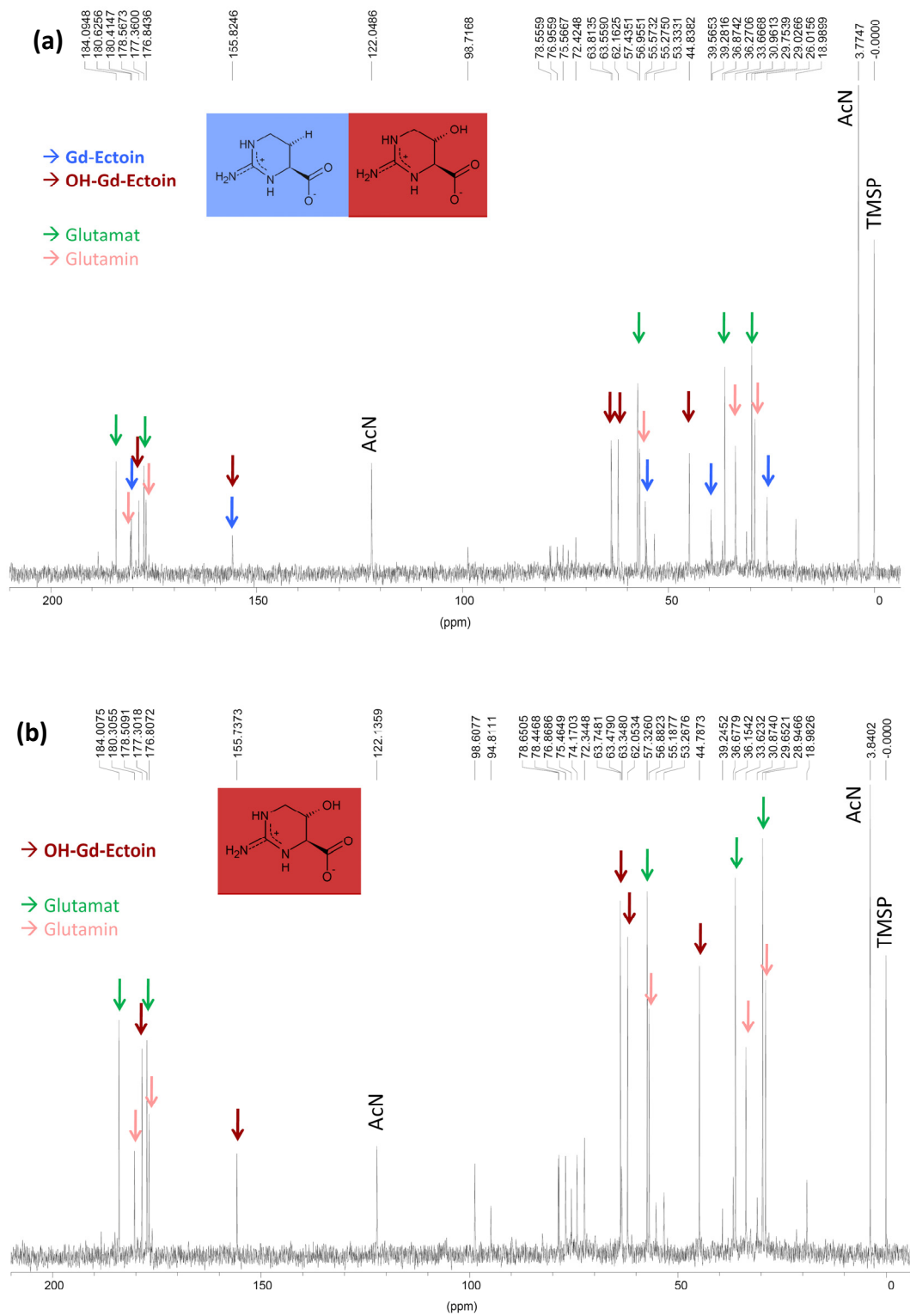


Abb. 40 ^{13}C -NMR-Spektren der Zellextrakte von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel

Abgebildet sind die ^{13}C -NMR-Spektren von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel Kulturen, die (a) in der späten exponentiellen und (b) in der stationären Phase geerntet wurden. Die Zellen wurden wie in Abb. 39 beschrieben angezogen und die Blich und Dyer-Extrakte analysiert. Neben den Signalen für Gd-Ectoin (blaue Pfeile) und OH-Gd-Ectoin (dunkelrote Pfeile) sind Glutamat (grün) und Glutamin (rosa) sowie der interne Standard Na-Trimethylsilylpropionat (TMSP) und Acetonitril (AcN) zu erkennen.

9. *In vitro* Untersuchungen der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata*

Wie in Abschnitt III. 7 beschrieben, wurde mit Hilfe von *E. coli* BL21 pETectDHis ein Ganzzellbiokatalyse-System zur Hydroxylierung von neuen Verbindungen etabliert. In diesem System wurde das *ectD*-Gen mit einem C-terminalen His₆-tag versehen, um es mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufzureinigen (Abb. 27). So sollte EctD näher charakterisiert und Untersuchungen zur Hydroxylierung von neuen Substraten durchgeführt werden.

9.1. Aufreinigung von EctDHis mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Zur Überexpression und Aufreinigung von EctDHis wurde der Stamm *E. coli* BL21 pETectDHis in LBG-2/100Carb unter Zusatz der Spurenelementlösung TES und unter Zusatz von 1 mM FeSO₄ angezogen, um das für die katalytische Aktivität von EctD notwendige Fe²⁺ in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. 3,5 h nach Induktion der Expression wurden die Zellen geerntet, über Ultraschall aufgeschlossen, das Zelllysate mit Ni-NTA-Agarose versetzt und EctDHis aufgereinigt.

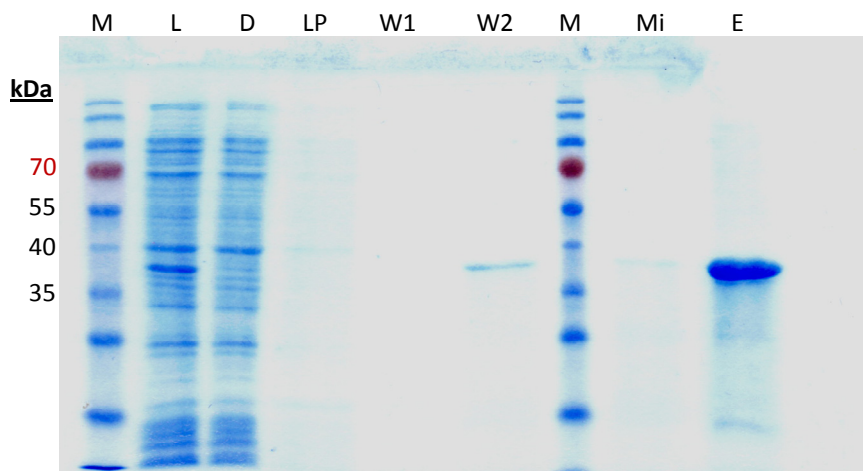


Abb. 41 SDS-Polyacrylamidgel des Aufreinigungsverlaufs von EctDHis mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Dargestellt ist ein 13 %iges SDS-Polyacrylamidgel des Aufreinigungsverlaufs von EctDHis. *E. coli* BL21 pETectDHis wurde in LBG-2/100Carb (TES, 1 mM FeSO₄) angezogen und die Expression von EctDHis bei einer OD₆₀₀ von 0,4 mit IPTG (0,5 mM) induziert. 3,5 h nach der Induktion wurde die Kultur geerntet und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Aufreinigung von EctDHis erfolgte durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie (Abschnitt II. 15.3). M: Proteinmarker; L: Lysat; D: Durchlauf; LP: Lysispuffer; W1: Waschpuffer 1 (20 mM Imidazol); W2: Waschpuffer 2 (50 mM Imidazol); Mi: Durchfluss nach Pufferwechsel mit Microcon; E: Eluat.

In Abb. 41 wird gezeigt, dass die Überexpression und Aufreinigung von EctDHis erfolgreich war. Im Zellysate (L) konnte eine verstärkte Proteinbande zwischen 35 kDa und 40 kDa beobachtet werden, die nach Nickelchelate-Affinitätschromatographie von allen anderen zellulären Proteinen getrennt wurde und EctDHis mit einem theoretischen Molekulargewicht von 38,9 kDa entsprach.

9.2. Aktivitätstests mit aufgereinigtem EctDHis

Das aufgereinigte Enzym EctDHis wurde in einem nächsten Schritt in Aktivitätstests eingesetzt. In Anlehnung an die Arbeit von Bursy *et al.* (2007), die für die Ectoinhydroxylase aus *V. salexigens* einen solchen Aktivitätstest entwickelten, wurde mit EctDHis getestet, ob das natürliche Substrat Ectoin zu Hydroxyectoin umgewandelt wird. Neben dem Substrat wurde in den Aktivitätstest der Kofaktor α -Ketoglutarat und FeSO_4 eingesetzt. Weiterhin wurde der Test unter aeroben Bedingungen durchgeführt, da molekularer Sauerstoff für die Hydroxylierungsreaktion essentiell ist (Abschnitt II. 15.6). Nach HPLC-Analysen wurde jedoch deutlich, dass das Substrat Ectoin nicht zu Hydroxyectoin umgesetzt wurde. Auch veränderte Anzuchtbedingungen unter höheren Salinitäten während der Überexpression von EctDHis führten nach der Aufreinigung zu keiner Aktivität von EctDHis.

Um auszuschließen, dass EctDHis bereits nach dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbehandlung inaktiv vorlag, wurde das Zellysate in den Aktivitätstest eingesetzt. Dazu wurde die Kultur in LBG-x/100Carb (x: 1 bis 4 % NaCl, TES, 1 mM FeSO_4) angezogen, die Expression von EctDHis mit IPTG induziert und nach 4 h geerntet. Nach dem Aufschluss der Zellen und Einsatz des Zellysats in den Aktivitätstest konnte dann mittels HPLC detektiert werden, dass es zu einer Umsetzung zu Hydroxyectoin kam (nicht dargestellt).

Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, dass EctDHis nach der Nickelchelate-Affinitätschromatographie seine Aktivität verloren haben muss. Durch Anwendung der His-tag Methode und der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose kann dem Enzym möglicherweise essentielles Eisen entzogen werden, da es wie Ni^{2+} mit dem Säulenmaterial komplexiert. Daher wurde in einem nächsten Schritt getestet, ob eine Lagerung von aufgereinigtem EctDHis in eisenhaltigem Aktivitätspuffer zu einer anschließenden Hydroxylierung von Ectoin führt. Nach dieser über Nacht Lagerung

konnte für EctDHis zumindest eine geringe Hydroxylierungsaktivität beobachtet werden.

Zusammenfassend kann daher geschlossen werden, dass für *in vitro*-Untersuchungen der Ectoinhydroxylase das mit einem C-terminalen His-tag versehene EctD nicht geeignet ist. Daher wurde im nächsten Abschnitt eine andere Möglichkeit der Aufreinigung von heterolog exprimiertem EctD gewählt.

9.3. Konstruktion von pASKectDStrep zur Expression des Fusionsproteins EctDStrep

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, konnte für das mit Hilfe der Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigte EctDHis keine Aktivität mehr *in vitro* nachgewiesen werden. Daher wurde, um eine mögliche Komplexbildung des essentiellen Eisens auszuschließen, der Vektor pASKectDStrep konstruiert, bei dem das *ectD*-Gen carboxyterminal mit einem Strep-tag®II fusioniert ist.

Das Klonierungsschema von pASKectDStrep ist in Abb. 42 dargestellt. Das *ectD*-Gen wurde mittels PCR und der Primer EctDStrep_for und EctDStrep_rev amplifiziert und nach erfolgter Restriktion mit *Bsal* in den mit dem gleichen Restriktionsenzym linearisierten Vektor pASK-IBA3 kloniert. Bei dem fertigen Konstrukt liegt das Fusionsprotein EctDStrep unter der transkriptionellen Kontrolle des Tetracyclin-abhängigen Promotors, der durch Zugabe von Anhydrotetracyclin induziert wird. pASKectDStrep wurde nach erfolgreicher Klonierung in *E. coli* DH5 α transformiert.

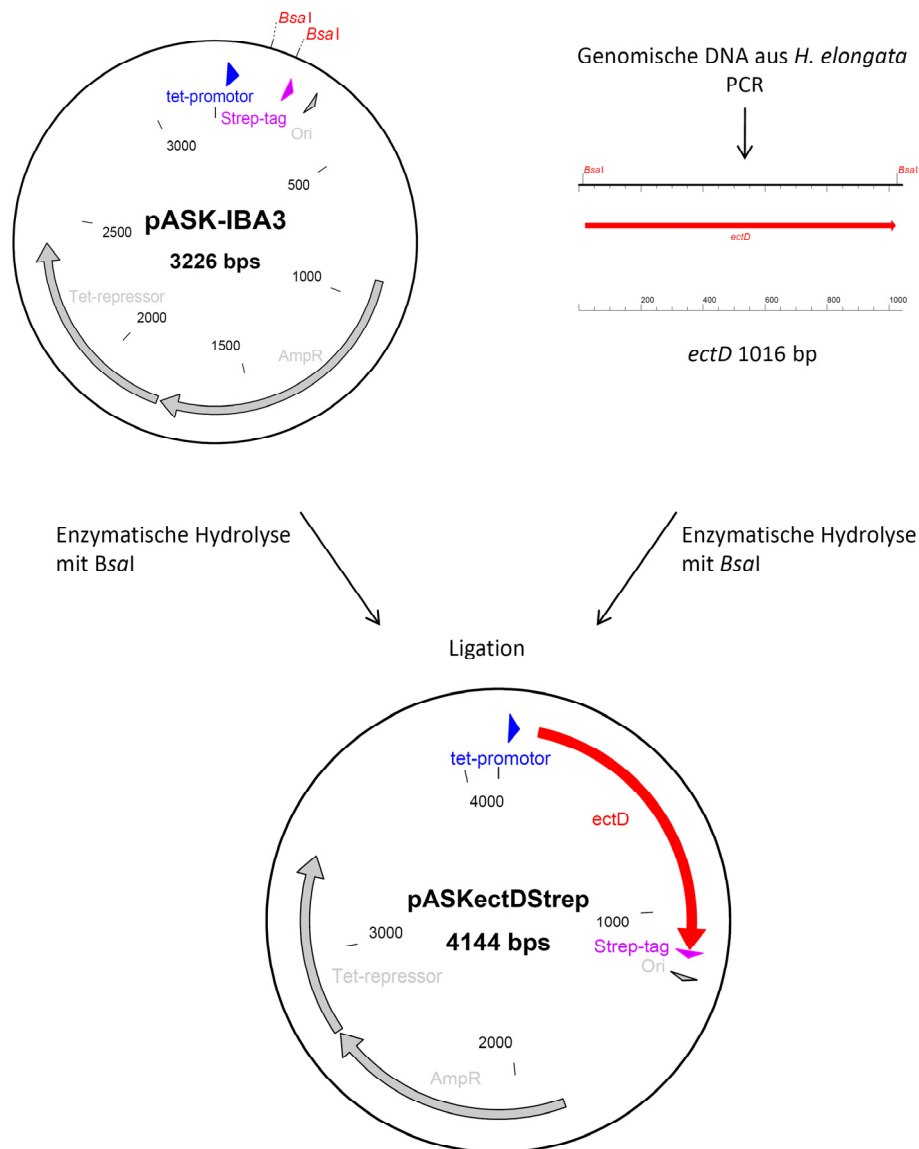


Abb. 42 Klonierungsstrategie zur Konstruktion von *pASKectDStrep*

Dargestellt ist das Klonierungsschema zur Herstellung des Vektors *pASKectDStrep*. Abgebildet ist neben dem Ausgangsplasmid *pASK-IBA3* das *ectD*-Gen aus *H. elongata*. Letzteres wurde per PCR mit den Primern *EctDStrep_for* und *EctDStrep_rev* amplifiziert, mit *BsaI* hydrolysiert und anschließend in den mit *BsaI* linearisierten und dephosphorylierten Vektor *pASK-IBA3* ligiert. Als Vektorkonstrukt entstand *pASKectDStrep* mit einer Größe von 4144 bp, bei dem das *ectD*-Gen unter Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promotors liegt und C-terminal mit einem Strep-tag versehen ist.

9.4. Gesamtproteinaufreinigung von *E. coli* DH5 α *pASKectDStrep* zur Überprüfung der Expression

Nach erfolgreicher Konstruktion des Plasmids *pASKectDStrep* wurde untersucht, ob mit Hilfe dieses Systems *EctDStrep* exprimiert wird. Dazu wurde *E. coli* DH5 α *pASKectDStrep* in AB-05/100Carb angezogen und die Expression von *EctDStrep* mit

0,2 µg/mL Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. Das Gesamtprotein des Stammes wurde vor sowie nach der Induktion isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert.

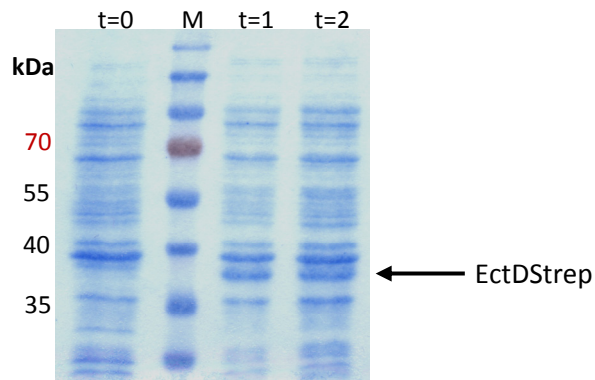


Abb. 43 SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung von *E. coli* DH5α pASKectDStrep

Dargestellt ist ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel der Gesamtproteinaufreinigung von *E. coli* DH5α pASKectDStrep. Der Stamm wurde in AB-0,5/100Carb angezogen und die Expression von EctDStrep mit 0,2 µg/mL AHT induziert. Es wurden 10 mL-Proben für die Gesamtproteinaufreinigung vor (t=0) sowie eine (t=1) und zwei (t=2) Stunden nach der Induktion entnommen. Jeweils 20 µg Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. EctDStrep besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 38,6 kDa. M: Proteinmarker.

In Abb. 43 wird gezeigt, dass eine Stunde nach der Induktion mit AHT eine Proteinbande zwischen 35 kDa und 40 kDa auftrat, die zum Zeitpunkt t=0 noch nicht vorlag und EctDStrep mit einem theoretisch vorausgesagten Molekulargewicht von 38,6 kDa entsprach. Eine Expression von EctDStrep mit Hilfe dieses Systems war also gegeben und steht zukünftig für *in vitro*-Studien an EctDStrep und weiteren Analysen zur Hydroxylierung von (in)kompatiblen Soluten zur Verfügung.

Ergebnisse (Teil III: *Escherichia coli* und die Totalsynthese der Edukte)

10. Untersuchungen an *E. coli* DH5α pAKECT1 zur heterologen Produktion von Ectoin

In vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass mit Hilfe des Ganzzellsystems Ectoin und andere zyklische Verbindungen hydroxyliert wurden und die hydroxylierte Version im Medium akkumuliert wurde. Allerdings musste dafür dem System das Substrat von außen angeboten werden, so dass dieses unter Salzstress in die Zelle

aufgenommen und dort hydroxyliert wird. In diesem Versuchsabschnitt geht es daher um die Totalsynthese des Eduktes Ectoin.

Durch heterologe Expression der Ectoin-Biosynthesegene ist *E. coli* in der Lage, das kompatible Solut Ectoin zu synthetisieren, so dass dieses nicht mehr dem Medium zugefügt werden muss. Diese Arbeiten beruhen auf den Ergebnissen von Bestvater *et al.* (2008), der mit Hilfe des Plasmids pAKECT1 eine Ectoin-Synthese in *E. coli* DH5 α nachweisen konnte. Wie in Abschnitt I. 7.2 erläutert, enthält pAKECT1 die Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* aus *M. halophilus* unter Kontrolle des eigenen salzinduzierbaren *promA*-Promotors. Zur Umgehung des metabolischen Flaschenhalses in *E. coli* (Reaktion von Aspartat zu Aspartylphosphat, Abb. 2) besitzt das Plasmid weiterhin das Gen einer deregulierten Aspartokinase *lysC* aus *C. glutamicum* MH20-22B unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Durch Koexpression dieser deregulierten Aspartokinase wurde der metabolische Flaschenhals der Ectoin-Produktion in *E. coli* umgangen. Auffällig war allerdings, dass der Ectoin-Gehalt ab einer Salinität von 3 % NaCl nicht weiter anstieg, sondern konstant bei 0,4 mmol/g TG blieb (Bestvater *et al.*, 2008).

Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit *E. coli* DH5 α pAKECT1 in MM63/50Cm (VA) bei Salinitäten von 1 bis 4 % NaCl angezogen, die Expression des deregulierten Aspartokinase-Gens *lysC* bei einer OD₆₀₀ von 0,4 mit IPTG induziert, die Zellen in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Extrakte mittels HPLC analysiert. Als Negativkontrolle diente *E. coli* DH5 α .

In Abb. 44 ist ein salinitätsabhängiger Anstieg der internen Solutekonzentration gezeigt. Während die Negativkontrolle *E. coli* DH5 α ausschließlich Trehalose als Antwort auf Osmostress akkumulierte, fand sich in den Zellen von *E. coli* DH5 α pAKECT1 Ectoin, wie es auch schon Bestvater *et al.* (2008) detektierten. Allerdings konnte ab einer Konzentration von 2 % NaCl in den Zellen von *E. coli* DH5 α pAKECT1 eine zusätzliche Trehalose-Akkumulation beobachtet werden. Bei einer Salinität von 4 % NaCl lagen bereits 0,37 mmol Trehalose/g TG in den Zellen vor, weshalb der Ectoin-Gehalt von *E. coli* DH5 α pAKECT1 ab einer Salinität von 3 % NaCl nicht weiter anstieg. Im Medium konnte kein Ectoin detektiert werden. Im Hinblick auf einen Ectoin-produzierenden Stamm, der industriell eingesetzt werden könnte, war die Tatsache, dass neben Ectoin Trehalose akkumuliert wurde, weniger geeignet. Daher

wurde im nächsten Abschnitt die Ectoin-Synthese in einem trehalosedefizienten *E. coli*-Stamm untersucht.

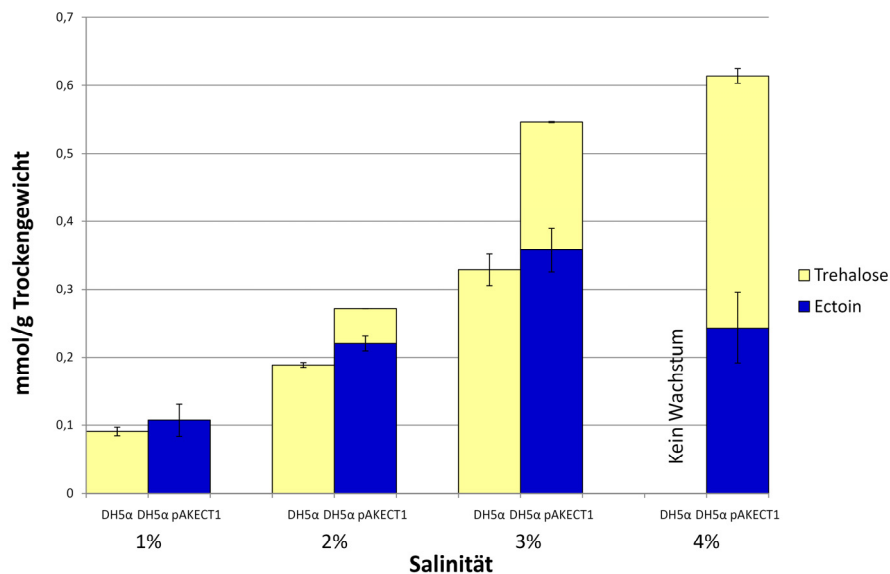


Abb. 44 Intrazellulärer Solutegehalt von *E. coli* DH5α und *E. coli* DH5α pAKECT1 bei verschiedenen Salinitäten

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mmol/g TG) an Ectoin (blau) und Trehalose (gelb) von *E. coli* DH5α und *E. coli* DH5α pAKECT1. Dazu wurden die Stämme in Minimalmedium (MM63-x/ ggf. 50Cm (VA)) bei verschiedenen Salinitäten (x: 1-4 % NaCl) und einer Temperatur von 37 °C angezogen und die Expression des deregulierten Aspartokinase-Gens *lysC* mit 0,5 mM IPTG in der exponentiellen Phase induziert. Die Kulturen wurden in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC analysiert.

10.1. Ectoin-Produktion des trehalosedefizienten Stammes *E. coli* BKA-13 pAKECT1

Da im Zuge einer heterologen Produktion von Ectoin bzw. Hydroxyectoin Trehalose ein Störfaktor ist, wurde im Folgenden ein trehalosedefizienter *E. coli*-Stamm mit dem Plasmid pAKECT1 transformiert. Trehalose wird in osmotisch gestressten *E. coli* Zellen *de novo* synthetisiert. Verantwortlich für die Synthese von Trehalose sind die Enzyme OtsA (Trehalose-6-phosphat-Synthase) und OtsB (Trehalose-6-Phosphatase), deren Gene im Genom als Operon organisiert unter Kontrolle eines osmoregulierbaren Promotors vorliegen (Giaever *et al.*, 1988; Strøm und Kaasen, 1993; Kaasen *et al.*, 1994). Burdziak (2006) konstruierte den Stamm *E. coli* BKA-13, indem das *otsB*-Gen vollständig im Genom von *E. coli* MKH13 ausgeschaltet wurde. Da das *otsB*-Gen 26 bp mit dem stromabwärts liegenden *otsA*-Gen überlappt, wurde durch Deletion von *otsB* auch die Anfangssequenz von *otsA* deletiert, was in einem vollständigen Verlust der

Trehalose-Synthese resultierte. Da *E. coli* MKH13 (Haardt *et al.*, 1995) der Ursprungstamm für die Konstruktion von *E. coli* BKA-13 war, sind neben der Deletion der Trehalose-Biosynthesegene auch verschiedene Transportergene (*putPA*, *proP*, *proU* und *betT*) deletiert.

Zur Untersuchung der Ectoin-Produktion in *E. coli* BKA-13 wurde der Stamm mit dem Plasmid pAKECT1 transformiert und eine Minifermentation durchgeführt. Dabei wurde der Stamm in MM63-1/50Cm (VA) angezogen, die Expression des *lysC*-Gens mit IPTG induziert und die Kultur auf eine Salinität von 3 % NaCl geschockt. In regelmäßigen Abständen wurden 2 mL-Proben gezogen, deren Blich und Dyer-Zellextrakte und Medienüberstände auf Ectoin hin untersucht wurden (Abb. 45).

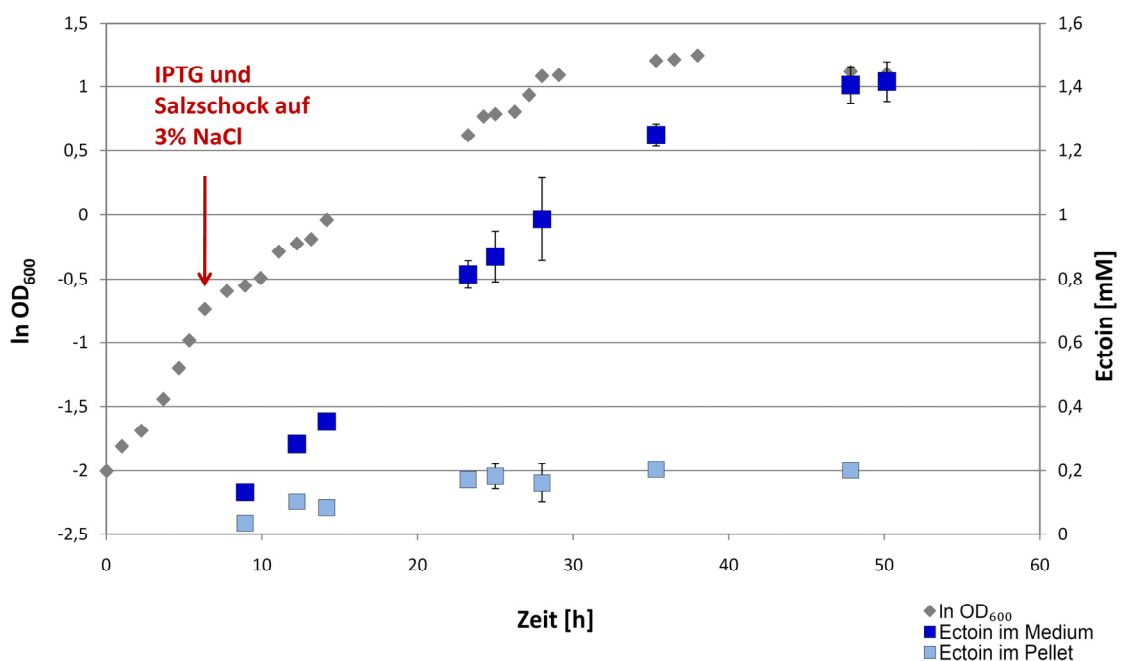


Abb. 45 Fermentationsverlauf und Ectoin-Produktion von *E. coli* BKA-13 pAKECT1

Abgebildet ist der Fermentationsverlauf von *E. coli* BKA-13 pAKECT1 und die Ectoin-Konzentration in den Zellen (hellblau) sowie im Medium (dunkelblau) in mM. Der Stamm wurde in MM63-1/50Cm (VA) angezogen, die Expression des *lysC*-Gens in der exponentiellen Phase mit 0,5 mM IPTG induziert und ein Salzschock auf 3 % NaCl durchgeführt. Die Wachstumsrate nach dem Salzschock und Induktion durch IPTG betrug $\mu = 0,08 \text{ h}^{-1}$.

Nach anfänglichem Wachstum in MM63-1/50Cm (VA) und der Durchführung eines Salzschocks auf 3 % NaCl brach das Wachstum von *E. coli* BKA-13 pAKECT1 zunächst ein, ging dann aber in exponentielles Wachstum über und erreichte eine End-OD₆₀₀ von ca. 3. Nach Analyse der Medienüberstände wurde deutlich, dass bereits eine Stunde nach dem Salzschock Ectoin im Medium detektiert werden konnte. Im Laufe

der Fermentation stieg der Ectoin-Gehalt im Medium kontinuierlich auf einen Wert von 1,4 mM an, während der Gehalt in den Zellen konstant bei ca. 0,2 mM blieb. Nach Ernte der Kultur und Analyse des Bligh und Dyer-Zellextraktes lagen nur ca. 1,5 mg Ectoin/g TG in den Zellen vor (nicht dargestellt).

In einer weiteren Fermentation wurde die Kultur nach Verbrauch der C-Quelle Glucose (nach ca. 28 h) zusätzlich mit 2,5 g/L Glucose nachgefüttert. Eine weitere Akkumulation von Ectoin im Medium im Vergleich zu der in Abb. 45 dargestellten Menge konnte aber nicht beobachtet werden (nicht gezeigt).

Bei *E. coli* BKA-13 pAKECT1 handelt es sich also um einen Ectoin-produzierenden Stamm, der das Solut kontinuierlich ins Medium ausschied. Bei einem Salzschock auf 3 % NaCl besitzt das System eine spezifische Produktionsrate von 20 mg (g TG⁻¹) h⁻¹. Im nächsten Abschnitt sollte daher die Ectoinhydroxylase EctD zur heterologen Produktion von Hydroxyectoin in das Plasmid pAKECT1 inseriert werden.

10.2. Konstruktion von pAKECT1-*tacctD* zur heterologen Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli*

Da gezeigt werden konnte, dass *E. coli* BKA-13 pAKECT1 Ectoin produziert und es ins Medium ausscheidet, wurde zusätzlich das *ectD*-Gen aus *H. elongata* in den Vektor pAKECT1 integriert, so dass das heterolog gebildete Ectoin mit Hilfe der exprimierten Ectoinhydroxylase zu Hydroxyectoin umgewandelt wird. Dazu wurde das *ectD*-Gen aus *H. elongata* mit den Primern pAKECTectD_3 und pAKECTectD_4 amplifiziert und mittels SOE-PCR mit dem zuvor mit den Primern pAKECTtac_1 und pAKECTtac_2 amplifizierten *tac*-Promotor fusioniert. Nach enzymatischer Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym *NruI*, das glatte Enden generiert, wurde das Fusionsprodukt *tacctD* in den mit *NruI* linearisierten Vektor pAKECT1 ligiert, so dass als fertiges Konstrukt pAKECT1-*tacctD* entstand (Abb. 46). Bei diesem Konstrukt lag das *ectD*-Gen somit unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Das fertige Plasmid wurde anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert.

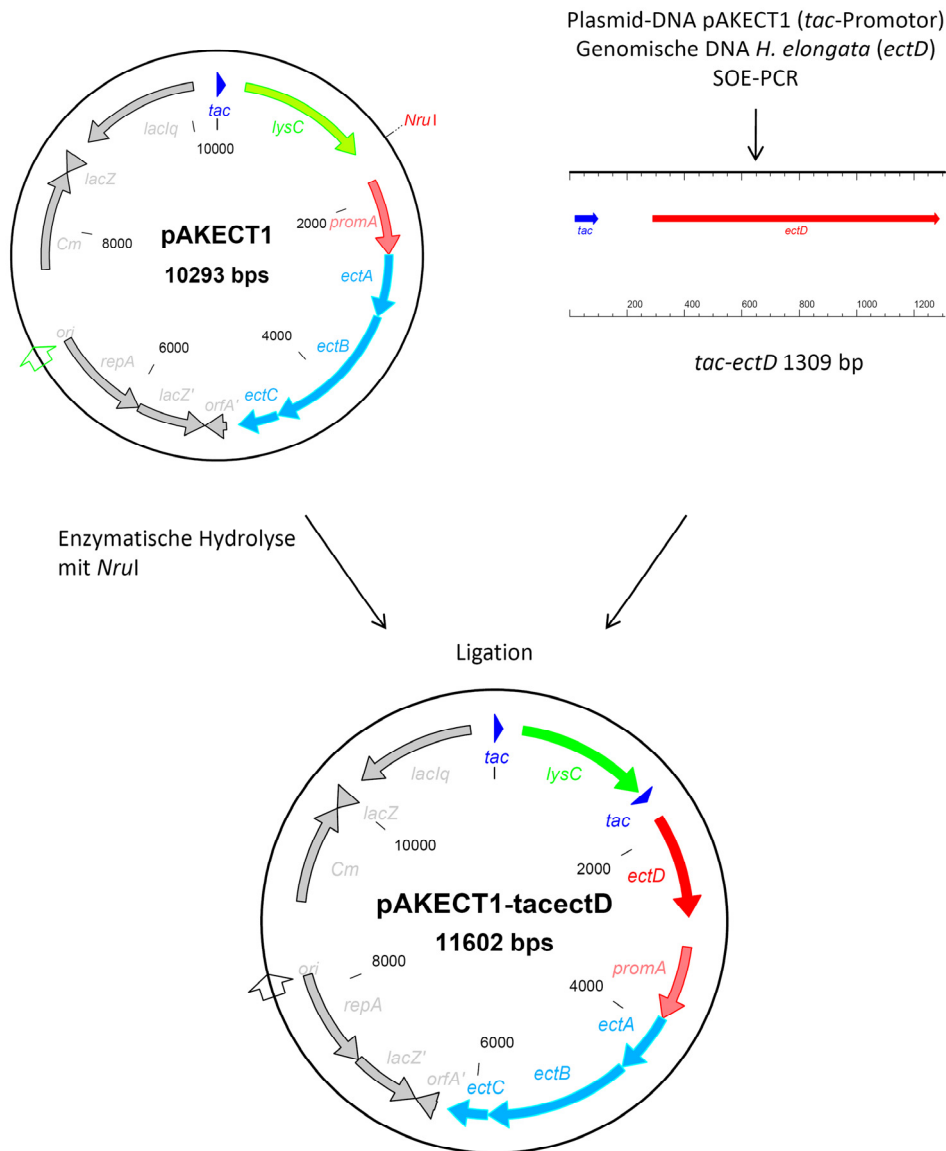


Abb. 46 Konstruktion von **pAKECT1-tacetD**

Dargestellt ist das Klonierungsschema zur Konstruktion von pAKECT1-tacetD. Der *tac*-Promotor wurde mit den Primern pAKECTtac_1 und pAKECTtac_2 aus dem Plasmid pAKECT1 amplifiziert. Das *ectD*-Gen aus *H. elongata* wurde mit den Primern pAKECTectD_3 und pAKECTectD_4 amplifiziert. Mit Hilfe der SOE-PCR wurden die beiden in getrennten PCR-Reaktionen entstandenen Fragmente fusioniert. Nach Linearisierung von pAKECT1 durch *NruI* wurde das PCR-Produkt ohne vorherige Restriktion in den *blunt end*-hydrolysierten Vektor ligiert. Als Endkonstrukt entstand pAKECT1-tacetD mit einer Größe von 11602 bp.

10.3. Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* DH5 α pAKECT1-tacetD

Zur Überprüfung der heterologen Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* DH5 α pAKECT1-tacetD wurde der Stamm in MM63-x/50Cm (VA) angezogen (x: 1-4 % NaCl), die

Expression von *lysC* und *ectD* mit IPTG induziert, die Zellen in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC analysiert (Abb. 47).

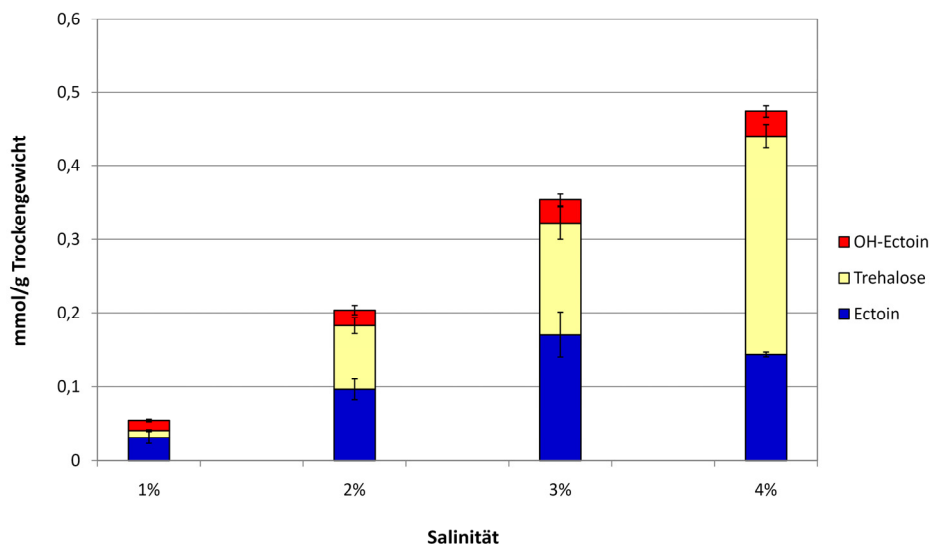


Abb. 47 Intrazellulärer Solutegehalt von *E. coli* DH5 α pAKECT1-*tacectD* bei verschiedenen Salinitäten

Dargestellt ist der zelluläre Gehalt (in mmol/g TG) an Ectoin (blau), Trehalose (gelb) und Hydroxyectoin (rot) von *E. coli* DH5 α pAKECT1-*tacectD*. Dazu wurde der Stamm in Minimalmedium (MM63-x/50Cm (VA)) bei verschiedenen Salinitäten (x: 1-4 % NaCl) und einer Temperatur von 37 °C angezogen und die Expression von *lysC* und *ectD* mit 1 mM IPTG in der exponentiellen Phase induziert. Die Kulturen wurden in der stationären Phase geerntet und die Bligh und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC analysiert. Die Fehlerbalken ergeben sich aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeweiliger Doppelbestimmung.

In Abb. 47 wird deutlich, dass der intrazelluläre Solutegehalt salinitätsabhängig anstieg. Trehalose machte einen großen Anteil der akkumulierten Solute aus. Bei einer Salinität von 4 % NaCl fanden sich ca. 0,3 mmol Trehalose/g TG in den Zellen von *E. coli* DH5 α pAKECT1-*tacectD*. Der Ectoin-Gehalt erreichte ab einer Salinität von 3 % NaCl einen Wert von ca. 0,15 mmol/g TG (20 mg/g TG). Durch Ko-Expression des *ectD*-Gens konnte eine intrazelluläre Hydroxyectoin-Synthese bei allen Salinitäten detektiert werden. Allerdings wurden bei Salinitäten von 3 % und 4 % NaCl nur ca. 0,03 mmol Hydroxyectoin/g TG (5 mg/g TG) in den Zellen nachgewiesen. Im Medium konnte auch hier kein Ectoin und Hydroxyectoin detektiert werden. Da das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis stark auf der Seite des Ectoins lag und keine vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin detektiert werden konnte, wurde dieser Versuch nicht in *E. coli* BKA-13 wiederholt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die heterologe Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* DH5 α pAKECT1-*tacectD* nicht vergleichbar mit den durch *H. elongata* erzielten Ergebnissen waren. Eine Hydroxylierung von Ectoin konnte zwar nachgewiesen werden, im Zuge eines heterologen Produktionsstammes sind allerdings weitere Optimierungen notwendig. Mit dem Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* BL21 pETectDHis konnte ein System etabliert werden, das eine Hydroxylierung von bislang 10 mM Ectoin ermöglicht. Dieses System steht in Zukunft für die Produktion von vor allem neuartigen hydroxylierten kompatiblen Soluten sowie dem inkompatiblen Solut Gd-Ectoin zur Verfügung. Als Alternative zum Ganzzellsystem wurde *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel konstruiert, mit dem die Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch NMR-Analysen verifiziert wurde. Für eine zukünftige industrielle Hydroxyectoin-Produktion hat sich der Stamm *H. elongata* bewährt. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wurde durch Konstruktion der genomischen Austauschmutanten *H. elongata* MaKu03 Δ ectB::*ectD*, *H. elongata* Δ ectB::*ectD* und *H. elongata* Δ ectB::*ectD* Δ promectD::*promKB1* bereits bei niedrigeren Salinitäten und Temperaturen ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 erzielt. Durch Optimierung der Anzuchtbedingungen konnte eine fast vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin detektiert werden.

IV. Diskussion

Kompatiblen Soluten wie Ectoin wird in den letzten Jahren aufgrund der protektiven Eigenschaften auf Makromoleküle sowie ganze Zellen immer mehr Beachtung geschenkt. Vor allem die kosmetische Industrie vermarktet Ectoin in verschiedenen Hautpflegeprodukten und Sonnenschutzmitteln als Feuchtigkeitsspender und UV-Schutz, aber auch in der medizinischen Forschung findet das Solut ein immer größer werdendes Interesse (Abschnitt I. 8). In vielen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass das 5-Hydroxyderivat (5-Hydroxyectoin), obwohl es sich von Ectoin nur in der funktionellen Hydroxylgruppe unterscheidet, andere protektive Eigenschaften besitzt, die zum Teil die Effekte von Ectoin übertreffen. So zeigten Borges *et al.* (2002), dass Hydroxyectoin die Lactatdehydrogenase am besten bei Hitzestress stabilisierte, während für Ectoin kein signifikanter Schutz beobachtet werden konnte. Auch bei Gefriertrocknungsprozessen von Modellenzymen oder ganzen Zellen (*E. coli* K12) zeigte Hydroxyectoin einen besseren Schutz als die nicht hydroxylierte Variante Ectoin (Lippert und Galinski, 1992; Louis *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Unterschiede besteht nicht nur ein großes Interesse der Industrie in der Produktion von Hydroxyectoin, sondern auch in der Produktion anderer neuartiger hydroxylierter Verbindungen, die in Zukunft Ectoin in den bislang vermarkteten Produkten ersetzen oder weitere Anwendungsbereiche erschließen könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Hydroxylierung von Ectoin und anderen kompatiblen Soluten sowie dem inkompatiblen Solut Gd-Ectoin durch die Ectoinhydroxylase EctD aus *Halomonas elongata* untersucht.

Bei EctD handelt es sich um eine Nicht-Häm-Fe(II)- α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenase, die mit Hilfe von α -Ketoglutarat und molekularem O₂ die Hydroxylierung von Ectoin katalysiert (Abschnitt I. 5.1, Abb. 3; Prabhu *et al.*, 2004; Ures, 2005; Bursy *et al.*, 2007). Bislang wird zur großtechnischen Produktion von Hydroxyectoin *H. elongata* DSM 2581^T genutzt (bitop AG, persönliche Mitteilung). Unter Hochsalzbedingungen (11 % NaCl) und einer Temperatur von 43 °C wird von *H. elongata* ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 in den Zellen akkumuliert. Nach Durchführung eines hypoosmotischen Schocks können die Solute aus dem Medium aufgereinigt werden. Zur Abtrennung von Ectoin sind im Anschluss an dieses „Bakterienmelk“-Verfahren chromatographische Aufreinigungsmethoden notwendig,

die den Produktionsprozess verlängern und kostenintensiv machen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, die Kultivierungsbedingungen für eine Hydroxyectoin-Produktion zu optimieren bzw. einen Produktionsstamm für das kompatible Solut zu etablieren. Neben Untersuchungen an dem bislang zur Produktion eingesetzten Stamm *H. elongata* wurde die heterologe Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* mit Hilfe der Ganzzellbiokatalyse und Totalsynthese des Eduktes untersucht.

1. Austausch des *ectB*-Gens durch *ectD* zur Erhöhung des EctD-Gehalts und der Hydroxyectoin-Produktion

H. elongata DSM 2581^T produziert unter hyperosmotischen Bedingungen als Hauptsolut Ectoin. Bei einer Salinität von 15 % NaCl und einer Kultivierungstemperatur von 20 °C liegt ausschließlich Ectoin als osmoregulatorisches Solut in den Zellen vor. Erst mit steigender Temperatur steigt auch die Hydroxyectoin-Produktion, auch bei geringeren Salinitäten (Wolfarth *et al.*, 1990; Ures, 2005). Während bei vielen Organismen wie z. B. *Streptomyces chrysomallus* oder *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T das Ectoinhydroxylase-Gen *ectD* Teil des Ectoin-Genclusters *ectABC* ist, liegt *ectD* in *H. elongata* unabhängig davon, unter Kontrolle eines Promotors, der Sequenzähnlichkeiten zu σ^S -abhängigen Promotoren aufweist, vor (Grammel, 2000; Ures, 2005; Schwibbert *et al.*, 2010; Seip *et al.*, 2011). Der σ^S -Faktor selbst ist für die Expression von Genen bei einer generellen Stressantwort, wie z. B. beim Übergang in die stationäre Phase, bei osmotischem Stress oder bei einem Kälte- oder Hitzeschock, verantwortlich (Loewen und Hengge-Aronis, 1994; Hengge-Aronis, 1996). Da *H. elongata* erst mit steigender Temperatur Hydroxyectoin akkumuliert, unterliegt die Expression des *ectD*-Gens somit einer stressinduzierbaren, vermutlich hitzeinduzierbaren, Kontrolle (vgl. dazu Abschnitt IV. 3.2). Zur Umgehung davon wurde in einem ersten Schritt das *ectB*-Gen durch das *ectD*-Gen *in frame* ausgetauscht. Dadurch sollte die *ectD*-Expression in Abhängigkeit der Ectoin-Biosynthesegene induziert, der intrazelluläre EctD-Gehalt gesteigert und die damit einhergehende Hydroxyectoin-Produktion erhöht werden.

1.1. Konstruktion der *ectB::ectD*-Austauschmutanten

Göller (1999) zeigte, dass die Insertion einer Ω -Kassette in das *ectB*-Gen und eine daraus resultierende Deletion der L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase (EctB) keine Auswirkungen auf die Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese hatte. Die Mutante *H. elongata* K2 (*ectB:: Ω*) akkumulierte gleiche Mengen an Ectoin und Hydroxyectoin wie *H. elongata* Wt. Da also keine funktionstüchtige L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase (EctB) mehr gebildet wurde, ist diese für die Ectoin-Biosynthese in *H. elongata* nicht essentiell. Die Aktivität kann offenbar durch ein anderes Enzym ersetzt werden. Zur Synthese von L-2,4-Diaminobuttersäure wäre neben dem für die Ectoin-Biosynthese bekannten Weg ein alternativer Syntheseweg, ausgehend von Aspartat über Homoserin zu L-2,4-Diaminobuttersäure, möglich (Göller, 1999).

Als Ausgangsstämme der genomischen *ectB::ectD*-Austauschmutanten dienten *H. elongata* MaKu03 (Δ *ectD*) und *H. elongata* Wt. Bei *H. elongata* MaKu03 handelt es sich um eine Mutante des Wt, deren *ectD*-Gen am natürlichen Standort im Genom unter Kontrolle des σ^S -abhängigen Promotors deletiert ist (Ures, 2005, vgl. Abb. 9). Es wurde gezeigt, dass *H. elongata* MaKu03 kein Hydroxyectoin mehr in den Zellen akkumulierte, woraus geschlossen werden konnte, dass EctD das für die Hydroxylierung von Ectoin verantwortliche Enzym ist. In der vorliegenden Arbeit diente dieser Stamm als Negativkontrolle. Im Gegensatz zu MaKu03 liegt in *H. elongata* Wt das *ectD*-Gen noch unter Kontrolle des vermutlich stressinduzierbaren Promotors vor. Die beiden genomischen Austauschmutanten wurden mit Hilfe der pK18*mobSacB*-Methode konstruiert (Schäfer *et al.*, 1994). Mittels homologer Rekombination wurde der offene Leserahmen des *ectB*-Gens gegen den des *ectD*-Gens *in frame* ausgetauscht und nach Einsatz der Kolonie-PCR konnten die positiven Mutanten *H. elongata* MaK03 Δ *ectB::ectD* und *H. elongata* Δ *ectB::ectD* identifiziert werden (Abschnitt III. 1.1, Abb. 9). Bei beiden Mutanten liegt das *ectD*-Gen somit anstelle des *ectB*-Gens unter Kontrolle des osmoregulierbaren *ectA*- bzw. eines potentiellen *ectB*-Promotors vor (vgl. dazu Abschnitt IV. 1.2).

1.2. Die Δ *ectB::ectD*-Mutanten zeigten eine höhere Hydroxyectoin-Produktion

Nach Anzucht von *H. elongata* MaKu03 Δ *ectB::ectD* und der *ectD*-Deletionsmutante *H. elongata* MaKu03 zeigte sich, dass die Austauschmutante die Fähigkeit zur Hydroxyectoin-Synthese wiedergewonnen hatte. Während die *ectD*-Deletionsmutante

MaKu03 ausschließlich Ectoin akkumulierte, lag in den Zellen von MaKu03 $\Delta ectB::ectD$ bei Salinitäten von 10 % und 15 % NaCl und Kultivierungstemperaturen von 37 °C und 40 °C ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 vor (Abschnitt III. 1.2.1, Abb. 10). Zum einen wurde bestätigt, dass die Deletion von *ectB* keinen Einfluss auf die Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Synthese hat. Zum anderen wurde eine aktive, funktionsfähige Ectoin-Hydroxylase exprimiert. Durch den Austausch des *ectB*-Gens gegen das *ectD*-Gen konnten ca. 50 % des intrazellulären Ectoin-Gehalts in Hydroxyectoin umgewandelt werden, was *H. elongata* Wt erst unter Hochsalzbedingungen und erhöhter Temperatur erreicht.

Da nachgewiesen werden konnte, dass eine *ectD*-Deletionsmutante durch den Austausch von *ectB* gegen *ectD* wieder zu einer Hydroxyectoin-Synthese befähigt war, wurde in einem nächsten Schritt die Hydroxyectoin-Produktion von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ mit der von *H. elongata* Wt verglichen. Im Hinblick auf einen Hydroxyectoin-Produktionsstamm sollte dieser Stamm gegenüber *H. elongata* MaKu03 $\Delta ectB::ectD$ von Vorteil sein, da das *ectD*-Gen zweifach im Genom vorhanden ist (Abb. 9). Nach Anzucht in Minimalmedium bei verschiedenen Salinitäten und Temperaturen zeigte sich, dass die *ectB::ectD*-Austauschmutante im Vergleich zum Wt mehr Hydroxyectoin in den Zellen akkumulierte, wobei der Unterschied bei einer Anzucht in 10 % NaCl zwischen Wt und $\Delta ectB::ectD$ -Mutante am deutlichsten war (Abschnitt III. 1.2.2 und Abb. 11). Bei einer Salinität von 15 % NaCl und Temperaturen von 37 °C und 40 °C stieg auch der Hydroxyectoin-Anteil von *H. elongata* Wt, was auf der Tatsache beruht, dass das *ectD*-Gen unter Kontrolle eines σ^S -abhängigen Promotors steht. Die Expression des *ectD*-Gens wird somit erst unter bestimmten Stresssituationen, in diesem Fall erhöhte Salinitäten und Temperaturen, induziert. Das *ectD*-Gen in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ liegt jedoch nicht nur am natürlichen Standort im Genom unter σ^S -abhängiger Kontrolle, sondern auch unter Kontrolle des osmoregulierbaren *ectA*-Promotors (*promA*) bzw. eines putativen hitzeinduzierbaren *ectB*-Promotors (Abb. 50, Anhang). Die Promotorelemente vor dem *ectA*-Gen wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten postuliert und konnten kürzlich näher beschrieben werden (Göller, 1999; Burdziak, 2006; Schwibbert *et al.*, 2010). Neben einem Promotorbereich des σ^{70} -Typs wurde ein stressinduzierbares Promotormotiv des σ^{38} -Typs identifiziert. In *H. elongata* handelt es sich bei diesem σ^{38} -abhängigen Promotor um einen osmotisch induzierbaren Promotor. Neben der typischen -10 DNA-

Sequenz wurde ein für osmoregulierbare Promotoren typisches G-Element an Position -35 detektiert (Lee und Gralla, 2004; Schwibbert *et al.*, 2010). Weiterhin konnten in vorangegangenen Arbeiten durch Transkriptionsanalysen über Northern-Blot und quantitative RT-PCR neben einem Gesamttranskript *ectABC* drei Einzeltranskripte der Ectoin-Gene *ectA-C* sowie u. a. ein *ectBC*-Kotranskript nachgewiesen werden (Stumpfe, 2003; Burdziak, 2006). Dies deutet darauf hin, dass die Transkription des *ectB*-Gens, bei den $\Delta\text{ectB}::\text{ectD}$ -Mutanten des *ectD*-Gens, auch unter Kontrolle eines eigenen Promotors liegt. Calderon *et al.* (2004) identifizierten in *C. salexigens* einen vor *ectB* liegenden Promotor des σ^{32} -Typs. Bei σ^{32} handelt es sich um einen σ -Faktor, der bei der Hitzeschockantwort eine zentrale Rolle spielt. Witt (unveröffentlicht) zeigte, dass sich das gleiche Promotormotiv vor dem *ectB*-Gen in *H. elongata* wiederfindet. Dies lässt vermuten, dass die Transkription des *ectB*-Gens bzw. des in den $\Delta\text{ectB}::\text{ectD}$ -Mutanten inserierten *ectD*-Gens nicht nur durch den osmoregulierbaren σ^{38} -abhängigen *ectA*-Promotor (*promA*), sondern auch durch einen putativen hitzeinduzierbaren σ^{32} -abhängigen *ectB*-Promotor reguliert wird.

Eine daraus resultierende verstärkte Transkriptionsrate des *ectD*-Gens bzw. ein erhöhter intrazellulärer EctD-Gehalt ist vermutlich verantwortlich für die höhere Hydroxyectoin-Produktion bei niedrigeren Salinitäten und Temperaturen. Dass die in den Zellen vorhandene EctD-Menge ein entscheidender Faktor bei der Hydroxyectoin-Biosynthese ist, wird in Abschnitt IV. 2 und IV. 3 eingehend erläutert. Eine vollständige Hydroxylierung unter gegebenen Bedingungen wurde zwar nicht erzielt, dafür konnte durch den Austausch von *ectB* durch *ectD* ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 bereits bei niedrigeren Salinitäten und Temperaturen erzielt werden, als es für *H. elongata* Wt notwendig ist.

1.3. Fermentation von *H. elongata* $\Delta\text{ectB}::\text{ectD}$ zur Überprüfung der Hydroxyectoin-Produktion in Abhängigkeit der Wachstumsphase

Um die Hydroxyectoin-Produktion von *H. elongata* $\Delta\text{ectB}::\text{ectD}$ in Abhängigkeit von der Wachstumsphase zu untersuchen, wurde eine Fermentation im 4 L-Maßstab durchgeführt. In der exponentiellen Wachstumsphase bei Anzucht in 10 % NaCl und bei 37 °C war das Verhältnis von Ectoin und Hydroxyectoin in den Zellen etwa gleich mit jeweils 100 mg/g TG (Abschnitt III. 1.2.3, Abb. 12). Im Gegensatz zu *Marinococcus*

sp. M52, *Virgibacillus salexigens* oder *Streptomyces coelicolor*, deren Hydroxyectoin-Produktion erst in der stationären Phase beginnt, verschob sich in *H. elongata* beim Übergang zur stationären Phase das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis zugunsten von Ectoin (80 mg Hydroxyectoin/g TG und 120 mg Ectoin/g TG; Frings *et al.* 1995; Bursy *et al.*, 2007, 2008).

Möglicherweise liegt eine Limitierung durch den Kofaktor α -Ketoglutarat vor. Allerdings ist in vielen anderen Organismen die Hydroxyectoin-Synthese stationärphasenabhängig, so dass die Menge an α -Ketoglutarat ausreichend sein müsste. Der Mangel an molekularem Sauerstoff kann keine Erklärung für die unvollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin sein. In der stationären Wachstumsphase stieg der Sauerstoffpartialdruck im Fermenter auf einen Wert von 94 % an und sollte so kein limitierender Faktor sein (in Abschnitt III. 1.2.3, Abb. 12 nicht dargestellt). Vielmehr könnte die unvollständige Hydroxylierung des akkumulierten Ectoins durch eine mögliche Instabilität von EctD erklärt werden, da es sich bei EctD um ein Enzym handelt, das vermutlich durch Proteasen abgebaut wird (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Erhard Bremer, Philipps-Universität Marburg).

In vielen Organismen werden kompatible Solute metabolisiert, um der Zelle Kohlen- oder Stickstoffquellen zur Verfügung zu stellen. So wird in dem Organismus *Halorhodospira halophilus* der intrazelluläre Ectoin-Gehalt unter stickstofflimitierenden Bedingungen, die z. B. häufig beim Übergang zur stationären Wachstumsphase erreicht werden, reduziert und durch das Solut Trehalose ersetzt (Galinski und Herzog, 1990). Manzanera *et al.* (2002) zeigten, dass auch *P. putida* in der Lage ist, Hydroxyectoin zu metabolisieren. In *Silibacter pomeroyi* wurde bereits ein Gencluster *eutABCDE* (*ectoine utilization*) identifiziert, deren Genprodukte für den Abbau von Ectoin und Hydroxyectoin verantwortlich sind, so dass dieser Organismus in der Lage ist, mit diesen beiden Soluten als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen (Lecher *et al.*, 2009). Erst kürzlich wurde ein Ectoin-Abbauweg in *H. elongata* identifiziert (Schwibbert *et al.*, 2010). Die kodierenden Genprodukte *doeABCD* (*degradation of ectoine*) sind für die Metabolisierung von Ectoin zu L-Aspartat verantwortlich. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass der Hydroxyectoin-Gehalt beim Übergang zur stationären Phase abnahm, jedoch die von EctD katalysierte Reaktion vermutlich nicht reversibel ist, kann postuliert werden, dass

H. elongata ebenfalls einen bislang nicht charakterisierten Hydroxyectoin-Abbauweg besitzt. Hydroxyectoin könnte unter bestimmten limitierenden Bedingungen, wie beim Übergang in die stationäre Phase, zu Ectoin metabolisiert worden sein, das dann durch die Aktivität von DoeABCD zu L-Aspartat umgewandelt wird und so der Zelle als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zur Verfügung steht. Da die Zellen jedoch weiterhin osmotischem Stress von 10 % NaCl ausgesetzt waren und Ectoin als Osmolyt zum Schutz der Zellen vor Dehydrierung akkumuliert bleiben musste, pendelte sich das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis in der stationären Phase ein (III. 1.2.3, Abb. 12).

1.4. Untersuchung des Gesamtzellproteins von *H. elongata* Δ ectB::ectD im Vergleich zum Wt

Um zu überprüfen, ob die unvollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin auf einem zu geringen intrazellulären EctD-Gehalt beruhte, wurde das Gesamtzellprotein von *H. elongata* Wt und Δ ectB::ectD in verschiedenen Wachstumsphasen mittels SDS-PAGE analysiert. Das Molekulargewicht von EctD liegt bei 37,4 kDa (www.expasy.org, Stand 11.05.2011). Eine schwache Bande bei dieser Größe wurde sowohl für *H. elongata* Wt als auch für *H. elongata* Δ ectB::ectD detektiert (Abschnitt III. 1.2.4, Abb. 13). Ein Unterschied im Expressionsmuster zwischen den beiden Stämmen wurde vermutet, da *H. elongata* Δ ectB::ectD mehr Hydroxyectoin produzierte als *H. elongata* Wt. Allerdings konnte dies mittels SDS-PAGE-Analysen nicht verifiziert werden. Witt (unveröffentlicht) zeigte, dass durch Insertion des Plasmids pWUB_ectD_Hel in *H. elongata* bis zu 95 % Hydroxyectoin in den Zellen akkumuliert wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem eine verstärkte Expressionsbande durch das Plasmid detektiert werden, was deutlich macht, dass der EctD-Gehalt in den Zellen ein wichtiger Parameter der Hydroxylierungsreaktion ist (vgl. Abschnitt III. 3, Abb. 17). Zum einen war der Unterschied des intrazellulären EctD-Gehalts in *H. elongata* Wt und Δ ectB::ectD vermutlich zu gering, um ihn über SDS-PAGE-Analysen zu detektieren. Zum anderen könnte die geringe EctD-Menge Grund der unvollständigen Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin sein.

2. Erhöhung des EctD-Gehalts in *H. elongata* durch pPromEct_ectD

Anlehnend an die Arbeiten von Prabhu *et al.* (2004) sollte durch heterologe Expression des *ectD*-Gens in *H. elongata* Wt die Hydroxyectoin-Produktion gesteigert werden.

Prabhu *et al.* klonierten das Ectoinhydroxylase-Gen *thpD* aus *Streptomyces chrysomallus* (Grammel, 2000) hinter den *ectA*-Promotor aus *H. elongata* DSM 3043 (heute *Chromohalobacter salexigens*). Als Expressionsplasmid nutzten sie ein selbstreplizierendes Plasmid für *C. salexigens* durch Kombination des *E. coli* pUC-Derivats pSP72 (Promega, Mannheim) mit dem aus *H. elongata* ATCC 33174 (heute DSM 3044) stammenden kryptischen Plasmid pHE1 (Vargas *et al.*, 1995). Nach erfolgreicher Konjugation dieses Konstrukts in *C. salexigens* und Anzucht bei einer Salinität von 10 % NaCl und 37 °C wurde ausschließlich Hydroxyectoin akkumuliert, was nach einem hypoosmotischem Schock im Medium nachgewiesen werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Ausgangsvektor ein Derivat des pBBR-MCS1-Vektors, pPromEct, genutzt (Brünig, 2005). In pPromEct liegt der osmoregulierbare *ectA*-Promotor (*promA*) aus *H. elongata* vor, hinter den bereits unterschiedliche Gene inseriert und erfolgreich über Salzinduktion exprimiert wurden (Brünig, 2005; Burdziak, 2006; Meffert, 2007; Lange, 2009). Nach Konstruktion des Plasmids pPromEct_ectD, bei dem das *ectD*-Gen unter Kontrolle des *promA*-Promotor geschaltet wurde (Abschnitt III. 2.1, Abb. 14), wurde das Konstrukt durch Konjugation auf *H. elongata* übertragen, so dass *H. elongata* pPromEct_ectD (im Folgenden als Wt⁺ bezeichnet) entstand.

Der Stamm *H. elongata* Wt⁺ zeigte nach einer Anzucht bei 5 % NaCl kaum einen Unterschied zum Wt (Abschnitt III. 2.2, Abb. 15). In den Zellen wurde fast ausschließlich Ectoin detektiert, was darauf schließen lässt, dass die Salinität für die Expression des *ectD*-Gens durch den osmoregulierbaren *promA*-Promotor nicht ausreichend hoch war. Mit steigender Salinität und Temperatur stieg auch die Hydroxyectoin-Synthese in *H. elongata* Wt⁺. Die größte Verbesserung der Hydroxyectoin-Ausbeute im Vergleich zum Wt konnte bei einer Salinität von 10 % NaCl beobachtet werden. Im Vergleich zu *H. elongata* Δ *ectB::ectD* konnte mit Hilfe von *H. elongata* Wt⁺ allerdings keine Verbesserung der Hydroxyectoin-Produktion erzielt werden. Die Akkumulation von Hydroxyectoin ähnelte der der genomischen Δ *ectB::ectD*-Austauschmutante, so dass vermutet wurde, dass der in den Zellen vorhandene EctD-Gehalt beider Stämme gleich hoch ist. Ausnahmen waren bei einer Anzucht von 10 % und 15 % NaCl und einer Temperatur von 30 °C, bei der vermutlich ein niedrigerer intrazellulärer EctD-Gehalt aufgrund der Verwendung des

osmoregulierbaren *promA*-Promotors zu einer verminderten Hydroxyectoin-Synthese gegenüber $\Delta ectB::ectD$ führte.

Mit *H. elongata* Wt⁺ blieb es jedoch bei einer unvollständigen Hydroxylierung des akkumulierten Ectoins. Aufgrund der Klonierungsstrategie des Plasmids pPromEct_ectD mit den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BspLU11I* kam es zu einem Aminosäureaustausch der zweiten Aminosäure in der Proteinsequenz von EctD (Abb. 51, Anhang). Bei der Klonierung musste die Restriktionsschnittstelle für *NcoI*, welches kompatible Enden zu *BspLU11I* bildet, eingesetzt werden, da im *ectD*-Gen selbst eine *BspLU11I*-Schnittstelle vorhanden war und demnach dieses Enzym nicht verwendet werden konnte. Somit wurde das in der Ursprungssequenz von EctD enthaltene polare Serin durch ein unpolares Alanin ersetzt. Da Witt (unveröffentlicht) bei der Konstruktion des Plasmids pWUB_ectD_Hel ebenfalls diesen Aminosäureaustausch vorfand und dennoch eine fast vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin in *H. elongata* pWUB_ectD_Hel detektieren konnte (vgl. Abschnitt IV. 3), scheint dieser Austausch die Aktivität von EctD nicht zu beeinflussen.

Die unvollständige Hydroxylierung des akkumulierten Ectoins in *H. elongata* Wt⁺ im Gegensatz zu den von Prabhu *et al.* (2004) erzielten Ergebnissen hängt möglicherweise mit der Replikationsrate des verwendeten Plasmids zusammen. Bei pPromEct mit dem *oriR* aus *Bordetella bronchiseptica* handelt es sich um einen *low-copy*-Vektor. Somit liegen nur wenige Kopien in der Zelle vor (Antoine und Locht, 1992, Kovach *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu könnte es sich bei dem von Prabhu *et al.* (2004) konstruierten Plasmid, welches aus Bestandteilen des selbstreplizierenden pHE1-Vektors aus *H. elongata* DSM 3044 und Teilen eines pUC-Derivats besteht, um einen Vektor mit einer höheren Kopienzahl handeln.

Neben der geringen Anzahl an Plasmidkopien könnte die unvollständige Hydroxylierung durch *H. elongata* Wt⁺ auch auf eine niedrige Aktivität des verwendeten Promotors *promA* aus *H. elongata* zurückgeführt werden (vgl. dazu Abschnitt IV. 3). Bei Promotoren von aktivierbaren Genen handelt es sich oft um schwache Promotoren mit einer niedrigen Affinität für die RNA-Polymerase (Schlegel, 2006). Der Promotor wird von der RNA-Polymerase nur selten und dann für kürzere Zeit frequentiert, was in einer geringeren Ausbeute des Genprodukts resultiert. Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass der Vektor pPromEct zwar als

Expressionssystem funktioniert, für eine Überexpression von hinter *promA*-klonierten Genen jedoch nicht ausreicht (Lange, 2009; Witt, unveröffentlicht). Im Gegensatz dazu könnte es sich bei dem *ectA*-Promotor aus *C. salexigens*, bei dem vier Transkriptionsstartpunkte identifiziert wurden (Calderón *et al.*, 2004), um einen stärkeren Promotor handeln, so dass ein daraus resultierender höherer EctD-Gehalt zu einer vollständigen Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin führte (Prabhu *et al.*, 2004).

Durch die Kombination aus niedriger Kopienzahl des *low-copy*-Vektors pPromEct_ectD und der Schwäche des *promA*-Promotors wird also in den Zellen vermutlich weniger *ectD*-Genprodukt als in dem von Prabhu *et al.* (2004) konstruierten System akkumuliert, wodurch die unvollständige Hydroxylierung des akkumulierten Ectoins in *H. elongata* Wt⁺ begründet werden kann. Diese Beobachtung bestätigten auch die Komplementierungsversuche von *H. elongata* MaKu03 mit dem Plasmid pPromEct_ectD (Abschnitt III. 2.3, Abb. 16). *H. elongata* MaKu03⁺ hydroxylierte nur 1/5 des intrazellulär vorhandenen Ectoins. Für eine Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion in *H. elongata* ist das Plasmid pPromEct_ectD daher nur bedingt geeignet. Im Vergleich zum Wt konnte die Hydroxylierung von Ectoin zwar verbessert werden, eine vollständige Umsetzung zum Hydroxyderivat wurde allerdings nicht erzielt.

3. Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion durch Verwendung der Promotorregion *promKB1*

Witt (unveröffentlicht) zeigte, dass in der *ectA*-Deletionsmutante *H. elongata* KB1 durch Deletion des *ectA*-Gens eine Veränderung der Promotorregion vor dem *ectB*-Gen auftrat, die zu einer verstärkten Expression des *ectC*-Gens führte. Eine verstärkte Expression von *ectB* wurde auch vermutet, konnte allerdings durch SDS-PAGE-Analysen nicht bestätigt werden. Bei dieser Promotorregion (*promKB1*) handelte es sich um den *ectA*-Promotor *promA*, hinter den aufgrund der Deletion von *ectA* eine zu *ectB*-gehörige optimale Ribosomenbindestelle (RBS) mit der Sequenz AGGAGGT, die genau der Konsensus-Sequenz der *Shine-Dalgarno*-Sequenz entspricht, gerückt ist (Abschnitt IV. 3.2, Abb. 48). Außerdem entfiel durch die Deletion eine Terminationsstelle hinter *ectA* sowie der putative hitzeinduzierbare σ^{32} -*ectB*-Promotor (Calderón *et al.*, 2004; Witt, unveröffentlicht). Eine Punktmutation, die die -35 Region

des σ^{38} -abhängigen Promotorbereichs betraf, konnte auch detektiert werden (Abb. 48). Für die verstärkte Expression des *ectC*-Gens postulierte Witt transkriptive Effekte, da der *ectA*-Promotor *promA* scheinbar eine stärkere Transkription erlaubte als der putative *ectB*-Promotor.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde zur Etablierung eines Expressionssystems in *H. elongata* der *promKB1*-Promotorbereich (mit optimaler RBS), gegen den vermutlich schwachen *promA*-Bereich im Vektor pPromEct ausgetauscht (Witt, unveröffentlicht). Das resultierende Plasmid pWUB zeigte im Vergleich zu pPromEct eine verstärkte Expression verschiedener Gene, die unter die Kontrolle von *promKB1* geschaltet wurden (Grün, 2011; Witt, unveröffentlicht). Nach Klonierung des *ectD*-Gens hinter *promKB1* und konjugativem Transfer des resultierenden Plasmids pWUB_ectD_Hel auf *H. elongata* Wt wurde das intrazelluläre Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis stark zugunsten von Hydroxyectoin verschoben (Witt, unveröffentlicht). Bei einer Salinität von 10 % NaCl und einer Anzuchttemperatur von 37 °C wurden mit diesem Stamm bereits über 80 % Hydroxyectoin in den Zellen akkumuliert, während im Vergleich dazu *H. elongata* Wt⁺ nur etwas mehr als 40 % Hydroxyectoin akkumulierte (Abb. 15). Bei weiterer Erhöhung der Temperatur konnte sogar ein Hydroxyectoin-Anteil von ca. 95 % erreicht werden. Die Expressionsrate durch Verwendung von pWUB im Vergleich zu pPromEct wurde also deutlich erhöht. Neben den bereits beschriebenen transkriptionellen Effekten, die in *H. elongata* KB1 zu einer Erhöhung der *ectC*-Expression führten, ist ein translationaler Effekt denkbar, der durch die in *promKB1* vorhandene Ribosomenbindestelle erklärt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die postulierte Erhöhung der Expression des *ectD*-Gens bestätigt. Nach SDS-PAGE-Analysen zeigte sich, dass mit Hilfe des Vektors pWUB_ectD_Hel eine Überexpression des *ectD*-Gens erzielt wurde (Abb. 17). Trotz der Verwendung eines *low-copy*-Vektors (Abschnitt IV. 2) konnte bereits bei einer Anzucht mit nur 2 % NaCl ein hoher EctD-Gehalt in den Zellen des Stamms *H. elongata* WUB02 (Δ *ectAC*), welcher in Abschnitt III. 8.6 zur Hydroxylierung von Gd-Ectoin konstruiert wurde, detektiert werden. Somit handelt es sich bei *promKB1* um einen starken Promotorbereich, bei dem durch die Kombination transkriptioneller und translationaler Effekte ein hoher intrazellulärer Protein-Gehalt erreicht wird.

Durch Erhöhung der *ectD*-Expression in den Zellen könnte also einem putativen Hydroxyectoin-Abbauweg entgegengewirkt werden. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit durchgeführten Fermentation mit *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$, bei der der Hydroxyectoin-Gehalt in der stationären Phase sank (Abb. 12), konnte mit *H. elongata* pWUB_ectD_Hel eine fast vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin, auch in der stationären Phase, detektiert werden (Witt, unveröffentlicht). Um allerdings eine Plasmidstabilität in *H. elongata* pWUB_ectD_Hel zu gewährleisten, muss dem Kultivierungsmedium das Antibiotikum Chloramphenicol zugesetzt werden. Im Hinblick auf einen Produktionsprozess mit diesem Stamm in großtechnischem Maßstab ist die Zugabe von Antibiotika zum Kulturmedium weniger geeignet, da dieses zum einen bei der anschließenden Produktaufreinigung abgetrennt werden muss und so unnötig Kosten verursacht. Zum anderen beruht die Chloramphenicolresistenz, die durch das Plasmid pWUB_ectD_Hel vermittelt wird, auf der Expression einer Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), die durch Acetylierung von Chloramphenicol die antibiotische Wirkung aufhebt (Shaw und Leslie, 1991). Aus diesem Grund müsste dem Medium im Laufe der Kultivierung ständig Chloramphenicol zugesetzt werden, was wiederum mit einem erhöhten Kostenaufwand einherginge. Daher lag das Augenmerk auf der Konstruktion einer genomischen Mutante.

3.1. Konstruktion von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ zur Erhöhung der Hydroxyectoin-Produktion

Zur Umgehung der Antibiotika-Zugabe wurde in einem nächsten Schritt der natürliche σ^S -abhängige *ectD*-Promotor gegen den starken osmoregulierbaren *promKB1*-Promotorbereich ausgetauscht. Somit sollte die Expression des *ectD*-Gens weiter erhöht und die Hydroxyectoin-Produktion aufgrund eines erhöhten intrazellulären EctD-Gehalts gesteigert werden. Die Konstruktion der Stämme erwies sich allerdings als schwierig. Der genomische Austausch des Promotorbereichs in *H. elongata* Wt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht erzielt. Diese Problematik kann dadurch erklärt werden, dass durch den Austausch des σ^S -abhängigen *ectD*-Promotors gegen *promKB1* eine proteinkodierende Gensequenz deletiert werden musste, da der von Ures (2005) vorausgesagte *ectD*-Promotor innerhalb dieses kodierenden Bereichs lag. Nach Sequenzierung und Publikation des Genoms von *H. elongata* (Schwibbert *et al.*, 2010) wurde festgestellt, dass es sich dabei um ein Protein handelt, das Ähnlichkeiten zu Proteinen der YodA-Familie besitzt, die metallbindenden Proteinen zugeordnet

werden können (David *et al.*, 2003). Für *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ als Ursprungstamm konnte eine einzige positive Austauschmutante identifiziert werden (Abschnitt III. 3.1, Abb. 18), bei der durch den Austausch des *ectD*-Promotors gegen *promKB1* 121 bp des *yodA*-Gens deletiert wurden. Somit kam es in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ entweder zu einem Funktionsverlust des Proteins oder die Funktion von YodA wurde durch andere Enzymaktivitäten ausgeglichen.

3.2. Hydroxyectoin-Produktion in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$

$\Delta promectD::promKB1$

Nach Untersuchungen des Hydroxyectoin-Gehalts in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ wurden Unterschiede zwischen der Mutante und dem Wt deutlich (Abschnitt III. 3.2, Abb. 19). Die Ergebnisse gegenüber der $\Delta ectB::ectD$ -Austauschmutante waren bei einer Salinität von 10 % NaCl ähnlich, erst bei einer Salinität von 15 % NaCl wurden Unterschiede deutlich. Während in *H. elongata* Wt und $\Delta ectB::ectD$ eine temperaturabhängige Erhöhung des Hydroxyectoin-Gehalts verzeichnet werden konnte, blieb der Hydroxyectoin-Gehalt in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ mit steigender Umgebungstemperatur gleich, wodurch sich Rückschlüsse auf die Regulation von *ectD* unter Kontrolle des natürlichen *ectD*-Promotors ziehen lassen. Da durch den Austausch des σ^S -abhängigen *ectD*-Promotors gegen den osmoregulierbaren *promKB1*-Promotorbereich die temperaturabhängige Akkumulation von Hydroxyectoin verloren ging, handelt es sich bei dem natürlichen *ectD*-Promotor vermutlich um einen hitzeinduzierbaren Promotor.

Dennoch kam es im Vergleich zu *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ zu keiner weiteren Verbesserung der Hydroxyectoin-Produktion, was die Funktionalität des *promKB1*-Promotorbereichs in Frage stellen könnte. Nach Sequenzierung von *promKB1* sowie dem Anfangsbereich des *ectD*-Gens in *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$ und dem Vergleich mit der theoretisch vorausgesagten Sequenz wurden drei Basenaustausche identifiziert (Abb. 48). Diese wurden bereits von Gramman (2000) nach Konstruktion der *ectA*-Deletionsmutante *H. elongata* KB1 beschrieben. Eine dieser Punktmutation betraf die -35-Region des erst kürzlich beschriebenen σ^{38} -abhängigen Promotorbereichs (Schwibbert *et al.*, 2010). Da dieser Basenaustausch allerdings auch in dem von Witt (unveröffentlicht) konstruierten Plasmid

translationalen Ebene, hat und so die Funktionalität von *promKB1*, wie sie im Plasmid pWUB_ectD_Hel beschrieben wurde, verloren ging, und die konstruierte Mutante eigentlich *H. elongata* MaKu03 Δ ectB::ectD entspricht, kann hier nicht eindeutig geklärt werden und müsste in weiterführenden Arbeiten überprüft werden.

Durch Konstruktion der drei genomischen Mutanten (*H. elongata* MaKu03 Δ ectB::ectD, *H. elongata* Δ ectB::ectD und *H. elongata* Δ ectB::ectD Δ promectD::promKB1) sowie von *H. elongata* Wt⁺ (pPromEct_ectD), bei dem das *ectD*-Gen plasmidvermittelt exprimiert wurde, konnte der Hydroxyectoin-Gehalt im Vergleich zum Wt gesteigert werden. Ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1, das beim Wt erst unter Hochsalzbedingungen und hohen Temperaturen akkumuliert wurde, konnte mit den Mutanten bereits bei niedrigeren Salinitäten und Temperaturen erreicht werden. Bei den genomischen Mutanten ließ sich dies vor allem durch transkriptionelle Effekte erklären. Durch den Austausch des *ectB*-Gens durch *ectD* unterliegt die Expression von *ectD* nicht nur dem σ^S -abhängigen *ectD*-Promotor, sondern auch dem osmoregulierbaren *ectA*- bzw. dem putativen hitzeinduzierbaren *ectB*-Promotor. Eine vermutlich erhöhte intrazelluläre EctD-Menge führte daher zu einer verbesserten Hydroxyectoin-Produktion. In *H. elongata* Wt⁺ konnte die Verbesserung der Hydroxyectoin-Produktion gegenüber von *H. elongata* Wt durch die Kopienzahl des Vektors und die damit einhergehende Erhöhung der EctD-Menge erklärt werden. Für eine zukünftige genomische Strategie ist es daher notwendig, einen starken Promotor mit optimaler RBS vor *ectD* zu klonieren, so dass eine hohe Expressionsrate des *ectD*-Gens erzielt werden kann, die einem putativen Hydroxyectoin-Abbauweg entgegenwirkt. Eine vollständige Hydroxylierung von Ectoin mit den genomischen Stämmen unter den beschriebenen Bedingungen konnte nicht erzielt werden. Daher wurde in weiteren Untersuchungen der Einfluss der Temperatur auf die Hydroxyectoin-Produktion näher untersucht.

4. Einfluss der Temperatur auf die Hydroxylierung von Ectoin

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde der positive Einfluss erhöhter Temperatur auf die Hydroxyectoin-Produktion beschrieben (Wolfarth *et al.*, 1990; Ures, 2005). Zur Überprüfung dieser Beobachtung wurden die konstruierten genomischen Mutanten (*H. elongata* MaKu03 Δ ectB::ectD, *H. elongata* Δ ectB::ectD und *H. elonga-*

ta $\Delta ectB::ectD$ $\Delta promectD::promKB1$) im Vergleich zu *H. elongata* Wt und MaKu03 bei dem von Vreeland *et al.* (1980) beschriebenen Temperaturmaximum von *H. elongata* (45 °C) angezogen und der intrazelluläre Solutegehalt bestimmt. Die *ectD*-Deletionsmutante MaKu03 akkumulierte nur Ectoin in den Zellen (Abschnitt III. 4.1, Abb. 20). Auffällig war, dass der Ectoin-Gehalt von MaKu03 geringer war als der Gesamtsolutegehalt vom Wt und der genomischen Mutanten. Zu testen bleibt, ob der Gesamtsolutegehalt durch andere kompatible Solute, wie z. B. durch die Akkumulation von α -Glutamat, ergänzt wurde, was durch die hier verwendete Methode der isokratischen HPLC nicht nachgewiesen wurde, aber über FMOC/ADAM-HPLC detektierbar wäre.

In *H. elongata* Wt wurde unter Anzucht bei 45 °C ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von ca. 1:1 bereits bei einer Salinität von 10 % NaCl detektiert, was sich bei 15 % NaCl zugunsten von Hydroxyectoin verschob. Die drei genomischen Mutanten wiesen eine noch höhere Akkumulation von Hydroxyectoin in den Zellen auf. Während der Hydroxyectoin-Anteil von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ bei einer Salinität von 15 % NaCl und einer Temperatur von 42 °C noch 65 % vom Gesamtsolutegehalt ausmachte (Abb. 19), stieg er durch Erhöhung um nur 3 °C um 15 %-Punkte auf einen Wert von 80 % an. Da die Temperatur also einen entscheidenden Einfluss auf die Hydroxylierung von Ectoin ausübte, wurde durch weitere Erhöhung der Kultivierungstemperatur versucht, eine vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin zu erzielen. Allerdings zeigten die Vorkulturen, die bei Temperaturen oberhalb von 45 °C inkubiert wurden, kein Wachstum. Daher wurde eine neue Strategie der Anzucht- und Kultivierungsbedingungen gewählt.

4.1. Wachstum der *Halomonas*-Stämme bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C

Die *Halomonas*-Stämme wurden zunächst bei einer Temperatur von 37 °C bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen und dann einer Temperaturerhöhung auf 50 °C ausgesetzt. Wie in Abschnitt III. 4.2 und Abb. 21 deutlich wurde, hatte dieser „Hitzeschock“ keinen negativen Einfluss auf das weitere Wachstumsverhalten der Stämme und erwies sich somit als vorteilhafte Methode. Die dargestellten Wachstumsverläufe dienten als Beispiel für alle bislang durchgeführten Wachstumsexperimente.

Auffällig war, dass die Stämme, denen *ectD* am natürlichen Standort im Genom unter Kontrolle des hitzeinduzierbaren σ^S -abhängigen Promotors fehlt (MaKu03-Stämme), eine niedrigere End-OD₆₀₀ erreichten als die drei anderen Stämme. Diesen Wachstumsnachteil beobachtete bereits Ures (2005) an *H. elongata* MaKu03 und erklärte ihn durch das Fehlen von Hydroxyectoin. Für *H. elongata* MaKu03 $\Delta ectB::ectD$ gilt dies jedoch nicht, da der Stamm durch den Austausch von *ectB* gegen *ectD* wieder zur Hydroxyectoin-Synthese befähigt war. Daher scheint die Deletion von *ectD* an seinem natürlichen Standort im Genom selbst das Wachstumsverhalten der MaKu03-Stämme zu beeinflussen. Nach Sequenzanalysen wurde deutlich, dass sich stromabwärts von *ectD* eine Gensequenz befindet, die für eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase kodiert. Dieses Enzym spielt beim Abbau der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin eine wichtige Rolle und besitzt somit eine essentielle metabolische Funktion (Bateman *et al.*, 2001). Durch die von Ures (2005) durchgeführte Deletion des *ectD*-Gens in *H. elongata* MaKu03 wurde gleichzeitig ein putatives Promotorelement, das nach Analysen mittels www.linux1.softberry.com/berry.phtml (Stand 17.06.2011) als σ^{70} -abhängiger Promotor identifiziert werden konnte, deletiert (vgl. Anhang, Abb. 52). Somit könnte die konstitutive Expression des Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Gens gestört sein, was sich letztendlich in der verringerten Biomasse von *H. elongata* MaKu03 auswirkte.

Im Gegensatz zu der verminderten End-OD₆₀₀ der MaKu03-Stämme war die Wachstumsrate der Mutanten, bei denen das *ectB*-Gen durch *ectD* ausgetauscht wurde, nach der Temperaturerhöhung verringert (Abb. 21). Das Fehlen von *ectB* und somit der Aktivität einer funktionstüchtigen L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase resultierte in einem reduzierten Wachstumsverhalten. Dies kann durch die Expression alternativer Synthesewege, die für eine Bereitstellung von L-2,4-Diaminobuttersäure zur Ectoin- und Hydroxyectoin-Synthese sorgen, erklärt werden. Weiterhin könnte EctB mit der Hydroxyectoin-Produktion in Zusammenhang gebracht werden. Bei der durch EctB katalysierten Transaminierungsreaktion von L-Aspartat- β -Semialdehyd zu L-2,4-Diaminobuttersäure dient Glutamat als Aminogruppendonor und wird zu α -Ketoglutarat umgewandelt (Abb. 2). Eine Wechselwirkung der EctB- und EctD-katalysierten Reaktion kann also möglich sein, da α -Ketoglutarat Kofaktor der Hydroxylierungsreaktion ist. In den $\Delta ectB$ -Mutanten muss der Kofaktor durch andere

Reaktionswege, wie z. B. den Zitratzyklus, bereitgestellt werden, was das verlangsamte Wachstum erklären könnte.

4.2. Hydroxyectoin-Produktion bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C und mögliche Regulationsmechanismen

Nach Analyse des zellulären Solutegehalts bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C zeigte sich, dass sich das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis der *Halomonas*-Stämme stark zugunsten von Hydroxyectoin verschob (Abschnitt III. 4.2, Abb. 22). Bei einer Salinität von 15 % NaCl lag der intrazelluläre Hydroxyectoin-Gehalt der genomischen Austauschmutanten zwischen 93 % und 96 %. Auch *H. elongata* Wt zeigte eine starke Akkumulation von Hydroxyectoin. Die große Standardabweichung kann dadurch erklärt werden, dass die Kulturen in verschiedenen Phasen des Wachstums geerntet wurden (früh-stationär und spät-stationär), worauf in Abschnitt IV. 4.3 näher eingegangen wird.

Eine Temperaturerhöhung über die maximale Temperatur, bei der *H. elongata* noch wächst, hinaus, wirkte sich also sehr positiv auf die Hydroxylierung von Ectoin aus. Neben der vermutlich gesteigerten Expressionsrate von *ectD* unter Kontrolle hitzeinduzierbarer Promotoren könnte es sich bei EctD um ein Enzym handeln, welches ein hohes Temperaturoptimum besitzt. Weiterhin könnte die Stabilität und Aktivität von EctD durch posttranslationale Modifikation unter Hitzeeinwirkung erhöht worden sein. Bei EctD aus *H. elongata* handelt es sich um ein relativ instabiles Enzym, das vermutlich durch Proteasen abgebaut wird (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Erhard Bremer, Philipps-Universität Marburg). Ein Sequenzvergleich verschiedener potentieller Ectoinhydroxylasen zeigte, dass EctD aus *H. elongata* die größte Sequenzidentität zu EctD aus dem nah verwandten Stamm *Chromohalobacter salexigens* aufweist (Tab. 15, Abb. 49). Der Vergleich der Aminosäuresequenz ergab eine Identität von 76 %. Zu allen anderen verglichenen putativen Ectoinhydroxylasen wies EctD aus *H. elongata* eine Sequenzidentität zwischen 43 % und 55 % auf. Die Besonderheit der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* besteht in ihrem N-terminalen Überhang. Im Vergleich zu anderen Proteinen besitzen nur EctD aus *H. elongata* und EctE aus *C. salexigens* einen solchen N-terminalen Sequenzüberhang von ca. 30 Aminosäuren. Bei *ectE* handelt es sich um eine in *C. salexigens* vorhandene Kopie des *ectD*-Gens, deren Expression im Vergleich zu *ectD* nur gering ist (Vargas *et*

al., 2008). Auffallend an der *Halomonas*-Sequenz ist, dass dieser Überhang eine erhöhte Anzahl der Aminosäuren Serin und Threonin aufweist, die einen Angriffspunkt für eine posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung darstellen könnten (Abb. 49, gelb hinterlegt). Rosen *et al.* (2004) zeigten, dass saure, phosphorylierte Proteine nur eine kurze Halbwertszeit besitzen. Daher vermuteten sie, dass die Modifizierung durch Proteinphosphorylierung ein Signal zum Abbau darstellen könnte. In eukaryontischen Zellen ist die Modifikation durch Ubiquitin ein erster Schritt der Proteasom-abhängigen Proteolyse (Ciechanover, 1988). So kann spekuliert werden, ob es sich bei EctD auch um ein phosphoryliertes Enzym handelt, welches unter mesophilen Bedingungen einem Abbau durch Proteasen ausgesetzt ist. Erst mit steigender Temperatur, wenn die Zelle auf die Anwesenheit von Hydroxyectoin z. B. zum Schutz der Proteine vor Denaturierung angewiesen ist, würden Serin/Threonin-Phosphatasen aktiv, die zur Abspaltung des Phosphats und somit zur Aktivierung von EctD führen könnten.

Tab. 15 Sequenzidentitäten der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* mit potentiellen EctD-Proteinen aus verschiedenen Organismen

Die Aminosäuresequenz von EctD aus *H. elongata* wurde mit den Aminosäuresequenzen potentieller EctD-Proteine aus verschiedenen Organismen verglichen und die Sequenzidentität ist in Prozent dargestellt.

Organismus	Sequenzidentität (%)
<i>C. salexigens</i>	76
<i>M. aquaeolei</i>	55
<i>S. shabanensis</i>	54
<i>C. salexigens</i> (EctE)	53
<i>P. brasiliensis</i>	53
<i>A. multivorum</i>	51
<i>A. xylooxidans</i>	51
<i>P. stutzeri</i>	49
<i>S. coelicolor</i>	49
<i>S. avermitilis</i>	49
<i>S. avermitilis</i>	49
<i>S. chrysomallus</i>	48
<i>M. alcaliphilum</i>	48
<i>V. salexigens</i>	47
<i>N. halophilus</i>	47
<i>R. equi</i>	43

Neben einer möglichen Aktivierung von EctD unter Hitzeeinfluss könnte es außerdem zu einer Beeinflussung des putativen Hydroxyectoin-Abbauweges kommen. So könnte der „Hitzeschock“ zur Hemmung der Hydroxyectoin-abbauenden Enzyme führen, um ausschließlich Hydroxyectoin in den Zellen zu akkumulieren und die Zelle vor Hitzeeinflüssen zu schützen. Bereits in vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Hydroxyectoin *in vivo* als Thermoschutz fungiert (Malin und Lapidot, 1996; Manzanera *et al.*, 2004). Eine *C. salexigens ectD*-Deletionsmutante war thermo-, jedoch nicht osmosensitiv (García-Esteva *et al.*, 2006). Da Hydroxyectoin die Schmelztemperatur der DNA leicht erhöht, wohingegen Ectoin sie erniedrigt, und Zellbestandteile wie Proteine und Membranen besser vor Hitzeeinflüssen schützt (Abschnitt I.8.1), ist eine Akkumulation von ausschließlich Hydroxyectoin für *H. elongata* von besonderer Bedeutung. Somit wird ein Überleben bei Temperaturen oberhalb der Wachstumsgrenze sichergestellt (Borges *et al.*, 2002; Schnoor *et al.*, 2004). Die Untersuchung der Regulation von EctD oder dem Hydroxyectoin-Abbauweg unter Einfluss eines Hitzeschocks bietet weitere Möglichkeiten zur Optimierung eines Produktionsstammes für das kompatible Solut Hydroxyectoin.

4.3. Sauerstoff als limitierender Faktor der Hydroxylierungsreaktion

Um den Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Hydroxyectoin-Produktion in Abhängigkeit der Wachstumsphase zu analysieren, wurde eine Fermentation mit *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ in MM63-10 durchgeführt (Abschnitt III.4.3, Abb. 23). Die Temperatur von 50 °C konnte aufgrund des hohen Kulturvolumens von 4 L nicht ganz erreicht werden und lag zwischen 47 °C und 48,4 °C. Das Wachstum nach dem „Hitzeschock“ erhöhte sich zunächst und sank dann im Gegensatz zu den Schüttelkolbenversuchen (Abb. 21) auf $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$ ab. Allerdings wurde eine ähnliche End-OD₆₀₀ wie bei Anzucht in 37 °C erreicht (Abb. 12), was zeigt, dass die Zellen auf die Temperaturerhöhung reagierten und ihren Stoffwechsel auf ein Überleben unter Hitzestress umstellten.

Nach Analyse des intrazellulären Solutegehalts wurde deutlich, dass vor der Temperaturerhöhung ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 vorlag, was bereits in einer vorangegangenen Fermentation beobachtet werden konnte (Abschnitt III.1.2.3, Abb. 12). Dies verdeutlicht nochmals, dass die $\Delta ectB::ectD$ -Mutante im Vergleich zu *H. elongata* Wt bereits bei niedrigeren Temperaturen und Salinitäten 50 %

Hydroxyectoin in den Zellen akkumuliert. Nach der Temperaturerhöhung auf 50 °C stieg der Hydroxyectoin-Gehalt kurzfristig auf 150 mg/g TG an, während der Ectoin-Gehalt auf ca. 30 mg/g TG sank, was gleichzeitig mit der Erhöhung der Wachstumsrate einherging. Der Hitzeeinfluss führte, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, zu einer Umstellung des Stoffwechsels auf eine verstärkte Hydroxyectoin-Synthese und machte die Zellen temperaturtolerant. Im weiteren Verlauf der Fermentation wurde allerdings wieder ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 erreicht, was in einer Reduzierung der Wachstumsrate resultierte. Erst beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase sank der Ectoin-Gehalt und Hydroxyectoin erreichte nach etwa 50-stündiger Kultivierung einen Anteil von ca. 94 % am Gesamtsolutegehalt.

Diese Fermentation zeigte, dass die Synthese und der anschließende Abbau von Hydroxyectoin von dem zur Verfügung stehenden Sauerstoff abhingen. Hydroxyectoin wurde zu Ectoin abgebaut, sobald der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) auf unter 20 % sank. Erst in der stationären Phase, nachdem der pO_2 -Gehalt wieder auf 80 % gestiegen war, verschob sich das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis stark zugunsten von Hydroxyectoin. Allerdings war der Gesamtsolutegehalt im Vergleich zum Startzeitpunkt auf etwa 100 mg/g TG gesunken. Ähnliche Beobachtungen machten Bursy *et al.* (2008) in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Der Gesamtsolutegehalt in der stationären Phase bei Anzucht mit einer Temperatur von 39 °C sank auf ca. 50 % im Vergleich zum Solutegehalt in der frühen stationären Phase. Eine physiologische Erklärung für diese Beobachtung konnten Bursy *et al.* (2008) nicht geben. Zum einen könnte es durch die Hitzebehandlung zur Lyse eines Teils der Zellen gekommen sein. Nach dem Hitzeschock und einer kurzfristigen Erhöhung der Wachstumsrate verlangsamte sich das Wachstum von *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$, was mit dem Abbau von Hydroxyectoin zu Ectoin, wahrscheinlich aufgrund des fehlenden Sauerstoffs, einherging. Vermutlich waren die Zellen durch die Akkumulation von Ectoin nicht mehr ausreichend gegen den Hitzeeinfluss geschützt und lysierten so teilweise. Zum anderen könnte in der stationären Phase, in der wieder ausreichend Sauerstoff zur Verfügung stand, Ectoin metabolisiert worden sein, um eine Versorgung mit α -Ketoglutarat für die Hydroxyectoin-Synthese zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu konnte in den Schüttelkolbenversuchen bei einer Anzucht in 10 %igem Medium ca. 200 mg/g TG Gesamtsolut, also ein doppelt so hoher Gehalt als im 4 L-Maßstab, detektiert werden (Abb. 22), was darauf hindeutet, dass die Sauerstoffversorgung ausreichend hoch

genug war. Für eine Produktion in großtechnischem Maßstab ist also für eine vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin eine ausreichende Zufuhr von Sauerstoff notwendig.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode der Temperaturerhöhung auf 50 °C fast ausschließlich Hydroxyectoin in den Zellen akkumuliert wurde. Dies konnte sowohl für *H. elongata* Wt als auch für die genomischen Austauschmutanten beobachtet werden, was neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene die Rolle einer posttranslationalen Regulation bedeutender macht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Sauerstoffzufuhr ein limitierender Schritt der Hydroxyectoin-Produktion ist. Durch Konstruktion der genomischen Mutanten sowie der Optimierung der Kultivierungsbedingungen konnte in der vorliegenden Arbeit also eine fast vollständige Umsetzung von Ectoin zu seinem Hydroxyderivat durch *H. elongata* erzielt werden. Eine einfache Umstellung des Fermentationsverfahrens ermöglicht somit eine starke Erhöhung des Hydroxyectoin-Gehalts, so dass keine weiteren Aufreinigungsmöglichkeiten mehr zur Abtrennung von Ectoin erforderlich sind.

5. *E. coli* als Ganzzellbiokatalyse-System zur Hydroxylierung von Soluten

Neben der Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion in dem industriell angewandten Organismus *H. elongata* wurde *Escherichia coli* als heterologes Expressionssystem näher untersucht. Durch Expression der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* sollte mit Hilfe der Ganzzellbiokatalyse die Hydroxylierung von Ectoin und anderen kompatiblen Soluten sowie dem inkompatiblen Solut Guanidino-Ectoin (Gd-Ectoin) untersucht werden.

Für die Etablierung eines effizienten Ganzzellbiokatalyse-Systems, d. h. einer enzymatisch katalysierten Umwandlung von in den Zellen vorhandenen Substraten, werden verschiedene Faktoren vorausgesetzt. Zum einen muss die Aufnahme der zu hydroxylierenden Substrate in die Zelle gewährleistet sein. Zum anderen muss eine stabile heterologe Expression des *ectD*-Gens erfolgen, so dass die von außen angebotenen Substrate zu ihrem Hydroxyderivat umgewandelt werden können und diese bestenfalls zurück ins Medium exportiert werden. Außerdem sollte dieses System den Kofaktor der Hydroxylierungsreaktion α -Ketoglutarat bereitstellen.

E. coli wurde als Ganzzellbiokatalyse-System gewählt, da eine Vielzahl von Soluten mit Hilfe der osmoregulierbaren Transportsysteme ProP und ProU in die Zelle aufgenommen werden können. Neben den Soluten Prolin und Glycinbetain werden z. B. Ectoin, Cholin, Pipecolinsäure, die Ectoinderivate Homoectoin und DHMICA sowie die inkompatiblen Solute Kreatin und Gd-Ectoin transportiert (Kempf und Bremer, 1998; Vielgraf, 2008; Mann, 2008; Sell, 2009). Ein weiterer Vorteil für *E. coli* als Produktionsstamm für Hydroxyectoin bestand in der Tatsache, dass *E. coli* im Vergleich zu *H. elongata* keinen Hydroxyectoin-Abbauweg besitzt. Ectoin und Hydroxyectoin werden von *E. coli* zwar als Osmo- und/oder Hitzesolut in den Zellen akkumuliert, allerdings können die Solute nicht als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle verwertet werden (Jebbar *et al.*, 1992; Malin und Lapidot, 1996).

Zur Überprüfung des Substratspektrums der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten Ganzzellbiokatalyse-Systeme entwickelt (Abschnitt I. 7.1, Abb. 4). So nutzte Ures (2006, unveröffentlicht) *E. coli* BL21 (DE3) als Expressionssystem. Nach Konstruktion des Plasmids pETectDcyt., bei dem das *ectD*-Gen unter Kontrolle des T7-Promotors kloniert wurde, konnte die *ectD*-Expression durch IPTG induziert werden, da das Gen der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lacUV*-Promotors liegt. In weiterführenden Versuchen traten mit diesem System allerdings immer wieder Probleme bei der Hydroxylierungsreaktion auf. Besonders bei Kultivierungen in größerem Maßstab wurden Substrate wie Ectoin nur unvollständig zum Hydroxyderivat umgesetzt (persönliche Mitteilung, Stein). Vielgraf (2008) zeigte weiterhin, dass nach SDS-PAGE-Analysen keine Überexpressionsbanden des *ectD*-Gens bei Nutzung des Ganzzellsystems *E. coli* BL21 pETectDcyt. nachgewiesen werden konnten. Diese Beobachtung ist untypisch für pET-basierte Systeme, da sie vor allem für die Überexpression von Genen etabliert wurden. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass EctD in unlöslicher Form als *inclusion bodies* in den Zellen vorlag. Bereits Grammel (2000) zeigte, dass die Ectoinhydroxylase ThpD aus *Streptomyces chrysomallus* bei der heterologen Expression in *E. coli* M15, in dem das *ectD*-Gen unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors liegt und ebenso IPTG-induzierbar ist, in Form von *inclusion bodies* ausfiel. Aufgrund der Problematik bei der Nutzung von *E. coli* BL21 pETectDcyt. wurde ein weiteres Ganzzellbiokatalyse-System entwickelt, das eine salzinduzierbare Expression des *ectD*-Gens erlaubte. Dazu wurde der T7-Promotor von pETectDcyt. gegen den osmoregulierbaren Ectoin-Promotor (*promA*) aus

Marinococcus halophilus ausgetauscht, welcher nachweislich in *E. coli* funktionell ist (Bestvater *et al.*, 2008), und das Konstrukt pETectD_promA in *E. coli* DH5 α transformiert (Vielgraf, 2008). Durch Zugabe von NaCl wurde in dem resultierenden Stamm *E. coli* DH5 α VIBO somit nicht nur die Expression des *ectD*-Gens induziert, sondern auch eine Aufnahme der von außen angebotenen Solute durch die Transportsysteme ProP und ProU in die Zellen erzielt. Da gezeigt werden konnte, dass EctD neben Ectoin weitere Substrate hydroxyliert (Stein *et al.*, 2008, VAAM-Poster; Vielgraf, 2008; Abschnitt IV. 5.4), wurde das Verfahren der stereospezifischen Hydroxylierung durch Ganzzellbiokatalyse patentiert (Galinski *et al.*, 2007, DE 10 2007 052 900 A1).

5.1. *E. coli* DH5 α VIBO als Ganzzellbiokatalyse-System

Nach Anzucht von *E. coli* DH5 α VIBO in MM63-1/100Carb (VA), Supplementierung mit 2 mM Ectoin und Durchführung eines Salzschocks auf 2 bis 4 % NaCl wurde eine salinitätsabhängige Akkumulation von Ectoin und Hydroxyectoin in den Zellen detektiert (Abschnitt III. 6.1, Abb. 25). Die Expression des *ectD*-Gens mit dem salzinduzierbaren System war erfolgreich, da bereits ab einer Salinität von 2 % NaCl fast ausschließlich Hydroxyectoin in den Zellen detektiert wurde. Somit wurde das den Zellen angebotene Ectoin mit Hilfe des Ganzzellbiokatalyse-Systems zu seinem Hydroxyderivat umgewandelt.

5.1.1. Akkumulation der hydroxylierten Verbindung im Medium

Die Untersuchung des Kulturüberstandes ergab erwartungsgemäß eine Abnahme des Solutegehalts mit steigender Salinität. Neben Ectoin wurde außerdem Hydroxyectoin detektiert. Bei einer Salinität von 1 % NaCl lag Ectoin noch in einer Konzentration von 1,5 mM vor, wohingegen ab einer Salinität von 3 % NaCl fast ausschließlich Hydroxyectoin detektiert werden konnte (Abschnitt III. 6.1, Abb. 25). Dies lässt auf ständige Freisetzung der Solute neben der erneuten Aufnahme schließen. Die Freisetzung aus den Zellen könnte auf passive Weise mit Hilfe von mechanosensitiven Kanälen erfolgen. Dabei handelt es sich um Effluxsysteme, die unter hypoosmotischen Bedingungen einen schnellen Ausstrom der intrazellulär akkumulierten Solute vermitteln und so einem Wassereinstrom, dem damit einhergehenden Anstieg des Turgordrucks und einem möglichen Platzen der Zelle entgegenwirken (Berrier *et al.*, 1992; Sukharev *et al.*, 1997). In *E. coli* ließen sich drei Typen an mechanosensitiven

Kanälen anhand der Porengröße identifizieren: MscM, MscS und MscL (*mechanosensitive channel of mini, small and large conductance*) (Berrier *et al.*, 1996; Levina *et al.*, 1999). Mechanosensitive Kanäle reagieren auf Membranspannung und werden nach Überschreitung eines bestimmten Schwellenwerts aktiviert (Berrier *et al.*, 1996). Obwohl bei der Anzucht von *E. coli* DH5 α VIBO kein Wechsel von hyper- zu hypoosmotischen Bedingungen stattfand, wurde bislang vermutet, dass mechanosensitive Kanäle zum Herausströmen der Solute aus den Zellen verantwortlich sind. Ebenso könnten aber auch bestimmte spezifische Transportsysteme daran beteiligt sein. *Bacillus subtilis*-Stämme, deren mechanosensitive Kanäle deletiert waren, zeigten dennoch eine Ansammlung von *de novo* synthetisiertem Prolin im Medium (Prof. Dr. E. Bremer, „Driving up the pressure - genetic and cellular responses of *Bacillus subtilis* to osmotic stress“, VAAM-Jahrestagung 2011, Karlsruhe).

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde die Akkumulation der hydroxylierten Version von kompatiblen Soluten im Medium beobachtet (Stein *et al.*, 2008, VAAM-Poster; Vielgraf, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei Anzucht von *E. coli* DH5 α VIBO ab einer Salinität von 3 % NaCl fast ausschließlich Hydroxyectoin nachgewiesen werden konnte (Abschnitt III. 6.1, Abb. 25). Dies könnte darauf beruhen, dass die Transporter bzw. Aufnahmesysteme für kompatible Solute ProP und/oder ProU eine höhere Affinität zu der unhydroxylierten Variante besitzen und so Ectoin bevorzugt aufnehmen. Vielgraf (2008, unveröffentlicht) zeigte, dass *E. coli* K12-Zellen bei Wettbewerbsversuchen mit Ectoin und Hydroxyectoin 10 mal mehr Hydroxyectoin von außen angeboten werden muss, um ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 intrazellulär zu akkumulieren. Zur genaueren Untersuchung davon sind weitere Transporter- und Affinitätsstudien notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

5.1.2. Hydroxylierung von 10 mM Ectoin

Da gezeigt werden konnte, dass *E. coli* DH5 α VIBO zu einer Hydroxylierung von 2 mM Ectoin befähigt ist, wurde in einem nächsten Schritt überprüft, ob auch höhere Mengen an Substrat umgesetzt werden. Dazu wurde der Stamm mit 10 mM Ectoin supplementiert und auf eine Salinität von 3 % NaCl geschockt, da diese Salinität ausreichend hoch war, um 2 mM Ectoin vollständig zu hydroxylieren (Abschnitt III. 6.1, Abb. 25). Auch hier erfolgte eine Akkumulation von Hydroxyectoin im Medium. 17,5 h

nach Durchführung des Salzschocks lag ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 im Medium vor, das sich im weiteren Verlauf der stationären Phase nicht mehr änderte (Abschnitt III. 6.2, Abb. 26). Erst nach erneuter Glucose-Supplementierung verschob sich das Verhältnis weiter zugunsten von Hydroxyectoin, so dass am Ende der Kultivierung nur noch ca. 13 % Ectoin im Medium detektierbar waren. Die Supplementierung von Glucose führte also zu einem erneuten Wachstum von *E. coli* DH5 α VIBO und verbunden damit zur Bereitstellung von α -Ketoglutarat als Kofaktor für die Hydroxylierungsreaktion, bedingt durch einen intakten Zitratzyklus. Allerdings wurde keine vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin erzielt. Eine dreimalige Nachfütterung mit Glucose führte zu keiner Verbesserung der Hydroxylierungsreaktion (nicht dargestellt). Dies könnte zum einen durch das Fehlen von Stickstoff und zum anderen durch den „*glucose overflow metabolism*“ in *E. coli* erklärt werden. Aerobes Wachstum von *E. coli* in Gegenwart hoher Glucose-Konzentrationen führt zur Akkumulation und Ausscheidung von Acetat (Hollywood und Doelle, 1976; Andersen und von Meyenburg, 1980; Vemuri *et al.*, 2006; Veit *et al.*, 2007). Acetyl-CoA wird demnach nicht in den Zitratzyklus eingeschleust, so dass α -Ketoglutarat gebildet werden kann, sondern in zwei Schritten, katalysiert durch die Phosphotransacetylase und Acetokinase, zu Acetat umgesetzt (Brown *et al.*, 1977).

Die spezifische Umsatzrate von Ectoin zu Hydroxyectoin in *E. coli* DH5 α VIBO wurde auf 158 mg (g TG⁻¹ h⁻¹) geschätzt. Im Vergleich zu anderen Systemen ist diese Rate relativ hoch (vgl. Abschnitt IV. 9). Jedoch wurde eine Konzentration von 10 mM Ectoin nicht vollständig umgesetzt. Wie in vorangegangenen Abschnitten erläutert (IV. 2, IV. 3), ist der intrazelluläre EctD-Gehalt ein entscheidendes Kriterium der Hydroxylierung von Ectoin. Möglicherweise könnte der für dieses Ganzzellbiokatalyse-System genutzte *promA* aus *M. halophilus*, wie *promA* aus *H. elongata* (Abschnitt IV. 3), ein schwacher Promotorbereich sein, der zu einer nicht ausreichenden Expression des *ectD*-Gens führte und somit u. a. ein Grund der unvollständigen Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin ist. Daher wurde in einem nächsten Schritt ein alternativer Weg der Ganzzellbiokatalyse verfolgt, der zu einer erhöhten Expression von *ectD* und somit zu einer vollständigen Hydroxylierung von Ectoin führen sollte.

5.2. *E. coli* BL21 (DE3) pETectDHis als Ganzzellbiokatalyse-System

Für eine mögliche industrielle Nutzung des Ganzzellbiokatalyse-Systems zur Hydroxylierung von Ectoin und anderen Soluten ist neben einer hohen Umsatzrate eine vollständige Hydroxylierung erforderlich. Daher wurde der Stamm *E. coli* BL21 pETectDHis konstruiert (Abschnitt III. 7.1, Abb. 27). In vorangegangenen Arbeiten war zwar bereits ein ähnliches System entwickelt worden, allerdings bereiteten die Expression des *ectD*-Gens und die Hydroxylierung von Soluten in größerem Kulturmaßstab Schwierigkeiten (Abschnitt I. 7.1, IV. 5). Desweiteren sollte mit diesem System das *ectD*-Gen mit einem carboxyterminalen His₆-tag versehen werden, um *in vitro* Tests an EctD durchführen zu können.

Nach Analyse des Gesamtzellproteins von *E. coli* BL21 pETectDHis zeigte sich, dass, im Gegensatz zu *E. coli* BL21 pETectDcyt., eine heterologe Expression der Ectoinhydroxylase EctDHis gegeben war (Abschnitt III. 7.2, Abb. 28). Die Bande verlief zwar etwas unterhalb der theoretisch vorausgesagten Größe von EctDHis mit 38,9 kDa, in Folge der Aufreinigung von EctDHis mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie konnte aber festgestellt werden, dass es sich dabei tatsächlich um das Zielprotein handelte (Abschnitt III. 9.1, Abb. 41).

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob die C-terminale Fusion des *ectD*-Gens mit einem His-tag Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms hat. Zum Ausgleich der erhöhten Salinität akkumulierte die Negativkontrolle *E. coli* BL21 pET-22b(+) über 110 mg Ectoin/g TG in den Zellen. Im Medium befand sich am Ende der Kultivierung noch 1 mM Ectoin (Abschnitt III. 7.3, Abb. 29). Eine weitere Negativkontrolle war *E. coli* BL21 pETectDHis, deren *ectD*-Expression nicht durch IPTG induziert wurde. Interessanterweise konvertierte dieser Stamm das den Zellen angebotene Ectoin zu über 90 % zu Hydroxyectoin. Auch im Medium befand sich überwiegend die hydroxylierte Variante. Eine Basalexpression des *ectD*-Gens in *E. coli* BL21 pETectDHis war also vorhanden. Bei der mit IPTG induzierten Kultur konnte in den Zellen und im Medium eine Akkumulation von ausschließlich Hydroxyectoin detektiert werden. Auffallend war, dass im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen der intrazelluläre Hydroxyectoin-Gehalt nur bei 40 mg/g TG lag. Diese Beobachtung konnte in unabhängigen Versuchen reproduziert werden und lässt vermuten, dass die hydroxylierte Variante nur noch schlecht in die Zellen aufgenommen wird.

Möglicherweise könnte dies auf Veränderungen der Aminosäuresequenz der Solutetransporter ProP und ProU zurückzuführen sein. Tatsächlich zeigten Sequenzanalysen des Transportsystems ProP und des periplasmatischen Substratbindeproteins ProX, das Teil des osmotisch induzierten Transportsystems ProU ist, aus *E. coli* BL21 im Vergleich zur Sequenz aus dem Originalstamm *E. coli* K12 für ProP drei Aminosäureaustausche und für ProX einen Aminosäureaustausch (nicht dargestellt, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; Stand 23.06.11). Somit kann spekuliert werden, ob sich durch diese Mutation die Affinität der Transporter für Hydroxyectoin in *E. coli* BL21 derart verschlechterte, dass es zu kaum einer Aufnahme von Hydroxyectoin mehr kam. Im Gegensatz dazu lag bei der uninduzierten *E. coli* BL21 pETectDHis-Kultur allerdings noch viel Hydroxyectoin in den Zellen vor, was durch eine langsamere Umsetzung aufgrund der verminderten *ectD*-Expression und somit einer langsameren Ausscheidung ins Medium erklärt werden könnte. Weitere Untersuchungen zur Affinität der Transporter für die hydroxylierte Variante in *E. coli* BL21 wären in diese Richtung erforderlich.

Außerdem zeigte sich, dass in diesem Versuchsansatz eine niedrigere Endkonzentration als 2 mM Ectoin zur Supplementierung eingesetzt wurde, da die Summe aus der im Medium vorhandenen und der in den Zellen akkumulierten Solute geringer war. Vermutlich war das für die Supplementierung verwendete Ectoin verunreinigt oder die Lagerung der Ectoin-Stammlösung führte zu einem Zerfall des Solut. Insgesamt konnte aber gezeigt werden, dass die C-terminale Fusion des *ectD*-Gens mit einem His-tag keine Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms hatte und *E. coli* BL21 pETectDHis als Ganzzellbiokatalyse-System eingesetzt werden konnte.

5.3. Hydroxylierung von 10 mM Ectoin

Bei Supplementierung von 10 mM Ectoin erwies sich das Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* BL21 pETectDHis als effiziente Alternative zu *E. coli* DH5 α VIBO. Bereits 30 min nach Durchführung des Salzschocks auf 3 % NaCl, der zur Aufnahme des Solut in die Zellen führte, konnte Hydroxyectoin im Medium detektiert werden (Abschnitt III. 7.3.1, Abb. 30). Dies zeigt, dass die durch das pET-System vermittelte hohe Expression des *ectD*-Gens zu einer schnellen Hydroxylierung von Ectoin führte. Die berechnete spezifische Umsatzrate dieses Systems lag bei 320 mg (g TG⁻¹) h⁻¹, also doppelt so hoch als bei *E. coli* DH5 α VIBO. Außerdem lagen am Ende der Kultivierung neben nur noch

0,3 mM Ectoin 6,5 mM Hydroxyectoin im Medium vor. Der Hydroxyectoin-Anteil der im Medium vorhandenen Solute lag somit bei über 95 %.

Zur weiteren Optimierung bzw. zum Versuch der vollständigen Konvertierung von Ectoin zu Hydroxyectoin wurden verschiedene Versuche mit dem Ganzzellsystem durchgeführt. Zum einen wurde *E. coli* BL21 pETectDHis in MM63-1/100Carb angezogen und auf höhere Salinitäten von 4 % und 5 % NaCl geschockt. Hier konnte allerdings keine Verbesserung gegenüber der Anzucht von 1 % auf 3 % NaCl detektiert werden. Es verblieben bis zu 0,5 mM Ectoin im Medienüberstand (> 95 % Hydroxyectoin), was darauf hindeutet, dass die Wiederaufnahme von Ectoin in die Zellen ein limitierender Faktor des Ganzzellbiokatalyse-Systems darstellen könnte.

Zum anderen wurde der Kofaktor der Hydroxylierungsreaktion α -Ketoglutarat in der stationären Wachstumsphase zugesetzt. *E. coli* besitzt eine membranständige α -Ketoglutarat Permease (KgtP), die konstitutiv exprimiert wird (Seol und Shatkin, 1992). Somit sollte *E. coli* in der Lage sein, α -Ketoglutarat in die Zelle aufzunehmen und für die Hydroxylierungsreaktion zu nutzen. Allerdings lagen auch hier am Ende der Kultivierung immer noch 5 % Ectoin im Medium vor.

Auch eine Anzucht in Glycerin anstelle von Glucose als C-Quelle erbrachte keine vollständige Umsetzung von 10 mM Ectoin zu Hydroxyectoin. Nach Grossmann *et al.* (1998) wird die Basalexpression der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors in *E. coli* BL21 durch Glucose, aufgrund der Katabolitrepression, niedrig gehalten. Dies ist besonders bei der Expression von toxischen Genen wichtig. Im Gegensatz dazu soll die Expression des *ectD*-Gens in *E. coli* BL21 optimal erfolgen. Daher wurde das Minimalmedium mit der alternativen C-Quelle Glycerin in einer Konzentration von 50 mM angesetzt. Im Hinblick auf eine industrielle Nutzung handelt es sich bei Glycerin zudem um eine billigere C-Quelle als Glucose. Dass allerdings durch Nutzung von Glycerin als C-Quelle eine verschlechterte Hydroxylierung von Ectoin beobachtet wurde, da am Ende der Kultivierung noch ca. 2 mM Ectoin im Medium vorlagen, könnte eventuell dadurch erklärt werden, dass die EctD-Proteine aufgrund einer zu starken Expression als *inclusion bodies* ausgefallen sind und in unlöslicher Form in der Zelle vorlagen. Zur Bestätigung dieser Vermutung wären weiterführende SDS-PAGE-Analysen erforderlich.

Statt Glucose und Glycerin wurde außerdem Glutamat als C-Quelle getestet. Glutamat kann von *E. coli* über drei verschiedene L-Glutamat-Transportsysteme in die Zelle aufgenommen werden (Szvetnik, 2004). Im Hinblick auf die Hydroxylierung von Ectoin stellte sich die Nutzung von Glutamat als sehr positiv dar. Nach Anzucht von *E. coli* BL21 pETectDHis in MM63-1/100Carb (50 mM Glutamat), Induktion der Expression des *ectD*-Gens mit IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,8 und Durchführung eines Salzschocks auf 4 % NaCl lag am Ende der Kultivierung sowohl intrazellulär als auch im Medienüberstand fast ausschließlich Hydroxyectoin vor (Abschnitt III. 7.3.1, Abb. 31). In den Zellen wurde nur noch ein Gesamtsolutegehalt von ca. 15 mg/g TG detektiert und geht einher mit den Beobachtungen, dass die hydroxylierte Variante, nachdem sie aus den Zellen ins Medium gelangt ist, von *E. coli* BL21 nur noch schlecht wieder aufgenommen wird (vgl. dazu Abschnitt IV. 5.2). Im Medium wurden 99 % Hydroxyectoin am Gesamtsolutegehalt detektiert. Bei einer Anzucht mit Glutamat steht im Gegensatz zur Anzucht mit Glucose direkt α -Ketoglutarat als Kofaktor der Hydroxylierung von Ectoin zur Verfügung, da es durch die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase zu α -Ketoglutarat umgewandelt werden kann (Sakamoto *et al.*, 1975). Außerdem handelt es sich bei Glutamat um ein kompatibles Solut, das unter hyperosmotischen Bedingungen in den Zellen akkumuliert wird. Mittels FMOC/ADAM-HPLC bleibt zu testen, ob der geringe intrazelluläre Hydroxyectoin-Anteil durch die Akkumulation von Glutamat kompensiert worden ist.

Mit *E. coli* BL21 pETectDHis wurde also ein Ganzzellbiokatalyse-System etabliert, welches eine Umsetzung von Ectoin bis zu einer Konzentration von 10 mM erlaubte. Höhere Konzentrationen (20 mM) zeigten eine Akkumulation von 10 mM hydroxyliertem Produkt im Medium. Die Limitierung des Verfahrens beruht daher möglicherweise auf der Wiederaufnahme des Substrats oder Produkts in die Zelle.

5.4. EctD ist nicht substratspezifisch

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits beobachtet werden, dass die Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata* nicht substratspezifisch ist und neben dem natürlichen Substrat Ectoin weitere Solute hydroxyliert werden. Hierbei handelte es sich um zyklische Verbindungen wie Prolin oder ADPC sowie die synthetischen Ectoinderivate Homoectoin und DHMICA (Stein *et al.*, 2008, VAAM-Poster; Vielgraf, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Hydroxylierung von Prolin und

DHMICA erstmalig auch die Hydroxylierung des inkompatiblen Soluts Gd-Ectoin näher betrachtet.

Vielgraf (2008) detektierte mit dem Ganzzellsystem *E. coli* BL21 pETectDcyt. nach Supplementierung von Prolin nur geringe Spuren an OH-Prolin in den Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung mit dem Ganzzellsystem *E. coli* BL21 pETectDHis bestätigt werden. In den Zellextrakten wurden nur geringe Mengen an OH-Prolin nachgewiesen, im Medienüberstand kam es allerdings im Laufe der Kultivierung zu einer Akkumulation von OH-Prolin (Abschnitt III. 7.4, Abb. 32). Dies deutet darauf hin, dass die Affinität der Transporter ProP und ProU für OH-Prolin niedriger ist, wie es bereits für Hydroxyectoin beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu wird die unhydroxylierte Variante Prolin mit hoher Affinität über die Transporter in die Zellen aufgenommen (Gousbet *et al.*, 1994; Culham *et al.*, 2003). Da Prolin von *E. coli* auch als C- oder N-Quelle genutzt werden kann, wurde vermutlich, nach Verbrauch der C-Quelle Glucose, Prolin und eventuell auch OH-Prolin metabolisiert (Kempf und Bremer, 1998).

Die Hydroxylierung des Ectoinderivats DHMICA konnte mittels HPLC-Analysen nicht eindeutig geklärt werden. Nach Supplementierung mit 2 mM DHMICA und Durchführung eines Salzschocks kam es in den Zellextrakten von *E. coli* BL21 pETectDHis zwar zu einer Abnahme des DHMICA-Signals, allerdings ließ sich kein neues Signal, welches hätte OH-DHMICA zugeordnet werden können, detektieren. Da DHMICA von *E. coli* nicht metabolisiert wird, entstand möglicherweise nach der Hydroxylierung durch EctD ein instabiles hydroxyliertes Zwischenprodukt, welches im Zuge einer Dehydratisierungsreaktion zu einer aromatischen Verbindung (2-Methyl-1H-imidazol-4-carbonsäure) reagierte. Diese Substanz konnte mittels der in der vorliegenden Arbeit verwendeten HPLC-Methode nicht detektiert werden. Weitere Untersuchungen durch NMR-Analysen mit entsprechenden Vergleichssubstanzen würden der Aufklärung dienen.

Die bislang von EctD hydroxylierten Verbindungen sind in Abschnitt III. 7.4, Abb. 33 dargestellt. Neben dem natürlichen Substrat Ectoin konnte die Hydroxylierung des Ectoinderivats Homoectoin bereits von Vielgraf (2008) nachgewiesen werden. Witt (unveröffentlicht) zeigte außerdem, dass die Verbindung ADPC (5-Amino-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-carbonsäure), die als neuartiges kompatibles Solut klassifiziert wurde, von

EctD als Substrat erkannt und zu OH-ADPC umgewandelt wurde. Bei EctD aus *H. elongata* handelt es sich daher um ein verhältnismäßig unspezifisches Enzym, das eine Reihe von zyklischen Verbindungen hydroxyliert. Mit *E. coli* BL21 pETectDHis steht somit in Zukunft ein Ganzzellbiokatalyse-System zur Verfügung, das die Produktion von neuen hydroxylierten Substanzen ermöglicht, die nach entsprechender Aufreinigung näher charakterisiert werden können.

6. Hydroxylierung des inkompatiblen Soluts Guanidino-Ectoin

Die Hydroxylierung des inkompatiblen Soluts Gd-Ectoin wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig näher untersucht. Bei Gd-Ectoin handelt es sich um ein chemisch synthetisiertes Ectoin-Derivat, das durch den Austausch der Methyl- durch eine Aminogruppe die Eigenschaft eines kompatiblen Soluts verliert und als inkompatibles Solut klassifiziert wurde (Abschnitt I. 9, Abb. 6).

Gd-Ectoin wurde nach der in Abb. 8 dargestellten Reaktion chemisch synthetisiert. Der Erfolg der Synthese konnte mittels HPLC-Analyse und ¹³C-NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Das NMR-Spektrum zeigte neben den Signalen der internen Standards Acetonitril und Na-TMSP fünf Signale, die Gd-Ectoin zugeordnet wurden (Abschnitt III. 8.1, Abb. 34).

6.1. Effekt von Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* MC4100

Nach Anzucht von *E. coli* MC4100 bei Salinitäten von 1 % NaCl bis 3 % NaCl und Supplementierung mit Gd-Ectoin in verschiedenen Konzentrationen verringerte sich die relative Wachstumsrate in Anwesenheit von Gd-Ectoin im Vergleich zu Kontrollkulturen, die ohne Solut angezogen wurden (Abschnitt III. 8.2, Abb. 35). Bei einer Salinität von 1 % NaCl war die relative Wachstumsrate nur leicht verringert, was durch die geringe Aufnahme von Gd-Ectoin in die Zellen begründet werden könnte. Ab einer Salinität von 2 % NaCl reduzierte sich die relative Wachstumsrate auf 60-70 % im Vergleich zur Kontrolle. Diese Werte sind vergleichbar mit den von Sell (2009) ermittelten Ergebnissen. Sell zeigte, dass das Wachstum von *E. coli* K12 bei einer Salinität von 3 % NaCl und Supplementierung mit 4 mM Gd-Ectoin auf ca. 60 % im Vergleich zur Kontrolle verringert war. Als bevorzugtes Aufnahmesystem für Gd-Ectoin wurde nach Versuchen mit entsprechenden Transportermutanten das Transportsystem ProU identifiziert, das auch bei der Aufnahme des inkompatiblen Soluts Kreatin eine wichtige Rolle spielt (Sell und Galinski, 2011; VAAM-Poster). Wie

Kreatin mit dem strukturell verwandten Betain wurde Gd-Ectoin mit Ectoin „verwechselt“ und unter hyperosmotischen Bedingungen in die Zelle aufgenommen, was in einem hemmenden Effekt des bakteriellen Wachstums resultierte. Die Wirkungsweise oder das mögliche Target von inkompatiblen Soluten ist bislang noch nicht eindeutig identifiziert. Die Guanidiniumgruppe scheint allerdings eine wichtige Rolle bei der Hemmung zu spielen, da sich neben Kreatin auch Gd-Ectoin negativ auf das Wachstum von *E. coli* und anderen *Enterobacteriaceae* auswirkte. Neben proteindenaturierenden Effekten könnte eine Hemmung von Natrium/Protonen-antiportern und eine damit einhergehende Störung der pH-Homöostase für das verringerte Wachstum von *E. coli* verantwortlich sein (Dibrov *et al.*, 2005; Waldmann, 2005). Weiterhin postuliert wird eine Interaktion mit dem bei der stringenten Kontrolle in *E. coli* synthetisierten Signalmolekül Guanosin-3',5'-bispyrophosphat (ppGpp), was in einer Störung der globalen Regulation der Genexpression unter Stressbedingungen resultieren könnte.

6.2. Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch EctD

Da EctD aus *H. elongata* neben Ectoin weitere zyklische Solute hydroxylierte, wurde getestet, ob das inkompatible Solut Gd-Ectoin ebenfalls als Substrat erkannt wird. Dazu wurde das Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* BL21 pETectDHis genutzt. Als Negativkontrolle diente *E. coli* BL21 pET-22b(+). Nach Anzucht in MM63-1/100Carb, Supplementierung mit 2 mM Gd-Ectoin und Durchführung eines Salzschocks auf 4 % NaCl wurden neben Gd-Ectoin ca. 60 mg Trehalose/g TG in den Zellen akkumuliert (Abschnitt III. 8.3, Abb. 35). Im Gegensatz zur Supplementierung mit Ectoin, bei der keine Trehalose intrazellulär akkumuliert wurde, um den osmotischen Stress auszugleichen (Abschnitt III. 7.3, Abb. 29), führte eine Gd-Ectoin-Supplementierung zur *de novo* Synthese von Trehalose. Dies wurde bereits von Sell (2009) beobachtet und bestätigt die Tatsache, dass es sich bei Gd-Ectoin um ein inkompatibles Solut handelt, welches nicht als Osmolyt fungiert.

E. coli BL21 pETectDHis zeigte nach Induktion der Expression des *ectD*-Gens mit IPTG eine komplette Hydroxylierung von Gd-Ectoin. Die Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch EctD wurde auch mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie bestätigt (Abschnitt III. 8.6, Abb. 40). Somit wurde das Substratspektrum von EctD um eine weitere Substanz ergänzt. In den Zellen von *E. coli* BL21 pETectDHis lagen neben Trehalose (ca. 40 mg /g TG) 100 mg OH-

Gd-Ectoin/g TG vor (Abschnitt III. 8.3, Abb. 35). Da die hydroxylierte Variante bislang noch nicht in reiner Form vorliegt, wurde als Standardsubstanz zur Quantifizierung Gd-Ectoin verwendet, welches aus einer chemischen Synthese stammte. Auch im Medienüberstand kam es zu einer Akkumulation von OH-Gd-Ectoin in einer Konzentration von ca. 1,1 mM, wie es bereits für Hydroxyectoin und andere hydroxylierte Verbindungen beobachtet wurde und durch die geringere Affinität der Transporter für die hydroxylierte Variante begründet werden konnte. Da auch hier, wie in Abschnitt III. 7.3 bei der Supplementierung mit Ectoin, die Summe aus des in den Zellen akkumulierten und im Medium enthaltenen Solut weniger als die eingesetzte Konzentration von 2 mM war, wurde vermutlich weniger Gd-Ectoin eingesetzt. Auch hier kann spekuliert werden, ob die Substanz nicht in 100 %iger Reinheit vorlag und so die Massenangaben verfälschte oder ob es durch Lagerung bei Raumtemperatur zu einer Hydrolyse von Gd-Ectoin gekommen ist.

Weiterhin zeigte sich, dass die zweite Negativkontrolle, *E. coli* BL21 pETectDHis, deren *ectD*-Expression nicht mit IPTG induziert wurde, neben Trehalose ausschließlich OH-Gd-Ectoin in den Zellen akkumulierte. Auch im Medium wurde neben Spuren von Gd-Ectoin die hydroxylierte Variante detektiert. Die Basalexpression des *ectD*-Gens in diesem Ganzzellbiokatalyse-System war also hoch genug, um geringe Konzentrationen an Substrat zu hydroxylieren.

6.3. Fermentation zur Untersuchung der Hydroxylierung von Gd-Ectoin

Zur Überprüfung der Hydroxylierung von Gd-Ectoin in Abhängigkeit der Wachstumsphase und zur möglichen Aufreinigung der hydroxylierten Verbindung wurde eine Fermentation mit *E. coli* BL21 pETectDHis durchgeführt. Zunächst wurde deutlich, dass das Wachstum von *E. coli* BL21 pETectDHis nach Induktion mit IPTG, Supplementierung mit Gd-Ectoin und Durchführung eines Salzschocks einbrach (Abschnitt III. 8.4, Abb. 37). Dies konnte in vorangegangenen Versuchen bereits nach Supplementierung mit Ectoin beobachtet werden und wurde auf die Überexpression des *ectD*-Gens und die Adaptation des Metabolismus auf eine starke Proteinexpression zurückgeführt (Wachstumskurven nicht dargestellt). Im Gegensatz zu mit Gd-Ectoin supplementierten Zellen erholte sich das Wachstum im Zuge der Kultivierung aber wieder. Dies konnte für mit Gd-Ectoin supplementierte Zellen durch den wachstumshemmenden Effekt nicht beobachtet werden.

Bereits 30 min nach Durchführung des Salzschocks lag ausschließlich OH-Gd-Ectoin in den Zellen vor (Abschnitt III. 8.4, Abb. 37). Gd-Ectoin wurde in die Zellen aufgenommen und durch die Aktivität von EctD zu OH-Gd-Ectoin umgewandelt. Außerdem wurde wie erwartet deutlich, dass nach Erhöhung der Salinität Trehalose in den Zellen akkumuliert wurde. Das Osmolyt wurde zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts *de novo* synthetisiert und erreichte zum Zeitpunkt der Ernte eine Konzentration von 40 mg/g TG, die vergleichbar war mit den in Abb. 36 dargestellten Werten des Schüttelkolbenversuchs. Im Medium kam es ebenfalls wieder zu einer Akkumulation der hydroxylierten Verbindung. Da die Bestimmung des Solutegehalts aufgrund der geringen Menge an vorhandener Substanz nur in einer Einfachbestimmung durchgeführt wurde, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die Abnahme des Solutegehalts während der Fermentation signifikant ist. Wie auch im Schüttelkolbenversuch wurde eine geringere Konzentration im Medium detektiert als erwartet und könnte dadurch erklärt werden, dass die chemisch synthetisierte Substanz nicht in 100 %iger Reinheit vorlag oder dass es durch die Lagerung der Stammlösung zu einer Hydrolyse von Gd-Ectoin gekommen ist. Die spezifische auf die Biomasse bezogene Umsatzrate wurde auf etwa $320 \text{ mg (g TG}^{-1}) \text{ h}^{-1}$ geschätzt und war somit vergleichbar mit den für Ectoin erhaltenen Werten (vgl. Abschnitt IV. 5.3).

6.4. Einfluss von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli*

Die Aufreinigung der hydroxylierten Verbindung konnte aus zeitlichen Gründen in der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Um allerdings einen ersten Hinweis über die Wechselwirkung von OH-Gd-Ectoin mit Bakterienzellen zu erhalten, wurde *E. coli* BL21 pETectDHis in Minimalmedium unter Zugabe verschiedener Konzentrationen an Gd-Ectoin bei Salinitäten von 1 bis 3 % NaCl angezogen und die relative Wachstumsrate bestimmt. Da in Abschnitt III. 8.3 gezeigt werden konnte, dass dieser Stamm auch ohne IPTG-Zugabe *ectD* exprimiert und Gd-Ectoin hydroxyliert wurde, sollte so indirekt durch intrazelluläre Umwandlung der Effekt von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* untersucht werden.

Es zeigte sich, dass nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an Gd-Ectoin das Wachstum von *E. coli* BL21 pETectDHis im Vergleich zur Kontrolle, die ohne Solut angezogen wurde, gehemmt wurde (Abschnitt III. 8.5, Abb. 38). Bereits bei einer Salinität von 1 % NaCl sank die relative Wachstumsrate auf einen Wert von 80 % im

Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz zu dem Effekt von Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* MC4100 war die Hemmung bei dieser Salinität stärker (Abb. 35). Die relativen Wachstumsraten bei einer Salinität von 2 % und 3 % NaCl verringerten sich auf 60-70 % im Vergleich zur Wachstumsrate der Kontrollkulturen. Somit scheint OH-Gd-Ectoin ebenfalls einen negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* auszuüben. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass neben der hydroxylierten Variante zum Zeitpunkt der Wachstumsratenbestimmung noch unhydroxyliertes Gd-Ectoin in den Zellen vorlag. Da der Versuchsaufbau in Mikrotiterplatten durchgeführt wurde und so der intrazelluläre Solutegehalt im Verlauf der Wachstumsphase nicht gemessen werden konnte, wird dieser Versuch zunächst als ein erstes Indiz dafür angesehen, dass es sich bei OH-Gd-Ectoin ebenfalls um ein inkompatibles Solut handelt. Zur genauen Bestätigung sind weiterführende Versuche mit der aufgereinigten Substanz OH-Gd-Ectoin notwendig. Um mit Gd-Ectoin vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müsste außerdem der Effekt von OH-Gd-Ectoin auf das Wachstum von *E. coli* MC4100 untersucht werden.

6.5. *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel als Alternative zum Ganzzellsystem

Neben dem etablierten Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* BL21 pETectDH_{is}, bei dem hydroxylierte Verbindungen aus dem Medium aufgereinigt werden könnten, wurde ein alternatives System konstruiert, das eine Aufreinigung aus den Zellen ermöglicht. Dazu wurde die von Witt *et al.* (2011) konstruierte Doppelmutante (Δ ectAC), die aufgrund der Deletionen im Ectoinbiosynthese-Gencluster zu keiner Synthese von Ectoin oder anderen kompatiblen Soluten wie ADPC befähigt ist, mit dem Plasmid pWUB_ectD_Hel konjugiert. In diesem Plasmid liegt das *ectD*-Gen unter Kontrolle des osmoregulierbaren Promotorbereichs *promKB1* (Abschnitt IV. 3). Nach Anzucht des Stammes in MM63-2/50Cm und Supplementierung mit 2 mM Gd-Ectoin wurde ein Salzschock auf 5 % NaCl durchgeführt, der zur Aufnahme des Solut in die Zellen und zur Expression des *ectD*-Gens führte. Nach Witt *et al.* (2011) ist eine Salinität von 5 % NaCl die maximal tolerierbare Salzkonzentration von *H. elongata* WUB02. Die in der späten exponentiellen Phase geernteten Kulturen wiesen neben Gd-Ectoin bereits ca. 30 mg OH-Gd-Ectoin/g TG in den Zellen auf. In den stationär geernteten Zellen befand sich ausschließlich die hydroxylierte Version, allerdings sank der Gesamtsolutegehalt auf ca. 35 mg/g TG ab (Abschnitt III. 8.6, Abb. 39). Da im Medienüberstand keine Solute detektiert werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass Gd-Ectoin oder OH-Gd-

Ectoin, ähnlich wie Ectoin bzw. Hydroxyectoin, von *H. elongata* verwertet werden kann. Ein Ectoin-Abbauweg in *H. elongata* wurde erst kürzlich identifiziert (Schwibbert *et al.*, 2010). Da sich Gd-Ectoin nur in der eingeführten Aminogruppe anstelle der Methylgruppe von Ectoin unterscheidet, könnte Gd-Ectoin ebenfalls als Substrat erkannt und metabolisiert worden sein. Zum Ausgleich des osmotischen Stresses müssten daher weitere Solute akkumuliert worden sein, die mittels HPLC-Methoden nicht detektiert werden konnten. Nach ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel zusätzlich Glutamat und Glutamin als osmoregulatorische Solute in den Zellen akkumulierte (Abschnitt III. 8.6, Abb. 40).

Weiterhin wurde mittels NMR-Spektroskopie die Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch EctD bestätigt. Während das NMR-Spektrum des exponentiell geernteten Zellextraktes Signale zeigte, die sowohl Gd-Ectoin als auch OH-Gd-Ectoin zugeordnet werden konnten, lag im Zellextrakt der stationär geernteten Kultur ausschließlich OH-Gd-Ectoin vor. Durch Hydroxylierung von Gd-Ectoin kam es zu einer Verschiebung der typischen Gd-Ectoin-Signale. Somit wurde neben HPLC-Untersuchungen die Hydroxylierung von Gd-Ectoin durch EctD mittels NMR verifiziert.

Neben der Etablierung des Ganzzellbiokatalyse-Systems in *E. coli* BL21 pETectDHis, bei dem hydroxylierte Verbindungen in Zukunft aus dem Medium aufgereinigt werden könnten, wurde ein Stamm konstruiert, der eine Aufreinigung von hydroxylierten Substanzen durch das „Bakterienmelk“-Verfahren ermöglicht. *H. elongata* stellt somit eine interessante Alternative zu *E. coli* dar, da die Zellen nach der Ernte und Überführung in Wasser die in den Zellen akkumulierten hydroxylierten Solute an die Umgebung verlieren würden. Eine Abtrennung von Medienbestandteilen und vor allem hohen Salzkonzentrationen könnte so umgangen werden. Allerdings sind für die Nutzung des *Halomonas*-Systems weitere Optimierungen notwendig. Neben dem Problem der niedrigen intrazellulären Akkumulation der hydroxylierten Verbindung müssten Aufreinigungsmethoden entwickelt werden, die den Zellextrakt von Glutamin und Glutamat befreien. Eine Möglichkeit bestünde in der enzymatischen Umwandlung von Glutamin zu Glutamat mit Hilfe des GOGAT-Systems und anschließender Abtrennung des Glutamats mittels eines Mischbetttauschers (Serdolit MB, Serva,

Heidelberg), mit dem Korsten (2011) bereits das kompatible Solut N-Acetylglutaminylglutamin-1-amid (NAGGN) von Glutamat befreien konnte.

6.6. OH-Gd-Ectoin, eine bislang unbekannte Substanz

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Substratspektrum der Ectoinhydroxylase EctD um die Substanz Gd-Ectoin erweitert werden konnte. Bei OH-Gd-Ectoin handelt es sich um eine Substanz, deren Struktur bislang noch unbekannt und nicht in der Literatur beschrieben war. Die Substruktur der unhydroxylierten Variante Gd-Ectoin ist in dem Peptidantibiotikum Stendomycin vertreten, das eine fungizide Wirkung besitzt und eine Vielzahl von Pflanzenpathogenen inhibiert (Cain, 1968; Bodanszky *et al.*, 1969). Die Substruktur von OH-Gd-Ectoin konnte nach Datenbankanalysen mit SciFinder® (www.scifinder.cas.org) nur bei der Modifizierung von Arginin mit Methylglyoxal beobachtet werden, wobei die beschriebene Pyrimidinstruktur nur eine geringe Ähnlichkeit zu OH-Gd-Ectoin aufweist (Klöpfer *et al.*, 2011). Somit handelt es sich bei OH-Gd-Ectoin um eine neuartige Substanz, deren Untersuchung, gerade im Hinblick auf die Inkompatibilität mit dem Stoffwechsel von *E. coli* sowie deren Wirkungsweise, ein spannendes Forschungsfeld darstellt. Voraussetzung allerdings ist, dass die Substanz in die Zellen aufgenommen wird.

7. *In vitro* Untersuchungen der Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata*

Der in Abschnitt III. 7 konstruierte Stamm *E. coli* BL21 pETectDHis sollte neben der *in vivo* Hydroxylierung von Ectoin und anderen Soluten genutzt werden, um *in vitro* Untersuchungen durchführen zu können, da die Gensequenz von *ectD* mit einem C-terminalen His₆-tag ergänzt wurde (Abb. 27). Die Überexpression und Aufreinigung von EctDHis waren erfolgreich (Abschnitt III. 9.1, Abb. 41). Durch Nickelchelataffinitätschromatographie wurde EctDHis von allen anderen zellulären Proteinen abgetrennt.

In Anlehnung an die Arbeit von Bursy *et al.* (2007), die ein *in vitro* System für die Ectoinhydroxylase aus *V. salexigens* etablierten, wurde EctDHis in Aktivitätstests eingesetzt. Dabei sollte die Hydroxylierung des Substrats Ectoin durch HPLC-Untersuchungen beobachtet werden. Zur Bereitstellung der Kofaktoren der Hydroxylierungsreaktion wurden dem Ansatz α -Ketoglutarat und FeSO₄ zugesetzt und die Inkubation unter aeroben Bedingungen durchgeführt, um ausreichend molekularen Sauerstoff bereitzustellen (Abschnitt II. 15.6). Eine Umwandlung zu Hydroxyectoin

konnte allerdings nicht beobachtet werden. Auch veränderte Kultivierungsbedingungen, wie z. B. eine Anzucht unter höherer Salinität, zeigten nach Nickelchelataffinitätschromatographie keine katalytische Aktivität von EctDHis.

Um zu testen, ob EctDHis bereits nach dem Aufschluss der Zellen durch Ultraschall inaktiv vorlag, wurde das Zelllysate in den Aktivitätstest eingesetzt. Eine Umsetzung zu Hydroxyectoin konnte beobachtet werden. Somit musste EctDHis nach der Aufreinigung durch Nickelchelataffinitätschromatographie seine Aktivität verloren haben. In dem zur Aufreinigung verwendeten Säulenmaterial Ni-NTA His-Bind[®] Superflow_{TM} (Novagen, Madison, USA) sind die Metallionen Ni²⁺ an Nitrilotriessigsäurereste (NTA) gebunden. Wahrscheinlich wurde EctDHis bei der Aufreinigung das für die katalytische Aktivität notwendige Fe²⁺ entzogen (vgl. dazu Abschnitt I. 5.1), da es, genauso wie Ni²⁺, mit dem Säulenmaterial bzw. NTA-Resten komplexierte. Infolge dessen kam es zu einem Aktivitätsverlust von EctDHis. Nach der Lagerung von aufgereinigtem EctDHis in eisenhaltigem Puffer konnte zumindest eine geringe Hydroxylierungsaktivität beobachtet werden. Zur Etablierung eines *in vitro* Systems war das mit einem His-tag versehene Enzym also nicht geeignet.

Daher wurde ein alternatives Expressionssystem konstruiert. Da bereits Bursy *et al.* (2007) das pASK-IBA-System (IBA BioTechnology, Göttingen) zur erfolgreichen Expression und Aufreinigung von EctD aus *V. salicigenus* nutzten, wurde in der vorliegenden Arbeit das *ectD*-Gen in den Vektor pASK-IBA3 kloniert (Abschnitt III. 9.3, Abb. 42). In dem Plasmid pASKectDStrep lag das *ectD*-Gen somit unter Kontrolle des Anhydrotetracyclin-induzierbaren *tet*-Promotors und war C-terminal mit einem Strep-tag^{®II} fusioniert. Der aus acht Aminosäuren bestehende Strep-tag (WSHPQFEK) soll, nach Angaben des Herstellers, keine Auswirkungen auf die Struktur und Funktionalität des Fusionsproteins haben. Außerdem soll sich diese Methode vor allem zur Aufreinigung von Metalloproteinen eignen.

Die Expression von EctDStrep konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Nach Anzucht des Stammes *E. coli* DH5 α pASKectDStrep in AB-0,5/100Carb und Induktion der Expression des *ectD*-Gens mit Anhydrotetracyclin konnte eine Proteinbande, die EctDStrep mit einem theoretisch vorausgesagten Molekulargewicht von 38,6 kDa entsprach, detektiert werden (Abschnitt III. 9.4, Abb. 43). Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf *in vivo* Hydroxylierungsversuche gerichtet war, wurde von

weiterführenden Versuchen abgesehen. Dieses System steht jedoch für nachfolgende Optimierungen zur Verfügung, um Analysen zur Hydroxylierung von Soluten und Untersuchungen an EctD durchführen zu können.

8. Heterologe Totalsynthese von Ectoin und Hydroxyectoin in *E. coli*

Neben der Nutzung eines Ganzzellbiokatalyse-Systems zur Hydroxylierung von Ectoin und anderen Verbindungen wurde in der vorliegenden Arbeit die heterologe Totalsynthese von Ectoin und Hydroxyectoin in *E. coli* untersucht. Wie Bestvater *et al.* (2008) zeigten, unterliegt die heterologe Ectoin-Produktion in *E. coli* einem metabolischen Flaschenhals (Abschnitt I. 7.2). Dieser limitierende Schritt wird durch die Reaktion der Aspartokinase, die L-Aspartat über eine ATP-abhängige Phosphorylierung zu L-Aspartylphosphat umwandelt, verursacht (Abb. 2). *E. coli* verfügt über drei Aspartokinasen-Isoenzyme, die einer negativen Feedback-Regulation durch die Aminosäuren der Aspartat-Familie unterliegen. Aufgrund dessen steht in *E. coli* nicht genügend Ausgangssubstrat L-Aspartat- β -semialdehyd für die Ectoin-Produktion zur Verfügung. Durch gemeinsame Expression der Ectoin-Biosynthesegene aus *M. halophilus* und dem Gen einer deregulierten Aspartokinase *lysC* aus *C. glutamicum* über das Plasmid pAKECT1 konnte die Ectoin-Produktion in *E. coli* DH5 α deutlich gesteigert werden. Aufgrund einer Punktmutation kann LysC nicht mehr negativ durch die Aminosäuren der Aspartat-Familie beeinflusst werden. Allerdings stieg der Ectoin-Gehalt ab einer Salinität von 3 % NaCl nicht mehr an und blieb mit Werten von ca. 0,4 mmol/g TG konstant (Bestvater *et al.*, 2008). Zur Überprüfung dieser Beobachtung wurde *E. coli* DH5 α pAKECT1 in MM63-x/50Cm (VA) (x: 1-4 % NaCl) angezogen, die Expression des deregulierten Aspartokinase-Gens *lysC* mit IPTG induziert und die Blich und Dyer-Zellextrakte mittels HPLC analysiert. Von *E. coli* K12 ist bekannt, dass ohne Zusatz von kompatiblen Soluten wie Glycinbetain oder Ectoin ein Wachstum bis zu einer Salinität von 3,8 % NaCl aufgrund der *de novo* Synthese von Trehalose möglich ist (Larsen *et al.*, 1987). *E. coli* DH5 α zeigte bei einer Salinität von 4 % NaCl kein Wachstum mehr. *E. coli* DH5 α pAKECT1 akkumulierte Ectoin, in vergleichbaren Mengen wie es Bestvater *et al.* (2008) detektierte, in den Zellen (Abschnitt III. 10, Abb. 44). Bei einer Salinität von 4 % NaCl reduzierte sich der Ectoin-Gehalt zwar im Vergleich zur Anzucht bei einer Salinität von 3 % NaCl, dies könnte

jedoch durch die unterschiedlichen Ernte-Zeitpunkte erklärt werden. Auffällig war, dass der von Bestvater *et al.* (2008) beobachtete maximale Ectoin-Gehalt bei einer Salinität von 3 NaCl mit der *de novo* Synthese des *E. coli*-eigenen Osmolyts Trehalose einherging, was in besagter Veröffentlichung fehlte. Bestvater *et al.* (2008) zeigten außerdem, dass *E. coli* DH5 α , nachdem den Zellen Ectoin von außen aus dem Medium angeboten wurde, ähnliche intrazelluläre Ectoin-Gehalte erzielte wie *E. coli* DH5 α pAKECT1, so dass eine Limitierung in der Wiederaufnahme bestehen könnte. Die Aufnahmesysteme für Ectoin können den Ausstrom aus den Zellen nicht mehr kompensieren, so dass Trehalose als Osmolyt synthetisiert werden musste. Im Hinblick auf einen Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-produzierenden *E. coli*-Stamm ist die intrazelluläre Trehalose-Akkumulation störend, da sie einen großen Anteil der beiden akkumulierten Solute einnimmt und daher nicht genügend Ectoin vorliegt.

8.1. Ectoin-Produktion des trehalosedefizienten Stammes *E. coli* BKA-13 pAKECT1

Aufgrund der salinitätsabhängigen Akkumulation von Trehalose in *E. coli* DH5 α pAKECT1 wurde das Plasmid pAKECT1 in einen trehalosedefizienten Stamm transformiert. Die *de novo* Synthese des Osmolyts Trehalose erfolgt in *E. coli* durch die Aktivität der Enzyme OtsA (Trehalose-6-phosphat-Synthase) und OtsB (Trehalose-6-Phosphatase), deren Gene als Operon organisiert unter Kontrolle eines osmoregulierbaren Promotors vorliegen (Giaever *et al.*, 1988; Strøm und Kaasen, 1993; Kaasen *et al.*, 1994). Durch vollständige Deletion des *otsB*-Gens, das 26 bp mit dem *otsA*-Gen überlappt, wurde die Trehalose-Synthese in dem resultierenden Stamm *E. coli* BKA-13 unterbunden (Burdziak, 2006). Da als Ausgangsstamm für die Deletion der Trehalose-Biosynthesegene *E. coli* MKH13 genutzt wurde, sind in *E. coli* BKA-13 zusätzlich die Transportergene *putPA*, *proP*, *proU* und *betT* deletiert (Haardt *et al.*, 1995; Burdziak, 2006). Nach Anzucht von *E. coli* BKA-13 pAKECT1 wurde bereits eine Stunde nach dem Salzschock Ectoin im Medium detektiert (Abschnitt III. 10.1, Abb. 45). Während der Ectoin-Gehalt in den Zellen konstant niedrig blieb, kam es im Lauf der Fermentation zu einem kontinuierlichen Anstieg des Ectoin-Gehalts im Medium. Nach der Ernte lagen in den Zellen nur ca. 1,5 mg Ectoin/g TG vor, im Medium wurde eine Ectoin-Konzentration von 1,4 mM erzielt. Durch zusätzliches Nachfüttern mit 2,5 g/L Glucose nach Verbrauch der C-Quelle konnte keine weitere Akkumulation von Ectoin im Medium beobachtet werden. Wahrscheinlich war eine weitere Limitierung von

Stickstoff oder Phosphat und somit von fehlendem Substrat verantwortlich dafür, dass kein Ectoin mehr synthetisiert und ausgeschieden wurde. In weiterführenden Experimenten sollte daher neben der Versorgung mit ausreichend C-Quelle eine Zufuhr aller wichtigen Medienbestandteile berücksichtigt werden, um den Ectoin-Gehalt im Medium weiter zu erhöhen.

Bei *E. coli* BKA-13 pAKECT1 handelt es sich also um einen Ectoin-produzierenden Stamm, der das Solut mit einer spezifischen Produktionsrate von $20 \text{ mg (g TG}^{-1}) \text{ h}^{-1}$ kontinuierlich ins Medium ausschied. Dass transportdefiziente Stämme ihre Solute ins Medium verlieren und es zu einer Überproduktion kommt, wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten beobachtet. So wird zur großtechnischen Produktion von Ectoin die Ausscheidermutante *H. elongata* KB2 genutzt, die aufgrund einer Mutation des spezifischen Ectoin-Transporters TeaABC Ectoin überproduziert und ins Medium abgibt (Gramman *et al.*, 2002). Auch eine *B. subtilis*-Mutante, in der das Transportsystem OpuE für das kompatible Solut Prolin deletiert ist, verliert Prolin und akkumuliert es im Medium (von Blohn *et al.*, 1997). Die von Schubert *et al.* (2007) erhaltenen Ergebnisse stehen zunächst im Widerspruch zu dieser Beobachtung. Die Ectoin-Gene aus *C. salexigens* wurden in den Vektor pASK-IBA7 unter Kontrolle des Anhydrotetracyclin-induzierbaren *tet*-Promotors kloniert und in *E. coli* DH5 α , in welchem die Transportsysteme noch funktionell sind, transformiert. Nach Anzucht des Stammes und Induktion der Expression der Ectoin-Gene wurde eine kontinuierliche Ausscheidung von Ectoin ins Medium beobachtet, während der intrazelluläre Ectoin-Gehalt mit 5 mg/g TG konstant niedrig blieb (Schubert *et al.*, 2007). Da die Expression der Ectoin-Gene in diesem System nicht salzabhängig ist, wurde der Stamm ohne die Anwesenheit von NaCl kultiviert. Dies lässt vermuten, dass die osmoregulierbaren Transport- und Aufnahmesysteme ProP und ProU unter gegebenen Bedingungen nicht aktiviert waren. Somit glich der Stamm einer transportdefizienten Mutante, Ectoin floss aus den Zellen und wurde, genauso wie bei *E. coli* BKA-13, nicht wieder aufgenommen. Durch die Inaktivierung der Transportsysteme für kompatible Solute stehen also industriell anwendbare Systeme zur Verfügung, die eine Akkumulation von Soluten im Medium erlauben. *E. coli* BKA-13 pAKECT1 ist durch die plasmidvermittelte Expression der Ectoin-Gene zu einer Ectoin-Synthese befähigt, verliert das Solut ins Medium und kann es aufgrund der Deletion der Transport- und Aufnahmesysteme nicht mehr in die Zelle aufnehmen.

8.2. pAKECT1-*tacectD* zur heterologen Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli*

Da gezeigt werden konnte, dass es sich bei *E. coli* BKA-13 pAKECT1 um einen Stamm handelt, der Ectoin ausscheidet und nicht dazu befähigt ist, es wieder aufzunehmen, wurde in einem nächsten Schritt das *ectD*-Gen aus *H. elongata* in den Vektor pAKECT1 inseriert, so dass das heterolog gebildete Ectoin mit Hilfe der exprimierten Ectoinhydroxylase zu Hydroxyectoin umgewandelt wird. Dazu wurde das *ectD*-Gen unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors kloniert und in den Vektor pAKECT1 inseriert (Abschnitt III. 10.2, Abb. 46). Nach erfolgreicher Transformation des Konstrukts pAKECT1-*tacectD* in *E. coli* DH5 α wurde der Stamm in MM63/50Cm (VA) bei Salinitäten von 1-4 % NaCl angezogen, die Expression des *ectD*- und *lysC*-Gens mit IPTG induziert und die Zellen in der stationären Phase geerntet. Es zeigte sich, dass, wie bei *E. coli* DH5 α pAKECT1, Trehalose einen großen Anteil des intrazellulären Gesamtsolutegehalts ausmachte (Abschnitt III. 10.3, Abb. 47). Auffällig war, dass der Ectoin-Gehalt nur noch einen Wert von ca. 0,15 mmol/g TG erreichte, während *E. coli* DH5 α pAKECT1 intrazellulär bis zu 0,35 mmol/g TG akkumulierte (Abb. 44). Hydroxyectoin machte nur einen minimalen Anteil am Gesamtsolutegehalt aus. Das Vorhandensein von geringen Hydroxyectoin-Mengen schien sich demnach auf die Ectoin-Synthese auszuwirken. Zu klären ist, ob Hydroxyectoin die Expression der Ectoin-Gene, die im Plasmid pAKECT1-*tacectD* unter Kontrolle des osmoregulierbaren *promA*-Promotors aus *M. halophilus* liegen, beeinflusst.

Eine Erklärung für die geringe Akkumulation von nur bis zu 0,03 mmol Hydroxyectoin/g TG (ca. 5 mg/g TG) in *E. coli* DH5 α pAKECT1-*tacectD* könnte in der geringen Expression des *ectD*-Gens liegen. Bei pAKECT1 handelt es sich um einen von pHSG575 abgeleiteten *low copy* Vektor, der nur unter 50 Kopien pro Zelle erreicht (Takeshita *et al.*, 1987). Trotz Insertion des *ectD*-Gens unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors reichte die intrazelluläre EctD-Menge vermutlich nicht aus, um das in den Zellen vorhandene Ectoin vollständig zu seinem Hydroxyderivat umzusetzen. Weiterhin möglich wäre eine Instabilität des über 11 kb großen Plasmids pAKECT1-*tacectD*. Wie in Abschnitt IV. 4 beschrieben, wird in *H. elongata* Hydroxyectoin erst unter Hochsalzbedingungen und vor allem hohen Temperaturen akkumuliert. Eine hitzeinduzierbare Stabilisierung von EctD wurde vermutet (Abschnitt IV. 4.2). Da *E. coli* DH5 α pAKECT1-*tacectD* nur bei einer Temperatur von 37 °C angezogen wurde, könnte ebenso die Temperatur eine geringe intrazelluläre EctD-Menge zur Folge haben.

Im Vergleich dazu detektierten Seip *et al.* (2011) mit *E. coli* DH5 α pSB01 eine Akkumulation von bis zu 80 mg Hydroxyectoin/g TG in den Zellen, wobei Ectoin bei einer Salinität von 3 % NaCl nur noch in geringen Mengen akkumuliert wurde. In dem Plasmid pSB01 liegt das gesamte Hydroxyectoin-Biosynthesegencluster (*ectABCD-ask*) aus *P. stutzeri* DSM 5190^T unter Kontrolle des eigenen osmoregulierbaren Promotors. Da pSB01 auf dem Vektor pUC18 basiert, handelt es sich um ein *high copy* Plasmid, so dass eine erhöhte EctD-Menge verantwortlich für die starke Akkumulation von Hydroxyectoin sein könnte. Weiterhin könnte eine unterschiedliche Regulation der Hydroxyectoin-Biosynthese in *P. putida* gegenüber der von *H. elongata* Ursache der hohen Hydroxyectoin-Konzentrationen in *E. coli* sein. Eine Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* DH5 α pAKECT1-*tacectD* konnte zwar gezeigt werden, allerdings sind für eine mögliche industrielle Anwendung als Produktionsstamm weitere Optimierungsarbeiten notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurden bessere Systeme für eine Hydroxyectoin-Produktion hervorgebracht, die im nächsten Abschnitt gegenübergestellt werden sollen.

9. Vergleich der Hydroxyectoin-Produktion von *H. elongata* und *E. coli* mit anderen Systemen

Um die Produktivität der Hydroxyectoin-Produktion der in dieser Arbeit konstruierten Systeme *H. elongata* und *E. coli* untereinander und mit anderen Organismen zu vergleichen, wurden die spezifischen Produktionsraten berechnet. Die spezifische Produktionsrate ergibt sich aus dem Gehalt an Hydroxyectoin (mg/g TG) multipliziert mit der Wachstumsrate (h^{-1}). Die genomische Austauschmutante *H. elongata* $\Delta\text{ectB}::\text{ectD}$ wies bei einer Salinität von 10 % NaCl und Kultivierungstemperatur von 37 °C eine spezifische Produktionsrate von 18 $\text{mg (g TG}^{-1}) \text{h}^{-1}$ auf (vgl. Abschnitt III. 1.2.3, Abb. 12). Die für *H. elongata* erhaltenen Raten bei einer Temperaturerhöhung auf 50 °C (vgl. III. 4.2, Abb. 22) sind in Tab. 16 dargestellt.

Die maximalen spezifischen Produktionsraten der *H. elongata*-Stämme wurden bei einer Salinität von 10 % NaCl erzielt, wobei *H. elongata* Wt mit einem Wert von 67 $\text{mg (g TG}^{-1}) \text{h}^{-1}$ am produktivsten war. Der Unterschied zu den in dieser Arbeit konstruierten Mutanten mit Produktivitäten von 57-59 $\text{mg (g TG}^{-1}) \text{h}^{-1}$ kommt durch die erhöhte Wachstumsrate von *H. elongata* Wt zustande.

Tab. 16 spezifische Produktionsrate von Hydroxyectoin der verschiedenen *H. elongata*-Stämme bei 10 % und 15 % NaCl und Kultivierung bei einem Hitzeschock auf 50 °C

Stamm	spezifische Produktionsrate	spezifische Produktionsrate
	[mg (g TG ⁻¹) h ⁻¹] bei 10 % NaCl	[mg (g TG ⁻¹) h ⁻¹] bei 15 % NaCl
<i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T	67	28
<i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i>	57	23
<i>H. elongata</i> Δ <i>ectB::ectD</i> Δ <i>promectD::promKB1</i>	59	21
<i>H. elongata</i> MaKu03 Δ <i>ectB::ectD</i>	59	26

Im Gegensatz dazu sank die bei der Fermentation von *H. elongata* Δ *ectB::ectD* erhaltene spezifische Produktivität auf 32 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ bei einer Salinität von 10 % NaCl (Abschnitt III. 4.3, Abb. 24). Dies geht einher mit der verringerten Hydroxyectoin-Ausbeute von nur 100 mg/g TG im Gegensatz zu den in den Schüttelkolben durchgeführten Untersuchungen (Abschnitt IV. 4.3). Zur Optimierung der Produktivität in größerem Maßstab sind daher weiterführende Untersuchungen notwendig, wobei besonders auf die Sauerstoffversorgung, die einen limitierenden Faktor der Hydroxylierungsreaktion darstellte, geachtet werden muss. Die bei einer Anzucht in 15 % NaCl erhaltenen spezifischen Produktionsraten lagen zwischen 21 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ und 28 mg (g TG⁻¹) h⁻¹, wobei *H. elongata* Wt wieder das effizienteste System darstellte.

Durch Temperaturerhöhung auf 50 °C konnte in *H. elongata* eine fast vollständige Hydroxylierung von Ectoin nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen Hydroxyectoin-produzierenden Stämmen, wie *C. salexigens* und *H. boliviensis*, geht die Synthese des Soluts immer in Kombination mit Ectoin einher (Vargas *et al.*, 2008; Van-Thuoc *et al.*, 2010), wodurch nach der Kultivierung chromatographische Aufreinigungsmethoden notwendig sind. In *Marinococcus* sp. M52 konnte eine stationärphasenabhängige Akkumulation von hauptsächlich Hydroxyectoin detektiert werden, allerdings ist dieser Organismus nicht zum „Bakterienmelk“-Verfahren geeignet (Frings *et al.*, 1995). Schiraldi *et al.* (2006) erzielten zwar eine Permeabilisierung der Membran durch die Kombination von Hitze unter hypoosmotischen Bedingungen, ein weiteres Problem von *Marinococcus* sp. M52

besteht jedoch darin, dass der Stamm wachstumshemmende Substanzen wie Acetat produziert und so nicht für Batch- und Fed-Batch-Fermentationen geeignet ist. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist mit dem bislang zur Hydroxyectoin-Produktion eingesetzten Organismus *H. elongata* durch eine einfache Umstellung des Fermentationsverfahrens eine fast vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin mit einer hohen spezifischen Produktivität möglich. Außerdem eignet sich *H. elongata* zum „Bakterienmelk“-Verfahren, so dass das Solut im Anschluss daran leicht und zudem ohne chromatographische Auftrennungsmethoden aufgereinigt werden kann.

Die spezifische auf die Biomasse bezogene Umsatzrate von Ectoin zu Hydroxyectoin durch das Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* DH5 α VIBO wurde bei einer Salinität von 3 % NaCl auf 158 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ geschätzt (Abschnitt III. 6.2) und liegt so weit über den von *H. elongata* erzielten Produktivitäten bei Anzucht in 10 % und 15 % NaCl und einer Temperaturerhöhung auf 50 °C. Eine vollständige Umsetzung von 10 mM Ectoin zu Hydroxyectoin wurde allerdings mit diesem System nicht erzielt, aufgrund einer vermutlich zu geringen Expression des *ectD*-Gens sowie einer Limitierung der Wiederaufnahme des Substrats bzw. Produkts.

Das Ganzzellbiokatalyse-System *E. coli* BL21 pETectDH α erreichte bei der Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin eine spezifische Umsatzrate von 320 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ bei einer Salinität von 3 % NaCl. Im Vergleich zu *E. coli* DH5 α VIBO ist das System doppelt so effektiv (Abschnitt III. 7.3.1). Außerdem konnten 10 mM eingesetztes Substrat zum Hydroxyderivat umgesetzt werden. Auch im Vergleich zu *H. elongata* ist das etablierte Ganzzellsystem weitaus produktiver und eignet sich so vor allem zur Produktion neuer hydroxylierter Verbindungen. Für eine Produktion von Hydroxyectoin ist das System, trotz der hohen Produktivität, nur bedingt geeignet, da es auf die Supplementierung des umzusetzenden Substrats von außen angewiesen ist.

Daher wurde die Totalsynthese des Eduktes Ectoin näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei *E. coli* BKA-13 pAKECT1 um einen Stamm handelt, der *de novo* synthetisiertes Ectoin kontinuierlich ins Medium ausschied (Abschnitt III. 10.1, Abb. 45). Bei einem Salzschock auf 3 % NaCl besitzt das System eine spezifische Produktionsrate von 20 mg (g TG⁻¹) h⁻¹. Im Vergleich zur Ectoinausscheidermutante *H. elongata* KB2 ($\Delta teaC$), die eine spezifische Produktionsrate von 45 mg (g TG⁻¹) h⁻¹

besitzt (Kunte *et al.*, 2002, DE 101 14 189 A1), ist die Produktionsrate von *E. coli* BKA-13 pAKECT1 etwa halb so hoch. Im Gegensatz zu dem von Schubert *et al.* (2007) konstruierten Ectoin-ausscheidenden System *E. coli* DH5 α (pASK-*ectABC*), das eine spezifische Produktionsrate von nur 2 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ besitzt, handelt es sich bei *E. coli* BKA-13 pAKECT1 allerdings um ein viel produktiveres System. Der von Bestvater *et al.* (2008) konstruierte Stamm *E. coli* DH5 α pAKECT1 besitzt eine maximale spezifische Produktionsrate bei einer Salinität von 2 % NaCl von ca. 20 mg (g TG⁻¹) h⁻¹. Bei niedrigen Salinitäten ist *E. coli* daher konkurrenzfähig zu *H. elongata* DSM 2581^T, welcher bei einer Salinität von 3 % NaCl ebenfalls eine Produktivität von 20 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ aufzeigt (Dötsch *et al.*, 2008). Allerdings akkumuliert *E. coli* DH5 α pAKECT1 neben Ectoin Trehalose, welche im Zuge eines Aufreinigungsprozesses wieder von Ectoin abgetrennt werden müsste. Für die Wahl eines zukünftigen Hydroxyectoin-Produktionsstammes ist daher eher der trehalose- und transportdefiziente Stamm *E. coli* BKA-13 geeignet, da hier die durch heterolog exprimierte Enzyme synthetisierten Solute, wie es in der vorliegenden Arbeit für Ectoin gezeigt wurde, im Medium akkumuliert werden.

Eine effektive heterologe Totalsynthese von Hydroxyectoin in *E. coli* konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erzielt werden. Durch Konstruktion des Stammes *E. coli* DH5 α pAKECT1-*tacectD* wurde zwar eine intrazelluläre Hydroxyectoin-Synthese nachgewiesen, allerdings lagen als Hauptsolute Trehalose und Ectoin vor (Abschnitt III. 10.3, Abb. 47). Vergleichbare spezifische Produktionsraten zu *E. coli* pSB01, der mit einer maximalen spezifischen Produktionsrate von 27,65 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ sogar die des natürlichen Produzenten *P. stutzeri* DSM 5190^T übersteigt, konnten nicht erzielt werden (Seip *et al.*, 2011). Allerdings wurde gezeigt, dass prinzipiell eine Hydroxyectoin-Produktion durch *E. coli* möglich ist. Somit steht in Zukunft ein System zur Verfügung, welches die Grundlage für weitere Optimierungsmöglichkeiten bietet. Durch Erhöhung des intrazellulären EctD-Gehalts und einer damit einhergehenden vollständigen Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin könnte das Plasmidkonstrukt anschließend in einen trehalose- und transportdefizienten Stamm inseriert werden. Eine daraus resultierende Akkumulation von Hydroxyectoin im Medium könnte dann mit den spezifischen Produktionsraten von *H. elongata* verglichen werden.

10. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass in *H. elongata* die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Hydroxyectoin-Produktion ausübte und durch Temperaturerhöhung auf 50 °C eine fast vollständige Hydroxylierung von Ectoin nachgewiesen werden konnte. In weiterführenden Arbeiten sollte dieser Effekt näher untersucht werden. Neben Untersuchungen der in dieser Arbeit konstruierten genomischen Austauschmutanten ist vor allem die Analyse der Hydroxyectoin-Produktion in *H. elongata* Wt unter Hitzebehandlung erforderlich. Gerade im Hinblick auf eine industrielle Hydroxyectoin-Produktion in großtechnischem Maßstab ist der Einsatz von nicht gentechnisch veränderten Organismen ein wichtiger Parameter. Weiterführende Fermentationen unter Hitzeeinfluss, besonders unter Betrachtung des limitierenden Faktors Sauerstoff, sind angebracht. Dabei sollte außerdem überprüft werden, ob eine Temperaturerhöhung in der exponentiellen Wachstumsphase auf Temperaturen, die 50 °C übersteigen, zu einer weiteren Verbesserung der Hydroxyectoin-Produktion führen.

Um die Hydroxyectoin-Produktion in *H. elongata* weiter zu optimieren, sollten die Gene des putativen Hydroxyectoin-Abbauweges identifiziert und deletiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beim Übergang zur stationären Phase der Hydroxyectoin-Gehalt in den Zellen abnahm (Abschnitt III. 1.2.3, Abb. 12). Durch Deletion der dafür verantwortlichen Enzyme wäre eine vollständige Hydroxylierung von Ectoin bereits bei niedrigeren Salinitäten und Temperaturen denkbar und würde den Produktionsprozess vereinfachen.

Die Untersuchung der Regulation der Hydroxyectoin-Produktion stellt ebenfalls ein wichtiges Forschungsfeld dar. Zu klären ist, ob durch den Einfluss von Hitze die Ectoinhydroxylase EctD stabilisiert oder der putative Hydroxyectoin-Abbauweg gehemmt wird. Nähere Untersuchungen zu einer möglichen Phosphorylierung und damit einhergehenden Instabilität von EctD sowie einer Stabilisierung durch posttranslationale Modifikation unter Hitzeeinfluss sind notwendig. Dazu könnten zunächst die zellulären Proteine vor und nach dem sogenannten „Hitzeschock“ durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und miteinander verglichen werden.

Um die Effektivität des Ganzzellbiokatalyse-Systems *E. coli* BL21 pETectDH_{is} zu erhöhen, wären ebenfalls weitere Untersuchungen notwendig. Eine Hydroxylierung

von bis zu 10 mM Substrat konnte in der vorliegenden Arbeit erzielt werden (Abschnitt III. 7.3.1). Eine höhere Supplementierung des Kultivierungsmediums mit dem Edukt Ectoin resultierte in der extrazellulären Akkumulation von 10 mM hydroxyliertem Produkt. Durch Erhöhung der Salzkonzentrationen auf über 5 % NaCl könnte untersucht werden, ob die Limitierung des Verfahrens in der Aufnahme des Edukts besteht. Außerdem könnte dem System zur Bereitstellung von genügend α -Ketoglutarat als Kofaktor der Hydroxylierungsreaktion Glutamat als einzige C-Quelle oder in Kombination mit Glucose zugesetzt werden. Da sich eine Temperaturerhöhung positiv auf die Hydroxylierungsreaktion in *H. elongata* auswirkte, sollte überprüft werden, ob durch Anzucht von *E. coli* BL21 pETectDHis unter Hitzestress die spezifische Umsatzrate des Ganzzellbiokatalyse-Systems erhöht werden kann. Weiterhin könnte das Kultivierungsverfahren abgeändert werden. Bislang wurde *E. coli* BL21 pETectDHis bis zur exponentiellen Phase angezogen, die Expression des *ectD*-Gens mit IPTG induziert, mit dem zu hydroxylierenden Solut supplementiert und ein Salzschock ausgeführt. Eine Supplementierung mit dem Edukt zu Beginn der Kultivierung könnte sich positiv auf die Expression des *ectD*-Gens und Stabilisierung von EctD auswirken, da kompatible Solute protektive Eigenschaften auf Makromoleküle aufweisen (Abschnitt I. 8.1). Eine mögliche Ausfällung als *inclusion bodies* könnte so umgangen und die intrazelluläre EctD-Menge erhöht werden.

Da EctD neben Ectoin weitere zyklische Solute hydroxyliert (Abschnitt III. 7.4), könnte das Ganzzellbiokatalyse-System nach oben beschriebenen Optimierungsversuchen genutzt werden, um neuartige hydroxylierte Verbindungen in größerem Maßstab zu produzieren, aufzureinigen und zu charakterisieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist eine Kultivierung in größerem Maßstab mit *E. coli* BL21 pETectDHis möglich (Abschnitt III. 8.4). Die Untersuchung der Hydroxylierung von DHMICA sollte mittels NMR-Analysen mit entsprechenden Vergleichssubstanzen überprüft werden. Die Produktion und Aufreinigung der bislang unbeschriebenen Substanz OH-Gd-Ectoin stellt einen wichtigen Ausgangspunkt dar, um vergleichende Untersuchungen mit den bislang in die Klasse der inkompatiblen Solute aufgeführten Substanzen Kreatin und Gd-Ectoin durchführen zu können. Gerade im Hinblick auf die Vermutung, ob durch die Einführung einer Hydroxylgruppe in das Substrat Gd-Ectoin neue Eigenschaften resultieren, wie es für Ectoin und Hydroxyectoin beobachtet werden konnte, wäre dies von Wichtigkeit.

Neben dem Ganzzellbiokatalyse-System könnte *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel genutzt werden, um hydroxylierte Verbindungen wie OH-Gd-Ectoin zu produzieren (Abschnitt III. 8.6). Da die hydroxylierten Verbindungen in den Zellen akkumuliert wurden, wäre eine Aufreinigung aus den Zellen durch das Verfahren des „Bakterienmelkens“ denkbar. Weitere Untersuchungen zur Optimierung des intrazellulären Solutegehalts sowie der Produktivität im Vergleich zu *E. coli* BL21 pETectDHis wären außerdem notwendig.

Das in dieser Arbeit konstruierte System *E. coli* DH5 α pASK-ectDStrep könnte genutzt werden, um EctDStrep aufzureinigen und *in vitro* Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des Enzyms durchzuführen. Neben der Ganzzellbiokatalyse zur Produktion neuer hydroxylierter Verbindungen könnte getestet werden, ob auch eine *in vitro* Hydroxylierung von Substraten möglich und effizient ist. Dies würde sich vor allem bei den Substanzen eignen, bei denen der Verdacht besteht, von *E. coli* oder *H. elongata* metabolisiert zu werden.

Die Untersuchung der Totalsynthese von Hydroxyectoin in *E. coli* wäre ein weiterer wichtiger Schritt. In der vorliegenden Arbeit konnte nur eine geringe Hydroxylierungsrate von Ectoin durch *E. coli* DH5 α pAKECT1-tacectD gezeigt werden, vermutlich aufgrund einer zu geringen Expression des *ectD*-Gens. Anstehende Untersuchungen sollten daher zunächst zu einer Erhöhung des intrazellulären EctD-Gehalts führen. Eine Insertion der Ectoinbiosynthese-Gene sowie des *ectD*-Gens in ein pUC-Derivat, wie es Seip *et al.* (2011) beschrieben hatten, würde in einer höheren Kopienzahl in der Zelle führen. Weiterhin könnte überprüft werden, ob der osmoregulierbare *promKB1*-Promotor in *E. coli* funktionell ist, so dass dieser *promA* aus *M. halophilus* ersetzen und zu einer erhöhten Expressionsrate führen könnte. Nach Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* DH5 α könnte das konstruierte Plasmid in einen trehalose- und transportdefizienten Stamm wie *E. coli* BKA-13 überführt werden, so dass es zu einer Akkumulation von Hydroxyectoin im Medium kommt, wie es für Ectoin in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde (Abschnitt III. 10.1, Abb. 45).

Neben diesen Untersuchungen könnte die Anzucht von Kokulturen zur Hydroxyectoin-Produktion analysiert werden. *E. coli* BKA-13 pAKECT1 synthetisierte Ectoin und akkumulierte es kontinuierlich im Medium. Durch gleichzeitige Anzucht von *E. coli*

BL21 pETectDH_{is} könnte das im Medium vorhandene Ectoin in die Zellen aufgenommen und zu Hydroxyectoin umgewandelt werden. Im Zuge dessen ist allerdings ein Abstimmen der Antibiotikaresistenzen der beiden verwendeten Stämme erforderlich, da *E. coli* BKA-13 pAKECT1 eine Chloramphenicolresistenz und *E. coli* BL21 pETectDH_{is} eine Carbenicillinresistenz besitzt. Weiterhin möglich wäre eine Hydroxyectoin-Produktion mit dem Ectoin-ausscheidenden Wildtypstamm *Halomonas salina* DSM 5928^T, der mit einer hohen spezifischen Produktionsrate von 150 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ Ectoin im Medium akkumuliert (Zhang *et al.*, 2009), und *E. coli* BL21 pETectDH_{is}. Nach Anzucht und Ernte der *H. salina*-Zellen könnte das Ectoin-haltige Medium für eine Hydroxylierung durch das Ganzzellbiokatalyse-System eingesetzt werden.

V. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Hydroxylierung von Ectoin und Derivaten durch die Ectoinhydroxylase EctD aus *H. elongata*.

Vorangegangene Untersuchungen an dem bislang zur Produktion von Hydroxyectoin eingesetzten Organismus *H. elongata* zeigten, dass die Hydroxylierung von Ectoin von der Kultivierungstemperatur und Salinität abhängt. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. *H. elongata* Wt akkumulierte erst unter Hochsalzbedingungen und erhöhten Temperaturen Ectoin und Hydroxyectoin im Verhältnis 1:1. Durch Konstruktion der genomischen Austauschmutanten *H. elongata* MaKu03 $\Delta ectB::ectD$, *H. elongata* $\Delta ectB::ectD$ und *H. elongata* $\Delta ectB::ectD \Delta promectD::promKB1$ konnte das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von 1:1 bereits bei niedrigeren Salinitäten und Temperaturen in den Zellen erzielt werden. Dies ließ sich auf transkriptionelle Effekte und eine damit einhergehende Erhöhung des intrazellulären EctD-Gehalts zurückführen. Die Austauschmutanten zeigten untereinander allerdings kaum einen signifikanten Unterschied in der Hydroxyectoin-Produktion. Eine vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin wurde zunächst nicht beobachtet.

Auch durch eine plasmidvermittelte Erhöhung der EctD-Menge konnte keine vollständige Hydroxylierung von Ectoin erreicht werden. *H. elongata* Wt⁺ (pPromEct_ectD) akkumulierte zwar mehr Hydroxyectoin als *H. elongata* Wt, im Vergleich zu den genomischen Austauschmutanten gab es aber auch hier wieder keinen Unterschied. Dies wurde durch die Nutzung eines *low-copy*-Vektors und der Tatsache, dass es sich bei dem *ectA*-Promotor (*promA*) um einen schwachen Promotor handelt und somit nicht ausreichend EctD in der Zelle zur Verfügung steht, erklärt.

Erst durch weitere Temperaturerhöhung, die über das Temperaturmaximum von *H. elongata* reichten, konnte eine fast vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin erzielt werden. Neben den drei genomischen Austauschmutanten, die bis zu 96 % Hydroxyectoin in den Zellen akkumulierten, konnte auch in *H. elongata* Wt bei einem „Hitzeschock“ auf 50 °C das Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis stark zugunsten von Hydroxyectoin verschoben werden. Diese Beobachtung könnten u. a. durch posttranslationale Regulationsmechanismen erklärt werden. Hydroxyectoin

selbst bietet der Zelle bei Hitzestress einen besseren Schutz als die unhydroxylierte Version Ectoin, da es die Schmelztemperatur der DNA leicht erhöht und Proteine vor Hitzeeinflüssen stabilisiert (Lippert und Galinski, 1992; Borges *et al.*, 2002; Schnoor *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für eine zukünftige Hydroxyectoin-Produktion weiterhin *H. elongata* genutzt werden kann. Durch Umstellung des bislang eingesetzten Fermentationsverfahrens und Anpassung an eine Temperaturerhöhung auf 50 °C kann eine deutlich höhere Ausbeute als 50 % Hydroxyectoin erzielt werden, wobei eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet sein muss. Die relativ hohen durch *H. elongata* erzeugten spezifischen Produktionsraten sprechen ebenso für die Wahl von *H. elongata* als zukünftigem Produktionsstamm.

Neben der Optimierung eines Produktionsstamms für das kompatible Solut Hydroxyectoin in *H. elongata* konnte ein Ganzzellbiokatalyse-System in *E. coli* BL21 etabliert werden. Durch Expression des *ectD*-Gens in *E. coli* BL21 pETectDHis wurde eine vollständige Hydroxylierung von bis zu 10 mM Ectoin erzielt. Weiterhin stellte sich Glutamat als optimale C-Quelle für die Hydroxylierungsreaktion heraus. Mit einer hohen spezifischen Umsatzrate von 320 mg (g TG⁻¹) h⁻¹ ermöglicht dieses System einen Einsatz in der Produktion neuer hydroxylierter Verbindungen, die dem System von außen zugefügt werden. Eine Fermentation von *E. coli* BL21 pETectDHis zeigte außerdem, dass das System auch in größerem Maßstab einsetzbar ist.

Weiterhin konnte bestätigt werden, dass es sich bei der Ectoinhydroxylase EctD um ein verhältnismäßig unspezifisches Enzym handelt, welches zyklische Verbindungen wie Prolin, die Ectoinderivate DHMICA und Homoectoin sowie ADPC hydroxyliert. Das Substratspektrum von EctD wurde außerdem um die Substanz Gd-Ectoin erweitert. Die Hydroxylierung des inkompatiblen Soluts Gd-Ectoin wurde mittels HPLC und ¹³C-NMR-Spektroskopie verifiziert. Da es sich bei OH-Gd-Ectoin um eine völlig neuartige Verbindung handelt, deren Struktur bislang nicht in der Literatur beschrieben war, bietet die Produktion und Aufreinigung dieses inkompatiblen Soluts zahlreiche Möglichkeiten zur näheren Charakterisierung.

Neben der Ganzzellbiokatalyse zur Hydroxylierung von Ectoin und anderen (in)kompatiblen Soluten konnte eine *de novo* Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* gezeigt werden. Allerdings akkumulierte *E. coli* DH5α pAKECT1-*tacectD* nur geringe

Menge an Hydroxyectoin in den Zellen, als Hauptsolute wurden Trehalose und Ectoin synthetisiert. Die niedrige Hydroxyectoin-Synthese beruht dabei vermutlich auf der geringen Expressionsrate des *ectD*-Gens. Weitere Untersuchungen, vor allem zur intrazellulären Erhöhung der EctD-Menge, sind für eine Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* notwendig. *E. coli* BKA-13 pAKECT1 wurde als Stamm identifiziert, der Ectoin ins Medium ausscheidet. Für eine zukünftige Untersuchung der Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* bietet sich daher dieser trehalose- und transportdefiziente Stamm an, da er zu einer Überproduktion und Ausscheidung des synthetisierten Soluts führte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit *H. elongata* durch Konstruktion der genomischen Mutanten bzw. durch Optimierung des Kultivierungsverfahrens Bedingungen geschaffen wurden, welche eine industrielle Produktion von Hydroxyectoin mit einer viel höheren Ausbeute, als bislang erreicht, erlauben. Mit *E. coli* wurde ein Ganzzellbiokatalyse-System etabliert, das vor allem zur Nutzung der Hydroxylierung neuartiger Verbindungen mit einer hohen spezifischen Produktivität dient.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden auf der VAAM-Jahrestagung 2009 in Bochum und 2011 in Karlsruhe veröffentlicht.

Vielgraf, S.; Meffert, A.; Stein, M. und Galinski, E. A. (2009)

Salt-induced production of novel hydroxylated ectoine derivatives by whole-cell biotransformation. Poster PX 34

Meffert, A. und Galinski, E. A. (2011)

Whole-cell biotransformation for the stereospecific hydroxylation of the incompatible solute guanidino-ectoine. Vortrag GWV018.

VI. Literaturverzeichnis

- Andersen, B. K. und von Meyenburg, K.** (1980) Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J Bacteriol* **144**: 114-123.
- Anderson, A. W.; Nordan, H. C.; Cain, R. F.; Parrish, G. und Duggan, D.** (1956) Studies on a radio-resistant micrococcus. I. The Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol* **10**: 575-577.
- Andersson, M. M.; Breccia, J. D. und Hatti-Kaul, R.** (2000) Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol Appl Biochem* **32**: 145-153.
- Antoine, R. und Locht, C.** (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* **6**: 1785-1799.
- Anton, J.; Oren, A.; Benlloch, S.; Rodriguez-Valera, F.; Amann, R. und Rossello-Mora, R.** (2002) *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 485-491.
- Arakawa, T. und Timasheff, S. N.** (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**: 411-414.
- Avron, M.** (1986) The osmotic components of halotolerant algae. *Trends Biochem Sci* **11**: 5-6.
- Bateman, R. L.; Bhanumoorthy, P.; Witte, J. F.; McClard, R. W.; Grompe, M. und Timm, D. E.** (2001) Mechanistic inferences from the crystal structure of fumarylacetoacetate hydrolase with a bound phosphorus-based inhibitor. *J Biol Chem* **276**: 15284-15291.
- Berrier, C.; Coulombe, A.; Szabo, I.; Zoratti, M. und Ghazi, A.** (1992) Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stress-activated channels in bacteria. *Eur J Biochem* **206**: 559-565.
- Berrier, C.; Besnard, M.; Ajouz, B.; Coulombe, A. und Ghazi, A.** (1996) Multiple Mechanosensitive Ion Channels from *Escherichia coli*, Activated at Different Thresholds of Applied Pressure. *J Membr Biol* **151**: 175-187.
- Bertani, G.** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **3**: 293-300.
- Bertau, M.** (2002) Novel developments in biocatalytic organic chemistry. *Curr Org Chem* **6**: 987-1014.
- Bestvater, T.; Louis, P. und Galinski, E. A.** (2008) Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Systems* **4**: 1-12.
- Betnér, I. und Földi, P.** (1988) The FMOC/ADAM-approach to amino acid analysis. *LC-GC* **8**: 832-840.
- Beyer, N.; Driller, H. und Büniger, J.** (2000) Ectoin - an innovative-multi-functional active substance for the cosmetic industry. *SÖFW Journal* **126**: 27-29.
- Bligh, E. G. und Dyer W. J.** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.
- Bodanszky, M.; Izdebski, J. und Muramatsu, I.** (1969) The Structure of the Peptide Antibiotic Stendomycin. *J Am Chem Soc* **91**: 2351-2358.

- Bommarius, A. S. und Riebel, B. R.** (2004) Biocatalysis. Weinheim. Wiley-VCH. 1-14.
- Borges, N.; Ramos, A.; Raven, N. D.; Sharp, R. J. und Santos, H.** (2002) Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles* **6**: 209-216.
- Bovell, C. R.; Packer, L. und Helgerson, R.** (1963) Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light-scattering. *Biochim Biophys Acta* **75**: 257-266.
- Brown, A.** (1976) Microbial water stress. *Microbiol Mol Biol Rev* **40**: 803-846.
- Brown, T. D.; Jones-Mortimer, M. C. und Kornberg, H. L.** (1977) The Enzymic Interconversion of Acetate and Acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *Microbiology* **102**: 327-336.
- Brünig, A.** (2005) Molekulargenetische und physiologische Studien zur Entwicklung eines Expressionssysteme in *Halomonas elongata* DSMZ 2581^T. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Bünger, J.; Degwert, J. und Driller, H.** (2001) The protective function of compatible solute ectoine on the skin cells and its biomolecules with respect to UV-radiation, immunosuppression and membrane damage. *IFSCC Magazine* **4**: 1-6.
- Bünger, J. und Driller, H.** (2004) Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physio* **17**: 232-237.
- Buommino, E.; Schiraldi, C.; Baroni, A.; Paoletti, I.; Lamberti, M.; de Rosa, M. und Tufano, M. A.** (2005) Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress Chaperones* **10**: 197-203.
- Burdziak, A.** (2006) Entwicklung eines bakteriellen Stammes zur Produktion des kompatiblen Solute Mannosylglycerat. Dissertation. Universität Bonn.
- Bursy, J.** (2005) Osmotisch regulierte Biosynthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*: Biochemische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD und Identifizierung ihres Strukturgenes. Dissertation. Universität Marburg.
- Bursy, J.; Pierik, A. J.; Pica, N. und Bremer, E.** (2007) Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J Biol Chem* **43**: 31147-31155.
- Bursy, J.; Kuhlmann, A. U.; Pittelkow, M.; Hartmann, H.; Jebbar, M.; Pierik, A. J. und Bremer, E.** (2008) Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7286-7296.
- Butinar, L.; Santos, S.; Spencer-Martins, I.; Oren, A. und Gunde-Cimerman, N.** (2005) Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* **2**: 229-234.
- Cain, C. K.** (1968) Annual Reports in Medicinal Chemistry. New York, London. Academic Press.
- Cairney, J.; Booth, I. R. und Higgins, C. F.** (1985) Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: proU encodes an osmotically induced betaine transport system. *J Bacteriol* **164**: 1224-1232.
- Calderón, M. I.; Vargas, C.; Rojo, F.; Iglesias-Guerra, F.; Csonka, L. N.; Ventosa, A. und Nieto, J. J.** (2004) Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. *Microbiology* **150**: 3051-3063.

- Canovas, D.; Vargas, C.; Iglesias-Guerra, F.; Csonka, L. N.; Rhodes, D.; Ventosa, A. und Nieto, J. J.** (1997) Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **41**: 25794-25801.
- Canovas, D.; Vargas, C.; Csonka, L.; Ventosa, A. und Nieto, J.** (1998) Synthesis of Glycine Betaine from Exogenous Choline in the Moderately Halophilic Bacterium *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4095-4097.
- Canovas, D.; Borges, N.; Vargas, C.; Ventosa, A.; Nieto, J. J. und Santos, H.** (1999) Role of N γ -Acetyldiaminobutyrate as an Enzyme Stabilizer and an Intermediate in the Biosynthesis of Hydroxyectoine. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3774-3779.
- Casadaban, M. J.** (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**: 541.
- Ciechanover, A.** (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* **17**: 7151-7160.
- Claus, D.; Fahmy, F.; Rolf, H. J. und Tosunoglu, N.** (1983) *Sporosarcina halophila* sp. nov., an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soil. *Syst Appl Microbiol* **4**: 496-506.
- Clegg, J. S.; Seitz, P.; Seitz, W. und Hazlewood, C. F.** (1982) Cellular response to extreme water loss: The water replacement hypothesis. *Cryobiol* **19**: 306-316.
- Clifton, I. J.; McDonough, M. A.; Ehrismann, D.; Kershaw, N. J.; Granatino, N. und Schofield, C. J.** (2006) Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded beta-helix fold proteins. *J Inorg Biochem* **100**: 644-669.
- Cohen, S. N.; Chang, A. C. und Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **8**: 2110-2114.
- Cremer, J.; Eggeling, L. und Sahm, H.** (1991) Control of the Lysine Biosynthesis Sequence in *Corynebacterium glutamicum* as Analyzed by Overexpression of the Individual Corresponding Genes. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1746-1752.
- Csonka, L. N.** (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**: 121-147.
- Csonka, L. N. und Epstein, W.** (1996) Osmoregulation. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Neidhard, F.C.; Curtiss, R. III, Ingraham, J. L. et al. Washington, D. C., USA. ASM Press: 1210-1223.
- Culham, D. E.; Lasby, B.; Marangoni, A. G.; Milner, J. L.; Steer, B. A.; van Nues, R. W. und Wood, J. M.** (1993) Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter ProP. *J Mol Biol* **229**: 268-276.
- Culham, D. E.; Henderson, J.; Crane, R. A. und Wood, J. M.** (2003) Osmosensor ProP of *Escherichia coli* responds to the concentration, chemistry, and molecular size of osmolytes in the proteoliposome lumen. *Biochemistry* **42**: 410-420.
- da Costa M. S.; Santos, H. und Galinski E. A.** (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117-153.
- Dagert, M. und Ehrlich, S. D.** (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **1**: 23-28.
- Dalgaard, R.; Ross, T.; Kamperman, L.; Neumeyer, K. und McMeckint, A.** (1994) Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int J Food Microbiol* **23**: 391-404.

- David, G.; Blondeau, K.; Schiltz, M.; Penel, S. und Lewit-Bentley, A. (2003) YodA from *Escherichia coli* Is a Metal-binding, Lipocalin-like Protein. *J Biol Chem* **278**: 43728-43735.
- Dibrov, P.; Rimon, A.; Dzioba, J.; Winogrodzki, A.; Shalitin, Y. und Padan, E. (2005) 2- Aminoperimidine, a specific inhibitor of bacterial NhaA Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Lett* **579**: 373-378.
- Dinnbier, U.; Limpinsel, E.; Schmid, R.; und Bakker, E. P. (1988) Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150**: 348-357.
- Donaldson, K.; Tran, L.; Jimenez, L. A.; Duffin, R.; Newby, D. E.; Mills, N.; MacNee, W. und Stone V. (2005) Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* **2**: 10.
- Dötsch, A.; Severin, J.; Alt, W.; Galinski, E. A. und Kreft, J. (2008) A mathematical model for growth and osmoregulation in halophilic bacteria. *Microbiology* **154**: 2956-2969.
- Edwards K. J.; Bond P. L.; Gihring T. M. und Banfield J. F. (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* **287**: 1796-1799.
- Empadinhas N. und da Costa, M. S. (2008) Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int Microbiol* **11**: 151-161.
- Frings, E.; Sauer, T. und Galinski, E. A. (1995) Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *J Biotech* **43**: 53-61.
- Galinski, E.; Pfeiffer, H. und Trüper H. (1985) 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem* **149**: 135-139.
- Galinski, E. A. und Herzog, R. M. (1990) The role of trehalose as a substitute for nitrogen containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch Microbiol* **153**: 607-613.
- Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 95-108.
- Galinski, E. A. (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**: 272-328.
- Galinski, E. A.; Ures, A.; Stein, M. und Schwarz, T. (2007) Stereospezifische Hydroxylierung von kompatiblen Soluten. DE 10 2007 052 900 A1, 07.11.2007; PCT/EP 2008/009414G.
- García-Esteva, R.; Argandoña, M.; Reina-Bueno, M.; Capote, N.; Iglesias-Guerra, F.; Nieto, J. J. und Vargas, C. (2006) The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Bacteriol* **11**: 3774-3784.
- Gavrieli, I. (1997) Halite deposition from the Dead Sea: 1960-1993. In *The Dead Sea. The Lake and its Setting*. Niemi, T. M.; Ben-Avrahamand, Z. und Joel, J. R., Oxford. Oxford University Press: 161-170.
- Giaever, H.; Styrvold, O.; Kaasen, I. und Strom, A. (1988) Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 2841-2849.
- Göller, K.; Ofer, A. und Galinski, E. A. (1998) Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **161**: 293-300.

- Göller, K.** (1999) Identifizierung und Charakterisierung des Ectoin-Genclusters in *Halomonas elongata*. Dissertation. Universität Bonn.
- Göller, K. und Galinski, E. A.** (1999) Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute addition. *J Mol Catal B Enzymatic* **7**: 37-45.
- Gouesbet, G.; Jebbar, M.; Talibart, R.; Bernard, T. und Blanco, C.** (1994) Pipecolic acid is an osmoprotectant for *Escherichia coli* taken up by the general osmoporters ProU and ProP. *Microbiology* **140**: 2415-2422.
- Graf, R.; Anzali, S.; Bünger, J.; Pflücker, F. und Driller, H.** (2008) The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin Dermatol* **26**: 326-333.
- Gramman, K.** (2000) Identifizierung und Charakterisierung eines osmoregulierten Solutetransporters in einer *ΔectA* Mutante von *H. elongata*. Dissertation. Universität Bonn.
- Grammann, K.; Volke, A. und Kunte, H. J.** (2002) New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *J Bacteriol* **11**: 3078-3085.
- Grammel, N.** (2000) Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei salzstresstoleranten Osmolyten, in *Streptomyces chrysomallus*. Dissertation. Technische Universität Berlin.
- Grant, W. D.** (2004) Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 1249-1266.
- Grossman T. H.; Kawasaki, E. S.; Punreddy, S. R. und Osburne, M. S.** (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **209**: 95-103.
- Grün, A.** (2011) Studien zur Expression und zum Tat-Transportsystem von heterologen Proteinen in *Halomonas elongata*. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Haardt, M.; Kempf, B.; Faatz, E. und Bremer, E.** (1995) The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Molec Gen Genet* **6**: 783-796.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **4**: 557-580.
- Harishchandra, R. K.; Wulff, S.; Lentzen, G.; Neuhaus, T. und Galla, H. J.** (2010) The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. *Biophys Chem* **150**: 37-46.
- Hausinger, R. P.** (2004) Fcl/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**: 21-68.
- Hengge-Aronis, R.; Klein, W.; Lange, R.; Rimmele, M. und Boos, W.** (1991) Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 7918-7924.
- Hengge-Aronis, R.** (1996) Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In *Escherichia coli and Salmonella, cellular and molecular biology*. Neidhard, F. C.; Curtiss, R. III; Ingraham, J. L. et al. Washington, D. C., USA. ASM Press: 1497-1512.

- Hohmann, S. (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Hollywood, N. und Doelle, H. W. (1976) Effect of specific growth rate and glucose concentration on growth and glucose metabolism of *Escherichia coli* K-12. *Microbios* **17**: 23-33.
- Horton, R.; Hunt, H.; Ho, S.; Pullen, J. und Pease, L. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61-68.
- Imhoff, J. und Trüper, H. G. (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. *Arch Microbiol* **114**: 115-121.
- Inbar, L. und Lapidot, A. (1988) The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ¹³C- and ¹⁵N-labeled L-glutamate and ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **31**: 16014-16022.
- Jebbar, M.; Talibart, R.; Gloux, K.; Bernard, T. und Blanco, C. (1992) Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol* **174**: 5027-5035.
- Joshi, A. K.; Baichwal, V. und Ames, G. F. (1991) Rapid polymerase chain reaction amplification using intact bacterial cells. *Biotechniques* **10**: 42-45.
- Kaasen, I.; McDougall, J. und Strom, A. R. (1994) Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* **145**: 9-15.
- Kanapathipillai, M.; Lentzen, G.; Sierks, M. und Park, C. B. (2005) Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Lett* **579**: 4775-4780.
- Kashefi, K. und Lovley, D. R. (2003) Extending the Upper Temperature Limit for Life. *Science* **301**: 934.
- Kato, C.; Li, L.; Nogi, Y.; Nakamura, Y.; Tamaoka, J. und Horikoshi, K. H. (1998) Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11,000 Meters. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1510-1513.
- Kempf, B. und Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **5**: 319-330.
- Klöpfer, A.; Spanneberg, R. und Glomb, M. A. (2011) Formation of arginine modifications in a model system of α -tert-butoxycarbonyl (Boc)-arginine with methylglyoxal. *J Agric Food Chem* **59**: 394-401.
- Knapp, S.; Ladenstein, R. und Galinski, E. A. (1999) Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* **3**: 191-198.
- Koch, A. L. (1983) The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv Microb Physiol* **24**: 301-366.
- Korsten, A. (2011) Heterologe Expression des kompatiblen Soluts NAGGN und Aufklärung der NAGGN-Biosynthese. Dissertation. Universität Bonn.
- Kovach, M. E.; Phillips, R. W.; Elzer, P. H.; Roop, R. M. und Peterson, K. M. (1994) pBRR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-802.
- Kraegeloh, A. und Kunte, H. (2002) Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles* **6**: 453-462.
- Kuhlmann, A. U. und Bremer, E. (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **68**: 772-783.

- Kunte, H. J. und Galinski, E. A.** (1995) Transposon mutagenesis in halophilic eubacteria: conjugal transfer and insertion of transposon Tn5 and Tn1732 in *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiol Lett* **128**: 293-299.
- Kunte, H. J.; Galinski, E. A.; Bestvater, T.; Volke, A. und Gramman, A.** (2002) Verfahren zur Gewinnung von Wertstoffen aus Organismen durch Beeinflussung/Beeinträchtigung der zelleigenen Transport-systeme für diese Wertstoffe bzw. durch Verwendung von Produktionsstämmen, denen besagte Transportsysteme fehlen. DE 101 14 189 A 1, 26.09.2002.
- Kushner, D. J.** (1978) Life in high salt and solute concentrations. In *Microbial Life in Extreme Environments*. Kushner, D. J. London. Academic Press: 317-368.
- Laemmli, U.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, M. C.; Sowers, K. R.; Robertson, D. E.; Roberts, M. F. und Gunsalus, R. P.** (1991) Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *J Bacteriol* **173**: 5352-5358.
- Landfald, B. und Strøm, A.** (1986) Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**: 849-855.
- Lange, C.** (2009) Optimierung der Produktion des kompatiblen Soluts Mannosylglycerat in einem heterologen Expressionsstamm. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Lanyi, J.** (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**: 272-290.
- Larsen, P. I.; Sydnes, L. K.; Landfald, B. und Strom, A. R.** (1987) Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch Microbiol* **147**: 1-7.
- Le Rudulier, D.; Strøm, A. R.; Dandekar, A. M.; Smith, L. T. und Valentine, R. C.** (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.
- Lecher, J.; Pittelkow, M.; Zobel, S.; Bursy, J.; Bönig, T.; Smits, S. H. J.; Schmitt, L. und Bremer, E.** (2009) The Crystal Structure of UehA in Complex with Ectoine-A Comparison with Other TRAP-T Binding Proteins. *J Mol Biol* **389**: 58-73.
- Lee, S. J. und Gralla, J. D.** (2004) Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase. *Mol Cell* **14**: 153-162.
- Lentzen, G. und Schwarz, T.** (2006) Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **4**: 623-634.
- Levina, N.; Töttemeyer, S.; Stokes, N. R.; Louis, P.; Jones, M. A. und Booth, I. R.** (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO J* **18**: 1730-1737.
- Lippert, K. und Galinski, E. A.** (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 61-65.
- Lo, C. C.; Bonner, C. A.; Xie, G.; D'Souza, M. und Jensen, R. A.** (2009) Cohesion Group Approach for Evolutionary Analysis of Aspartokinase, an Enzyme That Feeds a Branched Network of Many Biochemical Pathways. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 594-651.
- Loewen, P. C. und Hengge-Aronis, R.** (1994) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44**: 707-717.

- Lottspeich, F. und Zorbas H.** (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin.
- Louis, P.; Trüper, H. G. und Galinski, E. A.** (1994) Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 684-688.
- Louis, P. und Galinski, E. A.** (1997) Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**: 1141-1149.
- Lucht, J. M. und Bremer, E.** (1994) Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiol Rev* **14**: 3-20.
- Ma, Y.; Galinski, E. A.; Grant, W. D.; Oren, A. und Ventosa, A.** (2010) Halophiles 2010: life in saline environments. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6971-6981.
- MacElroy, R.** (1974) Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* **6**: 74-75.
- MacMillan, S. V.; Alexander, D. A.; Culham, D. E.; Kunte, H. J.; Marshall, E. V.; Rochon, D. und Wood, J. M.** (1999) The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1420**: 30-44.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M. und Parker J.** (2001) Brock Mikrobiologie. Heidelberg, Berlin. Spektrum Akademischer Verlag.
- Makarova K.S.; Aravind, L.; Wolf, Y. I.; Tatusov, R. L.; Minton, K. W.; Koonin, E. V. und Daly, M. J.** (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 44-79.
- Malin, G. und Lapidot, A.** (1996) Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol* **178**: 385-395.
- Malin, G.; Iakobashvili, R. und Lapidot, A.** (1999) Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. *J Biol Chem* **274**: 6920-6929.
- Mann, T.** (2008) Untersuchungen zum Effekt von Kreatin auf Bakterien. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Manzanera, M.; Garcia de Castro, A.; Tøndervik, A. und Rayner-Brandes, M.** (2002) Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4328-4333.
- Manzanera, M.; Vilchez, S. und Tunnacliffe, A.** (2004) High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol Lett* **233**: 347-352.
- Marmur, J.** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* **2**: 208-218.
- Martin, D. D.; Ciulla, R. A. und Roberts, M. F.** (1999) Osmoadaptation in Archaea. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1815-1825.
- Martins, L. O.; Carreto, L. S.; da Costa, M. S. und Santos, H.** (1996) New compatible solutes related to di-myo-inositol-phosphate in members of the order *Thermotogales*. *J Bacteriol* **178**: 5644-5651.
- Meffert, A.** (2007) Untersuchungen zur Mannosylglycerat-Produktion von *Halomonas elongata* KB10.1. Diplomarbeit. Universität Bonn.

- Mellies, J., Wise, A. und Villarejo, M.** (1995) Two different *Escherichia coli* promoters respond to osmotic and growth phase signals. *J Bacteriol* **177**: 144-151.
- Mevarech, M.; Frolow, F. und Gloss L. M.** (2000) Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys Chem* **86**: 155-164.
- Miller, J. H.** (1972) A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Los Angeles. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Milner, J. L.; Grothe, S. und Wood, J. M.** (1988) Proline porter II is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **263**: 14900-14905.
- Morimoto, R. I. und Santoro, M. G.** (1998) Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* **16**: 833-838.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. und Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*: 263-273.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*: 335-350.
- Myllylä, R.; Gunzler, V.; Kivirikko, K. I. und Kaska, D. D.** (1992) Modification of vertebrate and algal prolyl 4-hydroxylases and vertebrate lysyl hydroxylase by diethyl pyrocarbonate. Evidence for histidine residues in the catalytic site of 2-oxoglutarate-coupled dioxygenases. *Biochem J* **286**: 923-927.
- Nakayama, H.; Yoshida, K.; Ono, H.; Murooka, Y. und Shinmyo, A.** (2000) Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol* **122**: 1239-1247.
- Nevo, E.; Oren, A. und Wasser, S. P.** (2003) Fungal life in the Dead Sea. Ruggell (Liechtenstein). A.R.G. Gantner Verlag.
- Nyysölä, A.; Keruvuo, J.; Kaukinen, P.; von Weymarn, N. und Reinikainen, T.** (2000) Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J Biol Chem* **275**: 22196-22201.
- Ono, H.; Sawada, K.; Khunajakr, N.; Tao, T.; Yamamoto, M.; Hiramoto, M.; Shinmyo, A.; Takano, M. und Murooka, Y.** (1999) Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **1**: 91-99.
- Oren, A.** (1999) Bioenergetic Aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334-348.
- Oren, A.; Heldal, M.; Norland, S. und Galinski, E. A.** (2002) Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **6**: 491-498.
- Oren, A.** (2002) Halophilic microorganisms and their environments. Dordrecht, Boston, London. Kluwer Academic Publishers.
- Oren A.** (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**: 2.
- Patte, J. C.** (1996) Biosynthesis of Threonine and Lysine. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. C.; Curtis, R. III; Ingraham, J. L., et al. Washington, D. C., USA. ASM Press: 528-541.

- Peters, P.; Galinski, E. A. und Trüper, H. G.** (1990) The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 157-162.
- Pinner, E.; Kotler, Y.; Padan, E. und Schuldiner, S.** (1993) Physiological role of *nhaB*, a specific Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **3**: 1729-1734.
- Prabhu, J.; Schauwecker, F.; Grammel, N.; Keller, U. und Bernhard, M.** (2004) Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* **5**: 3130-3132.
- Price, J. C.; Barr, E. W.; Tirupati, B.; Bollinger, J. M., JR. Und Krebs, C.** (2003) The first direct characterization of a high-valent iron intermediate in the reaction of an alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase: a high-spin FeIV complex in taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **42**: 7497-7508.
- Prieur, D.** (2007) An Extreme Environment on Earth: Deep-Sea Hydrothermal Vents. Lessons for Exploration of Mars and Europa. In *Lectures in Astrobiology: Advances in Astrobiology and Biogeophysics*. Gargaud, M. et al., 2. Auflage. Berlin, Heidelberg. Springer: 319-345.
- Reshetnikov, A. S.; Khmelenina, V. N. und Trotsenko, Y. A.** (2004) Detection of ectoine biosynthesis genes in halotolerant aerobic methylotrophic bacteria. *Dokl Biochem Biophys* **396**: 200-202.
- Ringquist, S.; Shinedling, S.; Barrick, D.; Green, L.; Binkley, J.; Stormo, G. D. und Gold, L.** (1992) Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol Microbiol* **6**: 1219-1229.
- Rivkina, E. M.; Friedmann, E. I.; McKay, C. P. und Gilichinsky, D. A.** (2000) Metabolic Activity of Permafrost Bacteria below the Freezing Point. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3230-3233.
- Roberts, M. F.** (2000) Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci* **5**: 796-812.
- Roberts, M. F.** (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **1**: 1-30.
- Robertson, D. E.; Noll, D. und Roberts, M. F.** (1992) Free amino acid dynamics in marine methanogens. beta-Amino acids as compatible solutes. *J Biol Chem* **267**: 14893-14901.
- Rosen, R.; Becher, D.; Büttner, K.; Biran, D.; Hecker, M. und Ron E. Z.** (2004) Highly phosphorylated bacterial proteins. *Proteomics* **4**: 3068-3077.
- Rothschild, L. J. und Mancinelli, R. L.** (2001) Life in extreme environments. *Nature* **6823**: 1092-1101.
- Sakamoto, N.; Kotre, A. M. und Savageau, M. A.** (1975) Glutamate Dehydrogenase from *Escherichia coli*: Purification and Properties. *J Bacteriol* **124**: 775-783.
- Sambrook, J.; Russel D. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Porro, C.; Kaur, B.; Mann, H. und Ventosa, A.** (2010) *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *Int J Syst Evol Microbiol* **12**: 2768-2774.
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Golson, A.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467.
- Santos, H. und da Costa, M. S.** (2002) Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ Microbiol* **9**: 501-509.

- Sauer, T. und Galinski, E. A. (1998) Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* **57**: 306-313.
- Schäfer, A.; Tauch, A.; Jäger, W.; Kalinowski, J.; Thierbach, G. und Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **1**: 69-73.
- Schilz, Y. (2005) Untersuchung zur Bedeutung des Gens *ectR* in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Schiraldi, C.; Maresca, C.; Catapano, A.; Galinski, E. A. und De Rosa, M. (2006) High-yield cultivation of *Marinococcus* M52 for production and recovery of hydroxyectoine. *Res Microbiol* **157**: 693-699.
- Schlegel, H. G. (2006) Allgemeine Mikrobiologie. Fuchs, G., 8. Auflage. Stuttgart. Georg Thieme Verlag.
- Schnoor, M., Voss, P.; Cullen, P.; Boking, T.; Galla, H. J.; Galinski, E. A. und Lorkowski, S. (2004) Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 867-872.
- Schubert, T.; Maskow, T.; Benndorf, D.; Harms, H. und Breuer, U. (2007) Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium. *Appl Environ Microbiol* **10**: 3343-3347.
- Schwibbert, K.; Marin-Sanguino, A.; Bagyan, I.; Heidrich, G.; Lentzen, G.; Seitz, H.; Rampp, M.; Schuster, S. C.; Klenk, H. P.; Pfeiffer, F.; Oesterhelt, D. und Kunte, H. J. (2010) A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Environ Microbiol*: 1-22.
- Seckbach, J.; Chapman, D.; Garbary, D.; Oren, A. und Reisser, W. (2007) Algae and cyanobacteria under environmental extremes. In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Dordrecht, Niederlande. Springer: 783-787.
- Seip, B.; Galinski, E. A. und Kurz, M. (2011) Natural and Engineered Hydroxyectoine Production Based on the *Pseudomonas stutzeri* *ectABCD-ask* Gene Cluster. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1368-1374.
- Sell, K. (2009) Die antimikrobielle Wirkung von zwitterionischen Guanidiniumverbindungen. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Sell, K. und Galinski, E. A. (2011) Guanidino-ectoine: a new member of the incompatible solute family. Poster VAAM-Tagung SRP020.
- Seol, W. und Shatkin, A. J. (1992) *Escherichia coli* α -Ketogutarate Permease is a constitutively expressed proton symporter. *J Biol Chem* **267**: 6409-6413.
- Severin, J.; Wohlfarth, A. und Galinski, E. A. (1992) The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 1629-1638.
- Shaw, W. V. und Leslie, A. G. W. (1991) Chloramphenicol Acetyltransferase. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **20**: 363-386.
- Simon, R.; Priefer, U. und Pühler, A. (1983) A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotechnol* **9**: 784-791.
- Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.

- Stein, M.; Ures, A.; Witt, E.; Schwarz, T. und Galinski, E. A.** (2008) Whole-cell biocatalysis for the stereospecific hydroxylation of cyclic compatible solutes. Poster VAAM-Tagung.
- Strøm, A. und Kaasen, I.** (1993) Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol* **8**: 205-210.
- Stryer, L.** (2003) Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, 5. Auflage.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **1**: 113-130.
- Stumpfe, D.** (2003) Aufbau und Regulation der Ectoin-Synthesegene *ectABC* aus *Halomonas elongata* DSM2581^T. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Sukharev, S. I.; Blount, P.; Martinac, B. und Kung, C.** (1997) Mechanosensitive Channels of *Escherichia coli*. *Annu Rev Physiol* **59**: 633-657.
- Sutcliffe, J. G.** (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **43**: 77-90.
- Szvetnik, A.** (2004) Glutamate and methionine transport in *Escherichia coli*. Dissertation. Universität Szeged, Ungarn.
- Sydlik U.; Gallitz, I.; Albrecht, C.; Abel, J.; Krutmann, J. und Unfried, K.** (2009) The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **180**: 29-35.
- Takai, K.; Moser, D. P.; Onstott, T. C.; Spoelstra, N.; Pffiffer, S. M.; Dohnalkova, A. und Frederickson, J. K.** (2001) *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1245-1256.
- Takeshita, S.; Sato, M.; Toba, M.; Masahashi, W. und Hashimoto-Gotoh, T.** (1987) High-copy-number and low-copy number plasmid vectors for lacZ α -complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* **61**: 63-74.
- Ures, A.** (2005) Charakterisierung und Identifizierung des Ectoin-Hydroxylasegens *ectD* aus *Halomonas elongata* DSM 2581^T. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Van-Thuoc, D.; Guzmán, H.; Quillaguamán, J. und Hatti-Kaul, R.** (2010) High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture and milking process. *J Biotechnol* **147**: 46-51.
- Vargas, C.; Fernandez-Castillo, R.; Canovas, D.; Ventosa, A. und Nieto, J. J.** (1995) Isolation of cryptic plasmids from moderately halophilic eubacteria of the genus *Halomonas*. Characterization of a small plasmid from *H. elongata* and its use for shuttle vector construction. *Molec Gen Genet* **246**: 411-418.
- Vargas, C.; Argandoña, M.; Reina-Bueno, M.; Rodríguez-Moya, J.; Fernández-Aunión, C. und Nieto, J. J.** (2008) Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* **4**: 1-9.
- Veit, A.; Polen, T. und Wendisch, V. F.** (2007) Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 406-421.
- Vemuri, G. N.; Altman, E.; Sangurdekar, D. P.; Khodursky, A. B. und Eiteman, M. A.** (2006) Overflow Metabolism in *Escherichia coli* during Steady-State Growth: Transcriptional Regulation and Effect of the Redox Ratio. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3653-3661.

- Ventosa, A.; Nieto, J. J. und Oren, A.** (1998) Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504-544.
- Vielgraf, S.** (2008) Stereospezifische Hydroxylierung kompatibler Solute über Ganzzellkatalyse in *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Universität Bonn.
- Vreeland, R. H.; Litchfield, C. D.; Martin, E. L. und Elliot, E.** (1980) *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **2**: 485-495.
- von Blohn, C.; Kempf, B.; Kappes, R. M. und Bremer, E.** (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol* **25**: 175-187.
- Waldmann, L.** (2005) Effect of L-arginine and guanidinium chloride (GdmCl) on the unfolding and refolding of hen egg-white lysozyme (HEWL). Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wiechelmann, K. J.; Braun, R. D. und Fitzpatrick, J. F.** (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**: 231-237.
- Witt, E. M. H. J.; Davie, N. W. und Galinski, E. A.** (2011) Unexpected property of ectoine synthase and its application for synthesis of the engineered compatible solute ADPC. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 113-122.
- Wohlfarth, A.; Severin, J. und Galinski, E. A.** (1990) The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *J Gen Microbiol* **136**: 705-712.
- Wood, J. M.** (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 230-262.
- Xu, J. und Johnson R. C.** (1997) Activation of RpoS-dependent *proP* P2 transcription by the Fis protein *in vitro*. *J Mol Biol* **270**: 346-359.
- Zaccai, G.** (2011) Molecular adaptations to life at high salt: lessons from *Haloarcula marismortui*. In *Origins and Evolution of Life: An Astrobiological Perspective*. Gargaud, M.; López-García, P.; Hervé, M. Cambridge, New York. Cambridge University Press: 375.
- Zhang, L.-h.; Lang, Y.-j. und Nagata, S.** (2009) Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extremophiles* **4**: 717-724.

***H. elongata* MaKu03 Δ ectB::ectD und *H. elongata* Δ ectB::ectD**

```

1  TCGACGATGC CAGCGACGTG GTGGTCGGCG CTCACATGGT GGGCGAGGAG GCCGGCGAGA TCATCCAGGG CATCGCCATT GCCGTACGGG CCGGGCTGAC CAAGGCACAG TTCGACCAGA CGGTGGGCAT
131 TCATCCCACC GGCGCCGAAG AATTCGTGAC CATGCGTACT CCGACACGCC GCTGACGACC TTCGGGCAAT CCTGTACCGG CGATGTCATT CGGACGGGCC ACCCTCGAGG TGGCCCGTTG CGTTATGCGT
261 ATGGCCCGAA TGAATGTGGA CTAAACTGGG TCTGTGCGAA CGTCTGCAT TCGATGCCTT TTCGTACAAG ACCTGCCGGG GGACATCAGC CGGTACGAGC GCCGGTGGTC GATGTCGCAA GAATGGGGAG
391 AGCCGCTACA TACCGGCCCT GGGGAGTGGG CTATAATTTT CTATTATGGA ATTCAGCAAG CAAGATAACC TGGTTTTTGA AATGACCATA AGCGGCTGTT ATGATGCCGA TCAAAATTCGC TACAGCGAAC
      -35  $\sigma^{38}$  osmo      -10  $\sigma^{38}$  osmo      +1      -35  $\sigma^{70}$       gearbox -10  $\sigma^{70}$       +1      RBS
521 CACGACAATG AACGCAACCA CAGAGCCCTT TACACCCTCC GCCGACCTGG CCAAGCCCGAG CGTGGCCGAT GCCGTGGTGC GCCATGAGGC CTCACCGCTC TTCATCCGCA AGCCAAGCCC CGATGACGGC
651 TGGGGCATCT ACGAGCTGGT CAAGTCCTGT CCGCCTCTCG ACGTCAATTC CGCTACGCC TATCTGTTCG TGGCCACCCA GTTCCGCGAT AGCTGCGCCG TGGCGACCAA CGAAGAGGGC GAGATCGTCG
781 GCTTCGTTTC CGGCTACGTG AAGAGCAACG CCCCCGATAC CTATTTCTC TGGCAGGTTG CCGTGGGCGA GAAGGCACGT GGCACCGGCC TGGCCCGTCG TCTGGTGGAA GCCGTGATGA CACGCCCGGA
      ectA
911 AATGGCCGAG GTCCACCATC TCGAGACCAC TATCACGCC CACAACCAGG CGTCTGGGG CTTGTTCGCG CGTCTCGCCG ATCGCTGGCA GGCGCCGTTG AACAGCCCGG AATACTTCTC CACCGATCAA
1041 CTGCGCGGTG AGCATGACCC GAAAACCCTC GTTCGCATCG GCCGTTCCA GACCGACCAG ATCTGAGCCG GGACCGCCG TGGCCGGCCC GGTACGGGCC GGCAACCCGT CTTTTCGTTT TATCACTTTC
      -35  $\sigma^{32}$       -10  $\sigma^{32}$ 
1171 CCCCCACAGG AGGTCGCAAT GTCAGTGCAG ACATCGTCCA ACCGACCGCT GCCACAAGCG AACCTGCATA TCGCCACGGA GACACCCGAG GCCGACAGCC GGATCCGTAG CGCGCCGCGT CCGGGGCAGG
      RBS
1301 ATCCCTATCC GACCCGACTG AGCGAGCCCG TGGATCTTCC CTGGCTCAAT CGCCGCGAGC CGGTGGTCAA GGGAGAGGAG GCCGATGGGC CGCTCTCGGC CGCGCAGCTC GATACCTTCG AGCGCCAGGG
1431 CTTCATCTTC GAGCCGGACT TCCTGAAAAG CGAGGAACTC GAGGCGTTGC GCCACGAACT CAACGCCCTG CTGGCCCGGG ATGACTTCCG CGGACGAGAC TTCGCCATCA CCGAGCCGCA GGGCAACGAG
1561 ATCCGCTCGC TGTTGCGGCT GCACTACCTG TCGCGAGTCT TCAGCCGCTT GGCCAACGAC GAACGCCTGA TGGGTGCGCG CCGGCAGATT CTCGGCGGCG AGCCCTATGT CCATCAGTCG GCATCAACT
      ectD
1691 ACAAGCCCGG CTTGAGGGC AAGGGCTTCA ATTGGCATTG CGATTTTGAA ACCTGGCAGC CCGAGGATGG CATGCCCGCC ATGCATGCGG TGAGTGCCTC CATCGTGCTG ACCGACAACC ACACCTTCAA
1821 CGGGCCGCTG ATGCTGGTGC CCGGCTCACA CCGGGTATTC GTGCCGTGCC TGGGTGAAAC GCCGGAGGAT CATCACCGGC AGTCGCTCAA GACCCAGGAA TTCGGCGTGC CGAGCCGCCA GCGCCTGCGC
1951 GAGTTGATCG ACCGACATGG TATCGAAGCG CCCACCGGCG CGGCGGGTGG CCTGCTGCTG TTCGACTGCA ATACCCTGCA CGGCTCCAAC GCCAACATGT CGCCGGATCC GCGCAGCAAC GCCTTTTTTCG

```

2081 TCTACAACCG TCGTGACAAC CGCTGCGTCG AACCTTATGC GGCCTCCAAG CGCCGCCCGC GCTTCCTGGC CCACGAGCCG GATGAGGCGT GGTGCGCCGA TGGCTGATCG CCTGAGGTGC GCCATCGGGC
-24 σ^{54}

2211 CTGTCCATGG CAT CCTGTAT CGGTGCGCCG TGC GCGGCCG GCCAGTCATT GATTCACTGG AGAA TCGACA TGATCGTTGC CAATCTCGAA GAAGCGGCC AGACCGACCG TCTGGTCACC GCCGAAAACG
-12 σ^{54} RBS

2341 GCAACTGGGA CAGCACCCGC CTGTGCTGG CGAAGATGG TGGCAACTGC TCCTTCCACA TCACCCGCAT CTCGAGGGT ACCGAGACCC ACATCCACTA TAAGCATCAC TTCGAGGCTG TTTATTGCAT

2471 CGAAGGCGAG GCGAAGTGG AAACCTGGC CGATGGCAAG ATCTGGCCCA TCAAGCCGGG TGACATCTAC ATCCTCGACC AGCACGACGA GCACCTGCTG CGCGCCAGCA AGACCATGCA CCTGGCCTGC
ectC

2601 GTGTTACGC CGGGCCTGAC CGGCAACGAA GTGCACCGCG AAGACGGTTC CTACGCACCT GCCGACGAAG CCGACGACCA GAAGCCGCTG TAACCCGGCG CAGTATTCTG CCGTCTCGCA CGAAGAGCCC

2731 CCGGTCACGA TCGGGGCTC TTTCTGTTGTT CGCAGCGGCA CCGGTGCCAG TAGCTGGACG CCTCGGACGT TTCATGCCTA CTATTGCGTC ATGATTGATT CATCGTCCAG AAACCGTCAG CCCGTCGAGG

Abb. 50 DNA-Sequenz der *ectADC*-Region von *H. elongata* MaKu03 Δ *ectB::ectD* und *H. elongata* Δ *ectB::ectD*

Dargestellt ist die DNA-Sequenz von *H. elongata* MaKu03 Δ *ectB::ectD* bzw. *H. elongata* Δ *ectB::ectD* aus der Region von *ectA* (blau), *ectD* (rot) und *ectC* (grün) sowie den entsprechenden Promotorbereichen. Angegeben sind neben den *ectADC*-Gensequenzen Promotoren des σ^{38osmo} -, σ^{70} - und σ^{54} -Typs (Göller, 1999; Burdziak, 2006; Schwibbert *et al.*, 2010). Der Promotorbereich vor *ectA* wird in der vorliegenden Arbeit als *promA* zusammengefasst. Ein vor *ectB*-liegender Promotor des σ^{32} -Typs wurde in *C. salexigens* identifiziert und Witt (unveröffentlicht) zeigte, dass sich die identische Sequenz auch in *H. elongata* wiederfindet. +1: Transkriptionsstartpunkte; RBS: Ribosomenbindestellen.

pPromEct_ectD

```

1 CTAGATCATC CAGGGCATCG CCATTGCCGT ACGGGCCGGG CTGACCAAGG CACAGTTCGA CCAGACGGTG GGCATTATC CCACCGGCGC CGAAGAATTC GTGACCATGC GTACTCCGAC ACGCCGCTGA
131 CGACCTTCGG GCAATCCTGT CACGGCGATG TCATTCGGAC GGGCCACCCT CGAGGTGGCC CGTTGCGTTA TGCATATGGC CCGAATGAAT GTGGACTAAA CTGGGTCTGT GCGAACGTCC TGCATTGCAT
261 GCCTTTTCGT ACAAGACCTG CCGGGGGACA TCAGCCGGTA CGAGCGCCGG TGGTCGATGT CGCAAGAATG GGGAGAGCCG CTACATACGC GGCCTGGGGA GTGGGCTATA ATTTTCTATT ATGGAATTCA
-35  $\sigma^{38 \text{ osmo}}$  -10  $\sigma^{38 \text{ osmo}}$ 
391 GCAAGCAAGA TAACCTGGTT TTGAAATGA CCATAAGCGG CTGTTATGAT GCCGATCAA TTCGCTACAG CGAACCACGA ACATGGCAGT GCAGACATCG TCCAACCGAC CGCTGCCACA AGCGAACCTG
-35  $\sigma^{70}$  -10  $\sigma^{70}$  RBS Ala
521 CATATCGCCA CGGAGACACC CGAGGCCGAC AGCCGGATCC GTAGCGGCC GCGTCCGGGG CAGGATCCCT ATCCGACCCG ACTGAGCGAG CCGCTGGATC TTCCTGGCT CAATCGCCGC GAGCCGGTGG
651 TCAAGGGAGA GGAGGCCGAT GGGCCGCTCT CGGCCGCGCA GCTCGATACC TTCGAGCGCC AGGGCTTCAT CTTGAGCCG GACTTCCTGA AAGCGAGGA ACTCGAGGC TTGCGCCACG AACTCAACGC
781 CCTGCTGGCC CGGGATGACT TCCGCGGACG AGACTTCGCC ATCACCAGC CGCAGGGCAA CGAGATCCGC TCGTGTTCG CGGTGCACTA CCTGTCCGGA GTCTTCAGCC GCCTGGCCAA CGACGAACGC
911 CTGATGGGTC GCGCCCGCA GATTCTCGC GCGGAGCCCT ATGTCCATCA GTCGCGCATC AACTACAAGC CCGGCTTCGA GGGCAAGGGC TTCAATTGGC ATTCCGATTT TGAACCTGG CACGCCGAGG
ectD
1041 ATGGCATGCC CGCCATGCAT GCGGTGAGTG CGTCCATCGT GCTGACCAC AACCACACCT TCAACGGGCC GCTGATGCTG GTGCCCGGCT CACACCGGGT ATTCGTGCCG TGCCTGGGTG AAACGCCGGA
1171 GGATCATCAC CGGAGTCGC TCAAGACCCA GGAATTCGGC GTGCCGAGCC GCCAGGCGCT GCGCGAGTTG ATCACCAGC ATGGTATCGA AGCGCCACC GCGCGGCGG GTGGCCTGCT GCTGTTCGAC
1301 TGCAATACCC TGCACGGCTC CAACGCCAAC ATGTCGCCGG ATCCGCGCAG CAACGCCTTT TTCGTCTACA ACCGTCTGTA CAACCGCTGC GTCGAACCTT ATGCGGCCTC CAAGCGCCGC CCGCGCTTCC
1431 TGGCCACGA GCCGGATGAG GCGTGGTCGC CGGATGGCTG ACTCGGGGGT AGACTAACAA GTACGGCCCT TTCGCGCCT CCCTCTAACA AGGAGTCGAG TCGGACATGC GTTTCGTTC CCGTTTCACC

```

Abb. 51 DNA-Sequenz der *promA*-Promotorregion und des *ectD*-Gens auf dem Plasmid pPromEct_ectD

Dargestellt sind Auszüge der DNA-Sequenz des Plasmids pPromEct_ectD. Neben den Promotoren des $\sigma^{38\text{osmo}}$ - und σ^{70} -Typs (*promA*) ist das *ectD*-Gen (rot) abgebildet. Durch Klonierung mit dem Restriktionsenzym *NcoI* wurde die Sequenz TCA zu GCA verändert (lila). Daraus resultierte ein Aminosäurenaustausch der zweiten Aminosäure von EctD (Alanin anstatt Serin). RBS: Ribosomenbindestelle

***H. elongata* Δ ectB::ectD Δ promectD::promKB1**

```

1 GCTGGCAACC GCGGGCTGCG CTTTCATCTTC GAGCTGGAGC AGGGCGGTGA CGAGCTTCCC GAATATATCC AGTTCAGCGA CCACAGCATC TATCCGACCG ATGCCGATCA CTAGATCATC CAGGGCATCG

131 CCATTGCCGT ACGGGCCGGG CTGACCAAGG CACAGTTCAA CCAGACGGTG GGCATTCATC CCACCGGCGC CGAAGAATTC GTGACCATGC TACTCCGAC ACGCCGCTGA CGACCTTCGG GCAATCCTGT

261 CACGGCGATG TCACTCGGAC GGGCCACCCT CGAGGTGGCC CGTTGCGTTA TCGTATGGC CCGAATGAAT GTGGACTAAA CTGGGTCTGT GCGAACGTCC TGCATTCGAT GCCTTTTCGT ACAAGACCTG
                                promKB1

391 CCGGGGGACA TCAGCCGGTA CGAGCGCCGG TGGTCGATGT CGCAAGAATG GGGAGAGCCG CTACATACGC AGCCTGGGA GTGGGCTATA ATTTTCTATT ATGGAATCA GCAAGCAAGA TAACCTGGTT
                                -35  $\sigma^{38 \text{ osmo}}$  -10  $\sigma^{38 \text{ osmo}}$ 

521 TTGAAATGA CCATAAGCGG CTGTTATGAT GCCGATCAA TCGCTCACA GGAGGTCGAC ATGTCAGTGC AGACATCGTC CAACCGACCG CTGCCACAAG CGAACCTGCA TATCGCCAGG GAGACACCCG
-35  $\sigma^{70}$  -10  $\sigma^{70}$  RBS

651 AGGCCGACAG CCGGATCCGT AGCGCGCCGC GTCCGGGGCA GGATCCCTAT CCGACCCGAC TGAGCGAGCC GCTGGATCTT CCTGGCTCA ATCGCCCGGA GCCGGTGGTC AAGGGAGAGG AGGCCGATGG

781 GCCGCTCTCG GCCGCGCAGC TCGATACCTT CGAGCGCCAG GGCTTCATCT TCGAGCCGGA CTTCTGAAA GGCAGGAAC TCGAGGCGTT GCGCCACGAA CTCAACGCC TGTGGCCCGG GGATGACTTC

911 CGCGGACGAG ACTTCGCCAT CACCGAGCCG CAGGGCAACG AGATCCGCTC GCTGTTGCGG GTGCACTACC TGTGCGGAGT CTTAGCCGC CTGGCCAACG ACGAACGCCT GATGGGTGCG GCCCGCAGA

1041 TTCTCGGCGG CGAGCCCTAT GTCCATCAGT CGCGCATCAA CTACAAGCCC GGCTTCGAGG GCAAGGGCTT CAATTGGCAT TCCGATTTTG AAACCTGGCA CGCCGAGGAT GGCATGCCCG CCATGCATGC
                                ectD

1171 GGTGAGTGGC TCCATCGTGC TGACCGACAA CCACACCTTC AACGGGCCGC TGATGTGGT GCCCGCTCA CACCGGTAT TGTGCGGTG CCTGGGTGAA ACGCCGGAGG ATCATCACCG GCAGTCGCTC

1301 AAGACCCAGG AATTCGGCGT GCCGAGCCGC CAGGCGCTGC GCGAGTTGAT CGACCGACAT GGTATCGAAG CGCCACCCG CGCGCGGGT GCCTGCTGC TGTTCGACTG CAATACCTG CACGGCTCCA

1431 ACGCCAACAT GTCGCCGAT CCGCGCAGCA ACGCCTTTTT CGTCTACAAC CGTCGTGACA ACCGCTGCGT CGAACCTTAT GCGGCCTCCA AGCGCCGCC GCGCTTCTG GCCACGAGC CGGATGAGGC

1561 GTGGTCGCCG GATGGCTGAC TCGGGGGTAG ACTAACAAGT ACGGCCCTTT TCGGGCCTCC CTCTAACAAG GAGTCGAGTC GGACATGCGT TTCGTTCCCG GTTTCACCGA TGGCCGGCAG TTCCGGAGC
-35  $\sigma^{70}$  -10  $\sigma^{70}$  Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Gen

```

Abb. 52 DNA-Sequenz der *promKB1-ectD* Region von *H. elongata* Δ ectB::ectD Δ promectD::promKB1

Dargestellt ist die DNA-Sequenz von *H. elongata* Δ ectB::ectD Δ promectD::promKB1 aus der Region von *promKB1* (blau) und *ectD* (rot). Weiterhin angegeben sind die in *promKB1* vorhandenen Promotoren des $\sigma^{38\text{osmo}}$ - und σ^{70} -Typs des *ectA*-Promotors (*promA*) sowie die natürlicherweise zu *ectB*-gehörige Ribosomenbindestelle (RBS). Durch Konstruktion der Mutante *H. elongata* KB1 (Δ ectA; Gramman, 2000) entstand der Promotorbereich *promKB1*, der in der vorliegenden Mutante gegen den σ^5 -abhängigen *ectD*-Promotor ausgetauscht wurde (vgl. Abschnitt III. 3). Drei Basenaustausche in *promKB1* wurden bereits von Gramman (2000) beschrieben und sind schwarz hervorgehoben. In der *ectD*-Deletionsmutante MaKu03 entfiel der vorausgesagte σ^{70} -abhängige Promotor vor dem Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Gen (vgl. Abschnitt IV. 4.1)