

Nebenreaktionen der Ectoin-Synthase aus
Halomonas elongata DSM 2581^T und Entwicklung
eines salzinduzierten Expressionssystems

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Elisabeth Witt

aus

Siegburg

Bonn, im Dezember 2011

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

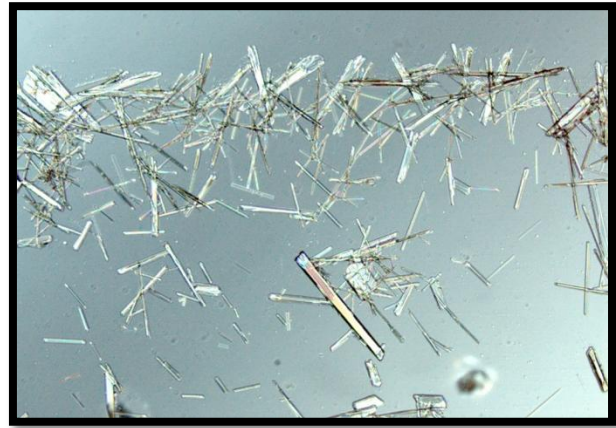
1. Gutachter: Prof. Dr. Erwin A. Galinski

2. Gutachterin: apl. Prof. Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 28.02.2012

Erscheinungsjahr: 2012

Nadelförmige Kristalle der
N γ -Acetyl-diaminobuttersäure
(ADABA)

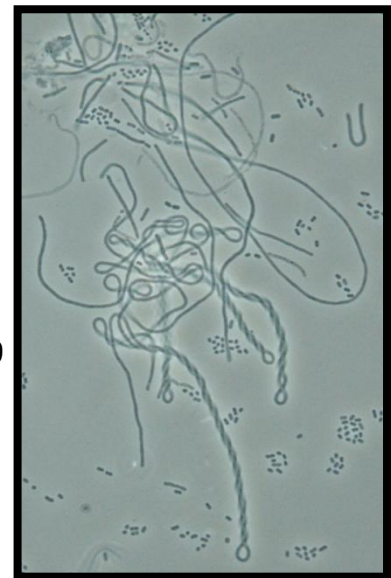
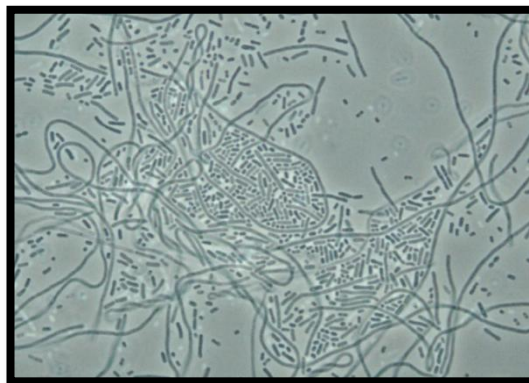


*Salz ist unter allen Edelsteinen, die uns die Erde schenkt, der
Kostbarste.*

Justus von Liebig (1803-1873)

*Richte daher deinen Sinn auf das Salz und beschäftige
dich nicht mit anderen Dingen.*

Rosarium Philosophorum, 1550



H. elongata, mikroskopiert
in der stationären Phase,
demonstriert
eindrucksvoll den
namensgebenden
Pleomorphismus

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen von Tagungs- und Zeitschriftenbeiträgen publiziert.

Poster

Witt E, Stein M, Kurz M, Galinski EA (2005) A substitute compatible solute of the ectoine deletion mutant *Halomonas elongata* KB1. VAAM-Jahrestagung Göttingen; EXP025

Witt E, Ures A, Stein M, Galinski EA (2007) Production and purification of N- γ -acetyl-L-2,4-diaminobutyric acid, the precursor of the compatible solute ectoine. VAAM-Jahrestagung Osnabrück; PB056

Stein M, Ures A, Witt E, Schwarz T, Galinski EA (2008) Whole-cell biocatalysis for the stereospecific hydroxylation of cyclic compatible solutes. VAAM-Jahrestagung Frankfurt; PC20

Witt E, Galinski EA (2010) Ectoine-Synthase: Substrate Spectrum and Reversibility. VAAM-Jahrestagung Hannover; BTP44

Korsten A, Witt E, Galinski EA (2010) Isolation and characterization of the unusual compatible solute NAGGN. VAAM-Jahrestagung Hannover; BTP43

Witt E, Grün A, Kurz M, Galinski EA (2011) Engineered salt-induced ectoine promoter for use in *H. elongata* as halophilic expression system. VAAM-Jahrestagung Karlsruhe, GWP029 (ausgezeichnet mit dem Poster-Preis)

Vorträge

Witt E, Stein M, Galinski EA (2007) Ectoine-synthase: action and side reaction. Halophiles Essex, Colchester, UK; O42

Witt EMHJ, Galinski EA (2010) Unexpected property of ectoine-synthase and its application for the production of the novel compatible solute ADPC. Halophiles Beijing, China; O31

Witt E, Galinski EA (2010) Improvement of salt-induced ectoine promoter for heterologous expression in *H. elongata*. Osmomeeting, Marburg

Zeitschriftenartikel

Witt EMHJ, Davies NW, Galinski EA (2011) Unexpected property of ectoine synthase and its application for synthesis of the engineered compatible solute ADPC. *Appl Microbiol Biotechnol* 91 (1): 113-122

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VIII
Verzeichnis der Abkürzungen und Trivialnamen	XI
I Einleitung.....	1
1 Extremophile Organismen.....	1
2 Halophile Mikroorganismen	2
2.1 Lebensräume und Problematik der hyperosmolaren Lebensräume	3
2.2 Strategie der Anpassung halophiler Organismen	4
2.2.1 „Salt-in-cytoplasm“-Strategie	4
2.2.2 „Compatible-solute“-Strategie	5
3 Kompatible Solute	6
3.1 Wirkweise	7
3.2 Stabilisierung von Biomolekülen.....	8
3.3 Solute in der Industrie.....	9
3.3.1 Produktion	9
3.3.2 Anwendungen.....	9
3.4 Neue Solute / Derivate bekannter Solute	10
4 <i>Halomonas elongata</i>	11
4.1 Ectoinbiosynthese in <i>H. elongata</i>	12
4.1.1 Die Entdeckung des ADPC.....	14
5 Ziel der Arbeit	15
II Material und Methoden.....	17
1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	17
2 Nährmedien	19
2.1 Medien für Flüssigkultur und Stammhaltung	19
2.2 Medien für die Hochzelldichte-Fermentation.....	20
2.3 Medien für Molekularbiologie und Proteinbiochemie	21
2.4 Medienzusätze und Supplementierungen	22
2.4.1 Antibiotika.....	22
2.4.2 Supplemente.....	23
2.5 Agarplatten.....	23
3 Puffer und Lösungen.....	23
3.1 Puffer und Lösungen für die Analytik.....	23

Inhaltsverzeichnis

3.2	Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	24
3.3	Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie	24
4	Kultivierungsverfahren	26
4.1	Stammhaltung von Bakterien.....	26
4.2	Bakterienanzucht.....	26
4.2.1	Schüttelkolben	26
4.2.2	Mikrotiterplatte	26
4.2.3	Fermenter	27
4.2.3.1	Fermentation im 5 L-Maßstab	27
4.2.3.2	Fermentation in 15 L-Fed-Batch-Verfahren.....	28
4.3	Verfolgung des Zellwachstums.....	29
4.4	Ernte	29
5	Analytik	29
5.1	Gefriertrocknung	29
5.2	Isokratische HPLC	29
5.2.1	Probenaufbereitung.....	30
5.2.2	HPLC-Messung	31
5.3	FMOC-ADAM-HPLC.....	31
5.3.1	Probenaufbereitung.....	32
5.3.2	FMOC-ADAM-HPLC-Messung	32
5.4	¹³ C-NMR.....	33
5.4.1	Probenaufbereitung.....	34
5.4.2	NMR-Messung.....	34
5.5	Glucose-Test	34
5.6	Citrat-Test.....	35
5.7	Mikroskopie.....	35
6	Gewinnung von Soluten.....	35
6.1	Extraktionsverfahren.....	35
6.1.1	Melken	35
6.1.2	Extraktion mit Methanol.....	36
6.1.3	Extraktion mit Ethanol	36
6.2	Reinigung aus Zellextrakten („Downstream Processing“)	37
6.2.1	Rotationsverdampfer	37
6.2.2	Chloroform-Behandlung	37
6.2.3	Chromatographische Aufreinigung.....	37
6.2.3.1	Anionenaustausch-Chromatographie.....	37

Inhaltsverzeichnis

6.2.3.2	Ionenverzögerungs-Chromatographie	38
6.3	Derivatisierung durch Hydroxylierung	39
6.4	Chemische Synthese von N-Carbamoyl-DABA.....	39
7	Charakterisierung von Soluten	40
7.1	Supplementierungsversuche.....	40
7.2	Trocknungsversuche.....	40
7.3	LDH-Assay.....	41
7.3.1	Gefrierzyklen.....	41
8	Molekularbiologische Methoden	42
8.1	Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von DNA	42
8.1.1	Isolierung von genomischer DNA.....	42
8.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA	43
8.1.3	Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	43
8.1.4	Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen	43
8.1.5	Quantifizierung von DNA	44
8.2	Enzymatische Modifikation von DNA.....	44
8.2.1	Restriktionsverdau	44
8.2.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	44
8.2.3	Ligation.....	45
8.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
8.3.1	Standard-PCR	46
8.3.2	Kolonie-PCR (<i>In situ</i> -PCR).....	46
8.3.3	Verwendete Primer.....	47
8.4	Agarosegelelektrophorese	48
8.5	Transformation von <i>E. coli</i>	49
8.5.1	Herstellung superkompetenter Zellen.....	49
8.5.2	Transformation superkompetenter Zellen	50
8.6	Konjugation	50
8.7	Herstellung chromosomaler Mutationen in <i>H. elongata</i>	51
8.8	Sequenzierung von DNA.....	52
9	Proteinbiochemische Methoden	52
9.1	Verwendete Expressionssysteme	52
9.2	Expressionskultur	53
9.3	Zellaufschluss	54
9.4	Gewinnung, Reinigung und Quantifizierung von Protein	54
9.4.1	Affinitäts-Chromatographie.....	54

Inhaltsverzeichnis

9.4.1.1	Chromatographie mit His-tag	54
9.4.1.2	Chromatographie mit <i>Strep</i> [®] -tag	55
9.4.2	Native Reinigung ohne Fusions-tag	55
9.4.2.1	Ammoniumsulfat-Fällung	55
9.4.2.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	56
9.4.3	Dialyse	56
9.4.4	Aufkonzentrieren von Proteinen	57
9.4.5	Gesamtzellprotein-Isolierung.....	57
9.4.6	TCA-Fällung	57
9.4.7	BCA-Assay zu Quantifizierung	58
9.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
9.5.1	Probenvorbereitung.....	59
9.5.2	Gelelektrophorese	60
9.5.3	Coomassie-Färbung.....	60
9.5.4	Gel-Trocknung.....	61
9.6	Strukturanalyse von Proteinen.....	61
9.6.1	Uniforme Markierung mit ¹⁵ N.....	61
9.6.2	NMR-Messung und Kristallisation.....	61
9.7	Gelfiltration (FPLC)	61
9.8	Aktivitäts-Assay für EctC.....	63
9.8.1	Photometrisch (Egler 2004, modifiziert).....	63
9.8.2	Mittels HPLC.....	63
10	Software und Internet-basierte Computeranalyse	64
11	Verwendete Chemikalien	64
III	Ergebnisse.....	69
1	Genomische Deletion von <i>ectC</i>	69
1.1	Charakterisierung von <i>H. elongata</i> WUB01	70
1.2	Charakterisierung von <i>H. elongata</i> WUB02	72
2	Produktion des natürlichen Substrats für EctC: ADABA	73
2.1	ADABA	73
2.1.1	ADABA-Produktion mit <i>H. elongata</i> WUB01	74
2.1.2	Extraktionsverfahren.....	75
2.1.3	Downstream-Processing	77
3	Chemische Synthese eines potentiellen alternativen Substrats: N-Carbamoyl-DABA	78
4	Heterologe Expression des Enzyms EctC in <i>E. coli</i>	81
4.1	Konstruktion der Expressionsvektoren	81

Inhaltsverzeichnis

4.1.1	pET-Vektoren	81
4.1.1.1	Fusion mit His-tag	81
4.1.1.2	Native Expression ohne Fusions-tag	83
4.1.2	Fusion mit <i>Strep</i> -tag	85
4.2	Expression	87
4.2.1	Mit dem pET-System	87
4.2.1.1	Proteinproduktion	87
4.2.1.2	ADPC-Produktion als Funktionalitätsnachweis	87
4.2.2	Mit dem pASK-IBA-Vektor	88
4.2.2.1	Proteinproduktion	88
4.3	Proteinreinigung	89
4.3.1	His ₆ -tag	89
4.3.2	<i>Strep</i> -tag	90
4.3.3	Ammoniumsulfat-Fällung und HIC	91
4.4	Strukturanalyse	93
4.4.1	FPLC	93
4.4.2	NMR	94
4.4.3	Kristallisation	94
5	<i>In vitro</i> -Versuche mit EctC aus <i>H. elongata</i>	95
5.1	Einfluss von Salinität und pH-Wert	95
5.2	Einfluss des His-tags	98
5.3	Einfluss des C-Terminus	98
5.4	Substratspektrum	100
5.4.1	Kondensationsreaktionen	100
5.4.1.1	Glutamin	101
5.4.1.2	weitere potentielle Substrate	102
5.4.2	Hydrolytische Reaktionen	102
5.4.2.1	ADPC	104
5.4.2.2	DHMICA	104
5.4.2.3	Homoectoin	106
5.4.2.4	Weitere potentielle Substrate für hydrolytische Reaktionen	108
6	Der Vektor pWUB	109
6.1	Gesamtzellprotein von <i>H. elongata</i> WT, KB1, SAA4 und WUB02	109
6.2	Konstruktion des Vektors pWUB	110
6.3	Homologe Proteinexpression in <i>H. elongata</i>	113
6.3.1	Konstruktion der Vektoren pWUB_ectC_Hel und pPromEct_ectC_Hel	113

Inhaltsverzeichnis

6.3.1.1	Vergleich der Expressionsniveaus von pPromEct und pWUB.....	114
6.3.1.2	ADPC-Produktion	115
6.3.2	Konstruktion des Vektors pWUB_ectD_Hel.....	116
6.3.2.1	Hydroxyectoin-Produktion im Schüttelkolben	117
6.3.2.2	Hydroxyectoinproduktion im Fermenter.....	119
6.4	Heterologe Proteinexpression in <i>H. elongata</i>	123
6.4.1	Konstruktion des Vektors pWUB_His	124
6.4.2	Konstruktion des Vektors pWUB_ectC_Psyr_His.....	125
6.4.2.1	Expression und Proteinreinigung.....	126
7	ADPC	128
7.1	Produktion.....	128
7.1.1	Verschiedene Produktionsstämme	128
7.1.2	Wachstumsphasenabhängigkeit	129
7.2	Downstream-Processing.....	131
7.3	Charakterisierung der Substanz	132
7.3.1	Supplementierungsversuche	132
7.3.2	LDH-Assay.....	133
7.3.3	Trocknungsversuche	134
7.4	Hydroxylierung von ADPC	135
IV	Diskussion.....	138
1	Ectoin-Synthase	138
1.1	Genomische Deletion des Gens <i>ectC</i> (WUB01 & WUB02).....	138
1.1.1	ADABA-Produktion.....	141
1.2	Die Ectoin-Synthase <i>in vitro</i>	142
1.2.1	Bioinformatische Datenbank-Recherche.....	142
1.2.1.1	Cupine	146
1.2.2	Expression	148
1.2.3	Reinigung.....	149
1.2.4	Strukturaufklärung.....	151
1.2.5	Charakterisierung.....	152
1.2.5.1	Auswirkung des C-Terminus	154
1.2.6	Substratspektrum.....	155
2	Veränderte Proteinexpression in <i>H. elongata</i> KB1.....	157
3	ADPC	161
3.1	Biosynthese in verschiedenen Stämmen	161
3.1.1	Wachstumsphasenabhängigkeit.....	162

Inhaltsverzeichnis

3.2	Produktion und Reinigung.....	164
3.3	Charakterisierung des ADPC als kompatibles Solut	166
3.3.1	Supplementierung unter Salzstress	166
3.3.2	Stabilisierung von Makromolekülen	167
3.3.3	Schutz ganzer Zellen unter Trockenstress	168
3.4	Hydroxylierung des ADPC.....	169
3.5	ADPC und verwandte Strukturen in der Literatur.....	170
4	Halomonas als Expressionssystem	172
4.1	Der Vektor pWUB.....	174
4.1.1	Homologe Expression in H. elongata mit pWUB	176
4.1.1.1	EctC-Expression.....	176
4.1.1.2	EctD-Expression	176
4.1.2	Heterologe Expression in H. elongata mit pWUB	179
V	Ausblick.....	181
VI	Zusammenfassung.....	184
	Literaturverzeichnis	186

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1: Auswahl einiger kompatibler Solute.	7
Abbildung 2: Chemische Derivate des Ectoins.	11
Abbildung 3: Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Biosynthese in <i>H. elongata</i>	13
Abbildung 4: ADPC-Biosynthese	15
Abbildung 5: Nachweis der genomischen <i>ectC</i> -Deletion mittels Kolonie-PCR	70
Abbildung 6: Salz-abhängige ADABA-Produktion in <i>H. elongata</i> WUB01	71
Abbildung 7: Formen der N-Acetyl-diaminobuttersäure.	73
Abbildung 8: Produktivität der ADABA-Produktion mit <i>H. elongata</i> WUB01	74
Abbildung 9: ¹³ C- NMR der gereinigten ADABA	78
Abbildung 10: Synthese der N-C-DABA	79
Abbildung 11: ¹³ C-NMR der N-Carbamoyl-DABA-Synthese im Alkalischen	80
Abbildung 12: Konstruktion des Vektors pET-22b_ectC_Hel_His	82
Abbildung 13: Konstruktion des Vektors pET-22b_ectC_Hel	84
Abbildung 14: Konstruktion des Vektors pASK-IBA5_ectC_Hel.....	86
Abbildung 15: Expression mit <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel_His	87
Abbildung 16: Expression mit <i>E. coli</i> DH5α pASK-IBA5_ectC_Hel	88
Abbildung 17: Ni-NTA-Reinigung des Enzyms EctC-10_Hel_His.....	89
Abbildung 18: <i>Strep</i> -tag-Reinigung des Enzyms EctC_Strep	90
Abbildung 19: HIC-Reinigung des nativen Enzyms EctC_Hel	92
Abbildung 20: Kalibrierung des FPLC-Systems	93
Abbildung 21: Kristalle des Proteins EctC-10_Hel	95
Abbildung 22: Charakterisierung von EctC_Hel.....	96
Abbildung 23: Vergleich des Einflusses von NaCl und KCl auf die EctC_Hel-Aktivität	97
Abbildung 24: Auswirkung des C-terminalen His ₆ -tag auf die Aktivität der Ectoin-Synthase.....	98
Abbildung 25: Einfluss des C-Terminus auf die Aktivität der Ectoin-Synthase.....	99
Abbildung 26: Einfluss des His ₆ -tags auf die Aktivität der verkürzten EctC-Variante EctC-10 ...	100
Abbildung 27: Substrate, deren Kondensation durch EctC gezeigt wurde	101
Abbildung 28: Reaktion der Ectoin-Synthase mit Glutamin als Substrat	101
Abbildung 29: Potentielle Substrate, deren Kondensation durch EctC nicht nachgewiesen wurde	103
Abbildung 30: Nachgewiesene Hydrolyse-Reaktionen der Ectoin-Synthase	103
Abbildung 31: Reaktion der Ectoin-Synthase mit den Substraten ADPC und Glutamin	104
Abbildung 32: Reaktion der Ectoin-Synthase mit DHMICA als Substrat	105
Abbildung 33: UV-Spektrum der HPLC-Analyse des EctC-katalysierten DHMICA-Umsatzes	105
Abbildung 34: Reaktion der Ectoin-Synthase mit Homoectoin als Substrat	106
Abbildung 35: UV-Spektrum der HPLC-Analyse des EctC-katalysierten Homoectoin-Umsatzes.....	107
Abbildung 36: Lineweaver-Burk-Plot der EctC-katalysierten Homoectoin-Hydrolyse.....	107
Abbildung 37: Weitere Substrate für potentielle hydrolytische Reaktionen der Ectoin-Synthase	108
Abbildung 38: Vergleich des Gesamtzellproteins verschiedener <i>H. elongata</i> -Stämme	110
Abbildung 39: Konstruktion des Vektors pWUB.....	111
Abbildung 40: Vergleich der Promotorbereiche PromA und PromKB1	112
Abbildung 41: Konstruktion des Vektors pWUB_ectC_Hel	114

Abbildungen und Tabellen

Abbildung 42: Vergleich der homologen, vektorbasierten EctC-Expression in <i>H. elongata</i> WUB01	115
Abbildung 43: Konstruktion des Vektors pWUB_ectD_Hel.....	116
Abbildung 44: Hydroxyectoin-Produktion in <i>H. elongata</i> durch Vektor-basierte EctD-Expression	117
Abbildung 45: <i>H. elongata</i> pWUB_ectD_Hel bei variabler NaCl-Konzentration.....	118
Abbildung 46: <i>H. elongata</i> pWUB_ectD_Hel bei variabler Temperatur	119
Abbildung 47: Fermentationen des Stammes <i>H. elongata</i> pWUB_ectD_Hel im 15 L-Maßstab	120
Abbildung 48: Citrat-Glucose-Metabolismus in einer Batch-Fermentation von <i>H. elongata</i> pWUB_ectD_Hel in GC-10/Cm50-Medium (Fermentation b).....	121
Abbildung 49: Relative Solutezusammensetzung des Stammes <i>H. elongata</i> pWUB_ectD_Hel über den Fermentationszeitraum.	123
Abbildung 50: Konstruktion des Vektors pWUB_His.....	124
Abbildung 51: Konstruktion des Vektors pWUB_ectC_Psyr_His.....	126
Abbildung 52: SDS-PAGE-Analyse der Expression und Reinigung des Proteins EctC_Psyr_His ..	127
Abbildung 53: Verlauf der ADPC-Produktion in <i>H. elongata</i> KB1.....	130
Abbildung 54: Fermentation des Stammes <i>H. elongata</i> WUB02 pWUB_ectC_Hel	131
Abbildung 55: Supplementierungsversuch	133
Abbildung 56: Vergleich der Schutzstoffe ADPC und Hydroxyectoin in einem LDH-Assay.....	134
Abbildung 57: Auswertung des Gefriertrocknungsversuchs	135
Abbildung 58: ADPC-Hydroxylierung mittels <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pETectDcyt.....	136
Abbildung 59: ¹³ C-NMR-Spektrum des OH-ADPC.....	137
Abbildung 60: Alignment verschiedener Ectoin-Synthasen	143
Abbildung 61: Verteilung saurer und basischer Aminosäuren in der EctC-Sequenz	144
Abbildung 62: Azidität verschiedener Ectoin-Synthasen	145
Abbildung 63: Sequenz-Alignment verschiedener Cupine (Dunwell <i>et al.</i> 2001)	147
Abbildung 64: Struktur eines bekannten Cupins (aus Dunwell <i>et al.</i> 2001).....	148
Abbildung 65: C-Termini der versch. EctC-Formen	154
Abbildung 66: Transkriptions- und Translations-bestimmende Elemente des Ectoingenclusters in <i>H. elongata</i>	158
Abbildung 67: Promotorelemente der Vektoren pPromEct und pWUB	160
Abbildung 68: ADPC-Derivate aus der Literatur	171
Abbildung 69: Vergleich der Vektoren pPromEct und pWUB mittels GFP _{UV} als Reportergen....	175
Abbildung 70: DNA-Sequenz der ectC-Deletion in <i>H. elongata</i> WUB01	195
Abbildung 71: DNA-Sequenz des Vektors pET-22b_ectC_Hel_His	199
Abbildung 72: DNA-Sequenz des Vektors pET-22b_ectC_Hel	196
Abbildung 73: DNA-Sequenz des Vektors pASK-IBA5_ectC_Hel	197
Abbildung 74: DNA-Sequenz des Vektors pWUB	198
Abbildung 75: DNA-Sequenz des Vektors pWUB_ectC_Hel (vgl. III.6.3.1).....	199
Abbildung 76: DNA-Sequenz des Vektors pWUB_ectD_Hel (vgl. III.6.3.2)	200
Abbildung 77: DNA-Sequenz des Vektors pWUB_His	201
Abbildung 78: DNA-Sequenz des Vektors pWUB_ectC_Psyr_His	202

Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Organismen	17
Tabelle 2: Verwendete Plasmide	17
Tabelle 3: Lösungsmittelgradient für die FMOC-ADAM-HPLC	33
Tabelle 4: Verwendete Primer	47
Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele	60
Tabelle 6: Gel Filtration Calibration Kit LMW	62
Tabelle 7: Eigenschaften der mit einem His ₆ -tag versehenen Expressionsprodukte.....	83
Tabelle 8: Eigenschaften der Expressionsprodukte ohne Fusions-tag	85
Tabelle 9: Eigenschaften des Proteins EctC_Strep..	86
Tabelle 10: Eigenschaften von EctC_Psy_His	125
Tabelle 11: Vergleich verschiedener ADPC-Produzenten.....	128
Tabelle 12: Solutgehalte verschiedener <i>H. elongata</i> -Stämme.....	140

Verzeichnis der Abkürzungen und Trivialnamen

% (v/v)	prozentualer Volumenanteil
% (w/v)	prozentualer Massenanteil pro Volumeneinheit
°C	Grad Celsius
μ	Wachstumsrate
μg	Einheit: Mikrogramm
μL	Einheit: Mikroliter
μM	Einheit: Mikromolar
AB	Antibiotic Broth Nr. 3 (Medium)
Abb.	Abbildung
AcN	Acetonitril
ADABA	N-Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure, γ-Form wenn nicht anders erwähnt
ADAM	1-Aminoadamantan
ADPC	5-Amino-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-carboxylsäure
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-Dicarbonsäure
Betain	Glycinbetain
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BRENDA	<i>BRAunschweig ENzyme DAtabase</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin)
Carb	Carbenicillin
Carb. Anhydr.	<i>Carbonic Anhydrase</i>
CHR63	<i>Chromohalobacter salexigens ectC::Tn1732</i>
cm	Einheit: Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DCE	siehe Decarboxy-Ectoin
Decarboxy-Ectoin	1,4,5,6-Tetrahydro-2-methylpyrimidin
Demethyl-Ectoin	1,4,5,6-Tetrahydro-pyrimidin-4-carbonsäure
DHMICA	4,5-Dihydro-2-methylimidazol-4-carbonsäure
DME	siehe Demethyl-Ectoin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
<i>ectA</i>	Gen der L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase
EctA	L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase
<i>ectB</i>	Gen der L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase
EctB	L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase
<i>ectC</i>	Gen der Ectoin-Synthase
EctC	Ectoin-Synthase

Abkürzungsverzeichnis

EctC_Hel	Ectoin-Synthase aus <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T
EctC_Hel_His	EctC aus <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T mit C-terminalem His ₆ -tag
EctC_Psyr_His	Ectoin-Synthase aus <i>Pseudomonas syringae</i> , mit C-terminalem His ₆ -tag
EctC_Strep	EctC aus <i>H. elongata</i> , mit N-terminalem Strep-tag
EctC-10_Hel	EctC aus <i>H. elongata</i> , C-terminal um 10 AS verkürzt
EctC-10_Hel_His	EctC aus <i>H. elongata</i> , C-terminal um 10 AS verkürzt, mit C-terminalem His ₆ -tag
EctC-8_Hel	EctC aus <i>H. elongata</i> , C-terminal um 8 AS verkürzt
EctC-9_Hel	EctC aus <i>H. elongata</i> , C-terminal um 9 AS verkürzt
<i>ectD</i>	Gen der Ectoin-Hydroxylase
EctD	Ectoin-Hydroxylase
Ectoin	(S)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
exc. / em.	excitation / emission (Anregung / Emission)
Fast-AP	Alkalische Phosphatase
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Einheit: Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC	Glucose-Citrat (Medium)
GFP _{UV}	grün fluoreszierendes Protein, modifizierte Variante
h	Einheit: Stunde(n)
H ₂ O _{demin}	demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
HABA	2-[4'-hydroxy-benzeneazo]benzoic acid
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>
Homoectoin	4,5,6,7-Tetrahydro-2-methyl-1H-[1,3]diazepin-4-carbonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hydroxy-ADPC (OH-ADPC)	5-Amino-3-hydroxy-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-carboxylsäure
Hydroxyectoin (OH-Ectoin)	(S-S)-2-Methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
KAc	Kalium-Acetat
kb	Einheit: Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Einheit: Kilodalton
Km	Kanamycin
K _m	Michaelis-Konstante
KOCN	Kaliumcyanat
L	Einheit: Liter
LB	Luria-Bertani (-Medium)
LBG	Luria-Bertani-Medium mit Glucose
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Lsg.	Lösung
M	Einheit: Molar
mAU	<i>milli absorption unit</i>
mbar	Einheit: Millibar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MeOH	Methanol

Abkürzungsverzeichnis

mg	Einheit: Milligramm
min	Einheit: Minute
mL	Einheit: Milliliter
mm	Einheit: Millimeter
mM	Einheit: Millimolar
MM63	Minimal Medium 63
MPa	Einheit: Megapascal
NaCl	Natriumchlorid
Na-TMSP	Natrium-Trimethylsilylpropionat
N-Carbamoyl-DABA / N-C-DABA	N-Carbamoyl-Diaminobuttersäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Einheit: Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OH-	Hydroxy-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure
pmol	Einheit: Picomol
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pPE	pPromEct
ppm	<i>parts per million</i>
pPromEct (pPE)	Bezeichnung eines Plasmids, das die Promotorregion <i>promA</i> der Ectoin-Gene aus <i>H. elongata</i> trägt (Brünig 2005)
<i>promA</i>	Promotorregion der Ectoin-Gene in <i>H. elongata</i> (vor <i>ectA</i>)
<i>promKB1</i>	Promotorregion vor <i>ectB</i> in <i>H. elongata</i> KB1 (Δ <i>ectA</i>), entspricht einem modifizierten <i>promA</i> mit optimierter Ribosomenbindestelle
Psyr	<i>Pseudomonas syringae</i>
pWUB	Bezeichnung eines Plasmids, das die Promotorregion <i>promKB1</i> trägt
RBS	Ribosomenbindestelle
RI	<i>refractive index</i> (Brechungsindex)
RNaseA	Ribonuklease A
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSB	reduzierender Probenpuffer
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Einheit: Sekunde(n)
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOE	<i>Splicing by Overlap Extension</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Abkürzungsverzeichnis

TG	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur
TMSP	Trimethylsilylpropionat
T _{opt}	Optimale Wachstumstemperatur
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit (Parameter der Michaelis-Menten-Kinetik)
WT	Wildtyp
WUB01	<i>Halomonas elongata</i> $\Delta ectC$
WUB02	<i>Halomonas elongata</i> $\Delta ectA, \Delta ectC$
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
α -ADABA	N α -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure
γ -ADABA	N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure

I Einleitung

1 Extremophile Organismen

„*Everything is everywhere, but, the environment selects*“. Diese als Bass-Becking-Hypothese bekannt gewordene Aussage des niederländischen Botanikers Lourens G. M. Baas Becking (1895-1963) inspiriert noch heute insbesondere Mikrobiologen weltweit. Die erste Hälfte dieses Satzes („*Alles is overal...*“) geht laut Bass Becking auf die Arbeit des niederländischen Mikrobiologen Martinus W. Beijerinck zurück und wurde von Bass Becking um die wichtige zweite Hälfte (*...maar het milieu selecteert.*) ergänzt. Kernaussage ist die geographische Verteilung insbesondere von Mikroorganismen auf der Erde in Abhängigkeit von dem vorherrschenden Selektionsdruck im entsprechenden Lebensraum (de Wit und Bouvier 2006; Quispel 1998).

Tatsächlich bietet der Planet Erde einige Habitate, deren Besiedlung hohe Ansprüche an den Metabolismus eines Organismus stellt, und in denen sich aufgrund dieses Selektionsdrucks nur Spezialisten ansiedeln können. Aus menschlicher Sicht gibt es im Allgemeinen Einigkeit darüber, wie die „normale“ Umwelt für Lebewesen gestaltet ist: Temperaturen zwischen 4 °C und 40 °C, ein pH-Wert von 5,0 - 8,5 und eine Salinität, die sich innerhalb der Grenzen von Süßwasser und Meerwasser befindet (Kristjánsson und Hreggvidsson 1995). Jedoch trifft man häufig auf Standorte, deren abiotische Faktoren sich deutlich jenseits dieser Norm bewegen. Darunter fallen beispielsweise das ewige Eis der arktischen Regionen, heiße Quellen wie im Yellowstone National Park, die Tiefsee mit den dort herrschenden hohen Drücken, Solfataren und ihre sauren Böden, Karbonatquellen mit entsprechend hohen pH-Werten sowie Salzseen, um nur einige zu nennen. Neben diesen natürlichen Habitaten wurden durch den Menschen weitere Lebensräume geschaffen, die spezielle Anpassungsstrategien erfordern, wie z. B. Salzgewinnungsanlagen, Erzlaugungshalden oder auch Heizungsanlagen.

Während die ersten Funde mikrobiellen Lebens in diesen extremen Habitaten einer wissenschaftlichen Sensation gleichkamen, ist die Erforschung dieser speziellen Organismen heute ein großer Teilbereich der Mikrobiologie, und in Hinblick auf ihre Lebensräume werden diese Mikroorganismen als **Extremophile** bezeichnet. Je mehr Extremophile identifiziert wurden, desto sinnvoller erschien eine Einteilung in verschiedene Gruppen. So unterscheidet man heute eine Vielzahl Extremophiler anhand ihrer Wachstumsbedingungen, wobei meist der

I Einleitung

abiotische Faktor ausschlaggebend ist, der sich am weitesten von den Normbedingungen entfernt.

Angesichts des Faktors „Temperatur“ grenzt man von den mesophilen Organismen ($T_{\text{opt}} \approx 37\text{ °C}$) die **Psychrophilen** ($T_{\text{opt}} \leq 15\text{ °C}$) sowie die **Thermophilen** ($T_{\text{opt}} > 50\text{ °C}$) ab. Mit der Entdeckung der **Hyperthermophilen** ($T_{\text{opt}} > 80\text{ °C}$) wurde die Temperaturgrenze für mikrobielles Leben sogar noch weiter nach oben korrigiert (Morozkina *et al.* 2010). Ein weiterer abiotischer Faktor mit großer Bedeutung für biologische Prozesse ist der pH-Wert der Umgebung, hier kennt man neben den neutrophilen Organismen (Optimum pH 6 - 8) die **Acidophilen** (Optimum pH < 2) sowie die **Alkaliphilen** (Optimum pH > 9) (Morozkina *et al.* 2010). Organismen der Tiefsee müssen an hohe Drücke angepasst sein, so kennt man **Piezophile**, auch als Barophile bezeichnet, die Drücke von 100-200 MPa für ihr Wachstum benötigen (Abe und Horikoshi 2001; Kato und Bartlett 1997).

Als Baas Becking seine Hypothese „*Everything is everywhere, but, the environment selects.*“ formulierte, beschäftigte sich seine Forschung mit Salzseen, den Habitaten einer weiteren Gruppe Extremophiler: den **Halophilen**. Diesen Organismen soll im Weiteren ein eigenes Kapitel gewidmet werden. Bevor jedoch die halophilen, also salzliebenden, Organismen im Detail vorgestellt werden, sollte erwähnt werden, dass die oben vorgestellte klare Unterteilung der Extremophilen natürlich nicht ausreicht, um den komplexen Selektionsdruck der Natur widerzuspiegeln. Kürzlich wurde der Begriff der Extremophilen um den der **Poly-Extremophilen** erweitert, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass viele Lebensräume eine Kombination extremer abiotischer Faktoren bieten (Bowers *et al.* 2009). So enthält die Gruppe der Poly-Extremophilen einige Organismen, die gleichzeitig als alkaliphil, thermophil und halophil bezeichnet werden müssen.

2 Halophile Mikroorganismen

Der Begriff „halophil“ leitet sich aus dem Griechischen ab und steht für „Salz liebend“. Er bezeichnet Organismen, die in Umgebungen hoher Salzkonzentration wachsen, also in einer Umgebung, die ohne spezielle Anpassung als lebensfeindlich gelten muss.

In Abhängigkeit von der Salzkonzentration, unter der optimales Wachstum zu beobachten ist, werden verschiedene Gruppen Halophiler unterschieden: Leicht Halophile, wie marine Bakterien, haben ihr Optimum im Bereich 0,2 - 0,5 M NaCl, moderat Halophile im Bereich 0,5 - 2,5 M NaCl und extrem Halophile wachsen noch bis in den Sättigungsbereich (2,5 - 5,2 M

NaCl). Aber auch unter den nicht halophilen Organismen, die ihr optimales Wachstum bei unter 0,2 M NaCl zeigen, finden sich Vertreter, die zwar kein Salz benötigen, aber dennoch höhere Konzentrationen tolerieren können. Diese Organismen werden als halotolerant bezeichnet (Kushner 1985).

2.1 Lebensräume und Problematik der hyperosmolaren Lebensräume

Bereits Meerwasser mit einem Salzgehalt von vergleichbar niedrigen 3,5 % (w/v) stellt ein Habitat mit erhöhter Osmolarität dar, und bedenkt man, dass rund 70 % der Erdoberfläche von Salzwasser bedeckt sind, wird deutlich, wie allgegenwärtig Lebensräume für Halophile anzutreffen sind.

Die bekanntesten Biotope für Halophile sind sicherlich der „Great Salt Lake“ im Norden Utahs der USA mit bis zu 33,3 % Salzgehalt, und das Tote Meer mit bis zu 34 % Salzgehalt (Oren 2006a; Gilmour 1990; Grant 1991). Solche hochsalinen Habitate entstehen meistens, wenn die Verdunstungsrate die Frischwasserzufuhr durch Regen oder Flußeinspeisung übersteigt. Nach demselben Prinzip schafft der Mensch weitere künstliche Habitate, beispielsweise durch die Anlage von Salinen zur Salzgewinnung oder durch die Verwendung von Salz zur Konservierung von Lebensmitteln.

Die Beispiele „Great Salt Lake“ und Totes Meer zeigen deutlich, dass hypersaline Habitate sich stark in ihrer Zusammensetzung unterscheiden können. Während der „Great Salt Lake“ einen leicht alkalischen pH aufweist (pH 7,7) und eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration mit einer höheren Mg^{2+} -Konzentration kombiniert, liegt der pH-Wert des Toten Meeres leicht im Sauren (pH 5,9 - 6,3) und die Konzentrationen von Ca^{2+} und Mg^{2+} liegen hier mit 0,4 M und 1,8 M beide sehr hoch (Grant 1991; Oren 1988). So werden die Eigenschaften eines hypersalinen Habitats zwar in erster Linie über den Salzgehalt definiert, der meist mit der NaCl-Konzentration gleichgesetzt wird, da NaCl normalerweise den Hauptanteil des Salzes ausmacht. Nicht vergessen werden sollte allerdings, dass auch die Ionenzusammensetzung eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung eines Habitats spielt.

Doch vor welche Probleme stellt ein hypersalines Habitat einen Mikroorganismus? Kernproblem ist die hohe Ionenstärke der Umgebung, die gleichzeitig eine niedrige Wasseraktivität mit sich bringt. Die Lipidmembran, von der Bakterien umgeben sind, ist für Ionen impermeabel und die Transportprozesse über die Membran, an denen Ionen beteiligt sind, sind streng reguliert. Somit ist eine Kontrolle der intrazellulären Ionenkonzentrationen

I Einleitung

auch in halophilen Mikroorganismen gewährleistet (van de Vossenberg *et al.* 1999; Oren 2006b). Für Wasser jedoch ist die Zellmembran permeabel (Bovell *et al.* 1963), weshalb eine bakterielle Zelle in hyperosmotischer Umgebung nach dem naturwissenschaftlichen Gesetz der Osmose Gefahr läuft, Wasser zu verlieren. Eine solche Dehydratation, die von bakteriellen Zellen nicht durch aktiven Wassertransport ausgeglichen werden kann, würde zum einen den gesamten Zellmetabolismus zum Erliegen bringen, zum anderen aber auch den zum Wachstum benötigten Zellturgor beeinträchtigen (Brown 1990; Roeßler und Müller 2001).

Für die bakterielle Zelle besteht somit die Notwendigkeit, das intrazelluläre Milieu zumindest isoosmotisch zur Umgebung zu halten, wenn nicht sogar hyperosmotisch, um den Turgor aufrecht zu erhalten (Oren 2006b). Um dies zu erreichen haben sich bei halophilen und halotoleranten Organismen zwei sehr unterschiedliche Strategien entwickelt, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden sollen.

2.2 Anpassungsstrategien halophiler Organismen

2.2.1 „Salt-in-cytoplasm“-Strategie

Eine in der Natur realisierte Möglichkeit, den durch die hohe Ionenkonzentration der Umgebung ausgelösten osmotischen Stress auszugleichen, stellt die Akkumulation anorganischer Ionen im Cytoplasma der Zelle dar. Hierdurch kann das Zellmilieu isoosmotisch bis leicht hyperosmotisch zur Umgebung gehalten werden. Diese als „salt-in-cytoplasm“-Strategie oder einfach nur „salt-in“-Strategie bezeichnete Anpassung findet sich bei aeroben Archaea der Gruppe Halobacteriales sowie bei anaeroben Bacteria der Gruppe Haloanaerobiales (Oren 2006b). Mit *Salinibacter ruber* wurde erstmals ein obligat aerober extrem halophiler Vertreter der Bacteria beschrieben, der diese Anpassungsstrategie nutzt (Oren und Mana 2002).

In den meisten bekannten Fällen findet sich K^+ als dominantes akkumuliertes Kation, als Gegenion dient das Anion Cl^- . Diese anorganischen Ionen können im Cytoplasma molare Konzentrationen erreichen. Aus diesem Grund bedarf es weitreichender Anpassungen der zellulären Enzyme, um den Metabolismus aufrecht zu erhalten.

So konnte bislang gezeigt werden, dass Proteine der Halobacteriales typischerweise einen hohen Gehalt an sauren Aminosäuren aufweisen und nur wenige basische und hydrophobe

I Einleitung

Aminosäuren enthalten (Dennis und Shimmin 1997; Lanyi 1974; Oren und Mana 2002). Proteine mit diesen Charakteristika werden auch als halophile Proteine bezeichnet. Die negative Ladung erhöht die Löslichkeit und Flexibilität dieser Proteine unter Hochsalzbedingungen, die bei nicht-halophilen Proteinen Aggregation auslösen würden (Mevarech *et al.* 2000). Zudem können Salzbrücken zwischen sauren Aminosäureresten und strategisch platzierten basischen Resten die Proteinstruktur stabilisieren (Dennis und Shimmin 1997). Jedoch machen diese Anpassungen halophiler Proteine eine kontinuierlich hohe Ionenkonzentration erforderlich, denn in einer Umgebung mit niedriger Ionenstärke tendieren halophile Proteine aufgrund der hohen Ladungsdichte und Abstoßungsreaktionen zum Denaturieren (Dennis und Shimmin 1997).

Aufgrund der erforderlichen Anpassung des zellulären Apparates ist die „*salt-in*“-Strategie somit sehr unflexibel gegenüber schwankenden Salinitäten des Außenmediums, da für das Aufrechterhalten des Zellmetabolismus eine kontinuierlich hoch bleibende Ionenkonzentration benötigt wird.

2.2.2 „Compatible-solute“-Strategie

Im Gegensatz zu der oben genannten „*salt-in-cytoplasm*“-Strategie verhindert die „*compatible-solute*“-Strategie hohe cytoplasmatische Salzkonzentrationen und hält die Ionenkonzentration im Gegenteil sogar durch aktiven Transport aus der Zelle niedrig (Oren 2006a). Das osmotische Gleichgewicht wird stattdessen durch die Akkumulation sogenannter „kompatibler Solute“ erreicht. Hierbei handelt es sich um organische Moleküle, meist niedrigen Molekulargewichts, die sich durch hohe Wasserlöslichkeit auszeichnen und auch in molaren Konzentrationen den Zellmetabolismus nicht negativ beeinträchtigen. Die Akkumulation in den Zellen erfolgt entweder durch *de novo*-Synthese oder durch Aufnahme aus dem umgebenden Medium (Kempf und Bremer 1998).

Die „*compatible-solute*“-Strategie ist weiter verbreitet als die oben genannte „*salt-in*“-Strategie, man findet sie bei den meisten halophilen und halotoleranten Bacteria und auch bei halophilen methanogenen Archaea sowie halophilen eukaryotischen Mikroorganismen (Oren 2006a). Es handelt sich auch um die weitaus flexiblere Strategie, denn aufgrund der Kompatibilität der organischen Solute mit dem Zellmetabolismus und der mit dieser Strategie erreichten niedrigen intrazellulären Ionenkonzentration kann eine hohe Salztoleranz ohne schwerwiegende Eingriffe in den enzymatischen Apparat der Zelle erreicht werden. Somit ist Bakterien, die osmotischen

I Einleitung

Stress durch kompatible Solute ausgleichen, das Wachstum über ein breiteres Salinitätsspektrum möglich, denn die intrazelluläre Konzentration der organischen Solute kann flexibel dem im Medium vorherrschenden osmotischen Druck angepasst werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Konzentration kompatibler Solute in Abhängigkeit von der äußeren Salinität des Mediums reguliert wird (Galinski und Louis 1999). Bei einer Veränderung der Mediensalinität können die Zellen schnell durch Neusynthese oder Aufnahme von Soluten aus dem Medium (im Falle eines *upshocks*) oder aber auch durch Abbau oder Freisetzung der Solute (im Falle eines *downshocks*) reagieren (Trüper und Galinski 1990).

3 Kompatible Solute

Organische kompatible Solute finden sich in den verschiedensten Stoffgruppen, meist handelt es sich allerdings um Derivate von Aminosäuren (z. B. Glycinbetain, Ectoine oder N ϵ -Acetyl- β -lysin) oder Zucker bzw. Zuckeralkohole (z. B. Trehalose, Glycerin). Aber auch einige underivatisierte Aminosäuren, wie z. B. Prolin oder Glutamin, können als Solut genutzt werden. Desweiteren konnten Trimethylammonium- und Dimethylsulfonium-Verbindungen nachgewiesen werden, und die Liste der bekannten Substanzen wird mit voranschreitender Forschung an halophilen Organismen länger (Galinski 1993, 1995; Galinski und Trüper 1994; Reed 1986; Trüper *et al.* 1991; Ventosa *et al.* 1998; Wohlfarth *et al.* 1990; Tiadó-Margarit *et al.* 2011). Hinzu kommt, dass viele Prokaryoten einen regelrechten „Cocktail“ verschiedener kompatibler Solute enthalten (Galinski 1995). So heterogen die Gruppe der kompatiblen Solute allerdings auch ist, so weisen ihre Vertreter doch einige grundlegende Gemeinsamkeiten auf. Es handelt sich um polare, hoch wasserlösliche Moleküle, die bei einem pH im physiologischen Bereich meist ungeladen oder zwitterionisch vorliegen (Oren 2006a).

Eine kleine Auswahl bekannter kompatibler Solute ist in Abbildung 1 dargestellt.

I Einleitung

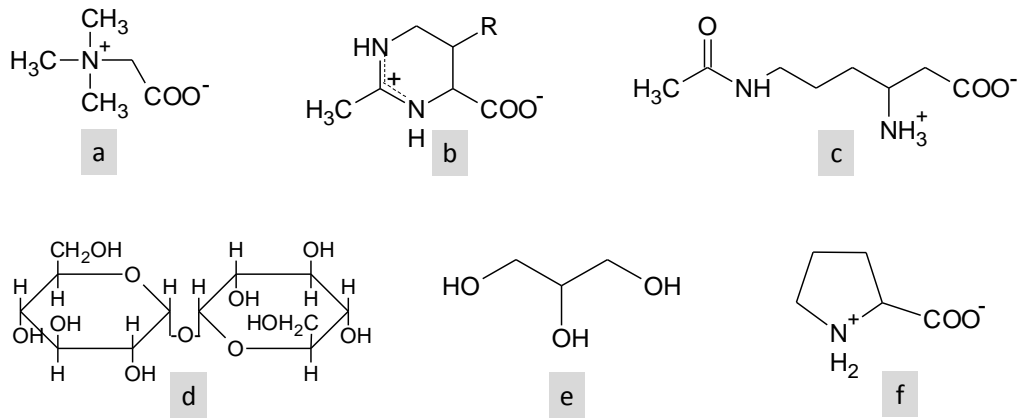


Abbildung 1: Auswahl einiger kompatibler Solute. a: Glycinebetain, b: Ectoin (R = H) bzw. Hydroxyectoin (R = OH), c: Nε-Acetyl-β-lysin, d: Trehalose, e: Glycerin, f: Prolin

Das Vorkommen der verschiedenen Solute kann auf bestimmte Gruppen beschränkt sein, wie im Falle des Glycerins, das aufgrund der hohen Permeabilität der bakteriellen Zellmembran in der Regel nur von Eukaryoten (*Dunaliella*, Hefen) als Solut genutzt wird (Ben-Amotz und Avron 1973, 1983; Brown 1990; Oren 2006b). Andere Substanzen, wie insbesondere das Glycinebetain, aber auch Ectoin, finden sich nahezu ubiquitär in der Welt der Prokaryoten (Oren 2006b). Viele dieser Solute können von Mikroorganismen unter Salzstress genutzt werden, selbst wenn der Biosyntheseweg im Metabolismus nicht realisiert ist. Durch Aufnahme aus dem Medium über entsprechende Transportsysteme kann so auch nicht halophilen Bakterien (z. B. *E. coli*) eine gewisse Salztoleranz vermittelt werden (Jebbar *et al.* 1992; Kempf und Bremer 1998).

3.1 Wirkweise

Neben ihrer Funktion als intrazelluläre Osmolyte zum Erreichen der Homeostase werden kompatible Solute auch aufgrund ihrer protektiven Effekte auf Makromoleküle, wie z. B. Proteine, geschätzt (Paleg *et al.* 1981). Der biophysikalische Hintergrund dieser protektiven Effekte kompatibler Solute ist Gegenstand verschiedener Theorien, die sich hauptsächlich mit der Wirkung auf Proteine beschäftigen, und unter denen das „*preferential exclusion*“-Modell das bisher bekannteste sein dürfte (Arakawa und Timasheff 1983, 1985; Timasheff 2002). Nach diesem Modell wird die native Struktur eines Proteins in Anwesenheit kompatibler Solute stabilisiert, da diese von der Hydrathülle des Proteins ausgeschlossen werden und das Protein somit, um den Kontakt mit den Soluten zu minimieren, eine kompaktere Struktur einnimmt (Pastor *et al.* 2010). Weitergehende Modelle führen den „*osmophobic effect*“ ein, der das

Peptid-Rückgrat als ursächlich für die Stabilisierung von Proteinen durch Solute beschreibt (Liu und Bolen 1995; Qu *et al.* 1998; Wang und Bolen 1997).

3.2 Stabilisierung von Biomolekülen

Neben verschiedenen theoretischen Modellen der Effekte von kompatiblen Soluten auf Biomoleküle sind diese natürlich auch Gegenstand experimenteller Forschung.

So konnten z. B. Ectoine in verschiedenen Stress-Situationen, wie Gefrierstress, Hitzestress, Trockenstress oder Oxidationsstress, als wirksame Schutzstoffe für das Modellenzym Lactat-Dehydrogenase (LDH) identifiziert werden (Lippert und Galinski 1992; Barth *et al.* 2000; Borges *et al.* 2002; Göller und Galinski 1999; Andersson *et al.* 2000). Insbesondere Hydroxyectoin gilt zur Zeit als einer der besten Proteinstabilisatoren, die auf dem Markt erhältlich sind. Dessen stabilisierende Wirkung auf das Modellenzym RNaseA konnte mittels Kalorimetrie gezeigt werden (Knapp *et al.* 1999). Durch Fluoreszenzspektroskopie wurde zudem nachgewiesen, dass die Schutzwirkung von Ectoinen auf die LDH auf einer Stabilisierung der Proteinstruktur beruht (Göller und Galinski 1999).

Auch die Ectoinvorstufe ADABA hat eine protektive Wirkung auf die LDH, wenn diese Hitzestress ausgesetzt wird (Cánovas *et al.* 1999); dieses Ergebnis deckt sich mit Daten von Göller und Galinski (1999), die acetylierte Diaminosäuren als effektive Proteinstabilisatoren identifizierten.

Neben der Wirkung auf Proteine wurde auch eine Interaktion von kompatiblen Soluten mit Nukleinsäuren gezeigt. Während Salze wie NaCl die Schmelztemperatur von DNA erhöhen, ist von kompatiblen Soluten wie Betain, Prolin und Ectoinen bekannt, dass sie die Schmelztemperatur doppelsträngiger DNA zu senken vermögen (Lapidot *et al.* 1999; Kurz 2008). Über die Wirkung kompatibler Solute auf RNA ist bislang nicht viel publiziert, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Solute einen destabilisierenden Effekt auf RNA-Sekundärstrukturen haben, während Tertiärstrukturen in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen sowohl stabilisiert als auch destabilisiert werden können (Lambert und Draper 2007).

Kürzlich wurde berichtet, dass Ectoine auch einen Effekt auf biologische Lipidmembranen haben, bei denen sie durch Steigerung der Oberflächen-Hydratisierung die Mobilität der Lipid-

Kopfgruppen erhöhen und somit eine stärkere Fluidität der Membran hervorrufen (Harishchandra *et al.* 2010).

3.3 Solute in der Industrie

3.3.1 Produktion

Wie bereits erwähnt werden kompatible Solute in hoher Konzentration im Cytoplasma halophiler Mikroorganismen akkumuliert, bis zu 30 % des Zelltrockengewichts im Fall von *H. elongata* und Ectoin (Galinski und Louis 1999). Da die Kultivierung verschiedener halophiler Organismen heutzutage - auch aufgrund der fortgeschrittenen Fermentationstechnologie (Krahe *et al.* 1996) - geringe Probleme bereitet, wird die großtechnische Produktion in bakterieller Biomasse der chemischen Synthese vorgezogen.

Das bekannte kompatible Solut Ectoin wird derzeit im industriellen Maßstab mittels kontinuierlicher Fermentation des Organismus *H. elongata* produziert (Lentzen und Schwarz 2005) und mittels der *bacterial milking technique* über osmotische *downshocks* aus den Zellen gewonnen (Sauer und Galinski 1998).

Für die Produktion von Hydroxyectoin stehen derzeit zwei Produktionsorganismen zur Verfügung. *Marinococcus halophilus* M52 produziert das Solut zwar mit nur geringfügiger Verunreinigung durch Ectoin, dieser Organismus ist jedoch resistent gegenüber dem *bacterial milking* und benötigt zudem aufwändige Fermentationstechnik, da höhere Zelldichten nur in einem Dialysefermenter erreicht werden können (Frings *et al.* 1995; Schiraldi *et al.* 2006). Aus diesem Grund wird Hydroxyectoin bislang ebenfalls in *H. elongata* produziert. Von diesem Stamm wird Hydroxyectoin zwar nur in Kombination mit Ectoin produziert, was eine aufwändige Trennung der Produkte erforderlich macht. Der Vorteil dieses Stammes ist jedoch die bereits etablierte Hochzelldichtefermentation sowie die Produktgewinnung durch Bakterienmelken.

3.3.2 Anwendungen

Aus den beschriebenen protektiven Eigenschaften der kompatiblen Solute auf Makromoleküle leitet sich eine Vielzahl potentieller Anwendungen ab, von denen heutzutage aber erst wenige für die Industrie relevant sind. Hauptsächlich zu nennen wären hier Einsatzgebiete für Solute in der Molekularbiologie, z. B. als PCR-Enhancer (Schnoor *et al.* 2004), oder als Stabilisator während Proteinexpression und -lagerung (Barth *et al.* 2000; Bersch *et al.* 2000; Kolp *et al.*

2006). In der medizinischen Forschung gewinnen kompatible Solute ebenfalls an Bedeutung, wie z. B. im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen (Arora *et al.* 2004; Furusho *et al.* 2005; Kanapathipillai *et al.* 2005; Kanapathipillai *et al.* 2008) oder der Transplantationschirurgie (Wei *et al.* 2009).

Bereits Marktreife hat der Einsatz von Ectoin in der Kosmetikindustrie als Zusatzstoff gegen Hautalterung und UV-Schädigung der Haut (Bünger 1999; Bünger und Driller 2004; Pflücker *et al.* 2005; Heinrich *et al.* 2007; Botta *et al.* 2008; Graf *et al.* 2008).

3.4 Neue Solute / Derivate bekannter Solute

Angesichts des breiten Spektrums an potentiellen Anwendungen für verschiedene kompatible Solute besteht ein großes Interesse an neuen Wirkstoffen und deren Anwendbarkeit. Neben der Suche nach weiteren natürlich vorkommenden Soluten bietet die chemische Synthese von Substanzen, deren Struktur sich an bekannten Soluten orientiert, eine weitere Möglichkeit, das Spektrum an Substanzen zu erweitern. So wurden beispielsweise verschiedene Ectoin-Derivate synthetisiert und charakterisiert (Abbildung 2). Durch Vergrößerung des Ectoin-Ringes wurde Homoectoin (4,5,6,7-Tetrahydro-2-methyl-1H-[1,3]diazepin-4-carbonsäure) erhalten (Voß 2002), eine Substanz, die zwar keine ausgeprägten osmoprotektiven Eigenschaften zeigt, jedoch stabilisierend auf Proteine wirkt (Voß 2002) und als PCR-Additiv sehr positive Auswirkungen hat (Schnoor *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu führt die Verkleinerung des Ectoin-Ringes bei DHMICA (4,5-Dihydro-2-methylimidazol-4-carbonsäure) zu einer osmoprotektiven Substanz, die zudem stabilisierend auf Proteine wirkt und die Schmelztemperatur von DNA beeinflusst (Voß 2002). Nicht immer jedoch wird durch die Synthese einer Solute-ähnlichen Struktur auch tatsächlich ein Schutzstoff gewonnen. So zeigt das kationische Decarboxy-Ectoin (1,4,5,6-Tetrahydro-2-methylpyrimidin, DCE) einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* (Voß 2002), und Lauryl-Ectoin weist sogar toxische Effekte auf Prokaryoten auf (Wedeking 2005). Im Fall des Lauryl-Ectoin konnte zudem das eigentliche Ziel der Ectoin-Derivatisierung, nämlich die Insertion des mit dem Fettalkohol 1-Dodecanol veresterten Ectoins in zelluläre Plasmamembranen, nicht erreicht werden (Wei *et al.* 2009). Die Synthese von Guanidino-Ectoin führte zu einem „inkompatiblen“ Solut, das das Wachstum verschiedener Bakteriengruppen hemmt (Mann 2008; Sell 2009).

Neben der chemischen Synthese rückt die Nutzung von Enzymen zur Erstellung neuer Solute immer weiter in den Focus der Wissenschaft. So konnten kürzlich Nebenreaktionen von

I Einleitung

Enzymen der Ectoinbiosynthese gezeigt werden, die die Hoffnung auf neuartige Wirkstoffe unterstützen. Die Ectoin-Hydroxylase aus *H. elongata* zeigt ein breites Substratspektrum und hydroxyliert neben Ectoin auch z. B. Homoectoin, DHMICA und Prolin (Galinski *et al.* 2007; Vielgraf 2008), wodurch bislang unbeschriebene Substanzen entstehen, deren Charakterisierung noch aussteht. Auf eine kürzlich entdeckte Nebenreaktion eines weiteren Enzyms der Ectoinbiosynthese, der Ectoin-Synthase, soll nachfolgend näher eingegangen werden.

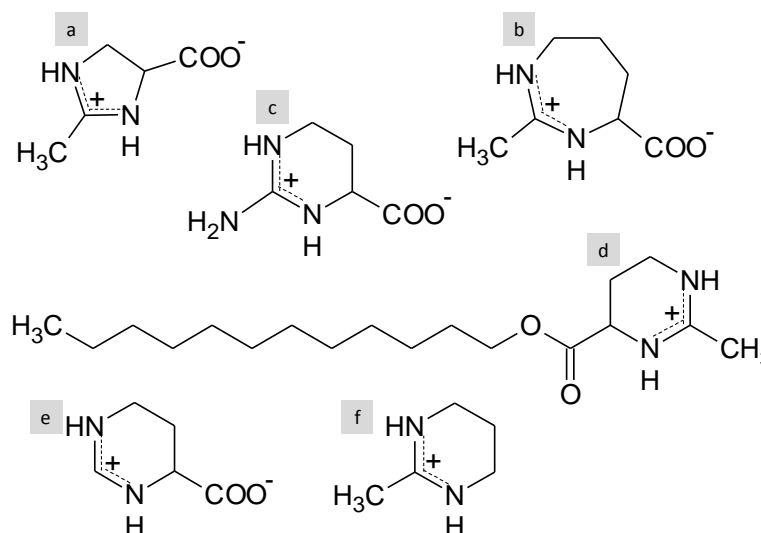


Abbildung 2: Chemische Derivate des Ectoins. a: DHMICA, b: Homoectoin, c: Guanidino-Ectoin, d: Lauryl-Ectoin, e: Demethyl-Ectoin (DME), f: Decarboxy-Ectoin (DCE)

4 *Halomonas elongata*

Halomonas elongata DSM 2581^T ist ein Gram-negatives γ -Proteobakterium aus der Familie der *Halomonadaceae* und Ordnung der Oceanospirillales, dessen Erstbeschreibung durch Vreeland im Jahr 1980 erfolgte. Isoliert wurde der Organismus aus einem Salzgewinnungsbecken (25 % NaCl) auf den niederländischen Antillen (Insel Bonaire) (Vreeland *et al.* 1980).

Die Familie der *Halomonadaceae* (Franzmann *et al.* 1988) setzt sich größtenteils aus halophilen oder zumindest halotoleranten Organismen zusammen, die aus Salzseen oder marinen Habitaten isoliert wurden. Jedoch sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass kürzlich auch potentiell pathogene Vertreter der *Halomonadaceae* identifiziert wurden. Der erste Bericht einer Wundinfektion nach einem Fischbiss nannte *Halomonas venusta* als Verursacher (von Graevenitz *et al.* 2000), sieben Jahre später wurde *H. phocaeensis* mit dem Ausbruch einer Bakteriämie auf einer Neugeborenenstation in Zusammenhang gebracht (Berger *et al.* 2007).

I Einleitung

Aktuell wurden drei neue *Halomonas*-Spezies, *H. stevensii*, *H. hamiltonii* und *H. johnsoniae*, aus dem Blut von Dialyse-Patienten sowie der Dialyse-Gerätschaft isoliert (Kim *et al.* 2010; Stevens *et al.* 2009). Für Aufsehen sorgten zuletzt auch der Stamm *H. titanicae* sp. nov., der aus Rostpartikeln des namensgebenden Dampfschiffs isoliert wurde und für den Verfall des Wracks mitverantwortlich gemacht wird (Sánchez-Porro *et al.* 2010) sowie der Stamm GFAJ-1, der ebenfalls der Familie der *Halomonadaceae* zugeordnet wird. Dieser Organismus steht derzeit im Focus der Wissenschaft, da in seiner DNA ein Austausch von Phosphor durch Arsen beschrieben wurde (Wolfe-Simon *et al.* 2010).

H. elongata DSM 2581^T gilt als nicht-pathogener Organismus. Das stäbchenförmige Bakterium zeigt in Abhängigkeit von der Wachstumsphase eine variable Morphologie, die von kurzen annähernd coccoiden Stäbchen bis zu langen fädigen Zellen reicht (Severin 1993; Dobson und Franzmann 1996; Ventosa *et al.* 1998; Arahal *et al.* 2002), wodurch der Artnamen „*elongata*“ zu erklären ist.

H. elongata wächst in Mineralsalzmedium über ein weites Salinitätsspektrum (~ 0,1 M - 4 M NaCl) (Vreeland *et al.* 1980; Ventosa 1994) mit einem Wachstumsoptimum nicht weit oberhalb der marinen Salzkonzentration (~ 3,5 %) und ist somit als moderat halophil einzustufen. Aufgrund des breiten Salzspektrums und der genetischen Zugänglichkeit (Kunte 1995; Kunte und Galinski 1995; Göller 1999) diente *H. elongata* in den letzten Jahren als Modellorganismus zur Untersuchung von Stressanpassungsmechanismen halophiler Organismen.

Die in *H. elongata* am besten untersuchte Anpassungsstrategie unter Salzstress ist wohl die Biosynthese des kompatiblen Soluts Ectoin. Dieses wird, zusammen mit Hydroxyectoin, zum Schutz vor osmotischem Stress in hypersaliner Umgebung akkumuliert.

4.1 Ectoinbiosynthese in *H. elongata*

Der Biosyntheseweg für Ectoin ist an verschiedenen Organismen gut untersucht, sowohl auf genetischer Ebene (Peters *et al.* 1990; Min-Yu *et al.* 1993; Louis und Galinski 1997; Göller *et al.* 1998; Göller 1999) wie auch auf Proteinebene (Tao *et al.* 1992; Ono *et al.* 1999; Egler 2004). Ausgehend von Aspartat- β -semialdehyd erfolgt die Synthese von Ectoin in drei enzymatisch katalysierten Reaktionen (siehe Abbildung 3). Erster Schritt ist die Bildung von L-2,4-Diaminobuttersäure durch eine Transaminase (EctB). Anschließend folgt die Acetylierung dieser

I Einleitung

Zwischenstufe zu N γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure (ADABA), katalysiert durch eine Acetyltransferase (EctA). Letzter Schritt ist eine intramolekulare Kondensationsreaktion von ADABA zu Ectoin durch die Ectoin-Synthase (EctC). Die biosynthetischen Gene *ectA*, *ectB* und *ectC* liegen in *H. elongata*, wie auch in vielen anderen Ectoin-Produzenten, in einem Cluster vor (siehe Abbildung 3).

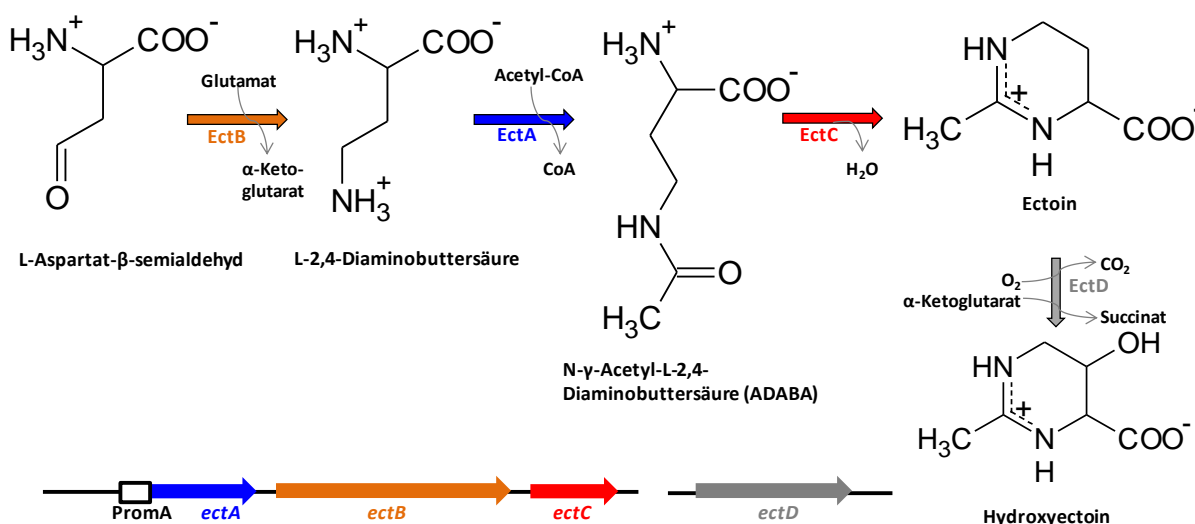


Abbildung 3: Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Biosynthese in *H. elongata*

Stromaufwärts von *ectA* wurde ein Promotorbereich identifiziert, der hohe Ähnlichkeit zu σ^{70} -abhängigen Promotoren aufweist und als *promA* bezeichnet wurde (Göller 1999). Kürzlich wurde ein weiterer Promotor des σ^{38} -Typs in der *promA*-Region identifiziert (Schwibbert *et al.* 2010). Der salzinduzierte Promotorbereich *promA* wurde in vorangegangenen Arbeiten zur Genexpression in *H. elongata* genutzt, sowohl für genomische Expression durch Austausch der *ect*-Gene gegen die zu exprimierenden Zielgene, als auch für Vektor-vermittelte Genexpression (Burdziak 2006; Meffert 2007; Lange 2009; Korsten 2011). Hierzu wurde der *promA*-Bereich in das „Broad-Host-Range“-Plasmid pBBR1-MCS kloniert und somit der für *Halomonas* geeignete Vektor pPromEct (pPE) konstruiert (Brünig 2005).

Außerhalb des Ectoinbiosyntheseclusters wurde in *H. elongata* eine Ectoin-Hydroxylase (EctD) identifiziert, die für die Hydroxyectoinbiosynthese ausgehend von Ectoin verantwortlich ist (Ures 2005). Dieses Enzym gehört zur Superfamilie der Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen Hydroxylasen und benötigt molekularen Sauerstoff für die Hydroxylierungsreaktion (Ures 2005; Vielgraf 2008; Bursy *et al.* 2007).

4.1.1 Die Entdeckung des ADPC

Die in *H. elongata* neu entdeckte Substanz ADPC (5-Amino-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-carboxylsäure, siehe Abbildung 4) wurde 2005 in der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) identifiziert und die Biosynthese aufgeklärt. Erstmals in einem halophilen Organismus nachgewiesen wurde diese neue Substanz in der Ectoin-Mangelmutante *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$) (Grammann 2000). Dieser Stamm zeigt durch die Deletion im Ectoinbiosyntheseweg eine stark reduzierte Salztoleranz mit einem Wachstum bei maximal 5 % NaCl. Durch Untersuchungen des Solutespektrums mittels isokratischer HPLC sowie FMOC-ADAM-HPLC (Gradienten-HPLC) konnten Glutamin und Glutamat sowie L-2,4-Diaminobuttersäure nachgewiesen werden (Mentrup 2004). Weiterhin wurde eine bislang unbekannte Substanz detektiert, die nachfolgend als ADPC identifiziert werden konnte (Witt 2005). Ein Vergleich verschiedener *H. elongata*-Stämme zeigte, dass eine deutliche ADPC-Produktion bislang nur in *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$) nachweisbar ist. Im Wildtyp konnten jedoch auch Spuren detektiert werden, während das völlige Fehlen der Ectoinbiosynthese-Gene in *H. elongata* KB10.1 ($\Delta ectABC$) die Fähigkeit zur ADPC-Produktion aufhob. Durch Untersuchungen zur ADPC-Produktion in *H. elongata* KB1 konnte eine deutliche Wachstumsphasenabhängigkeit nachgewiesen werden, geprägt durch einen starken Anstieg der Zell-assoziierten ADPC-Konzentration in der stationären Phase. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die akkumulierte ADPC-Menge mit steigender Salinität im Medium zunahm (Witt 2005).

Durch HPLC-analytische Verfahren konnte eine Korrelation zwischen dem Anstieg des Zell-assoziierten ADPC-Gehalts im Organismus und der Abnahme des Glutamin-Gehalts gezeigt werden, so dass Glutamin als potentielle Vorstufe für ADPC postuliert wurde. Mit Hilfe eines bereits entwickelten Expressionssystems (Kiss 2002; Egler 2004) wurde die Ectoin-Synthase aus *Marinococcus halophilus* als His-tag-Fusionsprotein überexprimiert und isoliert. So konnte die Beteiligung dieses für den letzten Schritt der Ectoinbiosynthese zuständigen Enzyms an der ADPC-Bildung aus Glutamin in einem *in vitro*-Assay nachgewiesen werden (Witt 2005). Demnach wird eine Einschritt-Reaktion postuliert, bei der die Ectoin-Synthase analog zur Ectoinsynthese eine Kondensationsreaktion katalysiert, bei der ein intramolekularer nukleophiler Angriff der α -Aminogruppe auf das Säureamid stattfindet, der letztlich zu einem Ringschluss führt (siehe Abbildung 4).

I Einleitung

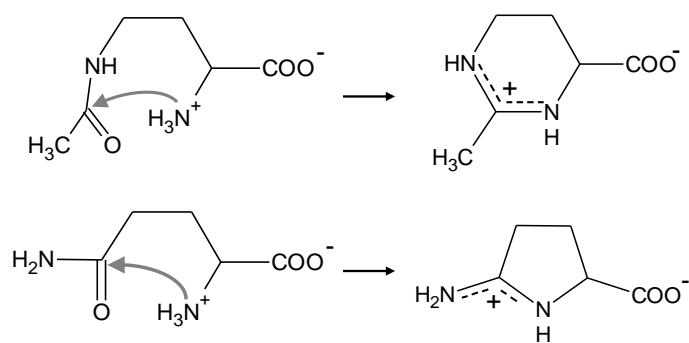


Abbildung 4: ADPC-Biosynthese (Witt 2005)

a: Synthese von Ectoin aus ADABA b: Synthese von ADPC aus Glutamin. Beide Reaktionen werden von der Ectoin-Synthase katalysiert.

5 Ziel der Arbeit

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) wurde eine Nebenreaktion der Ectoin-Synthase (EctC) entdeckt, die zur Bildung der Substanz ADPC aus Glutamin führt (vgl. Abbildung 4). Während die Substanz ADPC jedoch in einem *H. elongata*-Stamm produziert wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung der Ectoin-Synthase nur mit dem aus *M. halophilus* stammenden Enzym gezeigt werden. Aus diesem Grund sollte zunächst experimentell abgesichert werden, dass auch in *H. elongata* die Ectoin-Synthase das für die ADPC-Synthese verantwortliche Enzym ist. Durch genomische Deletion des entsprechenden Gens *ectC* wäre eine negative Beweisführung möglich, wenn durch die Deletion die Fähigkeit zur ADPC-Produktion aufgehoben würde.

Des Weiteren sollte ein heterologes Expressionssystem entwickelt werden, um die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* in aktiver Form zu produzieren und zu isolieren. Die Etablierung eines solchen Expressionssystems ist Voraussetzung für eine anschließende Charakterisierung des Enzyms. Durch *in vitro*-Untersuchungen an dem heterolog expremierten Enzym sollte eine weitergehende Charakterisierung der Ectoin-Synthase erfolgen, zum einen bezüglich der Struktur des Enzyms, zum anderen aber auch in Hinblick auf die Aktivität in Abhängigkeit vom umgebenden Milieu. Einen weiteren Schwerpunkt bei der geplanten Charakterisierung des Enzyms stellt das Substratspektrum dar, da aufgrund der Nebenreaktion mit Glutamin die Umsetzung weiterer Substrate erwartet wurde (Witt 2005).

Das für Enzym-Assays benötigte Substrat der Ectoin-Synthase, die N γ -Acetyl-L2,4-diaminobuttersäure (ADABA) ist kommerziell nicht erhältlich, so dass neben den

I Einleitung

proteinbiochemischen Arbeiten an EctC die Etablierung eines mikrobiellen Produktionssystems sowie eines geeigneten Aufbereitungsverfahrens für das Produkt als notwendig erachtet wurde.

Ausgehend von den Daten von Witt (2005) sollte weiterhin die ADPC-Produktion *in vivo* näher untersucht werden, einerseits als Grundlagenforschung, aber auch um Rahmenbedingungen für einen großtechnischen Produktionsprozess zu schaffen. Hierzu wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den bereits bekannten Produktionsorganismus *H. elongata* KB1 gelegt, ergänzend und zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden gentechnisch modifizierte Produktionsstämme mit der Möglichkeit zur homologen oder heterologen Expression der Ectoin-Synthase hinzugezogen.

Da die Substanz ADPC zuvor in halophilen Organismen nicht beschrieben wurde, und eine Funktion als kompatibles Solut aufgrund der Struktur und der salzabhängigen Akkumulation in *H. elongata* KB1 als möglich erachtet wurde, sollte die Charakterisierung dieses Moleküls ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit sein.

II Material und Methoden

1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 1: Verwendete Organismen

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T	Wildtyp	(Vreeland <i>et al.</i> 1980)
<i>H. elongata</i> KB1	$\Delta ectA$	(Grammann <i>et al.</i> 2002)
<i>H. elongata</i> SAA4	$ectA::Tn1732, Sm^R, Km^R$	(Göller <i>et al.</i> 1998)
<i>H. elongata</i> WUB01	$\Delta ectC$	diese Arbeit
<i>H. elongata</i> WUB02	$\Delta ectA, \Delta ectC$	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DSM 498	Wildtyp K12	(Migula 1895), Castellani & Chalmers 1919
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> /l(DE3)	(Studier und Moffatt 1986; Studier 1991)
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>supE44</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>gyrA96</i> , λ -, <i>thi-1</i> , $\Delta lacU169$ ($\phi 80lacZ\Delta M15$)	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> S17.1	RP4-2 (Tc ⁺ ::Mu) (Km ⁺ ::Tn7) chromosomal integriert; Sm ^R , <i>pro</i> , <i>thi</i> , <i>recA</i>	(Simon <i>et al.</i> 1983)

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pK18 <i>mobsacB</i> $\Delta ectC$	Km ^R , <i>mob</i> , <i>sacB</i> , ori pMB1, $\Delta ectC$ -Fragment aus <i>H. elongata</i>	(Witt 2005)
pBBR1-MCS	Broad-Host-Range-Vektor aus <i>Bordetella bronchiseptica</i> , Cm ^R	(Kovach <i>et al.</i> 1994; Kovach <i>et al.</i> 1995)
pPromEct	pBBR1-MCS mit dem Promotor des Ectoin-Genclusters (PromA) aus <i>H. elongata</i> , Cm ^R	(Brünig 2005)
pPromEct_ectC_Hel	pPromEct mit <i>ectC</i> aus <i>H. elongata</i> , Cm ^R	diese Arbeit

II Material und Methoden

pPromEct_ectD	pPromEct mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i> , Cm ^R	Meffert 2011
pWUB	pBBR1-MCS mit dem Promotor vor <i>ectB</i> aus <i>H. elongata</i> KB1 (PromKB1), Cm ^R	diese Arbeit
pWUB_ectC_Hel	pWUB mit <i>ectC</i> aus <i>H. elongata</i> , Cm ^R	diese Arbeit
pWUB_ectD_Hel	pWUB mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i> , Cm ^R	diese Arbeit
pWUB_His	pWUB mit His ₆ -Fragment, Cm ^R	diese Arbeit
pWUB_ectC_Psyr_His	pWUB mit <i>ectC</i> aus <i>P. syringae</i> in Fusion mit His ₆ -tag, Cm ^R	diese Arbeit
pET-22b(+)	Amp ^R , T7/ <i>lac</i> , pelB, His ₆ -tag	Novagen (Madison/ WI, USA)
pET-22b_ectC_Hel	pET-22b(+) mit <i>ectC</i> aus <i>H. elongata</i> , Amp ^R	diese Arbeit
pET-22b_ectC_Hel_His	pET-22b(+) mit <i>ectC</i> aus <i>H. elongata</i> in Fusion mit His ₆ -tag, Amp ^R	diese Arbeit
pET-22b_ectC-10_Hel	pET-22b(+) mit <i>ectC</i> (C-terminal um 10 AS verkürzt) aus <i>H. elongata</i> , Amp ^R	diese Arbeit
pET-22b_ectC-10_Hel_His	pET-22b(+) mit <i>ectC</i> (C-terminal um 10 AS verkürzt) aus <i>H. elongata</i> in Fusion mit His ₆ -tag, Amp ^R	diese Arbeit
pET-22b_ectC-9_Hel	pET-22b(+) mit <i>ectC</i> (C-terminal um 9 AS verkürzt) aus <i>H. elongata</i> , Amp ^R	diese Arbeit
pET-22b_ectC-8_Hel	pET-22b(+) mit <i>ectC</i> (C-terminal um 8 AS verkürzt) aus <i>H. elongata</i> , Amp ^R	diese Arbeit
pET-ectDcyt.	pET-22b(+) mit <i>ectD</i> aus <i>H. elongata</i> , Amp ^R	Ures, unveröffentlicht
pASK-IBA5	Amp ^R , <i>tet</i> , <i>Strep</i> [®] -tag (N-terminal)	IBA (Göttingen)
pASK-IBA5_ectC_Hel	pASK-IBA5 mit <i>ectC</i> aus <i>H. elongata</i> in Fusion mit <i>Strep</i> [®] -tag II (N-terminal), Amp ^R	diese Arbeit

2 Nährmedien

Alle im Folgenden aufgeführten Nährmedien wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ angesetzt.

Die verschiedenen Medien wurden je nach Bedarf mit unterschiedlich hohen NaCl-Konzentrationen hergestellt. Der prozentuale NaCl-Gehalt (w/v) wird im Folgenden der Medienbezeichnung als Zahl angehängt (z. B. MM63-3: MM63-Medium mit 3 % (w/v) NaCl).

2.1 Medien für Flüssigkultur und Stammhaltung

Mineralsalzmedium MM63 (L^{-1}) nach Miller (Larsen *et al.* 1987)

KH_2PO_4	13,61 g
KOH	4,21 g
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	1,98 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,0011 g
→ pH 7,1 (KOH / HCl)	
NaCl	variabel
Glucose* H_2O	5,00 g

Die Glucose wurde als Stammlösung (5,00 g/100 mL) getrennt autoklaviert und dem sterilen abgekühlten Medium zugegeben.

AB-Medium (Antibiotic Broth Medium No.3) (L^{-1})

Antibiotic Broth Medium	17,50 g
NaCl	variabel
→ pH 7,2 (bereits eingestellt)	

Bei der Zugabe von NaCl muss beachtet werden, dass dieses Fertigmedium bereits einen NaCl-Gehalt von 3,50 g/L aufweist.

II Material und Methoden

LB-Medium (Luria Bertani Medium) (L^{-1}) (Miller 1972)

Caseinhydrolysat (Trypton)	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	variabel

→ pH 7,2 (NaOH / HCl)

2.2 Medien für die Hochzelldichte-Fermentation

GC-Medium (Glucose-Citrat-Medium) (L^{-1})

NaCl	variabel
MgSO ₄ *7 H ₂ O	2,20 g
NH ₄ Cl	4,50 g
tri-Na-Citrat*2 H ₂ O	10,00 g
→ pH 7,5 (NaOH, HCl)	ad 700 ml
K ₂ HPO ₄	1,10 g
	in 100 mL getrennt autoklaviert
Glucose*H ₂ O	15,00 g
	in 200 mL getrennt autoklaviert
FeSO ₄ *7 H ₂ O	0,01 g
	Stammlösung sterilfiltriert

Für die Anzucht von Vorkulturen im Schüttelkolben ohne automatische pH-Regulierung enthielt dieses Medium zusätzlich zu den oben aufgeführten Komponenten Tris/HCl zur Pufferung (12 g/L).

Die nachfolgend aufgeführten Fed-Batch-Lösungen entsprechen grundsätzlich einem 10fach konzentrierten GC-Medium. Fed-Batch-Lösung 1 wurde bei den Fermentationen zur ADPC-Produktion mit *H. elongata* KB1 eingesetzt. Bei Fed-Batch-Lösung 2 wurde die Anzahl der C-Quellen auf eine (Glucose) reduziert, diese wurde dafür in erhöhter Menge eingesetzt. Diese Rezeptur wurde bei den Fermentationen von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel sowie *H. elongata* pWUB_ectD_Hel eingesetzt.

II Material und Methoden

Fed-Batch-Lösung 1 (L⁻¹)

NaCl	variabel
MgSO ₄ *7 H ₂ O	22,00 g
NH ₄ Cl	45,00 g
tri-Na-Citrat*2 H ₂ O	100,00 g
K ₂ HPO ₄	11,00 g
Glucose*H ₂ O	150,00 g

Fed-Batch-Lösung 2 (L⁻¹)

NaCl	variabel
MgSO ₄ *7 H ₂ O	22,00 g
NH ₄ Cl	45,00 g
K ₂ HPO ₄	11,00 g
Glucose*H ₂ O	200,00 g

2.3 Medien für Molekularbiologie und Proteinbiochemie

LBG-Medium (L⁻¹)

Caseinhydrolysat (Trypton)	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
Glucose*H ₂ O	2,00 g
NaCl	variabel

→ pH 7,5 (NaOH / HCl)

LBG-Saccharose-Medium (L⁻¹)

Caseinhydrolysat (Trypton)	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
Glucose*H ₂ O	2,00 g
NaCl	variabel
Saccharose	220,00 g

→ pH 7,5 (NaOH / HCl)

II Material und Methoden

SOB-Medium (L⁻¹) (Inoue *et al.* 1990)

Caseinhydrolysat (Trypton)	20,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	0,59 g
KCl	0,19 g
MgCl ₂ *6 H ₂ O	2,03 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	2,47 g

→ pH 6,7 (NaOH / HCl)

Medium für ¹⁵N-Markierung (L⁻¹)

KH ₂ PO ₄	13,61 g
KOH	4,21 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,25 g
FeSO ₄ *7 H ₂ O	0,0011 g

→ pH 7,1 (KOH / HCl)

NaCl	variabel
Glucose*H ₂ O	5,00 g
(¹⁵ NH ₄)SO ₄	2,00 g

Dieses Medium entspricht dem unter II.2.1 aufgeführten Mineralsalzmedium MM63, jedoch wurde es zunächst ohne N-Quelle angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurden 2 g/L Ammonium-¹⁵N-Sulfat sterilfiltriert zugegeben.

2.4 Medienzusätze und Supplementierungen

2.4.1 Antibiotika

Medien für Plasmid- oder Resistenzkassetten-tragende Stämme wurden zum Aufrechterhalten des Selektionsdrucks mit den entsprechenden Antibiotika versehen. Diese wurden nach dem Autoklavieren den abgekühlten Medien zugegeben. Antibiotika-Stammlösungen wurden in H₂O_{reinst} (Amp, Carb, Km) mit einer Konzentration von 100 mg/mL bzw. in Ethanol (Cm) mit einer Konzentration von 50 mg/mL angesetzt und bei -20 °C gelagert. Die Endkonzentration im Medium betrug 100 µg/mL (Amp, Carb, Km) bzw. 50 µg/mL (Cm).

2.4.2 Supplemente

Für Supplementierungen mit verschiedenen kompatiblen Soluten wurden diese als 100 mM bis 1 M konzentrierte Stammlösungen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ angesetzt und sterilfiltriert dem autoklavierten und abgekühlten Medium zugesetzt.

2.5 Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wurde das gewünschte Medium unter Zusatz von 2 % (w/v) Agar autoklaviert, in Petrischalen gegossen und die fertigen Platten bei 4 °C gelagert.

3 Puffer und Lösungen

3.1 Puffer und Lösungen für die Analytik

Isokratische HPLC

Laufmittel	80 % Acetonitril (v/v)
Bligh & Dyer-Reagenz	Methanol : Chloroform : $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ (10 : 5 : 4 (v/v))

FMOC-ADAM-HPLC

Boratpuffer	0,5 M Borsäure in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, pH 7,7 mit 1 N NaOH
Norvalin-Boratpuffer	25 μM Norvalin in Boratpuffer
FMOC-Reagenz	1 mM FMOC in Aceton
ADAM-Reagenz	40 mM ADAM in Boratpuffer, 1:1 mit Aceton
Na-Acetat-Puffer	50 mM Na-Acetat, pH 4,2
Laufmittel A	80 % 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)

LDH-Assay

Lösung 1	10 mM K_2HPO_4
Lösung 2	10 mM KH_2PO_4
Reaktionspuffer	Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH 7,8 einstellen
Pyruvat-Lsg.	40 mM Pyruvat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$
NADH-Lsg.	6 mM NADH in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$

3.2 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Alle nachfolgenden Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ angesetzt.

DNA-Isolierung

TES-Puffer 5 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM NaCl → pH 8,0

Natrium-Acetat 3 M Na-Acetat → pH 4,8

Plasmidpräparation

P1-Puffer 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 % RNase A (w/v) → pH 8,0

P2-Puffer 200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v) → pH 12,5

P3-Puffer 3 M KAc → pH 5,5 (mit KOH)

Gelelektrophorese

Elektrophorese-Puffer 40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,6 % Eisessig (v/v) → pH 8,0
(1xTAE)

6xProbenpuffer 60 mM EDTA, 0,09 % Bromphenolblau (w/v), 60 % Glycerin (v/v)

EtBr-Lösung 1 % Ethidiumbromid (w/v) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$

Transformation

Transformationspuffer 250 mM KCl, 15 mM CaCl_2 , 10 mM PIPES → pH 6,7 (mit KOH)
55 mM MnCl_2 sterilfiltriert zugeben

3.3 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

Alle nachfolgenden Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ angesetzt.

Expression

IPTG-Stammlösung 0,5 M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

Anhydrotetracyclin 0,2 % Anhydrotetracyclin (w/v) in 70 % Ethanol (v/v)

His-tag-Affinitäts-Chromatographie

Lysispuffer I 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol → pH 8,5 (NaOH / HCl)

Waschpuffer I 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol → pH 8,5 (NaOH / HCl)

Elutionspuffer I 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol → pH 8,5 (NaOH / HCl)

II Material und Methoden

Strep-tag-Affinitäts-Chromatographie

Waschpuffer II	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl → pH 8,4
Elutionspuffer II	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 2,5 mM Desthiobiotin → pH 8,4
Regenerationspuffer	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA → pH 8,0

native Proteinreinigung (HIC)

Lysispuffer II	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl → pH 8,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Stammlsg.	4 M (NH ₄) ₂ SO ₄
HIC-Puffer	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, variable (NH ₄) ₂ SO ₄ -Konzentration → pH 8,0
TCA-Lsg.	100 % Trichloressigsäure (w/v)

Dialyse

Dialysepuffer	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl → pH 8,5
---------------	--------------------------------------

Gesamtzellprotein

Resuspensionspuffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl → pH 8,0
Lysozym-Lsg.	10 % Lysozym (w/v)
SDS-Lösung	10 % SDS (w/v)
DNase I-Lsg.	1 % DNase I (w/v)
MgCl ₂ -Lsg.	50 mM MgCl ₂

SDS-PAGE

Acrylamid-Mix	9,8 mL Acrylamid (40 %), 4,0 mL Bisacrylamid (2 %), H ₂ O _{reinst} ad 20 mL
APS-Lsg.	10 % Ammoniumpersulfat (w/v)
Trenngelbuffer	1,5 M Tris-HCl → pH 8,8
Sammelgelbuffer	0,5 M Tris-HCl → pH 6,8
Laufpuffer	50 mM Tris, 370 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v) → pH 8,3-8,6 (nicht titriert)
4xRSB	4,5 mL Sammelgelbuffer, 5 mL Glycerin, 5 % SDS (w/v), 3,86 % DTT (w/v), Spatelspitze Bromphenolblau, H ₂ O _{reinst} ad 10 mL

Gelfiltration

Laufmittel	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl → pH 8,5
------------	--------------------------------------

Aktivitäts-Assays

Reaktionspuffer	50 mM Tris-HCl, variable NaCl- bzw. KCl-Konzentration, variabler pH (7,0 - 9,0)
-----------------	---

4 Kultivierungsverfahren

4.1 Stammhaltung von Bakterien

H. elongata-Stämme wurden, je nach Salztoleranz, auf AB-2- oder AB-3-Platten bei 30 °C angezogen. Diese Stammkulturen wurden bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert. *E. coli*-Stämme wurden auf AB-0,5-Platten bei 37 °C angezogen und ebenfalls bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Für Plasmid-tragende Stämme wurden den Platten die entsprechenden Antibiotika zugegeben. Bei *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen mit Expressionsvektoren wurde auf eine Stammlagerung auf Platte verzichtet, diese Stämme wurden für jede Expression frisch aus der Stammsammlung entnommen.

4.2 Bakterienanzucht

4.2.1 Schüttelkolben

Im Allgemeinen erfolgte die Flüssigkultur der verwendeten Bakterienstämme in sogenannten „OD“-Kolben (auch „Nasen“- oder „Pinocchio“-Kolben). Hierbei handelt es sich um modifizierte Weithals-Erlenmeyerkolben, denen seitlich ein Messfortsatz zur Bestimmung der optischen Dichte in einem Photometer angebracht wurde. Weiterhin verfügen diese Kolben über einen durch eine Schraubkappe verschließbaren Stutzen für nachträgliche Supplementierungen bzw. Probenahmen. Zur besseren Sauerstoffversorgung sind die „OD“-Kolben mit Schikanen ausgestattet und werden mit einer Silikon-Schaumkappe (Fa. Merck, Darmstadt) verschlossen. Für 100 mL-Kulturen wurden 250 mL-„OD“-Kolben verwendet, 500 mL-Kulturen wurden in 1 L-„OD“-Kolben angezogen.

Vorkulturen wurden von Agarplatten angeimpft und im selben Medium angezogen wie die spätere Hauptkultur (Ausnahme Fermentation, vergl. II.4.2.3). Beimpft wurden Hauptkulturen für Wachstumsversuche 2 - 4 %ig, Kulturen für die Proteinexpression bis zu 10 %ig.

Wenn nicht anders vermerkt erfolgte die Kultur von *H. elongata*-Stämmen bei 30 °C und 180 rpm im Thermoschüttler (Scientific innova 4230, Fa. New Brunswick (Edison, USA) oder Infors AG (Bottmingen, Schweiz)). *E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C und 180 rpm kultiviert.

4.2.2 Mikrotiterplatte

Um im kleinen Maßstab Wachstumsversuche zur Wachstumsratenbestimmung durchzuführen, wurden Flüssigkulturen in Mikrotiterplatten inkubiert. Hierzu wurden die Kulturen in 2 mL-Reaktionsgefäßen vorbereitet (Medium, gegebenenfalls Supplementierung, Vorkultur) und in

Mehrfachbestimmung auf eine Mikrotiterplatte verteilt. Pro Vertiefung wurde ein Kulturvolumen von 200 µL eingesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie (Acetat-Folie für Mikrotiterplatten, Sarstedt) abgeklebt, zur Belüftung wurde mittels einer Kanüle in jedes Well ein Luftloch gestochen. Die Inkubation erfolgte temperiert in einem Plattenleser (infinite M 200, Tecan, Crailsheim), dessen Programmierung erlaubte, die optische Dichte der Kulturen alle 15 Minuten zu bestimmen. Jeder 15minütige Zyklus beinhaltete folgende Schritte: 30 sec Schütteln/ Messung der OD₆₀₀/ 30 sec Schütteln/ 5 min Wartezeit/ 30 sec Schütteln/ 5 min Wartezeit/ 30 sec Schütteln.

Programmierung und Auswertung der Daten erfolgte über die Software Magellan 6 (V6.5, Tecan Austria GmbH).

4.2.3 Fermenter

4.2.3.1 Fermentation im 5 L-Maßstab

Zur Beobachtung der ADPC-Konzentration über den Wachstumsverlauf wurde der Organismus *H. elongata* KB1 in einem größeren Kulturvolumen angezogen, um die Entnahme mehrerer Proben für nachfolgende Analytik zu ermöglichen. Die Anzucht erfolgte in einem Volumen von ca. 4 L in einem Fermenter (Biostat V, Fa. B. Braun, Melsungen) mit elektrischem Rührwerk. An Messtechnik wurden eine pH-Sonde (Ingold Elektrode 465-35-90-K9, Elektrolyt 9816, Ingold, Steinbach) sowie eine pO₂-Sonde (Ingold 32-591-3005/77569, Ingold, Steinbach) eingesetzt. Die Kultivierungstemperatur von 30 °C wurde über einen externen Heizkreislauf eingestellt. Die Belüftung sowie die Rührerdrehzahl wurden manuell gesteuert. Auftretende Schaumbildung wurde bei Bedarf durch Zugabe von Antischaummittel (Dehysan Z 2111, Cognis Deutschland, Düsseldorf) unterdrückt. Die Sterilisation des Fermenters erfolgte gefüllt mit H₂O_{demin} nach Angabe des Herstellers. Das extern autoklavierte Medium wurde nach Ablassen des Wassers durch sterile Ansteckverbindungen eingefüllt. Die Inokulation erfolgte ebenfalls über einen sterilen Zugang.

Die Kultur von *H. elongata* KB1 erfolgte in MM63-3-Medium. Durch die Verwendung dieses gepufferten Mediums entfiel eine externe pH-Regulation während der Fermentation. Das Wachstum der Kultur wurde über manuelle Probennahme zur Messung der optischen Dichte (vgl. II4.3) verfolgt. Zudem wurden in unregelmäßigen Zeitabständen 100 mL-Proben entnommen und abzentrifugiert, um Zellmaterial für spätere HPLC-Analytik sowie Medienproben für spätere Glucosetests zu gewinnen.

4.2.3.2 Fermentation in 15 L-Fed-Batch-Verfahren

Zur Produktion von ADPC wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Hochzelldichte-Fermentationen mit den Organismen *H. elongata* KB1 und *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel durchgeführt, um Zellmaterial für eine anschließende Extraktion und Reinigung der Zielsubstanz zu gewinnen. Zudem erfolgten Fermentationen des Organismus *H. elongata* pWUB_ectD_Hel zur genaueren Analyse der Hydroxyectoinproduktion. Diese Fermentationen erfolgten in Rührkessel-Fermentern der Firma Bioengineering (Wald/ Schweiz), verwendet wurden sowohl der Typ L 1523 als auch der Typ NLF 22 mit jeweils einem Arbeitsvolumen von ca. 15 L. Zur Prozesskontrolle waren die Fermenter ausgestattet mit Sonden zur Messung von Temperatur, pH, pO₂ und Trübung. Die Kultivierungstemperatur von 30 °C wurde über einen geregelten Heizkreislauf eingestellt. Die Belüftung wurde durch kontinuierlich regelbare Magnetventile in Kopplung mit der gemessenen O₂-Konzentration reguliert. Die Rührerdrehzahl wurde manuell gesteuert, wobei wegen der Tendenz von *H. elongata* zur Schaumbildung eine zu hohe Drehzahl (> 500 rpm) nach Möglichkeit vermieden wurde. Auftretende Schaumbildung wurde durch manuelle Zugabe von Antischaummittel (Dehysan Z 2111, Cognis Deutschland, Düsseldorf) unterdrückt. Zur automatischen Regelung des pH-Wertes auf einen Wert von 7,5 wurden Säurelösung (2 M Citronensäure oder 1 M HCl) sowie Laugenlösung (1 M NaOH) über Regelkreis-gesteuerte Peristaltikpumpen zugeführt. Die Dokumentation der prozesskritischen Parameter erfolgte mit Hilfe der BioLogics Software V5.32. Zusätzlich wurde die Entwicklung der Biomasse durch manuelle Probenentnahme zur Bestimmung der optischen Dichte (vgl. II.4.3) verfolgt.

Die Sterilisation der Fermenter erfolgte gefüllt mit H₂O_{demin} nach Angabe des Herstellers, das extern autoklavierte Medium wurde nach Ablassen des Wassers durch sterile Anstechtechnik eingefüllt. Die Inokulation erfolgte ebenfalls über einen sterilen Zugang mit 1 L Vorkultur.

Zum Erreichen hoher Zelldichten wurden Fed-Batch-Fermentationen durchgeführt, es wurde also bei beginnender Stagnation des Wachstums aufgrund von Nährstoff-Limitierung mit Fed-Batch-Lösung nachgefüttert. In dieser Arbeit wurde mit einer konstanten Fütterungsrate gearbeitet, die Fed-Batch-Lösung wurde also über eine manuell gesteuerte Peristaltikpumpe mit konstanter Flussrate zugeführt.

4.3 Verfolgung des Zellwachstums

Um das Wachstum einer Bakterienkultur zu verfolgen, wurde die optische Dichte im Photometer (Novaspec II, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei 600 nm (OD_{600}) gegen Luft gemessen. Bei der Kultur im Schüttelkolben wurde die OD_{600} ohne Probenahme über den Messfortsatz unverdünnt bestimmt. Bei Kulturen im Fermenter wurden Proben - in geeigneter Verdünnung mit Medium – in einer Einweg-Kunststoff-Küvette gemessen. Zusätzlich bestand bei Fermenterkulturen die Möglichkeit, das Zellwachstum mittels einer automatischen Trübungsmessung zu verfolgen (vgl. II4.2.3). Die OD_{600} von Kulturen in der Mikrotiterplatte wurde automatisch in einem Plattenleser gemessen (vgl. II4.2.2).

4.4 Ernte

Flüssigkulturen wurden in einer BECKMANN-Zentrifuge (Avanti™, J-20 XP) mit JA-10-Rotor geerntet (8.500 rpm, 12.785 g, 20 min, 20 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurden Zellpellets für eine weitere Analyse mit HPLC zur Entfernung des Zellzwischenwassers auf Nitrocellulosefiltern (Whatman, Maidstone, England) ausgestrichen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Kleinere Kulturproben, wie z.B. 10 mL-Proben für die Proteinbiochemie, wurden in einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf, Centrifuge 5415 C) in 2 mL-Reaktionsgefäßen geerntet und der Überstand qualitativ entnommen.

Fermenter-Kulturen wurden zum Teil in einer BECKMANN-Zentrifuge (s.o.) und zum Teil in einem Separator (Durchflusszentrifuge, KA 05-00-105, Westfalia Separator AG, Oelde) geerntet.

5 Analytik

5.1 Gefriertrocknung

Feuchtes Zellmaterial wurde bei -20 °C eingefroren. Anschließend erfolgte die Gefriertrocknung in einer Anlage der Fa. Heraeus-Christ (Alpha I-6). Nach Erreichen des Hochvakuums von 0,05 mbar wurde die Heizplatte auf eine Temperatur von 30 °C hochgeheizt. Kleinere Zellmengen (z.B. aus 100 mL-Kulturen) wurden für ca. 15-20 h, größere Zellmengen (z. B. aus Fermentationen) für ca. 48 h gefriergetrocknet.

5.2 Isokratische HPLC

Die isokratische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mit Brechungsindex- und UV-Detektion (Galinski 1986) dient zum

Nachweis und zur Quantifizierung wasserlöslicher Substanzen, die bei physiologischem pH ungeladen sind. Somit ist diese Methode geeignet zum Nachweis der unterschiedlichsten Stoffklassen (Polyole, Zucker, Aminosäuren und Derivate) und optimiert für die gängigsten Solute.

Stationäre Phase dieses Chromatographiesystems ist eine Kieselgelmatrix, an deren Hydroxylgruppen über einen hydrophoben Abstandshalter (Propylketten) polare endständige Aminogruppen gebunden sind. Diese Aminogruppen liegen in saurer Lösung protoniert vor und geben der Matrix die Eigenschaft eines schwachen Anionenaustauschers. Das als mobile Phase eingesetzte 80 %ige Acetonitril besitzt einen physiologischen pH-Wert, bei dem die Ionenaustauscher-Eigenschaften der Matrix nur schwach ausgeprägt sind. Die Trennung von Substanzgemischen erfolgt durch die verzögerte Freisetzung von hydrophilen Stoffen durch die hydrophilen endständigen Aminogruppen. Hydrophobe Substanzen eluieren folglich deutlich schneller von der Säule, trotz der zusätzlichen durch die Propylketten vermittelten hydrophoben Eigenschaften der Matrix.

5.2.1 Probenaufbereitung

Für die HPLC-Analyse von Zellen wurde gefriergetrocknetes Zellmaterial einer Mikroextraktion (Bligh und Dyer 1959, modifiziert nach Galinski 1986) unterzogen. Bei diesem Extraktionsverfahren bilden Chloroform und Wasser ein Zwei-Phasen-System aus, das hydrophobe und hydrophile Zellbestandteile separiert. Makromolekulare Komponenten wie Proteine und Zelltrümmer werden an der Grenzschicht zwischen Chloroform und wässriger Phase ausgefällt.

Durchführung:

- Mörsern des gefriergetrockneten Zellmaterials mit einem Mikropistill
- Einwaage von 30 mg Zellmaterial in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß
- Zugabe von 500 µL Bligh & Dyer-Lösung
- Schütteln bei Raumtemperatur (mindestens 5 min)
- Zugabe von 130 µL Chloroform und 130 µL H₂O_{reinst}
- Schütteln bei Raumtemperatur (mindestens 5 min)
- Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge
- Überführen der wässrigen Oberphase in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß
- Lagerung der Extrakte bei -20 °C

Für die HPLC-Analyse wurden die Zellextrakte mit Acetonitril (80 %, (v/v)) verdünnt und vor der Messung in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (10.000 rpm, 5 min). Für die Analyse von Medienproben wurde der Kulturüberstand mindestens 1:10 - 1:50 mit Acetonitril (80 % (v/v)) verdünnt und zentrifugiert. Zur Analyse von *in vitro*-Enzym-Assays wurden Proben aus den Reaktionsansätzen direkt mit Acetonitril (80 % (v/v)) verdünnt und vor der Messung in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (10.000 rpm, 5 min).

5.2.2 HPLC-Messung

Das verwendete HPLC-System bestand aus folgenden Komponenten:

- Pumpe (Spectra System P100, Thermo Separation Products)
- Entgaser (Spectra System SCM1000, Thermo Scientific)
- Probenaufgabeeventil mit 20 µL Probenschleife (Rheodyne Injektor Nr. 7125, Rheodyne Inc.)
- Vorsäule (LiChrospher 100-NH₂, 5 µm, Merck)
- Trennsäule (Grom-Sil Amin-1PR, 3 µm, 125x4 mm, LiChrocart-System, Alltech Grom GmbH)
- UV-Detektor (Spectrasystem UV 1000, 210 nm, Thermo Separation Products)
- RI-Detektor (Shodex RI-71, Showa Denko K.K.)

Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 1 mL/min. Auswertung und Steuerung liefen über die Software ChromQuest 4.2.34, Version 3.1.6 (Thermo Quest Cooperation).

5.3 FMOC-ADAM-HPLC

Der Aminosäure-Nachweis mittels FMOC-ADAM-HPLC (Betnér und Földi 1988; Kunte *et al.* 1993) ist ein hochempfindliches Verfahren, um N-reaktive Verbindungen nachzuweisen. Durch einen nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares des Aminostickstoffs an der Carbonylchloridgruppe des FMOC's (Fluorenylmethylchloroformiat) entsteht ein Derivat, das mit Hilfe von Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden kann (Einarsson *et al.* 1983). Wird ein geeignetes Gradientenprofil angelegt, ist es möglich, mit diesem Verfahren komplexe Gemische N-reaktiver Substanzen zu trennen und exakt zu quantifizieren. Da mit dieser Methode auch der Nachweis geladener Aminosäuren, wie z.B. Glutamat, möglich ist, stellt die FMOC-ADAM-HPLC eine gute Ergänzung zu der bereits dargestellten isokratischen HPLC dar.

5.3.1 Probenaufbereitung

Mittels FMOC-ADAM-HPLC wurden sowohl Zellextrakte (vgl. II.5.2.1) als auch Enzym-Assays analysiert. Zellextrakte wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ im Verhältnis 1:20 verdünnt, Proben aus Enzymtests im Verhältnis 1:2000.

Anschließend wurde mit den entsprechend verdünnten Proben eine Vorsäulenderivatisierung gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt.

- 40 μL Norvalin-Boratpuffer + 40 μL Probe + 80 μL FMOC-Reagenz
- 45 sec Reaktionszeit auf einem Schüttler (IKA Vibrax, VXR, Staufen)
- Zugabe von 100 μL ADAM-Reagenz
- 45 sec Reaktionszeit auf einem Schüttler
- Zugabe von 140 μL Laufmittel A, mischen

Aminosäure-Standards zur Signal-Identifizierung und –Quantifizierung wurden mit einer Endkonzentration von 25 μM eingesetzt. Der im Boratpuffer enthaltene interne Standard Norvalin wies ebenfalls eine Endkonzentration von 25 μM auf und diente zur Überprüfung der korrekten Derivatisierung und Probenauftragung durch den Autosampler.

5.3.2 FMOC-ADAM-HPLC-Messung

Das verwendete HPLC-System bestand aus folgenden Komponenten:

- Pumpe (Spectra System P2000, Thermo Separation Products)
- Entgaser (Spectra System SCM1000, Thermo Scientific)
- Probenaufgabeventil mit 100 μL -Probenschleife (Autosampler Spectra System AS3000, Probenvolumen 10 μL , Probenhalter 4 °C, Thermo Separation Products)
- Trennsäule (Merck Superspher 60 RP-8, 4 μm , 125x4 mm, LiChrocart-System, Alltech Grom GmbH, Säulenofen 45 °C)
- Fluoreszenzdetektor (Spectra System FL2000, 254 nm (exc.), 315 nm (em.), Thermo Separation Products)

Die Trennung der Substanzgemische erfolgte bei einer Flussrate von 1,25 mL/min. Es wurde ein Lösungsmittelgradient gemäß Tabelle 3 angelegt. Auswertung und Steuerung erfolgten über die Software ChromQuest 4.2.34, Version 3.1.6 (Thermo Quest Cooperation).

Tabelle 3: Lösungsmittelgradient für die FMOC-ADAM-HPLC

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

5.4 ¹³C-NMR

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) ist eine Technik mit atomarer Auflösung, die zur Strukturbestimmung von Molekülen herangezogen wird. Grundlage ist die Tatsache, dass Kerne mit einer ungeraden Anzahl an Protonen und / oder Neutronen einen Spin aufweisen, also um eine Achse rotieren. Von besonderem Interesse sind in dieser Hinsicht die Atome ¹H (natürliche Häufigkeit: 99,9 %) und ¹³C (natürliche Häufigkeit: 1,1 %). Da der Kernspin zu einer zirkulierenden elektrischen Ladung führt, welche wiederum ein magnetisches Feld auslöst, kann man durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes die Kerne in zwei verschiedene Orientierungen bringen: parallel zum äußeren Feld (α -Zustand) oder entgegen gerichtet dazu (β -Zustand). Diese beiden Ausrichtungen entsprechen leicht unterschiedlichen Energieniveaus. Die Absorption von Radiofrequenzen, deren Energie exakt der Energiedifferenz zwischen diesen Niveaus entspricht, führt zum Übergang vom α - in den β -Zustand. Anschließend stellt sich durch Relaxation wieder ein Energiegleichgewicht ein, wobei Energie einer bestimmten Frequenz, der Resonanzfrequenz, abgestrahlt wird. Diese Resonanzfrequenz ist abhängig von der chemischen Umgebung des Kerns, da die Wirkung des Magnetfeldes durch verschieden starke Abschirmungseffekte verändert wird. Man spricht hier von der chemischen Verschiebung, die in Bezug zu einem internen Standard gesetzt und in ppm (*parts per million*) angegeben wird. Somit ist die Radiofrequenz, bei der Resonanz eintritt, charakteristisch für einen Kern in einer bestimmten chemischen Umgebung, und man kann aus dem sich ergebenden Absorptionsspektrum (bei Auftragung der Absorption gegen die Frequenz) auf die Struktur des untersuchten Moleküls schließen. Weiterhin kann das

Signalmuster mit zuvor gemessenen Standards verglichen werden, um Identifizierungen von Substanzen vorzunehmen.

5.4.1 Probenaufbereitung

Für die Analyse von Zellmaterial wurde aus ca. 1 g gefriergetrocknetem Zellmaterial ein Mikroextrakt wie unter II.5.2.1 beschrieben hergestellt. Dieser wurde eingetrocknet und in 1 mL D₂O (Deuteriumoxid) aufgenommen. Zur Analyse von Reinsubstanzen wurden mindestens 100 mg Probenmaterial eingewogen und in 1 mL D₂O aufgenommen. Als interner Standard wurden 5 mg Natrium-Trimethylsilylpropionat (Na-TMSP) zugegeben, zusätzlich wurden die Proben mit 10 µL Acetonitril als Kontrollsignal versetzt. Auf ein weiteres Kontrollsignal in Form von 10 µL Methanol wurde bei den meisten Messungen verzichtet, um eine Überlagerung von Signalen zu vermeiden.

5.4.2 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 ¹³C-Kanal und 300 MHz für den ¹H-Entkopplungskanal. Eine Eichung der Messwerte erfolgte durch den internen Standard Na-TMSP, dessen Methylgruppensignal eine definierte Verschiebung von 0 ppm zugeordnet wurde. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte mit der Software WIN-NMR (Bruker).

5.5 Glucose-Test

Der Glucosegehalt im Medium wurde mit Hilfe eines enzymatischen UV-Tests (Roche, Mannheim) bestimmt. Dieses Testsystem beruht auf der Spaltung von D-Glucose in Glucose-6-phosphat durch das Enzym Hexokinase und der darauf folgenden Oxidation des Glucose-6-phosphats zu D-Gluconat-6-phosphat durch NADP in Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In der letztgenannten Reaktion wird NADPH in einer der D-Glucose äquivalenten Menge gebildet und kann anhand seiner Absorption bei 340 nm quantifiziert werden.

Der Test wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, allerdings wurden die eingesetzten Mengen der Lösungen um den Faktor vier verringert. Als Proben dienten Überstände abzentrifugierter Kulturproben, die bis zur Messung bei -20 °C gelagert worden waren.

5.6 Citrat-Test

Der Citratgehalt im Medium wurde mit Hilfe eines enzymatischen UV-Tests (Roche, Mannheim) bestimmt. Dieses Testsystem beruht auf der Spaltung von Citronensäure (Citrat) in Oxalacetat und Acetat durch das Enzym Citrat-Lyase und der darauf folgenden Reduktion des Oxalacetats zu L-Malat, katalysiert durch die L-Malat-Dehydrogenase. Zusätzlich wird das Decarboxylierungsprodukt des Oxalacetats, Pyruvat, durch die L-Lactat-Dehydrogenase zu L-Lactat reduziert. In den beiden letztgenannten Reduktionsreaktionen wird NADH verbraucht, welches anhand seiner Absorption bei 340 nm quantifiziert werden kann.

Der Test wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, allerdings wurden die eingesetzten Mengen der Lösungen um den Faktor vier verringert. Als Proben dienten Überstände abzentrifugierter Kulturproben, die bis zur Messung bei -20 °C gelagert worden waren.

5.7 Mikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden lichtmikroskopische Untersuchungen an Zellen sowie an kristallinen Reinigungsprodukten durchgeführt. Die Mikroskopie erfolgte an einem Leica DMLB Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar). Die Bilder wurden mittels eines HCX PC Fluotar Objektivs mit einer Digitalkamera (Leica, DC 300F, Wetzlar) aufgenommen. Eine weitere Verarbeitung der Bilder erfolgte anschließend mit der Software Photo Impact 4.2 (Ulead, Braunschweig).

6 Gewinnung von Soluten

6.1 Extraktionsverfahren

6.1.1 Melken

Der Begriff des „Bakterienmelkens“ bezeichnet einen hypoosmotischen Schock, mit dem man die Freisetzung intrazellulär akkumulierter Solute über mechanosensitive Kanäle erzwingt (Sauer und Galinski 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode des Melkens an *H. elongata* WUB01 angewendet, um N γ -Acetyl-diaminobuttersäure aus den Zellen zu gewinnen. Hierzu wurden 250 mL Kultur geerntet (vgl. II4.4) und das erhaltene Pellet in 30 mL H₂O_{demin} resuspendiert. Nach 20 min wurde die Zellsuspension wieder abzentrifugiert (Beckmann-Coulter, JA-10-Rotor, 7000 rpm, 15 min, 10 °C). Der Überstand wurde wie unter II6.2 beschrieben weiterbehandelt, die

erhaltenen Pellets wurden auf Nitrocellulosefiltern (Whatman, Maidstone, England) ausgestrichen und bis zur späteren Analyse bei -20 °C gelagert.

6.1.2 Extraktion mit Methanol

Zur Extraktion von ADPC aus Zellmaterial wurde die Methode der Soxhlet-Extraktion mit Methanol als Lösungsmittel angewendet. Bei der Soxhlet-Extraktion handelt es sich um eine diskontinuierlich in einer Extraktionsapparatur verlaufende Extraktionsmethode, bei der ein Extraktor mit Zellmaterial einem Rundkolben mit siedendem Lösungsmittel aufgesetzt wird. Über einen Rückflusskühler wird das Lösungsmittel kondensiert und tropft von dort auf das Zellmaterial, aus dem so die extrahierbaren Substanzen gelöst werden. Die Lösung läuft zurück in den Rundkolben, aus dem wiederum reines Lösungsmittel verdampft wird.

Durchführung

Gefriergetrocknetes und gemörsertes Zellmaterial (ca. 100 g) wurde in eine Extraktionshülse (Schleicher & Schuell) gefüllt und im Extraktor der unter einem Abzug aufgebauten Extraktionsapparatur untergebracht. 700 - 800 mL Methanol wurden unter Zugabe von Siedesteinchen bis zum Rückfluss erhitzt und die Extraktion für mindestens fünf Extraktionszyklen betrieben.

Der gewonnene Rohextrakt wurde anschließend einem weiteren „Down Stream Processing“ unterworfen (vgl. II6.2). Um die Ausbeute der Extraktion zu überprüfen wurde das in der Extraktionshülse verbliebene Zellmaterial bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde das Zellmaterial mittels HPLC (vgl. II5.2) auf eventuell nach der Extraktion in den Zellen verbliebene Solute untersucht.

6.1.3 Extraktion mit Ethanol

Zur Extraktion der in Methanol schlecht löslichen ADABA wurde ein vereinfachtes Extraktionsverfahren mit Ethanol als Lösungsmittel durchgeführt (Cánovas *et al.* 1999, modifiziert). Hierzu wurden 2 g gefriergetrocknetes Zellmaterial in ~ 70 mL Ethanol (80 % (v/v) in H₂O_{reinst}) unter Rühren für ca. 30 min zum Sieden erhitzt. Der Zellextrakt wurde anschließend durch Filtration vom Zellmaterial getrennt und wie unter II6.2 beschrieben weiterbehandelt.

6.2 Reinigung aus Zellextrakten („Downstream Processing“)

6.2.1 Rotationsverdampfer

Die durch Methanol- oder Ethanol-Extraktion gewonnenen Rohextrakte wurden mittels Rotationsverdampfer (IKA-Werk) unter Vakuum (Vacuum System B-172, Büchi, Schweiz) bei maximal 60 °C eingeeengt, bis das Lösungsmittel komplett verdampft war.

Desweiteren diente der Rotationsverdampfer dem Einengen von wässrigen Lösungen, z. B. vereinigten Fraktionen der präparativen Chromatographien.

6.2.2 Chloroform-Behandlung

Die durch Methanol- oder Ethanol-Extraktion gewonnenen Rohextrakte enthalten neben diversen löslichen Substanzen (kompatible Solute, Aminosäure, Zucker, etc.) und Salzen (NaCl, auch aus Medienresten im Zellzwischenwasser) auch lösliche Proteine und Lipide als Verunreinigung. Diese können durch eine Chloroform-Behandlung entfernt werden, bei welcher sich Proteine und hydrophobe Verbindungen an der Grenzschicht zwischen wässriger und organischer Phase ansammeln.

Durchführung

Nach Verdampfung des Lösungsmittels (vgl. II6.2.1) wurden die Rohextrakte in ca. 20 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ aufgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde durch kräftiges Rühren homogenisiert, auf 2 mL-Reaktionsgefäße verteilt und die anschließende Phasentrennung durch Zentrifugieren (10.000 rpm, 5 min in einer Tischzentrifuge) beschleunigt. Die wässrigen Phasen wurden abgenommen und vereinigt.

6.2.3 Chromatographische Aufreinigung

6.2.3.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Anionenaustausch-Chromatographie als wichtiger Bestandteil des „Downstream Processing“ von bakteriell produzierten kompatiblen Soluten angewendet. Insbesondere die Abtrennung der geladenen Aminosäure Glutamat von den zwitterionischen Soluten ADPC und ADABA erforderte diesen Schritt.

Die Matrix des verwendeten Säulenmaterials (Dowex 1x2) besteht aus Kieselgel, das als funktionelle Gruppen quartäre Ammoniumgruppen trägt. Während der Lagerung in 1 M HCl sind diese Gruppen mit Cl^- -Anionen abgesättigt. Wird Na-Glutamat auf die Säule gegeben

verdrängt das anionische Glutamat die Cl^- -Ionen und bindet an die Matrix. Zwitterionische und ungeladene Substanzen durchlaufen die Matrix ungehindert und eluieren gemeinsam mit den in Form von NaCl eluierenden verdrängten Cl^- -Ionen. Eine Elution des gebundenen Glutamats kann während der Regeneration der Säule mit 1 M HCl erfolgen, bei der das Glutamat durch die im Überschuss vorhandenen Cl^- -Ionen wieder verdrängt wird.

Durchführung

Als Proben wurden Zellextrakte nach der Chloroform-Behandlung (vgl. II6.2.2) eingesetzt, das Probenvolumen betrug 10-20 mL. Als mobile Phase diente $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ mit einer Flussrate von 4 mL/min.

Die Anlage für die Anionenaustausch-Chromatographie bestand aus den folgenden Komponenten:

- Säule Dowex 1x2, Bettlänge 40 cm, Durchmesser 1,85 cm
- Peristaltik-Schlauchpumpe
- Differential-Refraktometer (Knauer)
- Leitfähigkeitsdetektor (LF530, WTW)
- UV/VIS Filter-Photometer $\lambda=220$ nm (Knauer)
- Kompensations-Linienschreiber (Knauer)
- Fraktionssammler (684 Büchi, Schweiz)

6.2.3.2 Ionenzögerungs-Chromatographie

Zur Entsalzung von aus Zellmaterial gewonnenen Substanzen wurde eine präparative Ionenzögerungs-Chromatographie mit einem bifunktionellen Harz (BioRad AG11-A8) durchgeführt. Dieses Harz besitzt schwach saure Kationenaustauscher- und stark basische Anionenaustauscher-Gruppen, die einander im unbeladenen Zustand als Gegenionen dienen („selbst-absorbierende Form“). Durch temporäre Bindung von geladenen Ionen (Na^+ , Cl^-) oder Molekülen (z.B. Glutamat) kommt es zu einer Verzögerung dieser Substanzen, während ungeladene bzw. elektrisch neutrale Moleküle das Harz ohne Verzögerung passieren können.

Durchführung

Als Proben dienten vereinte Fraktionen nach der Anionenaustausch-Chromatographie, deren Volumen gegebenenfalls mittels Rotationsverdampfer (vgl. II6.2.1) auf 10-20 mL eingengt wurde. Die mobile Phase $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ wurde mit einer Flussrate von 1,75 - 2,5 mL/min über die Säule geleitet.

Die Anlage für die Ionenverzögerungs-Chromatographie entsprach mit Ausnahme der Säule dem Aufbau der Anionenaustausch-Chromatographie (vgl. II6.2.3.1). Die verwendete Säule (BioRad AG11-A8) hatte eine Bettlänge von 80 cm und einen Innendurchmesser von 2,8 cm.

6.3 Derivatisierung durch Hydroxylierung

Zum Nachweis der Hydroxylierung von ADPC wurde mit dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pETectDcyt. ein von Ures (unveröffentlicht) entwickeltes Ganzzell-Katalyse-System genutzt. Dieser Stamm trägt die Hydroxylase EctD aus *H. elongata* auf einem Expressionsvektor und ist so in der Lage, Substrate des Enzyms umzusetzen, sofern sie von *E. coli* in die Zelle transportiert werden.

Durchführung

Zur Hydroxylierung von ADPC wurde der Stamm im 400 mL MM63-1,5/Amp100 bei 37 °C kultiviert. Das Medium wurde zu Beginn des Versuchs mit 1 mM ADPC supplementiert. Die Induktion der EctD-Expression erfolgte mit 0,5 mM IPTG bei einer OD_{600} von 0,45. Die Kultur wurde 24 h nach Induktion geerntet und das Pellet wie unter II5.4.1 beschrieben für eine ^{13}C -NMR-Analyse aufbereitet.

6.4 Chemische Synthese von N-Carbamoyl-DABA

N-Carbamoyl-Diaminobuttersäure (N-Carbamoyl-DABA, N-C-DABA) als potentiell Substrat der Ectoin-Synthase wurde in dieser Arbeit chemisch synthetisiert. Als Ausgangssubstanz diente L-2,4-Diaminobuttersäure Dihydrochlorid, als weiterer Reaktant wurde Kaliumcyanat zugegeben.

Durchführung

- 1 g L-2,4-Diaminobuttersäure Dihydrochlorid wurde in 5 mL H₂O_{reinst} gelöst (Endkonzentration 1046 mM).
- Durch Zugabe von 900 µL 5 M NaOH wurde auf einen pH-Wert von ca. 7,3 neutralisiert.
- 0,44 g Kaliumcyanat (KOCN) wurden als Feststoff langsam unter Rühren zugegeben.
- Der Ansatz wurde für weitere 6,5 h gerührt, durch zwischenzeitliche Zugabe von HCl wurde der steigende pH auf einen Wert von ca. 7,5 gegentitriert.

Der Versuch wurde dahingehend variiert, dass im letzten Schritt entweder gegentitriert wurde, so dass durch HCl-Zugabe ein Wert von ca. 7,5 gehalten wurde, oder aber eine während der Reaktion auftretende Alkalisierung zugelassen wurde, wodurch ein pH von ca. 10 erreicht wurde.

7 Charakterisierung von Soluten

7.1 Supplementierungsversuche

Zur Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener kompatibler Solute als zelluläre Schutzstoffe bei Wachstum unter osmotischem Stress wurden Testorganismen mit geringer Salztoleranz ausgewählt. Als solche dienten zum einen *E. coli* K12, zum anderen die Ectoin-Mangelmutante *H. elongata* WUB02 (Δ ectAC).

Schutzstoffe wurden in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Das Wachstum der Kulturen erfolgte in Mikrotiterplatten (vgl. II4.2.2) zur Bestimmung der Wachstumsrate oder in 100 mL-Schüttelkulturen (vgl. II4.2.1), wenn eine nachfolgende HPLC-Analytik zur Überprüfung der Aufnahme der supplementierten Substanz erfolgen sollte.

7.2 Trocknungsversuche

Der Organismus *E. coli* K12 wurde in MM63-0,5 bei 37 °C angezogen. Je 100 µL dieser Vorkultur wurden zu Ansätzen von 500 µL MM63-3-Medium gegeben, welche zuvor in einer Konzentration von 100 mM mit jeweils einem unterschiedlichen Solut versetzt wurden. Die Endkonzentration des Solut betrug somit 83,3 mM. Diese Ansätze wurden zu 20 µL auf eine Mikrotiterplatte aliquotiert, bei -20 °C eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet. Die

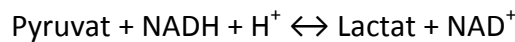
Lagerung der gefriergetrockneten und mit einer Klebefolie verschlossenen Mikrotiterplatte erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Wiederbelebung der gefriergetrockneten Kulturen erfolgte durch Zugabe von 200 μL LBG-0,5-Medium pro Vertiefung der Mikrotiterplatte. Anschließend erfolgte die Kultivierung wie unter II.4.2.2 beschrieben.

7.3 LDH-Assay

Die Verwendung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) als Modellenzym zur Untersuchung der protektiven Eigenschaften verschiedener kompatibler Solute wurde bereits zuvor beschrieben (Lippert und Galinski 1992). Die Durchführung der Experimente in dieser Arbeit richtete sich bis auf leichte Modifikationen nach der genannten Veröffentlichung.

Lactat-Dehydrogenasen katalysieren die im Folgenden dargestellte Reaktion:



Unter den angewendeten Versuchsbedingungen liegt das Gleichgewicht der Reaktion weit auf der Seite von Lactat und NAD^+ . Da die reduzierte Form NADH im Gegensatz zu NAD^+ Licht bei einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert, kann die Reaktion spektralphotometrisch verfolgt werden. Hierbei ist die Menge des umgesetzten Cosubstrats NADH proportional zu der Menge des umgesetzten Pyruvats, so dass quantitative Aussagen zur Aktivität der Lactat-Dehydrogenase getroffen werden können.

7.3.1 Gefrierzyklen

Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte am Photometer (Specord 210, Fa. Analytik Jena) bei 340 nm in einem Volumen von 1 mL. Die Auswertung der Messung erfolgte PC-basiert (Software WinASPECT, Version 2.2.0.0, Analytik Jena). In die Küvette vorgelegt wurde Reaktionspuffer, Pyruvat in einer Konzentration von 2 mM und NADH in einer Konzentration von 0,3 mM. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μL einer LDH-Lösung. Die verwendete LDH-Lösung enthielt 0,05 mg/mL LDH sowie 400 mM ADPC bzw. Hydroxyectoin in Reaktionspuffer. Als Kontrolle wurden die Solute durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ ersetzt.

Die oben beschriebene LDH-Lösung wurde in jedem Gefrierzyklus für 20 sec in Flüssigstickstoff (-196 °C) eingefroren und auf Eis langsam wieder aufgetaut. Im Anschluss wurde die Restaktivität des Enzyms photometrisch bestimmt.

8 Molekularbiologische Methoden

8.1 Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von DNA

8.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Lyse

Von einer in Komplexmedium gewachsenen Übernachtskultur wurden 4 mL in einem 2 mL-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, 10.000 g, 3 min). Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt und das Pellet in 1 mL TES-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und Entfernen des Überstands wurde das Pellet erneut in 800 µL TES-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde eine Spatelspitze Lysozym zugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden 20 µL 20 %ige SDS-Lösung zugegeben und nach mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Dem Zell-Lysat wurden 300 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25/24/1) zugegeben und das Reaktionsgefäß kräftig geschüttelt. Nach einer anschließenden Zentrifugation (13.600 g, 10 min) zur Unterstützung der Phasentrennung wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und erneut in ein Gefäß mit 300 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung überführt. Diese Schritte wurden 3-5-mal wiederholt, bis keine Zwischenphase mehr erkennbar war. Die zuletzt verbliebene wässrige Oberphase wurde in die anschließende DNA-Fällung eingesetzt.

DNA-Fällung

Die im vorangegangenen Schritt gewonnene DNA-haltige wässrige Phase wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 1 Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt und gut durchmischt. Die DNA wurde für 48 h bei -20 °C gefällt, nach einem Zentrifugationsschritt (13.600 g, 5 min) wurde der Überstand verworfen. Das verbliebene DNA-Pellet wurde in einem Waschschrift in 500 µL eiskaltem 70 %igem Ethanol geschwenkt, nach erneuter Zentrifugation (13.600 g, 5 min) wurde der Überstand quantitativ entfernt. Das DNA-Pellet wurde 10 min im geöffneten Reaktionsgefäß bei 60 °C getrocknet und anschließend in

50 μL sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

8.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse gemäß dem folgenden Protokoll:

1,5 - 8 mL einer in Komplexmedium gewachsenen Übernachtskultur wurden in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (9.500 *g*, 30 sec). Nach qualitativer Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 200 μL P1-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μL P2-Puffer wurde der Ansatz durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und zügig 200 μL P3-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde wieder durch Invertieren gemischt und anschließend zentrifugiert (16.060 *g*, 3 min). Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß mit 500 μL Chloroform gegeben, der Ansatz durchmischt und anschließend wieder zentrifugiert (16.060 *g*, 3 min). Der wässrige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 500 μL Isopropanol gegeben, anschließend wurde wieder zentrifugiert (16.060 *g*, 3 min). Der Überstand wurde qualitativ entfernt und das verbliebene DNA-Pellet mit 500 μL eiskaltem Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (16.060 *g*, 1 min) wurde der Überstand entfernt, das DNA-Pellet für 20 min im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet und anschließend in 50 μL sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

8.1.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

PCR-Produkte sowie hydrolysierte Plasmid-DNA wurden im Anschluss an eine Agarosegelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mittels eines Kits (peqlab peqGOLD Gelextraction Kit, Peqlab, Erlangen) isoliert. Dabei wurde das Gel bei 60 – 65 °C in einem Bindepuffer aufgelöst und gemäß den Herstellerangaben über eine Silicamatrix aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30-50 μL des mitgelieferten Elutionspuffers.

8.1.4 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

DNA aus Restriktionsansätzen für spätere Ligationen wurde teilweise direkt mittels eines Kits (peqlab peqGOLD Gelextraction Kit, Peqlab, Erlangen) gereinigt, um Verluste durch eine präparative Agarosegelelektrophorese zu vermeiden. Hierzu wurden Restriktionsansätze mit dem gleichen Volumen Bindepuffer versetzt und die Reinigung über eine Silicamatrix gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

8.1.5 Quantifizierung von DNA

Die DNA-Konzentration von Proben wurde durch Vergleich mit einem kommerziellen DNA-Größenmarker im Agarosegel bestimmt. Hierbei nutzt man die bekannte Konzentration der im Größenmarker enthaltenen DNA-Fragmente aus und vergleicht die Fluoreszenzintensität der Probenbande mit der einer Markerbande ähnlicher Größe.

Die Molarität der DNA berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{ng\ DNA/\mu L}{660 \frac{g}{mol} * Anzahl\ der\ bp\ des\ DNA - Fragments} = mol\ DNA/\mu L$$

8.2 Enzymatische Modifikation von DNA

8.2.1 Restriktionsverdau

Hydrolysen mit Restriktionsenzymen wurden mit Vektor- und Insert-DNA zur Vorbereitung von Ligationsreaktionen sowie mit Plasmid-DNA zur Restriktionsanalyse durchgeführt.

Zum Verdau eines Vektors und der zu ligierenden Insert-DNA wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 40 μ L erstellt. Diese enthielten jeweils 15 μ L DNA, 4-8 μ L Puffer (je nach Angabe des Herstellers) und 10 U Restriktionsenzym. Die Ansätze wurden für mindestens 3 h bei der für das entsprechende Enzym empfohlenen Temperatur im Wasserbad inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch einen 10-minütigen Hitzeschock bei 65 – 80 °C.

Restriktionsanalysen fanden in einem Gesamtvolumen von 20 μ L statt. Es wurden 5 μ L Plasmid-DNA, 2-4 μ L Puffer und 10 U Enzym eingesetzt und für 2-3 h inkubiert.

8.2.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Religation von hydrolysierten Vektor-DNA ohne Insertion von Insert-DNA während der Ligationsreaktion zu verhindern, wurde linearisierte Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Hierzu wurde im Anschluss an einen Restriktionsverdau 1 U des Enzyms Fast-AP zu dem Restriktionsansatz gegeben und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch einen 5minütigen Hitzeschock bei 75 °C. Anschließend wurde die Vektor-DNA aus dem Reaktionsansatz gereinigt (vgl. II8.1.3 bzw. II8.1.4).

8.2.3 Ligation

Dephosphorylierte Vektor-DNA und Insert-DNA wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase verknüpft. Dieses Enzym verbindet die Phosphatgruppe der 5`-Enden mit den OH-Gruppen der 3`-Enden der DNA, wobei sowohl kohäsive als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden können. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration (vgl. II.8.1.5) wurden Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt.

Die Ligation erfolgte in einem 20 µL-Ansatz. Etwa 50 ng Vektor-DNA wurde mit Insert-DNA vermischt, 2 U T4-DNA-Ligase und 2 µL Reaktionspuffer (10x) zugegeben und das Endvolumen von 20 µL mit sterilem H₂O_{reinst} eingestellt. Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Abschließend wurde die Reaktion durch einen Hitzeschock (65 °C, 10 min) abgestoppt.

8.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* ablaufende Methode zur selektiven Amplifizierung von DNA-Bereichen (Mullis und Faloona 1987). Benötigt werden zwei gegenläufige Oligonukleotid-Primer, die das zu amplifizierende DNA-Fragment einrahmen und nach der Denaturierung der DNA mit den komplementären Einzelsträngen hybridisieren. Ausgehend von den freien 3'-OH-Enden der somit entstehenden kurzen doppelsträngigen Abschnitte sind DNA-Polymerasen in der Lage, durch komplementären Anbau von Nucleosidtriphosphaten die vorhandenen DNA-Fragmente zu duplizieren.

Eine PCR ist ein zyklisch verlaufender Vorgang, bei dem durch die wiederholte Abfolge von DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht werden kann. Die für die DNA-Denaturierung benötigten hohen Temperaturen erfordern die Verwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen. Standardmäßig wird die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, die keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität aufweist. Für Anwendungen, wie z.B. Klonierungen, bei denen eine möglichst niedrige Fehlerrate gewünscht ist, bietet sich die Anwendung einer DNA-Polymerase mit 3'→5'-Exonukleaseaktivität („Korrekturlesefunktion“) an.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit PCR-Reaktionen für Klonierungen mit der *Phusion*[®] High Fidelity-DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) durchgeführt.

8.3.1 Standard-PCR

Das im Folgenden beschriebene Standard-Protokoll gilt für PCR-Reaktionen mit der *Phusion*-Polymerase.

Reaktionsansatz	
HF-Puffer (5x)	10 µL
dNTPs (2 mM)	5 µL
Primer 5' (50 pmol/µL)	1 µL
Primer 3' (50 pmol/µL)	1 µL
Betain (5 M)	10 µL
DNA	0,5 µL
<i>Phusion</i> -Polymerase (1 U/µL)	0,5 µL
H ₂ O _{reinst}	ad 50 µL

PCR-Programm			
Initialdenaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	20 sec	
Primeranlagerung	X	20 sec	30 Zyklen
Elongation	72 °C	15 sec – 1 min	
Verlängerte Elongation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Bei Verwendung der *Phusion*-DNA-Polymerase wurde die Temperatur für die Primeranlagerung um 3 °C höher als die niedrigere Schmelztemperatur des Primerpaares gewählt. Die Elongationsdauer richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Als Regel benötigt die *Phusion*-Polymerase 15-30 sec für 1 kb.

8.3.2 Kolonie-PCR (*In situ*-PCR)

Zur Überprüfung der genetischen Identität von *H. elongata*-Klonen wurde die Methode der Kolonie-PCR angewendet, bei der anstelle von zuvor isolierter DNA ganze Zellen als DNA-Template eingesetzt werden (Joshi *et al.* 1991). Hierfür wurde eine geringe Menge Zellmaterial mittels steriler Zahnstocher von Agarplatten gepickt und in 20-50 µL H₂O_{reinst} resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend in eine PCR-Reaktion mit der *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt, bei der wie im folgenden Protokoll beschrieben die Initialdenaturierung auf einen

II Material und Methoden

Zeitraum von 10 min erhöht wurde. Die Zugabe der *Taq*-DNA-Polymerase erfolgte erst nach Abschluss der Initialdenaturierung.

Reaktionsansatz	
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	5 μ L
dNTPs (2 mM)	5 μ L
Primer 5' (50 pmol/ μ L)	1 μ L
Primer 3' (50 pmol/ μ L)	1 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ L
Zellsuspension	0,5 μ L
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/ μ L)	1 μ L
H ₂ O _{reinst}	ad 50 μ L

PCR-Programm			
Initialdenaturierung	98 °C	10 min	
Denaturierung	98 °C	30 sec	
Primeranlagerung	X	45 sec	30 Zyklen
Elongation	72 °C	1 min	
Verlängerte Elongation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Bei Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase wurde die Temperatur für die Primeranlagerung um 5 °C niedriger als die niedrigere Schmelztemperatur des Primerpaares gewählt.

8.3.3 Verwendete Primer

Primer wurden in H₂O_{reinst} zu einer Endkonzentration von 50 pmol/ μ L resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4: Verwendete Primer

Fett und unterstrichen dargestellt sind Schnittstellen der angegebenen Restriktionsenzyme. Sämtliche Primer dieser Arbeit wurden in einer Konzentration von 50 pmol/ μ L angesetzt und verwendet.

Name	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle	T _m [°C]	Referenz
Primer für die genomische Deletion von <i>ectC</i>				
ectCdown_R1	acggcc <u>ctgcag</u> agcggagcgggtcgtga	<i>Pst</i> I	75,4	(Witt 2005)
ectCup_F1	ctcacgtc <u>ctgcag</u> cgccccgagctcga	<i>Pst</i> I	75,4	(Witt 2005)

II Material und Methoden

ectC-Klonierungen für *E. coli*

ectC_for_pet	gagaatc <u>catatg</u> atcggttcgcaatctc	<i>NdeI</i>	63,7	diese Arbeit
ectC_rev_pet	att <u>ccatgg</u> ttacagcggcttctggtc	<i>NcoI</i>	66,5	diese Arbeit
ectC_rev_XhoI	att <u>ctcgag</u> cagcggcttctggtcgtc	<i>XhoI</i>	69,5	diese Arbeit
ectC-10_NcoI	att <u>ccatgg</u> ttaaggtgcgtaggaaccgtctt	<i>NcoI</i>	68,2	diese Arbeit
ectC-10_XhoI	att <u>ctcgag</u> aggtgcgtaggaaccgtct	<i>XhoI</i>	68,0	diese Arbeit
ectC-9_NcoI	att <u>ccatgg</u> ttaggcaggtgcgtaggaacc	<i>NcoI</i>	69,5	diese Arbeit
ectC-8_NcoI	att <u>ccatgg</u> ttagtcggcaggtgcgtaggaa	<i>NcoI</i>	69,5	diese Arbeit
pASK5_ectC_for	atggta <u>cgctc</u> cagcggccatgatcggttcgcaatctcga	<i>Esp3I</i>	73,8	diese Arbeit
pASK5_ectC_rev	atggta <u>cgctc</u> catatcacagcggcttctggtcgtcgg	<i>Esp3I</i>	74,9	diese Arbeit

Vektor-Klonierungen für *H. elongata*

prom-KB1_rev	aat <u>ggatcc</u> ctacatgtcgacctcctgt	<i>BamHI</i>	66,6	diese Arbeit
prom_ect_f	ggaggccgt <u>ctagat</u> catccagg	<i>XbaI</i>	66,0	(Brünig 2005)
ectC_for_prom	gagaatcg <u>acatgt</u> tctggttcgcaatctc	<i>Bsphi11I</i>	65,1	diese Arbeit
ectC_rev_prom	tact <u>aagctt</u> ggttacagcggcttctggtc	<i>HindIII</i>	68,1	diese Arbeit
ectC_for_pagI	ttcactggagaatc <u>gtcatgat</u> cgttcg	<i>PagI</i>	65,1	diese Arbeit
ectC-10_rev_prom	att <u>aagctt</u> ttaaggtgcgtaggaaccgtctt	<i>HindIII</i>	65,6	diese Arbeit
ectDProm_for2	aggtatt <u>ccatgg</u> cagtcagacatcgt	<i>NcoI</i>	66,6	(Meffert 2011)
ectDProm_rev2	ctggtgg <u>caagctt</u> gatgaacagcaac	<i>HindIII</i>	66,5	
His_for_PstI	att <u>ctgcag</u> caccaccaccaccactg	<i>PstI</i>	70,9	diese Arbeit
His-tag for1	gtcccat <u>aagctt</u> atccgatatagttcctcttca	<i>HindIII</i>	69,5	(Burdziak 2006)
Psy_WU_for	cggc <u>acatgt</u> ttgttcgcaacaaaacc	<i>Bsphi11I</i>	65,0	(Kurz <i>et al.</i> 2010)
Psyr_WUBHis_rev	att <u>ctgcag</u> gtaagcggatcccgtacc	<i>PstI</i>	68,0	diese Arbeit

Kolonie-PCR zum Nachweis von *H. elongata*

sNhaDf1	atgccgacaacctgaccac	61,4	(Kurz 2003)
sNhaDr1	caggctctgacgcaggtagt	61,4	(Kurz 2003)

8.4 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. In dieser Arbeit diente diese Methode der Größenbestimmung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA.

Es wurden Flachbettkammern (Horizon 58, Gelvolumen 26 mL) der Firma GibcoBRL (Maryland, USA) verwendet. Die Agarose wurde in einer Konzentration von 1 % (w/v) durch Aufkochen in

Elektrophoresepuffer (1xTAE-Puffer) gelöst und nach Abkühlen auf ca. 55 – 65 °C in die Gelkammer gegossen. Das erstarrte Gel wurde mit 1xTAE-Puffer überschichtet.

Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen mit 6xProbenpuffer versetzt. Zusätzlich wurden 6 µL eines DNA-Größenmarkers (1 kb-Marker oder 100 bp-Marker Plus, Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 60 - 90 V (Electrophoresis Power Supply Consort E122, Sci.Plas Limited, Southham, UK).

Für die Gel-Dokumentation wurde das Gel zunächst für 5 min in Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/mL) gefärbt und anschließend für 5 min in H₂O_{de}min entfärbt. Zur Photographie wurde das Gel im UV-Durchlicht (Videosystem Intas, Göttingen) betrachtet. Aus präparativen Gelen wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend aufgereinigt (vgl. II8.1.3).

8.5 Transformation von *E. coli*

Unter Transformation versteht man das Einbringen freier DNA (z.B. Plasmid-DNA) in Bakterienzellen. Um die Effizienz dieses auch unter natürlichen Bedingungen ablaufenden Prozesses zu steigern, verwendet man Zellen, die zuvor chemisch kompetent gemacht wurden. Das hierzu in dieser Arbeit angewendete Protokoll richtet sich nach Inoue *et al.* (1990).

Da Bakterien über ein Restriktions-Modifikations-System verfügen, das vor dem Eindringen fremder DNA schützt, kann das Transformieren beliebiger *E. coli*-Stämme Probleme bereiten. Aus diesem Grund und zur sicheren Lagerung von Plasmiden in der Stammsammlung wurde Plasmid-DNA immer zunächst in *E. coli* DH5α eingebracht. Dieser Stamm weist Defekte im Restriktions-Modifikations-System auf, so dass die Stabilität der Plasmid-DNA gewährleistet ist. Zudem erlaubt die in diesem Organismus stattfindende stammspezifische Modifikation der DNA die spätere Transformation anderer *E. coli*-Stämme.

8.5.1 Herstellung superkompetenter Zellen

100 mL SOB-Medium wurden 1 %ig mit einer Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes (DH5α, S17-1 bzw. BL21 (DE3)) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert (22 °C, 180 rpm).

Die Kultur wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend geerntet (5000 g, 10 min, 4 °C, Beckmann Avanti™ J-20 XP, JA-10-Rotor).

II Material und Methoden

Das Zellpellet wurde in 80 mL vorgekühltem Transformationspuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 20 mL Transformationspuffer resuspendiert und tropfenweise mit 1,4 mL DMSO versetzt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 10 min wurden die Zellen in 1,5 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert (je 200 µL), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

8.5.2 Transformation superkompetenter Zellen

200 µL superkompetenter *E. coli*-Zellen wurden mit 20 µL Ligationsansatz bzw. 3 µL isolierter Plasmid-DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert.

Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit 800 µL vorgewärmtem SOB-Medium versetzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert (Thermomixer, Eppendorf, 500 rpm).

100 µL der Zellsuspension wurden auf Selektionsplatten (AB-0,5 mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 10.000 rpm, 1 min), der Überstand durch Dekantieren entfernt und die im Rücklauf resuspendierten Zellen ebenfalls auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert.

8.6 Konjugation

Unter bakterieller Konjugation versteht man die Übertragung genetischen Materials von einer Donor- auf eine Empfängerzelle über direkten Zell-Zell-Kontakt. Bei der Übertragung von Plasmid-DNA mittels Konjugation unterscheidet man konjugative und mobilisierbare Plasmide. Konjugative Plasmide enthalten die gesamte genetische Information, die für die DNA-Übertragung benötigt wird, also neben den Erkennungsstellen (*mob*-site, *oriT*) auch die *tra*-Gene. Im Gegensatz dazu fehlen den mobilisierbaren Plasmiden die vollständigen konjugativen Funktionen, diese können allerdings durch ein weiteres Plasmid oder - in einem geeigneten Bakterienstamm - genomisch zur Verfügung gestellt werden.

Bei den in dieser Arbeit in *H. elongata*-Stämme eingebrachten Plasmiden pK18*mobsacB* sowie pPromEct und pWUB handelt es sich um mobilisierbare Plasmide, denen die Transfer-Gene (*tra*-Gene) fehlen. Der konjugative Transfer in *H. elongata* wird ermöglicht durch die Verwendung von *E. coli* S17-1 als Donorstamm. In diesem Stamm liegen die *tra*-Gene für den

konjugativen Transfer von Plasmiden der RK2/RP4-Gruppe (Inkompatibilitätsgruppe P) ins Genom integriert vor (Simon *et al.* 1983).

Ein zusätzlicher Vorteil der Verwendung von *E. coli* S17-1 als Donorstamm ist die Prolin-Auxotrophie des Organismus, die bei Verwendung von Mineralsalz-Medium nach erfolgter Konjugation zur Selektion auf *Halomonas* ausgenutzt werden kann.

Durchführung (Kunte und Galinski 1995, modifiziert)

Der Donorstamm *E. coli* S17-1 mit dem zu übertragenden Plasmid wurde über Nacht auf einer AB-2-Platte mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Der *Halomonas*-Rezipienten-Stamm wurde in AB-2-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,9 angezogen. Der Donorstamm wurde in AB-2-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 resuspendiert. 600 µL der *Halomonas*-Kultur und 400 µL der *E. coli*-Suspension wurden in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß zusammengegeben und abzentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, 5 min, 6.500 g). Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt und das Pellet im Rückfluss resuspendiert.

Sterile hydrophile Nitrocellulosefilter (0,45 µm) wurden auf vorgewärmte AB-2-Platten gelegt und die Zellsuspension darauf pipettiert. Anschließend wurden die Platten bei 30 °C über Nacht inkubiert.

Die Nitrocellulosefilter wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und die Zellen in 1 mL MM63-2-Medium durch Vortexen vom Filter gelöst und resuspendiert. Von der erhaltenen Suspension wurden Verdünnungen der Stufen 10⁻¹ – 10⁻³ mit MM63-2-Medium hergestellt. Jeweils 100 µL der unverdünnten Suspension sowie der Verdünnungen wurden auf MM63-Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten enthielten ein dem übertragenen Plasmid entsprechendes Antibiotikum, die Salzkonzentration der Selektionsplatten wurde der Salztoleranz des *Halomonas*-Rezipienten-Stammes angepasst. Die Platten wurden anschließend mindestens 48 h bei 30 °C inkubiert.

8.7 Herstellung chromosomaler Mutationen in *H. elongata*

Zur Einführung chromosomaler Mutationen in *H. elongata* wurde der Vektor pK18*mobsacB* verwendet (Schäfer *et al.* 1994). Dieses pBR322-Derivat enthält eine Mobilisierungsregion (*mob*-site) und die für den Transfer notwendige Replikationsstelle *oriT*. Aufgrund des pMB1-Replicons, das zu einer engen Wirtsspezifität führt (Sutcliffe 1979), muss pK18*mobsacB* vom Empfängerorganismus *H. elongata* chromosomal integriert werden, damit die kodierte Km-

II Material und Methoden

Resistenz zu Selektionszwecken ausgeprägt werden kann. Durch das *sacB*-Gen (Laevan-Saccharase) aus *Bacillus subtilis* ist eine weitere negative Selektion möglich (Schäfer *et al.* 1994). Für *H. elongata* ist die durch Saccharose induzierte Bildung des Enzyms ab einer Saccharose-Konzentration im Medium von 20 % letal.

Zur genomischen Deletion von *ectC* in *H. elongata* wurde der in einer vorangegangenen Arbeit erstellte Vektor pK18*mobsacB* Δ *ectC* (Witt 2005) durch konjugativen Transfer (vgl. II.8.6) in *H. elongata* DSM 2581^T und *H. elongata* KB1 (Δ *ectA*) übertragen. In einem ersten Selektionsschritt wurden die Konjuganten auf MM63-2/Km100-Platten ausplattiert. Die erhaltenen Klone haben durch eine erste homologe Rekombination den Vektor pK18*mobsacB* Δ *ectC* in das Genom integriert. Eine weitere Selektion auf „Doppel-Cross-Over“-Mutanten, die das Plasmid wieder aus dem Genom entfernt haben, fand auf LBG-2-Platten mit 22 % Saccharose statt. Hierzu wurden Km-resistente Transkonjuganten-Klone über Nacht bei 30 °C in LBG-2-Medium kultiviert und in den Verdünnungsstufen 10⁰ - 10⁻⁸ auf den Selektionsplatten ausplattiert. Die auf diesen Platten gewachsenen Kolonien wurden nochmals auf AB-2-Platten und AB-2/Km100-Platten überführt, um eine Ausgliederung des Plasmids über den Verlust der Km-Resistenz zu überprüfen. Zur endgültigen Überprüfung der genetischen Identität wurden Kolonien in eine Kolonie-PCR (vgl. II.8.3.2) eingesetzt. Hierbei dienten die Primer *ectCdown_R1* und *ectCup_F1* dem Nachweis der erfolgreichen genomischen Gendeletion. Zusätzlich wurde mit den Primern *sNhaDf1* und *sNhaDr1* ein *H. elongata*-spezifisches PCR-Produkt amplifiziert, um eine *E. coli*-Kontamination aus dem Konjugationsschritt auszuschließen.

8.8 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Vektorkonstrukten wurden von der Firma SequiServe (Vatterstetten) nach der Didesoxymethode (Sanger *et al.* 1977) durchgeführt.

9 Proteinbiochemische Methoden

9.1 Verwendete Expressionssysteme

Für die heterologe Expression von Proteinen, in dieser Arbeit meist verschiedene Formen der Ectoin-Synthase, wurde der Organismus *E. coli* als Expressionssystem genutzt. Die verwendeten Vektoren gehörten der pET- bzw. pASK-IBA-Familie an.

Im pET-System wird das Zielgen unter Kontrolle des starken T7-Promotors gestellt, der aus dem Bakteriophagen T7 stammt. Die für die Transkription benötigte T7-RNA-Polymerase wird im Genom des Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3) unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren lacUV5-Promotors kodiert. Der in dieser Arbeit verwendete Ausgangsvektor pET-22b(+) bietet die Möglichkeit, das Zielprotein mit einem C-terminalen His₆-tag zu fusionieren.

Im Gegensatz zu den eine hohe Transkriptionseffizienz bietenden pET-Vektoren verfügen pASK-IBA-Vektoren über einen vergleichsweise schwachen, regulierbaren Tet-Promotor. Die Expression des Zielgens wird induziert durch Zugabe von Anhydrotetracyclin. Die Verwendung spezieller *E. coli*-Stämme, wie im Fall des pET-Systems, ist nicht nötig, da das Tet-System bakteriellen Ursprungs ist. Der in dieser Arbeit verwendete Ausgangsvektor pASK-IBA5 bietet die Möglichkeit, das Zielprotein mit einem N-terminalen Strep[®]-tag II zu fusionieren.

Neben dem Organismus *E. coli* wurde in einigen Versuchen auch *H. elongata* als Expressionssystem genutzt. Die verwendeten Vektoren pPromEct bzw. pWUB beinhalten einen osmoregulierten Promotor, so dass die Expression durch die Zugabe von Salz (NaCl) im Medium induziert wird.

9.2 Expressionskultur

Zur Gewinnung von Proteinen durch heterologe Expression wurden in dieser Arbeit meist *E. coli* BL21 (DE3)-Stämme mit den entsprechenden auf pET-22b(+) basierenden Vektoren verwendet. Diese Stämme wurden wenn nicht anders vermerkt in LBG-0,5/Amp100-Medium bei 37 °C kultiviert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ~0,45 mit 0,5 mM IPTG. Geerntet wurden die Kulturen ca. 4 h nach Induktion, die Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Produktion der Ectoin-Synthase mittels eines auf pASK-IBA5 basierenden Vektors wurde *E. coli* DH5α mit dem entsprechenden Expressionsvektor in LBG-0,5/Carb100-Medium bei 37 °C kultiviert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ~0,4 mit 0,2 µg/mL Anhydrotetracyclin. Geerntet wurden die Kulturen ca. 4 h nach Induktion, die Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bei Verwendung eines auf pWUB basierenden Vektors zur Proteinexpression in *H. elongata* wurde der verwendete *H. elongata*-Stamm mit dem entsprechenden Vektor in MM63-Medium mit Chloramphenicol (50 µg/mL) angezogen. Die Salzkonzentration richtete sich nach der

Toleranz des verwendeten *H. elongata*-Stammes. Eine zusätzliche Induktion der Expression entfiel, da die Expression durch den Salzgehalt des Mediums induziert wird. Geerntet wurden die Kulturen in der spät-exponentiellen bis früh-stationären Wachstumsphase, die Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

9.3 Zellaufschluss

Der Aufschluss der wie unter II9.2 gewonnenen Zellpellets zur weiteren Proteingewinnung erfolgte unter Kühlung in einem Ultraschallgerät (Sonifier Cell Disruptor B15, Branson). Hierzu wurde das Zellmaterial auf Eis aufgetaut, in einem Mindestvolumen von 5 mL Lysispuffer I (His₆-tag-Reinigung) bzw. Waschpuffer II (*Strep*[®]-tag-Reinigung) resuspendiert und der Zellaufschluss mit einem Pausenzeitintervall von 50 % durchgeführt (1 min/mL Zellsuspension). Das gewonnene Zell-Lysat wurde entweder auf 2 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert und in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5415 R, 4 °C, 12.000 rpm, 30 min) oder bei größeren Mengen in der Beckmann-Zentrifuge (Avanti[™], J-20 XP) mit JA-25,50-Rotor (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). Die Überstände wurden vereinigt.

9.4 Gewinnung, Reinigung und Quantifizierung von Protein

9.4.1 Affinitäts-Chromatographie

Um heterolog exprimierte Proteine leicht von dem Gesamtzellprotein des Expressionsorganismus isolieren zu können, wurde in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Affinitäts-tags gearbeitet, die an das Zielprotein fusioniert wurden: Der His₆-tag (Poly-Histidin-tag), der spezifisch an Säulenmaterialien mit komplexierten Ni²⁺-Ionen bindet, sowie der *Strep*[®]-tag II, ein aus 8 Aminosäuren bestehendes Peptid der Sequenz WSHPQFEK, das spezifisch an Streptavidin bindet.

9.4.1.1 Chromatographie mit His-tag

Die Aufreinigung der mit einem His-tag versehenen Ectoin-Synthase erfolgte an einer Agarosematrix mit über Nitrilotriessigsäure (NTA) gebundenen Ni-Ionen (Ni-NTA His-Bind[®] Superflow[™], Novagen, Madison/WI, USA).

Durchführung

Das wie in II9.3 beschrieben gewonnene Lysat (resuspendiert in Lysispuffer I) wurde mit 1-5 mL Ni-NTA-Agarose-Aufschwämmung versetzt und für 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz auf eine Polypropylen-Durchfluss-Säule mit Fritte (Qiagen,

Hilden) gegeben und gewartet, bis die Matrix sich gesetzt hat. Der Durchfluss sowie die folgenden Fraktionen wurden für eine weitere Analyse mittels SDS-PAGE aufgefangen. An der Matrix erfolgten Waschschriffe mit zunächst 10-20 mL Lysispuffer I, anschließend mit 10-20 mL Waschpuffer I. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit 1-5 mL Elutionspuffer I.

9.4.1.2 Chromatographie mit *Strep*[®]-tag

Die Aufreinigung der mit einem *Strep*[®]-tag II versehenen Ectoin-Synthase erfolgte an einer *Strep*-Tactin[®]-Sephacrose[®]-Matrix (IBA, Göttingen).

Durchführung

Das wie in II9.3 beschrieben gewonnene Lysat (resuspendiert in Waschpuffer II) wurde auf eine *Strep*-Tactin[®]-Sephacrose[®]-Säule (Matrixvolumen: 2 mL) in einer Polypropylen-Durchfluss-Säule mit Fritte (Qiagen, Hilden) gegeben. Der erste Durchfluss wurde gesammelt, anschließend wurde die Säule gewaschen mit insgesamt 10 mL Waschpuffer II (aufgefangen in zwei 5 mL-Fractionen). Eluiert wurde mit 1 mL Elutionspuffer II (aufgefangen in fünf 0,2 mL-Fractionen). Der Verlauf der Reinigung wurde anhand der gesammelten Fractionen mittels SDS-PAGE überprüft. Die Regeneration der Säule erfolgte nach Herstellerangaben durch dreimaliges Waschen mit je fünf Säulenvolumen Regenerationspuffer.

9.4.2 Native Reinigung ohne Fusions-tag

9.4.2.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Aussalzung ist eine Methode der Protein-Fällung, die darauf beruht, dass Salze die hydrophoben Effekte in der Lösung vergrößern und somit die Proteinaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen fördern. Das antichaotrope (kosmotrope) Salz Ammoniumsulfat wird am häufigsten zur Proteinfällung genutzt, da es in Konzentrationen oberhalb von 0,5 M die biologische Aktivität von Proteinen schützt (Lottspeich und Engels 2006).

Durchführung

Zunächst erfolgte ein Zellaufschluss (vgl. II9.3) des wie in II9.2 beschrieben produzierten Zellmaterials. Hierzu wurden ca. 0,7 g Zellmaterial in 10 mL Lysispuffer II resuspendiert. Das nach der Zentrifugation gewonnene Lysat wurde mit Ammoniumsulfat-Stammlösung (4 M) versetzt (1,67 mL Ammoniumsulfat-Stammlösung / 1 mL Lysat) und 5 min auf Eis inkubiert. Der

im anschließenden Zentrifugationsschritt (Beckmann, JA 25.50, 15.000 rpm, 20 min, 4 °C) gewonnene Überstand wurde für die hydrophobe Interaktionschromatographie verwendet.

9.4.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die hydrophobe Interaktionschromatographie (*hydrophobic interaction chromatography*, HIC) beruht darauf, dass die unpolaren Oberflächenregionen eines Proteins bei hohen Salzkonzentrationen an die schwach hydrophoben Liganden einer stationären Phase adsorbieren (Lottspeich und Engels 2006). Die Elution der Proteine erfolgt durch eine Verringerung der Salzkonzentration, die in dieser Arbeit schrittweise durchgeführt wurde.

Für die hydrophobe Interaktionschromatographie wurden 5 mL-HiTrap™ Phenyl HP-Säulen (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) in Kombination mit einer 20 mL-Spritze mit Schraubgewinde verwendet. Der HIC-Puffer wurde mit Ammoniumsulfat-Konzentrationen zwischen 0 M und 2 M eingesetzt, im Folgenden wird die Molarität des Ammoniumsulfats der Pufferbezeichnung angehängt (z.B. HIC-P-1.4 für HIC-Puffer mit 1,4 M Ammoniumsulfat).

Durchführung

Die in 20 % (v/v) Ethanol gelagerte Säule wurde zunächst mit 20 mL HIC-P-0 und 10 mL HIC-P-2 gespült. Anschließend erfolgte der Probenauftrag durch Beladen der Säule mit dem in II9.4.2.1 gewonnenen Überstand. Eine Elution der Proteine erfolgte durch aufeinanderfolgende Waschschriffe mit 10 mL HIC-P-2, 10 mL HIC-P-1.6, 10 mL HIC-P-1.4, 12 mL HIC-P-1.2, 10 mL HIC-P-1 und 10 mL HIC-P-0. Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen (die Fraktion von HIC-P-1.2 in 2 mL-Volumina) und für eine spätere Analyse mittels SDS-PAGE aufbereitet (vgl. II9.4.6).

9.4.3 Dialyse

Eluate aus der Ni-NTA-Reinigung (vgl. II9.4.1.1) sowie der HIC-Reinigung (vgl. II9.4.2.2) wurden im Anschluß an die Elution dialysiert, um die Imidazol- bzw. Ammoniumsulfat-Konzentration zu verringern.

Hierzu wurden die Eluate der Ectoin-Synthase in einen Dialyseschlauch (ZelluTrans, Roth) überführt und über Nacht bei 4 °C gegen 2 L Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,5) äquilibriert.

9.4.4 Aufkonzentrieren von Proteinen

Proteinlösungen aus den verschiedenen Aufreinigungen (vgl. II9.4.1 bzw. II9.4.2) wurden mittels Microcon YM-10 Zentrifugen-Membranfiltereinheiten der Firma Millipore (Schwalbach/Ts.) aufkonzentriert. Durch die Membran-Ausschlussgröße von 10 kDa können Wasser und Pufferbestandteile die Membran passieren, während Proteine ab einer Größe von ca. 10 kDa zurückgehalten werden.

9.4.5 Gesamtzellprotein-Isolierung

Zur Analyse von Gesamtzellprotein-Proben wurde ein von Brünig (2005) entwickeltes Protokoll verfolgt, bei dem durch Abtrennung von Zelltrümmern und Hydrolyse der DNA Proteinsuspensionen hergestellt werden, die leicht mittels BCA-Test quantifizierbar sind.

Durchführung

Zellpellets aus 10 mL-Proben wurden auf Eis aufgetaut und in 200 µL Resuspensionspuffer durch Vortexen resuspendiert. Zur Zell-Lyse wurden 2 µL Lysozym-Stammlösung zugegeben, durch Vortexen gemischt und die Ansätze unter zwischenzeitlichem Invertieren für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 µL SDS-Lösung (10 % (w/v)) wurden die Ansätze weitere 30 min auf Eis inkubiert. Zur Hydrolyse der DNA wurden 2 µL DNase I-Stammlösung und 1 µL MgCl₂-Lösung zugegeben und die Ansätze für weitere 1,5 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für mindestens 30 min bei -20 °C eingefroren und dann ca. 45 min im eisgekühlten Ultraschallwasserbad behandelt. Durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 30 min, 4 °C) wurden Zelltrümmer sowie unlösliche Proteine abgetrennt. Die Überstände wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung (BCA-Test, SDS-PAGE) bei -20 °C gelagert.

9.4.6 TCA-Fällung

Proben aus der HIC (vgl. II9.4.2.2) mussten aufgrund der hohen Ammoniumsulfat-Konzentration vor der Analyse mittels SDS-PAGE aufbereitet werden. Hierzu wurden die Proteine mittels Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt und anschließend in H₂O resuspendiert.

Durchführung

Jeweils 1 mL Probe wurde mit 100 µL TCA-Lösung (1 g/100 mL) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Pellets zweimal mit 100 µL eiskaltem Aceton (80 % (v/v))

gewaschen. Anschließend erfolgte wieder ein Zentrifugationsschritt (10 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde wieder entfernt und die Pellets bei 60 °C getrocknet. Für die SDS-PAGE wurden die Pellets in 60 µL H₂O_{reinst} resuspendiert und wie unter II9.5.1 beschrieben weiterbehandelt.

9.4.7 BCA-Assay zu Quantifizierung

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde ein „BCA Protein Assay Kit“ (Uptima, Montluçon, Frankreich) verwendet. Diese Methode kombiniert die Biuret-Reaktion mit der Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA) zur Proteinquantifizierung (Smith *et al.* 1985).

Die Quantifizierung von Proteinproben erfolgte in Mikrotiterplatten. Für eine Kalibrierungsreihe wurden BSA-Lösungen in definierten Konzentrationen mitgemessen. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Die Absorption der Proben wurde in einem Plattenlesegerät (infinite M 200, Tecan, Crailsheim) photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

Gesamtzellprotein-Proben (vgl. II9.4.5) wurden 1:50 mit H₂O_{reinst} verdünnt, Eluat aus Protein-Aufreinigungen wurde zwischen 1:5 und 1:100 verdünnt.

9.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird angewendet zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Im Vergleich zu Agarose-Gelen bilden Polyacrylamid-Gele Poren mit einer besser definierten Form und Größe und bieten weiterhin eine Erhöhung von Auflösungsvermögen und Stabilität. Zusammengesetzt sind Polyacrylamid-Gele aus den beiden Komponenten Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid. In Anwesenheit freier Radikale polymerisiert Acrylamid zu langen Ketten, die durch das N,N'-Methylen-Bisacrylamid über Methylgruppen quervernetzt werden. Die freien Radikale werden durch Ammoniumpersulfat bereitgestellt und die gesamte Reaktion wird katalysiert durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin). Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid in den Gelen reguliert die Größe der Poren, und der Gesamtanteil an Acrylamid kontrolliert die Dichte der Vernetzungen, so dass die Auflösung der Gele mit dem Anteil an Polyacrylamid zunimmt. Folglich gibt man zur Definition von Polyacrylamid-Gelen die Totalacrylamidkonzentration (T) und den Anteil des Quervernetzers Bisacrylamid (C) an.

Neben der Größe haben auch Eigenladung und Tertiärstruktur einen großen Einfluss auf das Laufverhalten von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel. Um diese Einflüsse zu verringern, kann eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden (Zugabe von SDS) und reduzierenden (Zugabe von DTT) Bedingungen durchgeführt werden. Das Detergenz SDS (*sodiumdodecylsulfate*) behindert die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein-Seitengruppen und maskiert zusätzlich die Eigenladung des Proteins, da die Sulfonsäure-Gruppen des SDS eine dem Molekulargewicht proportionale negative Ladung einbringen. Im Bereich der Sättigung werden pro 1 g Polypeptid 1,4 g SDS gebunden (Lottspeich und Engels 2006). Beim Vorliegen von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken ist der Zusatz eines reduzierenden Agens (z. B. DTT, Dithiothreitol) erforderlich, um ein Laufverhalten entsprechend dem Molekulargewicht zu erzielen.

Um stark fokussierte Proteinbanden zu erhalten bietet sich die diskontinuierliche SDS-PAGE als Optimierung der normalen SDS-PAGE an. Bei dieser Methode werden die Proben zunächst in einem Sammelgel (pH 6,8) fokussiert, die eigentliche Auftrennung erfolgt anschließend in einem Trenngel (pH 8,8). Der Elektrodenpuffer enthält Glycin-Ionen, welche aufgrund des pH-Werts nahe dem isoelektrischen Punkt im Sammelgel eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität haben (Folge-Ionen). Die Chlorid-Ionen der Gelpuffer dagegen weisen eine hohe Mobilität auf (Leit-Ionen). Der dadurch hervorgerufene Feldstärkegradient führt zu dem sogenannten Stapeleffekt: Die Proteine wandern zwischen den Folge- und Leit-Ionen langsam in die Gelmatrix und werden vorgetrennt und fokussiert. Beim Erreichen des Trenngels werden die Proteine durch den Reibungswiderstand des engporigen Trenngels verlangsamt und die Glycin-Ionen überholen den Proteinstapel. Ab diesem Punkt erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe (Lottspeich und Engels 2006).

Die Größe der untersuchten Proteine kann durch Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen bekannter Größe (Proteinmarker) bestimmt werden.

9.5.1 Probenvorbereitung

Proben für die SDS-PAGE wurden mit denaturierendem und reduzierendem Probenpuffer (4 x RSB) versetzt und für 5 - 10 min bei 70 – 100 °C erhitzt.

Zur Analyse von Gesamtzellprotein-Proben wurden zunächst Proteinsuspensionen hergestellt (vgl. II.9.4.5), diese mittels BCA-Assay quantifiziert (vgl. II.9.4.7) und das Volumen der Probe so gewählt, dass exakt 20 µg Gesamtzellprotein auf das Gel aufgetragen wurden.

II Material und Methoden

Proben aus Proteinreinigungen mittels Affinitäts-Chromatographie (vgl. II9.4.1) wurden ohne vorherige Quantifizierung in die SDS-PAGE eingesetzt. Proben aus Proteinreinigungen mittels HIC (vgl. II9.4.2) wurden zunächst einer TCA-Fällung unterzogen (vgl. II9.4.6) und nach Zugabe des Probenpuffers gegebenenfalls nachtitriert (0,1 M NaOH) bis der enthaltene Indikator Bromphenolblau wieder einen blauen Farbton annahm.

9.5.2 Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE erfolgte in Gelkammern der Firma BioRad (Hercules, Californien, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 5 angegeben. Die Trenngele wurden während des Polymerisationsvorgangs mit Ethanol (70 % (v/v)) überschichtet. Nach dem Auftragen der Proben sowie eines Proteinmarkers wurde die Gelkammer an eine Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply PS 3001, GibcoBRL) angeschlossen. Während des Laufs im Sammelgel wurde eine Spannung von 60 V angelegt, der Lauf im Trenngel erfolgte bei 100 V.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Trenngel (T = 13 %)		Sammelgel (T = 4 %)	
Trenngelpuffer	2,50 mL	Sammelgelpuffer	1,25 mL
Acrylamid-Mix	6,50 mL	Acrylamid-Mix	1,00 mL
SDS (10 %)	0,10 mL	SDS (10 %)	0,05 mL
H ₂ O _{reinst}	0,90 mL	H ₂ O _{reinst}	2,70 mL
Zum Polymerisieren (bei beiden Gelen):			
APS (10 %) 50 µL			
TEMED 5 µL			

9.5.3 Coomassie-Färbung

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen bietet sich mit einer Nachweisgrenze von ca. 5 µg die Coomassie-Färbung an. Dieser Farbstoff bindet unter sauren Bedingungen irreversibel an Proteine und macht diese somit als blaue Bande im Gel sichtbar.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Polyacrylamid-Gele zunächst für 5 min in H₂O_{demin} gewaschen und anschließend für 60 min in einer Coomassie-Färbelösung (Page Blue Protein Staining Solution, Fermentas, St. Leon-Rot) geschüttelt (IKA Vibrax, VWR, Staufen). Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch Waschschrte mit H₂O_{demin}.

9.5.4 Gel-Trocknung

Zur Dokumentation und Aufbewahrung wurden die Polyacrylamid-Gele mittels eines Vakuumtrockners (Gel Dryer, MGD-4534, VWR, Staufen) bei 80 °C für 2 h auf Whatman-Papier aufgetrocknet. Anschließend wurden die Gele einlaminiert und somit unbegrenzt lagerbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele anschließend eingescannt und konnten digital bearbeitet werden.

9.6 Strukturanalyse von Proteinen

9.6.1 Uniforme Markierung mit ¹⁵N

Die Expression uniform markierter Proteine erfolgte in einem modifizierten Mineralsalzmedium MM63 (vgl. II.2.3), in dem die einzige N-Quelle durch Ammonium-¹⁵N-Sulfat gestellt wurde. Die Expression mittels pET-Vektor in *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte in diesem Medium ansonsten wie unter II.9.2 beschrieben. Das verwendete Volumen der Hauptkultur betrug insgesamt 2 L.

9.6.2 NMR-Messung und Kristallisation

Erste Versuche zur Strukturaufklärung der Ectoin-Synthase mittels ¹⁵N-NMR sowie Kristallisation erfolgten in der Gruppe von Prof. David W. Rice im Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, Sheffield, UK.

Hierzu wurde das in dieser Arbeit produzierte Zellmaterial aus Expressionskulturen (EctC mit His-tag, EctC ohne Affinitäts-tag, EctC-10 ohne Affinitäts-tag sowie EctC markiert mit ¹⁵N) auf Trockeneis nach Sheffield verschickt. Die Reinigung des Enzyms mittels Affinitätschromatographie bzw. hydrophober Interaktionschromatographie sowie anschließender Gelfiltration erfolgte ebenso wie die Durchführung der ¹⁵N-NMR-Messungen und die Kristallisationsversuche durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe um Prof. David W. Rice.

9.7 Gelfiltration (FPLC)

Die Gelfiltration im Rahmen einer FPLC (*fast protein liquid chromatography*) wurde als eine Methode der Größenausschlusschromatographie genutzt, um die native Größe der Ectoin-Synthase und deren Oligomerisierungs-Status zu klären. Bei der Gelfiltration werden Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Diese Trennung beruht auf einer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Moleküle in einer porösen Matrix mit kontrollierter Porengröße. Während Moleküle ab einer bestimmten Größe nicht mehr in die Poren der Matrix eindringen können und somit in der Lösungsmittelfront eluieren, werden

II Material und Methoden

kleinere Moleküle durch das Eindringen in die Poren verzögert und haben eine längere Aufenthaltsdauer in der Matrix. Die kleinsten Moleküle werden folglich zuletzt eluiert. Bei der Gelfiltration fungiert die mobile Phase lediglich als Lösungsmittel und hat keinen Einfluss auf den Trenneffekt.

Durchführung

Die Anlage für die Gelfiltration bestand aus den folgenden Komponenten:

- Hochpräzisionspumpe P-500, Pharmacia (Uppsala, Schweden)
- Probenaufgabeventil V-7, Pharmacia (Uppsala, Schweden)
- Säule HiLoad™ 16/60, Superdex™ 75 pg, prep grade, GE Healthcare
- UV/VIS Filter-Photometer $\lambda=280$ nm (Knauer)
- Fraktionssammler (684 Büchi, Schweiz)
- Kühlwasserbad (RMT6, mgw Lauda)

Die Trennung erfolgte mit einer Flussrate von 1 mL/min bei 4 °C. Hierzu wurde die Säule über ein Kühlwasserbad gekühlt. Die Fraktionierung des Eluats erfolgte mit 120 sec/ Fraktion. Als Probe diente mit His-tag gereinigte Ectoin-Synthase nach Dialyse und Konzentrierung (vgl. II9.4.3 und II9.4.4), das Probenvolumen betrug 1 mL.

Kalibrierung der Säule

Zur Kalibrierung der Gelfiltrations-Säule wurde 1 mL eines Proteingrößenmarkers (Gel Filtration Calibration Kit LMW, GE Healthcare) unter den oben beschriebenen Bedingungen aufgetrennt.

Tabelle 6: Gel Filtration Calibration Kit LMW

Protein	Größe [kDa]	Konzentration
Aprotinin	6,5	3 mg/mL
Ribonuclease A	13,7	3 mg/mL
Carb. Anhydr.	29,0	3 mg/mL
Ovalbumin	43,0	4 mg/mL
Conalbumin	75,0	3 mg/mL

9.8 Aktivitäts-Assay für EctC

9.8.1 Photometrisch (Egler 2004, modifiziert)

Zur Charakterisierung der gereinigten Ectoin-Synthase wurden Enzymtests mit dem natürlichen Substrat N γ -Acetyl-L2,4-Diaminobuttersäure (ADABA) unter variablen Pufferbedingungen durchgeführt. Das bei der Reaktion entstehende Produkt Ectoin weist eine hohe UV-Absorption bei 220 nm auf, so dass der Verlauf der Reaktion am Photometer (Specord 210, Analytik Jena) verfolgt werden kann. Die Aufnahme der Messdaten erfolgte am angeschlossenen PC (Software WinASPECT, Version 2.2.0.0, Analytik Jena).

Durchführung

Für den photometrischen Enzymtest wurde Reaktionspuffer mit dem Substrat ADABA versetzt (Endkonzentration 0,25 mM) und 1 mL dieses Ansatzes in eine Quarzküvette überführt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 1-10 μ L Enzym-Lösung. Die Messung erfolgte bei 220 nm, zur Auswertung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde die lineare Anfangssteigung der erhaltenen Reaktionskurve ermittelt. Die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes, wobei für den Extinktionskoeffizienten von Ectoin ein Wert von $\epsilon_{220} = 4200 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ eingesetzt wurde (Egler 2004).

9.8.2 Mittels HPLC

Untersuchungen zum Substratspektrum der Ectoin-Synthase erfolgten *in vitro*; Proben der *in vitro*-Assays wurden mittels isokratischer HPLC bzw. FMOC-ADAM-HPLC analysiert.

Das zu untersuchende Substrat wurde in Reaktionspuffer gelöst (92 mM Endkonzentration für die meisten Versuche, variable Konzentrationen zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter), anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe der gereinigten Ectoin-Synthase gestartet. Die Versuchsansätze wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar nach Zugabe des Enzyms sowie in variablen Zeitabständen wurden Proben entnommen, zum Abstoppen der Reaktion mit dem gleichen Volumen Acetonitril (80 % (v/v)) versetzt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Analyse erfolgte je nach Substrat mittels isokratischer HPLC (vgl. II5.2) bzw. FMOC-ADAM-HPLC (vgl. II5.3).

10 Software und Internet-basierte Computeranalyse

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul *et al.* 1990)
- Clone-Manager 7: Version 7.03, Scientific & Educational Software, Durham, USA
- ClustalW2: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> WWW Service at the European Bioinformatics Institute, Rodrigo Lopez, Service Programme (Thompson *et al.* 1994)
- Plasmid Map Enhancer: Version 3.1, Scientific & Educational Software, Durham, USA
- Primer Designer: Version 3.0, Scientific & Educational Software, Durham, USA
- ExPASy Proteomics Server: <http://www.expasy.ch/>
- ProtParam tool: <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html> ExPASy Proteomics Server
- Translate tool: <http://www.expasy.ch/tools/dna.html> ExPASy Proteomics Server
- ACD/ChemSketch: Version 3.50, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada

11 Verwendete Chemikalien

Medien/Medienzusätze

Ampicillin (Amp) (für die Biochemie)	Merck, Darmstadt
Antibiotic broth medium No. 3	Oxoid LTD., Hampshire/ England
Carbenicillin (Carb)	Roth, Karlsruhe
Caseinhydrolysat (Säurehydrolyse)	Oxoid LTD., Hampshire/ England
Chloramphenicol (Cm)	Merck, Darmstadt
Citronensäure (zur Synthese)	Merck, Darmstadt
D-Glucose * H ₂ O (für die Biochemie)	Merck, Darmstadt
DMSO (p.a.)	Fluka, Buchs/ Schweiz
HCl (37 %, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Kanamycin (Km)	Fluka, Buchs/ Schweiz
Saccharose (für die Mikrobiologie)	Fluka, Buchs/ Schweiz
Select Agar	Gibco BRL, Paisly/ Schottland
Tri-Na-Citrat * 2 H ₂ O (zur Analyse)	Merck, Darmstadt

II Material und Methoden

Supplemente / Solute	
Acetyl-Ornithin	Homoectoin-Hydrolysat (Groß 2010)
ADPC	diese Arbeit
Albizziin (98 %)	Acros Organics, Geel/ Belgien
Betain (> 98 %)	Fluka, Buchs/ Schweiz
D(+)-Trehalose Dihydrat (≥ 99 %)	Fluka, Buchs/ Schweiz
DCE	Syntheseprodukt (Voß 2002)
DHMICA	Syntheseprodukt (Voß 2002)
DME	Syntheseprodukt (Voß 2002)
Ectoin	Isolat aus <i>H. elongata</i> , AG Galinski
Glutamin (> 99 %)	Sigma, Deisenhofen
Guanidino-Ectoin	Syntheseprodukt (Meffert 2011)
Homoectoin	Syntheseprodukt (Voß 2002)
Hydroxyectoin	Isolat aus <i>M. halophilus</i> , AG Galinski
Kreatin (≥ 99 %)	Fluka, Buchs/ Schweiz
L-2,4-Diaminobuttersäure Dihydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
L-Citrullin	Sigma, Deisenhofen
L-Pyroglutamat (L-5-Oxo-2-pyrrolidin-carboxylsäure)	Sigma, Deisenhofen
N-Carbamoyl-DABA (beide Formen)	diese Arbeit
Nε-Acetyl-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Pyroglutamamid (L-5-Oxo-2-pyrrolidin-carboxamid)	Sigma, Deisenhofen
α-ADABA	Ectoin-Hydrolysat, AG Galinski
γ-ADABA	diese Arbeit
Salze	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (reinst)	Merck, Darmstadt
CaCl ₂ * 2 H ₂ O (p.a.)	Merck, Darmstadt
FeSO ₄ * 7 H ₂ O (p.a.)	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄ (p.a.)	Roth, Karlsruhe
KCl (reinst)	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (p.a.)	Merck, Darmstadt
KOCN (Kaliumcyanat) (96 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
KOH (p.a.)	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ * 6 H ₂ O (reinst)	Merck, Darmstadt
MgSO ₄ * 7 H ₂ O (p.a.)	Merck, Darmstadt

II Material und Methoden

MnCl ₂ * 4 H ₂ O (p.a.)	Merck, Darmstadt
NaCl (p.a.)	Fluka, Buchs/ Schweiz
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O (p.a.)	Merck, Darmstadt
NaOH (p.a.)	Merck, Darmstadt
NH ₄ Cl (Rectapur)	VWR, Darmstadt
Lösungsmittel	
Aceton (für die Flüssigkeitschromatographie)	Merck, Darmstadt
Acetonitril (HPLC gradient grade)	VWR, Darmstadt
Chloroform (LiChrosolv)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) (100 %, Suprapur)	Merck, Darmstadt
Ethanol (p.a.)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (> 99,95 %)	Merck, Darmstadt
Methanol (Lichrosolv)	Roth, Karlsruhe
Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
THF (Tetrahydrofuran) (LiChrosolv)	Merck, Darmstadt
Pufferzusätze	
Borsäure (p.a.)	Fluka, Buchs/ Schweiz
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Eisessig (zur Synthese)	Merck, Darmstadt
Glycerin (99,5 %)	Serva, Heidelberg
Imidazol (99 %)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumacetat (99 – 100%)	Merck, Darmstadt
Na ₂ -EDTA (p.a.)	Serva, Heidelberg
Na-Acetat * 3 H ₂ O (p.a.)	Merck, Darmstadt
PIPES (≥ 99 %)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (p.a.)	Roth, Karlsruhe
Chemikalien für die Analytik	
ADAM (1-Aminoadamantan) (99 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deuteriumoxid (D ₂ O) (min. 99,9 %)	Merck, Darmstadt
FMOC-Chlorid (97 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na ₂ -NADH (≥ 97 %)	Fluka, Buchs/ Schweiz
Na-Pyruvat (krist.)	Serva, Heidelberg

II Material und Methoden

Natrium-Trimethylsilylpropionat (98 %)	Merck, Darmstadt
D/L-Norvalin (~99 %, NT)	Fluka, Buchs/Schweiz

Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten

1 kb DNA-Leiter #SM0321	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
100 bp ⁺ DNA-Leiter #SM0311	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
6x Ladepuffer	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
Agarose, Gentechn. Qual.	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix (2 mM)	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs/ Schweiz

Chemikalien für proteinbiochemische Arbeiten

Acrylamid 40 % (für die Elektrophorese)	Merck, Darmstadt
Ammonium- ¹⁵ N-Sulfat (98+ atom% ¹⁵ N)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (≥98 %)	BioRad, Hercules/ USA
Anhydrotetracyclin	IBA, Göttingen
Bisacrylamid 2 % (für die Elektrophorese)	Merck, Darmstadt
Bovine serum albumin (BSA)	Uptima, Montluçon/ Frankreich
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Dithiothreitol (>99 %)	Sigma, Deisenhofen
Glycin (zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG)	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ni-NTA His-Bind Superflow	Qiagen, Hilden
Page Blue Protein Staining Solution	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope	BioRad, Hercules/ USA
Prestained™ Protein Marker #SM0671	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
SDS-PAGE Laufpuffer	BioRad, Hercules/ USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS) (research grade)	Serva, Heidelberg
Strep-Tactin®-Sepharose®	IBA, Göttingen
Strep-tag® regeneration buffer	IBA, Göttingen
Trichloressigsäure (TCA) (>99,5 %)	Fluka, Buchs/ Schweiz

Enzyme

DNase I	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
---------	---------------------------------

II Material und Methoden

Fast-AP	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
Lactat-Dehydrogenase (LDH, rabbit muscle)	Fluka, Buchs/Schweiz
Lysozym	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
<i>Phusion</i> TM High-Fidelity-DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo/ Finnland
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen New England Biolabs, Schwalbach
RNaseA	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
Kits	
BCA-Assay: Protein Quantification Kit	Uptima, Montluçon/ Frankreich
Citronensäure-Test	r-Biopharm, Darmstadt
D-Glucose-Test	r-Biopharm, Darmstadt
Gel Filtration Calibration Kit LMW	GE Healthcare, Uppsala/ Schweden
peqlab peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen

III Ergebnisse

1 Genomische Deletion von *ectC*

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) war die Beteiligung der Ectoin-Synthase an der Umwandlung von Glutamin zu ADPC durch *in vitro* Enzymtests mit gereinigter Ectoin-Synthase aus *M. halophilus* gezeigt worden. ADPC als Bestandteil des Solutespektrums war jedoch *in vivo* in *H. elongata* nachgewiesen worden, so dass auch in diesem Organismus die Rolle der Ectoin-Synthase in der ADPC-Biosynthese gezeigt werden sollte. Eine solche Beweisführung sollte in Form einer Negativkontrolle erfolgen, indem das für die Ectoin-Synthase codierende Gen *ectC* aus dem Genom von *H. elongata* deletiert wird. Die resultierende Deletionsmutante sollte die Fähigkeit zur ADPC-Produktion verloren haben.

Die Deletion des Gens *ectC* durch homologe Rekombination mit einem $\Delta ectC$ -Fragment war bereits in der Diplomarbeit begonnen worden, indem Fragmente stromaufwärts und stromabwärts von *ectC* mittels SOE-PCR zu einem $\Delta ectC$ -Fragment fusioniert wurden, welches mit dem hydrolysierten Vektor pK18*mobsacB* ligiert wurde. Der konjugative Transfer des resultierenden Vektors pK18*mobsacB* $\Delta ectC$ von *E. coli* S17.1 in *H. elongata* WT bzw. *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$) und das 1. Cross-Over (Integration des Vektors in das bakterielle Genom) verliefen erfolgreich, jedoch konnte im Rahmen der Diplomarbeit kein erfolgreiches 2. Cross-Over nachgewiesen werden, bei dem das *ectC*-Gen im Genom gegen das Deletionsfragment ausgetauscht worden wäre (Witt 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente zur Erstellung einer *ectC*-Deletionsmutante wieder aufgenommen. Der Vektor pK18*mobsacB* $\Delta ectC$ wurde konjugativ in die Stämme *H. elongata* WT und *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$) transferiert. Die Selektion auf das 1. Cross-Over erfolgte mittels Kanamycinresistenz und es konnten für beide Stämme resistente Kolonien nachgewiesen werden. Auf ein erfolgreiches 2. Cross-Over wurde mittels Kolonie-PCR getestet. Unter Verwendung der Primer *ectCdown_R1* und *ectCup_F1* sollte eine WT- bzw. KB1-Kolonie ein PCR-Produkt mit einer Größe von 1441 bp aufweisen, eine *ectC*-Deletion dagegen sollte durch ein PCR-Produkt von 1027 bp nachgewiesen werden.

III Ergebnisse

Wie in Abbildung 5 beispielhaft zu sehen ist, konnte die genomische Deletion von *ectC* erfolgreich nachgewiesen werden. Da die Deletion in zwei verschiedenen *H. elongata*-Stämmen erfolgte, nämlich dem Wildtyp und der Mutante KB1 ($\Delta ectA$), resultieren aus diesem Projekt zwei neue Deletionsmutanten von *H. elongata*, die als ***H. elongata* WUB01** ($\Delta ectC$) und ***H. elongata* WUB02** ($\Delta ectAC$) bezeichnet wurden.

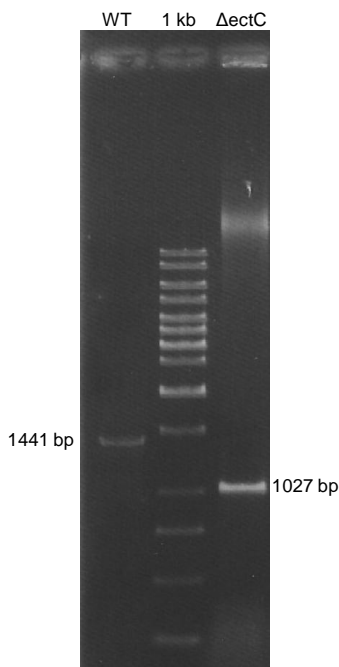


Abbildung 5: Nachweis der genomischen *ectC*-Deletion mittels Kolonie-PCR

WT: 1441 bp-Fragment weist das Vorhandensein des *ectC*-Gens im Genom des *H. elongata* Wildtyps nach. $\Delta ectC$: 1027 bp-Fragment zeigt die erfolgreiche Deletion des *ectC*-Gens in der Mutante WUB01. 1 kb: DNA-Größenmarker

1.1 Charakterisierung von *H. elongata* WUB01

Der neue *H. elongata*-Stamm WUB01 ($\Delta ectC$) wurde im Weiteren in Hinblick auf sein Wachstumsverhalten und seine Reaktion auf osmotischen Stress näher charakterisiert. Durch die Deletion der Ectoin-Synthase wurde ein Verlust der Ectoin-Biosynthese und damit einhergehend eine reduzierte Salztoleranz erwartet.

Untersuchungen des Wachstumsverhaltens zeigten, dass *H. elongata* WUB01 trotz der Deletion im Ectoinbiosyntheseweg einen breiten Toleranzbereich hinsichtlich verschiedener Salzkonzentrationen aufweist und in der Lage ist, in Minimalmedium NaCl-Konzentrationen bis zu 10 % (w/v) zu tolerieren (Daten nicht gezeigt). Das Wachstumsoptimum liegt im Bereich von

III Ergebnisse

2-3 % NaCl (vgl. Abbildung 6) und damit bei einer etwas niedrigeren Salinität als bei *H. elongata* WT, der sein Optimum im Bereich 3-5 % NaCl zeigt (Dötsch *et al.* 2008).

Im Weiteren wurde das Solutepektrum der Mutante *H. elongata* WUB01 mittels HPLC-Analyse untersucht. Hierbei zeigte sich zum einen, dass die Produktion von Ectoin durch die Deletion von *ectC* erfolgreich unterbunden wurde. So finden sich in *H. elongata* WUB01, gewachsen bei 3 % NaCl, unter 10 $\mu\text{mol/g}$ TG Ectoin, während *H. elongata* WT unter diesen Bedingungen etwa 400 $\mu\text{mol/g}$ TG akkumuliert (vgl. Abbildung 6, Tabelle 12). Durch Vektor-basiertes Einbringen des Gens *ectC* in die Mutante *H. elongata* WUB01 (vgl. III.6.3.1) wurde dagegen der Phänotyp des WT-Stammes wieder hergestellt (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass neben EctC wohl kein weiteres Enzym in *H. elongata* vorliegt, das die Funktion der deletierten Ectoin-Synthase übernehmen könnte. Zum anderen konnte bei der Untersuchung des Solutepektrums von *H. elongata* WUB01 die Akkumulation eines Intermediates der Ectoin-Biosynthese nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von der Salzkonzentration wird von der *ectC*-Deletionsmutante die N γ -Acetyl-diaminobuttersäure (ADABA) produziert und akkumuliert, wie in Abbildung 6 gezeigt.

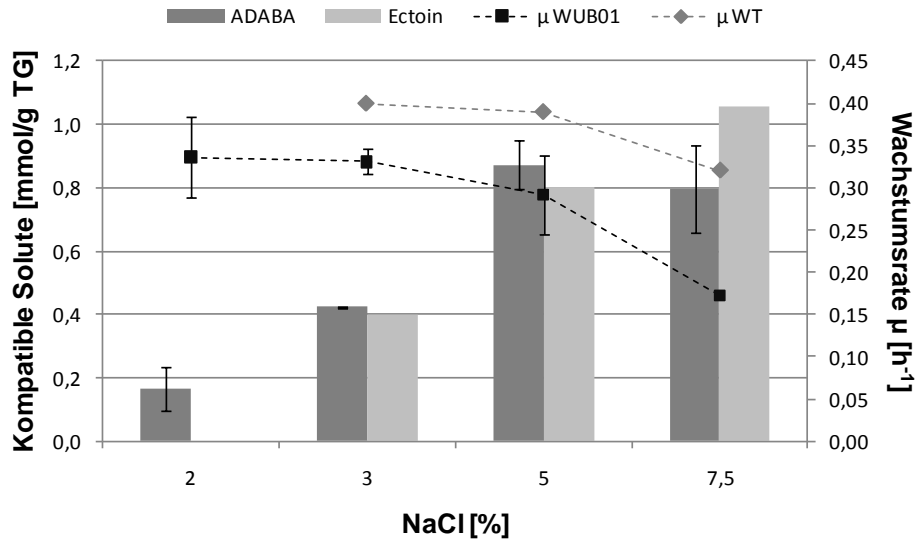


Abbildung 6: Salz-abhängige ADABA-Produktion in *H. elongata* WUB01

Dargestellt ist der intrazelluläre ADABA-Gehalt des Stammes *H. elongata* WUB01 (ΔectC) in Abhängigkeit von der extrazellulären NaCl-Konzentration [% (w/v)]. Im Vergleich wurde die entsprechende Ectoin-Produktion in *H. elongata* WT (Dötsch *et al.* 2008) bei 3-7,5 % NaCl der Graphik beigegefügt. Zusätzlich dargestellt sind die Wachstumsraten μ beider Stämme. Das Wachstum der Kulturen erfolgte in MM63-Medium bei 30 °C.

III Ergebnisse

Diese Akkumulation der ADABA resultiert aus dem Genotyp der Mutante, da ADABA als direkte Vorstufe des Ectoins fungiert und normalerweise durch die Ectoin-Synthase weiter umgesetzt wird. Durch die Deletion des Gens *ectC* kommt es zum Abbruch der Ectoin-Biosynthese und zur Akkumulation der Vorstufe. Beachtenswert ist jedoch die deutliche Salzabhängigkeit der ADABA-Akkumulation, die darauf hindeutet, dass die Schritte bis zu dieser Vorstufe durch die äußere Mediensalinität reguliert werden. Desweiteren zeigt sich, dass ADABA in ähnlichen Konzentrationen akkumuliert wird, wie Ectoin bei entsprechender Salinität im Wildtyp (vgl. Abbildung 6).

Das Vorliegen dieser hohen Mengen an ADABA erklärt die erhöhte Salztoleranz des Organismus *H. elongata* WUB01. Eine Funktion von ADABA als kompatibles Solut wurde bereits in der Literatur beschrieben (Cánovas *et al.* 1997; García-Esteba *et al.* 2006).

Ein Nachweis von ADPC konnte in der Mutante WUB01 nicht erfolgen. Während im *H. elongata* Wildtyp geringe Spuren nachweisbar sind, fehlt diese Substanz in der *ectC*-Deletionsmutante völlig. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass die Ectoin-Synthase auch in *H. elongata* alleine für die Umsetzung von Glutamin in ADPC verantwortlich ist.

1.2 Charakterisierung von *H. elongata* WUB02

Die Doppelmutante *H. elongata* WUB02 (Δ *ectAC*) wurde ebenso wie schon die Mutante WUB01 in Hinblick auf Wachstumsverhalten und Solutespektrum näher charakterisiert.

Auch *H. elongata* WUB02 wurde in Minimalmedium unterschiedlicher Salinität angezogen, um die Salztoleranz des Organismus zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass die Deletion des *ectC*-Gens zusätzlich zum *ectA*-Gen die Salztoleranz nicht noch weiter reduziert hat, denn wie auch schon die Mutante KB1 (Δ *ectA*) weist der Stamm WUB02 eine maximale tolerierbare Salzkonzentration von 5 % (w/v) im Minimalmedium auf (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung des Solutespektrums mittels HPLC zeigt die vollständige Abwesenheit von ADPC sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase. Somit verliert der Stamm KB1 durch die zusätzliche Deletion von *ectC* die Fähigkeit zur ADPC-Produktion, womit nachgewiesen wurde, dass die Ectoin-Synthase in *H. elongata* alleine für die ADPC-Bildung zuständig ist.

2 Produktion des natürlichen Substrats für EctC: ADABA

2.1 ADABA

N γ -Acetyl-diaminobuttersäure (ADABA) stellt als Intermediat der Ectoinbiosynthese die direkte Vorstufe des Ectoins und somit das natürliche Substrat für die Ectoin-Synthase dar. Um im Folgenden EctC näher zu charakterisieren ist das Vorhandensein eines geeigneten Substrats für Aktivitäts-Assays unabdingbar. ADABA ist jedoch kommerziell nicht erhältlich und wurde aus diesem Grund bislang durch alkalische Hydrolyse von Ectoin produziert. Dieses Verfahren bedeutet einen größeren Arbeits- und Kostenaufwand, da zunächst das bakteriell produzierte und chromatographisch gereinigte Ectoin wieder hydrolysiert und das Produkt aus dem Hydrolyseansatz gereinigt werden muss. Zum anderen entsteht bei der chemischen Hydrolyse von Ectoin neben der gewünschten γ -Form der ADABA auch die α -Form als Nebenprodukt (siehe Abbildung 7). Dies erschwert nicht nur die Reinigung einer reinen γ -Form sondern beeinflusst auch die Ausbeute des Produktionsprozesses.

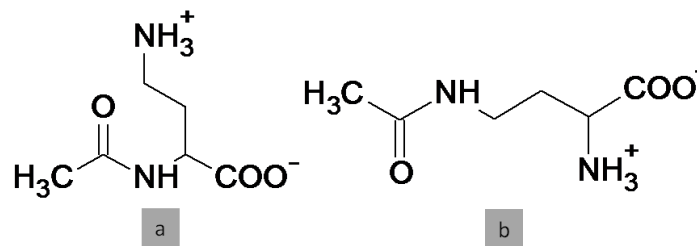


Abbildung 7: Formen der N-Acetyl-diaminobuttersäure. a: N α -ADABA, b: N γ -ADABA

Wie bereits gezeigt, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit *H. elongata* WUB01 (Δ ectC) eine Deletionsmutante von *H. elongata* konstruiert, die potentiell als Produktionsstamm für ADABA in Frage kommt (siehe III.1.1). Dieser Stamm bietet den Vorteil, dass während der Ectoinbiosynthese spezifisch die γ -Form der ADABA produziert wird und somit in *H. elongata* WUB01 ohne die α -Form als Nebenprodukt akkumuliert.

Ziel war es die Deletionsmutante *H. elongata* WUB01 als Produktionsstamm für ADABA zu etablieren und ein geeignetes Verfahren zur Gewinnung der Reinsubstanz zu entwickeln.

2.1.1 ADABA-Produktion mit *H. elongata* WUB01

Wie bereits in Abbildung 6 gezeigt, ist die ADABA-Akkumulation in *H. elongata* WUB01 abhängig von der Salinität des Mediums. Somit ist eine möglichst hohe Salzkonzentration Voraussetzung für eine hohe ADABA-Produktion und Ausbeute. Wie die Charakterisierung des Stammes (vgl. III.1.1) jedoch zeigt, nimmt die Wachstumsrate bei Salzkonzentrationen oberhalb von 3 % ab (siehe Abbildung 6), so dass zwischen hoher Ausbeute und möglichst kurzer Kulturdauer abgewägt werden muss. Dies lässt sich durch Berechnung der spezifischen Produktivität leicht darstellen, wofür der Solutgehalt mit der Wachstumsrate multipliziert wird (siehe Abbildung 8).

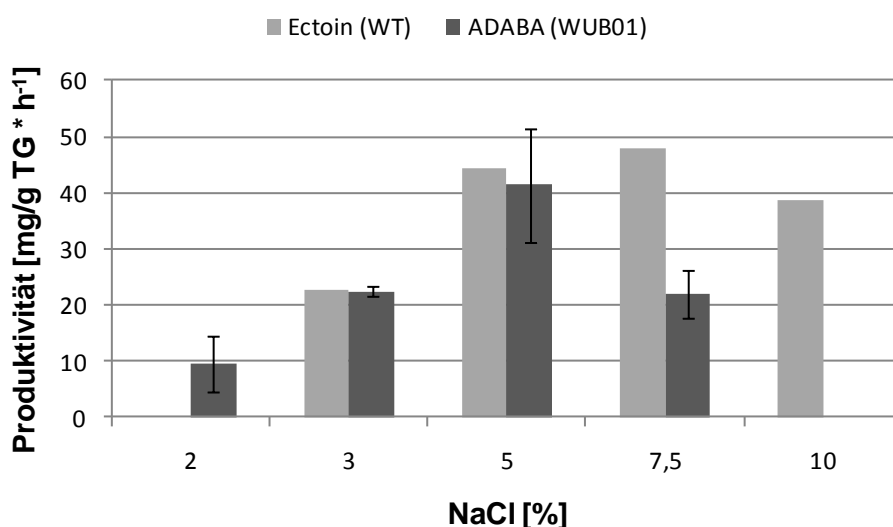


Abbildung 8: Produktivität der ADABA-Produktion mit *H. elongata* WUB01

Dargestellt ist die spezifische Produktivität des Stammes *H. elongata* WUB01 in mg ADABA * g TG⁻¹ * h⁻¹ in Abhängigkeit von der Mediensalinität. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Daten zur Ectoin-Produktion in *H. elongata* WT beigefügt (Dötsch *et al.* 2008). Die zu Grunde liegenden Solut-Konzentrationen und Wachstumsraten sind Abbildung 6 zu entnehmen. Für 10 % NaCl wurden keine Daten für *H. elongata* WUB01 ermittelt.

Wie in Abbildung 8 zu sehen, zeigt *H. elongata* WT die höchste Ectoin-Produktivität (ca. 48 mg * g TG⁻¹ * h⁻¹) bei einer Mediensalinität von etwa 7,5 % NaCl. Eine vergleichbare ADABA-Produktivität der Mutante *H. elongata* WUB01 wird mit ca. 40 mg * g TG⁻¹ * h⁻¹ bei einer Mediensalinität von etwa 5 % NaCl erreicht.

Eine Salzkonzentration von 7 % NaCl im Minimalmedium (MM63-7) erwies sich in dieser Arbeit dennoch als günstig, da eine Kulturdauer von ca. 20 - 25 h zu einer ausgewachsenen Kultur mit

III Ergebnisse

einem ADABA-Gehalt von 120-130 mg/g Trockengewicht führte (Daten nicht dargestellt). Durch eine Kultur im Fed-Batch-Verfahren mit Nachfütterung kann die Zelldichte der Kultur problemlos erhöht werden, ohne dass der ADABA-Gehalt in der Zelle abnimmt (Daten nicht dargestellt).

Eine weitere Optimierungsmöglichkeit der ADABA-Produktion mit dem Stamm *H. elongata* WUB01 bietet die Anwendung eines Salzschocks. Hierzu wurde der Stamm zunächst in MM63-3 angezogen, mit einer Salzkonzentration also, die dem Optimum für diesen Stamm entspricht und somit ein schnelles Wachstum ermöglicht. In der späten exponentiellen Wachstumsphase wurde ein Salzschock („Upshock“) durch Zugabe von kristallinem NaCl auf eine Salzkonzentration von 8 % NaCl durchgeführt. Die Analyse mittels HPLC zeigte einen Anstieg der intrazellulären ADABA-Konzentration von ca. 90 mg/g Trockengewicht bei 3 % NaCl auf ca. 190 mg/g Trockengewicht nach dem Schock auf 8 % NaCl. Diese Werte liegen höher als die in Abbildung 6 dargestellten ADABA-Gehalte, was sich möglicherweise dadurch erklären lässt, dass die Kultur hier in einem 500 mL-Maßstab in größeren Kulturgefäßen erfolgte und die Wachstumsbedingungen somit nicht vergleichbar sind. Die Anwendung eines Salzschocks bietet somit die Möglichkeit, eine optimale Wachstumsrate mit einer hohen ADABA-Ausbeute zu verbinden.

2.1.2 Extraktionsverfahren

Melken

Das sogenannte *bacterial milking* (Sauer und Galinski 1998) wird bereits großtechnisch zur Gewinnung von Ectoin aus *H. elongata* verwendet. Bei dieser Methode wird die Salzkonzentration des Mediums schlagartig erniedrigt, um die Zellen zum Ausschleusen der kompatiblen Solute über mechanosensitive Kanäle zu bewegen. Man spricht hier von einem sogenannten *downshock* oder vom „Melken“ der Bakterien.

In dieser Arbeit wurde versucht, die in *H. elongata* WUB01 akkumulierte ADABA mittels „Bakterienmelken“ (vgl. II6.1.1) aus den Zellen zu extrahieren. Hierzu wurde der Stamm zunächst wie unter III2.1.1 dargestellt kultiviert, geerntet, und das Pellet in H₂O_{demin} resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde mit dem Überstand weitergearbeitet. Tatsächlich enthielt dieser wässrige Überstand 80 - 95 % der von den Zellen produzierten ADABA (Daten nicht gezeigt), somit ist von einem erfolgreichen Melkprozess auszugehen. Die

III Ergebnisse

erhaltene wässrige ADABA-Lösung konnte anschließend mittels Rotationsverdampfer eingengt und in das anschließende Reinigungsverfahren eingesetzt werden.

Als Nachteil dieser Methode sollte nicht unerwähnt bleiben, dass für den Melkprozess große Mengen H_2O_{demin} verwendet werden müssen. Das Einengen größerer Volumina Wasser mittels Rotationsverdampfer stellt jedoch einen zeitaufwändigen Prozess dar, so dass nach weiteren Extraktionsverfahren gesucht wurde. Unter industriellem Gesichtspunkt jedoch birgt das Melkverfahren den Vorteil, dass die Biomasse nach der Extraktion für eine weitere Produktionskultur verwendet werden kann und sich durch ein solches zyklisches Verfahren eine deutlich höhere Produktivität erreichen lässt.

Extraktion mit Methanol

Die sogenannte Soxhlet-Extraktion mit Methanol als Lösungsmittel (vgl. II6.1.2) stellt eine effektive Methode zur Gewinnung von Soluten aus Bakterienzellen dar. In dieser Arbeit wurde eine solche Extraktion auch mit gefriergetrocknetem Zellmaterial von *H. elongata* WUB01 durchgeführt, um die akkumulierte ADABA aus den Zellen zu gewinnen. Es stellte sich jedoch heraus, dass mit dieser Methode lediglich ca. 10 % der in den Zellen enthaltenen ADABA extrahiert werden konnten (Daten nicht dargestellt). Dies konnte auf eine schlechte Löslichkeit der ADABA in Methanol zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde nach einer weiteren Methode zur ADABA-Extraktion gesucht.

Extraktion mit Ethanol

Die Verwendung von 80 %igem Ethanol zur Gewinnung von ADABA wurde bereits in der Literatur beschrieben (Cánovas *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde gefriergetrocknetes und gemörsertes Zellmaterial von *H. elongata* WUB01 direkt in 80 %igem Ethanol unter Rühren erhitzt, Zellbruchstücke durch Filtration entfernt und der gewonnene Extrakt für die weitere Reinigung verwendet. Mit einer Extraktionsausbeute von 80 - 90 % (Daten nicht dargestellt) stellte sich diese Methode als ähnlich effektiv wie die Melk-Methode heraus. Aufgrund des geringeren Volumens an benötigtem Lösungsmittel und der niedrigeren Siedetemperatur von Ethanol im Vergleich zu Wasser ist die weitere Aufbereitung des erhaltenen Extraktes mittels Rotationsverdampfer jedoch deutlich zeitsparender. Aus diesem

Grund wurde die Extraktion mit Ethanol als Standardverfahren für die ADABA-Gewinnung aus *H. elongata* WUB01 etabliert.

2.1.3 Downstream-Processing

Die Aufreinigung der ADABA verlief unabhängig von der Extraktionsmethode nach demselben Schema. Zunächst wurde das Lösungsmittel (Wasser im Fall der Melkmethode, 80 %iges Ethanol im Fall der Ethanol-Extraktion) mittels Rotationsverdampfer verdunstet, das zurückbleibende Produkt wurde wieder in einer geringen Menge Wasser aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Chloroformbehandlung zum Entfernen hydrophober Verunreinigungen wie z.B. Proteinen und Lipiden.

Da *H. elongata*-Mutanten, die ihre Fähigkeit zur Ectoin-Synthese verloren haben, häufig Glutamat in erhöhter Konzentration akkumulieren, um den osmotischen Stress auszugleichen, wurde als weiterer Reinigungsschritt eine Anionenaustausch-Chromatographie eingeführt. Hierbei durchläuft die zwitterionische ADABA das Säulenmaterial ohne zu binden. Anschließend kann das Säulenmaterial durch Spülen mit 1 M HCl regeneriert werden.

Im Anschluss wurden die nach der Anionenaustausch-Chromatographie gesammelten Fraktionen in eine Ionenverzögerungs-Chromatographie eingesetzt, um aus dem Medium sowie aus der vorangegangenen Anionenaustausch-Chromatographie stammendes NaCl vom Produkt ADABA abzutrennen. Eine Trennung von ADABA und NaCl konnte erfolgreich erreicht werden (Daten nicht dargestellt).

Die bei der Ionenverzögerungs-Chromatographie gesammelten und vereinigten Fraktionen wurden im Anschluss mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit vom Wasser befreit. ADABA bildete bei diesem Schritt wie in der Literatur (Liss 1962) beschrieben Nadel-förmige Kristalle aus (siehe Deckblatt). Das ¹³C-NMR-Spektrum (Abbildung 9) des Produkts zeigt die bereits zuvor beschriebenen Signale für ADABA (Cánovas *et al.* 1999) und bestätigt gleichzeitig, dass die Substanz ohne organische Verunreinigungen durch z.B. Glutamat vorliegt.

III Ergebnisse

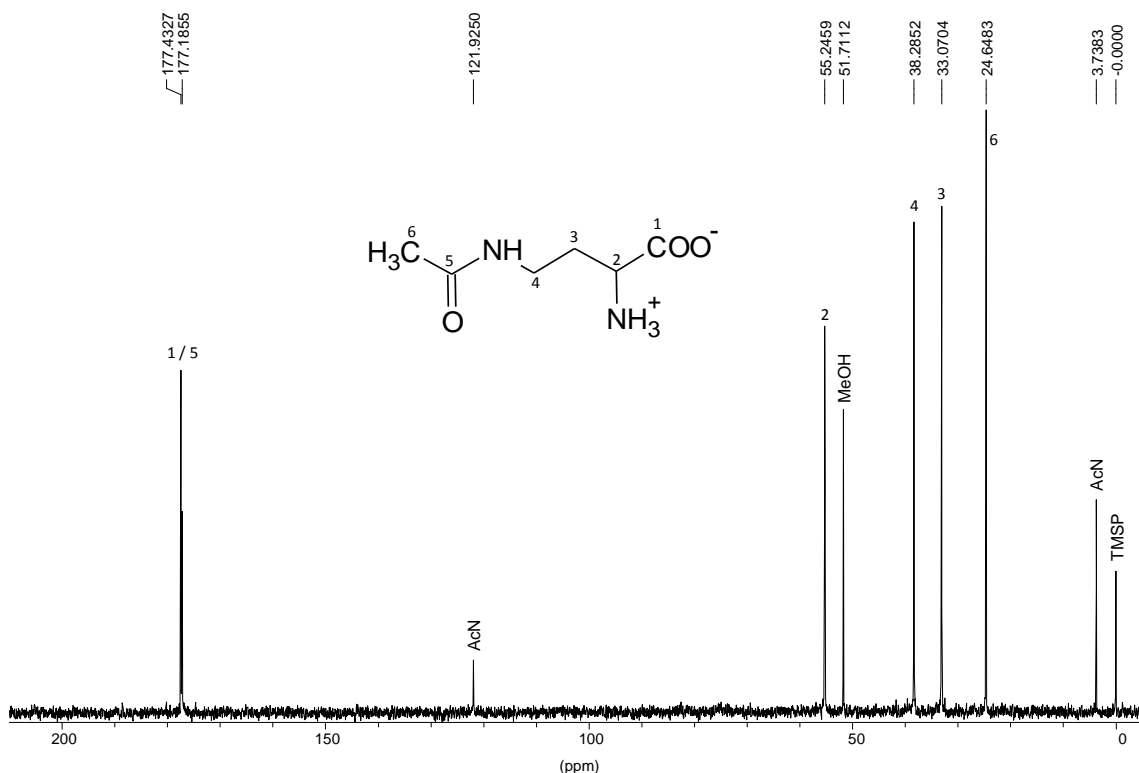


Abbildung 9: ¹³C- NMR der gereinigten ADABA

Neben den Signalen der ADABA sind deutlich die Signale der internen Standards Na-Trimethylsilylpropionsäure (TMSP), Acetonitril (AcN) und Methanol (MeOH) zu erkennen.

3 Chemische Synthese eines potentiellen alternativen Substrats: N-Carbamoyl-DABA

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Substratspektrum der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* untersucht werden (siehe Kapitel III.5.4), wozu auch einige unübliche potentielle Substrate benötigt wurden. Ein solches zu untersuchendes Substrat sollte die N_γ-Carbamoyl-Diaminobuttersäure (N-Carbamoyl-DABA) sein, die kommerziell nicht erhältlich ist und aus diesem Grund chemisch synthetisiert werden sollte. Die Synthese erfolgte wie beschrieben (siehe II.6.4) mit L-2,4-Diaminobuttersäure und Kaliumcyanat als Reaktanden. Theoretisch können bei der Reaktion zwei Produkte entstehen, nämlich neben der gewünschten N_γ-Carbamoyl-Diaminobuttersäure auch die α-Form (siehe Abbildung 10). Die Analyse des Syntheseproduktes mittels isokratischer HPLC bestätigte diese Vermutung, denn das HPLC-Spektrum zeigt zwei Signale, die mit ca. 7-minütigem Abstand in der Retentionszeit eluieren (Abbildung 10).

III Ergebnisse

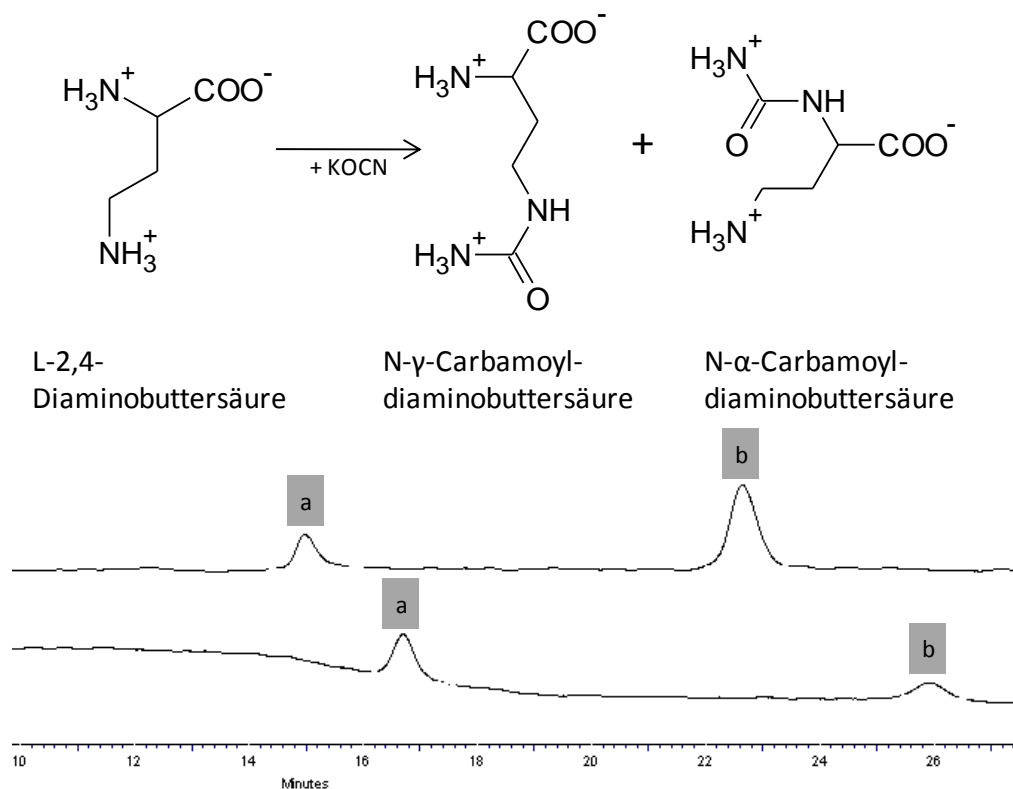


Abbildung 10: Synthese der N-C-DABA (oben) sowie RI-Spektren der Syntheseprodukte (unten)

Dargestellt sind die HPLC-RI-Spektren der Produkte zweier verschiedener Syntheseansätze. Im oberen Spektrum dargestellt ist eine Synthese bei neutralem pH-Wert, im unteren Spektrum zu sehen ist das Produkt einer Synthese bei alkalischem pH-Wert. Die HPLC-Analyse beider Syntheseansätze erfolgte mit großem zeitlichen Abstand, so dass es zu einer Verschiebung der Elutionszeiten kam. Die detektierten Synthese-Produkte a und b waren der α- bzw. γ-N-C-DABA aufgrund fehlender Standard-Substanzen nicht eindeutig zuzuordnen.

Vergleicht man das Ergebnis einer Synthese bei neutralem pH-Wert (pH 7,0-7,5) mit dem einer Synthese im Alkalischen (pH 10,5), so wird deutlich, dass sich das Verhältnis der beiden Produkte verschieben lässt (siehe Abbildung 10). Während im Neutralen das später eluierende Signal anteilig überwiegt, erhält man bei der Synthese im Alkalischen einen höheren Anteil des früher eluierenden Produktes.

Zur Reinigung wurde das Syntheseprodukt in eine Ionenverzögerungs-Chromatographie eingesetzt, um die hohen Salzkonzentrationen zu entfernen. Die vereinigten Fraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet und die erhaltene Trockensubstanz mittels ^{13}C -NMR analysiert (siehe Abbildung 11).

III Ergebnisse

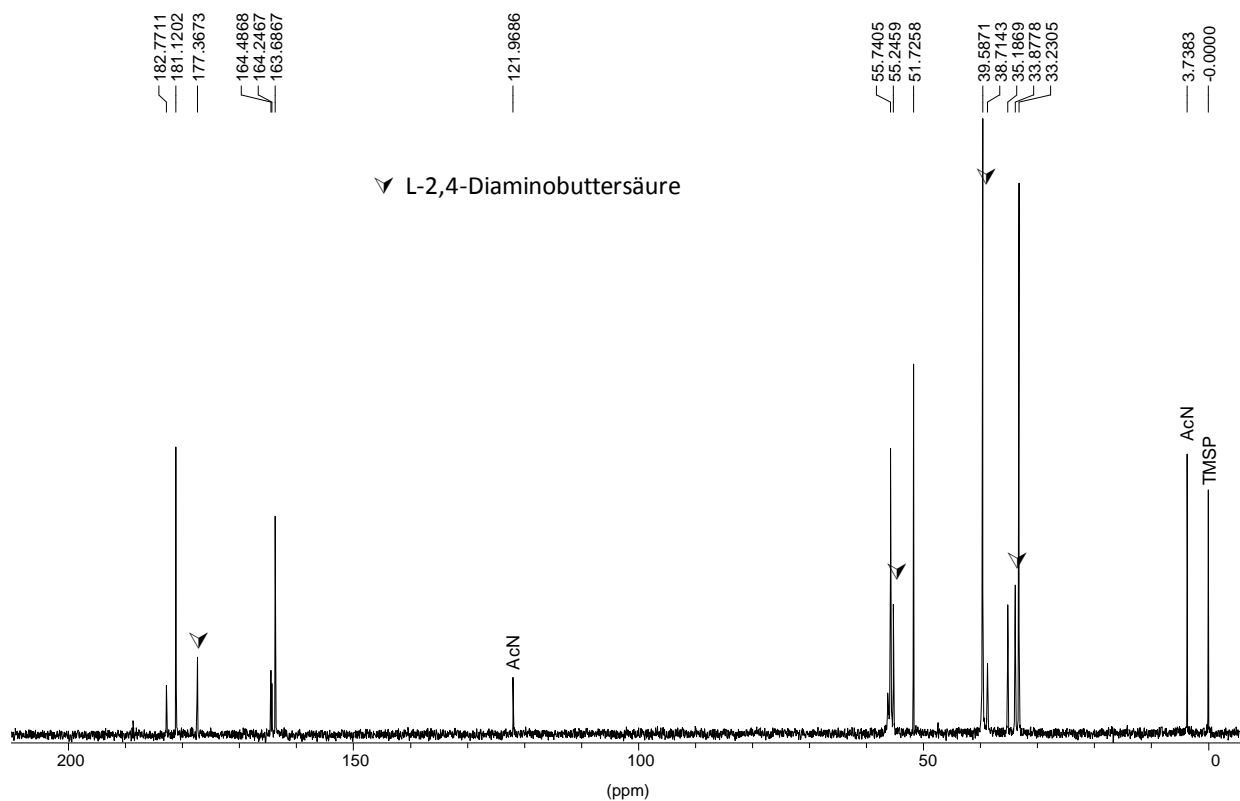


Abbildung 11: ^{13}C -NMR der N-Carbamoyl-DABA-Synthese im Alkalischen

Neben den markierten Signalen des Edukts L-2,4-Diaminobuttersäure sind die Signale der internen Standards Na-Trimethylsilylpropionsäure (TMSP) und Acetonitril (AcN) zu erkennen. Die weiteren Signale lassen sich aufgrund fehlender Standard-Substanzen nicht eindeutig der α - bzw. γ -N-C-DABA zuordnen.

Das NMR-Spektrum zeigt Signale von mehreren verschiedenen Substanzen. Zum einen liegt immer noch L-2,4-Diaminobuttersäure vor, die offensichtlich nicht komplett umgesetzt wurde. Diese ist mittels isokratischer HPLC nicht nachweisbar. Die weiteren Signale konnten den Produkten $\text{N}\alpha$ -Carbamoyl-DABA und $\text{N}\gamma$ -Carbamoyl-DABA nicht eindeutig zugeordnet werden, da für diese Substanzen kein Standard zur Verfügung stand. Für spätere Enzymtests wurde dieses Substanzgemisch ohne vorherige Trennung der Einzelsubstanzen eingesetzt.

4 Heterologe Expression des Enzyms EctC in *E. coli*

4.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

4.1.1 pET-Vektoren

Grundlage der in dieser Arbeit konstruierten Expressionsvektoren aus der pET-Familie ist der Vektor pET-22b(+), in den die im Folgenden beschriebenen verschiedenen Formen der Ectoin-Synthase kloniert wurden. Dieser kommerzielle Vektor bietet die Möglichkeit, unter Verwendung der geeigneten Schnittstellen einen C-terminalen His₆-tag an das Expressionprodukt zu fusionieren. Die im pET-22b(+)-Vektor kodierte *pelB*-leader-Sequenz wird bei Verwendung der *NdeI*-Schnittstelle deletiert und fehlt bei den in dieser Arbeit konstruierten Derivaten. Die Expression der Zielproteine erfolgt somit cytoplasmatisch.

4.1.1.1 Fusion mit His-tag

Zur vereinfachten Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie wurde das Gen *ectC* aus *H. elongata* zunächst derart in den Expressionsvektor pET-22b(+) kloniert, dass ein C-terminaler His₆-tag fusioniert wurde. Der resultierende Vektor wurde als pET-22b_ectC_Hel_His bezeichnet.

Zur Konstruktion des Vektors **pET-22b_ectC_Hel_His** wurde das Gen *ectC* aus *H. elongata* WT unter Verwendung der Primer *ectC_for_pet* und *ectC_rev_XhoI* amplifiziert. Durch diese beiden Primer wurden zwei Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt eingebaut: Im Bereich des *ectC*-Startcodons eine *NdeI*-Schnittstelle sowie eine *XhoI*-Schnittstelle stromabwärts von *ectC*. Auf das Stopcodon von *ectC* wurde hier verzichtet, um eine Fusionierung mit dem His₆-tag zu ermöglichen. Unter Ausnutzung der im Vektor enthaltenen *XhoI*-Schnittstelle können Gene über einen kurzen Spacer von zwei Aminosäuren (Leucin, Glutamat) mit der His₆-tag-Sequenz fusioniert werden. Die Konstruktion des Vektors pET-22b_ectC_Hel_His durch Einbau des *ectC*-Fragments in den pET-22b(+)-Vektor erfolgte anschließend wie in Abbildung 12 dargestellt.

III Ergebnisse

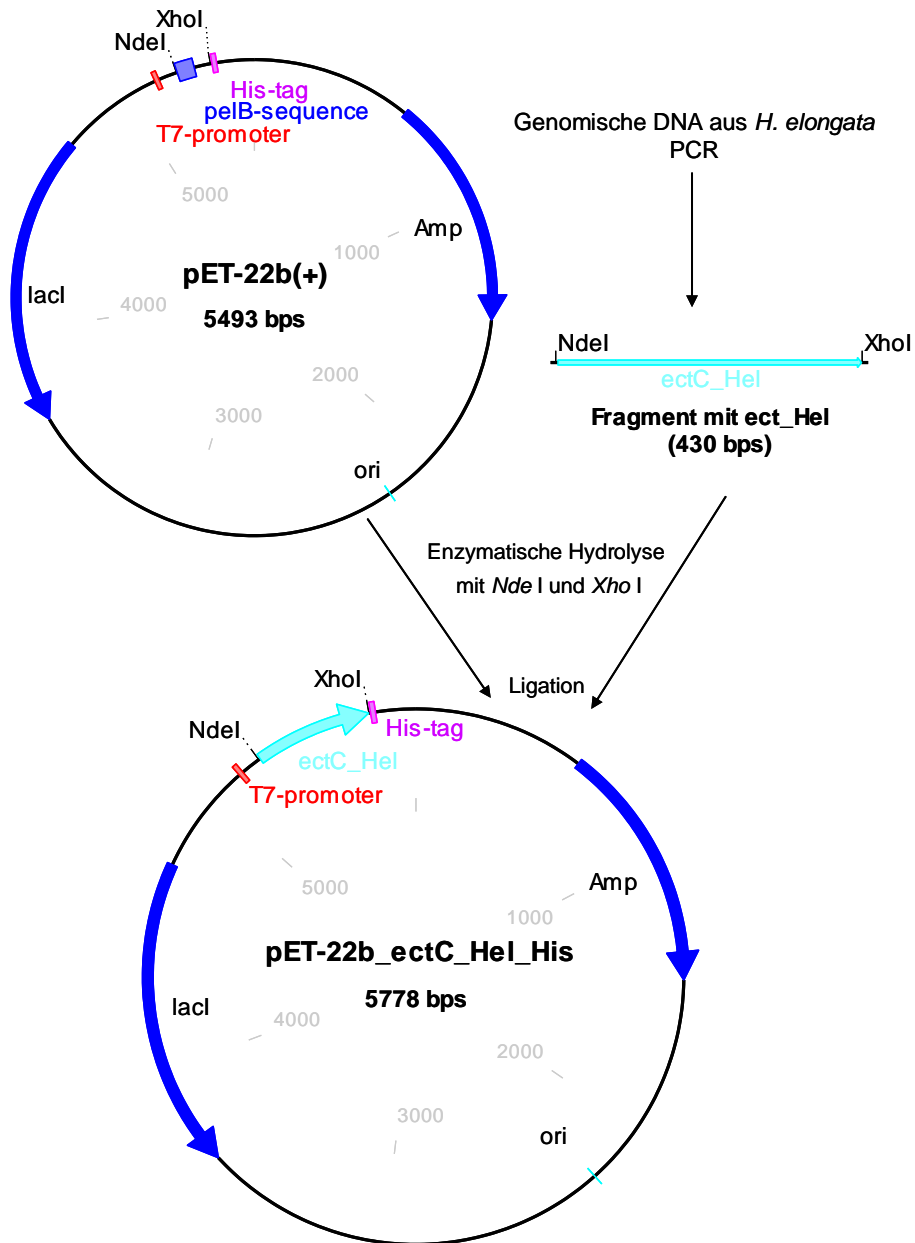


Abbildung 12: Konstruktion des Vektors pET-22b_ectC_Hel_His

Als Ausgangsvektor dient pET-22b(+). Die *pelB*-Sequenz des Ausgangsvektors wird durch die Verwendung der oben beschriebenen Restriktionsenzyme deletiert. Ein Ausschnitt der Vektor-Sequenz ist im Anhang zu finden (Abbildung 71).

Analog zu der Konstruktion des oben beschriebenen Vektors pET-22b_ectC_Hel_His wurde ein weiterer Expressionsvektor konstruiert, dessen Expressionsprodukt ein Fusionsprotein aus einer C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzten Ectoin-Synthase und einem C-terminalen His₆-tag ist. Als Primer zur Amplifizierung des verkürzten *ectC* aus *H. elongata* dienten *ectC_for_pet* sowie *ectC-10_XhoI*. Über den Primer *ectC-10_XhoI* wurde direkt downstream des letzten

III Ergebnisse

gewünschten Codons eine XhoI-Schnittstelle eingebaut, die wieder die Fusionierung über einen 2-Aminosäure-Spacer mit dem His₆-tag ermöglicht. Die Konstruktion des Vektors **pET-22b_ectC-10_Hel_His** erfolgte anschließend analog der Abbildung 12.

Tabelle 7 fasst die wichtigsten Eigenschaften der Expressionsprodukte von pET-22b_ectC_Hel_His und pET-22b_ectC-10_Hel_His zusammen.

Tabelle 7: Eigenschaften der mit einem His₆-tag versehenen Expressionsprodukte. Hervorgehoben sind der His₆-tag sowie die Spacer-Aminosäuren.

Name	AS	kDa	pI	Sequenz C-terminal
EctC_Hel_His	145	16,52	5,30	...APADEADDQKPLLE HHHHHH
EctC-10_Hel_His	135	15,44	5,58	...APLE HHHHHH

4.1.1.2 Native Expression ohne Fusions-tag

Um zu untersuchen, ob die Fusion mit einem C-terminalen His₆-tag Auswirkungen auf die Aktivität der Ectoin-Synthase hat, aber auch für die Strukturaufklärung des Enzyms und die Untersuchung der Rolle des C-Terminus wurden Expressionsprodukte nativer Sequenz benötigt, die nicht mit zusätzlichen Aminosäuren fusioniert wurden.

Zur Expression der vollständigen Ectoin-Synthase aus *H. elongata* wurde der Vektor **pET-22b_ectC_Hel** konstruiert. Hierzu wurde das Gen *ectC* aus *H. elongata* unter Verwendung der Primer *ectC_for_pet* und *ectC_rev_pet* vollständig inklusive Stopcodon amplifiziert. Durch Einbringen des Stopcodons ist eine Fusion mit der His₆-tag-Region ausgeschlossen. Durch die beiden Primer wurden zwei Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt eingebaut: Im Bereich des *ectC*-Startcodons eine *NdeI*-Schnittstelle sowie eine *NcoI*-Schnittstelle stromabwärts von *ectC*. Die weitere Konstruktion des Vektors pET-22b_ectC_Hel ist in Abbildung 13 dargestellt.

III Ergebnisse

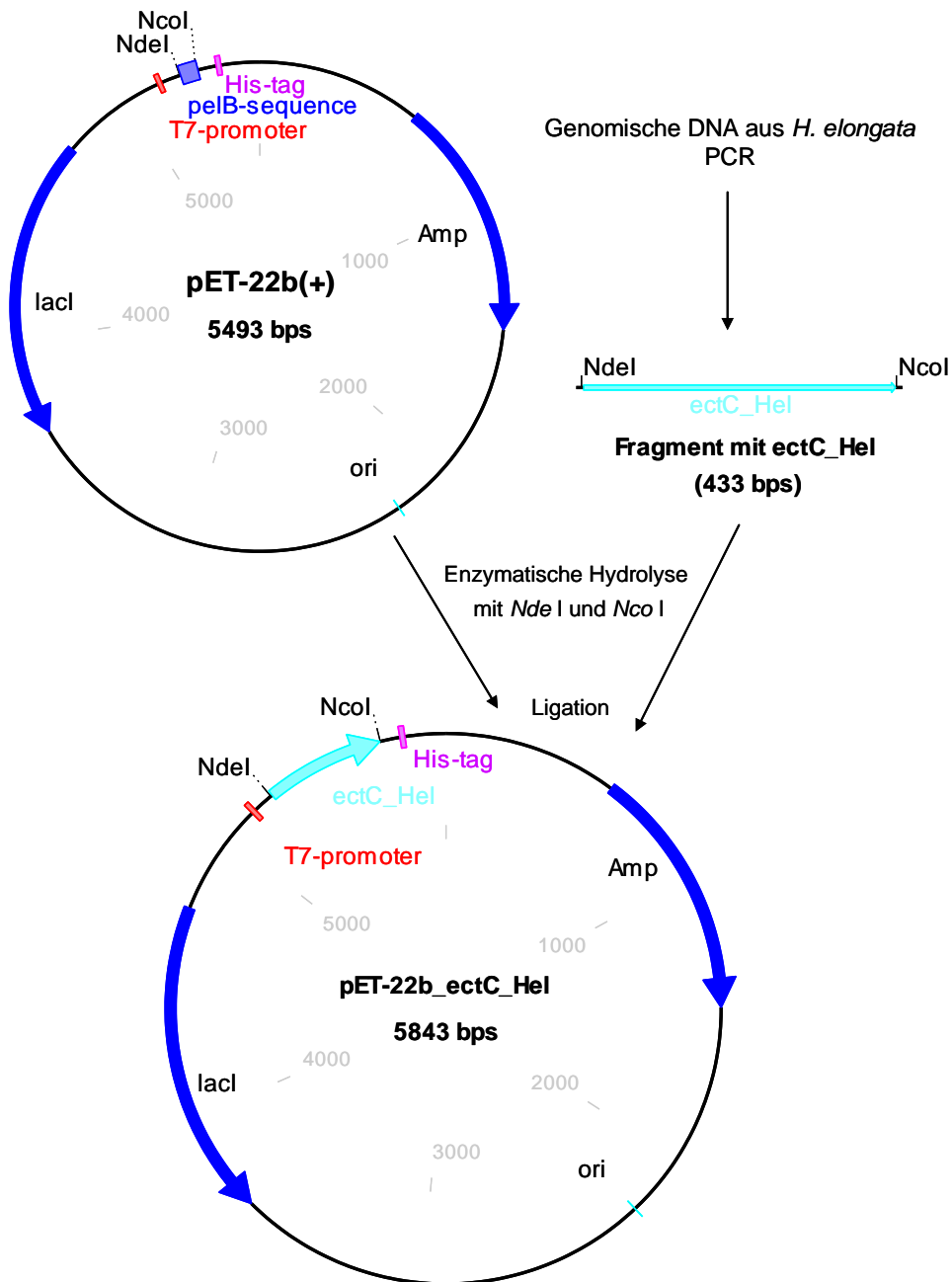


Abbildung 13: Konstruktion des Vektors pET-22b_ectC_Hel

Als Ausgangsvektor dient pET-22b(+). Die *pelB*-Sequenz des Ausgangsvektors wird bei Verwendung der oben beschriebenen Restriktionsenzyme deletiert. Ein Stop-Codon am Ende von *ectC* verhindert die Fusion mit der His-tag-Region. Ein Ausschnitt der Vektor-Sequenz ist im Anhang zu finden (Abbildung 712).

Zur Expression C-terminal verkürzter EctC-Formen wurden analog zu der oben beschriebenen Vektorkonstruktion weitere Expressionsvektoren erstellt. Über die Primer wurde bei der Amplifizierung der *ectC*-Inserts das Stopcodon jeweils direkt downstream des letzten gewünschten Codons eingefügt. Für die Konstruktion von pET-22b_ectC-10_Hel wurde mit dem

III Ergebnisse

Primerpaar `ectC_for_pet` und `ectC-10_NcoI` gearbeitet. Zur Konstruktion von **pET-22b_ectC-9_Hel** dienten die Primer `ectC_for_pet` und `ectC-9_NcoI`, für **pET-22b_ectC-8_Hel** wurden die Primer `ectC_for_pet` und `ectC-8_NcoI` verwendet.

Tabelle 8 fasst die wichtigsten Eigenschaften der verschiedenen Expressionsprodukte zusammen.

Tabelle 8: Eigenschaften der Expressionsprodukte ohne Fusions-tag

Name	AS	kDa	pI	Sequenz C-terminal
EctC_Hel	137	15,46	4,87	...APADEADDQKPL
EctC-10_Hel	127	14,37	5,12	...AP
EctC-9_Hel	128	14,45	5,12	...APA
EctC-8_Hel	129	14,56	5,04	...APAD

4.1.2 Fusion mit *Strep*-tag

Aus vorhergehenden Arbeiten mit der Ectoin-Synthase aus *M. halophilus* war bekannt, dass die Fusionierung mit einem N-terminalen His₆-tag keine Aufreinigung aktiven Enzyms erlaubt (Kiss 2002). Aus diesem Grund wurde die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* in dieser Arbeit stets mit einem C-terminalen His₆-tag versehen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten jedoch Modifikationen am C-Terminus des Enzyms eingeführt werden, die die Verwendung eines Fusions-tags an dieser Stelle unmöglich machten. Aus diesem Grund wurde versucht, durch Verwendung eines *Strep*-tags eine aktive, N-terminal mit einem Affinitäts-tag fusionierte, Ectoin-Synthase zu gewinnen.

Der aus 8 Aminosäuren bestehende *Strep*-tag II wird von IBA als ausgewogene Aminosäuresequenz beworben, die generell keine Auswirkung auf Struktur und Funktion der fusionierten Proteine haben soll. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob ein N-terminaler *Strep*-tag II die Aktivität der Ectoin-Synthase weniger beeinflusst als ein N-terminaler His₆-tag.

Zur Expression der N-terminal mit einem *Strep*-tag versehenen Ectoin-Synthase aus *H. elongata* wurde der Vektor **pASK-IBA5_ectC_Hel** konstruiert. Hierzu wurde das Gen *ectC* aus *H. elongata* unter Verwendung der Primer `pASK5_ectC_for` und `pASK5_ectC_rev` amplifiziert. Beide Primer

III Ergebnisse

enthalten eine mit der Endonuklease *Bsa*I kompatible Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Esp*3I. Die weitere Konstruktion des Vektors pASK-IBA5_ectC_Hel ist in Abbildung 14 dargestellt.

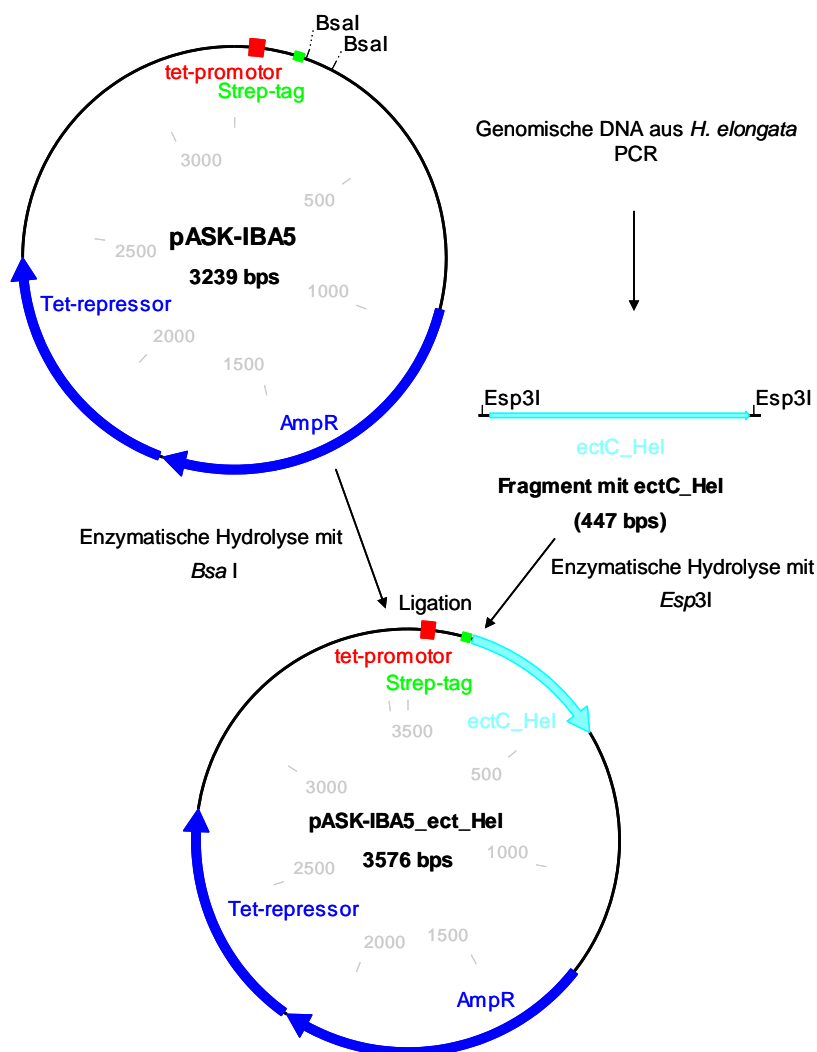


Abbildung 14: Konstruktion des Vektors pASK-IBA5_ectC_Hel

Als Ausgangsvektor dient pASK-IBA5. Es erfolgt eine Fusionierung des *ectC*-Gens mit einem N-terminalen *Strep*-tag II. Ein Ausschnitt der Vektor-Sequenz ist im Anhang zu finden (Abbildung 73).

Die Eigenschaften des Expressionsproduktes dieses Vektors, EctC_Strep, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Eigenschaften des Proteins EctC_Strep. Hervorgehoben sind die aus 8 Aminosäuren bestehende Sequenz des *Strep*-tag II sowie die angrenzenden Spacer-Aminosäuren.

Name	AS	kDa	pI	Sequenz N-terminal
EctC_Strep	150	16,92	4,97	MAS WSHPQFEK GAMIVRN...

4.2 Expression

4.2.1 Mit dem pET-System

4.2.1.1 Proteinproduktion

Um mittels pET-System möglichst große Mengen Expressionsprodukt zu erhalten, wurde *E. coli* BL21 (DE3) mit dem jeweiligen auf pET-22b(+) basierenden pET-Vektor in LBG-0,5/Amp100 angezogen und die Expression bei einer OD_{600} zwischen 0,4 und 0,5 durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch den Verlauf einer Proteinexpression am Beispiel des Vektors pET-22b_ectC_Hel_His. Für dieses Proteingel wurden der Expressionskultur über den Zeitverlauf Proben für eine Gesamtzellproteingewinnung entnommen und diese in eine SDS-PAGE eingesetzt. Deutlich zu erkennen ist das Auftreten eines Expressionsprodukts bereits eine Stunde nach Induktion bei der erwarteten Größe von 16,52 kDa. Diese Proteinbande verstärkt sich weiter über den Zeitverlauf bis zum Zeitpunkt vier Stunden nach Induktion.

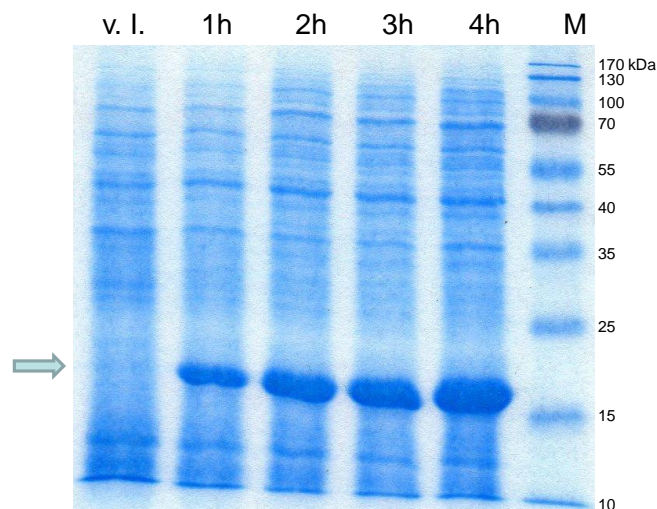


Abbildung 15: Expression mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel_His

Ein Pfeil markiert die Bande für das Expressionsprodukt EctC_Hel_His mit einem theoretischen Molekulargewicht von 16,52 kDa. v.l.: vor Induktion, 1h - 4h: eine bis vier Stunden nach Induktion, M: Proteingrößenmarker

Identische Expressionsverläufe konnten auch mit den anderen in dieser Arbeit konstruierten pET-Vektoren nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

4.2.1.2 ADPC-Produktion als Funktionalitätsnachweis

Die Funktionalität der in *E. coli* expremierten Ectoin-Synthasen konnte ohne vorherige Reinigung des Enzyms *in vivo* nachgewiesen werden, da eine erfolgreiche EctC-Produktion

III Ergebnisse

E. coli zur ADPC-Synthese befähigt. Mittels HPLC-Analyse von Zellmaterial aus einer Expressionskultur konnte so die Aktivität der heterolog expremierten EctC-Formen bestimmt werden.

Hierbei stellte sich heraus, dass unter Stressbedingungen (MM63-Medium, 3% NaCl) eine ADPC-Produktion in *E. coli* erreicht wurde, die der in *H. elongata* KB1 vergleichbar ist. Hierauf soll in Kapitel III7 näher eingegangen werden.

4.2.2 Mit dem pASK-IBA-Vektor

4.2.2.1 Proteinproduktion

Zur Expression der N-terminal mit einem *Strep*-tag II versehenen Ectoïn-Synthase wurde der Stamm *E. coli* DH5 α pASK-IBA5_ectC_Hel in 600 mL LBG-0,5/Carb100 bei 37 °C angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,4 durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (0,2 μ g/mL) induziert. Der Verlauf der Expression bis zur Ernte vier Stunden nach Induktion wurde mittels Gesamtzellprotein-Proben in einer SDS-PAGE untersucht.

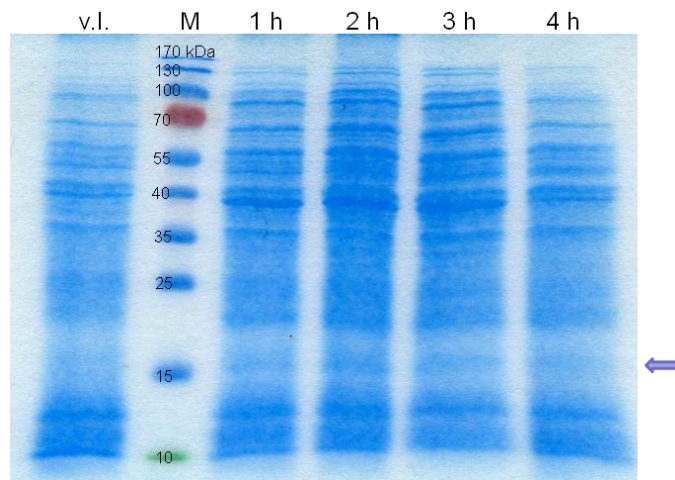


Abbildung 16: Expression mit *E. coli* DH5 α pASK-IBA5_ectC_Hel

Mit einem Pfeil markiert die Bande für das Expressionsprodukt EctC_Strep mit einem theoretischen Molekulargewicht von 16,92 kDa. v.l.: vor Induktion, 1 h - 4h: eine bis vier Stunden nach Induktion, M: Proteingrößenmarker

Vergleicht man die Proteinexpression in Abbildung 16 mit der in Abbildung 15 dargestellten Expression mittels pET-System, wird ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Proteinproduktion sichtbar. Mit dem pASK-IBA5-Vektor konnte nur eine sehr schwache Proteinexpression erreicht werden, was vermutlich auf den schwächeren Promotor zurückzuführen ist.

4.3 Proteinreinigung

4.3.1 His₆-tag

Die Reinigung von His₆-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix richtete sich nach einem Protokoll des Säulenmaterial-Herstellers Novagen (vgl. II.9.4.1.1). Nach diesem Protokoll wurde zuvor bereits die Ectoin-Synthase von *Marinococcus halophilus* erfolgreich gereinigt (Egler 2004). Im Anschluss an die Elution des Proteins von der Ni-NTA-Matrix wurde das Eluat gegen Tris-HCl-Puffer dialysiert, um das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol vom Protein abzutrennen. Ein Einengen der Proteinlösung erfolgte schließlich mittels Microcon, um das Enzym für spätere Aktivitätsassays möglichst hoch konzentriert vorliegen zu haben. Mittels SDS-PAGE wurde die Reinheit der isolierten Proteine anschließend analysiert. In dieser Arbeit wurde die Proteinreinigung mittels Nickelchelate-Chromatographie für zwei His₆-Fusionsproteine angewendet: Die vollständige Ectoin-Synthase EctC_Hel_His aus *H. elongata* sowie die C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzte Form EctC-10_Hel_His.

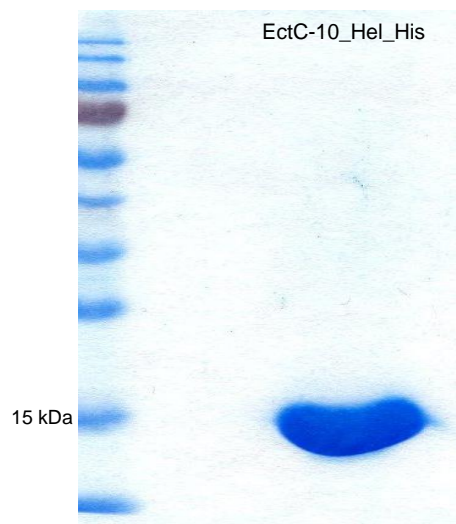


Abbildung 17: Ni-NTA-Reinigung des Enzyms EctC-10_Hel_His

Dargestellt ist die SDS-PAGE-Analyse des Eluats einer Ni-NTA-Reinigung des heterolog exprimierten Enzyms EctC-10_Hel_His. Das Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 15,44 kDa liegt im Eluat ohne Verunreinigung durch *E. coli*-spezifisches Protein vor.

Abbildung 17 zeigt exemplarisch das Produkt einer Ni-NTA-Reinigung der C-terminal verkürzten Ectoin-Synthase EctC-10_Hel_His. Das gewünschte Produkt mit einer Größe von 15,44 kDa

III Ergebnisse

konnte erfolgreich isoliert werden und liegt in hoher Reinheit vor. Ein vergleichbares Bild lieferte auch die Reinigung von EctC_Hel_His (hier nicht gezeigt).

Das dialysierte und konzentrierte Protein wurde vor dem Einsatz in weitere Untersuchungen mittels BCA-Assay quantifiziert. Im Schnitt konnten mit dem hier beschriebenen Verfahren eingeeingte Proteinlösungen mit Konzentrationen von 10-15 mg/mL erzielt werden.

4.3.2 *Strep-tag*

Zur Reinigung der N-terminal mit einem *Strep-tag* II versehenen Ectoin-Synthase wurde das Pellet einer Expressionskultur des Stammes *E. coli* DH5 α pASK-IBA5_ectC_Hel in Waschpuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. II9.4.1.2). Das Lysat wurde auf eine 2 mL-Strep-Tactin-Säule aufgetragen. Es folgten Waschschrte mit fünfmal 2 mL Waschpuffer, anschließend wurde mit fünfmal 200 μ L Elutionspuffer eluiert.

Die Analyse des Reinigungsverlaufs erfolgte mittels SDS-PAGE. Abbildung 18 zeigt Proben der Reinigungsschritte im Proteingel.

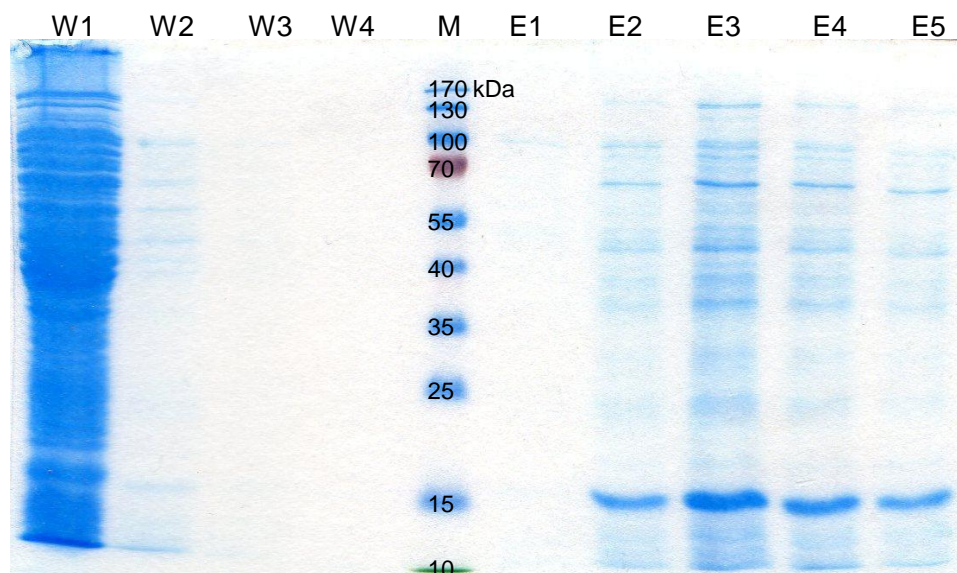


Abbildung 18: *Strep-tag*-Reinigung des Enzyms EctC_Strep

Verlauf der Reinigung der Ectoin-Synthase mit N-terminalem *Strep-tag* II. W1-W4: Waschpuffer-Fractionen, M: Proteinmarker, E1-E5: Elutionspuffer-Fractionen. Das Protein EctC_Strep mit einem theoretischen Molekulargewicht von 16,92 kDa liegt in den Eluat-Fractionen als Hauptkomponente vor.

In der ersten Waschpuffer-Fraktion ist neben der Vielzahl an eluierenden *E. coli*-Proteinen auch eine deutliche Bande im Bereich von ca. 15 kDa zu erkennen. Hier könnte es sich um nicht

gebundene Ectoin-Synthase handeln, was den Schluss nahelegt, dass das Säulenvolumen zu gering dimensioniert und die Matrix somit überladen wurde. Gut zu erkennen ist der Erfolg der Waschschritte, denn bereits in der dritten Waschpuffer-Fraktion sind keine Proteinbanden mehr zu erkennen. Betrachtet man die Fraktionen der Elution wird jedoch deutlich, dass keine vollständige Isolierung der Ectoin-Synthase EctC_Strep erreicht wurde. Zwar liegt diese als vorherrschendes Protein im Eluat vor, mit dem Elutionspuffer wurde jedoch auch noch eine Vielzahl weiterer verunreinigender Proteine von der Säulenmatrix gewaschen. Insgesamt ist die Reinheit des mittels *Strep*-tag II isolierten Proteins geringer als die des His₆-Fusionsproteins nach der Nickelchelate-Chromatographie (vgl. Abbildung 17).

Da ein Aktivitätstest im Anschluss an die Reinigung keine EctC-Aktivität im Eluat nachweisen konnte, wurden keine weiteren Versuche unternommen diese Form der Proteinreinigung zu optimieren. Ausgehend von diesen Daten wurde der Versuch einer N-terminalen Affinitäts-tag-Fusionierung der Ectoin-Synthase eingestellt.

4.3.3 Ammoniumsulfat-Fällung und HIC

Um für die Strukturanalyse der Ectoin-Synthase mittels NMR und Kristallisation ein natives Protein zur Verfügung zu haben, aber auch um die Rolle des C-Terminus untersuchen zu können, wurde ein Protokoll zur nativen Proteinreinigung ohne Fusions-tag benötigt. Das in dieser Arbeit angewendete Protokoll kombiniert Ammoniumsulfat-Fällung und hydrophobe Interaktionschromatographie und wurde in Anlehnung an ein von S. Sedelnikova (Arbeitsgruppe Rice, Sheffield, UK) entworfenes Protokoll modifiziert. Zunächst wurde das gewünschte Protein in nativer Form (ohne Fusions-tag) mittels pET-Vektor in *E. coli* exprimiert (vgl. II.9.2). Die anschließende Ammoniumsulfat-Fällung und HIC-Reinigung erfolgte wie unter II.9.4.2 beschrieben. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Varianten der Ectoin-Synthase nach dieser Methode isoliert: Die natürlich vorliegende Form EctC_Hel sowie die C-terminal verkürzten Formen EctC-10_Hel, EctC-9_Hel und EctC-8_Hel. In Abbildung 19 ist exemplarisch der Verlauf der Reinigung von EctC_Hel gezeigt.

III Ergebnisse

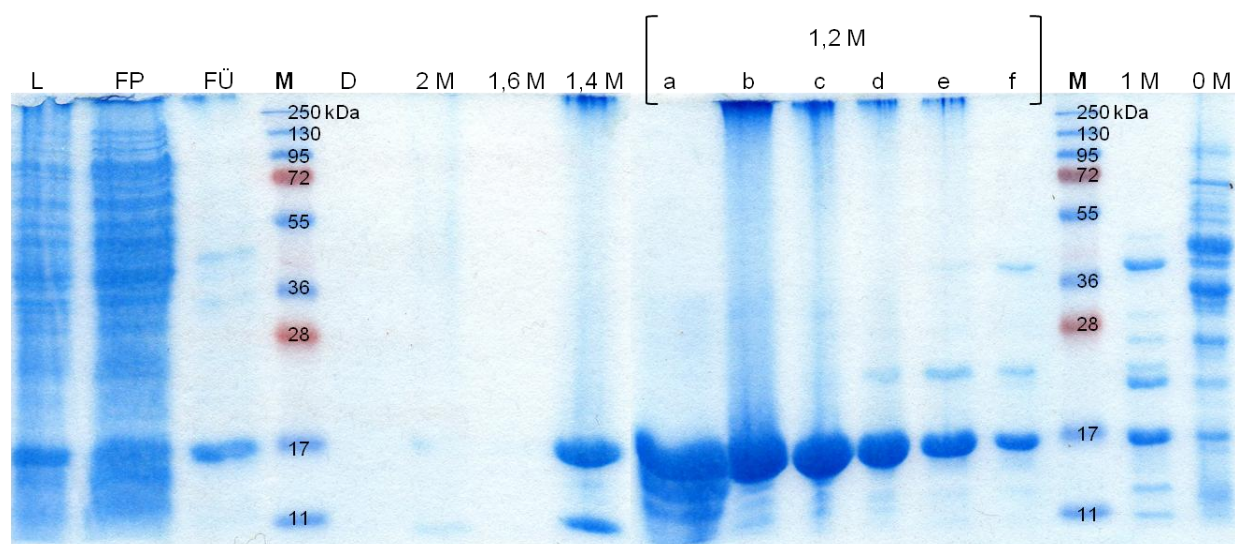


Abbildung 19: HIC-Reinigung des nativen Enzyms EctC_{Hel}

Dargestellt ist der Verlauf von Ammoniumsulfat-Fällung und HIC-Reinigung einer nativen Ectoïn-Synthase ohne Fusionstag (EctC_{Hel}). Das Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 15,46 kDa wurde erfolgreich in *E. coli* exprimiert und verbleibt nach der Ammoniumsulfat-Fällung im Überstand. Eine Elution während der HIC erfolgte ab einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 1,4 M. L: Lysat; FP: Fällungspellet; FÜ: Fällungsüberstand; D: Durchfluss; 2 M – 0 M: Puffer mit sinkender Ammoniumsulfat-Konzentration; a-f: fraktioniertes Eluat bei 1,2 M Ammoniumsulfat; M: Proteinmarker

Wie man anhand des Proteingels (Abbildung 19) deutlich sehen kann, verblieb ein großer Teil der *E. coli*-Proteine nach der Ammoniumsulfat-Fällung im Pellet, so dass der Fällungsüberstand die Ectoïn-Synthase bereits in erhöhter Reinheit enthielt. Bei der anschließenden hydrophoben Interaktionschromatographie wurden Proteine mit sinkender Ammoniumsulfat-Konzentration von der Matrix eluiert, wobei der Elutionsschritt mit 1,2 M Ammoniumsulfat in mehreren Fraktionen aufgefangen wurde, um eine möglichst optimale Trennung zu erreichen. Im Bereich von 1,4 M und 1,2 M Ammoniumsulfat konnte eine deutliche Elution von EctC_{Hel} festgestellt werden, das Protein zeigt sich im Proteingel mit der erwarteten Größe (15,46 kDa). Von wenigen verunreinigenden Proteinbanden abgesehen konnte das Protein hier mit einem guten Reinheitsgrad isoliert werden. Die nachfolgenden Waschschrìtte mit 1,0 M bzw. 0 M machen deutlich, dass während der hydrophoben Interaktionschromatographie eine gute Trennung von weiteren verunreinigenden Proteinen erreicht wurde. Die Reinigungen der verkürzten EctC-Formen nach diesem Protokoll verliefen vergleichbar. In allen Fällen wurden die Fraktionen mit der höchsten Reinheit vereinigt, anschließend gegen Tris-HCl-Puffer dialysiert und mittels Microcon aufkonzentriert.

4.4 Strukturanalyse

4.4.1 FPLC

Mittels Gelfiltrations-Chromatographie sollte untersucht werden, ob die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* im nativen Zustand ein Oligomer bildet. In der Literatur finden sich Hinweise, dass es sich bei dem Enzym um ein Dimer handeln könnte (Ono *et al.* 1999). Untersucht wurde die mittels Nickelchelate-Chromatographie gereinigte Form der Ectoin-Synthase, also das His₆-Fusionsprotein EctC_Hel_His.

Die Gelfiltration erfolgte mit einer Superdex 75µg-Säule, die einen optimalen Trennbereich zwischen 3 kDa und 70 kDa aufweist, und somit sowohl ein Monomer (ca. 15 kDa) als auch ein Dimer (ca. 30 kDa) der Ectoin-Synthase darstellen kann. Dem Laufpuffer wurden 0,5 M NaCl zugegeben und ein pH von 8,4 eingestellt, da unter diesen Bedingungen das Enzym eine hohe Aktivität aufweist (vgl. III5) und somit im nativen Zustand vorliegen sollte. Um anhand des Laufverhaltens des Proteins Rückschlüsse auf das Molekulargewicht ziehen zu können, wurde die Säule zunächst wie unter II9.7 beschrieben kalibriert (Abbildung 20). Bei Verwendung identischer Einstellungen sollte die Fraktion, in der ein Protein bestimmter Größe eluiert, reproduzierbar sein. Aus diesem Grund wurde ausgehend von der reproduzierbaren Kalibrierung eine Kurvengleichung erstellt, anhand der spätere Probenläufe ausgewertet werden konnten (siehe Abbildung 20).

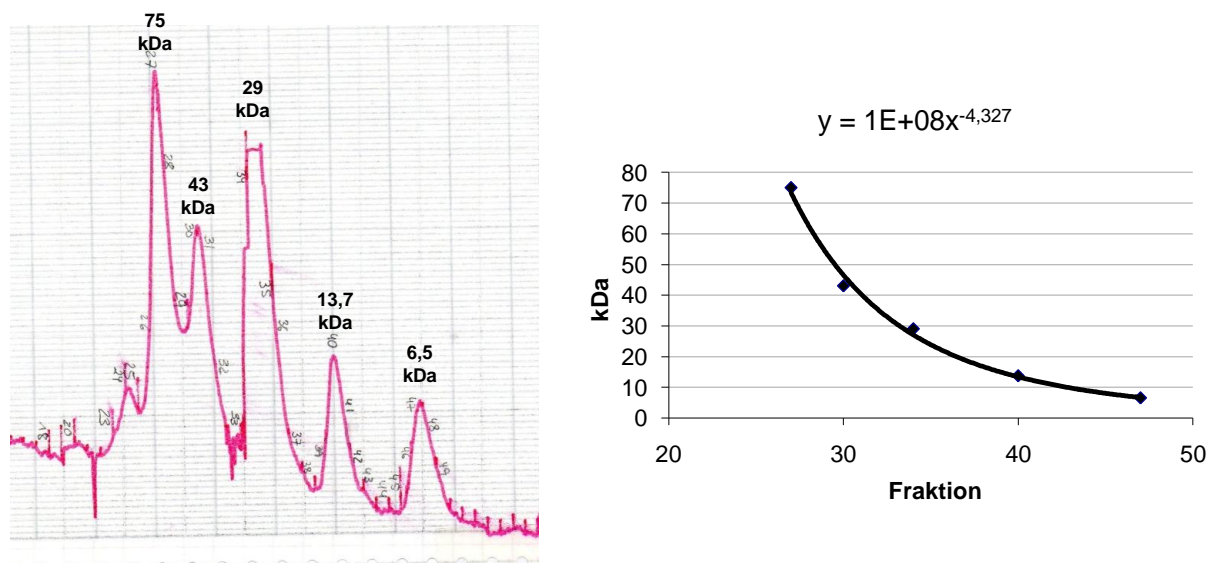


Abbildung 20: Kalibrierung des FPLC-Systems

In der linken Abbildung dargestellt ist die Auftrennung eines Proteingrößenmarkers (Gel Filtration Calibration Kit LMW (vgl. Tabelle 6), rechts dargestellt die daraus ermittelte Kalibrierungskurve.

III Ergebnisse

Anschließend erfolgte die Gelfiltration von EctC_Hel_His wie unter II9.7 beschrieben. Über den UV-Detektor (280 nm) konnte die Elution eines einzelnen Signals detektiert werden (nicht abgebildet). Dieses beginnt in Fraktion 31, der Scheitelpunkt liegt in Fraktion 32. Zur Berechnung des Molekulargewichts wurde deshalb ein Wert von 31,5 in die Kalibrierungsgleichung eingesetzt:

$$10^8 \times 31,5^{-4,327} = \mathbf{32,87 \text{ kDa}}$$

Das theoretische Molekulargewicht von EctC_Hel_His liegt bei 16,5 kDa für ein Monomer und somit bei 33 kDa für ein Dimer. Das Ergebnis der Gelfiltration unterstützt also die Vermutung, dass es sich bei der Ectoin-Synthase um ein als Homodimer vorliegendes Protein handelt.

4.4.2 NMR

Eine ¹⁵N-NMR-Analyse des im Rahmen dieser Arbeit mittels *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel_His heterolog exprimierten und ¹⁵N-markierten Enzyms EctC_Hel_His wurde durch Dr. Jeremy Craven (AG Rice, Sheffield, UK) durchgeführt. Diese Analyse zeigte einen flexiblen Bereich des Enzyms am C-Terminus, der sich in Lösung als sehr beweglich darstellt, und aus etwa 10 Aminosäureresten zu bestehen scheint (neben den Histidinen des Fusions-tags).

4.4.3 Kristallisation

Kristallisationsversuche mit der im Rahmen dieser Arbeit in *E. coli* heterolog exprimierten Ectoin-Synthase wurden durch Dr. Svetlana Sedelnikova (AG Rice, Sheffield, UK) durchgeführt. Die ersten Kristallisationsversuche mit den EctC-Formen EctC_Hel_His und EctC_Hel zeigten keinen Erfolg, da eine Kristallisation der Proteine auch nach mehreren Versuchen ausblieb.

Aufgrund der NMR-Analyse des Proteins EctC_Hel_His (vgl. III4.4.2) wurde vermutet, dass der hochflexible C-Terminus des Proteins eine Kristallisation stören könnte. Der daraufhin erfolgte Versuch der Kristallisation der heterolog exprimierten EctC-Form EctC-10_Hel (C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzt) verlief erfolgreicher und erbrachte EctC-10_Hel-Kristalle (Abbildung 21), deren Qualität jedoch für eine nachfolgende Strukturanalyse nicht ausreichte.



Abbildung 21: Kristalle des Proteins EctC-10_Hel (S. Sedelnikova)

5 *In vitro*-Versuche mit EctC aus *H. elongata*

5.1 Einfluss von Salinität und pH-Wert

Nach erfolgreicher Expression und Reinigung der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* sollte das Enzym in Hinblick auf Salz- und pH-Optimum für seine Aktivität näher charakterisiert werden.

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte photometrisch wie unter II9.8.1 beschrieben, wobei der verwendete Reaktionspuffer sowohl in der Salzkonzentration als auch im pH-Wert variiert wurde. Für die hier dargestellten Daten wurde das Enzym EctC_Hel verwendet, also die mittels hydrophober Interaktionschromatographie gereinigte native Ectoin-Synthase ohne Fusions-tag.

Abbildung 22 stellt die Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von NaCl-Konzentration und pH-Wert des Reaktionspuffers dar. Deutlich zu erkennen ist eine Aktivitätssteigerung mit steigendem pH-Wert; so ist erst mit einem leicht alkalischen pH-Wert von 8,5 eine deutliche Aktivität von ca. $4\text{-}5\ \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ messbar. Die Aktivität steigt noch weiter an wenn der pH einen Wert von 9,0 erreicht, die obere Grenze der Pufferkapazität des hier verwendeten Tris-HCl-Puffersystems.

III Ergebnisse

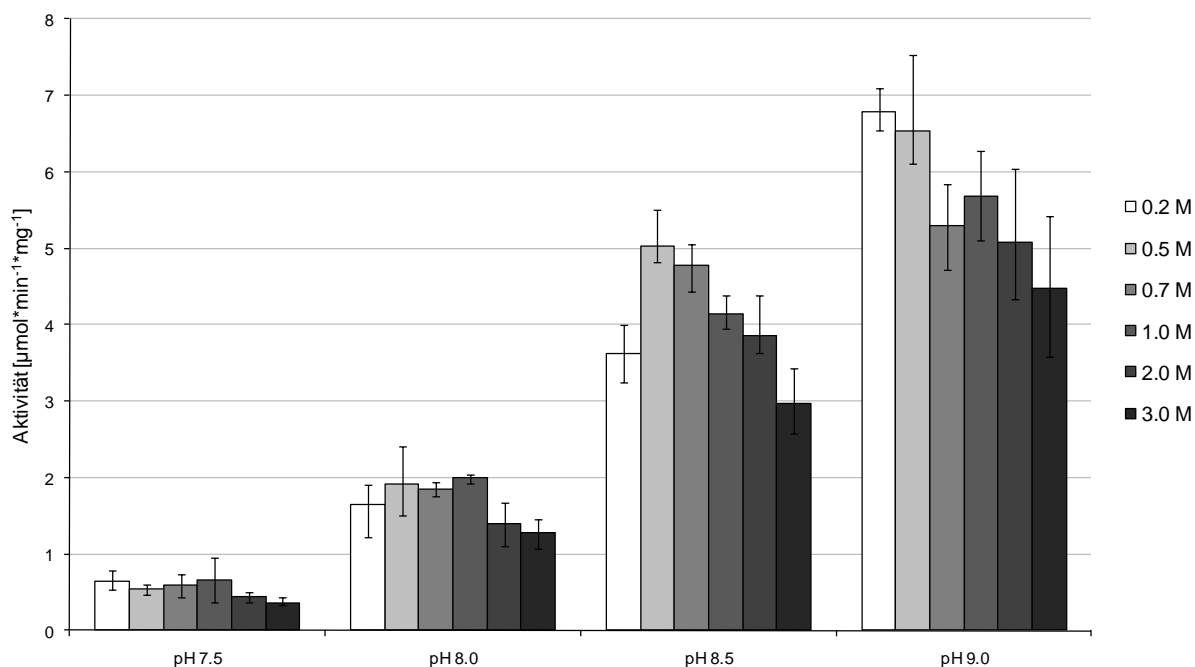


Abbildung 22: Charakterisierung von EctC_Hel

Die Ectoïn-Synthase EctC_Hel wurde mittels HIC gereinigt und die Aktivität in Tris-Puffer variabler NaCl-Konzentration und variablen pH-Werts photometrisch bestimmt. 0.2 M – 3.0 M: NaCl-Konzentrationen im Puffer

Die NaCl-Konzentration im Reaktionspuffer hatte ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivität der Ectoïn-Synthase. Ein deutliches Optimum im Bereich von 0,5 M NaCl zeigt sich bei einem pH-Wert von 8,5. In Abhängigkeit vom pH-Wert scheint sich das Salzoptimum leicht zu verschieben, so dass z.B. bei niedrigeren pH-Werten NaCl-Konzentrationen von 0,2 - 1,0 M recht ähnliche Aktivitäten erzielen. Jedoch sind die Enzymaktivitäten hier insgesamt niedrig. Bei pH 9,0 zeigt sich eine auffällig hohe Enzymaktivität bei der recht niedrigen NaCl-Konzentration von 0,2 M.

Insgesamt wurde ausgehend von den dargestellten Daten eine Kombination von pH 8,5 und einer NaCl-Konzentration von 0,5 M für weitere *in vitro*-Versuche als geeignet erachtet. An dieser Stelle muss festgestellt werden, dass die photometrisch bestimmten Enzymaktivitäten aufgrund der niedrigen eingesetzten Substratkonzentration von 0,25 mM weit von den maximal erreichbaren Reaktionsgeschwindigkeiten entfernt sind ($K_m = 11 \text{ mM}$, $V_{max} = 56 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; Ono *et al.* 1999). Somit ist ein Vergleich mit V_{max} -Werten aus der Literatur mit diesen Werten nicht sinnvoll. Höhere Substratkonzentrationen wurden aufgrund der Absorption der ADABA in den photometrischen Enzymassays nicht eingesetzt.

Vergleich von NaCl und KCl

Da bereits ein Einfluss der Salzkonzentration auf die Aktivität der Ectoin-Synthase gezeigt werden konnte, sollte im Anschluss untersucht werden, ob die Art des Salzes ebenfalls eine Rolle spielt. Unter der Annahme, dass in der intrazellulären Ionenkomposition von *H. elongata* sowohl KCl als NaCl von Bedeutung sind (Vreeland *et al.* 1983), wurde aus diesem Grund die Aktivität der HIC-gereinigten Ectoin-Synthase EctC_Hel in NaCl- bzw. KCl-haltigem Tris-HCl-Puffer verglichen (siehe Abbildung 23). In dieser Abbildung ist der bereits aus Abbildung 22 bekannte Verlauf der photometrisch bestimmten EctC-Aktivität in NaCl-haltigem Puffer gezeigt, mit einem Optimum im Bereich von 0,5 M NaCl bei pH 8,5. Bei Verwendung von KCl scheint sich das Optimum in den Bereich der höheren Ionenstärke (ca. 0,7 - 1,0 M KCl) zu verschieben, wobei jedoch über den gesamten Konzentrationsbereich keine so deutliche Aktivitätsänderung auszumachen ist wie bei Verwendung von NaCl. Insbesondere im Bereich der höheren Ionenstärke (ab ca. 1,0 M) ist kaum noch ein Unterschied in der Aktivität mit KCl oder NaCl festzustellen.

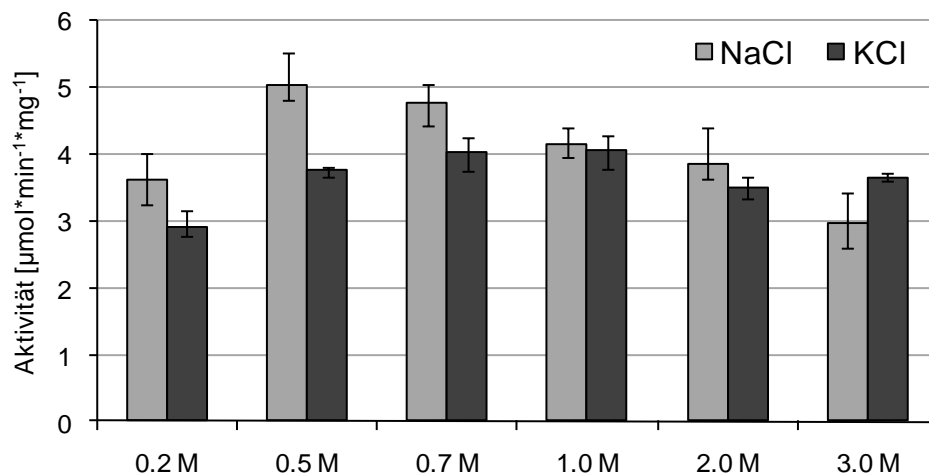


Abbildung 23: Vergleich des Einflusses von NaCl und KCl auf die EctC_Hel-Aktivität

Photometrische Aktivitätsbestimmung der HIC-gereinigten Ectoin-Synthase EctC_Hel in Tris-Puffer bei pH 8,5 und variabler NaCl- bzw. KCl-Konzentration.

5.2 Einfluss des His-tags

Um zu überprüfen, ob das Einbringen eines C-terminalen His₆-tags Auswirkungen auf die Funktionalität der Ectoin-Synthase hat, wurde die Aktivität der Ectoin-Synthase mit und ohne C-terminalen His₆-tag verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

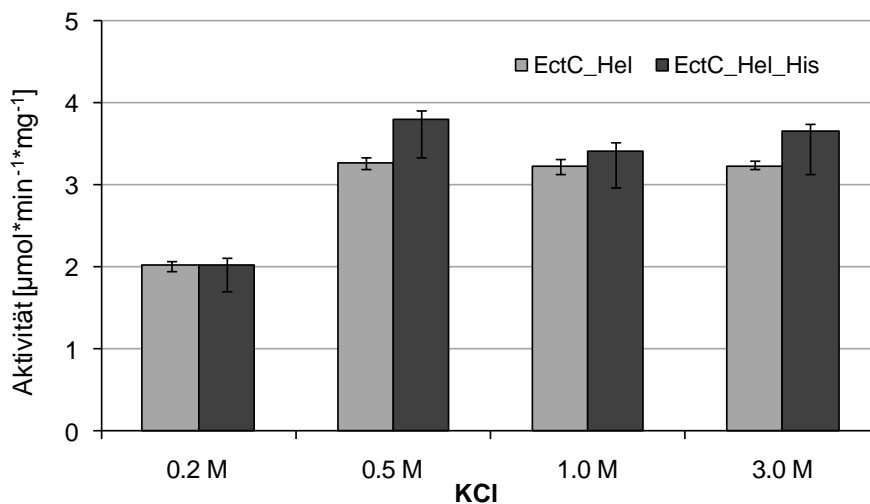


Abbildung 24: Auswirkung des C-terminalen His₆-tag auf die Aktivität der Ectoin-Synthase

Photometrische Aktivitätsbestimmung der Ectoin-Synthase-Varianten EctC_Hel (HIC-gereinigt) und EctC_Hel_His (Ni-NTA-gereinigt) in Tris-Puffer bei pH 8,5 und variabler KCl-Konzentration.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, hat der C-terminal fusionierte His₆-tag keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der Ectoin-Synthase. Während aus vorherigen Arbeiten bekannt ist, dass ein N-terminal fusionierter Affinitäts-tag die Aktivität der Ectoin-Synthase inhibiert (vgl. III4.3.2, Bestvater 2001; Kiss 2002; Egler 2004), wird durch die C-terminale Fusion weder die Aktivität des Enzyms gehemmt noch die Reaktion auf variierende Ionenstärken deutlich beeinflusst. Es wurde aus diesem Grund entschieden, die Charakterisierung des Enzyms hinsichtlich des Substratspektrums mit der Variante EctC_Hel_His durchzuführen.

5.3 Einfluss des C-Terminus

Aufgrund der Ergebnisse der ¹⁵N-NMR-Strukturanalyse (vgl. III4.4.2) der Ectoin-Synthase wurde größeres Augenmerk auf den C-Terminus gelegt. Zur Analyse der Bedeutung des C-Terminus wurden verschiedene C-terminal modifizierte (verkürzte) Varianten von EctC verglichen. Hierzu wurden die Enzyme in *E. coli* heterolog expremiert, mittels HIC gereinigt und in einen

III Ergebnisse

photometrischen Aktivitäts-Assay mit ADABA als Substrat eingesetzt. Die Bedingungen wurden anhand der Ergebnisse des Kapitels III.5.1 angepasst.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, sind deutliche Unterschiede in der Aktivität der verschiedenen verkürzten EctC-Formen nachzuweisen. Die Aktivität des Enzyms nimmt immer weiter ab je stärker der C-Terminus verkürzt wird.

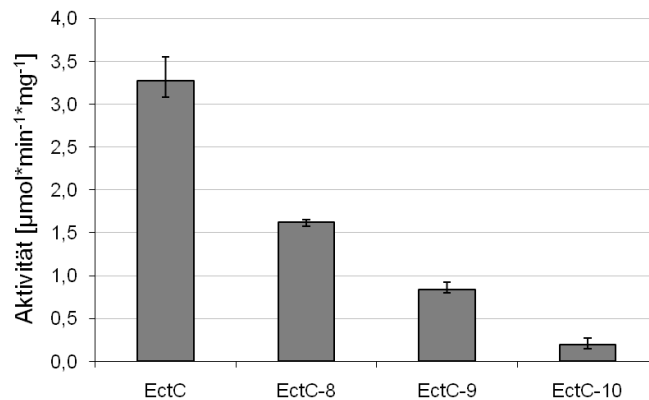


Abbildung 25: Einfluss des C-Terminus auf die Aktivität der Ectoin-Synthase

Photometrische Aktivitätsbestimmung HIC-gereinigter verkürzter Ectoin-Synthase-Varianten in Tris-Puffer mit 0,5 M KCl und pH 8,5. Die Enzyme wurde C-terminal um 8-10 Aminosäuren verkürzt. Verglichen wurden die EctC-Varianten EctC_Hel, EctC-8_Hel, EctC-9_Hel sowie EctC-10_Hel.

His-tag bei der C-terminal verkürzten EctC-Form

Wie in III.5.2 bereits gezeigt, hat der C-terminal fusionierte His₆-tag keinen negativen Einfluss auf die Funktion bzw. Aktivität der Ectoin-Synthase. Im Fall der C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzten EctC-Form hat die Fusionierung mit einem C-terminalen His₆-tag jedoch eine deutliche Auswirkung (siehe Abbildung 26).

Die beiden jeweils rechten Balken der Abbildung 26 zeigen die Aktivität der EctC-Varianten EctC-10_Hel und EctC-10_Hel_His. Im Vergleich hierzu wurden die aus Abbildung 24 bereits bekannten Daten der EctC-Varianten EctC_Hel und EctC_Hel_His hinzugefügt. Im Fall der verkürzten Ectoin-Synthase scheint das Einbringen des Fusions-tags die normalerweise herabgesetzte Aktivität wiederherzustellen.

III Ergebnisse

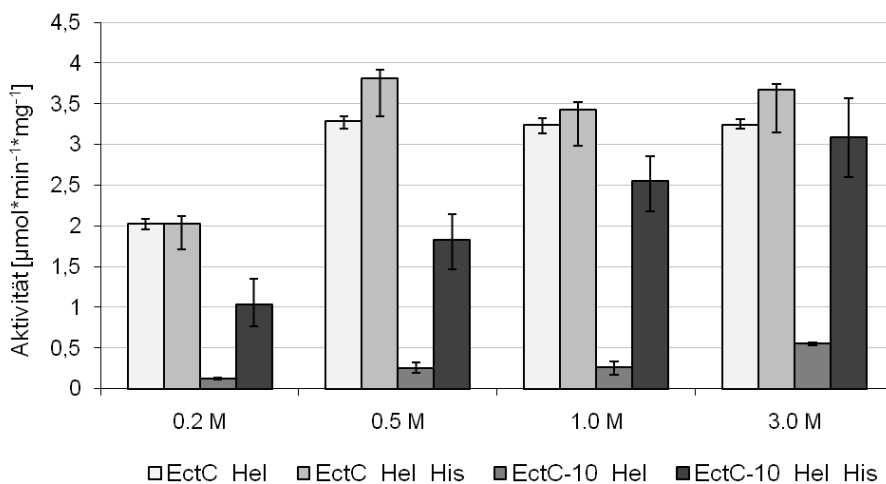


Abbildung 26: Einfluss des His₆-tags auf die Aktivität der verkürzten EctC-Variante EctC-10

Photometrische Aktivitätsbestimmung verschiedener Varianten der Ectoin-Synthase in Tris-Puffer variabler NaCl-Konzentration und pH 8,5. Verglichen wurden die HIC-gereinigten Varianten EctC_Hel und EctC-10_Hel sowie die Ni-NTA-gereinigten Varianten EctC_Hel_His und EctC-10_Hel_His

5.4 Substratspektrum

Mit der Entdeckung einer Nebenreaktion der Ectoin-Synthase, nämlich der Umwandlung von Glutamin in ADPC (Witt 2005), wurde die Frage nach weiteren potentiellen Nebenreaktionen dieses Enzyms aufgeworfen. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb potentielle Substrate für einen Ringschluss, aber auch für die reversible Reaktion (eine hydrolytische Ringöffnung) untersucht. Hierzu wurden *in vitro*-Assays mit Ni-NTA-gereinigter Ectoin-Synthase (EctC_Hel_His) durchgeführt. In allen Versuchen entsprachen die Pufferbedingungen mit pH 8,5 und einer Salzkonzentration von 0,5 M NaCl dem Optimum der natürlichen Ectoin-Synthase-Reaktion. Als Negativkontrolle wurde eine Ni-NTA-Reinigung mit Zellmaterial einer Expressionskultur des Stammes *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b(+) durchgeführt und das erhaltene Eluat ebenfalls in die *in vitro*-Assays eingesetzt. Somit konnte sichergestellt werden, dass eventuelle Reaktionen nicht durch verunreinigende *E. coli*-Proteine verursacht wurden, sondern tatsächlich auf die Ectoin-Synthase zurückzuführen sind.

5.4.1 Kondensationsreaktionen

Die eigentliche Funktion der Ectoin-Synthase ist die Katalyse des letzten Schrittes der Ectoin-Biosynthese. Hierbei wird N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure (**ADABA**) in einer Kondensationsreaktion, ausgehend von einem intramolekularen nukleophilen Angriff der α -Aminogruppe auf die N-Acetylgruppe, in das zyklische Derivat Ectoin umgewandelt (siehe

III Ergebnisse

Abbildung 27a). Diese Reaktion war in dieser Arbeit bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen (vgl. III5.1 - III5.3).

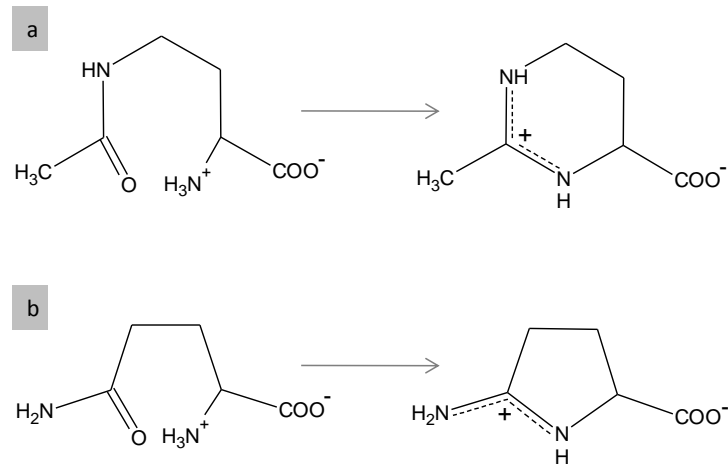


Abbildung 27: Substrate, deren Kondensation durch EctC gezeigt wurde

a: Reaktion der Ectoin-Synthase mit ADABA zu Ectoin, b: Reaktion der Ectoin-Synthase mit Glutamin zu ADPC

5.4.1.1 Glutamin

Die Nebenreaktion mit **Glutamin** als Substrat als intramolekularer nukleophiler Angriff der α-Aminogruppe auf das Säureamid (siehe Abbildung 27b) (Witt 2005), also die Produktion von ADPC, wurde in einem *in vitro*-Assay (vgl. II9.8.2) näher untersucht. Über den Zeitverlauf entnommene Proben wurden mittels FMOC-ADAM-HPLC analysiert und eine Quantifizierung des Glutamins vorgenommen. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 28 zusammengefasst.

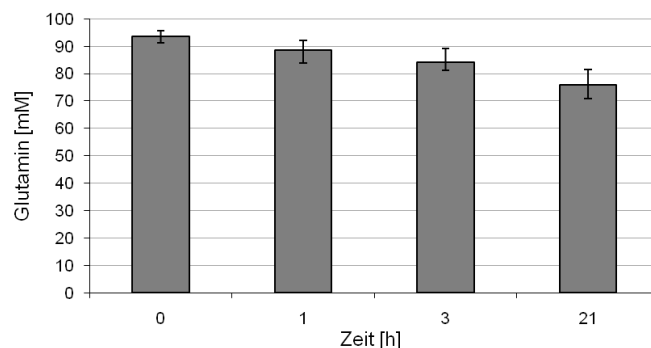


Abbildung 28: Reaktion der Ectoin-Synthase mit Glutamin als Substrat

Dargestellt ist der Zeitverlauf eines *in vitro*-assays mit dem Enzym EctC_{Hel_His} und Glutamin als Substrat. Tris-Puffer: pH 8,5; 0,5 M NaCl

Über den Zeitverlauf kann eine Abnahme der Glutaminkonzentration beobachtet werden, die mit einer Zunahme der ADPC-Konzentration (mittels isokratischer HPLC analysiert, nicht dargestellt) korreliert und in der Negativkontrolle nicht auftritt. Beachtet man jedoch den Zeitrahmen der Reaktion, so wird deutlich dass diese Reaktion sehr langsam abläuft (ca. $0,09 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) und auch nach 21 h keinen kompletten Umsatz hervorbringt. Tatsächlich verbleiben etwa 80 % des Glutamins im Ansatz. Im Gegensatz dazu wurde ADABA als Substrat immer vollständig umgesetzt.

5.4.1.2 weitere potentielle Substrate

Analog zu den Untersuchungen mit Glutamin als Substrat wurden weitere putative Substrate für die Ectoin-Synthase in *in vitro*-Assays getestet. Zu diesen potentiellen Substraten gehörten **Albizziin, Citrullin, N-Acetyl-Ornithin, N-Acetyl-Lysin, N-Carbamoyl-diaminobuttersäure** sowie die **N α -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure**. Diese Substanzen sowie die theoretisch möglichen Kondensationsprodukte nach Reaktion der Ectoin-Synthase sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Analyse der Reaktionsansätze mittels HPLC erbrachte jedoch keinen Hinweis auf eine enzymatische Reaktion mit diesen Substraten, so dass davon auszugehen ist dass die Ectoin-Synthase mit keiner dieser Substanzen im Sinne einer zyklischen Kondensationsreaktion reagiert.

5.4.2 Hydrolytische Reaktionen

Neben der Untersuchung potentieller neuer Kondensationsreaktionen wurde in dieser Arbeit auch die Reversibilität der Ectoin-Synthase untersucht, also die Fähigkeit des Enzyms, neben kondensierenden Ringschlüssen auch hydrolytische Ringöffnungen zu katalysieren. Hierzu wurden in die *in vitro*-Assays verschiedene zyklische Aminosäure-Derivate als Substrat eingesetzt (vgl. Abbildung 30 und Abbildung 37). Tatsächlich konnte, wie im Weiteren gezeigt, die Hydrolyse von ADPC, DHMICA und Homoectoin nachgewiesen werden.

III Ergebnisse

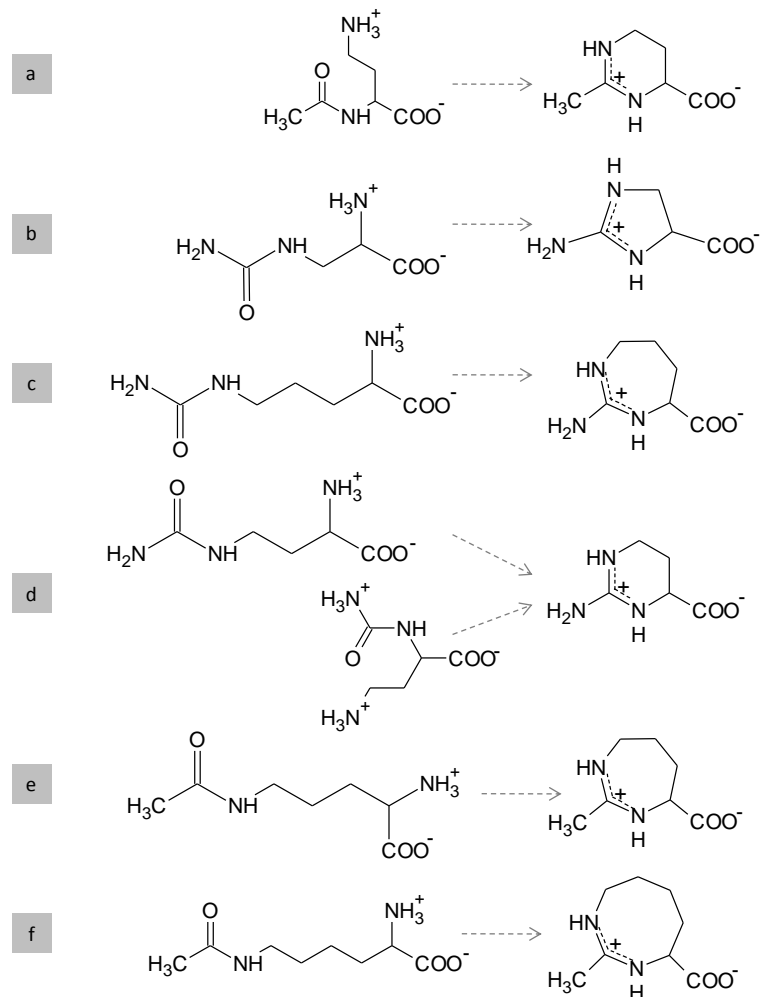


Abbildung 29: Potentielle Substrate, deren Kondensation durch EctC nicht nachgewiesen wurde

Dargestellt sind verschiedene Substrate, mit denen die Ectoin-Synthase keine Kondensationsreaktion eingeht. a: α -ADABA, b: Albizziin, c: Citrullin, d: N-Carbamoyl-DABA, e: N δ -Acetyl-Ornithin, f: N ϵ -Acetyl-Lysin

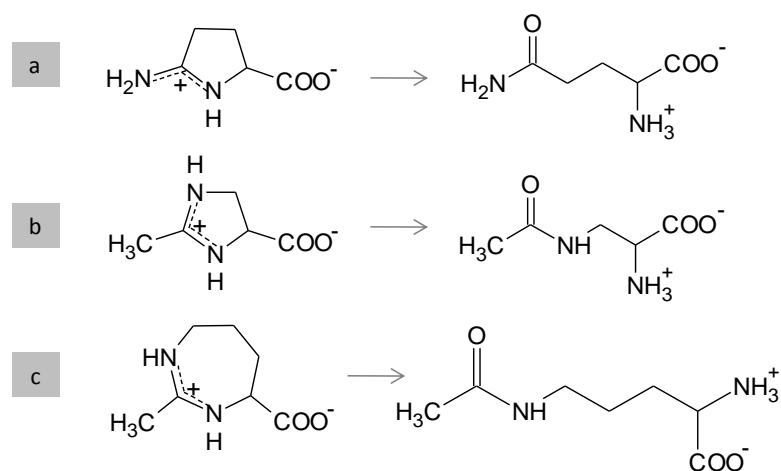


Abbildung 30: Nachgewiesene Hydrolyse-Reaktionen der Ectoin-Synthase

Dargestellt sind nachgewiesene durch EctC katalysierte Hydrolysereaktionen. a: ADPC zu Glutamin, b: DHMICA zu 3-Acetamido-2-aminopropansäure, c: Homoectoin zu N δ -Acetyl-Ornithin

5.4.2.1 ADPC

Der Zeitverlauf der Reaktion mit **ADPC** als Substrat ist in Abbildung 31 dargestellt. Auch hier wurde wieder die Glutamin-Konzentration über den Reaktionsverlauf quantifiziert.

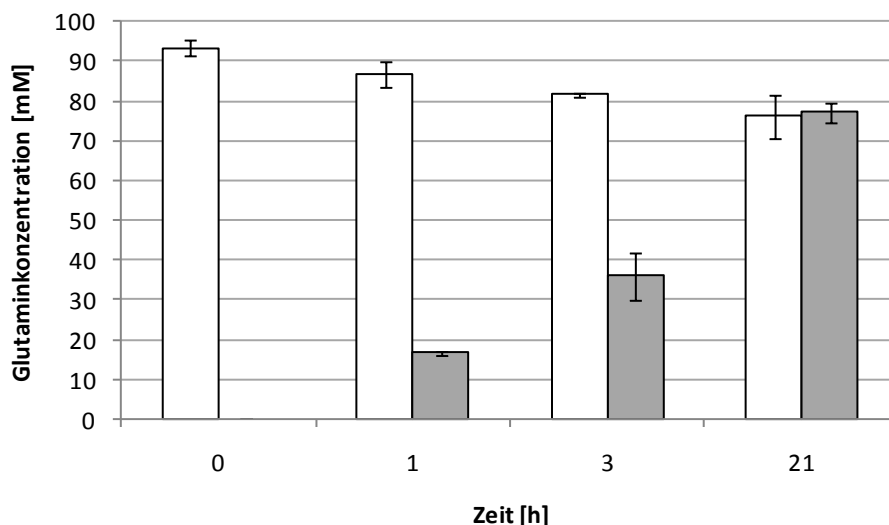


Abbildung 31: Reaktion der Ectoin-Synthase mit den Substraten ADPC und Glutamin

Dargestellt ist der Zeitverlauf eines *in vitro*-Assays mit der Ectoin-Synthase EctC_Hel_His mit ADPC als Substrat (■). Zum Vergleich wurde der Reaktionsverlauf mit Glutamin als Substrat beigegefügt (□). Quantifiziert wurde in beiden Fällen die Glutamin-Konzentration im Reaktionsansatz. Tris-Puffer: pH 8,5; 0,5 M NaCl

Der deutliche Anstieg der Glutamin-Konzentration im Ansatz, der in der Kontrolle nicht festzustellen war (nicht dargestellt), macht deutlich, dass die Ectoin-Synthase in der Lage ist, das zyklische ADPC in seine offenkettige Vorstufe Glutamin zu überführen. Diese hydrolytische Reaktion verläuft mit einer Geschwindigkeit von etwa $0,3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ sogar schneller als die Bildung des ADPC und erreicht einen höheren Umsatz, da hier nach 21 h nur etwa 20 % des ADPC zurückzubleiben scheinen. In Kombination mit den Daten der Glutamin-Umsetzung (vgl. III.5.4.1.1) unterstützen diese Daten die Hypothese eines potentiellen Gleichgewichtes zwischen Glutamin und ADPC, das deutlich auf der Seite des Glutamins liegt.

5.4.2.2 DHMICA

Der Zeitverlauf der Reaktion mit **DHMICA** als Substrat ist in Abbildung 32 dargestellt. Die deutliche Abnahme der DHMICA-Konzentration im Ansatz, die in der Kontrolle ausblieb (nicht dargestellt), zeigt, dass die Ectoin-Synthase auch DHMICA umsetzt. Wie im HPLC-Spektrum in Abbildung 33 zu sehen, ist neben der Abnahme des DHMICA-Signals auch das Auftreten eines neuen, wesentlich später eluierenden Signals zu verzeichnen. Dieses Signal zeigt eine deutlich

III Ergebnisse

schwächere UV-Absorption als DHMICA und könnte somit der offenkettigen Vorstufe 3-Acetamido-2-aminopropansäure zugeordnet werden, für die jedoch kein Standard zur Verfügung stand.

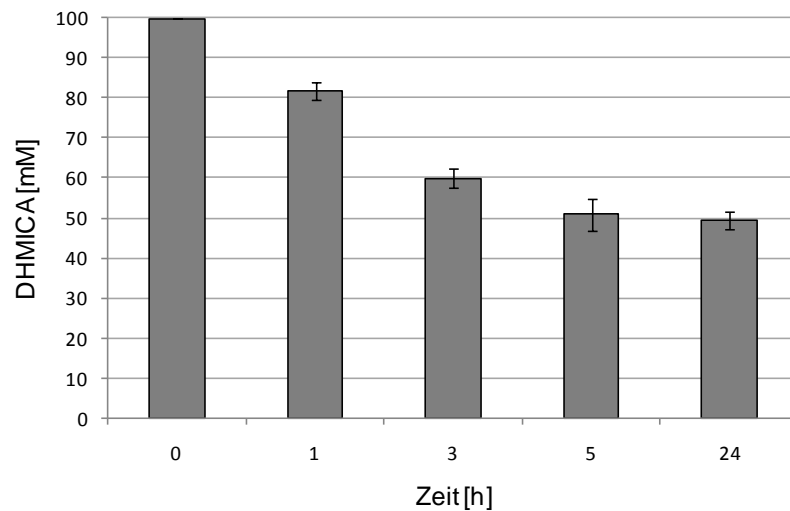


Abbildung 32: Reaktion der Ectoin-Synthase mit DHMICA als Substrat

Dargestellt ist der Zeitverlauf eines *in vitro*-Assays mit dem Enzym EctC_HeI_His und DHMICA als Substrat. Tris-Puffer: pH 8,5; 0,5 M NaCl

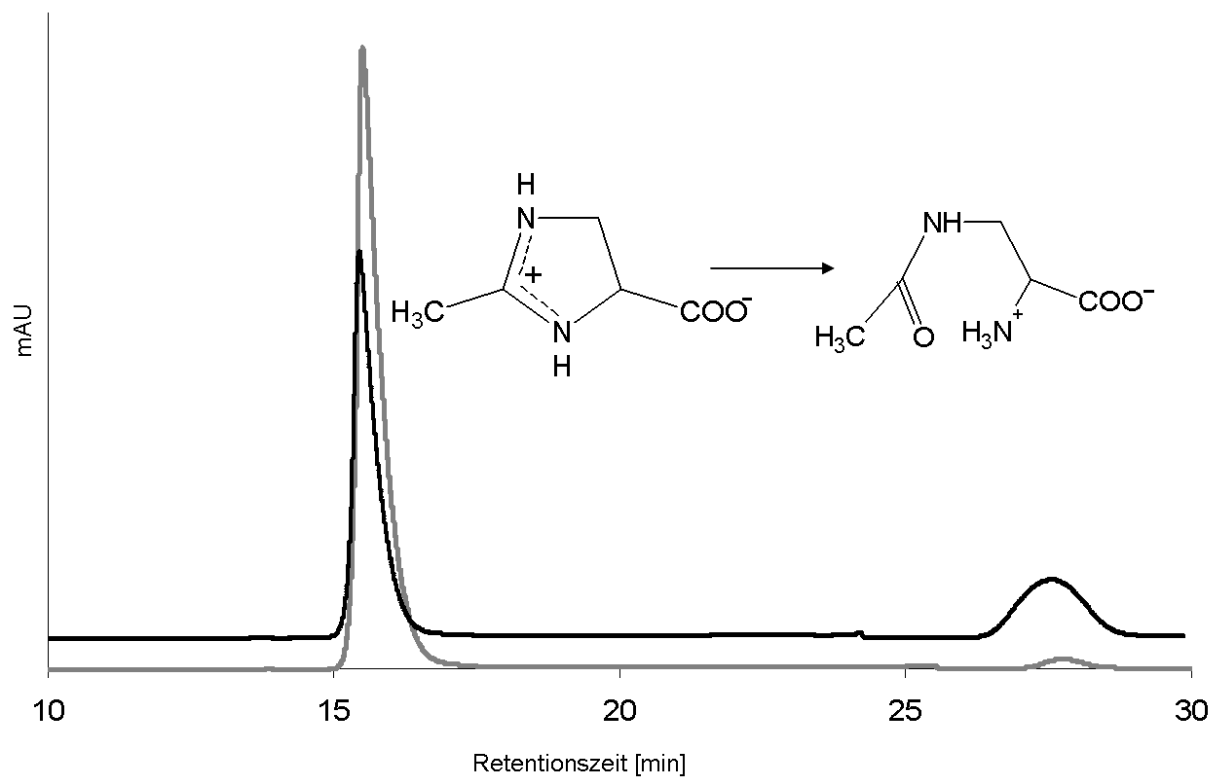


Abbildung 33: UV-Spektrum der HPLC-Analyse des EctC-katalysierten DHMICA-Umsatzes

Dargestellt ist die Analyse der *in vitro*-Reaktion des Enzyms EctC_HeI_His mit DHMICA. Die Probenahme für die isokratische HPLC erfolgte zum Zeitpunkt 0 der Reaktion (grau) sowie nach 24 h Reaktionsdauer (schwarz).

Ähnlich der ADPC-Umsetzung verläuft auch die Reaktion mit DHMICA langsam (ca. $0,16 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) und auf den ersten Blick unvollständig, da 50 % der Ausgangssubstanz auch nach 24 h im Ansatz verblieben. Bedenkt man jedoch, dass DHMICA als D/L-Racemat vorliegt (Voß 2002), muss man von einem stereospezifisch kompletten Umsatz ausgehen. Dies sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, eröffnet sich hier doch die Möglichkeit, Racemate mit Hilfe dieser enzymatischen Reaktion zu trennen.

5.4.2.3 Homoectoin

Der Zeitverlauf der Reaktion mit **Homoectoin** als Substrat ist in Abbildung 34 dargestellt. Hier ist offensichtlich, dass es zu einem Umsatz des Ectoin-Derivates kommt, der auch bei dieser Reaktion in dem Kontrollansatz nicht nachweisbar war (nicht dargestellt) und somit der Ectoin-Synthese zugeordnet werden kann. Das HPLC-Spektrum (Abbildung 35) zeigt neben der Abnahme des Homoectoin-Signals das Auftreten eines neuen Signals, das der offenkettigen Vorstufe des Homoectoins, dem N δ -Acetyl-Ornithin, zugeordnet werden konnte. Die hydrolytische Umsetzung des Homoectoins verläuft wesentlich schneller als die Reaktionen mit ADPC oder DHMICA unter gleichen Versuchsbedingungen. Außerdem scheint es sich um eine vollständige Umsetzung zu handeln.

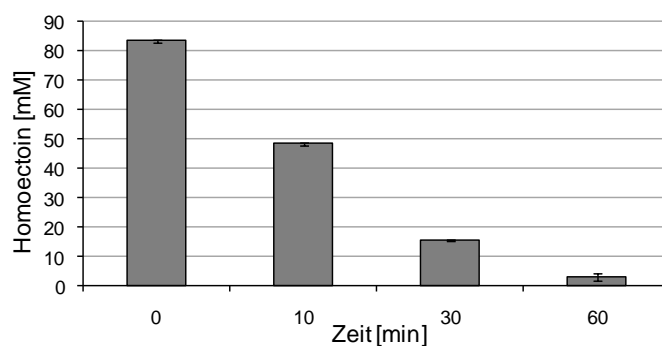


Abbildung 34: Reaktion der Ectoin-Synthase mit Homoectoin als Substrat

Dargestellt ist der Zeitverlauf eines *in vitro*-Assays mit dem Enzym EctC_HeI_His und Homoectoin als Substrat. Tris-Puffer: pH 8,5; 0,5 M NaCl

III Ergebnisse

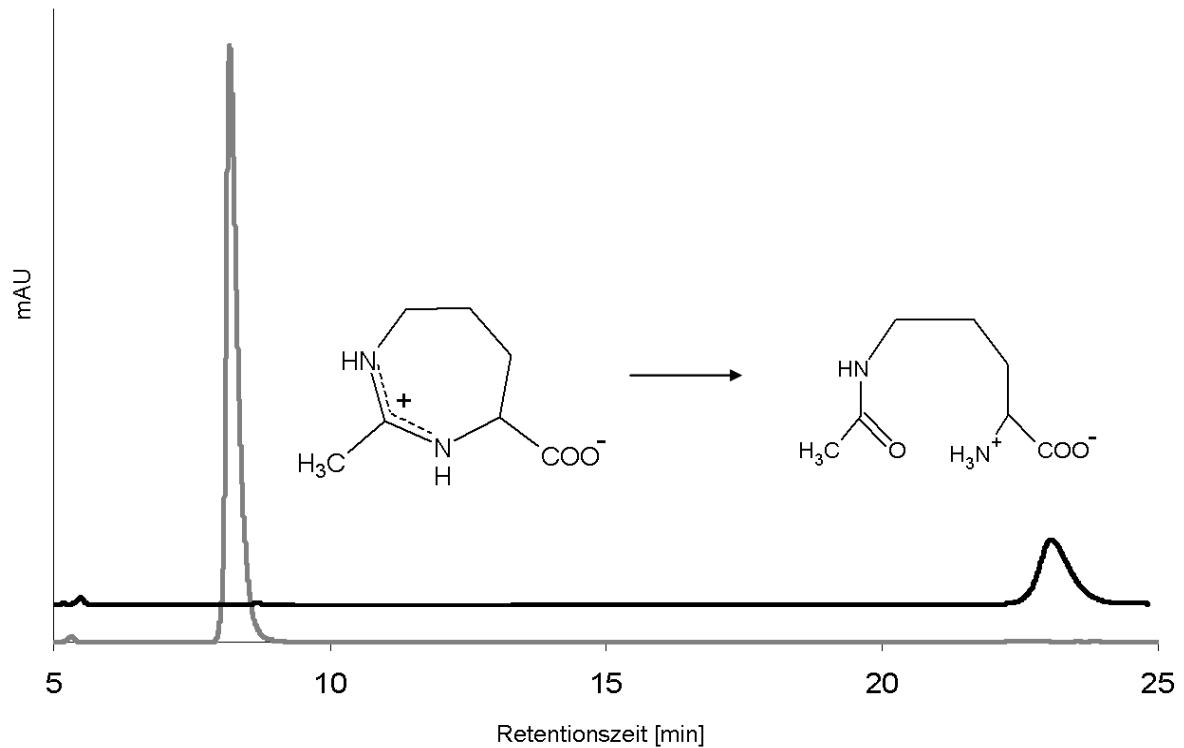


Abbildung 35: UV-Spektrum der HPLC-Analyse des EctC-katalysierten Homoecytosin-Umsatzes

Dargestellt ist die Analyse der *in vitro*-Reaktion des Enzyms EctC_HeI_His mit Homoecytosin. Die Probenahme für die isokratische HPLC erfolgte zum Zeitpunkt 0 der Reaktion (grau) sowie nach 24 h Reaktionsdauer (schwarz).

Zur Bestimmung kinetischer Daten wurde die Hydrolyse-Reaktion mit Homoecytosin als Substrat *in vitro* mit variabler Substratkonzentration (0,5; 2; 5; 10; 50 mM) durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde bestimmt und aus den erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten mittels Lineweaver-Burk-Auftragung (siehe Abbildung 36) die kinetischen Werte K_m und V_{max} abgeleitet.

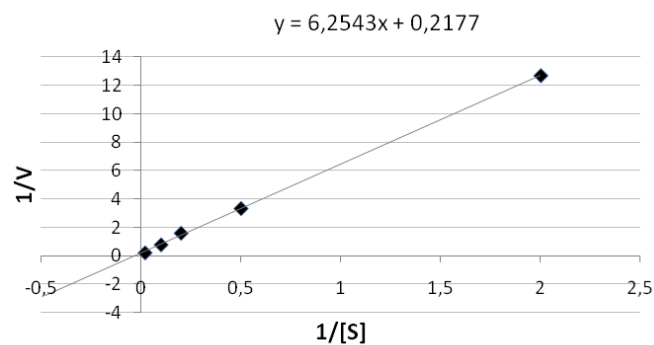


Abbildung 36: Lineweaver-Burk-Plot der EctC-katalysierten Homoecytosin-Hydrolyse

Dargestellt ist die Lineweaver-Burk-Auftragung der *in vitro* ermittelten Kinetik des Enzyms EctC_HeI_His unter Verwendung von Homoecytosin als Substrat einer Hydrolysereaktion.

Durch Anwendung der Lineweaver-Burk-Gesetze lässt sich aus Abbildung 36 ein Wert von $4,59 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ für V_{max} und ein K_m von $28,74 \text{ mM}$ bestimmen. Verglichen mit den Daten der Ectoinbildung aus ADABA (V_{max} : $56 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, K_m : 11 mM ; Ono *et al.* 1999) sprechen diese Werte für eine deutlich niedrigere Reaktivität des Enzyms bei hydrolytischer Aktivität.

5.4.2.4 Weitere potentielle Substrate für hydrolytische Reaktionen

Wie schon für die Kondensationsreaktionen wurden auch für die hydrolytische Aktivität der Ectoin-Synthase verschiedene potentielle Substrate untersucht. Hierzu wurden die zyklischen Aminosäure-Derivate **Ectoin**, **Hydroxyectoin**, **Guanidino-Ectoin**, **Demethyl-Ectoin (DME)**, **Decarboxy-Ectoin (DCE)**, **Pyroglutamat** und **Pyroglutamamid** in die *in vitro*-Assays eingesetzt (vgl. Abbildung 37).

Die Analyse der Reaktionsansätze mittels HPLC erbrachte jedoch keinen Hinweis auf eine enzymatische Reaktion mit diesen Substraten, so dass davon auszugehen ist dass die Ectoin-Synthase die genannten Substanzen nicht hydrolysieren kann. Im Fall von Ectoin konnten jedoch minimale Spuren der Vorstufe ADABA detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass das Gleichgewicht der EctC-katalysierten Reaktion hier vollständig auf der Seite der zyklischen Verbindung Ectoin liegt und eine Reversibilität somit unter den bislang untersuchten Bedingungen nicht auftritt.

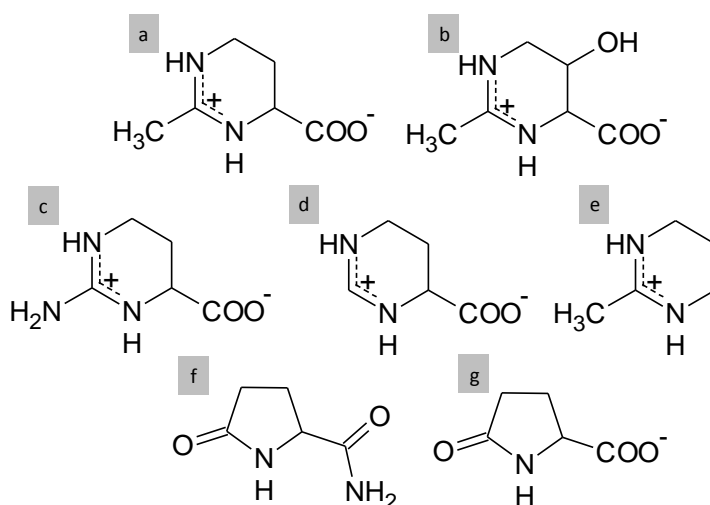


Abbildung 37: Weitere Substrate für potentielle hydrolytische Reaktionen der Ectoin-Synthase

a: Ectoin, b: Hydroxyectoin, c: Guanidino-Ectoin, d: Demethyl-Ectoin (DME), e: Decarboxy-Ectoin (DCE), f: Pyroglutamamid, g: Pyroglutamat

6 Der Vektor pWUB

Versuche der heterologen EctC-Expression mittels pET-Vektor hatten gezeigt, dass die Menge des in den *E. coli*-Zellen akkumulierten ADPC mit der Stärke der mittels Proteingel nachgewiesenen EctC-Expression korrelierte (siehe III.4.2.1.2). Da in *E. coli* vergleichbare ADPC-Mengen wie in *H. elongata* KB1 erzielt werden konnten, dies jedoch nur unter der Bedingung einer deutlichen Proteinüberexpression, wurde vermutet, dass auch in *H. elongata* KB1 die ADPC-Produktion auf eine verstärkte EctC-Expression zurückzuführen sein könnte. Eine solche Veränderung in der Proteinexpression wurde als potentiell möglich erachtet, da es in *H. elongata* KB1 durch die genomische Deletion des *ectA*-Gens (Grammann *et al.* 2002) zu einer Veränderung der vor dem Ectoingencluster liegenden Promotorregion *promA* kommt. Im Weiteren wird diese in *H. elongata* KB1 vor dem *ectB*-Gen liegende veränderte Promotorregion als *promKB1* bezeichnet. Der Begriff „Promotorregion“ umfasst in der vorliegenden Arbeit neben den Promotorelementen der Transkription auch die für die Translation benötigte Ribosomenbindestelle (RBS).

Dieses Kapitel befasst sich mit dem Vergleich des Gesamtzellproteins verschiedener *H. elongata*-Stämme unter dem Gesichtspunkt der EctC-Expression sowie mit Untersuchungen der Promotorregion *promKB1*. Diese Untersuchungen erfolgten durch Einbringen der Promotorregion in einen Vektor und anschließende Expressionsstudien mit unterschiedlichen Genen.

6.1 Gesamtzellprotein von *H. elongata* WT, KB1, SAA4 und WUB02

Die Hypothese, dass in *H. elongata* KB1 durch die Deletion des *ectA*-Gens eine Veränderung der Promotorregion auftritt, die zu einer verstärkten Expression der Gene *ectB* und insbesondere *ectC* führt, sollte durch Vergleich von Gesamtzellproteinproben näher untersucht werden. Hierzu wurden neben dem Wildtyp die *H. elongata*-Stämme KB1, SAA4 und WUB02 verwendet. Der Stamm *H. elongata* SAA4 diente hierbei als Negativkontrolle, da dieser Stamm ebenso wie *H. elongata* KB1 kein funktionelles *ectA*-Gen mehr aufweist, dies jedoch aufgrund einer Transposon-Insertion und nicht aufgrund einer genomischen Deletion. Die Promotorregion *promA* sollte hier also unverändert sein. Der Stamm *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$) wurde als weitere Negativkontrolle hinzugezogen, da hier dieselbe Veränderung im Promotorbereich vorliegt ($\Delta ectA$), jedoch das *ectC*-Gen ebenfalls deletiert ist.

III Ergebnisse

Die verschiedenen *H. elongata*-Stämme wurden unter vergleichbaren Bedingungen angezogen (MM63-3, 30 °C; SAA4 in MM63-3/Km100) und das Gesamtzellprotein mittels SDS-PAGE analysiert.

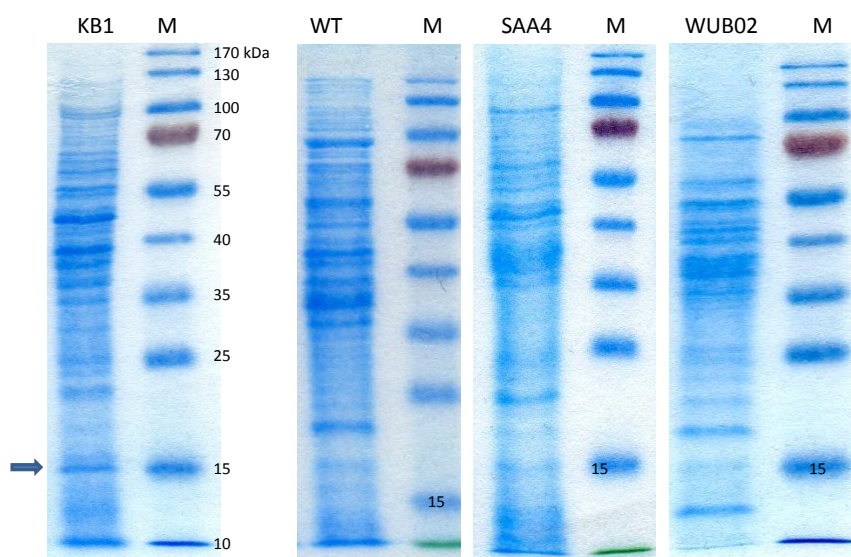


Abbildung 38: Vergleich des Gesamtzellproteins verschiedener *H. elongata*-Stämme

Verglichen wurde das Gesamtzellprotein der Stämme *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$), *H. elongata* WT, *H. elongata* SAA4 ($ectA::Tn1732$) und *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectAC$) mittels SDS-PAGE. M: Proteinmarker. Mit einem Pfeil hervorgehoben wurde eine Proteinbande mit der Größe des theoretischen Molekulargewichts von Ect_{Hel} (15,46 kDa) in der Probe des Stammes KB1.

Wie in Abbildung 38 zu sehen, lassen sich im Vergleich tatsächlich unterschiedlich starke Proteinbanden im Bereich von 15 kDa ausmachen (theoretisches Molekulargewicht der Ectoin-Synthase: 15,46 kDa). Während bei *H. elongata* KB1 eine deutliche Proteinbande von ca. 15 kDa auftritt, ist diese Bande in den Proben des Wildtyps und der Transposonmutante SAA4 nur sehr schwach ausgeprägt. Da in der *ectC*-Deletionsmutante WUB02 ebenfalls eine sehr schwache Bande bei ca. 15 kDa sichtbar wird, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um EctC, sondern um ein unidentifiziertes Protein ähnlicher Größe handelt.

6.2 Konstruktion des Vektors pWUB

Die in *H. elongata* WT vor dem Ectoin-Gencluster liegende Promotorregion *promA* wurde bereits erfolgreich in einem Vektor zur Genexpression in *H. elongata* verwendet (Brünig 2005). Hierzu wurde die Promotorregion in den Vektor pBBR1-MCS eingebracht, wodurch das Derivat pPromEct entstand (Brünig 2005). Der Promotorbereich *promA* gilt als osmoreguliert, die

III Ergebnisse

Expression von Genen unter Kontrolle dieses Promotors lässt sich also durch die Mediansalinität steuern (Brüning 2005).

Analog zu der Konstruktion des Vektors pPromEct erfolgte in dieser Arbeit die Konstruktion des Vektors pWUB, der anstelle der Promotorregion *promA* die in KB1 vor *ectB* liegende Promotorregion *promKB1* enthält (vgl. Abbildung 39).

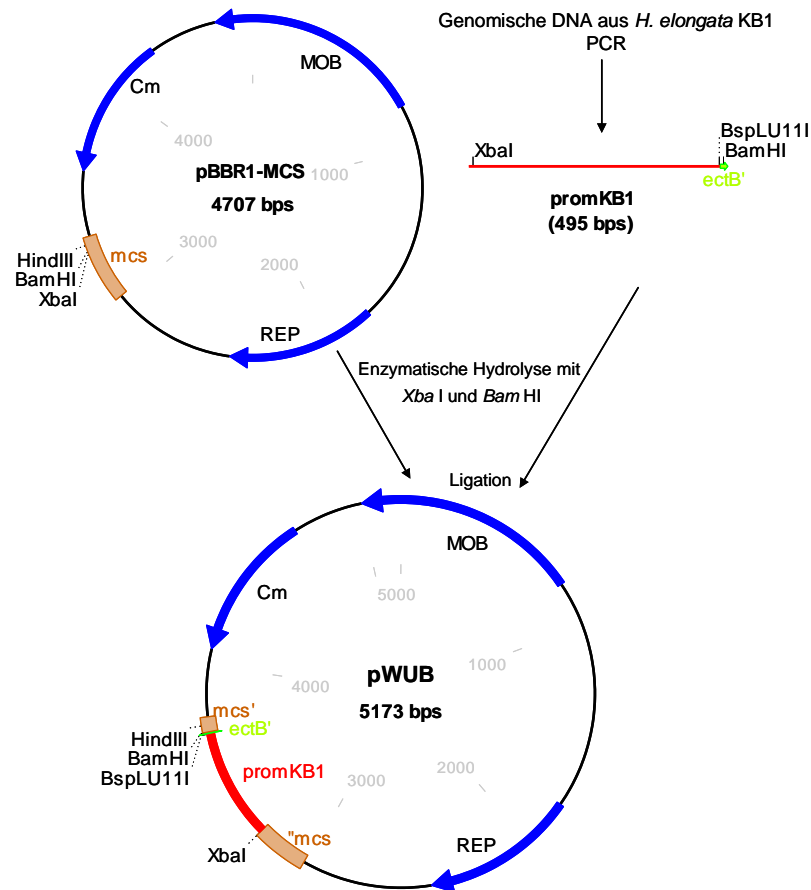


Abbildung 39: Konstruktion des Vektors pWUB

Als Ausgangsvektor dient pBBR1-MCS. Der aus *H. elongata* KB1 stammende modifizierte Promotorbereich *promKB1* wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme *XbaI* und *BamHI* in den Ausgangsvektor inseriert. In dem resultierenden Vektor pWUB wird die *XbaI*-Schnittstelle durch eine Erkennungssequenz für Dcm-Methylierung inhibiert. Ein Ausschnitt der Vektorsequenz ist im Anhang zu finden (Abbildung 74)

Die Promotorregion *promKB1* aus *H. elongata* KB1 wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *prom_ect_f* und *promKB1_rev* amplifiziert. Durch diese beiden Primer wurden insgesamt drei Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt eingebaut: Zur Klonierung des Promotorbereichs in den Ausgangsvektor pBBR1-MCS eine *XbaI*- und eine *BamHI*-Schnittstelle, für spätere Klonierungen eine *Bsplu11I*-Schnittstelle direkt um das Startcodon des *ectB*-Gens. Es

III Ergebnisse

muss beachtet werden, dass das Einbringen der *Bsplu111*-Schnittstelle zum Austausch zweier Basen stromaufwärts des *ectB*-Startcodons führt (CA zu AC, vgl. Abbildung 40). Eine solche Mutation fand ebenfalls in der Promotorregion *promA* bei der Klonierung des Vektors pPromEct statt (Brüning 2005). Der Einbau des *promKB1*-Fragments in den Vektor pBBR1-MCS erfolgte über die *XbaI*-und *BamHI*-Schnittstellen (vgl. Abbildung 39) von Vektor und Insert.

Die Sequenzierung des *promKB1*-Bereichs in pWUB zeigte die erwartete DNA-Sequenz, die in Abbildung 40 im Vergleich zu der *promA*-Region aus dem Vektor pPromEct dargestellt ist. Wie in Abbildung 40 zu sehen, führt die Deletion des *ectA*-Gens in *H. elongata* KB1 zu einer Veränderung des *promA*-Promotorbereichs unmittelbar vor dem Startcodon des nachfolgenden Gens. Diese ist unter anderem dadurch charakterisiert, dass die vor *ectA* liegende Ribosomenbindestelle durch die zu *ectB* gehörige Ribosomenbindestelle ersetzt wird.

PromA	CTAGATCATCCAGGGCATCGCCATTGCCGTACGGGCCGGGCTGACCAAGGCACAGTTCCA	60
PromKB1	CTAGATCATCCAGGGCATCGCCATTGCCGTACGGGCCGGGCTGACCAAGGCACAGTTCCA	59

PromA	CCAGACGGTGGGCATTCATCCCACGGCGCCGAAGAATTCGTGACCATGCGTACTCCGAC	120
PromKB1	CCAGACGGTGGGCATTCATCCCACGGCGCCGAAGAATTCGTGACCATGCGTACTCCGAC	119

PromA	ACGCCGCTGACGACCTTCGGGCAATCCTGTACGGCGATGTCAATTCGGACGGGGCCACCCT	180
PromKB1	ACGCCGCTGACGACCTTCGGGCAATCCTGTACGGCGATGTCAATTCGGACGGGGCCACCCT	179

PromA	CGAGGTGGCCCGTTGCGTTATGCGTATGGCCCCGAATGAATGTGGACTAAACTGGGTCTGT	240
PromKB1	CGAGGTGGCCCGTTGCGTTATGCGTATGGCCCCGAATGAATGTGGACTAAACTGGGTCTGT	239

PromA	GCGAACGTCCTGCATTTCGATGCCTTTTCGTACAAGACCTGCCGGGGGACATCAGCCGGTA	300
PromKB1	GCGAACGTCCTGCATTTCGATGCCTTTTCGTACAAGACCTGCCGGGGGACATCAGCCGGTA	299

PromA	CGAGCGCCGGTGGTTCGATGTTCGCAAGAATGGGGAGAGCCGCTACATACGGCCTGGGGA	360
PromKB1	CGAGCGCCGGTGGTTCGATGTTCGCAAGAATGGGGAGAGCCGCTACATACGGCCTGGGGA	359

PromA	GTGGGCTATAATTTTCTATTATGGAATTCAGCAAGCAAGATAACCTGGTTT	420
PromKB1	GTGGGCTATAATTTTCTATTATGGAATTCAGCAAGCAAGATAACCTGGTTT	419

PromA	CCATAAGCGGCTGTATATGATGCCGATCAAATTCGCT-ACAGCGAACCCACGAACATG	475
PromKB1	CCATAAGCGGCTGTATATGATGCCGATCAAATTCGCTCACAGGAGGTCG---ACATG	472

Abbildung 40: Vergleich der Promotorbereiche *promA* und *promKB1*

Dargestellt sind die Promotorbereiche *promA* aus dem Vektor pPromEct sowie *promKB1* aus dem Vektor pWUB. Blau dargestellt wurden die Startcodons für *ectA* (*promA*) bzw. *ectB* (*promKB1*). Gelb hinterlegt ist ein durch die Einführung einer *Bsplu111*-Schnittstelle verursachter Basenaustausch (CA → AC). Grün hinterlegt ist die potentielle RBS vor *ectA* (*promA*) bzw. die RBS vor *ectB* (*promKB1*). Pink hinterlegt wurden die Transkriptions-bestimmenden Elemente eines σ^{38} - sowie eines σ^{70} -Promotors (Schwibbert *et al.* 2010). Basenaustausche im *promKB1*-Bereich, die bereits bei der Sequenzierung von KB1 gefunden wurden (Grammann 2000), sind mit Kästen hervorgehoben. Eine solche Punktmutation an Position 351 betrifft die -35-Region des σ^{38} -Promotors.

6.3 Homologe Proteinexpression in *H. elongata*

Zur Untersuchung des Promotorbereichs *PromKB1* wurden zunächst zwei verschiedene aus *H. elongata* stammende Gene in den Vektor *pWUB* kloniert, nämlich das für die Ectoin-Synthase kodierende Gen *ectC* sowie das für die Ectoin-Hydroxylase codierende Gen *ectD*. Durch Expressionsstudien sollte die Funktionalität des Vektors *pWUB* und somit der Promotorregion *promKB1* bestätigt werden. Zudem sollte durch Verwendung der analogen *pPromEct*-basierenden Vektoren ein direkter Vergleich der Promotorregionen *promA* und *promKB1* ermöglicht werden.

6.3.1 Konstruktion der Vektoren *pWUB_ectC_Hel* und *pPromEct_ectC_Hel*

Zur Konstruktion des Vektors *pWUB_ectC_Hel* wurde das Gen *ectC* aus *H. elongata* WT unter Verwendung der Primer *ectC_for_pagI* und *ectC_rev_prom* amplifiziert. Durch diese beiden Primer wurden zwei Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt eingebaut: Im Bereich des *ectC*-Startcodons eine *Bsplu11I*-kompatible *PagI*-Schnittstelle sowie eine *HindIII*-Schnittstelle stromabwärts von *ectC*. Unter Ausnutzung der im Vektor enthaltenen *Bsplu11I*- und *HindIII*-Schnittstellen können Gene exakt an der Stelle des *ectB*-Startcodons in die *promKB1*-Promotorregion des Vektors *pWUB* eingebaut werden. Die Konstruktion des Vektors *pWUB_ectC_Hel* durch Einbau des *ectC*-Fragments in den *pWUB*-Vektor erfolgte anschließend wie in Abbildung 41 dargestellt.

Analog zu dieser Vektorkonstruktion und unter Ausnutzung derselben Primer und Schnittstellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Vektor *pPromEct_ectC_Hel* konstruiert, indem das Gen *ectC* aus *H. elongata* in den Vektor *pPromEct* eingebracht wurde. Die Vektoren *pPromEct_ectC_Hel* und *pWUB_ectC_Hel* sind somit identisch mit Ausnahme der Veränderung im Promotorbereich und erlauben somit, die Auswirkung dieser Veränderung genauer zu untersuchen.

III Ergebnisse

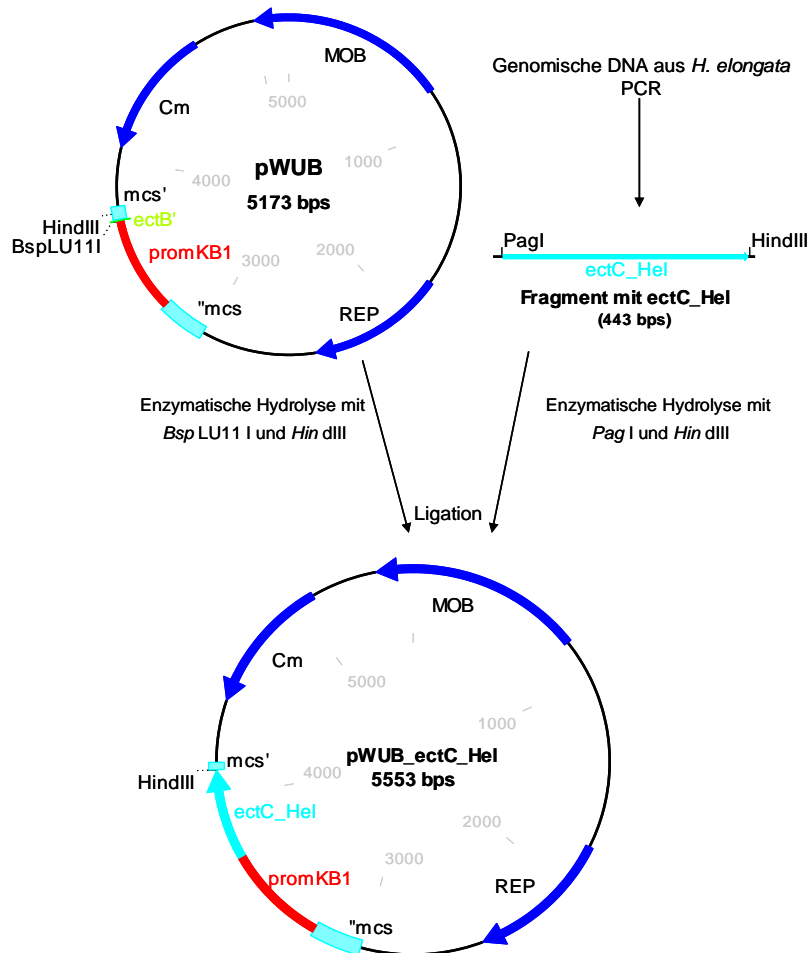


Abbildung 41: Konstruktion des Vektors pWUB_ectC_Hel

Als Ausgangsvektor dient pWUB. Die Restriktionsenzyme *Bsp*LU11I und *Pag*I produzieren kompatible Überhänge, deren Ligation jedoch die Erkennungssequenzen für beide Enzyme zerstört. Ein Ausschnitt der Vektorsequenz ist im Anhang zu finden (Abbildung 75).

6.3.1.1 Vergleich der Expressionsniveaus von pPromEct und pWUB

Durch direkten Vergleich der Proteinexpression mittels der Vektoren pPromEct_ectC_Hel und pWUB_ectC_Hel sollte untersucht werden, ob die oben beschriebenen Veränderungen in der *promKB1*-Promotorregion die Promotorstärke beeinflussen.

Hierzu wurden die beiden Vektoren durch Konjugation in die Deletionsmutante *H. elongata* WUB01 (Δ *ectC*) transferiert, wodurch es zu einer Komplementierung kam, die die Fähigkeit zur Ectoinbiosynthese wiederherstellte. Durch Verwendung einer *ectC*-Deletionsmutante konnte sichergestellt werden, dass in einem Proteingel keine genomisch exprimierte Ectoin-Synthase dargestellt wurde.

III Ergebnisse

Die resultierenden Stämme *H. elongata* WUB01 pPromEct_ectC_Hel und *H. elongata* WUB01 pWUB_ectC_Hel wurden anschließend unter identischen Bedingungen (MM63-7/Cm50, 30 °C) angezogen und das Gesamtzellprotein mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abbildung 42). Der direkte Vergleich im Proteingel zeigt einen deutlichen Unterschied in der Expressionsstärke der beiden verwendeten Vektoren. Bei der Expression der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* wird ein Expressionsprodukt mit einem theoretischen Molekulargewicht von ca. 15,46 kDa erwartet. Während eine Proteinbande dieser Größe bei Verwendung des pPromEct-Vektors lediglich sehr schwach auftritt ist in der Probe des pWUB-Vektors eine deutliche Überexpression der Ectoin-Synthase nachweisbar.

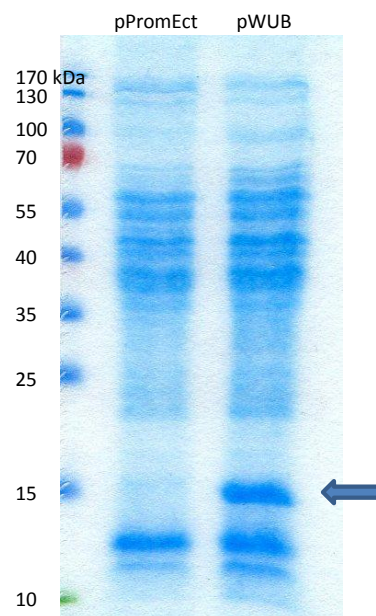


Abbildung 42: Vergleich der homologen, vektorbasierten EctC-Expression in *H. elongata* WUB01

Verglichen wurde das Gesamtzellprotein der Stämme *H. elongata* WUB01 pPromEct_ectC_Hel und *H. elongata* WUB01 pWUB_ectC_Hel. Die Kultur der Stämme erfolgte bei 30 °C in MM63-7/Cm50. Deutlich zu sehen ist die Vektor-vermittelte EctC-Expression mittels pWUB-Vektor (Pfeil).

6.3.1.2 ADPC-Produktion

Auf die Verwendung des Vektors pWUB_ectC_Hel zur Produktion von ADPC durch homologe Überexpression der Ectoin-Synthase in *H. elongata* wird in Kapitel III7 näher eingegangen.

6.3.2 Konstruktion des Vektors pWUB_ectD_Hel

Zur Konstruktion des Vektors pWUB_ectD_Hel wurde das Gen *ectD* aus *H. elongata* WT unter Verwendung der Primer ectDProm_for2 und ectDProm_rev2 amplifiziert. Durch diese beiden Primer wurden zwei Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt eingebaut: Im Bereich des *ectD*-Startcodons eine *Bsp*lu11I-Schnittstelle sowie eine *Hin*dIII-Schnittstelle stromabwärts von *ectD*. Es muss beachtet werden, dass der Einbau der *Bsp*lu11I-Schnittstelle zu einer Punktmutation im *ectD*-Gen und einem damit einhergehenden Aminosäureaustausch führt (Alanin anstelle eines Serins nach dem Start-Methionin). Die Konstruktion des Vektors pWUB_ectD_Hel durch Einbau des *ectD*-Fragments in den pWUB-Vektor erfolgte anschließend wie in Abbildung 43 dargestellt.

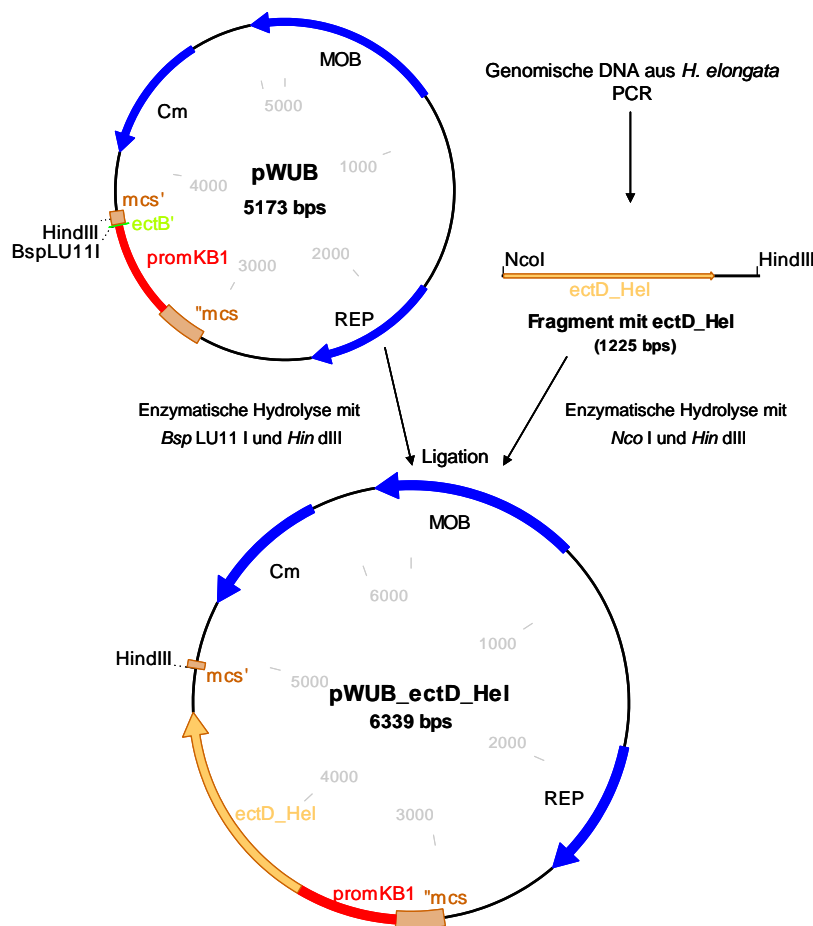


Abbildung 43: Konstruktion des Vektors pWUB_ectD_Hel

Als Ausgangsvektor dient pWUB. Die Restriktionsenzyme *Bsp*lu11I und *Nco*I produzieren kompatible Überhänge, deren Ligation jedoch die Erkennungssequenzen für beide Enzyme zerstört. Ein Ausschnitt der Vektorsequenz ist im Anhang zu finden (Abbildung 76).

6.3.2.1 Hydroxyectoin-Produktion im Schüttelkolben

Um die Auswirkung des Promotorbereichs vor dem *ectD*-Gen auf die Ectoinhydroxylierung näher zu untersuchen, wurde wieder mit zwei analog konstruierten Vektoren gearbeitet. Zum einen mit dem oben beschriebenen pWUB_ectD_Hel, zum anderen mit dem bereits zuvor von Meffert konstruierten pPromEct_ectD (Meffert 2011). Beide Vektoren wurden konjugativ in den Stamm *H. elongata* WT transferiert und die resultierenden Plasmid-tragenden Stämme unter identischen Bedingungen angezogen (MM63-7/Cm50, 37 °C, Ernte in der stationären Phase). Die Analyse des intrazellulären Solutegehalts erfolgte mittels isokratischer HPLC (siehe Abbildung 44).

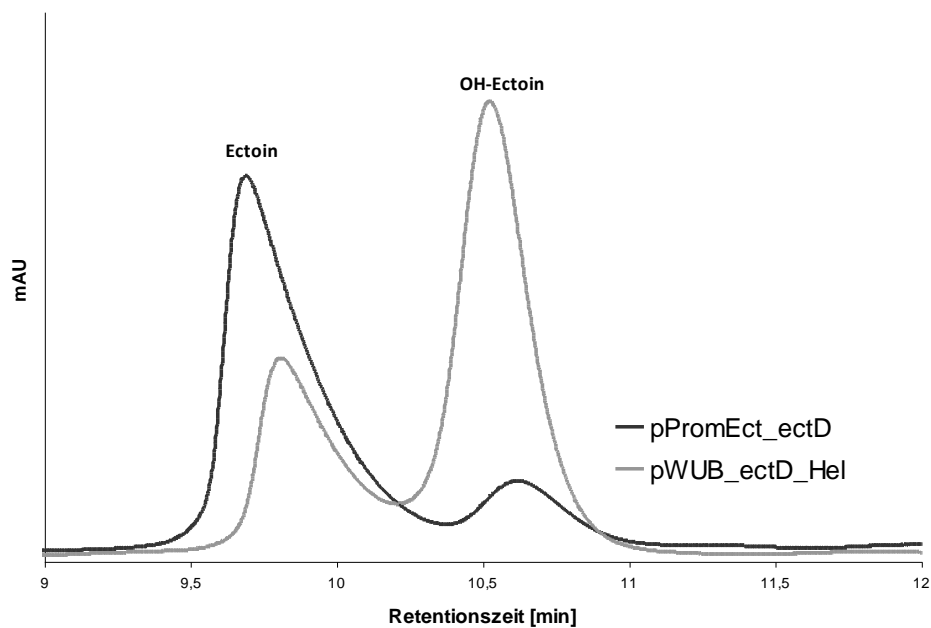


Abbildung 44: Hydroxyectoin-Produktion in *H. elongata* durch Vektor-basierte EctD-Expression

Dargestellt sind RI-Spektren der HPLC-Analyse von Zellextrakten der Stämme *H. elongata* pPromEct_ectD und *H. elongata* pWUB_ectD_Hel nach Anzucht in MM63-7/Cm50 bei 37 °C. Deutlich zu erkennen ist eine Umkehrung des Ectoin-Hydroxyectoin-Verhältnisses zugunsten der hydroxylierten Form im Stamm *H. elongata* pWUB_ectD_Hel.

Der direkte Vergleich des Solutespektrums der beiden Stämme zeigt eine deutliche Verschiebung des Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnisses zugunsten der hydroxylierten Form bei Verwendung des pWUB-Vektors (siehe Abbildung 44). Auch diese Daten unterstützen die Hypothese, dass es sich bei der *promKB1*-Promotorregion im Vergleich zu *promA* um einen deutlich verstärkten Promotor handelt, da der gesteigerte Hydroxyectoin-Gehalt auf eine erhöhte EctD-Menge in den Zellen schließen lässt. Meffert konnte mittels SDS-PAGE diese

III Ergebnisse

Überexpression des EctD-Proteins in dem Stamm *H. elongata* WUB02 pWUB_ectD_Hel deutlich zeigen (Meffert 2011).

Um im Weiteren die Hydroxyectoin-Produktion zu optimieren wurde der Stamm *H. elongata* pWUB_ectD_Hel unter variablen Salzkonzentrationen bzw. Temperaturen kultiviert und das intrazelluläre Solutepektrum mittels isokratischer HPLC analysiert. Aus vorangegangenen Arbeiten (Ures 2005, Meffert 2011) war bereits bekannt, dass eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur bei *H. elongata* den Hydroxyectoin-Gehalt erhöht.

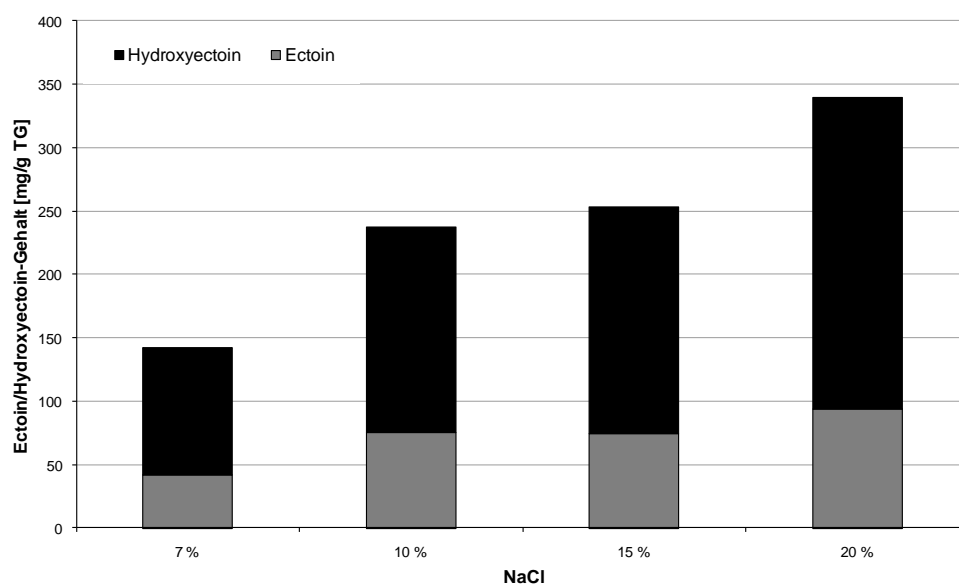


Abbildung 45: *H. elongata* pWUB_ectD_Hel bei variabler NaCl-Konzentration

Ectoin- und Hydroxyectoingehalt des Stammes *H. elongata* pWUB_ectD_Hel bei Wachstum in MM63/Cm50 mit variablem NaCl-Gehalt [% (w/v)].

Wie in Abbildung 45 deutlich zu erkennen, nimmt mit steigender Salzkonzentration nicht nur der Gesamtsolutegehalt der Zelle, sondern auch der Anteil des Hydroxyectoins am Gesamtectoin-Pool zu. Dies deckt sich mit den Erwartungen, da aufgrund des salzinduzierten Promotors bei höheren Salzkonzentrationen auch mit einer verstärkten EctD-Expression zu rechnen ist.

Abbildung 46 zeigt den Einfluss der Temperatur auf die Hydroxyectoin-Produktion. Die bereits in vorhergehenden Arbeiten (Ures 2005, Meffert 2011) an *H. elongata* WT erfolgte Beobachtung, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einer höheren Hydroxyectoin-Ausbeute führt, bestätigt sich hier auch für den plasmidtragenden Stamm *H. elongata* pWUB_ectD_Hel. Die Abbildung zeigt zudem, dass mittels des Vektors pWUB_ectD_Hel eine starke Verbesserung

III Ergebnisse

der Hydroxyectoin-Ausbeute in *H. elongata* erzielt werden konnte. Bei hohen Temperaturen von z. B. 45 °C konnte ein Hydroxyectoin-Anteil von ca. 95 % erreicht werden (Abbildung 46).

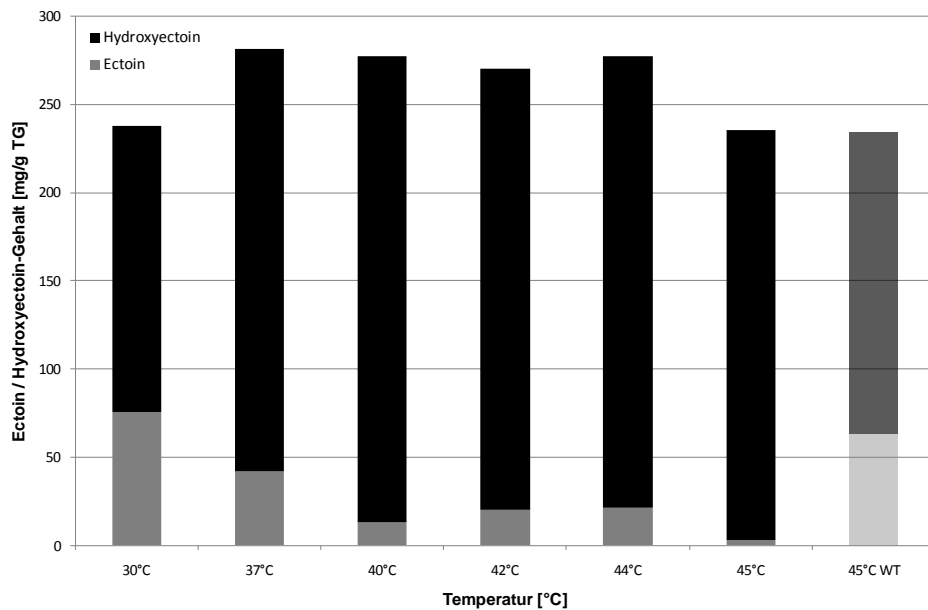


Abbildung 46: *H. elongata* pWUB_ectD_Hel bei variabler Temperatur

Ectoin- und Hydroxyectoingehalt des Stammes *H. elongata* pWUB_ectD_Hel bei Wachstum in MM63-10/Cm50 bei variabler Temperatur. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Werte einer Wildtyp-Kultur bei Wachstum in MM63-10 bei 45 °C beigegefügt (transparenter Balken).

6.3.2.2 Hydroxyectoinproduktion im Fermenter

Um das Potential des neuen Stammes *H. elongata* pWUB_ectD_Hel für die Hydroxyectoin-Produktion auch im großtechnischen Maßstab zu untersuchen, wurde der Stamm mit einem Arbeitsvolumen von 15 L in einem NLF-Fermenter (Bioengineering) kultiviert. Als Fermentationsmedium diente Glucose-Citrat-Medium mit 10 % (w/v) NaCl, die Kultivierungstemperatur wurde mit 40 °C deutlich höher gewählt als für übliche Kulturen von *H. elongata*, um die Hydroxyectoin-Produktion zu unterstützen. Um die Plasmidstabilität zu gewährleisten wurde das Medium mit Chloramphenicol versetzt (50 µg/mL) und dieses zusätzlich über den gesamten Fermentationsverlauf in regelmäßigen Abständen zugesetzt.

Es wurden zwei unterschiedliche Typen der Fermenter-Kultur angewendet (siehe Abbildung 47): In der ersten Fermentation (Fermentation a) wurde versucht, mittels Fütterung mit Fed-Batch-Lösung 2 eine Hochzelldichte zu erreichen. Bei der zweiten Fermentation (Fermentation b) wurde auf die Fütterung verzichtet, also ein Batch-Verfahren gewählt, und gleichzeitig auf eine bessere Sauerstoffversorgung der Kultur geachtet.

III Ergebnisse

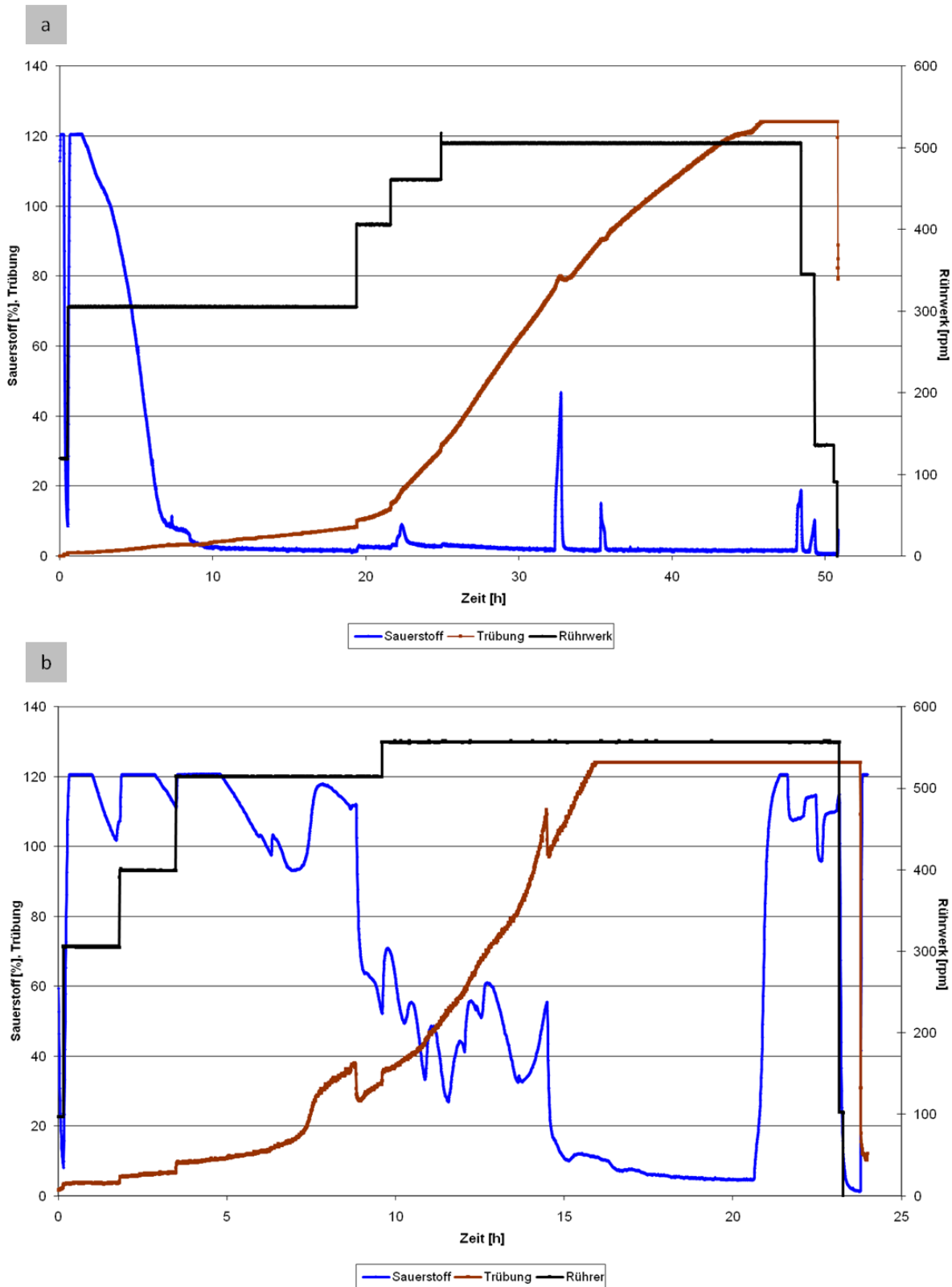


Abbildung 47: Fermentationen des Stammes *H. elongata* pWUB_ectD_Hel im 15 L-Maßstab

Dargestellt sind die Fermentations-Parameter Sauerstoffgehalt, Trübung und Rührwerkgeschwindigkeit über den Zeitverlauf. a: Fed-Batch-Fermentation, b: Batch-Fermentation

III Ergebnisse

Am Verlauf einer solchen Fermentation lässt sich beispielhaft das Wachstum von *H. elongata* in Glucose-Citrat-Medium zeigen. Wie in Abbildung 47 und Abbildung 48 deutlich zu sehen, folgt das Wachstum auf diesem C-Quellen-Gemisch einem diauxischen Verlauf, welcher sich anhand der pH-Messung gut verfolgen lässt. Die enzymatischen Quantifizierungen von Glucose und Citrat machen deutlich, dass Citrat die bevorzugte und demzufolge zuerst verstoffwechselte C-Quelle darstellt. Die Umstellung auf die zweite C-Quelle Glucose lässt sich anhand eines kurzzeitigen Anstiegs in der Sauerstoffkonzentration und einem Absinken des pH-Wertes genau zeitlich einordnen. Es wurde aufgrund dessen entschieden, Hochzelldichte-Fermentationen mit *H. elongata* im Fed-Batch-Verfahren mit Fed-Batch-Lösung 2 durchzuführen (Glucose als einzige C-Quelle), um eine erneute Metabolismus-Umstellung durch Citratnachfütterung zu vermeiden.

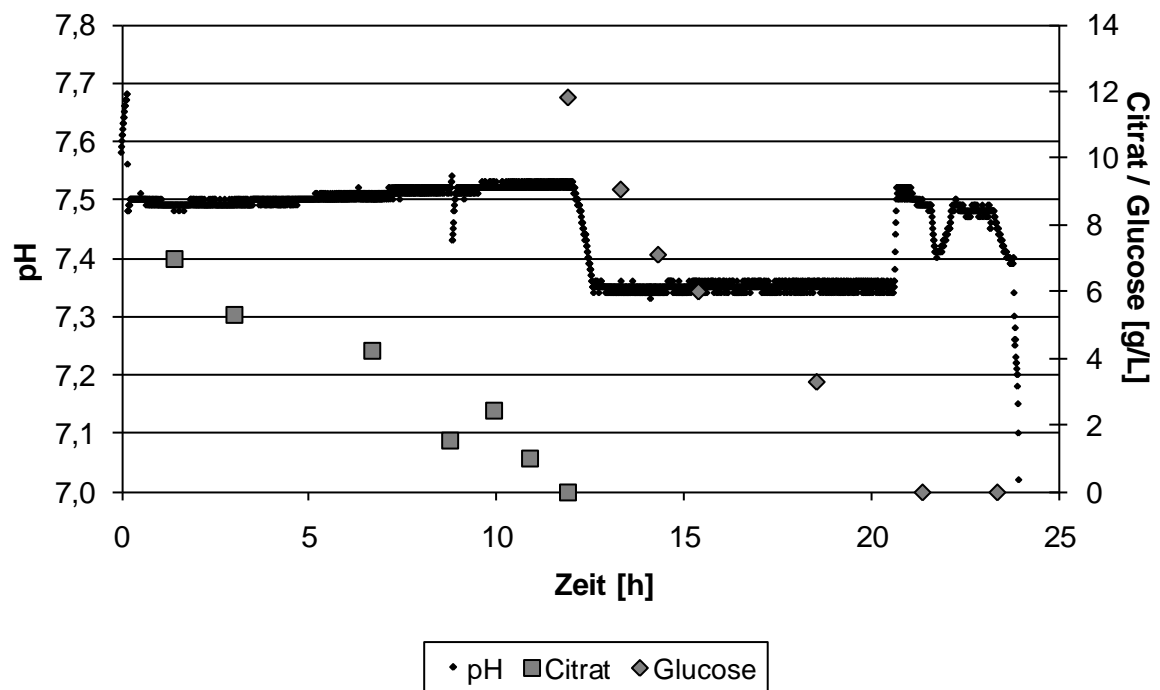


Abbildung 48: Citrat-Glucose-Metabolismus in einer Batch-Fermentation von *H. elongata* pWUB_ectD_Hel in GC-10/Cm50-Medium (Fermentation b).

Dargestellt sind der pH-Wert, der in den Grenzen von ca. 7,35 und 7,5 automatisch reguliert wurde, sowie die enzymatisch bestimmten Citrat- und Glucosekonzentrationen im Medium.

Fermentation a stellt die durchgeführte Fed-Batch-Fermentation mit *H. elongata* pWUB_ectD_Hel in GC-10-Medium dar (vgl. Abbildung 47 a). Nach ca. 23 h erfolgte der C-Quellen-Wechsel von Citrat auf Glucose (zu erkennen an einem kurzen Anstieg der Sauerstoffkonzentration), nach ca. 33 h begann die Zufütterung der Fed-Batch-Lösung mit

III Ergebnisse

Glucose als einziger C-Quelle, da die im Batch eingesetzte Glucose aufgebraucht war (wieder zu erkennen am Sauerstoffanstieg). Die Fütterung erfolgte mit gleichbleibender Flussrate und wurde nach ca. 36 h Fermentationsdauer kurzzeitig unterbrochen, was zu einem annähernd sofortigen Anstieg der Sauerstoffkonzentration führte. Der erneute Anstieg der Sauerstoffkonzentration nach ca. 48 h weist auf eine beginnende stationäre Phase hin, zu diesem Zeitpunkt wurde die Ernte der Fermenterkultur eingeleitet. Wie Abbildung 47 a deutlich zeigt, ist diese Fed-Batch-Fermentation durch eine durchgehende Limitierung an Sauerstoff charakterisiert, die durch eine hohe Zelldichte und einen unter diesen Bedingungen zu geringen Sauerstoffeintrag hervorgerufen wird.

Auch **Fermentation b** zeigt den Wechsel von Citrat auf Glucose bei einer Kulturdauer von ca. 12 h (vergleiche Abbildung 47 b und Abbildung 48). Der Eintritt in die stationäre Phase und somit der Beginn der Ernte erfolgte hier bereits nach ca. 22 h, da in dieser Fermentation auf eine Zufütterung nach Beendigung des ersten Batch verzichtet wurde. Wie Abbildung 47 b zeigt, wurde in dieser Fermentation versucht, die Sauerstoffkonzentration im Fermenter durchgehend höher zu halten, was durch eine verstärkte Luftzufuhr von bis zu 15 L/min auch bis zu einer Kulturdauer von ca. 15 h gelang. Die deutlich erhöhte Sauerstoffversorgung ist auch der Grund für die wesentlich schnellere Anwachsphase der Kultur in Fermentation b verglichen mit Fermentation a.

Der intrazelluläre Solutegehalt wurde anhand von Zellproben über den Wachstumsverlauf mittels HPLC analysiert (siehe Abbildung 49). Abbildung 49 a zeigt den Verlauf der Hydroxyectoin-Produktion während der Fed-Batch-Fermentation, in der Sauerstoff als limitierender Faktor gelten muss. Nach ca. 10 h Kulturdauer beträgt der Hydroxyectoin-Anteil 65 % des Gesamtectoingehalts. Im weiteren Verlauf reduziert sich dieser Wert auf ein 50:50-Verhältnis, wie man es auch im *H. elongata* Wildtyp erwarten würde. Dem gegenüber steht ein Hydroxyectoinanteil von bis zu 85 % während der Batch-Fermentation (Abbildung 49 b). Auch hier korreliert die Hydroxyectoin-Produktion mit der Entwicklung des Sauerstoffgehalts im Fermenter (vgl. Abbildung 47).

III Ergebnisse

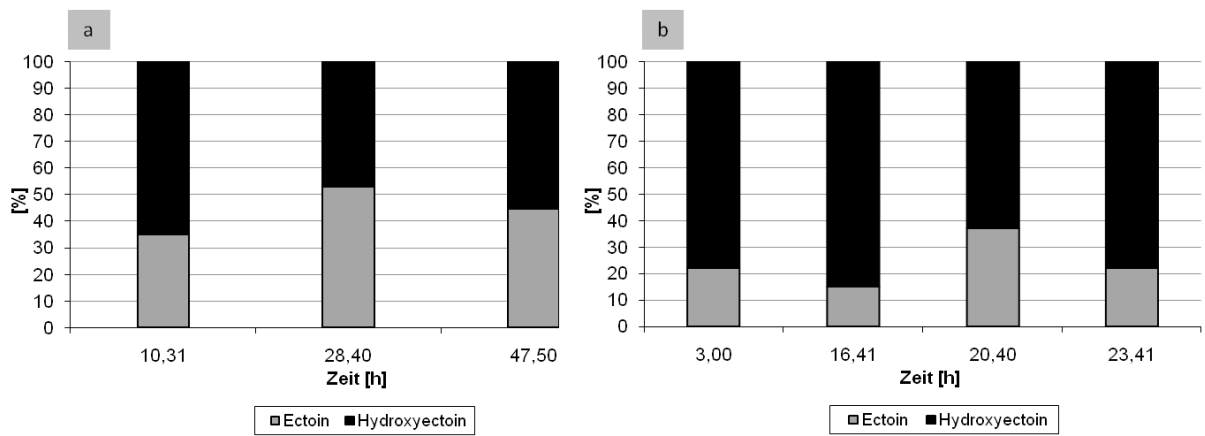


Abbildung 49: Relative Solutezusammensetzung des Stammes *H. elongata* pWUB_ectD_Hel über den Fermentationszeitraum.

Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis von Ectoin und Hydroxyectoin in Zellextrakten des Stammes *H. elongata* pWUB_ectD_Hel im Zeitverlauf zweier verschiedener Fermentationen. a: Proben aus der Fermentation a (Fed-Batch), b: Proben aus der Fermentation b (Batch)

Der Versuch der Hydroxyectoin-Produktion mittels *H. elongata* pWUB_ectD_Hel im 15 L-Fermenter macht deutlich, dass die im Schüttelkolben erzielten Daten (vgl. Abbildung 46) nicht ohne weiteres auf Produktionen im größeren Maßstab angewendet werden können. Während die Kultur in einem Volumen von 100 mL bei 40 °C einen Hydroxyectoin-Anteil von ca. 95 % erreichte (Abbildung 46), konnte während der Fermentationen im besten Fall ein Anteil von 85 % erzielt werden (Abbildung 49). Neben der potentiellen Möglichkeit der Plasmidinstabilität scheint der Grund hierfür in der benötigten guten Sauerstoffversorgung für die Hydroxylierungsreaktion zu liegen, die insbesondere bei Kulturen hoher Zelldichte nicht erreicht werden konnte.

6.4 Heterologe Proteinexpression in *H. elongata*

Die unter III.6.3 beschriebenen Verwendungen des pWUB-Vektors befassten sich mit homologer Expression, es wurden also *H. elongata*-eigene Gene exprimiert. Im Weiteren wurde untersucht, ob das pWUB-System in *H. elongata* ähnlich dem pET-System in *E. coli* zur heterologen Expression von Fremdgenen einsetzbar ist. Besonderes Augenmerk lag hier auf Proteinen, deren Expression in *E. coli* Probleme bereitet, die also z. B. dazu neigen, in *inclusion bodies* zu akkumulieren. Es wurde vermutet, dass durch die Akkumulation proteinstabilisierender kompatibler Solute bei der osmotisch induzierten Proteinexpression in

H. elongata ein intrazelluläres Milieu geschaffen wird, dass die Bildung von *inclusion bodies* reduzieren könnte.

6.4.1 Konstruktion des Vektors pWUB_His

Die Verwendung eines His₆-tags in der Proteinexpression ermöglicht neben der vereinfachten Proteinreinigung über Affinitätschromatographie auch die Detektion des Zielproteins über einen Immunoblot. Um diese Möglichkeiten auch in *H. elongata* zu haben, wurde bereits in den Vektor pPromEct eine His₆-tag-Region eingebracht (Burdziak 2006).

Ähnlich dieser vorangegangenen Arbeit wurde in der vorliegenden Arbeit ein His₆-tag-Fragment in den Vektor pWUB eingebracht. Hierzu wurde eine His₆-tag-enthaltende Region des Vektors pET-22b(+) unter Verwendung der Primer His_for_PstI und His-tag for 1 amplifiziert. Der Einbau des Fragments in den Vektor pWUB erfolgte über *Pst*I- und *Hind*III-Schnittstellen wie in Abbildung 50 dargestellt.

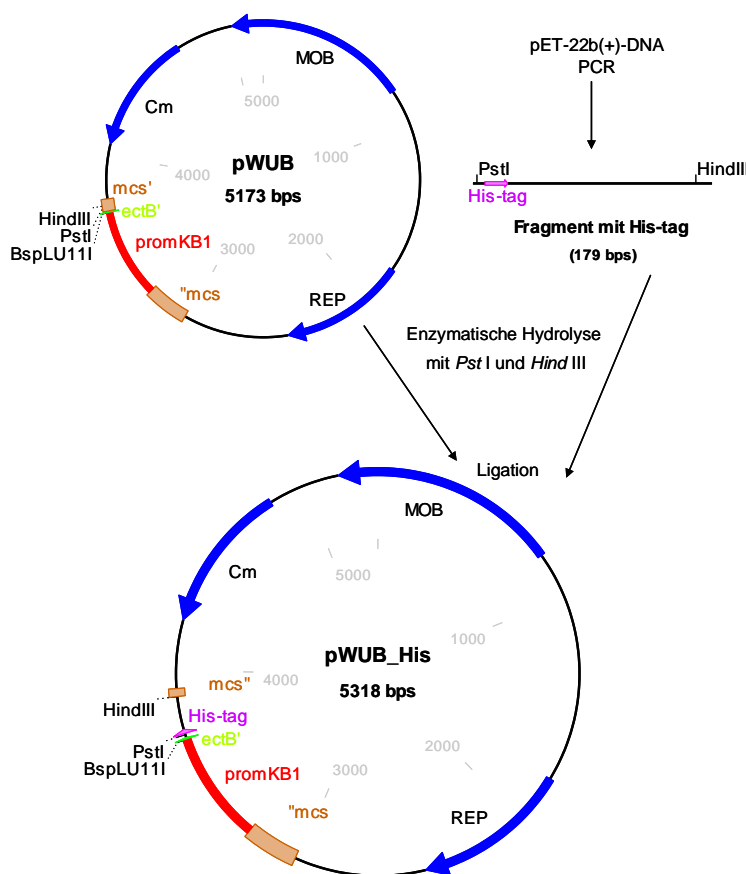


Abbildung 50: Konstruktion des Vektors pWUB_His

Als Ausgangsvektor dient pWUB. Das inserierte His₆-tag-Fragment wurde aus dem Vektor pET-22b(+) amplifiziert und dient der C-terminalen His₆-tag-Fusion beliebiger in *H. elongata* zu exprimierender Proteine. Ein Ausschnitt der Vektorsequenz ist im Anhang zu finden (Abbildung 77).

III Ergebnisse

Der resultierende Vektor wurde als pWUB_His bezeichnet. Wie schon der Ausgangsvektor pWUB erlaubt dieser Vektor den Einbau von Genen exakt an der Stelle des *ectB*-Startcodons in die Promotorregion *promKB1* unter Ausnutzung der *Bsplu11I*-Schnittstelle. Zusätzlich wird ermöglicht, durch Ausnutzung der *PstI*-Schnittstelle eine Fusion des Gens mit einem His₆-tag durchzuführen. Hierbei werden zwei Aminosäuren als Spacer eingeführt (Leucin und Glutamin).

6.4.2 Konstruktion des Vektors pWUB_ectC_Psyr_His

Um die heterologe Expression von Fremdproteinen in *H. elongata* mittels des Vektors pWUB zu untersuchen, wurde ein Protein gewählt, dessen Expression in dem Standard-Expressionssystem *E. coli* Probleme bereitet. Das als Ectoin-Synthase annotierte Protein EctC aus *Pseudomonas syringae* akkumulierte bei Expression in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* und war nicht funktionell exprimierbar (Seip 2009).

Zur Konstruktion des Vektors pWUB_ectC_Psyr_His wurde das Gen *ectC* aus *P. syringae* unter Verwendung der Primer Psy_WU_for und Psyr_WUBHis_rev amplifiziert. Durch diese beiden Primer wurden zwei Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt eingebaut: Im Bereich des *ectC*-Startcodons eine *Bsplu11I*-Schnittstelle sowie eine *PstI*-Schnittstelle stromabwärts von *ectC*. Die Konstruktion des Vektors pWUB_ectC_Psyr_His durch Einbau des *ectC*-Fragments in den Vektor pWUB_His erfolgte wie in Abbildung 51 dargestellt.

Das resultierende Genprodukt ist eine putative Ectoin-Synthase aus *P. syringae*, die eine um 8 Aminosäuren (inklusive His₆-tag) erweiterte Proteinsequenz am C-Terminus aufweist (EctC_Psyr_His).

Tabelle 10: Eigenschaften von EctC_Psyr_His

Name	AS	kDa	pI
EctC_Psyr_His	136	15,56	5,96

III Ergebnisse

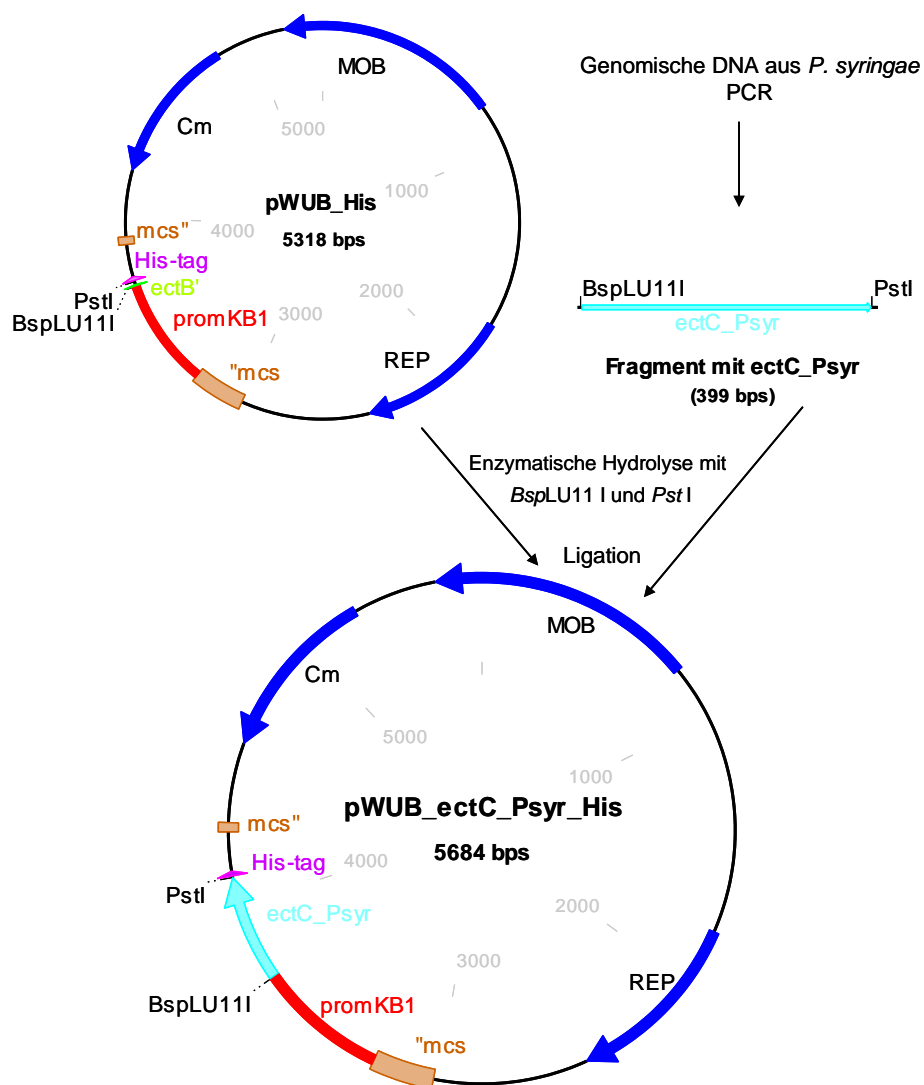


Abbildung 51: Konstruktion des Vektors **pWUB_ectC_Psy_His**

Als Ausgangsvektor diente **pWUB_His**. Die **ectC_Psy**-Sequenz wurde C-terminal mit einer **His₆-tag**-Sequenz fusioniert. Ein Ausschnitt der Vektorsequenz ist im Anhang zu finden (Abbildung 78).

6.4.2.1 Expression und Proteinreinigung

Der wie in III.6.4.2 beschrieben konstruierte Vektor **pWUB_ectC_Psy_His** wurde in den Rezipientenstamm *H. elongata* WT konjugiert. Der resultierende Stamm *H. elongata* **pWUB_ectC_Psy_His** wurde in MM63-10/Cm50 angezogen, geerntet und das Pellet einer His-tag-Reinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie (vgl. II.9.4.1.1) unterzogen. Expression und Verlauf der Proteinreinigung wurden mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 52).

III Ergebnisse

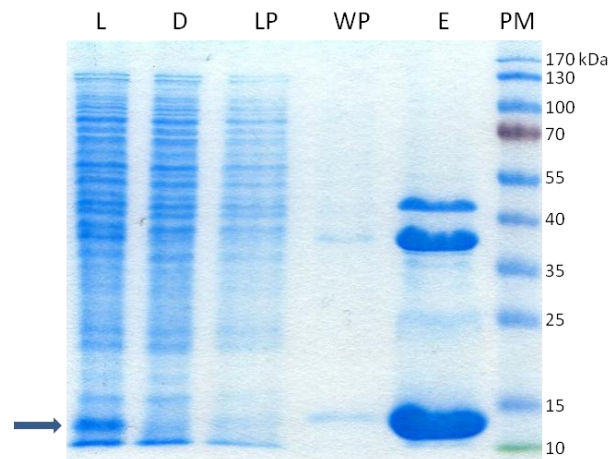


Abbildung 52: SDS-PAGE-Analyse der Expression und Reinigung des Proteins EctC_Psyr_His

Verlauf der His-tag-Reinigung des Proteins EctC_Psyr_His aus *H. elongata*. Mit einem Pfeil markiert wurde das Expressionsprodukt. L: Lysat, D: Durchfluss, LP: Lysispuffer-Fraktion, WP: Waschpuffer-Fraktion, E: Eluat, PM: Proteinmarker

Wie in Abbildung 52 dargestellt, ist im löslichen Gesamtprotein des Zell-Lysats eine deutliche Expressionsbande zu erkennen. Diese Proteinbande findet sich ebenfalls deutlich aufkonzentriert im Eluat der Ni-NTA-Reinigung wieder, so dass davon auszugehen ist dass es sich um das Protein EctC_Psyr_His handelt. Der Vergleich mit dem Proteingrößenmarker zeigt ein Molekulargewicht von unter 15 kDa an, obwohl die theoretische Größe des Proteins bei 15,56 kDa liegen sollte (vgl. Tabelle 10). Dieses Phänomen wurde jedoch bereits von Seip beschrieben (Seip 2009).

Die Analyse der Proteinreinigung zeigt, dass EctC_Psyr_His in der Ni-NTA-Chromatographie angereichert sowie von einem großen Teil des restlichen Zellproteins separiert werden konnte. Auffällig sind jedoch verunreinigende Proteine im Bereich von ca. 38 kDa und ca. 45 kDa, die bei His-tag-Reinigungen aus *E. coli* in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurden und somit als *Halomonas*-spezifisch angesehen werden können.

Da *in vivo* bereits gezeigt werden konnte, dass die Ectoin-Synthase aus *Pseudomonas syringae* bei Vektor-codierter Expression in *H. elongata* WUB01 ($\Delta ectC$) die Fähigkeit zur Ectoin-Synthase vermittelt (Kurz 2010), kann davon ausgegangen werden, dass sich das Enzym in nativer Form in *H. elongata* exprimieren lässt. Somit stellt die Überexpression des Enzyms mittels pWUB-Vektor in *H. elongata* eine geeignete Alternative zu *E. coli*-Expressionssystemen dar.

7 ADPC

7.1 Produktion

7.1.1 Verschiedene Produktionsstämme

Die Produktion von ADPC wurde bislang in verschiedenen *H. elongata*-Stämmen sowie in *E. coli* nachgewiesen. Voraussetzung für die Bildung des ADPC ist jedoch immer das Vorhandensein einer aktiven Ectoin-Synthase, da dieses Enzym die Bildung von ADPC aus Glutamin katalysiert (Witt 2005).

Das Vorkommen von ADPC, zumindest in Spuren, in *H. elongata* WT wurde schon in der vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) gezeigt. Erstmals nachgewiesen und im größeren Maßstab produziert wurde ADPC jedoch in der Deletionsmutante *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$), einem Stamm, in dem die Ectoin-Synthase nachgewiesenermaßen in erhöhter Menge vorliegt (vgl. III.6.1). Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene EctC-exprimierende Stämme in Hinblick auf ihre ADPC-Produktion untersucht, wobei neben verschiedenen *H. elongata*-Stämmen auch der heterologe EctC-Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) in Kombination mit dem Vektor pET-22b_ectC_Hel bzw. pET-22b_ectC_Hel_His (vgl. III.4.2.1) hinzugezogen wurde.

Die erreichten zellassozierten ADPC-Gehalte der verschiedenen Stämme sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Vergleich verschiedener ADPC-Produzenten

Verglichen wurden die zellassozierten ADPC-Gehalte verschiedener im Rahmen dieser Arbeit untersuchter ADPC-Produzenten. Für diesen Vergleich wurden die für den jeweiligen Stamm bei 3 % NaCl höchsten bestimmten Werte herangezogen. Neben den *H. elongata*-Stämmen KB1, SAA4 und WUB02 pWUB_ectC_Hel wurde auch der heterologe EctC-Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel untersucht.

Stamm	ADPC-Gehalt [mg/g TG]
<i>H. elongata</i> KB1	15
<i>H. elongata</i> SAA4	2
<i>H. elongata</i> WUB02 pWUB_ectC_Hel	28
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel	18

Der Vergleich des zellassozierten ADPC-Gehalts der *H. elongata*-Stämme KB1 ($\Delta ectA$) und SAA4 (*ectA::Tn1732*) bestätigt die in III.6.1 beschriebene Beobachtung der verstärkten EctC-Expression in dem Stamm KB1 (vgl. Abbildung 38). Beiden Stämmen fehlt ein funktionstüchtiges EctA-Protein, jedoch nur der Stamm KB1 verfügt über die durch die Gendeletion

III Ergebnisse

hervorgerufene Veränderung im Promotorbereich. Dieser genomische Unterschied wirkt sich deutlich auf die ADPC-Produktion aus, denn während der Stamm KB1 annähernd 15 mg/g TG akkumuliert, finden sich in SAA4 lediglich ca. 2 mg/g TG.

Zwei weitere Stämme wurden hinsichtlich ihrer Eignung als ADPC-Produzenten untersucht: *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel (bzw. pET-22b_ectC_Hel_His) sowie *H. elongata* pWUB_ectC_Hel (vgl. III.6.3.1). Beiden Stämmen ist gemein, dass die *ectC*-Expression Vektorbasiert und unter Kontrolle eines stärkeren Promotors erfolgt. Die Untersuchung dieser beiden Stämme erfolgte zusätzlich im Rahmen einer dieser Arbeit angegliederten Diplomarbeit (Ganser 2010). Wie in Tabelle 11 deutlich zu erkennen, kann durch eine verstärkte Expression der Ectoin-Synthase eine Verbesserung der ADPC-Produktion erreicht werden. Der heterologe Expressionstamm *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel erreicht zellassoziierte ADPC-Mengen von ca. 18 mg/g TG (bei Wachstum in MM63, Salzschock von 1 % auf 3 % NaCl). Eine deutliche Verbesserung der ADPC-Produktion konnte mit dem *H. elongata*-Stamm WUB02 pWUB_ectC_Hel mit einem zellassoziierten ADPC-Gehalt von ca. 28 mg/g TG erreicht werden (bei Wachstum in MM63-3).

Tatsächlich genutzt für die ADPC-Produktion wurden bislang nur die *H. elongata*-Stämme KB1 (Witt 2005, diese Arbeit) sowie WUB02 pWUB_ectC_Hel (Ganser 2010).

7.1.2 Wachstumsphasenabhängigkeit

Eine deutliche Wachstumsphasenabhängigkeit der ADPC-Akkumulation in *H. elongata* KB1 konnte bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) gezeigt werden. Hier konnte beobachtet werden, dass der zellassoziierte ADPC-Gehalt mit Eintritt in die stationäre Phase ansteigt, begleitet von einer Abnahme der Glutaminkonzentration. Dieses Phänomen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit über den Verlauf einer Batch-Fermentation reproduziert (siehe Abbildung 53).

Hierzu wurde der Organismus *H. elongata* KB1 in einem 5 L-Fermenter in MM63-4-Medium bei 30 °C kultiviert und der ADPC- und Glutamingehalt der Zellen über den Wachstumsverlauf analysiert. Wie in Abbildung 53 dargestellt, konnte wieder ein Anstieg des zellassoziierten ADPC-Gehalts mit Eintritt in die stationäre Phase nach ca. 40 h Kulturdauer nachgewiesen

III Ergebnisse

werden. Damit einhergehend wurde eine im selben Maßstab stattfindende Abnahme der ADPC-Vorstufe Glutamin verzeichnet.

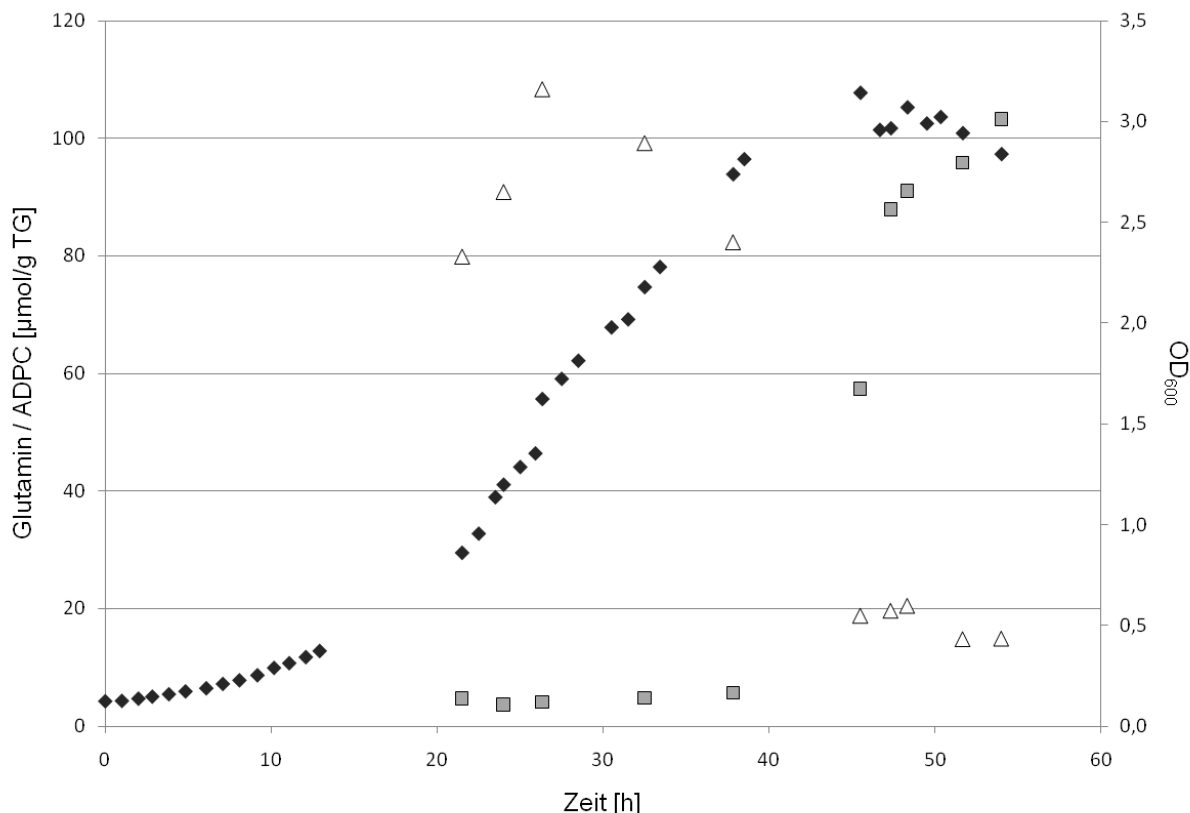


Abbildung 53: Verlauf der ADPC-Produktion in *H. elongata* KB1

Dargestellt ist der Wachstumsverlauf von *H. elongata* KB1 (ΔectA) in MM63-4 im 5 L-Fermenter und die Analyse des zellassozierten Glutamin- und ADPC-Gehalts. ◆ OD₆₀₀ △ Glutamin ■ ADPC

Während einer Fed-Batch-Fermentation des Organismus *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel konnte diese Stationärphasenabhängigkeit ebenfalls beobachtet und bestätigt werden (siehe Abbildung 54). In diesem Versuch wurde der Organismus *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel in einem 15 L-Fermenter in GC-3-Medium angezogen und bei Erreichen der ersten stationären Phase mit 1 L Fed-Batch-Lösung 2 gefüttert. Der zellassozierte ADPC-Gehalt wurde über den Verlauf der Fermentation mittels HPLC bestimmt.

Wie in Abbildung 54 gezeigt, nimmt der zellassozierte ADPC-Gehalt mit Beginn der Fütterung nach ca. 32 h Kulturdauer wieder ab. Dies deutet darauf hin, dass die Produktion bzw. Akkumulation des ADPC tatsächlich abhängig vom Energiehaushalt der Zellen sein könnte, da

III Ergebnisse

die höchsten ADPC-Werte sowohl in *H. elongata* KB1 als auch in *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel im Zustand des C-Quellen-Mangels verzeichnet wurden.

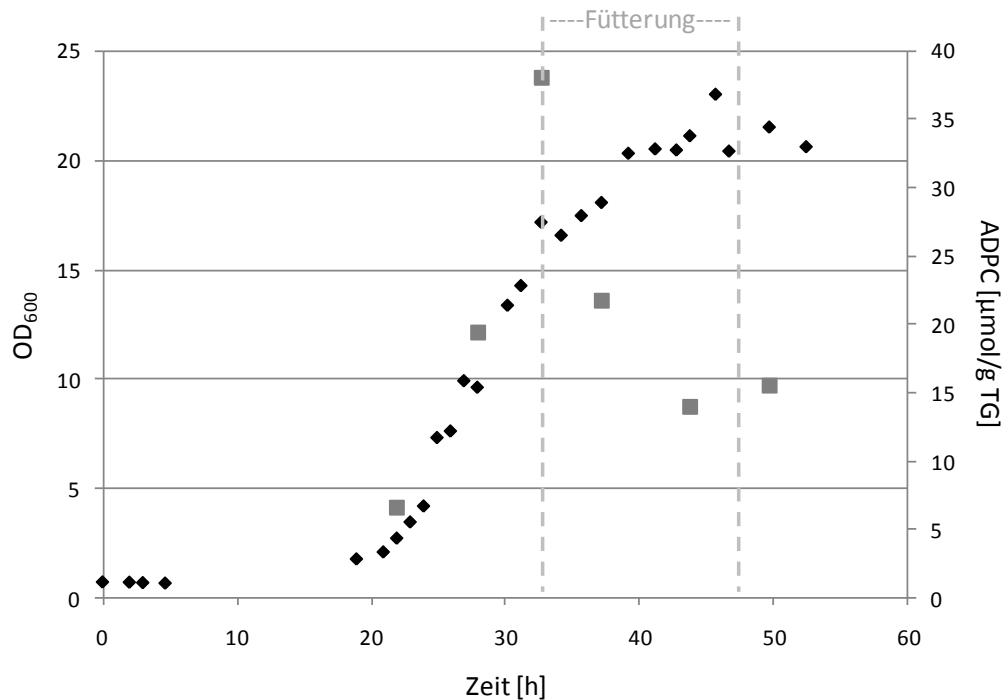


Abbildung 54: Fermentation des Stammes *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel

Dargestellt ist der Wachstumsverlauf von *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel in GC-3-Medium im 15 L-Fermenter und die Analyse des zellassoziierten Glutamin- und ADPC-Gehalts. In dem durch gestrichelte Linien markierten Zeitraum erfolgte die Zugabe von insgesamt 1 L Fed-Batch-Lösung 2. ◆ OD₆₀₀ ■ ADPC

7.2 Downstream-Processing

Die Aufreinigung von ADPC aus Zellmaterial des Organismus *H. elongata* KB1 wurde bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) beschrieben. Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte ADPC mittels einer Soxhlett-Extraktion mit Methanol als Lösungsmittel aus den Zellen extrahiert sowie durch chromatographische Methoden weiter aufgereinigt werden. Hierbei stellte Glutamat die Hauptverunreinigung dar, die durch eine chromatographische Trennung auf einer präparativen Kieselgelsäule größtenteils – jedoch nicht vollständig - entfernt werden konnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Reinigungsprozedur für ADPC erweitert, indem eine Anionenaustausch-Chromatographie zur Trennung des zwitterionischen ADPC von dem anionischen Glutamat durchgeführt wurde. Die Reinigung des ADPC aus dem Methanolextrakt erfolgte somit analog der ADABA-Reinigung (siehe II6.2) durch

Chloroformbehandlung, Anionenaustausch-Chromatographie und Ionenverzögerungs-Chromatographie. Der Erfolg der Reinigung konnte mittels isokratischer HPLC, Fmoc-ADAM-HPLC und ^{13}C -NMR bestätigt werden (nicht dargestellt). Eine Kristallisation des ADPC konnte jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden, was durch den stark hygroskopischen Charakter der Substanz bedingt sein könnte.

7.3 Charakterisierung der Substanz

Die strukturelle Ähnlichkeit des ADPC zu bekannten kompatiblen Soluten wie Ectoin oder DHMICA sowie die Biosynthese durch ein Enzym der osmotischen Stressantwort lassen vermuten, dass ADPC ebenfalls Wirksamkeit als kompatibles Solut zeigen könnte. Im Folgenden sollte deshalb eine Charakterisierung der Substanz ADPC erfolgen, bei der drei verschiedene Aspekte untersucht wurden: Die Auswirkung einer ADPC-Supplementierung auf bakterielles Wachstum unter osmotischem Stress, die Wirksamkeit von ADPC als Stabilisator eines Modell-Enzyms, sowie die Stabilisierung von Zellen gegen Trockenstress.

7.3.1 Supplementierungsversuche

Um die Wirkung von ADPC als kompatibles Solut näher zu untersuchen, wurde die Deletionsmutante *H. elongata* WUB02 (ΔectAC) unter Salzstress kultiviert und mit verschiedenen bekannten Soluten sowie ADPC supplementiert. Die Kultivierung erfolgte in der Mikrotiterplatte in MM63-3, die Supplemente wurden in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Die Mutante *H. elongata* WUB02 (ΔectAC) ist nicht mehr in der Lage Ectoin zu synthetisieren und somit sensibel gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen im Medium (vgl. III.1.2). Der Effekt der Supplementierungen wurde durch Bestimmung der Wachstumsrate quantifiziert.

Wie in Abbildung 55 dargestellt, konnte für die bekannten Solute Betain, Ectoin sowie Hydroxyectoin im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle eine deutliche Verbesserung des bakteriellen Wachstums unter Salzstress verzeichnet werden. ADPC steigert die Wachstumsrate in einem ähnlichen Bereich wie Hydroxyectoin, ein Effekt der durch die Vorstufe Glutamin nicht hervorgerufen wird.

III Ergebnisse

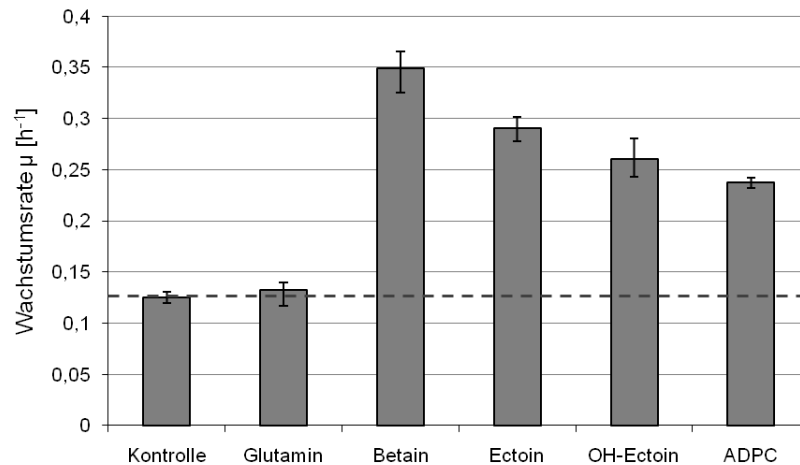


Abbildung 55: Supplementierungsversuch

H. elongata WUB02 (Δ ectAC) wurde angezogen in MM63-3 bei 30 °C in der Mikrotiterplatte. Supplementierung mit verschiedenen Soluten erfolgte in einer Endkonzentration von 1 mM. Die durchschnittliche Wachstumsrate der unsupplementierten Kontrollkultur wurde zum besseren Vergleich mittels einer gestrichelten Linie markiert.

Die Aufnahme von ADPC durch den Stamm *H. elongata* WUB02 unter Salzstress wurde im Rahmen eines Supplementierungsexperiments im 100 mL-Maßstab nachgewiesen. Nach Wachstum in MM63-4 unter Zugabe von 1 mM ADPC ließ sich mittels HPLC ein ADPC-Gehalt von etwa 70 mg/g TG detektieren (Daten nicht dargestellt).

7.3.2 LDH-Assay

Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) wurde bereits zuvor erfolgreich als Testsystem eingesetzt, um die Wirksamkeit verschiedener Solute als Proteinstabilisatoren zu untersuchen (Lippert und Galinski 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde die LDH denaturierenden Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt und die Aktivität des Enzyms über den Verlauf dieser Prozedur verfolgt. Als Schutzstoffe dienten ADPC und Hydroxyectoin in einer Endkonzentration von 400 mM, in der Kontrolle wurde auf die Zugabe eines Schutzstoffes verzichtet.

In Abbildung 56 sind die relativen LDH-Aktivitäten dargestellt. Die durchschnittliche Aktivität des Kontrollansatzes vor dem ersten Gefrierzyklus wurde als 100 % definiert und die weiteren Daten in Relation zu diesem Wert gesetzt. Während die Kontrolle nach drei Gefrierzyklen einen annähernd vollständigen Aktivitätsverlust aufweist, ist bei Zugabe des Schutzstoffes Hydroxyectoin eine LDH-Aktivität auch nach sechs Zyklen noch nachweisbar, wenn auch mit einem starkem Verlust von ca. 80 %. Im Gegensatz dazu ist in dem mit ADPC versetzten Ansatz auch nach sechs Gefrierzyklen noch eine Restaktivität von etwa 70 % der Anfangsaktivität zu

III Ergebnisse

verzeichnen. Diese Restaktivität entspricht sogar annähernd der Aktivität des Kontrollansatzes vor Beginn der Gefrier-Auftau-Zyklen.

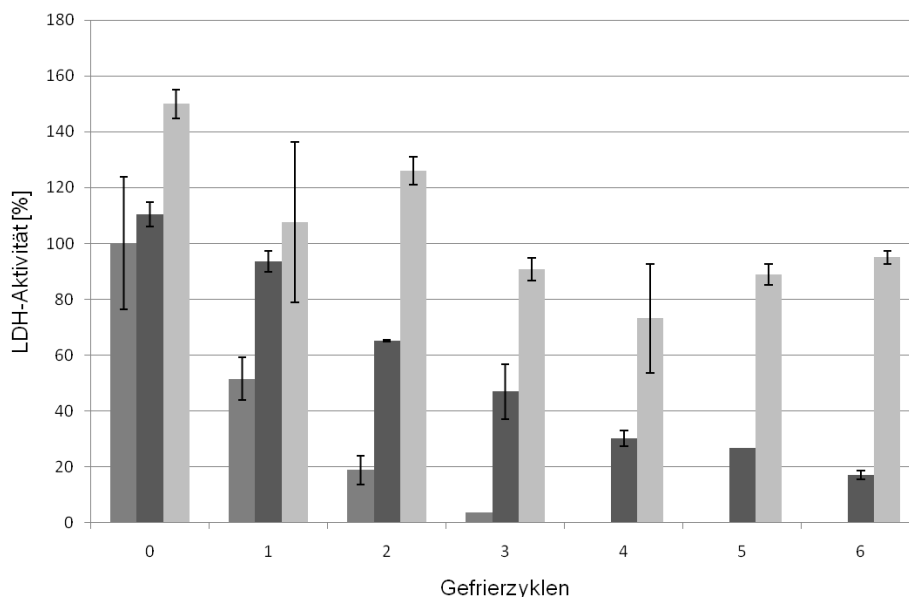


Abbildung 56: Vergleich der Schutzstoffe ADPC und Hydroxyectoin in einem LDH-Assay

Dargestellt ist die relative Aktivität der LDH nach Gefrier-Auftau-Zyklen. Die Anfangsaktivität des Kontrollansatzes ohne Schutzstoff-Zugabe wurde als 100 % definiert. ■ Kontrolle ■ Hydroxyectoin ■ ADPC

Wie Abbildung 56 ebenfalls deutlich zeigt, erhöht die Zugabe der Schutzstoffe auch die Grundaktivität der LDH, im Fall von Hydroxyectoin um ca. 10 %, im Fall des ADPC sogar um ca. 50 %.

7.3.3 Trocknungsversuche

Die Verwendung von Trehalose oder Hydroxyectoin als Stabilisator von Zellen unter Trockenstress wurde bereits zuvor erfolgreich gezeigt (Manzanera *et al.* 2002; Manzanera *et al.* 2004). In dieser Arbeit sollte auch die Wirksamkeit von ADPC untersucht werden. Hierzu wurde der Testorganismus *E. coli* K12 in MM63-0,5 angezogen und durch Überimpfen auf eine Mikrotiterplatte in MM63-3 einem Salzschock unterzogen. Gleichzeitig erfolgte in den MM63-3-Kulturen eine Supplementierung mit verschiedenen Soluten in einer Endkonzentration von 100 mM. Nach Beimpfen der MM63-3-Kulturen wurde die Mikrotiterplatte bei -20 °C eingefroren und im Anschluss gefriergetrocknet.

Die gefriergetrockneten Kulturen wurden durch Zugabe von LBG-0,5-Medium nach ca. 48 h Lagerung wiederbelebt und das Wachstum im Plattenlesegerät verfolgt. Aus den

III Ergebnisse

Wachstumskurven wurde anhand einer Kurvenanpassung der prozentuale Anteil überlebender Zellen an der Gesamt-OD zum Zeitpunkt der Wiederbelebung abgeschätzt, gemäß der folgenden Formel: $OD = OD_{(tot)} + OD_{(lebend)} * e^{\mu t}$ (Abbildung 57).

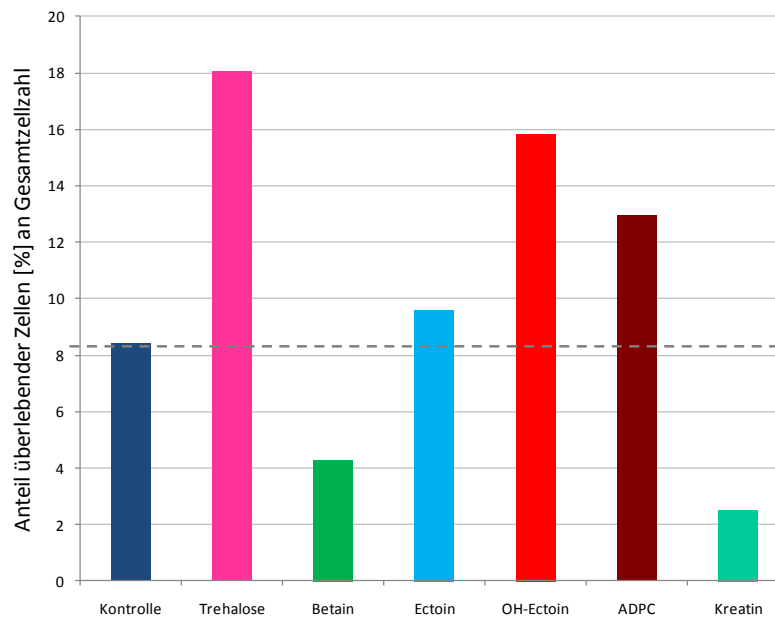


Abbildung 57: Auswertung des Gefriertrocknungsversuchs

Mithilfe der Wachstumskurven und den zugehörigen Wachstumsraten μ wurde gemäß den Formeln $OD_{(gesamt)} = OD_{(tot)} + OD_{(lebend)}$ sowie $OD = OD_{(tot)} + OD_{(lebend)} * e^{\mu t}$ der Anteil überlebender Zellen an der Gesamt-OD zum Zeitpunkt $t = 0$ (Start der Wiederbelebung) bestimmt.

Wie erwartet wirken sich Trehalose und Hydroxyectoin deutlich positiv auf das Überleben der *E. coli*-Zellen unter Trockenstress aus (Abbildung 57). Auch Ectoin weist im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Schutzwirkung auf, deutlich besser noch als Ectoin wirkt sich allerdings ADPC auf die Überlebensrate von *E. coli* K12 aus. Im Gegensatz dazu bewirken Betain und das inkompatible Solut Kreatin (Sell 2009; Mann 2008) eine Verschlechterung der Überlebensrate.

7.4 Hydroxylierung von ADPC

In *H. elongata* führt die Hydroxylierung von Ectoin durch die Hydroxylase EctD zu einem weiteren äußerst wirksamen Solut, dem Ectoinderivat Hydroxyectoin (Ures 2005). Eine solche Derivatisierung wurde auch für ADPC als potentiell möglich erachtet, insbesondere da Studien an der Hydroxylase EctD ein breites Substratspektrum gezeigt haben (Vielgraf 2008).

III Ergebnisse

Mittels des Ganzzellkatalyse-Systems *E. coli* BL21 (DE3) pETectDcyt. (Galinski *et al.* 2007) wurde eine Hydroxylierung von ADPC durchgeführt. Hierzu wurde der Stamm im Rahmen einer heterologen EctD-Expression in Minimalmedium angezogen und mit einer Endkonzentration von 1 mM ADPC supplementiert. Die Analyse des Mediums mittels isokratischer HPLC zeigte eine deutliche Abnahme des ADPC-Signals über den Zeitverlauf, gleichzeitig aber auch das Auftreten eines neuen Signals (Abbildung 58), das eine ebenso starke UV-Absorption aufweist wie das ursprüngliche ADPC-Signal.

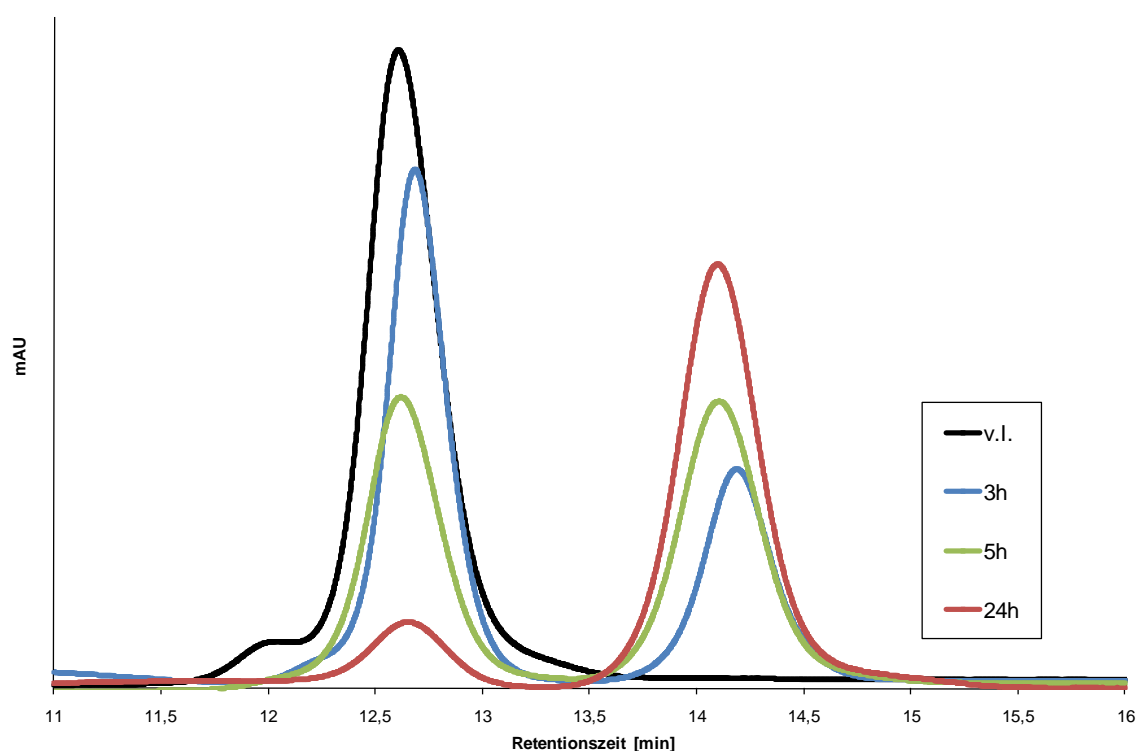


Abbildung 58: ADPC-Hydroxylierung mittels *E. coli* BL21 (DE3) pETectDcyt.

Dargestellt sind RI-Spektren der HPLC-Analyse des Mediums der EctD-Expressionskultur im Zeitverlauf. Zu erkennen ist das Signal für ADPC mit einer Retentionszeit von ca. 12,7 min sowie das neu auftretende Signal für das potentielle OH-ADPC mit einer Retentionszeit von ca. 14,2 min. v.l.: vor Induktion

Zur genaueren Analyse der neu auftretenden Substanz wurde die Kultur geerntet und das Zellmaterial für eine ^{13}C -NMR aufbereitet. Zum Zeitpunkt der Ernte lagen laut HPLC ADPC und die neu auftretende Substanz im Verhältnis 1:1 in den Zellen vor. Dieses Bild bestätigt sich auch in der NMR (Abbildung 59). Zusätzlich zu den bereits bekannten ADPC-Signalen treten neue Signale bei 41,26 ppm, 73,90 ppm, 74,41 ppm, 172,35 ppm und 177,69 ppm auf. Die Lage dieser Signale ist mit der Einführung einer Hydroxylgruppe in das ADPC-Molekül am C_3 und der damit einhergehenden Verschiebung der ADPC-Signale erklärbar. Eine Hydroxylierung des

III Ergebnisse

ADPC-Moleküls durch die Hydroxylase EctD und der Nachweis von Hydroxy-ADPC (OH-ADPC) wird somit als gesichert angesehen.

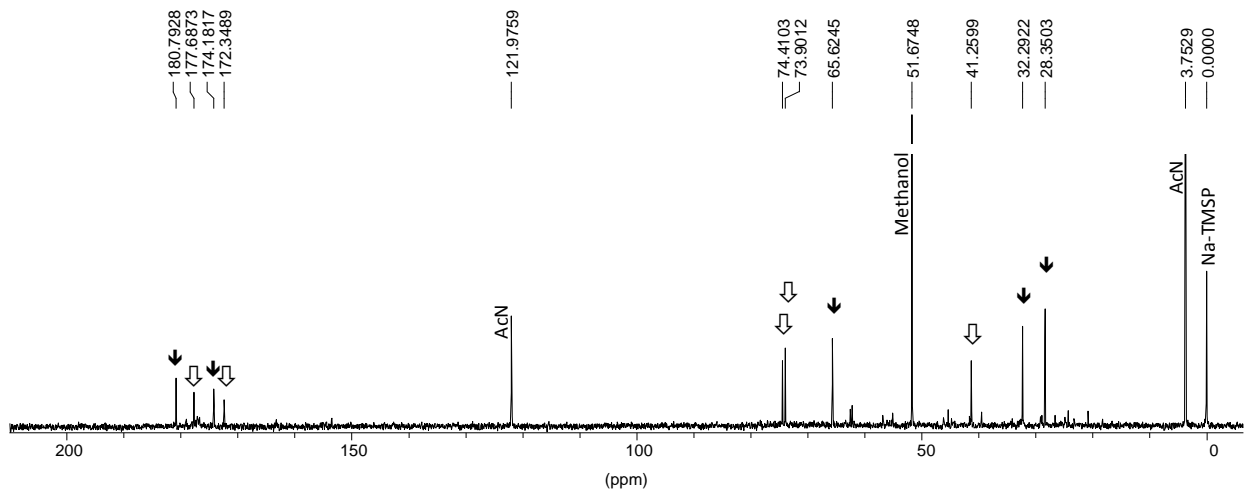


Abbildung 59: ^{13}C -NMR-Spektrum des OH-ADPC

Nachweis der Hydroxylierung von ADPC durch die Ectoin-Hydroxylase EctD. Dargestellt ist eine ^{13}C -NMR des Zellextrakts von *E. coli* BL21 (DE3) pETectDcyt. nach Supplementierung mit ADPC und Induktion mit IPTG. Neben den markierten Signalen sind Signale der internen Standards Na-Trimethylsilyl-propionsäure (Na-TMSP), Acetonitril (AcN) und Methanol zu erkennen. ↓: Signale des ADPC; ⇓ Signale des OH-ADPC

IV Diskussion

1 Ectoin-Synthase

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) war die Substanz 5-Amino-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-carboxylsäure (ADPC) als Bestandteil des Solutespektrums der Deletionsmutante *Halomonas elongata* KB1 ($\Delta ectA$) identifiziert worden. Die Rolle der Ectoin-Synthase in der ADPC-Biosynthese wurde ebenfalls im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht und es konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Enzym aus *Marinococcus halophilus in vitro* die Reaktion von Glutamin zu ADPC katalysiert. Da jedoch *in vivo*-Untersuchungen zur ADPC-Synthese stets an *H. elongata* durchgeführt wurden, stand nach Abschluss der Diplomarbeit eine nähere Charakterisierung der Ectoin-Synthase aus dem Modellorganismus *H. elongata* noch aus und wurde im Rahmen dieser Dissertation wieder aufgegriffen.

1.1 Genomische Deletion des Gens *ectC* (WUB01 & WUB02)

Die genomische Deletion des für die Ectoin-Synthase codierenden Gens *ectC* in *H. elongata* war ein wichtiger Schritt, um die Rolle des Enzyms in der ADPC-Biosynthese aufzuklären. Aufgrund der mit dem aus *M. halophilus* stammenden Enzym erzielten *in vitro*-Daten war postuliert worden, dass die Ectoin-Synthase allein verantwortlich für die ADPC-Synthese sein sollte (Witt 2005). Die Deletion des Gens *ectC* in *H. elongata* sollte also folgerichtig die ADPC-Synthese unterbinden. Die Sequenz des Gens sowie der angrenzenden Bereiche war bereits zuvor aufgeklärt worden (Stumpfe 2003) und ein Protokoll für die genomische Mutagenese von *H. elongata* war bereits publiziert (Kunte und Galinski 1995).

Durch Deletion von *ectC* in *H. elongata* entstand der Stamm *H. elongata* **WUB01** ($\Delta ectC$). Dieser Stamm hat die Fähigkeit zur Ectoin-Synthase verloren und weist eine dementsprechend verringerte Salztoleranz auf, die jedoch aufgrund der Akkumulation der Ectoin-Vorstufe N γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure (ADABA) immer noch recht hoch ist (bis zu $\sim 10\%$ NaCl (w/v) $\approx 1,7$ M). Geringe Spuren intrazellulären Ectoins können möglicherweise auf spontane Reaktionen der ADABA zurückzuführen sein. Weiterhin denkbar wäre eine Beteiligung von Enzymen des kürzlich entdeckten Ectoin-Abbauwegs, z. B. eine reversible Reaktion der Ectoin-Hydrolase DoeA (Schwibbert *et al.* 2010), wengleich eine Reversibilität dieses Enzyms bislang

nicht beschrieben ist. Zumindest zeigt die Charakterisierung dieses Stammes, dass die Ectoin-Synthase EctC in *H. elongata* für die osmotisch induzierte Ectoin-Synthase benötigt wird und kein weiteres Enzym diese Aufgabe übernehmen kann bzw. keine weitere Kopie der Ectoin-Synthase an anderer Stelle vorhanden zu sein scheint. Diese Information war für die Untersuchungen an der Ectoin-Synthase wichtig, da das *H. elongata*-Genom zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht war. Eine Komplementierung des Stammes mit einer Vektor-codierten Ectoin-Synthase stellte den WT-Phänotyp wieder her (vgl. III.1.1), so dass von einer erfolgreichen genomischen Mutagenese auszugehen ist.

Das Ausschalten der Ectoin-Synthase innerhalb eines Ectoin-Biosynthesegenclusters wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben (Cánovas *et al.* 1997). Hier handelte es sich um eine Transposon-Insertion in das Gen *ectC* des Organismus *Chromohalobacter salexigens*, einem nahen Verwandten von *H. elongata*, wodurch die Mutante *C. salexigens* CHR63 (*ectC::Tn1732*) entstand. Im Rahmen der Charakterisierung dieser Mutante wurde ebenfalls eine erhöhte Salztoleranz (bis zu 1,5 M NaCl) im Vergleich zu einer *ectA*-Mutante (bis zu 0,75 M NaCl) beschrieben, zurückzuführen auf eine nachgewiesene Akkumulation der Ectoin-Vorstufe ADABA. Diese Akkumulation betrug bis zu 80 % des Gesamtsolutegehalts (García-Esteva *et al.* 2006), genauere quantitative Werte sind jedoch in den Publikationen nicht angegeben. Auffällig ist ein immer noch relativ hoher Ectoin- und Hydroxyectoingehalt in den Zellen der *ectC*-Mutante (6 % bzw. 12 % des Gesamtsolutegehalts). Diese Beobachtung wird in der Literatur auf einen alternativen biosynthetischen Weg zum Hydroxyectoin bzw. Ectoin zurückgeführt (Vargas *et al.* 2005), der jedoch bislang nicht belegt ist. Ausgehend von ADABA wird hier eine Hydroxylierung zu OH-ADABA, gefolgt von einer Kondensation zu Hydroxyectoin, postuliert. Letzteres könnte dann durch eine Entfernung der Hydroxyl-Gruppe in Ectoin umgewandelt werden. Potentielle an diesen Reaktionen beteiligte Enzyme wurden jedoch bis heute nicht nachgewiesen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte genomische *ectC*-Deletionsmutante *H. elongata* WUB01 zeigt eine ähnliche Salztoleranz wie die *Chromohalobacter*-Mutante CHR63, und auch die nachgewiesene ADABA-Akkumulation deckt sich mit den Beobachtungen an *Chromohalobacter*. Die für CHR63 beschriebenen relativ hohen Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalte konnten in WUB01 nicht festgestellt werden. Zwar finden sich geringe Mengen Ectoin (< 10 µmol/g TG bei 3 % NaCl), Hydroxyectoin jedoch konnte unter den verwendeten

IV Diskussion

Wachstumsbedingungen nicht nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 12). Die Charakterisierung des Stammes *H. elongata* WUB01 wurde wesentlich detaillierter durchgeführt als die der *Chromohalobacter*-Mutante, so dass zum einen quantitative Daten zur ADABA-Akkumulation zur Verfügung stehen, zum anderen zusätzlich gezeigt wurde, dass die ADABA-Synthese und -Akkumulation abhängig von der Salinität ist. Tatsächlich wird ADABA in *H. elongata* WUB01 in ähnlichen Konzentrationen akkumuliert, wie Ectoin im Wildtypstamm unter denselben Wachstumsbedingungen (Tabelle 12, Abbildung 6). Diese Erkenntnis ist interessant im Hinblick auf die Regulation der Ectoinbiosynthese, zeigt sie doch, dass bereits die Schritte bis zu dem Ectoin-Vorläufer ADABA osmoreguliert sein müssen. Eine Regulation im Bereich der Ectoin-Synthese, beispielsweise auf Enzymebene, wird somit unwahrscheinlicher.

Tabelle 12: Solutgehalte verschiedener *H. elongata*-Stämme

Verglichen wurden die Solutgehalte der *H. elongata*-Stämme WT, KB1, WUB01 und WUB02 bei Wachstum in MM63-3 bei 30 °C

	Ectoin [$\mu\text{mol/g TG}$]	ADABA [$\mu\text{mol/g TG}$]	ADPC [$\mu\text{mol/g TG}$]
<i>H. elongata</i> WT	400 ¹	< 50 ²	-
KB1 (ΔectA)	-	-	100
WUB01 (ΔectC)	7	460	-
WUB02 ($\Delta\text{ectA}, \Delta\text{ectC}$)	-	-	-

¹ (Dötsch *et al.* 2008); ² (Göller *et al.* 1998)

Neben diesen neuen Erkenntnissen für die Ectoin-Biosynthese konnte die Mutante *H. elongata* WUB01 aber auch für andere Versuche bereits erfolgreich eingesetzt werden. So eignet sich diese *ectC*-Deletionsmutante für vektorbasierte heterologe Komplementierungen mit putativen *ectC*-Genen aus Fremdorganismen, um deren Funktion als Ectoin-Synthase nachzuweisen (Kurz *et al.* 2010; Willée 2010).

Durch Deletion des *ectC*-Gens in der Deletionsmutante *H. elongata* KB1 (ΔectA) wurde die genomische Mutante *H. elongata* **WUB02** ($\Delta\text{ectA}, \Delta\text{ectC}$) konstruiert. Dieser Stamm diente als Negativkontrolle, um die Rolle der Ectoin-Synthase an der ADPC-Biosynthese in *H. elongata* zu zeigen. Durch Deletion des für die Ectoin-Synthase codierenden Gens *ectC* wurde dem ADPC-Produzenten *H. elongata* KB1 die Fähigkeit zur ADPC-Synthese genommen (vgl. Tabelle 12), so dass bewiesen war, dass EctC auch in *Halomonas* für die ADPC-Synthese benötigt wird. Auch

bei diesem Stamm wurde eine vektorbasierte Komplementierung mit dem Gen *ectC* durchgeführt, die die Fähigkeit zur ADPC-Synthese wieder herstellte (vgl. III7.1).

Die Charakterisierung der Mutante *H. elongata* WUB02 zeigt eine deutlich verringerte Salztoleranz verglichen mit dem Wildtypstamm (bis zu ~ 5 % NaCl (w/v) \approx 0,85 M), die jedoch nicht niedriger ist als die des Stammes KB1 ($\Delta ectA$) (Grammann 2000). Dies zeigt, dass die ADPC-Produktion in KB1 keinen positiven Effekt auf das Wachstum unter Salzstress zu haben scheint, was aufgrund der Stationärphasenabhängigkeit der ADPC-Akkumulation jedoch auch unwahrscheinlich schien.

Der Stamm *H. elongata* WUB02 wurde bereits im Verlaufe der vorliegenden Arbeit mehrfach erfolgreich für Supplementierungsversuche eingesetzt, da dieser Stamm aufgrund der herabgesetzten Salztoleranz einen guten Testorganismus für die Charakterisierung verschiedener Solute darstellt (vgl. III7.3.1). Hinzu kommt, dass dieser Organismus aufgrund der fehlenden ADPC-Synthese bei Messungen an der isokratischen HPLC (zumindest bei Verwendung des in dieser Arbeit beschriebenen Systems) lediglich eine Basislinie zeigt, so dass keinerlei Überlagerungen mit aufgenommenen supplementierten Substanzen auftreten können. Somit ist der Stamm WUB02 für Supplementierungsexperimente besser geeignet als die Ectoin-Deletionsmutante KB1, die ADPC produziert.

1.1.1 ADABA-Produktion

γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure (ADABA) stellt im Rahmen der Ectoin-Biosynthese die direkte Vorstufe des Ectoins dar und ist somit das Substrat für die Ectoin-Synthase. Ein natürliches Vorkommen dieser Aminosäure wurde, abgesehen von Mikroorganismen die zur Ectoin-Synthese befähigt sind, lediglich in Pflanzen beschrieben (Fowden 1972; Liss 1962). Über die Funktion von ADABA in Pflanzen ist jedoch bislang nichts bekannt. In Mikroorganismen wurde ADABA bereits als kompatibles Solut beschrieben. Zum einen wurde beobachtet, dass die ADABA-Produktion *ectC*-Deletionsmutanten eine erhöhte Salztoleranz vermittelt (*C. salexigens*: Cánovas *et al.* 1997; *H. elongata*: diese Arbeit, vgl. III1.1), zum anderen konnte gezeigt werden, dass durch die Aufnahme der Substanz aus dem Medium die Salztoleranz osmosensitiver Organismen erhöht wird (García-Esteba *et al.* 2006). Weiterhin wurde gezeigt, dass ADABA das Modellenzym Lactat-dehydrogenase (LDH) gegen Hitzeinaktivierung stabilisieren kann (Cánovas *et al.* 1999).

Obwohl aufgrund dieser Daten ADABA ein interessantes kompatibles Solut darstellt, ist die Substanz bislang nicht kommerziell erhältlich. Eine Produktion auf chemischem Weg, sei es durch Neusynthese oder durch alkalische Hydrolyse von Ectoin, wird dadurch erschwert, dass neben der γ -Form stets auch die α -Form der Acetyl-diaminobuttersäure entsteht (Kunte *et al.* 1993; Voß 2002), und eine Trennung der beiden Substanzen aufwändig ist. Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, erfolgt die Akkumulation der ADABA (γ -Form) in der *ectC*-Deletionsmutante *H. elongata* WUB01 zum einen salzabhängig in hohen Konzentrationen und zum anderen stereospezifisch ohne Verunreinigungen durch die α -Form. Somit eignet sich *H. elongata* WUB01 gut als Produktionsstamm für ADABA, zumal *H. elongata* bereits als Produktionsstamm für Ectoin industriell genutzt wird und die Anzucht auch in größerem Maßstab somit bereits etabliert wurde.

Die Gewinnung von ADABA aus einer *ectC*-Transposon-Insertionsmutante von *Chromohalobacter salexigens* wurde bereits in der Literatur beschrieben (García-Esteva *et al.* 2006). In der genannten Publikation wurde die ADABA-Reinigung aus Ethanol-Extrakten der Mutante CHR63 (*ectC::Tn1732*) über Kationenaustausch-Chromatographie und Elution mittels eines Perchlorsäure-Gradienten, gefolgt von einer Ionenverzögerungs-Chromatographie zur Entfernung von Salzen, durchgeführt. Quantitative Angaben zur Ausbeute des Prozesses wurden nicht gemacht. Die Gewinnung der ADABA aus *H. elongata* WUB01, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert wurde, orientiert sich in den Grundzügen an der oben genannten Publikation, denn aufgrund der schlechten Löslichkeit in Methanol wurde auch hier ein Extraktionsverfahren mit Ethanol gewählt. Die anschließende Reinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie zur Abtrennung der Hauptverunreinigung Glutamat ist jedoch weniger aufwändig als das Anlegen eines Perchlorsäure-Gradienten. Insgesamt scheint der Organismus *H. elongata* WUB01 als Produktionsorganismus besser geeignet zu sein als die *Chromohalobacter*-Mutante, da die Verunreinigungen durch Ectoin bzw. Hydroxyectoin in WUB01 deutlich geringer ausfallen als für CHR63 beschrieben (Cánovas *et al.* 1999).

1.2 Die Ectoin-Synthase *in vitro*

1.2.1 Bioinformatische Datenbank-Recherche

Die Ectoin-Synthase (EC 4.2.1.108) wird in den verschiedenen Datenbanken (z. B. BRENDA, NCBI) unter dem systematischen Namen N γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrate-Hydrolyase geführt

IV Diskussion

oder auch unter dem alternativen Namen γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat-dehydratase. Sie zählt somit in die Gruppe der Hydro-Lyasen (EC 4.2.1), also zu Enzymen, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen unter Mitwirkung von Wasser öffnen. Die von der Ectoin-Synthase katalysierte Reaktion γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure \rightarrow L-Ectoin + H₂O fällt unter den Reaktionstyp Kondensation, stellt also die umgekehrte Sichtweise dar.

In den Datenbanken sind Ectoin-Synthasen aus den verschiedensten Organismen geführt, die Annotierung erfolgte jedoch in fast allen Fällen aufgrund von Sequenzähnlichkeit und nicht durch Nachweis der Aktivität. In Abbildung 60 sind die Proteinsequenzen verschiedener Ectoin-Synthasen bekannter Ectoin-Produzenten miteinander verglichen. Durch das Alignment wird deutlich, dass es sich bei Ectoin-Synthasen um stark konservierte Proteine handelt. Es ist anzunehmen, dass die streng konservierten Aminosäuren von struktureller sowie katalytischer Bedeutung sind (vgl. IV1.2.1.1), jedoch liegen hierzu zur Zeit keine genaueren Informationen vor.

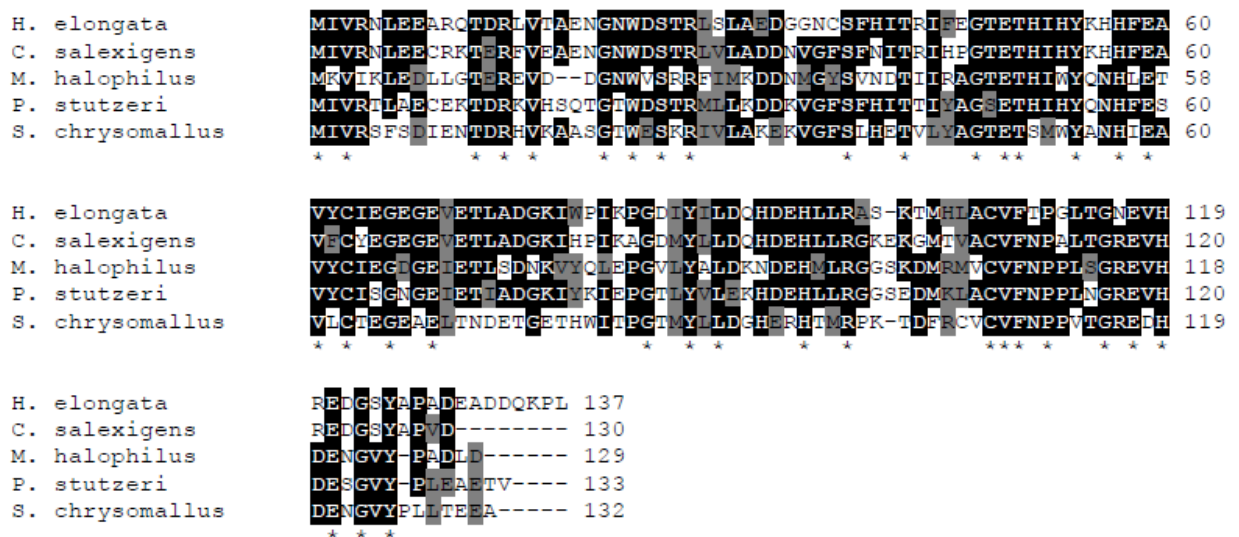


Abbildung 60: Alignment verschiedener Ectoin-Synthasen

Alignment verschiedener Ectoin-Synthasen mittels ClustalW. Alle gezeigten Ectoin-Synthasen sind Bestandteil von Ectoin-Biosynthesegenclustern. Die Sequenzen wurden der Expsay-Datenbank entnommen: *Halomonas elongata* (Accession number: O52251), *Chromohalobacter salexigens* (Q9ZEU6), *Marinococcus halophilus* (O06061), *Streptomyces chrysomallus* (Q6QUY8), *Pseudomonas stutzeri* (aus Seip 2009). Identische Aminosäuren (mindestens 3) sind schwarz unterlegt, streng konservierte Aminosäuren zusätzlich mit einem * markiert. Konservative Austausche nach Needleman und Wunsch (1970) wurden grau hinterlegt: G-A, I-L-V-M, S-T, R-K-H, N-Q, F-Y-W sowie D-E.

In einer vorangegangenen Arbeit von Egler (2004) zu den Enzymen der Ectoin-Biosynthese aus *Marinococcus halophilus* wurde die Acidität bzw. Basizität der Enzyme bestimmt und mit der

IV Diskussion

der aus *H. elongata* stammenden Enzyme verglichen. Hierzu wurde die Anzahl der sauren Aminosäuren (Aspartat & Glutamat) von der Anzahl der basischen Aminosäuren (Arginin & Lysin) subtrahiert und dieser Wert durch die Gesamtanzahl der Aminosäuren geteilt. Je stärker der resultierende Wert ins Negative tendiert, desto ausgeprägter ist der saure Charakter des Proteins. Dabei fiel auf, dass die Ectoin-Synthasen beider Organismen eine Azidität aufweisen, die die der anderen Ectoinbiosynthese-Enzyme übertrifft (Egler 2004).

Tatsächlich weist die Ectoin-Synthase aus *H. elongata*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit detaillierter charakterisiert wurde, einen Überschuss saurer Aminosäurereste (Aspartat und Glutamat) verglichen mit basischen Aminosäureresten (Arginin & Lysin) auf (siehe Abbildung 61).

```
MIVRNLEEARQTDRLVTAENGNWDSTRLSLAEDGGNCSFHITRIFEGTETHIHYKHHFEA  
VYCI EGEGETLADGKIWPIKPGDIYILDQHDEHLLRASKTMHLACVFTPGLTGNEVHR  
EDGSYAPADEADDQKPL
```

Abbildung 61: Verteilung saurer und basischer Aminosäuren in der EctC-Sequenz

Saure Aminosäurereste (Aspartat & Glutamat) wurden pink hinterlegt, basische Aminosäurereste (Arginin & Lysin) blau.

Bei einer Gesamtzahl von 137 Aminosäuren beinhaltet die Sequenz 26 saure Reste (D+E) und nur 12 basische Reste (R+K). Hieraus leitet sich auch ein recht niedriger theoretischer pI von 4,87 ab. Ein Überschuss von sauren Aminosäuren zu basischen Aminosäuren ist ein bekanntes Phänomen bei halophilen Proteinen, also Proteinen aus obligat halophilen Archaea und Bacteria, die die *salt-in*-Strategie zur Osmoadaptation verfolgen und deshalb eine hohe cytoplasmatische Ionenstärke aufweisen. Vergleicht man die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* jedoch mit der Aminosäurezusammensetzung des Proteoms aus *Salinibacter ruber*, einem obligat halophilen Organismus (Oren und Mana 2002), so reicht die Azidität des EctC nicht aus, um es als halophiles Protein zu charakterisieren. Hierzu wird nach Oren und Mana (2002) ein Überschuss saurer Aminosäuren [(Asx + Glx)-(Lys + Arg)] von etwa 20 mol% gefordert, wobei hier zu beachten ist, dass nicht zwischen Aspartat/Asparagin bzw. Glutamat/Glutamin unterschieden wurde. Dieser Wert liegt jedoch bei EctC aus *H. elongata* bei nur etwa 15 mol%. Da *H. elongata* auch nicht zu den obligat halophilen Ionen-akkumulierenden Organismen zählt, ist dies nicht überraschend.

In einer neueren Publikation (Tadeo *et al.* 2009) wurde jedoch gezeigt, dass die Salzabhängigkeit von Proteinen zum größten Teil unabhängig von der Gesamtladung ist und vielmehr durch die Zusammensetzung der Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche beeinflusst wird. Da die Struktur der Ectoin-Synthase noch nicht aufgeklärt ist, bleibt an dieser Stelle offen, ob der erhöhte Gehalt an sauren Aminosäureresten (vgl. Abbildung 61) möglicherweise hauptsächlich auf Lösungsmittel-zugängliche Bereiche des Proteins verteilt ist und somit doch zu einer Salzabhängigkeit führen kann. In diesem Zusammenhang ist auffällig, dass unter den annotierten Ectoin-Synthasen insbesondere die Proteine einen ausgeprägteren sauren Charakter aufweisen, die in einem Ectoinbiosynthese-Cluster liegen, und unter diesen insbesondere diejenigen, die aus Organismen mit erhöhter Salztoleranz stammen (vgl. Abbildung 62). Verwaiste Ectoin-Synthasen, die im Genom ohne die begleitenden biosynthetischen Enzyme EctA und EctB vorliegen und meist in pflanzenassoziierten, aber nicht zwingend halotoleranten Organismen zu finden sind (Seip 2009), weisen eine geringere Azidität auf (vgl. Abbildung 62). Ebenso die Ectoin-Synthasen aus *A. cryptum* und *W. succinogenes*, zwei Organismen, die ebenfalls nicht für Halotoleranz bekannt sind.

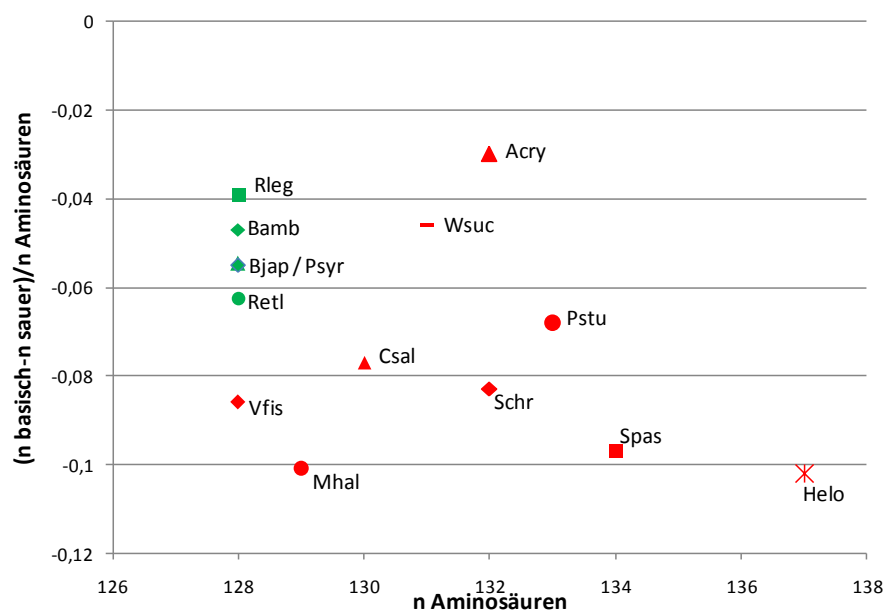


Abbildung 62: Azidität verschiedener Ectoin-Synthasen

Zur Bestimmung der Azidität wurde die Anzahl der sauren Aminosäuren von der Anzahl der basischen Aminosäuren abgezogen und der erhaltene Wert durch die Gesamtzahl der Aminosäurereste geteilt. Je negativer der Betrag, desto ausgeprägter ist der saure Charakter des Enzyms. Verglichen wurden verwaiste Ectoin-Synthasen (grün), die ohne die weiteren Enzyme der Ectoin-Biosynthese im Genom vorkommen, mit Enzymen aus Ectoin-Biosyntheseclustern (rot). Acry: *Acidiphilium cryptum* JF-5, Bamb: *Burkholderia ambifaria* AMMD, Bjap: *Bradyrhizobium japonicum*, Csal: *Chromohalobacter salexigens*, Helo: *Halomonas elongata*, Mhalo: *Marinococcus halophilus*, Pstu: *Pseudomonas stutzeri*, Psyr: *Pseudomonas syringae*, Retl: *Rhizobium etli* CFN42, Rleg: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, Schr: *Streptomyces chrysomallus*, Spas: *Sporosarcina pasteurii*, Vfis: *Vibrio fischeri* ES 114, Wsuc: *Wolinella succinogenes*

Wie in Abbildung 62 zu erkennen, weist EctC aus *H. elongata* ebenso wie das entsprechende Enzym aus *M. halophilus*, einem weiteren Organismus mit hoher Salztoleranz, einen deutlich sauren Charakter auf. Dieser verleiht dem Enzym wahrscheinlich eine hohe Stabilität und Löslichkeit auch unter Bedingungen hoher Ionenstärke (Tokunaga *et al.* 2010a).

1.2.1.1 Cupine

Auch wenn bislang noch keine Strukturdaten für eine Ectoin-Synthase vorliegen, wird dieses Enzym doch einer Proteinfamilie zugeordnet, die sich durch eine hochkonservierte Tertiärstruktur auszeichnet, nämlich der Cupin-Superfamilie (Dunwell *et al.* 2001). Die charakteristische Cupin-Domäne (cupa: lateinisch „kleines Faß“) besteht aus zwei konservierten Motiven, von denen jedes zwei β -Stränge beinhaltet, die durch einen weniger konservierten Bereich getrennt werden, der wiederum zwei weitere β -Stränge mit dazwischenliegender Schleife ausbildet. Wie in Abbildung 63 zu erkennen, wurde die charakteristische Cupin-Domäne auch in Ectoin-Synthasen identifiziert, weshalb diese nun eine Unterklasse der Cupin-Superfamilie bilden (Dunwell *et al.* 2001).

Vertreter der Cupin-Superfamilie finden sich sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten, und insgesamt gehört diese Proteinfamilie zu den funktionell diversesten. Viele Cupine binden Metallionen im katalytischen Zentrum, besonders häufig Eisen (Dunwell *et al.* 2004), jedoch gilt dies nicht für alle Vertreter. Für die Ectoin-Synthase wurde ebenfalls spekuliert, dass aufgrund der Zuordnung zu der Cupin-Superfamilie Eisenionen im katalytischen Zentrum beteiligt sein könnten (Argandoña *et al.* 2010). Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da die für die Metallbindung identifizierten Histidinreste der konservierten Motive in dieser Enzymfamilie fehlen. Zudem ist für die evolutionär den Ectoin-Synthasen am nächsten verwandte Unterklasse der Cupine, die dTDP-4-Dehydrorhamnose-3,5-Epimerasen, bekannt, dass sie keine Metallionen benötigen (Dunwell *et al.* 2001).

Gemein ist den Vertretern der Cupine die konservierte Tertiärstruktur, die als sehr temperaturstabil gilt und eine hohe Resistenz gegenüber Proteaseabbau vermittelt. Evolutionär betrachtet wird prognostiziert, dass die Proteinfamilie der Cupine sich von einem trockentoleranten kleinen Protocupin aus *Thermotoga maritima* ableitet. Tatsächlich finden sich unter den Cupinen viele Proteine, die unter abiotischen Stressbedingungen induziert

Aufgrund der konservierten Tertiärstruktur dieser Proteinfamilie kann spekuliert werden, ob die Ectoin-Synthase strukturell anderen Vertretern dieser Familie ähneln könnte. Als Modell ist in Abbildung 64 die bekannte Struktur einer dTDP-4-Dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RmlC) aus *Salmonella enterica* dargestellt. Diese Enzyme sollen nach Dunwell *et al.* (2001) den Ectoin-Synthasen phylogenetisch betrachtet am nächsten stehen, ohne Strukturdaten zu einer Ectoin-Synthase sind solche Vergleiche jedoch rein hypothetisch zu sehen.

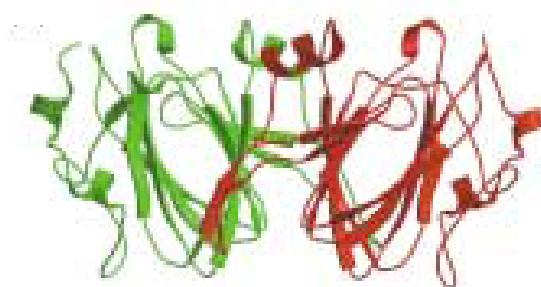


Abbildung 64: Struktur eines bekannten Cupins (aus Dunwell *et al.* 2001)

Gezeigt ist das Dimer der dTDP-4-Dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RmlC) aus *Salmonella enterica*. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von dTDP-4-keto-6-deoxy-D-Glucose in dTDP-4-keto-L-Rhamnose und steht in der phylogenetischen Verwandtschaft der Cupine den Ectoin-Synthasen am nächsten (Dunwell *et al.* 2001).

1.2.2 Expression

Die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* sollte im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden, wozu es notwendig war das Enzym für den *in vitro*-Einsatz zu isolieren. Für die aus *H. elongata* stammende Ectoin-Synthase war bislang noch kein heterologes Expressionssystem beschrieben worden, und für die einzigen publizierten Daten zu diesem Enzym (Ono *et al.* 1999) wurde das Protein aus dem Ursprungsorganismus isoliert. Eine heterologe Expression kombiniert jedoch die Vorteile einer erhöhten Ausbeute durch die Wahl eines starken Promotors und der Möglichkeit, einen Affinitäts-tag an das Expressionsprodukt zu fusionieren, um die Reinigung des Proteins zu erleichtern. Zudem wird durch die Verwendung eines Expressionsvektors die Kopienzahl des Gens erhöht.

Für andere Organismen war aus vorangegangenen Arbeiten bereits bekannt, dass die Proteine des Ectoin-Biosyntheseweges in *E. coli* exprimierbar und funktionell sind. So konnten die entsprechenden Enzyme aus dem Gram-positiven Organismus *Marinococcus halophilus* sowohl

als Cluster (Louis und Galinski 1997; Bestvater 2001; Bestvater *et al.* 2008) als auch einzeln (Egler 2004) in *E. coli* exprimiert werden. Entsprechende Arbeiten wurden kürzlich auch mit dem Ectoin-Cluster aus dem Gram-negativen Organismus *Pseudomonas stutzeri* sowie der aus diesem Organismus stammenden Ectoin-Synthase durchgeführt (Seip *et al.* 2011).

Aufgrund der Erfahrungen aus vergangenen Arbeiten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit *E. coli* BL21 (DE3) in Kombination mit dem pET-Vektor ein starkes heterologes Expressionssystem für die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* gewählt. Wie gezeigt werden konnte (vgl. III.4.2) lässt sich das Enzym sowohl in nativer Form als auch mit C-terminalem His₆-tag in großer Menge in *E. coli* exprimieren und liegt in den Zellen löslich vor. Das Auftreten von sogenannten *inclusion bodies* konnte nicht beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Protein nativ gefaltet wurde. Die heterologe EctC-Expression vermittelte dem *E. coli*-Stamm zudem die Fähigkeit zur ADPC-Synthese (vgl. III.7.1.1), so dass die Funktionalität des Enzyms bereits *in vivo* nachgewiesen wurde. Die starke Expression und cytoplasmatische Akkumulation der Ectoin-Synthase in *E. coli* mag auf den sauren Charakter (siehe IV.1.2.1) des Proteins zurückzuführen sein. Wilkinson und Harrison entwickelten 1991 ein Modell, um die Löslichkeit von Proteinen in *E. coli* vorherzusagen (Wilkinson und Harrison 1991; Tokunaga *et al.* 2010a). Hiernach sind Proteine, die ein hohes Verhältnis von sauren zu basischen Aminosäuren aufweisen, mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit in *E. coli* löslich exprimierbar.

Die Expression der Ectoin-Synthase in *E. coli* DH5 α in Kombination mit dem pASK-IBA-Vektorsystem konnte zwar ebenfalls gezeigt werden (vgl. III.4.2.2), jedoch fiel hier die Proteinausbeute deutlich geringer aus, was vermutlich auf den schwächeren tet-Promotor zurückzuführen ist. Eine solche schwächere Expression kann für Proteine, die zur Aggregation in *inclusion bodies* neigen, eine sinnvolle Lösung darstellen, ist aber für die Ectoin-Synthase unnötig, da eine Überexpression von funktionellem Protein unter Kontrolle des starken T7-Promotors (pET-Vektor) erfolgreich gezeigt wurde (siehe III.4.2.1).

1.2.3 Reinigung

Für die Isolierung heterolog exprimierter Proteine von dem Gesamtproteom des Wirtsorganismus stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Fusion des Expressionsprodukts an einen Affinitäts-tag (z. B. His₆-tag oder *Strep*-tag) ermöglicht eine

IV Diskussion

Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie und erlaubt so eine spezifische Isolierung des gewünschten Proteins in hoher Reinheit. Jedoch ist eine solche Fusionierung ein nicht unerheblicher Eingriff in die Primärstruktur eines Proteins und kann die native Faltung negativ beeinflussen oder auch die Oligomerisierung von Proteinuntereinheiten behindern.

In vorangegangenen Arbeiten (Bestvater 2001; Kiss 2002; Egler 2004) wurde bereits gezeigt, dass die Ectoin-Synthase aus *M. halophilus* mit C-terminalem His₆-tag aktiv exprimiert und gereinigt werden kann, während eine N-terminale Fusion mit einer His₆-Region das Enzym inaktiviert. Aufgrund dieser Erfahrungswerte wurde eine His₆-tag-Fusion in der vorliegenden Arbeit an der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* nur C-terminal vorgenommen. Auf diese Weise konnte das Enzym (EctC_Hel_His) erfolgreich und mit einer hohen Reinheit aus *E. coli* BL21 (DE3) isoliert werden (vgl. III4.3.1). Eine negative Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Fusionierung mit dem Affinitäts-tag konnte nicht festgestellt werden (vgl. III5.2).

Auf eine N-terminale Fusion mit einem His₆-tag wurde aufgrund der Versuche mit der Ectoin-Synthase aus *M. halophilus* (Kiss 2002) verzichtet, jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit ein Versuch unternommen, eine N-terminale Fusion mit einem weiteren Affinitäts-tag, dem *Strep*-tag, vorzunehmen. Der aus einer ausgewogenen Abfolge von acht Aminosäuren bestehende *Strep*-tag wird von IBA beworben mit der Aussage, dass durch diesen Affinitäts-tag generell kein Effekt auf Proteinstruktur oder -Aktivität zu erwarten ist. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die N-terminale Fusion mit einem *Strep*-tag die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* inaktiviert (vgl. III4.3.2). Hieraus lässt sich ableiten, dass dem N-Terminus des Enzyms eine wichtige Rolle in der nativen Faltung bzw. der Dimerisierung oder sogar im katalytischen Zentrum zukommen muss. Tatsächlich zeigt ein Alignment verschiedener Ectoin-Synthasen eine starke Konservierung des N-Terminus (vgl. Abbildung 60), während der C-Terminus des Enzyms eher variabel gestaltet ist.

Zusätzlich zu der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Proteinreinigung über Ammoniumsulfat-Fällung und hydrophobe Interaktionschromatographie durchgeführt. Auf diese Weise sollte die Ectoin-Synthase in nativer Form ohne eventuell störenden Affinitäts-tag und Spacer-Aminosäuren gewonnen werden. Eine solche native Ectoin-Synthase wurde zum einen für die Kristallisation und Strukturanalyse benötigt, zum anderen war auch unklar, ob die Fusion mit einem Affinitäts-tag möglicherweise die Aktivität des Enzyms negativ beeinflussen würde. In der vorangegangenen

Arbeit an der Ectoin-Synthase aus *M. halophilus* (Egler 2004) war lediglich das C-terminal mit einem His₆-tag versehene Enzym untersucht worden, und die Aktivität des Enzyms lag mit einer V_{\max} von $8,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ deutlich unter der der nativ gereinigten Ectoin-Synthase aus *H. elongata* mit einer V_{\max} von $56 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Ono *et al.* 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die heterolog exprimierte Ectoin-Synthase erfolgreich nativ aus *E. coli* isoliert werden. Durch eine Fällung mit Ammoniumsulfat wurde der größte Anteil des *E. coli*-Proteoms präzipitiert, so dass die Ectoin-Synthase bereits in erhöhter Reinheit im Fällungs-Überstand verblieb (vgl. III.4.3.3). Dies ist vermutlich auf den bereits erwähnten sauren Charakter des Enzyms zurückzuführen, der der Ectoin-Synthase eine hohe Löslichkeit und Stabilität auch unter Hochsalzbedingungen vermittelt. Die weitere Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie erbrachte schließlich das Zielprotein in hoher Reinheit.

Die unterschiedlichen hier angewendeten Methoden der Proteinreinigung weisen die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* als ein auch unter Hochsalzbedingungen recht stabiles Enzym aus, dass Modifikationen am C-Terminus in Form von Fusions-tags gut toleriert, am N-Terminus jedoch sensitiv gegenüber Modifikationen ist.

1.2.4 Strukturaufklärung

Die erste Charakterisierung der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* (Ono *et al.* 1999) beschreibt ein mittels SDS-PAGE ermitteltes Molekulargewicht von etwa 19 kDa sowie von 35 kDa in der Gelfiltration, das auf eine native Dimerisierung oder aber eine unspezifische Aggregation unter Hochsalzbedingungen zurückgeführt wurde. Mit dem Vorliegen der Sequenz kann das Molekulargewicht der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* heute auf 15,46 kDa festgelegt werden. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen des Enzyms mittels Gelfiltration unterstützen die Annahme, dass die Ectoin-Synthase nativ als Homodimer vorliegt.

Weitergehende Versuche, die Struktur des Enzyms näher aufzuklären, sollten durch Kristallisation und Röntgenbeugung in Kooperation mit Prof. Dr. D. Rice (Sheffield, UK) erfolgen. Jedoch konnte auch nach mehrfachen Versuchen eine Kristallisation der nativen Ectoin-Synthase (EctC_Hel) nicht erreicht werden (Prof. Dr. D. Rice, mündliche Mitteilung). Eine NMR-Analyse des Enzyms zeigte einen flexiblen Bereich am C-Terminus (ca. 10 Aminosäuren), der mit

IV Diskussion

der Kristallisation interferieren könnte. Aus diesem Grund wurde das Enzym C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzt und wieder in die Kristallisationsexperimente eingesetzt. Tatsächlich konnte mit diesem modifizierten Protein (EctC-10_Hel) eine Kristallisation erreicht werden. Die Qualität der erhaltenen Kristalle reichte jedoch für eine Strukturaufklärung nicht aus (D. Rice, mündliche Mitteilung).

Dennoch konnte durch die C-terminale Verkürzung des Enzyms eine drastische Verbesserung des Kristallisationsprozesses erzielt werden. Das Alignment verschiedener funktioneller Ectoin-Synthasen zeigt, dass der C-Terminus des Enzyms weitaus variabler gestaltet ist als z. B. der recht konservierte N-Terminus (vgl. Abbildung 60). Zudem wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits verschiedene C-terminal modifizierte EctC-Formen konstruiert (EctC-10_Hel, EctC-9_Hel, EctC-8_Hel), so dass in weiterführenden Versuchen auch diese Proteine in Kristallisationsexperimente eingesetzt werden könnten. Es ist an dieser Stelle nicht auszuschließen, dass mit 10 Aminosäuren eine zu starke Verkürzung vorgenommen wurde, die die Struktur der Ectoin-Synthase negativ beeinflussen könnte. Der Vergleich der Aktivitäten der verschiedenen EctC-Formen (vgl. III.5.3) zeigt eine deutliche Aktivitätsminderung im Fall von EctC-10_Hel, was ebenfalls ein Hinweis darauf sein könnte, dass diese Verkürzung zu drastisch war.

Wie unter IV.1.2.1.1 beschrieben kann an dieser Stelle zwar prognostiziert werden, dass die Ectoin-Synthase eine Tertiärstruktur annehmen dürfte, wie sie den Vertretern der Cupin-Superfamilie zu Eigen ist. Jedoch ist eine solche Vermutung lediglich aufgrund von Sequenzähnlichkeiten sehr vage und sollte durch experimentelle Daten abgesichert werden.

1.2.5 Charakterisierung

Die Charakterisierung der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* in Bezug auf pH-Optimum und Einfluss der Ionenkonzentration erbrachte ein komplexes Bild. Es kann mit Sicherheit von einem pH-Optimum im leicht Alkalischen ausgegangen werden, also im Bereich von pH 8,5-9,0. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten von Ono und Egler (pH-Optimum bei pH 8,5; Ono *et al.* 1999; Egler 2004). Bei einem pH von 8,5 zeigt sich zudem ein Salz-Optimum von 0,5 M NaCl, ebenfalls entsprechend den vorangegangenen Publikationen. Eine genauere Betrachtung der enzymatischen Aktivität unter variablen pH-Werten und Ionenkonzentrationen im Puffer lässt jedoch auf einen weiteren interessanten Zusammenhang dieser zwei Parameter schließen.

Tatsächlich scheinen pH-Wert und Salzkonzentration einen entgegen gerichteten Effekt auf die Aktivität der Ectoin-Synthase zu haben. Während bei einem eher neutralem pH von 7,5-8,0 die Aktivität der Ectoin-Synthase in einem Salinitätsbereich von 0,2-1,0 M NaCl recht stabil bleibt, mit einem Optimum im Bereich von 1,0 M NaCl, verschiebt sich dieses Optimum mit steigendem pH in den niedrigeren Salinitätsbereich (vgl. Abbildung 22). Diese Beobachtung mag einen Hinweis auf mögliche Regulationsmechanismen des Enzyms geben und könnte im Zusammenhang mit dem schon erwähnten hohen Anteil saurer Aminosäuren (vgl. Abbildung 61) stehen.

Eine Aktivierung im Alkalischen würde für ein Ectoin-bildendes Enzym Sinn machen, weiß man doch, dass als Antwort auf einen Salzschock eine Alkalisierung des Cytoplasmas erfolgt (Dinnbier *et al.* 1988, Egler 2004). Eine Regulation der Ectoinbiosynthese über den intrazellulären pH-Wert wurde auch schon für den Organismus *Marinococcus halophilus* diskutiert, da auch hier die biosynthetischen Enzyme ihr Aktivitätsoptimum bei alkalischem pH zeigten und der cytoplasmatische pH nach einem osmotischen Schock von pH 7,6 auf pH 8,2 erhöht wurde (Egler 2004). Eine hohe Ionenstärke könnte jedoch durch Interaktion mit den sauren Gruppen einen gegenteiligen Effekt hervorrufen, insbesondere im Alkalischen, wo die negative Ladung des Enzyms durch die schwächere Protonierung der basischen Aminosäuren noch verstärkt sein dürfte. Tatsächlich war in den Aktivitäts-Assays ein solcher Effekt zu beobachten.

Vergleicht man die Aktivität des Enzyms in Anwesenheit von KCl und NaCl, so zeigt sich, dass mit KCl eine leichte Verschiebung des Optimums in den Bereich der höheren Ionenkonzentration erfolgt. Die Charakterisierung der Ectoin-Synthase aus dem Gram-positiven Organismus *M. halophilus* ließ keine unterschiedliche Reaktion auf Natrium- oder Kaliumionen feststellen (Egler 2004).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Ionenstärke einen weniger starken Effekt auf die Aktivität der Ectoin-Synthase zu haben scheint als der pH des Umgebungsmilieus. Für zukünftige Versuche sollten jedoch auch Salzkonzentrationen unterhalb von 0,2 M gewählt werden, um zu überprüfen, ob die Ectoin-Synthase auch im Niedrigsalz-Milieu aktiv bleibt.

1.2.5.1 Auswirkung des C-Terminus

Ausgehend von den Versuchen zur Strukturanalyse mittels Kristallisation wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene EctC-Formen konstruiert, bei denen der C-Terminus des Enzyms in der Länge modifiziert wurde. Zudem wurden durch das Einbringen eines C-terminalen His₆-Fusionstags zwei weitere EctC-Formen modifiziert. Durch den Vergleich der Aktivitäten dieser C-terminal modifizierten Ectoin-Synthasen lassen sich Rückschlüsse auf potentielle Regulationsmechanismen ziehen. Zum besseren Verständnis sind in Abbildung 65 die C-Termini der verschiedenen EctC-Formen zusammengefasst.

EctC_Hel	REDGSYAPAD E ADDQKPL	137
EctC-8_Hel	REDGSYAPAD	129
EctC-9_Hel	REDGSYAPA	128
EctC-10_Hel	REDGSYAP	127
EctC_Hel_His	REDGSYAPAD E ADDQKPL LE HHHHHH	145
EctC-10_Hel_His	REDGSYAP LE HHHHHH	135

Abbildung 65: C-Termini der versch. EctC-Formen

Farbig hervorgehoben ist ein saurer Aminosäurerest, der von regulatorischer Bedeutung sein könnte. Fett hervorgehoben dargestellt sind die Spacer-Aminosäuren bei Einbringen eines Fusions-tags.

Die native Ectoin-Synthase EctC_Hel weist einen C-Terminus auf, der im Vergleich mit bekannten Ectoin-Synthasen aus anderen Ectoin-produzierenden Organismen auffallend lang ist und einen hohen Anteil saurer Aminosäuren aufweist (vgl. Abbildung 60). Für die Kristallisation wurde die um 10 Aminosäuren verkürzte Form EctC-10_Hel erstellt, deren Aktivität im Vergleich zur nativen Form jedoch dramatisch reduziert ist (vgl. Abbildung 25 und Abbildung 26). Die weniger stark verkürzten Formen EctC-9_Hel und EctC-8_Hel sind ebenfalls in ihrer enzymatischen Aktivität reduziert, interessanter Weise verläuft jedoch die Aktivitätsminderung analog zu der Anzahl der fehlenden Aminosäuren (vgl. Abbildung 25).

Auffällig ist der Einfluss eines C-terminalen His₆-Fusionstags auf die Aktivität der Ectoin-Synthase. Ein negativer Einfluss konnte nicht festgestellt werden, eher eine leichte Aktivitätssteigerung der Form EctC_Hel_His verglichen mit der nativen Form EctC_Hel unter höherer Ionenstärke (0,5-3,0 M KCl). Noch deutlicher wird dieser Effekt für die um 10

Aminosäuren verkürzte Form EctC-10_Hel. Während diese EctC-Form wie schon erwähnt eine dramatische Reduktion der Aktivität zeigt, wird diese Aktivitätsminderung durch Einbringen des His₆-tags wieder teilweise zurückgenommen. Bei einer Salzkonzentration von 0,5 M und pH 8,5 entspricht die Aktivität des Fusionsproteins EctC-10_Hel_His etwa der Aktivität der Variante EctC-8 und bei steigender Ionenkonzentration wird sogar der Aktivitätslevel der nativen Ectoin-Synthase erreicht (vgl. Abbildung 25, Abbildung 26).

Es wird an dieser Stelle prognostiziert, dass dieser oben beschriebene Effekt des Fusionstags nicht auf die Abfolge der sechs Histidine zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf die zwei eingebrachten Spacer-Aminosäuren Leucin und Glutamat, genauer vermutlich auf die saure Aminosäure Glutamat. Betrachtet man Abbildung 65, so fällt auf dass das eingebrachte Glutamat des Fusionstags einen ebenfalls sauren Aspartat-Rest ersetzt, der bei den verkürzten Formen EctC-9_Hel und Ect-10_Hel wegfällt. Dieser saure Aminosäure-Rest könnte ausgehend von den vorliegenden Daten eine Konformations-bestimmende und/oder regulatorische Rolle spielen. Betrachtet man Ectoin-Synthasen aus anderen Organismen, so scheint eine saure Aminosäure an dieser Position weit verbreitet (vgl. Abbildung 60). In zukünftigen Untersuchungen sollten deshalb die Reaktionen der EctC-Formen EctC-9_Hel und EctC-8_Hel auf verschiedene Salzkonzentrationen verglichen werden.

1.2.6 Substratspektrum

Ectoin-Synthasen wurden bislang für sehr spezifische Enzyme der Ectoin-Biosynthese gehalten, mit der einzigen Funktion der Umwandlung von N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure (ADABA) in Ectoin.

Bei *in vitro*-Analysen der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* wurde bereits 1999 das Substratspektrum des Enzyms untersucht, unter der Annahme, dass neben ADABA auch strukturell verwandte Diaminosäuren zyklisiert werden könnten (Ono *et al.* 1999). Als putative Substrate für eine solche Kondensationsreaktion wurden N α -Acetyl-L-Asparagin, N α -Acetyl-L-Ornithin, N α -Acetyl-L-Lysin sowie N ϵ -Acetyl-L-Lysin eingesetzt, jedoch konnte mit keiner dieser Substanzen eine durch die Ectoin-Synthase katalysierte Reaktion festgestellt werden (Ono *et al.* 1999). 2005 wurde mit der Entdeckung des ADPC in *H. elongata* KB1 die Nutzung von Glutamin als Substrat vorgeschlagen, und diese Nebenreaktion der Ectoin-Synthase durch *in vitro*-Assays mit dem entsprechenden Enzym aus *Marinococcus halophilus* auch nachgewiesen (Witt 2005).

IV Diskussion

Eine Reversibilität der Ectoin-Synthase war bereits 1990 von Peters prognostiziert worden, als in Zellextrakten des Organismus *Ectothiorhodospira halochloris* die Umwandlung von Ectoin in die Vorstufe ADABA beobachtet wurde (Peters *et al.* 1990). Angesichts des kürzlich in *H. elongata* aufgedeckten Ectoin-Abbauwegs, der völlig unabhängig von der Ectoin-Synthase verläuft (Schwibbert *et al.* 2010), ist jedoch davon auszugehen, dass es sich hier nicht um eine Reaktion der Ectoin-Synthase handelte. Ähnlich verhält es sich mit Versuchen an einer nicht vollständig gereinigten Ectoin-Synthase aus *Streptomyces*, die auf eine mögliche Ectoin-Hydrolyse hindeuteten (Grammel 1999). Auch hier kann eine Verunreinigung mit Enzymen eines Ectoin-Abbauwegs nicht ausgeschlossen werden. 1999 wurde durch *in vitro*-Analysen der aus *H. elongata* isolierten Ectoin-Synthase die Reversibilität des Enzyms untersucht, indem Ectoin als Substrat angeboten wurde (Ono *et al.* 1999). Das Ausbleiben einer Reaktion charakterisierte das Enzym damals als irreversibel.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Substratspektrum der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* um einige Substanzen erweitert werden. Glutamin als Substrat für eine Kondensationsreaktion zu ADPC spielt zwar, wie die Reaktionsgeschwindigkeit von nur etwa 0,1 U/mg zeigt, eine eher untergeordnete Rolle im Rahmen einer langsamen Nebenreaktion. Dennoch wurde durch diese Reaktion, bei der es sich nachgewiesenermaßen um eine Gleichgewichtseinstellung handelt, erstmals die Reversibilität der Ectoin-Synthase entdeckt. Die Hydrolyse des ADPC verläuft mit etwa 0,3 U/mg sogar schneller als die Kondensationsreaktion und erklärt mit der Gleichgewichtseinstellung auf Seiten des Glutamins, weshalb eine vollständige Umsetzung von Glutamin zu ADPC bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit nicht erreicht werden konnte (Witt 2005).

Mit der nachfolgenden Untersuchung zur hydrolytischen Aktivität der Ectoin-Synthase konnten dem Substratspektrum des Enzyms mit DL-DHMICA und L-Homoectoin zwei weitere zyklische Aminosäure-Derivate hinzugefügt werden. Die Umsetzung von L-Homoectoin in N δ -Acetyl-L-Ornithin verlief deutlich schneller als die ADPC-Hydrolyse, so dass für diese Reaktion kinetische Daten generiert werden konnten. Mit einer V_{\max} von etwa 4,6 U/mg und einem K_m von etwa 28,7 mM ist allerdings auch diese Reaktion im Vergleich zur Ectoin-Bildung (V_{\max} : 56 U/mg, K_m : 8,4; Ono *et al.* 1999) als langsamere Nebenreaktion zu werten. Dennoch konnte die während der vorliegenden Arbeit gereinigte Ectoin-Synthase bereits erfolgreich für die Herstellung der seltenen Substanz N δ -Acetyl-L-Ornithin aus Homoectoin verwendet werden (Groß 2010). Die

Umsetzung des racemischen DL-DHMICA ist mit etwa 0,16 U/mg ebenfalls eine langsame Nebenreaktion, zeigt aber deutlich, dass auch die hydrolytische Aktivität der Ectoin-Synthase stereospezifisch verläuft, da exakt 50 % des Racemats nach der Reaktion verbleiben.

Vergleicht man die verschiedenen Hydrolysereaktionen, sowie die getesteten Substrate die nicht hydrolysiert werden, so fällt auf, dass unter den hydrolytisch spaltbaren Ringen keine 6-Ring-Verbindungen auftauchen. Eine komplette Umsetzung konnte für den 7-Ring Homoectoin und den 5-Ring DHMICA gezeigt werden, der 5-Ring ADPC wird trotz Gleichgewichtseinstellung ebenfalls zu ca. 80 % hydrolysiert. Im Fall von Ectoin bzw. Hydroxyectoin scheint das Gleichgewicht der Reaktion dagegen vollständig auf der Seite des zyklischen Produktes zu liegen, möglicherweise aufgrund der chemischen Stabilität einer 6-Ring-Struktur. Dies erklärt auch, weshalb trotz der nachgewiesenen Reversibilität des Enzyms für den Ectoin-Abbau in *H. elongata* ein von der Ectoin-Synthase unabhängiger Weg genutzt wird (Schwibbert *et al.* 2010).

2 Veränderte Proteinexpression in *H. elongata* KB1

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, tritt im Gesamtprotein der *H. elongata*-Mutante KB1 im Vergleich zum Wildtyp eine verstärkte Menge des EctC-Expressionsproduktes auf. Eine solche Veränderung in der Proteinzusammensetzung sollte seine Ursache in der Deletion des *ectA*-Gens haben, da diese die KB1-Mutante auszeichnet. Jedoch stellt sich die Frage, ob die Veränderung der EctC-Menge ein Effekt der Transkription oder der Translation ist.

In einer vorangegangenen Arbeit (Stumpfe 2003) wurde die Transkription des *ectABC*-Clusters aus *H. elongata* mittels Northern-Blot-Analyse sowie RT-PCR näher untersucht. Hierbei wurden Einzeltranskripte der drei Gene sowie ein Gesamttranskript (*ectABC*) und zwei Cotranskripte *ectBC* und *ectBCR* detektiert. Ausgehend von diesen Daten müssen also alle drei Gene über einen eigenen Promotor verfügen, zudem spricht die Präsenz von Einzeltranskripten neben einem Gesamttranskript für das Vorliegen von Terminationsschleifen stromabwärts der Ectoingene. Bereits in der genannten Arbeit (Stumpfe 2003) wurde der Stamm *H. elongata* KB1 untersucht und eine auffällig verstärkte Transkription des *ectB*- sowie des *ectBC*-Transkripts gezeigt.

IV Diskussion

Die in vorangegangenen Arbeiten (Göller 1999; Stumpfe 2003) postulierten Promotorelemente, Terminationsschleifen und Ribosomenbindestellen sind in Abbildung 66 zusammengefasst. Kürzlich wurde die Transkription des Ectoin-Clusters in *H. elongata* experimentell weiter aufgeklärt (Schwibbert *et al.* 2010), auch diese Daten wurden in Abbildung 66 integriert.

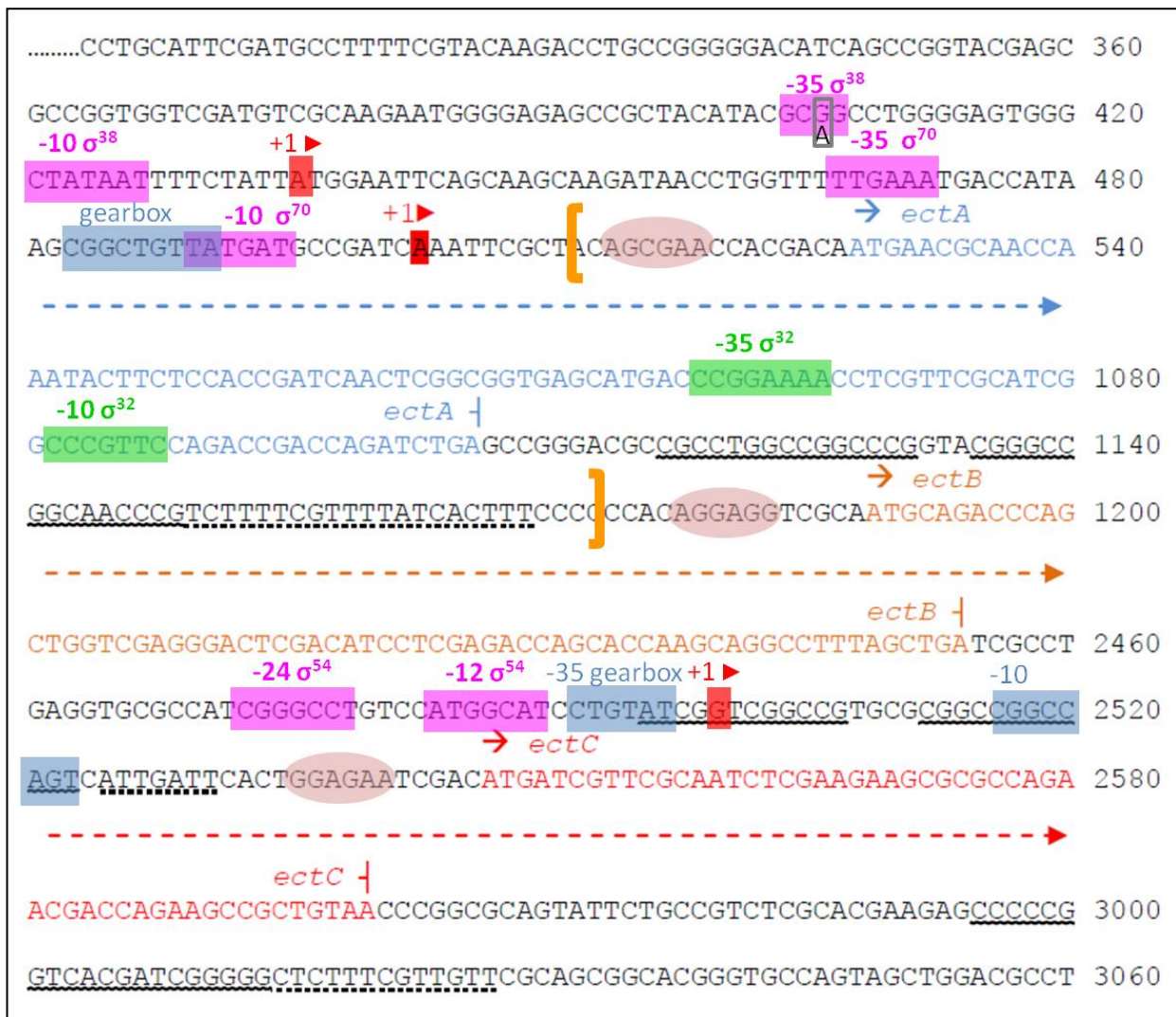


Abbildung 66: Transkriptions- und Translations-bestimmende Elemente des Ectoingenclusters in *H. elongata*

Dargestellt ist das *ectABC*-Cluster aus *H. elongata* mitsamt den entsprechenden Promotorbereichen. Es liegen Promotoren des σ^{38} -, σ^{70} - und σ^{54} -Typs vor (Göller 1999; Schwibbert *et al.* 2010), sowie einige putative *gearbox*-Elemente (Göller 1999). Ein vor *ectB* liegender Promotor des σ^{32} -Typs wurde in *C. salexigens* identifiziert (Calderón *et al.* 2004) und findet sich in identischer Sequenz auch in *H. elongata*. Vor *ectA* und *ectC* liegende Transkriptionsstartpunkte wurden experimentell ermittelt (Burdziak 2006; Schwibbert *et al.* 2010). Putative Bereiche von Terminationsschleifen sind mit einer wellenförmigen, darauffolgende AT-reiche Regionen mit einer durchbrochenen Linie markiert (Stumpfe 2003). Ribosomenbindestellen sind elliptisch hinterlegt. Der in *H. elongata* KB1 genomisch deletierte Bereich (Grammann 2000) um das *ectA*-Gen wurde in dieser Abbildung durch eckige Klammern gekennzeichnet. In *H. elongata* KB1 (Δ *ectA*) wurde eine Punktmutation identifiziert (Position 406, G → A) (Grammann 2000), die die -35-Region des σ^{38} -Promotors betrifft.

In einer Studie zur Transkription der Ectoingene in *Chromohalobacter salexigens* (Calderón *et al.* 2004) wurden Promotorelemente beschrieben, die sich teils in identischer Sequenz auch in *H. elongata* wiederfinden, wie der Promotorbereich vor dem *ectB*-Gen. Diese Daten wurden ebenfalls in Abbildung 66 eingefügt.

In *H. elongata* KB1 wurden bei der Deletion des *ectA*-Gens neben dem Genbereich auch einige Basen stromauf- und stromabwärts von *ectA* entfernt (Grammann *et al.* 2002), wie in Abbildung 66 dargestellt. Es ist davon auszugehen, dass diese genomische Veränderung innerhalb des Ectoinbiosynthese-Genclusters Auswirkungen auf die Transkription der verbleibenden Gene (*ectB* und *ectC*) haben muss, denn nicht nur die Terminationschleife hinter *ectA* wurde entfernt, auch der innerhalb von *ectA* liegende putative *ectB*-Promotor entfällt.

Mithilfe der in Abbildung 66 zusammengefassten Daten lässt sich somit die folgende Hypothese aufstellen, die die erhöhte EctC-Menge in *H. elongata* KB1 erklären könnte: Durch die Deletion von *ectA* entfällt sowohl die Terminationschleife hinter *ectA* als auch der Promotorbereich vor *ectB*. Somit muss die Transkription von *ectB* sowie des *ectBC*-Cotranskripts nun ausgehend von dem ehemals vor *ectA* liegenden Promotorbereich (*promA*) erfolgen. Bedenkt man die in KB1 nachgewiesenermaßen gesteigerte Transkriptmenge (Stumpfe 2003), so scheint dieser Promotorbereich im Vergleich zum *ectB*-Promotor eine stärkere Transkription zu erlauben. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in *C. salexigens* innerhalb der *promA*-Region vier Transkriptionsstartpunkte nachgewiesen werden konnten, vor *ectB* jedoch nur einer (Calderón *et al.* 2004). Für *H. elongata* wurden vor *ectA* immerhin zwei Transkriptionsstartpunkte identifiziert (Burdziak 2006; Schwibbert *et al.* 2010), jedoch bislang keiner vor *ectB*. Durch das Vorliegen eines *ectBC*-Cotranskripts (Stumpfe 2003), das darauf hindeutet dass zwischen den beiden Genen sehr wahrscheinlich eine nur schwache Terminationschleife vorliegt, muss sich der Austausch des Promotors vor *ectB* (von *promB* zu *promA*) indirekt auch auf die EctC-Menge auswirken. Es sieht also ausgehend von dieser Hypothese so aus, dass die in *H. elongata* KB1 nachgewiesene erhöhte EctC-Menge rein durch transkriptive Effekte zu erklären ist. Da sich die vor den Genen liegenden Ribosomenbindestellen durch die *ectA*-Deletion nicht verändern, ist eine Auswirkung auf translationaler Ebene nicht wahrscheinlich.

Weiter verkompliziert wird die Auswertung der vorliegenden Daten jedoch noch durch eine bereits 2000 beschriebene Punktmutation im Promotorbereich des Stammes *H. elongata* KB1 (Grammann 2000). Diese Punktmutation (G → A an Position 406, Abbildung 66) liegt in der -35-

bestimmenden Elementen im Genom des Stammes *H. elongata* KB1 (vgl. Abbildung 66), in dem zwischen den Promotorelementen und dem *ectC*-Gen das *ectB*-Gen liegt, sowie eine andere Ribosomenbindestelle für die Translation von *ectC* zuständig ist. Hier lässt sich vermuten, dass auch die Kombination der vor *ectC* liegenden Ribosomenbindestelle der Sequenz GGAGAA mit den in Abbildung 67 dargestellten transkriptiven Promotorelementen eine stärkere Expression erlaubt als die vor *ectA* liegende Ribosomenbindestelle der Sequenz AGCGAA.

Welcher Art die Auswirkungen auf die Transkription und/oder Translation in *H. elongata* KB1 tatsächlich sind, und ob es sich sogar um eine Kombination der oben beschriebenen Effekte handelt, sollte in nachfolgenden Arbeiten durch Transkriptionsstudien verifiziert werden.

3 ADPC

3.1 Biosynthese in verschiedenen Stämmen

Die Rolle der Ectoin-Synthase in der Biosynthese des ADPC konnte in der vorliegenden Arbeit zweifelsfrei nachgewiesen werden. Bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) war eine ADPC-Akkumulation in dem Stamm *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$) gezeigt worden. Durch genomische Deletion des *ectC*-Gens wird die Fähigkeit zur ADPC-Bildung ausgeschaltet, wie die Charakterisierung des Stammes *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$) deutlich zeigt (vgl. III.1.2). Die heterologe Expression des *ectC*-Gens aus *H. elongata* in *E. coli*, wie sie z. B. mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel durchgeführt wurde (vgl. III.4.2.1), vermittelt dem Organismus die Fähigkeit zur ADPC-Synthese, was ebenfalls beweist, dass die Ectoin-Synthase ursächlich für die Synthese ist. Zusätzlich konnte die enzymatisch katalysierte Reaktion mit isoliertem Enzym aus *H. elongata* *in vitro* gezeigt werden (vgl. III.5.4.1.1), wie zuvor bereits auch für das entsprechende Enzym aus *M. halophilus* (Witt 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Produktion von ADPC in verschiedenen Organismen nachgewiesen bzw. induziert werden (vgl. III.7.1.1). Die dadurch erhaltenen Daten helfen, die Biosynthese der Substanz und deren Regulation besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang ist der Vergleich der *H. elongata*-Stämme KB1 ($\Delta ectA$) und SAA4 (*ectA*::Tn1732) besonders interessant. In beiden Stämmen ist die Ectoin-Biosynthese an derselben Stelle, nämlich der Acetylierungsreaktion zu ADABA, unterbrochen, so dass ein identisches Solutespektrum der beiden Stämme erwartet worden war. Tatsächlich jedoch zeigte sich ein

deutlicher Unterschied im ADPC-Gehalt, der bei der Mutante KB1 mit ca. 14 mg/g TG deutlich höher ausfiel als bei SAA4 mit ca. 2 mg/g TG (vgl. Tabelle 11). Durch Vergleich des Gesamtzellproteins konnte nachgewiesen werden, dass der Stamm KB1 eine verstärkte EctC-Expression aufweist, deren Ursache in der genomischen Deletion von *ectA* und dadurch verursachten Transkriptionseffekten liegt (vgl. III6.1), die in der Mutante SAA4 fehlen. Der Rückschluss, dass eine detektierbare ADPC-Produktion größere Mengen Enzym benötigt, wird durch die Untersuchung des Stammes *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel bestärkt. Auch in diesem Stamm ist *ectA* deletiert, *ectC* befindet sich jedoch anstelle der natürlichen Position im Genom auf dem Vektor pWUB. Dadurch liegt das Gen in höherer Kopienzahl vor und steht zudem unter der Kontrolle eines starken Promotors, die Menge des Expressionsproduktes übersteigt somit die in KB1 deutlich (vgl. Abbildung 38 und Abbildung 42). Dies spiegelt sich dann auch im ADPC-Gehalt der Zellen wieder, denn mit ca. 28 mg/g TG produziert WUB02 pWUB_ectC_Hel noch einmal doppelt so viel ADPC wie KB1 (vgl. Tabelle 11).

Die heterologe ADPC-Produktion in *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel sollte unabhängig von den in *H. elongata* erhaltenen Daten betrachtet werden. Zwar konnte in *E. coli* durch vektorbasierte EctC-Expression eine ADPC-Produktion erreicht werden, die mit ca. 18 mg/g TG die von KB1 leicht übersteigt (vgl. Tabelle 11). Es muss allerdings auch beachtet werden, dass mit dem Wechsel des Organismus diverse Faktoren verändert werden, wie z. B. das intrazelluläre Milieu. Für die ADPC-Produktion ausschlaggebend könnte unter anderem die cytoplasmatische Ionenkonzentration sein, die die Aktivität der Ectoin-Synthase beeinflusst (vgl. III5.1), aber auch die Konzentration des Substrats Glutamin bzw. anderer Solute könnte regulierend wirken. So produziert *E. coli* beispielsweise Trehalose und unterscheidet sich somit deutlich von *H. elongata*. Auch das Vorhandensein von Transportsystemen ist ein Faktor, der in Bezug auf ADPC-Produktion und Akkumulation von Interesse sein könnte (siehe IV3.1.1). Festzuhalten bleibt jedoch, dass auch in *E. coli* ein deutlicher Zusammenhang zwischen Stärke der EctC-Expression und Höhe des zellassozierten ADPC-Gehalts besteht.

3.1.1 Wachstumsphasenabhängigkeit

Die Beobachtung, dass die ADPC-Produktion in *H. elongata* KB1 eine deutliche Wachstumsphasenabhängigkeit aufweist (Witt 2005) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (vgl. III7.1.2). Bezieht man die neuen Erkenntnisse zur reversiblen Aktivität der Ectoin-Synthase mit ein, so lässt sich der niedrige ADPC-Gehalt der Zellen während

des Wachstums leicht mit der *in vitro* gezeigten Gleichgewichtseinstellung zwischen Glutamin und ADPC erklären (vgl. III.5.4.2.1). Auffällig bleibt hierbei, dass das in den KB1-Zellen beobachtete Glutamin/ADPC-Verhältnis eher im Bereich 95/5 liegt als bei den *in vitro* gezeigten 80/20 (vgl. Abbildung 53), obwohl die Substratkonzentration in den *in vitro*-Reaktionen ausgehend von der Quantifizierung des intrazellulären Glutamingehalts (siehe Abbildung 53) nach Dötsch der cytoplasmatischen Substratkonzentration angepasst wurde (Dötsch *et al.* 2008). Diese Differenz sollte Anlass zu weiteren zukünftigen Untersuchungen sein, bleibt doch fraglich, ob *in vivo* weitere Faktoren eine regulatorische Rolle spielen könnten.

Eine offene Frage ist, weshalb sich das auf Seite des Glutamins liegende Gleichgewicht *in vivo* mit Eintritt in die stationäre Phase auf die Seite des ADPC verschiebt (vgl. Abbildung 53). Bei der Durchführung von *in vitro*-Assays mit der Ectoin-Synthase konnte eine solche Gleichgewichtsverschiebung bei der Umsetzung von Glutamin als Substrat weder durch eine Veränderung der Ionenkonzentration im Puffer noch durch eine pH-Änderung des Reaktionspuffers induziert werden (Daten nicht gezeigt), so dass es als unwahrscheinlich gilt, dass eine Änderung des intrazellulären Milieus ursächlich für den Anstieg des zellassozierten ADPC-Gehalts ist. In diesem Zusammenhang ist die reproduzierbare Beobachtung, dass der mit Eintritt in die stationäre Phase ansteigende ADPC-Gehalt durch Fütterung der Kultur wieder reduziert wird (vgl. Abbildung 54, Ganser 2010), interessant. Diese Daten weisen auf einen energieabhängigen Prozess hin, der die Gleichgewichtseinstellung beeinflusst. Da die Einstellung eines Gleichgewichts leicht beeinflusst werden kann, indem eine Komponente des Gleichgewichts diesem entzogen wird, könnte ein solcher energieabhängiger Prozess ein Transportsystem sein, das ADPC aus dem Periplasma zurück in das Cytoplasma transportiert. Eine vorstellbare Hypothese wäre an dieser Stelle, dass durch einen energieabhängigen Transporter ein ADPC-Verlust der Zelle, wie er für Ectoin in *H. elongata* bereits bekannt ist (Grammann *et al.* 2002), verhindert wird, und dass das ADPC hierdurch wieder in das durch die Reversibilität der Ectoin-Synthase hervorgerufene Gleichgewicht zurückgeführt wird. Wird dieser Transport durch den Mangel an C-Quelle bei Eintritt in die stationäre Phase eingestellt, verliert die Zelle ADPC nach außen, wodurch die Gleichgewichtsreaktion im Cytoplasma der Zelle weiter in Richtung ADPC ablaufen würde. Ein Anstieg des ADPC-Gehalts könnte jedoch nur detektiert werden, wenn das ADPC periplasmatisch oder anderweitig zellassoziert verbleiben würde.

Dass *H. elongata* ein Transportsystem für ADPC besitzen muss konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch ADPC-Supplementierung von *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA \Delta ectC$) gezeigt werden (vgl. III7.3.1). Ein möglicher Kandidat für ein solches Transportsystem in *H. elongata* ist der Ectoin-Transporter TeaABC (*transporter for ectoine accumulation ABC*) (Grammann *et al.* 2002; Tetsch und Kunte 2002). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des ADPC zu Ectoin wären eine Interaktion des Substratbindepoteins TeaA mit dieser Substanz und ein nachfolgender Transport in die Zelle denkbar. TeaABC wird in die Transporterklasse der TRAP-Transporter (*tripartite ATP-independent periplasmic*) eingruppiert (Forward *et al.* 1997). Es handelt sich hier um ein sekundäres Transportsystem, das einen Ionengradienten (H^+ oder Na^+) als Energiequelle benötigt (Grammann *et al.* 2002). In der stationären Phase wäre also eine Einstellung der Transporteraktivität denkbar. Ob die Interaktion des zugehörigen Bindepoteins TeaA ausreichen würde, um den Anstieg der zellassoziierten ADPC-Konzentration zu verursachen, sollte durch zukünftige Studien weiter verfolgt werden. Hier wäre es sicherlich empfehlenswert, mit TeaABC-Deletionsmutanten bzw. Deletionen einzelner Transporteruntereinheiten zu arbeiten und die ADPC-Aufnahme sowie -Produktion dieser Stämme zu untersuchen.

3.2 Produktion und Reinigung

Die Produktion und Reinigung von ADPC wurde bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (Witt 2005) erfolgreich durchgeführt. Als Produktionsstamm diente damals wie auch in der vorliegenden Arbeit *H. elongata* KB1. Durch weiterführende Arbeiten wurde versucht, effektivere ADPC-Produzenten einzusetzen, indem das Gen für die Ectoin-Synthase Vektorbasiert in *E. coli* (*E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel) und *H. elongata* (*H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel) überexprimiert wurde (vgl. III7.1.1, Ganser 2010). Während die Untersuchung dieser Plasmid-tragenden Stämme im 100 mL-Maßstab eine deutliche Steigerung der ADPC-Produktion verzeichnete, konnte im größeren Produktionsmaßstab, z. B. bei Kultur des *H. elongata*-Stammes im 15 L-Reaktor, keine hohe ADPC-Ausbeute erzielt werden, da hier die zellassoziierten ADPC-Gehalte deutlich niedriger lagen (vgl. III7.1.2). Dies wurde zunächst mit einer möglichen Plasmidinstabilität aufgrund insuffizienter Antibiotika-Zugabe begründet (Ganser 2010). Die nähere Untersuchung der ADPC-Produktion über den Fermentationsverlauf des Stammes *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel zeigte jedoch, dass hier eher der Einsatz

einer Fed-Batch-Methode problematisch war (vgl. Abbildung 54). Vor der Optimierung des Produktionsorganismus sollte hier also erst die Optimierung der Kultur stehen, die aufgrund der beschriebenen Stationärphasen-Abhängigkeit der ADPC-Akkumulation (vgl. III7.1.2) zukünftig besser im Batch-Verfahren erfolgen sollte.

Obwohl mit dem heterologen Expressionssystem *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Hel ein schnelles Wachstum und eine recht hohe ADPC-Akkumulation von bis zu 18 mg/g TG erreicht werden konnte (vgl. Tabelle 11), sollte bedacht werden, dass dieser Stamm den kostenintensiven Induktor IPTG benötigt und zudem aufgrund der starken Proteinüberexpression keine hohen Zelldichten erreicht (Ganser 2010). Das homologe Expressionssystem *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel dagegen benötigt aufgrund des osmotisch induzierten Promotors keinen externen Induktor zusätzlich zu dem im Medium vorhandenen Salz. Mit bis zu 30 mg/g TG ist dieser Stamm der bislang stärkste ADPC-Produzent (vgl. Tabelle 11). Zudem ist *H. elongata* leicht auch im großen Maßstab in hohen Zelldichten zu kultivieren, was ebenfalls die ADPC-Ausbeute steigern dürfte. Eine weitere bislang nicht verwirklichte Möglichkeit der Produktivitätssteigerung könnte in der Verwendung einer Ausscheidermutante liegen, die aufgrund einer Deletion im Ectoin- bzw. ADPC-Transportsystem das Produkt in das Medium verliert, wodurch die cytoplasmatische Biosynthese weiter in Richtung des ADPC ablaufen könnte. Für die Ectoin-Produktion wurde eine solche Produktionssteigerung durch Verwendung einer TeaABC-Mutante bereits gezeigt (Grammann *et al.* 2002).

Bezüglich der Reinigung der Substanz konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das bereits beschriebene Aufarbeitungsverfahren (Witt 2005) durch Einführung einer Anionenaustausch-Chromatographie optimiert werden. Hierdurch konnte eine vollständige Trennung des ADPC von der Aminosäure Glutamat erzielt werden, die in *H. elongata* unter osmotischen Stressbedingungen insbesondere in Ectoin-Mangelmutanten in erhöhter Konzentration vorliegt (Göller *et al.* 1998). Weiterführende Arbeiten zur ADPC-Gewinnung sollten sich stärker mit dem letzten fehlenden Schritt der Aufreinigungsprozedur beschäftigen, der Kristallisation. Bislang konnte ADPC nicht als Feststoff gewonnen werden, sondern lediglich als stark viskose Flüssigkeit. Verschiedene Versuche, die Substanz in wasserfreiem Methanol zu kristallisieren, schlugen fehl. Dies könnte auf einen stark hygroskopischen Charakter des ADPC zurückzuführen sein.

3.3 Charakterisierung des ADPC als kompatibles Solut

Neben ihrer Eigenschaft, unter osmotischem Stress für eine Homöostase in Zellen zu sorgen, weisen viele kompatible Solute weitere protektive Eigenschaften auf, die von der Stabilisierung von Makromolekülen bis zum Schutz von ganzen Zellen unter Stressbedingungen reichen (Lentzen und Schwarz 2006). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die neue Substanz ADPC unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht, um festzustellen, ob eine Einordnung in die Gruppe der kompatiblen Solute erfolgen kann. Die erhaltenen Daten, die im Folgenden gesondert diskutiert werden, weisen darauf hin, dass es sich bei ADPC tatsächlich um ein kompatibles Solut handelt. Die Substanz zeigt alle zu erwartenden Eigenschaften: Sie wird in hohen Konzentrationen akkumuliert, verbessert das Wachstum unter Salzstress, kann als Proteinstabilisator dienen und erhöht die Überlebensrate ganzer Zellen unter Trockenstress.

3.3.1 Supplementierung unter Salzstress

Wie bereits gezeigt (Witt 2005, diese Arbeit) wird ADPC im Produktionsorganismus *H. elongata* KB1 oder auch *H. elongata* WUB02 pWUB_ectC_Hel erst in der stationären Wachstumsphase in erhöhter Menge akkumuliert, was sich vermutlich mit der Reversibilität der durch EctC katalysierten Reaktion erklären lässt (vgl. III.5.4.2.1). Eine Stationärphasen-abhängige Biosynthese schließt jedoch aus, dass diese Substanz vom Produktionsorganismus selbst als kompatibles Solut während des Wachstums unter Stressbedingungen genutzt wird, da die Substanz hierfür bereits in der exponentiellen Phase akkumuliert werden müsste. Eine Wirkung als kompatibles Solut in Zellen, die keine Ectoin-Synthase aufweisen und somit ADPC nicht in Glutamin umwandeln können, schien allerdings aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zu bekannten Soluten wie Ectoin oder DHMICA wahrscheinlich. Tatsächlich konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ADPC unter Salzstress von *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$) aus dem Medium aufgenommen und akkumuliert wird und einen positiven Einfluss auf die Wachstumsrate dieses Organismus hat (siehe III.7.3.1). Ebenso konnte ein vergleichbarer Effekt auf *E. coli* gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass der Effekt von ADPC auf die Wachstumsrate von *H. elongata* WUB02 annähernd vergleichbar mit dem der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin ist, den natürlichen Soluten von *H. elongata*. Die hier gezeigten Daten unterstützen somit die Einordnung des ADPC in die Gruppe der kompatiblen Solute, da eine Erhöhung der Salztoleranz einer Ectoin-Mangelmutante von *H. elongata* eindeutig gezeigt werden konnte.

3.3.2 Stabilisierung von Makromolekülen

Neben ihrer osmotischen Funktion wird kompatiblen Soluten auch eine Schutzwirkung auf Makromoleküle, wie Proteine, unter denaturierenden Stressbedingungen nachgesagt (Rajendrakumar *et al.* 1994; Lippert und Galinski 1992; Göller und Galinski 1999). Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) stellt ein standardisiertes Testenzym dar, da der Aktivitätsnachweis in einem einfachen photometrischen Assay erfolgen kann und das Enzym selbst als sensitiv gegenüber verschiedensten destabilisierenden Stress-Situationen gilt (Lippert und Galinski 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Gefrier-Auftau-Zyklen eine bereits etablierte Protein-Denaturierungs-Methode gewählt, wobei durch die Verwendung von Flüssigstickstoff und Auftauen bei Raumtemperatur das sogenannte *fast-freeze-* und *slow-thaw-*Verfahren durchgeführt wurde (Lippert und Galinski 1992). Als Positivkontrolle für einen stabilisierenden Schutzstoff wurde Hydroxyectoin eingesetzt. Dieses hydroxylierte Ectoin-Derivat war bereits im Vorfeld als sehr guter Enzymstabilisator insbesondere der LDH beschrieben worden (Lippert und Galinski 1992; Göller und Galinski 1999; Borges *et al.* 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Schutzwirkung des ADPC auf die LDH gezeigt werden (vgl. Abbildung 56). Während das Enzym ohne Zugabe eines Schutzstoffes bereits nach 3-4 Gefrier-Auftau-Zyklen keine Aktivität mehr zeigte, konnte durch Zugabe der Schutzstoffe die Enzymaktivität auch über 6 Zyklen erhalten werden. Hierbei erfolgte bei Zugabe von Hydroxyectoin jedoch ein Aktivitätsverlust von ca. 80 %, während die Zugabe von ADPC ca. 70 % der Anfangsaktivität erhalten konnte. Aufgrund der starken Steigerung der Basalaktivität durch die Zugabe der Schutzstoffe, im Fall des ADPC um ca. 50 %, entsprach somit die Aktivität der ADPC-behandelten LDH nach 6 Zyklen noch immer der Anfangsaktivität der unbehandelten LDH. Eine solche Steigerung der Basalaktivität durch Zugabe von kompatiblen Soluten wie Hydroxyectoin war bereits zuvor beschrieben worden (Lippert und Galinski 1992). Die in Abbildung 56 zu erkennenden Schwankungen in der Aktivitätsbestimmung insbesondere bei Zusatz von ADPC sind vermutlich auf den leicht viskosen Charakter einer 400 mM-ADPC-Lösung und die damit einhergehende erschwerte Herstellung eines homogenen Reaktionsansatzes in der Küvette zurückzuführen.

Die vorliegenden Daten lassen somit den Schluss zu, dass es sich bei ADPC um einen höchst effektiven Proteinstabilisator handeln könnte. Weiterführende Untersuchungen mit variablen

Testenzymen und verschiedenen denaturierenden Stresssituationen, wie z. B. Hitzestress, sollten sich der vorliegenden Arbeit anschließen, um diese Ergebnisse weiter abzusichern.

3.3.3 Schutz ganzer Zellen unter Trockenstress

Der Einsatz von kompatiblen Soluten als Schutzstoff für ganze Zellen unter Trockenstress, sei es unter natürlichen Stressbedingungen oder auch beim biotechnologischen Einsatz im Rahmen des sogenannten „anhydrobiotic engineering“, wurde bereits zuvor in der Literatur diskutiert (Louis *et al.* 1994; Manzanera *et al.* 2002; Manzanera *et al.* 2004). Die Methoden der Zelltrocknung variieren bei den genannten publizierten Daten erheblich, so dass eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht ohne Weiteres gegeben ist. Grundlegend kann jedoch festgestellt werden, dass polare Substanzen mit Hydroxylgruppen wie die Zucker Trehalose und Saccharose sowie Hydroxyectoin eine gute Schutzwirkung zeigen.

Dieses Bild zeigt sich ebenfalls bei dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuch zum Überleben von *E. coli*-Zellen unter Gefriertrocknungs-Stress (vgl. III.7.3.3). Hierbei wurden *E. coli* K12-Kulturen im Mikrotiterplatten-Maßstab unter Salzstress und Supplementierung mit verschiedenen Soluten (100 mM) eingefroren und gefriergetrocknet. Das erhaltene Lyophilisat wurde nach ca. 48 h durch Zugabe von Medium und Kultur bei 37 °C wiederbelebt.

Betrachtet man den prozentualen Anteil überlebender Zellen, so zeigt Abbildung 57 deutlich, dass Trehalose gefolgt von Hydroxyectoin die besten Stabilisatoren sind. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt auch der Einsatz von Ectoin eine Schutzwirkung, die jedoch deutlich schwächer ausfällt als die der zuvor genannten Substanzen. Wie bereits zuvor beschrieben (Louis *et al.* 1994) lässt sich mit Betain keine Stabilisierung der Zellen erzielen, tatsächlich konnte sogar ein negativer Effekt durch Betain festgestellt werden. Dies wurde bereits zuvor während längerfristiger Trockenlagerung beobachtet (Louis *et al.* 1994; Marshall *et al.* 1974). Das inkompatible Solut Kreatin (Mann 2008; Sell 2009) beeinflusst das Überleben der *E. coli*-Zellen unter Gefriertrocknungs-Stress sogar noch deutlicher negativ. Diese Beobachtung sollte sicherlich durch weitere Versuche verifiziert werden, da sich hieraus weitere Einsatzmöglichkeiten für das inkompatible Solut Kreatin ergeben könnten.

Die beschriebenen Beobachtungen decken sich gut mit den Daten von Louis (1994), so dass die erzielten Ergebnisse mit dem neuen Solut ADPC in diesen Kontext eingeordnet werden können. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zeigt ADPC eine Schutzwirkung auf *E. coli*-

Zellen, die deutlich über der von Ectoin liegt, jedoch nicht an die von Hydroxyectoin heranreicht. Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass die neu beschriebene Substanz Hydroxy-ADPC (III7.4) ein lohnendes Objekt zukünftiger Forschung sein könnte, da hier durch das Einführen einer Hydroxyl-Gruppe eine weitere Steigerung der Schutzwirkung zu erwarten ist.

3.4 Hydroxylierung des ADPC

Die in *H. elongata* für die Umwandlung von Ectoin in Hydroxyectoin verantwortliche Ectoin-Hydroxylase EctD wurde 2005 von Ures identifiziert und charakterisiert (Ures 2005). Weiterführende Arbeiten zeigten ein durchaus breiteres Substratspektrum; so katalysiert dieses Enzym auch die Hydroxylierung weiterer strukturell verwandter Substrate wie Prolin, DHMICA und Homoectoin (Galinski *et al.* 2007; Vielgraf 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dem Enzym auch ADPC als Substrat angeboten, da die strukturelle Ähnlichkeit zu den oben genannten Substraten eine Hydroxylierungsreaktion erwarten ließ. Der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pETectDcyt. (Ures, unveröffentlicht) diente wie schon zuvor beschrieben als Ganzzellkatalyse-System (Vielgraf 2008). Hierbei wird eine Aufnahme des im Medium supplementierten Substrats in die *E. coli*-Zellen durch Anzucht unter Salzstress eingeleitet, cytoplasmatisch erfolgt dann die Hydroxylierung durch die Vektor-basiert und IPTG-induziert exprimierte Ectoin-Hydroxylase EctD. Wie bereits für dieses System beschrieben, wird das hydroxylierte Produkt nicht nur in den Zellen akkumuliert, sondern auch wieder in das Medium ausgeschleust (Vielgraf 2008).

Die Hydroxylierung des ADPC im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben. Über den Zeitverlauf konnte im Medium eine Abnahme des Substrates ADPC beobachtet werden, damit einhergehend wurde mittels HPLC das Auftreten eines neuen Signals mit vergleichbar starker UV-Absorption beobachtet (vgl. Abbildung 58). Während nach 24 h im Medium eine annähernd vollständige Umsetzung des ADPC erfolgt war, wurde in den Zellen nach 24 h ein ADPC/Hydroxy-ADPC-Verhältnis von etwa 1:1 erreicht. Die Analyse mittels ¹³C-NMR (Abbildung 59) zeigt eine Verschiebung der ADPC-Signale, die für eine Hydroxylierung der Substanz am C₃ spricht.

Die gezeigten Daten erweitern somit nicht nur das Substratspektrum der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *H. elongata* um eine weitere Substanz, sie unterstützen auch den Nachweis der neuen,

bislang unbeschriebenen Struktur des Hydroxy-ADPC (5-Amino-3-hydroxy-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-carboxylsäure). In Anbetracht der oben beschriebenen Charakterisierung des ADPC als kompatibles Solut gilt es als wahrscheinlich, dass auch diese neue Substanz protektive Eigenschaften aufweisen kann. Tatsächlich konnte für die beiden Solute Ectoin und Hydroxyectoin mehrfach gezeigt werden, dass die Einführung der Hydroxylgruppe die Wirkeigenschaften der Solute bei verschiedenen Applikationen deutlich verändern kann. Beispielsweise zeigt die hydroxylierte Verbindung stärkere Wirkung als Proteinstabilisator (Borges *et al.* 2002; Lippert und Galinski 1992) oder als Schutzstoff für ganze Zellen unter Trockenstress (Louis *et al.* 1994). In Anbetracht der oben gezeigten protektiven Eigenschaften des ADPC könnte Hydroxy-ADPC ebenfalls ein interessanter Beitrag zur Gruppe der kompatiblen Solute sein, so dass eine weitere Produktion und Charakterisierung dieser neuen Substanz in nachfolgenden Arbeiten thematisiert werden sollte.

3.5 ADPC und verwandte Strukturen in der Literatur

ADPC als akkumuliertes Solut wurde bislang nur in *H. elongata* KB1 beschrieben (Witt 2005). Da es sich bei diesem Stamm jedoch um einen genetisch veränderten Organismus handelt, kann man hier weniger von einem natürlichen Vorkommen sprechen als von einem gentechnisch verursachten Auftreten.

Allerdings gibt es Literaturstellen, in denen ADPC als natürlicher Strukturbestandteil von verschiedenen Peptid-Antibiotika genannt wird. In diesen antimikrobiell wirksamen Verbindungen, zu denen beispielsweise Kikumycin A, Kikumycin B, Dihydrokikumycin B, Anthelvencin A oder Noformycin (Abbildung 68) zählen, bildet die ADPC-Struktur eine N-terminale Aminosäure (Lee *et al.* 1988; Lee und Lown 1987; Takizawa *et al.* 1987). Ein Vorkommen von ADPC als Intermediat in der Biosynthese oder dem Abbau solcher Antibiotika ist somit vorstellbar (Takizawa *et al.* 1987), und die Verwendung der ADPC-Struktur in der chemischen Synthese eines solchen Wirkstoffs wurde bereits publiziert (Lee *et al.* 1988; Lee und Lown 1987).

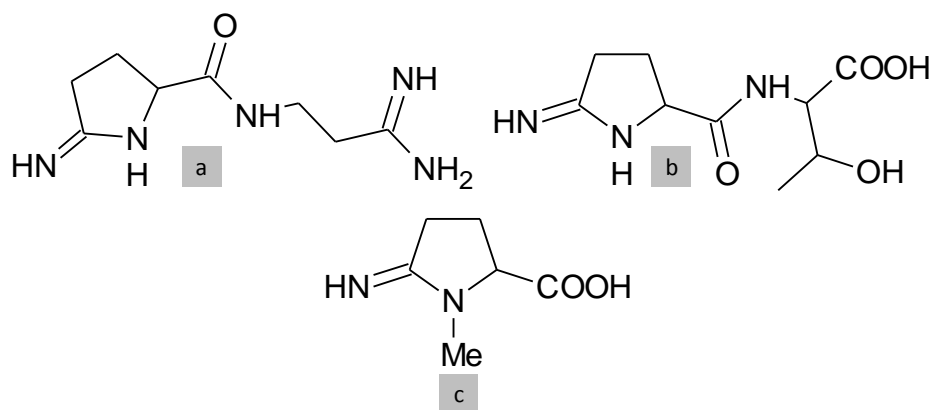


Abbildung 68: ADPC-Derivate aus der Literatur

a: Noformycin (Lee und Lown 1987), b: 2-Imino-5-L-(carboxy-L-threoninyl)-pyrrolidin (Mitchell und Teh 2005), c: 2-Imino-1-methylpyrrolidin-5-carboxylsäure (Castellanos *et al.* 2006)

Strukturell dem ADPC verwandte Verbindungen wurden kürzlich von natürlichen Standorten isoliert und identifiziert. So wurde ein N-methyliertes Derivat des ADPC, die 2-Imino-1-methylpyrrolidin-5-carboxylsäure (Abbildung 68), aus dem marinen Schwamm *Cliona tenuis* isoliert (Castellanos *et al.* 2006). Diese Verbindung steht unter Verdacht, allelopathische Aktivität gegen Korallen zu zeigen, also bioaktiv zu sein. Ein weiteres Derivat, das 2-Imino-5-L-(carboxy-L-threoninyl)-pyrrolidin (Abbildung 68), stellt strukturell ein mit einer Threonin-Einheit verestertes ADPC dar. Diese Verbindung wurde aus einem pflanzenpathogenen Bakterium, *Burkholderia plantarii*, isoliert (Mitchell und Teh 2005). Zwar zeigt diese Substanz keine bioaktive Wirkung, sie wurde jedoch zusammen mit zwei strukturell verwandten Substanzen isoliert, die bakterielles Wachstum inhibieren (2-Imino-3-methylen-5-L-(carboxyl-L-valyl)-pyrrolidin bzw. 2-imino-3-methylen-5-L-(carboxyl-L-threoninyl)-pyrrolidin).

Über die Biosynthese der genannten dem ADPC strukturell verwandten Substanzen ist nach bisherigem Kenntnisstand nichts bekannt. Bedenkt man die Rolle der Ectoin-Synthase an der ADPC-Produktion bzw. -Hydrolyse in *H. elongata* wäre eine Beteiligung verwandter Enzyme an der Biosynthese bzw. dem Abbau der genannten Sekundärmetabolite denkbar. Hierbei muss man bedenken, dass viele Proteine in Datenbanken allein aufgrund von Sequenzähnlichkeiten annotiert werden, ein Funktionsnachweis also in vielen Fällen noch nicht erfolgt ist. Es kann also spekuliert werden, dass viele als Ectoin-Synthase annotierte Proteinsequenzen möglicherweise in einem anderen Zusammenhang betrachtet werden sollten. Dies könnte insbesondere dann zutreffen, wenn das als Ectoin-Synthase annotierte Gen singulär, also ohne

die weiteren Gene des Ectoin-Clusters, im Genom vorliegt und der entsprechende Organismus zudem weder für Ectoin-Synthese, noch für eine erhöhte Stresstoleranz bekannt ist. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass Bakterien mit solitären *ectC*-Genen meist pflanzenassoziiert anzutreffen sind (Willée 2010; Kurz *et al.* 2010), auch in der Familie der *Burkholderiaceae*, aus der bereits ADPC-verwandte Strukturen publiziert sind (s.o., Mitchell und Teh 2005). Derivatisierungen, wie z. B. die Veresterung mit Threonin (vgl. Abbildung 68), würden zudem das prognostizierte Gleichgewicht der durch EctC katalysierten Reaktion (vgl. III.5.4.2.1) verschieben, so dass eine effektivere Bereitstellung der ADPC-Grundstruktur möglich wäre.

4 Halomonas als Expressionssystem

Für die heterologe Expression von Proteinen, sowohl prokaryotischen als auch eukaryotischen Ursprungs, werden derzeit verschiedenste Expressionssysteme gehandelt. Bakterielle Expressionssysteme kombinieren meist ein schnelles Wachstum mit einer hohen Proteinausbeute, und unter ihnen ist das Bakterium *E. coli* in Kombination mit verschiedenen Vektoren sicherlich das am häufigsten eingesetzte. Die Gruppe der pET-Vektoren mit dem starken T7-Promotor beispielsweise erlaubt eine rekombinante Proteinexpression mit hohen Ausbeuten und wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls erfolgreich eingesetzt (vgl. III.4.2.1).

Gerade in Systemen mit einer solch hohen Transkriptions- und Translationsleistung kann es jedoch häufig zu Problemen kommen, etwa wenn es zu Fehlfaltungen des Fremdproteins kommt und dieses daraufhin zu sogenannten *inclusion bodies* aggregiert. Zusätzliche Probleme können aber auch auftreten, wenn das zu exprimierende Protein aufgrund des intrazellulären Milieus des Wirtsorganismus nicht nativ gefaltet wird und dadurch unlöslich aggregiert. Die Modifizierung bestehender Expressionssysteme bzw. die Entwicklung neuartiger Expressionssysteme ist dadurch in der aktuellen Forschung ein großes Thema.

Eine Richtung, die hierbei verfolgt wird, ist der Einsatz von kompatiblen Soluten während der Kultivierung bestehender Expressionssysteme, um durch den Zusatz dieser Proteinstabilisatoren und Faltungshelfer den Anteil an löslichem Expressionsprodukt zu erhöhen (Barth *et al.* 2000). So sollen z. B. *E. coli*-Zellen durch die Aufnahme kompatibler Solute aus dem Medium ein periplasmatisches oder auch intrazelluläres Milieu erhalten, das die native Faltung rekombinanter Proteine fördert.

Eine andere Option, die derzeit in den Focus der Forschung rückt, ist der Einsatz von halophilen Mikroorganismen als Expressionssystem. Hierdurch erhofft man sich eine erhöhte Effizienz bei der Expression rekombinanter Proteine, da kompatible Solute in Halophilen bereits Bestandteil des cytoplasmatischen Milieus sind und somit nicht von außen kostenintensiv zugegeben werden müssen. Zudem ist das Spektrum halophiler Bakterien, deren Kultivierung gut untersucht und ohne großen Aufwand zu betreiben ist, in den letzten Jahren stark gewachsen, wobei sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Organismen zur Verfügung stehen. Limitierend ist hier derzeit jedoch noch die Auswahl an verfügbaren und geeigneten Expressionsvektoren (Tokunaga *et al.* 2010b).

Bereits 1995 wurde ausgehend von einem kryptischen Plasmid aus *Chromohalobacter* (damals noch bezeichnet als *H. elongata* ATCC 33174) ein Klonierungsvektor für den Einsatz in moderat halophilen *Chromohalobacter*-Stämmen entwickelt (Vargas *et al.* 1995; Vargas *et al.* 1999; Vargas und Nieto 2004; Afendra *et al.* 2004). Mit Hilfe dieses Vektors konnte z. B. erstmals ein archaeales Protein (α -Amylase aus *Pyrococcus woesei*) in einem moderat Halophilen exprimiert werden (Frillingos *et al.* 2000). Auf diese Arbeit aufbauend konnte der Einsatz von *C. salexigens* als moderat halophiles Expressionssystem für verschiedene Proteine, die in *E. coli* zur Aggregation neigen, erfolgreich gezeigt werden (Nagayoshi *et al.* 2009; Nagayoshi *et al.* 2006; Tokunaga *et al.* 2010b). Ausschlaggebend hierfür war unter anderem die Isolierung eines geeigneten Promotorbereichs, wobei gute Ergebnisse mit einem konstitutiven Porin-Promotor erzielt wurden (Nagayoshi *et al.* 2006).

Für den Einsatz in *H. elongata* wurde in vorangegangenen Arbeiten die Eignung des Vektors pBBR1-MCS gezeigt (Schnoor 2001; Burdziak 2004). Dieses Derivat des Broad-Host-Range-Vektors pBBR1 (Antoine und Locht 1992) wurde im Weiteren mit der in *H. elongata* vor dem Ectoin-Gencluster liegenden Promotorregion *promA* versehen, wodurch der Vektor pPromEct (pPE) entstand (Brünig 2005). Die vektorbasierte Expression von verschiedenen Proteinen in *H. elongata* unter Kontrolle dieses salzinduzierten Promotorbereichs konnte darauf folgend mehrfach gezeigt werden (Brünig 2005; Meffert 2007; Lange 2009), jedoch war die Expressionsrate bei Verwendung dieses Promotors sehr gering (Brünig 2005).

Der Einsatz moderat halophiler Mikroorganismen für die rekombinante Proteinexpression ist somit ein vielversprechendes Forschungsgebiet, und die Suche nach geeigneten Promotoren, die mit dem in *E. coli* etablierten strikt regulierten T7-System konkurrieren können, bietet Raum

zur Optimierung. In diesem Kontext sollten im Folgenden die mit dem Vektor pWUB erzielten Daten betrachtet werden.

4.1 Der Vektor pWUB

Der Vektor pWUB wurde analog zu dem bereits zuvor beschriebenen Vektor pPromEct (Brüning 2005) als Derivat des Broad-Host-range Vektors pBBR1-MCS konstruiert. Anstelle der aus *H. elongata* WT stammenden Ectoin-Promotorregion *promA* wurde in diesen Vektor die aus *H. elongata* KB1 stammende analoge Promotorregion *promKB1* inseriert (vgl. III6.2).

Im Vergleich der Expressionsniveaus der Vektoren pPromEct und pWUB zeigte sich eine deutlich verstärkte Expression mit dem Vektor pWUB (vgl. III6.3.1.1). Wie schon unter IV2 beschrieben können hierfür unterschiedliche Effekte verantwortlich sein. Zum einen ist eine Beeinflussung der Transkription durch die bereits beschriebene Punktmutation innerhalb der -35-Region eines putativen osmoregulierten σ^{38} -Promotors denkbar (Grammann 2000; Schwibbert *et al.* 2010). Der Vergleich der Vektoren pPromEct und pWUB zeigt jedoch auch einen möglichen Effekt auf Translationsebene, denn in der Promotorregion *promKB1* von pWUB liegt eine Ribosomenbindestelle, die mit AGGAGGT exakt der Konsensus-Sequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz entspricht (Shine und Dalgarno 1974). Ein erhöhtes Expressionsniveau aufgrund einer durch optimierte Ribosomenbindung verstärkten Translation könnte somit auch möglich sein. Hierbei könnte neben der Sequenz der Ribosomenbindestelle auch deren Abstand zum Startcodon eine Rolle spielen. Die Promotorregion *promKB1* weist zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz und dem Startcodon mit nur 5 Basenpaaren einen deutlich kürzeren Spacer auf als die *promA*-Region mit 8 Basenpaaren.

Da eine Veränderung der Promotorsequenz weg von der Konsensus-Sequenz bislang nur mit einer Herabsetzung der Transkription in Verbindung gebracht wurde (Lee und Gralla 2004) und die Transkription ausgehend von dem beschriebenen σ^{70} -Promotor zudem unverändert erfolgen sollte, wird ein translationaler Effekt an dieser Stelle als wahrscheinlicher angesehen. Weiterführende Transkriptions- und Expressionsstudien könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Der Vergleich der Vektoren pPromEct und pWUB macht deutlich, dass durch die in *promKB1* auftretenden Sequenzabweichungen eine ausgeprägte Verstärkung des Expressionsniveaus erzielt werden konnte. Der neue Vektor pWUB bietet somit die Möglichkeit der Proteinüberexpression in *H. elongata* und stellt dadurch ein wichtiges Werkzeug für die

IV Diskussion

Etablierung dieses Organismus als Expressionssystem dar. Wie im Folgenden näher diskutiert, wurde der Vektor bereits erfolgreich für verschiedene homologe und heterologe Expressionen in *H. elongata* eingesetzt. Zusätzlich wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Grün 2011) durch Expression des Reportergens *gfp_{uv}* Promotorstudien mit dem pWUB-Vektor durchgeführt. Ähnliche Experimente wurden bereits zuvor in *E. coli* zur Untersuchung des Ectoin-Promotors aus *Marinococcus halophilus* durchgeführt (Bestvater und Galinski 2002). Hier konnte durch Messung der GFP_{UV}-Fluoreszenz die Induktion des Promotors durch osmotischen Stress sowie eine Hemmung der Promotoraktivität durch die kompatiblen Solute Betain und Ectoin gezeigt werden. Die vergleichende GFP_{UV}-Expression in *H. elongata* mittels der Vektoren pPromEct und pWUB durch A. Grün bestätigte zum einen, dass die Promotorregion *promKB1* deutlich stärkere Expressionslevel erlaubt als die Region *promA* (vgl. Abbildung 69) und dass zudem auch der optimierte Promotor weiterhin durch osmotischen Stress induzierbar ist (Grün 2011). Zum anderen gibt die erwähnte Arbeit ebenfalls Hinweise auf einen hemmenden Effekt der kompatiblen Solute Betain, Ectoin und Hydroxyectoin (Grün 2011).

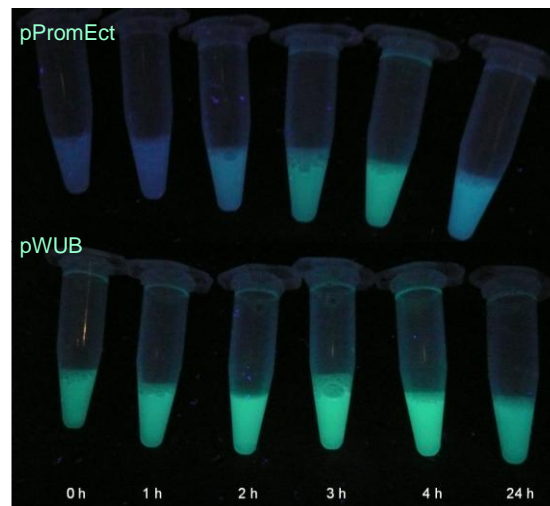


Abbildung 69: Vergleich der Vektoren pPromEct und pWUB mittels *gfp_{uv}* als Reportergen (Grün 2011)

Das Gen *gfp_{uv}* wurde unter Kontrolle des Promotors *promA* (Vektor pPromEct) bzw. *promKB1* (Vektor pWUB) in *H. elongata* exprimiert. In der Abbildung zu sehen sind Zell-Lysate unter der UV-Lampe bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm. Die Anzucht erfolgte in AB-5-Medium, zum Zeitpunkt $t = 0$ h erfolgte ein Salzschock auf 15 % NaCl zur Induktion einer stärkeren Expression.

Auch wenn weiterführende Promotorstudien und Expressionsstudien mit Reportergenen wie z. B. *gfp_{uv}* an dieser Stelle noch ausstehen, unterstützen diese ersten Daten die weitere Verwendung des Vektors pWUB. Eine Induktion der Expression durch externen Salzstress sowie die Möglichkeit der Repression durch Zusatz von kompatiblen Soluten bietet eine Form der

Regulation, wie sie für Promotoren im Einsatz in halophilen Expressionssystemen derzeit gesucht wird (Tokunaga *et al.* 2010a, Tokunaga *et al.* 2010b).

4.1.1 Homologe Expression in *H. elongata* mit pWUB

4.1.1.1 EctC-Expression

Die aus *H. elongata* stammende Ectoin-Synthase EctC diente als erstes Test-Protein für die Nutzung des pWUB-Vektors, und wie mittels SDS-PAGE deutlich gezeigt werden konnte lässt sich dieses Enzym in *H. elongata* WUB01 ($\Delta ectC$) mit dem Vektor pWUB_ectC_Hel sehr gut löslich überexprimieren und erreicht Expressionsniveaus, die mit dem pET-System in *E. coli* vergleichbar sind (vgl. III4.2.1). Diese Daten wurden in den direkten Vergleich zu dem Vektor pPromEct_ectC_Hel gesetzt, wodurch die Stärke des *promKB1*-Promotorbereichs sehr gut sichtbar gemacht werden konnte, da unter identischen Bedingungen mit dem auf *promA* beruhenden pPromEct-Vektor kaum Expressionsprodukt nachweisbar war (vgl. III6.3.1.1).

Diese EctC-Überexpression diente jedoch nicht nur dem Nachweis der Vektor-Funktionalität sondern konnte auch für die Untersuchung der ADPC-Produktion in *H. elongata* genutzt werden (vgl. III7.1.1). Durch Einbringen des Vektors pWUB_ectC_Hel in die Deletionsmutante *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$) wurde der mit ca. 30 mg/g TG bei 3 % Mediensalinität derzeit stärkste ADPC-Produzent konstruiert (vgl. Tabelle 11, Ganser 2010). Dadurch wurde bestätigt, dass die Enzymmenge tatsächlich ausschlaggebend für die Stärke der ADPC-Produktion ist.

4.1.1.2 EctD-Expression

Die Ectoin-Hydroxylase EctD diente als weiteres Testprotein. Der Vektor pWUB_ectD_Hel wurde konstruiert und zunächst mit dem analogen pPromEct_ectD-Vektor (Meffert 2011) verglichen. Im Fall der Hydroxylase erfolgte die Analyse der Expressionsstärke über den Nachweis der Enzymaktivität, jedoch konnte Meffert im Stamm *H. elongata* pWUB_ectD_Hel auch eine deutliche EctD-Expression mittels SDS-PAGE nachweisen (Meffert 2011).

In *H. elongata* WT ist Ectoin das vorherrschende kompatible Solut, bei Kombination von Salz- und Hitzestress kann der Anteil an Hydroxyectoin jedoch deutlich ansteigen, bis zu einem Verhältnis von ca. 1:1 (Ures 2005). Wie bereits zuvor gezeigt (Meffert 2011), wird der Anteil an Hydroxyectoin in den Zellen durch eine zusätzliche EctD-Expression basierend auf dem schwachen Expressionsvektor pPromEct nicht wesentlich erhöht. Dies konnte auch im Rahmen

dieser Arbeit bestätigt werden (vgl. III6.3.2.1). Eine auf dem optimierten pWUB-Vektor basierende EctD-Expression führte bereits bei einer relativ niedrigen Temperatur von 37 °C zu einer Verschiebung des Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnisses auf Seite der hydroxylierten Form (vgl. Abbildung 44). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass das Expressionsniveau auch im Fall von EctD als Testprotein bei Verwendung des pWUB-Vektors deutlich höher ist als bei Verwendung des pPromEct-Vektors.

Weiterführend wurde untersucht, ob sich die Hydroxyectoin-Produktion in *H. elongata* pWUB_ectD_Hel durch Variation der Kulturbedingungen weiter optimieren lässt. Die Anzucht unter steigenden Salzkonzentrationen im Bereich zwischen 7 % und 20 % NaCl führte bei allen getesteten Salzkonzentrationen zu einem den Ectoingehalt übersteigenden Hydroxyectoin-Anteil in den Zellen. Der höchste Hydroxyectoin-Anteil mit ca. 75 % des Gesamtectoin-Gehalts wurde bei 20 % NaCl erzielt. Dies ist unter Berücksichtigung der Kultivierungstemperatur von nur 30 °C bemerkenswert, da *H. elongata* WT selbst bei einer erhöhten Temperatur von 37 °C bei 20 % NaCl lediglich ca. 40 % Hydroxyectoin produziert (Ures 2005).

Da aus vorangegangenen Arbeiten (Ures 2005, Meffert 2011) bekannt war, dass eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur für die Hydroxyectoin-Produktion in *H. elongata* WT unabdingbar ist, wurde der Stamm *H. elongata* pWUB_ectD_Hel bei 10 % NaCl mit steigender Kultivierungstemperatur angezogen. Hierbei lag die höchste Temperatur, bei der *H. elongata* (sowohl WT als auch der Plasmid-tragende Stamm) kultiviert werden konnte, bei 45 °C. Der Einfluss von Hitzestress auf die Hydroxyectoin-Produktion konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Während der Hydroxyectoin-Anteil am Gesamtectoin-Gehalt bei 30 °C noch bei ca. 70 % lag, stieg er auf bis zu 95 % bei einer Temperatur von 45 °C an (vgl. Abbildung 46). Im Vergleich erreichte der Wildtyp-Stamm *H. elongata* bei 45 °C einen Hydroxyectoin-Anteil von ca. 70 %. Doch auch bei einer Temperatur von 40 – 42 °C, bei der noch gutes Wachstum des Organismus möglich ist, konnte im Plasmid-tragenden Stamm bereits ein Hydroxyectoin-Anteil von ca. 85 - 90 % erreicht werden (vgl. Abbildung 46), während der Wildtypstamm lediglich 25 - 45 % Hydroxyectoin produzierte (Ures 2005).

Bei der industriellen Hydroxyectoin-Produktion wird derzeit *H. elongata* WT verwendet und unter Hitzestressbedingungen ein Ectoin/Hydroxyectoin-Verhältnis von etwa 1:1 erzielt (Meffert 2011). Dies zieht anschließende chromatographische Reinigungsschritte nach sich, die aufwändig und kostenintensiv sind, weshalb die Suche nach einem Stamm, der im besten Fall

IV Diskussion

reines Hydroxyectoin produziert, nicht nur von akademischem Interesse ist. Die oben beschriebenen Daten stellen mit *H. elongata* pWUB_ectD_Hel einen interessanten Kandidaten vor. Da diese Daten jedoch aus Experimenten im kleinen Maßstab erhalten wurden (100 mL-Kultur) sollte abschließend überprüft werden, ob der Stamm auch für die Produktion im größeren Maßstab (Fermenter) geeignet ist.

Unter den für die Fermentationen gewählten Bedingungen (10 % NaCl, 40 °C) war im 100 mL-Schüttelkolben ein Hydroxyectoin-Anteil von ca. 90 % nachgewiesen worden (vgl. III6.3.2.1). Dieser Wert konnte im 15 L-Maßstab der ersten Fermentation nicht erreicht werden, lag hier der Hydroxyectoin-Anteil im Zellmaterial doch lediglich bei ca. 50 % zum Zeitpunkt der Ernte der Kultur (vgl. III6.3.2.2). Als limitierender Faktor konnte Sauerstoff identifiziert werden, denn durch eine optimierte Sauerstoffversorgung während der zweiten Fermentation wurde der Hydroxyectoin-Anteil auf ca. 80 % erhöht (vgl. III6.3.2.2). Zudem konnte auch über Verlaufspuren ein direkter Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck im Medium und Hydroxyectoin-Gehalt in den Zellen festgestellt werden. Die Rolle des Sauerstoffs ergibt sich aus der Reaktionsgleichung der Ectoin-Hydroxylase. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase, die je ein Sauerstoffatom aus dem O₂-Molekül auf Ectoin und das Co-Substrat α -Ketoglutarat überträgt (Ures 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Expressionsvektors pWUB gezeigt werden, dass der Umfang der Ectoin-Hydroxylierung in *H. elongata* in großem Maße nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Menge des Enzyms Ectoin-Hydroxylase bestimmt wird. Zudem wurde Sauerstoff als wichtiger limitierender Faktor identifiziert, so dass für zukünftige Hydroxylierungsversuche im großen Maßstab eine Optimierung der Sauerstoffzufuhr in die Kultur angeraten wird. Die Beobachtung, dass bereits bei niedrigen Temperaturen (30 °C bzw. 37 °C) hohe Hydroxyectoin-Gehalte erreicht werden können, ist aber auch für die Grundlagenforschung interessant. Die vorliegenden Daten sprechen gegen einen effektiven Hydroxyectoin-Abbauweg als Grund für niedrige Hydroxyectoin-Gehalte unter diesen Bedingungen, da durch Erhöhung der Hydroxylase-Konzentration hohe Hydroxyectoin-Gehalte problemlos erzielt werden konnten. Zudem zeigen die Fermentationen, dass auch in der stationären Phase, also unter C-Quellen-Mangel, Ectoin-Hydroxylierung stattfindet. Bislang wurde die Ectoin-Hydroxylierung hauptsächlich der exponentiellen Wachstumsphase

zugeschrieben, da aufgrund der α -Ketoglutarat-Abhängigkeit des Enzyms ein aktiver Zellstoffwechsel als Voraussetzung galt (Reuter *et al.* 2010).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene homologe EctD-Expression in *H. elongata* stellt nicht den ersten Versuch der Plasmid-kodierten Hydroxyectoin-Produktion dar. Bereits 2004 wurde in *Chromohalobacter salexigens* (ehemals *H. elongata* DSM 3043) das für eine Ectoin-Hydroxylase kodierende Gen *thpD* aus *Streptomyces chrysomallus* exprimiert und dadurch die Hydroxyectoin-Produktion des Wirtsorganismus temperaturabhängig bis zu einer 100 %igen Hydroxylierung gesteigert (Prabhu *et al.* 2004). Hierbei wurde jedoch nicht die Solutzusammensetzung des Zellmaterials analysiert sondern das Medium nach einem hypoosmotischen Schock, so dass ein direkter Vergleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit nicht gezogen werden kann. Prabhu exprimiert das Gen *thpD* unter Kontrolle des *ectA*-Promotors aus *C. salexigens*, der über vier Transkriptionsstartpunkte verfügt (Calderón *et al.* 2004), während der in der vorliegenden Arbeit verwendete modifizierte *ectA*-Promotor aus *H. elongata* nur zwei bekannte Transkriptionsstartpunkte beinhaltet (Schwibbert *et al.* 2010; vgl. Abbildung 66). Somit ist an dieser Stelle nicht eindeutig feststellbar, ob die stärkere Hydroxylierungseffizienz des von Prabhu vorgestellten Systems im Vergleich zum pWUB-System auf den anderen Wirtsorganismus (*C. salexigens*), die andere Hydroxylase (*thpD* aus *S. chrysomallus*), einen stärkeren Promotor, eine variierende Kopienzahl des verwendeten Vektors (Kombination eines pUC-Derivats mit dem aus *C. salexigens* stammenden Vektor pHE1) oder auch nur auf eine differierende Messmethode zurückzuführen ist.

4.1.2 Heterologe Expression in *H. elongata* mit pWUB

Moderat halophile Mikroorganismen als Expressionssysteme stehen derzeit im Focus der Forschung, da man sich von der intrazellulären Akkumulation kompatibler Solute eine Stabilisierung und verbesserte Faltung der Expressionsprodukte erhofft (Tokunaga *et al.* 2010b). Insbesondere Proteine, die bei heterologer Expression in *E. coli* zu Aggregation und Bildung von *inclusion bodies* neigen, sind somit geeignete Kandidaten für Test-Expressionen in moderat Halophilen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine heterologe Expression eines solchen „Problemproteins“ mit Hilfe des neuen Expressions-Vektors pWUB in *H. elongata* durchgeführt. Das Protein EctC aus *Pseudomonas syringae* wurde bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Seip 2009) untersucht. Es handelt sich um eine putative Ectoin-Synthase, die im

IV Diskussion

Genom singular, also ohne die üblicherweise begleitenden Enzyme der Ectoin-Biosynthese, vorliegt. Die Expression in *E. coli* mittels pET-System führte zur Aggregation des Expressionsproduktes in *inclusion bodies*, eine Aktivität des derart exprimierten Enzyms konnte nicht nachgewiesen werden (Seip 2009).

Für die heterologe Expression in *H. elongata* in Hinblick auf Überexpression und Reinigung von Fremdproteinen wurde der Vektor pWUB durch eine His₆-tag-Region erweitert, und das Gen für die oben beschriebene putative Ectoin-Synthase derart in den Vektor kloniert, dass eine Expression unter Kontrolle der *promKB1*-Promotorregion als His₆-Fusionsprotein (EctC_Psyr_His) ermöglicht wurde (vgl. III.6.4.2). Die Expression wurde in *H. elongata* WT durchgeführt und tatsächlich konnte das Expressionsprodukt in der löslichen Proteinfraction in hohen Mengen nachgewiesen werden. Eine Isolierung des Proteins vom Gesamtzellprotein unter Ausnutzung der fusionierten His₆-tag-Region konnte ebenfalls gezeigt werden, wenngleich die Reinheit des Proteins durch zwei *H. elongata*-eigene Proteinkontaminanten reduziert wurde. Dies weist darauf hin, dass dieser Fusions-tag nicht die geeignete Wahl für Proteinisolierungen aus *H. elongata* ist. Offensichtlich werden hier Wirts-eigene Proteine mit isoliert, so dass als weiterführende Optimierung des Expressionssystems an dieser Stelle die Verwendung eines spezifischeren Fusions-tags, wie beispielsweise des *Strep*-tags, empfohlen wird.

Das beschriebene Enzym EctC_Psyr_His ist ein erstes Beispiel für eine gelungene Expression eines in *E. coli* aggregierenden Proteins in *H. elongata* unter Nutzung des Vektors pWUB. Zusätzlich zu den hier beschriebenen Daten wurde kürzlich auch die Ectoin-Synthase-Aktivität dieses Enzyms durch Expression in der aus der vorliegenden Arbeit stammenden Mutante *H. elongata* WUB01 (Δ ectC) nachgewiesen (Kurz *et al.* 2010). Um genauere Aussagen zur Eignung von *H. elongata* als Expressionssystem für „Problempoteine“ treffen zu können, müssen in Zukunft sicherlich weitere Testexpressionen mit weiteren Proteinen durchgeführt werden. Im vorliegenden Fall wurde mit einer Ectoin-Synthase ein Protein gewählt, dass im Biosynthese-Apparat von *H. elongata* bereits bekannt ist. Für weiterführende Experimente wären Proteine eukaryotischen Ursprungs interessant, beispielsweise humane Proteine, wie sie bereits erfolgreich in *Chromohalobacter salexigens* exprimiert wurden (Nagayoshi *et al.* 2009; Nagayoshi *et al.* 2006).

V Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Ectoin-Synthase ein lohnendes Objekt zukünftiger Forschung und es wäre sinnvoll dieses Enzym in nachfolgenden Studien weiter zu charakterisieren. Die Strukturaufklärung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit begonnen und es konnte gezeigt werden, dass eine Kristallisation des Proteins durch den flexiblen C-Terminus behindert wird. Die Gewinnung erster Kristalle einer C-terminal verkürzten EctC-Version sollte Anlass sein, auf diesem Gebiet weiter zu arbeiten und z. B. die Kristallisation weniger stark verkürzter EctC-Versionen zu versuchen. Denkbar wäre, dass die schlechte Qualität der bislang erhaltenen Kristalle auf eine zu drastische Verkürzung des C-Terminus und eine damit einhergehende Destabilisierung des Proteins zurückzuführen ist.

Gleichzeitig können diese C-terminal unterschiedlich stark verkürzten EctC-Varianten aber nicht nur der Strukturaufklärung dienen, sondern auch in Enzymassays eingesetzt werden, um eine mögliche regulatorische Rolle des flexiblen C-Terminus aufzuklären. Erste Daten aus der vorliegenden Arbeit deuten auf eine potentielle Rolle in der osmotischen Regulation des Enzyms hin. Es wäre interessant dies mit verschiedenen EctC-Versionen zu bestätigen und die beteiligten Aminosäurereste zu identifizieren. Zudem sollte nicht nur die Reaktion der verkürzten Versionen auf variable Salzkonzentrationen untersucht werden, sondern auch der pH-Wert variiert werden, da das Vorliegen saurer Aminosäuren im C-Terminus auch auf eine pH-Abhängigkeit hindeutet.

Die erstmals gezeigte Reversibilität der Ectoin-Synthase macht deutlich, dass die Frage nach dem Substratspektrum des Enzyms noch bei weitem nicht abschließend geklärt wurde. So sollte im Anschluss an die vorliegende Arbeit untersucht werden, ob sich weitere zyklische Substrate für eine Hydrolyse-Reaktion finden lassen oder das Enzym genutzt werden kann, um neue zyklische Solute zu generieren, wobei z. B. neuartige Schwefel-haltige Verbindungen interessant sein könnten. In diesem Zusammenhang schließt sich auch die Frage an, ob die gezeigte Reversibilität auch natürlich eine Rolle im bakteriellen (Sekundärmetabolit-) Stoffwechsel spielt oder lediglich ein Artefakt der *in vitro*-Assays darstellt. Aus diesem Grund ist die Charakterisierung von Enzymen, die als Ectoin-Synthase annotiert aber singulär ohne die weiteren Enzyme des Ectoin-Biosyntheseclusters vorliegen, von großem Interesse.

V Ausblick

Für die biotechnologische Produktion des neuen kompatiblen Solut ADPC stellt die Reversibilität der Ectoin-Synthase einen Nachteil dar, da durch die Einstellung eines Reaktionsgleichgewichtes auf Seiten der Vorstufe Glutamin eine effektive Umsetzung behindert wird. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigten protektiven Eigenschaften des ADPC zeigen jedoch, dass es sich lohnt an der ADPC-Produktion und der nachfolgenden Produktgewinnung weiterzuarbeiten. Hier sollte zunächst geklärt werden, wodurch die Stationärphasen-Abhängigkeit der ADPC-Akkumulation in *H. elongata* ausgelöst wird. Es bietet sich an, in dieser Hinsicht das Transportsystem TeaABC näher zu untersuchen, da dieses einen potentiellen Kandidaten für einen energieabhängigen ADPC-Transporter darstellt. Aus einer vorangegangenen Arbeit (Grammann 2004) liegen bereits TeaABC-Deletionsmutanten von *H. elongata* vor, mit *H. elongata* KB1-4-1-1 ($\Delta ectA$, $\Delta teaABC$) auch eine Transportermutante, die aufgrund der *ectA*-Deletion wie auch *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$) zur ADPC-Synthese befähigt ist. Untersuchungen zur ADPC-Produktion dieser Transportermutante sollten Aufschluss über eine mögliche Beteiligung des TeaABC-Transporters an der ADPC-Akkumulation und deren Stationärphasen-Abhängigkeit geben. Um die Frage zu klären, ob TeaABC tatsächlich als einziges Transportsystem für die Aufnahme von ADPC genutzt wird, wird jedoch ein *H. elongata*-Stamm benötigt, der neben einer Deletion des Transportsystems auch das *ectC*-Gen deletiert hat und somit kein ADPC mehr produziert.

Ein weiterer Ansatzpunkt, um die ADPC-Produktivität zu verbessern, könnte in der Erhöhung des Glutamin- oder Glutamatgehalts im Produktionsorganismus liegen. Aufgrund der Gleichgewichtseinstellung sollte mit steigender Glutaminkonzentration auch der ADPC-Gehalt ansteigen. Möglicherweise könnte in dieser Hinsicht ein anderer Organismus wie z. B. *Corynebacterium glutamicum*, der für die großtechnische Aminosäureproduktion genutzt wird, ebenfalls eine Alternative sein. Eine Optimierung der ADPC-Produktion wäre auch die Voraussetzung für die Produktion des hydroxylierten Derivates, das ein weiteres völlig neues potentielles kompatibles Solut darstellt und dessen Gewinnung und Charakterisierung noch ausstehen.

Mit der Entwicklung des Vektors pWUB zur effektiven Proteinexpression in *H. elongata* wurde in der vorliegenden Arbeit die Grundlage geschaffen, diesen halophilen Organismus als Expressionssystem zu nutzen. Solche halophilen Expressionssysteme bieten den Vorteil der Anwesenheit kompatibler Solute, die allgemein als förderlich für die Produktion nativer

Proteine und die Vermeidung von *inclusion bodies* angesehen werden (Tokunaga *et al.* 2010a, Tokunaga *et al.* 2010b). Aufbauend auf der vorliegenden Arbeit sollten nachfolgend weitere Optimierungen an dem pWUB-Vektor vorgenommen werden, wie z. B. die Verwendung eines *Strep*[®]-tags anstelle des His₆-tags für die Proteingewinnung aus *H. elongata*. Ein weiteres bislang nicht erreichtes Ziel ist die Transformation von *H. elongata*. Derzeit ist es noch nicht gelungen, einem halophilen Organismus die Kompetenz zur DNA-Aufnahme zu vermitteln. Der konjugative Transfer von Plasmid-DNA stellt jedoch einen Zeitfaktor dar, der für die Etablierung eines effektiven Expressionssystems hinderlich ist.

Der dem pWUB-Vektor zugrunde liegende Promotorbereich *promA* der Ectoin-Biosynthese aus *H. elongata* stellt ein weiteres Thema für zukünftige Forschungen dar. Zunächst einmal sollte abschließend geklärt werden, ob die mit dem Vektor pWUB erreichte Verbesserung der Expressionsrate auf Ebene der Transkription, also durch die Mutation im σ^{38} -Promotor, oder auf Ebene der Translation, also durch die optimierte Ribosomenbindestelle, erreicht wurde. Hierzu würde es sich anbieten, die im *promA*-Bereich liegenden Promotorelemente des σ^{38} - und des σ^{70} -Typs getrennt voneinander zu betrachten, jeweils mit der ursprünglichen und der optimierten Ribosomenbindestelle. Diese Untersuchungen sollten auch in Hinblick auf ein besseres Verständnis der Regulation der Ectoin-Biosynthese erfolgen. Bislang ist wenig über die Regulation osmotisch induzierter Promotoren bekannt, ebenso wurden Untersuchungen zu bevorzugten RBS-Sequenzen bislang nahezu ausschließlich in *E. coli* durchgeführt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten sollten deshalb in nachfolgenden Transkriptions- und Expressionsstudien, z. B. mit *gfp_{UV}* als Reporter gen, vertieft werden.

VI Zusammenfassung

Das für die Ectoin-Synthase codierende Gen *ectC* konnte erfolgreich im Genom von *H. elongata* deletiert werden. Dadurch wurden zwei neue *H. elongata*-Stämme generiert: *H. elongata* WUB01 ($\Delta ectC$) und WUB02 ($\Delta ectA, \Delta ectC$). In *H. elongata* WUB01 führte die *ectC*-Deletion zu einem Verlust der Fähigkeit zur Ectoin-Biosynthese und einer Akkumulation der Ectoin-Vorstufe Ny-Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure (ADABA). Die Mutante *H. elongata* WUB02 zeigte einen Verlust der Fähigkeit zur ADPC-Synthese, die für die Mutante *H. elongata* KB1 ($\Delta ectA$) zuvor beschrieben worden war (Witt 2005). Hierdurch wurde die Beteiligung der Ectoin-Synthase an der ADPC-Biosynthese in *H. elongata* bewiesen.

Die genomische Deletionsmutante *H. elongata* WUB01 ($\Delta ectC$) wurde als Produktionsstamm für die Ectoin-Vorstufe Ny-Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure (ADABA) etabliert. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Produktgewinnungsverfahren umfasst eine Zellextraktion mittels 80 %igem Ethanol sowie eine Reinigung über Anionenaustausch- und Ionenverzögerungs-Chromatographie.

Als zentrales Thema der vorliegenden Arbeit wurde die Ectoin-Synthase aus *H. elongata* näher charakterisiert. Hierzu wurde das Protein erfolgreich heterolog in *E. coli* überexprimiert, wozu ein auf dem pET-Vektorsystem basierendes Expressionssystem konstruiert wurde. Für *in vitro*-Experimente konnte die Ectoin-Synthase sowohl nativ über hydrophobe Interaktionschromatographie als auch C-terminal mit einem His₆-tag versehen über Ni-NTA-Affinitätschromatographie funktionell isoliert werden. Die Verwendung eines N-terminalen *Strep*-tags führte zu einem inaktiven Produkt, was auf eine strukturelle und/oder katalytische Bedeutung des N-Terminus hindeutet.

Durch verschiedene Methoden wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Aufklärung der Struktur des EctC-Proteins begonnen. Mittels Gelfiltration wurde das Protein als putatives Homodimer dargestellt. In Kooperation mit der AG Rice (Sheffield, UK) konnte über ¹⁵N-NMR-Spektroskopie ein flexibler C-Terminus aus ca. 10 Aminosäureresten identifiziert werden, der sich als hinderlich für die Proteinkristallisation herausstellte. Durch Expression unterschiedlicher C-terminal verkürzter EctC-Varianten konnten zum einen erste Proteinkristalle erzielt werden, zum anderen wurden auch erste Hinweise auf eine regulatorische Bedeutung des C-Terminus für die Enzymaktivität gewonnen.

VI Zusammenfassung

Bezüglich der Enzymaktivität konnte ein pH-Optimum im Alkalischen (pH 8,5-9,0) festgestellt werden sowie eine optimale Salzkonzentration von etwa 0,5 M NaCl im Reaktionspuffer. Bei Verwendung von KCl wurde eine leichte Verschiebung des Salzoptimums in den Bereich 0,7-1,0 M festgestellt.

Durch *in vitro*-Untersuchungen der Ectoin-Synthase aus *H. elongata* konnten neue Erkenntnisse zum Substratspektrum des Enzyms gewonnen werden. Neben dem natürlichen Substrat N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure wurde die Umsetzung von Glutamin im Rahmen einer Kondensationsreaktion bestätigt. Erstmals wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Reversibilität der EctC-katalysierten Reaktion nachgewiesen, also die enzymatische Hydrolyse zyklischer Strukturen. Als Substrate einer solchen hydrolytischen Aktivität wurden ADPC, DHMICA und Homoectoin identifiziert.

Das neuentdeckte kompatible Solut ADPC als Produkt einer EctC-katalysierten Kondensation von Glutamin wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich seiner Biosynthese als auch seiner protektiven Eigenschaft näher charakterisiert. Hierzu wurden verschiedene Produktionsstämme (*H. elongata* & *E. coli*) generiert und miteinander verglichen, wobei ein klarer quantitativer Zusammenhang zwischen EctC-Expression und ADPC-Akkumulation festgestellt werden konnte. Zudem wurde gezeigt, dass der zellassoziierte ADPC-Gehalt in *H. elongata*-Stämmen in der stationären Phase deutlich ansteigt, was auf den Einfluss eines Energie-abhängigen Prozesses hindeutet. Die Charakterisierung des im Rahmen dieser Arbeit aus *H. elongata* KB1 gewonnenen ADPC lässt eine Zuordnung der Substanz in die Gruppe der kompatiblen Solute zu. Neben Verbesserung des mikrobiellen Wachstums unter osmotischem Stress sowie Schutz von Zellen unter Trockenstress konnte eine proteinstabilisierende Wirkung des ADPC gezeigt werden. Durch Hydroxylierung konnte ein weiteres Derivat dieses neuen Soluts generiert werden.

Durch Vergleich des Gesamtzellproteins verschiedener *H. elongata*-Stämme konnte eine verstärkte EctC-Expression in *H. elongata* KB1 nachgewiesen werden, die auf Veränderungen im Ectoin-Promotor *promA* durch die Deletion des *ectA*-Gens zurückzuführen und ursächlich für die erhöhte ADPC-Produktion in diesem *H. elongata*-Stamm ist. Die Verwendung dieses modifizierten Promotorbereichs in einem pBBR1-MCS-Derivat führte zu einem Vektor (pWUB), der erfolgreich für verschiedene homologe und heterologe Proteinüberexpressionen in *H. elongata* genutzt wurde.

Literaturverzeichnis

- Abe F, Horikoshi K (2001) The biotechnological potential of piezophiles. *Trends in Biotechnology* 19:102–108
- Afendra AS, Vargas C, Nieto JJ, Drainas C (2004) Gene transfer and expression of recombinant proteins in moderately halophilic bacteria. *Methods Mol. Biol.* 267:209–223
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410. doi:10.1006/jmbi.1990.9999
- Andersson MM, Breccia JD, Hatti-Kaul R (2000) Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32 (Pt 3):145–153
- Antoine R, Loch 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
- Arahal DR, Ludwig W, Schleifer KH, Ventosa A (2002) Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:241–249
- Arakawa T, Timasheff SN (1983) Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 224:169–177
- Arakawa T, Timasheff SN (1985) Mechanisms of poly(ethylene glycol) interaction with proteins. *Biochemistry* 24:6756–6762
- Argandoña M, Nieto JJ, Iglesias-Guerra F, Calderón MI, García-Esteva R, Vargas C (2010) Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3575–3589. doi:10.1128/AEM.03136-09
- Arora A, Ha C, Park CB (2004) Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Lett.* 564:121–125
- Barth S, Huhn M, Matthey B, Klimka A, Galinski EA, Engert A (2000) Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1572–1579
- Ben-Amotz A, Avron M (1973) The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic algae *Dunaliella parva*. *Plant physiology* 51:875–878
- Ben-Amotz A, Avron M (1983) Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:95–119
- Berger P, Barguelli F, Raoult D, Drancourt M (2007) An outbreak of *Halomonas phocaensis* sp. nov. bacteraemia in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 67:79–85
- Bersch S, Vangala M, Schwarz T, Kaufmann M (2000) Protection of antibodies against proteolytic degradation by compatible solutes. In: 2nd international conference on protein stabilization/biomolecule stabilization, Lissabon
- Bestvater T (2001) Regulation der Ectoin-Biosynthese-Gene in *Marinococcus halophilus* und bei rekombinanter Expression in *E. coli*. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Bestvater T, Galinski EA (2002) Investigation into a stress-inducible promoter region from *Marinococcus halophilus* using green fluorescent protein. *Extremophiles* 6:15–20
- Bestvater T, Louis P, Galinski EA (2008) Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Systems* 4:12. doi: 10.1186/1746-1448-4-12
- Betnér I, Földi P (1988) The FMOC-ADAM-approach to amino acid analysis. *LC-GC* 8:832–840
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911–917
- Borges N, Ramos A, Raven ND, Sharp RJ, Santos H (2002) Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles* 6:209–216

- Botta C, Di Giorgio C, Sabatier AS, Méo M de (2008) Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *J. Photochem. Photobiol. B* 91:24–34
- Bovell CR, Packer L, Helgerson R (1963) Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. *Biochimica et Biophysica Acta* 75:257–266
- Bowers KJ, Mesbah NM, Wiegel J (2009) Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems* 5:9
- Brown AD (1990) Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. John Wiley & Sons. Chichester, 313
- Brünig A (2005) Molekulargenetische und physiologische Studien zur Entwicklung eines Expressionssystems in *Halomonas elongata* DSMZ 2581^T. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Bünger J (1999) Ectoine added protection and care for the skin. *Eurocosmetics* 7:22–24
- Bünger J, Driller H (2004) Ectoine: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol. Physiol.* 17:232–237
- Burdziak A (2006) Entwicklung eines bakteriellen Stammes zur Produktion des kompatiblen Solutes Mannosylglycerat. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Burdziak D (2004) Untersuchungen zur Bedeutung des Gens *yhgl* für die Stressanpassung von *Halomonas elongata* DSM2581^T und *Escherichia coli* K-12. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Bursy J, Pierik AJ, Pica N, Bremer E (2007) Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 282:31147–31155. doi:10.1074/jbc.M704023200
- Calderón MI, Vargas C, Rojo F, Iglesias-Guerra F, Csonka LN, Ventosa A, Nieto JJ (2004) Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. *Microbiology* 150:3051–3063. doi:10.1099/mic.0.27122-0
- Cánovas D, Borges N, Vargas C, Ventosa A, Nieto JJ, Santos H (1999) Role of N γ -Acetyldiaminobutyrate as an Enzyme Stabilizer and an Intermediate in the Biosynthesis of Hydroxyectoine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:3774–3779
- Cánovas D, Vargas C, Iglesias-Guerra F, Csonka LN, Rhodes D, Ventosa A, Nieto JJ (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
- Castellanos L, Duque C, Zea S, Espada A, Rodriguez J, Jimenez C (2006) Isolation and Synthesis of (-)-(5S)-2-Imino-1-methylpyrrolidine-5-carboxylic Acid from *Cliona tenuis*. Structure Revision of Pyrostatins. *Organic letters* 8:4967–4970
- Dennis PP, Shimmin LC (1997) Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:90–104
- Dinnbier U, Limpinsel E, Schmid R, Bakker EP (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
- Dobson SJ, Franzmann PD (1996) Unification of the Genera *Deleya* (Baumann *et al.* 1983), *Halomonas* (Vreeland *et al.* 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the Species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a Single Genus, *Halomonas*, and Placement of the Genus *Zymobacter* in the Family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:550–558.
- Dötsch A, Severin J, Alt W, Galinski EA, Kreft J (2008) A mathematical model for growth and osmoregulation in halophilic bacteria. *Microbiology* 154:2956–2969
- Dunwell JM, Culham A, Carter CE, Sosa-Aguirre CR, Goodenough PW (2001) Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *TRENDS in Biochemical Sciences* 26:740–746
- Dunwell JM, Purvis A, Khuri S (2004) Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65:7–17
- Egler C (2004) Die Regulation der Ectoinbiosynthese in *Marinococcus halophilus* auf Proteinebene. Inaugural-Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

- Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist S (1983) Determination of amino acids with fluorenylmethylchloroformate and reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 282:609–618
- Espinosa-Urgel M, Chamizo C, Tormo A (1996) A consensus structure for sigma S-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 21:657–659
- Forward JA, Behrendt MC, Wyborn NR, Cross R, Kelly DJ (1997) TRAP transporter: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 179:5482–5493
- Fowden L (1972) Amino acid complement of plants. *Phytochemistry* 11:227–2271
- Franzmann PD, Wehmeyer U, Stackebrandt E (1988) *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class Proteobacteria to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst. Appl. Microbiol.* 11:16–19
- Frillingos S, Linden A, Niehaus F, Vargas C, Nieto JJ, Ventosa A, Antranikian G, Drinas C (2000) Cloning and expression of α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *J. Appl. Microbiol.* 88:495–503
- Frings E, Sauer T, Galinski EA (1995) Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *Journal of Biotechnology* 43:53–61.
- Furusho K, Yoshizawa T, Shoji S (2005) Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol. Dis.* 20:170–178. doi:10.1016/j.nbd.2005.02.011
- Galinski EA (1986) Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen, phototrophen Bakterien. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Galinski EA (1993) Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49:487–496
- Galinski EA (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 37:273–328
- Galinski EA, Louis P (1999) Compatible Solutes: Ectoine Production and Gene Expression. In: Oren A (ed) *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*, pp 187–202
- Galinski EA, Trüper HG (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 15:95–108
- Galinski EA, Ures A, Stein M, Schwarz T (2007) Stereospezifische Hydroxylierung von kompatiblen Soluten. DE 10 2007 052 900 A1, 07.11.2007; PCT/EP 2008/009414G
- Ganser DA (2010) Optimierung der Produktion von 5-Amino-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-carboxylsäure und Selektion eines Produktionsorganismus. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- García-Esteva R, Cánovas D, Iglesias-Guerra F, Ventosa A, Csonka LN, Nieto JJ, Vargas C (2006) Osmoprotection of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by N γ -acetyldiaminobutyrate, the precursor of the compatible solute ectoine. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:626–633
- Gilmour D (1990) Halotolerant and halophilic microorganisms. In: *Microbiology of Extreme Environments*. Edwards C (ed.). Milton Keynes: Open University Press:147–177
- Göller K (1999) Identifizierung und Charakterisierung des Ectoinengenclusters in *Halomonas elongata*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Göller K, Galinski EA (1999) Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7:37–45
- Göller K, Ofer A, Galinski EA (1998) Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 161:293–300
- Graevenitz A von, Bowman J, Del Notaro C, Ritzler M (2000) Human infection with *Halomonas venusta* following fish bite. *J Clin Microbiol* 38:3123–3124
- Graf R, Anzali S, Buenger J, Pfluecker F, Driller H (2008) The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin. Dermatol.* 26:326–333. doi:10.1016/j.clinidmatol.2008.01.002
- Grammann K (2000) Identifizierung und Charakterisierung eines osmoregulierten Solutetransporters in einer *DectA* Mutante von *H. elongata*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- Grammann K (2004) Molekularbiologische Charakterisierung des osmoregulierten TRAP-Transportsystems TeaABC und seines potentiellen Regulatorproteins TeaD aus *Halomonas elongata*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Grammann K, Volke A, Kunte HJ (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. 184:3078–3085
- Grammel N (1999) Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei salzstreßinduzierbaren Osmolyten, in *Streptomyces chrysomallus*. Dissertation, Technische Universität Berlin
- Grant WD (1991) General view of halophiles. In: Horikoshi K, Grant, WD (ed.) Superbugs. Microorganisms in extreme environments. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan:15–37
- Groß J (2010) Das kompatible Solut N- δ -Acetylornithin in *Halobacillus*-Arten. Bachelorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Grün A (2011) Studien zur Expression und zum Tat-Transportsystem von heterologen Proteinen in *Halomonas elongata*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557–580
- Harishchandra RK, Wulff S, Lentzen G, Neuhaus T, Galla HG (2010) The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. Biophys. Chem. doi:10.1016/j.bpc2010.02.007
- Heinrich U, Garbe B, Tronnier H (2007) In vivo assessment of Ectoin: a randomized, vehicle-controlled clinical trial. Skin Pharmacol. Physiol. 20:211–218.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96:23–28
- Jebbar M, Talibart R, Gloux K, Bernard T, Blanco C (1992) Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoines: Uptake and accumulation characteristics. J. Bacteriol. 174:5027–5035
- Joshi AK, Baichwal V, Ames GF (1991) Rapid polymerase chain reaction amplification using intact bacterial cells. BioTechniques 10:42, 44-5
- Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, Park CB (2005) Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. FEBS Lett. 579:4775–4780
- Kanapathipillai M, Ku SH, Girigoswami K, Park CB (2008) Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. Biochem. Biophys. Res. Commun. 365:808–813. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.074
- Kato C, Bartlett DH (1997) The molecular biology of barophilic bacteria. Extremophiles 1:111–116
- Kempf B, Bremer E (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch. Microbiol. 170:319–330
- Kim KK, Lee KC, Oh HM, Lee JS (2010) *Halomonas stevensii* sp. nov., *Halomonas hamiltonii* sp. nov. and *Halomonas johnsoniae* sp. nov., isolated from a renal care centre. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:369–377
- Kiss C (2002) Rekombinante Expression und Funktionalität der Ectoin-Synthase aus *Marinococcus halophilus*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Knapp S, Ladenstein R, Galinski EA (1999) Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes β -hydroxyectoine and betaine. Extremophiles 3:191–198
- Kolp S, Pietsch M, Galinski EA, Gütschow M (2006) Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. Biochimica et Biophysica Acta 1764:1234–1242
- Korsten A (2011) Das seltene kompatible Solut N-Acetyl-glutaminylglutamin-1-amid (NAGGN): Heterologe Expression des Genclusters aus *Pseudomonas putida* und Untersuchungen zur Funktion der putativen Biosyntheseenzyme. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Kovach ME, Elzer PH, Hill SD, Robertson GT, Farris MA, Roop, Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS1, carrying different antibiotic resistance cassettes. Gene 166:175–176
- Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, Peterson KM (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. BioTechniques 16:800–802

- Krahe M, Antranikian G, Märkl H (1996) Fermentation of extremophilic microorganisms. FEMS Microbiol. Rev. 18:271–285. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00243.x>
- Kristjánsson JK, Hreggvidsson GO (1995) Ecology and habitats of extremophiles. World Journal of Microbiology & Biotechnology 11:17–25
- Kunte HJ (1995) Grundlagen zur molekularbiologischen Untersuchung halophiler Eubakterien: Aufbau eines Insertionsmutagenese-Systems für *Halomonas elongata*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Kunte HJ, Galinski EA (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 HJ, Galinski EA, Trueper HG (1993) A modified FMOC-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines). J. Microbiol. Meth. 17:129–136
- Kurz M (2003) Natrium/ Protonen-Antiporter und mechanosensitive Kanäle von *Halomonas elongata*: Überlebensstrategien bei osmotischem Stress. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Kurz M (2008) Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. Saline Systems 4:6 doi:10.1186/1746-1448-4-6
- Kurz M, Burch AY, Seip B, Lindow SE, Gross H (2010) Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance. Appl. Environ. Microbiol. 76:5452–5462
- Kushner DJ (1985) The Halobacteriaceae. CR Woese & RS Wolfe. The bacteria. A treatise on structure and function. Vol. VIII. Archaeobacteria. Academic Press. Orlando, FL., pp 171–214
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685
- Lambert D, Draper DE (2007) Effects of osmolytes on RNA secondary and tertiary structure stabilities and RNA-Mg²⁺ ion interactions. J. Mol. Biol. 370(5): 993-1005
- Lange C (2009) Optimierung der Produktion des kompatiblen Soluts Mannosylglycerat in einem heterologen Expressionsstamm. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Lanyi JK (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. Bacteriol. Rev. 38:272–290
- Lapidot A, Iakobashvili R, Malin G (1999) Methods for DNA amplification and sequencing Int. Appl. WO 9941410A1
- Larsen PI, Sydnes LK, Landfald B, Strøm AR (1987) Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. Arch. Microbiol. 147:1–7
- Lee JS, Gralla JD (2001) Sigma38 (rpoS) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. J. Biol. Chem. 276:30064–30071
- Lee M, Coulter DM, Lown JW (1988) Total synthesis and absolute configuration of the antibiotic oligopeptide (4S)-(+)-anthelvencin A and its 4R(-) enantiomer. J. Org. Chem. 53:1855–1859
- Lee M, Lown JW (1987) Synthesis of (4S)- and (4R)-methyl 2-amino-1-pyrroline-5-carboxylate and their application to the preparation of (4S)-(+)- and (4R)-(-)-dihydrokikumycin B. J. Org. Chem. 52:5717–5721
- Lee SJ, Gralla JD (2004) Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase. Molecular Cell 14:153–162
- Lentzen G, Schwarz T (2005) Kompatible Solute: Mikrobielle Herstellung und Anwendung. In: Antranikian G (ed) Angewandte Mikrobiologie., pp 355–372
- Lentzen G, Schwarz T (2006) Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:623–634.
- Lippert K, Galinski EA (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:61–65
- Liss I (1962) N-acetyldiaminobuttersäure, eine neue Aminosäure aus dem Latex von *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. Phytochemistry 1:87–88
- Liu Y, Bolen DW (1995) The Peptide Backbone Plays a Dominant Role in Protein Stabilization by Naturally Occurring Osmolytes. Biochemistry 34:12884–12891
- Lottspeich F, Engels JW (ed) (2006) Bioanalytik, 2nd edn. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag

Literaturverzeichnis

- Louis P, Galinski EA (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
- Louis P, Trueper HG, Galinski EA (1994) Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:684–688
- Mann T (2008) Untersuchungen zum Effekt von Kreatin auf Bakterien. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Manzanera M, García Castro A de, Tøndervik A, Rayner-Brandes M, Strøm AR, Tunnacliffe A (2002) Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4328–4333
- Manzanera M, Vilchez S, Tunnacliffe A (2004) High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol. Lett.* 233:347–352. doi:10.1016/j.femsle.2004.03.005
- Marshall BJ, Coote GG, Scott WJ (1974) A study of factors affecting the survival of dried bacteria during storage. *CSIRO Aust. Div. Food Res. Tech. Pap.* 39:1–29
- Meffert A (2007) Untersuchungen zur Mannosylglycerat-Produktion von *Halomonas elongata* KB10.1. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Meffert A (2011) Die Hydroxylierung von Ectoin und Derivaten durch die Hydroxylase EctD aus *Halomonas elongata*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Mentrup V (2004) Trennung von Racematen durch halophile Bacteria: Untersuchungen zur selektiven Aufnahme von Prolinisomeren und Charakterisierung der beteiligten Transportsysteme. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Mevarech M, Frolow F, Gloss LM (2000) Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophysical Chemistry* 86:155–164
- Migula W (1895) Bacteriaceae (Stäbchenbakterien). In: Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Teil I, Abteilung Ia, 20-30. W. Engelmann, Leipzig
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York
- Min-Yu L, Ono H, Takano M (1993) Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp. *Annual Report of the International Center for Cooperative Research in Biotechnology Japan* 16:193–200
- Mitchell RE, Teh KL (2005) Antibacterial iminopyrrolidines from *Burkholderia plantarii*, a bacterial pathogen of rice. *Org. Biomol. Chem.* 3:3540–3543. doi:10.1039/b509319h
- Morozkina EV, Slutskaia ES, Fedorova TV, Tugay TI, Golubeva LI, Koroleva OV (2010) Extremophilic Microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 46:1–14
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335–350
- Nagayoshi C, Ishibashi M, Tokunaga M (2009) Purification and characterization of human brain serine racemase expressed in moderately halophilic bacteria. *Protein Pept. Lett.* 16:201–206
- Nagayoshi C, Tokunaga H, Hayashi A, Harazono H, Hamasaki K, Ando A, Tokunaga M (2006) Efficient expression of haloarchaeal nucleoside diphosphate kinase via strong porin promoter in moderately halophilic bacteria. *Protein Pept. Lett.* 13:611–615
- Needleman SB, Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48:443–453
- Ono H, Sawada K, Khunajakr N, Tao T, Yamamoto M, Hiramoto M, Shinmyo A, Takano M, Murooka Y (1999) Characterization of Biosynthetic Enzymes for Ectoine as a Compatible Solute in a Moderately Halophilic Eubacterium, *Halomonas elongata*. *J. Bacteriol.* 181:91–99
- Oren A (1988) The microbial ecology of the Dead Sea. KC Marshall. *Advances in microbial ecology*. Plenum Press. New York, NY 10:193–229
- Oren A (2006a) Life at high salt concentrations. *Prokaryotes* 2:263–282
- Oren A (2006b) Life in saline and hypersaline environments. In: Seckbach (ed) *Life as we know it*, pp:77-89
- Oren A, Mana L (2002) Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. *Extremophiles* 6:217–223

- Paleg LG, Douglas TJ, van Daal A, Keech DB (1981) Betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. *Aust. J. Plant Physiol.* 8:107–110
- Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, Iborra JL, Vargas C, Nieto JJ, Cánovas M (2010) Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol. Adv.* 28:782–801. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.06.005
- Peters P, Galinski EA, Trüper HG (1990) The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* 71:157–162
- Pflücker F, Bünger J, Hitzel S, Witte G, Beck J, Lergenmüller M, Driller H (2005) Complete photo protection : Going beyond visible endpoints. *SÖFW J* 131:20–30
- Prabhu J, Schauwecker F, Grammel N, Keller U, Bernhard M (2004) Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (thpD) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3130–3132
- Qu Y, Bolen CL, Bolen DW (1998) Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9268–9273
- Quispel A (1998) Lourens G. M. Baas Becking (1895-1963). Inspirator for many (micro)biologists. *Int. Microbiol.* 1:69–72
- Rajendrakumar CS, Reddy BV, Reddy AR (1994) Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:957–963. doi:10.1006/bbrc.1994.1795
- Reed RH (1986) *Microbes in extreme environments*. Special publications for the Society for General Microbiology. Academic Press, London
- Reuter K, Pittelkow M, Bursy J, Heine A, Craan T, Bremer E (2010) Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD. *PLoS ONE* 5:e10647. doi:10.1371/journal.pone.0010647
- Roeßler M, Müller V (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ. Microbiol.* 3:743–754
- Sánchez-Porro C, Kaur B, Mann H, Ventosa A (2010) *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:2768–2774
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463–5467
- Sauer T, Galinski EA (1998) Bacterial Milking: A Novel Bioprocess for Production of Compatible Solutes. *Biotechnology & bioengineering* 57:306–313
- Schäfer A, Tauch A, Jaeger W, Kalinowski J (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* 145:69–73
- Schiraldi C, Maresca C, Catapano A, Galinski EA, Rosa M de (2006) High-yield cultivation of *Marinococcus* M52 for production and recovery of hydroxyectoine. *Res. Microbiol.* 157:693–699.
- Schnoor M (2001) Konstruktion eines Expressionsvektors für *Halomonas elongata*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Schnoor M, Voß P, Cullen P, Boking T, Galla HJ, Galinski EA, Lorkowski S (2004) Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322:867–872
- Schwibbert K, Marin-Sanguino A, Bagyan I, Heidrich G, Lentzen G, Seitz H, Rampp M, Schuster SC, Klenk H, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Kunte HJ (2010) A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02336.x
- Seip B (2009) Charakterisierung des Hydroxyectoin-Biosynthesegenclusters aus *Pseudomonas stutzeri* und Vergleich der Ectoinsynthese mit der anderer Organismen. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Seip B, Galinski EA, 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, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- Severin J (1993) Kompatible Solute und Wachstumskinetik bei halophilen aeroben heterotrophen Eubakterien. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Shine J, Dalgarno L (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:1342–1346
- Simon R, Priefer U, Puhler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nat. Biotech. 1:784–791
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150:76–85
- Stevens DA, Hamilton, JR, Johnson N, Kim KK, Lee JS (2009) *Halomonas*, a newly recognized human pathogen causing infections and contamination in a dialysis center. Three new species. Medicine 88:244–249
- Studier FW (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J. Mol. Biol. 219:37–44
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189:113–130
- Stumpfe D (2003) Aufbau und Regulation der Ectoin-Synthesegene *ectABC* aus *Halomonas elongata* DSM 2581^T. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Sutcliffe J (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43:77–90
- Tadeo X, López-Méndez B, Trigueros T, Lain A, Castano D, Millet O (2009) Structural basis for the amino acid composition of proteins from halophilic archaea. PLOS Biology 7(12) e1000257
- Takizawa M, Tsubotani S, Tanida S, Harada S, Hasegawa T (1987) A new pyrrole-amidine antibiotic TAN-868 A. J. Antibiot. 40:1220–1230
- Tao T, Yasuda N, Ono H, Shinmyo A, Takano M (1992) Purification and characterization of 2,4-diaminobutyric acid transaminase from *Halomonas* spec. Annual Report of the International Center for Cooperative Research in Biotechnology Japan 15:187–199
- Tetsch L, Kunte HJ (2002) The substrate-binding protein TeaA of the osmoregulated ectoine transporter TeaABC from *Halomonas elongata*: purification and characterization of recombinant TeaA. FEMS Microbiol. Lett. 211:213–218
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680
- Tiadó-Margarit X, Vila X, Galinski EA (2011) Osmoadaptive accumulation of Nε-acetyl-β-lysine in green sulfur bacteria and *Bacillus cereus* CECT 148. FEMS Microbiol. Lett. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02254.x
- Timasheff SN (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:9721–9726
- Tokunaga H, Arakawa T, Tokunaga M (2010a) Novel soluble expression technologies derived from unique properties of halophilic proteins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 88:1223–1231
- Tokunaga M, Arakawa T, Tokunaga H (2010b) Recombinant expression in moderate halophiles. Current Pharmaceutical Biotechnology 11:259–266
- Trüper HG, Galinski EA (1990) Biosynthesis and fate of compatible solutes in extremely halophilic phototrophic eubacteria. FEMS Microbiol. Rev. 75:247–254
- Trüper HG, Severin J, Wohlfarth A, Müller E, Galinski EA (1991) Halophily, taxonomy, phylogeny and nomenclature. In: Rodriguez-Valera, F (ed.) General and applied aspects of halophilic microorganisms. Plenum Press, New York, N.Y.:3–7
- Ures A (2005) Identifizierung und Charakterisierung des Ectoin-Hydroxylasegens *ectD* aus *Halomonas elongata* DSM 2581^T. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- van de Vossen JLCM, Driessen AJM, Grant D, Konings WN (1999) Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration. Extremophiles 3:253–257

Literaturverzeichnis

- Vargas C, Fernández-Castillo R, Cánovas D, Ventosa A, Nieto JJ (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. *Mol. Gen. Genet.* 246:411–418
- Vargas C, Kallimanis A, Koukkou AI, Calderon MI, Canovas D, Iglesias-Guerra F, Drainas C, Ventosa A, Nieto JJ (2005) Contribution of chemical changes in membrane lipids to the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:571–581
- Vargas C, Nieto JJ (2004) Genetic tools for the manipulation of moderately halophilic bacteria of the family *Halomonadaceae*. *Methods Mol. Biol.* 267:183–208
- Vargas C, Tegos G, Drainas C, Ventosa A, Nieto JJ (1999) Analysis of the replication region of the cryptic plasmid pHE1 from the moderate halophile *Halomonas elongata*. *Mol. Gen. Genet.* 261:851–861
- Ventosa A (1994) Taxonomy and phylogeny of moderately halophilic bacteria. In: F.G. Priest (ed.), *Bacterial diversity and systematics*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:504–544
- Vielgraf SL (2008) Stereospezifische Hydroxylierung kompatibler Solute über Ganzzellkatalyse in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Voß P (2002) Synthese von kompatiblen Soluten mit ectoinanaloger Struktur und Charakterisierung des protektiven Effektes auf biochemische Modellsysteme und *Escherichia coli*. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Vreeland RH, Litchfield CD, Martin EL, Elliot E (1980) *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:485–495
- Vreeland RH, Mierau BD, Litchfield CD, Martin EL (1983) Relationship of the internal solute composition to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *Can. J. Microbiol.* 29:407–414
- Wang A, Bolen DW (1997) A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* 36:9101–9108. doi:10.1021/bi970247h
- Wedeking A (2005) Synthese von Ectoinderivaten und Untersuchungen zu deren Wirkung auf Säugerzellen. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Wei L, Wedeking A, Buttner R, Kalff JC, Tolba RH, van Echten-Deckert G (2009) A natural tetrahydropyrimidine protects small bowel from cold ischemia and subsequent warm in vitro reperfusion injury. *Pathobiology* 76:212–220. doi:10.1159/000218338
- Wilkinson DL, Harrison RG (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)* 9:443–448
- Willée E (2010) Funktionelle Charakterisierung singulärer Ectoinsynthesen aus *Burkholderia ambifaria*, *Stigmatella aurantiaca* und *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Bachelorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Wit R de, Bouvier T (2006) 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ. Microbiol.* 8:755–758. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01017.x
- Witt E (2005) Untersuchungen zu alternativen kompatiblen Soluten bei der Deletionsmutante *Halomonas elongata* KB1. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Wohlfarth A, Severin J, Galinski EA (1990) The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *Journal of General Microbiology* 136:705–712
- Wolfe-Simon F, Switzer Blum J, Kulp TR, Gordon GW, Hoeft SE, Pett-Ridge J, Stolz JF, Webb SM, Weber PK, Davies PCW, Anbar AD, Oremland RS (2010) A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science*. DOI:10.1126/science.1197258

```

1931 gcaagttctt cagcttcgag catgccggca tcacgccgga tatcgtgacc aactccaagt cgctgtccgg ttacggcctg ccgttcgctc acgtcctgca
>.....ectB.....>
2031 gcgccccgag ctcgacaagt ggaagcccgg tcagtacaac ggcaccttcc gcggttcaa cctggctttc gccactgctg ctgccccat gcgcaagtac
ectCup_F1
>.....ectB.....>
2131 tggagcgacg acaccttcga gcgtgacgtg cagcgcaagg ctgcgcatgt cgaggaacgc ttcggcaaga tcgccgctg gctgagcgag aacggcatcg
>.....ectB.....>
2231 aggcctccga gcgcggccgc gggctgatgc ggggcatcga cgtgggttcc ggcgatatcg ccgacaagat caccaccaa gccttcgaga acgggtgat
>.....ectB.....>
2331 catcgaacc agcggtcagg acggcgaagt ggtaagtgc ctgtgccgc tgaccattcc cgacgaagac ctggtcgagg gactcgacat cctcgagacc
>.....ectB.....>
2431 agcaccaagc aggccttag ctgatgcct gaggtgcgcc atcgggcctg tccatggcat cctgtatcgg tcggccgtgc gcggccggcc agtcattgat
>.....ectB.....>>
-24 Sig54 -12 Sig54 +1
2531 tcaactggaga atcgaccccg gcgcagtatt ctgccgtctc gcacgaagag cccccgtca cgatcggggg ctcttctggt gttcgcagcg gcacgggtgc
RBS c -35 Sig70
2631 cagtagctgg acgcctcgga cgtttcatgc ctactattgc gtcatgattg attcatcgtc cagaaaccgt cagcccgtcg aggaaggggc agtcgaggaa
-10 Sig70 RBS r
2731 ggggcattgc ccaacgacct ggtcagcga ctgctgctcg gcatgcgtct aagcggcatc cagtatcgcc gcatacaggc ggttctccc ttcggcatcg
>>.....ectR.....>
2831 gggccttcgg tgccagcccg ggggtggccc actttcactt catcgcgca gggccagtat atctgcgag tcccggcggg gccgtgcacc ggctcgaggt
>.....ectR.....>
2931 cggtgacgca gtgcttctgc cgcgcccgg accgcatgag ctgctgtcgt cgccggagca atccgccagt cgtgatatcg ccagcttcac gaccgctccg
>.....ectR.....>
3031 ctctgcaggg ccgtcagtgc ggtgcgcaac ggttcccag aagtttgcca ggagagtggg gccgtcatct
ectCdown_R1
>.....ectR.....>

```

Abbildung 70: DNA-Sequenz der *ectC*-Deletion in *H. elongata* WUB01

Dargestellt ist die Δ *ectC*-Region der Mutante *H. elongata* WUB01 mit den verbliebenen angrenzenden Genen *ectB* und *ectD* sowie den zugehörigen Promotorregionen und Ribosomenbindestellen (RBS). *ectC* wurde von Start- bis Stop-Codon deletiert (vgl. III1), der zugehörige σ^{54} -Promotor sowie die RBS (Schwibbert *et al.* 2010) verbleiben im Genom. +1: Transkriptionsstartpunkt, in rot dargestellt sind die Bindestellen der verwendeten Primer.

```

5111  cgaaattaat acgactcact ataggggaat tgtgagcgga taacaattcc cctctagaaa
      T7-promoter
      >>.....lac-operator.....>>
      NdeI
      --+---
5171  taattttgtt taactttaag aaggagatat acatatgatc gttcgcaatc tcgaagaagc
      pelB-sequence'
      >>.....ectC.....>
5231  gcgccagacc gaccgtctgg tcaccgccga aaacggcaac tgggacagca cccgcctgtc
      >.....ectC.....>
5291  gctggccgaa gatggtggca actgctcctt ccacatcacc cgcatcttcg agggtaccga
      >.....ectC.....>
5351  gacccacatc cactataagc atcacttcga ggctgtttat tgcatcgaag gcgagggcga
      >.....ectC.....>
5411  agtggaaacc ctggccgatg gcaagatctg gcccatcaag ccgggtgaca tctacatcct
      >.....ectC.....>
5471  cgaccagcac gacgagcacc tgctgcgcgc cagcaagacc atgcacctgg cctgcgtgtt
      >.....ectC.....>
5531  cacgccgggc ctgaccggca acgaagtgca ccgcgaagac ggttcctacg cacctgccga
      >.....ectC.....>
      XhoI
      --+---
5591  cgaagccgac gaccagaagc cgctgctoga gcaccaccac caccaccact gagatccggc
      spacer His-tag stop
      >.....ectC.....>

```

Abbildung 71: DNA-Sequenz des Vektors pET-22b_ectC_Hel_His

Dargestellt sind Auszüge der DNA-Sequenzen der Vektoren pET-22b_ectC_Hel_His sowie pET-22b_ectC_Hel (vgl. III.4.1.1). Deutlich zu sehen ist, dass die *pelB*-Leader-Sequenz durch Einfügen des *ectC*-Gens deletiert wird. In grau dargestellt sind die Spacer-Region zwischen *ectC* und His-tag im Fall des Vektors pET-22b_ectC_Hel_His sowie die relevanten Stop-Codons.

```

5111  cgaaattaat acgactcact ataggggaat tgtgagcgga taacaattcc cctctagaaa
      T7-promoter
      >>.....lac-operator.....>>
      NdeI
      --+---
5171  taattttgtt taactttaag aaggagatat acatatgatc gttcgcaatc tcgaagaagc
      pelB-sequence'
      >>.....ectC.....>
5231  gcgccagacc gaccgtctgg tcaccgccga aaacggcaac tgggacagca cccgcctgtc
      >.....ectC.....>
5291  gctggccgaa gatggtggca actgctcctt ccacatcacc cgcatcttcg agggtaccga
      >.....ectC.....>
5351  gacccacatc cactataagc atcacttcga ggctgtttat tgcatcgaag gcgagggcga
      >.....ectC.....>
5411  agtggaaacc ctggccgatg gcaagatctg gcccatcaag ccgggtgaca tctacatcct
      >.....ectC.....>
5471  cgaccagcac gacgagcacc tgctgcgcgc cagcaagacc atgcacctgg cctgcgtgtt
      >.....ectC.....>
5531  cacgccgggc ctgaccggca acgaagtgca ccgcgaagac ggttcctacg cacctgccga
      >.....ectC.....>
      NcoI
      --+---
5591  cgaagccgac gaccagaagc cgctgtaacc atggatatcg gaattaattc ggatccgaat
      stop
      >.....ectC.....>
      HindIII
      --+---
      XhoI
      --+---
5651  tcgagctccg tcgacaagct tgcggccgca ctcgagcacc accaccacca ccactgagat
      His-tag

```

Abbildung 72: DNA-Sequenz des Vektors pET-22b_ectC_Hel

```

1  ccacgcaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaat
   tet-promotor
101 gaatagttcg acaaaaatct agataacgag ggcaaaaaat ggctagctgg agccaccgc agttcgaaaa aggcgccatg atcgttcgca atctcgaaga
   N-Überhang Strep-tag spacer
   >>.....ectC_strep.....>
201 agcgcgccag accgaccgtc tggtcaccgc cgaaaacggc aactgggaca gcacccgcct gtcgctggcc gaagatgggtg gcaactgctc cttccacatc
   >.....ectC_strep.....>
301 acccgcatct tcgagggtag cgagaccac atccactata agcatcactt cgaggtggtt tattgcatcg aaggcgaggg cgaagtggaa accctggccg
   >.....ectC_strep.....>
401 atggcaagat ctggcccatc aagccgggtg acatctacat cctcgaccag cacgacgagc acctgctgcg cgccagcaag accatgcacc tggcctgcgt
   >.....ectC_strep.....>
501 gttcacgccg ggctgaccg gcaacgaagt gcaccgcgaa gacggttcct acgcacctgc cgacgaagcc gacgaccaga agccgctgtg atatctaact
   stop
   >.....ectC_strep.....>>

```

Abbildung 73: DNA-Sequenz des Vektors pASK-IBA5_ectC_Hel

Dargestellt ist ein Ausschnitt der DNA-Sequenz des Vektors pASK-IBA5_ectC_Hel (vgl. III.4.1.2). In grün dargestellt ist die für 8 Aminosäuren kodierende *Strep*-tag II-Region, in grau dargestellt sind der Amino-terminale Überhang, die Spacerregion zwischen *ectC* und *Strep*-tag II sowie das relevante Stop-Codon.

```

                                XbaI
                                -+----
3200 ctatagggcg aattggagct ccaccgcggt ggcggccgct ctatagcatc cagggcatcg ccattgccgt acgggcccggg ctgaccaagg cacagttcaa
                                Punktmutation
<.....'mcs'.....<<
                                >>.....promKB1.....>
3300 ccagacggtg ggcattcatc ccaccggcgc cgaagaattc gtgaccatgc gtactccgac acgccgtga cgacctcgg gcaatcctgt cacggcgatg
>.....promKB1.....>
3400 tcactcggac gggccaccct cgaggtggcc cgttgcgta tgcgtatggc ccgaatgaat gtggactaaa ctgggtctgt gcgaacgtcc tgcattcgat
Punktmutation
>.....promKB1.....>
3500 gccttttcgt acaagacctg ccgggggaca tcagccggta cgagcgccgg tggtcgatgt cgcaagaatg gggagagccg ctacatacgc agcctgggga
                                -35 Sig38
                                Punktmutation
>.....promKB1.....>
3600 gtgggctata attttctatt atggaattca gcaagcaaga taacctggtt ttgaaatga ccataagcgg ctgttatgat gccgatcaaa ttcgctccac
-10 Sig38                                -35 Sig70                                -10 Sig70
>.....promKB1.....>

                                NspI                                KpnI
                                -+----+                                -+----+
                                BspLU11I                                SmaI                                XhoI                                Acc65I
                                -+----+                                -+----+                                -+----+
                                HincII                                XmaI                                HindIII                                HincII                                ApaI
                                -+----+                                -+----+                                -+----+                                -+----+
                                SalI                                BamHI                                PstI                                EcoRV                                ClaI                                SalI                                PspOMI
                                -+----+                                -+----+                                -+----+                                -+----+
3700 aggaggtcga catgtaggga tccccgggc tgcaggaatt cgatatcaag cttatcgata ccgtcgacct cgaggggggg cccgtaccc a
RBS
>.promKB1.>>
ectB' >>...>>
<<.....mcs'.....<<

```

Abbildung 74: DNA-Sequenz des Vektors pWUB

Dargestellt ist ein Ausschnitt der DNA-Sequenz des Vektors pWUB (III6.2). Die Region *promKB1* beinhaltet Promotoren des σ^{38} - und σ^{70} -Typs. In grün dargestellt ist die zum *ectB*-Gen gehörige Ribosomenbindestelle (RBS). Die drei rot markierten Basenaustausche im Vergleich zur *promA*-Region des *H. elongata* WT wurden bereits von Grammann (2000) beschrieben.


```

3501 ccttttcgta caagacctgc cgggggacat cagccggtag gagcgccggt ggtcgtatgtc gcaagaatgg ggagagccgc tacatacgca gcctggggag
-35 Sig38
>......promKB1.....>

3601 tgggctataa ttttctatta tgggaattcag caagcaagat aacctggttt ttgaaatgac cataagcggc tgttatgatg cggatcaaat tcgctccaca
-10 Sig38 -35 Sig70 -10 Sig70
>......promKB1.....>

3701 ggaggtgcac atgatcgttc gcaatctcga agaagcgcgc cagaccgacc gtctgggtcac cgccgaaaac ggcaactggg acagcaccgc cctgtcgtg
RBS
>.....>> promKB1
>>.....ectC.....>

3801 gccgaagatg gtggcaactg ctccctccac atcaccgcga tcttcgaggg taccgagacc cacatccact ataagcatca cttcgaggct gtttattgca
>.....ectC.....>

3901 tcgaaggcga gggcgaagtg gaaaccctgg ccgatggcaa gatctggccc atcaagccgg gtgacatcta catcctcgac cagcagcagc agcacctgct
>.....ectC.....>

4001 gcgcgccagc aagaccatgc acctggcctg cgtgttcacg ccgggcctga ccggcaacga agtgaccgc gaagacggtt cctacgcacc tgccgacgaa
>.....ectC.....>

KpnI
-----+
XhoI
-+-----
Acc65I
-+-----
ClaI
--+---
HincII
---+---
ApaI
-----+
HindIII
-+-----
SalI
-+-----
PspOMI
-+-----

4101 gccgacgacc agaagccgct gtaaccaagc ttatcgatac cgtcgacctc gagggggggc ccggtaccca gcttttgttc cctttagtga gggttaattg
>.....ectC.....>>
stop
<<.....mcs' '.....<<

```

Abbildung 75: DNA-Sequenz des Vektors pWUB_ectC_Hel (vgl. III.6.3.1)

```

3561 gcaagaatgg ggagagccgc tacatacgca gcctggggag tgggctataa ttttctatta tggaattcag caagcaagat aacctggttt ttgaaatgac
      -35 Sig38 -10 Sig38 -35 Sig70
      >.....promKB1.....>
3661 cataagcggc tgttatgatg ccgatcaaat tcgctccaca ggaggtcgac atggcagtgc agacatcgtc caaccgaccg ctgccacaag cgaacctgca
      -10 Sig70 RBS
      >.....promKB1.....>>.....ectD.....>
3761 tatcgccacg gagacacccg aggccgacag ccggatccgt agcgcgccgc gtccggggca ggatccctat ccgacccgac tgagcgagcc gctggatcct
      >.....ectD.....>
3861 ccctggctca atcgccgca gccggtggtc aagggagagg aggccgatgg gccgctctcg gccgcgcagc tcgatacctt cgagcgccag ggcttcatct
      >.....ectD.....>
3961 tcgagccgga ctctctgaaa ggcgaggaac tcgagggcgtt gcgccacgaa ctcaacgcc tgctggcccg ggatgacttc cgcggacgag acttcgccat
      >.....ectD.....>
4061 caccgagccg cagggcaacg agatccgctc gctgttcgcg gtgcactacc tgtcgcgagt cttcagccgc ctggccaacg acgaacgcct gatgggtcgc
      >.....ectD.....>
4161 gcccggcaga ttctcggcgg cgagccctat gtccatcagt cgcgcatcaa ctacaagccc ggcttcgagg gcaagggctt caattggcat tccgattttg
      >.....ectD.....>
4261 aaacctggca cgcgaggat ggcgatgccg ccatgcatgc ggtgagtgcg tccatcgtgc tgaccgaaa ccacaccttc aacgggccgc tgatgctggt
      >.....ectD.....>
4361 gcccgctca caccgggtat tcgtgccgtg cctgggtgaa acgccggagg atcatcaccg gcagtcgctc aagaccagg aattcggcgt gccgagccgc
      >.....ectD.....>
4461 caggcgtgc gcgagttgat cgaccgacat ggtatcgaag cgcccaccg cgcggcgggt ggctgctgc tgttcgactg caataacctg cacggtcca
      >.....ectD.....>
4561 acgccaacat gtcgcggat ccgcgcagca acgccttttt cgtctacaac cgtcgtgaca accgctgctg cgaaccttat gcggcctcca agcgcgcc
      >.....ectD.....>
4661 gcgcttctg gccacgagc cggatgaggc gtggtcgccg gatggctgac tcggggtag actaacaagt
      stop
      >.....ectD.....>>

```

Abbildung 76: DNA-Sequenz des Vektors pWUB_ectD_Hel (vgl. III6.3.2)

```

3200 ctatagggcg aattggagct ccaccgcggt ggcggccgct ctagatcatc cagggcatcg ccattgccgt acgggccggg ctgaccaagg cacagttcaa
<.....'mcs'.....<<
                                     >>.....promKB1.....>
3300 ccagacggtg ggcattcatc ccaccggcgc cgaagaattc gtgaccatgc gtactccgac acgccctga cgacctcgg gcaatcctgt cacggcgatg
>.....promKB1.....>
3400 tcactcggac gggccaccct cgaggtggcc cgttgcgta tgcgtatggc ccgaatgaat gtggactaaa ctgggtctgt gcgaacgtcc tgcattcgat
>.....promKB1.....>
3500 gccttttcgt acaagacctg ccgggggaca tcagccgga cgagcgccg tggtcgatgt cgcaagaatg gggagagccg ctacatagc agcctgggga
                                     -35 Sig38
>.....promKB1.....>
3600 gtgggctata attttctatt atggaattca gcaagcaaga taacctggtt ttgaaatga ccataagcgg ctgtatgat gccgatcaaa ttcgctccac
-10 Sig38                                     -35 Sig70                                     -10 Sig70
>.....promKB1.....>

          NspI          SmaI
          -+-----+
          HincII        XmaI
          -+-----+
          SalI          BamHI          PstI
          -+-----+
3700 aggaggtcga catgtaggga tccccgggc tgcagcacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg agttggctgc
RBS                                     His-tag          stop
>.promKB1.>>
      ectB' >>...>>
          <<.....'mcs'.....<<

                                     HindIII
                                     -+-----
3800 tgccaccgct gagcaataac tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg tttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg ataagcttat
                                     T7-terminator
                                     mcs' <<.....<

3900 cgataccgtc gacctcgagg gggggcccgg taccagctt t
<.....mcs'.....<<

```

Abbildung 77: DNA-Sequenz des Vektors pWUB_His

Dargestellt ist ein Ausschnitt der DNA-Sequenz des Vektors pWUB-His (vgl. III.6.4.1). Die His-tag-Region mitsamt anschließendem T7-Terminator wurde dem Vektor pET-22b(+) entnommen.

```

3561 gcaagaatgg ggagagccgc tacatacgca gcctggggag tgggctataa ttttctatta tggaattcag caagcaagat aacctggttt ttgaaatgac
      -35 Sig38          -10 Sig38          -35 Sig70
      >.....promKB1.....>
                                     BspLU11I
                                     -+-----
3661 cataagcggc tgttatgatg ccgatcaaat tcgctccaca ggaggtcgac atgtttgttc gcaacaaaac cgatgtcgag aacaccctt atttcgtcga
      -10 Sig70          RBS
      >.....promKB1.....>>
                                     >>.....ectC_Psy.....>
3761 atggggcgcc ggaaccagtc accgtctgct cactgaacgt gatgctatgg gctttacgct gtgccacacc attgtccgcg cgggcacaga gtcgctcttg
      >.....ectC_Psy.....>
3861 cattaccgca atcaccttga ggcgtgctat tgcattggag gtgaaggcga agtcgaggac atgcaaggca acgtatttcc gatccggcct ggggatgtgt
      >.....ectC_Psy.....>
3961 atgtgcttga ccagcacgat cggcactttc tgcgcgagg caaggagcag gacctgatac tggtcagcgt cttcaatccg ctttgcgtg gggacgagcg
      >.....ectC_Psy.....>
                                     BamHI
                                     -+-----
                                     XhoII          PstI          XhoII
                                     -+-----   -+-----   -+-----
4061 acataacctc aatgacggta cgggatccgc ttacctgcag caccaccacc accaccactg agatccgct gctaacaaag cccgaaagga agctgagttg
      >.....ectC_Psy.....>>
                                     spacer          His-tag          stop
4161 gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggtttt tgctgaaagg aggaactata tccgataag
      T7\terminator
                                     mcs'' <<
4261 cttatcgata ccgctgacct cgaggggggg cccggtaccc
      <.....mcs''.....<<

```

Abbildung 78: DNA-Sequenz des Vektors pWUB_ectC_Psy_His

Dargestellt ist ein Ausschnitt der DNA-Sequenz des Vektors pWUB_ectC_Psy_His (III.6.4.2). Grau dargestellt ist die Spacerregion zwischen *ectC*-Gen und His-tag-Region sowie das relevante Stop-Codon.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. **Erwin A. Galinski** möchte ich mich nicht nur für die Bereitstellung eines spannenden Themas und des nötigen Arbeitsplatzes bedanken, sondern auch für die Möglichkeit, selbstständig die Grenzen dieses Themas auszudehnen, herumzuforschen und nebenbei auf vielen spannenden Tagungen in der Welt herumzukommen.

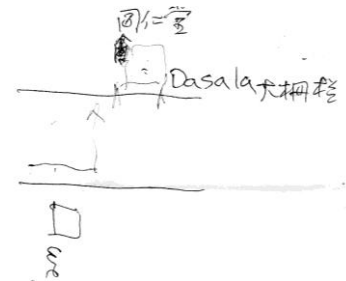
Für die freundliche Übernahme des Korreferats danke ich Frau apl. Prof. Dr. **Christiane Dahl**.

Herrn Dr. **Matthias Kurz** danke ich für die gute Zusammenarbeit bei diversen Kursbetreuungen sowie die Möglichkeit, mit EctC aus *P. syringae* zu arbeiten.

Damit die Forschung gut läuft ist ein gutes Arbeitsklima unerlässlich. In dieser Hinsicht konnte ich mich in einer halophilen Arbeitsgruppe natürlich glücklich schätzen, denn:

„Humor ist das Salz der Erde, und wer gut durchgesalzen ist, bleibt lange frisch.“ (Karel Capek)

Dieses Zitat umschreibt die letzten Jahre ganz gut, und deshalb sind hier einige Dankesworte fällig. Mit Frau **Birgit Amendt** durfte ich mir nicht nur das Labor teilen, sondern auch nach Feierabend viel Spaß haben, z.B. mit der kleinen Hexe oder Ronja Räubertochter. Absolutes Highlight war natürlich unsere Reise nach China, wo wir recht orientierungslos auf der Suche nach getrockneten Seegurken in Pralinschachteln durch Peking wanderten. Und dabei hatten wir doch so eine schöne Wegbeschreibung... (siehe rechts). Für die ganze schöne Zeit ein ganz großes Dankeschön! Bei Frau **Marlene Stein** (seien wir mal ehrlich, an Hecker haben wir uns noch nicht gewöhnt) habe ich gelernt, einfach mal drauf los zu schrauben und zu reparieren, wenn's nötig ist... bislang ist's gut gegangen und ich kann mit Stolz die erste Fermentation ohne Blutverlust oder Brandverletzungen verkünden! Danke auch für die vielen Grünzeug-Deals die wir abgewickelt haben und die meine Tomatensammlung bereicherten. Frau Dipl.-Biol. **Elisabeth Schwab**, die das Lösungskompetenz-Team vervollständigt, danke ich für eine unterhaltsame Zeit im Labor, wo die Namensgleichheit so einige Verwirrungen hervorrief („Elisabeth, kannst du mal gerade... NEE, NICHT DU!“).



Und was waren das für schöne Zeiten, als morgens um 8 im großteils noch schlafenden IfMB Frau Dr. rer.nat. **Anne Korsten** und ich den Tag über einem schönen Becher Kaffee starteten. Für meine dadurch stark erhöhte Koffeintoleranz und die netten motivierenden Gespräche, sowie die mittlerweile 168 vor dem Fernseher verbrachten Stunden (ja, genau, 7 Staffeln) möchte ich mich herzlich bedanken. Ebenso großer Dank gebührt Frau Dipl.-Biol. **Andrea Meffert**, die in meinem Rücken so manchen unerreichten Rekord aufstellte. Zudem teilt sie meine Schwäche für wirklich schlechte Fernsehunterhaltung, und somit konnten wir nicht nur unterhaltsame Diskussionen führen („Hast du gestern gesehen...?“), sie trug auch nicht unerheblich zu einem gemütlichen Abinente am Arbeitsplatz bei. Ein weiteres Danke dafür, dass ich auch ein wenig Hydroxylieren durfte. Bei Frau Dipl.-Biol. **Sinje Vielgraf** bedanke ich mich für viele unterhaltsame Kaffee-Pausen mit Friends-Zitaten und Tatort-Zusammenfassungen, leckere Cookies und aktive Mithilfe bei der täglichen Schokoladen-Vernichtung. Frau Dipl.-Biol. **Britta Seip** baut nicht nur so wie ich ganzjährig Gemüse im Labor an – backen kann sie auch noch! Für die unvergessenen Weckmann-Aktionen gibt es hier noch mal ein Dankeschön. Auf ihre eigene Anregung hin möchte ich mich zudem bei ihr dafür bedanken, dass sie so gerne mit einem Gel, einem verwirrenden

Restriktionsmuster oder einfach nur so bei mir vorbeischaute. Herr M. Sc. **Christoph Tanne** ist ein sprudelnder Quell der Kreativität, der mit Wort- und Bildwitz für gute Stimmung sorgt. Wie viele Wissenschaftler gibt es wohl, die mit nur drei Aminosäuren so große Begeisterung bei ihren Mitmenschen auslösen können („Glutamat, Aspartat und Lysin?“ – „Jippieh, Käsebrötchen!“)? Für diese unterhaltsame Zeit am Arbeitsplatz und die Erkenntnis, dass Pinguine echt lecker sind, ein dickes Dankeschön. Bei Frau Dipl.-Biol. **Kati Sell**, dem Kreatin-Girl der Gruppe, möchte ich mich ganz besonders herzlich für die (Unterhaltungs-) Romane bedanken, die sie mir geschrieben hat. Und für ganz viele Aufmunterungen zum richtigen Zeitpunkt. Vielleicht starten wir ja nochmal einen Versuch Otten zu füttern? Bei Herrn M. Sc. **Jhonny Correa** möchte ich mich dafür bedanken, dass ich einen Knoblauch-Baum im Garten habe und ich dieses Bild auch nicht mehr loswerde.

Bei unserem Wunscherfüller und geprüften Leiter- und Tritte-Experten **Elmar Kopp** möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass ich jederzeit vorbeikommen konnte wenn bei mir mal eine Schraube locker war oder im Keller wieder Disco-Feeling herrschte – auch ohne die Berechtigung Aufträge zu erteilen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen **aktuellen und ehemaligen AG- und IfMB-Mitgliedern** herzlich bedanken, die mich während meiner Zeit im Haus begleitet haben und zu der guten Stimmung beitrugen. Unter den Diplomanden, Bachelor-Studenten und Laborblöcklern möchte ich einige Wenige namentlich hervorheben, die das (manchmal möglicherweise zweifelhafte) Vergnügen hatten, an meinen Themen zu arbeiten: Danke an **Sinje Vielgraf, Sandy Schulz, Ariane Matz, Bernadette Rauch, Thomas Weissgerber, Christina Möller, Anna Hermann, Daniel Ganser, Julia Kurth** und **Tassilo van Ooyen** für eine Menge Daten, die in einigen Fällen halt auch mal zeigten wie es eben nicht funktioniert.

Herrn Dr. **René Fakoussa** sowie dem Land NRW danke ich für die Bereitstellung von Geräten aus dem Forschungsprojekt Kohle-Biotechnologie. Herrn Dr. **Stefan Kehraus** aus der AG König, pharmazeutische Biologie, danke ich für die NMR-spektroskopischen Messungen. Bei Herrn Prof. Dr. **David Rice** (Sheffield, UK) und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. **Svetlana Sedelnikova**, möchte ich mich für die Arbeiten zur Strukturaufklärung der Ectoin-Synthese bedanken.

Bei Frau Dipl.-Biol. **Claudia Wegscheid** bedanke ich mich ganz herzlich für eine langjährige Freundschaft, eine äußerst effektive Paperversorgung und vor allem für die vielen, vielen, vielen aufmunternden, lustigen, unterhaltsamen, motivierenden, lehrreichen und immer wieder aufbauenden, teilweise recht langen Telefonate. In diesem Zusammenhang auch ein Dank an O₂ dafür, dass die Standleitung nach Hamburg kostenfrei zur Verfügung gestellt wurde (wenn die mal Pleite gehen lag's an uns).

Nicht zuletzt geht ein ganz dickes „Dankeschön“ an **meine Familie**. Insbesondere an meine Eltern, die so bereitwillig einfach mal alles toll finden und unterstützen was ich tue, auch wenn nicht immer klar ist, warum das Kind sich über so einen blauen Fleck in einem Gel freut.