

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

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne Korsten

aus

Mönchengladbach

Bonn, 2011

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

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

Tag der Promotion: 20.09.2011

Erscheinungsjahr: 2012

“Anybody who has been seriously engaged in scientific work of any kind realizes that over the entrance to the gates of the temple of science are written the words: ‘Ye must have faith.’”

(Max Planck)

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	V
Abkürzungen	VIII
I. Einleitung	1
1. Extremophile Organismen	1
1.1. Halophilie	4
2. Strategien der Osmoadaptation extremophiler Organismen	5
2.1. Akkumulation anorganischer osmoregulatorischer Solute („salt-in strategy“)	6
2.2. Akkumulation organischer osmoregulatorischer Solute („organic osmolyte strategy“)	7
2.3. Klassen der kompatiblen Solute	7
2.4. Allgemeines Vorkommen des kompatiblen Soluts NAGGN	10
2.5. Biosynthese des kompatiblen Soluts NAGGN	11
2.6. Osmoadaptation	13
2.6.1. Osmoadaptation des halotoleranten Bakteriums <i>Pseudomonas putida</i>	13
2.6.2. Osmoadaptation des halotoleranten Stammes <i>E. coli</i>	14
2.6.3. Osmoadaptation des moderat halophilen Stammes <i>H. elongata</i>	15
3. Expressionssysteme	17
3.1. <i>E. coli</i> als Expressionsstamm für halophile Enzyme	18
3.2. <i>H. elongata</i> als Expressionsstamm für halophile Enzyme	19
4. Zielsetzung dieser Arbeit	21
II. Material und Methoden	23
1. Verwendete Stämme	23
2. Nährmedien	24
2.1. Nährmedien für <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> und <i>H. elongata</i> Stämme	24
2.2. Medium und Lösungen L ⁻¹ für die Fermentation von <i>H. elongata</i> AKB	25
2.3. Medium für die Transformation	26
2.4. Selektionsmedium für homologe Rekombination	26
2.5. Medienzusätze	27
3. Lösungen und Puffer	28
3.1. Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden	28
3.2. Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Arbeiten	29
3.3. Lösungen und Puffer für analytische Verfahren	29
3.4. Lösungen und Puffer für enzymatische Assays	30
4. Bakterienanzucht und –kultivierungsverfahren	32
4.1. Mikrobanksystem	32
4.2. Stammhaltung	32
4.3. Allgemeine Bakterienkultivierung	33
4.4. Anzucht von Bakterien in Mikrotiterplatten	33
4.5. Fermentation	34
5. molekularbiologische Methoden	35
5.1. verwendete Plasmide	35
5.2. Primer	36
5.3. PCR – Polymerasekettenreaktion	37
5.3.1. SOE-PCR (splicing by overlap extension)	38
5.3.2. Kolonie – PCR	38
5.4. Gewinnung von DNA	39
5.4.1. Isolierung genomischer DNA	39
5.4.2. Plasmidisolierung	39
5.5. Modifizierung von DNA	39
5.5.1. Restriktion	39

Inhaltsverzeichnis

5.5.2.	Dephosphorylierung	40
5.5.3.	Ligation	40
5.6.	Reinigung von DNA nach enzymatischen Modifikationen	40
5.7.	Transformation von <i>E. coli</i>	40
5.7.1.	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	40
5.7.2.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	41
5.8.	Agarosegelelektrophorese	41
5.9.	Herstellung chromosomaler Mutanten	42
5.10.	Blau-Weiß-Selektion	43
5.11.	DNA Größenbestimmung und Quantifizierung	44
5.12.	Konjugation von <i>H. elongata</i>	45
5.13.	Sequenzierungen	46
6.	Biochemische Methoden	46
6.1.	Expressionssystem pET-System	46
6.2.	Ultraschallzellaufschluss	47
6.3.	Ni-Chelat-Affinitätschromatographie	47
6.4.	Proteinprobenaufbereitung	48
6.5.	BCA-Assay zur Proteinbestimmung	48
6.6.	SDS-PAGE	49
6.7.	Proteingrößenstandard	50
6.8.	Enzymatische Aktivitätstests	51
6.8.1.	N-Acetyl-Transferase Assay	51
6.8.2.	LDH-Assay	52
7.	Analytik	54
7.1.	Extraktion	54
7.2.	Soxhlet-Extraktion	54
7.3.	Vakuum-Destillation	55
7.4.	Isokratische HPLC	55
7.5.	Aminosäurenanalyse via Gradienten-HPLC	56
7.6.	NMR-Spektroskopie („Kernresonanz-Spektroskopie“)	57
8.	chromatographische Verfahren	59
8.1.	Kieselgelsäule	59
8.2.	Größenausschlusschromatographie	59
8.3.	Ionenverzögerungschromatographie	59
8.4.	Anionenaustauschchromatographie	60
8.5.	Totalentsalzer	60
9.	Chemische Synthesen	62
9.1.	Glutamin-1-amid	62
10.	Stammbaumanalysen	64
10.1.	BLAST-Suche (basic local alignment search tool)	64
10.2.	Stammbaum-Konstruktion	64
11.	lösungsmittelzugängliche Oberflächenbestimmung kompatibler Solute	65
12.	Chemikalien Liste	66
13.	Geräteliste	70
III.	Ergebnisse	72
1.	phylogenetische Analysen des NAGGN-Genclusters	72
1.1.	Stammbaumkonstruktion basierend auf dem <i>Neighbor-Joining</i> Prinzip	73
1.2.	Stammbaumkonstruktion basierend auf dem <i>Maximum Parsimony</i> Prinzip	75
2.	<i>P. putida</i> KT2440 - Produktion und Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN	77
2.1.	Anzucht von <i>P. putida</i> KT2440 mit ansteigender Medium Salinität	77
2.2.	Anzucht von <i>P. putida</i> KT2440 mit verschiedenen C-Quellen	78
2.3.	Fermentation des Stammes <i>P. putida</i> KT2440	80
2.4.	Aufreinigungsverfahren für das kompatible Solut NAGGN	82

Inhaltsverzeichnis

2.4.1.	Aufreinigung von NAGGN über eine Kieselgelsäule	83
2.4.2.	Aufreinigung von NAGGN über eine Größenausschlusschromatographie	84
3.	Konstruktion des Vektors pK18-naggn	87
3.1.	Konstruktion des Vektors pK18-3,5	87
3.2.	Konstruktion des Vektors pK18-naggn	91
4.	Aufklärung der Biosynthese	95
4.1.	Deletionen der einzelnen NAGGN-Biosynthesegene in dem Vektor pK18-naggn	95
4.1.1.	Analyse der kompatiblen Solute und des Aminosäuregehalts in den plasmidtragenden <i>E. coli</i> DH5 α Stämmen	96
4.1.2.	Analyse der kompatiblen Solute und des Aminosäuregehalts in <i>E. coli</i> BKA-13	98
4.2.	Überexpression einzelner NAGGN-Biosynthesegene	101
4.2.1.	Überexpression des Enzyms PP1750 <i>in vivo</i>	101
4.2.2.	Überexpression und Reinigung des Enzyms PP1749	102
4.3.	In vitro Assay des N-Acetyltransferase PP1749	104
4.3.1.	Chemische Synthese des Glutamin Derivats Glutamin-1-amid	104
4.3.2.	N-Acetyltransferase Assay des Enzyms PP1749 mit C-terminalem His-Tag	105
5.	<i>E. coli</i> – heterologe NAGGN Expression	108
5.1.	Heterologe Expression des kompatiblen Solut NAGGN in <i>E. coli</i> DH5 α	108
5.2.	Heterologe Expression des kompatiblen Solut NAGGN in <i>E. coli</i> BKA-13	109
6.	<i>H. elongata</i> – heterologe NAGGN Expression	112
6.1.	Codon-Usage-Analysen	112
6.2.	Genomische Integration des NAGGN-Genclusters in <i>H. elongata</i>	114
6.3.	Salzabhängige Expression des kompatiblen Solut NAGGN	119
6.4.	¹³ C-NMR Spektroskopie des Stammes <i>H. elongata</i> AKB	120
7.	<i>H. elongata</i> AKB - Produktion und Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN	122
7.1.	Fermentation des Stammes <i>H. elongata</i> AKB	122
7.2.	Zweischritt-Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN	124
7.2.1.	Anionenaustauschchromatographie	124
7.2.2.	Ionenverzögerungschromatographie	126
7.3.	Einschritt-Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN	127
7.3.1.	Mischbetttaucher respektive Vollentsalzer	127
7.3.2.	¹³ C-NMR-Spektroskopie des aufgereinigten NAGGN	129
7.4.	NAGGN-Gehalte in den Zellen und im Medium <i>H. elongata</i> AKB vs. <i>P. putida</i> KT2440	130
7.5.	Spezifische Produktivität der NAGGN-Produzenten	131
8.	Charakterisierung des kompatiblen Solut NAGGN	134
8.1.	Solut Supplementierung des Stammes <i>H. elongata</i> WUB02 im Mikrotiterplattenmaßstab	134
8.2.	Aufnahmeversuch des kompatiblen Solut NAGGN durch <i>E. coli</i> DH5 α	135
8.3.	Trockenstabilisierung ganzer Zellen durch das kompatible Solut NAGGN	137
8.4.	Enzymstabilisierende Wirkung des kompatiblen Solut NAGGN	138
8.5.	Kristallisierung des kompatiblen Solut NAGGN	140
8.6.	Oberflächenbestimmung der lösungsmittelzugänglichen Bereiche verschiedener kompatibler Solute	140
IV.	Diskussion	145
1.	Phylogenetische Analysen des NAGGN-Genclusters	145
2.	<i>P. putida</i> KT2440 – Produktion und Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN	148
2.1.	Optimierung der NAGGN Produktion	148
2.2.	Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN aus <i>P. putida</i> KT2440	149
3.	NAGGN-Biosynthese	152
3.1.	Deletionen der NAGGN-Biosynthese	152
3.2.	Überexpression der einzelnen Biosynthesegene	154
3.3.	Enzymatischer N-Acetyltransferase Assay	155
3.4.	Einordnung der Daten in Sagot's Modell der NAGGN Biosynthese	156
4.	<i>E. coli</i> - heterologe NAGGN Expression	161

5. <i>H. elongata</i> - Heterologe NAGGN Expression und Optimierung der Expressionsbedingungen	163
6. Aufreinigung und Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN	165
6.1. Fermentation des Stammes <i>H. elongata</i> AKB	165
6.2. Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN	166
6.3. Kristallisation	168
6.4. NAGGN-Gehalte in den Zellen und im Medium von <i>H. elongata</i> AKB vs. <i>P. putida</i> KT2440	168
6.5. Produktivitäten	170
7. Charakterisierung des kompatiblen Solut NAGGN	172
7.1. Solut Supplementierung von <i>H. elongata</i> WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$)	172
7.2. Solut Supplementierung von <i>E. coli</i> DH5 α	173
7.3. Trockenstabilisierung ganzer Zellen durch das kompatible Solut NAGGN	174
7.4. LDH-Assay	174
7.5. Charakterisierung der lösungsmittelzugänglichen Oberflächen	176
8. Ausblick	181
V. Zusammenfassung	184
VI. Literaturverzeichnis	186
VII. Anhang	203

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1: Übersicht über kompatible Solute.....	9
Abb. 2: Das kompatible Solut NAGGN	12
Abb. 3: (A) 100 bp plus DNA-Leiter #SM0321 (B) 1 kb DNA-Leiter #SM0311 (Fermentas, Vilnius, Litauen)	44
Abb. 4: Der Proteingrößenstandard #SM0671 von der Fa. Fermentas (Vilnius).	50
Abb. 5: Chemische Synthese der Verbindung Glutamin-1-amid.....	63
Abb. 6: Die evolutionäre Beziehung der 36 Spezies wurde unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode erschlossen	73
Abb. 7: Die evolutionäre Beziehung der 36 Spezies wurde unter Verwendung der Maximum Parsimony Methode erschlossen.	75
Abb. 8: Solutspektrum von <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 bei einer Anzucht mit Medium Salinitäten in einem Bereich von 1 % bis 6 % NaCl.	77
Abb. 9: Anzucht des Stammes <i>Pseudomonas putida</i> mit unterschiedlichen C-Quellen in dem Mineralsalzmedium MM63-3.	78
Abb. 10: Fermentation des Stammes <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.	80
Abb. 11: NAGGN-Gehalt der Proben, die während der Fermentation des Stammes <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 entnommen wurden.....	81
Abb. 12: Zum Abschluss der Fermentation wurden die Gehalte der Osmolyte NAGGN, Mannitol und Trehalose bestimmt. Die Werte resultieren aus einer Einfachbestimmung.	82
Abb. 13: Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN über eine Kieselgelsäule (Woelm).	83
Abb. 14: Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN über eine Gelfiltrationssäule. Die in den Fraktionen vorhandenen Solute wurden über HPLC-Analysen bestimmt.	85
Abb. 15: Klonierungsschema für die Konstruktion des Vektors pK18-3,5.	89
Abb. 16: Der erstellte Vektor pK18-3,5 wurde durch Restriktionsanalysen überprüft.	90
Abb. 17: Konstruktion des Vektors pK18-naggn.	92
Abb. 18: Der erstellte Vektor pK18-naggn wurde im Hinblick auf die korrekte Konstruktion durch Restriktionsanalysen überprüft.....	93
Abb. 19: Gehalte der kompatiblen Solute und der Aminosäuren des Stammes <i>E. coli</i> DH5 α mit den jeweils einzelnen eingebrachten Plasmiden pK18-naggn, pK18- Δ PP1750, pK18- Δ PP1749, pK18- Δ PP1748 und LV (=Leervektor). Die Anzucht erfolgte in dem Medium MM63 bei NaCl Konzentrationen von 1 %, 2 % und 3 %. Die Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.	96
Abb. 20: Analyse der kompatiblen Solute und des Aminosäurespektrums in <i>E. coli</i> BKA-13 mit den jeweils einzelnen eingebrachten Plasmiden pK18-naggn, pK18- Δ PP1750, pK18- Δ PP1749 und pK18- Δ PP1748. Die Anzucht erfolgte in dem Medium MM63 bei einer NaCl Konzentration von 2 %. Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.	99
Abb. 21: Aminosäurenanalyse der Zellextrakte durch HPLC-Messungen der <i>in vivo</i> Überexpression des Enzyms PP1750 (AsnB) in <i>E. coli</i> BL21(DE3), LV (=Leervektor).....	101
Abb. 22: SDS-PAGE der heterologen Überexpression des Proteins PP1749 in <i>E. coli</i> BL21(DE3) mit anschließender affinitätschromatographischer Aufreinigung.....	103
Abb. 23: ¹³ C-NMR spektroskopische Messung der gereinigten Verbindung Glutamin-1-amid.	105
Abb. 24: Enzymatischer Aktivitätstest des Enzyms PP1749 <i>in vitro</i>	106
Abb. 25: Solutgehalte des Stammes <i>E. coli</i> DH5 α pK18-naggn, der in dem Mineralsalzmedium MM63 mit ansteigendem Salzgehalt (NaCl) von 1 %, 2 % und 3 % angezogen wurde.	108
Abb. 26: Solutgehalt des Stammes <i>E. coli</i> BKA-13 in dem Mineralsalzmedium MM63 mit einem Salzgehalt (NaCl) zwischen 1 und 3 %. Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.....	110
Abb. 27: (A) Bestimmung des GC-Gehalts und (B) der Codon-Usage der Organismen (<i>E. coli</i> , <i>C. salexigens</i> und <i>P. putida</i>) mittels des Tools Graphical Codon-Usage Analyzer (GCUA).	113
Abb. 28: Genetische Organisation der NAGGN-Region des Stammes <i>H. elongata</i> AKB und der Ectoin-Region des Stammes <i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T	115
Abb. 29: Die Amplifikation des Gens <i>ectC</i> (436 bp) diente in dieser Kolonie-PCR zur Überprüfung, ob es sich nach dem Konjugationsschritt bei den Konjuganten um den Rezipientenstamm <i>H. elongata</i> oder um den Donorstamm <i>E. coli</i> S-17-1 handelt.	116

Abb. 30: Kolonie-PCRs zur Überprüfung der Integration des NAGGN-Genclusters in das Genom von <i>H. elongata</i> .	117
Abb. 31: Kolonie-PCR zur Vervielfältigung des DNA-Fragments bestehend aus dem partiellen Gen <i>PP1749</i> und dem vollständigen Gen <i>PP1748</i> zum Nachweis der genomischen Integration des NAGGN-Genclusters	118
Abb. 32: HPLC-Analyse des gefriergetrockneten und extrahierten Zellmaterials des Stammes <i>H. elongata</i> AKB mit Medien-Salinitäten von 1-6 % und Auftragung der entsprechenden Wachstumsraten μ .	119
Abb. 33: ^{13}C -NMR spektroskopische Analyse des getrockneten und extrahierten Zellmaterials von <i>H. elongata</i> AKB.	120
Abb. 34: Fermentation des Stammes <i>Halomonas elongata</i> AKB mit einem Arbeitsvolumen von 15 L unter Verwendung des Mineralsalzmediums GC. Aufgenommene	122
Abb. 35: HPLC-Analysen der Verlaufspalten, die während der Fermentation des Stammes <i>H. elongata</i> AKB entnommen wurden.	123
Abb. 36: Anionenaustauschchromatographie (Säule Dowex 1x8 Cl^- Form) mit dem extrahierten Zellmaterial des Stammes <i>H. elongata</i> AKB.	124
Abb. 37: Ionenverzögerungschromatographie (Säule AG11A8-Biorad).	126
Abb. 38: Mischbetttaucher (Serdolit MB – Serva)	128
Abb. 39: ^{13}C -NMR-Spektrum des kompatiblen Soluts NAGGN.	129
Abb. 40: HPLC-Analyse zur Bestimmung der NAGGN-Gehalte in den Zellen und im Medium der Stämme <i>P. putida</i> KT2440 (PP) und <i>H. elongata</i> AKB (AKB), die in MM63-Medium mit 3 % bzw. 4 % NaCl Zusatz angezogen wurden.	130
Abb. 41: Die Produktivitäten der NAGGN produzierenden Stämme bei unterschiedlichen Salinitäten (NaCl [%]) sind gezeigt.	131
Abb. 42: Anzucht der <i>H. elongata</i> Mutante WUB02 (ΔectA , ΔectC) im Mikrotiterplattenmaßstab mit Zusatz verschiedener kompatibler Solute mit einer Konzentration von 2 mM.	134
Abb. 43: HPLC-Analyse der intrazellulären Solutgehalte des Stammes <i>E. coli</i> DH5 α bei einer Anzucht im Medium mit 3 % NaCl. In den Versuchsansätzen wurde eine Supplementierung mit 2 mM Betain bzw. 2 mM NAGGN durchgeführt. Als Kontrolle diente eine unsupplementierte Kultur.	136
Abb. 44: Der Stamm <i>H. elongata</i> WUB02 wurde mit Zusatz verschiedener kompatibler Solute in einer Konzentration von 2 mM gefriergetrocknet und anschließend das Wachstum der Zellen auf Agarplatten als KBE/mL dokumentiert (KBE= koloniebildende Einheiten). OH-Ectoin=Hydroxyectoin	137
Abb. 45: LDH-Assay – die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase wurde mit Zusatz unterschiedlicher kompatibler Solute (50 mM) vor und nach mehreren Einfrier-Auftauzyklen bestimmt.	138
Abb. 46: Kristalle des kompatiblen Soluts NAGGN.	140
Abb. 47: Bestimmung der Oberflächen von kompatiblen Soluten.	141
Abb. 48: Die Oberflächen der kompatiblen Solute Betain, NAGGN, Ectoin und Hydroxyectoin. Die polaren Oberflächenbereiche sind in blau (positiv) und rot (negativ) dargestellt und die apolaren Bereiche in weiss.	143
Abb. 49: Modifiziert nach Schwibbert <i>et al.</i> , 2010. (A) Nukleotidsequenz der Promotorregion des NAGGN-Genclusters aus dem Stamm <i>H. elongata</i> AKB. Die Transkriptionsinitiationsstellen sind mit +1 gekennzeichnet. (B) Nukleotidsequenz der Promotorregion des Gens <i>PP1748</i> aus dem Stamm <i>H. elongata</i> AKB.	153
Abb. 50: Biosyntheschema des kompatiblen Soluts NAGGN modifiziert nach Sagot <i>et al.</i> , 2010. Rot: Acetylgruppe, blau: Carboxamidgruppe bzw. Aminogruppe.	158
Abb. 51: Die lineare Regressionslinie (schwarze Linie) hat eine negative Steigung mit einem Korrelationskoeffizient von 0,81, der zeigt, dass die Rückgrat/Osmolyt Interaktionen favorisiert werden je polarer das Osmolyt ist (Street <i>et al.</i> , 2006).	178
Abb. 52: Die Oberflächenpotentiale der Enzyme Laktatdehydrogenase (A), Glucaratdehydratase (B) und der Pfu-Polymerase (C) wurden mit dem Program PyMOL und dem Plugin APBS berechnet.	180
Abb. 53: Konstruktion des Vektors pET15b- <i>PP1750</i> . Als Ausgangsvektor diente der Vektor pET15b in den das Gen <i>PP1750</i> kloniert wurde.	203
Abb. 54: Klonierungsschema des Vektors pET22b(+)- <i>PP1749</i> . Als Ausgangsvektor diente der Vektor pET22b(+) verwendet, in den das Gen <i>PP1749</i> inseriert wurde.	204
Abb. 55: Klonierungsschema des Vektors pK18- Δ <i>PP1750</i> . Als Ausgangsvektor diente der Vektor pK18-naggn, in den die Amp ^R -Kassette aus dem Vektor pUC18 inseriert wurde.	205

Abb. 56: Klonierungsschemata der Vektoren pK18- Δ PP1749 und pK18- Δ PP1748. Als Ausgangsvektor diente der Vektor pK18-naggn. 206

Abb. 57: Region des NAGGN-Genclusters in *H. elongata* AKB..... 209

Tabellen

Tab. 1: verwendete Stämme 23

Tab. 2: verwendete Antibiotika und deren eingesetzte Konzentrationen 33

Tab. 3: verwendete Plasmide und deren genotypische Bezeichnungen und Quellen..... 35

Tab. 4: verwendete Primer und deren Sequenzen und Besonderheiten. Die Hybridisierungsbereiche innerhalb der Primersequenz mit der Nukleotidsequenz des NAGGN-Genclusters aus *P. putida* KT2440 sind unterstrichen. 36

Tab. 5: PCR-Reaktionsansatz 37

Tab. 6: PCR-Programm 38

Tab. 7: Zusammensetzung der SDS-PAGE 50

Tab. 8: Zusammensetzung des Acrylamid-Mixes 50

Tab. 9: Zusammensetzung des Enzymtests für den Nachweis der Thiolgruppen..... 52

Tab. 10: Der Reaktionsansatz, in dem die LDH mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten stabilisiert wird. ... 53

Tab. 11: Enzymtest der Lactatdehydrogenase 53

Tab. 12: Chemikalienliste 66

Tab. 13: Liste der verwendeten Enzyme 69

Tab. 14: Geräteliste 70

Abkürzungen

μ	Micro
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADAM	1-Aminoadamantan
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzkassette
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	4,4'-Bichinolin-2,2'-Dicarbonsäure
Betain	Glycin-Betain
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar / Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Celcius
c _{eq}	Äquivalentkonzentration, Normalität (N)
CoA	Coenzym A
CoA-SH	Coenzym mit einer Sulfhydrylgruppe
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carboxyterminus
D ₂ O	deuteriertes Wasser
Da	Dalton
DGP	Di-Glycerol-phosphat
DIP	Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-Phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure)
Ectoin	1,4,5,6,-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
Fa.	Firma
FastAP	alkalische Phosphatase
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride
g	Schwerebeschleunigung / Fallbeschleunigung
g	Gramm
GlnA	Glutamin-1-amid
GluA	Glutamat-1-amid
h	Stunde

Abkürzungen

H ₂ O _{demin}	demineralisiertes Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hydroxyectoin	S,S-β-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galaktopyranosid
Kan ^R	Kanamycinresistenzkassette
kb	Kilobasen
Km ^R	Kanamycin-Resistenzkassette
L	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
LBG	Luria Bertani Broth mit Glucose
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site)
min	Minute
n	nano
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NAGGN	N-Acetyl-glutaminylglutamin-1-amid
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Aminoterminus
OD _{xxx}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
OH-Ectoin	siehe Hydroxyectoin
p.a.	<i>pro analysi</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Base</i>
PP1748	Gen der M42-Peptidase aus <i>P. putida</i> KT2440
PP1748	M42-Peptidase aus <i>P. putida</i> KT2440
PP1749	Gen der N-Acetyltransferase aus <i>P. putida</i> KT2440
PP1749	N-Acetyltransferase aus <i>P. putida</i> KT2440
PP1750	<i>asnB</i> , Gen der Asparaginsynthetase aus <i>P. putida</i> KT2440
PP1750	AsnB, Asparaginsynthetase aus <i>P. putida</i> KT2440
ppm	<i>parts per million</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
RI	Brechungsindex
RNaseA	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S	Sievert

Abkürzungen

SDS-PAG	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese
SOE	<i>Splicing by Overlap Extension</i>
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Temp	Temperatur
TG	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofuran
Tm	Schmelztemperatur
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
TMSP	Natriumtrimethylsilylpropionat
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
λ	Wellenlänge

I. Einleitung

1. Extremophile Organismen

Mikrobielle Organismen besiedeln in ihrer Vielfalt sehr viele unterschiedliche Lebensräume, die sich von moderaten Umweltbedingungen (pH im neutralen Bereich, 20 °C bis 40 °C, 1 atm Luftdruck, Vorkommen entsprechender Mengen an Wasser, Nährstoffen und Salz) bis hin zu extremen Lebensräumen erstrecken. Der Ausdruck der „extremen“ Umweltbedingungen ist im Wesentlichen aus der menschlichen Sicht geprägt, aus der Tatsache resultierend, dass es sich für uns Menschen um lebensfeindliche Habitate handelt. Lebensräume, die als extrem bezeichnet werden, weisen unterschiedliche Charakteristika auf. Es gibt Habitate mit sehr niedrigen und sehr hohen Temperaturen, mit sehr sauren oder alkalischen pH-Werten, niedrigem Nährstoffvorkommen, hohem Druck oder mit einer hohen Salinität (Satyanarayana *et al.* 2005).

Niedrige Temperaturen treten in frischem oder marinem Wasser, in Böden und Gewässern der Polarregionen Arktis und Antarktis, in Hochalpinregionen, in Gletschern oder auch in vom Menschen geschaffenen Lebensräumen, wie in Kühl- und Gefrierschränken, auf (Brambilla *et al.*, 2001; Bowman & McCuaig, 2003; Gordon *et al.*, 2000; Satyanarayana *et al.* 2005; Spiegel & Priscu, 1996). Kalte Habitate werden oft durch Mikroorganismen, Psychrophile genannt, dominiert, u.a. Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Archaea, Hefen, Pilze und Protisten (Morgan-Kiss *et al.*, 2006).

Mechanismen für die Adaption an kalte Lebensräume sind *cold-shock*- und *antifreeze*-Proteine, veränderte Kinetiken von Schlüsselenzymen und die Entwicklung von Membranen, die eine erhöhte Fluidität durch eine Akkumulation polyungesättigter Fettsäuren aufweisen (Morgan-Kiss *et al.*, 2006). An Kälte adaptierte Proteine sind polarer und besitzen weniger hydrophobe Reste, keine Salzbrücken, reduzierte hydrophobe Interaktionen zwischen den Untereinheiten, d.h. insgesamt eine erhöhte Flexibilität, im Gegensatz zu thermophilen Enzymen, die eine erhöhte Stabilität aufweisen (Russel, 1998; Russel, 2000). Potentielle biotechnologische Anwendungen von Enzymen finden sich in dem Einsatz des „*ice nucleation proteins*“, das die Eiskristallbildung katalysiert, in der Eiscremeherstellung oder in der Produktion synthetischen Schnees. Eine psychrophile β -Galactosidase verringert den Laktosegehalt der Milch (bedeutsam für Laktose-intolerante Menschen) (Russel, 2000).

Vulkanische und geothermale Gegenden erreichen Temperaturen, die oft höher als der Siedepunkt des Wassers sind. Temperaturen bis zu 70 °C werden in durch

Sonneneinstrahlung aufgeheiztem Abfall, in Böden und Sedimenten erreicht. Ähnliche Bedingungen herrschen in Komposthaufen, Sägemehl- und Kohleabfallhaufen. Thermale Quellen werden durch vulkanische Aktivitäten auf relativ konstante Temperaturen von über 60 °C aufgeheizt. Thermophile Organismen mit Wachstumstemperaturen zwischen 70 °C und 100 °C sind in den Domänen Archaea und Bacteria verbreitet und sind meist marinen Ursprungs (Ladenstein & Antranikian, 1998). Es gibt nicht nur thermophile (*Thermus aquaticus*) und hyperthermophile Bakterien (*Pyrococcus furiosus*, *Nannoarchaeum equitans*), sondern auch thermophile Pilze, Algen und Protozoen (Brock & Freeze, 1969; Fiala & Stetter, 1986; Jahn *et al.*, 2008; Satyanarayana *et al.* 2005). Anpassungsmechanismen an hohe Temperaturen sind auf Proteinebene beschrieben worden. Die Sequenz der Proteine ist derart modifiziert, dass ein größerer Anteil hydrophober Reste verdeckt ist. Auch das Verhältnis Oberfläche zu Volumen des Proteins ist bei thermophilen Proteinen vermindert, so dass die internen Wechselwirkungen zu einem kompakteren Protein führen (Ladenstein & Antranikian, 1998). Biotechnologische Anwendungen finden Enzyme wie DNA-Polymerasen (van der Oost *et al.*, 1998) Amylasen, Xylanasen und proteolytische Enzyme (Ladenstein & Antranikian, 1998). Interessante potentielle Anwendungen thermophiler Organismen finden sich in dem Bereich der Biodegradation von Verbindungen wie Alkanen und Phenolen, die bei der Ölverarbeitung entstehen, sowie weiterer Verbindungen wie Benzene und Toluene (Hauptkomponente von Mineralöl), polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) (Gaswerke) und chlorierte Kohlenwasserstoffe. Die gemeinsame Komponente dieser Verbindungen ist die schädliche Wirkung auf Mensch und Umwelt in Kombination mit einer relativ schlechten Löslichkeit, die aber bei erhöhten Temperaturen gesteigert werden kann. Thermophile Organismen und deren Fähigkeit, einen großen Anteil solcher Verbindungen zu verstoffwechseln und zu nicht toxischen Substanzen umzusetzen, macht sie zu idealen Kandidaten für Biodegradationsprozesse (Müller *et al.*, 1998).

Lebensräume, die sich durch einen außerordentlich sauren pH-Wert, geringer als pH 3, auszeichnen, treten vermehrt in Gegenden auf in denen Steinkohle, Braunkohle oder Schwefel abgebaut wird. Schwefel und Pyrit, die dem Luftsauerstoff ausgesetzt sind, werden in einer exothermen Reaktion abiotisch zu Schwefelsäure bzw. Eisen(III) oxidiert. Vorhandene Mikroorganismen beschleunigen diesen Prozess jedoch drastisch (Senko *et al.*, 2008). Die Ansäuerung solcher Habitats wird durch die Schwefelsäure verursacht (Gimmler *et al.*, 1991). Alkaline Umweltbedingungen werden in Böden durch die mikrobielle Ammonifizierung und Sulfatreduktion verursacht. Hohe pH-Werte in Gewässern oder wässrigem Milieu werden

meist durch ausgelaugte Silikat Minerale verursacht. Soda-Seen oder Soda-Wüsten, wie East African Rift Valley oder der indische Sambhar See sind bekannte Habitate dieses Typs (Satyanarayana *et al.*, 2005).

Alkaliphile Mikroorganismen regeln die Aufrechterhaltung eines neutralen oder leicht alkalischen pH durch eine Na⁺-abhängige pH-Homöostase. Durch H⁺/Na⁺-Antiporter werden Natriumionen in den extrazellulären Raum entlassen und gleichzeitig werden H⁺-Ionen ins Zytoplasma transportiert. Durch Na⁺-Symporter, die Na⁺-Ionen in die Zelle transportieren, wird die Natriumbilanz wieder ausgeglichen. Neben diesen Anpassungsmechanismen gibt es noch weitere, die dem Review Artikel von Krulwich *et al.* (1997) zu entnehmen sind.

Böden und Ozeane repräsentieren typische Habitate mit geringen Nährstoffkonzentrationen. Dadurch wird es Organismen, insbesondere auch Mikroorganismen, erschwert sich in solchen Lebensräumen anzusiedeln. Ozeane zeichnen sich aber auch noch durch einen weiteren Parameter aus, der vor allem in der Tiefsee an Bedeutung gewinnt, nämlich dem hydrostatischen Druck. Organismen, die einem hohen hydrostatischen Druck standhalten, nennt man barophile oder piezophile Organismen. Einige Vertreter sind aus tiefen Öl- oder Schwefelquellen isoliert worden und trotzen gleichsam zwei extremen Bedingungen, einem hydrostatischen Druck zwischen 200 und 400 bar und einer Temperatur von ca. 100 °C (Satyanarayana *et al.*, 2005). Die meisten barophilen oder barotoleranten Organismen gehören zu den γ -Proteobakterien (Priour & Marteinsson, 1998) der Gattung *Shewanella* (Kato & Bartlett, 1997). Aber es wurde auch eine Koexistenz von archaealen Mikroorganismen mit Bakterien der Gattung *Pseudomonas* im Marianengraben entdeckt (Li *et al.*, 1999).

Viele Habitate erfordern eine Anpassung an unterschiedliche „extreme“ Bedingungen. Bakterien, die die Tiefsee besiedeln müssen gleichsam Kälte und einem hohen hydrostatischen Druck standhalten (Morgan-Kiss *et al.*, 2006), ebenso wie die an Hitze angepassten Organismen der „Black Smoker“ gleichzeitig auch barophil sind (Ladenstein & Antranikian, 1998). An Salz angepasste Organismen, Halophile genannt, kommen sowohl in kalten Habitaten wie z. B. der Antarktis vor (Morgan-Kiss *et al.*, 2006; Spigel & Priscu, 1996), als auch in Sodaseen mit sehr alkalischem pH-Wert (Mormile *et al.*, 1999; Sorokin *et al.*, 2007; Sorokin *et al.*, 2008). Einige Mikroorganismen, die die Anpassung an multiple Extreme in sich vereinen, werden als polyextremophile Organismen bezeichnet. Die anaeroben Mikroorganismen *N. thermophilus*, *N. trueperi* und *N. wadinatrunensis* wurden aus dem alkalischen, hypersalinen See Wadi An Natrun (Ägypten) isoliert. Sie sind an die

Extreme Hitze, Salz und Alkali angepasst und erfüllen damit den Anspruch der Klassifizierung in die Polyextremophilen (Bowers *et al.*, 2009).

1.1. Halophilie

Halophile Organismen sind in den drei Domänen Archaea, Bacteria und Eukarya vertreten. Sie sind in den Domänen des Lebens sehr verbreitet und werden vielen sehr unterschiedlichen Phyla zugeordnet. Nachweislich wurden halophile Organismen, die Vertreter der Phyla Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes und Bacteroides sind, isoliert und charakterisiert (Oren, 2008).

Hypersaline Lebensräume enthalten Salzkonzentrationen, die vergleichbar mit denen des Meeres von 3,5 % (ca. 0,6 M) sind (Bowers *et al.*, 2009; Satyanarayana *et al.*, 2005). Salzseen, die durch die Evaporation des Seewassers entstanden sind, enthalten Salzkonzentrationen zwischen 3 und 3,5 M (17,5 % und 20,5 %). Die zwei größten und am besten untersuchten hypersalinen Seen sind der Great Salt Lake (USA) und das Tote Meer.

Halophile Organismen treten in thalassohalinen Habitaten, dem Meerwasser, und in hypersalinen Habitaten auf wie z. B. in Meerwassersalinen, Salzseen und salzhaltigen Böden. Es gibt aber auch kalte Salzseen in der Antarktis und alkalische saline Milieus, wie im Lake Magadi (Kenia) oder Wadi An Natrun (Ägypten), in denen salzangepasste Organismen leben. Ungewöhnlicher sind Halophile, die aus gepökeltem und getrocknetem Fisch, aus Fischinnereien, Soyasoßenmaische und aus ähnlichen Lebensmittelprodukten isoliert wurden (Ventosa *et al.*, 1998; Onishi *et al.*, 1980).

Die Klassifizierung halophiler Organismen von 1978 (Kushner) erfolgte basierend auf den unterschiedlichen Salinitäten, die von den Organismen toleriert und teilweise auch für ein Wachstum benötigt wurden und besitzt auch heute noch Gültigkeit. Extrem halophile Organismen zeigen ein Wachstumsoptimum zwischen 2,5 und 5,2 M Salz. Grenzwertig (*borderline*) extremophile Organismen haben mit 1,5 – 4,0 M ein sehr breites Salinitätsspektrum, in dem sie zum Leben befähigt sind. Einen im Vergleich sehr viel niedrigeren Salinitätsbereich weisen moderat halophile Organismen mit 0,5 – 2,5 M auf (Kushner, 1978). Eine vereinfachte Version der Klassifizierung halophiler Organismen wurde durch Oren (2008) aufgestellt, wonach alle Organismen als halophil betrachtet werden, deren optimale Salzkonzentration bei 50 g/L (0,85 M oder 5 %) NaCl liegt, einhergehend mit einer Salztoleranz von mindestens 100 g/L (1,7 M oder 10 %).

2. Strategien der Osmoadaptation extremophiler Organismen

Der Konzentrationsanstieg niedermolekularer Solute in einer wässrigen Umgebung hat für die Mikroorganismen eine geringere Zugänglichkeit des vorhandenen Wassers zur Folge. Die Verringerung der Verfügbarkeit des externen Wassers führt wiederum zu einem verringerten Zellvolumen und damit in Zusammenhang stehend einem Wasserverlust der Zellen, der letztendlich metabolische Systeme und Makromoleküle tangiert (DaCosta *et al.*, 1998). Der Turgordruck ist der Druck, der bei einem Wassereinstrom von der Zytoplasmamembran auf die Zellwände ausgeübt wird. Diese Definition ist ursprünglich für pflanzliche Zellen entwickelt worden, lässt sich aber auch auf Bakterienzellen übertragen (Brown, 1976; Csonka, 1989). Das für die Zelle verfügbare Wasser wird auch als Wasseraktivität (a_w) ausgedrückt. Der osmotische Druck ist schwer messbar, deshalb bedient man sich des osmotischen Potentials (π), das mit der Wasseraktivität (a_w) zusammenhängt. Die Wasseraktivität ist experimentell relativ leicht zu bestimmen und ist geeignet, auch Aussagen über das osmotische Potential zu zulassen (Csonka, 1989). Die Wasseraktivität ist per Definition auf den Wert 1 festgelegt. Durch den Zusatz von osmotisch aktiven Substanzen verringert sich die Wasseraktivität auf Werte < 1 (Csonka, 1989).

Halophile Organismen haben im Lauf der Evolution Adaptionsmechanismen auf verschiedenen Ebenen entwickelt die ihnen eine Anpassung an osmotischen Stress ermöglichen.

Ein erster Forschungsschwerpunkt war die Untersuchung der Zytoplasmamembran moderat halophiler Bakterien, die eine erste Barriere zwischen dem Zytoplasma, das normalerweise einen relativ geringen Salzgehalt in der Form von Na^+ -Ionen aufweist, und der äußeren Umgebung mit einer hohen Salinität, die aber je nach Umweltbedingungen Schwankungen unterworfen ist, darstellt. Bei vorhandenem osmotischem Stress war eine Veränderung in der Lipidzusammensetzung zu beobachten. Das Verhältnis von polaren zu neutralen Lipiden in der Zellmembran ändert sich derart, dass bei einem Anstieg der Salinität der Anteil negativ geladener Lipide (Phosphatidylglycerol, PG und Diphosphatidylglycerol, CL) zunimmt und der Anteil neutraler Lipide (Phosphatidylethanolamin, PE) abnimmt (Vreeland *et al.*, 1984; Vreeland, 1987, Ventosa *et al.*, 1998).

Die Adaptation von Proteinen von moderat halophilen und halophilen Bakterien ist in einem erhöhten Vorkommen von sauren Aminosäuren (Glutamat und Aspartat) auszumachen, bei einer gleichzeitig etwas verringerten Häufigkeit von basischen Aminosäuren (Lysin) (Gandbhir *et al.*, 1995; Lanyi, 1974; Madern *et al.*, 2000). Die maximale Aktivität eines

solchen Enzyms hängt von der intrazellulären Kaliumionen Konzentration ab. Halophile Enzyme benötigen eine bestimmte Kaliumkonzentration, weil das Zytoplasma durch die Anpassung mittels „salt-in“-Strategie (Abschn. 2.1) eine erhöhte Kaliumkonzentration besitzt (Madern *et al.*, 2000). Bei moderat halophilen Enzymen findet man maximale Enzymaktivitäten auch schon bei geringeren Kaliumkonzentrationen, da für die Anpassung an osmotischen Stress hauptsächlich die „organic osmolyte“-Strategie (Abschn. 2.2) angewendet wird, wobei die intrazelluläre Kaliumkonzentration wesentlich geringer ist (Ventosa *et al.*, 1998).

In der Natur haben sich zwei völlig unterschiedliche Strategien entwickelt, mit deren Hilfe Mikroorganismen osmotischen Stress bewältigen können. Die erste Strategie wird „salt-in strategy“ genannt und führt zu einer intrazellulären Akkumulation von KCl im molaren Bereich. Die „organic osmolyte strategy“ verwendet einen anderen Mechanismus, die Synthese sogenannter kompatibler Solute, um ein osmotisches Gleichgewicht zwischen Zytoplasma und dem umgebenden Medium herbei zu führen (Oren, 2008, DaCosta *et al.*, 1998; Galinski, 1995; Galinski & Trüper, 1994). Beide Strategien haben ihre Vor- und Nachteile, die in den weiteren Abschnitten im Detail aufgezeigt werden.

2.1. Akkumulation anorganischer osmoregulatorischer Solute („salt-in strategy“)

Die „salt-in strategy“ führt, wie der Name schon impliziert, zu einem Influx von Salzen (K^+ , Na^+ , Cl^-), insbesondere Kaliumchlorid. Die intrazellulären Salzgehalte (insbesondere KCl) erreichen in den Zellen molare Konzentrationen (Oren, 2008, DaCosta *et al.*, 1998; Galinski, 1995; Galinski & Trüper, 1994). Diese Art der Anpassung findet sich an konstant hypersalinen Standorten und erfordert einen hohen Grad an mikrobieller Adaptation. Dies äußert sich in einer Anpassung der gesamten zellulären Maschinerie, inklusive der vorhandenen Proteine mit anteilig mehr sauren Aminosäuren, die in ihrer Gesamtheit eine erhöhte Salztoleranz aufweisen. Das bedeutet im Gegenzug, dass Organismen, die diese Art der Anpassung entwickelt haben, nicht flexibel auf verminderte Salzkonzentrationen reagieren können und somit eine gewisse Salzkonzentration für diese Organismen zum Überleben notwendig geworden ist (Oren, 2008; DaCosta *et al.*, 1998). Allerdings ist die „salt-in strategy“ für die Zellen unter bioenergetischen Gesichtspunkten günstiger als die „organic osmolyte strategy“ (Oren, 1999).

2.2. Akkumulation organischer osmoregulatorischer Solute („organic osmolyte strategy“)

Eine weitere Strategie, die die Organismen im Laufe der Evolution entwickelt haben, um sich an osmotisch extreme Bedingungen anzupassen, ist die „organic osmolyte strategy“ (Oren, 2008, DaCosta *et al.*, 1998; Galinski, 1995; Galinski & Trüper, 1994). Im Gegensatz zu der „salt-in strategy“ findet bei dieser Art der Anpassung ein Efflux der Salze in das die Zellen umgebende Medium, bei gleichzeitiger Akkumulation niedermolekularer Verbindungen in den Zellen, statt. Für diese niedermolekularen organischen Verbindungen wurde der Ausdruck „kompatible Solute“ geprägt, weil diese Moleküle zum einen wasserlöslich sind (Solut), und zum anderen den zentralen Zellmetabolismus nicht negativ beeinflussen, also mit diesem „kompatibel“ sind (Brown, 1976). Die sehr unterschiedlichen kompatiblen Solute werden von den Mikroorganismen selbst synthetisiert oder als kostengünstigere Variante für die Zellen über spezifische Transportmechanismen aus dem äußeren Milieu aufgenommen. Im Fall des Komplexmediums LB z. B. wird den Bakterien durch den enthaltenen Hefeextrakt eine große Menge Betain zur Verfügung gestellt (Galinski, 1995; Oren, 1999). Das Proteom der Organismen, die die „organic-osmolyte strategy“ anwenden, muss im Gegensatz zu der „salt-in“ Strategie nur geringfügig adaptiert sein. Ein Vorteil der „organic-osmolyte strategy“ liegt in der hohen Flexibilität bei sich ändernden Umweltbedingungen leben zu können, wie beispielsweise ein sehr breites Salinitätsspektrum. Die Biosynthese der kompatiblen Solute wird abhängig von den Umweltbedingungen reguliert und führt so bei geringer Osmolarität entweder zu einer Sekretion ins Medium oder bei hoher Osmolarität zu einer Aufnahme oder Neusynthese (Csonka, 1989; Oren, 2008; DaCosta *et al.* 1998). Die „organic-osmolyte strategy“ ist bioenergetisch für die Zellen ungünstiger, weil die Zellen mehr Energie für die Biosynthese der organischen kompatiblen Solute benötigen als für den K^+ -Einstrom. Ectoin und Betain sind neben Glycerol die Solute, deren Biosynthese bioenergetisch am günstigsten ist (Oren, 1999).

2.3. Klassen der kompatiblen Solute

Die kompatiblen Solute, die von den Mikroorganismen bei der „organic-osmolyte“-Strategie akkumuliert werden, sind sehr divers, ebenso wie die Mikroorganismen, die diese Solute synthetisieren, und deren Habitate. Die wichtigsten Gruppen der kompatiblen Solute sind Polyole, Heteroside, Zucker, Aminosäuren und deren Derivate, N-acetylierte Diaminosäuren, Ectoine, Betaine und Thetine (DaCosta *et al.*, 1998; Galinski, 1995).

Zu der Gruppe der Polyole gehört als bekanntestes Solut das Glycerol. Es wird von der halophilen Grünalge *Dunaliella parva* synthetisiert (Ben-Amotz & Avron, 1973).

Typische Polyole, die als kompatible Solute in halophilen bzw. halotoleranten Pilzen, Algen und Pflanzen weit verbreitet sind, sind die Verbindungen Glycerol, Arabitol und Inositol. Es gibt nur sehr wenige Bakterien, die die Fähigkeit besitzen Polyole zu synthetisieren. *Zymomonas mobilis* ist ein Gram-negatives Bakterium, das aus Agavensaft isoliert worden ist, und das Polyol Sorbitol als kompatibles Solut akkumuliert (DaCosta *et al.*, 1998). Ein weiteres Bakterium, das zur Synthese eines Polyols befähigt ist, ist das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas putida*. Unter osmotischen Stressbedingungen wird das kompatible Solut Mannitol angereichert, das in diesem Organismus in Kombination mit den kompatiblen Soluten Trehalose und N-Acetylglutaminylglutamin-1-amid (NAGGN) auftritt (Kets *et al.*, 1996).

Ein Polyolderivat, das zu der Gruppe der Heteroside gehört, stellt das kompatible Solut Glucosylglycerol dar. Es wurde zunächst in einigen Rotalgen und der Familie der Chrysophyceae entdeckt, die für eine intermediäre Salztoleranz bekannt sind (DaCosta *et al.*, 1998). Einige Vertreter der Pseudomonaden, *Pseudomonas mendocina* und *Pseudomonas pseudoalkaligenes*, die ein ähnliches Salinitätsspektrum aufweisen, akkumulieren ebenfalls das kompatible Solut Glucosylglycerol unter osmotischen Stressbedingungen (Pocard *et al.*, 1994).

Die Zucker Saccharose und Trehalose sind unter eukaryotischen und prokaryotischen Organismen weit verbreitet. Saccharose wird hauptsächlich in der Gruppe der nicht halophilen Cyanobakterien aufgefunden (DaCosta *et al.*, 1998), wohingegen das Disaccharid Trehalose in sehr vielen Bakterien akkumuliert wird. Der Name der Dissaccharids Trehalose wurde von der Beschreibung der externen Cuticula, der „Trehalamana“, eines Pflanzenparasitischen Insekts abgeleitet (Arguelles, 2000; Elbein, 1974). Trehalose ist ein weitverbreitetes kompatibles Solut, das in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Invertebraten und Säugetieren vorkommt (Arguelles, 2000; van Laere, 1989). In Hefen dient es auch als Speicherstoff in Sporen (van Laere, 1989). Einige für diese Arbeit bedeutsame Vertreter unter den Bakterien sind *Pseudomonas aeruginosa* (Madkour *et al.*, 1990), *Sinorhizobium meliloti* (Smith & Smith, 1989) und *Escherichia coli*. In *E. coli* werden zusätzlich zur Synthese des kompatiblen Soluts Trehalose Kalium-Ionen und α -Glutamat in den Zellen angereichert (Larsen *et al.*, 1987).

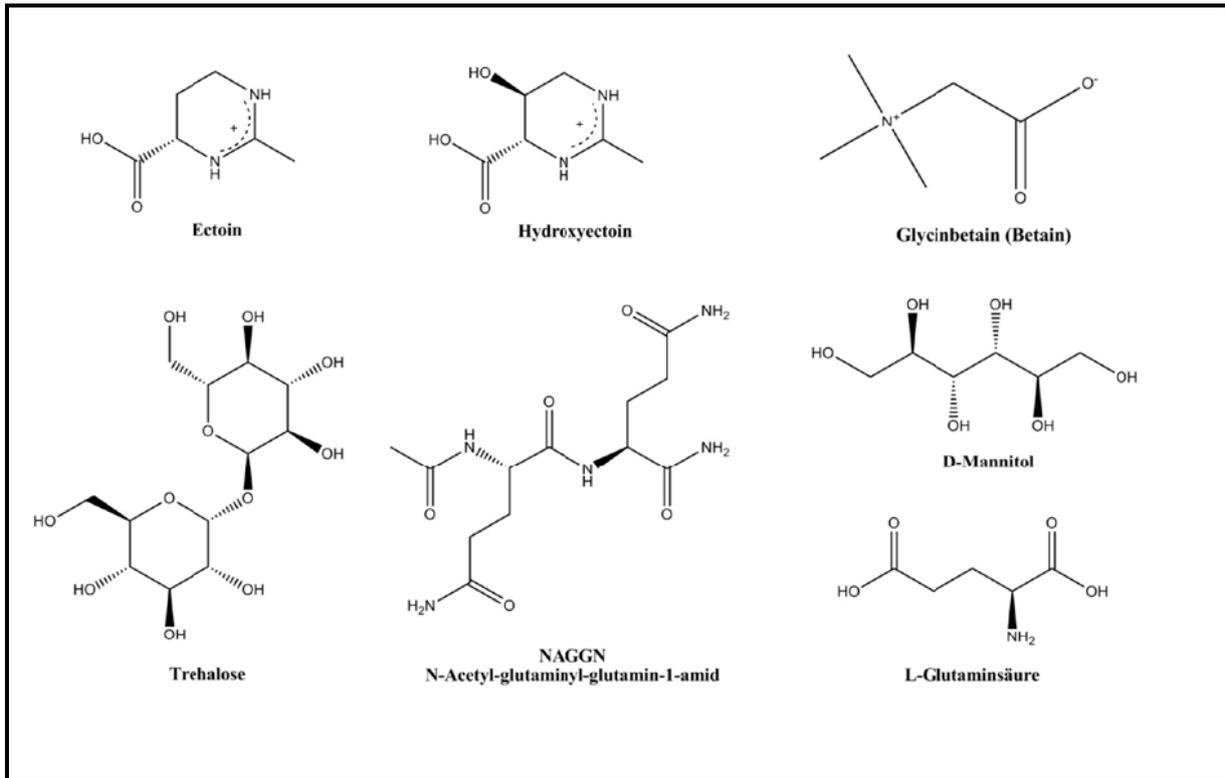


Abb. 1: Übersicht über kompatible Solute.

Natürlich vorkommende Aminosäuren, wie beispielsweise Alanin, Glutamin und Prolin stellen ebenfalls wichtige bakterielle Osmolyte dar, die in Abhängigkeit von der Salinität akkumuliert werden. Prolin kommt hierbei eine bedeutsamere Rolle zu, da diese Aminosäure in sehr hohen Konzentrationen angereichert werden kann (DaCosta *et al.*, 1998). Wichtige Aminosäurederivate, wie die des α -Glutamins, sind Glutamin-1-amide. Es gibt derzeit zwei bekannte Glutamin-1-amide, nämlich das N- α -Carbamoylglutamin-1-amid, das in *Ectothiorhodospira marismortui* nachgewiesen wurde (Galinski & Oren, 1991), und N- α -Acetylglutaminylglutamin-1-amid, das unter den Bakterien weiter verbreitet ist. Das N- α -Acetylglutaminylglutamin-1-amid wurde in moderat halophilen Pupurbakterien entdeckt (Peters *et al.*, 1990), sowie in anderen Prokaryoten, z. B. *Azospirillum brasiliense* (Galinski & Trüper, 1994), *Sinorhizobium meliloti* (Smith & Smith, 1989), und vielen Vertretern der Gattung *Pseudomonas* (Aspedon *et al.*, 2006; Diab *et al.*, 2006; D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Kets *et al.*, 1996; Pocard *et al.*, 1994; Kurz *et al.*, 2010; Sagot *et al.*, 2010).

Eine N-Acetylierung von positiv geladenen Diaminosäuren führt z. B. bei der nicht ribosomal synthetisierten Aminosäure Ornithin und der Aminosäure Lysin zu einer neutralen zwitterionischen Verbindung. Solche N-acetylierten Verbindungen sind N- δ -Acetyl-Ornithin (aus Bacillus ähnlichen Organismen), N- ϵ -Acetyl-Lysin (aus *Sporosarcina halophila* und

Bacillus ähnlichen Organismen) und N-Acetyl-Diaminobuttersäure, die als Vorstufe in der Ectoinbiosynthese dient (DaCosta *et al.*, 1998).

Das kompatible Solut Ectoin wurde erstmals in dem phototrophen Schwefelbakterium *Halorhodospira halochloris* (ehemals *Ectothiorhodospira halochloris*) nachgewiesen, wodurch auch die Namensgebung resultierte (Galinski *et al.*, 1985). Das kompatible Solut Ectoin ist ebenfalls eine N-acetylierte Diaminosäure, die aber zyklisch vorliegt. Das kompatible Solut Ectoin, das in der Natur sehr weit verbreitet ist, ist ein sehr typisches Solut der halophilen phototrophen Bakterien.

Betain (Glycin-Betain) ist ein sehr universelles kompatibles Solut, das in salz- und zuckertoleranten Pflanzen, Algen, im Tierreich und in diversen Prokaryoten vorkommt. Sehr wenige Mikroorganismen, wie einige Vertreter der halophilen Cyanobakterien, der anoxygenen Phototrophen (*Halorhodospira* spp.) und der halophilen methanogenen Archaea sind zur *de novo* Synthese von Glycin-Betain befähigt (Ventosa *et al.*, 1998; Oren, 2001). Glycin-Betain wird über die reduktive Methylierung der Aminosäure Glycin erreicht, die wiederum von der polaren Aminosäure Serin generiert wird.

Die methylierten Schwefel-Analoga der Betaine sind die Thetine. Besonders erwähnenswert ist die Verbindung Dimethylsulfoniopropiothetin, kurz DMSP. Dieses Solut ist in marinen Pflanzen, Algen und Cyanobakterien verbreitet (DaCosta *et al.*, 1998).

2.4. Allgemeines Vorkommen des kompatiblen Soluts NAGGN

Das kompatible Solut N-Acetyl-glutaminylglutamin-1-amid, auch unter den Abkürzungen NAGGN oder AGGA bekannt, wurde bereits in diversen Bakterien nachgewiesen. Der erste Nachweis dieses Soluts wurde in osmotisch gestressten Bakterienkulturen von *Sinorhizobium meliloti* erbracht (Smith & Smith, 1989). Das phototrophe Bakterium *Sinorhizobium meliloti* weist neben einer NAGGN-Akkumulation auch die Synthese von Glutamat und Trehalose auf (Smith & Smith, 1989; Pocard *et al.*, 1994, Smith *et al.*, 1994).

Caumette (1993), Galinski (1986) und Severin *et al.* (1992) stellten fest, dass NAGGN in geringen Mengen in den Organismen *Rhodopseudomonas marina*, *Chromatium purpuratum*, *Chromatium salexigens* und *Thiocapsa halophila* vorkommt, die aus marinen Salinen isoliert wurden.

In der Familie der Pseudomonadaceae ist die Akkumulation des kompatiblen Soluts NAGGN zur Osmoregulation weit verbreitet. Es wurde bereits in den Untergruppen *Pseudomonas*

aeruginosae (Aspedon *et al.*, 2006; D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Kets *et al.*, 1996), *Pseudomonas putidae* (Kets *et al.*, 1996), *Pseudomonas syringae* (Kurz *et al.*, 2010) und *Pseudomonas fluorescens* (Kets *et al.*, 1996; Kurz *et al.*, 2010) nachgewiesen.

Die Gruppe der Pseudomonaden weist überwiegend eine NAGGN-Akkumulation auf, die gleichzeitig mit einer Erhöhung des Glutamatspiegels auftritt. Die Co-Solute sind in den unterschiedlichen Untergruppen sehr heterogen. In *Pseudomonas aeruginosa* tritt, neben den kompatiblen Soluten NAGGN und Glutamat, Trehalose als zusätzliches Solut auf (Aspedon *et al.*, 2006; Diab *et al.*, 2006; D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Kets *et al.*, 1996). Mannitol, ein sehr ungewöhnliches Solut für Gram-negative Bakterien, und Trehalose werden von *Pseudomonas putida* in Kombination mit den Soluten NAGGN und Glutamat akkumuliert (Kets *et al.*, 1996). Das Polyol Mannitol war zuvor nur als Osmolyt in einigen Hefen bekannt (Onishi & Suzuki, 1968). Das kompatible Solut Glucosylglycerol fand sich in den Organismen *P. mendocina* und *P. pseudoalcaligenes* in Kombination mit NAGGN und Glutamat (Pocard *et al.*, 1994).

2.5. Biosynthese des kompatiblen Solut NAGGN

Das zentrale Element des kompatiblen Solut NAGGN (N-Acetyl-glutaminylglutamin-1-amid) ist ein Dipeptid, das sich aus zwei Einheiten der Aminosäure Glutamin zusammensetzt (Abb. 2). Die endständige α -Aminogruppe ist durch eine N-Acetylierung modifiziert, so dass eine N-Acetylgruppe vorliegt. Durch eine Amidierungsreaktion erfolgt eine Derivatisierung der endständigen α -Carboxylgruppe. Für die Bildung des kompatiblen Solut NAGGN sind also drei unterschiedliche Reaktionen vonnöten. Eine dieser Reaktionen ist die Knüpfung der Peptidbindung, um das Dipeptid Di-Glutamin zu bilden. (Abb. 2, roter Kreis 2). Durch die zwei Substitutionsreaktionen in Form einer Amidierung (Abb. 2; roter Kreis 3) bzw. einer N-Acetylierung (Abb. 2; roter Kreis 1) des zwitterionischen Dipeptids Di-Glutamin wird das ungeladene, aber polare kompatible Solut NAGGN generiert (Abb. 2).

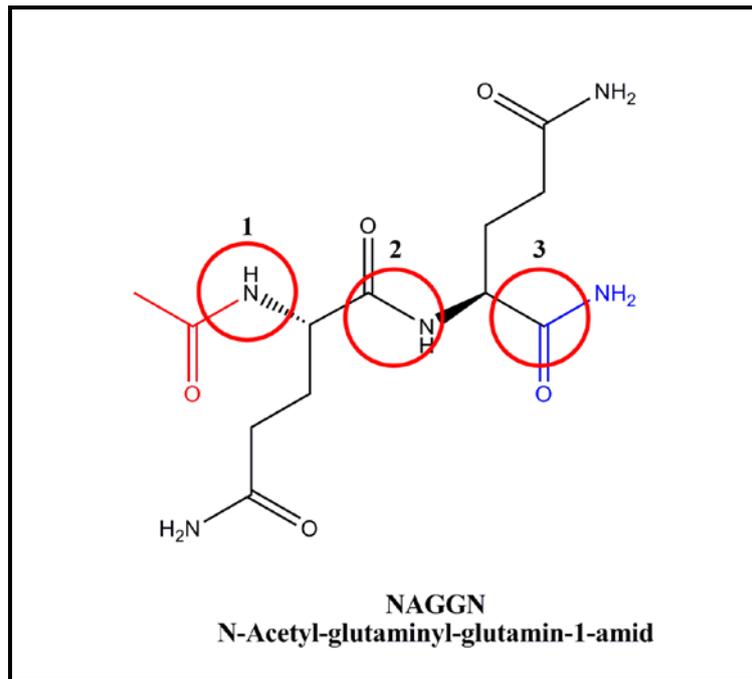


Abb. 2: Das kompatible Solut NAGGN. Rot=Acetylgruppe; Blau=Carboxamidgruppe; rote Kreise: potentielle Angriffspunkte für Enzyme der Biosynthese.

Durch Transkriptionsstudien, die durch Microarray-Analysen durchgeführt wurden (Aspedon *et al.*, 2006), konnte in dem Stamm *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 eine verstärkte Genexpression der Gene *PA3459*, *PA3460* und *PA3461* unter hyperosmotischen Stressbedingungen festgestellt werden, die in diesem Versuch durch Salz angelegt wurden. Das Gen *PA3459* ist eine putative Aminotransferase, das als synonymes Kürzel die Bezeichnung *asnB* (Asparaginsynthetase B) trägt. Das Gen *PA3460* stellt eine putative N-Acetyltransferase dar, die aufgrund bioinformatischer Untersuchungen zur Familie der GCN5 verwandten N-Acetyltransferasen eingeordnet wurde. Das Gen *PA3461* kodiert für eine putative Peptidase, die zu den Glutamin abhängigen Metallopeptidasen der Familie M42 gehört.

Erste Untersuchungen zur Aufklärung der NAGGN-Biosynthese wurden durch Smith *et al.* (1994) durchgeführt. In dem phototrophen Bakterium *Sinorhizobium meliloti* wurde abhängig von der Salinität eine NAGGN-Akkumulation nachgewiesen (Smith & Smith, 1989). In *in vitro* Versuchen, die mit Zellextrakten des Stammes *S. meliloti* durchgeführt wurden, konnte eine N-Acetylglutaminyglutamin (NAGG) Synthese, also die Synthese eines putativen Zwischenprodukts der NAGGN-Biosynthese, nachgewiesen werden. Die NAGG-Synthese wurde durch Zugabe von Kalium-Ionen gesteigert und zeigte eine ATP-Abhängigkeit. Durch

Radiomarkierungsexperimente wurde gezeigt, dass die Peptidsynthese der beiden Glutamine nicht ribosomal abläuft (Smith *et al.*, 1994).

2.6. Osmoadaptation

2.6.1. Osmoadaptation des halotoleranten Bakteriums *Pseudomonas putida*

Das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas putida* gehört zu der Gattung *Pseudomonas* und wird phylogenetisch den Pseudomonadaceae, einer Familie innerhalb der γ -Gruppe der Proteobakterien, zugeordnet (Palleroni, 1993; Olsen *et al.*, 1994). Pseudomonaden sind chemoorganotrophe, obligate Aerobier, die durch einen Oxidase-Aktivitätsnachweis von Enterobakterien unterschieden werden können (Madigan *et al.*, 2001). Einige Arten der Gattung *Pseudomonas* sind pflanzen-, tier- oder humanpathogen (Gross & Cody, 1985; Palleroni, 1984; Hof *et al.*, 2000).

Pseudomonas putida ist ein mesophiles, halotolerantes Bakterium mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 25-30 °C (Palleroni, 1984) und einer Salinitätstoleranz zwischen 0 und 6 % NaCl. Das Habitat dieses Bakteriums befindet sich auf Pflanzenwurzeln und in der Rhizosphäre (Ronchel & Ramos, 2001) von Dikotyledonen (Barazani & Friedmann, 2001). Der Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 ist ein Derivat des Stammes *Pseudomonas putida* m-2, der sich dadurch auszeichnet, dass er ein defektes Restriktionssystem besitzt, das die DNA-Aufnahme erleichtert, und darüber hinaus kein TOL-Plasmid besitzt, dessen Gene für den Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe wie Toluol und Xylen verantwortlich sind (Ramos *et al.*, 1997; Bagdasarian *et al.*, 1981).. Die Aufklärung des Genoms mit der Größe 6,18 Mb von *Pseudomonas putida* KT2440 führte zu der Erkenntnis, dass dieser Stamm sehr unterschiedliche Transporter und metabolische Systeme besitzt (Nelson *et al.*, 2002).

Das kompatible Solut Trehalose wird in der Natur über unterschiedliche Biosynthesewege synthetisiert, die teilweise Einschnitt- (z.B. Trehalosesynthase (TS) - Biosyntheseweg) und Zweischrittbiosynthesewege (z. B. Trehalosephosphatsynthase (TSP) / Trehalosephosphatphosphatase (TPP) - Biosyntheseweg) umfassen. Die Trehalosesynthase des Bakteriums *S. avermitilis* [Genbank-Nr.: 29829345] (Avonce *et al.*, 2006) weist eine starke Homologie (73 % Positive und 61 % Identität auf Proteinebene) zu der Trehalose Synthase (PP4059) aus *P. putida* KT2440 auf. Die Trehalosesynthase aus *S. avermitilis* katalysiert die Umsetzung von Maltose zu Trehalose und wurde als TS-Biosyntheseweg (Einschnittbiosyntheseweg) bezeichnet (Avonce *et al.*, 2006), der aufgrund der Homologievergleiche mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls in *P. putida* KT2440 vorliegt. Das kompatible Solut Mannitol

wurde in dem pflanzlichen Organismus *Apium graveolens* (Sellerie) nachgewiesen. In *P. putida* KT2440 konnte eins der drei an der Mannitol Biosynthese in Pflanzen beteiligten Enzyme (Rumpho *et al.*, 1983), die D-Mannose-6-phosphat-Isomerase, durch einen Homologievergleich mit dem Enzym aus *Apium graveolens* detektiert werden. In den Organismen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und *Pseudomonas fluorescens*, die nachweislich kein Mannitol synthetisieren, wurde kein entsprechendes Gen gefunden.

2.6.2. Osmoadaptation des halotoleranten Stammes *E. coli*

Das Gram-negative stäbchenförmige Enterobakterium *Escherichia coli* (Migula, 1895; Castellani & Chalmers, 1919) wurde von Skerman *et al.* (1980) bezüglich der Namensgebung und Klassifizierung aktualisiert. Das Wachstumsoptimum liegt bei 37 °C und der tolerierte Salinitätsbereich erstreckt sich von 0,5 % extrazellulärem NaCl bis zu 5 %.

Bei osmotischem Stress ist *E. coli* befähigt Osmolyte in Form von K⁺-Ionen und kompatiblen Soluten zu akkumulieren. Bei einer hohen Osmolarität erfolgt die erste Reaktion der Zellen in Form eines K⁺-Influx und einer Glutamat-Synthese (Dinnbier *et al.*, 1988; Yan *et al.*, 1996).

Für die Aufnahme von Kaliumionen sind drei Transportsysteme bekannt, Trk, Kdp und Kup (Csonka und Eppstein, 1996). Die Synthese von Glutamat erfolgt z. B. über die beiden Enzyme Glutamatdehydrogenase und Glutamatsynthase, die durch die Gene *gdhA* und *gltBD* kodiert werden (Strøm, 1998). Mutationen in diesen Genen haben gezeigt, dass der Kalium-Glutamatpool der Zellen sinkt und damit einhergehend auch die Fähigkeit der Adaptation an höhere Osmolaritäten (Csonka *et al.*, 1994). Der Aufrechterhaltung des Kalium-Glutamatpools kommt somit Bedeutung im Zuge der osmotischen Anpassung zu. Ungeklärt ist bis dato, ob der Kalium-Glutamatpool ein internes Signal für osmotischen Stress ist (Strøm, 1998). Ungefähr dreißig Minuten nach einem angelegten hyperosmotischen Schock wird bei einer Anzucht des Bakteriums *E. coli* in einem Minimalmedium mit einer Molarität von 0,5 M Salz die Kalium-Glutamat-Akkumulation von der Synthese des kompatiblen Soluts Trehalose abgelöst (Dinnbier *et al.*, 1988).

Die Biosynthese des kompatiblen Soluts Trehalose erfolgt über den TPS/TPP-Weg. Dieser zweistufige Biosyntheseweg besteht aus zwei enzymatischen Schritten, katalysiert durch die Enzyme Trehalosephosphat-6-Synthetase und Trehalose-6-phosphatphosphatase, die durch die Gene *otsA* bzw. *otsB* kodiert werden (Kaasen *et al.*, 1992). Zunächst werden UDP-Glucose und Glucose-6-phosphat durch die Trehalosephosphat-6-Synthetase zu Trehalose-6-phosphat umgesetzt. Eine anschließende Dephosphorylierung des Trehalose-6-phosphats durch die Trehalose-6-phosphatphosphatase führt zur Bildung des kompatiblen Soluts

Trehalose (Giaever *et al.*, 1988; Kaasen *et al.*, 1992; Kaasen *et al.*, 1994; Hengge-Aronis *et al.*, 1991). Die Gene *otsAB* sind in einem Operon organisiert, das durch KatF (RpoS), einen putativen Sigmafaktor σ^S , der einige Stationärphasen abhängige Expressionen induziert, reguliert wird (Hengge-Aronis *et al.*, 1992).

Ein weiterer Mechanismus für die osmotische Anpassung von *E. coli* ist die Möglichkeit externes Cholin über einen Transporter (BetT) aufzunehmen und intrazellulär über das Intermediat Betinaldehyd weiter zu Betain zu oxidieren (Strøm, 1998; Landfald & Strøm, 1986; Falkenberg & Strøm, 1990).

2.6.3. Osmoadaptation des moderat halophilen Stammes *H. elongata*

Das moderat halophile Bakterium *Halomonas elongata* DSMZ 2581^T wurde von Vreeland *et al.* (1980) isoliert und beschrieben. Es ist Gram-negativ mit einer stäbchenförmigen Morphologie. Dieses Bakterium wurde zusammen mit ähnlichen Spezies aus einer Meersalzanlage der Insel Bonaire, die zu der Inselgruppe der Niederländischen Antillen gehört, isoliert. Das Bakterium *H. elongata* ist fakultativ anaerob, was in diesem Fall bedeutet, dass anaerobes Wachstum in Anwesenheit von Nitrat möglich ist, wobei das vorhandene Nitrat zu Nitrit reduziert wird. *H. elongata* reagiert Katalase-positiv, Kovac-Oxidase-positiv und Ornithin- und Lysin- Decarboxylase-positiv. Temperatur und pH-Bereiche liegen zwischen 4 °C und 45 °C bzw. pH 4-9. Das Salinitätsspektrum von *H. elongata* ist mit einem Wachstum zwischen 2 % und 20 % Salz sehr ausgeprägt (Kraegeloh & Kunte, 2002). Allerdings ist die größte Toleranz gegenüber unterschiedlichen Salinitäten bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C beobachtet worden.

Die Antibiotika Unempfindlichkeit von *Halomonas*-Stämmen gegen Aminoglycoside wie Gentamycin, Kanamycin, Neomycin und Streptomycin nimmt mit steigender Salzkonzentration des verwendeten Mediums zu. Der genaue Mechanismus ist bis heute nicht aufgeklärt. Gegen Tetracyclin liegt ebenfalls eine Antibiotikaempfindlichkeit vor (Coronado *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist Chloromycetin (Chloramphenicol) einsetzbar. Diese Kenntnisse ermöglichen das molekularbiologische Arbeiten mit *H. elongata*.

Osmoadaptive Prozesse von *H. elongata* sind die Akkumulation und/oder Synthese der osmolytisch wirksamen Substanzen K^+ , Glutamat, Ectoin und Hydroxyectoin (Cummings *et al.*, 1993).

Das kompatible Solut Ectoin ((4S)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure), das von dem marinen moderat halophilen Organismus *H. elongata* synthetisiert wird, wurde

erstmalig in dem Organismus *Halorhodospira halochloris* (Galinski *et al.*, 1985) nachgewiesen, der aus dem Wadi Natrun in Ägypten isoliert wurde.

In *H. elongata* wurde intrazellulär eine Akkumulation von Ectoin bei ansteigender Salinität dokumentiert, die eine Konzentration von bis zu 2 M erreicht. (Galinski & Louis, 1999). *H. elongata* akkumuliert bis zu einer Mediansalinität von 0,5 M (ca. 3 %) vorwiegend Kalium-Glutamat (Kraegeloh & Kunte, 2002). Erst bei höheren Salinitäten überwiegt der Anteil an vorhandenem Ectoin im Vergleich zu Kalium-Glutamat.

Das Ectoin wird ausgehend vom Aspartat, das zunächst in das Aspartat- β -semialdehyd überführt wird, synthetisiert. Von der Verbindung Aspartat- β -semialdehyd ausgehend erfolgt die Ectoinbiosynthese in drei Schritten. Die erste enzymatische Reaktion ist eine Transaminierung und wird durch das Enzym EctB (L-2,4-Diaminobutyrattransaminase) katalysiert, wobei Aspartat- β -semialdehyd zu L-2,4-Diaminobuttersäure umgesetzt wird. Die L-2,4-Diaminobuttersäure wird in einer zweiten Acetylierungsreaktion durch das Enzym 2,4-Diaminobutyratecetylase (EctA) in das Intermediat N- γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure überführt. Die finale Kondensation der N- γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure zu dem Produkt L-Ectoin wird durch eine N- γ -Acetyldiaminobutyratedehydratase, oder auch L-Ectoin-Synthase (EctC) genannt, katalysiert (Galinski, 1995; Peters *et al.*, 1990).

Der marine moderat halophile Stamm *H. elongata* weist vielfältige Anpassungsmechanismen auf, die ein Leben in einem euryhalinen Habitat ermöglichen.

3. Expressionssysteme

In der wissenschaftlichen Forschung und in der Industrie werden zahlreiche und sehr unterschiedliche Expressionssysteme mit sehr voneinander abweichenden Zielsetzungen eingesetzt. Ein Hauptunterscheidungskriterium der vielfältigen Expressionssysteme ist die Unterteilung in eu- und prokaryotische Systeme.

Als eukaryotische Expressionssysteme werden Pflanzen und Säugetier Zellkultursysteme eingesetzt (Doran, 2000; Larrick & Thomas, 2001). Insbesondere Säugetier Zellkulturen sind für die Expression therapeutisch relevanter Proteine bedeutsam (Chu & Robinson, 2001). Das Baculovirussystem ermöglicht die Proteinexpression in Insektenzellen (Hitchman, *et al.*, 2010). Die Hefen *S. cerevisiae*, aus der Brot- und Bierherstellung vertraut, und *Pichia pastoris* sind Modellorganismen für die Expression von Proteinen, wobei insbesondere *Pichia pastoris* durch die Expression der humanen Chitinase (Goodrick *et al.*, 2001) und der Herstellung von Insulin Vorläuferverbindungen (Wang *et al.*, 2001) an Bedeutung gewann.

Der bekannteste und meist genutzte Wirtstamm für die prokaryotische Proteinexpression ist *Escherichia coli*. Für dieses Bakterium steht eine Vielzahl an Vektoren zur Verfügung und darüber hinaus ist es biochemisch und genetisch sehr gut untersucht (Makrides, 1996). Die pharmazeutische Industrie nutzt *E. coli* für die Herstellung von Proinsulin und diversen Wachstumsfaktoren, u. a. dem *Bovine growth factor*. In einem gänzlich anderen industriellen Zweig, der Lebensmittelindustrie, tendieren die Bemühungen dahin, dass vermehrt Mikroorganismen verwendet werden, die als für den Menschen ungefährlich betrachtet werden. Auf diese Weise klassifizierte Mikroorganismen werden als GRAS (generally regarded as save) Organismen eingestuft. Die Mikroorganismen *Lactococcus lactis*, der traditionell in der Milchindustrie eingesetzt wird, und das Bodenbakterien *Corynebacterium glutamicum* entsprechen diesen GRAS-Kriterien. *Lactococcus lactis* wird darüberhinaus auch im medizinischen Bereich zur Produktion unterschiedlicher Malaria-Antigene verwendet (Sodoyer, 2004) und *Corynebacterium glutamicum* ist ein wichtiger Wirt für die Aminosäureherstellung, insbesondere Glutamat und Glutamin, geworden (Leuchtenberger *et al.*, 2005).

Verschiedene Faktoren wie Zellwachstumseigenschaften, Expressionsniveau, intrazelluläre oder extrazelluläre Expression, posttranslationale Modifizierungen, biologische Aktivität des Proteins von Interesse und auch regulatorische Begebenheiten (wichtig für therapeutische Proteine) führen zur Auswahl eines bestimmten Expressionssystems (Makrides, 1996; Baneyx, 1999). Weitere Überlegungen in ökonomischer Hinsicht liegen in der

Kostenreduzierung des Gesamtprozesses und auch in den Möglichkeiten einer Anzucht des Wirtsstamms in größerem Maßstab (Bioreaktor) (Makrides, 1996).

Für die Wahl des Wirtsstamms ist auch die molekularbiologische Komponente, in Form des Vektordesigns, von Bedeutung. Wichtige Gesichtspunkte für die Auswahl und/oder für die Konstruktion eines Expressionsvektors sind die Gendosis, die durch die Kopienzahl des Vektors bestimmt wird, die Promotorstärke, wodurch eine Regulation auf transkriptioneller Ebene stattfindet, die mRNA-Stabilität und die Initiation bzw. die Termination der Translation (Jana & Deb, 2005).

Expressionssysteme, die auf die Expression salzangepasster Proteine abgestimmt sind, besitzen häufig *broad host range*-Vektoren, die einen Replikationsursprung enthalten, der die Vervielfältigung des Plasmids in vielen Gram-negativen Bakterien, wie *H. elongata*, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ermöglichen. Darüberhinaus ist es möglich osmoregulierte Promotoren zu verwenden (z. B. PromA des Ectoin Biosynthesegenclusters), die bei einer Bakterienanzucht durch Salz induziert werden können. Bei einer Expression salzangepasster Proteine bietet die Induktion durch Salz den zusätzlichen Vorteil, dass diese Proteine bei der Expression durch Salz stabilisiert werden, sofern die internen Salzgehalte erhöht vorliegen.

3.1. *E. coli* als Expressionsstamm für halophile Enzyme

Der für die heterologe Proteinexpression sehr bekannte Wirtsstamm *E. coli* wurde bislang auch für die Expression von einzelnen Enzymen, die in der osmotischen Regulation involviert sind, und für die Expression vollständiger Biosynthesegencluster verwendet. Interessante Beispiele sind Enzyme wie EctC, ein Enzym der Ectoinbiosynthese, aus dem moderat halophilen Organismus *H. elongata* oder aus *Marinococcus halophilus*, die in *E. coli* bereits erfolgreich exprimiert wurden (Louis & Galinski, 1997; Witt *et al.*, 2011). Ein wichtiger Bestandteil der Osmoadaptation dieser Organismen ist die Biosynthese kompatibler Solute, insbesondere des kompatiblen Soluts Ectoin, die im Zuge der „*organic osmolyte strategy*“ von den Zellen akkumuliert werden. Louis & Galinski (1997) erreichten eine osmoregulierte Genexpression eines vollständigen Biosynthesegenclusters, aus drei Genen bestehend, für das kompatible Solut Ectoin aus *Marinococcus halophilus* in dem Expressionsstamm *E. coli*. Auch in Bezug auf Biosynthesewege anderer kompatibler Solute wie Betain wurden erfolgreiche heterologe Expressionen durchgeführt. Die Funktionalität des Enzyms Cholindehydrogenase aus *H. elongata*, das die Reaktion von Cholin zu Glycinbetain über ein Betinaldehyd-Intermediat katalysiert, wurde in *E. coli* gezeigt (Gadda & McAllister-Wilkins,

2003). Ein Enzym aus dem moderat halophilen Organismus *H. elongata*, die Ndk (nucleoside diphosphate kinase), besitzt eine gänzlich andere Funktion als die der bisher aufgeführten Enzyme. Die Ndk phosphoryliert Nucleosiddiphosphate, um so das Gleichgewicht zwischen ATP und exemplarisch GTP in den Zellen wieder herzustellen. Auch ein solches Enzym konnte effizient in *E. coli* exprimiert werden (Yonezawa *et al.*, 2003). Es wurden auch schon Versuche unternommen periplasmatische Expressionen von Enzymen durch Zugabe kompatibler Solute im Verlauf des Wachstums zu optimieren (Barth *et al.*, 2000).

3.2. *H. elongata* als Expressionsstamm für halophile Enzyme

Der moderat halophile Organismus *H. elongata* ist in der Vergangenheit bereits mehrfach sowohl als homologer als auch als heterologer Expressionsstamm verwendet worden. Dieser Stamm bietet bei einer Expression von Proteinen unter hyperosmotischen Bedingungen im Vergleich zu *E. coli* Vorteile, da der Bereich der osmotischen Anpassung ein größeres Spektrum aufweist und damit einhergehend die Wachstumsraten höher als die des Bakteriums *E. coli* liegen. Durch das relativ breite Salinitätsspektrum (2-20 % NaCl) ist es in diesem Organismus möglich, auch Proteine, die einen bestimmten Salzgehalt für ihre Aktivität benötigen zu exprimieren.

Es sind aber auch schon sehr interessante Versuche einer heterologen Expression in *H. elongata* durchgeführt worden. Ein weiteres kompatibles Solut, Mannosylglycerat (Firoin A), das ursprünglich aus dem thermophilen Organismus *Rhodothermus marinus* stammt, wurde erfolgreich in dem Stamm *H. elongata* unter der Kontrolle der Ectoinbiosynthese Regulationsmechanismen (PromA und putativer Regulator EctR) exprimiert (Burdziak, 2006).

Der Stamm *Chromohalobacter salexigens*, ein naher Verwandter von *H. elongata* wurde aber auch für die heterologe Expression von Genen eingesetzt, die keine Verbindung mit Halophilie oder kompatiblen Soluten aufwiesen. Das Enzym α -Amylase aus *Pyrococcus woesei* war das bislang erste beschriebene Enzym aus einem archaealen Organismus, das in einem moderat halophilen Organismus wie *Chromohalobacter salexigens* mit nachgewiesener Aktivität exprimiert werden konnte. Das exprimierte und aufgereinigte Enzym α -Amylase zeigt ähnliche thermale Stabilität, Metallionen Interaktionen, Temperaturoptima und pH-Optimum wie das native Enzym aus *Pyrococcus* (Frillingos *et al.*, 2000; Linden *et al.*, 2000). Das Gen *inaZ* wurde ebenfalls in *Chromohalobacter salexigens* heterolog exprimiert. Das Protein InaZ wird auch als *ice nucleation protein* bezeichnet und ist an der Eiskristallbildung

beteiligt (Arvanitis, *et al.*, 1995; Russel, 1998). Arvanitis *et al.* (1995) setzten das Gen *inaZ* aus *Pseudomonas syringae* als Reporter gen für Promotoraktivitätsstudien ein, weil ein sehr einfacher Assay die Expression dieses Gens nachweisen kann. Darüber hinaus beschrieben Afendra *et al.*, 2004 die heterologe Expression der Gene *inaZ*, *gfp* und des Gens, das für die α -Amylase kodiert, in *Halomonas* und *Chromohalobacter* Stämmen mit entsprechendem funktionellem Nachweis dieser rekombinanten Enzyme.

4. Zielsetzung dieser Arbeit

Das kompatible Solut NAGGN wurde in zahlreichen Vertretern der Pseudomonaden nachgewiesen (Kets *et al.*, 1996; Pocard *et al.*, 1994). Durch spätere Transkriptom-Analysen wurden die putativen NAGGN-Biosynthesegene des Stammes *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt (Aspedon *et al.*, 2006). Dadurch eröffneten sich vielfältige Möglichkeiten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten.

Ein Aspekt sollte die nähere Beleuchtung der NAGGN-Biosynthese bzw. die Abfolge der enzymatischen Reaktionen im Detail sein. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung boten sich zwei Strategien an. Zum einen sollte durch Deletion einzelner Biosynthesegene untersucht werden, ob mögliche Intermediate der NAGGN-Biosynthese detektiert werden. Dadurch könnten Rückschlüsse auf die Biosynthese gezogen werden. Zum anderen sollte durch eine gezielte Überexpression der Biosynthesegene eine genauere Untersuchung der an der NAGGN Biosynthese beteiligten Enzymreaktionen erreicht werden.

Neben der Aufklärung des Biosyntheseweges für NAGGN stellte die Isolierung des kompatiblen Solutes mit dem Ziel einer Charakterisierung einen großen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Für die Isolierung des Osmolyts war zunächst die Verwendung des Stammes *Pseudomonas putida* KT2440 als nicht pathogenem Organismus geplant. Allerdings war eine NAGGN-Isolierung mit diesem Stamm schwierig, da *P. putida* KT2440 neben NAGGN die Co-Solute Mannitol und Trehalose synthetisiert, die sich in den Eigenschaften wie Polarität und Ladung kaum voneinander unterscheiden. Deshalb wurden alternative Expressionsstämme eingesetzt, die bei auftretenden Schwierigkeiten herangezogen werden sollten, wie der halotolerante Mikroorganismus *E. coli* und das moderat halophile Bakterium *Halomonas elongata*. Mit dem Ziel einer erhöhten NAGGN Synthese ohne störende Co-Solute wurden die NAGGN -Biosynthesegene in die Stämme *E. coli* und *H. elongata* eingebracht.

Nach der Etablierung der NAGGN Expressionsstämme sollte in einem nächsten Schritt eine Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, um NAGGN näher charakterisieren zu können. Dazu sollten die klassischen chromatographischen Verfahren wie die Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration), Ionenaustauschchromatographie (Anionenaustauschchromatographie) und Adsorptionschromatographie (Ionenverzögerungschromatographie) verwendet werden. Nach der Entwicklung einer

geeigneten Aufreinigungsstrategie für NAGGN, war das nächste Ziel die Wirkung von NAGGN als Osmolyt auf ganze Zellen und Proteine unter Hitze, Kälte und Trockenstress zu untersuchen. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit bewährte Methoden eingesetzt (Lippert *et al.*, 1992) und neue entwickelt werden, um die Eigenschaften von NAGGN als Osmolyt zu charakterisieren.

II. Material und Methoden

1. Verwendete Stämme

Tab. 1: verwendete Stämme

Stämme	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> DH5a	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> BKA-13	<i>E. coli</i> MC4100, Δ <i>otsB</i>	Burziak, 2006
<i>Escherichia coli</i> S17.1	RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn 7) chromosomal integriert; Sm _R , <i>pro</i> , <i>thi</i> , <i>recA</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen, Merck Group, Darmstadt
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T	Wildtyp	Vreeland <i>et al.</i> , 1980
<i>Halomonas elongata</i> AKB	Δ <i>ectABC</i> :: <i>PP1750, PP1749, PP1748</i>	Diese Arbeit
<i>Halomonas elongata</i> WUB02	Δ <i>ectA, ectC</i>	Elisabeth Witt (unveröffentlicht)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440		Trevisan, 1889 Migula, 1895
DSM 6125		Nelson <i>et al.</i> , 2002

Die Bezeichnungen der Genotypen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli* (Bachmann, 1983).

2. Nährmedien

2.1. Nährmedien für *E. coli*, *P. putida* und *H. elongata* Stämme

Antibiotic Broth - Medium L⁻¹ (AB – Medium)

Antibiotic Broth No. 3	17,5 g
NaCl	6,5 g

ad 1000 mL H₂O_{demin.}

Luria-Bertani - Medium L⁻¹ (LB – Medium)

(Bertani, 1951)

Pepton/Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g

ad 1000 mL H₂O_{demin.}

Mineralsalzmedium MM63 L⁻¹

(Miller, 1972)

KH ₂ PO ₄	13,61 g
KOH	4,21 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,1 mg
NaCl	X x 10 g

pH 7,2

in 800 mL H₂O_{demin.} lösen

Glucose x 1 H₂O 5 g

in 100 mL H₂O_{demin.} Lösen

2.2. Medium und Lösungen L⁻¹ für die Fermentation von *H. elongata* AKB

Glucose – Citrat – Medium L⁻¹

NaCl	30 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,2 g
NH ₄ Cl	4,5 g
Tri-Natrium-Citrat x 2 H ₂ O	10 g

Das Medium wird in 700 mL H₂O_{demin.} gelöst, auf den pH-Wert 7,5 eingestellt, und anschließend autoklaviert.

- (1) K₂HPO₄ 1,1 g
in 100 mL H₂O_{demin.} lösen und getrennt autoklavieren.
- (2) Glucose x 1 H₂O 15 g
in 200 mL H₂O_{demin.} lösen und getrennt autoklavieren.
- (3) Fe(II)SO₄ x 7 H₂O 0,001 g
in 0,666 mL H₂O_{demin.} lösen und steril filtrieren.

Das Medium und die Lösungen (1), (2) und (3) wurden für 20 min bei 121 °C sterilisiert und anschließend zusammengegeben.

Fed-Batch-Lösung L⁻¹ (10x) für die Fermentation

NaCl	30 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	22 g
NH ₄ Cl	45 g
Tri-Natrium-Citrat x 2 H ₂ O	100 g
K ₂ HPO ₄	11 g
Glucose x 1 H ₂ O	150 g
Fe(II)SO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g

Ein Liter H₂O_{demin.}, ein 1 L Gefäß sowie Spatel und Rührfische wurden sterilisiert. Die Einzelkomponenten werden getrennt in Bechergläser überführt und ungelöst autoklaviert.

Anschließend werden die Einzelkomponenten unter sterilen Bedingungen in einem Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gelöst.

2.3. Medium für die Transformation

(Dagert & Ehrlich, 1979)

2x YT-Medium L^{-1}

Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
Ad 1000 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$	

Die Mediumkomponenten wurden zusammengegeben und bei 121 °C 20 min autoklaviert.

2.4. Selektionsmedium für homologe Rekombination

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Glucose x 1 H_2O	2 g
NaCl	2 g
Ad 1000 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$	

Der pH wurde auf 7,2 eingestellt.

Für die Selektion des zweiten Rekombinationsschrittes (Abschn.I.5.9) wurden Agarplatten mit zusätzlichen 22 % Saccharose hergestellt.

2.5. Medienzusätze

Spurenelement – Lösung TES

(Claus *et al.*, 1983)

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

pH 7,0 (mit 1 M KOH einstellen)

Ad 1000 mL H₂O_{demin.}

Vitamin- Lösung Imhoff

(Imhoff & Trüper, 1977)

Nicotinsäureamid	0,35 g
Thiamin x HCl (Vitamin B ₁)	0,30 g
Biotin	0,10 g
p-Aminobenzoesäure	0,20 g
Pyridoxin x HCl (Vitamin B ₆)	0,10 g
Ca-DL-Panthenat	0,10 g
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,05 g
Ad 1000 mL H ₂ O _{demin.}	

3. Lösungen und Puffer

3.1. Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden

Plasmidisolation:

Puffer P1:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNaseA
Puffer P2:	200 mM NaOH, pH 12,5, 1 % SDS
Puffer P3:	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

Isolierung genomischer DNA:

Es wurden die Puffer verwendet, die das Kit pEQ Gold Bacterial DNA Kit (pEQlab, Erlangen) enthält.

Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese mit DNA:

TAE-Puffer (1x):	40 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 0,6 % Eisessig, pH 8,0
Probenpuffer (6x):	60 mM EDTA, 0,09 % (w/v) Bromphenolblau, 60 % (v/v), Glycerol, pH 8,0

Lösung für die Transformation von Bakterien:

Salzlösung

1 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O	7 mL
1 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 mL
Ad 100 mL steriles H ₂ O _{demin}	

Das H₂O_{demin} wurde vorgelegt, weil ansonsten eine Fällung der Salze zu beobachten ist.

3.2. Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Arbeiten

SDS-PAGE:

6x Proteinprobenpuffer:	Tris-HCl	50 mM
	Glycerol	10 % (v/v)
	SDS	4 % (w/v)
	β -Mercaptoethanol	2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
	Ad 10 mL H ₂ O _{demin}	

Der pH des Probenpuffers wurde auf 6,8 eingestellt.

Ni-NTA-Proteinaufreinigung:

Lysispuffer:	10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
Waschpuffer:	20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
Elutionspuffer:	250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0

3.3. Lösungen und Puffer für analytische Verfahren

Extraktion:

Bligh & Dyer-Lösung: Methanol:Chloroform:Reinstwasser im Volumenverhältnis
10:5:4

Soxhlet-Extraktion: 100 %iges Methanol

Isokratische HPLC:

Laufmittel: 80 % (v/v) Acetonitril (100 %), 20 % (v/v) H₂O_{reinst}

Gradienten HPLC mit Vorsäulenderivatisierung:

Laufmittel:

Na-Acetat-Puffer: (1) 0,3 %ige Essigsäure

(2) 50 mM Na-Acetat-Lösung

Der pH-Wert der 0,3 %igen Essigsäure (1) wird mit der 50 mM Acetat-Lösung (2) auf den pH-Wert 4,2 eingestellt.

Laufmittel A: 79,5 % (v/v) Acetonitril (100 %), 20 % (v/v) Na-Acetat-Puffer,
0,5 % (v/v) THF

Laufmittel B: 20 % (v/v) Acetonitril (100 %), 80 % (v/v) Na-Acetat-Puffer

Vorsäulenderivatisierung:

Borat-Puffer: 25 mM Borsäure, pH 7,4 (mit 1 N NaOH) einstellen

Lösung 1: **Boratpuffer** mit einer Aminosäure als **internen Standard**
20 µL 2,5 mM interner Standard (Taurin oder Norvalin)
1,980 µL Boratpuffer

Lösung 2: 1 mM **FMOC**-Reagenz-Lösung
(1) 2,6 mg FMOC-Reagenz in einem mL Aceton lösen.
(2) 1,8 mL mit 200 µL FMOC-Reagenz-Lösung (1) versetzen.

Lösung 3: 40 mM **ADAM**-Reagenz-Lösung
(1) 22,8 mg ADAM Reagenz in 1,5 mL Boratpuffer lösen.
(2) 1,5 mL Aceton zu der ADAM-Reagenz-Lösung (1) geben.

Lösung 4: Laufmittel A

3.4. Lösungen und Puffer für enzymatische Assays

LDH-Assay:

Lösung 1: 100 mM K_2HPO_4

Lösung 2: 100 mM KH_2PO_4

Die Lösung 1 wurde mit der Lösung 2 auf den pH-Wert 7,8 eingestellt.

Pyruvat-Stammlösung:	40 mM in Reinstwasser
NADH-Stammlösung:	6 mM in Reinstwasser (frisch)
LDH-Stammlösung (Fluka):	0,050 mg/mL
Solutstammlösungen:	50 mM Solut in 100 mM Kaliumphosphatpuffer

Thiolnachweis:

Ellman-Reagenz-Lösung:	2 mM DTNB wurden in 50 mM NaH ₂ PO ₄ Puffer (mit 1 N NaOH auf pH 7,2 einstellen) gelöst.
SDS-Lösung:	1 % (w/v) in H ₂ O _{demin.}
5x Reaktionspuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 750 mM NaCl, pH 8,0
Glutamin-Stammlösung:	200 mM in Reinstwasser
Glutamat- Stammlösung:	200 mM in Reinstwasser
Glutamin-1-amid- Stammlösung:	200 mM in Reinstwasser
Glutamat-1-amid.Lösung:	200 mM in Reinstwasser
Acetyl-CoA- Stammlösung:	10 mM in Reinstwasser
Cystein- Stammlösung:	2 mM in Reinstwasser
ATP- Stammlösung:	10 mM in Reinstwasser

4. Bakterienanzucht und –kultivierungsverfahren

4.1. Mikrobanksystem

Das käuflich erhältliche Kit Microbank™ enthält kleine, poröse Kugeln, die als Träger dienen, um die Mikroorganismen während der Kryopreservation zu unterstützen. Die Mikroorganismen können an die Oberfläche dieser kleinen Kugeln anhaften. Durch diese mechanische Hilfestellung in Kombination mit der ebenfalls enthaltenen Lösung, die Kryoschutzstoffe enthält, ist es möglich die Mikroorganismen für einen längeren Zeitraum bei -70 °C zu lagern.

Das Kryogefäß wurde unter sterilen Bedingungen geöffnet und mit Zellen aus einer Flüssigkultur oder mit Zellen, die von einer Kultivierungsplatte entnommen wurden, befüllt.

Das Kryogefäß wurde wieder verschlossen und 4-5 mal invertiert, um die Zellen mit der Schutzlösung zu emulgieren. Anschließend wurde das Kryogefäß mit der enthaltenen Bakterienkultur bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

4.2. Stammhaltung

Die Bakterienstämme *H. elongata* und *H. elongata* AKB wurden auf Kultivierungsplatten mit einem 2 %igem Agar-Zusatz zu dem Minimalmedium MM63 mit einem Salzgehalt (NaCl) von 2 % bzw. 1 % über Nacht bei 30 °C angezogen. Für eine längerfristige Lagerung wurden Kultivierungsplatten mit einem Antibiotic Broth Medium No. 3 (AB-Medium) hergestellt und ebenfalls mit einem 2 %igem Agar-Zusatz und dem entsprechenden Salzgehalt versehen.

E. coli Stämme wurden analog zu dem oben erwähnten Stamm *H. elongata* AKB angezogen, wobei dem Minimalmedium eine Vitaminlösung zugesetzt wurde, weil der Stamm *E. coli* DH5 α Thiamin auxotroph ist. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C auf Agarplatten, die aus dem Mineralsalzmedium MM63 hergestellt wurden. Für eine längerfristige Lagerung wurde der Stamm auf Kultivierungsplatten, die aus dem Komplexmedium Antibiotic Broth Medium No. 3 bestanden, über Nacht bei 30 °C angezogen. Der Organismus *Pseudomonas putida* KT2440 wurde ebenfalls auf dem Minimalmedium MM63 und dem Komplexmedium Antibiotic Broth Medium No. 3 über Nacht bei 30 °C kultiviert. Hier wurde standardmäßig ein entsprechender Salzgehalt zugesetzt, so dass die Endkonzentration der Medien 1 % NaCl und 2 % Agar betrug.

Alle verwendeten Stämme wurden auf den Kultivierungsplatten bis zu zwei Monate bei 4 °C gelagert. Plasmidtragenden Stämmen wurde das entsprechende Antibiotikum (Tab. 2) zugefügt.

Tab. 2: verwendete **Antibiotika** und deren eingesetzte Konzentrationen

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>H. elongata</i>
Kanamycin	50 µg/mL	50 µg/mL – 250 µg/mL
Ampicillin	100 µg/mL	-
Carbenicillin	100 µg/mL	-

4.3. Allgemeine Bakterienkultivierung

Die Anzucht von Vorkulturen wurde in 100 mL Erlenmeyer Kolben durchgeführt, der mit 20-30 mL Medium befüllt und durch eine mit einer Impföse von einer Agarplatte abgestrichenen Bakterienkolonie beimpft wurde. Den plasmidtragenden Stämmen wurde das entsprechende Antibiotikum in der angemessenen Konzentration (Tab. 2) zugesetzt.

Die Bakterienkultivierung der Hauptkulturen wurde standardmäßig in OD-Kolben, bestehend aus einem modifizierten 250 mL Weithalskolben mit einem seitlich angebrachten Glasrohr, durchgeführt. Eine am Grund des Kolbens vorhandene Schikane dient der besseren Sauerstoffversorgung der Kultur. Die Schaumstoffkappen gewährleisten ebenfalls einen adäquaten und sterilen Gasaustausch der Kultur. Ein Schraubverschluss vereinfacht eine Probennahme der angezogenen Kulturen. Die Hauptkulturen wurden mit einer OD_{600} zwischen 0,05 und 0,1 einer angewachsenen Vorkultur beimpft. Das Kulturvolumen der Hauptkulturen betrug 100 mL und in einigen Ausnahmefällen 50 mL. Auch hier wurden gegebenenfalls die entsprechenden Antibiotika in der angemessenen Konzentration zugegeben (Tab. 2). Der Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 wurde additiv mit der Spurenelementlösung TES (Abschn. I.2.5) versetzt. *E. coli* DH5 α wurde begründet durch die vorhandene Thiamin Auxotrophie Vitaminlösung (Abschn. I.2.5) zugegeben.

4.4. Anzucht von Bakterien in Mikrotiterplatten

Für die Bakterienanzucht in Mikrotiterplatten wurde eine 20 mL Vorkultur in einem 100 mL Erlenmeyerkolben angesetzt. In die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden 182 µL MM63 Medium mit der entsprechenden Salinität und 2 mM Solutlösung gegeben. Zu diesem Gemisch wurden 5 %ig mit einer Bakterienkultur angeimpft. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie verschlossen, in die mit einer Kanüle jeweils 2 kleine, seitliche Luftlöcher pro

Kavität gestochen wurden. Anschließend wurde das Bakterienwachstum in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 600 nm dokumentiert.

4.5. Fermentation

Für die homologe bzw. die heterologe Produktion des kompatiblen Soluts NAGGN wurden die Stämme *Pseudomonas putida* KT2440 und der heterologe Produktionsstamm *H. elongata* AKB in dem Laborfermenter der Fa. Bioengineering AG mit der Typbezeichnung NLF22 in einem Arbeitsvolumen von 15 L fermentiert. Die Mess- und Regeltechnik zur Kontrolle und Dokumentation des Prozesses enthielt folgende Bestandteile:

- Temperatursonde
- pO₂-Sonde
- pH-Sonde
- Sonde zur Trübungsmessung

Der vollständige Zusammenbau aller Sonden, Schlauchverbindungen und Filtereinheiten erfolgte vor der Sterilisation des Fermenters. Der Prozess der Sterilisation wurde die Herstellerangaben beachtend 20 min bei 121 °C vollführt.

Für den Organismus *P. putida* wurde das Mineralsalzmedium MM63-3 mit Glycerin als C-Quelle und für den heterologen NAGGN-Produzenten *H. elongata* AKB wurde das Glucose-Citrat-Medium in einem externen Gefäß autoklaviert.

Nach der Sterilisation wurde der Fermenter mit dem entsprechenden Medium steril befüllt. Nachdem die Temperatur auf die Prozesstemperatur von 30 °C geregelt wurde, konnte der Fermentationsprozess mit der sterilen Einleitung der Vorkultur (500 mL) gestartet werden. Die Rührerdrehzahl wurde manuell gesteuert, ebenso wie die Zugabe des Antischaummittels (Dehysan Z 2111, Cognis Deutschland, Düsseldorf) bei einsetzender Schaumbildung. Bei Abweichungen des pH-Werts konnte durch regelkreisgesteuerte Peristaltikpumpen steril 1 M HCl Lösung bzw. 1 M NaOH Lösung zugeführt werden. Probenahmen erfolgten im 1 mL Volumen für die manuelle Bestimmung der optischen Dichte und in größeren Volumina, 100 mL, für die weitere Probenanalyse beispielsweise durch HPLC-Messungen. Die Parameter Temperatur, pO₂, pH und Trübung wurden durch die „Biologics Software“ Version 5.32 dokumentiert.

5. molekularbiologische Methoden

5.1. verwendete Plasmide

Tab. 3: verwendete Plasmide und deren genotypische Bezeichnungen und Quellen

Plasmide	Genotyp	Quelle
pK18<i>mobsacB</i>	Kan ^R , <i>mob</i> -Kassette, <i>sacB</i> -Gen	Pridmore, 1987
pK18-3,5	pK18 <i>mobsacB</i> , Promotorbereich des Ectoingenclusters aus <i>H. elongata</i> , Gene <i>PP1750</i> und <i>PP1749</i> aus <i>P. putida</i>	Diese Arbeit
pK18-naggn	pK18 <i>mobsacB</i> , Promotorbereich und stromabwärts Bereich des Ectoingenclusters aus <i>H. elongata</i> , Gene <i>PP1750</i> , <i>PP1749</i> und <i>PP1748</i> aus <i>P. putida</i>	Diese Arbeit
pK18-Δ<i>PP1750</i>::Amp^R	pK18-naggn, in dem eine Amp ^R – Kassette in das Gen <i>PP1750</i> inseriert wurde	Diese Arbeit
pK18-Δ<i>PP1749</i>	pK18-naggn, der eine Deletion des Gens <i>PP1749</i> aufweist	Diese Arbeit
pK18-Δ<i>PP1748</i>	pK18-naggn, der eine Deletion des Gens <i>PP1748</i> aufweist	Diese Arbeit
pET15b	Amp ^R , pT7	Novagen, Merck Group, Darmstadt
pET15b-<i>PP1750</i>	Amp ^R , Gen <i>PP1750</i> aus <i>P. putida</i> KT2440 steht unter der Kontrolle des pT7	Diese Arbeit
pET22b(+)	Amp ^R , pT7, <i>peIB</i> leader Sequenz	Novagen, Merck Group, Darmstadt
pET22b(+)-<i>PP1749</i>	Amp ^R , Gen <i>PP1749</i> aus <i>P. putida</i> KT2440 steht unter der Kontrolle des pT7	Diese Arbeit

5.2. Primer

Tab. 4: verwendete Primer und deren Sequenzen und Besonderheiten. Die Hybridisierungsbereiche innerhalb der Primersequenz mit der Nukleotidsequenz des NAGGN-Genclusters aus *P. putida* KT2440 sind unterstrichen.

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]	Länge [bp]
uect-up	<i>Bam</i> HI	66,4	26
	ATCA <u>GGATCC</u> GATCATCCAGGGCATC		
uect-dwn	<u>AATCCGCACAT</u> TGTCGTGGTTCGCT	64,6	25
nagn-up	CGAACCACGACAAT <u>TGTGCGGATTAGCAG</u>	68,0	25
Prim2-HindIII	<i>Hind</i> III	66,3	25
	CATGA <u>AAGCTT</u> TCCAGCAGCACGCG		
Prim1-HindIII	<i>Hind</i> III	64,4	24
	TGGA <u>AAGCTT</u> TCATGCCGGGTTCCG		
nagn-dwn	AGAATACTGCGCCT <u>TAGCCTTTGTTTCCG</u>	66,7	29
dect-up	<u>AACAAAGGCTAAGGCGCAGTATTCTGCC</u>	66,6	28
dect-dwn	<i>Bg</i> III	66,7	29
	AGCG <u>AGATCT</u> GTATCGACACGCATCACTT		
forPP1750	<i>Nde</i> I	61,3	25
	ATA <u>CATATG</u> TGCGGATTAGCAGGAG		
revCPP1750	<i>Xho</i> I	64,8	26
	TA <u>CTCGAG</u> GATTCCTTGTTTCGCTCAG		
fPP1749-c	<i>Nde</i> I	63,3	33
	TATTCT <u>CATATG</u> AAAGCCCATGAAATCGCTTAT		
revCPP1749	<i>Xho</i> I	69,6	24
	TA <u>CTCGAG</u> GGCCAACGGCCGGCTA		

5.3. PCR – Polymerasekettenreaktion

(Mullis & Faloona, 1987)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifizierung von Genen bzw. DNA Bereichen angewendet. Die Oligonukleotide, als Startermoleküle, enthalten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, durch die eine gezielte Klonierung der amplifizierten DNA-Fragmente, beispielsweise in einen Klonierungsvektor, ermöglicht wurde.

Die Oligonukleotide flankierten den zu vervielfältigenden Genbereich und hybridisierten nach der Denaturierung an die homologen DNA Bereiche (Annealing). Durch die freien 3'-OH-Enden konnten die kurzen doppelsträngigen DNA Bereiche durch die DNA-Polymerase und deren komplementären Einbau von Nukleosidtriphosphaten verlängert werden (Mullis & Faloona, 1987). Eine PCR unterteilt sich üblicherweise in drei Schritte. Zunächst erfolgt die Denaturierung des Templates, bei der die doppelsträngige DNA durch Hitzeeinwirkung in Einzelstränge denaturiert wird. Der Annealing-Schritt umfasst die Anlagerung, der im Reaktionsansatz befindlichen Primer an die homologen DNA Bereiche der Matrize. Die freien 3'-OH-Gruppen dienen der DNA Polymerase als Startpunkte für die DNA Strangsynthese. Diese Synthese der DNA zum Doppelstrang erfolgt in Anwesenheit von dNTPs durch die DNA Polymerase und wird als Elongation bezeichnet. Durch mehrfache Wiederholung der oben genannten Schritte ist es möglich eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA Bereiches zu generieren.

Es wurde die thermostabile, modifizierte DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, die Phusion-DNA-Polymerase der Fa. NEB, verwendet.

Tab. 5: PCR-Reaktionsansatz

Reaktionskomponente	Konzentration
Oligonukleotid I	5-50 pmol
Oligonukleotid II	5-50 pmol
5x Polymerase-Puffer	10 µL
2 mM dNTP-Mix	5 µL
DNA-Polymerase	0,02 U/µL
Betain	1 M
Matrizen-DNA	20-100 ng

Tab. 6: PCR-Programm

Zyklus Schritt	Temp [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	3 min	1
Denaturierung	98	45 s	30
Annealing	50 - 68	45 s	
Elongation	72	15 - 30 s/kb	
finale Elongation	72	10 min	1
	4	Hold	1

5.3.1. SOE-PCR (splicing by overlap extension)

Die Technik der SOE-PCR (Horten *et al.*, 1989) wurde eingesetzt, um zwei DNA-Fragmente mittels PCR miteinander zu verknüpfen. Zunächst wurden zwei DNA Bereiche, mit genomischer DNA als Matrize, in zwei separaten Reaktionsansätzen amplifiziert. Für diese PCR-Reaktionen wurden jeweils zwei Oligonukleotide, die das zu vervielfältigende DNA-Fragment flankierten, verwendet. Die Oligonukleotide wurden so gestaltet, dass sie komplementäre Bereiche des zu verknüpfenden Gen-Fragments besaßen und somit verlängert wurden. In einem zweiten Schritt diente eine weitere PCR-Reaktion dazu, die schon amplifizierten DNA Produkte miteinander zu fusionieren. In diesem Fall wurden die generierten DNA-Fragmente als Matrize verwendet, wobei die komplementären DNA Bereiche hybridisierten und als Startermoleküle für die DNA-Polymerase wirkten. An ihren freien 3'-OH-Enden wurde die beiden Stränge verlängert, wodurch ein Fusionsprodukt der beiden einzelnen DNA-Fragmente erzielt wurde. Die äußeren, flankierenden Oligonukleotide dienten der Vervielfältigung dieses Fusionsproduktes und enthielten zusätzlich Restriktionsschnittstellen für eine sich anschließende Klonierung.

5.3.2. Kolonie – PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Überprüfung der chromosomalen Mutante durchgeführt und unterscheidet sich von einer Standard PCR derart, dass statt isolierter genomischer DNA ganze Zellen als Matrize eingesetzt werden, die durch eine verlängerte Initialdenaturierung von 10 min aufgeschlossen werden. Nach der Initialdenaturierung wird der PCR-Prozess

unterbrochen, um die DNA-Polymerase hinzuzugeben. Das weitere Vorgehen verläuft nach dem Standardprotokoll (Abschn. I.5.3).

5.4. Gewinnung von DNA

5.4.1. Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Bakterienzellen erfolgte gemäß den Herstellerangaben für das eingesetzte Kit pEQGold Bacterial DNA Kit der Fa. pEQlab aus Erlangen.

5.4.2. Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung wurde zunächst eine Vorkultur mit einem Mediumvolumen von 30 mL beimpft, die über Nacht bei der entsprechenden Temperatur und 180 rpm inkubiert wurde. Es wurden 1,5-8 mL in einem 2 mL Eppendorfgefäß zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µL Puffer P1 versetzt und durch Mischen (Vortexen) resuspendiert. Daran schloss sich eine Zugabe von 200 µL Puffer P2 an, der durch Invertieren (4-5 mal) gemischt wurde. Innerhalb von 2 min wurden 200 µL Puffer P3 zugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde ein Zentrifugationsschritt von 3 min und 13 000 rpm (16 060 g) durchgeführt. Der Überstand wurde in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt, in denen schon 500 µL Chloroform vorgelegt waren. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 3 min bei 13 000 rpm (16 060 g) wurde eine Phasentrennung der beiden Lösungsmittel Chloroform und Wasser erleichtert. Die obere Phase wurde in frische Eppendorfgefäße überführt, die mit 500 µL Isopropanol gefüllt waren.

Die Proben wurden 3 min bei 13 000 rpm (16 060 g) zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung in 500 µL 70 %igem eiskaltem Ethanol. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und der Überstand wurde abermals entfernt. Die Proben wurden bei einer Temperatur zwischen 65 und 75 °C getrocknet. Zu den getrockneten Proben wurden 30 bis 50 µL H₂O_{reinst} oder TE-Puffer gegeben.

5.5. Modifizierung von DNA

5.5.1. Restriktion

Die Restriktion von DNA-Fragmenten wurde in einem Reaktionsvolumen zwischen 30 und 40 µL durchgeführt. Die Puffer wurden entsprechend der Herstellerangaben zu den verwendeten Enzymen ausgewählt. Die Puffer wurden für Restriktionsansätze, in denen zwei Enzyme verwendet wurden, so ausgewählt, dass die jeweiligen Enzyme die höchste Aktivität

zeigten. Wenn kein adäquater Puffer für einen Doppelverdau aufzufinden war, wurden die Restriktionen einzeln und nacheinander durchgeführt, wobei zwischen den einzelnen Reaktionen ein Aufreinigungsschritt vollzogen wurde, um störende Enzyme und Pufferbestandteile zu entfernen (Abschn. I.5.6). Zu den Reaktionsansätzen wurden zwischen 2,5 U und 20 U Enzym zugesetzt. Die Restriktionen wurden 1,5 bis 3 h bei der für das Enzym vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur, meistens 37 °C, inkubiert.

5.5.2. Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde eingesetzt, um beispielsweise bei Klonierungen die Religation des Klonierungsvektors zu vermeiden. Das Desoxyribose-Phosphat Rückgrat der DNA kann ohne verbindende Phosphatgruppen keine geschlossene Ringstruktur ausbilden. Unter Verwendung eines geeigneten Puffers, der in den Restriktionsansätzen verwendet wurde, wurden 0,5 U FastAP der Fa. Fermentas (Vilnius) zu dem Restriktionsansatz (Abschn. I.5.5.1) hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 85 °C 20 min inaktiviert.

5.5.3. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde durch die T4-DNA-Ligase, die aus dem Bakteriophagen T4 stammt, vermittelt. Die Ligationsansätze wurden mit dem dazugehörigen T4-DNA-Ligase Puffer durchgeführt. Zusätzlich wurden die Reaktionsansätze mit ATP und β -Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 0,5-1 mM versetzt. Die Ligation wurde entweder über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die T4-DNA-Ligase bei 65 °C für 20 min inaktiviert.

5.6. **Reinigung von DNA nach enzymatischen Modifikationen**

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder zur Reinigung hydrolysierter DNA-Fragmente von Pufferbestandteilen und Enzymen wurde das E.Z.N.A Gelextraction Kit (peqlab, Erlangen) eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.7. **Transformation von *E. coli***

5.7.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde das Verfahren nach Dagert & Ehrlich (1979) ausgewählt. Ein Mediumvolumen von 70 mL 2x YT-Medium wurde 1 %ig mit einer zuvor angezogenen *E. coli* Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde bis zur

exponentiellen Phase, welche einer OD_{600} von 0,3 -0,4 entspricht, bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde in sterilen Zentrifugenbechern bei 5000 g und 4 °C 6 min abgeerntet. Das Zellpellet wurde in 10,5 mL eiskalter Salzlösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 5000 g und 4 °C 10 min zentrifugiert und abermals für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine Zugabe von 875 µL sterilem 100 %igem Glycerin. Das mit Salzlösung und Glycerin versetzte Zellpellet wurde durch Vortexen gemischt und anschließend auf 1,5 mL Eppendorfgefäße mit einem Volumen von 200 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden entweder sofort verwendet oder bei -70 °C gelagert.

5.7.2. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Ein Aliquot nach Dagert & Ehrlich (1979) hergestellter chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde mit 2 bis 20 µL Plasmid oder Ligationsansatz versetzt. Die Zellen wurden 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte daraufhin ein Hitzeschock für 1,5 min bei 42 °C. Die Zellen wurden nach dem Hitzeschock für 2 min auf Eis inkubiert. Zu dem Transformationsansatz wurden 500 µL 2x YT-Medium gegeben. Die Dauer der phänischen Expression variierte je nach vorliegender Antibiotikaresistenz und belief sich auf einen Zeitraum zwischen 30 min und 3 h. Weitere Parameter wie Inkubationstemperatur und Rotationsgeschwindigkeit betragen 37 °C und 180 rpm (Brutschrank). Von dem Transformationsansatz wurden 100 µL auf eine Selektionsagarplatte ausgestrichen. Der restliche Transformationsansatz wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit dem Rücklauf wurde das Pellet resuspendiert und ebenfalls auf eine Selektionsagarplatte ausgestrichen. Die ausgestrichenen Agarplatten wurden zumeist über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

5.8. **Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren, das auf der Auftrennungsgeschwindigkeit geladener Moleküle in einem elektrischen Feld beruht. Durch das Zucker-Phosphat-Rückgrad der DNA und dem damit einhergehenden gleichen Ladungs-Masse Verhältnis bewegt sich die DNA in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird dabei von mehreren Faktoren wie Größe der DNA-Fragmente, deren Konformation, Prozentigkeit des Agarosegels und der elektrischen Feldstärke beeinflusst. Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Überprüfung von Restriktionen, PCR-Reaktionen, zur präparativen Isolierung und Mengenabschätzung von DNA-Fragmenten verwendet.

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,7 % und 2 % in 1 x TAE-Puffer für die Gelmatrix verwendet. Die DNA-Proben wurden mit einem 6fach konzentrierten Probenpuffer versetzt. Die angelegte Spannung lag in den horizontalen Gelkammern zwischen 60 und 120 V. Als Laufmittel diente 1 x TAE-Puffer. Es erfolgte eine Anfärbung der DNA mit 0,1 %igem Ethidiumbromid für 5 min in einem Färbebad. Die Entfärbung wurde mit H₂O_{demin} für 5 min durchgeführt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die Helix von doppelsträngiger DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich emittiert ($\lambda=590$). Die Visualisierung der DNA erfolgte mit einer Geldokumentationsanlage von Viodeosystems INTAS (Göttingen), unter Verwendung der Software INTAS, in der die DNA mit UV-Licht der Wellenlängen 365 nm angeregt wurde.

5.9. Herstellung chromosomaler Mutanten

Integrationen von Genen oder ganzen Genbereichen in das Genom ist eine essentielle Methode zur Herstellung chromosomaler Mutanten. Solche chromosomalen Integrationsmutanten sind unter anderem für die Produktion vorteilhaft, weil keine Aufrechterhaltung der Plasmide durch Antibiotika Zugabe vonnöten ist. Chromosomale Austausche beruhen auf dem Ereignis der homologen Rekombination. Eine singular stattfindende homologe Rekombination führt zu einer Insertion, wohingegen zwei solcher Rekombinationsereignisse einen Austausch eines Genbereichs gegen einen anderen verursachen können.

Das erste Rekombinationsereignis wurde durch den Phänotyp einer Antibiotikaresistenz, in diesem Fall des Antibiotikums Kanamycin, das von dem Vektor pK18*mobsacB* kodiert wurde, selektioniert. In *H. elongata* Zellen wurde der Vektor pK18*mobsacB* konjugiert und auf MM63-2 Agarplatten mit einer sehr hohen Kanamycin Konzentration (250 µg/mL) ausgestrichen. Für die Selektion auf das zweite Rekombinationsereignis wurden dementsprechend nur kanamycinresistente *H. elongata* Zellen eingesetzt.

Das zweite Rekombinationsereignis wurde durch das auf dem Vektor pK18*mobsacB* vorhandene Gen *sacB*, das das Enzym Levansaccharase aus *B. subtilis* kodiert, forciert. Durch Addition von Saccharose zu dem komplexen LBG-Medium wurde auf die Zellen selektioniert, die das Gen *sacB* nicht mehr hatten und damit einhergehend die Excision des noch im Genom vorhandenen Vektoranteils stattgefunden hat. Durch die exprimierte Levansaccharase entstehen Zuckerpolymere aus Saccharose, die toxisch auf die Zellen

wirken, da sie deren Stoffwechsel stark beeinträchtigen. Für den zweiten Rekombinationsschritt wurden kanamycinresistente *H. elongata* Zellen über Nacht bei 30 °C in 5 mL Kulturen in LBG-2 Flüssigmedium angezogen und anschließend mit frischem Medium verdünnt ($10^{-1} - 10^{-8}$). Von den Verdünnungsstufen $10^{-4} - 10^{-8}$ wurden jeweils 100 µL auf LBG-2 Platten mit 22 % Saccharose ausgestrichen. Die Kolonien, die ein Wachstum auf Saccharose haltigen LBG-2 Agarplatten zeigten, wiesen eine Excision des, durch die erste homologe Rekombination im Genom verbliebenen, Vektoranteils auf. Diese Kolonien zeigten als Genotyp entweder den Wildtyp oder die chromosomale Mutante. Durch Kolonie-PCR wurden die einzelnen Klone auf ihren Genotyp überprüft.

5.10. Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß Selektion wird als einfaches Screening Verfahren eingesetzt, um festzustellen, ob bei einer erfolgten Klonierung ein Gen in den verwendeten Klonierungsvektor inseriert worden ist. Als Markergen wird das Gen *lacZα*, das den C-terminalen Bereich der β-Galaktosidase, einen Bestandteil des Lactose-Operons, kodiert, verwendet. Sofern ein Plasmid, das das *lacZα* Gen trägt, in einen Stamm transformiert wird, der den N-terminalen Teil der β-Galaktosidase exprimiert, so kommt es zu der sogenannten α-Komplementation. Dieses Phänomen stellt die Anlagerung der beiden separat exprimierten Domänen der β-Galaktosidase zu einem funktionalen rekombinanten Enzym dar. Bietet man Bakterienzellen, die diese rekombinante β-Galaktosidase exprimieren, X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranosid) als Substrat an, so wird dieses zu einem blauen Farbstoff umgesetzt.

Eine Integration eines Gens bzw. eines DNA-Fragments in das Gen *lacZα* führt dazu, dass das *lacZα* Gen deletiert wird und keine funktionstüchtige β-Galaktosidase mehr gebildet wird. Die Bakterienzellen, denen das Substrat angeboten wird, bleiben somit weiß. Dieses Selektionsverfahren ermöglicht die Unterscheidung von Zellen, die ein Plasmid mit inseriertem DNA-Fragment enthalten von denen, die einen Ausgangsvektor aufweisen, aufgrund der unterschiedlichen Färbung der transformierten Zellen.

Die Lösungen 0,05 M X-Gal in DMSO und 0,1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) in H₂O_{demin} wurden hergestellt. Die X-Gal-Stammlösung wurde jeweils frisch angesetzt und nur kurzfristig im Dunkeln gelagert. Von diesen Lösungen wurden 50 µL X-Gal- und 10 µL IPTG-Stammlösung zusammen mit den auszuplattierenden Zellen ausgestrichen. Nach 24 h war eine Blaufärbung der Kolonien, in denen sich religierter Vektor befand, zu erkennen.

5.11. DNA Größenbestimmung und Quantifizierung

Für die Größenbestimmung und Quantifizierung von DNA-Fragmenten wurde eine 1 kb DNA Leiter #0311 (Fermentas, Vilnius, Litauen) verwendet (Abb. 3). Die Größe der zu bestimmenden DNA-Fragmente wurde mit den Banden definierter Größe des Größenstandards analysiert. Die quantitative Bestimmung der DNA-Fragmente erfolgte aufgrund der Intensität einzelner Banden im Vergleich zu der Intensität vorhandener Banden der DNA Leiter. Die Banden des DNA Größenstandards entsprechen nicht nur einer bestimmten Größe, sondern auch einer definierten Menge DNA. Die Leuchtintensität der Banden nimmt bei zunehmender DNA Menge ebenfalls zu. Unter Verwendung dieser Methode der DNA Quantifizierung findet lediglich eine Abschätzung statt.

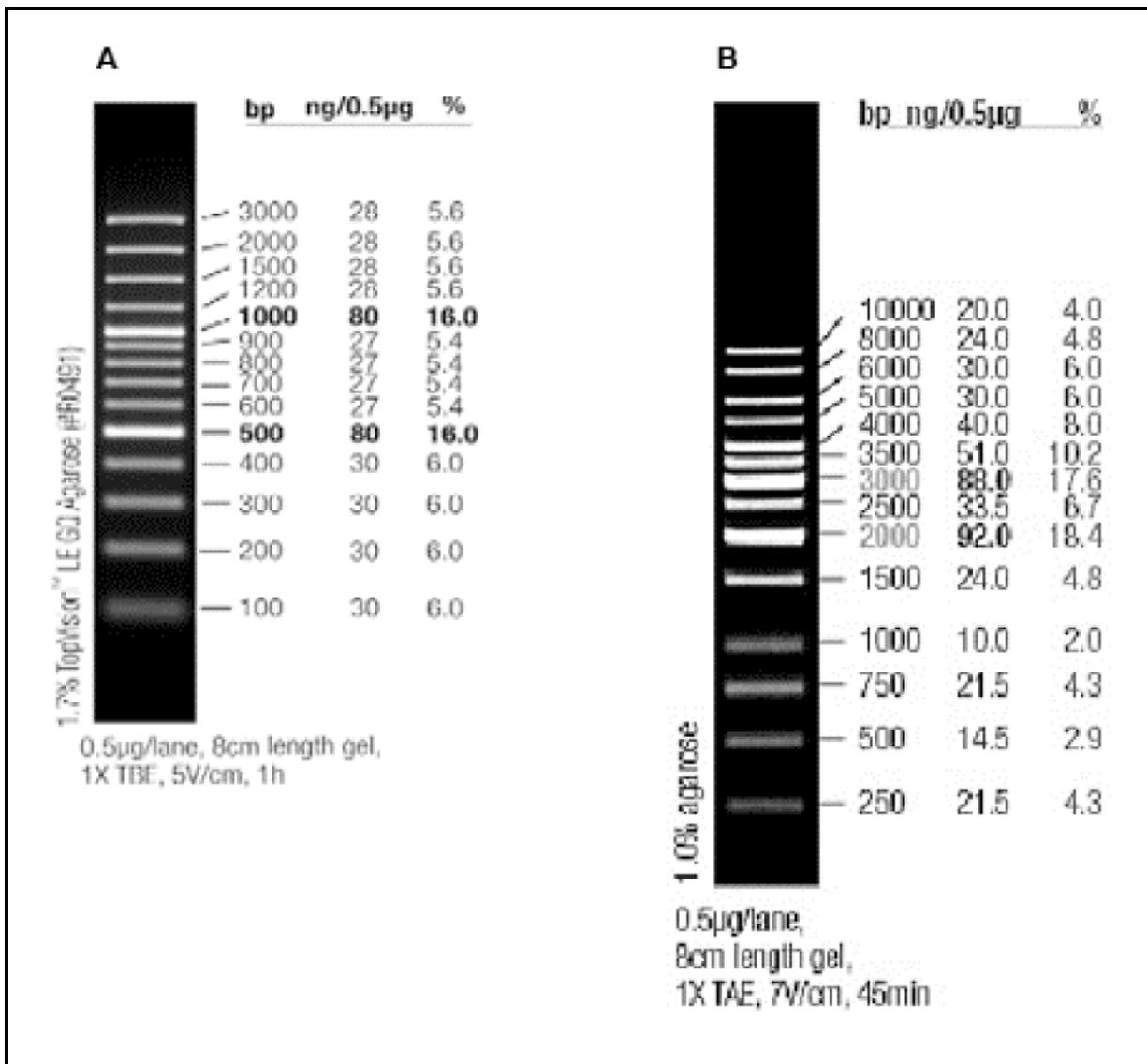


Abb. 3: (A) 100 bp plus DNA-Leiter #SM0321 (B) 1 kb DNA-Leiter #SM0311 (Fermentas, Vilnius, Litauen)

5.12. Konjugation von *H. elongata*

Für die konjugative Übertragung mobilisierbarer Plasmide wurde die Methode des „biparentalen matings“ genutzt. Durch die bakterielle Konjugation ist es möglich DNA, beispielsweise Plasmid DNA durch direkten Zell-Zell-Kontakt über sog. Konjugationsbrücken, die F-Pili, zu übertragen. Für diese Art der DNA-Aufnahme wurde der *E. coli* Stamm S17.1 verwendet, der sich dadurch auszeichnet, dass die *tra*-Gene des RP-4 Plasmids stabil im Genom integriert sind, und als Donorstamm fungiert. Die *tra*-Gene vermitteln die Ausbildung des Konjugationsapparates. Auf dem Plasmid befindliche *mob*-Gene kodieren für Mobilisierungsproteine, die an dem *oriT*, der sich ebenfalls auf dem Plasmid befindet, binden und dadurch einen Strangbruch induzieren. An dem Replikationsursprung *oriT* wird der „rolling-circle“ Mechanismus (Novick, 1980; Ibelgaufits, 1993) ausgelöst, wodurch das Plasmid über die Konjugationsbrücke übertragen wird. *H. elongata* diente als Rezipient.

Der plasmidtragende Stamm *E. coli* S.17.1 pK18-naggn wurde bei 37 °C und 180 rpm über Nacht in LB-1 Medium angezogen. Der Rezipientenstamm *H. elongata* wt wurde bei 30 °C und 180 rpm über Nacht kultiviert. Der Donorstamm *E. coli* S.17.1 pK18-naggn wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,05 in frischem Medium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Von dem Donorstamm *E. coli* S.17.1 pK18-naggn wurden 2 mL in einem 2 mL Eppendorfgefäß 1 min bei 13 000 rpm (16 060 g) zentrifugiert. Anschließend wurde 1 mL des Rezipientenstammes *H. elongata* wt ebenfalls in das Eppendorfgefäß pipettiert, in dem der Donorstamm bereits sedimentiert wurde. Mit 1 mL 2 %iger steriler NaCl-Lösung wurden die Zellen gewaschen und vorsichtig resuspendiert, damit die fragilen Pili intakt blieben. Ein weiterer Zentrifugationsschritt erfolgte für 1 min bei 13 000 rpm (16 060 g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden im Rücklauf vorsichtig resuspendiert und auf einen Konjugationsfilter gegeben, der schon auf eine LB-2-Agarplatte ohne Selektionsdruck aufgelegt worden war. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 24 h. Der Konjugationsfilter wurde in ein 2 mL Eppendorfgefäß gerollt und die Zellen wurden mit 2 %iger NaCl-Lösung von dem Filter gewaschen. Nach einer 1 minütigen Zentrifugation bei 13 000 rpm (16 060 g) wurde der Filter entfernt. Die Proben wurden mit Verdünnungsstufen zwischen 10⁰–10⁻⁴ verdünnt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden 100 µL auf MM63-2 Agarplatten ausgestrichen, die zudem noch mit 250 µg/mL des Antibiotikums Kanamycin, entsprechend der Antibiotikaresistenzkassette des verwendeten Plasmids pK18-naggn, versehen waren.

5.13. Sequenzierungen

Die in dieser Arbeit vorliegenden Sequenzierungen waren Auftragsarbeiten und wurden von der Fa. Sequiserve aus Vaterstetten durchgeführt.

6. Biochemische Methoden

6.1. Expressionssystem pET-System

Das käufliche pET-Expressionssystem ist ein starkes und weit verbreitetes Expressionssystem. Durch den späten Promotor der T7-RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 wird eine Expression homologer und heterologer Proteine ermöglicht (Studier & Moffatt, 1986; Tabor & Richardson, 1985). Das T7-RNA-Polymerase Gen *gene1* kann sowohl chromosomal als auch plasmidkodiert vorliegen. In dem verwendeten *E. coli* Stamm BL21(DE3) liegt das T7-RNA-Polymerase Gen *gene1* als genomisch integrierte Variante vor, die unter der Kontrolle des Promotors *lacUV5* steht, der im nicht induzierten Zustand und ohne weitere Kontrollen, wie z. B. durch das Enzym LysS (Studier, 1991), eine geringe Basalexpression zulässt. Die Transkriptionseinheit der T7-RNA-Polymerase ist durch das Lactose-Analogon IPTG induzierbar. Die T7-RNA-Polymerase ist hochspezifisch für ihre eigenen Promotoren, somit ist auch nur eine geringe Menge des Enzyms T7-RNA-Polymerase vonnöten, um eine hohe Transkription eines Gens, das durch einen T7-Promotor reguliert wird, und in einem Plasmid mit mittlerer Kopienzahl vorliegt, zu erzielen (Studier & Moffatt, 1986). Eine starke Regulierung des Systems ist wegen der hohen Effizienz der T7-RNA-Polymerase sehr wichtig (Mertens *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurden die Vektoren pET15b und pET22b(+) verwendet, die über eine Ampicillin-Resistenzkassette verfügen und auf diese Weise unter Selektionsdruck in der Bakterienzelle stabil vorliegen. Der Vektor pET15b weist darüber hinaus einen His-Tag auf, der durch die gerichtete Klonierung eines Zielgens in die Multiple Cloning Site des Plasmids als ein Fusionskonstrukt vorliegt, das bei der Expression über einen N-terminalen His-Tag verfügt. Das Plasmid pET22b(+) enthält ebenfalls einen His-Tag, der in diesem Fall durch die gerichtete Klonierung eines Zielgens C-terminal in dem Zielprotein vorliegt. In beiden Plasmiden liegt der Promotor pT7 vor, der durch die Bindung der T7-RNA-Polymerase, die Transkription der heterologen oder homologen Gene, die stromabwärts in die jeweiligen Vektoren inkloniert wurden, induziert. Das Gen *gene1* der T7-Polymerase steht selbst wiederum unter der Kontrolle des *lac*-Promotors, der durch den Induktor IPTG induziert wird.

Für die Expressionsversuche wurden 100 mL bis 500 mL Kulturen angezogen, bei denen zwei unterschiedliche Komplexmedien verwendet wurden. Zum einen wurde das Medium LB eingesetzt und zum anderen LB-Medium mit einem 0,75 %igen Glucose-Zusatz, der zu einer Repression des lac-Promotors im nicht induzierten Zustand führt. Die Kulturen wurden in der exponentiellen Phase bei einer OD_{600} zwischen 0,34 und 0,5 mit IPTG-Konzentrationen zwischen 0,2 mM und 0,4 mM induziert. Die Kulturen wurden 3 – 4 h je nach Expressionsmaximum geerntet. Die Bakterienzellen wurden per Ultraschall (Abschn. I.6.2) aufgeschlossen und für weitere Versuche, wie die Affinitätschromatographische Aufreinigung, eingesetzt.

6.2. Ultraschallzellaufschluss

Das Pellet einer Bakterienkultur mit einem Anzuchtvolumen zwischen 100 mL und 500 mL wurde in 6 - 12 mL eiskaltem Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschall unter Kühlung aufgeschlossen (Branson Sonifier Cell Disruptor, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury/CT, USA; 1 min/mL, Leistungszyklus 50 %). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (Tischzentrifuge; 30 min, 13 600 g). Der Überstand wurde in einem 15 mL Falcon-Tube gesammelt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei 4 °C gelagert.

6.3. Ni-Chelat-Affinitätschromatographie

Expressionskulturen wurden in einem Kulturvolumen zwischen 100 und 500 mL angezogen, induziert und geerntet. Die Zellen wurden in 6 bis 12 mL Lysispuffer aufgenommen und resuspendiert. Durch Ultraschall (Leistungszyklus 50 %) wurden die Zellen pro mL eine Minute aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in 2 mL Eppendorfgefäßen 30 min bei 4 °C und 13 000 rpm (16 060 g) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und von dem gesammelten Überstand (Lysat) wurde eine 200 µL Probe entnommen. Das Lysat wurde mit 200 bis 500 µL Ni-NTA-Agarose versetzt und eine Inkubation bei 4 °C und 200 rpm für 1 h folgte. Das Lysat wurde auf eine „gravity flow-through“ Säule gegeben und wiederum wurde eine 200 µL Probe von dem Durchflusses in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Der Rest des Durchflusses wurde verworfen. Der nächste Schritt bestand aus einem Waschschrift, bei dem der Lysis-Puffer (10 mL) verwendet wurde, der 10 mM Imidazol enthielt. Von dem Durchfluss wurde abermals eine Probe genommen und anschließend verworfen. Es schloss sich ein Waschschrift mit 10 mL eines Waschpuffers an, der 20 mM Imidazol enthielt. Nach der Probenahme des Durchflusses wurde dieser ein weiteres Mal verworfen. Der letzte

Schritt ist die Elution des Zielproteins, die mit 500 μL eines Elutionspuffers durchgeführt wurde, der 250 mM Imidazol enthielt und somit das Zielprotein von der Säule verdrängen konnte. Das vollständige Eluat wurde in einem Eppendorfgesäß aufgefangen.

6.4. Proteinprobenaufbereitung

Für die SDS-PAGE wurden 2 mL Proben von Überexpressionskulturen entnommen. Die optische Dichte wurde bei 600 nm bestimmt. Es wurde ein Volumen in ein neues Eppendorfgesäß überführt, das einer OD_{600} von 0,15 entsprach. Diese Probe wurde 3 min bei 13 000 rpm (16 060 g) zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Probe wurde mit 2 x 10 μL Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend verwendet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Proben aus Proteinaufreinigungen wurden mit einem Proteinbestimmungstest, dem BCA-Test, auf ihren Proteingehalt hin überprüft. Es wurden 20 μg der Proben auf das SDS-PAGE aufgetragen.

6.5. BCA-Assay zur Proteinbestimmung

Der BCA-Assay dient der kolorimetrischen Bestimmung des Proteingehaltes und wurde im Mikrotiterplatten Maßstab durchgeführt. Dieser Nachweis kombiniert zwei etablierte Reaktionen, die Biuretreaktion, bei der zweiwertige Kupfer Ionen in alkalischem Milieu zu einwertigen reduziert werden, und die colorimetrische Detektion von einwertigen Kupfer Ionen durch die Bicinchoninsäure (BCA). Die violette Farbe entsteht durch einen Chelatkomplex, der aus zwei Molekülen BCA und einem einwertigen Kupfer Ion gebildet wird. Dieser Komplex weist eine starke Absorption bei 562 nm auf. Die makromolekulare Struktur, Anzahl der Peptidbindungen und insbesondere die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin scheinen für die Komplexbildung ursächlich zu sein.

Die Eichreihe wurde mit einer BSA-Lösung unterschiedlicher Konzentration durchgeführt. Es wurden BSA-Konzentrationen von 500 μg , 400 μg , 300 μg , 200 μg , 100 μg , 50 μg und 0 μg angesetzt. Jeweils 20 μL dieser Lösungen wurden in eine Kavität einer Mikrotiterplatte pipettiert, wobei pro Konzentration eine Vierfachbestimmung vollzogen wurde. Jeweils 20 μL Probe wurden, wenn nötig verdünnt und in Vierfachbestimmung, in den Test eingesetzt.

Die Lösung mit den Reagenzien setzte sich aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil Lösung B zusammen. Jeweils 200 μL wurden in eine Kavität pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie verschlossen. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation in einem auf 60 °C vorgeheizten Heizschrank. Nach der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte bei

550 nm im Mikrotiterplattenlesegerät vermessen. Die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988; Kessler & Fanestil, 1986; Brown *et al.*, 1989).

6.6. SDS-PAGE

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit in dem elektrischen Feld wird von der Größe, der Eigenladung und der Tertiärstruktur der Proteine und nicht zuletzt von dem Vernetzungsgrad des Polyacrylamidgels bestimmt. Zur Verminderung dieser Einflüsse wird die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durch den Zusatz des Detergenz Natriumdodecylsulfat (kurz SDS; engl. Sodiumdodecylsulfate) durchgeführt, das zur Namensgebung der SDS-PAGE durch den Erfinder Laemmli (1970) führte. Durch die, im gleichen Verhältnis, stattfindende Bindung des anionischen Detergenz SDS an Proteine wird die Eigenladung der Proteine maskiert und die Laufgeschwindigkeit im Polyacrylamid-Gel wird vornehmlich durch die Größe des aufzutrennenden Proteins bestimmt und nur noch in zu vernachlässigbarem Maße durch die Eigenladung. Durch das Detergenz SDS werden Ladungen proportional zur Molekülmasse eingeführt (ein Molekül SDS pro zwei Aminosäuren), wodurch sich die Molekülmasse eines Proteins durch dessen Laufstrecke bestimmen lässt. Durch die Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen durch inter- und intramolekulare Disulfidbrücken tritt teilweise eine Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE auf, die nicht dem Molekulargewicht entspricht. Reduktionsmittel, wie beispielsweise β -Mercaptoethanol, minimieren diese Effekte durch die Reduktion der vorhandenen Disulfidbrücken, wodurch sie gespalten werden. Bei der SDS-PAGE werden sowohl die denaturierenden als auch die reduzierenden Bedingungen ausgenutzt, um eine besonders scharfe Fokussierung der Proteinbanden zu erzielen.

Die diskontinuierliche SDS-PAGE ist eine Weiterentwicklung der SDS-PAGE und besteht aus einem Trenngel und einem darüber gelagerten Sammelgel. Das Sammelgel dient der Aufkonzentrierung der einzelnen Proteinproben und das Trenngel der eigentlichen Größenauftrennung. Die Zusammensetzung folgt wie in Tab. 7 beschrieben.

Tab. 7: Zusammensetzung der SDS-PAGE

	Trenngel		Sammelgel
	10%	13%	4%
1,5 M Tris-HCl	2,5 mL	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl	-	-	1,25 mL
Acrylamid-Mix	5 mL	6,5 mL	1 mL
10%iges SDS	100 µL	100 µL	50 µL
H ₂ O _{reinst}	2,4 mL	900 µL	2,7 mL
10%iges APS	50 µL	50 µL	50 µL
Temed	5 µL	5 µL	5 µL

Tab. 8: Zusammensetzung des Acrylamid-Mixes

Lösungen	Volumen
Acrylamid (40%)	9,8 mL
Bisacrylamid (2%)	4,0 mL
H ₂ O _{reinst}	Ad 20 mL

6.7. Proteingrößenstandard

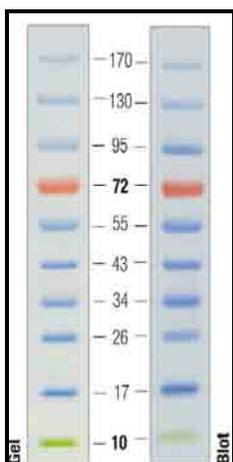


Abb. 4: Der Proteingrößenstandard #SM0671 von der Fa. Fermentas (Vilnius).

Der Proteingrößenstandard #SM0671 (Fermentas, Vilnius) kann, wie in Abb. 4 zeigt, mit einem 4-20 %igen Tris-Glycin Gel derart visualisiert werden. Der Größenstandard wurde zur Bestimmung der Proteingrößen verwendet.

6.8. Enzymatische Aktivitätstests

6.8.1. N-Acetyl-Transferase Assay

Die enzymatische Reaktion einer N-Acetylierung wird durch die enzymatische Klasse der N-Acetyltransferasen katalysiert. Die durch Enzyme dieser Klasse hervorgerufene N-Acetylierung kann durch den Einsatz des Ellman Reagenzes (DTNB) durch eine Farbreaktion visualisiert werden. Als Acetyl-Donor diente Acetyl-CoA, welches bei der Übertragung der Acetylgruppe zu CoA-SH umgesetzt wird. Das Ellman Reagenz bindet freie Thiolgruppen, wie die des bei der Enzymreaktion entstandenen CoA-SH und wird dabei zu einem farbigen Komplex umgesetzt. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei 405 nm.

Zunächst wurde eine Cystein-Eichreihe in einer Mikrotiterplatte erstellt. Die Eichreihe umfasste eine Konzentrationsreihe von 0 mM bis 0,35 mM Cystein-Lösung, in 0,05er Schritten, mit einem Volumen von 100 µL pro Kavität. Die Cystein-Eichreihe wurde, in Doppelbestimmung, mit dem 5x Reaktionspuffer hergestellt, um die Vergleichbarkeit in dem eigentlichen Reaktionsansatz zu gewährleisten.

Der Enzymtest mit der N-Acetyltransferase PP1749 wurde in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß bei 30 °C durchgeführt und nach dem Schema in Tab. 9 zusammengestellt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe des Enzyms gestartet. Die minütlich entnommenen 10 µL Proben wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, in der bereits 90 µL pro Kavität 1 %ige (w/v) SDS-Lösung vorgelegt wurden, um die Reaktion zu stoppen.

Tab. 9: Zusammensetzung des Enzymtests für den Nachweis der Thiolgruppen

Reaktionskomponenten	Volumen [μL]
5x Puffer	20
<u>Jeweils 1 Substrat pro Enzymtest:</u>	
200 mM Glutamin (Substrat)	15
200 mM Glutamat (Substrat)	15
200 mM Glutamin-1-amid (Substrat)	15
200 mM Glutamat-1-amid (Substrat)	15
10 mM Ac-CoA	10
10 mM ATP	10
Enzym PP1749 (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1
$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$	Ad 100 μL

Anschließend wurden 50 μL der 2 mM Ellman-Reagenz-Stammlösung zu den abgestoppten Reaktionsansätzen und zu der Cystein-Eichreihe hinzugegeben und direkt in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen.

6.8.2. LDH-Assay

Das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) aus dem Kaninchen Muskel (Fluka) katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat. Bei diesem Enzymtest werden die dafür aufzuwendenden Elektronen durch das Reduktionsmittel NADH zur Verfügung gestellt, das bei dieser Reaktion selbst zu NAD^+ oxidiert wird. Die Lactatdehydrogenase wurde zusammen mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten (Tab. 10) in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut.

Tab. 10: Der **Reaktionsansatz**, in dem die LDH mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten stabilisiert wird.

Volumen	Reaktionskomponente
180 μL	100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8, 50 mM Solut
20 μL	LDH-Stammlösung

Das Einfrieren wurde 20 s lang vollzogen und der Auftauvorgang 5 min bei Raumtemperatur. Dieser Prozess wurde sechsmal wiederholt. Nach den einzelnen Einfrier-Auftauzyklen wurde die verbliebene Restaktivität des Enzyms Lactatdehydrogenase vermessen und so die proteinstabilisierende Wirkung der kompatiblen Solute dokumentiert. Aus dem Reaktionsansatz, in dem das Enzym Lactatdehydrogenase zusammen mit verschiedenen kompatiblen Soluten den Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen wurde, wurden 10 μ L Probenvolumen für den Enzymtest entnommen. Für den Enzymtest, zur Überprüfung der Restaktivität des Enzyms, wurde Pyruvat als Substrat und NADH als Elektronendonator eingesetzt. Alle Reaktionskomponenten wurden in eine Quarzküvette gegeben (Tab. 11) und einhergehend mit der finalen Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm, dem Absorptionsmaximum von NADH. Die Abnahme der NADH Absorption wurde unter Verwendung des Photometers Novaspec[®] II verfolgt.

Tab. 11: Enzymtest der Lactatdehydrogenase

Volumen	Reaktionskomponente
890 μL	100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8
50 μL	40 mM Pyruvat-Stammlösung
10 μL	Probe (aus dem Reaktionsansatz)
50 μL	6 mM NADH-Stammlösung

7. Analytik

7.1. Extraktion

Dieses Extraktionsverfahren, zumeist für eine sich anschließende HPLC-Analyse genutzt, erfolgte durch die durch Galinski (1986) modifizierte Methode von Bligh & Dyer (1959). Von schon zuvor gefriergetrocknetem Zellmaterial wurden 30 mg abgewogen und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Ein Volumen von 500 μL Bligh & Dyer – Lösung, bestehend aus 10 Teilen Methanol, 5 Teilen Chloroform und 4 Teilen Wasser, wurde zu dem bereits abgewogenen gefriergetrocknetem Zellmaterial gegeben und für 5-20 min auf einem Schüttler bei ca. 1000 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 130 μL Chloroform und 130 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ zu dem Extraktionsansatz hinzugegeben und für weitere 5-20 min auf einem Schüttler bei 1000 rpm inkubiert. Die zusätzliche Zugabe von $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ und Chloroform führt zu einer Phasentrennung, durch die eine Methanol/Wasser und eine Chloroform- Phase entsteht, an deren Grenzfläche sich Proteine und andere Zellbestandteile als Interphase anreichern. Die wasserlöslichen kompatiblen Solute befinden sich in der wässrigen Phase. Durch einen Zentrifugationsschritt (5 min, 10 000 rpm = 9 500 g) bildeten sich die beiden Phasen schneller aus und die Abnahme von ungefähr 500 μL der wässrigen oberen Phase in ein frisches 1,5 mL Eppendorfgefäß wurde ermöglicht. Der Extrakt wurde direkt für weitere Analysen verwendet oder bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

7.2. Soxhlet-Extraktion

Die Soxhlet-Extraktion ist eine Methode der Extraktion aus festem Material mit einem flüssigen Lösungsmittel unter kontinuierlichem Rückfluss. Diese Art der Extraktion wurde bei größeren Mengen gefriergetrockneten Zellmaterials, z. B. nach Fermentationen im 15 L Maßstab, eingesetzt. Als Lösungsmittel fungierte 100 %iges Methanol.

Ein Zweihalsrundkolben mit einem Volumen von einem Liter wurde in einen Heizpilz platziert. Über dem Rundkolben wurde ein Soxhlet-Aufsatz montiert, in den eine Extraktionshülse aus Filterpappe mit dem zu extrahierenden Zellmaterial eingesetzt wurde. Ein Kühler wurde auf den Soxhlet-Aufsatz aufgesetzt. In den Rundkolben wurden Siedesteine appliziert, um einen Siedeverzug zu vermeiden, und 700 mL Methanol eingefüllt. Das Erhitzen des Heizpilzes führt zum Sieden des Methanols, das durch das Dampfrohr aufsteigt und im Kühler kondensiert. Durch die Kondensation im Kühler tropft das Methanol in die Extraktionshülse und löst so die Methanol löslichen Bestandteile aus dem Zellmaterial heraus. Der Flüssigkeitsspiegel des Lösungsmittels in der Extraktionskammer steigt immer weiter an,

bis es die Biegung des dünnen Röhrchens, des Heberrohrs, erreicht, welches, durch eine Saugheberwirkung, das Lösungsmittel mit dem extrahierten Material wieder zurück in den Kolben leitet. Der Prozess dauerte solange an wie der Siedevorgang des Methanols, durch die angelegte Hitze, währte.

Die Extraktion wurde 24 h bis 72 h durchgeführt, abhängig von der im Rundkolben immer intensiver werdenden Gelbfärbung. Die charakteristische Gelbfärbung wurde durch im Zellmaterial vorhandene und bereits extrahierte Farbpigmente verursacht, die in diesem Fall kennzeichnend für eine erfolgreiche Extraktion waren.

7.3. Vakuum-Destillation

Die Vakuum-Destillation wurde hauptsächlich verwendet, um Methanol aus Proben zu entfernen, das beispielsweise bei der Extraktion nach Bligh & Dyer oder bei der Soxhlet-Extraktion anfiel. Proben aus Aufreinigungen unter Einsatz von $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ als Laufmittel wurden teilweise eingeengt, um weitere experimentelle Schritte zu erleichtern.

Für die Vakuum-Destillation wurde ein 1 L Einhalsrundkolben über einem Wasserbad platziert und mit 0,2 bis 0,5 L Probe befüllt. Der Rundkolben wurde an einer Halterung befestigt, die eine Drehung des Kolbens ermöglichte. Auf den Rundkolben wurde ein Kühler aufgesetzt, der durch einen konstanten Wasserstrom gekühlt wurde. Der Vakuum-Destillator wurde ebenfalls derart mit dem Rundkolben verbunden, dass dadurch eine Druckverminderung in dem Rundkolben angelegt wurde und damit einhergehend der Siedepunkt des zu destillierenden Lösungsmittels abgesenkt wurde.

Für die Destillation von Methanol wurde das Wasserbad auf 55 °C erhitzt und ein Unterdruck von ungefähr 400 mbar angelegt. Wasser besitzt einen höheren Siedepunkt, deshalb wurde für dessen Destillation das Wasserbad auf 80 °C temperiert und ein Unterdruck von 150 – 200 mbar verwendet.

7.4. Isokratische HPLC

Die isokratische HPLC wurde für die Analyse von kompatiblen Soluten genutzt. Für diese Methode wurde der Degaser Spectra System SCM1000, die Pumpe Spectra System P100 und der RI-Detektor Shodex RI-71 bzw. der UV-Detektor Spectra System UV1000 der Fa. Tsp thermo separation system verwendet. Als Laufmittel diente ein 80 %iges (v/v) Acetonitril/Wasser-Gemisch. Die Säule CC 125/4 Nucleosil 100-3 NH_2 (Fa. Macherey-Nagel, MN) wurde eingesetzt. Auf der Oberfläche der Säulenmatrix befinden sich Propyl-Gruppen die wiederum mit Aminogruppen gekoppelt sind. Die Proben, die zuvor durch die Methode

nach Bligh & Dyer extrahiert wurden, wurden abhängig von ihrem Salzgehalt zwischen 1/5 und 1/100 mit dem Laufmittel verdünnt. Mediumproben wurden entsalzt und ca. 1/100 verdünnt.

Die Entsalzung von 200 μL Mediumprobe erfolgte durch die Zugabe von 10 mg Serdolit (OH^- -Form) und 10 mg Amberlit. Der Ansatz wurde 5 min bei 10 000 rpm (9 500 g) zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

7.5. Aminosäurenanalyse via Gradienten-HPLC

Die Aminosäurenanalyse erfolgte mittels Gradienten-HPLC, bei der der Degaser Spectra System SCM1000, die Pumpe Spectra System P2000, der Autosampler Spectra System AS3000 und der Fluoreszenzdetektor Spectra System FL3000 eingesetzt wurden. Als Säule wurde die CC 125/4 Nucleodur 100-3 C8 ec (Fa. Macherey-Nagel, MN) eingesetzt, deren Oberflächen mit C8-Polymeren besetzt ist. Bei dieser Methode wurde eine Vorsäulenderivatisierung eingesetzt, durch die der Fluoreszenzfarbstoff Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid) an primäre und sekundäre Amine gekoppelt wurde. Bei der Elution wurden alle Substanzen detektiert, deren Aminogruppe mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fmoc derivatisiert wurden. Die Retentionszeiten wurden durch die unterschiedlich gestalteten Reste, die an das Fmoc-Reagenz gebunden waren, bedingt. Für die Ausbildung des Gradienten wurden zwei Laufmittel, bestehend aus einem unterschiedlichen Verhältnis eines Acetonitril/Acetat-Puffer-Gemischs, verwendet. Für den Acetat-Puffer wurde zunächst eine 0,3 %ige (v/v) Essigsäure-Lösung hergestellt, die mit einer Acetat-Lösung, bestehend aus $6,8 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ Tri-Natriumacetat, auf einen pH von 4,2 eingestellt wurde. Das Laufmittel bestand aus 79,5 % (v/v) Acetat-Puffer (pH 4,2), 20 % (v/v) Acetonitril (100 %ig) und 0,5 % (v/v) THF. Das Laufmittel B setzte sich aus 20 % (v/v) Acetat-Puffer (pH 4,2) und 80 % (v/v) Acetonitril (100 %ig) zusammen. Die angesetzten Laufmittel A und B wurden in einem Ultraschallwasserbad, begleitet von einem angelegten Vakuum durch eine Wasserstrahlpumpe, entgast.

Die Proben wurden unter Verwendung der vier Lösungen derivatisiert (Abschn.I.3.3). Zunächst wurden 40 μL der Lösung 1 in ein HPLC-Röhrchen gegeben. Ebenfalls 40 μL der Probe und 80 μL von der Lösung 2 wurden hinzugefügt und 45 s unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach Ablauf der 45 s wurden 100 μL der Lösung 3 pipettiert und nochmals 45 s unter Schütteln bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 140 μL der Lösung 4 zugefügt. Die Proben waren gekühlt ungefähr 24 h stabil.

Proben, die nach der durch Galinski (1986) modifizierte Methode Bligh & Dyer extrahiert wurden, wurden meist 1/20 verdünnt. Proben aus Enzymtests und NMR-Spektroskopischen Messungen wurden bis zu 1/2000 verdünnt.

Standardverbindungen wurden in den Konzentrationen 25 μM und 50 μM eingesetzt.

7.6. NMR-Spektroskopie („Kernresonanz-Spektroskopie“)

Die Hauptanwendung der NMR-Spektroskopie ist die strukturelle Aufklärung von Biomakromolekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren. Die NMR-Spektroskopie basiert, wie der Name schon impliziert, auf dem Phänomen der kernmagnetischen Resonanz. Der quantenmechanische Eigendrehimpuls oder auch Spindrehimpuls der Atomkerne wird auch Kernspin genannt. Zwischen dem Spindrehimpuls (I) und dem magnetischen Drehmoment (μ) besteht ein ursächlicher Zusammenhang, der sich auch in einem Proportionalitätsverhältnis widerspiegelt. Die sog. Larmorfrequenz ist die Rotation des magnetischen Drehmoments eines Kerns mit einer Präzisionsbewegung in Richtung des Magnetfeldes. Protonen und Neutronen des Kerns beeinflussen ebenfalls den Kernspin. Gerade Massen und Atomkerne resultieren in einem Kernspin von ($I=0$), der für NMR-spektroskopische Messungen ungeeignet ist. Für NMR spektroskopische Messungen geeignete Isotope weisen einen Kernspin ungleich 0 auf. Die Kernspins können durch ein äußeres Magnetfeld in eine bestimmte Ausrichtung gebracht werden. Dies geschieht beispielsweise durch eingestrahelte Radiowellen, deren Energie die Kernspins von einem energiearmen in einen energiereichen Zustand überführt. Der energiereiche Zustand relaxiert wieder, indem er Energie in Form der Resonanzfrequenz abgibt, die detektiert werden kann. Die Resonanzabsorption tritt genau dann auf, wenn die Messfrequenz und die Resonanzfrequenz sich entsprechen. Die Resonanzfrequenz wird von der chemischen Umgebung des Kerns stark beeinflusst, weil alle Atome unterschiedliche lokale Magnetfelder aufweisen und infolgedessen die Larmorfrequenz des untersuchten Atoms bzw. dessen Bindungen und die daraus resultierenden unterschiedlich starken Abschirmungen die chemische Umgebung des Atoms sehr verändern.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode der eindimensionalen NMR-Spektroskopie wird der natürlich vorkommende Anteil des Kohlenstoffisotops ^{13}C , der etwa 1,1 % der Kohlenstoffatome ausmacht, für die Messungen ausgenutzt. Die sich ergebenden chemischen Verschiebungen werden auf den Standard TMSP (Na-Trimethylsilylpropansulfonsäure) bezogen und sind lediglich von der Kernumgebung und dem Lösungsmittel abhängig. Die chemische Verschiebung wird in ppm (parts per million) angegeben und basiert auf dem

Frequenzunterschied zum internen Standard (TMSP), dessen Methylgruppe als 0 ppm definiert wird. Die aus Proben resultierenden Signale können mit Hilfe von Standardverbindungen abgeglichen werden und daraus entweder Substanzen bestimmt oder funktionelle Gruppen ermittelt werden.

Für die Probenaufbereitung der NMR-Spektroskopischen Messungen wurde 1 g gefriergetrocknetes Zellmaterial in die Extraktion nach Bligh & Dyer eingesetzt. Die Extraktion wurde unter einem Abzug in einem 100 mL Becherglas durchgeführt. Zur Durchmischung der Lösungen wurde ein Rührfisch zugefügt. Das Becherglas wurde mit Alufolie bedeckt, um größere Verdunstungseffekte zu vermeiden. Die bei der Extraktion entstandene wässrige Phase wurde gesammelt und für 24 h bei 50 °C im Trockenschrank inkubiert. Der getrocknete Rückstand wurde in 1 mL D₂O resuspendiert und mit den internen Standards Na-TMSP (5 mg), Methanol (10 µL) und Acetonitril (10 µL) versetzt. Bei eventueller Überdeckung der Signale aus dem Standard mit den Signalen aus den Proben wurde gegebenenfalls der interne Standard Methanol nicht mit hinzugegeben.

Die NMR-Spektroskopischen Messungen waren Auftragsarbeiten und wurden von der AG König (Dr. Stefan Kehraus) des Instituts „Pharmazeutische Biologie“ Universität Bonn angefertigt.

Die Messungen erfolgten an einem NMR-Spektrometer Bruker Avance 300 DPX. Die Messfrequenz belief sich auf 75,46 MHz für den ¹³C-Kanal und 300 MHz für den ¹H-Entkopplungskanal. Die Auswertung der generierten Daten für die Spektren erfolgte durch die Software WIN-NMR Version 940701.9 (Fa. Bruker-Franzen Analytik GmbH).

8. chromatographische Verfahren

8.1. Kieselgelsäule

Die Kieselgelsäule (Fa. Woelm) besitzt keine funktionelle Gruppen und die Partikel haben einen Durchmesser von 0,032 – 0,063 mm (Bezugsquelle: ICN Pharmaceuticals GmbH & Co., Eschwege, West-Germany). Mit dem Leitfähigkeitsmessgerät LF350 der wiss.-techn. Werkstätten und dem UV-Vis-Filter Photometer der Fa. Knauer wurde die Auftrennung bei 220 nm verfolgt. Die Dokumentation erfolgte mit einem Schreiber der Fa. Knauer. Als Fließmittel wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ mit einer Flussrate von 1,5 - 2 mL/min verwendet.

8.2. Größenausschlusschromatographie

Die Gelfiltration nutzt Partikel mit einer definierten Porengröße aus, um eine chromatographische Auftrennung nach der Molekülgröße zu erzielen. Die Partikel wirken dabei als Molekularsieb, das heißt, dass kleine Moleküle in die Partikel eindringen und dadurch retardiert werden und größere Moleküle, die nicht durch das Säulenmaterial aufgehalten werden, früher eluieren. Für die Gelfiltration wurde das Säulenmaterial Biogel P 2 (Fa. Biorad) verwendet, das aus porösen Polyacrylamidpartikeln, die durch eine Kopolymerisierung von Acrylamid und N,N'-Methylen-bis-acrylamid hergestellt wurden und im hydratisierten Zustand eine Größe von 45 – 90 μm aufweisen. Die Spezifikationen dieses Säulenmaterials verweisen auf eine Trennleistung im Größenbereich zwischen 100 und 1800 g/mol. Das hydratisierte Massenvolumen des trockenen Säulenmaterials entspricht 3 mL/g. Mit dem Leitfähigkeitsmessgerät LF350 der wiss.-techn. Werkstätten und dem UV-Vis-Filter Photometer der Fa. Knauer wurde die Auftrennung bei 220 nm verfolgt. Die Dokumentation erfolgte mit einem Schreiber der Fa. Knauer. Als Fließmittel wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ mit einer Flussrate von 1,5 mL/min verwendet.

8.3. Ionenverzögerungschromatographie

Die Methode der Ionenverzögerungschromatographie entsalzt oder trennt Ionen von nichtionischen Verbindungen. SDS kann von Proteinen oder anorganische Salze können von Aminosäuren getrennt werden. Die Ionen, von z. B. NaCl werden von dem Säulenmaterial, im Gegensatz zu einem Anionentauscher, absorbiert und durch den Fließmittelstrom wieder desorbiert. Durch diesen sich ständig wiederholenden Prozess des Absorbierens und Desorbierens werden die Ionen, wie der Name schon impliziert, zeitlich verzögert eluiert. Mit

dieser Art der Auftrennung ist es möglich, Salze, also ionische Verbindungen, von kompatiblen Soluten, die meist nicht ionisch oder zwitterionisch sind, zu separieren.

Die Säulenmatrix der verwendeten Säule AG11A8 von der Fa. Biorad, besteht aus polymerisierter Acrylsäure, die durch Styren und Divinylbenzen Einheiten miteinander quervernetzt ist. Die funktionalen quartären Ammonium- und Carboxylgruppen sind an diese Matrix assoziiert. Die Säule AG11A8 wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ als Laufmittel verwendet. Der Quervernetzungsgrad betrug 8 %. Die nominale Größe beträgt 0,7 g/mL und eine mindest-Nasskapazität von 0,7 meq/mL. Es wurde ein Leitfähigkeitsmessgerät (μS) und ein UV-Vis-Filter Photometer (220 nm) verwendet. Die Flussrate lag zwischen 1 mL/min und 1,5 mL/min. Die Dokumentation erfolgte mit einem Schreiber der Fa. Knauer.

8.4. Anionenaustauschchromatographie

Der Anionentauscher Dowex 1 x 8 (Cl⁻-Form) der Fa. Dow wurde für die Entfernung negativ geladener Verbindungen genutzt. Das Säulenmaterial steht zur Lagerung in 1 M HCl. Für den eigentlichen Säulenlauf wurde die Säule mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gespült. Die Säule wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Entfernung von Glutamat im Zuge der NAGGN-Aufreinigung verwendet. Das negativ geladene Glutamat bindet an die quartären Ammoniumgruppen des Säulenmaterials. Die Chloridionen, die mit den Ammoniumgruppen interagieren, und die Natriumionen, die meist mit Glutamat assoziiert sind, dissoziierten als Salz von der Säule.

Die Flussrate dieser Säule belief sich auf 1-3 mL/min. Ein UV-Vis-Filter Photometer (220 nm) und ein Leitfähigkeitsmessgerät (μS) wurden verwendet.

Die Siebgröße und die Kapazität des Säulenmaterials betragen 0,152 – 0,075 mm und 1,2 meq/mL.

8.5. Totalentsalzer

Mit dem Säulenmaterial eines Mischbetttauschers ist es möglich, sowohl positiv als auch negativ geladene Verbindungen aus der Probe zu entfernen. Funktionale Gruppen, die an die Säulenmatrix gekoppelt sind, ermöglichen, dass die positiv geladenen Substanzen an die Sulfonsäuregruppen und die negativ geladenen Verbindungen an die quartären Ammoniumgruppen binden. Der Totalentsalzer wurde einerseits benutzt, um Salz aus den Proben zu entfernen, aber auch, um die in hohen Konzentrationen vorliegenden geladenen Aminosäuren wie Glutamat oder Glutamin, zu von dem kompatiblen Solut NAGGN zu separieren.

Die Bindung der geladenen Substanzen an die funktionalen Gruppen ist irreversibel, so dass die Säule nicht regeneriert werden konnte. Ein Farbindikator der einen Farbumschlag von blau zu orange bei zunehmender Besetzung der funktionalen Gruppen des Säulenmaterials hervorrief, visualisierte die Abnahme der vorhandenen Bindungskapazität.

Das eingesetzte Säulenmaterial trug die Bezeichnung Serdolit MB von der Fa. Serva. Die Kapazität des Säulenmaterials betrug 0,8 eq/L und die Partikelgröße betrug 0.3 - 1.2 mm. Zur Verfolgung der Aufreinigung wurde ein UV-Detektor und eine Leitfähigkeitsdetektor verwendet. Als Laufmittel wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ eingesetzt und die Flußrate betrug 1,5 - 3 mL/min.

9. Chemische Synthesen

9.1. Glutamin-1-amid

Für den Aufbau der Apparatur für die chemische Synthese des Aminosäurederivats Glutamin-1-amid wurde ein 500 mL Zweihalsrundkolben in einem Korkring auf einen Magnetrührer platziert. Auf den Rundkolben wurde ein Kühler aufgesetzt. Eine Ammoniakgasflasche wurde über Schlauchverbindungen mit einer zwischengeschalteten leeren Waschflasche mit dem zweiten Hals des 500 mL Zweihalsrundkolbens verbunden. Der aufgesetzte Kühler wurde mit zwei nachgeschalteten Waschflaschen verbunden, von denen die erste leer und die zweite mit 1 M HCl befüllt war.

In dem 500 mL Rundkolben wurden 500 mg t-Boc-Glutamin-*p*-nitrophenolat in 50 mL Dichlormethan gelöst. Nachdem die Ausgangsverbindung t-Boc-Glutamin-*p*-nitrophenolat sich vollständig gelöst hatte, wurde unter Rühren der t-Boc-Glutamin-*p*-nitrophenolat Lösung Ammoniakgas eingeleitet. Das Ammoniakgas greift an der C_α-Carbonylgruppe des t-Boc-Glutamins an und führt zur Abspaltung des gelbgefärbten *p*-Nitrophenolats, bei gleichzeitiger Amidierung der C_α-Carbonylgruppe des Glutamins. Die entstehenden Verbindungen dieses Schritts sind t-Boc-Glutamin-1-amid, das als weißer Niederschlag zu erkennen ist, und gelbes *p*-Nitrophenolat, das ursächlich für die Gelbfärbung der Lösung ist.

Der entstandene Niederschlag wurde über eine Nutsche von der Flüssigkeit separiert. In dem Niederschlag verbliebenes negativ geladenes *p*-Nitrophenolat wurde über einen Totalentsalzer entfernt. Die Schutzgruppe tBoc wurde von dem nunmehr reinen t-Boc-Glutamin-1-amid durch Zugabe von einem zehnfachen Überschuss 1 M HCl, das als Katalysator der Reaktion diente, abgespalten. Die abgespaltene tBoc Gruppe zersetzte sich in CO₂ und Isobuten, welches beides als Gas dem Reaktionsansatz entwich. Das synthetisierte Glutamin-1-amid wurde für die enzymatischen Assays der N-Acetyltransferase eingesetzt (Abb. 5).

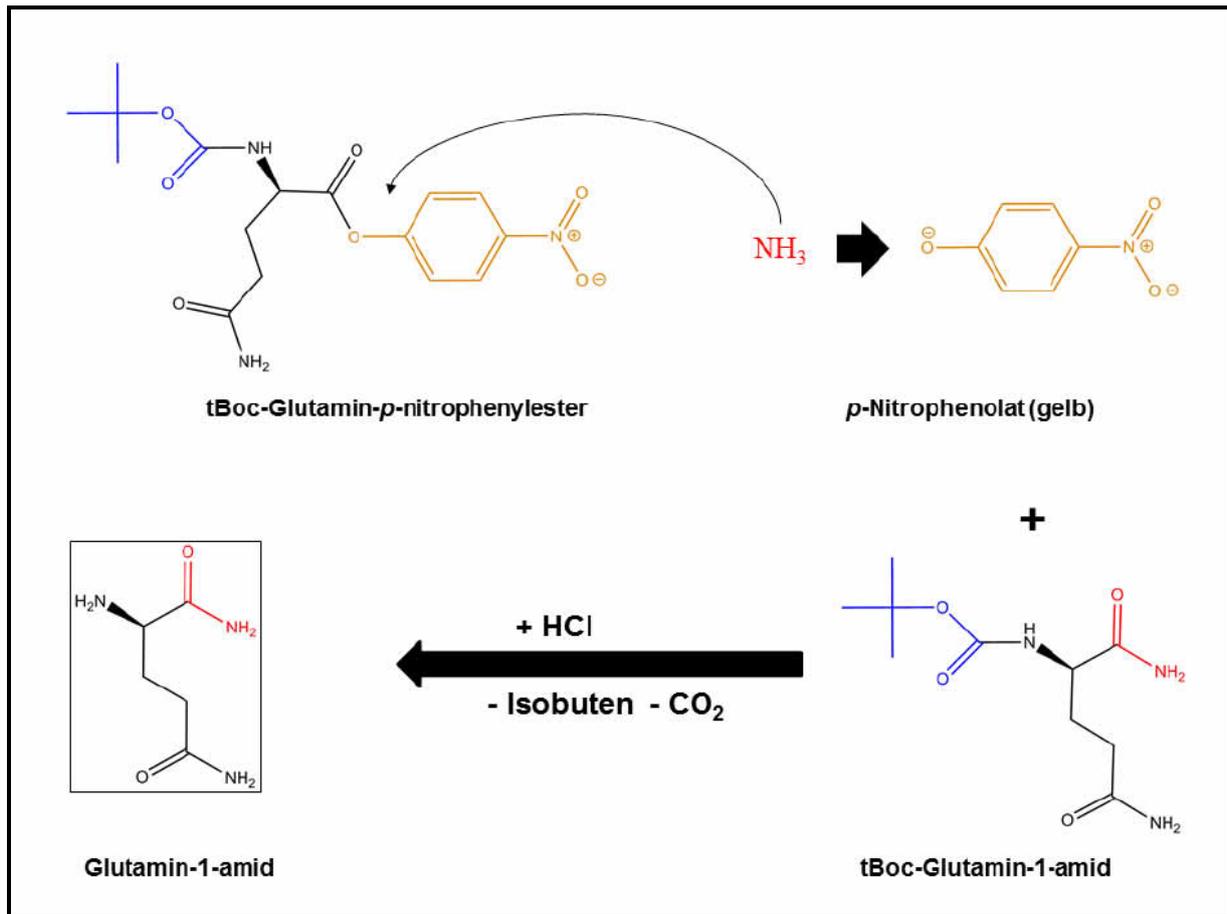


Abb. 5: Chemische Synthese der Verbindung Glutamin-1-amid.

10. Stammbaumanalysen

10.1. BLAST-Suche (basic local alignment search tool)

Die Nukleotidsequenzsuche für die Sequenz des NAGGN-Genclusters wurde mit dem Programm BLAST Version 2.2.23, dem „basic local alignment search tool“, auf der Homepage der Datenbank „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“, durchgeführt. Es wurde das Programm „*blastn*“ für die Nukleotidsuche ausgewählt, wobei als Algorithmus ein diskontinuierlicher Megablast ausgewählt wurde. Die generellen Parameter lagen bei einer Wortlänge von 11 und einem Schwellenwert von 10. Die Scoring Parameter beliefen sich auf Gap Kosten für eine Existenz von Gaps bei 5 und für eine Verlängerung von Gaps bei 2. Die Treffer/Nichttreffer Punktzahl betrug 2,-3. Die Matrizenlänge lag bei 18 für kodierende Bereiche (Altschul *et al.*, 1997).

10.2. Stammbaum-Konstruktion

Die durch die BLAST-Suche ausgewählten Nukleotidequenzen wurden mit Hilfe des Programms Bioedit verwaltet und in das FASTA-Format umgewandelt. Die erstellten FASTA-Dateien dienten als Ausgangsdateien für das Programm MEGA 4.0. Mit diesem Programm ist es möglich Stammbäume basierend auf Distanz- und Charaktermethoden zu erstellen. Dafür wurde innerhalb des Programms zunächst ein multiples Alignment unter Verwendung der ClustalW Algorithmen ausgeführt. In einem zweiten Schritt wurden die Stammbäume entweder unter Verwendung von Distanzmatrizen erstellt (in dieser Arbeit *Neighbor-Joining*-Methode) oder durch Charaktermethoden (in dieser Arbeit *Maximum-Parsimony*-Methode).

11. Lösungsmittelzugängliche Oberflächenbestimmung kompatibler Solute

Die lösungsmittelzugänglichen Oberflächen diverser kompatibler Solute wurden durch die Software PyMOL bestimmt. Das Programm PyMOL benötigt als Eingabedateiformat PDB-Dateien, *.pdb, (Protein Data Base), die mit der Software ChemDraw erstellt wurden. In dem Programm PyMOL ist ein Lösungsmittel-Radius von 1,4 Å voreingestellt.

Die Konsolenbefehle für die Erstellung der Moleküloberfläche lauten:

- load Beispielmolekül.pdb (Eingabe der Moleküldatei)
- h_add (Wasserstoffatome zufügen)
- flag ignore, none
- set dot_solvent, 1
- set dot_density, 3
- beispiel_area=cmd.get_area („Beispielmolekül“)
- print beispiel_area

Für die Erstellung der polaren Oberfläche der Moleküle müssen folgende Konsolenbefehle verwendet werden:

- set dot_density, 4
- remove hydro
- remove solvent
- show dots
- set dot_solvent, 1
- get_area elem N+O
- get_area elem C+S
- get_area all

Die erhalten Flächen wurden als Verhältnis polar/Gesamtoberfläche und negative Oberflächenbereiche im Verhältnis zu positiven Oberflächenbereichen in einem Diagramm dargestellt.

12. Chemikalien Liste

Tab. 12: Chemikalienliste

Chemikalie	Reinheitsgrad	Herkunft
10x Tris/Glycin/SDS-Buffer	Glycin 10-20 % Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 2,5-5 % Natriumlaurylsulfat 0,1-1 %	BioRad
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)	≥98 % (TLC)	Sigma
Aceton	mind 99,8	Merck
Acetonitril	mind. 99,9 %	HiPerSolv CHROMANORM
Acetyl-CoA	96 % (HPLC)	Sigma
Acrylamid	40 %ige Lösung Rotiphorese® Gel A	Roth
ADAM (1-Aminoadamantan)	99 %	Fluka
Agarose GTQ	Gentechn. Qual.	Roth (ROTI®GAROSE)
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	≥98 %, p.a.	Roth
Ammoniumchlorid	rein	Merck
Ammoniumpersulfat	≥98%, f.d. Molekularbiologie	Sigma
Ammoniumsulfat	>99 %, reinst	Merck
Ampicillin	99 %	Roth
Antibiotic Medium No.3 (Assay Broth)	Pulver	Oxoid
ATP	>98 %	Roth
Betain anhydrous	>98 % (NT)	Fluka
Bisacrylamid	2 %ige Lösung Rotiphorese® Gel B	Roth
BOC-L-Glutamin-4-nitrophenylester	≥98 %	Sigma
Borsäure	≥99,0 % (T), p.a.	Fluka
Bromphenolblau	ACS	Roth
Ca-DL-Panθοthenat (Vitamin B₅)	≥98 % (TLC)	Sigma
Calciumcarbonat	min. 99 %	Merck
Calciumchloriddihydrat	Min. 99,5 %	Merck

II Material & Methoden

Carbenicillin	≥90 %	Roth
Chloroform	≥99,8 %	Merck
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	≥99 %, p.a.	Roth
Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂)	97-100 %	Merck
D-(+)-Glucosemonohydrat	≥99 % (HPLC)	Fluka
D-(+)-Saccharose	≥99 % - 100 %	Fluka
D-(+)-Saccharose	≥99-100 %	Fluka
D-(+)-Trehalose Dihydrat	≥99 %	Sigma
D/L-Norvalin	≈99% (NT)	Fluka
d-Biotin (Vitamin H)	99 % (TLC)	Sigma
Deuteriumoxid	min. 99,9 %	Merck
Dichlormethan	≥99,5 % (GC)	Fluka
Dikaliumhydrogenphosphat	p.a., ≥98 %	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat	p.a., min. 99,5 %	Merck
D-Mannitol	>99 %	Fluka
DMSO	≥99,9 % (GC)	Fluka
Dodecylsulfatnatriumsalz	2fach cryst. analytical grade	Serva
Ectoin		Bitop
Eisen(II)sulfatheptahydrat	p.a., mind. 99,5 %	Merck
Essigsäure (Eisessig)	100 %	Merck Suprapur
Ethanol rein	≥99,8 %, p.a.	Roth
Ethanol vergällt	≥70% mit ca. 1% MEK Ethylalkoholt	Roth
FMOC-Chlorid	97 %	Sigma-Aldrich
Glutamat-1-amid	98 %	Sigma
Glutamin-1-amid	Eigensynthese	diese Arbeit
Glycerin	p.a., >99,5 %, wasserfrei	Roth
Hefeextrakt	pulv. f.d. Mikrobiologie	Roth
Hydroxyectoin		Bitop
Imidazol	≥99 %; f.d. Molekularbiologie	Sigma
IPTG	≥99 %	Fermentas

II Material & Methoden

Isopropanol	≥99,95 %	Roth
Kaliumacetat	99-100 %	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	≥99 %, p.a.	Roth
Kanamycinsulfat	≥99,0 % (TLC)	Fluka
KOH	p.a., 85%	Merck
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	≥99,5 %, p.a.	Roth
L-Alanin	>99 % (NT)	Fluka
L-Asparagin	99%	Aldrich
L-Aspartat	>99 % (NT)	Fluka
L-Cysteinhydrochlorid	99,5 %	EGA Chemie
L-Glutamin	99-100 %	Sigma
L-Glutaminsäuremonohydrat	p.a., ≥99,0 % (NT)	Fluka
L-Prolin	≥99,5 % (NT)	
L-Tryptophan	≥99,0 %	Merck
L-Valin	reinst	Serva
Magnesiumsulfatheptahydrat	≥99 %, p.a.	Roth
Mangan(II)chloridtetrahydrat	p.a., mind. 99 %	Merck
Mangansulfatmonohydrat	min. 99 %	Merck
Methanol	100 %	Roth Rotisolv HPLC
Na₂MoO₄ x 2 H₂O	≥99,5 %, p.a.	Roth
N-Acetylglutamin	≥99,0 % (T) puriss.	Fluka
NaCl	99,5-100,5 %	Merck
NADH-Dinatriumsalz	≥98 %	Roth
Na-TMSP	min. 98 %	Merck
Natriumacetattrihydrat	≥99,5 % (NT)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	p.a., ≥98,0%	Roth
Natriumhydroxid	≥98 %, Plätzchen	Roth
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	., ≥98,0%, p.a.	Roth
Nicotinsäureamid	≥99,5 % (HPLC)	Sigma
PageBlue™ Protein Staining Solution #R0571		Fermentas

II Material & Methoden

p-Aminobenzoesäure (Vitamin H₁)	., ≥99 %	Fluka
Pyridoxin x HCl (Vitamin B₆)	99 %	Merck
Pyruvatmononatriumsalz	krist.	Serva
Salzsäure	37 %	Roth
Select Agar		GibcoBRL/Life Technologies
Siedesteine		Merck
Taurin	p.a., ≥99 %	Fluka, Chemika
Temed	99 %	Roth
THF (Tetrahydrofuran)	≥99.9%	CHROMASOLV [®] Plus, Sigma
Thiamin x HCl (Vitamin B₁)	>99 %	Fluka
Titriplex III (EDTA)	p.a., mind. 99%	Merck
Tri-Natrium-Citrat x 2 H₂O	≥99 %, p.a.	Roth
Tris-Pufferan[®]	p.a., ≥99%	Roth
Trypton		Oxoid
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside)	≥ 99.0%	Fermentas
Zinksulfatheptahydrat	p.a., ≥99,5% (KT)	Fluka, Chemika
β-Mercaptoethanol	electrophoresis purity reagent	BioRad

Tab. 13: Liste der verwendeten Enzyme

Enzyme	Konzentration	Herkunft
RNaseA (Ribonuclease A)	≥70 Kunitz units/mg Protein, bovine pancreas	Fluka, Sigma
LDH (Lactatdehydrogenase)	rabbit muscle, 612 U/mg	Fluka
Restriktionsendonukleasen	Einsatz entsprechend nach den einzelnen Enzymspezifikationen	Fermentas
Phusion-Polymerase	2000 U/mL	NEB
FastAP[™] Thermosensitiv Alkaline Phosphatase	1 U/μL	Fermentas
T4-DNA-Ligase	5U/μL	Fermentas

13. Geräteliste

Tab. 14: Geräteliste

Gerät	Firma
Fluoreszenzdetektor Spectra System FL3000	Tsp thermo separation system
UV-Detektor Spectra System UV1000	Tsp thermo separation system
RI-Detektor Shodex RI-71	Shodex
Autosampler Spectra System AS3000	Tsp thermo separation system
Pumpe Spectra System P2000	Tsp thermo separation system
Pumpe Spectra System P100	Tsp thermo separation system
Degaser Spectra System SCM1000	Thermo Scientific
Ultraschallwasserbad TK52	Bandelin Sonorex
Vacuum System B-172	Büchi
Photometer Novaspec® II	Pharmacia Biotech
MyCycler™ thermal cycler	BioRad
iCycler	BioRad
Inkubationsschüttler HT	Infors
Inkubationsschrank	Heraeus instruments
Heizschrank	Ecocell
Plattenlesegerät NanaQuant infinite M200	Tecan
UV-Vis-Filter Photometer (220 nm)	Knauer
Pumpe	Ismatec
Leitfähigkeitsmessgerät	Wissenschaftlich-technische Werkstätten LF350
Schreiber	Knauer
Fraktionssammler Büchi 684 fraction collector	Büchi
Geltrockner Gel Dryer MGD-4534	VWR

II Material & Methoden

Fermenter NLF22, 19 L	Bioengineering
Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6	Heraeus-Christ
Sorvall Avanti™ J-20 XP Zentrifuge	Beckmann Coulter
Ultraschallgerät	Branson Ultrasonics Corporation
Proteingelkammern: Mini-Protean® 3 Cell	BioRad
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Biofuge fresco	Heraeus

III. Ergebnisse

1. phylogenetische Analysen des NAGGN-Genclusters

Das kompatible Solut NAGGN ist in der Natur weiter verbreitet als zunächst angenommen wurde. *Sinorhizobium meliloti* war einer der ersten Organismen, in dem das NAGGN erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Später wurde auch in einigen *Pseudomonas* Stämmen das Vorhandensein des Soluts NAGGN beschrieben (Kets *et al.*, 1996; Galinski, 1992). Um zu demonstrieren wie verbreitet das kompatible Solut NAGGN in der Natur ist, wurde die Nukleotidsequenz des NAGGN-Genclusters mit denen anderer Organismen verglichen und in phylogenetischen Bäumen veranschaulicht. Dazu wurden zwei verschiedene Algorithmen angewendet. *Maximum-Parsimony* ist eine Charakter-Methode. Hierbei wird der Baum mit der geringsten Anzahl an Mutationen gesucht. Allerdings werden hier Mutationen vernachlässigt, die nur in einer Spezies vorkommen. Dies ist vor allem bei DNA-Sequenzen problematisch. Deshalb wurde noch eine zweite Methode verwendet.

Die *Neighbor-Joining*-Methode ist eine sogenannte Distanz-Methode, die eine schnelle und einfache Berechnung eines Baumes erlaubt. Es wird der Baum mit der Summe der kleinsten Astlängen berechnet.

Zur Erstellung der phylogentischen Bäume wurden zunächst 36 ähnliche DNA-Sequenzen des NAGGN-Genclusters in anderen Organismen, ausgehend von der DNA-Sequenz des NAGGN-Genclusters in *P. putida* KT2440, durch BlastN-Analysen bestimmt. Mit diesen Sequenzen wurde ein multiples Alignment (Programm: ClustalW) durchgeführt, das wiederum den Ausgangspunkt für die im Folgenden konstruierten phylogenetischen Stammbäume darstellt.

1.1. Stammbaumkonstruktion basierend auf dem *Neighbor-Joining* Prinzip

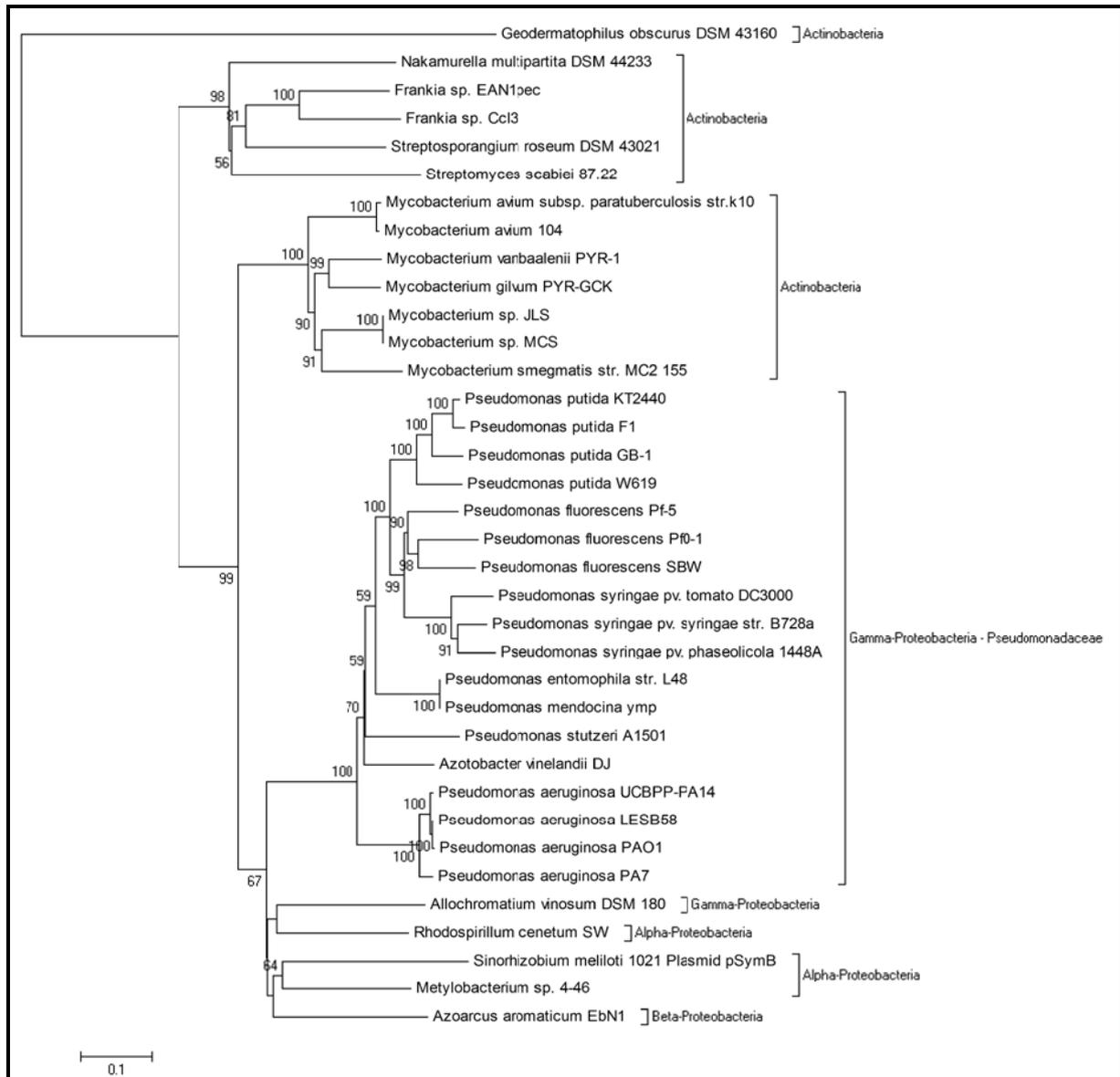


Abb. 6: Die evolutionäre Beziehung der 36 Spezies wurde unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode erschlossen. Der Bootstrap-Consensus-Baum wurde basierend auf 1000 Replikaten ermittelt, wobei Äste kollabiert wurden, die mit weniger als 50 % bootstrap Replikaten erzeugt wurden. Die Prozentigkeiten, der replizierten Bäume, in denen die assoziierten Taxa in einem Bootstrap Test geclustert wurden (1000 Replikate) sind an den Ästen der Bäume gezeigt.

Mit Hilfe des Programmpaketes MEGA 4.0 wurde der phylogenetische Stammbaum basierend auf der *Neighbor-Joining*-Methode erstellt. Dieser Stammbaum zeigt die Ähnlichkeit des NAGGN-Genclusters auf DNA Ebene.

Das NAGGN-Gencluster tritt in der Familie der Pseudomonadaceae, die zu den Gram-negativen Gamma-Proteobakterien gehören, auf. Innerhalb der Familie der

Pseudomonadaceae ist es in der *Pseudomonas aeruginosae* Gruppe, der *Pseudomonas putidae* Gruppe, der *Pseudomonas syringae* Gruppe und der *Pseudomonas fluorescens* Gruppe vertreten. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit der zu der Familie der Pseudomonadaceae gehörende Stamm *Azotobacter vinelandii* DJ auch experimentell auf eine NAGGN-Akkumulation in den Zellen überprüft. Es zeigte sich, dass das Bakterium *Azotobacter vinelandii* DJ ebenfalls das kompatible Solut NAGGN synthetisiert und zwar bei 2 % Medium Salinität (NaCl) 6,9 mg/g TG (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch bestätigt die phylogenetischen Analysen die, basierend auf der Nukleotidsequenz des NAGGN-Genclusters, *Azotobacter vinelandii* als möglichen NAGGN-Produzenten verifizierten.

Das NAGGN-Gencluster wurde auch in diversen Actinobacterien aufgefunden. Eine starke Präsenz ist innerhalb der Mycobacterien zu erkennen, von denen einige Organismen wie *Mycobacterium avium* Tierpathogenität aufweisen, z. B. in Form der Krankheit Geflügeltuberkulose. Menschenpathogene Stämme sind unter den dargestellten Stämmen, die das NAGGN-Gencluster besitzen, nicht gegeben. Diese Stämme gehören durchweg zu den sog. MOTT Stämmen (mycobacteria other than tuberculosis). Das NAGGN-Biosynthesegencluster kommt auch in anderen Familien der Actinobacterien vor, in denen der Frankiaceae, Streptosporangiaceae, Streptomycetaceae, Nakamurellaceae und Geodermatophilaceae.

Desweiteren sind auch Vertreter in den Untergruppen der Alpha- und Beta-Proteobakterien vorhanden. *Methylobacterium* sp.4-46 und *Sinorhizobium meliloti* werden den Alpha-Proteobakterien zugeordnet. Der bislang einzige Vertreter der Beta-Proteobakterien ist *Azoarcus* sp.

1.2. Stammbaumkonstruktion basierend auf dem *Maximum Parsimony* Prinzip

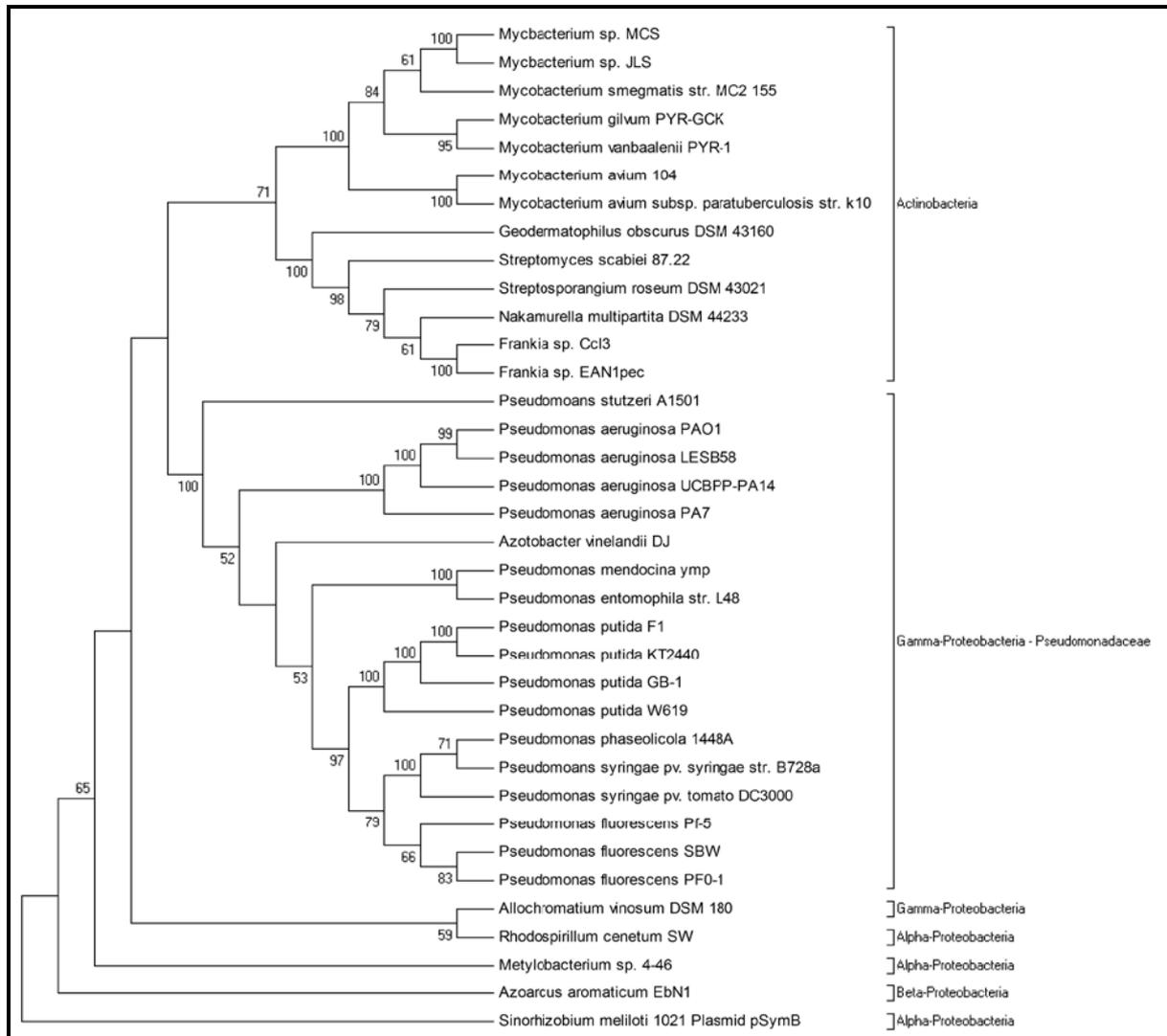


Abb. 7: Die evolutionäre Beziehung der 36 Spezies wurde unter Verwendung der *Maximum Parsimony* Methode erschlossen. Der *Bootstrap-Consensus-Baum* wurde basierend auf 1000 Replikaten ermittelt, wobei Äste kollabiert wurden, die mit weniger als 50 % *bootstrap* Replikaten erzeugt wurden. Die Prozentigkeiten, der replizierten Bäume, in denen die assoziierten Spezies in einem *Bootstrap* Test geclustert wurden (1000 Replikate) sind an den Ästen der Bäume gezeigt.

Dem phylogenetischen Stammbaum, der durch das *Parsimony*-Prinzip konstruiert wurde, liegt das multiple Alignment des NAGGN-Genclusters aus 36 unterschiedlichen Organismen zugrunde. Der phylogenetische Baum wurde mithilfe des Programmpakets MEGA 4.0 erstellt. Dieser Stammbaum zeigt die Ähnlichkeit des NAGGN-Genclusters auf DNA Ebene.

Die Familie der Pseudomonadaceae wird den Gamma-Proteobakterien zugeordnet, unter denen sich viele Organismen befinden, in denen das Biosynthesegencluster für das kompatible Solut NAGGN detektiert wurde. Vertreter der Untergruppen *Pseudomonas aeruginosae*, *Pseudomonas putidae*, *Pseudomonas syringae* und *Pseudomonas fluorescens* enthalten dieses NAGGN-Gencluster. Aber auch Organismen wie *Pseudomonas medocina* und *Azotobacter vinelandii* DJ sind potentielle NAGGN-Produzenten.

Nicht nur in der Gamma-Gruppe der Proteobakterien, sondern auch in der Alpha- und Beta-Gruppe der Proteobakterien wurde das NAGGN-Gencluster gefunden. Vertreter der Alpha-Proteobakterien sind die Bakterien *Methylobacterium* sp.4-46 und *Sinorhizobium meliloti*. Ein Vertreter der Beta-Proteobakterien, der ebenfalls die biosynthetischen Gene des kompatiblen Solut NAGGN enthält, ist der Organismus *Azoarcus* sp.

Innerhalb der Actinobakterien zeigten sehr viele Stämme die zu der Familie der Mycobacteriaceae gehören das Vorhandensein der Biosynthesegene für das kompatible Solut NAGGN. Unter den NAGGN-Biosynthesegene enthaltenden Mycobacterien sind zwar keine für Menschen pathogene Stämme vertreten, aber mit *Mycobacterium avium*, der zu der Gruppe der MOTT-Stämme gehört (mycobacteria other than tuberculosis) ein Tier pathogener Organismus, der Erreger der Geflügeltuberkulose.

Die Familien Frankiaceae, Streptosporangiaceae, Streptomycetaceae, Nakamurellaceae und Geodermatophilaceae enthalten ebenfalls Vertreter, in denen die Biosynthesegene für das kompatible Solut NAGGN vorhanden sind.

Die beiden phylogenetischen Stammbäume (Abb. 6 & Abb. 7) wurden zwar durch unterschiedliche Methoden generiert, *Neighbor-Joining*- und *Maximum Parsimony*-Methode, aber sie zeigen eine sehr ähnliche Verwandtschaft des NAGGN-Genclusters in den 36 berücksichtigten Spezies auf.

2. *P. putida* KT2440 - Produktion und Aufreinigung des kompatiblen Soluts NAGGN

Das kompatible Solut NAGGN wird von dem Organismus *P. aeruginosa* und anderen Stämmen der Gattung *Pseudomonas* (Kets *et al.*, 1996; Aspedon *et al.*, 2006) synthetisiert. Die Überprüfung der Akkumulation des kompatiblen Soluts NAGGN in dem *Pseudomonas putida* Subtyp KT2440 wurde bislang noch nicht beschrieben.

2.1. Anzucht von *P. putida* KT2440 mit ansteigender Medium Salinität

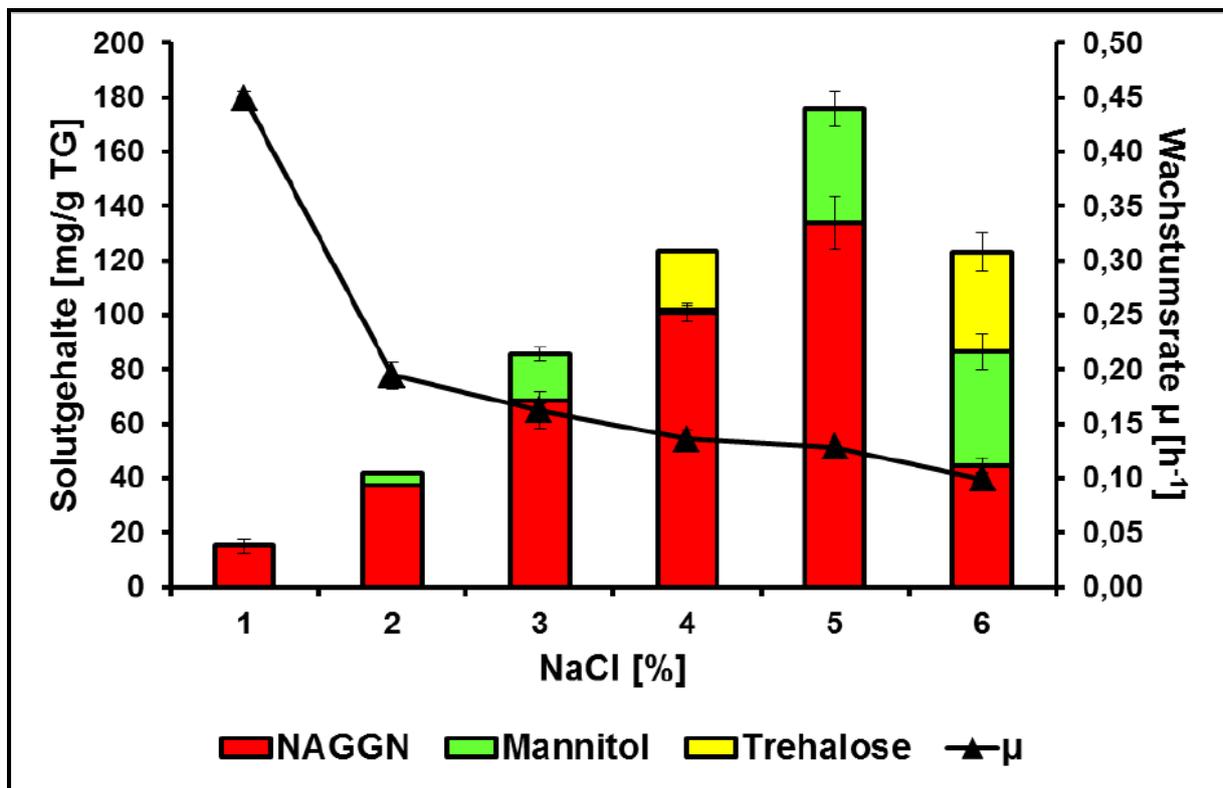


Abb. 8: Solutspektrum von *Pseudomonas putida* KT2440 bei einer Anzucht mit Medium Salinitäten in einem Bereich von 1 % bis 6 % NaCl. Die gezeigten Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.

Der Stamm *P. putida* KT2440 wurde unter Verwendung des Mineralsalzmediums MM63 mit ansteigenden Salzgehalten bis zu 6 % angezogen. Die geernteten Kulturen wurden gefriergetrocknet, extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Es zeigte sich, dass die kompatiblen Solute NAGGN, Mannitol und Trehalose synthetisiert wurden. Die Gehalte des kompatiblen Soluts NAGGN stiegen mit zunehmender Salinität an und reichten von 15 mg/g TG bei 1 % Salz im Medium über 68,22 mg/g TG bei 3 % NaCl bis

zu 133,94 mg/g TG bei einem Salzgehalt von 5 %. Die Kulturen wurden in der früh-stationären Wachstumsphase geerntet, bis auf jene, die mit einem Salzgehalt von 4 % und 6 % NaCl angezogen wurden. In den *P. putida* Kulturen, die früh-stationär geerntet wurden (1 % - 3 % und 5 % NaCl im Medium), war NAGGN das vorherrschende Solut. Ab einer Salinität von 2 % wurde das kompatible Solut Mannitol co-synthetisiert mit Gehalten von 4,24 mg/g TG (2 %) bis hin zu 41,93 mg/g TG bei 5 %. Bei NaCl-Konzentrationen von 4 % und 6 %, ist das kompatible Solut Trehalose nachweisbar. Bei einer Salinität von 6 % NaCl belief sich der Trehalose-Gehalt auf 36,65 mg/g TG. Es ist offensichtlich, dass in der stationären Phase zunehmend die beiden Solute Mannitol und Trehalose zusätzlich zu dem bereits in der früh-stationären Phase vorhandenen kompatiblen Solut NAGGN synthetisiert wurden. *P. putida* KT2440 ist befähigt bis zu einer Salinität von 6 %igem (NaCl) Minimalmedium zu wachsen. Allerdings geht mit dem Anstieg der Salinität eine Verringerung der Wachstumsrate einher. Die Wachstumsrate bei einer Salinität von 1 % betrug $0,45 \text{ h}^{-1}$. Die Wachstumsrate verringerte sich auf $0,16 \text{ h}^{-1}$ bei 3 % NaCl und zeigte eine noch deutlichere Verminderung mit $0,03 \text{ h}^{-1}$ bei 5 % NaCl.

2.2. Anzucht von *P. putida* KT2440 mit verschiedenen C-Quellen

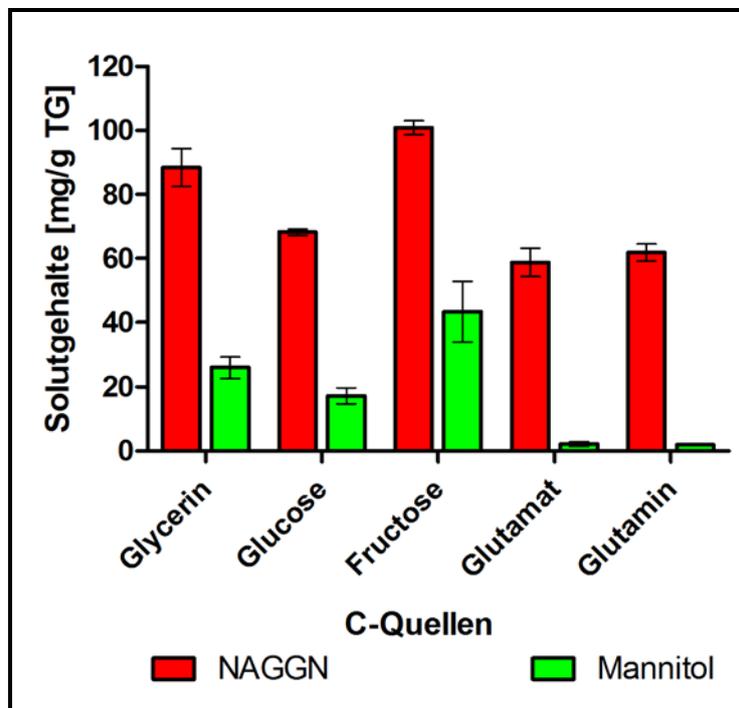


Abb. 9: Anzucht des Stammes *Pseudomonas putida* mit unterschiedlichen C-Quellen in dem Mineralsalzmedium MM63-3. Die gezeigten Werte resultieren aus Doppelbestimmungen.

Der Stamm *P. putida* KT2440 wurde im Hinblick auf folgende Anzuchten im großen Maßstab und nachstehende Aufreinigungsschritte für das kompatible Solut NAGGN optimiert. Zur Verbesserung der Rahmenbedingungen wurden Kulturen des *P. putida* Stammes KT2440 mit unterschiedlichen C-Quellen angezogen, früh stationär geerntet und gefriergetrocknet. Nach einem Extraktionsschritt wurden die Gehalte der kompatiblen Solute per HPLC-Analyse bestimmt. Als Medium für die Anzucht wurde das Mineralsalzmedium MM63 mit einem Salzgehalt (NaCl) von 3 % verwendet. Die C-Quellen Glycerin, Glutamat und Glutamin wurden in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt, wohingegen die C-Quellen Glucose und Fructose in einer Konzentration von 25 mM zugegeben wurden.

Der niedrigste NAGGN-Gehalt lag unter Verwendung der C-Quellen Glutamat und Glutamin bei ungefähr 60 mg/g TG vor. Glucose als C-Quelle verbesserte die NAGGN Ausbeute um weitere 10 mg/g TG (Abb. 9). Der höchste Gehalt des kompatiblen Soluts NAGGN wurde mit Fructose als C-Quelle bestimmt und betrug 100,85 mg/g TG (Abb. 9). Mit Glycerin als C-Quelle lag die NAGGN Ausbeute zwar nur bei 88,49 mg/g TG, aber im Vergleich zu Fructose ist der Einsatz von Glycerin mit geringeren Kosten verbunden (Abb. 9). Deshalb wurde bei sich anschließenden Fermentationen das Mineralsalzmedium mit einer Salinität von 3 % und 50 mM Glycerin als C-Quelle eingesetzt.

2.3. Fermentation des Stammes *P. putida* KT2440

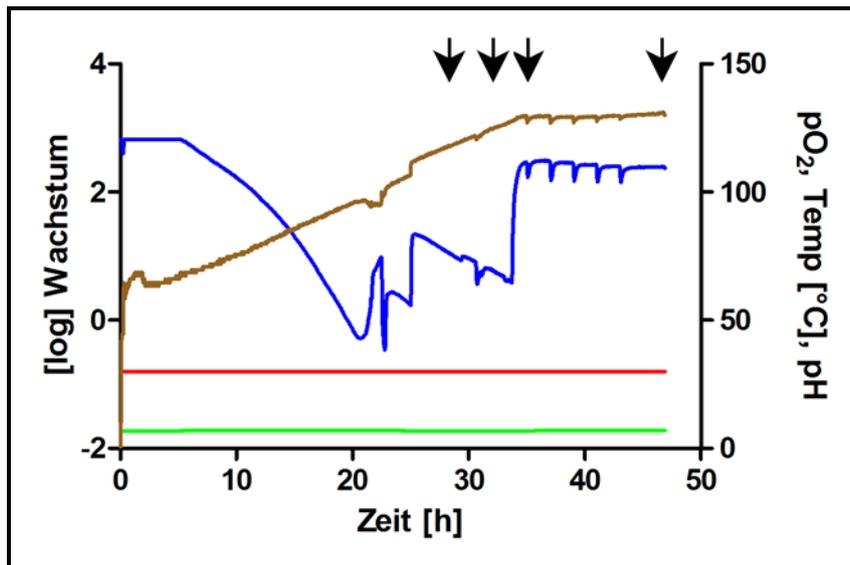


Abb. 10: Fermentation des Stammes *Pseudomonas putida* KT2440 mit einem Arbeitsvolumen von 15 L unter Verwendung des Mineralsalzmediums MM63-3 mit 50 mM Glycerin als C-Quelle. Aufgenommene Parameter: (—) Inkubationstemperatur [°C], (—) pH-Wert, (—) Sauerstoffpartialdruck pO_2 , (—) Trübung. (→) Entnahmezeitpunkte von Verlaufsproben.

Nachdem die optimalen Rahmenbedingungen für eine Fermentation des Stammes *P. putida* KT2440 bestimmt wurden (Abschn. III.2.1 & III.2.2), erfolgte diese mit dem Mineralsalzmedium MM63-3 und 50 mM Glycerin als C-Quelle in einem 15 L Maßstab. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C (rote Kurve) und der pH-Wert (grüne Kurve) wurde in einem Bereich zwischen 6,8 und 7,2 durch eine entsprechende Titration von Base (1 M NaOH) und Säure (1 M HCl) konstant gehalten (Abb. 10). Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 (blaue Kurve) fiel nach ungefähr 9 h kontinuierlich ab. Dies ging mit dem beginnenden Wachstum des Stammes, welches sich in einer zunehmenden Trübung (braune Kurve) zeigte, einher (Abb. 10). Der unruhige Kurvenverlauf des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 resultierte aus einer Erhöhung der Luftzufuhr durch Steigerung der Rührerdrehzahl bzw. Hochregulation der Luftzufuhr selbst. Starke Einbrüche des Kurvenverlaufs, wie bei 23 h erkennbar, wurden durch den rapiden Verbrauch des Sauerstoffs durch den *P. putida* Stamm verursacht (Abb. 10). Die manuelle Erhöhung der Luftzufuhr führte wiederum zu einem recht schnellen Anstieg des pO_2 . Das Wachstum des Organismus *P. putida* verlief nach dem klassischen Verlauf einer statischen Bakterienkultur mit anfänglicher lag-Phase, exponentieller und stationärer Wachstumsphase. Die lag-Phase betrug ca. 3 h (Abb. 10). Die exponentielle

Wachstumsphase war zwischen 3 h und 34 h deutlich zu erkennen. Die stationäre Phase trat nach ca. 34 h ein und konnte bis zum Fermentationsende nach 50 h beobachtet werden.

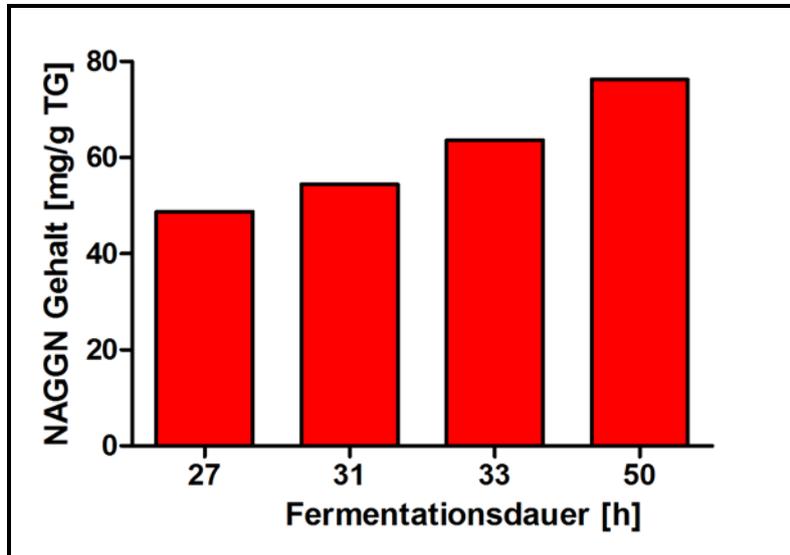


Abb. 11: NAGGN-Gehalt der Proben, die während der Fermentation des Stammes *Pseudomonas putida* KT2440 entnommen wurden. Die Werte resultieren aus Einfachbestimmungen.

Während des Fermentationsprozesses wurden in den unterschiedlichen Wachstumsphasen Proben entnommen, die extrahiert und mittels isokratischer HPLC analysiert wurden.

Der Gehalt des kompatiblen Solut NAGGN stieg im Verlauf der Zeit. In der mittleren exponentiellen Phase (27 h) wurde ein NAGGN-Gehalt von 48,79 mg/g TG nachgewiesen (Abb. 11). Die Konzentration des von den Zellen synthetisierten NAGGN stieg im Verlauf der exponentiellen Phase bis auf 63,63 mg/g TG (31 h) an. In der stationären Phase (50 h) erreichte der NAGGN-Gehalt sein Maximum mit 76,26 mg/g TG. Das bedeutet, dass es sich hier um einen Wachstumsphasen abhängigen Anstieg des NAGGN handelt (Abb. 11).

Die letzte Probe, die während der Fermentation in der stationären Wachstumsphase entnommen wurde, beinhaltete nicht nur das kompatible Solut NAGGN, sondern auch die Solute Mannitol und Trehalose. In den Proben die während der Fermentation entnommen wurden (Abb. 11), konnten diese Solute nicht nachgewiesen werden. Die beiden Co-Solute Mannitol und Trehalose erreichten keine entsprechend hohen Solut-Gehalte im Vergleich mit denen des kompatiblen Solut NAGGN (Abb. 12). Die Konzentration des Solut Mannitol in den Zellen lag bei 11,64 mg/g TG und die der Trehalose bei 17,42 mg/g TG in den Zellen.

Allerdings sind beide Solute in deutlich geringeren Mengen als das Solut NAGGN vorhanden, dessen Konzentration bei 76,26 mg/g TG liegt. Das kompatible Solut NAGGN ist in diesem Versuch das dominierende Solut des Stammes *P. putida* KT2440 (Abb. 12).

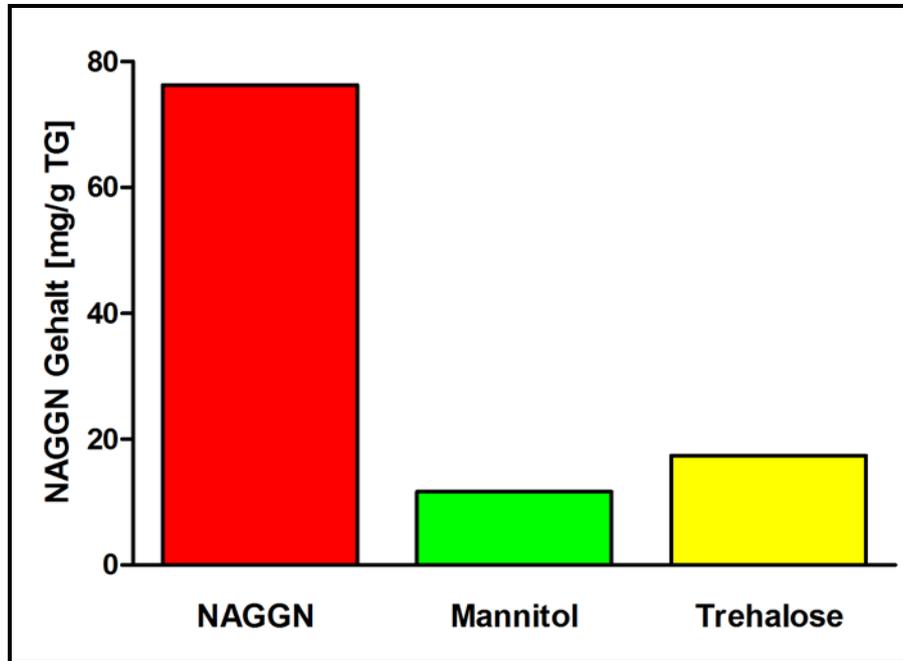
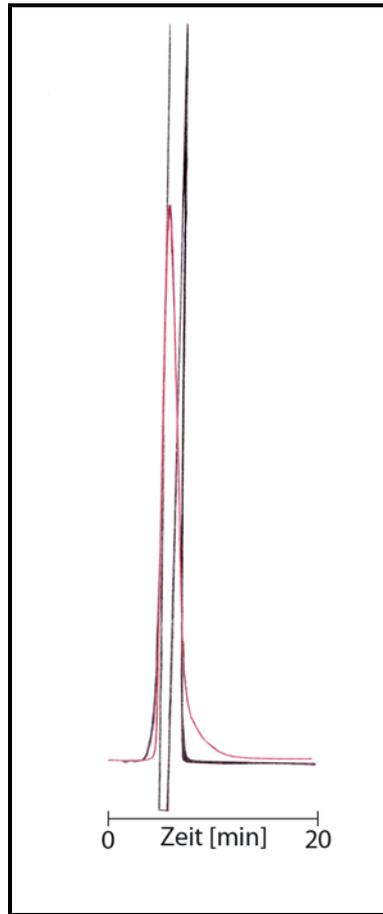


Abb. 12: Zum Abschluss der Fermentation wurden die Gehalte der Osmolyte NAGGN, Mannitol und Trehalose bestimmt. Die Werte resultieren aus einer Einfachbestimmung.

2.4. Aufreinigungsverfahren für das kompatible Solut NAGGN

Für die Aufreinigungsverfahren wurde das gefriergetrocknete Zellmaterial, dass durch die Fermentation des Stammes *Pseudomonas putida* KT2440 gewonnen wurde (Abschn.I.2.23), durch eine Extraktionsmethode nach Soxhlet, bei der Methanol als Lösungsmitteln eingesetzt wurde, extrahiert (Jensen, 2007). Anschließend wurde der Extrakt Vakuum destilliert, um das Methanol zu entfernen. Die verbleibenden Verunreinigungen wurden durch die Extraktion mit Chloroform und Wasser noch weiter gereinigt. Die wässrige Phase wurde für die weiteren Aufreinigungsschritte eingesetzt.

2.4.1. Aufreinigung von NAGGN über eine Kieselgelsäule



**Abb. 13: Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN über eine Kieselgelsäule (Woelm).
rot=UV-Signal; schwarz=LF-Signal**

Die chromatographische Aufreinigung des kompatiblen Solut über eine Kieselgelsäule wurde mit Wasser als Laufmittel durchgeführt. Die rote Kurve zeigt die UV-Absorption und die schwarze Kurve die Leitfähigkeitsdetektion. Bauartbedingt stellt der Schreiber Signale größer als die Papierbreite negativ („gespiegelt“) dar. Es ist zu erkennen, dass das Signal, das durch den Leitfähigkeitsdetektor dokumentiert wurde, mit dem Signal, das die UV-Absorption visualisiert, überlappt. Das Leitfähigkeitssignal wurde einerseits durch Salz, das in den Proben vorhanden war, und andererseits durch andere sich in den Proben befindlichen Bestandteile hervorgerufen. Im UV-Bereich verursachen die kompatiblen Solute NAGGN, Mannitol ein Signal. Die Fraktionen wurden durch HPLC-Analysen genauer untersucht und zeigten, dass zudem der Zucker Trehalose in den Fraktionen des UV-Signals vorhanden war. In diesem Chromatogramm sind keine getrennten Signale zu erkennen, was bedeutet, dass alle

Komponenten gleich stark mit dem Säulenmaterial interagierten und über diese chromatographische Methode nicht getrennt von der Säule eluierten.

2.4.2. Aufreinigung von NAGGN über eine Größenausschlusschromatographie

Die chromatographische Aufreinigung des Solut NAGGN über eine Kieselgelsäule konnte nicht erzielt werden. Deshalb wurde eine Methode eingesetzt, die die unterschiedliche Größe der aufzutrennenden Einzelkomponenten ausnutzt. Kleinere Moleküle werden retardiert, da sie durch Poren in die Partikel der Säulenmatrix eindringen können und größere Moleküle passieren die Säule schneller und eluieren daher zuerst. Bauartbedingt stellt der Schreiber Signale größer als die Papierbreite negativ („gespiegelt“) dar.

In dieser Gelfiltration wurden zwei prominente Signale in der Leitfähigkeit dokumentiert und per HPLC analysiert (Abb. 14, Signale 6 und 7). Die Fraktionen des Signal 6 enthielten hauptsächlich die kompatiblen Solute NAGGN und Trehalose hervorgerufen. Das zweite, größere Signal 7 ist typisch für die Elution von Salz, in diesem Fall NaCl. Ein separates Signal, das mit der Elution von Mannitol korreliert, konnte nicht detektiert werden. Die UV-Absorption wies mehrere Signale auf (Abb. 14, Signale 1-5), von denen alle per HPLC analysiert wurden. Die Fraktionen des größten Signals (2), das zudem zwei Schultern aufwies (Abb. 14, Signale 1 und 3), bestand aus NAGGN und Trehalose, wobei das Signal 1, der Bereich der vorderen Schulter, hauptsächlich NAGGN enthielt. Das Signal 5 konnte über die Methode der isokratischen HPLC keiner Verbindung zugeordnet und identifiziert werden. Das kompatible Solut Mannitol wurde als ein sehr schwaches Signal visualisiert (4), welches später auftrat als das der kompatiblen Solute NAGGN und Trehalose (1-3). Dies zeigt, dass die Separierung des Solut Mannitol von den Soluten NAGGN und Trehalose mit dieser Methode erfolgreich war. Allerdings ist der Unterschied der Molekulargewichte von NAGGN und Trehalose zu gering, 315,326 g/mol respektive 342,30 g/mol, als dass eine Auftrennung dieser beiden Solute mit dieser Methode möglich gewesen wäre. Verringerungen der Flußrate des Laufmittels führten zwar zu einer deutlicheren Abtrennung von Mannitol, aber eine chromatographische Auftrennung von NAGGN und Trehalose erfolgte nicht.

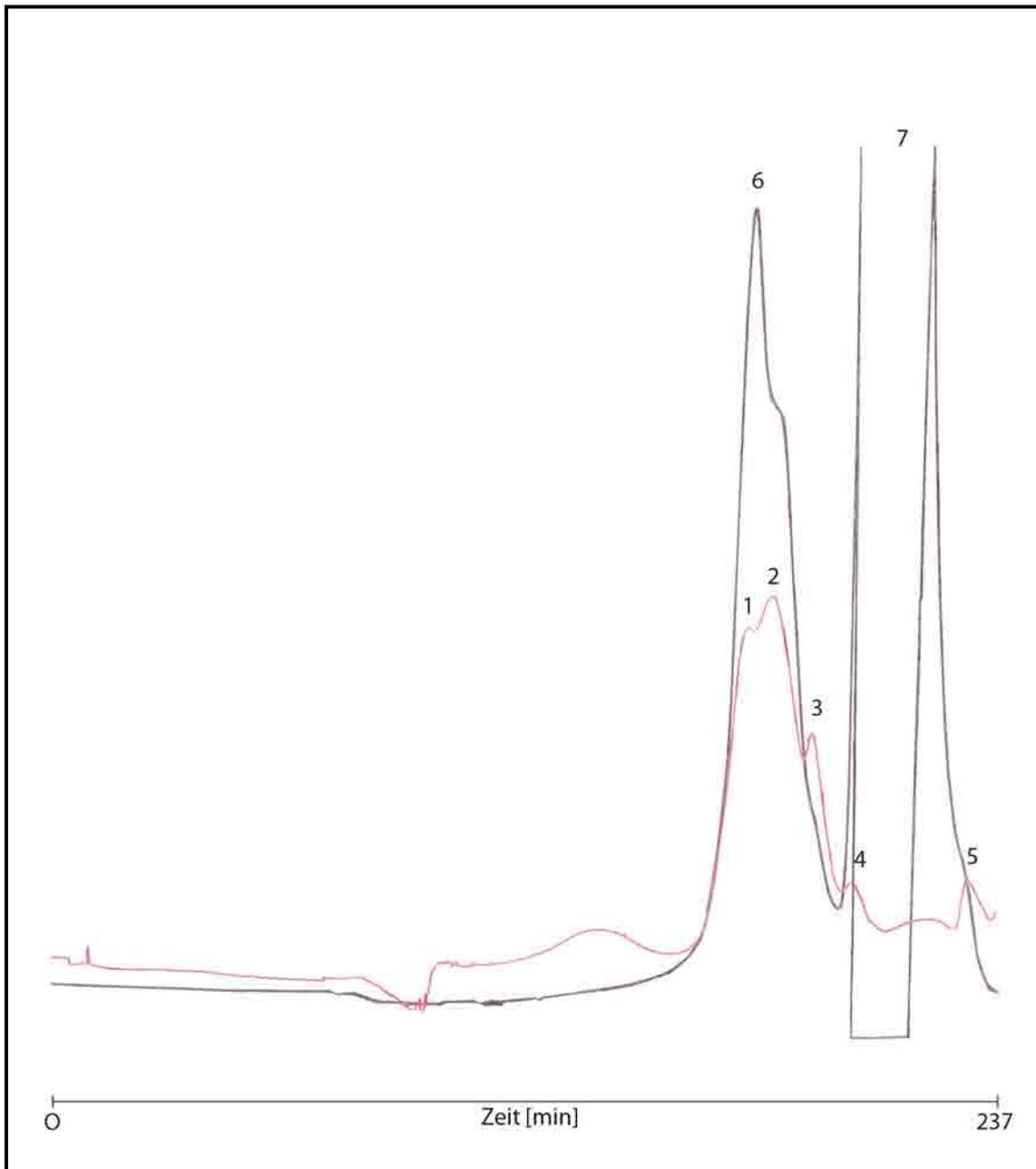


Abb. 14: Aufreinigung des kompatiblen Soluts NAGGN über eine Gelfiltrationssäule. Die in den Fraktionen vorhandenen Solute wurden über HPLC-Analysen bestimmt. UV-Signale (rot) 1: NAGGN; 2: NAGGN & Trehalose; 3: NAGGN & Trehalose; 4: Mannitol; 5: nicht identifiziertes Signal; Leitfähigkeitssignale (schwarz) 6: NAGGN & Trehalose; 7: Salz

Die Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN aus dem Organismus *P. putida* KT2440 konnte mit keiner der verwendeten Methoden erreicht werden, weil die Separierung von dem kompatiblen Solut Trehalose nicht erfolgte. Der Grund für diesen Umstand liegt in den ähnlichen biochemischen Eigenschaften dieser beiden kompatiblen Solute. Beide besitzen ein ähnliches Molekulargewicht und sind polar und ungeladen.

3. Konstruktion des Vektors pK18-naggn

Die Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN aus dem natürlichen NAGGN-Produzenten *Pseudomonas putida* KT2440 wurde durch die Co-Solute Trehalose erschwert. Dies war ausschlaggebend für die Entscheidung einen heterologen Expressionsstamm zu verwenden. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pK18-naggn erstellt, dessen Konstruktion in den folgenden Abschnitten erläutert wird. Dieser Vektor basiert auf dem Ausgangsvektor pK18*mobsacB*, in den das vollständige NAGGN-Biosynthesegencluster aus *P. putida* KT2440 unter der Kontrolle des osmoregulierten Promotors PromA der Ectoinbiosynthesegene aus *H. elongata* kloniert wurde. Der konstruierte Vektor pK18-naggn ermöglichte die genomische Konstruktion eines heterologen Expressionsstammes, wobei *H. elongata* als Expressionsstamm diente. Darüber hinaus konnte der Vektor pK18-naggn für die plasmidkodierte Expression der NAGGN-Biosynthesegene in *E. coli* eingesetzt werden.

Die Integration des NAGGN-Genclusters aus *P. putida* KT2440 in den Vektor pK18*mobsacB* erfolgte in einem zweistufigen Klonierungsverfahren. Zunächst wurde der Vektor pK18-3,5 erstellt, der den stromabwärts Bereich des Ectoingenclusters aus *H. elongata* in Kombination mit einem Teil der biosynthetischen NAGGN Gene enthielt. In diesen Vektor pK18-3,5 wurden, zur Konstruktion des Vektors pK18-naggn, sowohl die noch fehlenden NAGGN-Biosynthese Gene kloniert, die zur Vervollständigung der NAGGN-Biosynthesegene führen sollten, als auch der stromabwärts Bereich des Ectoin -Biosyntheseweges. Die stromabwärts und stromaufwärts befindlichen Genregionen des Ectoin-Genclusters wurden derart in den Vektor pK18*mobsacB* kloniert, dass diese Bereiche die NAGGN-Biosynthesegene flankierten.

3.1. Konstruktion des Vektors pK18-3,5

Für die Erstellung des Vektors pK18-3,5 wurde zunächst der stromaufwärts Bereich des NAGGN-Genclusters amplifiziert, der für eine spätere homologe Rekombination in das Genom von *H. elongata* benötigt wurde. Das PCR Produkt enthielt am 5'-Ende eine flankierende Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI. Das Gen *PPI750* und das partielle *PPI749* wurden separat durch eine PCR Reaktion als ein Amplifikat erstellt, das stromabwärts flankierend eine Erkennungsstelle für die Endonuklease *Hind*III enthielt (Abb. 15). Diese beiden PCR Produkte wurden erfolgreich erstellt (nicht gezeigt) und konnten mit einer SOE-PCR Reaktion fusioniert werden. Das entstandene SOE-PCR Produkt (nicht gezeigt) wurde von den Schnittstellen der Endonukleasen *Bam*HI und *Hind*III flankiert,

wodurch eine gerichtete Klonierung in den Vektor pK18*mobsacB* ermöglicht wurde (Abb. 15). Das SOE-PCR Produkt und der Vektor pK18*mobsacB* wurden in getrennten Reaktionsansätzen mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Hind*III restringiert. Das hydrolysierte SOE-PCR Produkt, ebenso wie der verdaute Vektor pK18*mobsacB* wurden durch die T4-DNA-Ligase mit einander ligiert und anschließend in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Durch die auf dem Vektor vorhandene Antibiotikaresistenz wuchsen nur plasmidtragende Bakterienzellen, aus denen die Plasmide isoliert wurden. Anschließend wurden sie auf eine korrekte Insertion des hydrolysierten SOE-PCR Produktes, durch Restriktionsanalysen, getestet (Abb. 16).

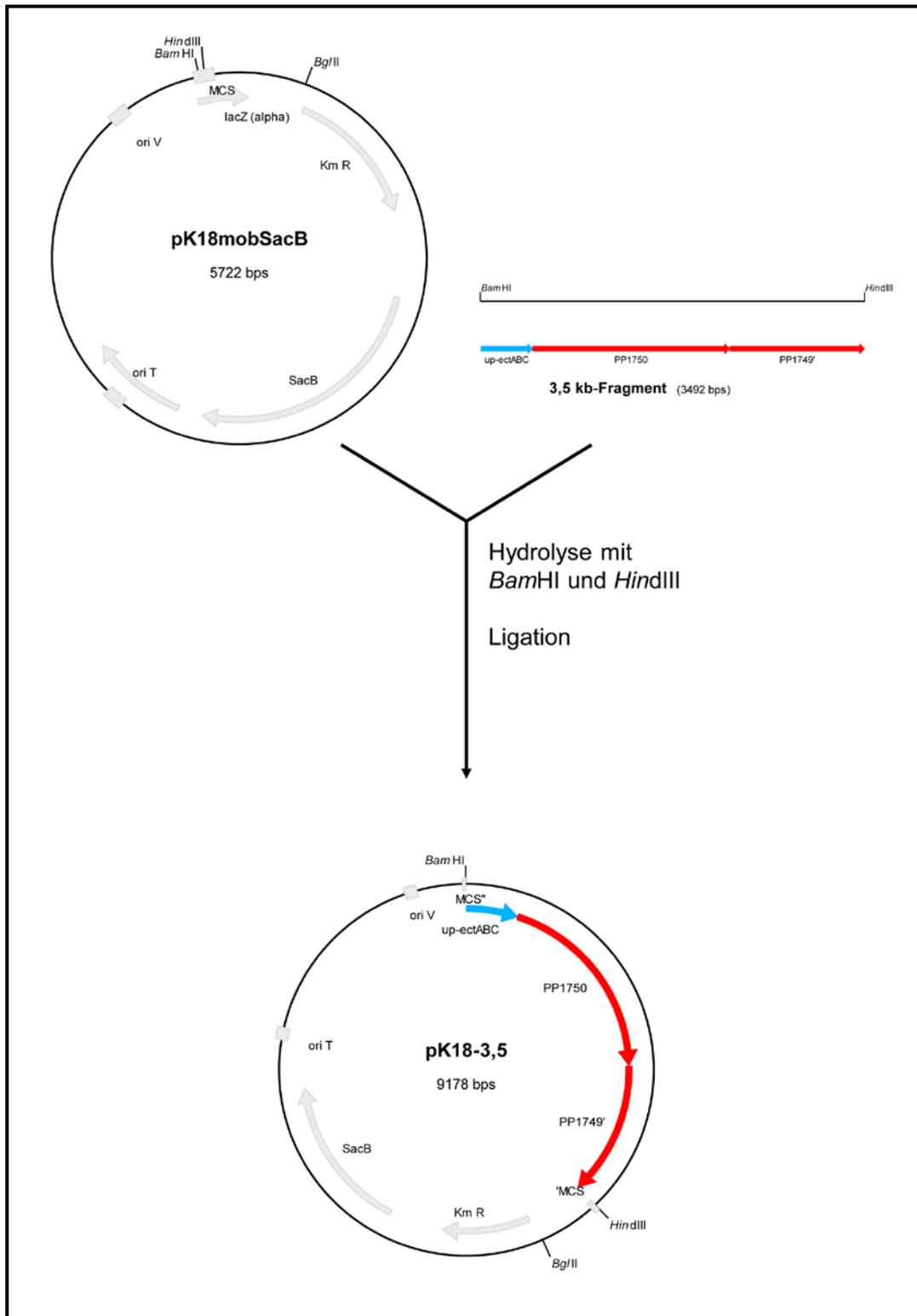


Abb. 15: Klonierungsschema für die Konstruktion des Vektors pK18-3,5 bestehend aus dem Ausgangsvektor pK18*mob*sacB mit dem integrierten stromaufwärts Bereich des Ectoingenclusters aus *H. elongata* (up-ectABC) und dem stromabwärts fusionierten Gen *PP1750* und dem partiellen Gen *PP1749*.

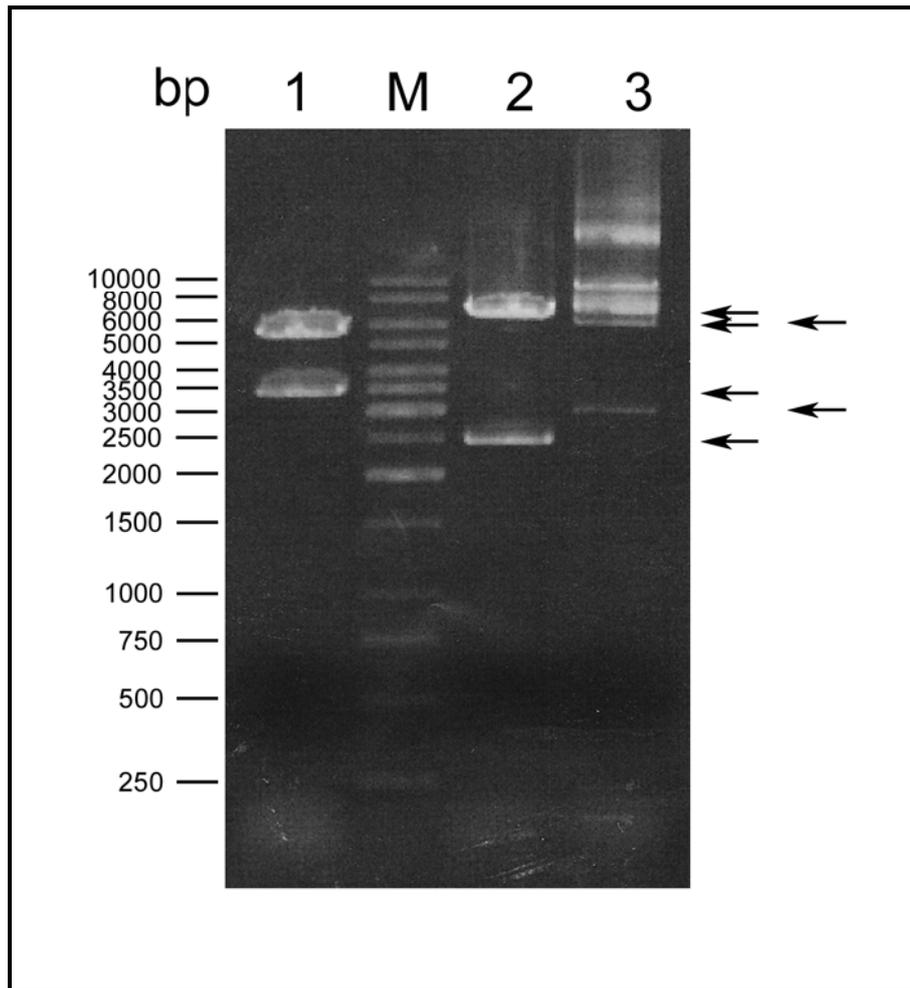


Abb. 16: Der erstellte Vektor pK18-3,5 wurde durch Restriktionsanalysen überprüft.

Spur M: kennzeichnet die verwendete 1 kb DNA-Leiter #0311 (Fermentas)

Spur 1: Hydrolyse des Vektors pK18-3,5 mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Hind*III

Spur 2: Hydrolyse des Vektors pK18-3,5 mit der Endonuklease *Sma*I

Spur 3: Hydrolyse des Vektors pK18-3,5 mit der Endonuklease *Pvu*I

Die Restriktionsanalysen wurden mit den Endonukleasen *Hind*III und *Bam*HI in einem Doppelverdau und mit *Sma*I und *Pvu*I jeweils in einem Einzelverdau durchgeführt. In Abb. 16 ist zu erkennen, dass durch den enzymatischen Verdau des Vektors pK18-3,5 mit den Endonukleasen *Hind*III und *Bam*HI, in der ersten Spur, ein Restriktionsmuster entstanden ist, dass mit den erwarteten Banden von 3487 bp und 5722 bp übereinstimmt. Der Verdau des Vektors mit den Enzymen *Sma*I bzw. *Pvu*I führte zu Banden mit den Größen 2500 bp und 6700 bp (Spur 2) bzw. 3000 bp und 6200 bp (Spur 3), die den erwarteten Bandengrößen (2474 bp und 6704 bp bzw. 2995 bp und 6183 bp) entsprechen. In Spur 3 sind darüber hinaus noch drei weitere Banden sichtbar, die sich im Bereich 7000 bp, 9000 bp und über 12 000 bp

befinden. Dieses Bandenmuster stellt die 3 Zustandsformen vektorieller unvedauter DNA dar. Bei dem Restriktionsverdau mit dem Enzym *PvuI* wurde der Vektor nicht vollständig hydrolysiert.

Die in Abb. 16 dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Vektor pK18-3,5 erfolgreich erstellt werden konnte. Bei den Restriktionsanalysen sind alle erwarteten Fragmente mit den entsprechenden Größen entstanden.

3.2. Konstruktion des Vektors pK18-naggn

Der stromaufwärts Bereich dieses Amplifikats wurde durch die Endonuklease *HindIII* flankiert. Eine weitere PCR Reaktion wurde zur Vervielfältigung des stromabwärts Bereichs des Ectoin-Biosynthesegenclusters mit genomischer DNA, die aus *H. elongata* gewonnen wurde, durchgeführt. Das stromabwärts gelegene Ende wurde durch die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *BglIII* begrenzt. Eine SOE-PCR Reaktion wurde zur Fusion beider erfolgreich vervielfältigter (nicht gezeigt) Amplifikate eingesetzt. Das SOE-PCR Produkt wurde durch Schnittstellen für die Endonukleasen *HindIII* und *BglIII* flankiert und gewährt dadurch eine gerichtete Klonierung in den bereits konstruierten Vektor pK18-3,5 (Abb. 17). Das SOE-PCR-Produkt und der Vektor pK18-3,5 wurden durch die Endonukleasen *HindIII* und *BglIII* verdaut und für eine sich anschließende Ligation eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

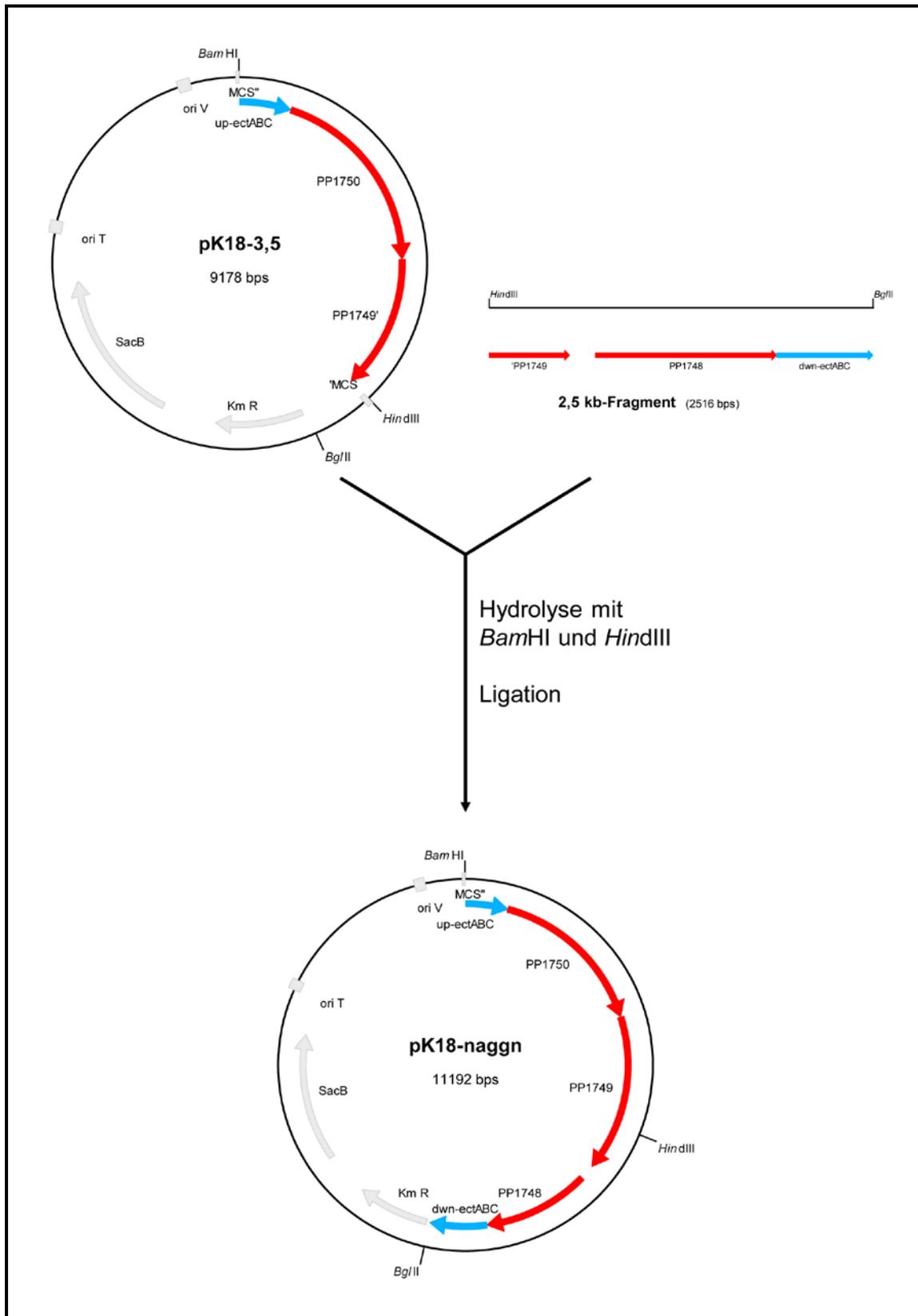


Abb. 17: Konstruktion des Vektors pK18-naggn, der das vollständige NAGGN-Gencluster enthält, das unter der Kontrolle des Ectoinbiosynthese Promotors (PromA) steht und zusätzlich den downstream Bereich der Ectoinbiosynthesegene (dwn-ectABC) inseriert trägt.

Der Erfolg der Klonierung wurde überprüft, in dem aus den plasmidtragenden Zellen das Plasmid isoliert wurde und es im Folgenden durch eine Restriktionsanalyse auf die Insertion des gewünschten Genbereichs überprüft wurde. Das in Abb. 18 gezeigte Bandenmuster resultierte aus einer enzymatischen Hydrolyse mit der Endonuclease *SacI*, die Bandengrößen von 1700 bp und 9500 bp hervorrief, die den erwarteten Banden von 1741 bp und 9451 bp entsprachen. Dieses Ergebnis zeigt die erfolgte Insertion des Bereich 'PPI1749-PPI1748-dwn-ectABC in den Vektor pK18-3,5, wodurch der Vektor pK18-naggn generiert wurde.

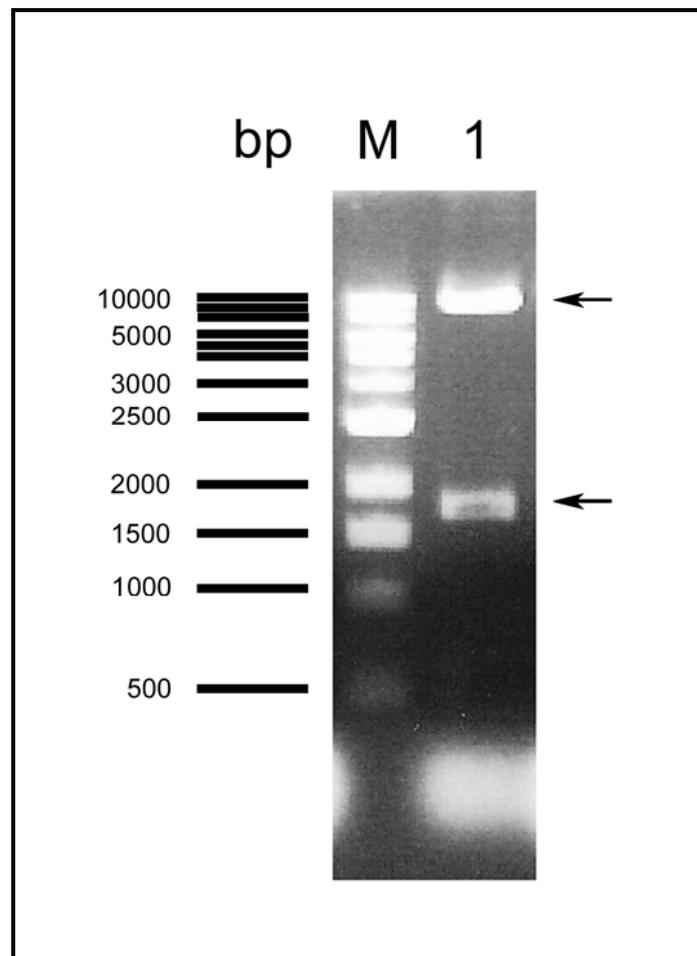


Abb. 18: Der erstellte Vektor pK18-naggn wurde im Hinblick auf die korrekte Konstruktion durch Restriktionsanalysen überprüft.

(M) kennzeichnet die verwendete 1 kb DNA-Leiter #0311 (Fermentas)

Spur (1) Hydrolyse des Vektors pK18-naggn mit der Endonuclease *SacI*

Der Vektor pK18-naggn wurde erfolgreich mit einer zweistufigen Klonierungsstrategie erstellt und enthält das vollständige NAGGN-Biosynthesegencluster aus dem Bakterium *Pseudomonas putida*, das von den stromaufwärts und stromabwärts Bereichen des Ectoingenclusters aus dem Organismus *H. elongata* flankiert wird.

4. Aufklärung der Biosynthese

Neben der Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN ist die Aufklärung der NAGGN-Biosynthese ein weiteres interessantes Themengebiet, das auch im Hinblick auf die Erstellung eines NAGGN-Produzenten wertvolle Einblicke liefern könnte.

Die Biosynthese des kompatiblen Solut NAGGN war zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit noch nicht aufgeklärt. Es boten sich zwei Strategien zur Lösungen dieser Fragestellung an. Die Konstruktion von Mutanten, die Deletionen im Bereich der einzelnen NAGGN-Biosynthesegene aufweisen, und die Überexpression einzelner Gene und deren Aktivitätsnachweis *in vivo* und *in vitro*.

4.1. Deletionen der einzelnen NAGGN-Biosynthesegene in dem Vektor pK18-naggn

Als Ausgangspunkt für die Erstellung von Deletionsmutanten diene das Plasmid pK18-naggn, in dem die einzelnen Biosynthesegene entsprechend entfernt wurden (Abschn. VII). Die konstruierten Plasmide wurden jeweils nach dem deletierten Gen benannt, pK18- $\Delta PPI1750$, pK18- $\Delta PPI1749$, pK18- $\Delta PPI1748$. Das Plasmid pK18- $\Delta PPI1750$ besitzt beispielsweise eine Deletion in dem Gen *PPI1750*. Das Gen *PPI1750* kodiert für eine Asparaginsynthetase, das Gen *PPI1749* für eine N-Acetyltransferase und das Gen *PPI1748* für eine metallabhängige Peptidase der Klasse M42.

Die konstruierten Plasmide wurden zur Detektion von auffälligen Solut- oder Aminosäure-Gehalten in verschiedene *E. coli* Stämme transformiert.

4.1.1. Analyse der kompatiblen Solute und des Aminosäuregehalts in den plasmidtragenden *E. coli* DH5 α Stämmen

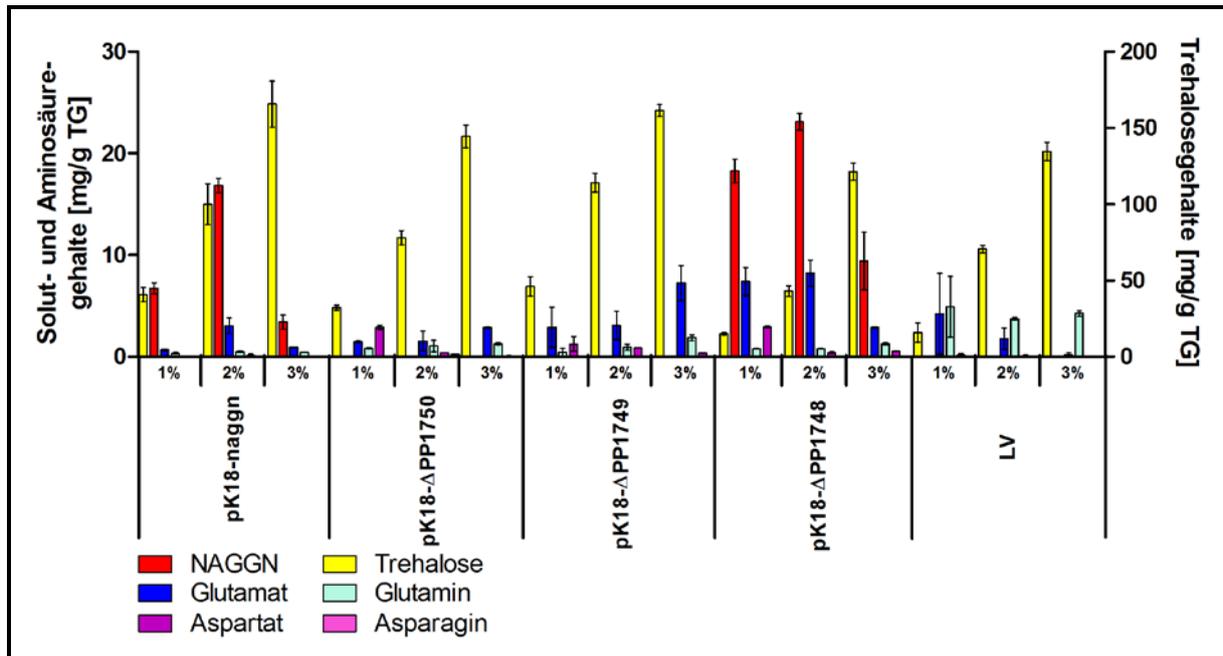


Abb. 19: Gehalte der kompatiblen Solute und der Aminosäuren des Stammes *E. coli* DH5 α mit den jeweils einzelnen eingebrachten Plasmiden pK18-naggn, pK18- Δ PPI1750, pK18- Δ PPI1749, pK18- Δ PPI1748 und LV (=Leervektor). Die Anzucht erfolgte in dem Medium MM63 bei NaCl Konzentrationen von 1 %, 2 % und 3 %. Die Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.

In den Stamm *E. coli* DH5 α wurde das Plasmid pK18-naggn eingebracht, das das vollständige NAGGN-Gencluster, unter der Kontrolle des salzinduzierbaren Promotors der Ectoin-Biosynthesegene, enthielt (Abschn. III.3.2). Die Vektoren pK18- Δ PPI1750, pK18- Δ PPI1749, pK18- Δ PPI1748 wurden ebenfalls in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Diese Plasmide basieren auf dem Plasmid pK18-naggn, wobei jeweils eine Deletion des namensgebenden Gens aus dem NAGGN-Gencluster vorlag. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pK18*mobsacB* verwendet. Die *E. coli* DH5 α Stämme mit den jeweiligen Plasmiden wurden in dem Mineralsalzmedium MM63 mit Salinitäten von 1-3 % NaCl im Medium angezogen und in der früh-stationären Phase geerntet. Die Solute NAGGN und Trehalose wurden mittels isokratischer HPLC detektiert und die Gehalte der Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Aspartat und Asparagin wurden durch Gradienten HPLC mit Vorsäulenderivatisierung quantifiziert.

In allen Kulturen wurde das wirtseigene Solut Trehalose detektiert. Die Trehalose-Gehalte der Stämme *E. coli* DH5 α pK18-naggn, *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI1750 und *E. coli* DH5 α

pK18- Δ PPI749 lagen bei 1 % NaCl im Medium zwischen 32 und 46 mg/g TG. In den Stämmen *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI748 und *E. coli* DH5 α pK18*mobsacB* lagen mit ca. 15 mg/g TG geringere Trehalose-Gehalte vor (Abb. 19). Mit der Anzucht in dem Mineralsalzmedium MM63-2 wurden Trehalose-Gehalte zwischen 70,5 und 114,07 mg/g TG erreicht. In dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI748 wurde ein verringerter Trehalose-Gehalt von 43,0 mg/g TG nachgewiesen. Bei einem Salzgehalt von 3 % im Medium wurden Trehalose-Gehalte von 121,2 mg/g TG bis zu 165,7 mg/g TG bestimmt (Abb. 19).

Das kompatible Solut NAGGN wurde in dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18-nagn und in dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI748 nachgewiesen. In dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18-nagn wurde bei 2 % NaCl im Medium ein Maximum des NAGGN-Gehalts mit 16,8 mg/g TG festgestellt. Bei einer Salinität von 1 % bzw. 3 % lagen die NAGGN-Gehalte bei 6,7 und 3,4 mg/g TG. In dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI748 war ebenfalls das NAGGN nachweisbar und auch hier wurde eine maximale NAGGN-Synthese bei einem Salzgehalt von 2 % mit 23,11 mg/g TG dokumentiert. Insgesamt lagen die NAGGN-Gehalte in dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI748 leicht erhöht vor. Bei 1 % bzw. 3 % NaCl im Medium wurden NAGGN-Gehalte von 18,27 bzw. 9,42 mg/g TG festgestellt, welches ungefähr einer Verdreifachung der NAGGN-Gehalte im Vergleich zu dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18-nagn entspricht (Abb. 19).

Die Aminosäure Asparagin wurde nur in dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI750 (2 % NaCl) in sehr geringem Maße detektiert (0,23 mg/g TG). Die Aminosäure Glutamin lag in allen Proben zwischen 0,35 und 1,86 mg/g TG vor, außer in den Proben der Negativkontrolle. In dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18*mobsacB*, der als Negativkontrolle fungierte, lagen Glutamin-Gehalte zwischen 3,7 und 4,25 mg/g TG vor. Die Glutamat-Gehalte der Proben weisen ein sehr heterogenes Bild auf. Die niedrigste Glutamat-Akkumulation findet man in dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18-nagn bei 1 % NaCl (0,66 mg/g TG) und die Höchste in dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI748 bei 2 % NaCl (8,22 mg/g TG) (Abb. 19). Einen Anstieg der NAGGN-Synthese, die mit einer Erhöhung des Salzgehaltes einhergeht, findet man in den Stämmen *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI750 und *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI749. In den NAGGN produzierenden Stämmen *E. coli* DH5 α pK18-nagn und *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI748 liegt der maximale Glutamat-Gehalt, korrelierend mit der maximalen NAGGN-Synthese, bei 2 % NaCl vor. Ungewöhnlich hohe Aspartat-Gehalte wurden bei einer Salinität von 1 % in den Stämmen *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI750, *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI749 und *E. coli* DH5 α pK18- Δ PPI748 nachgewiesen (2,87 mg/g TG;

1,23 mg/g TG; 2,94 mg/g TG). Die durchschnittliche Aspartat-Akkumulation beträgt 0,5 mg/g TG und ist damit deutlich niedriger, als die oben erwähnten Höchstwerte (Abb. 19).

In allen Stämmen wurde das kompatible Solut Trehalose synthetisiert, wobei es in den Stämmen *E. coli* DH5 α pK18-naggn und *E. coli* DH5 α pK18- Δ PP1748 zu einer zusätzlichen NAGGN-Akkumulation kam. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass das Plasmid pK18- Δ PP1748 lediglich zwei der drei biosynthetischen Gene enthält, die für die Enzyme Asparaginsynthetase (AsnB/PP1750) und N-Acetyltransferase (PP1749) kodieren, und dennoch NAGGN synthetisiert wurde. Die Glutamat-Gehalte korrelieren mit der NAGGN-Akkumulation. Die Aminosäuren Glutamin, Asparagin und Aspartat waren in sehr geringen Konzentrationen vorhanden, wobei Aspartat in einigen Proben (s.o.) deutlich erhöht vorlag.

4.1.2. Analyse der kompatiblen Solute und des Aminosäuregehalts in *E. coli* BKA-13

Die NAGGN-Gehalte der Stämme *E. coli* DH5 α pK18-NAGGN und *E. coli* DH5 α pK18- Δ PP1748 lagen max. bei 16,8 mg/g TG (Abb. 20). In dem Stamm *P. putida* KT2440 wurden dagegen Werte zwischen 80 und 90 mg/g TG bestimmt. Diese Diskrepanz zwischen den NAGGN-Gehalten in *E. coli* DH5 α und *P. putida* KT2440 kann mehrere Ursachen haben. Der Promotor PromA aus *H. elongata*, unter dessen Kontrolle das NAGGN-Gencluster auf dem Plasmid pK18-naggn und dessen Derivate liegt, könnte in seiner Funktionalität in *E. coli* eingeschränkt sein. Eine andere Ursache für den niedrigen NAGGN-Gehalt könnte in der hohen Trehalose-Akkumulation, dem wirtseigenen kompatiblen Solut, begründet liegen, das die NAGGN Produktion verringert. Für nähere Untersuchungen zum Einfluss der Trehalose-Akkumulation auf die NAGGN-Biosynthese wurde der Stamm *E. coli* BKA-13 verwendet. Der Bakterienstamm *E. coli* BKA-13 basiert auf dem *E. coli* Stamm MC4100, in dem die Transporter PutPA, ProP und ProU deletiert sind, und der außerdem Trehalose defizient ist (*ΔotsAB*) (Burdziak, 2006).

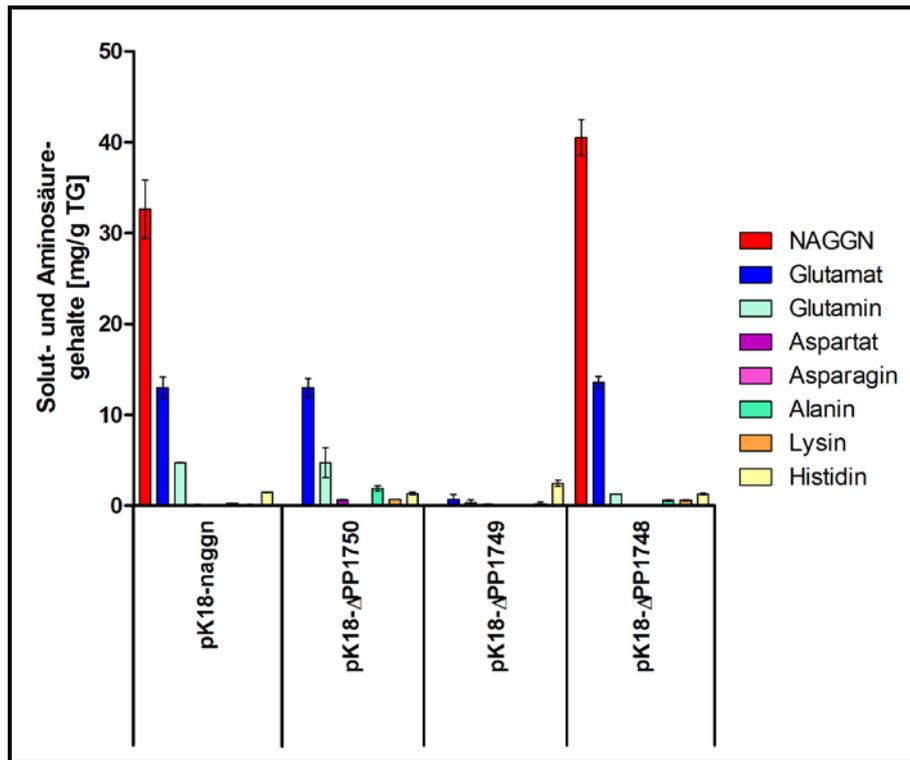


Abb. 20: Analyse der kompatiblen Solute und des Aminosäurespektrums in *E. coli* BKA-13 mit den jeweils einzelnen eingebrachten Plasmiden pK18-naggn, pK18- Δ PPI1750, pK18- Δ PPI1749 und pK18- Δ PPI1748. Die Anzucht erfolgte in dem Medium MM63 bei einer NaCl Konzentration von 2 %. Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.

Der Stamm *E. coli* BKA-13 wurde mit den Plasmiden (Abschn. III.3 & Abschn. VII) pK18-naggn, pK18- Δ PPI1750, pK18- Δ PPI1749 und pK18- Δ PPI1748 transformiert und anschließend in dem Mineralsalzmedium MM63-2 angezogen. Die Gehalte der Solute, respektive einiger Aminosäuren, wurden durch HPLC-Analysen quantifiziert.

Es wurde in diesem Versuch keine Leervektorkontrolle durchgeführt, weil bereits bei einer Salinität von 2 % NaCl das Wachstum sehr eingeschränkt war, so dass nicht genügend Zellmaterial für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand.

In allen getesteten Stämmen war das Solut Trehalose nicht zu detektieren.

Das kompatible Solut NAGGN konnte sowohl in dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18-naggn, als auch in dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PPI1748 nachgewiesen werden. Die NAGGN-Gehalte dieser beiden Stämme betragen 32,65 und 40,53 mg/g TG (Abb. 20).

Desweiteren wurden die Aminosäure-Gehalte von Glutamat, Glutamin, Aspartat, Asparagin, Alanin, Lysin und Histidin untersucht. Der Glutamat-Spiegel in dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PPI1749 war mit 0,68 mg/g TG im Vergleich zu den anderen getesteten Stämmen,

deren Glutamat-Gehalt sich auf ca. 13 mg/g TG belief, auffallend gering. In den Stämmen *E. coli* BKA-13 pK18-naggn und *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1750 lag Glutamin bei 4,7 mg/g TG. In dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1749 war der Glutamin-Gehalt mit 0,3 mg/g TG deutlich verringert. Der Aspartat-Gehalt der Stämme betrug im Durchschnitt 0,1 mg/g TG und verzeichnete in dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1750 einen überdurchschnittlich hohen Wert mit 0,63 mg/g TG. Die Asparaginspiegel der Stämme lagen zwischen 0,036 und 0,082 mg/g TG und waren damit nahe der unteren Nachweisgrenze, so dass die Werte in diesem Bereich keine verlässlichen Daten lieferten (Abb. 20). Der Alanin-Gehalt war in dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1750 mit 1,8 mg/g TG ungefähr viermal höher als in den übrigen getesteten Stämmen. Der Lysin-Gehalt betrug in den Stämmen *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1750 und *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1748 ca. 0,6 mg/g TG. In den Stämmen *E. coli* BKA-13 pK18-naggn (0,13 mg/g TG) und *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1749 (0,23 mg/g TG) lagen verringerte Lysin-Gehalte vor. Der Histidin- Spiegel lag im Mittel bei 1,4 mg/g TG, zeigte aber in dem Stamm pK18- Δ PP1749 eine Erhöhung auf 2,44 mg/g TG (Abb. 20). In diesem Trehalose defizienten *E. coli* Stamm BKA-13 konnte das Solut NAGGN in zwei Stämmen detektiert werden, in *E. coli* BKA-13 pK18-naggn und in *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1748. Der Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1748 besitzt nur zwei (*PP1750/asnB* und *PP1749*) der drei potentiellen NAGGN-Biosynthesegene. In allen Stämmen wurde, wie es der genetische Hintergrund erwarten ließ, keine Trehalose nachgewiesen. In dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1749 wichen die Aminosäure-Gehalte deutlich von denen der anderen getesteten Stämme ab. Die Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Alanin und Lysin waren deutlich verringert, wohingegen der Histidin-Gehalt deutlich erhöht vorlag. Der Zellmetabolismus schien in diesem Stamm, durch die Expression der plasmidkodierten Gene, besonders stark beeinträchtigt zu sein. Der Aspartat-Spiegel schien in dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ PP1750 auffallend erhöht zu sein. Dies ging mit einem erhöhten Vorkommen der Aminosäure Alanin einher.

Die Untersuchungen zu den Deletionen der einzelnen NAGGN-Biosynthesegene in dem Plasmid pK18-naggn zeigten keine Akkumulation potentieller Zwischenverbindungen wie Glutamin-amid oder Glutamat-amid. Es wurde festgestellt, dass sich die Trehalose Akkumulation negativ auf die NAGGN-Biosynthese auswirkt. Außerdem gab es Hinweise, dass zwei der drei potentiellen NAGGN-Biosynthesegene für die Biosynthese ausreichen könnten, nämlich die Asparaginsynthetase *PP1750* und die N-Acetyltransferase *PP1749*.

Allerdings muss noch geklärt werden, ob die Peptidase durch ein in *E. coli* vorhandenes Enzym komplementiert werden kann oder ob es sich hier um ein NAGGN abbauendes Enzym handelt.

4.2. Überexpression einzelner NAGGN-Biosynthesegene

In den Untersuchungen zu den Deletionen der einzelnen biosynthetischen Gene des Plasmids pK18-naggn konnten keine potentiellen NAGGN-Biosynthese Zwischenverbindungen detektiert werden. Eine Überexpression der einzelnen NAGGN-Biosynthesegene im Rahmen des pET-Expressionssystems wurde als eine weitere Strategie ausgewählt, um genaueren Aufschluss über die möglichen Umsetzungen einzelner Enzyme des NAGGN-Biosyntheseweges zu erhalten.

4.2.1. Überexpression des Enzyms PP1750 *in vivo*

Das erste Enzym der NAGGN-Biosynthese ist die Asparaginsynthetase AsnB/PP1750.

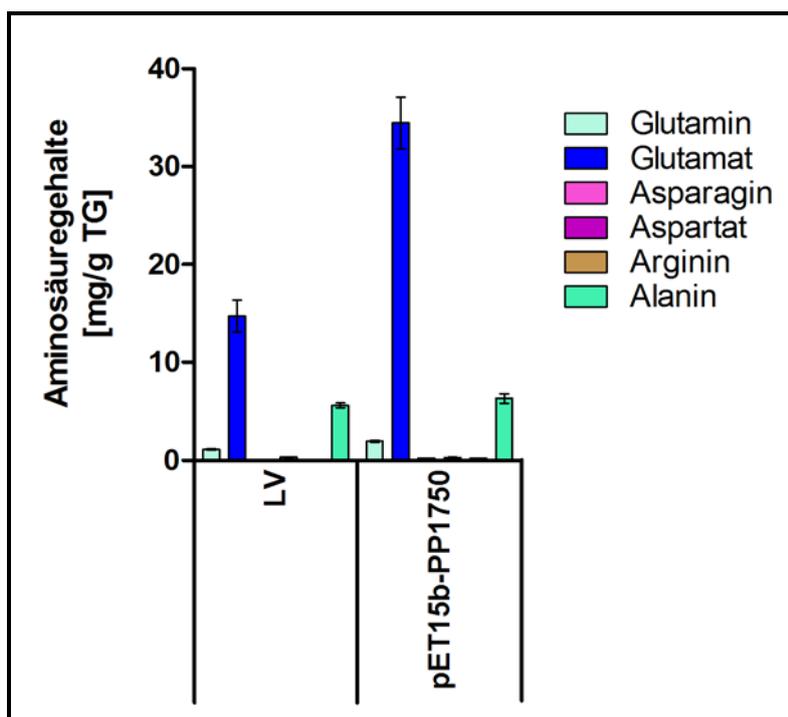


Abb. 21: Aminosäureanalyse der Zellextrakte durch HPLC-Messungen der *in vivo* Überexpression des Enzyms PP1750 (AsnB) in *E. coli* BL21(DE3), LV (=Leervektor).

Die Stämme *E. coli* BL21(DE3) pET15b-PP1750 und *E. coli* BL21(DE3) mit dem entsprechenden Leervektor wurden in dem Mineralsalzmedium MM63 mit einer Salinität von

3 % (NaCl) angezogen. Die Kulturen wurden in der exponentiellen Phase mit IPTG induziert und nach 3 h geerntet. Das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde extrahiert und auf Solut- und Aminosäure-Gehalte hin überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die Gehalte der Aminosäuren Asparagin, Aspartat und Arginin sehr geringe Konzentrationen aufwiesen. Die geringen Aminosäurekonzentrationen befanden sich im Grenzbereich der verwendeten Methode zur Aminosäuren Bestimmung, womit leichte Ungenauigkeiten einhergehen. Die Aminosäure Alanin wies einen konstanten Wert von ca. 6 mg/g TG auf (Abb. 21). Der Gehalt der Aminosäure Glutamin steigt im Vergleich zur Leervektorkontrolle von 1,13 auf 1,99 mg/g TG leicht an. Die Aminosäure Glutamat verzeichnete den größten Anstieg von 14,7 mg/g TG auf 34,46 mg/g TG (Abb. 21). Das bedeutet, dass eine Überexpression des Enzyms PP1750 3 h nach Induktion mit IPTG zu einem erhöhten Glutamat-Spiegel in den Zellen führt. In *in vitro* Versuchen mit dem isolierten Enzym PP1750 wurden bislang keine Rahmenbedingungen gefunden, in denen ein aktives Enzym dokumentiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.2.2. Überexpression und Reinigung des Enzyms PP1749

Das zweite Enzym der NAGGN-Biosynthese ist die putative N-Acetyltransferase PP1749. Datenbankrecherchen (NCBI) ließen durch die vorhandene rimK-Domäne (Amin/Carboxy-Ligase-Funktion) auf eine Bifunktionalität des Enzyms schließen. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch lediglich die N-Acetyltransferase-Funktion näher untersucht.

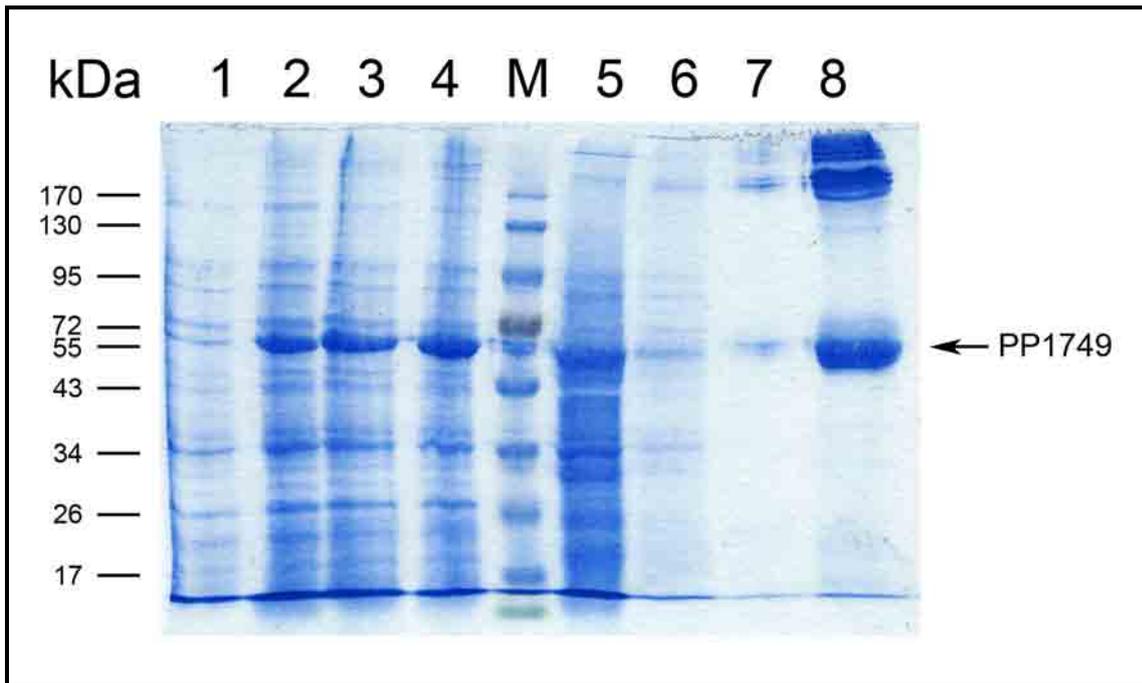


Abb. 22: SDS-PAGE der heterologen Überexpression des Proteins PP1749 in *E. coli* BL21(DE3) mit anschließender Affinitätschromatographischer Aufreinigung.

Spur M: Proteingrößenstandard #SM0671(Fermentas)

Spur 1: Gesamtzellprotein zum Zeitpunkt der IPTG-Induktion (t0).

Spur 2: Gesamtzellprotein 1 h nach der IPTG-Induktion (1).

Spur 3: Gesamtzellprotein 2 h nach der IPTG-Induktion (2).

Spur 4: Gesamtzellprotein 3 h nach der IPTG-Induktion (3).

Spur 5: Ni-Chelat Affinitätschromatographie des Proteins PP1749 (Lysis)

Spur 6: Ni-Chelat Affinitätschromatographie des Proteins PP1749 (Waschfraktion I)

Spur 7: Ni-Chelat Affinitätschromatographie des Proteins PP1749 (Waschfraktion II)

Spur 8: Ni-Chelat Affinitätschromatographie des Proteins PP1749 (Elutionsfraktion)

Das Enzym PP1749, eine putative N-Acetyltransferase, wurde in dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) erfolgreich überexprimiert. Die Induktion erfolgte mit dem Laktoseanalogon IPTG und wurde in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Konzentration von 0,4 mM durchgeführt. Der Zeitpunkt der Induktion wurde mit 0 und die im Folgenden entnommenen stündlichen Proben wurden mit 1, 2 und 3 bezeichnet.

Auf dem in Abb. 22 gezeigten SDS-PAGE ist eine Stunde nach dem Induktionszeitpunkt eine deutliche Überexpressionsbande zu erkennen, die über den Verlauf der folgenden zwei Stunden nur geringfügig an Intensität zunahm. Das Enzym PP1749 entsprach dem theoretischen Molekulargewicht von 64,82 kDa (ExPasy Proteomic Server, Compute pI/Mw).

Die Affinitätschromatographische Aufreinigung dieses erfolgreich überexprimierten Enzyms wurde über den an das Protein fusionierten C-terminalen His-Tag ermöglicht. In der Fraktion, die mit einem Lysispuffer durchführt wurde, waren neben einer Bande, die der Größe des Zielproteins PP1749 entsprach, noch viele weitere Proteinbanden zu erkennen. In der ersten Waschfraktion waren einerseits geringe Anteile des Zielproteins vorhanden, aber auch noch weitere Proteine, die sowohl ein höheres, als auch ein geringeres Molekulargewicht aufwiesen. In der zweiten Waschfraktion wurden vornehmlich Proteine im hochmolekularen Bereich detektiert, aber auch geringe Spuren des Zielproteins PP1749. Der letzte Schritt bestand aus einem Elutionsschritt in dem sich hauptsächlich das Zielprotein PP1749 befand und weitere hochmolekulare Proteine im Bereich von 100 kDa (Abb. 22).

Die Überexpression des Enzyms PP1749 in dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) verursachte 1-3 Stunden nach der Induktion mit IPTG Überexpressionsbanden. Diese Überexpressionskultur wurde für eine sich anschließende Enzymaufreinigung über eine Affinitätschromatographie eingesetzt und das Protein erfolgreich isoliert. Das Enzym PP1749 wurde im Folgenden für enzymatische Assays verwendet.

4.3. In vitro Assay des N-Acetyltransferase PP1749

4.3.1. Chemische Synthese des Glutamin Derivats Glutamin-1-amid

Für einen Aktivitätsassay mit dem Enzym PP1749 wurde die Verbindung Glutamin-1-amid chemisch synthetisiert. Von der Verbindung tBoc-Glutamin-*p*-nitrophenol wird bei der Begasung mit Ammoniak *p*-Nitrophenolat abgespalten und gleichzeitig die C α -Carboxylgruppe des t-Boc-Glutamins amidiert. Diese erste Reaktion konnte durch einen Farbumschlag der Lösung visuell verfolgt werden, weil das entstehende *p*-Nitrophenolat eine intensive Gelbfärbung der Lösung hervorruft. Durch eine zweite Reaktion, die durch die Zugabe von 1 M HCl katalysiert wurde, erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppe tBoc, so dass das gewünschte Endprodukt Glutamin-1-amid entstand. Die abgespaltene tBoc Gruppe zersetzte sich in CO₂ und Isobuten, welches beides als Gas dem Reaktionsansatz entwich. Die Synthese der Verbindung Glutamin-1-amid wurde durch ¹³C-NMR spektroskopische Messungen nachgewiesen (Abb. 23). Die Signale bei 179,72, 174,35, 55,18, 32,961 und 29,22 ppm korrelieren mit der Verbindung Glutamin-1-amid. Es sind außerdem noch Signale vorhanden, die auf verbliebene Anteile der Schutzgruppe tBoc im Reaktionsansatz hinweisen (161,21, 84,45, 30,45 ppm) (Abb. 23).

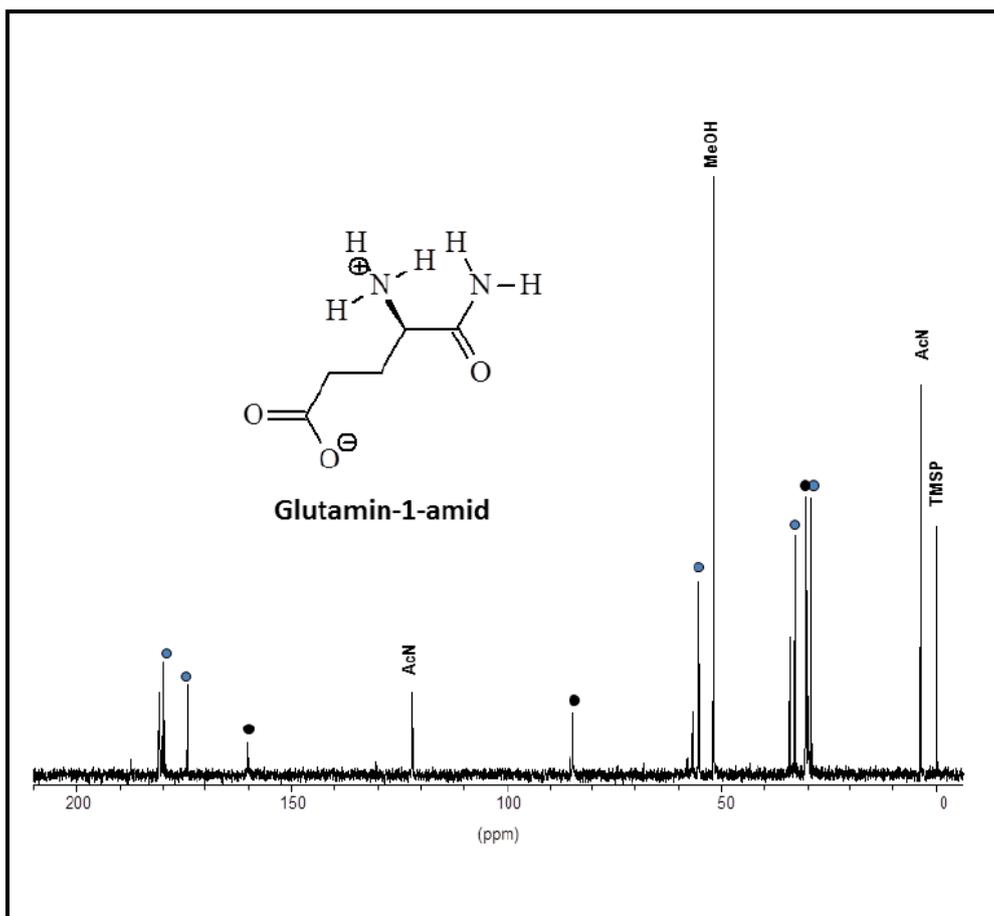


Abb. 23: ^{13}C -NMR spektroskopische Messung der gereinigten Verbindung Glutamin-1-amid. (●) Glutamin-1-amid; (●) tBOC-Schutzgruppe

4.3.2. N-Acetyltransferase Assay des Enzyms PP1749 mit C-terminalem His-Tag

Zur *in vitro* Untersuchung des Enzyms PP1749 wurde das Enzym überexprimiert und anschließend isoliert (Abschn. III.4.2.2). Für den eigentlichen enzymatischen Assay wurde außerdem ein potentiell Zwischenprodukt, Glutamin-1-amid, der NAGGN-Biosynthese chemisch synthetisiert (Abschn. III.4.3.1). Nach diesen Vorarbeiten waren alle Komponenten zusammengetragen worden, um den eigentlichen enzymatischen Assay durchführen zu können.

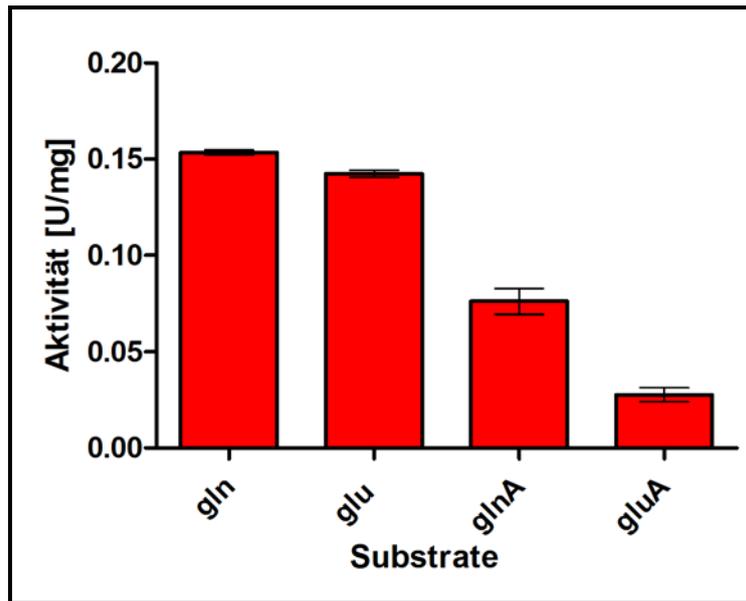


Abb. 24: Enzymatischer Aktivitätstest des Enzyms PP1749 *in vitro*. Als Substrate wurden die Aminosäuren und -derivate Glutamin (gln), Glutamat (glu), Glutamin-1-amid (glnA) und Glutamat-1-amid (gluA) eingesetzt.

Die Aktivität (U/mg) des Enzyms N-Acetyltransferase PP1749, mit C-terminalem His-Tag, wurde mit den eingesetzten Substraten Glutamin (gln), Glutamat (glu) und deren Amidformen Glutamin-1-amid (glnA) und Glutamat-1-amid (gluA) bestimmt. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte indirekt durch die photometrische Bestimmung der gelbgefärbten Verbindung TNB⁻, die bei der Derivatisierung freigesetzter Thiolgruppen entsteht. Bei der enzymatischen Umsetzung von Acetyl-CoA zu CoA-SH werden Acetylgruppen auf eines der eingesetzten Substrate übertragen, wobei das CoA-SH eine solche Thiolgruppe enthält, die eine Derivatisierung durch das Ellman Reagenz (DTNB) ermöglicht.

Die Enzymaktivitäten der N-Acetyltransferase PP1749 zeigten bei dem Einsatz der Substrate Glutamin bzw. Glutamat die höchsten Werte mit 0,15 und 0,14 U/mg. Das amidierete Glutaminderivat Glutamin-1-amid wies eine Aktivität von 0,08 U/mg auf. Das Substrat Glutamat-1-amid zeigte eine sehr viel geringere Aktivität des Enzyms PP1749 von 0,028 U/mg (Abb. 24).

Die Substrate Glutamin und Glutamat schienen die von dem Enzym PP1749 favorisierten Substrate zu sein. Die amidierten Derivate dieser Aminosäuren führten zu keiner entsprechend hohen Aktivität.

Die Versuche zur Untersuchung der NAGGN-Biosynthese zeigten, dass eine *in vivo* Expression des Enzyms PP1750 (AsnB – Asparaginsynthetase) in *E. coli* BL21(DE3) zu einer erhöhten intrazellulären Akkumulation der Aminosäure Glutamat führt. Ein Aktivitätstest, der mit dem aufgereinigten Enzym PP1749 (N-Acetyltransferase) durchgeführt wurde, zeigte *in vitro*, dass Glutamin das favorisierte Substrat dieses Enzyms darstellt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* das Enzym PP1748 (Peptidase) entweder für die Biosynthese nicht benötigt wird oder durch eine in *E. coli* vorkommende Peptidase komplementiert wird.

5. *E. coli* – heterologe NAGGN Expression

Der Vektor pK18-naggn (Abschn. III.3) enthält die NAGGN-Biosynthesegene unter der Kontrolle des Promotors PromA der Ectoinbiosynthesegene aus *H. elongata*. Zur Aufklärung der NAGGN-Biosynthese wurde dieser Vektor pK18-naggn und dessen Derivate (Abschn. VII) bereits eingesetzt (Abschn. III.4.1.). Dabei wurde die Funktionalität des Promotors PromA aus *H. elongata* in *E. coli* nachgewiesen. *E. coli* ist ein sehr gut untersuchter Expressionsstamm in dem auch salzregulierte Biosynthesegene anderer kompatibler Solute, wie beispielsweise des Ectoins, exprimiert wurden (Louis & Galinski, 1997).

5.1. Heterologe Expression des kompatiblen Soluts NAGGN in *E. coli*

DH5 α

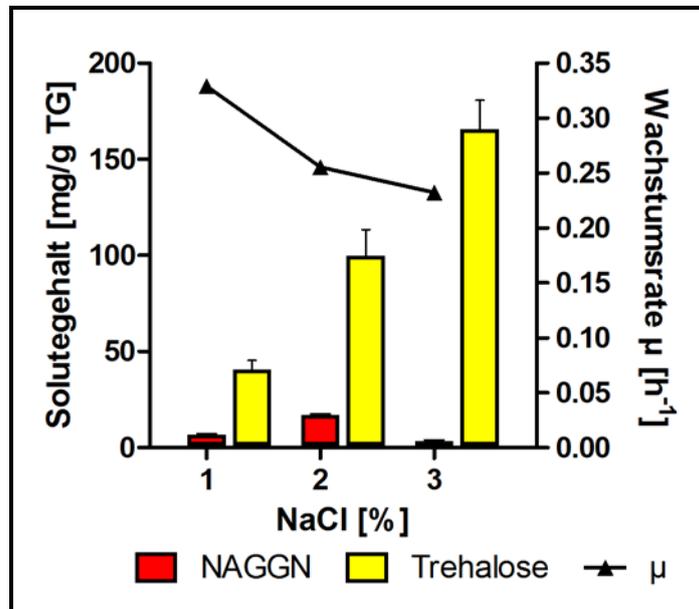


Abb. 25: Solutegehalte des Stammes *E. coli* DH5 α pK18-naggn, der in dem Mineralsalzmedium MM63 mit ansteigendem Salzgehalt (NaCl) von 1 %, 2 % und 3 % angezogen wurde. Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.

Für die heterologe Expression des kompatiblen Soluts NAGGN wurde der Vektor pK18-naggn in den Stamm *E. coli* DH5 α eingebracht. Das kompatible Solut NAGGN stand unter der Kontrolle eines salzinduzierbaren Promotors aus *H. elongata*. Die Anzucht erfolgte in dem Mineralsalzmedium MM63 bei 1-3 % Salz. Das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde extrahiert und anschließend durch HPLC-Analysen verifiziert.

Das wirtseigene kompatible Solut Trehalose wurde salzabhängig exprimiert und erreichte Gehalte von 40,82 mg/g TG bei 1 % NaCl im Medium bis zu 165,7 mg/g TG bei einer Salzkonzentration von 3 %. Der maximale Gehalt des kompatiblen Soluts NAGGN betrug bei einer Medium Salinität von 2 % 16,85 mg/g TG (Abb. 25). Durch die erfolgte Anzucht von *E. coli* DH5 α in einem Mineralsalzmedium mit Salinitäten von 1 % bzw. 3 % NaCl verringerten sich die NAGGN-Gehalte mit 6,74 mg/g TG bzw. 3,43 mg/g TG im Vergleich zu den NAGGN-Gehalten, die bei einem Mediensalzgehalt von 2 % vorhanden waren. Die Wachstumsrate lag bei 1 % Salz bei 0,33 h⁻¹ und nahm mit zunehmender Salinität, ab (Abb. 25). Bei einem applizierten Salzgehalt von 3 % betrug die Wachstumsrate lediglich 0,23 h⁻¹. Die Synthese des kompatiblen Soluts NAGGN in *E. coli* DH5 α unter einem Salz induzierbaren Promotor war erfolgreich. Die höchsten NAGGN-Gehalte wurden bei einer Salinität von 2 % NaCl erzielt (Abb. 25). Bei einem Mediensalzgehalt von 3 % NaCl wurde die NAGGN-Synthese vermindert, aber sie wurde durch die gesteigerte Synthese des natürlichen kompatiblen Soluts von *E. coli*, des Disaccharids Trehalose, kompensiert (Abb. 25).

5.2. Heterologe Expression des kompatiblen Soluts NAGGN in *E. coli* BKA-13

Neben der Akkumulation des kompatiblen Soluts NAGGN wurde in *E. coli* DH5 α das wirtseigene Solut Trehalose detektiert (Abschn. III.5.1.). Allerdings lag das Solut Trehalose nahezu in den Mengen vor, die ohne die Synthese des NAGGNs in *E. coli* unter Salzstress akkumuliert werden.

Bislang ist ungeklärt, ob der Promotor PromA aus *H. elongata* in seiner Funktionalität in *E. coli* eingeschränkt ist. Die Akkumulation der Trehalose selbst könnte aber ebenso die Ursache für die geringe NAGGN-Synthese sein, indem sie selbst den Promotor negativ reguliert.

Um die Wirkung der Trehalose-Akkumulation auf die NAGGN-Biosynthese näher zu verfolgen, wurde der Trehalose defiziente *E. coli* Stamm BKA-13 verwendet (Burdziak, 2006).

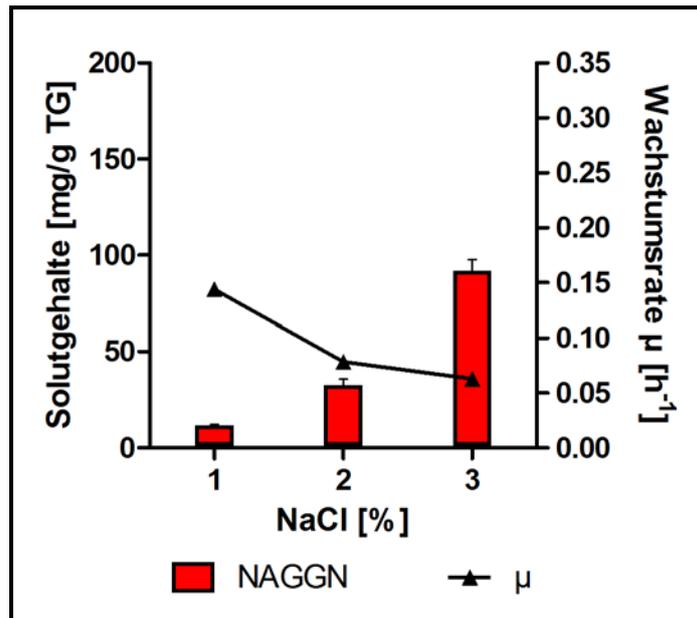


Abb. 26: Solutgehalt des Stammes *E. coli* BKA-13 in dem Mineralsalzmedium MM63 mit einem Salzgehalt (NaCl) zwischen 1 und 3 %. Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.

Der Trehalose defiziente Bakterienstamm *E. coli* BKA-13 wurde für die heterologe Expression des kompatiblen Soluts herangezogen, um den Kompensationseffekt durch das natürliche Solut Trehalose, während der Synthese zu vermeiden. Der Stamm *E. coli* BKA-13 mit dem eingebrachten Plasmid pK18-naggn wurde in dem Mineralsalzmedium MM63 bei Salinitäten von 1-3 % angezogen. Das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde extrahiert und die enthaltenen Solute wurden durch HPLC-Analysen bestimmt.

Das extrahierte Zellmaterial enthielt bei einer NaCl Prozentigkeit von 1 % 11,81 mg/g TG des Soluts NAGGN, welches im Vergleich zu dem NAGGN-Gehalt in *E. coli* DH5 α verdoppelt wurde (Abb. 25). Der NAGGN-Gehalt bei 2 bzw. 3 % lag bei 32,65 mg/g TG bzw. 91,81 mg/g TG. Die NAGGN Produktion bei 3 % NaCl im Medium wurde unter Verwendung des Trehalose defizienten *E. coli* Stammes BKA-13 ungefähr um das dreißigfache gesteigert. Die Wachstumsraten des Stammes *E. coli* BKA-13 waren allerdings niedriger als in dem Stamm *E. coli* DH5 α . Die Wachstumsraten des Stammes *E. coli* BKA-13 pK18-naggn betragen bei 1 % NaCl 0,144 h^{-1} bis hin zu 0,063 h^{-1} bei einer Mediumsalinität von 3 % (Abb. 25). Die Wachstumsraten dieses Stammes waren um ca. 1/3 verringert im Vergleich zu denen des Stammes *E. coli* DH5 α pK18-naggn, der die Kombination der Solute NAGGN und Trehalose synthetisierte. Der Anstieg des NAGGN-Gehalts von 3,43 mg/g TG auf 91,81 mg/g TG, ist trotz des Nachteils der relativ niedrigen Wachstumsrate eine extreme Steigerung.

Die plasmidkodierte, osmoregulierte, heterologe Expression der biosynthetischen Gene des kompatiblen Solut NAGGN in *E. coli* ist möglich. Durch Verwendung einer Trehalose defizienten Mutante (*E. coli* BKA-13) konnte die NAGGN-Synthese noch gesteigert werden.

6. *H. elongata* – heterologe NAGGN Expression

6.1. Codon-Usage-Analysen

Das kompatible Solut NAGGN wurde in dem Organismus *P. putida* und in dessen Subtyp KT2440 nachgewiesen (Abschn. III.2; Abb. 8). Die Aufreinigung des Soluts NAGGN aus dem Miroorganismus *P. putida* KT2440 wurde durch die simultane Expression anderer Solute wie Trehalose und Mannitol erschwert. Die größten Hindernisse in den Aufreinigungsverfahren verursachte das kompatible Solut Trehalose, weil es polar und dabei dennoch ungeladen ist wie NAGGN. Zudem weist Trehalose ein sehr ähnliches Molekulargewicht wie das Solut NAGGN auf. Aus diesen Gründen fiel die Wahl auf ein heterologes Expressionssystem, um die Aufreinigungsprozesse zu erleichtern.

Potentielle Kandidaten als Expressionsstamm waren einerseits *E. coli*, der bereits ein sehr etablierter Wirtsorganismus für heterologe Expression ist, und andererseits *H. elongata*, der den Vorteil aufweist ein salzangepasster Organismus zu sein und im Zuge dessen kompatible Solute in hohen Konzentrationen exprimiert. Die Anzuchtbedingungen zur Synthese von kompatiblen Soluten sind von beiden Organismen gleichermaßen gut untersucht. Das Gencluster der NAGGN-Biosynthese ist mit 4938 bp vergleichsweise groß, weshalb die Analyse des Codon-Gebrauchs wichtige Hinweise auf eine erfolgversprechende Expression lieferte. Das Genom von *E. coli* ist bereits aufgeklärt, wodurch die Bestimmungen des GC-Gehalts und der Codon-Usage-Analyse vereinfacht wurden. Der moderat halophile Organismus *H. elongata* ist in dieser Hinsicht noch nicht ausreichend untersucht worden. Die Analyse des GC-Gehalts und des Codon-Gebrauchs wurde mit einem phylogenetisch eng verwandten Organismus durchgeführt. Das Bakterium *Chromohalobacter salexigens* gehört ebenso wie *H. elongata* zu der Familie der Halomonadaceae. Dessen Genom ist bereits sequenziert, was die folgenden Untersuchungen ermöglichte.

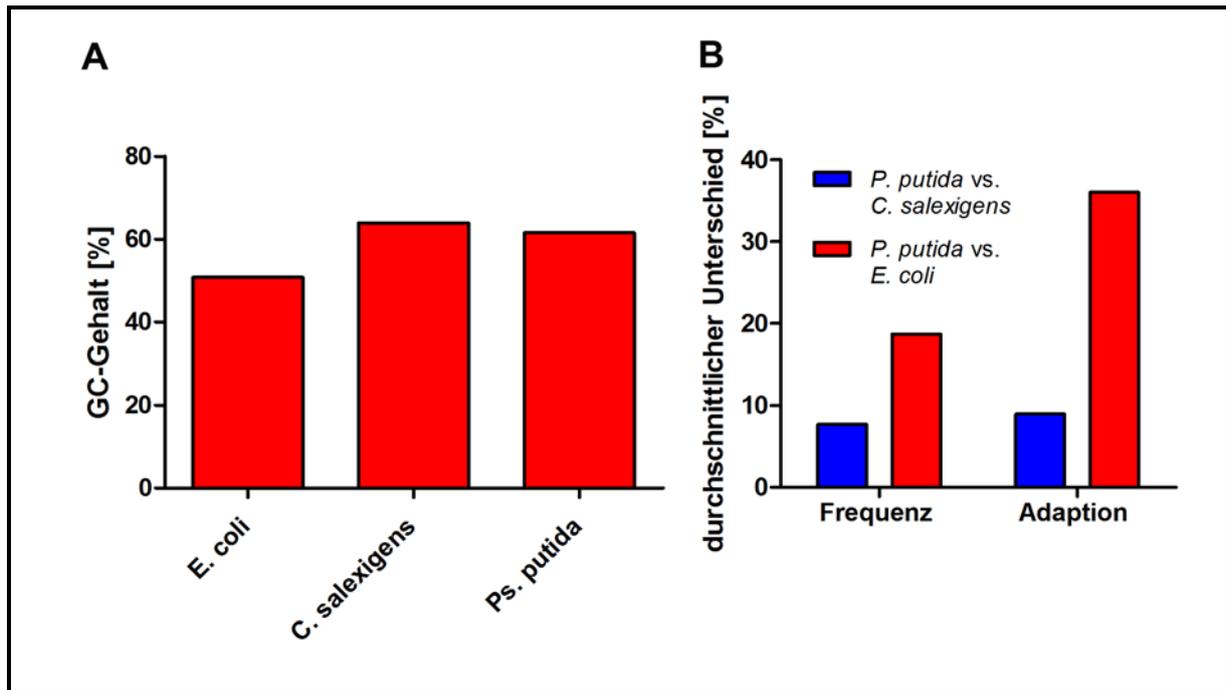


Abb. 27: (A) Bestimmung des GC-Gehalts und (B) der Codon-Usage der Organismen (*E. coli*, *C. salexigens* und *P. putida*) mittels des Tools Graphical Codon-Usage Analyzer (GCUA).

Unter Verwendung des Online Tools Graphical Codon-Usage Analyzer (GCUA) Version 2.0 wurde sowohl der GC-Gehalt als auch die Codon-Usage bestimmt. Das Tool GCUA Version 2.0 greift auf die Datenbank Kazusa (homepage: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>) zu, die wiederum mit der Datenbank NCBI-GenBank Flat File Release 160.0 [June 15 2007] verlinkt ist.

In Abb. 27 A ist zu erkennen, dass der GC-Gehalt von *Chromohalobacter salexigens* und *P. putida* mit 63,91 % bzw. 61,52 % zueinander vergleichsweise ähnlicher ist, als der GC-Gehalt von *E. coli* und *P. putida*. Der GC-Gehalt von *E. coli* beträgt nur 50,79 % und ist damit um ca. 10 % geringer als der von *P. putida* und *C. salexigens*. Das bedeutet, dass im Hinblick auf den GC-Gehalt *C. salexigens*, stellvertretend für *H. elongata*, als Expressionsstamm vorzuziehen ist.

Die Analyse der Codon-Usage ist ebenfalls eine wichtige bioinformatische Methode, um Aufschluss über die Eignung bestimmter Organismen für die heterologe Expression von Fremdgenen zu erhalten. Die durchschnittliche Häufigkeit (Frequenz) der verwendeten Codons ist in Abb. 27 B dargestellt. Die Häufigkeit des Codon-Gebrauchs der Organismen *P. putida* und *C. salexigens* bzw. *P. putida* und *E. coli* wurde miteinander verglichen und als durchschnittliche Frequenz (Häufigkeit in %) dargestellt. Es wird verdeutlicht, dass die

durchschnittliche Frequenz der verwendeten Codons von *P. putida* und *C. salexigens* mit 7,66 % im Vergleich zu *P. putida* und *E. coli* (18,66 %) geringer ist, was bedeutet, dass *P. putida* und *C. salexigens* eine größere Gemeinsamkeit in der Nutzung gleicher Codons aufweisen. Im Gegensatz zur Codon Usage Frequenz wird bei der Adaption die Anzahl der Codons, die für eine einzelne Aminosäure kodieren, mit einbezogen. Als Grundlage für die Berechnung der Adaption wurden diejenigen Codons mit der höchsten Frequenz für eine einzelne Aminosäure auf 100 % festgesetzt. In der Abb. 27 B ist ebenfalls der Vergleich zwischen *P. putida* und *C. salexigens* bzw. *P. putida* und *E. coli* dargestellt. Ein Vergleich der Adaption zeigt noch deutlicher, dass *P. putida* und *C. salexigens* (8,97 %) ähnlichere Codons als *P. putida* und *E. coli* (35,98 %) verwenden.

Das Bakterium *C. salexigens*, dessen Genomsequenz in diesem Fall stellvertretend für die des Organismus *H. elongata* für die bioinformatischen Untersuchungen eingesetzt wurde, ist, basierend auf den Erkenntnissen aus den GC-Gehalt Vergleichen und den Codon-Usage-Analysen, *E. coli* als Expressionsstamm vorzuziehen.

6.2. Genomische Integration des NAGGN-Genclusters in *H. elongata*

Der Organismus *H. elongata* wurde als heterologer Expressionsstamm für das kompatible Solut NAGGN ausgewählt. Durch den Austausch des wirtseigenen Genclusters, das ursächlich für die Synthese des kompatiblen Soluts Ectoin ist, gegen das Biosynthesegencluster für die Synthese des kompatiblen Soluts NAGGN, sollte ein heterologer Expressionsstamm etabliert werden, der einzig das Solut NAGGN produzierte (Abb. 28). Für die Umsetzung dieses Vorhabens wurde der Vektor pK18-naggn konstruiert, der das vollständige Biosynthesegencluster des kompatiblen Soluts NAGGN enthielt und unter der Kontrolle des salzinduzierbaren Promotors und des Regulators EctR aus *H. elongata* stand. Die Elemente Promotor und Regulator flankieren das NAGGN-Gencluster. Die stromaufwärts Region (Promotorregion) des Vektors pK18-naggn ist zu dem stromabwärts Bereich des genomischen Ectoin-Genclusters homolog. Desgleichen ist der stromabwärts gelegene Bereich (Regulatorregion) des Vektors pK18-naggn zu dem genomischen stromabwärts Bereich des Ectoin-Genclusters homolog. Mit diesen beiden Regionen ist durch homologe Rekombination ein Austausch des vektoriiellen NAGGN-Genclusters gegen das genomische Ectoin-Gencluster möglich (Abb. 28).

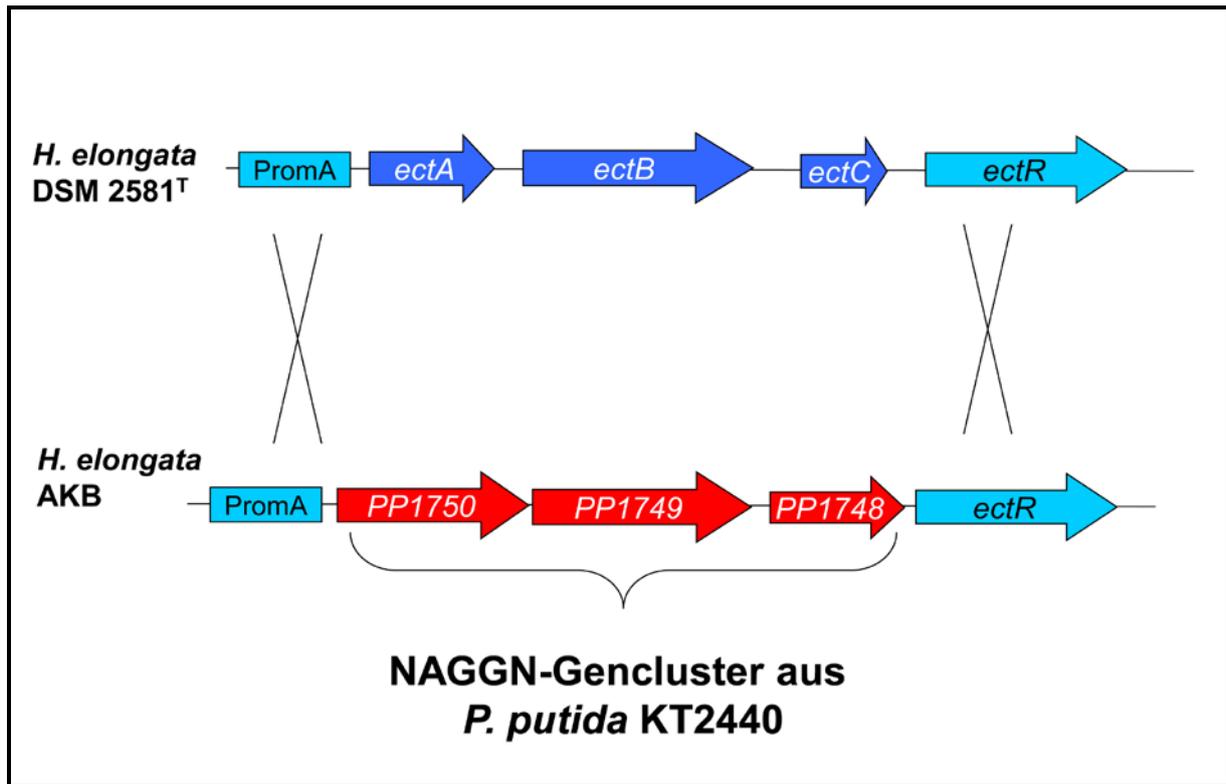


Abb. 28: Genetische Organisation der NAGGN-Region des Stammes *H. elongata* AKB und der Ectoin-Region des Stammes *H. elongata* DSM 2581^T. **PromA:** Promotor des Gens *ectA* aus *H. elongata* DSM 2581^T, **PP1750:** Gen für eine putative Asparaginsynthetase AsnB, **PP1749:** Gen für eine putative N-Acetyltransferase, **PP1748:** Gen für eine putative Peptidase, **ectR:** Gen für ein putatives Regulatorprotein, **ectA:** Gen für eine Diaminobuttersäure-Acetyltransferase, **ectB:** Gen für eine Diaminobuttersäure-Transaminase, **ectC:** Ectoin-Synthase

Der Vektor pK18-naggn wurde in den konjugationsfähigen Stamm *E. coli* S17.1 transformiert. Der Ausgangsvektor pK18*mobsacB* besitzt einen Replikationsursprung, der nur in *E. coli* das Plasmid vervielfältigt und in anderen Stämmen wie z. B. in *H. elongata* als *Suicide*-Plasmid wirkt. *Suicide*-Plasmide liegen in Stämmen, in denen der Replikationsursprung nicht funktionsfähig ist, in nur einer einzigen Kopie vor und werden somit nicht auf Tochterzellen weitergegeben. Plasmid kodierte Resistenzen bilden sich nur aus, wenn das Plasmid in das Genom integriert wurde, was durch auf dem Plasmid vorhandene homologe Bereiche ermöglicht werden kann. Auf dem Vektor pK18-naggn liegen zwei solcher homologer Bereiche vor, der Promotorbereich und der regulatorische Bereich des Ectoin-Biosyntheseweges aus *H. elongata*.

Das erste Rekombinationsereignis ist für eine Integration des vollständigen Vektors in das Genom des Organismus *H. elongata* ursächlich. Das Screening auf dieses erste

Rekombinationsereignis wurde durch die Selektion auf die vektorielle Antibiotikaresistenzkassette Kanamycin erreicht. Antibiotikaresistente Klone wurden auf saccharosehaltigen Selektionsplatten angezogen. Der Vektor pK18-naggn enthält ein Gen, *sacB* aus *B. subtilis*, das für eine Levansaccharase kodiert, die unter Verwendung des Substrats Saccharose Polymere ausbildet. Für *H. elongata* Zellen sind diese Polymere toxisch, weil sie den Primärstoffwechsel der Zellen zu stark beeinträchtigen. Klone, die auf saccharosehaltigen Agarplatten gewachsen waren, hatten entweder ihr Plasmid vollständig aus dem Genom entfernt oder nur das Vektorrückgrat exzidiert, so dass das NAGGN-Biosynthesegencluster im Genom verblieb. Durch Kolonie PCR wurde überprüft, ob die Zellen genotypisch als Wildtyp oder als Mutante mit integriertem NAGGN-Gencluster vorlagen.

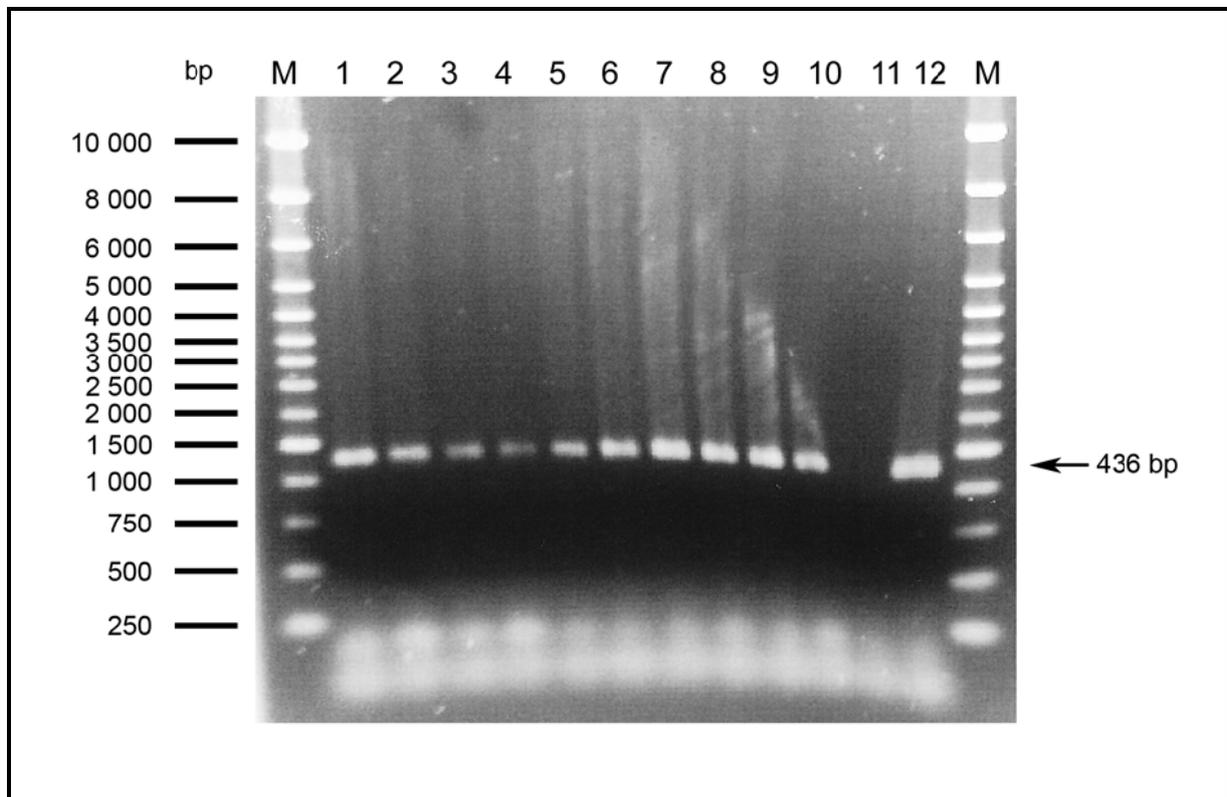


Abb. 29: Die Amplifikation des Gens *ectC* (436 bp) diente in dieser Kolonie-PCR zur Überprüfung, ob es sich nach dem Konjugationsschritt bei den Konjuganten um den Rezipientenstamm *H. elongata* oder um den Donorstamm *E. coli* S-17-1 handelt.

1-10: Konjuganten; 11: genom. DNA aus *E. coli* S17-1 (Negativkontrolle); 12: genom. DNA aus *H. elongata* (Positivkontrolle).

In einer ersten PCR-Reaktion (Abb. 29) wurde überprüft, ob es sich, nach dem Schritt der ersten homologen Rekombination, bei den kanamycinresistenten Klonen um den Organismus

H. elongata oder *E. coli* handelt. Das Gen *ectC*, das aus dem Ectoin-Biosynthesegencluster des Bakteriums *H. elongata* stammt, wurde für diesen Zweck amplifiziert. Es wurden in dieser PCR-Reaktion ganze Zellen (Verweis Kolonie-PCR) von *H. elongata* eingesetzt, die als Positivkontrolle (Abb. 29, Spur 12) dienten. Als Negativkontrolle fungierten *E. coli* Zellen (Abb. 29, Spur 11). In der Positivkontrolle (Abb. 29, Spur 12) ist eindeutig eine Bande zwischen 400 und 500 bp zu erkennen, die der Größe des Gens *ectC* mit 436 bp entspricht. Die Negativkontrolle (Abb. 29, Spur 11) zeigt wie erwartet keine Bande. In den Spuren 1 - 10 sind Amplifikate aus den Kolonie-PCR-Reaktionen mit Klonen, die im Zuge der Integration des NAGGN-Genclusters durch doppelt homologe Rekombination in den Organismus *H. elongata* entstanden, visualisiert. In allen Spuren ist eine Bande, die dem Gen *ectC* entspricht, auszumachen. Es handelt sich bei den Klonen 1 - 10 um *H. elongata* Zellen.

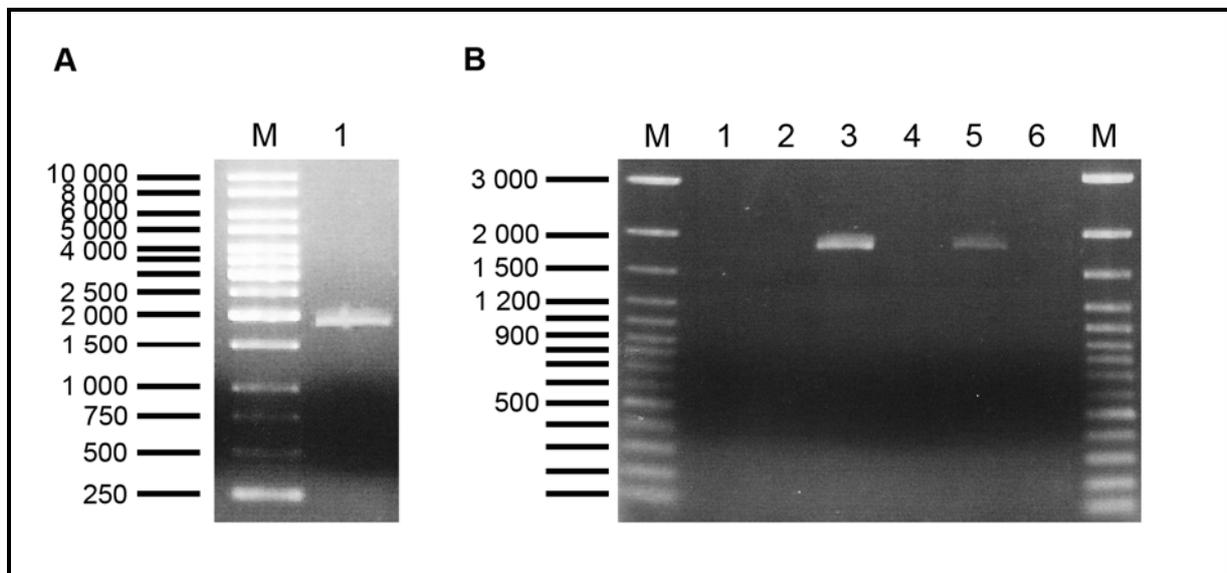


Abb. 30: Kolonie-PCRs zur Überprüfung der Integration des NAGGN-Genclusters in das Genom von *H. elongata*. (A) Amplifikation des Gens *PP1750* mit *P. putida* KT2440 Zellen als Template (Positivkontrolle) (B) Amplifikation des Gens *PP1750* mit *H. elongata* Zellen als Template, die potentiell das NAGGN-Gencluster inseriert tragen.

Nachdem festgestellt worden war, dass es sich bei den kanamycinresistenten Konjuganten wie erwartet um *H. elongata* Zellen handelte, wurden Kolonie-PCRs mit dem Ziel der Überprüfung einer erfolgreichen Insertion des NAGGN-Genclusters durchgeführt.

In Abb. 30 A ist ein PCR-Produkt zu erkennen, das mit den Primern generiert wurde, die das Gen *PP1750* des NAGGN-Biosynthesegenclusters flankieren. In dieser Kolonie-PCR, die nach der zweiten homologen Rekombination durchgeführt wurde, wurden *H. elongata* Zellen

eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt bei der *Pseudomonas putida* Zellen als Template dienten. In Abb. 30 A ist eine Bande mit der Größe 1800 bp zu erkennen, die der erwarteten Größe des Gens *PP1750* mit 1787 bp entspricht. In Abb. 30 B wurden 6 der 10 in Abb. 30 getesteten Klone auf ihren Genotyp bezüglich der zweiten homologen Rekombination, also der Integration des NAGGN-Genclusters in das Genom von *H. elongata* überprüft. Klon 3 und Klon 5 wiesen Banden der Größe 1800 bp auf. Das bedeutet, dass diese beiden Klone eines der Biosynthesegene aufweisen und somit vermutlich das vollständige Gencluster.

Eine genauere Untersuchung wurde durch die Amplifikation eines Fragments, bestehend aus dem partiellen Gen *PP1749* und dem vollständigen Gen *PP1748*, durchgeführt.

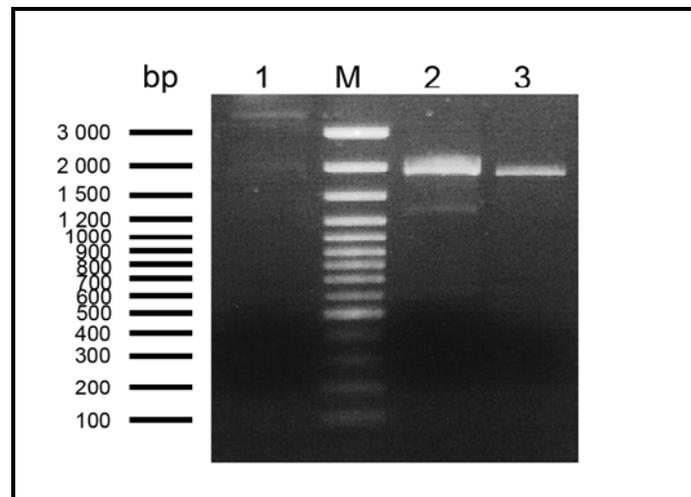


Abb. 31: Kolonie-PCR zur Vervielfältigung des DNA-Fragments bestehend aus dem partiellen Gen *PP1749* und dem vollständigen Gen *PP1748* zum Nachweis der genomischen Integration des NAGGN-Genclusters.

In Abb. 31 ist bei Einsatz von *H. elongata* wt Zellen keine Bande vorhanden (Spur 1). In Spur 2 und 3 dagegen erkennt man ein Amplifikat mit einer Größe von 1900 bp, das durch den Einsatz der Klone 3 und 5 aus Abb. 31 entstanden ist. Dieses PCR-Produkt entspricht der Größe des erwarteten Produkts mit 1913 bp. Das bedeutet, dass die Klone 3 und 5 mindestens die Hälfte des NAGGN-Genclusters inseriert tragen.

Zur genaueren Verifizierung wurde der Stamm, in den das NAGGN-Gencluster potentiell inseriert worden war, *H. elongata* AKB (Klon 3), angezogen und der Solutgehalt des Stammes wurde zudem genau überprüft.

6.3. Salzabhängige Expression des kompatiblen Soluts NAGGN

Der *H. elongata* Stamm, in den das NAGGN-Gencluster anstelle des Ectoin-Genclusters inseriert wurde, wurde *H. elongata* AKB genannt. Neben den molekularbiologischen Methoden zur Überprüfung der erfolgreichen genomischen Etablierung des NAGGN-Genclusters (Abschn. III.6.2) in das Genom von dem Organismus *H. elongata*, wurden zusätzlich analytische Methoden eingesetzt (HPLC-Analysen), um die Funktionalität des NAGGN-Genclusters in *H. elongata* nachzuweisen.

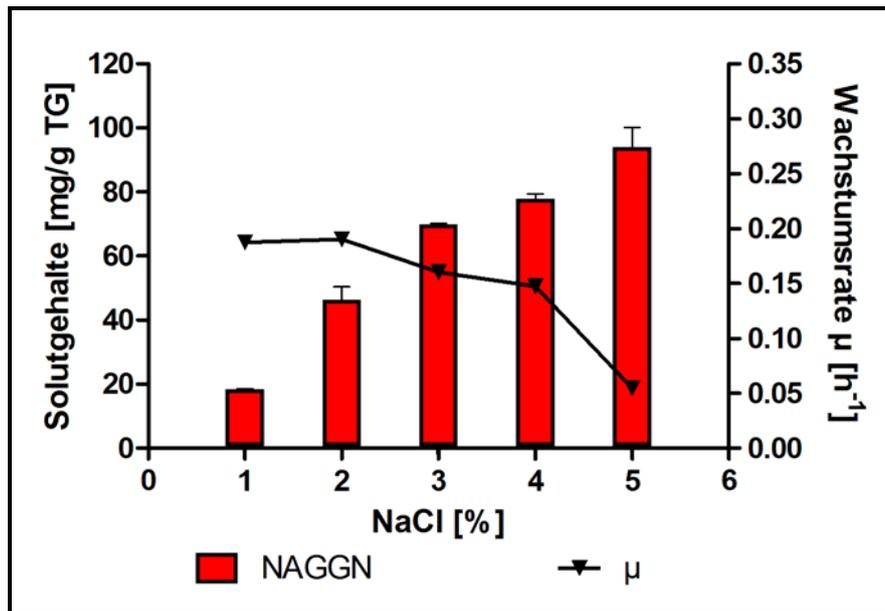


Abb. 32: HPLC-Analyse des gefriergetrockneten und extrahierten Zellmaterials des Stammes *H. elongata* AKB mit Medien-Salinitäten von 1-6 % und Auftragung der entsprechenden Wachstumsraten μ . Die dargestellten Mittelwerte resultieren aus Doppelbestimmungen.

Der Expressionsstamm für das kompatible Solut *H. elongata* AKB wurde in dem Mineralsalzmedium MM63 mit einem Salinitätsspektrum von 1-5 % NaCl angezogen. Die Kulturen wurden in der früh-stationären Phase geerntet und das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde extrahiert. Per HPLC-Analysen wurden die NAGGN-Gehalte in den Proben verifiziert.

Das kompatible Solut NAGGN konnte in dem Stamm *H. elongata* AKB detektiert werden. Das Salinitätsspektrum bei dem ein Bakterienwachstum aufzufinden war, reichte von 1 % bis 5 % NaCl. Die Synthese des kompatiblen Soluts NAGGN erfolgte bei den getesteten Salinitäten 1 %-5 % und stieg analog zu der Erhöhung des Mediensalzgehaltes an. Die Anzucht, die bei 1 % Salz im Medium durchgeführt wurde, zeigte schon eine NAGGN

Produktion von 18,49 mg/g TG. Mehr als der dreifache NAGGN-Gehalt, 69,81 mg/g TG wurde bei einer Anzucht des Stammes *H. elongata* AKB in 3 %igem Medium nachgewiesen. Die maximale Ausbeute konnte bei einer Mediumsaliinität von 5 % mit 94,04 mg/g TG verzeichnet werden (Abb. 32).

Die Wachstumsraten μ waren bei 1 % und 2 % NaCl mit $0,19 \text{ h}^{-1}$ am höchsten. Eine leichte Verringerung der Wachstumsrate konnte bei einer Anzucht des Stammes *H. elongata* AKB bei 3 und 4 % Mediensaliinität mit $0,16 \text{ h}^{-1}$ und $0,15 \text{ h}^{-1}$ beobachtet werden. Ein Salzgehalt von 5 % führte dagegen zu einem starken Wachstumseinbruch, das sich in der geringen Wachstumsrate von $0,06 \text{ h}^{-1}$ widerspiegelt (Abb. 32).

Die Anzucht des Stammes *H. elongata* AKB ist bei einer Salinität von 3 % und 4 % einerseits mit relativ hohen Ausbeuten des kompatiblen Soluts NAGGN verbunden und andererseits mit Wachstumsraten, die in einem gut handhabbaren Bereich liegen.

6.4. ^{13}C -NMR Spektroskopie des Stammes *H. elongata* AKB

Für eine zusätzliche Absicherung, dass der Stamm *H. elongata* AKB NAGGN und nicht eine andere Verbindung mit einer ähnlichen Retentionszeit (HPLC) akkumuliert, wurden ^{13}C -NMR spektroskopische Messungen durchgeführt.

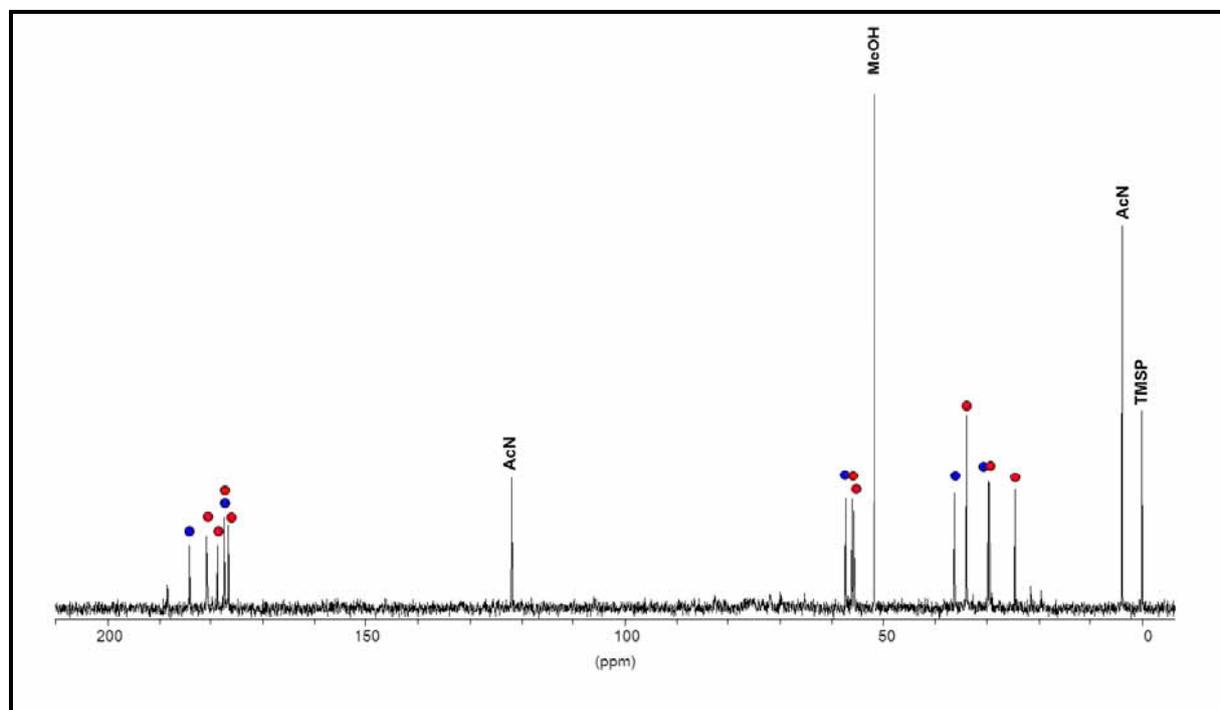


Abb. 33: ^{13}C -NMR spektroskopische Analyse des getrockneten und extrahierten Zellmaterials von *H. elongata* AKB. (●) NAGGN (●) Glutamat

Der Stamm *H. elongata* AKB wurde in dem Mineralsalzmedium MM63 mit einer Salinität von 3 % angezogen und in der stationären Phase geerntet. Das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde anschließend per ^{13}C -NMR Spektroskopie analysiert. Die aufgetretenen Signale bei 29,5, 30,24, 36,22, 59,333, 174,66 und 179,12 ppm weisen auf ein Vorhandensein der Aminosäure Glutamat hin. Das NMR-Spektrum spiegelt aber auch die Existenz des kompatiblen Solut NAGGN in dem Stamm *H. elongata* AKB wider (24,56, 29,74, 33,91, 55,73, 56,14, 176,57, 177,17, 178,61 und 180,68 ppm) (Abb. 33).

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt, dass die Aminosäure Glutamat und das kompatible Solut NAGGN in ähnlichen Mengen synthetisiert wurde.

Der Stamm *H. elongata* AKB trägt das vollständige NAGGN-Gencluster genomisch unter der Kontrolle des osmoregulierten Promotors der Ectoinbiosynthesegene, wobei die Ectoinbiosynthesegene gegen das NAGGN-Gencluster ausgetauscht wurden. Die NAGGN-Akkumulation wurde durch HPLC-Analysen und ^{13}C -NMR-Spektroskopie nachgewiesen.

7. *H. elongata* AKB - Produktion und Isolierung des kompatiblen Soluts NAGGN

Als Vorbereitung für die Anzucht des Stammes *H. elongata* AKB im großen Maßstab (15 L) wurden unterschiedliche Optimierungsversuche mit dem Ziel einer Erhöhung der intrazellulären NAGGN-Gehalte durchgeführt. Sowohl Salzschockexperimente (nicht gezeigt) als auch verschiedene Supplementierungsversuche (nicht gezeigt) mit den Aminosäuren Glutamin und Glutamat erbrachten keine verbesserten internen NAGGN-Gehalte. Auch der Einsatz verschiedener C-Quellen wie Glycerol, Fructose, Glutamat oder Glutamin erhöhten den NAGGN-Gehalt in den Zellen nicht. Eine Abschätzung der NAGGN- und Glutamatgehalte in den Zellen weist daraufhin, dass die Zellen bereits maximale Solutgehalte für die entsprechenden Salinitäten aufwiesen und somit auch keine Steigerung des Soluts NAGGN in den Zellen zu erwarten war. Das bedeutet, dass bereits optimale Rahmenbedingungen für eine Anzucht des Stammes *H. elongata* AKB vorhanden waren und eine Anzucht im großen Maßstab im Hinblick auf eine sich anschließende NAGGN-Isolierung durchgeführt werden konnte.

7.1. Fermentation des Stammes *H. elongata* AKB

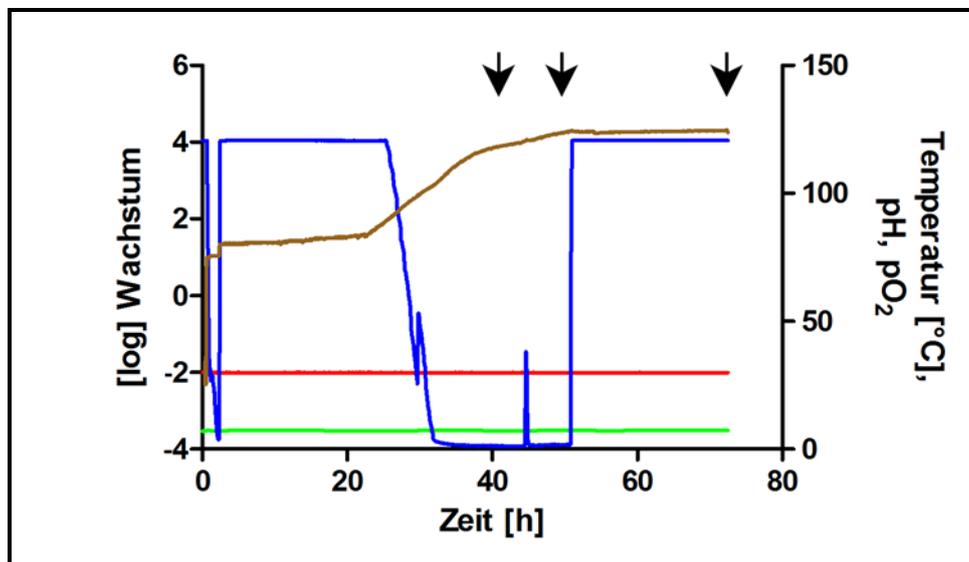


Abb. 34: Fermentation des Stammes *Halomonas elongata* AKB mit einem Arbeitsvolumen von 15 L unter Verwendung des Mineralsalzmediums GC. Aufgenommene Parameter: (—) Inkubationstemperatur [°C], (—) pH-Wert, (—) Sauerstoffpartialdruck pO_2 , (—) Trübung. (→) Entnahmezeitpunkte von Verlaufspröben.

Der heterologe Expressionsstamm für das kompatible Solut NAGGN *H. elongata* AKB wurde im 15 L Maßstab unter Verwendung des GC-Mediums (pH 7.0) bei einer Prozesstemperatur von 30 °C fermentiert. Die Justierung des pH-Wertes auf einen konstanten Wert im Bereich zwischen 6,8 und 7,2 wurde durch die Steuereinheit automatisch geregelt und erfolgte durch Titration von Base (1 M NaOH) bzw. Säure (1 M HCl).

Die ersten 21,5 h befindet sich der Organismus in der lag-Phase des Wachstumsverlaufs. Nach 21,5 h ist die exponentielle Wachstumsphase zu erkennen, das durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch verdeutlicht wurde (Abb. 34). Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 wurde zum Zeitpunkt 29,73 h durch eine stärkere Öffnung des Sauerstoffventils und damit einer erhöhten Luftzufuhr, kurzzeitig wieder leicht erhöht. Nach 44,62 h stieg der Sauerstoffpartialdruck wieder an, weshalb eine kontinuierliche Zuführung einer Fed-Batch Lösung (Abschn. II.2.2) durchgeführt wurde. Dies führte zu einem erneuten exponentiellen Wachstum der Kultur bis zu dem Zeitpunkt ca. 50 h (Abb. 34). Hier erfolgte der Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, die mit der Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks korrelierte. Nach 72,5 h wurde die Kultur geerntet.

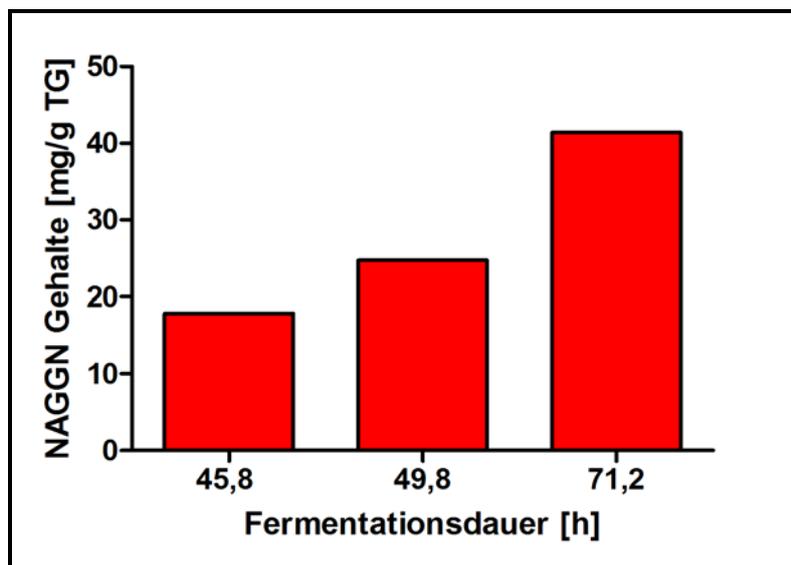


Abb. 35: HPLC-Analysen der Verlaufsprouben, die während der Fermentation des Stammes *H. elongata* AKB entnommen wurden.

Die NAGGN-Gehalte stiegen während des Fermentationsverlaufs des Stammes *H. elongata* AKB an. Nach 45,8 h im Bereich der exponentiellen Wachstumsphase wurde ein NAGGN-Gehalt von 17,86 mg/g TG berechnet. Bei dem Eintritt des Stammes *H. elongata* AKB in die stationäre Phase nach 49,8 h wurde eine leichte Erhöhung des NAGGN-Gehalts auf

24,74 mg/g TG dokumentiert. Im Verlauf der stationären Phase bis zum Erntezeitpunkt (71,2 h) steigerte sich der NAGGN-Gehalt auf 41,41 mg/g TG (Abb. 35).

7.2. Zweischnitt-Aufreinigung des kompatiblen Soluts NAGGN

Mit der Anzucht in einem 15 L Maßstab konnte ausreichend Zellmaterial des Stammes *H. elongata* AKB gewonnen werden, um daraus das Solut NAGGN zu isolieren.

7.2.1. Anionenaustauschchromatographie

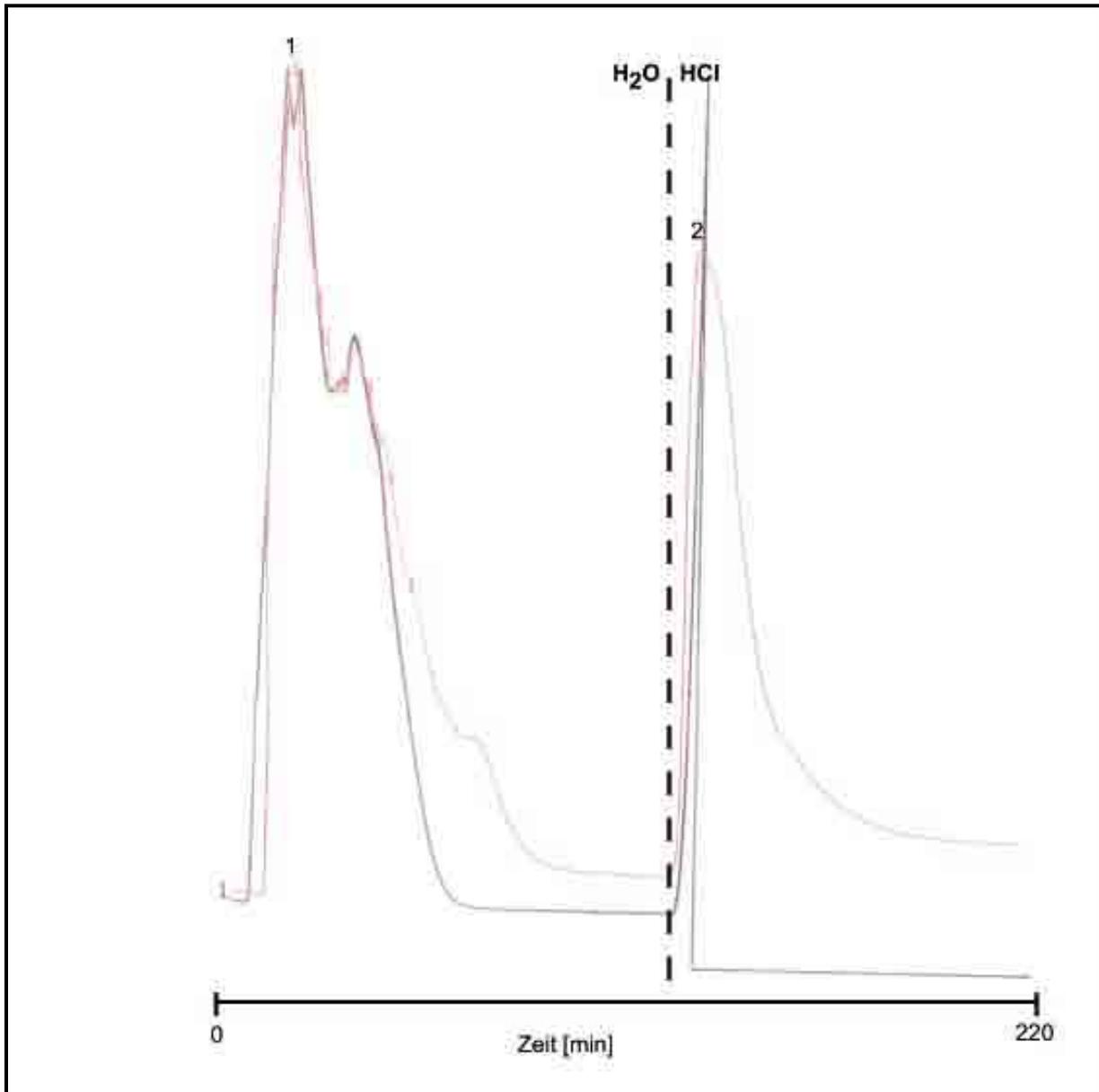


Abb. 36: Anionenaustauschchromatographie (Säule Dowex 1x8 Cl⁻ Form) mit dem extrahierten Zellmaterial des Stammes *H. elongata* AKB. LF-Signale (schwarz) 1: NAGGN; UV-Signale (rot): 1: NAGGN, 2: vermutlich Glutamat

Die Anionenaustauschchromatographie wurde als ein erster Schritt zur Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN eingesetzt, das zusammen mit anderen wasserlöslichen Komponenten zuvor aus dem gefriergetrockneten Zellmaterial extrahiert wurde. Bauartbedingt stellt der Schreiber Signale größer als die Papierbreite negativ („gespiegelt“) dar.

In der Anionenaustauschchromatographie sind zwei dominante Signale zu erkennen. Das Signal 1, das nach ungefähr 20 min auftrat, zeigte durch HPLC-Analysen, dass die Fraktionen, die mit dem Signal 1 korrelierten das kompatible Solut NAGGN enthielten (Abb. 36). Nach ca. 110 min wurde das Laufmittel von $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ auf 1 M HCl umgestellt, um das Säulenmaterial zu regenerieren. Mit diesem Laufmittel ist es möglich Substanzen, die an die funktionalen Gruppen des Säulenmaterials binden, zu eluieren. Es trat ein prominentes UV-Signal auf (Abb. 36, Signal 2) und die Leitfähigkeit stieg aufgrund des Laufmittels HCl erwartungsgemäß an. Das Signal 2 (Abb. 36) konnte wegen der hohen HCl Konzentration nicht weiter analysiert werden. Vermutlich handelt sich hierbei um die Aminosäure Glutamat, die als zweite Hauptkomponente neben dem kompatiblen Solut NAGGN in dem Zellmaterial des Produktionsstammes *H. elongata* AKB auftrat (Abschn. III.6.4).

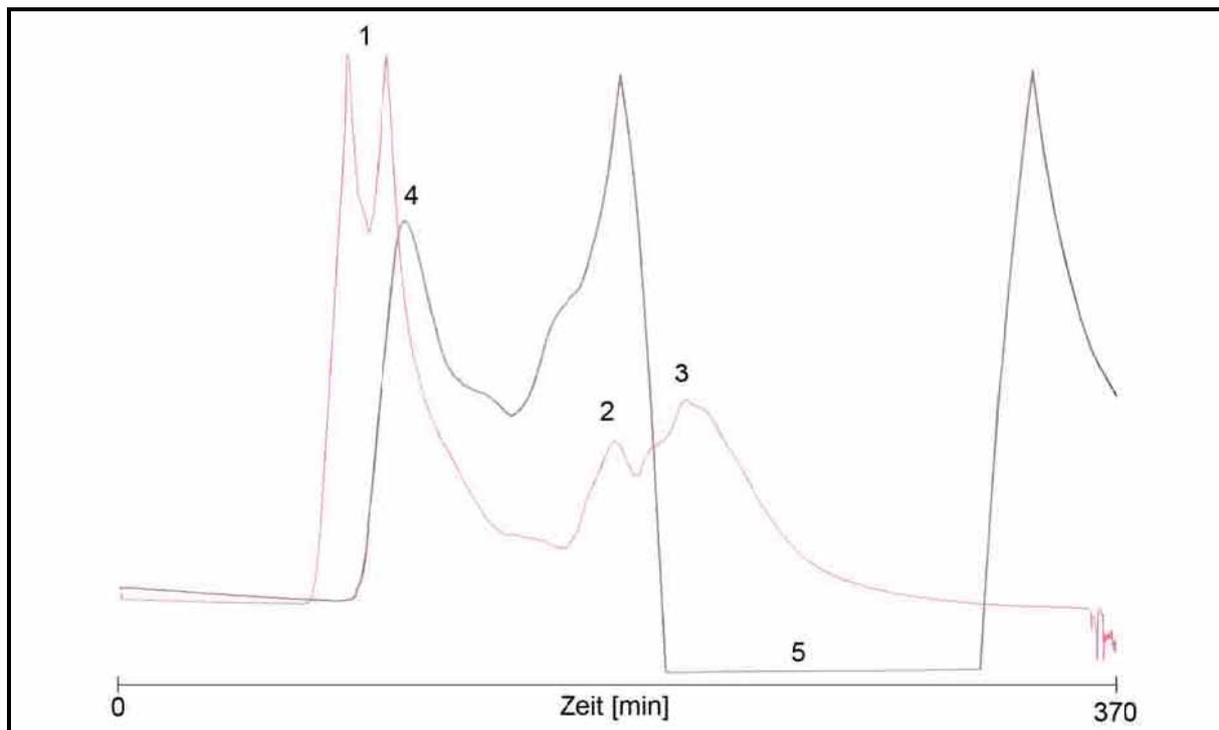
7.2.2. Ionenverzögerungschromatographie

Abb. 37: Ionenverzögerungschromatographie (Säule AG11A8-Biorad). UV-Signale (rot): 1-NAGGN, geringe Menge Glutamin & Glutamat; 2-Glutamin, 3-Glutamat; LF-Signale (schwarz): 4-NAGGN, geringe Menge Glutamin & Glutamat; 5-Salz (hauptsächlich NaCl)

Die Ionenverzögerungschromatographie wurde mit den fusionierten, NAGGN enthaltenden Fraktionen, aus der Anionenaustauschchromatographie durchgeführt.

Bei diesem Aufreinigungsverfahren wurden mehrere Signale über die UV-Detektion und auch über die Leitfähigkeitsdetektion visualisiert. Bauartbedingt stellt der Schreiber Signale größer als die Papierbreite negativ („gespiegelt“) dar. Die Fraktionen, die dem Signal 1 im UV-Bereich entsprechen, wurden über die isokratische HPLC analysiert. Es zeigte sich, dass zu einem überwiegenden Anteil NAGGN von der Säule eluierte. Die Signale 2 und 3 entsprachen keinen Substanzen, die durch die Methode der isokratischen HPLC-Analyse detektiert werden konnten (Abb. 37). Durch eine Aminosäurenanalyse, die über eine Gradienten HPLC mit einer Vorsäulenderivatisierung durch das Reagenz FMOC vorgenommen wurde, konnten hauptsächlich die Aminosäuren Glutamin und Glutamat nachgewiesen werden. Das Signal 2 wurde hauptsächlich durch die Aminosäure Glutamin verursacht und in den Fraktionen, die dem Signal 3 entsprachen wurde zu einem überwiegenden Anteil Glutamat aufgefunden (Abb. 37). Das Signal 1 wurde nicht nur durch das kompatible Solut NAGGN verursacht, sondern auch zu einem vergleichsweise geringeren

Anteil Glutamin und Glutamat (Abb. 37). Das Leitfähigkeitssignal Signal 5 wurde durch Salz (NaCl) verursacht (Abb. 37).

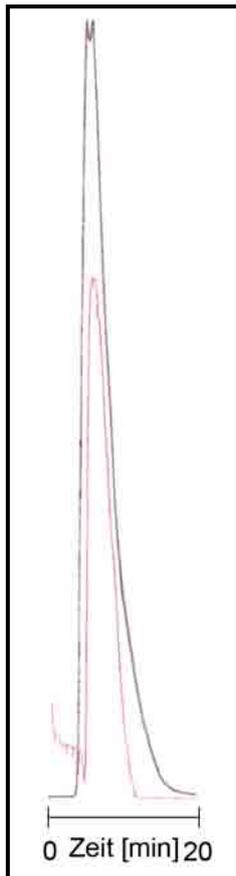
Mit dieser Aufreinigungsmethode war es möglich Salz von dem kompatiblen Solut NAGGN zu trennen, aber es waren noch Anteile von Glutamin und Glutamat in den NAGGN enthaltenden Fraktionen aufzufinden. Durch die vorgeschaltete Anionenaustauschchromatographie wurde das Glutamat nicht vollständig abgetrennt. Die Aminosäuren Glutamin und Glutamat wurden durch die Ionenverzögerungschromatographie nicht ausreichend voneinander separiert, so dass sich auch über diese chromatographische Methode das NAGGN nicht vollständig rein isolieren lässt.

7.3. Einschritt-Aufreinigung des kompatiblen Soluts NAGGN

Das Zweischritt-Verfahren, das zunächst zur Aufreinigung des NAGGNs verwendet worden ist beinhaltet als ersten Schritt eine Anionenaustauschchromatographie, um negativ geladene Substanzen, in diesem Fall hauptsächlich Glutamat, aus dem Zellmaterial zu entfernen. Der folgende Schritt bestand aus einer Ionenverzögerungschromatographie durch die die Entfernung des Salzes aus dem Zellmaterial ermöglicht werden sollte. Die NAGGN-Isolierung, die mit Hilfe des Zweischritt-Verfahrens durchgeführt wurde, führte nicht zu einer reinen Verbindung NAGGN. Deshalb wurde ein weiteres Verfahren entwickelt. Es wurde ein Säulenmaterial verwendet, dass auch für Vollentsalzungen verwendet wird.

7.3.1. Mischbetttaucher respektive Vollentsalzer

Die Aufreinigung des kompatiblen Soluts NAGGN erfolgte zunächst durch Bligh und Dyer Extraktion des gefriergetrockneten Zellmaterials des Stammes *H. elongata* AKB. Die wässrige Fraktion wurde, nach Entfernung des enthaltenen Methanols, für die NAGGN-Aufreinigung mittels Mischbetttaucher (Serdolit MB, Serva) eingesetzt. Das Säulenmaterial bzw. dessen funktionale Gruppen ermöglichen eine Entfernung geladener Substanzen. In diesem Fall sind Salz (NaCl) und die Aminosäure Glutamat die Komponenten, die die größten Verunreinigungen darstellen. Mit Hilfe des Mischbetttauchers oder Totalentsalzlers war es möglich, das NAGGN von den verunreinigenden Komponenten zu trennen. Das Salz und auch das Glutamat binden irreversible an den Mischbetttaucher. Bauartbedingt stellt der Schreiber Signale größer als die Papierbreite negativ („gespiegelt“) dar. Das kompatible Solut eluierte (Abb. 38) in einer Fraktion von der Säule. Dies ist anhand des einzelnen sichtbaren UV-Signals (rot) und des einzelnen Leitfähigkeitssignals (schwarz) in Abb. 38 zu erkennen. Das NAGGN wurde anschließend gefriergetrocknet. Zur Überprüfung der Reinheit wurde das



aufgereinigte NAGGN durch Gradienten-HPLC mit Vorsäulenderivatisierung auf den verbliebenen Glutamat-Gehalt überprüft, aber es wurde kein Glutamat nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das getrocknete NAGGN war jetzt für weitere Versuche einsetzbar.

**Abb. 38: Mischbetttauscher (Serdolit MB – Serva)
LF-Signal (schwarz); UV-Signal (rot)**

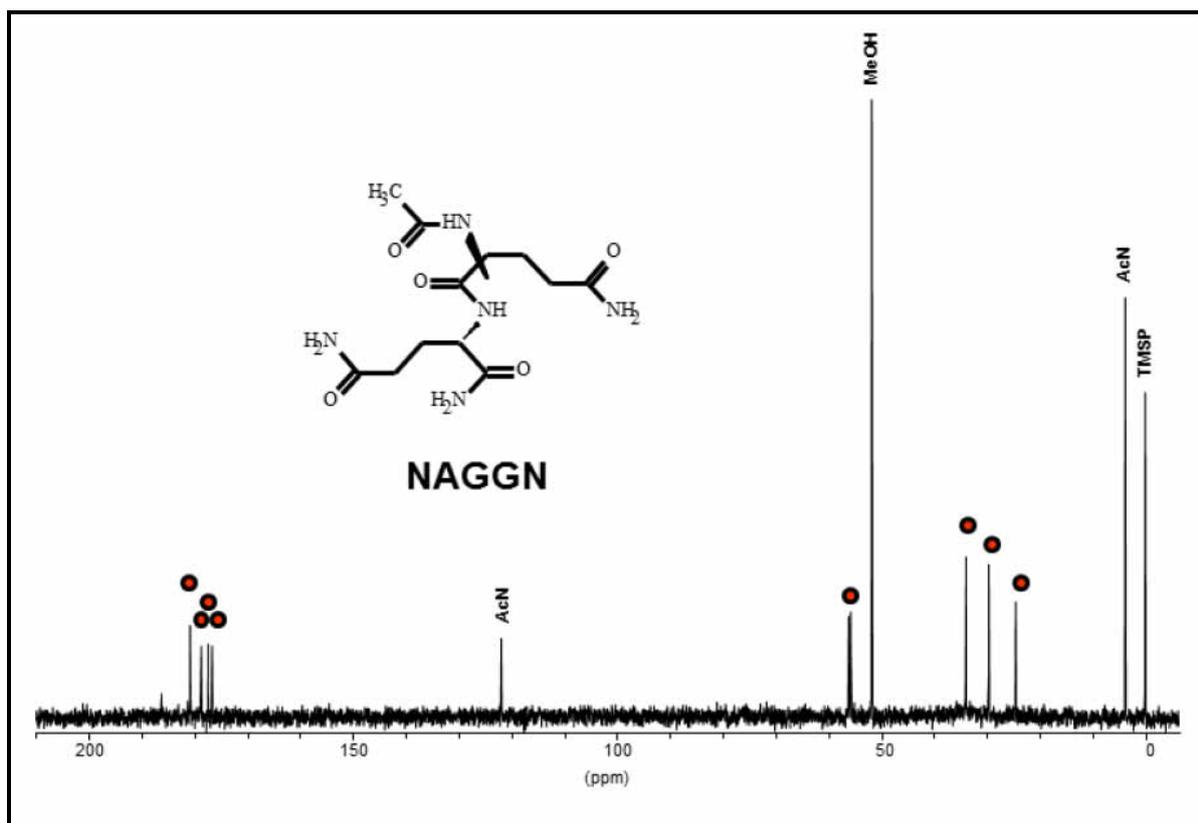
7.3.2. ^{13}C -NMR-Spektroskopie des aufgereinigten NAGGN

Abb. 39: ^{13}C -NMR-Spektrum des kompatiblen Soluts NAGGN. (●) NAGGN; MeOH – Methanol; AcN – Acetonitril; TMSP - Trimethylsilylpropionat

Das kompatible Solut NAGGN wurde nach dem Einschritt-Aufreinigungsverfahren über ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert. Aufgrund der vorhandenen Signale bei 24,55, 29,63, 33,98, 55,78, 56,20, 176,66, 177,40, 178,72 und 180,81 ppm, die mit der osmolytisch wirksamen Substanz NAGGN korrelieren, konnte gezeigt werden, dass das NAGGN in einer sehr reinen Form vorliegt. Dieser hohe Reinheitsgrad wurde durch die völlige Abwesenheit anderer Signale untermauert. Es sind lediglich Referenzsignale der Verbindungen Methanol und Acetonitril vorhanden (Abb. 39).

7.4. NAGGN-Gehalte in den Zellen und im Medium *H. elongata* AKB vs. *P. putida* KT2440

In den vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, dass eine NAGGN-Isolierung aus dem Zellmaterial des Stammes *H. elongata* AKB in einer reinen Form möglich war. Für weitere Produktionsverfahren ist es von großem Interesse, ob der Stamm *H. elongata* AKB ein Ausscheider ist, der das kompatible Solut NAGGN ins Medium abgibt. Daraus würden sich Möglichkeiten für weitere NAGGN-Isolierungsverfahren eröffnen.

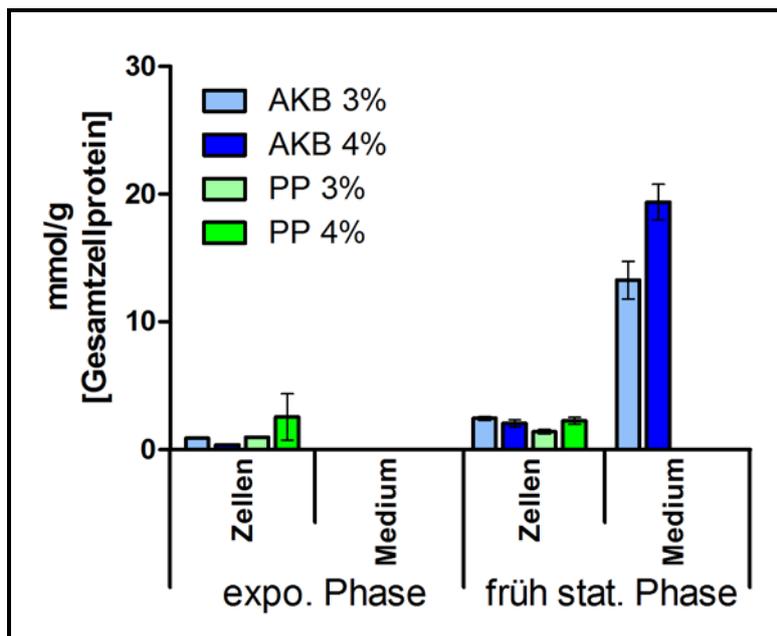


Abb. 40: HPLC-Analyse zur Bestimmung der NAGGN-Gehalte in den Zellen und im Medium der Stämme *P. putida* KT2440 (PP) und *H. elongata* AKB (AKB), die in MM63-Medium mit 3 % bzw. 4 % NaCl Zusatz angezogen wurden.

Der Stamm *P. putida* KT2440 der das kompatible Solut NAGGN natürlicherweise synthetisiert und der heterologe Expressionsstamm *H. elongata* AKB wurden in dem Mineralsalzmedium MM63 mit den Salzgehalten von 3 und 4 % angezogen. Die NAGGN-Gehalte der Organismen in den Zellen und im Medium wurden durch HPLC-Analysen bestimmt und auf das Gesamtprotein der Zellen bezogen.

In der exponentiellen Wachstumsphase wurde das kompatible Solut NAGGN in den Zellen akkumuliert. Es lag in beiden Stämmen in einer Konzentration zwischen 0,37 und 2,59 mmol/g Gesamtzellprotein vor. Im Medium dagegen wurde in der exponentiellen Phase kein NAGGN detektiert (Abb. 40).

In der früh-stationären Wachstumsphase verhielt es sich anders. Auch hier wurde in den Zellen ein Gehalt des kompatiblen Solut NAGGN zwischen 0,14 und 2,48 mmol/g Gesamtzellprotein nachgewiesen. Im Medium trat ein gravierender Unterschied auf. In den Proben des heterologen Expressionsstammes *H. elongata* AKB konnte das kompatible Solut NAGGN bestimmt werden. Die Konzentrationen im Medium zeigten mit 13,27 und 19,39 mmol/g [Gesamtzellprotein] einen deutlich erhöhten NAGGN-Gehalt im Vergleich zu den NAGGN-Gehalten in den Zellen (Abb. 40). In dem Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 dagegen wurde das Solut NAGGN nur in den Zellen detektiert. Das bedeutet, dass das, im Medium befindliche, NAGGN des Produktionsstammes *H. elongata* AKB ebenfalls in ausreichend hohen Mengen vorliegt, um es direkt aus dem Medium aufzureinigen.

7.5. Spezifische Produktivität der NAGGN-Produzenten

Die Bestimmung der spezifischen Produktivitäten für die NAGGN akkumulierenden Stämme diente der Feststellung des besten NAGGN-Produzenten. Der gebildete NAGGN-Gehalt (mg) wurde auf ein bestimmtes Zelltrockengewicht (g TG) und eine definierte Zeit (h) bezogen.

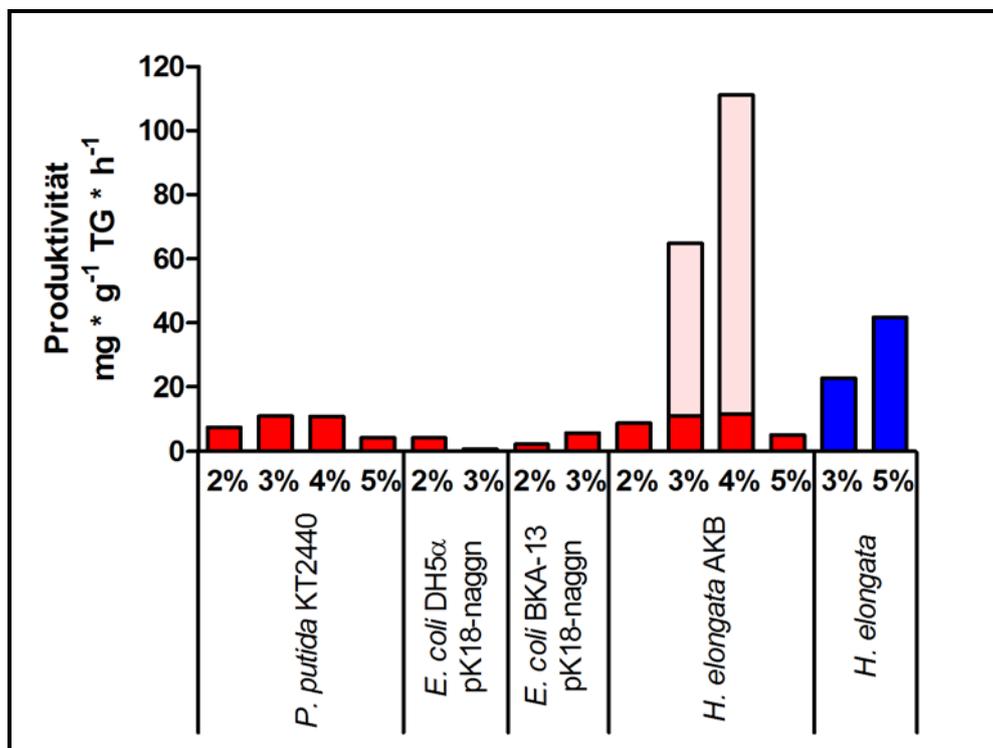


Abb. 41: Die Produktivitäten der NAGGN produzierenden Stämme bei unterschiedlichen Salinitäten (NaCl [%]) sind gezeigt (■). Die Produktivität von *H. elongata* dient als Referenz. Der Stamm *H. elongata* akkumuliert das kompatible Solut Ectoin (■). Der Stamm *H. elongata* AKB entlässt das kompatible Solut NAGGN in das Medium und die daraus berechneten Produktivitäten sind zusätzlich aufgezeigt (□).

Der Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 synthetisiert das kompatible Solut NAGGN als natürliches kompatibles Solut. Die minimale Produktivität des *Pseudomonas* Stamms ist $4,40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei einer Salinität von 5 % und die maximale Produktivität beläuft sich auf $11,08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei einer Salinität von 3 % (Abb. 41).

Zwei unterschiedliche *E. coli* Stämme wurden hinsichtlich ihres NAGGN-Gehalts untersucht, der durch die heterologe Expression der NAGGN-Biosynthesegene, kodiert durch das Plasmid pK18-naggn, hervorgerufen wurde. Der Stamm *E. coli* DH5 α besitzt eine maximale Produktivität von $4,21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 2 % NaCl. Der Trehalose defiziente Stamm *E. coli* BKA-13 erreichte seine maximale Produktivität bei einer Salinität von 2 %. Obwohl der interne Gehalt des kompatiblen Soluts NAGGN durch die Verwendung des Trehalose defizienten Stammes BKA-13 gesteigert werden konnte, waren die Wachstumsraten verringert. Dadurch resultieren die ähnlichen Produktivitäten, $5,72 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ des Stammes *E. coli* BKA-13 verglichen mit dem Stamm *E. coli* DH5 α mit einer Produktivität von $4,21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ (Abb. 41).

H. elongata akkumuliert sein natürliches kompatibles Solut Ectoin. Die Produktivitätswerte sind $22,8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 3 % NaCl und $41,72 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 5 % NaCl (basiert auf Dötsch *et al.*, 2008).

Der Stamm *H. elongata* AKB, ein heterologer Expressionstamm der NAGGN-Biosynthesegene genomisch kodiert, erreicht Produktivitäten bis zu $11,67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei einer Medium Salinität von 4 %. Der *Pseudomonas putida* Stamm KT2440 zeigt auch solche Produktivitäten. Bei einer Salinität von 3 % sind diese Produktivitäten des Stammes *H. elongata* AKB mit $11,17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ nur leicht reduziert. Im Gegensatz zu *P. putida* KT2440 ist der heterologe Expressionsstamm *H. elongata* AKB befähigt große Menge des kompatiblen Soluts NAGGN ins Medium zu entlassen. Der Medium Gehalt des kompatiblen Soluts NAGGN wurde ebenfalls bestimmt und resultiert in Produktivitätswerten von $53,67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 3 % NaCl und $99,48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 4 % (Abb. 41). Die kombinierten Produktivitäten die durch den NAGGN Gehalt des Mediums und der Zellen erzielt wurden sind $64,84 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei einer Medium Salinität von 3 % und $111,18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei einer Salinität von 4 %. Das bedeutet, dass der Stamm *H. elongata* AKB insgesamt eine höhere NAGGN Produktivität aufweist und damit ein besserer NAGGN-Produzent ist, als der *H. elongata* wt Stamm für sein natürliches kompatibles Solut Ectoin.

Das kompatible Solut NAGGN, das in dem Stamm *H. elongata* AKB exprimiert wurde, konnte durch die entwickelten Aufreinigungsverfahren erfolgreich isoliert werden und im Folgenden für weitere Charakterisierungsversuche eingesetzt werden.

8. Charakterisierung des kompatiblen Soluts NAGGN

Die Akkumulation des kompatiblen Soluts NAGGN wurde zwar bereits beschrieben (Smith & Smith, 1989; Kets *et al.*, 1996), aber bislang wurde das Solut NAGGN noch nicht isoliert. Mit der Etablierung des Produktionsstammes *H. elongata* AKB (Abschn. III.6) und der entwickelten Aufreinigungsstrategie (Abschn. III.7) wurde dies erstmals möglich. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurde aufgereinigtes, nicht kristallines NAGGN verwendet.

8.1. Solut Supplementierung des Stammes *H. elongata* WUB02 im Mikrotiterplattenmaßstab

Zunächst wurde untersucht welchen Effekt die Supplementierung des NAGGNs im Vergleich zu anderen kompatiblen Soluten auf die Wachstumsrate des Stammes *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$) (Witt, unveröffentlicht) hat. Der Stamm *H. elongata* WUB02 wurde verwendet, weil die Biosynthese des Ectoins und dessen Vorstufen durch die Deletion der Gene $\Delta ectA$, $\Delta ectC$ beeinträchtigt ist. Das bedeutet, dass der Stamm *H. elongata* WUB02 kompatible Solute aufnehmen muss, um bei höheren Salinitäten zum Wachstum befähigt zu sein.

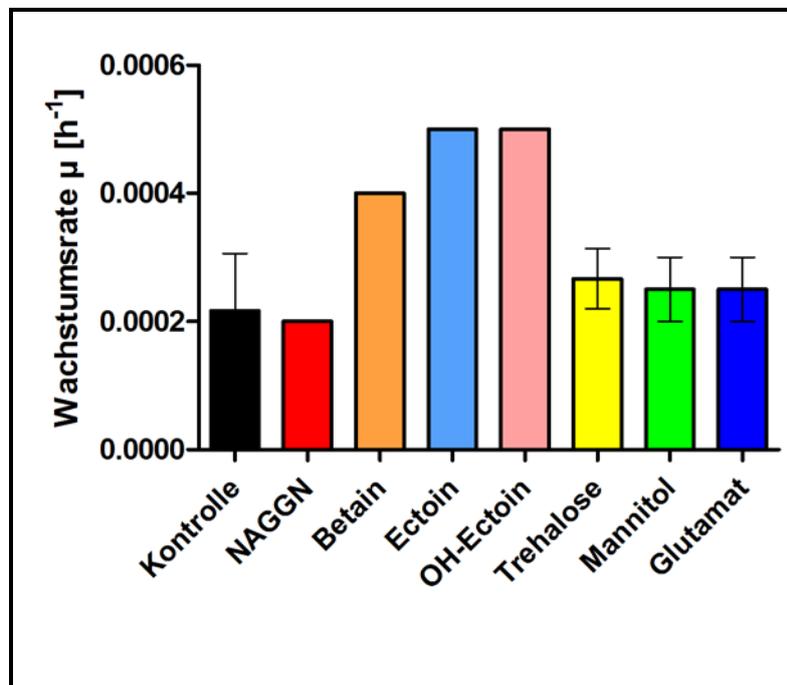


Abb. 42: Anzucht der *H. elongata* Mutante WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$) im Mikrotiterplattenmaßstab mit Zusatz verschiedener kompatibler Solute mit einer Konzentration von 2 mM.

Die Anzucht des Mikroorganismus *H. elongata* WUB02 ($\Delta lectA$, $\Delta lectC$) erfolgte als Vorkultur in dem Mineralsalzmedium MM63-1. Die Kultivierung in der Mikrotiterplatte wurde in MM63-4 Medium bei 30 °C durchgeführt und mit 2 mM Solut supplementiert.

In der Abb. 42 ist zu erkennen, dass die Kulturen, die mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin supplementiert, angezogen wurden mit 0,0005 und 0,0005 die höchsten Wachstumsraten erreichten. Die Kulturen, die mit Betain supplementiert wurden, erzielten eine Wachstumsrate von 0,004. Die Supplementierungen durch Trehalose, Mannitol, Glutamat führten zu ähnlichen Wachstumsraten, 0,00026, 0,00025 und 0,00025. Die Supplementierung mit NAGGN führte mit 0,0002 zu einer ähnlichen Wachstumsrate wie die un-supplementierte Kontrollkultur mit 0,00022 (Abb. 42). Die Wachstumsraten bei der Anzucht in einem Mikrotiterplattenmaßstab liegen insgesamt deutlich niedriger, als bei der Anzucht in 100 mL Kolben. Aus diesem Versuch geht hervor, dass die Supplementierung mit NAGGN keinen Wachstumsratenanstieg für den Stamm *H. elongata* WUB02 bewirkt.

8.2. Aufnahmeversuch des kompatiblen Soluts NAGGN durch *E. coli* DH5 α

Der Supplementierungsversuch des Stammes *H. elongata* WUB02 mit NAGGN und anderen kompatiblen Solute zeigte, dass NAGGN kein verbessertes Wachstum dieses Stammes bei erhöhter Salinität hervorgerufen wurde (Abschn. III.8.1). Ungeklärt blieb, ob die fehlende Steigerung der Wachstumsrate ein *H. elongata* spezifischer Effekt war oder ob andere Organismen wie beispielsweise *E. coli* ebenfalls keine gesteigerte Osmotoleranz durch NAGGN erhalten.

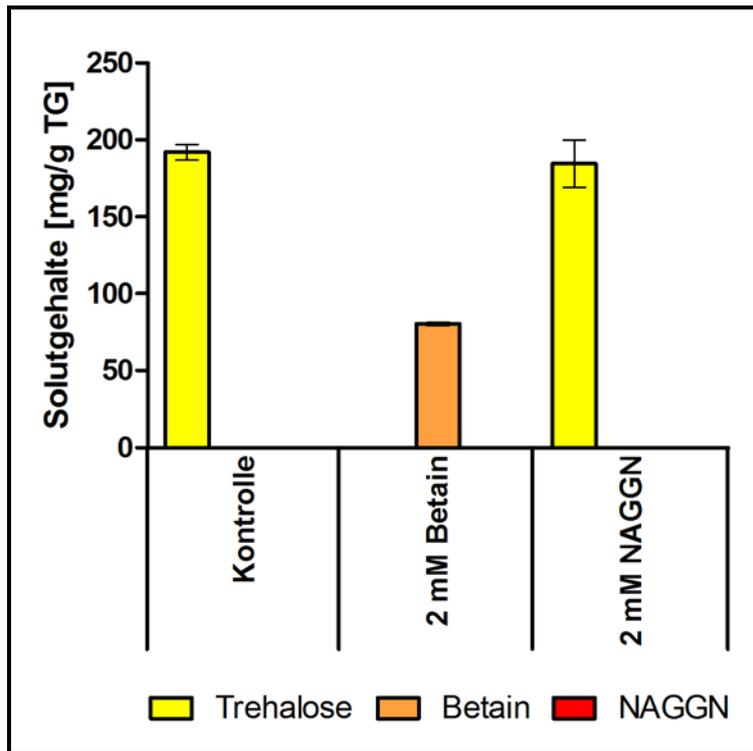


Abb. 43: HPLC-Analyse der intrazellulären Solutgehalte des Stammes *E. coli* DH5 α bei einer Anzucht im Medium mit 3 % NaCl. In den Versuchsansätzen wurde eine Supplementierung mit 2 mM Betain bzw. 2 mM NAGGN durchgeführt. Als Kontrolle diente eine unsupplementierte Kultur.

Der Stamm *E. coli* DH5 α wurde in dem Mineralsalzmedium MM63-3 angezogen und mit den Soluten Betain und NAGGN in einer Konzentration von je 2 mM supplementiert. Die Zellen wurden geerntet und das gefriergetrocknete Material wurde extrahiert. Der Solutgehalt der Proben wurde via HPLC-Analysen bestimmt.

Der *E. coli* DH5 α Stamm, der nicht supplementiert wurde, enthielt einen Trehalose-Gehalt von 191,91 mg/g TG (Abb. 43). In den Proben, die aus dem Versuch stammen, in dem mit 2 mM Betain supplementiert wurde, konnte ein Betain-Gehalt in den Zellen von 80,23 mg/g TG nachgewiesen werden (Abb. 43). Die Trehalose-Synthese wurde hier vollständig durch die Betain Supplementierung bzw. die Betain Aufnahme der Zellen kompensiert. Die Supplementierung des Stammes *E. coli* DH5 α mit dem kompatiblen Solut NAGGN führt zu einem ähnlichen internen Trehalose-Gehalt verglichen mit der unsupplementierten Kontrolle, nämlich 184,4 mg/g TG. Das Solut NAGGN konnte nicht in den *E. coli* DH5 α Zellen nachgewiesen werden.

8.3. Trockenstabilisierung ganzer Zellen durch das kompatible Solut NAGGN

Die Supplementierungsversuche von *H. elongata* (Abschn. III.8.1) und *E. coli* (Abschn. III.8.2) zeigten, dass eine Supplementierung mit dem kompatiblen Solut NAGGN keinen wachstumsfördernden Effekt hat und dass dieses Solut nicht von *E. coli* aufgenommen wird. Durch den Versuch der Trockenstabilisierung sollte geklärt werden, ob NAGGN eine positive Wirkung auf ganze Zellen unter Trockenstress (hier: Gefriertrocknung) besitzt.

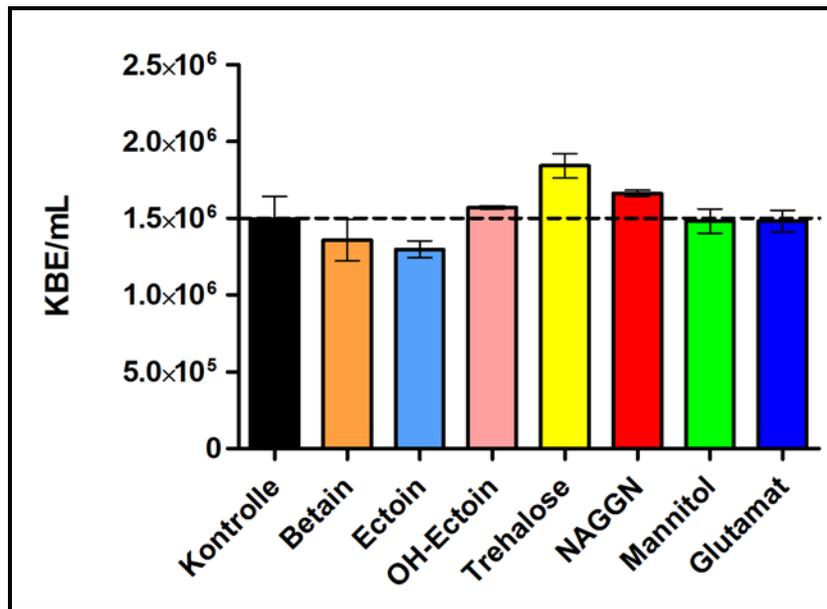


Abb. 44: Der Stamm *H. elongata* WUB02 wurde mit Zusatz verschiedener kompatibler Solute in einer Konzentration von 2 mM gefriergetrocknet und anschließend das Wachstum der Zellen auf Agarplatten als KBE/mL dokumentiert (KBE= koloniebildende Einheiten). OH-Ectoin=Hydroxyectoin

Der Stamm *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$) wurde in dem Mineralsalzmedium MM63-1 angezogen und unter Zusatz von 2 mM Solut gefriergetrocknet. Die resuspendierten Zellen wurden auf Kultivierungsplatten (MM63-1) ausgestrichen und bei 30 °C bebrütet. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden ausgezählt.

Die Kontrolle wies eine KBE/mL von $1,5 \times 10^6$ auf. Die Kulturen, die mit Betain bzw. Ectoin versetzt wurden zeigten eine KBE/mL von $1,36 \times 10^6$ und $1,30 \times 10^6$ auf und liegen damit beide unter den KBE/mL der Kontrolle (Abb. 44). Zugewetztes Mannitol bzw. Glutamat führte zu einer KBE/mL von $1,48 \times 10^6$, die ungefähr dem der Kontrolle entsprach. Die Supplementierung von OH-Ectoin zeigt mit $1,57 \times 10^6$ eine leicht erhöhte KBE/mL (Abb. 44). Der Zusatz von NAGGN führte zu einer leichten Steigerung der KBE/mL mit $1,66 \times 10^6$

im Vergleich zu der Zugabe von OH-Ectoin. Die höchste Steigerung der KBE/mL erfolgte bei einem Zusatz von Trehalose. Hier wurden $1,84 \times 10^{-6}$ KBE/mL nach der Gefriertrocknung erzielt (Abb. 44). Die drei Solute OH-Ectoin, Trehalose und NAGGN liegen bezüglich der KBE/mL gering über dem Niveau der Kontrolle.

8.4. Enzymstabilisierende Wirkung des kompatiblen Soluts NAGGN

Nachdem gezeigt wurde wie die Wirkung des Soluts NAGGN auf ganze Zellen unter Trockenstress ist (Abschn. III.8.3), war die Untersuchung hinsichtlich der Protein-stabilisierenden Eigenschaften des NAGGNs ein weiterer Gesichtspunkt, um die Charakterisierung des kompatiblen Soluts NAGGN abzurunden.

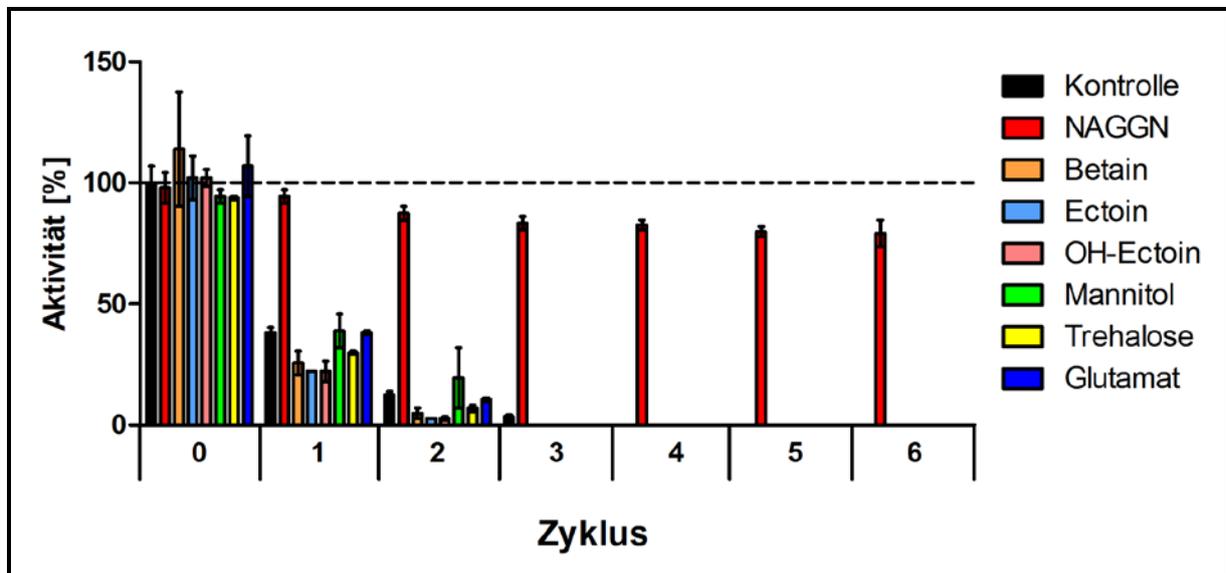


Abb. 45: LDH-Assay – die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase wurde mit Zusatz unterschiedlicher kompatibler Solute (50 mM) vor und nach mehreren Einfrier-Auftauzyklen bestimmt.

Das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) wurde als Modellenzym für die Stabilisierung von Enzymen, bei angelegtem Kältestress, durch kompatible Solute verwendet. Das Enzym wurde mit 50 mM Solut versetzt, das zuvor in dem Reaktionspuffer des Enzyms LDH gelöst wurde; ein Kaliumphosphatpuffer mit dem pH-Wert 6,8. Die Aktivität des Enzyms LDH wurde durch einen enzymatischen Assay bestimmt, in dem Pyruvat zu Lactat reduziert wird bei gleichzeitiger Oxidation des Kofaktors NADH zu NAD⁺. Die NADH Abnahme, verursacht durch ein aktives Enzym, wurde bei 340 nm photometrisch dokumentiert.

In Abb. 45 ist gezeigt, dass die Aktivität der Lactatdehydrogenase vor dem ersten Einfrier-Auftau-Zyklus in allen Proben, unabhängig welches Solut zugesetzt wurde, ungefähr 100 %

Aktivität betrug. Die gezeigte Aktivität der Negativkontrolle, bestehend aus dem Enzym LDH ohne zusätzliches Solut, vor dem ersten Einfrier-Auftau-Zyklus wurde auf 100 % festgesetzt. Nach dem ersten Zyklus war in fast allen Proben eine deutliche Abnahme der Aktivität festzustellen. Die verbleibende Aktivität der Enzyme (LDH), die mit 50 mM Ectoin bzw. OH-Ectoin versetzt wurden, zeigte noch eine Restaktivität von 22,22 % (Abb. 45). Die Aktivität der LDH, der 50 mM Betain bzw. 50 mM Trehalose zugegeben wurde, belief sich auf 25,69 % und befand sich damit in einem ähnlichen Rahmen wie die Proben in denen sich Ectoin und OH-Ectoin befand. Die Negativkontrolle ohne Solut, die mit 50 mM Glutamat bzw. mit 50 mM Mannitol versetzte Enzymprobe zeigten vergleichbare Restaktivitäten von 38,19 %, 38,19 % und 38,90 % (Abb. 45). Die einzige Probe, die nach dem ersten Einfrier-Auftau-Zyklus mit 94,44 % wesentlich höhere Aktivität aufwies, war die in der das Enzym mit 50 mM NAGGN stabilisiert wurde.

Nach 3 Einfrier-Auftau-Zyklen war in der Kontrolle und den Enzymen LDH, die mit Betain, Ectoin, OH-Ectoin und Trehalose stabilisiert wurden nur noch eine Aktivität von unter 10 % zu bestimmen. Der Zusatz von Mannitol und Glutamat führte zu einer verbliebenen Aktivität von 19,44 % und 10,41 % (Abb. 45). Das kompatible Solut NAGGN führte auch hier wieder zu einer ungewöhnlichen hohen Restaktivität von 87,50 %. Nach 6 Zyklen war das Enzym, das durch NAGGN stabilisiert wurde, mit 79,17 % immer noch sehr aktiv (Abb. 45).

8.5. Kristallisierung des kompatiblen Soluts NAGGN

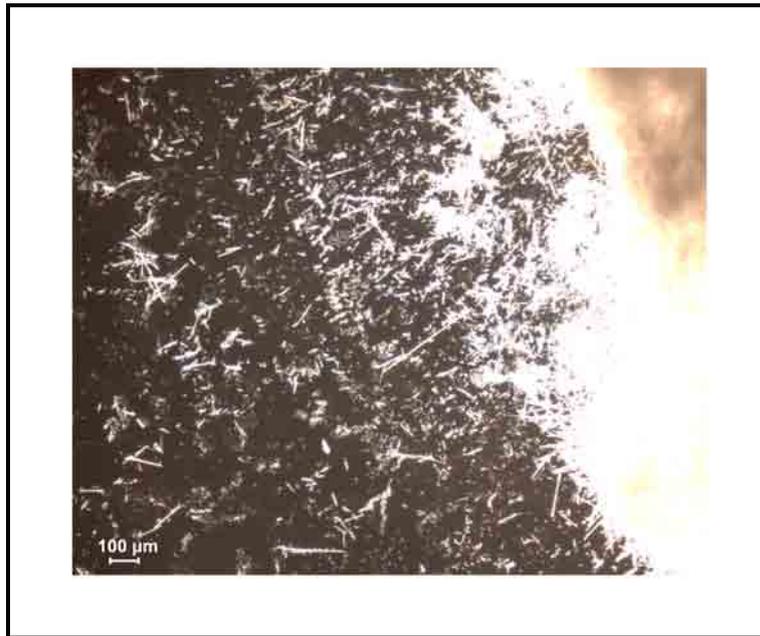


Abb. 46: Kristalle des kompatiblen Soluts NAGGN.

Das kompatible Solut NAGGN wurde in 100 %igem Methanol gelöst. Anschließend wurde so viel NAGGN zugegeben bis eine gesättigte Lösung vorlag, die durch Einengen des Volumens übersättigt wurde. Nach einer Inkubation für mehrere Tage bei 4 °C erfolgte eine Ausbildung von weißen, kristallinen Strukturen in dem Reaktionsgefäß. Die kristallinen Strukturen wurden getrocknet und zur strukturellen Verifizierung mikroskopisch betrachtet. Die Abb. 46 zeigt nadelförmig ausgebildete Kristalle mit einer Länge zwischen 50 μm und 300 μm und mit einer durchschnittlichen Breite von 10 μm.

8.6. Oberflächenbestimmung der lösungsmittelzugänglichen Bereiche verschiedener kompatibler Solute

Eine Möglichkeit kompatible Solute zu charakterisieren ist die Bestimmung der lösungsmittelzugänglichen Oberflächenbereiche. Die in dieser Arbeit bestimmten Oberflächen wurden nach der Vorgehensweise von Street (Street *et al.*, 2006) durchgeführt. Dies beinhaltet einerseits die Bestimmung der polaren und unpolaren Oberflächenbereiche und andererseits die Berechnung der negativen und positiven Oberflächenbereiche der untersuchten Osmolyte. Hierbei wurden positive und negative Oberflächen ebenso in Relation gesetzt wie die polaren Oberflächenbereiche zur Gesamtoberfläche.

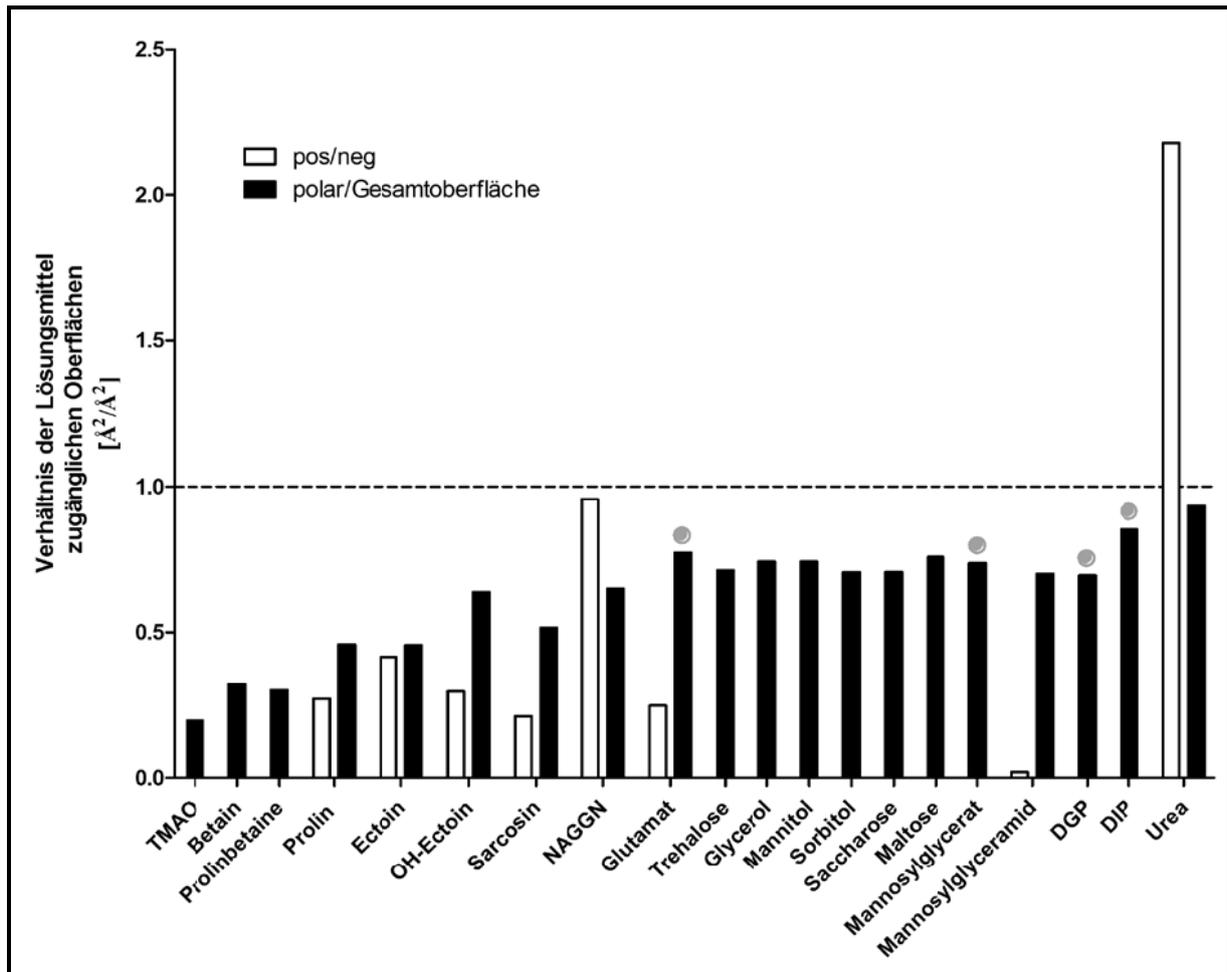


Abb. 47: Bestimmung der Oberflächen von kompatiblen Soluten. OH-Ectoin=Hydroxyectoin, DGP=Diglycerolphosphat, DIP=Di-myo-inositolphosphat, TMAO=Trimethylamin-N-oxid (●) negativ geladenes kompatibles Solut

Die kompatiblen Solute weisen sehr unterschiedliche durch lösungsmittelzugängliche Oberflächen auf. Die Betaine wie TMAO, Betain, und Prolinbetain besitzen mit Werten der Verhältnisse der polaren Oberflächenbereiche zur Gesamtoberfläche zwischen 0,2 und 0,32 sehr apolare Oberflächen und die wenigen vorhandenen polaren Oberflächenbereiche sind dabei negativ Bereiche. Die Zucker und Polyole, Trehalose, Maltose, Saccharose, Glycerol, Mannitol und Sorbitol haben mit Werten zwischen 0,71 und 0,76 einen hohen Anteil der polaren Oberflächenbereiche an der Gesamtoberfläche. Die polaren lösungsmittelzugänglichen Oberflächen sind bei den Zuckern und Polyolen negativ (Abb. 47). Die Solute der thermophilen Organismen Mannosylglycerat, Diglycerolphosphat und Di-myo-inositolphosphat sind neben Glutamat die einzigen untersuchten kompatiblen Solute, die eine negative Ladung besitzen. Sie haben ebenso wie die Zucker und Polyole einen sehr hohen

Anteil der polaren Oberflächenanteile an der Gesamtoberfläche mit Werten zwischen 0,69 und 0,85 mit denen der Zucker und Polyole vergleichbar (Abb. 47).

Die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin weisen trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit Unterschiede auf, die sich vor allem in der Oberflächenpolarität äußern. Ectoin hat ein kleineres Verhältnis polarer Oberflächenbereiche zu der Gesamtoberfläche (0,46) als Hydroxyectoin (0,64). Das Verhältnis der positiven und negativen Oberflächenbereiche zueinander liegt im Fall von Ectoin bei 0,41 und bei Hydroxyectoin bei 0,26 (Abb. 47).

Das destabilisierende Urea hat mit Werten von 0,93 im Verhältnis polarer Oberflächenbereiche zu der Gesamtoberfläche einen größeren polaren Oberflächenbereich als alle anderen untersuchten kompatiblen Solute. Das Oberflächenverhältnis positiver und negativer Bereiche weist einen Wert von 2,17 auf und ist damit das Solut mit dem größten positiven Oberflächenbereich (Abb. 47).

Das kompatible Solut NAGGN stellt im Hinblick auf die Ladungsverteilung der Oberfläche eine Ausnahme dar, weil bei diesem Molekül der Anteil der positiven und negativen Oberflächenbereiche nahezu gleich ist, wobei die negativen Oberflächenbereiche leicht überwiegen (0,96). Die polaren Oberflächenbereiche im Verhältnis zur Gesamtoberfläche betragen 0,65 und liegen damit in der Größenordnung von Hydroxyectoin und leicht unter denen der Zucker und Polyole (Abb. 47).

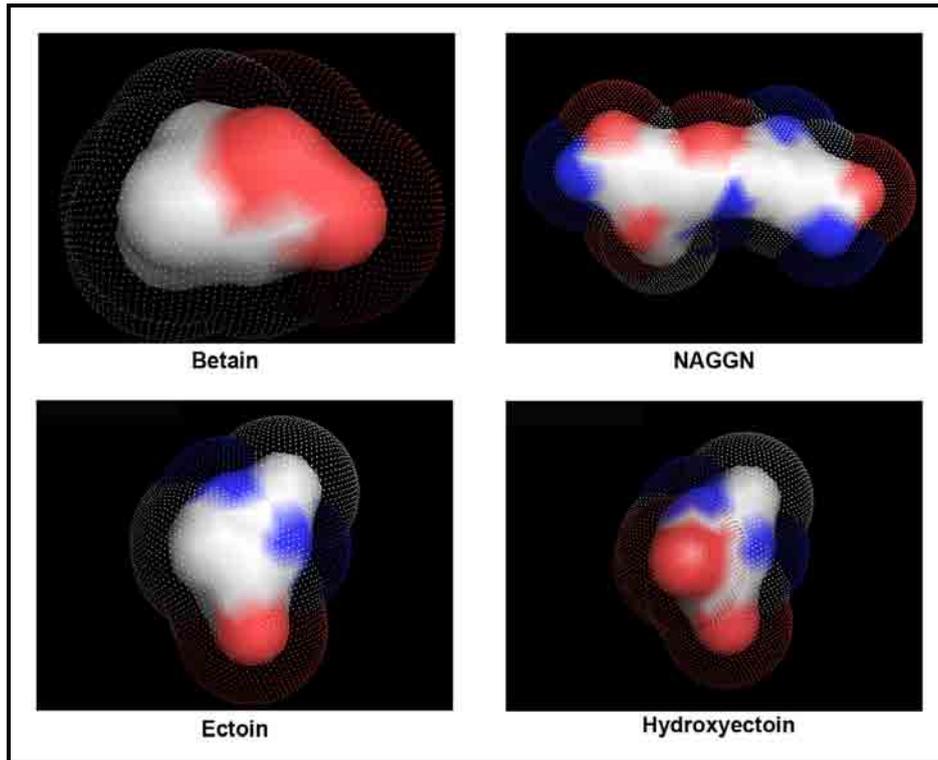


Abb. 48: Die Oberflächen der kompatiblen Solute Betain, NAGGN, Ectoin und Hydroxyectoin. Die polaren Oberflächenbereiche sind in blau (positiv) und rot (negativ) dargestellt und die apolaren Bereiche in weiss.

Die lösungsmittelzugänglichen Bereiche der vier kompatiblen Solute Betain, NAGGN, Ectoin und Hydroxyectoin wurden bioinformatisch hinsichtlich ihrer Polarität untersucht. In Abb. 48 sind die polaren (rot und blau) und apolaren (weiß) Bereiche sowie die negativen (rot) und positiven (blau) Oberflächenbereiche der Moleküle dargestellt. Anhand der Molekülstrukturen ist sehr gut zu erkennen, dass Betain einen hohen Anteil apolarer Oberflächen besitzt und die polaren Oberflächenbereiche lediglich aus negativen Oberflächenbereichen bestehen, die hier durch Sauerstoffatome hervorgerufen wurden (Abb. 48). Das kompatible Solut NAGGN besitzt verglichen mit Betain einen höheren Anteil polarer Moleküloberflächen, die zu nahezu gleichen Anteilen aus positiven und negativen Bereichen bestehen. Die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin sind bis auf eine zusätzliche Hydroxygruppe im Fall des Hydroxyectoins identisch. Durch die geringe Größe des gesamten Moleküls und der Oberfläche verursacht diese zusätzliche OH-Gruppe bereits eine Verschiebung einer überwiegend apolaren Oberfläche wie bei der des Ectoins in Richtung einer überwiegend polaren Oberfläche wie im Falle des Hydroxyectoins (Abb. 48).

Die Charakterisierung des kompatiblen Solut NAGGN wurde hauptsächlich im Hinblick auf seine Protein-stabilisierende Wirkung untersucht. Dort zeigte sich, dass das kompatible Solut NAGGN vorwiegend in geringen Konzentrationen (50 mM) deutlich Protein-stabilisierende Wirkung aufweist.

IV. Diskussion

1. Phylogenetische Analysen des NAGGN-Genclusters

Für die phylogenetischen Analysen des NAGGN-Genclusters wurden zwei verschiedene Methoden zur Stammbaumkonstruktion verwendet. Die erste Methode ist die *Neighbor-Joining* Methode, bei der die Distanz zwischen zwei Spezies berechnet wird und letztlich ein phylogenetischer Baum konstruiert wird. Allerdings ist diese Methode heuristisch und hängt teilweise von der Eingabereihenfolge der Sequenzen ab. Aus diesem Grund wurde eine weitere Methode, die *Maximum Parsimony* Methode, angewendet. Diese Methode ist eine Charaktermethode, die die Information an den einzelnen Positionen mit einbezieht. Bei dieser Methode wird der Baum generiert, der die geringsten Austausche in der Sequenz beinhaltet. Diese Methode birgt den Nachteil, dass es Ungenauigkeiten bei der Anwendung von DNA-Sequenzen gibt und Mutationen, die in nur einer Sequenz vorkommen nicht berücksichtigt werden. Zusätzlich wurden die Stammbäume über das sogenannte *Bootstrapping* Verfahren statistisch abgesichert. Die Äste, die einen *Bootstrapping* Wert unter 50 % zeigen, sind lediglich nicht ausreichend abgesichert. Das bedeutet jedoch nicht, dass der phylogenetische Baum an dieser Stelle nicht korrekt ist. Die über die *Neighbor-Joining* und die *Maximum Parsimony* Methode erstellten phylogenetischen Bäume weisen sehr viele Parallelen auf.

Das NAGGN-Gencluster aus dem Organismus *P. putida* KT2440 wurde eingesetzt, um über den BLAST-Algorithmus Organismen zu bestimmen, in denen eine ähnliche DNA-Sequenz vorhanden ist. Die 36 Organismen, in denen die Nukleotidsequenz die höchste Ähnlichkeit zu dem NAGGN-Gencluster aus *P. putida* KT2440 besaß, wurden für die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume mit der *Neighbor-Joining* Methode bzw. dem *Maximum Parsimony* Prinzip eingesetzt.

Die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz des NAGGN-Genclusters ist innerhalb einer Bakteriengruppe, z. B. der Familien der Pseudomonadaceae oder der Mycobacteriaceae am größten. Die Gruppe der Pseudomonaden besteht überwiegend aus ubiquitär auftretenden Mikroorganismen, deren Habitat vorwiegend der Boden ist, sich aber auch auf Sumpf- und Küstengebiete erstrecken kann. Zudem ist es unterschiedlichen *Pseudomonas* Arten möglich Pflanzen- und Tiergewebe zu besiedeln, wobei aerobe Bedingungen meist bevorzugt werden (Stover *et al.*, 2000; Oberhardt *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2006). Durch den gemeinsamen Lebensraum Erdboden, oder im Fall von *P. putida* und *P. fluorescens* die Rhizosphäre von

Pflanzen, ist die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers zwischen den einzelnen Arten der Gattung *Pseudomonas* gegeben (Paulsen *et al.*, 2005, Ronchel & Ramos, 2001).

Weitere Pflanzen-assoziierte Organismen sind *P. stutzeri* und verschiedene Pathovaren von *P. syringae*, die durch ihre epiphytische Lebensweise, im Fall von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a, oder durch ihre endophytische Lebensweise, beispielsweise *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, eine Pflanzenpathogenität aufweisen (Feil *et al.*, 2005; Joardar *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2008). Andere Bakterien, die sich im Wurzelbereich aufhalten und/oder mit den Pflanzen selbst assoziiert sein können, sind *Frankia* sp., die symbiontische Beziehungen mit diversen Büschen und Bäumen eingehen, *Nakamurella multipartita*, ein naher Verwandter der Gattung *Frankia*, *Streptomyces scabiei*, ein Pflanzenpathogen der Kartoffel und *Azotobacter vinelandii* (Lechevalier, 1994; Healy & Lambert, 1991; De Smedt *et al.*, 1980; Setubal *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008; Yoshimi *et al.*, 1996).

Pseudomonas mendocina, *Germatophilus obscurus* und *Aromatoleum aromaticum* EbN1 sind Bakterien, die zwar im Boden vorkommen, aber nicht direkt mit Pflanzen assoziiert sind (Cantwell *et al.*, 1978; Luedemann, 1968; Rabus *et al.*, 2005).

Zu den Actinobakterien gehören viele nicht humanpathogene Mycobakterienstämme, die oft auch das Erdreich besiedeln (McMurray, 1996; Gordon *et al.*, 1959). Andere pathogene Stämme und potentielle NAGGN-Produzenten sind das Bodenbakterium *Pseudomonas entomophila*, das *Drosophila melanogaster* und andere Insekten befallen kann. Auch unterschiedlichen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme PAO1, PA7, ein multiresistenter Stamm und LESB, ein Biofilm Überproduzent sind aufgrund der phylogenetischen Daten in der Lage NAGGN zu produzieren (Vodovar *et al.*, 2006; Stover *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2010; Winstanley *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Produktion des kompatiblen Soluts NAGGN durch das Bakterium *Azotobacter vinelandii* DJ nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), wodurch die Erkenntnisse, die auf den hier vorliegenden Stammbaumanalysen beruhen, bestätigt worden sind.

Gemeinsame Komponenten der potentiellen NAGGN-Produzenten sind der Lebensraum Erdreich, der sich bei einer Vielzahl der Bakterien (z. B. *Frankia* sp., *Pseudomonas fluorescens*) auf den Bereich der Pflanzen konzentriert, u. a. auch auf den Bereich der Rhizosphäre. Eine Reihe der Organismen sind Pflanzenpathogene (*Pseudomonas syringae* Arten), Tierpathogene (Mycobakterien) und Humanpathogene (*Pseudomonas aeruginosa* Arten).

Diese Kenntnisse erhöhen die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers, wobei in dieser Arbeit aufgrund der verwendeten Methoden (kein *Molecular Clock*) kein Hinweis darauf gegeben wird welches Bakterium evolutionär das NAGGN-Gencluster zuerst trug.

2. *P. putida* KT2440 – Produktion und Aufreinigung des kompatiblen Soluts NAGGN

2.1. Optimierung der NAGGN Produktion

Die homologe Expression der kompatiblen Solute NAGGN, Trehalose und Mannitol in *P. putida* KT2440 wurde bei ansteigenden Salzkonzentrationen in dem Mineralsalzmedium MM63 dokumentiert. Zuvor wurde bereits die NAGGN-Akkumulation in anderen *Pseudomonas* Arten dokumentiert. Allerdings wurde ein anderes Medium verwendet, das zu einer verstärkten Akkumulation des Soluts Mannitol führte (Kets *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde in dem Stamm *P. putida* KT2440 sowohl eine deutliche Steigerung des kompatiblen Soluts NAGGN bei zunehmendem osmotischen Stress, der in der Form von Salz angelegt wurde, auffällig, als auch die Dominanz des Osmolyts NAGGN im Vergleich zu den beiden anderen Soluten Trehalose und Mannitol. Die *P. putida* Kulturen, die bei 1 %, 2 %, 3 % und 5 % NaCl Zusatz im Medium angezogen wurden, wurden bereits beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase geerntet. Das vorherrschende compatible Solut ist hier ganz deutlich NAGGN. Das Osmolyt Mannitol wurde in diesen Stämmen zwar in geringeren Mengen akkumuliert, aber es lag dennoch in sehr gut detektierbaren Konzentrationen vor. Die *P. putida* Kulturen, die bei einer Salinität von 4 % (NaCl) angezogen wurden, akkumulierten ebenfalls große Mengen NAGGN. Sie enthielten aber anstelle des Mannitols Trehalose als Co-Solut. Eine mögliche Erklärung für die Akkumulation eines anderen Co-Soluts ist der differierende Erntezeitpunkt, der bei diesen Kulturen in der mittleren stationären Phase lag. Die Zusammensetzung der kompatiblen Solute bei einer Anzucht mit 6 % NaCl zeigt ein sehr deutlich abweichendes Bild. Der maximale NAGGN-Gehalt lag bei 5 % NaCl im Medium bei 133,94 mg/g TG. Die durchschnittlichen Gehalte aller drei Solute NAGGN, Trehalose und Mannitol lagen bei einer angelegten Salinität von 6 % bei ungefähr 40 mg/g TG. Durch die sehr geringen Wachstumsraten, die bei dieser Salinität vorliegen, wurde der Stamm *P. putida* vergleichsweise lange angezogen, um für eine Ernte adäquate Zelldichten zu erreichen. Dies führte dazu, dass zum Erntezeitpunkt bereits die spät stationäre Phase erreicht wurde, so dass die sehr abweichende Solutkomposition bei einer Salinität von 6 % ihre Ursache in diesen experimentellen Begebenheiten findet.

Der Umstand, dass das compatible Solut NAGGN in *P. putida* in der früh-stationären Wachstumsphase gegenüber den anderen Osmolyten erhöhte Gehalte aufweist, ist im Zuge

der Produktion und Isolierung der Substanz NAGGN vorteilhaft. Diese Dominanz des NAGGNs in der früh-stationären Wachstumsphase zeigt einige Hinweise darauf, dass es sich um ein wachstumsphasenabhängiges Phänomen handelt.

Zur optimalen Produktion im größeren Maßstab wurden unterschiedliche C-Quellen ausgetestet, um eine kostengünstige Produktion verbunden mit einer hohen Expressionseffizienz der biosynthetischen Gene, einer erhöhten enzymatischen Aktivität und einer gesteigerten Akkumulation des kompatiblen Solutes NAGGN zu erzielen. Bei der näheren Untersuchung der C-Quellen Glycerol, Glucose, Fructose, Glutamin und Glutamat stellte sich heraus, dass sowohl Fructose als auch Glycerol mit NAGGN-Gehalten von 101 und 88 mg/g TG im Vergleich zu NAGGN-Gehalten zwischen 60 und 70 mg/g TG, die mit den anderen C-Quellen erreicht wurden, eine erhöhte NAGGN-Akkumulation aufwiesen. Die C-Quelle Glycerol bot die kostengünstigste Alternative in Kombination mit einem hohen internen NAGGN-Gehalt und wurde deshalb für weitere Produktionen in größerem Maßstab eingesetzt.

2.2. Aufreinigung des kompatiblen Solutes NAGGN aus *P. putida* KT2440

Die Fermentation des Stammes *P. putida* KT2440 mit einem Arbeitsvolumen von 15 L wurde ohne Zusatz einer Fed-Batch-Lösung durchgeführt. Der Verlauf des Wachstums, wie in dem Kurvenverlauf der Trübung zu erkennen (Abb. 10), verlief den Erwartungen gemäß in nahezu idealer Ausprägung der einzelnen Wachstumsphasen. Die relativ starke Unruhe in der Kurve des Sauerstoffpartialdrucks resultiert aus der manuellen Regulation der Luftzufuhr. Weiteres Potential liegt in dem Erzielen höherer Zelldichten, was z. B. mit der Zufuhr einer Fed-Batch-Lösung ermöglicht werden würde. In diesem experimentellen Rahmen wurde jedoch darauf verzichtet, weil die vorrangige Zielsetzung zunächst die Übertragung der Anzuchtbedingungen aus einem kleinen Anzuchtvolumen, 100 mL, auf ein größeres, 15 L, war.

Die Proben, die während der Fermentation entnommen wurden, zeigten, dass der NAGGN-Gehalt während des Verlaufs zunahm. Der NAGGN-Gehalt nahm sogar noch im Verlauf der stationären Phase zu, wenn man die Gehalte der Probenzeitpunkte 33 h, früh-stationäre Phase, mit dem Zeitpunkt 50 h, spät stationäre Phase, vergleicht. Zum finalen Zeitpunkt der Fermentation wurde die Akkumulation der kompatiblen Solute NAGGN, Trehalose und Mannitol beobachtet. Die Akkumulation von Mannitol und Trehalose deutet auf eine Stickstofflimitierung in der stationären Phase hin. Diese Solute enthalten nämlich im

Gegensatz zu dem Osmolyt NAGGN keinen Stickstoff und wurden erst in der stationären Phase akkumuliert, in der eine Stickstofflimitierung wahrscheinlicher ist, und nicht in vorangegangenen Wachstumsphasen. Um dies mit Bestimmtheit sagen zu können, müsste während des Fermentationsverlaufs untersucht werden, ob die Kultur in der stationären Wachstumsphase stickstofflimitiert ist.

Die Synthese des kompatiblen Soluts NAGGN war zu dem finalen Zeitpunkt der Fermentation dominierend. Dieser Umstand ist für die spätere Isolierung von Vorteil, weil das gewünschte Produkt in größeren Mengen vorliegt und damit die potentielle Ausbeute erhöht wird.

Die Dokumentation der Fermentation durch die graphische Darstellung der Fermentationsparameter und der NAGGN-Gehalte zeigt, dass die Übertragung der Wachstumsbedingungen von einem 100 mL-Maßstab auf ein 15 L-Arbeitsvolumen funktioniert hat. Dieser Prozess ermöglicht nun sich anschließende Aufreinigungsverfahren zur Isolierung des kompatiblen Soluts NAGGN.

Als Aufreinigungsmethoden boten sich mehrere Möglichkeiten. Zunächst wurde eine Aufreinigung über eine Kieselgelsäule durchgeführt. Dieses Säulenmaterial eignete sich nicht für die Separierung der kompatiblen Solute NAGGN, Trehalose und Mannitol, weil diese Substanzen ähnlich stark mit dem Säulenmaterial interagierten und so keine sichtbare Trennleistung zu dokumentieren war.

Die Größenausschlusschromatographie war als Methode vielversprechender, weil dieses chromatographische Verfahren auf einer Trennleistung entsprechend der Größe basiert. Die Separierung des kompatiblen Soluts Mannitol von den Soluten NAGGN und Trehalose konnte durch Verringerung der Flußrate erfolgen (hier: von 1,5 mL/min auf 0,75 mL/min). Allerdings lag die verringerte Flußrate schon bei sehr niedrigen 750 µL/min, so dass eine weitere Verringerung der Flußrate keine Option darstellte. Das Säulenmaterial Biogel P2 (BioRad) ermöglicht nach Herstellerangaben eine Trennleistung von Moleküle in einem Größenbereich zwischen 100 und 1800 Dalton. Die Molekulargewichte der kompatiblen Solute NAGGN, Trehalose und Mannitol liegen mit ihren Molekulargewichten 315,326 g/mol, 342,30 g/mol und 182,17 g/mol am unteren Limit des Auftrennungsbereichs. Darüber hinaus sind die Größen der kompatiblen Solute NAGGN und Trehalose mit einem Unterschied von nur ungefähr 30 g/mol so ähnlich, dass eine Separierung aufgrund der Größe sehr schwierig erscheint. Eine chromatographische Methode, die die Ladung der Moleküle ausnutzt, ist in diesem Fall auch nicht anwendbar, weil sowohl NAGGN als auch Trehalose

polar und ungeladen sind. Aus diesen gegebenen Schwierigkeiten, die bei der Isolierung des kompatiblen Soluts NAGGN auftraten, wurden Überlegungen verfolgt, die ein heterologes Expressionssystem zugrunde legen. Das Ziel, dass mit einem solchen Stamme verfolgt wurde, war die NAGGN-Synthese ohne für die Aufreinigung hinderliche Nebenprodukte.

Als ein potentieller Expressionsstamm kam der sehr gut untersuchte und bereits als Wirtsstamm für unterschiedlichste Expressionen verwendete Organismus *E. coli* in Frage.

In *E. coli* wurden bereits Bioyntheseegencluster, die in der Biosynthese unterschiedlicher kompatibler Solute involviert sind, exprimiert. Die Biosynthesegene für das kompatible Solut Ectoin aus *Marinococcus halophilus* wurden unter der Kontrolle des Spender-eigenen, osmoregulierten Promotors in *E. coli* exprimiert (Louis & Galinski, 1997). Ebenso gelang es die biosynthetischen Gene (*betAB*) für das kompatible Solut Betain aus *S. meliloti* in *E. coli* zu exprimieren (Pocard *et al.*, 1997).

Die nähere Untersuchung der genauen Abfolge einzelner NAGGN-Biosynthese Schritte könnte im Hinblick auf die Erstellung heterologer Expressionssysteme wertvolle Erkenntnisse für die exakte Konstruktion liefern.

3. NAGGN-Biosynthese

Für die Aufklärung der NAGGN-Biosynthese wurden zwei Strategien verwendet. Der Vektor pK18-naggn wurde für die Erstellung von Plasmiden verwendet, die jeweils in einem der NAGGN-Biosynthesegene eine Deletion aufwiesen. Der zweite Weg, die Biosynthese des kompatiblen Solut NAGGN aufzuklären, wurde über die gezielte Überexpression einzelner Biosynthesegene mittels pET-Vektor vollzogen.

3.1. Deletionen der NAGGN-Biosynthese

Zur Aufklärung der NAGGN-Biosynthese wurden Varianten des Plasmids pK18-naggn erstellt, die jeweils in einem der drei putativen Biosynthesegene eine Deletion aufwiesen (Abschn. VII.).

Die Konstruktion der Plasmidderivate, die Deletionen in den putativen Biosynthesegenen aufwiesen, wurde der Konstruktion genomischer Deletionsmutanten in dem Stamm *P. putida* KT2440 vorgezogen. Die Entscheidung für diese Vorgehensweise lag in vergangenen bereits dokumentierten Schwierigkeiten bei der genomischen Integration rekombinanter Enzyme unter Verwendung homologer Rekombination in dem verwendeten *P. putida* Stamm KT2440 (Korsten, 2006). Der Stamm *P. putida* KT2440 besitzt zudem ein defektes Restriktions- und Modifikationssystem, so dass nicht auszuschließen ist, dass es auch Beeinträchtigungen in dem Mechanismus der homologen Rekombination gibt (Regenhardt *et al.*, 2002; Bagdasarian *et al.*, 1981). Die Benennung der Plasmid-Derivate wurde entsprechend nach dem deletierten Gen vollzogen, pK18- Δ PPI750, pK18- Δ PPI749 und pK18- Δ PPI748 (Abschn. VII.).

Die *E. coli* DH5a Stamm mit den eingebrachten Vektor -Derivaten pK18- Δ PPI750, pK18- Δ PPI749 und pK18- Δ PPI748 zeigten keine Akkumulation potentieller NAGGN-Biosynthese Intermediate und zudem sehr heterogene Aminosäuregehalte. Diese Heterogenität liegt zum einen an leicht differierenden Erntezeitpunkten, aber auch an den geringen Konzentrationen einiger Aminosäuren wie Asparagin und Aspartat, die sich am Rande der Nachweisbarkeit mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Gradienten-HPLC befinden.

Aufgrund der Vermutung, dass man eventuelle Auffälligkeiten in den Aminosäurespiegeln oder Akkumulationen von Intermediaten wegen der starken Trehalose-Akkumulation nicht erkennen konnte, wurde für weitere Versuche ein *E. coli* Stamm verwendet, der Deletionen in Bereich der Trehalose Biosynthesegene *otsAB* besitzt (Burdziak, 2006).

Eine Besonderheit, die in beiden *E. coli* Stämmen DH5 α und BKA-13 beobachtet wurde, ist die Tatsache, dass die Stämme, in die die Plasmide pK18- Δ PP1750 und pK18- Δ PP1749 eingebracht wurden, keine NAGGN-Akkumulation zeigten. Dies legt den Schluss nahe, dass die Gene *PP1750* und *PP1749* in der NAGGN-Biosynthese involviert sind. Bei der Konstruktion des Plasmids pK18- Δ PP1750 kam es jedoch durch die Integration einer Antibiotikakassette (Amp^R) in das Gen *PP1750* zu einem *Frameshift*, wodurch *downstream* Effekte, die insbesondere die Transkription des Gens *PP1749* betreffen, nicht ausgeschlossen werden können. Aus diesem Grund wurde mit den Promotorvorhersageprogrammen „PromScan“ und „BProm“ das NAGGN-Gencluster mit dem *upstream* liegenden Promotorbereich des Ectoingenclusters aus *H. elongata* AKB analysiert.

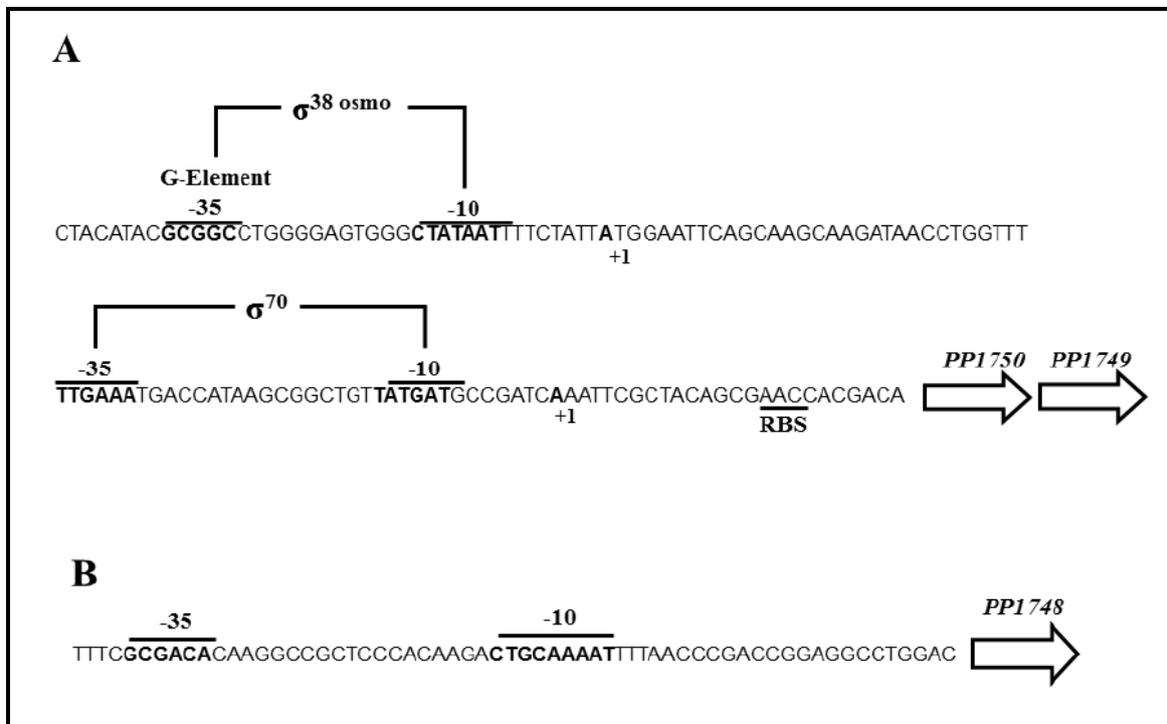


Abb. 49: Modifiziert nach Schwibbert *et al.*, 2010. (A) Nukleotidsequenz der Promotorregion des NAGGN-Genclusters aus dem Stamm *H. elongata* AKB. Die Transkriptionsinitiationsstellen sind mit +1 gekennzeichnet. (B) Nukleotidsequenz der Promotorregion des Gens *PP1748* aus dem Stamm *H. elongata* AKB.

Der durch Schwibbert *et al.* (2010) beschriebene σ^{70} Promotor des Ectoingenclusters wurde durch beide Promotoranalyse Programme identifiziert. Ein weiterer potentieller Promotorbereich, der nicht durch experimentelle Daten bestätigt wurde, liegt vor dem Gen *PP1748*, dem letzten Gen der NAGGN-Biosynthesegene, das für eine Peptidase kodiert.

Durch diesen Promotor wird die Transkription des Gens *PP1748*, das sich in dem Plasmid pK18- Δ *PP1750* befindet, sehr wahrscheinlich nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus bedeutet dies, dass die Gene *PP1750* und *PP1749* wahrscheinlich in einem Operon organisiert sind und dass basierend auf den Promotoranalysen keine Hinweise auf einen eigenen Promotor vor dem Gen *PP1749* vorliegen. Das bedeutet, dass der *frameshift*, in dem Vektor pK18- Δ *PP1750*, der durch die eingeführte Antibiotika-Kassette verursacht wurde, vermutlich negative Auswirkungen auf die korrekte Transkription des downstream befindlichen Gens *PP1749* besitzt. Allerdings sind die Daten aus den Untersuchungen der beiden *E. coli* Stämme DH5 α und BKA-13 mit den eingebrachten Plasmiden pK18- Δ *PP1749* und *E. coli* DH5 α pK18- Δ *PP1748* unproblematisch, weil hier keine ungünstigen *downstream* Effekte vorliegen. Die Plasmide pK18-naggn, pK18- Δ *PP1750*, pK18- Δ *PP1749* und pK18- Δ *PP1748* wurden in den Trehalose defizienten *E. coli* Stamm BKA-13 eingebracht und dieser auf Veränderungen im Aminosäuregehalt überprüft. In dem Stamm *E. coli* BKA-13 pK18- Δ *PP1750* wurden zwei Auffälligkeiten beobachtet. Einerseits die viermal höhere Akkumulation der Aminosäure Alanin verglichen mit den anderen getesteten Stämmen und eine Erhöhung der Aminosäure Aspartat von im Durchschnitt 0,1 mg/g TG auf 0,63 mg/g TG. Die Anreicherung der Aminosäure Alanin ist zwar ungewöhnlich, aber sie ist in anderen Bakterien bereits in der Funktion als Osmolyt beschrieben worden (Killham und Firestone, 1984).

Die beobachteten, leichten Veränderungen im Aminosäuregehalt der verschiedenen Stämme ließen keine neuen Erkenntnisse bzw. Schlussfolgerungen zum Ablauf der NAGGN-Biosynthese zu.

3.2. Überexpression der einzelnen Biosynthesegene

Für die weitere Untersuchung der NAGGN-Biosynthese wurden die Gene einzeln mit Hilfe des pET-Expressionssystems in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert (Studier & Moffatt, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990).

Alle drei Proteine der NAGGN-Biosynthese konnten erfolgreich in *E. coli* überexprimiert werden. Für das Enzym PP1748, eine potentielle Peptidase, konnte weder *in vivo* noch *in vitro* eine Funktionalität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die *in vitro* Versuche mit dem Enzym PP1748 (Peptidase) wurde unter anderem auch NAGGN als Substrat eingesetzt, wobei aber keine peptische Aktivität festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für den Nachweis der Funktionalität des Enzyms könnten zunächst Standardassays zum Nachweis

von proteolytischer Aktivität eingesetzt werden, bei denen Substrate wie z. B. Milchpulver verwendet werden.

Bei der Expression der Asparaginsynthetase (AsnB/PP1750) in *E. coli* BL21 (DE3) (Abschn. I.4.2.2) wurde zum Zeitpunkt der Ernte, 3 h nach einer Induktion mit IPTG, ein erhöhter Glutamat-Spiegel nachgewiesen. Die Aminosäure Glutamat stellt ein potentielles Produkt der Reaktion des Enzyms AsnB (PP1750) dar (Abschn. III.4.3.2). Die putative Reaktion, die basierend auf Datenbankinformationen (NCBI) durch das Enzym katalysiert wird, ist die Umsetzung von Aspartat zu Asparagin bei gleichzeitiger Hydrolyse des Glutamins zu Glutamat.

Bei der Expression der putativen N-Acetyltransferase (PP1749) in *E. coli* BL21 (DE3) wurde eine prominente Überexpressionsbande im Bereich 65 kDa sichtbar, die der berechneten Größe des Enzyms PP1749 von 64,82 kDa entspricht (Abschn. III.4.2.2). Die Überexpression des Proteins PP1749 war nach drei Stunden am deutlichsten erkennbar, wodurch optimale Bedingungen für eine erfolgreiche Überexpression mit darauf folgender Aufreinigung des Proteins vorlagen.

3.3. Enzymatischer N-Acetyltransferase Assay

Das erfolgreich überexprimierte Enzym PP1749 (N-Acetyltransferase) wurde über den am C-Terminus fusionierten Polyhistidin-Tag affinitätschromatographisch über das Säulenmaterial Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Isolierung des Enzyms PP1749 konnte durch die gewählten Bedingungen der Wasch- und Elutionspuffer (siehe Material und Methoden) effizient gestaltet werden. Bei salzangepassten Enzymen, auch aus moderat halophilen Organismen, führt eine Erhöhung des Salzgehaltes in den Aufreinigungspuffern in einigen Fällen zu einer Stabilisierung des Enzyms und somit auch zu einer verbesserten Aktivität (Egler, 2004). In diesem Fall wurde auf eine Erhöhung des Salzgehaltes der Wasch- und Elutionspuffer verzichtet, weil das Zielprotein lediglich aus dem halotoleranten Organismus *P. putida* KT2440 stammt und damit die Salzadaption des Enzyms potentiell geringer ausgeprägt ist. Das Enzym PP1749 wurde mit einigen Verunreinigungen im höher molekularen Bereich erhalten und konnte in enzymatische Assays eingesetzt werden (Abb. 22).

Der enzymatische Assay, der mit diesem Enzym durchgeführt wurde, hatte den Nachweis der N-Acetyltransferase Funktion des Enzyms zum Ziel. In diesem Assay wird das nach Ellman benannte Reagenz eingesetzt, das durch einen indirekten colorimetrischen Nachweis die

Übertragung von Acetylgruppen visualisiert (Egler, 2004; Riener *et al.*, 2002). Die verwendeten Substrate des N-Acetyltransferase Assays waren Glutamin und Glutamat als potentielle Vorstufen der NAGGN-Biosynthese und die Verbindungen Glutamat-1-amid und Glutamin-1-amid als putative Intermediate der NAGGN-Biosynthese. Die Aminosäure Glutamin wurde als Substrat gewählt, weil das kompatible Solut NAGGN aus dem Dipeptid Di-Glutamin besteht, das N- und C-terminal modifiziert ist. Die engen biochemischen Zusammenhänge der Glutamin- und Glutamat-Biosynthesewege ließen eine Relevanz von Glutamat als potentieller Vorläuferverbindung der NAGGN-Biosynthese zu, obwohl diese Aminosäure kein Bestandteil der finalen Verbindung NAGGN ist (Reitzer *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2002).

Für den enzymatischen Assay zum Nachweis der N-Acetyltransferasefunktion des Enzyms PP1749 war es notwendig das Substrat Glutamin-1-amid chemisch zu synthetisieren (Abschn. III.4.3.1). Dies gelang mit leichten Verunreinigungen durch die Schutzgruppe tBOC, die bei der chemischen Synthese zum Schutz der C α -Amino-Gruppe des Glutamins eingesetzt wurde.

Die enzymatische Aktivität des Enzyms PP1749 war wesentlich erhöht, wenn Glutamat und Glutamin als Substrat verwendet wurden. Die Aktivität des Enzyms bei der Verwendung der Edukte Glutamin-1-amid und Glutamat-1-amid fiel vergleichsweise gering aus. Diese gesteigerte Aktivität des Enzyms PP1749 in der Anwesenheit von Glutamat bzw. Glutamin im Reaktionsansatz gibt erste Hinweise darauf, dass die NAGGN-Biosynthese eine N-Acetylierung von Glutamat oder Glutamin als initiale Reaktion beinhaltet.

3.4. Einordnung der Daten in Sagot's Modell der NAGGN Biosynthese

Im Jahr 2010 wurden die Untersuchungen zu der NAGGN-Biosynthese von Sagot *et al.* fortgesetzt. Die Determination hypothetischer NAGGN-Biosynthesegene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Aspedon *et al.*, 2006) eröffnete die Möglichkeit, putative homologe Biosynthesegene in *Sinorhizobium meliloti* aufzufinden. Sagot *et al.* (2010) bestimmten einen Genlocus auf dem extrachromosomalen Plasmid pSymb, der die Gene *Smb20481* (*asnO*) und *Smb20482* (*ngg*) enthielt. Das Gen *Smb20481* aus *S. meliloti* zeigt eine Homologie zu der putativen Amidotransferase aus *P. aeruginosa* PA3459 und das Gen *Smb20481* aus *S. meliloti* weist eine Homologie zu der N-Acetyltransferase PA3460 aus *P. aeruginosa* auf. Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* PAO1 (3 Gene) besteht die putative Genregion für die NAGGN-Biosynthese in *S. meliloti* nur aus zwei Genen, die in einer Transkriptionseinheit organisiert

zu sein scheinen. Die Inaktivierung von jeweils einem der beiden Gene (*asnO* und *ngg*) durch Transposonmutagenese verhinderte in beiden Fällen eine NAGGN-Synthese. Durch NMR-spektroskopische Analysen wurde in dem *S. meliloti* Stamm UNA442, der ein mutiertes Gen *asnO* enthält, als Zwischenprodukt N-Acetylglutaminyglutamin akkumuliert. Der Biosynthese Vorschlag von Sagot *et al.* (2010), der konsistent mit den Ergebnissen dieser Veröffentlichung ist, beinhaltet als ersten Schritt die Erstellung der Peptidbindung der Glutaminuntereinheiten und die N-Acetylierung durch das Enzym Ngg, wobei die Zwischenverbindung N-Acetylglutaminyglutamin (NAGG) entsteht. Ungeklärt ist bis dato die Abfolge von Acetylierungsreaktion und Peptidbindung. In einem zweiten finalen Schritt zur NAGGN-Synthese wird die Verbindung NAGG durch die Amidotransferase *AsnO* amidiert (Sagot *et al.*, 2010).

Durch Vergleiche der Proteinsequenzen stellte sich eine Homologie des bifunktionellen Enzyms Ngg aus *S. meliloti* zu der N-Acetyltransferase PP1749 aus *P. putida* KT2440 heraus. Auf die potentielle Bifunktionalität des Enzyms PP1749 gab es bereits zuvor Hinweise durch zwei vorhandene Domänen, die durch einen Datenbankabgleich mit der Datenbank „Conserved Domain Database“ des NCBI Servers unter Verwendung des Suchalgorithmus BLAST identifiziert wurden (Marchler-Bauer *et al.*, 2009; Marchler-Bauer & Bryant, 2004; Altschul *et al.*, 1997). Die erste Domäne ist eine „rimK ähnliche ATP-grasp“ Domäne und weist eine ATP-abhängige Carboxylat-Amin/Thiol Ligase Aktivität auf (Galperin & Koonin, 1997). Dieser Aktivität kommt bei der Bildung des Di-Glutamins aus zwei Glutaminen in der Biosynthese des kompatiblen Soluts NAGGN eine Schlüsselfunktion zu. Die N-Acetyltransferase Funktion des Enzyms basiert auf einer zweiten Domäne „RimI“, der Gruppe der GCN5 verwandten N-Acetyltransferasen zugeordnet wird. Die Abfolge der Ligase und der N-Acetyltransferase Reaktionen wurde noch nicht näher aufgeklärt.

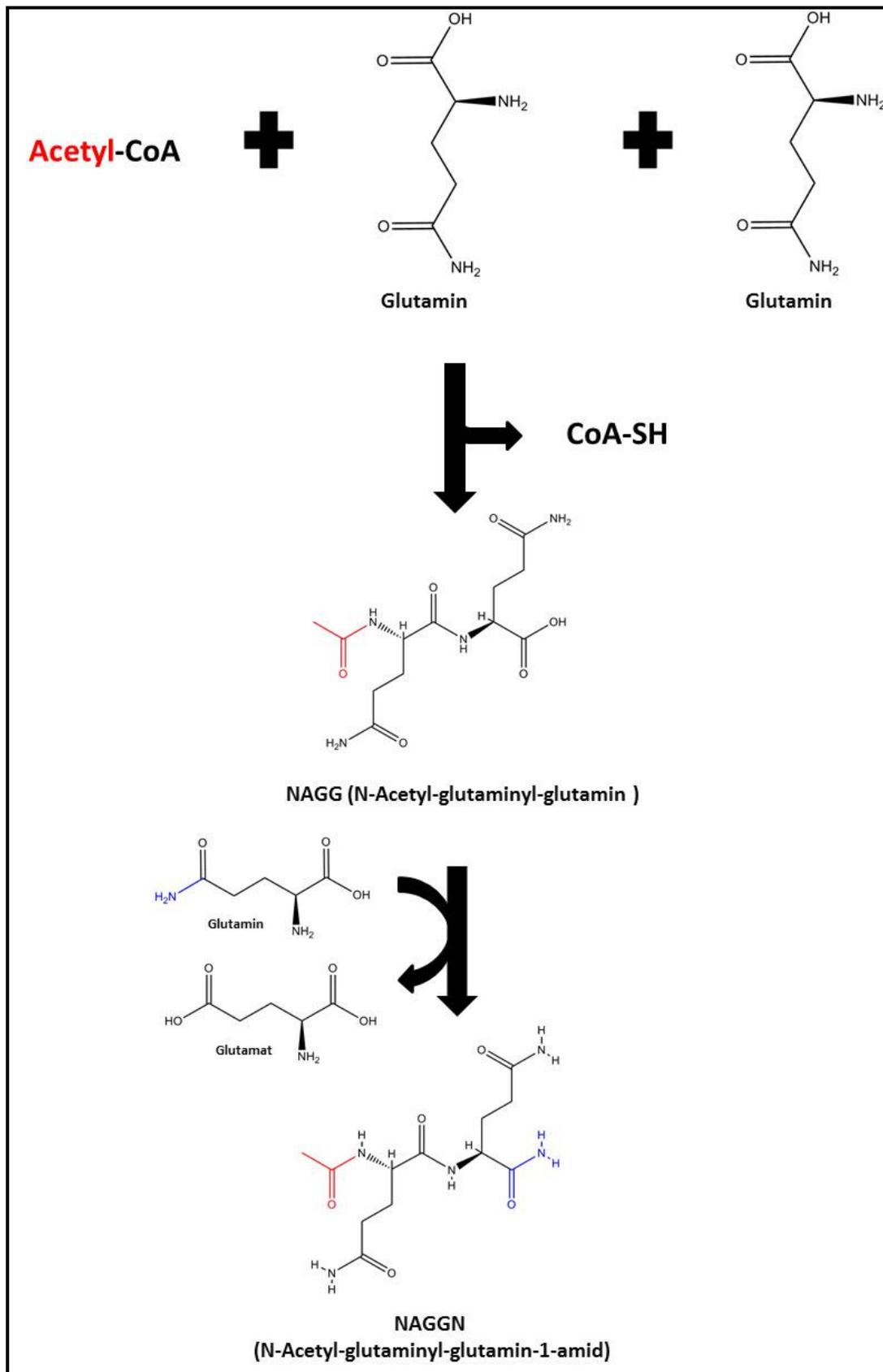


Abb. 50: Biosyntheschema des kompatiblen Soluts NAGGN modifiziert nach Sagot *et al.*, 2010. Rot: Acetylgruppe, blau: Carboxamidgruppe bzw. Aminogruppe.

Die Verbindung N-Acetylglutaminylglutamin enthält die Verbindung N-Acetylglutamin, die als eine sehr stabile Verbindung in wässrigen Lösungen bei pH-Werten zwischen pH 5 und pH 8 bekannt ist (Snowden *et al.*, 2002). Ein sehr stabiles Intermediat wie das N-Acetylglutamin bildet eine gute Ausgangsbasis für sich anschließende biochemische Reaktionen in Form von Carboxylat-Amin-Ligationen und/oder Amidierungen. Die noch fehlende Reaktion, um die Verbindung N-Acetylglutaminylglutamin zu dem kompatiblen Solut NAGGN zu komplettieren, ist eine Amidierungsreaktion der C-terminalen C_α-Carboxygruppe. In *S. meliloti* erfolgt diese Amidierungsreaktion durch das Enzym AsnO, das zu der Asparaginsynthetase AsnB aus *P. putida* KT2440 eine ausgeprägte Homologie aufweist.

Die Aufklärung der Biosynthese durch Sagot *et al.* (2010) ist konsistent mit den Resultaten, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurden. Die N-Acetyltransferase PP1749 aus *P. putida* KT2440 zeigt die höchste Aktivität in Bezug auf die N-Acetyltransferase-Funktion bei der Verwendung von Glutamin und Glutamat als Substrat. Die hohe Affinität zu dem Substrat Glutamin stimmt sowohl mit dem experimentell nachgewiesenen Modell der Biosynthese von Sagot *et al.*, (2010) überein, als auch mit der bereits im Jahr 1994 postulierten Biosynthese nach Smith *et al.* (1994). Smith *et al.* (1994) hatten N-Acetylglutamin und im Folgenden N-Acetylglutaminylglutamin als potentielle Zwischenverbindungen erachtet (Smith *et al.*, 1994). Die bereits nachgewiesene Stabilität des Intermediats N-Acetylglutamin unterstützt diese These (Snowden *et al.*, 2002). Durch den enzymatischen Assay für die N-Acetyltransferase PP1749 wurde lediglich eine N-Acetylierung beobachtet. Die Erstellung eines Dipeptids, das aus zwei Glutamin-Einheiten besteht ist momentan nicht käuflich zu erwerben. Das macht weitere Versuche mit diesem Enzym, die die Umsetzung zu den möglichen Produkten N-Acetyl-glutamin und besonders N-Acetyl-glutaminylglutamin unter Einsatz des Edukts Glutamin näher beleuchten auch in industrieller Hinsicht sehr interessant. Weiteres Potential in der Arbeit mit diesem Enzym (N-Acetyltransferase) läge in der Verknüpfung von zwei Glutaminen als Dipeptid. Ein solches Produkt wie Di-Glutamin ließe sich im Folgenden auch als Substrat für weitere Derivatisierungen einsetzen.

Sagot *et al.* (2010) klärten die NAGGN-Biosynthese durch die Bestimmung akkumulierter Zwischenprodukte von Mutanten durch NMR-spektroskopische Messungen auf, die genomische Deletionen im Bereich der Biosynthesegene aufwiesen. Bei der Analyse akkumulierter Verbindungen, die bei der Überexpression oder bei der Deletion einzelner Biosynthesegene im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, kamen hauptsächlich HPLC-

Analysen zum Einsatz. Allerdings standen zu diesem Zeitpunkt keine Methoden zur Verfügung, die einen Nachweis der Verbindungen N-Acetyl-glutamin, N-Acetyl-glutamat, N-Acetyl-glutaminylglutamin und N-Acetyl-glutamylglutamat ermöglicht hätten. Wobei durch das Ausbleiben anderer potentieller Intermediate der NAGGN-Biosynthese eine dieser Verbindungen als Zwischenstufe immer wahrscheinlicher wurde. Letztlich wurde durch Sagot *et al.* (2010) das Intermediat N-Acetylglutaminylglutamin identifiziert.

Bei der *in vivo* Überexpression der Asparaginsynthetase AsnB (PP1750) wurde ein erhöhter Glutamat-Spiegel aufgefunden. Dies deckt sich mit der Rolle, die das homologe Enzym AsnO aus *S. meliloti* in der NAGGN-Biosynthese spielt. Es katalysiert nämlich die Umsetzung von Glutamin und N-Acetylglutaminylglutamin zu NAGGN und Glutamat. Die Aminosäure Glutamat ist also eines der Produkte, die durch AsnO bzw. das homologe Enzym in *P. putida*, AsnB (PP1750) hervorgerufen werden. Es ist bis dato ungeklärt, ob dieses Enzym PP1750 aus *P. putida* KT2440 eine ähnliche Umsetzung von Aspartat zu Asparagin wie das homologe Enzym AsnB aus *E. coli* katalysieren kann (Boehlein *et al.*, 1994).

Das Gen *PP1748* aus *P. putida* KT2440, das eine Peptidase kodiert, ist in dem Organismus *S. meliloti* nicht vorhanden. Deshalb ist fraglich, ob der Peptidase eine entscheidende Rolle in der NAGGN-Biosynthese zukommt. Das homologe Enzym aus *P. aeruginosa* PAO1 ist bei hyperosmotischen Bedingungen hochreguliert, ebenso wie die beiden weiteren Gene der NAGGN-Biosynthese (Aspedon *et al.*, 2006). Sagot *et al.* postulieren, dass dieses Enzym eine potentielle Funktion im Rahmen der NAGGN Degradation spielt (Sagot *et al.*, 2010). Diese Theorie passt zu Befunden anderer kompatibler Solute, die ebenfalls zusätzlich zu den Biosynthesegenen entsprechende Gene für den Abbau aufweisen. Für die kompatiblen Solute Ectoin und Trehalose sind bereits Abbauewege beschrieben worden (Schwibbert *et al.*, 2010; Van Laere, 1989; Csonka, 1989).

Reaktionsgleichungen der NAGGN-Biosynthese (nach Sagot *et al.*, 2010):

- (1) Glutamin + Glutamin + AcCoA → N-Acetylglutaminylglutamin
- (2) N-Acetylglutaminylglutamin (NAGG) + Glutamin
→ N-Acetylglutaminylglutamin-1-**amid** (NAGGN) + Glutamat
- (3) Aspartat + Glutamin ↔ Asparagin + Glutamat

4. *E. coli* - heterologe NAGGN Expression

Es wurde zuvor bereits die Funktionalität des osmoregulierten Promotors für das Ectoinbiosynthesegencluster aus *Marinococcus halophilus* in *E. coli* dokumentiert (Louis & Galinski, 1997). Deshalb wurde die Expression des NAGGN-Genclusters nach einem sehr ähnlichen Ansatz gestaltet. Das NAGGN-Gencluster wurde zu diesem Zweck unter die Kontrolle des osmoregulierten Promotors PromA des Ectoin -Biosyntheseweges aus *H. elongata* gestellt. Dieses Konstrukt eröffnete zum einen die Möglichkeit, einen funktionellen Nachweis dieses Promotors PromA in *E. coli* zu erbringen und andererseits das vollständige NAGGN-Gencluster osmoreguliert in *E. coli* zu exprimieren.

Die Expression des NAGGN-Genclusters in *E. coli* wurde durch das Plasmid pK18-nagn vermittelt. Als Expressionsstamm diente zunächst der *E. coli* Stamm DH5 α , in dem eine NAGGN-Akkumulation nachgewiesen werden konnte. Allerdings betrug der maximale NAGGN-Gehalt bei einer Salinität von 2 % und einer Wachstumsrate von 0,25 h⁻¹ lediglich 16,85 mg/g TG.

Das prominente Osmolyt, das in *E. coli* DH5 α in der spät exponentiellen Phase und der stationären Phase dominiert, ist das Disaccharid Trehalose (Larsen *et al.*, 1987). Der Trehalosegehalt stieg in dem Stamm *E. coli* DH5 α pK18-nagn in Zusammenhang mit einer steigenden Salinität (1 %, 2 % und 3 %) an. Diese Beobachtungen entsprechen den Erwartungen, weil osmolytisch aktive Substanzen bei einem erhöhten osmotischen Stress vermehrt von Mikroorganismen, in diesem Fall *E. coli* DH5 α , akkumuliert werden (Strøm & Kaasen, 1993; Larsen *et al.*, 1987; Strøm, 1998; Styrvold & Strøm, 1991).

Die Gehalte des kompatiblen Solut Trehalose, dem wirtseigenen kompatiblen Solut, lagen mit bis zu 165,7 mg/g TG bei einer Salinität von 3 % wesentlich höher als die NAGGN-Gehalte. Dadurch lag die Vermutung nah, dass die hohe Akkumulation des wirtseigenen Osmolyts Trehalose einen negativen Einfluss auf das Expressionsniveau des ebenfalls osmoregulierten NAGGN-Genclusters ausübe.

Das kompatible Solut NAGGN kann den positiven Effekt des wirtseigenen Solut Trehalose in der osmotischen Stresssituation, die durch den erhöhten Salzgehalt im Medium hervorgerufen wurde, nicht kompensieren. Die Aufnahme des kompatiblen Solut Betain verringert im Gegensatz zur NAGGN-Biosynthese die Trehalose-Akkumulation fast vollständig (Cayley *et al.*, 1992).

Für die Untermauerung der Hypothese, dass die Akkumulation des kompatiblen Solut Trehalose das Expressionsniveau der NAGGN-Biosynthesegene vermindert, wurde das

Plasmid pK18-naggn in einen Trehalose defizienten Stamm eingebracht. Dieser Trehalose defiziente Stamm *E. coli* BKA-13 besitzt eine Deletion der Gene *otsAB* (Burdziak, 2006). Die Akkumulation des kompatiblen Solut NAGGN in *E. coli* DH5 α im Vergleich zu *E. coli* BKA-13 wurde von 3,43 mg/g TG auf 91,81 mg/g TG bei einer Salinität von 3 % gesteigert. Das bedeutet, dass bei einer Abwesenheit des kompatiblen Solut Trehalose ungefähr 27 mal mehr NAGGN in den Zellen vorliegt.

Der Promotor der Ectoinbiosynthesegene aus *H. elongata* ist in *E. coli* funktional und das NAGGN-Biosynthesegencluster erlaubt trotz abweichender Codon-Verwendung (Abb. 27) grundsätzlich eine Expression in *E. coli*. Aufgrund der hier erzielten geringen Wachstumsraten von 0,063 h⁻¹ (*E. coli* BKA-13) bei einer Salinität von 3 % erscheint eine Verwendung des Stammes *E. coli* BKA-13 pK18-naggn in biotechnologischer Hinsicht, wie zur NAGGN Produktion, von untergeordneter Rolle. Für molekularbiologische Handhabungen, die im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf Proteinexpressionen einzelner Gene, wie beispielsweise durch das pET-Expressionssystem, oder Modifizierungen/Deletionen der Biosynthesegene durchgeführt wurden, eignete sich dieser Stamm jedoch hervorragend (Studier & Moffatt, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990).

Die Hypothese des starken Trehalose Einflusses auf die Expression des Solut NAGGN wurde durch diesen Versuch bestätigt. Die Ursachen dieser starken Wirkung der Trehalose müssen noch genau untersucht werden. Das Solut NAGGN könnte in *E. coli* unter den verwendeten Versuchsbedingungen ein weniger effizientes Osmolyt sein als der Zucker Trehalose. Darüber hinaus ist die Regulation des Promotors PromA aus *H. elongata* noch weitgehend ungeklärt. Es sind auch indirekte Regulationsmechanismen denkbar, die durch die Trehalose-Akkumulation verursacht werden und den Promotor PromA negativ regulieren.

5. *H. elongata* - Heterologe NAGGN-Expression

In *Chromohalobacter salexigens*, einem nahen Verwandten des in dieser Arbeit verwendeten Stammes *Halomonas elongata* wurde die heterologe Expression einzelner Biosynthesegene wie der α -Amylase aus *Pyrococcus woesei* (Frillingos *et al.*, 2000; Linden & Niehaus *et al.*, 2000) und des Gens *inaZ* aus *Pseudomonas syringae* (Arvanitis *et al.*, 1995, Afendra *et al.*, 2004) erfolgreich durchgeführt. Die Expression der Biosynthesegene für das kompatible Solut Mannosylglycerat stellt bislang die einzige Bemühung dar, die im Bereich der Expression vollständiger Biosynthesegencluster in *H. elongata* angestrebt wurde (Burdziak, 2006). Eine Veranlassung *H. elongata* als heterologen Expressionsstamm zu verwenden, wurde durch die erfolgreiche heterologe Expression in dem Stamm *Chromohalobacter salexigens* des Gens *inaZ*, das aus dem Organismus *P. syringae* stammt, gegeben (Arvanitis *et al.*, 1995, Afendra *et al.*, 2004). *P. syringae* gehört genau wie *P. putida* KT2440 zu der Familie der Pseudomonadaceae und weist somit eine nahe Verwandtschaft zu *P. putida* KT2440 auf. Ein weiterer Punkt der letztendlich zu der Entscheidung geführt hat *H. elongata* als Expressionsstamm zu verwenden lag in dem sehr ähnlichen GC-Gehalt und einer ebenfalls sehr ähnlichen Codon-Verwendung der Organismen *P. putida* KT2440 und *H. elongata* (Abb. 27).

Durch die Entscheidung *H. elongata* als heterologen Expressionsstamm zu verwenden, konnte nun eine Klonierungsstrategie festgelegt werden. Die Integration des NAGGN-Genclusters aus *H. elongata* sollte genomisch erfolgen, damit einerseits keine Notwendigkeit für Antibiotikazusätze gegeben war und andererseits das im Expressionsstamm *H. elongata* vorhandene Biosynthesegencluster für das kompatible Solut Ectoin bei der Etablierung des heterologen Expressionsstammes gegen das NAGGN-Gencluster ausgetauscht werden konnte. Organismen wie *H. elongata*, die das kompatible Solut Ectoin als Osmolyt akkumulieren, tolerieren einen sehr breiten Salinitätsbereich, 2-20 % (Vreeland *et al.*, 1980). Pseudomonaden haben mit einem möglichen Wachstum bis zu 6 % NaCl im Medium ein geringeres Salinitätsspektrum (Abb. 8, Kets *et al.*, 1996). Dadurch ist ein negativer Effekt eines starken Osmolyts wie Ectoin auf die Expression eines potentiell schwächer wirksamen Osmolyts sehr wahrscheinlich und war ein ausschlaggebender Grund von einer Co-Expression der beiden Solute Ectoin und NAGGN abzusehen. Für die genomische Integration wurde ein Vektor erstellt, pK18-naggn, der das vollständige NAGGN-Gencluster aus *P. putida* KT2440 trug und von den stromaufwärts und stromabwärts liegenden Bereichen des Ectoingenclusters aus *H. elongata* flankiert wurde. Diese stromaufwärts und stromabwärts

Bereiche des Ectoingenclusters wurden für die doppelt homologe Rekombination des NAGGN-Genclusters in das Genom von *H. elongata* benötigt.

Die genomische Etablierung des NAGGN-Genclusters in *H. elongata* im Austausch gegen das wirtseigene Gencluster, das für die Biosynthesegene des kompatiblen Soluts Ectoin kodiert, wurde derart durchgeführt, dass die Regulationsmechanismen des wirtseigenen Ectoingenclusters bestehen blieben, z. B. der stromaufwärtsgelegene Promotorbereich und der stromabwärtsgelegene putative Regulator. Die Aufrechterhaltung der Promotoren innerhalb des Ectoin Gensclusters wurde im Zuge der Integration des NAGGN-Genclusters jedoch nicht berücksichtigt. Der Nachweis der Funktionalität des NAGGN-Genclusters in der konstruierten *Halomonas* Mutante *H. elongata* AKB erfolgte bereits durch die Bestimmung des Solutspektrums mittels qualitativer isokratischer HPLC- und NMR-Analysen extrahierter Zellextrakte. Die positiven Resultate, nämlich die Akkumulation des kompatiblen Soluts NAGGN in dem Stamm *H. elongata* AKB in der Höhe von ca. 80 mg/g TG bei einer Salinität von 3 %.

6. Aufreinigung und Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN

Für die Aufreinigung des kompatiblen Solut NAGGN wurde zunächst eine Fermentation des Stammes *H. elongata* AKB mit einem Arbeitsvolumen von 15 L durchgeführt, damit ausreichend NAGGN-haltiges Zellmaterial für sich anschließende Isolierungsverfahren zur Verfügung stand.

6.1. Fermentation des Stammes *H. elongata* AKB

Unter den angewendeten Fermentationsbedingungen (Abschn. III.7.1) wurde das kompatible Solut NAGGN in dem Stamm *H. elongata* AKB akkumuliert. Allerdings konnten die maximalen Ausbeuten von ungefähr 80 mg/g TG, die in vergleichbaren Versuchen in 100 mL Schüttelkolben erzielt wurden, mit 41,41 mg/g TG im Fermentationsprozess nicht erreicht werden. Es gibt mehrere potentielle Ansatzpunkte für Überlegungen, warum die NAGGN-Gehalte während der Fermentation verringert waren. Zum einen wurde ein Medium verwendet, dass neben der C-Quelle Glucose zusätzlich Citrat enthielt (GC-Medium). Dieses Medium wurde verwendet, weil in der Vergangenheit bei Fermentationsprozessen mit *H. elongata* unter Verwendung dieses Mediums gute Erfahrungen gemacht wurden. Für die NAGGN-Synthese erscheint an dieser Stelle dieses Medium eher abträglich.

Bei der Prozesserweiterung im Sinne der Arbeitsvolumen Vergrößerung, hier von einem 0,1 L Maßstab auf 15 L, sind Veränderungen der Bedingungen vorhanden. Bei einer Fermentation in einem 15 L Maßstab (Bioreaktor) sind die Bedingungen zwar kontrollierbarer, aber es sind mikroanaerobe Bedingungen vorhanden, die sich auch durch eine geregelte Luftzufuhr nicht ganz beseitigen lassen. In Kolben ist die Belüftung durch das kleine Arbeitsvolumen (0,1 L) gewährleistet. Gerade bei einem Organismus wie *H. elongata*, der obligat aerob ist, beeinträchtigen solche mikroanaeroben Milieus den Organismus besonders stark und es werden nicht so hohe Zelldichten wie vergleichsweise mit *E. coli* erreicht. Die NAGGN Ausbeuten, die bislang bei der Fermentation von *H. elongata* bei der Expression von Biosynthesegenen für kompatible Solute aus anderen Organismen erreicht wurden, waren deutlich geringer als die, die bei der Fermentation des Stammes *H. elongata* AKB nachgewiesen wurden (ca. 40 mg/g TG). Ein Beispiel ist die Mannosylglycerat-Synthese während der Fermentation des Stammes *H. elongata* KB10.1 (Meffert, 2007). In diesem Stamm sind die Biosynthesegene für das Solut Mannosylglycerat genomisch etabliert und der Mannosylglycerat-Gehalt belief sich auf 10 mg/g TG und ist damit wesentlich geringer als die NAGGN-Akkumulation des Stammes *H. elongata* AKB, in den die Biosynthesegene

ebenfalls genomisch integriert sind. Allerdings wurde die Fermentation mit einem geringen Arbeitsvolumen durchgeführt und bereits hier war auch schon die Mannosylglycerat-Akkumulation in 100-mL-Kolben erfolgreicher (Burdziak, 2006; Meffert, 2007).

6.2. Isolierung des kompatiblen Soluts NAGGN

Die Extraktion des Probenmaterials erfolgte hauptsächlich durch die Bligh & Dyer Extraktion, weil bei Versuchen in denen die Soxhlet-Extraktion als Extraktionsmethode gewählt wurde das kompatible Solut NAGGN nicht vollständig aus den Zellen extrahiert wurde. Potential liegt dennoch auch in der Anwendung der Soxhlet-Extraktionsmethode, wenn die Zeit der Durchführung ausgedehnt oder ein anderes Lösungsmittel als Methanol für die Extraktion verwendet werden würde.

Nach der Extraktion des Zellmaterials wurden zwei unterschiedliche Methoden getestet, um das kompatible Solut NAGGN zu isolieren. Die Hauptkomponenten die bei der Isolierung des NAGGNs entfernt werden mussten, waren einerseits Glutamat, das von *H. elongata* Zellen verstärkt akkumuliert wird, wenn sie unter osmotischem Stress stehen und andererseits Salz, in diesem Fall NaCl (Kraegeloh & Kunte, 2002).

Die erste Methode erfolgte über eine Zweischritt-Aufreinigung, bei der zunächst eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt wurde, um das negativ geladene Glutamat von dem neutralen NAGGN abzutrennen. Bei dem zweiten Schritt wurde das in den Proben vorhandene Salz über eine Ionenverzögerungssäule separiert. Dies geschah, indem das Salz durch Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix retardiert wurde und das neutrale NAGGN schneller von der Säule eluierte. Nachteilig bei dieser Zwei-Schritt-Aufreinigungsmethode ist, dass sowohl Glutamat als auch Glutamin über die Anionenaustauschchromatographie nicht vollständig abgetrennt wurden, obwohl unter Zugabe von 1 M HCl-Lösung ein Signal (Abb. 36, Signal 2) zu erkennen war, das vermutlich von der Aminosäure Glutamat herrührte. Dieses Signal wurde nicht weiter analysiert. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass es sich um die Aminosäure Glutamat handelt, weil genau diese Aminosäure nachweislich in einem großen Anteil im Zellmaterial des Stammes *H. elongata* AKB vorlag (Anschn. III.6.4). Bei der Ionenverzögerungschromatographie wurde ein Teil des NAGGNs von dem Salz getrennt (Abb. 37, Signal 1). Allerdings gab es viele Fraktionen, in denen die Komponenten NAGGN und die Aminosäuren Glutamin und Glutamat auftraten (Abb. 37, Signal 1 und 4). Lediglich die Entfernung des Salzes funktionierte über diese Art der Chromatographie gut, weil das Signal, das mit der Elution des Salzes korreliert, zeitlich verzögert war (Abb. 37, Signal 1,4

und Signal 5). Bei der Ionenverzögerungschromatographie wurden die Elutionsfraktionen notwendigerweise auf ein sehr kleines Volumen von ca. 2 mL eingestellt, was einen deutlichen Probenverlust verursachte, da die einzelnen Reagenzgläser nicht rückstandsfrei geleert werden konnte und so letztlich nicht das vollständige NAGGN des Probenmaterials gewonnen werden konnte. Die zwischengeschaltete Vakuum-Destillation, um die Elutionsfraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie so weit einzuengen, dass die Probe wieder ein geeignetes Volumen für die zweite Chromatographie (Ionenverzögerung) besaß, barg eine weitere Problematik in dem Prozess der Zweischritt-Aufreinigung an dem ein NAGGN-Verlust hätte vonstatten gehen können. Es ist nämlich unklar, ob die starke Erhitzung (ca. 80 °C), die trotz des Unterdrucks bei der Destillation notwendig war, Auswirkungen auf das kompatible Solut NAGGN hatte, weil die Hitzestabilität des Solut NAGGN bislang nicht beschrieben wurde. Der sich an die chromatographischen Schritte anschließende Gefriertrocknungsschritt der NAGGN enthaltenden Fraktionen umfasst ein relativ großes Volumen (500 mL – 1 L) und ist dementsprechend zeitaufwendig (2-3 Tage).

Die Einschritt-Aufreinigung über einen Mischbetttauscher bietet einige Vorteile. Der Vorteil, der wohl am meisten hervorzuheben ist, ist die Tatsache, dass über solch ein Säulenmaterial sowohl die Aminosäuren Glutamat und Glutamin als auch Salz (NaCl) von dem ungeladenen NAGGN abgetrennt werden können. Da das extrahierte Zellmaterial des Stammes hohe Glutamat-, Glutamin- und Salz-Gehalte vorwies, war eine Trennung dieser Komponenten von NAGGN ein notwendiger Schritt. Das NAGGN interagiert reversibel mit dem Säulenmaterial des Mischbetttauschers und wurde von der Säule eluiert. Es wurde ein Signal identifiziert, dass sich anhand sich anschließender HPLC- und NMR-Analysen als das kompatible Solut NAGGN ohne kontaminierende Komponenten wie Glutamat, Glutamin oder Salz erwies (Abb. 38). Die Prozessdauer ist mit 20 min auch wesentlich verkürzt. Allein die chromatographischen Schritte des Zweischrittverfahrens dauerten ca. 10 h wobei die Einengungen des Volumens mit erneuten 2-3 h noch nicht mit einberechnet worden sind. Daraus ergibt sich eine Zeitersparnis des Einschritt-Aufreinigungsverfahrens von 11,5 - 12,5 h im Vergleich zum Zweischrittverfahren.

Die Reinheit des Produktes wurde über das Einschritt-Verfahren auch gesteigert. Nach dem Zweischritt-Verfahren wurden Glutamin und Glutamat als Verunreinigungen des isolierten NAGGN nachgewiesen. Die ¹³C-NMR spektroskopische Messung des über das Einschritt-Verfahren isolierten NAGGNs zeigte, dass keine weiteren Signale, die nicht dem kompatiblen

Solut NAGGN entsprechen, vorhanden waren (Abb. 38). Es gelang erstmalig, das kompatible Solut NAGGN in einer reinen Form zu erhalten.

6.3 Kristallisation

Die Kristallisation des kompatiblen Soluts NAGGN wurde zur Erhöhung des Reinheitsgrades von bereits isoliertem NAGGN durchgeführt. Es wurde ein Mischverfahren der Evaporations- und Kühlungskristallisation verwendet. Als Lösungsmittel diente ebenso wie bei der Kristallisation des Ectoins wasserfreies Methanol (Lapidot *et al.*, 1998). Durch den Evaporationsschritt wurde die Lösung übersättigt. Die anschließende Kühlung ermöglichte die Induktion der Kristallkeimbildung. Durch den Aufreinigungsschritt der Ectoin Kristallisation fand ein hoher Ausbeuteverluste statt. Diese Problematik sollte bei der Kristallisation des kompatiblen Soluts NAGGN berücksichtigt werden. Selbst ohne Kristallisationsschritt wurde bereits sehr reines NAGGN gewonnen, wie durch eindimensionale ¹³C-NMR-Messungen (Abb. 39) bestätigt wurde. Allerdings könnte ein Kristallisationsschritt im Hinblick auf die NAGGN Gewinnung aus dem Medium einen Bestandteil einer möglichen Aufreinigungsstrategie darstellen. Die Produktionsverfahren von anderen kompatiblen Soluten wie Betain, Trehalose oder Mannitol enthalten ebenfalls Kristallisationsschritte (Paananen *et al.*, 2007; Zhang, 2006; Peng *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 2008). Es gibt unterschiedliche Kristallisationsverfahren für die Reinigung der sehr diversen kompatiblen Solute. Bei der Reinigung des kompatiblen Soluts Betain wird durch die Zusammenführung von zwei verschiedenen Lösungen (Lsg. A= Mischung aus Natriumcarbonat mit Chlorsäure; Lsg. B= Lösung A mit zugegebenem Trimethylamin) und anschließender Dekompression eine Übersättigung erzielt (Paananen *et al.*, 2007; Zhang, 2006). Die Kristallisation des kompatiblen Soluts Trehalose erfordert dagegen das Lösungsmittel Ethanol anstatt wie bei der Ectoin Kristallisation Methanol (Peng *et al.*, 1999). Im Falle des NAGGNs wäre wegen seiner relativ schlechten Löslichkeit in Methanol ein alternatives Lösungsmittel wie Ethanol, dass aus der Trehalose Kristallisation bekannt ist, zu erwägen.

6.4. NAGGN-Gehalte in den Zellen und im Medium von *H. elongata* AKB vs. *P. putida* KT2440

Für die Aufreinigung des kompatiblen Soluts Ectoin aus *H. elongata* wird das „bacterial milking“-Verfahren angewendet. Bei diesem Verfahren wird schon bei der Fermentation durch hyperosmotische Bedingungen die Synthese von kompatiblen Soluten wie Ectoin

induziert. Durch einen hypoosmotischen Schock wird intrazellulär akkumuliertes Solut an den extrazellulären Raum abgegeben und später aus dem Medium isoliert. Die verbleibenden *H. elongata* Zellen können für einen erneuten hyperosmotischen Schock eingesetzt werden. Die chromatographischen Schritte der Ectoin-Isolierung erfolgen über einen Kationentauscher (Sauer & Galinski, 1997).

Für eine biotechnologische Produktion des Solut NAGGN könnte man ebenfalls ein solches „bacterial milking“ Verfahren anwenden (Sauer & Galinski, 1997). Allerdings weist der Stamm *H. elongata* AKB eine Besonderheit auf. Von dem Stamm *H. elongata* AKB synthetisiertes NAGGN wird auch ohne einen hypoosmotischen Schock in großem Maße an das Medium abgegeben (Abb. 40). Die Medienproben des Stammes *P. putida* KT2440, aus dem die biosynthetischen Gene für das kompatible Solut NAGGN stammen, wiesen kein NAGGN auf (Abb. 40). Bislang wurden noch keine Transportmechanismen für das kompatible Solut NAGGN in dem Stamm *P. putida* KT2440 identifiziert. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass dieser Stamm Transportmechanismen für NAGGN besitzt, weil kein NAGGN im Medium detektiert wurde (Abb. 40) und für andere polare (Glucosylglycerol) bzw. zwitterionische kompatible Solute (Betain und Ectoin) spezifische Transportmechanismen bereits beschrieben wurden (Touzé *et al.*, 2001; Hagemann *et al.*, 1997).

In dem NAGGN Produktionsstamm *H. elongata* AKB steht die NAGGN-Biosynthese unter der Kontrolle des Ectoinbiosynthese Promotors. Die Regulierungsmechanismen der Ectoinbiosynthese aus *H. elongata* sind noch nicht bekannt. Deshalb ist es an dieser Stelle nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob der NAGGN-Efflux von *H. elongata* AKB in das Medium auch regulatorische Ursachen haben könnte. Der NAGGN Transport über die Zellmembran ins Medium könnte über Efflux-Systeme wie mechanosensitive Kanäle vollzogen werden (Booth *et al.*, 2007).

Das TeaABC-Transportsystem aus *H. elongata* weist eine starke Homologie zu den TRAP-T-Systemen auf („tripartite ATP-independent periplasmic transporters“). Durch Transposonmutagenese wurde die Deletionsmutante *H. elongata* AFE35 konstruiert, die eine Insertion des Transposons Tn1732 in dem Gen *teaC* aufweist. Das Gen *teaC* kodiert für eines der Transportproteine des TeaABC-Transport-Systems. Mit Hilfe dieser Mutante wurde festgestellt, dass die Ectoin- und Hydroxyectoin-Aufnahme beeinträchtigt wurde. Desweiteren wurde vermutet, dass das TeaABC-Transportsystem hauptsächlich für die Aufnahme von aus der Zelle diffundiertem Ectoin verwendet wird, weil die natürlichen Habitate der Halophilen

meistens nicht ausreichend Ectoin vorweisen, als das die Aufnahme von externem Ectoin die Salztoleranz genügend steigern würde. Über die Spezifität des Transporters ist noch nicht viel bekannt. Allerdings handelt es sich bei den Substraten Ectoin und Hydroxyectoin, die über dieses Transportsystem in die Zelle transportiert werden, um strukturell sehr ähnliche Verbindungen. Daher ist ein Transport des strukturell sehr abweichenden Osmolyts NAGGN über das TeaABC-System aus *H. elongata* eher unwahrscheinlich (Gramman *et al.*, 2002). Gezielte Untersuchungen, ob NAGGN von *H. elongata* aufgenommen wird stehen noch aus. Erste indirekte Hinweise, dass ein solcher NAGGN-Transport in die Zellen ausbleibt, sind die hohen NAGGN-Konzentrationen im Medium des NAGGN-Produktionsstammes *H. elongata* AKB.

Unabhängig von den Ursachen der NAGGN Sekretion ins Medium stellt diese Tatsache einen Vorteil bei der Produktion dar. Es muss kein „bacterial milking“ Verfahren angewendet werden, weil auch ohne einen hypoosmotischen Schock die *H. elongata* AKB Zellen das kompatible Solut NAGGN in den extrazellulären Raum entlassen.

6.5. Produktivitäten

Basierend auf den spezifischen Produktivitäten für das kompatible Solut NAGGN ist es möglich den Stamm zu ermitteln, der für eine wirtschaftliche Produktion am besten geeignet ist.

Unter der spezifischen Produktivität der einzelnen Stämme versteht man die erzielte Menge (mg) einer Substanz in diesem Fall pro Zelltrochgewicht (g TG) und Zeit (h).

Die Produktivität der NAGGN produzierenden Stämme lag in den Zellen von *P. putida* KT2440 am höchsten. Die Produktivitäten der beiden *E. coli* Stämme DH5 α und BKA-13, die das Plasmid pK18-naggn mit den NAGGN-Biosynthesegenen enthielten, lagen ungefähr bei der Hälfte der Produktivität von *P. putida*. Der *E. coli* Stamm BKA-13 besaß trotz ca. 90 mg/g TG NAGGN in den Zellen eine vergleichsweise geringe Produktivität. Der Stamm *E. coli* BKA-13 wies zwar im Vergleich zu dem *E. coli* DH5 α Stamm eine viel geringere Wachstumsrate auf, aber der NAGGN-Gehalt war gleichzeitig wesentlich erhöht. In dem Stamm *E. coli* DH5 α verhielt es sich genau umgekehrt. In diesem Stamm war die Wachstumsrate deutlich höher als in dem Stamm *E. coli* BKA-13, aber der NAGGN-Gehalt betrug nur ungefähr 20 mg/g TG. Trotz der unterschiedlichen NAGGN-Gehalte und Wachstumsraten lag in beiden *E. coli* Stämmen nur ungefähr die gleiche Produktivität vor, die ungefähr halb so groß wie die des natürlichen NAGGN-Produzenten *P. putida* KT2440 war.

Der heterologe Expressionsstamm *H. elongata* AKB ist von der Produktivität des in dem Zellmaterial vorhandenen NAGGNs mit dem natürlichen Produzentenstamm *P. putida* KT2440 zu vergleichen, weil die Produktivitäten in einem Bereich von $11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ liegen. Im Vergleich dazu liegt der Wildtyp Stamm *H. elongata* mit der Produktivität des kompatiblen Soluts Ectoin deutlich über diesen Produktivitätswerten. Für das Osmolyt Ectoin ist eine Produktivität von $22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 3 % NaCl gegeben (Dötsch *et al.*, 2008). Das bedeutet ungefähr eine doppelt so hohe Ectoin Produktivität des Wildtyps *H. elongata* verglichen mit der NAGGN Produktivität des Stammes *H. elongata* AKB bei der gleichen Salinität. Allerdings entlässt der Stamm *H. elongata* AKB das kompatible Solut NAGGN auch in das Medium, wodurch eine weitere Möglichkeit gegeben ist, vorhandenes NAGGN zu gewinnen. Ein möglicher Grund für die NAGGN-Ausscheidung ins Medium könnte das Fehlen von Transportmechanismen für NAGGN in dem Stamm *H. elongata* sein. Wie in Kapitel IV.6.4 im Detail beschrieben, ist für das TeaABC-Transportsystem bislang nur ein Transport von Ectoin und Hydroxyectoin nachgewiesen worden (Gramman *et al.*, 2002). Ein Nachweis bislang unbekannter Transportmechanismen für das Solut NAGGN in *P. putida* KT2440 könnte Aufschluss über das Vorhandensein homologer Transportmechanismen in *H. elongata* geben. Das in dem Medium vorhandene NAGGN steigert die Werte für die NAGGN Produktivität deutlich. So ist bei 4 % NaCl statt einer Produktivität von ungefähr $11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TG} \cdot \text{h}^{-1}$ eine ungefähr 10 fache Produktivität erzielt worden. Diese Werte übersteigen sogar den sehr effizienten Produktionsstamm *H. elongata* für das kompatible Solut Ectoin und machten den Stamm *H. elongata* AKB noch interessanter als Produktionsstamm für NAGGN. Für die Isolierung des kompatiblen Soluts NAGGN aus dem Medium ist im Rahmen dieser Arbeit keine entsprechende Methode entwickelt worden. Eine vielversprechende Methode stellt aber die Elektrodialyse dar. Mögliche Schwierigkeiten bei der Elektrodialyse entstehen hauptsächlich, wenn in den aufzureinigenden Proben zu viel Salz enthalten ist wie dies bei Anzuchten unter Hochsalz der Fall wäre. Diese Problematik ist aber unter den Produktionsbedingungen des Stammes *H. elongata* AKB bei einem relativ moderaten Salzgehalt von 3 % nicht gegeben.

Das bedeutet, dass der Stamm *H. elongata* AKB bislang der Stamm mit der höchsten Produktivität für das kompatible Solut NAGGN ist.

7. Charakterisierung des kompatiblen Solut NAGGN

Nachdem das kompatible Solut NAGGN erfolgreich isoliert wurde, konnte es nun näher charakterisiert werden. Dies wurde einerseits durch Supplementierungsversuche erzielt, aber auch indem die stabilisierende Wirkung des Solut NAGGN auf ganze Zellen und Proteine untersucht wurde. Für diese Versuche wurde aufgereinigtes, aber noch nicht kristallisiertes NAGGN eingesetzt.

7.1. Solut Supplementierung von *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$)

Der Stamm *H. elongata* WUB02 ($\Delta ectA$, $\Delta ectC$) wurde mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten in einer Konzentration von 2 mM supplementiert und in einem Mineralsalzmedium mit einer Salinität von 4 % angezogen. Der Stamm *H. elongata* WUB02 wurde verwendet, weil er Deletionen der Gene *ectA* und *ectC* besitzt, wodurch er kein Ectoin oder ein osmotisch wirksames Intermediat der Ectoin Biosynthese bilden kann. Die Wachstumsrate des Stammes *H. elongata* WUB02 ist ohne Supplement in Form eines kompatiblen Solut sehr gering (Abb. 44, Abb. 42). Dies deutet darauf hin, dass dieser Stamm auf die Aufnahme von Osmolyten angewiesen ist, um dem osmotischen Druck, in Form der 4 % NaCl des Mediums entgegen zu wirken.

Die mit Abstand wirkungsvollsten Solute waren die wirtseigenen Ectoin und Hydroxyectoin, die für ihre starke wachstumsfördernde Wirkung bekannt sind (Bestvater *et al.*, 2008). Die Kulturen, die mit Betain supplementiert wurden, zeigten ein etwas vermindertes Wachstum im Vergleich zu den Kulturen, die mit Ectoin und Hydroxyectoin supplementiert wurden. Das Wachstum war aber immer noch deutlich besser als von den Kulturen, die mit Mannitol, Glutamat, Trehalose und NAGGN versetzt wurden. Das bedeutet, dass das kompatible Solut NAGGN keine deutliche wachstumsfördernde Wirkung für den Stamm *H. elongata* WUB02 erzielte. Dies deutet darauf hin, dass das Osmolyt NAGGN höchstwahrscheinlich nicht von den Zellen aufgenommen werden kann. Diese Vermutung unterstützt auch die These, dass die Akkumulation im Medium von dem Produktionsstamm *H. elongata* AKB auf fehlende Transportmechanismen zurückzuführen ist (Abschn. IV.6.4). Eine eigenständige Versuchsreihe zur NAGGN Aufnahme von *H. elongata* würde zur Aufklärung dieser Thematik beitragen.

7.2. Solut Supplementierung von *E. coli* DH5 α

Cayley *et al.* (1992) beschrieben, dass eine exogene Betain Supplementierung von *E. coli* eine Verringerung der Trehalose-Akkumulation bewirke. Die Reduzierung des Trehalose-Gehalts muss dabei auch auf die energiesparsamere Aufnahme von kompatiblen Soluten wie Betain zurückgeführt werden und nicht allein auf die osmotische Wirksamkeit eines kompatiblen Soluts wie Betain.

Analog zu den Versuchen von Cayley *et al.* (1992) wurde *E. coli* DH5 α mit je 2 mM der Solute Betain und NAGGN supplementiert. Anschließend wurde der interne Gehalt der kompatiblen Solute von *E. coli* DH5 α bestimmt. Von diesem Stamm ist bekannt, dass er über die Transporter ProP und ProU Betain aufnehmen kann und somit für den Versuch eine eindeutige Positivkontrolle vorhanden war (Jebbar *et al.*, 1992; Cairney *et al.*, 1985; Le Rudulier *et al.*, 1991). Die internen Solut-Gehalte zeigten, dass bei der Negativkontrolle ohne Supplementierung nur das wirtseigene kompatible Solut Trehalose gebildet wurde. Die Positivkontrolle mit dem Zusatz von Betain wies einen internen Betain-Gehalt auf und keine Trehalose-Akkumulation. Das kompatible Solut Betain wurde von den Zellen aufgenommen und zeigte eine ähnliche osmotische Wirkung wie das kompatible Solut Trehalose (Cayley *et al.*, 1992). Die Rahmenbedingungen des Versuchs waren gut gewählt. In dem eigentlich entscheidenden Versuchsteil, nämlich der Supplementierung mit dem kompatiblen Solut NAGGN, wurde kein internes NAGGN nachgewiesen. Das Bakterium *E. coli* DH5 α akkumulierte Trehalose mit ähnlichen Gehalten wie in der un-supplementierten Negativkontrolle, um sein osmotisches Ungleichgewicht auszugleichen. Das NAGGN wurde noch nicht einmal in geringen Konzentrationen in den Zellen nachgewiesen, was stark darauf hindeutet, dass es nicht von den Zellen aufgenommen wird. Die Überprüfung der extrazellulären NAGGN-Gehalte müsste in diesem Zusammenhang in weiteren Versuchen abgeklärt werden. Eine weitere Erklärung könnte auch eine schlechtere osmotische Wirksamkeit von NAGGN im Vergleich zu Betain und dem wirtseigenen Solut Trehalose sein. Erste Schritte, um die Resultate dieses Versuchs näher zu beleuchten wären die Bestimmung der extrazellulären NAGGN-Gehalte und die Identifizierung potentieller Transportproteine in *Pseudomonas* Spezies oder *Sinorhizobium meliloti*, die einen Import des kompatiblen Soluts NAGGN in das Zytoplasma ermöglichen.

7.3. Trockenstabilisierung ganzer Zellen durch das kompatible Solut NAGGN

Zuvor wurden bereits die Stämme *H. elongata* WUB02 und *E. coli* während des Wachstums mit kompatiblen Soluten supplementiert. In diesem Versuchsteil wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten des Stammes *H. elongata* WUB02 unter Zusatz unterschiedlicher Solute nach dem Gefriertrocknungsstress dokumentiert. Der Solutzusatz erfolgte in einer Konzentration von 2 mM. Die Zellen wurden vor dem Gefriertrocknungsschritt bei Raumtemperatur inkubiert, um den Bakterienzellen eine Solutaufnahme zu ermöglichen. Allerdings gab es bei den vorangegangenen Versuchen, z. B. bei der Supplementierung von *H. elongata* WUB02 Hinweise darauf, dass die Solutaufnahme nicht erfolgt (Abschn. IV., 7.1). Das kompatiblen Solute Trehalose und Hydroxyectoin zeigten eine leicht erhöhte Zahl koloniebildender Einheiten. Unter dem Zusatz von NAGGN lag die Anzahl der koloniebildenden Einheiten leicht über der der Kontrolle.

Bei ähnlichen Versuchen mit *E. coli* Zellen wurden 500 mM Solut zugesetzt (Louis *et al.*, 1994). Bei einem solchen Versuchsaufbau mit einer höheren Solutkonzentration zeigte sich die Wirkung der Solute von außen deutlicher. Dennoch war aber auch hier der Einsatz der Solute Trehalose und Hydroxyectoin für eine hohe Anzahl koloniebildender Einheiten nach einem Gefriertrocknungsschritt förderlich (Louis *et al.*, 1994). Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch ist die Aufnahme der Osmolyte vor dem Gefriertrocknungsschritt maßgeblich. Eine weiterführende Arbeit wäre mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wie dem von Louis möglich (Louis *et al.*, 1994). Allerdings liegt die maximale Löslichkeit des Solut NAGGN bei 200 mM. Um eine Vergleichbarkeit innerhalb des Versuchs zu gewährleisten, müssten alle verwendeten Solute mit einer maximalen Konzentration von 200 mM eingesetzt werden.

7.4. LDH-Assay

Das isolierte kompatible Solut NAGGN wurde verwendet, um die möglichen Stabilisierungseffekte dieses Osmolyts auf Proteine oder Enzyme zu testen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) als Testsystem ausgewählt (Lippert & Galinski, 1992). Das Enzym LDH wurde Einfrier-Auftau-Zyklen unterworfen und unter Zusatz von jeweils einem kompatiblen Solut auf die verbleibende Restaktivität hin getestet. Das kompatible Solut NAGGN zeigte eine starke stabilisierende Wirkung auf das Enzym LDH bei schon sehr geringen Konzentrationen wie 50 mM. Der stabilisierende Effekt auf das

Enzym LDH war verglichen mit anderen sonst sehr potenten Enzymstabilisatoren unter den kompatiblen Soluten wie Trehalose, Ectoin und Hydroxyectoin, die in derselben niedrigen Konzentration eingesetzt wurden, wesentlich deutlicher. Kompatible Solute wie Ectoin und Hydroxyectoin wiesen bislang erst bei Konzentrationen ab 1 M ähnlich stabilisierende Wirkung auf (Lippert & Galinski, 1992). Da in diesem Versuch lediglich aufgereinigtes NAGGN eingesetzt wurde und kein bereits kristallisiertes, können Effekte durch enthaltene Verunreinigungen nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wurde das aufgereinigte NAGGN sowohl durch HPLC-Analysen, als auch durch NMR-Spektroskopie bezüglich seiner Reinheit untersucht bevor es eingesetzt wurde. Der gezeigte stabilisierende Effekt von NAGGN auf Proteine könnte auch in einer spezifischen Interaktion zwischen dem Solut und dem Enzym Laktatdehydrogenase begründet sein. Das kompatible Solut Betain ist beispielsweise ein guter Schutzstoff für das Enzym Phosphofruktokinase, aber es hat nur einen geringen Effekt auf die Laktatdehydrogenase (Galinski, 1993). Deshalb sollten weitere Enzyme im Hinblick auf protektive Wirkungen des kompatiblen Solut NAGGN getestet werden. Die Phosphofruktokinase (PFK) würde sich hier auch als Testsystem eignen, weil sie ebenso wie die LDH sowohl hitzesensitiv als auch kältesensitiv ist (Lippert & Galinski, 1992; Galinski, 1993). Weitere interessante Temperatur sensitive Enzyme mit einem bereits entwickelten Assay wären ebenfalls weitere geeignete Kandidaten. Zudem wäre darüber hinaus die Verbesserung von Lagerungsstabilitäten verschiedener Enzyme unter Zusatz von kompatiblen Soluten ein weiterer interessanter Gesichtspunkt.

Die Wirksamkeit von NAGGN unter Einsatz geringer Konzentrationen (50 mM) lässt vermuten, dass im Fall des NAGGN ein neuartiger Mechanismus der Osmolyt-Protein-Interaktion vorhanden ist. Diese Beobachtungen widersprechen den bekannten Mechanismen, die alle von einer hohen Osmolyt-Konzentration (ca. 1 M und mehr) ausgehen: das „*Preferential Interaction Model*“ von Arakawa und Timasheff (1983), das „*Water Density Fractions*“ von Wiggins (1990), der „osmophile Effekt“ von Bolen und Baskakov (2001). Die Aufklärung des genauen Mechanismus der hier vorliegenden Osmolyt-Protein-Interaktion erfordert weitreichende experimentelle Vorgehensweisen, um dieses interessante Forschungsgebiet zu erschließen.

7.5. Charakterisierung der Lösungsmittelzugänglichen Oberflächen

Für die Interaktion zwischen Osmolyten und zu stabilisierenden Proteinen gibt es bislang noch keinen beschriebenen allgemeingültigen Mechanismus. Es gibt mehrere Modelle die jeweils einen Teilaspekt beleuchten, die aber nicht auf alle unterschiedlichen Osmolyte, Stresssituationen und Proteine angewendet werden können. Die bekanntesten beschriebenen Modelle sind das „*Preferential Interaction Model*“ von Arakawa und Timasheff (1983), das später von Timasheff (1998) revidiert worden ist („*Preferential Exclusion Model*“), die „*Water Replacement Hypothesis*“ von Clegg *et al.* (1982), „*Water Density Fractions*“ von Wiggins (1990) und der „osmophobe Effekt“ von Bolen und Baskakov (2001).

Ein weiterer Ansatz eine allgemein gültige Regel für die Interaktion von Proteinen und Osmolyten zu finden war Streets Modell aus dem Jahr 2006 (Street *et al.*, 2006). Es wurde beobachtet, dass die Transferenergie ΔG_{tr} des Peptidrückgrats (Diketopiperazin wurde als Modell für das Peptidrückgrad verwendet) von Wasser zu einer Wasser-Osmolyt-Lösung negativ mit der polaren Oberfläche der Osmolyte korreliert (Street *et al.*, 2006). Ein solcher Zusammenhang würde bedeuten, dass es mit Hilfe der Transferenergie möglich ist den Grad der Proteinstabilisierung durch ein Osmolyt zu messen.

Die destabilisierenden Osmolyte weisen sehr stark polare Oberflächen in Kombination mit positiven Oberflächenbereichen auf, wie im Fall von Urea. Dies erlaubt eine favorisierte Interaktion der positiven Oberflächen des Urea mit den Carboxylgruppen des Peptidrückgrats. Eine solche Interaktion mit dem Peptidrückgrad eines Proteins führt zu einer Destabilisierung des Proteins. Die stabilisierenden Osmolyte besitzen größere negative Oberflächenbereiche und haben einen größeren Anteil unpolarer Oberfläche an der Gesamtoberfläche. Für ein Osmolyt wie TMAO finden durch die große unpolare Oberfläche des Moleküls überwiegend neutrale Interaktionen mit dem Peptidrückgrad statt. Daraus resultiert eine räumliche Distanz zu dem Protein, wodurch das Protein stabilisiert wird. Dieses von Street *et al.* (2006) beschriebene Modell fügt sich sehr gut in die bisher aufgestellten Theorien zum Mechanismus der Osmolyt-Protein-Interaktion ein. Das „*Preferential Interaction*“-Modell beschreibt, dass Osmolyte wie Glycerol und Betain von der Oberfläche des Proteins ausgeschlossen werden (Arakawa & Timasheff, 1983). Dieses Phänomen wird auch von Street *et al.* berücksichtigt (Street *et al.*, 2006). Die „*Water Replacement Hypothesis*“ (Clegg *et al.*, 1982) in Streets Modell einzuordnen ist dagegen schwieriger, weil der hier beobachtete Austausch von Wasser gegen Solute unter Bedingungen extrem niedriger Wasseraktivität geschieht. Solche Zustände sind z. B. bei hoher Trockenheit vorherrschend

und damit eine Situation, die nicht unter die von Street erfassten Modellbedingungen gehört. Das „*Water Density Fractions*“-Modell bezieht die unterschiedliche Dichte des Wassers mit ein. Wasser mit einer hohen Dichte besitzt kurze Bindungen, die relativ schwach sind und eine relativ geringe dreidimensionale Ordnung vorweisen. Liegt das Wasser dagegen mit einer geringen Dichte vor, dann sind die Bindungen sehr stark und lang. Darüber hinaus ist es sehr viel geordneter. Osmolyte tendieren zur Bildung einer ausgeprägten Hydrathülle, was in dichtem Wasser, in dem die einzelnen Bindungen schwächer sind, erleichtert wird. Das führt dazu, dass das umgebende Wasser außerhalb der Hydrathülle eines Osmolyts weniger dicht ist. Weniger dichtes Wasser führt durch seine relativ starken Bindungen zum einen zu einer Verringerung der Hydrierung hydrophober Bereiche im Inneren eines Proteins und zum anderen zu einer Verstärkung des hydrophoben Effekts der unpolaren Aminosäuren im Proteininneren. Durch diesen indirekten Effekt der Osmolyte wird das Protein stabilisiert (Wiggins, 1990). Street *et al.* gehen zwar nicht näher auf unterschiedliche Wasserdichten und die damit zusammenhängenden Protein-Osmolyt-Mechanismen ein, aber die von Street *et al.* beobachteten Phänomene widersprechen dem „*Water Density Fractions*“-Modell nicht. Der „osmophile Effekt“ wurde von Bolen und Baskakov (2001) als eine Kraft, die zusätzlich zu den bekannten Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen Kräften, van der Waals- und hydrostatischen Wechselwirkungen vorhanden ist, beschrieben. Der hydrophobe Effekt führt zu einer Zusammenlagerung von apolaren Seitenketten der Aminosäuren eines Proteins in wässriger Lösung. Der „osmophile Effekt“ beeinflusst dagegen das Proteinerückgrat. Hierbei wird das Proteinerückgrat von der Soluttlösung ausgeschlossen („*preferential exclusion*“) und dadurch die native Proteinkonformation stabilisiert. Diese Theorie stimmt sowohl mit der „*Preferential Interaction*“-Theorie überein aber auch mit dem Modell das Street *et al.* entworfen haben.

Die kleinen Moleküle wie TMAO und Betain passen sehr gut in Streets Modell. Die positiven Partiaalladungen des Stickstoffatoms von Betain und TMAO werden in beiden Strukturen auf die umgebenden Methylgruppen delokalisiert, so dass auf der Moleküloberfläche lediglich eine sehr kleine positive Fläche vorhanden ist. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche ist ca. 1,4 Å von der Moleküloberfläche entfernt. Dieser Abstand bewirkt, dass die geringe positive Partiaalladung des Stickstoffatoms im Bereich der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche nicht mehr detektierbar ist. Die Zucker, z. B. Trehalose und Saccharose, weichen dagegen stark ab (Abb. 51, Street *et al.*, 2006). Die Oberflächeneigenschaften von Ectoin und Hydroxyectoin wurden in dieser Arbeit nach der Methode von Street *et al.* berechnet (Street *et*

al., 2006). Die Transferenergien ΔG_{tr} von Ectoin und Hydroxyectoin belaufen sich auf ca. 50 cal/mol und ca. 40 cal/mol (Voß, 2002).

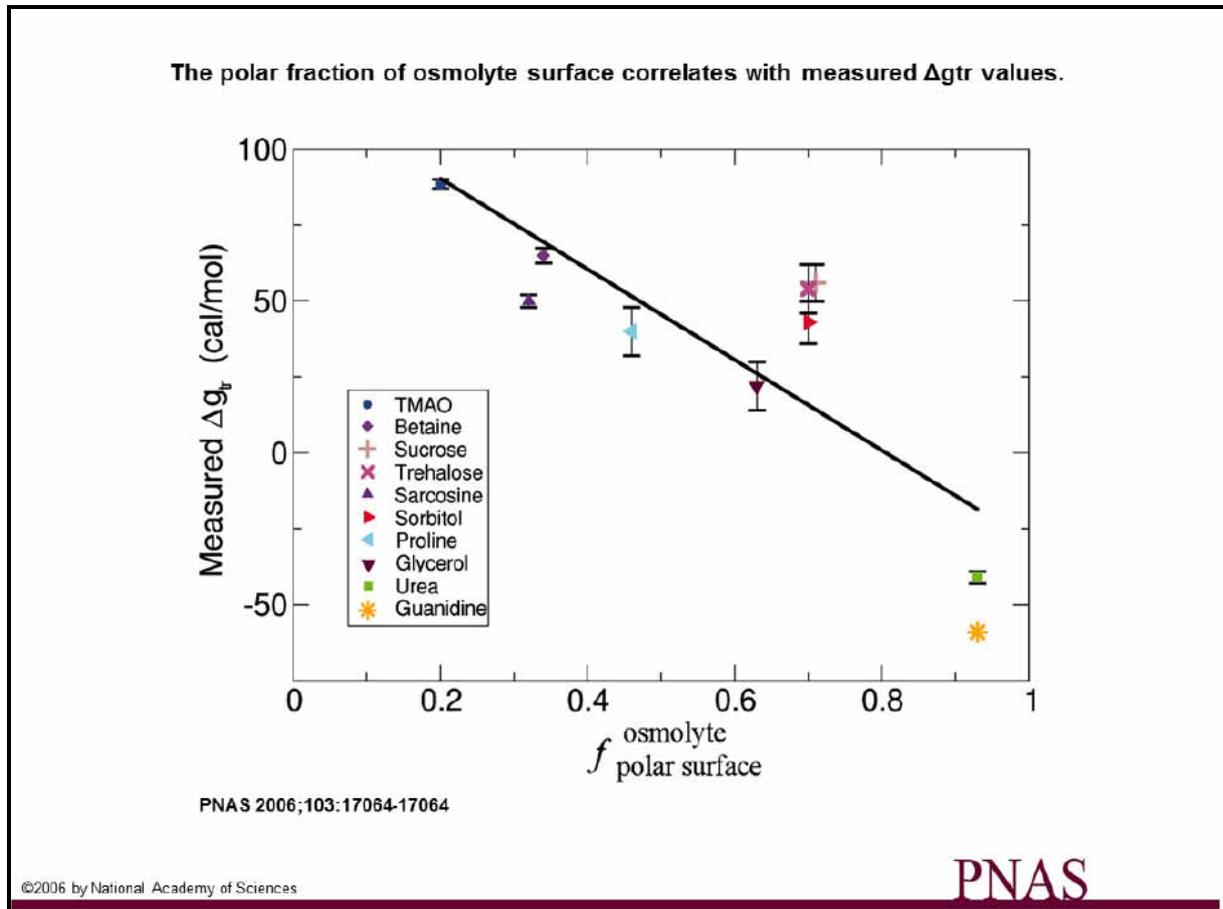


Abb. 51: Die lineare Regressionslinie (schwarze Linie) hat eine negative Steigung mit einem Korrelationskoeffizient von 0,81, der zeigt, dass die Rückgrat/Osmolyt Interaktionen favorisiert werden je polarer das Osmolyt ist (Street *et al.*, 2006).

In Relation mit dem bestimmten Verhältnis von polaren Oberflächenbereichen zur Gesamtoberfläche liegen die Transferenergien von Ectoin und Hydroxyectoin im Bereich der Ausgleichsgeraden und passen somit sehr gut in das durch Street aufgestellte Osmolyt-Protein-Interaktionsmodell. Das kompatible Solut NAGGN besitzt verglichen mit den bislang getesteten Osmolyten sehr ungewöhnliche Oberflächeneigenschaften. Die polaren Oberflächenanteile an der Gesamtoberfläche lassen sich ungefähr mit denen der Zucker vergleichen. Die polare Oberfläche bei den meisten untersuchten Soluten besitzt einen sehr hohen negativen Oberflächenanteil. Im Fall des Solut NAGGN sind die negativen und positiven Oberflächenanteile nahezu ausgeglichen. Aber auch hier wie bei den anderen

stabilisierenden Osmolyten überwiegt der negative Oberflächenbereich. Allerdings wird die Einordnung in Streets Modell dadurch problematisch, dass die Messung der Transferenergien durch die geringe NAGGN-Löslichkeit (ca. 200 mM) nicht möglich ist. Nach Streets Modell läge die Transferenergie im Bereich des Glycerins. Glycerin besitzt aber keine positiven Partialladungen und damit gänzlich andere Eigenschaften. Deshalb ist es fraglich, ob NAGGN ähnliche Stabilisierungseigenschaften wie Glycerin aufweist.

Ein Punkt, der in allen Osmolyt-Protein-Interaktionsmodellen vernachlässigt wurde, ist die Eigenschaft der Proteine bzw. deren Oberflächen. Die Diversität der Proteine wurde anhand der Oberflächenpotentiale unterschiedlicher Proteine visualisiert (Abb. 52). Stellvertretend für ein mesophiles Enzym wurde die Lactatdehydrogenase aus dem Kaninchen analysiert. Als thermophile bzw. moderat halophile Enzyme wurden die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* und die Glucaratdehydratase aus *Chromohalobacter salexigens* verwendet. Auffallend ist, dass das thermophile Enzym Pfu-Polymerase eine extrem negative Oberfläche besitzt. Dies passt auch zu der Beobachtung, dass thermophile Organismen einige kompatible Solute synthetisieren oder akkumulieren, die negativ geladen sind (DaCosta *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 2002). Das moderat halophile Enzym Glucaratdehydratase besitzt eine überwiegend negative Oberfläche, aber es weist auch einige positive Oberflächenanteile auf. Solche moderat halophilen Enzyme werden durch kompatible Solute wie Ectoin stabilisiert, die ebenfalls eine eher negative Oberfläche besitzen, aber dennoch positive Oberflächenbereiche aufweisen. Aufgrund der Proteinoberflächenpotentiale alleine ist es ebenfalls schwierig genaue Vorhersagen über die Proteinstabilisierung bestimmter Osmolyte zu treffen. Die Analyse der Oberflächenpotentiale der Proteine diene lediglich dem Zweck, Unterschiede in den Oberflächeneigenschaften der einzelnen Proteine hervorzuheben, damit bei zukünftigen Proteinstabilisierungsversuchen eine größere Anzahl an Proteinen eingesetzt wird und deren Eigenschaften stärker bei der Auswahl berücksichtigt werden.

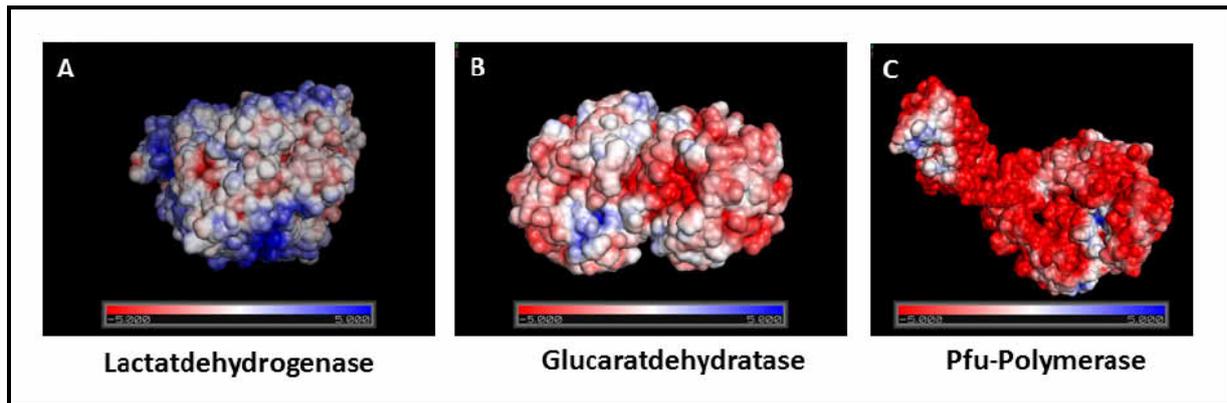


Abb. 52: Die Oberflächenpotentiale der Enzyme Lactatdehydrogenase (A), Glucaratdehydratase (B) und der Pfu-Polymerase (C) wurden mit dem Program PyMOL und dem Plugin APBS berechnet.

Rot = negativ; Blau = positiv; Weiß = neutral

Unter den untersuchten kompatiblen Soluten weist bislang kein anderes Solut ähnliche Charakteristika und Oberflächeneigenschaften wie das NAGGN auf (Abb. 48). Deshalb bleibt es spannend, ob das NAGGN einzigartig ist oder ob es zu einer Gruppe noch unbeschriebener kompatibler Solute gehört.

8. Ausblick

Bei der Untersuchung der NAGGN-Biosynthese wurde festgestellt, dass die Peptidase PP1748 sehr wahrscheinlich nicht für die eigentliche Biosynthese benötigt wird, sondern vermutlich eher eine abbauende Funktion inne hat (Abschn. I.4.1.2). Die Funktionalität der Peptidase PP1748 könnte in *in vitro* Versuchen mit NAGGN als Substrat untersucht werden. Für dieses Enzym müssten ebenfalls die Expressionsbedingungen und entsprechende *in vitro* Assays entwickelt werden. Wenn sich die Vermutung einer Abbaureaktion durch *in vitro* Versuche mit dem Enzym PP1748 experimentell bestätigte, eröffnete dies die Möglichkeit den konstruierten Expressionsstamm *H. elongata* AKB für das kompatible Solut NAGGN durch eine genomische Deletion des Gens *PP1748* zu verändern. Durch diese Deletion selbst könnte ebenfalls dargelegt werden, ob das Enzym PP1748 für die NAGGN-Biosynthese notwendig ist und die postulierte Funktion einer Peptidase besitzt, die befähigt ist das kompatible Solut NAGGN abzubauen. Im Fall einer peptischen Eigenschaft könnte ein derart modifizierter Stamm eine noch höhere NAGGN-Akkumulation aufweisen und damit ein noch effizienterer Produktionsstamm erstellt werden.

Eines der NAGGN-Biosynthesegene ist das Enzym PP1749, das eine Bifunktionalität, bestehend aus einer N-Acetyltransferasedomäne und einer Carbox-Amin-Ligase-Funktion, aufweist. Eine Verbindung wie das Dipeptid Di-Glutamin ist käuflich nicht zu erwerben. Experimente zu dieser Ligase-Funktionalität sind aus diesem Grund überaus interessant. Darüber hinaus würden sich im Folgenden Möglichkeiten für weitere Derivatisierungsschritte einer solchen Verbindung eröffnen. Zudem könnte man, um eine Acetylierung zu vermeiden, einen Versuch unternehmen nur die entsprechende Untereinheit (rimK-Domäne), die wahrscheinlich kausal für die Ligase-Funktion ist, zu exprimieren.

Die Expression und Acetyltransferase-Funktionalität des Holoenzymes PP1749 wurde bereits in dieser Arbeit gezeigt. Dies dient als guter Ausgangspunkt für den Nachweis der Carbox-Amin Ligase-Funktion und für die Expression einer singulären Untereinheit, die für die Ligase-Funktionalität verantwortlich ist.

Das Enzym PP1750 ist ebenfalls ein sehr interessantes Enzym, das durch seine Fähigkeit der Amidierung der α -Carboxylgruppe großes Potential für die Modifizierung diverser Aminosäuren und deren Derivate besitzt. Allerdings müssten für dieses Enzym zunächst geeignete Expressionsbedingungen definiert werden.

Die Rahmenbedingungen für die eigentliche NAGGN-Synthese des Produzenten *H. elongata* AKB, der die NAGGN-Biosynthese genomisch integriert trägt, wurden zwar schon optimiert, aber es wurde ein starker Fokus auf die internen NAGGN-Gehalte gelegt. Bei der Untersuchung von Mediumproben, die bei der Anzucht des Stammes *H. elongata* AKB entnommen wurden, war es möglich extrazelluläres NAGGN zu detektieren. Homologe Versuche mit dem Schwerpunkt auf Untersuchungen extrazellulärer NAGGN-Gehalte bergen weiteres Potential für die Erhöhung der NAGGN-Gehalte und der damit einhergehenden Verbesserung des Expressionsstammes *H. elongata* AKB.

Im Verlauf des Aufreinigungsprozesses mit dem Ziel der NAGGN-Isolierung sind im Bereich der Zellmaterialextraktion ebenfalls noch Optimierungen möglich. Die Soxhlet-Extraktionsmethode wird bei der Extraktion von Zelltrockenmasse, die bei Fermentationen im großen Maßstab gewonnen wird, häufig eingesetzt. Allerdings besitzt das kompatible Solut NAGGN eine geringe Methanol-Löslichkeit, weswegen hier noch Optimierungsbedarf besteht. Durch den Einsatz eines alternativen Lösungsmittels wie beispielsweise Ethanol wäre eine Optimierungsmöglichkeit gegeben.

Nach dem Extraktionsschritt folgte die Aufreinigung über einen Vollentsalzer und eine finale Kristallisierung. Die Kristallisierung bietet noch großes Potential zur Optimierung, weil hier Methanol als Lösungsmittel verwendet wurde, das, wie schon bei der Extraktionsmethode beschrieben, nicht das geeignete Lösungsmittel ist. Daher wäre auch hier ein alternatives Lösungsmittel wie Ethanol wünschenswert.

Die Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN aus dem Medium könnte als erster Ansatzpunkt mit einer Elektrodialyse angegangen werden. Das Zellmaterial selbst könnte durch eine Auskristallisierung des NAGGNs aus dem Zellmaterial, wie das bei der Produktion von Mannitol gemacht worden ist, erreicht werden (United States Patent 7358072).

Durch die Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN wurde eine Charakterisierung dieses Solut möglich. Das isolierte kompatible Solut NAGGN wurde auf Protein-stabilisierende Eigenschaften hin untersucht. Versuche zur Stabilisierung von ganzen Zellen wurden beispielsweise noch nicht im Detail durchgeführt. Zudem wären weitere Versuche zur

Enzymstabilisierung von unterschiedlichen Versuchsbedingungen denkbar. Bislang wurde nur der stabilisierende Effekt des kompatiblen Solut NAGGN auf ein der Kälte ausgesetztes Enzym (LDH) untersucht. Welche Wirkung NAGGN auf solche Enzyme wie die LDH unter Hitzestress zeigt, wurde noch nicht beschrieben. Darüber hinaus wären Versuche mit anderen Enzymen interessant. Hier böte sich das Enzym Phosphofruktokinase an, für das ein Assay bereits etabliert ist (Lippert *et al.*, 1992).

Basierend auf den Bestimmungen der Oberflächenpolaritäten nach Street *et al.* (2006) wurden die Oberflächen der Osmolyte Ectoin, Hydroxyectoin und NAGGN bioinformatisch analysiert. Die ergänzende Untersuchung zur Bestimmung der Transferenergien dieser Solute mit Diketopiperazin als artifizielles Peptidrückgrat stehen noch aus.

Die Analyse der Osmolyt-Oberflächen in Kombination mit Proteinstabilisierungsversuchen zeigt, dass der Mechanismus der Interaktion von kompatiblen Soluten und Biomolekülen immer noch Aufklärungsbedarf besitzt. Erste Ansatzpunkte liegen in der Interaktion von Osmolyten und extremophilen Enzymen. Die Interaktion zwischen thermophilen Enzymen mit ihrem sehr negativen Oberflächenpotential und den negativ geladenen kompatiblen Soluten zeigen wie sich die Eigenschaften von Osmolyt und Enzym bedingen und der *Preferential-Exclusion*-Effekt in diesem Fall verstärkt wird (Borges *et al.*, 2002). Die Untersuchung von Stabilisierungsmechanismen halophiler, psychrophiler und weiterer extremophiler Enzyme durch unterschiedliche kompatible Solute wäre ein weiteres interessantes Forschungsgebiet, das vielleicht einen Einblick in die evolutionäre Entwicklung strukturell sehr unterschiedlicher kompatibler Solute zulässt.

V. Zusammenfassung

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit richtete sich auf das kompatible Solut NAGGN, ein bislang relativ wenig untersuchtes Solut, das zu der Gruppe der acetylierten Aminosäurederivate gehört.

Das NAGGN-Gencluster ist unter den Bakterien weiter verbreitet als bisher angenommen. Es tritt hauptsächlich in den Familien der Pseudomonadaceae und der Frankinae auf.

Der leicht kultivierbare und molekularbiologisch zugängliche Organismus *P. putida* KT2440 synthetisiert das kompatible Solut NAGGN unter osmotischem Stress. Eine Isolierung des kompatiblen Soluts NAGGN aus diesem Organismus wurde durch die Co-Solute Trehalose und Mannitol erschwert. Deshalb wurde für die Isolierung des kompatiblen Soluts NAGGN ein heterologes Expressionssystem ausgewählt.

Der Stamm *E. coli* wurde für die Expression und Deletion von einzelnen plasmidkodierten Genen des NAGGN-Genclusters aus *P. putida* KT2440 zur Aufklärung der NAGGN-Biosynthese verwendet. Durch die Deletion einzelner, plasmidkodierter Biosynthesegene zeigte sich, dass das Gen *PP1748*, das für eine Peptidase kodiert, nicht für die NAGGN-Synthese notwendig ist oder alternativ durch andere Peptidasen des Expressionswirts *E. coli* komplementiert werden kann. Eine Überexpression des Gens *PP1750* in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) führte zu einer internen Erhöhung des Glutamatspiegels. Die höchste Aktivität des Enzyms PP1749, eine N-Acetyltransferase, konnte in *in vitro* Assays bei dem Einsatz der Substrate Glutamin bzw. Glutamat festgestellt werden.

Der Expressionswirt *E. coli* wurde in dieser Arbeit ebenfalls für die heterologe Expression des kompatiblen Soluts NAGGN verwendet. Hier wurde zum einen die Funktionalität des Promotors der Ectoinbiosynthesegene aus *H. elongata* in *E. coli* und eine erfolgreiche Expression des NAGGN-Genclusters gezeigt. Die größte NAGGN-Akkumulation konnte mit einem Trehalose defizienten *E. coli* Stamm (Burdziak, 2006) erzeugt werden. Ein Vergleich aller Expressionsstämme zeigte, dass die höchste Produktivität mit dem konstruierten Stamm *H. elongata* AKB erzielt werden konnte, weil dieser Stamm auch NAGGN ins Medium entlässt.

Das moderat halophile Gram-negative Bakterium *H. elongata* wurde zur genomischen Integration des NAGGN-Genclusters aus *P. putida* KT2440 eingesetzt. Das wirtseigene Gencluster für das kompatible Solut Ectoin wurde derart ausgetauscht, dass das integrierte NAGGN-Gencluster unter der Kontrolle des osmoregulierbaren Ectoinbiosynthese Promotors steht.

Die Bedingungen für die Expression mit dem konstruierten Stamme *H. elongata* AKB wurden optimiert, so dass mit der sich anschließenden Fermentation in einem 15 L Maßstab eine Basis für folgende Aufreinigungsprozesse zur Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN gebildet wurde. Die Aufreinigungsprozesse wurden durch Verwendung eines Vollentsalters drastisch vereinfacht, zeitlich verkürzt und der Reinheitsgrad des Endprodukts NAGGN wurde zudem gesteigert.

Die Isolierung des kompatiblen Solut NAGGN eröffnete die Möglichkeit die Substanz zu charakterisieren. Dies geschah in Form von Supplementierungs- und Protein-stabilisierungsversuchen, in denen NAGGN mit weiteren Soluten verglichen wurde. Darüber hinaus wurden die Oberflächeneigenschaften der Solute NAGGN, Ectoin und Hydroxyectoin bioinformatisch analysiert.

Für die Untersuchung einer Protein-stabilisierenden Wirkung wurde das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) eingesetzt. Unter Verwendung von Einfrier-Auftau-Zyklen wurde gezeigt, dass das kompatible Solut NAGGN schon in der relativ geringen Konzentration von 50 mM stabilisierende Wirkung auf dieses Enzym zeigte.

Eine Analyse der Oberflächeneigenschaften unterschiedlicher kompatibler Solute zeigte, dass Protein-stabilisierende Osmolyte grundsätzlich eher eine negative Oberflächen Polarität aufweisen. Das kompatible Solut NAGGN nimmt unter den analysierten kompatiblen Soluten eine Sonderstellung ein, weil bislang kein anderes Osmolyt nahezu gleiche Anteile positiver und negativer Oberflächenanteile besitzt.

VI. Literaturverzeichnis

Afendra, A. S., Vargas, C., Nieto, J. J. und Drainas, C. (2004).

Gene Transfer and Expression of Recombinant Proteins in Moderately Halophilic Bacteria. Recombinant Gene Expression: Methods in Molecular Biology.

Balbas, P. and Lorence, A. Totowa, NJ, Humana Press Inc. 209-223.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997).

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.

Arahal, D. R., Garcia, M. T., Vargas, C., Canovas, D., Nieto, J. J. und Ventosa, A. (2001).

Chromohalobacter salexigens sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174.

Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 4): 1457-1462.

Arakawa, T. und Timasheff, S. N. (1983).

Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions.

Archives of biochemistry and biophysics **224**(1): 169-177.

Arguelles, J. C. (2000).

Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis.

Arch Microbiol **174**(4): 217-224.

Arvanitis, N., Vargas, C., Tegos, G., Perysinakis, A., Nieto, J. J., Ventosa, A. und Drainas, C. (1995).

Development of a gene reporter system in moderately halophilic bacteria by employing the ice nucleation gene of *Pseudomonas syringae*.

Appl Environ Microbiol **61**(11): 3821-3825.

Aspedon, A., Palmer, K. und Whiteley, M. (2006).

Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*.

J Bacteriol **188**(7): 2721-2725.

Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. und Iturriaga, G. (2006).

Insights on the evolution of trehalose biosynthesis.

BMC Evol Biol **6**: 109.

Bachmann, B. J. (1983).

Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 7.

Microbiol Rev **47**: 180-230.

Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F. C., Bagdasarian, M. M., Frey, J. und Timmis, K. N. (1981).

Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*.

Gene **16**: 237-247.

Baneyx, F. (1999).

Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.

Curr Opin Biotechnol **10**: 411-421.

Barazani, O. und Friedman, J. (2001).

Allelopathic bacteria and their impact on higher plants.

Crit Rev Microbiol **27**(1): 41-55.

- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A. und Engert, A.** (2000).
Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions.
Appl Environ Microbiol **66**(4): 1572-1579.
- Ben-Amotz, A. und Avron, M.** (1973).
The Role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the Halophilic Alga *Dunaliella parva*.
Plant Physiol **51**(5): 875-878.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. und Stryer, L.** (2002).
Biochemistry.
New York, Freeman, W. H. and Company.
- Bestvater, T., Louis, P. und Galinski, E. A.** (2008).
Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck.
Saline Systems **4**: 12.
- Bligh, E. G. und Dyer, W. J.** (1959).
A rapid method of total lipid extraction and purification.
Can J Biochem Physiol **37**(8): 911-917.
- Boehlein, S. K., Richards, N. G. und Schuster, S. M.** (1994).
Glutamine-dependent nitrogen transfer in *Escherichia coli* asparagine synthetase B. Searching for the catalytic triad.
J Biol Chem **269**(10): 7450-7457.
- Bolen, D. W. und Baskakov, I. V.** (2001).
The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding.
Journal of molecular biology **310**(5): 955-963.
- Booth, I. R., Edwards, M. D., Black, S., Schumann, U. und Miller, S.** (2007).
Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure?
Nat Rev Microbiol **5**(6): 431-440.
- Borges, N., Ramos, A., Raven, N. D., Sharp, R. J. und Santos, H.** (2002).
Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes.
Extremophiles **6**(3): 209-216.
- Bowers, K. J., Mesbah, N. M. und 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.
- Bowman, J. P. und Mccuaig, R. D.** (2003).
Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment.
Appl Environ Microbiol **69**(5): 2463-2483.
- Brambilla, E., Hippe, H., Hagelstein, A., Tindall, B. J. und Stackebrandt, E.** (2001).
16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica.
Extremophiles : life under extreme conditions **5**(1): 23-33.
- Brock, T. D. und Freeze, H.** (1969).
Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile.
J Bacteriol **98**(1): 289-297.
- Brown, A. D.** (1976).
Microbial water stress.
Bacteriol Rev **40**(4): 803-846.
- Brown, A. D.** (1978).
Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms.
Adv Microb Physiol **17**: 181-242.

Brown, R. E., Jarvis, K. L. und Hyland, K. J. (1989).

Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* **180**(1): 136-139.

Burdziak, A. (2006).

Entwicklung eines bakteriellen Stammes zur Produktion des kompatiblen Solutes Mannosylglycerat.
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Cairney, J., Booth, I. R. und Higgins, C. F. (1985).

Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: proU encodes an osmotically induced betaine transport system. *J Bacteriol* **164**(3): 1224-1232.

Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D. S. und Fall, R. R. (1978).

Biodegradation of Acyclic Isoprenoids by *Pseudomonas* Species. *J Bacteriol* **135**(2): 324-333.

Caumette, P. (1993).

Ecology and physiology of phototrophic bacteria and sulfate-reducing bacteria in marine salterns. Basel, Birkhäuser Verlag. 473-481.

Cayley, S., Lewis, B. A. und Record, M. T., Jr. (1992).

Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **174**(5): 1586-1595.

Chu, L. und Robinson, D. K. (2001).

Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol* **12**(2): 180-187.

Claus, D., Fahmy, F., Rolf, H. J. und Tosunoglu, N. (1983).

Sporosarcina halophila sp. nov., an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soils. *Syst Appl Microbiol* **4**(496-506).

Clegg, J. S., Seitz, P., Seitz, W. und Hazlewood, C. F. (1982).

Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. *Cryobiology* **19**(3): 306-316.

Coronado, M. J., Vargas, C., Kunte, H. J., Galinski, E. A., Ventosa, A. und Nieto, J. J. (1995).

Influence of salt concentration on the susceptibility of moderately halophilic bacteria to antimicrobials and its potential use for genetic transfer studies. *Current microbiology* **31**(6): 365-371.

Csonka, L. N. (1989).

Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**(1): 121-147.

Csonka, L. N. und Epstein, W. (1996).

Osmoregulation. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. Curtis, R. I., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Tiley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E. and (Eds). Washington, DC, ASM Press. 1210-1224.

Csonka, L. N., Ikeda, T. P., Fletcher, S. A. und Kustu, S. (1994).

The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolality but not induction of the proU operon. *J Bacteriol* **176**(20): 6324-6333.

Cummings, S. P., Williamson, M. P. und Gilmour, D. J. (1993).

Turgor regulation in a novel *Halomonas* species.

Arch Microbiol **160**: 319-323.

D'souza-Ault, M. R., Smith, L. T. und Smith, G. M. (1993).

Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress.

Appl Environ Microbiol **59**(2): 473-478.

Da Costa, M. S., Santos, H. und Galinski, E. A. (1998).

An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea.

Adv Biochem Eng Biotechnol **61**: 117-153.

Dagert, M. und Ehrlich, S. D. (1979).

Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells.

Gene **6**(1): 23-28.

De Smedt, J., Bauwens, M., Tytgat, R. und De Ley, J. (1980).

Intra- and Intergeneric Similarities of Ribosomal Ribonucleic Acid Cistrons of Free-Living, Nitrogen-Fixing Bacteria.

Int J Syst Bacteriol **30**(1): 106-122.

Diab, F., Bernard, T., Bazire, A., Haras, D., Blanco, C. und Jebbar, M. (2006).

Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities.

Microbiology **152**(Pt 5): 1395-1406.

Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. und Bakker, E. P. (1988).

Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations.

Arch Microbiol **150**(4): 348-357.

Doran, P. M. (2000).

Foreign protein production in plant tissue cultures.

Curr Opin Biotechnol **11**(2): 199-204.

Dötsch, A., Severin, J., Alt, W., Galinski, E. A. und Kreft, J. U. (2008).

A mathematical model for growth and osmoregulation in halophilic bacteria.

Microbiology **154**(Pt 10): 2956-2969.

Egler, C. (2004).

Die Regulation der Ectoinbiosynthese in *Marinococcus halophilus* auf Proteinebene.

Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

Elbein, A. D. (1974).

The metabolism of alpha, alpha-trehalose.

Adv Carbohydr Chem Biochem **30**: 227-256.

Epstein, W. (1986).

Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*.

FEMS Microbiol Rev **39**: 73-78.

Epstein, W. und Schultz, S. G. (1965).

Cation Transport in *Escherichia coli*: V. Regulation of cation content.

J Gen Physiol **49**(2): 221-234.

Falkenberg, P. und Strøm, A. R. (1990).

Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*.

Biochim Biophys Acta **1034**(3): 253-259.

- Feil, H., Feil, W. S., Chain, P., Larimer, F., Dibartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J. E., Lapidus, A., Detter, J. C., Land, M., Richardson, P. M., Kyrpides, N. C., Ivanova, N. und Lindow, S. E.** (2005). Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 11064-11069.
- Fiala, G. und Stetter, K. O.** (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archives of Microbiology*(145): 56-61.
- Frillingos, S., Linden, A., Niehaus, F., Vargas, C., Nieto, J. J., Ventosa, A., Antranikian, G. und Drainas, C.** (2000). Cloning and expression of alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *J Appl Microbiol* **88**(3): 495-503.
- Gadda, G. und Mcallister-Wilkins, E. E.** (2003). Cloning, expression, and purification of choline dehydrogenase from the moderate halophile *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* **69**(4): 2126-2132.
- Galinski, E. A.** (1986). Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen, phototrophen Bakterien. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Galinski, E. A.** (1992). Kompatible Solute aus Bakterien - Gewinnung, Anwendung, Struktur und Funktion. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Galinski, E. A.** (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Galinski, E. A.** (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**: 272-328.
- Galinski, E. A. und Louis, P.** (1999). Compatible Solutes: Ectoine Production and Gene Expression. Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments. Oren, A. Boca Raton (Florida), CRC Press LLC. pp. 187-202.
- Galinski, E. A. und Oren, A.** (1991). Isolation and structure determination of a novel compatible solute from the moderately halophilic purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira marismortui*. *Eur J Biochem* **198**(3): 593-598.
- Galinski, E. A., Pfeiffer, H. P. und Trüper, H. G.** (1985). 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem* **149**(1): 135-139.
- Galinski, E. A. und Trüper, H. G.** (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 95-108.
- Galperin, M. Y. und Koonin, E. V.** (1997). A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci* **6**(12): 2639-2643.

Gandbhir, M., Rasched, I., Marliere, P. und Mutzel, R. (1995).

Convergent evolution of amino acid usage in archaeobacterial and eubacterial lineages adapted to high salt.

Res Microbiol **146**(2): 113-120.

Giaever, H. M., Styrvoid, O. B., Kaasen, I. und Strøm, A. R. (1988).

Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*.

J Bacteriol **170**(6): 2841-2849.

Gimmler, H., Schieder, M., Kowalski, M., Zimmermann, U. und Pick, U. (1991).

Dunaliella acidophila: an algae with a positive zeta potential at its optimal pH for growth.

Plant, Cell and Environment **14**: 261-269.

Goodrick, J. C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B. M., Schiavi, S., Hoppe, H. und Wan, N. C. (2001).

High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system.

Biotechnol Bioeng **74**(6): 492-497.

Gordon, D. A., Priscu, J. und Giovannoni, S. (2000).

Origin and Phylogeny of Microbes Living in Permanent Antarctic Lake Ice.

Microb Ecol **39**(3): 197-202.

Gordon, R. E. und Mihm, J. M. (1959).

A comparison of four species of mycobacteria.

J Gen Microbiol **21**: 736-748.

Grammann, K., Volke, A. und Kunte, H. J. (2002).

New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581(T).

J Bacteriol **184**(11): 3078-3085.

Gross, D. C. und Cody, Y. S. (1985).

Mechanism of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species.

Can J Microbiol **31**: 403-410.

Hagemann, M., Ribbeck-Busch, K., Klähn, S., Hasse, D., Steinbruch, R. und Berg, G. (2008).

The Plant-Associated Bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* Expresses a New Enzyme for the Synthesis of the Compatible Solute Glucosylglycerol.

J Bacteriol **190**(17): 5898-5906.

Hagemann, M., Richter, S. und Mikkat, S. (1997).

The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.

J Bacteriol **179**(3): 714-720.

Hanahan, D. (1983).

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

J Mol Biol **166**(4): 557-580.

Healy, F. G. und Lambert, D. H. (1991).

Relationships among *Streptomyces* spp. Causing Potato Scab.

Int J Syst Bacteriol **41**(4): 479-482.

Hengge-Aronis, R. und Fischer, D. (1992).

Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*.

Mol Microbiol **6**(14): 1877-1886.

Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmel, M. und Boos, W. (1991).

Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*.

J Bacteriol **173**(24): 7918-7924.

Hitchman, R. B., Possee, R. D., Crombie, A. T., Chambers, A., Ho, K., Siaterli, E., Lissina, O., Sternard, H., Novy, R., Loomis, K., Bird, L. E., Owens, R. J. und King, L. A. (2010).

Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells.

Cell Biol Toxicol **26**(1): 57-68.

Hof, H., Müller, R. L. und Dörries, R. (2000).

Mikrobiologie.

Stuttgart, Georg Thieme Verlag

Horten, R. M., Hunta, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989).

Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension

Gene **77**(1): 61-68.

Ibelgaufts, H. (1993).

Gentechnologie von A bis Z.

Weinheim, New York, VCH.

Imhoff, J. F. und Trüper, H. G. (1977).

Ectothiorhodospira halochloris sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b.

Arch Microbiol **114**: 114-121.

Jahn, U., Gallenberger, M., Paper, W., Junglas, B., Eisenreich, W., Stetter, K. O., Rachel, R. und Huber, H. (2008).

Nanoarchaeum equitans and *Ignicoccus hospitalis*: new insights into a unique, intimate association of two archaea.

J Bacteriol **190**(5): 1743-1750.

Jana, S. und Deb, J. K. (2005).

Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*.

Appl Microbiol Biotechnol **67**(3): 289-298.

Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T. und Blanco, C. (1992).

Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics.

J Bacteriol **174**(15): 5027-5035.

Jensen, W. B. (2007).

The Origin of the Soxhlet Extractor.

J Chem Educ **84**: 1913-1914.

Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R. W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Deboy, R., Durkin, A. S., Giglio, M. G., Madupu, R., Nelson, W. C., Rosovitz, M. J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D. H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H., Feldblyum, T., White, O., Fraser, C. M., Chatterjee, A. K., Cartinhour, S., Schneider, D. J., Mansfield, J., Collmer, A. und Buell, C. R. (2005).

Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition.

J Bacteriol **187**(18): 6488-6498.

Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O. B. und Strøm, A. R. (1992).

Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by *katF* (AppR).

J Bacteriol **174**(3): 889-898.

Kaasen, I., Mcdougall, J. und Strøm, A. R. (1994).

Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* **145**(1): 9-15.

Kato, C. und Bartlett, D. H. (1997).

The molecular biology of barophilic bacteria. *Extremophiles* **1**(3): 111-116.

Kessler, R. J. und Fanestil, D. D. (1986).

Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **159**(1): 138-142.

Kets, E. P., Galinski, E. A., De Wit, M., De Bont, J. A. und Heipieper, H. J. (1996).

Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J Bacteriol* **178**(23): 6665-6670.

Killham, K. und Firestone, M. K. (1984).

Salt stress control of intracellular solutes in streptomycetes indigenous to saline soils. *Appl Environ Microbiol* **47**(2): 301-306.

Korsten, A. (2006).

Untersuchungen zur Nutzung nicht-pathogener Pseudomonaden als Expressionssystem.

Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Kraegeloh, A. und Kunte, H. J. (2002).

Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*.

Extremophiles **6**(6): 453-462.

Krulwich, T. A., Ito, M., Gilmour, R. und Guffanti, A. A. (1997).

Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in alkaliphilic strains of *Bacillus*. *Extremophiles* **1**(4): 163-169.

Kurz, M., Burch, A. Y., Seip, B., Lindow, S. E. und 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**(16): 5452-5462.

Kushner, D. (1978).

Microbial life in extreme environments. London; New York, Academic Press.

Ladenstein, R. und Antranikian, G. (1998).

Proteins from hyperthermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 37-85.

Laemmli, U. K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.

Landfald, B. und Strøm, A. R. (1986).

Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**(3): 849-855.

Lanyi, J. K. (1974).

Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**(3): 272-290.

Lapidot, A., Inbar, L., Ben-Asher, E. und Aloni Deceased, Y.

Pharmaceutical compositions comprising tetrahydropyrimidine derivatives. US Appl. 08/011668 (1998)

Larrick, J. W. und Thomas, D. W. (2001).

Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr Opin Biotechnol* **12**(4): 411-418.

- Larsen, P. I., Sydnes, L. K., Landfald, B. und Strøm, A. R.** (1987).
Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose.
Arch Microbiol **147**(1): 1-7.
- Le Rudulier, D., Gloux, K. und Riou, N.** (1991).
Identification of an osmotically induced periplasmic glycine betaine-binding protein in *Rhizobium meliloti*.
Biochim Biophys Acta **1061**: 197-205.
- Lechevalier, M. P.** (1994).
Taxonomy of the Genus *Frankia* (*Actinomycetales*).
Int J Syst Bacteriol **44**(1): 1-8.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Deziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G. und Ausubel, F. M.** (2006).
Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial.
Genome Biol **7**(10): R90.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K. und Drauz, K.** (2005).
Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects.
Appl Microbiol Biotechnol **69**(1): 1-8.
- Li, L., Kato, C. und Horikoshi, K.** (1999).
Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths.
Biodiversity and Conservation **8**: 659-677.
- Linden, A., Niehaus, F. und Antranikian, G.** (2000).
Single-step purification of a recombinant thermostable alpha-amylase after solubilization of the enzyme from insoluble aggregates.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl **737**(1-2): 253-259.
- Lippert, K. und Galinski, E. A.** (1992).
Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying.
Appl Microbiol Biotechnol **37**: 61-65.
- Louis, P. und Galinski, E. A.** (1997).
Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*.
Microbiology **143** (Pt 4): 1141-1149.
- Louis, P., Trüper, H. G. und Galinski, E. A.** (1994).
Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes.
Appl Microbiol Biotechnol **41**: 684-688.
- Luedemann, G. M.** (1968).
Geodermatophilus, a New Genus of the *Dermatophilaceae* (*Actinomycetales*).
J Bacteriol **96**(5): 1848-1858.
- Madern, D., Ebel, C. und Zaccai, G.** (2000).
Halophilic adaptation of enzymes.
Extremophiles **4**(2): 91-98.
- Madigan, M. T., M., M. J. und J., P.** (2001).
Brock Mikrobiologie.
Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.

- Madkour, M. A., Smith, L. T. und Smith, G. M.** (1990). Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**(9): 2876-2881.
- Makrides, S. C.** (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**(3): 512-538.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Deweese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N. und Bryant, S. H.** (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D205-210.
- Marchler-Bauer, A. und Bryant, S. H.** (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**(Web Server issue): W327-331.
- Meffert, A.** (2007). Untersuchungen zur Mannosylglycerat-Produktion von *Halomonas elongata* KB10.1. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Mertens, N., Remaut, E. und Fiers, W.** (1995). Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. *Biotechnology (N Y)* **13**(2): 175-179.
- Miller, J. H.** (1972). A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *E. coli* and Related Bacteria. Los Angeles, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L. und Huner, N. P.** (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(1): 222-252.
- Mormile, M. R., Romine, M. F., Garcia, M. T., Ventosa, A., Bailey, T. J. und Peyton, B. M.** (1999). *Halomonas campisalis* sp. nov., a denitrifying, moderately haloalkaliphilic bacterium. *Syst Appl Microbiol* **22**(4): 551-558.
- Müller, R., Antranikian, G., Maloney, S. und Sharp, R.** (1998). Thermophilic Degradation of Environmental Pollutants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins Dos Santos, V. A., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., Deboy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J. A., Timmis, K. N., Dusterhoft, A., Tumbler, B. und Fraser, C. M.** (2002).

Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**(12): 799-808.

Novick, R. P. (1980).
Plasmids.
Sci Am **243**(6): 102-104, 106, 110 passim.

Oberhardt, M. A., Puchalka, J., Fryer, K. E., Martins Dos Santos, V. A. und Papin, J. A. (2008).
Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.
J Bacteriol **190**(8): 2790-2803.

Olsen, G. J., Woese, C. R. und Overbeek, R. (1994).
The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology.
J Bacteriol **176**(1): 1-6.

Onishi, H., Fuchi, H., Konomi, K., Hidaka, O. und Kamekura, M. (1980).
Isolation and Distribution of a Variety of Halophilic Bacteria and Their Classification by Salt-Response.
Agric Biol Chem **44**(6): 1253 - 1258.

Onishi, H. und Suzuki, T. (1968).
Production of D-mannitol and glycerol by yeasts.
Appl Microbiol **16**(12): 1847-1852.

Oren, A. (1999).
Bioenergetic aspects of halophilism.
Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 334-348.

Oren, A. (2001).
The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems.
Hydrobiologia **466**: 61-72.

Oren, A. (2008).
Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity.
Saline Systems **4**: 2.

Paananen, H., Saari, P. und Nurmi, N.
Method for separating betaine.
US Appl. 11/328800 (2007)

Palleroni, N. J. (1984).
Pseudomonaceae. Bergey's manual of systematic bacteriology Williams and Williams.
Krieg, N. R. and Holt, J. G. E. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 141-199.

Palleroni, N. J. (1993).
Pseudomonas classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria.
Antonie Van Leeuwenhoek **64**(3-4): 231-251.

Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S., Mavrodi, D. V., Deboy, R. T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Sullivan, S. A., Rosovitz, M. J., Gwinn, M. L., Zhou, L., Schneider, D. J., Cartinhour, S. W., Nelson, W. C., Weidman, J., Watkins, K., Tran, K., Khouri, H., Pierson, E. A., Pierson, L. S., 3rd, Thomashow, L. S. und Loper, J. E. (2005).
Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5.
Nat Biotechnol **23**(7): 873-878.

Peng, J., Pai, S., Lin, A. und Chen, M.
Process for producing trehalose.
US Appl. 08/951711 (1999)

Peters, P., Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1990).
The biosynthesis of ectoine.
FEMS Microbiol Lett **71**: 157-162.

Pocard, J. A., Smith, L. T., Smith, G. M. und Le Rudulier, D. (1994).
A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress.
J Bacteriol **176**(22): 6877-6884.

- Pocard, J. A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M. C. und Le Rudulier, D.** (1997).
Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34.
Microbiology **143** (Pt 4): 1369-1379.
- Pridmore, R. D.** (1987).
New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker.
Gene **56**(2-3): 309-312.
- Prieur, D. und Marteinsson, V. T.** (1998).
Prokaryotes Living Under Elevated Hydrostatic Pressure.
Adv Biochem Eng Biotechnol **61**.
- Rabus, R.** (2005).
Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1.
Appl Microbiol Biotechnol **68**(5): 580-587.
- Ramos, J. L., Marques, S. und Timmis, K. N.** (1997).
Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators.
Annu Rev Microbiol **51**: 341-373.
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D. U., Strompl, C., Moore, E. R. und Timmis, K. N.** (2002).
Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440.
Environ Microbiol **4**(12): 912-915.
- Reitzer, L. und Schneider, B. L.** (2001).
Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*.
Microbiol Mol Biol Rev **65**(3): 422-444, table of contents.
- Riener, C. K., Kada, G. und Gruber, H. J.** (2002).
Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine.
Anal Bioanal Chem **373**(4-5): 266-276.
- Ronchel, M. C. und Ramos, J. L.** (2001).
Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation.
Appl Environ Microbiol **67**(6): 2649-2656.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. und Studier, F. W.** (1987).
Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase.
Gene **56**(1): 125-135.
- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y. und Paulsen, I. T.** (2010).
Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7.
PLoS One **5**(1): e8842.
- Rumpho, M. E., Edwards, G. E. und Loescher, W. H.** (1983).
A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves : activity and localization of key enzymes.
Plant Physiol **73**(4): 869-873.
- Russell, N. J.** (1998).
Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications.
Adv Biochem Eng Biotechnol **61**: 1-21.
- Russell, N. J.** (2000).
Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles.
Extremophiles **4**(2): 83-90.

Sagot, B., Gaysinski, M., Mehiri, M., Guignon, J. M., Le Rudulier, D. und Alloing, G. (2010).

Osmotically induced synthesis of the dipeptide N-acetylglutaminylglutamine amide is mediated by a new pathway conserved among bacteria.

Proc Natl Acad Sci U S A **107**(28): 12652-12657.

Saha, B., Racine, F. M. und Terentjeva, E.

Fermentative production of mannitol.

US Appl. 11/250671 (2008)

Satyanarayana, T., Raghukumar, C. und S., S. (2005).

Extremophilic microbes: Diversity and perspectives.

Current Science **89**(1): 78-90.

Sauer, T. und Galinski, E. A. (1997).

Bacterial Milking: A Novel Bioprocess for Production of Compatible Solutes.

Biotechnol Bioeng **57**(3): 306-313.

Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., Rampp, M., Schuster, S. C., Klenk, H. P., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D. und Kunte, H. J. (2010).

A blueprint of ectoine metabolism from the genome of industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T.

Environ Microbiol: 1-22.

Sekler, I., Glaser, H. U. und Pick, U. (1991).

Characterization of a plasma membrane H(+)-ATPase from the extremely acidophilic alga *Dunaliella acidophila*.

J Membr Biol **121**(1): 51-57.

Senko, J. M., Wanjugi, P., Lucas, M., Bruns, M. A. und Burgos, W. D. (2008).

Characterization of Fe(II) oxidizing bacterial activities and communities at two acidic Appalachian coalmine drainage-impacted sites.

ISME J **2**(11): 1134-1145.

Setubal, J. C., Dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvag, H., Espin, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J. A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T. J., Latreille, P., Ligon, L. S., Lu, J., Maerk, M., Miller, N. M., Norton, S., O'carroll, I. P., Paulsen, I., Raulfs, E. C., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S. L., Studholme, D. J., Sun, J., Viana, C. J., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D. R., Dixon, R. und Wood, D. (2009).

Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes.

J Bacteriol **191**(14): 4534-4545.

Severin, J., Wohlfarth, A. und Galinski, E. A. (1992).

The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria.

J Gen Microbiol **138**: 1629-1638.

Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A. (1983).

A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria.

Biotechnology **1**: 784 - 791.

Skerman, V. B., McGowan, V. und Sneath, P. H. (1980).

Approved List of Bacterial Names.

Int J Syst Bacteriol: 225-420.

Smith, L. T., Allaith, A. A. und Smith, G. M. (1994).

Mechanism of osmotically regulated N-acetylglutaminylglutamine amide production in *Rhizobium meliloti*.

Plant and Soil **161**: 103-108.

- Smith, L. T. und Smith, G. M.** (1989).
An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*.
J Bacteriol **171**(9): 4714-4717.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C.** (1985).
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Snowden, M. K., Baxter, J. H., Mamula Bergana, M., Reyzer, I. L. und Pound, V.** (2002).
Stability of N-Acetylglutamine and Glutamine in Aqueous Solution and in a Liquid Nutritional Product by an Improved HPLC Method.
J Food Sci **67**(1): 384-389.
- Sodoyer, R.** (2004).
Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals.
BioDrugs **18**(1): 51-62.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Henstra, A. M., Stams, A. J., Galinski, E. A. und Muyzer, G.** (2008).
Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatronospira delicata* sp. nov. - a novel lineage of Deltaproteobacteria from hypersaline soda lakes.
Microbiology **154**(Pt 5): 1444-1453.
- Sorokin, D. Y., Trotsenko, Y. A., Doronina, N. V., Tourova, T. P., Galinski, E. A., Kolganova, T. V. und Muyzer, G.** (2007).
Methylohalomonas lacus gen. nov., sp. nov. and *Methylonatronum kenyense* gen. nov., sp. nov., methylotrophic gammaproteobacteria from hypersaline lakes.
Int J Syst Evol Microbiol **57**(Pt 12): 2762-2769.
- Spigel, R. H. und Priscu, J. C.** (1996).
Evolution of temperature and salt structure of Lake Bonney, a chemically stratified Antarctic lake.
Hydrobiologia **321**: 177-190.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. und Olson, M. V.** (2000).
Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen.
Nature **406**(6799): 959-964.
- Street, T. O., Bolen, D. W. und Rose, G. D.** (2006).
A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability.
Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 13997-14002.
- Strøm, A. R.** (1998).
Osmoregulation in the model organism *Escherichia coli*: genes governing the synthesis of glycine betaine and trehalose and their use in metabolic engineering of stress tolerance.
J Biosci **23**(4): 437-445.

- Strøm, A. R. und Kaasen, I.** (1993).
Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression.
Mol Microbiol **8**(2): 205-210.
- Studier, F. W.** (1991).
Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system.
J Mol Biol **219**(1): 37-44.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986).
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W.** (1990).
Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.
Methods Enzymol **185**: 60-89.
- Styrvold, O. B. und Strøm, A. R.** (1991).
Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase.
J Bacteriol **173**(3): 1187-1192.
- Tabor, S. und Richardson, C. C.** (1985).
A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.
Proc Natl Acad Sci U S A **82**(4): 1074-1078.
- Timasheff, S. N.** (1998).
Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated.
Advances in protein chemistry **51**: 355-432.
- Touzé, T., Gouesbet, G., Boiangiu, C., Jebbar, M., Bonnassie, S. und Blanco, C.** (2001).
Glycine betaine loses its osmoprotective activity in a bspA strain of *Erwinia chrysanthemi*.
Mol Microbiol **42**(1): 87-99.
- Van Der Oost, J., Ciaramella, M., Moracci, M., Pisani, F. M., Rossi, M. und De Vos, W. M.** (1998).
Molecular biology of hyperthermophilic Archaea.
Adv Biochem Eng Biotechnol **61**: 87-115.
- Van Laere, A.** (1989).
Trehalose, reserve and/or stress metabolite?
FEMS Microbiol Rev **63**: 201-210.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. und Oren, A.** (1998).
Biology of moderately halophilic aerobic bacteria.
Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 504-544.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Medigue, C. und Boccard, F.** (2006).
Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*.
Nat Biotechnol **24**(6): 673-679.
- Voß, P.** (2002).
Synthese von kompatiblen Soluten mit ectoinanaloger Struktur und Charakterisierung des protektiven Effektes auf biochemische Modellsysteme und *Escherichia coli*.
Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

- Vreeland, R. H.** (1987). Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Crit Rev Microbiol* **14**(4): 311-356.
- Vreeland, R. H., Anderson, R. und Murray, R. G.** (1984). Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **160**(3): 879-883.
- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L. und Elliot, E.** (1980). *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 485-495.
- Wang, Y., Liang, Z. H., Zhang, Y. S., Yao, S. Y., Xu, Y. G., Tang, Y. H., Zhu, S. Q., Cui, D. F. und Feng, Y. M.** (2001). Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng* **73**(1): 74-79.
- Wiechelmann, K. J., Braun, R. D. und Fitzpatrick, J. D.** (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**(1): 231-237.
- Wiggins, P. M.** (1990). Role of water in some biological processes. *Microbiological reviews* **54**(4): 432-449.
- Winstanley, C., Langille, M. G., Fothergill, J. L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F., Thomson, N. R., Winsor, G. L., Quail, M. A., Lennard, N., Bignell, A., Clarke, L., Seeger, K., Saunders, D., Harris, D., Parkhill, J., Hancock, R. E., Brinkman, F. S. und Levesque, R. C.** (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* **19**(1): 12-23.
- Witt, E. M., Davies, N. W. und Galinski, E. A.** (2011). Unexpected property of ectoine synthase and its application for synthesis of the engineered compatible solute ADPC. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Wood, J. M.** (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(1): 230-262.
- Yan, D., Ikeda, T. P., Shauger, A. E. und Kustu, S.** (1996). Glutamate is required to maintain the steady-state potassium pool in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6527-6531.
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He, S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., Wang, Y., Elmerich, C., Lin, M. und Jin, Q.** (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(21): 7564-7569.
- Yonezawa, Y., Tokunaga, H., Ishibashi, M., Taura, S. und Tokunaga, M.** (2003). Cloning, expression, and efficient purification in *Escherichia coli* of a halophilic nucleoside diphosphate kinase from the moderate halophile *Halomonas* sp. #593. *Protein Expr Purif* **27**(1): 128-133.

Yoshimi, Y., Hiraishi, A. und Nakamura, K. (1996).

Isolation and Characterization of *Microsphaera multipartita* gen. nov., sp. nov., a Polysaccharide-Accumulating Gram-Positive Bacterium from Activated Sludge.

Int J Syst Bacteriol **46**(2): 519-525.

Zhang, J.

Method of producing Betaine compound.

US Appl. 10/888741 (2006)

VII. Anhang

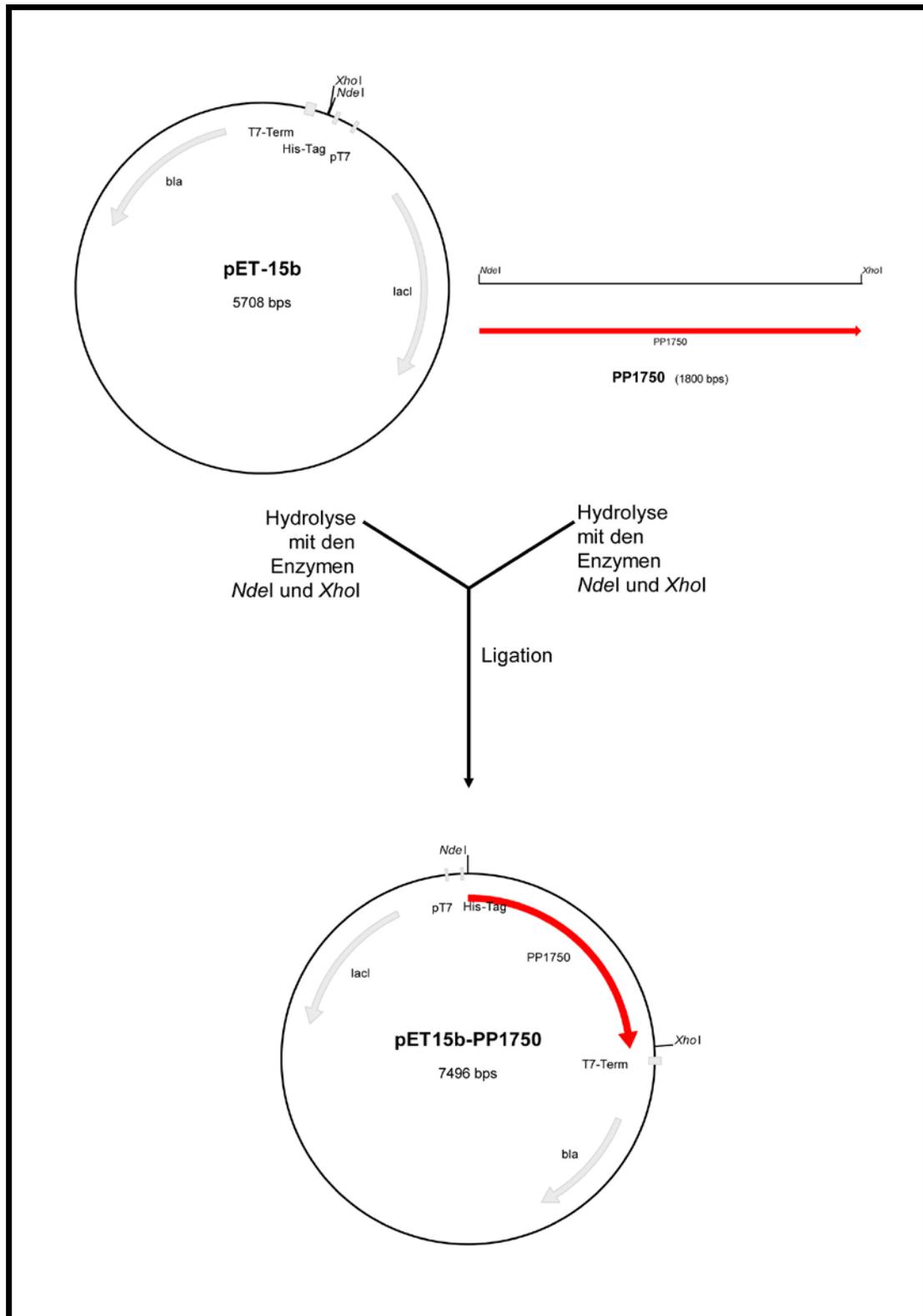


Abb. 53: Konstruktion des Vektors pET15b-PP1750. Als Ausgangsvektor diente der Vektor pET15b in den das Gen *PP1750* kloniert wurde.

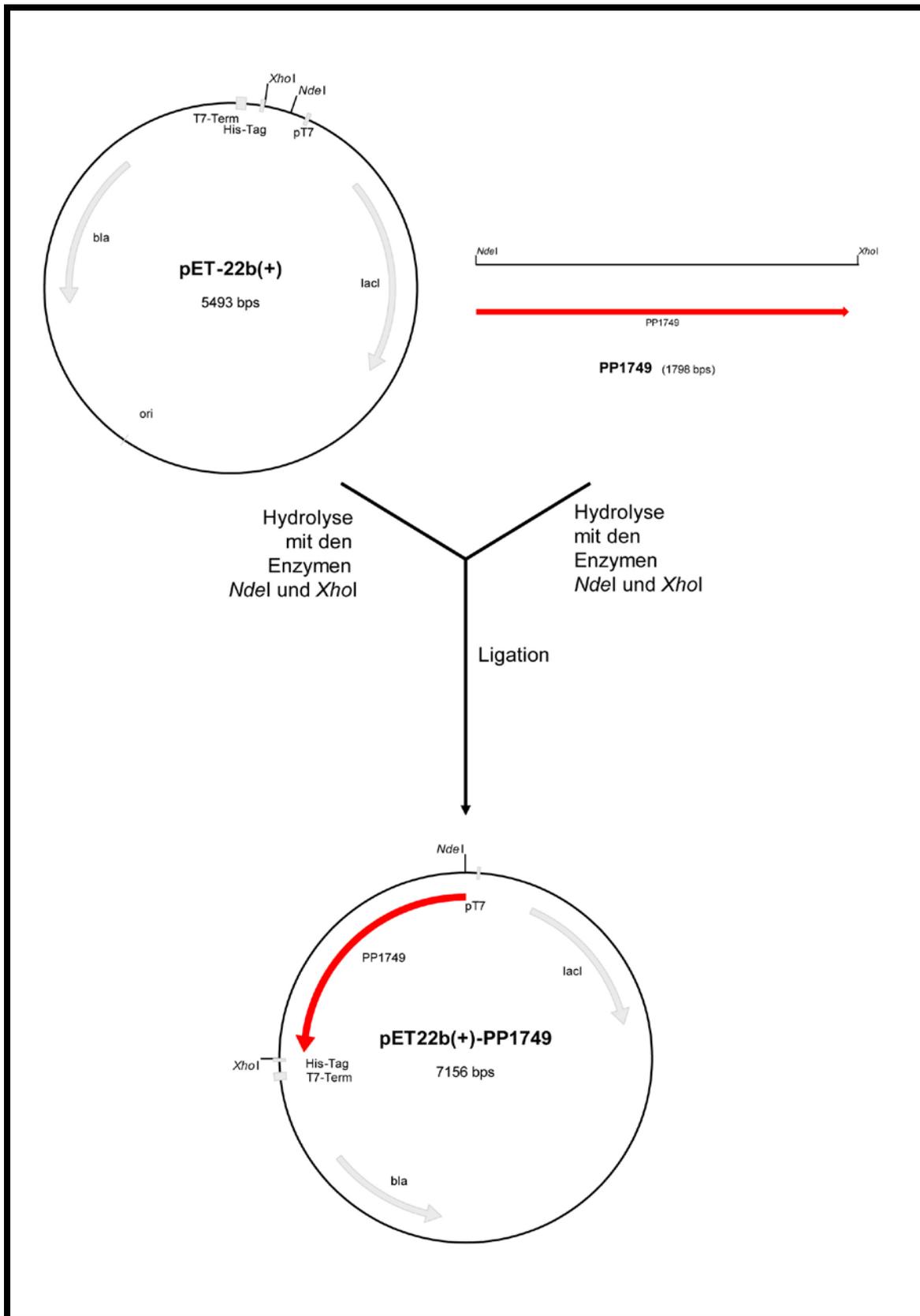


Abb. 54: Klonierungsschema des Vektors **pET22b(+)-PP1749**. Als Ausgangsvektor diente der Vektor **pET22b(+)** verwendet, in den das Gen **PP1749** inseriert wurde.

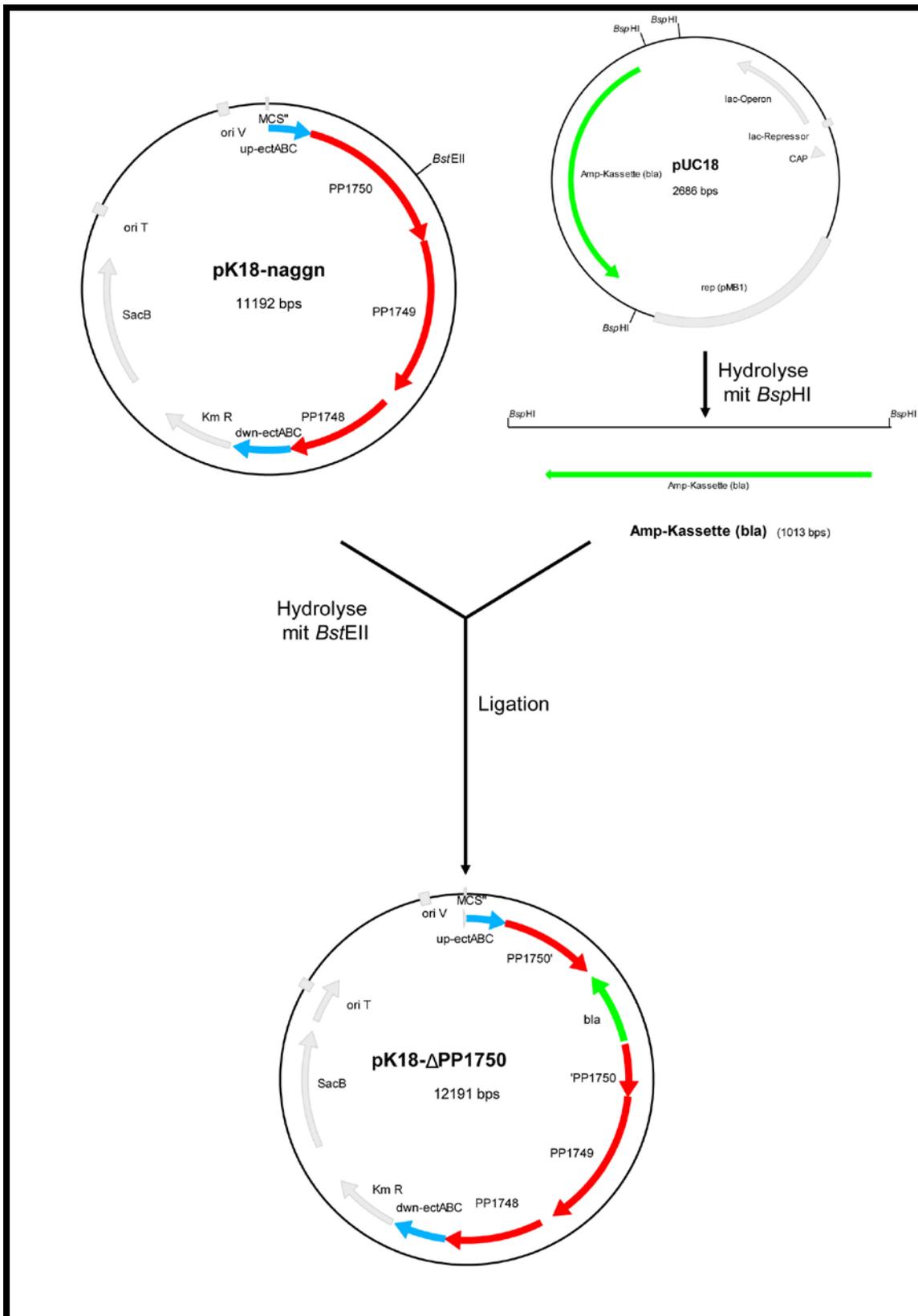


Abb. 55: Klonierungsschema des Vektors pK18- Δ PP1750. Als Ausgangsvektor diente der Vektor pK18-naggn, in den die Amp^R-Kassette aus dem Vektor pUC18 inseriert wurde.

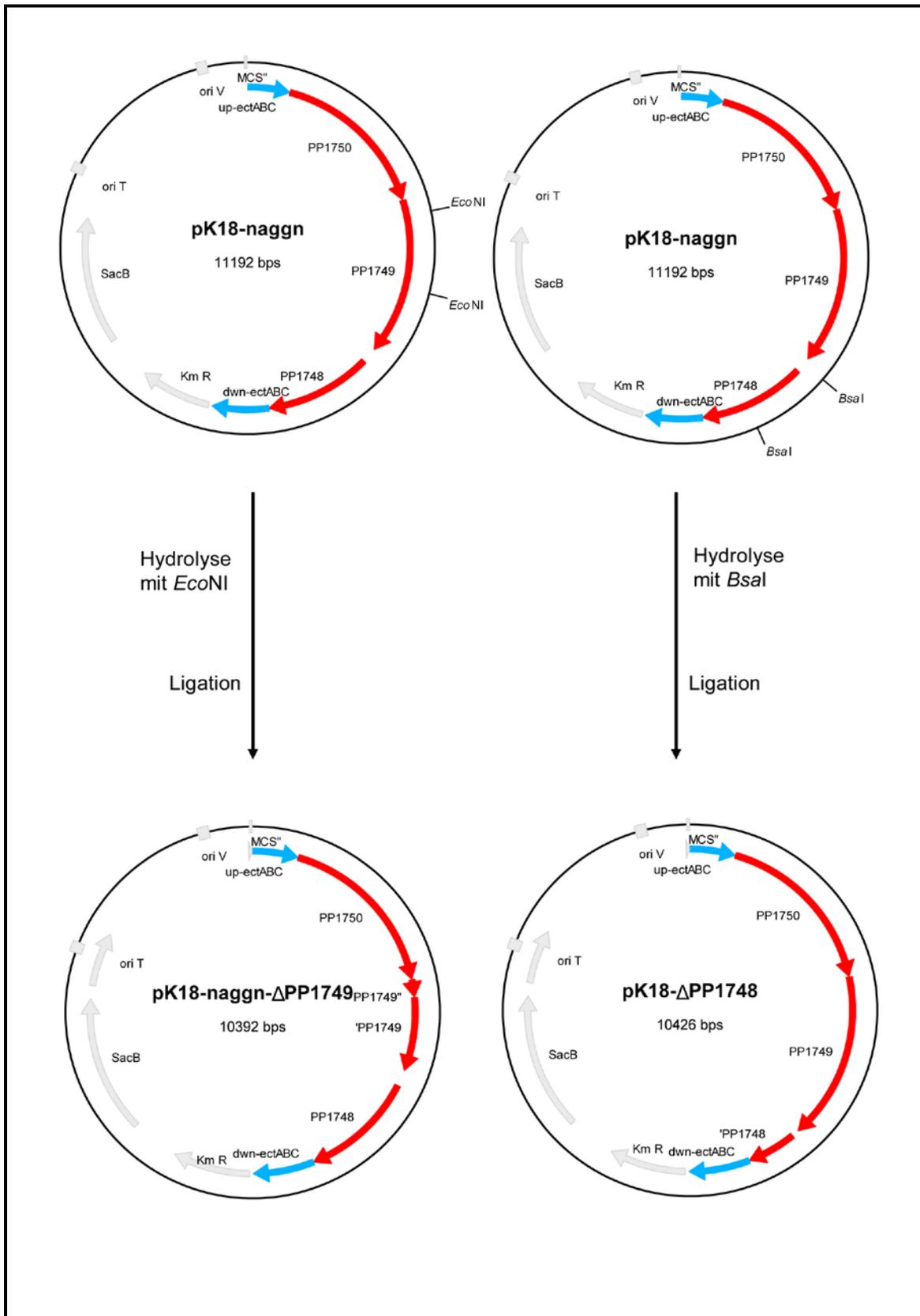


Abb. 56: Klonierungsschemata der Vektoren pK18-ΔPP1749 und pK18-ΔPP1748. Als Ausgangsvektor diente der Vektor pK18-naggn.

VII Anhang

H. elongata AKB

BamHI

1 ggatccgatc atccagggca tgcattgctc cgtacgggccc gggctgacca aggcacagtt cgaccagacg gtgggcattc atcccaccgg cgcccgaagaa

101 ttctgaccca tgcgtactcc gacacgccgc tgacgacctt cgggcaatcc tgtcacggcg atgtcattcg gacgggccac cctcgagggtg gcccggttgcg

201 ttatgcgtat ggcccgaatg aatgtggact aaactgggtc tgtgcaaacg tctgtcattc gatgcctttt cgtacaagac ctgccggggg acatcagccg

up-ectABC

301 gtacgagcgc cggtggtcga tgtcgcaaga atggggagag ccgctacata **cgccggcctgg** ggagtgggct **ataat**tttctt attatggaat tcagcaagca

-35 $\sigma^{32\text{osmo}}$ -10 $\sigma^{32\text{osmo}}$

401 agataacctg **gtttt**gaaa **tgaccataag** **cggctgttat** **gatg**ccgatc aaattcgcta **cagc**gaa**cca** cgacaatgtg **cg**gattagca **gg**agagttac

-35 σ^{70} -10 σ^{70} RBS PP1750→

501 gtttcacccc catcgaccaa gccctcgcg cagccgacct ggctgcggta gagcgcatta cccatcacct ggccccgcga ggccccgatg cctggggcctt

601 ccatagccag ggccccgatc ccctggggcca tgggcgcctg aagatcatgg acctgtcggg cggtcgcggc cagccgatgg tcgacaatac gctgggcctg

701 tcgctggcct tcaacgggtc catctacaac ttccccgaac tgcgcgagga actgcaggcg ctgggctaca gcttctggtc cgacggcgac accgaggtgc

801 tgctcaaggg ctaccacgcc tggggcgcg cgctgctgcc caagctcaac ggcatgtttg ccctggccat ctgggagcgc gacaaccagc gcctgttctt

901 ggccccgcga cgctggggcg tcaaaccctt gtacctgtca cgcaacggcg agcgcctgcg ctttgctcgc accctgccgg cactgctcaa gggcggcgac

1001 atcgaccgca tgctcgaccg ggtggccctc aaccactacc tgaatttcca cgccgtggta ccggcaccgc gcaccctgct ggccaactg cagaagctgg

1101 agcccggcac ctggatgcgc atcgaccgcc atggcgaagt ggaacgccag gtctggtggc aactgcacta cggccccac cccgacgagc gtgaactgga

1201 cctggaaggc tggaccaccg gcgtgctcga cgccaccgca gacgccgtag ccatccgcca acgggcagcc gtcgatgtgg gtgtgttgcg gtccggcgcg

1301 gtcgattcca gcctgctggt cggcttgctg cgcaagtgg gcggtgacga cctgtcgacc ttctccatcg gctttgaaga tgccggcgcg gagcgcggcg

1401 acgagttcca gtattcggac ctgatcgcca aactacgca caccgctcac caccagttgc gcattgccga acacgaaatc atcgaccaac tgccggccgc

1501 cttccgcgcc atgagcgagc cgatggtcag ccacgactgc atcgcttctt acctgctgct gcgggaagtg gccaaagcact gcaaggcgt acagagcggc

1601 caggtgccc atgagctgtt cgccggttac cactggtacc cgaggtgga cggcgcgcgac gacgcctatg cggcctaccg tgaggcgttc ttcgaccgca

1701 gccacgccga ataccgagc accgtgcagg cccctggct gctggaacc gacgctgccc gcgacttctg gcgcgaacac ttcgcgcgcc ccggcgcacc

1801 ggctgccgtg gacaaggcgc tgcgctgga cagcaccgtg atgctggtcg acgaccggt caagcgggtg gacaacatga ccatggcctg gggcctggag

1901 gcgcgtacgc cgttctcga ttaccgctg gtggaactgt cggcacgcat tcccggccgc ttcaagctgc ccgacggcg caagcaggtg ctcaagcagg

VII Anhang

2001 cggcgcgacg ggtgatcccc catgaggtga tcgaccgcaa gaagggttac ttcccgttac cgggcctgaa gcatctggaa ggtgccaccc tgggctgggt
2101 acgcgaactg ttgaccgacc ccagccagga ccgagggttg ttcaaccoga ccatgctcga ccgctgctg agcaaccgc acggccagct gacgccactg
2201 cgcggttcca agctgtggca actggcgcg ctagaacctgt ggctgagcga acaaggaatc tgaccgatga aagcccatga aatcgcttat ggtcagcgcc

PP1749→

2301 tgctgcgcbg ccaggcgccg tcctacgagc gcctgcaggc gcgctggcc ggcgacggca gccagccaca cgaccagccg cgtgccgtgc actgcggctg
2401 gggccggctg ttgataggcc acacctacc cagccggct tcctggccg aggatctgct cgacgagcac ccgggcgaac gcgacatcgc cctgtactg
2501 gccgcaccgc agcaggtgtt ggcacaggcc cctcagcagc tgttctcga cccgtccgac accctgcgcc tgtggttcac cgactaccgc ccggcgcagc
2601 gggatatttcg cggcttccgc gtgcggcggg cacagaacc cgccgactgg caggcgatca acacgctgta ccaggcgcg gggatgctcc ccgtcagcgc
2701 cgagctgctt accccccggc acttgggtgg cccggtgtat tggctggcag aggacgaaga cagcggcgcg attatcggca gcgtcatggg cctgaaccac
2801 accaaggcgt tcgatgacc cgagcatggc agcagcctgt ggtgcctggc ggtggacca cactgcacc gccccggct gggatgaagt ctggtgcgcc
2901 acctgatcga aacttcatg agccgtggcc tggcctacct ggacctgtc gtgctgcag acaaccgcca ggccaagcgc ctgtaccaga aactgggttt
3001 tcgcaacctg cccaccttcg cagtcaagcg caagaacggt atcaacgagc agctgttct cgggcctggc ccgcaagccg acctcaacc ctacgcacgc
3101 atcatcgtc acgaggccct gcgccggggc atcgaagtgc aggtggacga ccgctggc ggctgttca cctgagcct gggcggcgcg cgcattcgtc
3201 gccgggaatc gctcagcagc ctgaccagt ccgtgacct gacctgtgc caggacaaac gcctgacca gcatgccctg cacaacgctg ggtgcaggt
3301 gcccgcgcaa cagctggcgg gcaatgccga tgacaacct gcgtttctgg aagagcatgg ccggtggtg gtaaaaccg tcgatggcga gcaaggccag

HindIII

3401 ggcgtggcgg tgaacctgac ctgcatcagc gacatcacc gtgccgtggc gcatgcccgc cagttcgaca gccgcgtgct gctggaaagc tttcatgccg
3501 ggttcgacct gcgcatcgtg gtgatcggct acgaggtggt ggccgcggcc atccgccacc cagcgcaggt gctgggcgac ggtaagcaca gcgtgcgcca
3601 gttgatcga gcgagagcc gtcgacgcca ggctgccacc ggtggcgaga gccgattcc gctggacgac gaaaccgagc gcaccttgc cgcagcgggc
3701 gttggctatg acgacgtgtt gccggccggc cagcgcctgg ccgtgcggcg cacggccaac ctgcacaccg gcggcaccct ggaggacgtc accgaacgcc
3801 tgcaccgggt gctggccgat gctgccgtgc gcgcgccag ggcactggaa attccggtgg tggggctgga cttcatggtg cgtgatgccg ggcagccgga
3901 gtacgtgatc atcagggcca acgaacgtgc tggcctggcc aacctgaac cgcagcccac ccgagcgt tttatcgacc tgctgtttcc ccatagccgg
4001 ccggtggcct gacaactgct cggcttttg tgggagcggc cttgtgtcgc gaatggggtg cgaagcggc ctagggtctc agcttcgctg ccgatattgc
4101 cggggccgct ttgcggccct ttcgagacac aaggccgctc ccacaagact gcaaaattt aaccggaccg gaggcctgga catgtccgaa cgactccccg

-10

-35

PP1748→

VII Anhang

4201 aaccgatct cgactatctc aaacgcgtgc tgctgaaat gctcgccatc cccagcccca ccggcttcac cgacaccatc gtgcgctacg tggccgaacg
4301 ccttgacgaa ctgggcatcc ccttcgagct gaccgcgcg ggcaccattc gcgccaccct caaaggccgg caggccacc cccgaccgcg cgtctctgcc
4401 cacctggata ccacgcgcg cagcgtgcgc caattgcagg acaatggccg cctggccctg gcgcccctcg gctgctggtc cagccgtttt gccgagggca
4501 gccgggtag cgtgtttacc gataccgggg tattccgtgg cagcgtgctg ccgctgatgg ccagcgggca tgcattcaac acggcgatcg accagatgcc
4601 gatcagctgg gaccacgtgg aagtgcgcct ggatgcctac tgcgccacgc gcgctgactg tgaggcactg ggcgtgagca ttggtgattt cgtggccttc
4701 gaccattgc ccgagttcac cgaaagcggc cacatcagcg cccgtcacct ggacgacaag gctggcgtag cggcattgct ggccgactg aaggtctggt
4801 tggaaagcgg ccgccagccg ctgatcgact gccaccgct gttcaccatc accgaggaga ccggctcggg tgcagccggc gccctgccct gggacgtcag
4901 cgagttcgtc ggcatcgaca tcgccccggt ggcgccggg caggcttcca gcgagcatgc ggtcagtgtg gccatgcagg actcgtcggg gccttacgac
5001 taccacctgt cccggcacct gctgaaactg gccggcgacc atgacttgcc ggtgcggcgc gacctgttcc gctattactt cagcgatgcc cattcggcgg
5101 tgactgccgg gcacgatatt cgtaccgcgc tgggtggcgtt cggttgcgat gccaccatg gttacgagcg cacccatata gcagcctgg cagcgtgag
5201 ccggttggtg tcagcctacc tgctgagccc gcccgattt gccagcgatt cgcagccggc caatacgtca cttgagcgtc tcagccacca gctggagcac
5301 gatgcgcaga tggaaagcga cagcgggta ccggccgtgg acagcctggt cggaaacaaa ggctaaggcg cagtattctg ccgtctcgca cgaagagccc
5401 ccggtcacga tcgggggctc tttcgttggt cgcagcggca cgggtgccag tagctggacg cctcggacgt ttcattgcta ctattgcgtc atgattgatt
5501 catcgtccag aaaccgtcag cccgtcgagg aaggggcagt cgaggaagg gcattgcca acgacctggt cagcgaactg ctgctcggca tgcgtctaag
5601 cggcatccag tatcgccga tacaggcgtt tcctccctc ggcacgggg gcttcggtgc cagccgggg tgggccact ttcacttcat cgcgcgaggg
dwn-ectABC
5701 ccagtatac tgcgcagtcc cggcggggc gtgcaccggc tcgaggtcgg tgacgcagt cttctgccg gcggcggacc gcatgagctg ctgtcgtcgc
5801 cggagcaatc cgccagtcgt gatatcgcca gcttcacgac cgctccgctc tgcaaggccg tcagtgcggt gcgcaacggt tccccagaag tttgccagga
BglIII
5901 gagtggggcc gtcatttca gcggctgcat ggagttcgat ctcggcggca tgcattccgt cgtcggcttg atgccgaag tgatgcgtgt cgatacagat
6001 ct

Abb. 57: Region des NAGGN-Genclusters in *H. elongata* AKB.