

Einfluss kompatibler Solute auf die Thermostabilität prokaryotischer Ribosomen und die Aktivität der zellfreien Protein-Synthese

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Britta Seip

aus Dormagen

Bonn, im Juli 2013

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

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

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

Tag der Promotion: 11. September 2013

Erscheinungsjahr: 2013

Meiner Familie

*“Don’t judge each day by the harvest you reap,
but by the seeds that you plant”*

Robert Louis Stevenson

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	VII
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND TRIVIALNAMEN	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Osmoadaption halophiler Mikroorganismen	2
1.1.1 „Salt-in-cytoplasm“-Strategie	3
1.1.2 „Compatible-solute“-Strategie	4
1.2 Kompatible Solute	5
1.2.1 Ectoin und Hydroxyectoin	6
1.2.2 Metabolischer Kreislauf des Ectoins	7
1.3 Wirkung kompatibler Solute	8
1.3.1 Wirkung auf ganze Zellen	8
1.3.2 Wirkung auf Proteine	9
1.3.3 Wirkung auf DNA	10
1.3.4 Wirkung auf RNA	12
1.4 Modelle der Wirkungsweisen kompatibler Solute	13
1.4.1 „Preferential interaction“-Theorie (Arakawa und Timasheff, 1983)	14
1.4.2 Osmophober Effekt (Bolen und Baskakov, 2001)	17
1.4.3 „Water replacement“ (Clegg <i>et al.</i> , 1982)	18
1.5 Biotechnologische Anwendung kompatibler Solute	18
1.6 Ribosomen	19
1.6.1 Aufbau des Ribosoms	20
1.6.2 Translation	21
1.6.3 Stabilisierung durch mono- und divalente Metallionen	23
1.6.4 Stressbedingte Stabilisation in der Zelle	24
1.6.5 Temperaturstabilität bakterieller Ribosomen	25

1.7	Zellfreie Protein-Synthese	27
1.8	Zielsetzung der Arbeit	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	33
2.2	Nährmedien	33
2.2.1	Medien für Zellkultur und Stammhaltung	34
2.2.2	Medium für die Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.2.3	Medien für DSC-Messungen an ganzen Zellen	35
2.2.4	Medienzusätze	35
2.3	Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen	36
2.3.1	Stammhaltung	36
2.3.2	Flüssigkultur	36
2.3.3	Verfolgung des Zellwachstums	38
2.3.4	Gefriertrocknung	39
2.4	Analytische Methoden	39
2.4.1	Puffer und Lösungen für die Analytik	39
2.4.2	Mikroextraktion des Zellmaterials (Bligh und Dyer, 1959)	39
2.4.3	HPLC zur Bestimmung organischer Solute	40
2.5	Molekulargenetische Methoden	40
2.5.1	Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	40
2.5.2	Isolierung genomischer DNA	41
2.5.3	Isolierung von Plasmid-DNA	42
2.5.4	Restriktionshydrolyse von DNA	43
2.5.5	Ethanol-fällung von DNA	43
2.5.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	43
2.5.7	Polymerasekettenreaktion	43
2.5.8	Ligation	45
2.5.9	Agarosegelelektrophorese	45
2.5.10	Denaturierende Agarosegelelektrophorese für RNA	46
2.5.11	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach der CaCl ₂ -Methode	46
2.5.12	Transformation von <i>E. coli</i>	47
2.5.13	Sequenzierung von DNA	47

2.6	Proteinbiochemische Methoden	47
2.6.1	Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie	47
2.6.2	Gesamtzellproteinaufreinigung	48
2.6.3	BCA-Test	48
2.6.4	Bradford-Test	49
2.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.7	Isolierung bakterieller Ribosomen	51
2.7.1	Aufreinigung von kruden 70S-Ribosomen	52
2.7.2	Herstellung von Saccharosegradienten	52
2.7.3	Aufreinigung der ribosomalen Untereinheiten	53
2.7.4	Konzentrationsbestimmung isolierter Ribosomen und -untereinheiten	54
2.7.5	Aufreinigung ribosomaler RNA	55
2.7.6	Konzentrationsbestimmung von ribosomaler RNA	55
2.8	Kalorimetrie	56
2.8.1	Dynamische Differenzkalorimetrie	56
2.8.2	Kalorimetrie an ganzen Zellen, Ribosomen und isolierten ribosomalen Untereinheiten	58
2.8.3	Analyse der kalorimetrischen Messungen - Anpassung nach Gauß	59
2.9	<i>In vitro</i>-Transkription	60
2.9.1	Die T7 RNA-Polymerase P266L	61
2.9.2	Aufreinigung der T7 RNA-Polymerase	61
2.9.3	Durchführung der <i>in vitro</i> -Transkription	62
2.10	Zellfreie Protein-Synthese	63
2.10.1	Herstellung des S30-Zellextraktes	64
2.10.2	Durchführung der zellfreien Protein-Synthese	65
2.10.3	Nachweis der Luciferase-Aktivität	66
2.11	Polysomen-Profile	66
2.12	Verwendete Chemikalien	67
2.13	Software und Internet-basierte Computerprogramme	70
3	ERGEBNISSE	71
3.1	Kalorimetrische Messungen an intakten Zellen und Zellextrakten	71
3.1.1	Kalorimetrische Messungen an intakten Zellen	71

3.1.2	Kalorimetrische Messungen an lysierten Zellen	74
3.1.3	Kalorimetrische Messungen an beladenen Zellen	75
3.2	Kalorimetrie an bakteriellen Ribosomen	80
3.2.1	Isolierung bakterieller Ribosomen	80
3.2.2	Kalorimetrie an isolierten Ribosomen	83
3.2.3	Schmelzpunkt ohne kompatible Solute	86
3.2.4	Kalorimetrie an isolierten Ribosomen mit verschiedenen Konzentrationen kompatibler Solute	93
3.2.5	Effekt kompatibler Solute auf die Thermostabilität isolierter Ribosomen aus <i>Escherichia coli</i> K12	94
3.2.6	Effekt kompatibler Solute auf die Thermostabilität isolierter Ribosomen aus <i>Halomonas elongata</i> Wt	102
3.2.7	Effekt von Salzen auf die Thermostabilität von Ribosomen	105
3.2.7.1	Schmelzpunkt ohne kompatible Solute	106
3.2.7.2	Schmelzpunkt mit kompatiblen Soluten	109
3.2.8	Wirkung kompatibler Solute auf die Schmelztemperaturen aufgereinigter ribosomaler Untereinheiten	112
3.2.8.1	Isolierung ribosomaler Untereinheiten	113
3.2.8.2	Thermostabilität ribosomaler Unterheiten und der Einfluss kompatibler Solute	114
3.3	Analyse der sequenziellen Unterschiede in den Ribosomen zwischen <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	120
3.3.1	Die ribosomalen Proteine L10 und L25 in <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	121
3.3.2	Heterologe Expression des ribosomalen Proteins L13	123
3.4	Zellfreie Protein-Synthese	124
3.4.1	Aktivität des ZFPS-Systems bei unterschiedlichen Temperaturen	126
3.4.2	Zellfreie Protein-Synthese mit einem Zellextrakt aus <i>H. elongata</i> Wt	127
3.4.3	Einfluss kompatibler Solute auf die zellfreie Protein-Synthese	129
3.4.4	Einfluss von Ectoin und Hydroxyectoin auf die zellfreie Protein-Synthese	130
3.4.5	Einfluss der Ectoine auf die <i>in vitro</i> -Transkription	133
3.4.6	<i>In vitro</i> -Transkription von <i>ectC</i>	134
3.4.7	Analyse von Polysomen-Profilen	135
4	DISKUSSION	139
4.1	Kalorimetrie an intakten Zellen und Zellextrakten	140
4.1.1	Kalorimetrie an intakten Zellen und Zelllysaten angezogen in verschiedenen Medien	140

4.1.2	Thermische Stabilität zellulärer Komponenten in supplementierten Zellen	141
4.2	Kalorimetrie an isolierten Ribosomen	142
4.2.1	Thermostabilität isolierter Ribosomen aus <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	143
4.2.2	Einfluss kompatibler Solute auf die Thermostabilität isolierter Ribosomen	147
4.2.3	Effekt von Salzen auf die Thermostabilität isolierter Ribosomen	153
4.2.4	Effekt kompatibler Solute auf die Thermostabilität NaCl-gestresster Ribosomen	154
4.2.5	Vergleich der Daten aus den Ganzzellmessungen mit den Erkenntnissen der <i>in vitro</i> -Messungen	155
4.3	Unterschiede in den Ribosomen von <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	156
4.3.1	Vergleich der ribosomalen RNA	156
4.3.2	Vergleich der ribosomalen Proteine	157
4.4	Zellfreie Protein-Synthese	159
4.4.1	Zellfreie Protein-Synthese in <i>H. elongata</i> S30-Zellextrakt	159
4.4.2	Zellfreie Protein-Synthese mit <i>E. coli</i> S30-Zellextrakt	161
4.4.3	Einfluss der Ectoine auf die <i>in vitro</i> -Transkription von <i>luc</i>	163
4.4.4	Einfluss der Ectoine auf die <i>in vitro</i> -Transkription von <i>ectC</i>	164
4.4.5	Polysomen-Profile	165
5	AUSBLICK	169
5.1	Einfluss kompatibler Solute auf die Thermostabilität	169
5.2	Zellfreie Protein-Synthese	172
6	ZUSAMMENFASSUNG	177
	LITERATURVERZEICHNIS	181
	ANHANG	199
	DANKSAGUNG	219

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1: Strukturformeln einiger bekannter kompatibler Solute	5
Abbildung 2: Thermodynamisches Energieschema der möglichen Interaktionen der Proteinoberfläche mit dem Cosolvens	16
Abbildung 3: Das zentrale Dogma der Molekularbiologie	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung der eubakteriellen Translation	23
Abbildung 5: Denaturierungstemperaturen wichtiger Zellbestandteile	26
Abbildung 6: Schematischer Ablauf der zellfreien Protein-Synthese	28
Abbildung 7: Denaturierungsverhalten von RNase A in einer DSC-Messung	57
Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der Luciferase	66
Abbildung 9: DSC-Messung an intakten Zellen von <i>E. coli</i> K12 angezogen in Komplexmedium	72
Abbildung 10: DSC-Messung an intakten Zellen von <i>E. coli</i> K12 angezogen in Minimalmedium	73
Abbildung 11: DSC-Messung lysierter Zellen von <i>E. coli</i> K12 in Komplexmedium oder Minimalmedium	75
Abbildung 12: DSC-Messung mit intakten Zellen von <i>E. coli</i> K12 mit Betain supplementiert, in Minimalmedium und in Komplexmedium angezogen	76
Abbildung 13: Intrazelluläre Solutkonzentration von <i>E. coli</i> K12 angezogen in verschiedenen Medien	77
Abbildung 14: DSC-Messungen an ganzen Zellen von <i>E. coli</i> K12 in Minimalmedium supplementiert mit Ectoin oder Hydroxyectoin	78
Abbildung 15: DSC-Messung an intakten Zellen von <i>E. coli</i> MC4100 Δ otsB	79
Abbildung 16: Analyse der Proteinfractionen in den verschiedenen Aufreinigungsschritten von Ribosomen aus <i>E. coli</i> K12	81
Abbildung 17: Analyse der Proteinfractionen in den verschiedenen Aufreinigungsschritten von Ribosomen aus <i>H. elongata</i>	82
Abbildung 18: DSC-Messung an aufgereinigten <i>E. coli</i> -Ribosomen	83
Abbildung 19: Reproduzierbarkeit von DSC-Messungen an kruden Ribosomen	84
Abbildung 20: Vergleich eingefrorener und nicht-eingefrorener Ribosomen	85
Abbildung 21: Kurvenanpassung nach Gauß an einer DSC-Messung mit <i>E. coli</i> -Ribosomen	86
Abbildung 22: Reproduzierbarkeit der kalorimetrischen Messungen an <i>H. elongata</i> -Ribosomen	88
Abbildung 23: Kurvenanpassung nach Gauß an DSC-Messung von kruden 70S-Ribosomen aus <i>H. elongata</i>	89
Abbildung 24: Abgebrochene DSC-Messungen an <i>H. elongata</i> -Ribosomen	90
Abbildung 25: Analyse der Proteinfractionen aus den abgebrochenen DSC-Messungen	91

Abbildung 26: DSC-Messung aufgereinigter rRNA aus <i>E. coli</i>	92
Abbildung 27: Effekt unterschiedlicher Konzentrationen Saccharose auf die Thermostabilität aufgereinigter Ribosomen aus <i>E. coli</i>	94
Abbildung 28: Schmelzpunkte der drei Denaturierungsreaktionen von <i>E. coli</i> K12-Ribosomen mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen	96
Abbildung 29: Effekt steigender Hydroxyectoinkonzentrationen auf die Thermostabilität aufgereinigter Ribosomen aus <i>E. coli</i>	97
Abbildung 30: Grafische Darstellung der Schmelzpunkte der drei Denaturierungsreaktionen von <i>E. coli</i> -Ribosomen mit unterschiedlichen Hydroxyectoin-Konzentrationen	98
Abbildung 31: Differenzen der Schmelztemperaturen der einzelnen Denaturierungsereignisse mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten	100
Abbildung 32: Differenzen der Schmelztemperaturen der einzelnen Denaturierungsereignisse an <i>H. elongata</i> -Ribosomen mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten	103
Abbildung 33: Effekt unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen auf die Thermostabilität aufgereinigter Ribosomen aus <i>E. coli</i>	106
Abbildung 34: DSC-Messung an <i>H. elongata</i> -Ribosomen mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen	107
Abbildung 35: SDS-PAGE zur Analyse der denaturierten und nativen Fraktion nach Upscan mit 0,25 M NaCl	108
Abbildung 36: Thermostabilität aufgereinigter 70S-Ribosomen aus <i>H. elongata</i> unter KCl-Einfluss	109
Abbildung 37: Effekt von kompatiblen Soluten auf die Thermostabilität NaCl-gestresster Ribosomen aus <i>E. coli</i> K12	110
Abbildung 38: Einfluss von 1,5 M Hydroxyectoin auf NaCl-gestresste <i>E. coli</i> K12-Ribosomen	111
Abbildung 39: Effekt kompatibler Solute auf die Thermostabilität NaCl-gestresster Ribosomen aus <i>H. elongata</i> Wt	112
Abbildung 40: SDS-PAGE mit isolierten ribosomalen Untereinheiten aus <i>E. coli</i> K12	113
Abbildung 41: DSC-Messung isolierter 30S-Untereinheiten aus <i>E. coli</i> K12 (HEPES-Puffer)	114
Abbildung 42: DSC-Messung isolierter ribosomaler 30S-Untereinheiten in Untereinheiten-Puffer nach (Mackey et al., 1991)	115
Abbildung 43: DSC-Messung an isolierten 50S-Untereinheiten aus <i>E. coli</i> in HEPES-Puffer und Analyse der nativen und denaturierten Fraktionen nach Denaturierung des ersten Peaks	116
Abbildung 44: DSC-Messung isolierter 50S-Untereinheiten (nach Mackey et al., 1991, Tris-HCl-Puffer)	116

Abbildung 45: DSC-Messung mit aufgereinigten, ribosomalen 50S-Untereinheiten aus <i>E. coli</i> K12 mit und ohne 1 M Betain (HEPES-Puffer)	117
Abbildung 46: Vergleich der Thermostabilität aufgereinigter 50S-Untereinheiten ohne Solutzusatz und 50S-Untereinheit unter Einfluss von 1 M Betain (Tris-HCl-Puffer)	118
Abbildung 47: Differenzen der Denaturierungstemperaturen isolierter ribosomaler Untereinheiten unter Soluteinfluss in verschiedenen Puffersystemen	119
Abbildung 48: Multialignment der Aminosäuresequenzen der ribosomalen Proteine L25 aus verschiedenen Organismen	122
Abbildung 49: Bestimmung der optimalen T7 RNA-Polymerasekonzentration	125
Abbildung 50: Aktivität der zellfreien Protein-Synthese bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen	126
Abbildung 51: Luciferase-Expression mit <i>H. elongata</i> -Zellextrakt unter NaCl-Einfluss	128
Abbildung 52: Einfluss ausgewählter kompatibler Solute auf die zellfreie Protein-Synthese	129
Abbildung 53: Einfluss der Ectoine auf die Expression der Luciferase in der zellfreien Protein-Synthese bei Inkubation bei 30 °C	130
Abbildung 54: Zellfreie Protein-Synthese bei 37 °C mit ansteigenden Ectoin- und Hydroxyectoinkonzentrationen	131
Abbildung 55: Einfluss von Salz und Hydroxyectoin auf die Expression der Luciferase in der zellfreien Protein-Synthese	132
Abbildung 56: Formaldehyd-Gelelektrophorese (1,2 % Agarose) der <i>in vitro</i> -Transkription der Luciferase mRNA unter Einfluss von steigenden Ectoin- oder Hydroxyectoinkonzentrationen	133
Abbildung 57: Nicht-denaturierendes Agarosegel (1 %ig) zur Analyse der <i>in vitro</i> -Transkription von pET-22b(+)_ectC_lang_Pstu	135
Abbildung 58: Analyse der Polysomen-Profile von Reaktionen der zellfreien Protein-Synthese mit Hydroxyectoin	136
Abbildung 59: Wachstum von <i>H. elongata</i> Wt in MM63-1 mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen	206
Abbildung 60: Sequenzvergleich der 5S rRNA-Gens aus <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	206
Abbildung 61: Sequenzvergleich des 16S rRNA-Gens aus <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	208
Abbildung 62: Sequenzvergleich des 23S rRNA-Gens aus <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	210
Abbildung 63: Multialignment der Aminosäuresequenzen der ribosomalen Proteine L10 aus verschiedenen Organismen	211
Abbildung 64: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsplasmides pQE60_L13_Chla	212
Abbildung 65: Vergleich des Ergebnisses der Sequenzierung des Plasmids pQE60_L13_Chla mit der geplanten Sequenz	213
Abbildung 66: Vergleich des Ergebnisses der Sequenzierung des Plasmids pQE60_L13_Ecol mit der geplanten Sequenz	214

Abbildung 67: Vergleich des Ergebnisses der Sequenzierung des Plasmids pQE60_L13_Helo mit der geplanten Sequenz	215
Abbildung 68: Vergleich der Wachstumsraten von <i>E. coli</i> DH5 α mit unterschiedlichen Plasmiden bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (MM63-Medium)	216
Abbildung 69: Vergleich der Wachstumsraten von <i>E. coli</i> DH5 α mit unterschiedlichen Plasmiden bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (Komplexmedium)	216
Abbildung 70: SDS-PAGE zur Analyse der Aufreinigung ribosomaler Untereinheiten aus <i>E. coli</i> K12 nach (Mackey et al., 1991) modifiziert	217
Abbildung 71: Aufreinigung der T7 RNA-Polymerase aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) p266L	217
Abbildung 72: Aktivität der bei 42 °C mit unterschiedlichen Ectoin- und Hydroxyectoinkonzentrationen exprimierten Luciferase	218

Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme	33
Tabelle 2: Verwendete Plasmide	33
Tabelle 3: Lösungen und Puffer für die Analytik	39
Tabelle 4: Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie	41
Tabelle 5: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit <i>Pfu</i> -Polymerase	44
Tabelle 6: Verwendete Primer	44
Tabelle 7: PCR-Programm mit <i>Pfu</i> -Polymerase	45
Tabelle 8: Lösungen und Puffer, die für die Proteinbiochemie verwendet wurden.	47
Tabelle 9: Zusammensetzung von SDS-PAGEs zur Analyse von Gesamtzellproteinproben oder Ribosomenaufreinigungen	50
Tabelle 10: Puffer und Lösungen für die Isolierung bakterieller Ribosomen	51
Tabelle 11: Puffer und Lösungen für die Kalorimetrie	56
Tabelle 12: Programme zur Messung von Ribosomen, Ribosomenuntereinheiten und ganzen Zellen im dynamischen Differentialkalorimeter	59
Tabelle 13: Puffer und Lösungen für die <i>in vitro</i> -Transkription	60
Tabelle 14: Zusammensetzung eines <i>in vitro</i> Transkriptionsansatzes	62
Tabelle 15: verwendete Puffer und Lösungen in der zellfreie Protein Synthese	63
Tabelle 16: Vergleich der Schmelztemperaturen von Ribosomen aus dieser Arbeit mit Literaturwerten	87
Tabelle 17: Schmelztemperaturen der einzelnen Peaks bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen Saccharose zu aufgereinigten Ribosomen aus <i>E. coli</i>	95
Tabelle 18: Schmelztemperaturen aufgereinigter <i>E. coli</i> -Ribosomen unter Zusatz verschiedener Hydroxyectoinkonzentrationen	98
Tabelle 19: Schmelztemperaturen der <i>E. coli</i> -Ribosomen mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten in ansteigenden Konzentrationen	199
Tabelle 20: Schmelztemperaturen aufgereinigter <i>H. elongata</i> -Ribosomen mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgewählter kompatibler Solute	201
Tabelle 21: Denaturierungstemperaturen aufgereinigter ribosomaler Untereinheiten aus <i>E. coli</i>	202
Tabelle 22: Vergleich der ribosomalen Proteine der 30S-Untereinheit aus <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	203
Tabelle 23: Vergleich der ribosomalen Proteine der 50S-Untereinheit aus <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	203
Tabelle 24: Ribosomale Proteine aus <i>Salinibacter ruber</i>	205

Verzeichnis der Abkürzungen und Trivialnamen

μ	Wachstumsrate
%	Prozent
100S	Komplex aus zwei 70S-Ribosomen
30S	kleine Untereinheit des Ribosoms, sedimentiert mit 30S durch Gradienten
50S	große Untereinheit des Ribosoms, sedimentiert mit 50S durch Gradienten
70S	Komplex aus 30S- und 50S-Untereinheit
A260	Absorption bei 260 nm
Å	Angström, entspricht 1×10^{-10} m
Ack	Acetatkinase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^R	Ampicillinresistenzgen
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenzgen
cfu	Kolonie-bildende Einheiten (engl.: colony forming units)
CoA	Acetyl-Coenzym A
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleotide (Mix aus allen 4 dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DSC	Dynamische Differentialkalorimetrie (engl.: differential scanning calorimetry)
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongations-Faktor
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere (lat.: et alii)
FAGE	Formaldehyd-Gelelektrophorese
g	Gramm

<i>g</i>	Erdumdrehung
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: green fluorescent protein)
griech.	griechisch
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O _{DEPC}	Reinstwasser, das durch Zugabe von DEPC RNase-frei gemacht wurde
H ₂ O _{demin.}	demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst.}	Reinstwasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo (z.B. in kDa = Kilo-Dalton)
Kbp	Kilo-Basenpaare
L	Liter
lat.	lateinisch
LDH	Lactatdehydrogenase
M	mol/L
M	Mega
Min	Minuten
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MWCO	molekulare Ausschlussgröße (engl.: molecular weight cut off)
n.d.	nicht bestimmt (engl.: not determined)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pdh	Pyruvatdehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase
P _i	anorganisches Phosphat
pI	isoelektrischer Punkt (bei Proteinen)
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
Pps	PEP-Synthase
Pta	Pyruvattransacetylase
Pyk	Pyruvatkinase
RBS	Ribosom-Binde-Stelle (engl.: ribosome binding site)
RHF	ribosome hibernation factor

RLU	Lichtemission der Luciferase (engl.: relative light units)
RMF	ribosome modulation factor
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RSB	reduzierender Probenpuffer
S	Svedberg, Einheit des Sedimentationskoeffizienten, definiert als 10^{-13} Sekunden
S100	Zellextrakt nach Zentrifugation bei 100.000 g
S30	Zellextrakt nach Zentrifugation bei 30.000 g
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
ssRNA	single strand RNA, Einzelstrang-RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
UTP	Uridintriphosphat
v/v	Volumen pro Volumen (engl.: volume per volume)
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: weight per volume)
ΔG_h^b	Differenz des chemischen Potentials bei bevorzugter Bindung des Solut an die Proteinoberfläche zum chemischen Potential reinen Wassers
ΔG_h^i	Differenz des chemischen Potentials bei inertem Solut zum chemischen Potential reinen Wassers
ΔG_h^x	Differenz des chemischen Potentials bei Soluten die von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden zum chemischem Potential reinen Wassers

1 Einleitung

Der mikrobielle Zensus steht derzeit bei etwa 11.800 beschriebenen Spezies (Stand Januar 2013) (Euzéby, 2013). Dies ist nicht viel, vergleicht man die Anzahl der bereits beschriebenen Insekten (~1 Million Spezies, Stand 2005 Grimaldi und Engel, 2005). Dies hat zwei zusammenhängende Gründe: Zum einen stellt sich die Frage, ab wann ein Organismus einer neuen Spezies zugeordnet wird. Unterschieden werden Spezies derzeit noch anhand ihres DNA-DNA-Hybridisierungslevels. Dieses wurde vor mehr als 20 Jahren aufgrund damaliger Speziesdefinitionen auf einen Re-Assoziationswert von 70 % und einen Schmelzpunktunterschied ≤ 5 % festgelegt (Achtman und Wagner, 2008). Zum anderen sind die Forschungsobjekte sehr klein und der Nachweis scheitert bisher oft an geeigneten Nachweis- und/oder Kultivierungsmethoden. Erst durch die Erfindung (und seitdem ständige Weiterentwicklung) des Mikroskops im 17. Jahrhundert sowie neue molekularbiologische Methoden können Mikroorganismen bestimmt und nachgewiesen werden. Daher ist die Mikrobiologie noch eine recht „junge“ Wissenschaft und es wird vermutet, dass bisher lediglich 1 %, möglicherweise 2 %, aller mikrobiellen Spezies entdeckt wurden (Oren, 2004).

Der beeindruckenden Diversität an Mikroorganismen stehen darüber hinaus vielfältige metabolische Prozesse und Überlebensstrategien zur Seite. Mit der Entdeckung jeder neuen Spezies können somit auch immer weitere Details, welche das Überleben einzelner Spezies sichern, hinzugefügt werden. Besonders beeindruckend sind die Leistungen der extremophilen Mikroorganismen. Unter dem Sammelbegriff Extremophile, also das Extreme liebend, werden all jene Organismen zusammengefasst, die sich an das Leben unter extremen Umweltfaktoren angepasst haben. Durch geschickte Anpassungsmechanismen besetzen sie so ökologische Nischen, welche aus menschlicher Sicht völlig unwirtliche Bedingungen bieten. So konnten einerseits Mikroorganismen aus kalten Regionen wie der Arktis und Antarktis isoliert werden. Diese psychrophilen Organismen zeigen auch bei Temperaturen bis -8 °C noch Wachstum (Mondino *et al.*, 2009). Andererseits wurden thermophile Mikroorganismen z. B. aus den Schloten der schwarzen Raucher der Tiefsee isoliert, die Wachstum auch noch bei 250 °C aufweisen (Baross und Deming, 1983). Neben den Temperaturen bestimmen aber auch andere abiotische Faktoren wie Druck (Barophile), Salinität (Halophile), pH-Wert (Acido- bzw. Alkaliphile) oder die Verfügbarkeit von Wasser die Charakteristika eines Standortes an die der dort lebende Organismus angepasst sein muss. Dabei gibt es sowohl Organismen, die lediglich eine dieser besonderen Bedingungen tolerieren, aber auch Mischformen (Bowers *et al.*, 2009), die als Polyextremophile bezeichnet

werden. So sind die Mikroorganismen aus den schwarzen Rauchern auch gleichzeitig zumindest barotolerant (Baross und Deming, 1983) und die psychrophilen Zellen aus der Antarktis können gleichzeitig auch halophil oder zumindest halotolerant sein.

1.1 Osmoadaption halophiler Mikroorganismen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung kompatibler Solute, die eine Überlebensstrategie halophiler Organismen darstellen. Daher sollen die Reaktionen der Osmoadaption halophiler Organismen, wie dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stamm *Halomonas elongata* nachfolgend genauer betrachtet werden. Die Bezeichnung „halophil“ leitet sich von den griechischen Wörtern *halos* für Salz und *philos* für Freund (oft übersetzt als „liebend“) ab. Halophile sind also Salz-liebende Organismen. Sie benötigen oft Salzkonzentrationen, die für nicht angepasste Organismen ein Überleben unmöglich machen. Die klassische Einteilung nach Kushner (Kushner, 1978) in halotolerante, moderat halophile und extrem halophile Organismen, die auf der Fähigkeit beruhte in Medien definierter Salzkonzentration zu wachsen, wurde in den vergangenen Jahren auf Vorschlag von Oren vereinfacht (Oren, 2008). Hier wurde die Einteilung in halophile und halotolerante Organismen gewählt, da die tolerierte Salzkonzentration oftmals von der Medienzusammensetzung und der Wachstumstemperatur abhängt. Zu den halotoleranten Organismen werden demnach alle Organismen gezählt, die ein Wachstumsoptimum unterhalb von 3 % NaCl haben und bei denen oberhalb von 10 % kein Wachstum mehr nachweisbar ist. Als halophil werden alle Organismen bezeichnet, die oberhalb einer Salzkonzentration von 10 % gut wachsen können (Oren, 2008).

Halophile und halotolerante Organismen finden sich in allen drei Reichen des Lebens: bei den Eubakteria, den Archaeen und auch im Reich der Eukarya (Oren, 2002, 2006a). Sie sind weltweit an Standorten erhöhter Salinität nachweisbar. Die Spanne reicht dabei von nur wenigen Prozent Salinität in den Meeren (etwa 3,5 %) bis hin zu hochsalinen Habitaten wie dem Toten Meer (etwa 34 %) oder Natursolen (37 %) (Antón *et al.*, 2000). Aber auch künstlich erzeugte Standorte können solch hohe Salinitäten aufweisen. So konnten auch bereits halotolerante Organismen von gepökeltem Fisch oder Fleisch isoliert werden (Ventosa *et al.*, 1998). Zwar werden all diese Standorte als (hoch-)salin bezeichnet, jedoch weisen sie oftmals eine unterschiedliche Ionenzusammensetzung auf. So enthält Meerwasser hauptsächlich Na^+ - und Cl^- -Ionen und nur zu geringen Anteilen andere Ionen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} oder K^+ und besitzt einen pH-Wert von etwa 8,1 (Garrels und Thompson, 1962). Im Vergleich dazu enthält das Tote Meer neben großen Mengen Na^+ und Cl^- auch etwa 1,8 M Mg^{2+} und 0,4 M Ca^{2+} und hat einen pH-Wert von etwa 6 (Oren, 1999b).

Obwohl gelöste Ionen unerlässlich für die Aktivität und Stabilität von Enzymen, DNA und RNA (vgl. 1.6.3) sind, können diese hohen Ionenstärken nur von angepassten Organismen toleriert werden. Hohe Ionenstärken bedeuten gleichzeitig eine geringe Wasseraktivität. Allerdings ist die Verfügbarkeit von freiem Wasser für die Aufrechterhaltung der zellulären Vorgänge unabdingbar. Da das Wasser, im Gegensatz zu gelösten Ionen, frei über die semipermeable Cytoplasmamembran diffundieren kann (Bovell *et al.*, 1962) und nach dem Prinzip der Osmose zum Konzentrationsausgleich aus der Zelle herausdiffundieren würde, benötigen die Zellen spezielle Anpassungsmechanismen um das osmotische Potential der Zelle zu regulieren. Zwei unterschiedliche Strategien sind bekannt um das intrazelluläre osmotische Potential dem der Umgebung anzupassen (Csonka, 1989) und so den Wasserausstrom aus dem Cytoplasma zu verhindern: die „salt-in-cytoplasm“-Strategie und die „compatible-solute“-Strategie.

1.1.1 „Salt-in-cytoplasm“-Strategie

Zellen, die dem osmotischen Druck mit der „salt-in-cytoplasm“-Strategie (Galinski, 1995b) begegnen akkumulieren bei hohem osmotischen Druck anorganische Ionen im Cytoplasma (da Costa *et al.*, 1998). Dabei werden hauptsächlich K^+ -, Na^+ - und Cl^- -Ionen aufgenommen. So konnten intrazelluläre Konzentrationen von bis zu 4,6 M K^+ -Ionen bereits dokumentiert werden (Martin *et al.*, 1999). Obwohl diese Strategie für die Zellen aus energetischer Sicht relativ kostengünstig ist, ist sie in den verschiedenen phylogenetischen und physiologischen Gruppen der Halophilen nicht weit verbreitet. In lediglich drei Gruppen sind bisher Vertreter dieser Strategie gefunden worden: bei den aeroben Archaea der *Halobacteriales* und bei den anaeroben Bacteria der *Haloanaerobiales* (Oren, 2006b). Vor kurzem wurde mit *Salinibacter ruber* der erste obligat aerobe Vertreter aus dem Reich der Bacteria beschrieben, der die „salt-in-cytoplasm“-Strategie anwendet (Antón *et al.*, 2002).

Um den hohen Ionenstärken im Cytoplasma standzuhalten müssen alle Zellbestandteile daran angepasst sein. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Proteine als Anpassung typischerweise einen hohen Anteil saurer Aminosäuren (Glutamat und Aspartat) aufweisen. Die negative Ladung der Proteine erhöht so unter Hochsalzbedingungen die Löslichkeit und Flexibilität, während die Proteine ohne die hohen Ionenstärken aufgrund der sich abstoßenden Ladung denaturieren würden (Mevarech *et al.*, 2000). Diese Anpassungsstrategie ist daher sehr erfolgreich bei extremen Salzkonzentrationen, andererseits jedoch sehr unflexibel und die Zellen sind so auf Habitate konstanter Salinität angewiesen.

1.1.2 „Compatible-solute“-Strategie

Im Gegensatz zu Vertretern der „salt-in-cytoplasm“-Strategie können Vertreter der „compatible-solute“-Strategie deutlich flexibler auf schwankende Salzkonzentrationen reagieren. Die Strategie ist daher auch unter den Bacteria und Eukarya weiter verbreitet und konnte auch bereits in methanogenen Archaea nachgewiesen werden (Imhoff und Rodriguez-Valera, 1984; Lai und Gunsalus, 1992; Oren, 2008).

Hier reagieren die Zellen auf einen hyperosmotischen Schock als erste Antwort zwar ebenfalls mit der Aufnahme von anorganischen Ionen wie K^+ ins Cytoplasma, diese werden jedoch im weiteren Verlauf der Stressantwort durch niedermolekulare, gut wasserlösliche Verbindungen mit osmotischem Potential ersetzt (Dinnbier *et al.*, 1988; Galinski, 1995b). Diese Verbindungen haben, anders als die Ionen in der „salt-in-cytoplasm“-Strategie, selbst in molaren Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Stoffwechselforgänge der Zellen. Aus diesem Grund sind keine Anpassungen des Zellapparates an die hohen Solutkonzentrationen vonnöten. Sie werden daher als kompatible Solute bezeichnet (Brown, 1976).

Kompatible Solute können von den Zellen selbst *de novo* synthetisiert oder, energetisch günstiger und daher von den Zellen favorisiert, aus dem Medium aufgenommen werden (Kempf und Bremer, 1998; Oren, 1999a). Sofern die Zellen also in der Lage sind geeignete Transporter zu exprimieren, können auch Zellen, die keine *de novo*-Synthese betreiben können, eine Osmotoleranz erwerben (Galinski und Trüper, 1994; Kempf und Bremer, 1998), da keine speziellen Anpassungen des Zellapparates notwendig sind.

Die Zellen regulieren die intrazelluläre Solutkonzentration in Abhängigkeit von der Salinität (Wohlfarth *et al.*, 1990; Galinski und Louis, 1999) des Mediums durch Synthese und Aufnahme beziehungsweise Abbau und Abgabe. Im Falle eines hypoosmotischen Schocks sind sie weiter in der Lage die kompatiblen Solute in kurzer Zeit an das Medium abzugeben und so das osmotische Potential ihres Cytoplasmas zu senken. Dies und die Tatsache, dass keine speziellen Anpassungen vonnöten sind erklärt die hohe Flexibilität dieser Strategie und ermöglicht ihren Vertretern sich auch an Standorten schwankender Salinität anzusiedeln (Ventosa *et al.*, 1998).

1.2 Kompatible Solute

Die heute bekannten kompatiblen Solute haben, obwohl sie aus vielen unterschiedlichen Spezies isoliert wurden, drei grundlegende, gemeinsame Eigenschaften: sie interagieren nicht mit dem Stoffwechsel der Zellen, sind im Allgemeinen sehr gut wasserlöslich und liegen bei physiologischem pH-Wert meist zwitterionisch vor (Galinski und Trüper, 1994; Galinski, 1995a).

Die kompatiblen Solute leiten sich trotz dieser Gemeinsamkeiten von nur wenigen, aber höchst unterschiedlichen Stoffklassen ab: Zucker und deren Derivate (z. B. Trehalose, Saccharose und Mannosylglycerat), Polyole (z. B. Glycerol und Arabitol), Aminosäuren (z. B. L- α -Glutamat, β -Glutamat und L-Prolin), Aminosäurederivate (z. B. Glycinbetain, Ectoin und Hydroxyectoin) und Schwefelverbindungen (z. B. Dimethylsulfoniopropionat). Einige Strukturformeln kompatibler Solute sind in Abbildung 1 gezeigt.

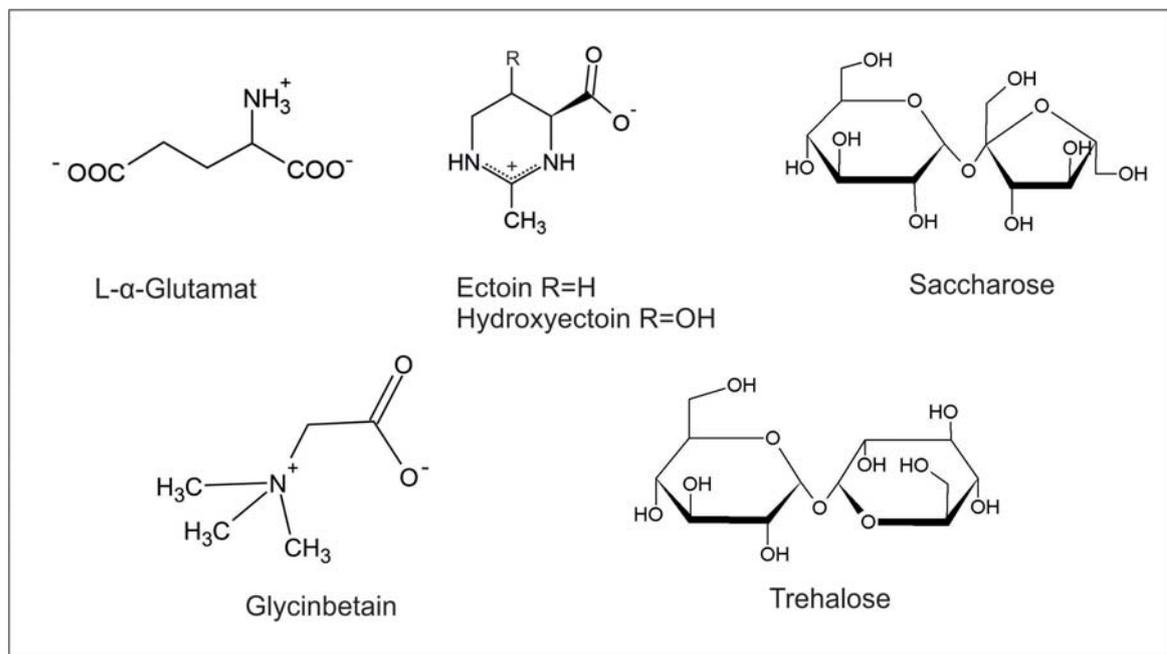


Abbildung 1: Strukturformeln einiger bekannter kompatibler Solute

Dargestellt sind die Strukturformeln der kompatiblen Solute, die, bis auf die Saccharose, von *E. coli* und *H. elongata* unter Stressbedingungen *de novo* synthetisiert oder mit Hilfe von speziellen Transportern aufgenommen werden können. L- α -Glutamat wird als erste Stressantwort auf hyperosmotische Bedingungen mit K^+ als Gegenion akkumuliert. *E. coli* ersetzt das Glutamat im Zuge der Stressantwort durch Trehalose, während *H. elongata* Ectoin und Hydroxyectoin akkumuliert. Das Disaccharid Saccharose ist als kompatibles Solut hauptsächlich bei halophilen Cyanobakterien verbreitet.

Die quartäre Ammoniumverbindung Betain (Glycinbetain) ist in allen drei Domänen des Lebens als kompatibles Solut bekannt (Storey und Wyn Jones, 1975; Galinski, 1995b). Bei den Prokaryoten sind allerdings nur relativ wenige Vertreter beschrieben, die in der

Lage sind Betain selbst zu synthetisieren. Viel öfter nehmen die Zellen das Solut unter Stress aus Komplexmedien auf (Galinski, 1995b).

Beide in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modellorganismen, *E. coli* und *H. elongata*, sind über spezielle Transportsysteme in der Lage Betain aus dem Medium aufzunehmen (Landfald und Strøm, 1986; Haardt *et al.*, 1995; Cánovas *et al.*, 1996; Nyssölä *et al.*, 2000). Liegt im Medium Cholin vor, so ist für *E. coli* und *Chromohalobacter salexigens*, einem nahen Verwandten von *Halomonas elongata* DSM 2581^T (Schwibbert *et al.*, 2011), gezeigt worden, dass die Zellen dieses aufnehmen und intrazellulär in Betain umsetzen können (Landfald und Strøm, 1986; Cánovas *et al.*, 1996, 1998). Dabei wird Cholin zunächst von der Cholindehydrogenase zu Betinaldehyd oxidiert und dieses im zweiten Schritt von der Betinaldehyddehydrogenase zu Glycinbetain umgesetzt (Landfald und Strøm, 1986). Es konnte zudem gezeigt werden, dass hohe Betainkonzentrationen im Cytoplasma die Synthese der zelleigenen kompatiblen Solute reprimierten (Vargas *et al.*, 2006)(Galinski, unveröffentlicht).

Das nicht-reduzierende Disaccharid Trehalose ist als kompatibles Solut sowohl unter Eu- als auch Prokaryoten weit verbreitet (Mackenzie *et al.*, 1988; Montiel, 1998; Argüelles, 2000). Wenn kein anderes Solut im Medium vorliegt akkumuliert *E. coli* Trehalose durch *de novo* Synthese unter Stressbedingungen als Hauptsolut (Giæver *et al.*, 1988) und kann damit Salinitäten von bis zu 3,8 % NaCl im Minimalmedium tolerieren (Larsen *et al.*, 1987). Saccharose, ebenfalls ein nicht-reduzierendes Disaccharid, wird hauptsächlich von halophilen Cyanobakterien akkumuliert (Reed *et al.*, 1986; Roberts, 2005), konnte aber beispielsweise auch in der Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* nachgewiesen werden. Im Fall der Austrocknung setzt diese, insbesondere in den Blättern, den sonst vorhandenen Zucker 2-Octulose in Saccharose um (Bartels und Salamini, 2001).

1.2.1 Ectoin und Hydroxyectoin

Ectoin [(S)-2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylsäure] wurde erstmals 1985 in dem gramnegativen halophilen Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* (mittlerweile umbenannt in *Halorhodospira halochloris*) nachgewiesen und als kompatibles Solut beschrieben (Galinski *et al.*, 1985). Nur wenige Jahre später wurde dann die am C5 des Pyrimidinringes hydroxylierte Version des Ectoins, Hydroxyectoin [(S,S)-2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylsäure], in dem grampositiven Organismus *Streptomyces parvalus* entdeckt (Inbar und Lapidot, 1988).

Mittlerweile sind eine ganze Reihe Mikroorganismen, sowohl Halotolerante als auch Halophile, bekannt, die zur Ectoinbiosynthese fähig sind. Insbesondere unter den aeroben chemotrophen *Bacteria* ist die Fähigkeit weit verbreitet und teilweise wird die Ectoinsynthese auch als Kennzeichen halophiler Zellen betrachtet (Galinski, 1995a; Roberts, 2005; Pastor *et al.*, 2010; Schwibbert *et al.*, 2011). Zur Einführung der OH-Gruppe am C5-Atom des Ectoin-Pyrimidinringes wird ein weiteres Enzym benötigt (vgl. 1.2.2), dessen Gen nicht in allen Genomen von Ectoinproduzieren codiert ist (Schwibbert *et al.*, 2011).

Dabei hängt die intrazelluläre Akkumulation der Ectoine nicht nur von der Osmolarität des Mediums, sondern auch von anderen Faktoren wie der vorhandenen Kohlenstoffquelle, der Sauerstoffverfügbarkeit und der Wachstumsphase der Kultur ab. Für *H. elongata* und den nah verwandten Stamm *C. salexigens*, die in der Lage sind sowohl Ectoin als auch Hydroxyectoin zu synthetisieren, konnte gezeigt werden, dass die Zellen das akkumulierte Ectoin insbesondere unter Hochsalzbedingungen und unter Hitzestress zu Hydroxyectoin umsetzen (Wohlfarth *et al.*, 1990; Garcia-Esteva *et al.*, 2006; Meffert, 2011). *Virgibacillus salexigens* (früher *Salibacillus salexigens*) hingegen zeigte die erhöhte Hydroxyectoinsynthese erst in der stationären Phase (Bursy *et al.*, 2007).

1.2.2 Metabolischer Kreislauf des Ectoins

Die Synthese von Ectoin aus der Aminosäure Aspartat wurde bereits früh aufgeklärt (Peters *et al.*, 1990; Louis und Galinski, 1997; Ono *et al.*, 1999). Es handelt sich um einen dreistufigen Weg in dem L-Aspartat- β -Semialdehyd aus dem zentralen Aminosäurestoffwechsel abgezogen und zunächst von EctB, der L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase, zu Diaminobuttersäure (DABA) transaminiert wird. Im zweiten Schritt transferiert die durch *ectA* codierte DABA-N γ -Acetyltransferase die Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die Diaminobuttersäure und bildet so N γ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure (ADABA). Im letzten Schritt katalysiert die Ectoinsynthese (codiert durch *ectC*) die Kondensationsreaktion zum zyklischen Ectoin. Für die Hydroxylierung des Ectoins wird von der, durch *ectD* codierten, Ectoinhydroxylase während einer oxidativen Decarboxylierung ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf das C5 des Ectoins übertragen und so Hydroxyectoin gebildet.

In *H. elongata* liegen die Ectoin-Synthesegene *ectA*, *ectB* und *ectC* als Operon codiert vor. Die durch *ectD* codierte Ectoinhydroxylase liegt außerhalb dieses Genclusters vor (Ures, 2005). Es sind aber auch Organismen bekannt, bei denen die

Hydroxyectoin-Biosynthesegene als Gencluster vorliegen (Schwibbert *et al.*, 2011; Seip *et al.*, 2011).

Im Zuge der Sequenzierung von *H. elongata* DSM 2581^T wurden vor wenigen Jahren auch Gene gefunden, die Enzyme für die Ectoidegradation codieren (Schwibbert *et al.*, 2011). Diese wurden als *doeABCD* (degradation of ectoine) bezeichnet. Die Ectoinhydrolase DoeA hydrolysiert zunächst Ectoin zu N α -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure, die im nächsten Schritt durch die N α -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure Deacetylase (DoeB) zu DABA deacetyliert wird. DABA kann dann entweder als Substrat für EctA dienen und wieder in die Ectoinsynthese eingehen oder wird durch die Aktivität von DoeD, der DABA-Transaminase, zu L-Aspartat- β -Semialdehyd umgesetzt. DoeC, die Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase wandelt dann im letzten Schritt das L-Aspartat- β -Semialdehyd zu L-Aspartat um und schließt damit den metabolischen Kreislauf. Die Zellen sind so in der Lage besser auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Neben dem Ectoin-Abbau scheint *H. elongata* auch in der Lage zu sein Hydroxyectoin zu metabolisieren. Correa Acosta konnte nachweisen, dass die Zellen in der Lage sind mit Hydroxyectoin als einziger Kohlenstoff-Quelle zu wachsen und postuliert verschiedene mögliche Abbauege des Solut (Correa Acosta, 2013).

1.3 Wirkung kompatibler Solute

Neben ihrer Wirkung als Osmoprotektiva sind auch andere Effekte kompatibler Solute bekannt. Da in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf der Wirkung der Solute auf Ribosomen liegt, soll im Folgenden zunächst ihr Einfluss auf ganze Zellen, Proteine und anschließend die Nukleinsäuren DNA und RNA näher betrachtet werden.

1.3.1 Wirkung auf ganze Zellen

Untersuchungen an getrockneten Zellen haben gezeigt, dass die Überlebensrate der Zellen deutlich gesteigert werden konnte wenn die Zellen intra- oder extrazellulär kompatible Solute zur Verfügung hatten (Louis *et al.*, 1994; Manzanera *et al.*, 2002; Manzanera *et al.*, 2004). Dabei erwiesen sich Hydroxyectoin und die Zucker Trehalose und Saccharose als gute Stabilisierer, während Ectoin und Betain nur unter Umständen positiv wirkten und unter anderen Umständen die Überlebensrate sogar reduzierten.

Während der Trocknung sind die Zellen verschiedenen Arten des Stresses ausgesetzt: Durch den Wasserverlust erhöht sich die Osmolarität des Cytoplasmas und der pH-Wert verändert sich. Des Weiteren können die Membranen durch den Übergang vom flüssigkristallinen zum gelartigen Zustand geschädigt werden. Wird die Trocknung

zudem durch erhöhte Temperaturen ausgelöst, müssen alle wichtigen Zellbausteine auch noch vor der Denaturierung durch Hitze geschützt werden. Wichtig für das Überleben der Zelle und die Fähigkeit der Replikation nach der Rehydrierung sind insbesondere eine intakte Zellmembran sowie die gesamte Proteinbiosynthesemaschinerie, angefangen bei der DNA, über die RNA-Polymerase bis hin zu den Ribosomen (vgl. 1.6).

Die besten Ergebnisse der Membranstabilisierung wurden mit den Zuckern Saccharose und Trehalose erzielt. Diese Stabilisierung wurde hauptsächlich auf die Fähigkeit der Zucker zurückgeführt, welche die verlorenen Wasserstoffbrücken der Phosphatköpfe mit ihren freien Hydroxylgruppen substituieren könnten (Crowe *et al.*, 1987; Welsh, 2000; Hinch und Hagemann, 2004, vgl. auch 1.4.3). Die besten Stabilisierungsergebnisse der Membranen wurden mit einem Zucker:Lipid-Verhältnis von etwa 1,5 Zuckerringen pro Phosphatidylcholin erzielt (Lenné *et al.*, 2007).

Manzanera *et al.* zeigten außerdem, dass Hydroxyectoin zwar für die extrazelluläre Stabilisierung von *E. coli* nützlich sein kann, die intrazelluläre Stabilisierung hingegen funktioniert mit Trehalose deutlich besser (Manzanera *et al.*, 2004). Die Autoren führten dies auf die geringere Anzahl der OH-Gruppen in Hydroxyectoin im Vergleich zur Trehalose zurück. Trotzdem kann die Akkumulation von Hydroxyectoin zu höheren Überlebensraten führen: So zeigten Trocknungsversuche von Tanne & Galinski an *H. elongata*, dass die erhöhte intrazelluläre Hydroxyectoinkonzentration nach der Trocknung zu verbesserten Überlebensraten führen kann (Tanne und Galinski, 2012). Auf die Stabilisierung der weiteren Zellbestandteile, wie Proteine, DNA und RNA, soll in den nächsten Punkten weiterführend eingegangen werden.

1.3.2 Wirkung auf Proteine

Die Untersuchungen der Wirkung kompatibler Solute auf Proteine wurden mit vielen verschiedenen Modellenzymen und unter unterschiedlichsten Bedingungen durchgeführt und zeigten, bis zu einem gewissen Grad, stets eine Stabilisierung des Proteins.

Untersuchungen zur Stabilität der RNase A zeigten eine höhere Denaturierungstemperatur des Enzyms wenn es mit den kompatiblen Soluten Hydroxyectoin, Betain oder Glycin versetzt wurde (Santoro *et al.*, 1992; Knapp *et al.*, 1999). Dies konnte ebenfalls für die Modellenzyme Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Phosphofruktokinase (PFK) gezeigt werden, die in Gegenwart insbesondere von Hydroxyectoin stabilisiert werden (Lippert und Galinski, 1992; Borges *et al.*, 2002). Zudem konnte für die LDH und die PFK gezeigt werden, dass unter Zugabe der Ectoine oder der Zucker Trehalose und Saccharose die Aktivität der Enzyme auch nach vier

Einfrier-Auftau-Zyklen erhalten blieb (Lippert und Galinski, 1992). In einer weiteren Studie an der LDH konnte zudem nachgewiesen werden, dass sich die Enzymaktivitätskurve durch die Zugabe von Betain oder Hydroxyectoin zu höheren Temperaturen verschiebt (Göller und Galinski, 1999).

Auch für andere Proteine und Solute konnte die stabilisierende Wirkung gezeigt werden. Die Zugabe von Diglycerolphosphat zu Rubredoxin aus *Desulfovibrio gigas* stabilisierte das Protein unter Hitzeeinwirkung, sodass unter Soluteinfluss noch viermal mehr aktives Protein am Schmelzpunkt vorlag. Diese Studie untersuchte zudem die Wirkung des Solut auf die Proteinstruktur und zeigte, dass diese auch bei Zugabe des Solutes unverändert blieb (Lamosa *et al.*, 2003).

Neben der Stabilisierung von Proteinen *in vitro* ist auch eine Stabilisierung während der Proteinexpression, also *in vivo*, möglich. Die Expression des hitzelabilen Reporterproteins Luciferase gelang nur in Hefe-Zellen, die unter Thermostress gesetzt wurden und gleichzeitig in der Lage waren Trehalose herzustellen (Singer und Lindquist, 1998). Auch die verringerte Aggregation denaturierter Proteine durch die erhöhte intrazelluläre Trehalosekonzentration konnte im Zuge dieser Studie belegt werden. Die Proteine werden in einer teilweise denaturierten Form gehalten, so dass Chaperone möglicherweise in der Lage sind, auch diese Proteine wieder richtig zu falten (Singer und Lindquist, 1998). Einen ähnlichen Ansatz wählte Witt (Witt, 2012). Die Expression des als Ectoinsynthese annotierten Gens *ectC* aus *Pseudomonas syringae* in *E. coli* hatte sich zuvor als schwierig erwiesen, da die Proteine von den Zellen in „inclusion bodies“ abgelagert wurden und keine aktiven Enzyme aufgereinigt werden konnten (Seip, 2009). Witt konnte das Protein erfolgreich in *Halomonas elongata* exprimieren und aufreinigen (Witt, 2012). Zudem konnte in der *ectC*-Mangelmutterante *Halomonas elongata* WUB01 durch Expression der Ectoinsynthese aus *P. syringae* wieder Ectoin nachgewiesen werden (Kurz *et al.*, 2010). Dabei könnten die natürlich vorhandenen Solute des Organismus geholfen haben, das Protein korrekt zu exprimieren und zu falten.

1.3.3 Wirkung auf DNA

Die Betrachtung der Wirkung kompatibler Solute auf DNA wird in zwei Abschnitte unterteilt. Zum einen die Wirkung der Solute auf reine DNA, zum anderen die Wirkung der Solute auf DNA-Protein-Komplexe.

Nur wenige Daten sind zur Wirkung kompatibler Solute auf reine DNA verfügbar. Dabei wurde meist die Schmelztemperatur T_m der DNA als Kenngröße herangezogen, während nur wenige Arbeiten den Effekt auf die Struktur der DNA betrachtet haben. So zeigen Schnoor *et al.* 2004 dass Ectoin und Betain die Schmelztemperatur von doppelsträngiger

DNA (dsDNA) verringern, während sie durch die Zugabe von Hydroxyectoin leicht erhöht wird. Allerdings wurden diese Daten unter Verwendung von SYBR Green gewonnen. Dieses bindet dsDNA und der dsDNA-SYBR green Farbstoffkomplex wird photometrisch nachgewiesen. Dadurch kommt es jedoch zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur von bis zu 10 °C (Gudnason *et al.*, 2007; Kurz, 2008). Andere Studien zeigen eine Schmelzpunktsenkung doppelsträngiger DNA mit Soluten. Hydroxyectoin, Ectoin, Betain, Trehalose und Prolin senken den T_m der DNA um mehrere Grad Celsius (Rees *et al.*, 1993; Spiess *et al.*, 2004; Kurz, 2008). Für Ectoin und Betain wurde ein weiterer interessanter Zusammenhang festgestellt: beide senken den Wert der Schmelztemperatur, aber nur bei GC-haltiger DNA. Bei reiner AT-DNA wurde kein Effekt beobachtet. Werden die beiden Solute jedoch bei GC-haltiger DNA in ausreichender Menge (für Betain bis zu 5 M) eingesetzt, so senken sie den Schmelzpunkt der DNA auf den Wert der mit reiner AT-DNA ermittelt wird (Rees *et al.*, 1993; Lapidot *et al.*, 1999).

Es scheint also ein Unterschied zwischen der Interaktion der Solute mit GC-haltiger und reiner AT-DNA zu bestehen. Diesen Zusammenhang haben Spink *et al.* näher betrachtet und Daten der Schmelztemperaturen und -enthalpien reiner GC-DNA und Betain beziehungsweise reiner AT-DNA und Betain analysiert. Sie vermuten aufgrund der Enthalpiedaten, dass Betain mit der Duplexform der DNA interagiert, die eigentlich zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur führen müsste. Da dies jedoch nicht der Fall ist, gehen sie von einem kompensierenden Effekt der erhöhten Entropie durch die höhere Betainkonzentration aus. Für GC-haltige DNA schlagen sie eine geringere Interaktion des Betains mit dem Doppelstrang oder eine höhere Interaktion mit dem Einzelstrang vor (Spink *et al.*, 2007).

Salze wie NaCl und MgCl₂ haben ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität der dsDNA und erhöhen den Schmelzpunkt. Es wird vermutet, dass dies durch ihre Interaktion mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA erfolgt. Dadurch wird die durch die negative Ladung hervorgerufene Abstoßung der beiden Einzelstränge verringert und die Schmelztemperatur steigt. Daher ist die Ionenzusammensetzung des Puffers in dem die Stabilitätsbestimmung durchgeführt wird ein wichtiger Anhaltspunkt für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. So wird aus den Daten von Schnoor *et al.* deutlich, dass die Schmelztemperaturen der verwendeten DNA-Fragmente sich um bis zu 5 °C unterscheiden je nach Ionenkonzentration (Schnoor *et al.*, 2004).

Des Weiteren sind Salze wichtige Kofaktoren für Enzyme wie DNA- oder RNA-Polymerasen und Restriktionsenzyme. Die Hydrolyse von Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme ist in Gegenwart von Ectoin und Hydroxyectoin deutlich verringert. Kein Unterschied konnte hingegen in der Aktivität von DNase in Anwesenheit von

Soluten beobachtet werden (Malin *et al.*, 1999). Diese Effekte wurden auf eine Veränderung der DNA-Struktur zurückgeführt, die so die spezifischen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme schlechter erreichbar macht, während die Sequenz-unspezifisch bindende DNase die DNA weiterhin hydrolysieren kann (Malin *et al.*, 1999).

Weiter wurde der Effekt von kompatiblen Soluten auf die Polymerasekettenreaktion untersucht. Hier kommen unterschiedliche Effekte zum Tragen. Zum einen die Interaktion der Solute mit der DNA und zum anderen die Interaktion mit der Polymerase, ganz abgesehen von den im Puffer vorhandenen Ionen und den für die PCR benötigten Primern. Die Taq-Polymerase wurde erwartungsgemäß, wie aus Abschnitt 1.3.2 hervorgeht, unter Einfluss von Prolin, Trehalose, Ectoin und Hydroxyectoin stabilisiert (Lapidot *et al.*, 1999; Spiess *et al.*, 2004). Zudem wurde durch die Zugabe von Homoectoin, einem Derivat von Ectoin, die Spezifität der PCR gesteigert (Schnoor *et al.*, 2004).

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass kompatible Solute, wenn auch die Ionenkonzentration und -zusammensetzung sowie der GC-Gehalt der untersuchten DNA und die Solutkonzentration durchaus eine wichtige Rolle spielen, die Schmelztemperatur der DNA tendenziell senken.

1.3.4 Wirkung auf RNA

Grundsätzlich unterscheiden sich DNA und RNA lediglich durch eine Hydroxylgruppe am Zuckerbaustein des Nucleotids. Anders als die DNA, die fast ausschließlich in einer Doppelhelixstruktur vorliegt, kommt die RNA in vielen unterschiedlichen Konformationen vor. Diese werden, wie bei den Proteinen auch, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen genannt. Typische RNA-Sekundärstrukturen sind Haarnadelschleifen (hair pins) und „stem loops“, doppelsträngige Bereiche, die kleinere oder größere Schleifen einzelsträngiger RNA miteinander verbinden. RNAs in Tertiärstrukturen bilden über die Sekundärstruktur hinaus intramolekulare Wechselwirkungen mit anderen, weiter entfernt liegenden Teilen des gleichen RNA-Strangs aus. Dadurch entstehen dreidimensionale Strukturen wie Pseudoknoten innerhalb des RNA-Strangs. Genau wie Proteine, können auch verschiedene RNA-Moleküle miteinander interagieren und liegen dann in ihrer Quartärstruktur vor (vgl. 1.6.1). Zudem wird mehr und mehr bekannt über die unterschiedlichen Formen der RNA. Diese ist oftmals nicht nur Informationsüberträger, sondern kann auch enzymatische Funktion, wie beispielsweise die Ribozyme, haben. Aufgrund dieser vielen Unterschiede soll der RNA und der Wirkung der kompatiblen Solute auf sie hier ein eigenes Kapitel gewidmet werden.

Für die Stabilität der RNA sind insbesondere Kationen wie Mg^{2+} und K^+ wichtig. Genau wie bei der DNA kommt es sonst durch das negativ geladene Phosphatrückgrat zu einer Abstoßungsreaktion, so dass Sekundär- und Tertiärstrukturen nur schwer gebildet werden können. Allerdings sind genau diese Strukturen wichtig für die spezifische Aktivität der RNA, wie beispielsweise bei den tRNAs, die für den Transport der Aminosäuren zum Ribosom wichtig sind (vgl. 1.6.2).

Die ersten Daten zum Effekt kompatibler Solute auf die Stabilität verschiedener RNA-Moleküle wurden 2007 von Lambert und Draper publiziert (Lambert und Draper, 2007). Sie konnten zeigen, dass alle untersuchten Osmolyte (Betain, Sorbitol, Prolin, TMAO (Trimethylamin-N-oxid), Glycerin und Saccharose), sowie Urea die Sekundärstrukturen der verwendeten RNAs destabilisieren. Dadurch werden die RNA-Moleküle in ihren ungefalteten Zustand überführt und die Basen liegen zugänglich vor. Andererseits können die gleichen Osmolyte auf die Tertiärstruktur einer RNA auch eine stabilisierende Wirkung haben. Lediglich Urea und Prolin zeigten eine durchgängig destabilisierende Wirkung, während beispielsweise Betain und TMAO auf die Tertiärstruktur stabilisierend wirken konnten. Insbesondere bei Betain ist eine starke Abhängigkeit von der Struktur der verwendeten RNA und der Ionenumgebung zu erkennen. Insgesamt gibt es vermutlich zwei verschiedene Arten der Interaktion mit RNAs. Zum einen die Moleküle, die mit den Basen der RNAs interagieren und so die Struktur destabilisieren. Dazu gehören vermutlich Urea und Prolin. Andererseits werden die stabilisierenden Moleküle vermutlich vom Rückgrat ausgeschlossen, so dass die Struktur stabilisiert wird (Lambert und Draper, 2007).

Zwei weitere Studien belegen den stabilisierenden Effekt von TMAO auf unterschiedliche RNA-Moleküle (Pincus *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2010). Während Pincus *et al.* eine direkte Interaktion von TMAO mit den Basen über Wasserstoffbrücken-Bindungen vermuten, schlagen Lambert *et al.* eine eher indirekte Wechselwirkung über die Senkung der Aktivierungsenergie zur Faltung der RNA vor.

Insgesamt ist über die Wirkung der Solute auf RNA bisher nur wenig bekannt. Es scheint einen destabilisierenden Einfluss der Solute auf die RNA-Sekundärstrukturen zu geben, während der Einfluss auf die Tertiärstrukturen eher von der RNA-Struktur selbst, den vorhandenen Ionen und auch der Art des Solut abhängen (Lambert und Draper, 2007; Lambert *et al.*, 2010).

1.4 Modelle der Wirkungsweisen kompatibler Solute

Es existieren unterschiedliche Modelle zur Art und Weise wie die kompatiblen Solute zur Stabilität und Funktionalität der Biomoleküle beitragen. Da bisher allerdings nur für die

Interaktion zwischen Proteinen und Soluten ausreichend Daten vorliegen, werden im Folgenden die wichtigsten Modelle beschrieben, die dazu aufgestellt wurden.

1.4.1 „Preferential interaction“-Theorie (Arakawa und Timasheff, 1983)

Die „preferential interaction“-Theorie (Arakawa und Timasheff, 1983) wurde als universeller Mechanismus zur Wirkung der kompatiblen Solute auf biologische Makromoleküle formuliert. Sie folgt der Beobachtung, dass manche Moleküle wie Saccharose oder Glycerin in Laboren standardmäßig in hohen Konzentrationen zur Stabilisierung von Biomolekülen eingesetzt werden, während Harnstoff in ähnlich hohen Konzentrationen zur Denaturierung der gleichen Moleküle führt (Timasheff, 1993).

Im Jahr 1981 berichteten Gekko und Timasheff, dass Glycerin nicht nur die Oberflächenspannung des Wassers senkt, sondern auch von der Oberfläche von Proteinen ausgeschlossen wird (Gekko und Timasheff, 1981). Wenig später berichteten Arakawa und Timasheff das gleiche für Betain und formulierten aus diesen Erkenntnissen die „preferential interaction“-Theorie (Arakawa und Timasheff, 1983). Dabei wird die Oberfläche des Proteins als Ganzes betrachtet, ohne auf einzelne Wechselwirkungen der Moleküle oder des Wassers mit den unterschiedlich geladenen Seitenketten oder dem Rückgrat des Proteins einzugehen. Einen guten Überblick über die Theorie gibt Timasheff auch in seinem Review von 1998 (Timasheff, 1998). Die Theorie geht von insgesamt drei unterschiedlichen Möglichkeiten der Interaktion eines in Wasser gelösten Proteins mit einem Cosolvens, wie Betain oder Urea, aus: die Proteinoberfläche und das Cosolvens interagieren, das Cosolvens verhält sich inert oder das Cosolvens wird von der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Im Folgenden werden diese drei Möglichkeiten näher betrachtet.

Wird ein Protein in Wasser gelöst, so bildet sich um das Protein eine Hydrathülle aus, wodurch das chemische Potential der gesamten Lösung ansteigt. Die Differenz zwischen diesen beiden Zuständen ist die freie Hydratationsenergie ΔG_h .

Durch das Lösen von Soluten oder Salzen in Wasser verringert sich das chemische Potential, da die Wasseraktivität der Lösung sinkt. Wird nun darin ein Protein gelöst, so steigert dieses Lösen immer noch das chemische Potential der Lösung. Es kommt jedoch jetzt auf die Art und Weise der Interaktion zwischen Cosolvens und Protein an, wie groß die freie Hydratationsenergie ist. Dabei werden drei verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen (vgl. Abbildung 2):

Möglichkeit 1: das Cosolvens **interagiert bevorzugt** mit der Proteinoberfläche

Interagiert das Cosolvens bevorzugt mit der Proteinoberfläche, so können insgesamt weniger Wassermoleküle mit der Proteinoberfläche interagieren. Durch den geringeren Hydratisierungsgrad ist auch die frei werdende Hydratisierungsenergie ΔG_h^b geringer als die Hydratationsenergie ΔG_h einer reinen Protein-Wasserlösung.

Möglichkeit 2: **inertes** Cosolvens

Im Falle eines inerten Cosolvens sind die Wasser- und Solutmoleküle in der Lösung und auf der Proteinoberfläche gleich verteilt. Dadurch sind die freien Hydratationsenergien ΔG_h^i und ΔG_h gleich.

Möglichkeit 3: **bevorzugter Ausschluss** des Cosolvens von der Proteinoberfläche

Wird ein Cosolvens von der Proteinoberfläche bevorzugt ausgeschlossen (engl. preferential exclusion) führt dies im Umkehrschluss zu einer „preferential hydration“. Im Extremfall wird das Protein so nur von Wassermolekülen umgeben. Die Hydratisierungsenergie wäre auf dem gleichen Niveau wie in reinem Wasser. Allerdings unterscheidet sich das System thermodynamisch von reinem Wasser dadurch, dass sich ein Konzentrationsgefälle zwischen der Proteinoberfläche und den davon ausgeschlossenen Soluten ergibt. Die freie Hydratationsenergie ΔG_h^x ergibt sich für diesen Fall somit aus der Summe von ΔG_h und der Energie, die für den Ausschluss der Solute notwendig ist.

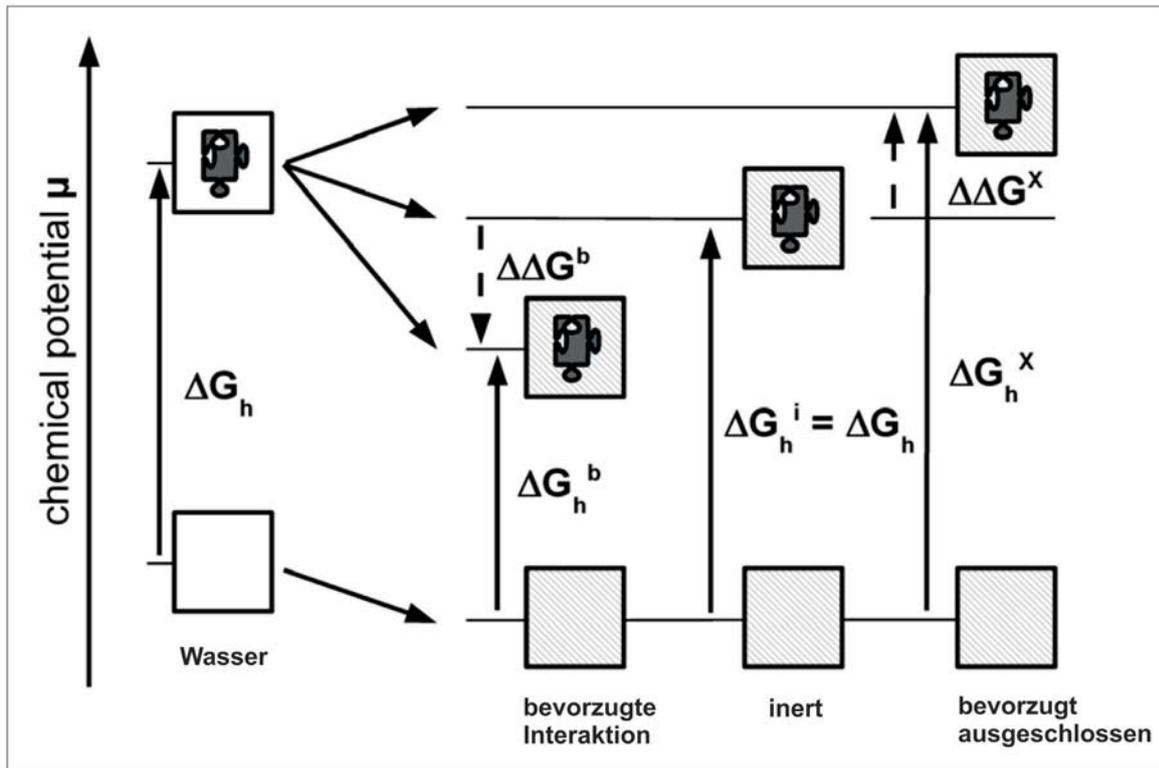


Abbildung 2: Thermodynamisches Energieschema der möglichen Interaktionen der Proteinoberfläche mit dem Cosolvens

Das Lösen eines Proteins in Wasser erhöht das chemische Potential μ der Lösung um die Hydratationsenergie ΔG_h , die durch die Bildung der Hydrathülle frei wird. Das chemische Potential einer Lösung mit Soluten ist geringer als das reinen Wassers. Wird darin ein Protein gelöst so ergeben sich drei mögliche Interaktionen des gelösten Soluts mit dem Protein: durch die bevorzugte Interaktion wird weniger Hydratationsenergie ΔG_h^b frei, ein inertes Solut verändert die Hydratationsenergie ΔG_h^i im Vergleich zu reinem Wasser nicht und ein Solut, das von der Proteinoberfläche bevorzugt ausgeschlossen wird, erhöht durch die zusätzliche Ordnung die frei werdende Hydratationsenergie ΔG_h^x . Das Vorzeichen von $\Delta\Delta G$ gibt damit an, ob das Protein durch die Solute stabilisiert oder destabilisiert wird. Abbildung entnommen aus (Kurz, 2008), modifiziert.

Geht man nun zum Anfang der Beobachtung zurück, dass Betain stabilisierend und Urea destabilisierend auf Proteine in Lösung wirkt, ist es möglich, dies durch die unterschiedlichen thermodynamischen Bedingungen zu erklären. Betain wird, wie die meisten kompatiblen Solute, von der Proteinoberfläche ausgeschlossen, während Urea mit der Proteinoberfläche interagiert (Makhatadze und Privalov, 1992). Dies sind also die Möglichkeiten 1 und 3. Dadurch, dass bei Molekülen, die mit der Proteinoberfläche binden, $\Delta\Delta G$ negativer und somit durch das Lösen des Proteins Energie frei wird, wird das Protein denaturiert. Der Ausschluss der Solute von der Proteinoberfläche hingegen führt zu einem positiveren $\Delta\Delta G$. Das Auffalten der Proteine benötigt somit mehr Energie und stabilisiert so die native Form. Zusätzlich führt der Ausschluss der Solute auch zu einer Erhöhung der Solutkonzentration in der restlichen Lösung.

Neuere Daten von Yu *et al.* untersuchen den Einfluss von Ectoin auf die Hydrathülle eines Proteins. Sie zeigen an zwei Modellenzymen, dass Ectoin von der Hydrathülle ausgeschlossen wird und der Effekt bei dem größeren der beiden untersuchten Proteine stärker ist (Yu *et al.* 2007). In einer früheren Publikation haben Yu & Nagaoka auch die Diffusionsgeschwindigkeit der Wassermoleküle untersucht und dabei beobachtet, dass die Diffusionsgeschwindigkeit unter Ectoineinfluss gesenkt wurde (Yu und Nagaoka, 2004). Normalerweise erhöht sich die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle mit steigender Temperatur. Da Yu *et al.* gezeigt haben, dass Ectoin in der Lage ist die Diffusionsgeschwindigkeit zu verringern, vermuten die Autoren hierin einen Zusammenhang mit der Stabilisation von Proteinen bei erhöhten Temperaturen. Dadurch würde Ectoin die Lösungseigenschaften des Wassers selbst verändern und so die Stabilität der Proteine beeinflussen.

1.4.2 Osmophober Effekt (Bolen und Baskakov, 2001)

Neben den bekannten proteinstabilisierenden Kräften der Wasserstoffbrücken-Bindungen, elektrostatischen, van der Waals und hydrophobe Wechselwirkungen präsentierten Bolen & Baskakov 2001 eine weitere Kraft, die sie den *osmophoben Effekt* nennen (Bolen und Baskakov, 2001).

Der osmophobe Effekt kommt insbesondere in hochkonzentrierten Lösungen zum Tragen und passt zur „preferential exclusion“, also dem bevorzugten Ausschluss von der Proteinoberfläche aus Arakawa und Timasheffs „preferential interaction“-Theorie. Anders jedoch als Arakawa und Timasheff betrachten Bolen und Baskakov die Auswirkungen auf die Aminosäuren und das Peptidrückgrat einzeln. Durch Löslichkeitsexperimente der Aminosäuren und Diketopiperazin, als Modellsubstanz für das Peptidrückgrat, sowohl in Wasser als auch in Lösungen von Saccharose und Sarcosin (Liu und Bolen, 1995), TMAO (Wang und Bolen, 1997) und Prolin (Qu *et al.*, 1998) zeigten sie, dass sich insbesondere das Proteinrückgrat schlecht in den Soluten löst. Da jedoch gerade der zugängliche Anteil am Peptidrückgrat steigt, wenn das Protein denaturiert wird, erhöht der osmophobe Effekt die freie Energie des denaturierten Zustandes und verschiebt so das Gleichgewicht auf die Seite der nativen Proteinstruktur (Bolen und Baskakov, 2001).

Zusätzlich beobachteten Qu *et al.* bei ihren Untersuchungen, dass die Proteine in eine kompaktere Struktur übergangen, wenn sie in hohen Solutkonzentrationen gelöst wurden (Qu *et al.*, 1998). So verringert sich die Proteinoberfläche, die mit den Soluten interagieren muss und die native Struktur des Proteins wird stabilisiert.

1.4.3 „Water replacement“ (Clegg *et al.*, 1982)

Das „water replacement“-Modell basiert auf den Beobachtungen, dass viele Organismen in der Lage sind nahezu auszutrocknen und nach der Rehydrierung wieder ohne Probleme weiter leben können. Clegg *et al.* sahen einen Zusammenhang zwischen dieser Austrocknungstoleranz und den akkumulierten Soluten und vermuteten, dass im Falle der Austrocknung die Hydroxylgruppen der Solute die Hydrathülle der Moleküle ersetzen und diese so schützen (Clegg *et al.*, 1982).

Diese Theorie erscheint zunächst widersprüchlich zu der von Arakawa und Timasheff formulierten „preferential interaction“-Theorie zu sein, nach der eine Stabilisierung durch Ausschluss der Solute von der Proteinoberfläche stattfindet. Allerdings gilt zu beachten, dass Clegg *et al.* durch die Wahl austrocknungsresistenter Organismen in sehr hohen (molaren) Solutkonzentrationen arbeiten. Die „water replacement“-Theorie gilt also für den Bereich sehr hoher Solutkonzentrationen bei gleichzeitig geringer Wasseraktivität.

Crowe *et al.* konnten 1990 zeigen, dass die Phosphofruktokinase die höchste Restaktivität zeigte, wenn sie in Trehalose, also einem Zucker der entsprechend viele freie Hydroxylgruppen aufweist, getrocknet wurde. Zudem konnten sie nachweisen, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Seitenketten des Proteins und der Trehalose ausgebildet wurden, die die Konformation des Proteins stabilisierten (Crowe *et al.*, 1990). Auch bei der Austrocknung ganzer Zellen erwies sich intrazellulär akkumulierte Trehalose als besserer Stabilisator gegenüber dem intrazellulären Einsatz von Hydroxyectoin (Manzanera *et al.*, 2004).

Allen drei vorgestellten Modellen ist also gemein, dass sie einen Effekt auf die Oberfläche der Proteine postulieren.

1.5 Biotechnologische Anwendung kompatibler Solute

Durch ihre weitreichenden Wirkungen auf Zellen und biologische Makromoleküle (vgl. 1.3) sind kompatible Solute auch ins Blickfeld der biotechnologischen Industrie gerückt. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Anwendungen, von denen einige hier kurz angesprochen werden sollen. Die Spanne reicht dabei vom Einsatz im Labor, über die (human-) medizinische Anwendung bis hin zur Kosmetikindustrie (Lentzen und Schwarz, 2006; Pastor *et al.*, 2010).

Die stabilisierende Wirkung der Solute auf Proteine macht man sich beispielsweise zur Lagerung von Enzymen, in der Proteinexpression und, wie bereits angeklungen, in der Verbesserung der PCR zu Nutze (Singer und Lindquist, 1998; Barth *et al.*, 2000; Schnoor *et al.*, 2004). Die Firma bitop, die Ectoin und Hydroxyectoin im industriellen

Maßstab herstellt, bietet unter dem Namen BioStab eine ganze Serie gebrauchsfertiger Stabilisierungslösungen an (bitop AG, Witten, www.bitop.de).

Aber auch die Lagerung ganzer Zellen ist ein wichtiger Aspekt, sowohl in der Forschung als auch in der Medizin. Durch die verbesserte Überlebensfähigkeit ganzer, in Soluten getrockneter Zellen wird die Lagerung und Stammhaltung im Labor vereinfacht. Gefriergetrocknete Zellen lassen sich bei Bedarf schnell rehydrieren und können sofort wieder in Nährmedium anwachsen. Diese Vorteile sind auch Bestandteil von Überlegungen zum Einsatz der Solute in (Lebend-) Impfstoffen (Patentanmeldung von Melmer und Schwarz, 2002, persönliche Kommunikation mit Dr. Edwin Kets, MSD Animal Health), da dies die Lagerung und den Transport vereinfachen, sowie durch die höheren Überlebenszahlen die Produktionskosten senken würde.

Bereits angewendet werden die Ectoine im Bereich des Hautschutzes. Studien haben eine protektive Wirkung der Ectoine vor UV-Strahlung und eine Unterstützung der zelleigenen Schutz- und Reparaturmechanismen auf Hautzellen gezeigt (Bünger, 1999; Beyer *et al.*, 2000; Bünger und Driller, 2004; Pflücker *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 2007; Graf *et al.*, 2008). Die Kosmetikindustrie setzt Ectoin in einer Vielzahl von Produkten, hauptsächlich Sonnenschutzmitteln und Kosmetikprodukten, ein.

1.6 Ribosomen

Ribosomen sind makromolekulare Komplexe aus Proteinen und Ribonukleinsäuren und elementarer Bestandteil aller lebenden Zellen. Das zentrale Dogma der Molekularbiologie, 1970 erstmalig von Crick formuliert (Crick, 1970), verdeutlicht ihre zentrale Rolle in den Zellen:

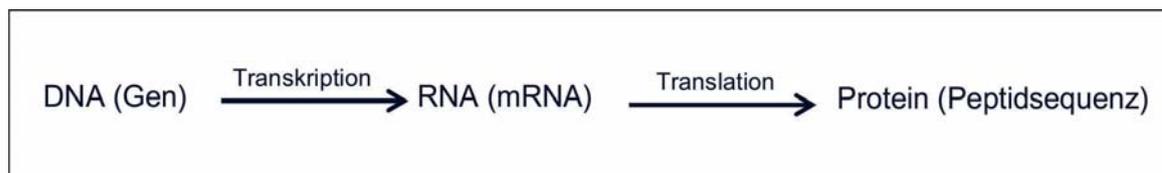


Abbildung 3: Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

Die in der DNA enthaltene Information wird zunächst durch eine Transkription in RNA umgeschrieben. Die Information wird dann vom Ribosom in eine Proteinsequenz übersetzt.

Die genetische Information der DNA wird durch DNA-Polymerasen während der Replikation vervielfältigt und an alle Tochterzellen weitergegeben. Zur Übersetzung in Proteine muss die DNA zunächst mit Hilfe einer RNA-Polymerase in messenger RNA (mRNA) umgeschrieben werden. Dann erst kann das Ribosom die genetische Information in ein Protein übersetzen. Das Ribosom selbst ist ein Enzym. Seine Substrate sind Aminoacyl-tRNAs (transfer RNA) und seine Produkte sind Polypeptide,

deren Sequenzen durch die RNA-Vorlagen bestimmt werden (Moore, 2012). Damit erfüllt es zwei wichtige Funktionen für die Zelle: einerseits die Übersetzung der genetischen Information und andererseits die Bildung von Peptidbindungen (Lecompte *et al.*, 2002).

1.6.1 Aufbau des Ribosoms

Ribosomen bestehen aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten. Die etwas größeren eukaryotischen Ribosomen (80S) bestehen aus einer 40S- und einer 60S-Untereinheit, die kleineren prokaryotischen Ribosomen (70S) aus einer 30S- und einer 50S-Untereinheit. Traditionsgemäß werden die Ribosomen und ihre Bestandteile nach ihrem Sedimentationskoeffizient während einer Ultrazentrifugation eingeteilt und in der Svedberg-Einheit (S) angegeben. Eukaryotische Ribosomen enthalten mehr ribosomale Proteine und insgesamt 4 ribosomale RNAs (rRNA) während die prokaryotischen Ribosomen lediglich 3 rRNAs aufweisen. Einige der ribosomalen Proteine sind sowohl in eu- als auch in prokaryotischen Ribosomen zu finden (Lecompte *et al.*, 2002; Jenner *et al.*, 2012), andere liegen nur in einem Typ vor. Da in dieser Arbeit jedoch ausschließlich mit bakteriellen Ribosomen gearbeitet wurde, soll lediglich deren Aufbau hier näher erläutert werden.

Die kleine 30S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms setzt sich aus einer ribosomalen RNA, der 16S rRNA sowie 21 ribosomalen Proteinen (S1-21, S für small subunit) zusammen und hat ein Molekulargewicht von etwa 0,9 MDa. Die große 50S-Untereinheit enthält neben zwei weiteren rRNAs (5S und 23S) 34 ribosomale Proteine (L1-L36, L für large subunit) und ist etwa 1,6 MDa groß. Daraus ergibt sich für das 70S-Ribosom ein Molekulargewicht von etwa 2,5 MDa. Die Benennung der ribosomalen Proteine ist nicht konsistent, da in den Anfangszeiten der Ribosomenforschung die Identität einzelner Proteine noch unsicher war. Deshalb stimmt die Nummerierung der Proteine in der großen Untereinheit nicht mit der tatsächlichen Anzahl überein. Zudem liegt ein Protein sowohl in der kleinen als auch in der großen Untereinheit vor (S20 und L26), L7 und L12 sind die acetylierte bzw. methylierte Form des gleichen Proteins und das als L8 bezeichnete Protein ist ein Komplex aus L7, L10 und L12 (Arnold und Reilly, 1999). Mit Ausnahme von S1 (Molekulargewicht von 61,2 kDa) sind alle ribosomalen Proteine kleiner als 30 kDa. Die meisten der ribosomalen Proteine sind in Operons codiert, die teilweise auch nicht-ribosomale Proteine codieren. So ist eine koordinierte Expression möglich.

Obwohl Ribosomen aus einer großen Anzahl an Proteinen bestehen, machen Proteine doch nur etwa 1/3 der Masse des Ribosoms aus. Die restlichen 2/3 des Ribosoms bestehen aus rRNA. Genau wie ribosomale Proteine sind auch die rRNAs im Genom als

Operon codiert. *H. elongata* verfügt über vier rRNA-Operons (Helo_rRNA1-4) (Schwibbert *et al.*, 2011), *E. coli* über insgesamt sieben (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, *rrnH*) (Lindahl und Zengel, 1986), denen gemeinsam ist, dass sie zusätzlich auch für tRNAs (transfer RNA) codieren. Für die Operons aus *E. coli* ist außerdem bekannt, dass sie zwei Promotoren aufweisen. Zunächst wurde vermutet, dass diese Vielzahl an Operons existiert um eine hohe Anzahl ribosomaler RNAs zur Verfügung zu stellen und so ein schnelles Wachstum zu ermöglichen (Nomura *et al.*, 1977). Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei *E. coli* fünf der sieben Operons deletiert werden können und die Zellen noch immer hohe Wachstumsraten erreichen (Condon *et al.*, 1995), jedoch scheint die Anpassung an Nährstoff- und Temperaturänderungen beeinflusst zu werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die sieben Operons unterschiedlich kontrolliert werden und so zu einer verbesserten Anpassungsfähigkeit der Zellen führen (Kolmsee *et al.*, 2011).

Aufgrund der zentralen Stellung des Ribosoms ist die rRNA hoch konserviert. Dies macht man sich auch in der Phylogenie zu Nutze. So wurde nach der Analyse der 16S rRNA-Sequenzen der phylogenetische Stammbaum um das Reich der Archaea erweitert (Woese und Fox, 1977) und viele Organismen neuen Phylae zugeordnet. Mittlerweile gibt es jedoch auch Bestrebungen die Phylogenetik der Organismen nicht mehr „nur“ über ein Gen zu bestimmen, sondern die Einordnung über den Verwandtschaftsgrad aller ribosomaler Proteine zu erreichen (Jolley *et al.*, 2012).

Seit nun mehr als zehn Jahren ist auch die Kristallstruktur der bakteriellen Ribosomen aufgeklärt (Ban *et al.*, 2000; Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000). Diese Arbeit wurde 2009 mit dem Nobelpreis für Chemie an V. Ramakrishnan, T. A. Steitz und A. Yonath ausgezeichnet. Im Jahre 2010 wurde nachfolgend auch die Kristallstruktur eines eukaryotischen Ribosoms aufgeklärt (Ben-Shem *et al.*, 2010).

Obwohl Ribosomen sehr große, hochkomplexe Moleküle aus RNA und Proteinen sind, sind sie in den Zellen doch sehr stabil. Eine wichtige Rolle für ihre Stabilisierung spielen die ribosomalen Proteine. Diese verhindern durch ihre Interaktion mit der rRNA die Abstoßung des negativ geladenen Ribose-Phosphat-Rückgrates, indem sie mit der rRNA interagieren und Lücken auffüllen, so dass sie fast wie Klebstoff zwischen den RNA-Molekülen wirken (Ban *et al.*, 2000).

1.6.2 Translation

Die Translation ist der Vorgang, in dem die Triplets der Nukleotidsequenz einer mRNA von den Ribosomen in die dazugehörige Peptidsequenz übersetzt werden. Die

Translation selbst kann in drei Abschnitte unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination.

Mit Hilfe von zwei Initiationsfaktoren (IF1 und IF-3) bindet zunächst die 30S-Untereinheit mit einer komplementären Sequenz ihrer 16S rRNA an die Shine-Dalgarno-Sequenz der mRNA (Shine und Dalgarno, 1974). Anschließend bindet IF-2 mit einer formyl-Methionin-tRNA an den Komplex und positioniert die Start-tRNA an der P-Stelle der 30S-Untereinheit. Die korrekte Basenpaarung zwischen der mRNA und der fMet-tRNA führt zur Abspaltung von IF-3. Dadurch kann die 50S-Untereinheit an den Komplex binden und unter GTP-Hydrolyse wird IF-2 abgespalten.

Die Aufgaben, die den Untereinheiten während der Translation zufallen, sind verschieden. Die 30S-Untereinheit vermittelt die Interaktion zwischen den Codons der mRNA und den tRNA-Codons, die so die Reihenfolge bestimmen in der die Aminosäuren an die entstehende Peptidkette geknüpft werden. Die 50S-Untereinheit hingegen enthält das Peptidyltransferase-Zentrum, in dem die Peptidbindungen entstehen. Beide Untereinheiten enthalten drei tRNA-Bindestellen: die A-Stelle, diese bindet die mit den Aminosäuren beladenen tRNAs, die P-Stelle an der die Peptidbindung geschlossen wird und die E-Stelle an der die leere tRNA das Ribosom wieder verlässt.

Im nächsten Schritt, der Elongation, wird nun mit Hilfe des Elongationsfaktors (EF) EF-Tu eine Aminoacyl-tRNA und GTP an die freie A-Stelle des Ribosoms gebracht. Basenpaarinteraktionen zwischen dem Codon der mRNA und dem Anticodon der tRNA bestimmen welche der Aminoacyl-tRNA-Komplexe aus dem vorhandenen Pool ausgewählt werden. Die Hydrolyse von GTP stellt die benötigte Energie zur Verfügung. GDP und EF-Tu verlassen das Ribosom während gleichzeitig die Peptidyltransferase-Reaktion stattfindet. Die wachsende Peptidkette wird von der tRNA in der P-Stelle auf die Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle übertragen und verlängert so die Peptidkette um die nächste Aminosäure. Die Reaktion wird von der 23S rRNA katalysiert, weshalb das Ribosom auch als Ribozym betrachtet wird (Cech, 2000).

Im nächsten Schritt bindet Elongationsfaktor G (EF-G) zusammen mit einem weiteren Molekül GTP an die Stelle, die zuvor EF-Tu gebunden hatte, und sorgt für die Translokation. Die deacetylierte tRNA in der P-Stelle wird in die E-Stelle geschoben und die tRNA mit der wachsenden Peptidkette wechselt in die P-Stelle des Ribosoms. Außerdem rückt das gesamte Ribosom um ein Codon an der mRNA weiter in 3'-Richtung. EF-G und GDP verlassen das Ribosom und dieses ist bereit für eine weitere Elongation der Peptidkette.

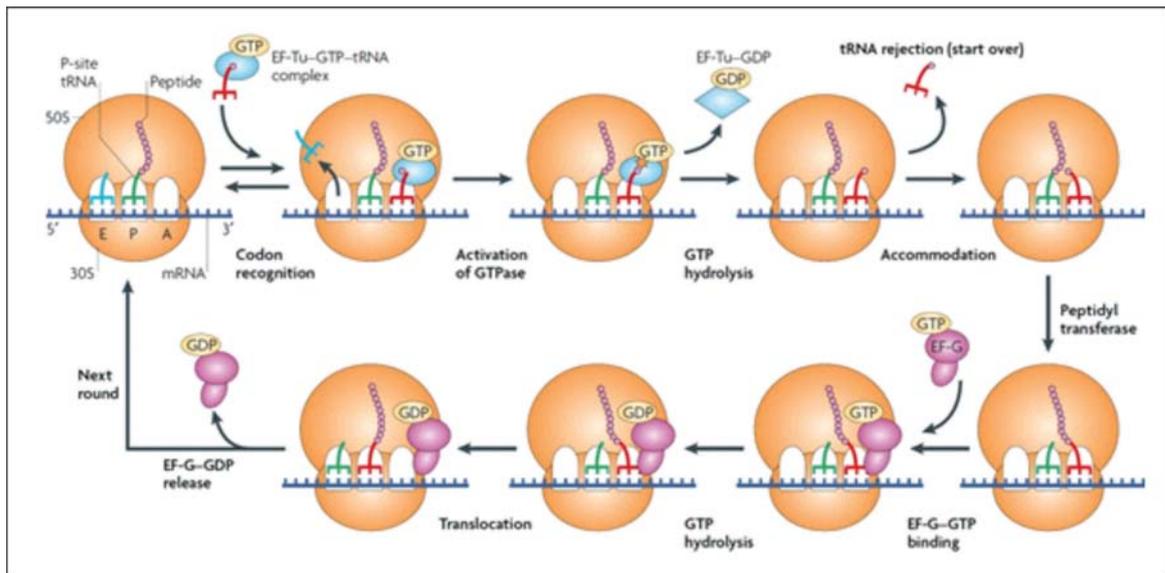


Abbildung 4: Schematische Darstellung der eubakteriellen Translation

Das translaterende Ribosom hat insgesamt drei Bindungsstellen für die mit Aminosäuren beladenen tRNAs, A, P und E. Zu Beginn der Elongation der Peptidkette wird mit Hilfe des EF-Tu eine Aminoacyl-tRNA sowie GTP zur freien A-Stelle gebracht. Die benötigte Energie wird durch die GTP-Hydrolyse bereitgestellt. GDP und EF-Tu verlassen das Ribosom und ermöglichen so, dass die wachsende Peptidkette aus der P-Stelle auf die Aminoacyl-tRNA der A-Stelle übertragen wird. Durch Bindung von EF-G und einem weiteren Molekül GTP wird die tRNA aus der A-Stelle in die P-Stelle gerückt und die tRNA der P- in die E-Stelle. GDP und EF-G verlassen das Ribosom, dieses rückt auf der mRNA um ein Basentriplett nach vorne und ist dann bereit zu Bindung der nächsten Aminoacyl-tRNA. Abbildung entnommen aus: Steitz, 2008.

Dieser Prozess wird wiederholt bis das Ribosom die Terminationssequenz der mRNA erreicht. Für dieses Codon existiert keine tRNA so dass der Prozess angehalten wird. Spezifische Terminationsfaktoren (release factor, RF1-3) beenden den Prozess. RF1 und RF2 erkennen die Terminationscodons und katalysieren die Hydrolyse der Esterbindung zwischen der Polypeptidkette und der tRNA in der P-Stelle. Mit Hilfe von RF3 werden RF1 oder RF2 wieder vom Ribosom gelöst. Zuletzt spaltet der Ribosomen-Recycling-Faktor zusammen mit EF-G die Ribosomen, so dass diese für einen neuen Translationsvorgang dissoziiert im Cytoplasma vorliegen (Petry *et al.*, 2008).

1.6.3 Stabilisierung durch mono- und divalente Metallionen

Neben der durch die ribosomalen Proteine vermittelten Stabilisierung der Ribosomen spielen auch mono- und divalente Metallionen eine essentielle Rolle für die biologische Funktionalität der Ribosomen. Da die basischen, funktionellen Gruppen der Proteine nicht in der Lage sind alle negativen Ladungen der nah beieinander liegenden rRNAs zu kompensieren werden diese Ionen zusätzlich gebraucht um diese Ladungen zu neutralisieren. Neben Calcium-, Natrium- und Kalium- sind Magnesiumionen in diesem

Zusammenhang besonders wichtig (Pyle, 2002). Insgesamt können Metallionen immer an den Stellen im Ribosom nachgewiesen werden die aus sterischen Gründen nicht von ribosomalen Proteinen belegt werden (Klein *et al.*, 2004).

Magnesiumionen sind durch ihren geringen Ionenradius und die dadurch hohe Ladungsdichte besonders gut geeignet die negativen Ladungen des Phosphat-Rückgrates der rRNA zu kompensieren und dadurch die Struktur zu stabilisieren. Allein in der großen ribosomalen Untereinheit konnten 116 Mg^{2+} -Ionen nachgewiesen werden (Klein *et al.*, 2004). Dabei muss unterschieden werden zwischen Ionen, die diffus binden und solchen, die direkte Kontakte zu den Atomen der RNA aufbauen (Pyle, 2002). Ein Verlust dieser Ionen führt vermutlich zur Denaturierung, dem Verlust der ribosomalen Proteine und Destabilisierung der sekundären RNA-Struktur (Allen und Wong, 1986). So erklärt sich auch, warum die Aktivität der Ribosomen an bestimmte Mg^{2+} -Konzentrationen gebunden ist.

Neben dem Zusammenhalt innerhalb der Untereinheiten ist auch die Interaktion der Untereinheiten miteinander über Mg^{2+} vermittelt. Bereits Ende der 1950er Jahre konnte gezeigt werden, dass die Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten zum 70S Komplex *in vitro* stark von der vorhandenen Mg^{2+} -Konzentration abhängt (Chao, 1957; Tissières, 1959). So wird zur Aufreinigung ribosomaler Untereinheiten aus kruden 70S-Ribosomen die Mg^{2+} -Konzentration auf etwa 1 mM gesenkt (Blaha *et al.*, 2000). Dadurch dissoziieren diese und können in einer Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt werden.

Neben Mg^{2+} sind aber auch monovalente Ionen wichtig für die Ribosomen. Aufgereinigte Ribosomen denen durch Dialyse die Kaliumionen entzogen wurden sind instabil (Näslund und Hultin, 1970). Ein wichtiges Kaliumatom konnte im Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms nachgewiesen werden. Dort ist es an der katalytischen Aktivität der rRNA beteiligt (Nissen *et al.*, 2000).

1.6.4 Stressbedingte Stabilisation in der Zelle

Unter optimalen Wachstumsbedingungen enthält eine *E. coli*-Zelle etwa 70.000 Ribosomen, während es bei geringeren Wachstumsraten deutlich weniger, etwa 20.000 Ribosomen sind (Bremer und Dennis, 1987). Leiden sie jedoch unter Nährstoffmangel, so sind die Zellen in der Lage ihre Ribosomen zu katabolisieren (Jacobson und Gillespie, 1968; Deutscher, 2003). Insbesondere freie ribosomale Untereinheiten werden dann abgebaut, um die darin enthaltenen Nährstoffe zu verwerten (Zundel *et al.*, 2009).

Bevor Zellen solch drastische Maßnahmen ergreifen, können sie zunächst auch die Rate der Proteinbiosynthese verringern indem die Ribosomen inaktiviert werden. Dafür

werden zwei 70S-Ribosomen miteinander verbunden und der Komplex durch den *ribosome modulation factor* (RMF) und den *hibernation promoting factor* (HPF) stabilisiert (Wada *et al.*, 1995; Wada *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine nicht an aktiv translatierende Ribosomen binden können (Polikanov *et al.*, 2012). So wird gewährleistet, dass nur die Ribosomen verbunden werden, die überflüssig in der Zelle vorliegen.

1.6.5 Temperaturstabilität bakterieller Ribosomen

Da Ribosomen eine solch entscheidende Rolle in den zellulären Prozessen spielen, sind sie nicht nur Angriffspunkt vieler Antibiotika (Tenson und Mankin, 2006), sondern es wurde auch schon früh diskutiert, ob ihre Integrität die Temperaturgrenze des Lebens bestimmt (Pace und Campbell, 1967). Pace und Campbell haben die Ribosomen 19 verschiedener Organismen zunächst aufgereinigt und dann deren Schmelztemperatur im Spektrophotometer untersucht. Dabei sahen sie einen Zusammenhang zwischen der Schmelztemperatur der Ribosomen und der maximalen Wachstumstemperatur der Organismen. Je höher die Schmelztemperatur der Ribosomen, desto höher war auch die maximale Temperatur bei der Wachstum nachgewiesen werden konnte. Allerdings konnten sich diese Temperaturen um etwa 30 °C unterscheiden wie etwa für *E. coli* oder *Bacillus megaterium* gezeigt werden konnte. Nicht eindeutig beantwortet werden kann die Frage, ob der entscheidende Faktor dabei die Ribosomen selbst sind, oder möglicherweise Ribosomen-assoziierte Proteine wie beispielsweise Elongationsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen (Gaucher *et al.*, 2008).

Insbesondere Ende der 1960er und Anfang der 1970er Jahre wurde viel auf diesem Gebiet geforscht. Danach allerdings ist bis etwa Anfang der 1990er Jahre nur wenig Literatur verfügbar. Erst dann wurde das Thema wieder aufgegriffen und mehrere Studien veröffentlicht, die mit Hilfe der Kalorimetrie die Überlebensrate hitzestresser Zellen mit der Denaturierungstemperatur der Ribosomen korrelieren (Anderson *et al.*, 1991; Stephens und Jones, 1993; Mohácsi-Farkas *et al.*, 1999; Lee und Kaletunç, 2002). Anderson *et al.* und Stephens *et al.* haben ihre Experimente mit *Listeria monocytogenes* durchgeführt. *L. monocytogenes* ist ein grampositives, fakultativ anaerobes, pathogenes Bakterium und wird häufig über verunreinigte Lebensmittel aufgenommen. Anderson *et al.* konnten nachweisen, dass Zellen, die zuvor NaCl-gestresst wurden, höhere Überlebensraten aufwiesen als Zellen ohne Salzstress. Die Zellen wurden dafür in Lösungen unterschiedlicher NaCl-Konzentration resuspendiert und anschließend auf 56 °C, 60 °C oder 62 °C erhitzt. So reduzierte sich die Anzahl vermehrungsfähiger Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation bei 56 °C mit 0,1 M NaCl um den Faktor 10⁴, während Zellen resuspendiert in 1,6 M NaCl und mit dem gleichen Temperaturprogramm

lediglich eine Reduktion um den Faktor 10 aufwies. Kalorimetrische Daten aus der Publikation zeigen zudem, dass sich ein Signal bei 65 °C zu höheren Temperaturen verschiebt, wenn die Zellen kurzzeitig mit NaCl inkubiert wurden. Zusammen mit der Denaturierungstemperatur dieses Signals verschiebt sich auch die Überlebensrate zu höheren Temperaturen. Anderson *et al.* vermuteten hinter diesem Signal die Denaturierung der Ribosomen. Dies bestätigt sich, wenn man die Daten einer im gleichen Jahr veröffentlichten Studie von Mackey *et al.* (Mackey *et al.*, 1991) mit Andersons Daten vergleicht. Mackey *et al.* untersuchten die Schmelztemperaturen einzelner zellulärer Bestandteile. Zunächst wurden ganze Zellen, dann die einzelnen aufgereinigten Komponenten im Kalorimeter analysiert. So gibt die Studie einen ersten guten Überblick über die verschiedenen Thermostabilitäten der Zellbestandteile. Weitere Details zu den Denaturierungstemperaturen der Ribosomen gehen dann aus der Publikation von Bonincontro *et al.* (Bonincontro *et al.*, 1998) hervor.

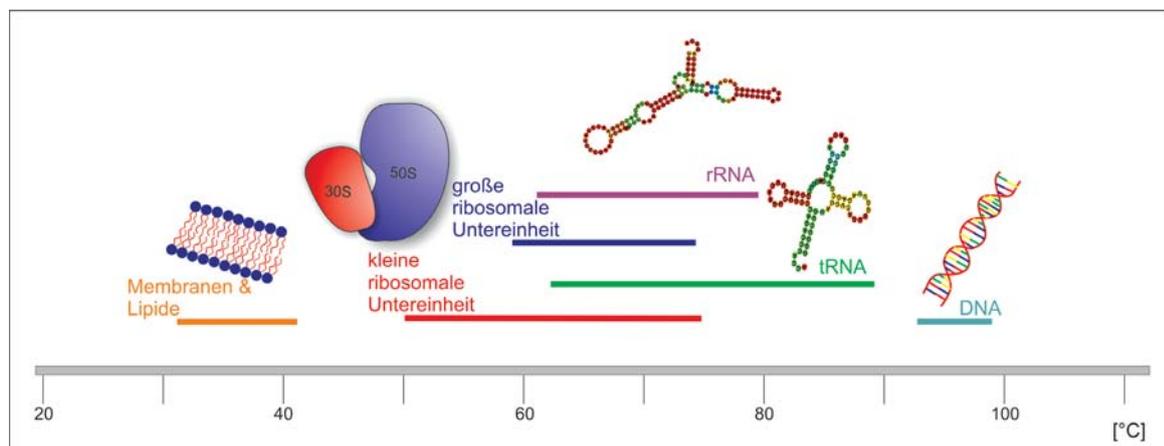


Abbildung 5: Denaturierungstemperaturen wichtiger Zellbestandteile

Gezeigt sind die Spannweiten der Denaturierungsereignisse wichtiger Zellbestandteile nach Daten von Mackey *et al.* und Bonincontro *et al.* (Mackey *et al.*, 1991; Bonincontro *et al.*, 1998). Die dargestellten RNAs sind die 5S rRNA und eine tRNA aus *H. elongata* (Strukturvorhersage mit Hilfe von RNA fold web server).

Membranen und Lipide gehen bereits bei relativ geringen Temperaturen von etwa 30 °C bis 40 °C vom festen, kristallinen in den flüssigen Zustand über. Die reversible Denaturierung genomischer DNA konnte zwischen 90 °C und 100 °C detektiert werden, mit einem Schmelzpunkt bei 95 °C. In einem sehr weiten Bereich zwischen 50 °C bis 80 °C denaturieren die beiden ribosomalen Untereinheiten und die ribosomale RNA. Mackey *et al.* zeigte die Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit bei 65,6 °C, der 50S-Untereinheit bei 74,0 °C und des 70S-Komplexes bei 75,9 °C und bestätigte damit die Beobachtung dass die 30S-Untereinheiten instabiler sind als die 50S-Untereinheit. In ähnlichen Experimenten, jedoch mit deutlich geringerer Mg^{2+} -Konzentration (0,08 mM im

Vergleich zu 10 mM), beschreiben Bonincontro *et al.* die Denaturierung der 30S Untereinheit als „floppy“, also als schwer bestimmbar (Bonincontro *et al.*, 1993). Im Vergleich zu Mackey *et al.* beschreiben Bonincontro *et al.* die Denaturierung der 50S-Untereinheit jedoch als zwei-stufigen Prozess. Zwei deutlich getrennte Signale im Thermogramm unterstützen diese These (Bonincontro *et al.*, 1998).

1993 und 2002 folgten zwei weitere Studien zur Überlebensfähigkeit von Bakterien nach Hitzeeinwirkung. Stephens und Jones schlugen für *L. monocytogenes* vor, dass die 30S-Untereinheit aufgrund ihrer geringeren Denaturierungstemperatur die Temperaturgrenze vorgibt (Stephens und Jones, 1993). 2002 zeigten Lee und Kaletunç für *E. coli* und *Lactobacillus plantarum*, dass die Absterberate der Zellen und irreversible Denaturierungsereignisse im Bereich zwischen 55 ° und 70 °C miteinander korrelieren.

In einem kürzlich erschienenen Artikel wurde erstmals der Effekt kompatibler Solute auf die Denaturierungstemperatur bakterieller Ribosomen und damit verbunden die Überlebensfähigkeit der Zellen untersucht (Pleitner *et al.*, 2012). Damit die Zellen intrazellulär kompatible Solute akkumulieren wurden sie bei 4 % NaCl (w/v) angezogen. Die Autoren haben gezeigt, dass die gestressten Zellen nach einem Hitzeschock eine höhere Überlebensrate aufweisen, als Zellen die ohne NaCl angezogen wurden. In den durchgeführten kalorimetrischen Messungen zeigen die Autoren, dass sich die den Ribosomen zugeordneten Signale der kalorimetrischen Ganzzellmessungen bei Zellen mit Salzstress zu höheren Temperaturen verschieben im Vergleich zu Zellen ohne Salzstress. So kommen Pleitner *et al.* zu dem Schluss, dass die erhöhte Hitzeresistenz und damit Überlebensrate der NaCl-gestressten Zellen auf die erhöhte intrazelluläre Konzentration kompatibler Solute zurückzuführen ist.

1.7 Zellfreie Protein-Synthese

Die zellfreie Protein-Synthese ist eine der sich schnell entwickelnden *in vitro*-Techniken, die einerseits für die Expression rekombinanter Proteine und andererseits zur Untersuchung zellulärer Prozesse eingesetzt werden kann. Die ersten Versuche wurden bereits in den 1950er Jahren mit homogenisiertem Zellmaterial gemacht und führten zunächst zur Identifikation der Ribosomen als Ort der Proteinsynthese und wenig später auch zur Entschlüsselung des genetischen Codes durch Nirenberg und Matthaei (Roberts, 1958; Nirenberg und Matthaei, 1961). Einen guten Überblick über die Möglichkeiten und Anwendungen geben Spirin und Swartz (Spirin und Swartz, 2008a).

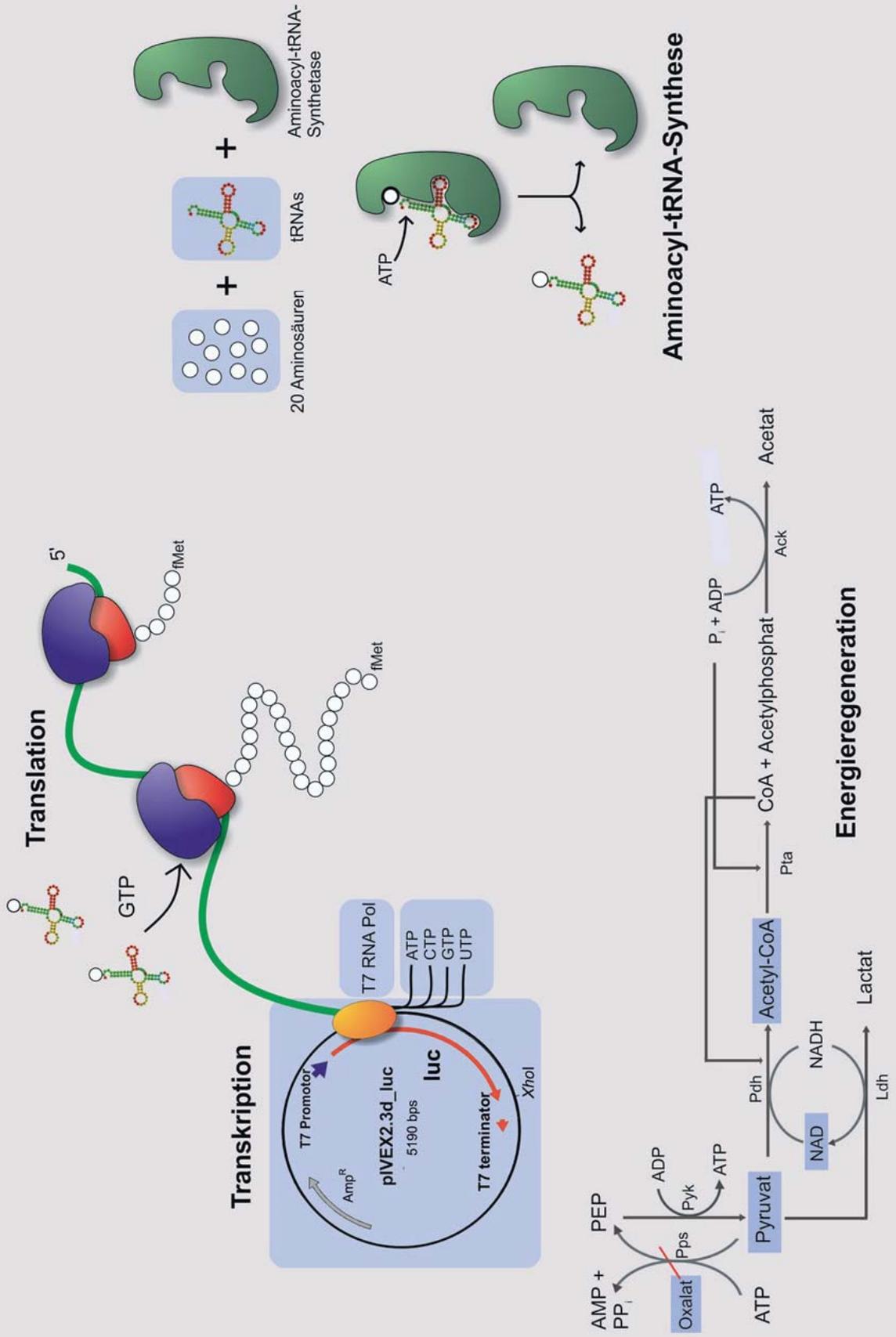
Zwar ist die zellfreie Protein-Synthese derzeit noch eine relativ kostspielige Methode (Calhoun und Swartz, 2005), dennoch bietet sie einige Vorteile: Denn dadurch, dass die Expression eines Proteins *in vitro* stattfindet, können die Reaktionsbedingungen direkt

kontrolliert werden, ohne auf das Überleben der exprimierenden Zelle achten zu müssen. So können auch Proteine, die *in vivo* nicht oder nur schwierig herzustellen sind, wie toxische oder Membranproteine (Avenaud *et al.*, 2004; Klammt *et al.*, 2008) exprimiert werden. Weiter ist es möglich, ungewöhnliche Aminosäuren, wie Selenocystein, in die Proteine einzubauen (Kigawa *et al.*, 2002), die sonst aufgrund ihrer Cytotoxizität nur in sehr geringem Umfang in rekombinant exprimierte Proteine eingebaut werden können, da sie von lebenden Zellen nur in geringen Konzentrationen akkumuliert werden.

Es existieren zwei verschiedene Systeme für die zellfreie Protein-Synthese. Zum einen die Verwendung eines kruden Zellextraktes, der im Prinzip alle benötigten Komponenten enthält und zum anderen das 2005 vorgestellte PURE-System (Shimizu *et al.*, 2005). In diesem System wurden alle benötigten Enzyme und Faktoren rekombinant hergestellt und mit aufgereinigten Ribosomen so zusammengefügt, dass nur die Bestandteile in die Reaktion eingehen, die dafür auch wirklich benötigt werden. Die Verwendung eines kruden Zellextraktes ist kostengünstiger, allerdings sind die Bedingungen nicht so exakt definiert wie bei der Verwendung des PURE-Systems.

Abbildung 6: Schematischer Ablauf der zellfreien Protein-Synthese

Dargestellt sind die vier Hauptreaktionen, die für eine funktionierende zellfreie Protein-Synthese ablaufen müssen. Alle Komponenten, die dem Zellextrakt vor der Reaktion zugesetzt wurden, sind hier blau unterlegt. Alle restlichen Reaktanden stammen aus dem Zellextrakt. Zunächst wird während der Transkription das Gen der Luciferase (*luc*) von der zugesetzten T7 RNA-Polymerase in mRNA transkribiert. Diese mRNA wird im nächsten Schritt (**Translation**) von den Ribosomen in das Protein der Luciferase translatiert. Damit stets genügend beladene tRNAs vorliegen ist die **Aminoacyl-tRNA-Synthese** die dritte wichtige Reaktion. Hier werden die 20 verschiedenen Aminosäuren spezifisch an die entsprechenden tRNAs gebunden. Die vierte wichtige Reaktion, damit die zellfreie Protein-Synthese stattfinden kann, ist die **Energiereneration**. Als Energiedonor wird dem System Pyruvat zugesetzt. Dieses wird in einer zwei-stufigen Reaktion zunächst von der Pyruvatdehydrogenase (Pdh) in Acetyl-CoA und dieses von der Pyruvattransacetylase (Pta) in CoA und Acetylphosphat umgesetzt. Im letzten Schritt wird Acetylphosphat von der Acetatkinase zu Acetat dephosphoryliert und die Phosphatgruppe zur Regeneration von ATP auf ein Molekül ADP übertragen. Zur Regeneration des während der Reaktion der Pdh oxidierten NAD wird außerdem Pyruvat von der Lactatdehydrogenase zu Lactat umgesetzt und dabei das NADH wieder zu NAD reduziert. Zusätzlich wurde dem System Oxalat zugesetzt. Dieses inhibiert die Reaktion der Phosphoenolpyruvatsynthase (Pps). Bei dieser Reaktion würde Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Verbrauch von ATP zu AMP + PP_i umgesetzt. Bei der anschließenden Regeneration von Pyruvat aus PEP durch die Pyruvatkinase (Pyk) wird jedoch nur ADP zu ATP regeneriert, aber nicht das energieärmere AMP. Damit ginge diese Energie nicht in die Proteinsynthese ein. Zusätzlich käme es zur Akkumulation von anorganischem PP_i, dieses jedoch kann die restliche Reaktion stören. Energierenerationsschema modifiziert nach: Jewett und Swartz, 2004.



Die Herausforderung der zellfreien Protein-Synthese ist die Kombination aus der *in vitro*-Transkription und der *in vitro*-Translation, so dass die Reaktion das gesamte zentrale Dogma der Molekularbiologie (vgl. Abbildung 3) abdeckt. Anders als in anderen molekularbiologischen Methoden, die einzelne aufgereinigte Moleküle verwenden, werden für die zellfreie Protein-Synthese sehr viele Enzyme, verschiedene Energieträger sowie Nucleinsäuren benötigt. Deren Stabilität, und damit Funktionalität, muss nicht nur über den gesamten Reaktionszeitraum gewährleistet werden, sondern die einzelnen Prozesse müssen auch so ausbalanciert sein, dass am Ende der Reaktion das fertige, funktionale Protein vorliegt.

Insgesamt gibt es vier Hauptreaktionen (vgl. Abbildung 6) während der zellfreien Protein-Synthese deren Wechselspiel für eine funktionierende Synthese gewährleistet sein muss: zunächst die *Transkription* der DNA durch eine RNA-Polymerase zur mRNA. Diese wird in der *Translation* (vgl. Abbildung 4) zum fertigen Protein übersetzt, für die die *Aminoacyl-tRNA-Synthese* stets genügend mit Aminosäuren beladene tRNAs zur Verfügung stellen muss. Die vierte Hauptreaktion ist die *Regeneration der Energieüberträger*, die in den anderen drei Reaktionen verbraucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zellfreie Protein-Synthese nach dem System von Seidelt *et al.*, welches von Thakral weiterentwickelt wurde, durchgeführt (Seidelt *et al.*, 2009; Thakral, 2012 unveröffentlicht). Dabei handelt es sich um ein gekoppeltes Transkriptions-Translationssystem, welches als Reporterprotein die Leuchtkäfer-Luciferase exprimiert. Diese hat gegenüber anderen Reporterproteinen den Vorteil, dass die Aktivität direkt nach Abstoppen der Reaktion nachgewiesen werden kann. Das Gen steht dabei unter der Kontrolle eines T7-Promotors und wird durch die extra zugesetzte T7 RNA-Polymerase transkribiert.

Zur Energetisierung und Energieregeneration wird das aus dem PANOx-System (Pyruvat/Acetyl-CoA/NAD/Oxalat) (Kim und Swartz, 2001) hervorgegangene Cytomim-System (Jewett und Swartz, 2004) angewendet. Dieses verwendet anstatt des sehr teuren Phosphoenolpyruvats (PEP) Pyruvat als Energiequelle für die Reaktion. Die biologischen Hauptenergielieferanten NAD und ATP werden aus Pyruvat regeneriert indem dieses in einer zweistufigen Reaktion zu CoA und Acetylphosphat umgesetzt wird. Acetylphosphat wird dann von der Acetatkinase zu Acetat dephosphoryliert und das Phosphat zur ATP-Regeneration auf ein Molekül ADP übertragen. Das in der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA reduzierte NAD wird unter Verbrauch eines weiteren Moleküls Pyruvat zu NADH oxidiert und Lactat wird als Nebenprodukt frei. Durch die Zugabe von Oxalat wird auch die Akkumulation des anorganischen Pyrophosphats (PP_i) verhindert, welches die Gesamtreaktion der zellfreien Protein-Synthese stören kann.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die stabilisierende Wirkung kompatibler Solute auf Proteine in unterschiedlichen Stresssituationen ist gut belegt. Andererseits ist nur wenig über ihre Wirkung auf DNA und noch weniger über ihre Wirkung auf RNA bekannt. Chemisch unterscheiden sich diese beiden Nucleinsäuren zwar nur wenig voneinander, in der Zelle nehmen sie jedoch grundlegend unterschiedliche Aufgaben wahr. Insbesondere die RNA ist durch ihre Vielseitigkeit, also einerseits ihre vielen unterschiedlichen Konformationen und andererseits die verschiedenen, zentralen Aufgaben in der Zelle, wichtiger Bestandteil und daher auch möglicher Interaktionspartner der kompatiblen Solute in der gestressten Zelle.

Da bisher nur wenige Daten zum Effekt der Solute auf Nucleinsäuren publiziert sind, sind Ribosomen als Komplexe aus Proteinen und Nucleinsäuren interessante Forschungsobjekte um die Wirkung kompatibler Solute auf Biomoleküle zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollten erstmals Daten zur Wirkung der kompatiblen Solute auf die Stabilität der Ribosomen gewonnen werden, da sie durch ihre zentrale Funktion für das Überleben der Zellen essentiell sind.

Das Ziel der Arbeit bestand darin, zunächst mit Hilfe kalorimetrischer Messungen den Effekt der kompatiblen Solute auf die Thermostabilität bakterieller Ribosomen zu bestimmen. Dabei stellte sich zunächst die Frage, ob, und wenn ja wie, die Zugabe kompatibler Solute die Thermostabilität der Ribosomen beeinflusst. Daran schloss sich die Frage an, ob sich der mögliche Effekt als Wirkung auf eine der beiden Komponenten, also entweder die rRNA oder die ribosomalen Proteine, zurückführen lässt oder ob die Solute die Interaktion der beiden Komponenten beeinflusst.

Neben dieser ersten, biophysikalischen Analyse sollte als zweite Herangehensweise auch der Effekt der kompatiblen Solute auf die Funktionalität der Ribosomen untersucht werden. Dafür sollte die Translation *in vitro* durchgeführt werden und der Einfluss unterschiedlicher Solute in unterschiedlichen Konzentrationen analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ B ⁻), <i>gal</i> , λ, (DE3)	(Studier und Moffatt, 1986)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>supE44</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>gyrA96</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , Δ <i>lacU169</i> (φ80 <i>lacZ</i> ΔM15)	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> DSM 498	Wildtyp K12	(Migula, 1895: 20-30), (Castellani und Chalmers, 1919)
<i>Escherichia coli</i> KC6	A19 Δ <i>speA</i> Δ <i>tnaA</i> Δ <i>sdaA</i> Δ <i>sdaB</i> Δ <i>gshA</i> Δ <i>tonA</i> Δ <i>endAmet</i> ⁺	(Calhoun und Swartz, 2006)
<i>Escherichia coli</i> KC6 Δ <i>ssrA</i> Δ <i>smpB</i>	A19 Δ <i>speA</i> Δ <i>tnaA</i> Δ <i>sdaA</i> Δ <i>sdaB</i> Δ <i>gshA</i> Δ <i>tonA</i> Δ <i>endAmet</i> ⁺ Δ <i>ssrA</i> Δ <i>smpB</i>	(Seidelt <i>et al.</i> , 2009)
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T	Wildtyp	(Vreeland <i>et al.</i> , 1980)

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
p266L	Amp ^R , T7 <i>lac</i> , (His) ₆ -tag, T7 RNAP-Gen P266L	(Guillerez <i>et al.</i> , 2005)
pBDHP-BBC1	Amp ^R <i>bbc1</i> aus <i>Chlamydomonas</i> W-80	Stephens, unveröffentlicht
pIVEX2.3d	Amp ^R , T7 <i>lac</i> , (His) ₆ -tag,	5prime, Gaithersburg, MD, USA
pIVEX2.3d_luc	Amp ^R , T7 <i>lac</i> , <i>luc</i>	Thakral, unveröffentlicht
pET22b(+)_ectC_lang_Pstu	Amp ^R , T7 <i>lac</i> , <i>ectC</i> aus <i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Seip, 2009)
pQE60	Amp ^R , Cam ^R , <i>lac</i>	Qiagen, Hilden
pQE60_L13_Chla	Amp ^R , Cam ^R , <i>lac</i> , <i>rpm</i> aus <i>Chlamydomonas</i> W-80	diese Arbeit
pQE60_L13_Ecol	Amp ^R , Cam ^R , <i>lac</i> , <i>rpm</i> aus <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pQE60_L13_Helo	Amp ^R , Cam ^R , <i>lac</i> , <i>rpm</i> aus <i>H. elongata</i>	diese Arbeit

2.2 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden mit H₂O_{demin.} angesetzt. Je nach Bedarf wurden unterschiedliche Konzentrationen an NaCl (w/v) zugesetzt. Der prozentuale Gehalt an NaCl ist der Mediumsbezeichnung mit einem Bindestrich nachgestellt. Das Medium LB-3

enthält entsprechend eine NaCl-Konzentration von 3 % (w/v). Alle Medien wurden zur Sterilisation 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

2.2.1 Medien für Zellkultur und Stammhaltung

LB-Medium (lysogeny broth), x % NaCl, (Bertani, 1951), (L⁻¹)

Caseinhydrolysat (NZamin)	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	variabel %

→ pH 7,2

Dieses Medium wurde zur Anzucht von *E. coli* K12 (1 % NaCl, (w/v)) und für *H. elongata* (3 % NaCl (w/v), zusätzlich 2 % Glucose (w/v)) für die Isolierung von Ribosomen, die Herstellung des S30-Zellextraktes aus *H. elongata* sowie zur Anzucht von Kulturen für eine anschließende Plasmidisolierung verwendet.

Terrific broth (Tartoff und Hobbs, 1987), (L⁻¹)

Caseinhydrolysat (NZamin)	12,00 g
Hefeextrakt	24,00 g
Glycerin	4,00 mL

In 900 mL H₂O_{demin.} lösen und autoklavieren.

KH ₂ PO ₄	2,31 g
K ₂ HPO ₄	16,40 g

In 100 mL H₂O_{demin.} lösen und ebenfalls autoklavieren.

Nach dem Erkalten beider Lösungen wird das Medium mit der Phosphatlösung komplettiert. Dieses Medium wurde zur Fermentation von *E. coli* BL21 (DE3) p266L genutzt um die T7 RNA-Polymerase zu exprimieren und dabei möglichst hohe Zelldichten zu erreichen.

2.2.2 Medium für die Transformation von *E. coli*

2x YT-Medium (Sambrook J. et al., 1989), (L⁻¹)

Caseinhydrolysat (NZamin)	16,00 g
Hefeextrakt	10,00 g
NaCl	5,00 g

→ pH 7,2

2x YT-Medium wurde für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen sowie für die Regeneration der Zellen nach der Transformation verwendet.

2.2.3 Medien für DSC-Messungen an ganzen Zellen

Tryptone Soya Broth (TSB). (Mackey *et al.*, 1991) (L⁻¹)

TSB-Fertig-Medium	30,00 g
Hefeextrakt	3,00 g

Dieses Medium wurde zur Anzucht von *E. coli* K12 für die Kalorimetrie an ganzen Zellen verwendet.

Mineralsalzmedium MM63 (Miller, 1972), x % NaCl, modifiziert nach (Larsen *et al.*, 1987) (L⁻¹)

KH ₂ PO ₄	13,61 g
KOH	4,21 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
pH-Wert mit KOH (1 M) oder HCl (1 M) auf 7,1 eingestellt	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,25 g (als Stammlösung zugegeben)
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,0011 g (als Stammlösung zugegeben)
NaCl	10 * x g
Glucose * H ₂ O	5,00 g

Die Kohlenstoffquelle wurde in einem Teilvolumen getrennt autoklaviert und dem restlichen Medium nach Erkalten zugesetzt. Dieses Medium wurde für die Anzucht von *E. coli* K12 für anschließende Ganzzellmessungen am Kalorimeter verwendet.

2.2.4 Medienzusätze

Antibiotika

Antibiotika wurden eingesetzt um frisch transformierte Bakterien zu selektionieren beziehungsweise um den Selektionsdruck bei plasmidtragenden Bakterienstämmen aufrechtzuerhalten. Alle verwendeten Plasmide codieren für eine Ampicillinresistenz. In der vorliegenden Arbeit wurde Carbenicillin verwendet, da dieses ebenfalls durch die β -Lactamase gespalten werden kann, dabei jedoch insbesondere bei der Langzeitlagerung eine höhere Stabilität aufweist. Das Antibiotikum wurde dem handwarmen Medium bei Bedarf nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen in einer Endkonzentration von 100 μ g/mL zugesetzt.

Feste Nährmedien

Zur Herstellung von Agarplatten wurde das gewünschte Medium mit 2 % (w/v) Agar versetzt, 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und anschließend in Petrischalen gegossen. Nach dem Erkalten wurden die fertigen Agarplatten bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

Vitaminlösung (VA-Lösung) (Imhoff und Trüper, 1977), (L⁻¹)

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

Die Lösung wurde sterilfiltriert und im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Zur Anzucht von *E. coli* MC4100 Δ *otsB* in MM63 wurde 1 mL dieser Lösung zu einem Liter Minimalmedium gegeben.

2.3 Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen

2.3.1 Stammhaltung

Alle verwendeten Stämme wurden zur Stammhaltung auf LB-Agarplatten (1 % NaCl (w/v) für *E. coli*, 3 % NaCl (w/v) für *H. elongata*) ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C bebrütet und anschließend bei 4 °C gelagert. Bei Stämmen mit Antibiotikaresistenzen wurden Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum verwendet um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten.

2.3.2 Flüssigkultur

Kultur in 5 mL-Röhrchen

Für Plasmidisolierungen wurden meist Kulturen mit nur wenigen mL Volumen benötigt. Daher wurden sterile 5 mL-Röhrchen zu etwa 2/3 mit Medium gefüllt und anschließend die Zellen mit einem sterilen Zahnstocher in die Röhrchen überimpft. Die Röhrchen wurden schräg in einen Reagenzglasständer gestellt und über Nacht im Schüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Durch das Schütteln und die schräge Ausrichtung der Röhrchen in den Reagenzglasständern war eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleistet. Die Kulturen wurden anschließend in

einer Tischzentrifuge (3 Minuten, 13.000 rpm, RT; Heraeus, Biofuge fresco) geerntet und das Zellpellet anschließend in die Plasmidisolierung eingesetzt.

Flüssigkultur zur Isolierung von Ribosomen

Da zur Isolierung der Ribosomen stets große Mengen an Zellmaterial benötigt wurden, wurden mehrere Liter der Kulturen gleichzeitig angezogen. Für die Anzucht von *E. coli* wurden 2 L-Erlenmeyerkolben mit je 1 L Medium verwendet. Für die Isolierung von Ribosomen aus *H. elongata* wurden die Zellen in 1 L-OD-Kolben mit je 500 mL Medium angezogen. Diese Weithalskolben sind zur Direktmessung mit einem geschlossenen Glasrohr versehen. Zudem bieten sie gegenüber den für die *E. coli*-Anzucht verwendeten 2 L-Erlenmeyerkolben den Vorteil, dass sie Schikanen aufweisen, die die Belüftung der Kulturen deutlich verbessern. Der Nachteil liegt jedoch im geringeren Kulturvolumen begründet, so dass von *H. elongata* jeweils maximal 4 L Kultur angezogen werden konnten, während von *E. coli* 10 L gleichzeitig angezogen werden konnten.

Die Hauptkulturen wurden mit einer Übernachtskultur 0,5 - 2 %ig beimpft. Die unterschiedliche Inokulation der Hauptkulturen war wichtig, um zu gewährleisten, dass die Kulturen zu unterschiedlichen Zeiten geerntet werden konnten. Die Hauptkulturen wurden bei 37 °C und 180 rpm im Thermoschüttler (Fa. Infors AG, Bottmingen, Schweiz) angezogen und die optische Dichte der Kulturen im Photometer verfolgt um die Wachstumsphase abschätzen zu können.

Nach etwa 2/3 der exponentiellen Phase wurden die Kulturen geerntet (Beckman Coulter, Rotor JA-10, 8.000 rpm, 15 Minuten). Die Zellen wurden in den ersten Versuchen noch direkt bei -20 °C eingefroren, später jedoch vorher in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20 °C gelagert. Anhand der DSC-Messungen war jedoch kein Unterschied in der Ribosomenqualität nach der einen oder anderen Methode zu erkennen.

Flüssigkultur zur Herstellung des S30-Zellextraktes

Zur Herstellung eines S30-Zellextraktes von *H. elongata* WT wurden die Zellen in 6 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane mit je 2 L LB-3 mit 2 % (w/v) Glucose angezogen. Die Hauptkultur wurde 3 %ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und dann bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler (Series 25 Incubation Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen und anschließend geerntet (8000 rpm, 20 Minuten, 4 °C, Sorvall Evolution RC, Rotor SRC 6000, Thermo Scientific).

Die Zellen wurden anschließend direkt für die Herstellung des S30-Zellextraktes verwendet.

Flüssigkultur zur Anzucht von Zellen für die DSC-Ganzzellmessungen

Zur Anzucht von Zellen, die für anschließende Messungen intakter Zellen oder von Zelllysaten verwendet wurden, wurden 50 mL Medium in 500 mL-OD-Kolben 0,5 - 2 %ig mit einer Übernachtskultur des gleichen Mediums angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,7 angezogen. Die Kultur wurde in ein 50 mL-Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen vorsichtig für 5 Minuten bei 5000 rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur geerntet. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und das Zellpellet in 800 µL frischem Medium (bei LB-Kulturen) oder MM63 ohne Glucose (bei MM63-Kulturen) resuspendiert. Für die Messung intakter Zellen wurden die Proben anschließend ins Kalorimeter geladen und vermessen. Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die resuspendierten Zellen mit 10 µL Lysozym-Stammlösung (100 mg/mL) versetzt und zunächst 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 x 15 Minuten im eisgekühlten Ultraschallwasserbad lysiert.

Fermentation in Minifermentern

Für die Isolierung der T7 RNA-Polymerase wurden die Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) p266L in Minifermentern mit Temperatursteuerung und Rührvorrichtung (DASGIP technologies, Jülich), pH-Sonde (Mettler Toledo, Gießen) und Belüftung durch einen Kompressor in 750 mL terrific broth angezogen. Die Hauptkultur wurde 1 %ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und das Wachstum der Kultur durch regelmäßige Messungen der OD_{600} verfolgt. Der pH-Wert wurde manuell durch Zugabe von HCl oder KOH auf dem Ausgangswert gehalten. Die Expression der T7 RNA-Polymerase wurde bei einer OD_{600} von etwa 1,0 durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach weiteren vier Stunden Wachstum wurden die Kulturen geerntet und die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Zellen wurden bis zur Aufreinigung der Polymerase bei -50 °C gelagert.

2.3.3 Verfolgung des Zellwachstums

Das Zellwachstum in Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gegen Luft im Photometer (Novaspec II, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden, oder Spectronic 20D, Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) verfolgt.

Anhand der Wachstumskurve, die sich aus der Auftragung der optischen Dichte gegen die Wachstumsdauer ergibt, kann die Wachstumsphase der Kultur abgelesen werden.

Da die Wachstumsversuche in OD-Kolben mit einer Direktmessung der optischen Dichte im OD-Rohr durchgeführt wurden, wurden die Proben zur Bestimmung der optischen Dichte der Hauptkulturen ebenfalls unverdünnt gemessen. Bei Kulturen, die für die Aufreinigung von Ribosomen verwendet wurden, wurde für *H. elongata* ebenfalls das OD-Rohr zur Messung verwendet, für *E. coli* wurden die Proben unverdünnt in Plastikkuvetten gemessen.

2.3.4 Gefriertrocknung

Bei der Gefriertrocknung handelt es sich um ein Verfahren, mit dem per Sublimation gefrorenem Zellmaterial schonend das Wasser entzogen werden kann. Zellpellets wurden zunächst für mindestens 2 Stunden bei -20 °C eingefroren und anschließend bei einem Druck von weniger als 0,05 bar mit einer Heizflächentemperatur von 20 °C über Nacht in der Gefriertrocknungsanlage (Alpha I-6, Heraeus-Christ, Osterode) getrocknet.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Puffer und Lösungen für die Analytik

Tabelle 3: Lösungen und Puffer für die Analytik

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

2.4.2 Mikroextraktion des Zellmaterials (Bligh und Dyer, 1959)

Für die Analyse gefriergetrockneten Zellmaterials in der HPLC (vgl. 2.4.3) wurden die Proben zunächst in einer Mikroextraktion (nach Bligh und Dyer, 1959; modifiziert nach Galinski und Herzog, 1990) aufbereitet. Währenddessen bildet sich ein Zwei-Phasen-System aus, in dem die hydrophilen und hydrophoben Zellbestandteile voneinander getrennt werden.

Durchführung der Bligh & Dyer-Extraktion

30 mg gefriergetrocknetes, gemörsertes Zellmaterial wurden mit 500 µL Bligh & Dyer-Lösung versetzt und für mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln (IKA Vibrax, VWR, Staufen) inkubiert. Anschließend wurden 130 µL Chloroform und 130 µL H₂O_{reinst} zu der Probe gegeben und diese weitere 10 Minuten geschüttelt. Zur Phasentrennung wurden die Proben 5 Minuten bei 9,300 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.4.3 HPLC zur Bestimmung organischer Solute

Intrazelluläre organische Solute und die Reinheit der in den kalorimetrischen Messungen (vgl. 2.8.2) verwendeten Solute wurden mit Hilfe der isokratischen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography) mit UV- und Brechungsindexdetektor (Galinski, 1986) analysiert. Mit dieser Methode können wasserlösliche Substanzen, die bei physiologischem pH-Wert ungeladen vorliegen nachgewiesen und quantifiziert werden. Als stationäre Phase dient eine Reversed-Phase-Kieselgelmatrix an deren Hydroxylgruppen über hydrophobe Abstandshalter (Propylketten) polare endständige Aminogruppen gebunden sind. Als mobile Phase wurde 80 %iges Acetonitril verwendet, das einen physiologischen pH-Wert aufweist, so dass die Ionenaustauschereigenschaften des Säulenmaterials nur gering ausgeprägt sind. Die Zellextrakte wurden zur Analyse 1:5 mit Acetonitril (80 % (v/v)) verdünnt.

Die HPLC-Anlage bestand aus folgenden Komponenten:

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

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur und mit einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Mit Hilfe von Standardsubstanzen und der Software ChromQuest 4.2.34, Version 3.1.6 (Thermo Quest Corporation) wurden die einzelnen Signale bestimmten Substanzen zugeordnet und quantifiziert.

2.5 Molekulargenetische Methoden

2.5.1 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Alle Lösungen für DNA-Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, in H₂O_{demin.} angesetzt. Für RNA-Arbeiten hingegen wurden alle Lösungen mit doppelt autoklaviertem H₂O_{reinst.} angesetzt. Alle Glaswaren wurden für RNA-Arbeiten über Nacht bei 180 °C sterilisiert. Plastikwaren, sofern sie nicht vom Hersteller steril geliefert wurden, wurden ebenfalls zwei Mal autoklaviert um die Kontamination der Proben mit RNasen zu minimieren.

Tabelle 4: Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
10x MOPS-Puffer	200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,0 mit NaOH einstellen
6x Probenpuffer	60 mM EDTA, 0,09 % (w/v) Bromphenolblau, 60 % (w/v) Glycerin
CaCl ₂ -MgSO ₄ -Lösung	70 mM CaCl ₂ , 20 mM MgSO ₄ , getrennt autoklaviert
Elektrophoresepuffer (1x TAE)	40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,6 % (v/v) Eisessig, pH 8,0
Na-Acetat-Lösung	3 M Na-Acetat
Plasmidaufreinigung	Puffer 1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mg/mL RNase A, pH 8,0 Puffer 2: 200 mM NaOH, 1,5 % (w/v) SDS, pH 12,5 Puffer 3: 3 M KAc, pH 5,5 (mit KOH eingestellt)
Puffer α	50 mM Na-Acetat, 10 mM Na-EDTA, pH 4,7
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA
TES-Puffer	5 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM NaCl, pH 8,0
SYBR Gold-Färbelösung	SYBR Gold 1:10.000 in 1x TE-Puffer verdünnt

2.5.2 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA wurde nach der von Marmur 1961 entwickelten Methode durchgeführt (Marmur, 1961).

Zellernte und -Lyse

Von einer Übernachtskultur in Komplexmedium (37 °C, 180 rpm) wurden 2 x 1,5 mL in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen geerntet (Biofuge fresco, Heraeus, 10.000 rpm, 3 Minuten) und der Überstand anschließend quantitativ entfernt. Das Zellpellet wurde anschließend in 800 µL TES-Puffer resuspendiert und die Zellen wieder abzentrifugiert (13.000 rpm, 4 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 800 µL TES-Puffer resuspendiert. Zur Zelllyse wurden anschließend 40 µL SDS-Lösung (10 % (w/v)) hinzugegeben und der Ansatz nach kurzem Schwenken 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Das Zelllysat wurde mit 300 µL Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) versetzt und das Reaktionsgefäß kräftig geschüttelt. Durch Zentrifugation (10.000 rpm, 10 Minuten) wurden die Phasen voneinander getrennt und anschließend die DNA-haltige Oberphase in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde mehrere Male wiederholt bis keine Zwischenphase mehr erkennbar war.

DNA-Fällung

Zur Fällung wurde der DNA-haltigen Phase aus der Phenol-Chloroform-Extraktion 1/10 Volumen 3 M Na-Acetatlösung (pH 4,8) sowie 1 Volumen Isopropanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde für mindestens 30 Minuten bei -20 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (13.000 rpm, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µL eiskaltem Ethanol (70 % (v/v)) versetzt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut abzentrifugiert (13.000 rpm, 5 Minuten). Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet im Wärmeschrank getrocknet und anschließend in 50 µL H₂O_{reinst} aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung kleinerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse. 5 mL einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (16.060 x g, 1 Minute) und das Pellet in 200 µL Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µL Puffer 2 wurden die Reaktionsgefäße kurz invertiert, 200 µL Puffer 3 hinzugegeben und wieder zentrifugiert (16060 g, 3 Minuten). Der Überstand wurde anschließend zu 500 µL Chloroform pipettiert, der Ansatz gut geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (16.060 x g, 3 Minuten). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µL Isopropanol pipettiert, geschüttelt und wiederum zentrifugiert (16.060 x g, 3 Minuten). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das erhaltene Pellet mit 500 µL eiskaltem Ethanol (70 %, (v/v)) gewaschen. Nach diesem letzten Zentrifugationsschritt (16.060 x g, wenige Sekunden) wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet im Heizschrank bei 60 °C etwa 30 Minuten getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50 µL H₂O_{reinst} aufgenommen und zur besseren Lösung 10 Minuten im Thermomixer bei 70 °C inkubiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA für die *in vitro* Transkription wurde das Pure Link HiPure Plasmid Filter DNA Purification Kit (Invitrogen, Paisley, UK) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend in 500 µL 1x TE-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Plasmid-DNA für die zellfreie Protein-Synthese wurde freundlicherweise von Durga Thakral, Yale University (New Haven, CT, USA) zur Verfügung gestellt.

2.5.4 Restriktionshydrolyse von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs die doppelsträngige DNA an spezifischen Basensequenzen erkennen und hydrolysieren. In der Molekularbiologie werden zumeist Restriktionsendonukleasen vom Typ II eingesetzt, die die DNA direkt innerhalb ihrer palindromischen Erkennungssequenz hydrolysieren. Die dabei entstehenden Enden können kohäsiv (sticky) oder glatt (blunt) sein und können in weiteren Reaktionen weiter modifiziert oder wieder verknüpft werden.

Die Restriktion von DNA wurde in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern und bei der vorgegebenen Temperatur im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die hydrolysierte DNA wurde entweder direkt in einem DNA-Agarosegel analysiert oder für weitere Schritte mit Ethanol gefällt.

2.5.5 Ethanolfällung von DNA

Nach der Restriktion von DNA wurde der Restriktionsansatz mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M) und 1 Volumen eiskaltem Ethanol (99,8 %ig) versetzt. Durch Invertieren wurden die Lösungen gemischt und der Ansatz anschließend für mindestens 4 h, vorzugsweise über Nacht, bei -50 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, 13.200 rpm, 30 Minuten, 4 °C) und die enthaltene DNA so pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA für 20 Minuten bei 60 °C im Wärmeschrank getrocknet. Die getrocknete DNA wurde dann in 50 µL 1x TE-Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die annähernde Konzentrationsbestimmung aufgereinigter DNA wurden die Proben (Plasmide wurden linearisiert) auf einem DNA-Agarosegel zusammen mit einem Größenstandard aufgetrennt und die Probenkonzentration anhand der Leuchtintensität der Markerbande vergleichbarer Größe und der vom Hersteller angegebenen Konzentration abgeschätzt.

Die Konzentration von Plasmid-DNA für die *in vitro*-Transkription oder die zellfreie Protein-Synthese wurde mit einem Nano Drop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) gegen den Resuspensionspuffer der DNA bei 260 nm bestimmt.

2.5.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) wurde 1986 von Mullis *et al* entwickelt und dient zur gezielten Vervielfältigung von DNA (Mullis *et al.*, 1986). Mit Hilfe gegenläufiger Primer, die die Zielsequenz der doppelsträngigen DNA-Matrize einrahmen, einer DNA-Polymerase sowie den Nukleotidtriphosphaten wird in

den drei Schritten eines PCR-Zyklus die Ziel-DNA-Sequenz selektiv amplifiziert: In der Denaturierung schmilzt die dsDNA auf und wird einzelsträngig, sodass im folgenden Annealing (Anlagerung) die Primer selektiv an die komplementären Bereiche binden können. Im dritten Schritt, der Elongation, baut die DNA-Polymerase komplementär zum Matrizenstrang ausgehend vom 3'-Ende der Primer den DNA-Doppelstrang auf. Durch die mehrfache Wiederholung dieses Vorgangs kann die exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz erreicht werden (Mullis und Faloona, 1987).

In der vorliegenden Arbeit wurde die thermostabile *Pfu*-Polymerase (Thermo Scientific) aus *Pyrococcus furiosus* verwendet, da diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität eine hohe Genauigkeit der DNA-Replikation erzielt. Für PCR-Reaktionen wurden die in Tabelle 5 beschriebenen Komponenten in einem 200 µL PCR-Reaktionsgefäß auf Eis zusammenpipettiert. Die PCR wurde in einem Thermocycler (MyCycler, BioRad) nach dem Programm in Tabelle 7 durchgeführt.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit *Pfu*-Polymerase

Komponente	Eingesetzte Menge
<i>Pfu</i> -Puffer (10x)	5 µL
Betain (5 M)	10 µL
Primer 5' (forward) (5 pmol/µL)	0,5-10 µL
Primer 3' (reverse) (5 pmol/µL)	0,5-10 µL
dNTPs (2 mM)	5 µL
genomische DNA	1 µL
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	0,5 µL
H ₂ O _{reinst}	ad 50 µL

Tabelle 6: Verwendete Primer

Fett und unterstrichen dargestellt sind die Schnittstellen der angegebenen Restriktionsenzyme.

Name	Sequenz	T _m [°C]	Schnittstelle
BBC1_NcoI_f	5'-AGG CCATGG TGCGCGGCAAC-3'	61,5	<i>NcoI</i>
	5'-GGAC AAGCTT TTAGTGGTGGTGGT		
BBC1_HindIII_r	GGTGCTTGTGTCCTTCTTGGCG-3'	57,9	<i>HindIII</i>
EcoL13_for	5'-GGC CCATGG AAACTTTTACAGCTAA-3'	62,2	<i>NcoI</i>
EcoL13_rev	5'-CCCGATTA AGATCT GATGTCAAGAA-3'	63,0	<i>BglII</i>
Helol13_for	5'-TTA CCATGG AGACGTTCACTGCC-3'	59,7	<i>NcoI</i>
Helol13_rev	5'-GCGAAGCT AGATCT GATGTTCAAT-3'	58,5	<i>BglII</i>

Tabelle 7: PCR-Programm mit *Pfu*-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer
Initialdenaturierung	95 °C	1 Minute
Zyklus (30x)		
• Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
• Annealing	$T_m - 5$ °C	30 Sekunden
• Elongation	72 °C	2 min/kb
Verlängerte Elongation	72 °C	10 Minuten
Kühlung	4 °C	∞

Die verwendete Annealingtemperatur hing von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer ab, die vom Hersteller angegeben wurde. Für die Amplifizierung wurde, wie vom Hersteller der *Pfu*-Polymerase empfohlen, die Annealingtemperatur 5 °C niedriger gewählt als die niedrigere Schmelztemperatur des Primerpaares.

2.5.8 Ligation

Zur Verbindung von hydrolysiertem Insert mit einem ebenfalls hydrolysierten Plasmid wurde eine T4-DNA-Ligase verwendet. Diese verknüpft unter ATP-Verbrauch die 5'-Phosphatenden mit den 3'-OH-Gruppen der beiden DNA-Fragmente. Nach der Konzentrationsbestimmung der DNA (vgl. 2.5.6) wurden Plasmid-DNA und Insert-DNA in einem molaren Konzentrationsverhältnis von 1:4 in die Ligationsreaktion eingesetzt. Pro 10 μ L Ligationsansatz wurden 1 μ L Ligase-Puffer, 0,5 μ L Ligase sowie 1 μ L ATP-Stammlösung (10 mg/mL) zugegeben und das Endvolumen mit H_2O_{reinst} eingestellt. Die Reaktion wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch 10 minütiges Erhitzen auf 65 °C die Ligase inaktiviert. Das Ligationsprodukt wurde im nächsten Schritt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.5.9 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese von DNA (oder auch RNA) wird die Nukleinsäure aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphatrückgrates in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Je höher die Agarosekonzentration im Gel gewählt wird, desto kleiner werden die Poren, durch die die DNA im elektrischen Feld zur Kathode wandert.

Die Agarose wurde durch Aufkochen in einer Konzentration von 1-3 % (w/v) in Elektrophorese-Puffer gelöst und in die Gelkammer gegossen. Das polymerisierte Gel wurde mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Vor dem Auftragen wurden die zu analysierenden Proben mit 6x Probenpuffer versetzt. Außerdem wurden 3 μ L eines

Größenstandards (100 bp oder 1 kbp, je nach Bedarf) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 70-90 V für etwa 90 Minuten. Zur Analyse wurde das Gel etwa 20 Minuten in Gel Red (Biotium, Hayward, CA, USA) gefärbt und anschließend im UV-Durchlichtsystem (Intas, Göttingen) betrachtet.

Diese Gele wurden auch für RNA verwendet, wenn diese unter nicht-denaturierenden Bedingungen analysiert werden sollte. RNA-Gele wurden jedoch wegen der höheren Sensitivität des Farbstoffes mit SYBR Gold gefärbt (vgl. 2.5.10).

2.5.10 Denaturierende Agarosegelelektrophorese für RNA

Bei der Agarosegelelektrophorese von RNA muss beachtet werden, dass auch einzelsträngige RNA (ssRNA) Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbildet. Dadurch wird das Laufverhalten im Agarosegel beeinflusst und die Auftrennung nach der Molekülgröße verfälscht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Formaldehyd-Gelelektrophoresen (FAGE) durchgeführt. Formaldehyd bildet mit der Iminogruppe des Guanins eine instabile Schiff-Base und reduziert dadurch die Anzahl inter- und intramolekularer Wechselwirkungen des RNA-Moleküls und erhöht so die Reproduzierbarkeit des Laufverhaltens.

Zunächst wurden die Gelkammer und der Gelkamm mit RNase Away behandelt. Das Agarosegel wurde 1-1,2 %ig in 1x MOPS-Puffer angesetzt und bei geringer Leistung in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde das Agarosegel auf Handwärme abkühlen gelassen und mit 5 % ((v/v), Endkonzentration) Formaldehyd versetzt, kurz geschwenkt und das Gel direkt in die vorbereitete Gelkammer mit Gelkamm gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel mit 1x MOPS-Puffer überschichtet und zunächst für 30 Minuten bei 4 °C vorinkubiert. Die Proben wurden vor dem Beladen mit 2x Probenpuffer (Thermo Scientific) versetzt. Nach dem Beladen wurde das Gel für 90 Minuten bei 60 V und 4 °C laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel für 40 Minuten mit SYBR Gold gefärbt und im UV-Durchlichtsystem (Intas, Göttingen) analysiert.

2.5.11 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der CaCl₂-Methode

Die Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* DH5α und *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte nach der CaCl₂-Methode von Dagert und Ehrlich (Dagert und Ehrlich, 1979). Die Hauptkultur (70 mL, 2x YT-Medium) wurde 1 %ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 wachsen gelassen. Die Zellen wurden in sterilen Zentrifugenbechern geerntet (Beckman Coulter, Rotor JA-10, 4.000 rpm, 6 Minuten, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 10,5 mL CaCl₂-MgSO₄-Lösung

resuspendiert und nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erneut abzentrifugiert (4.000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde in 3,5 mL CaCl₂-MgSO₄-Lösung aufgenommen und wiederum nach einer weiteren 30 minütigen Inkubation auf Eis mit 875 µL sterilem Glycerin versetzt. Die Suspension wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und die Zellen anschließend in 200 µL-Aliquots aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -50 °C gelagert.

2.5.12 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation mit Plasmid-DNA wurden die kompetenten Zellen von *E. coli* auf Eis aufgetaut und das Plasmid dazu gegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend die Zellen bei 42 °C 45 Sekunden lang einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach der Zugabe von 600 µL 2x YT-Medium wurden die Zellen zur Regeneration 1 h lang bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. 100 µL der regenerierten Zellen wurden dann zur Selektion auf Selektivnährböden ausgestrichen und die Agarplatten über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.5.13 Sequenzierung von DNA

Isolierte DNA wurde zur Sequenzierung nach der Dideoxymethode (Sanger *et al.*, 1977) zur Firma Sequiserve (Vaterstetten) verschickt. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit Standardplasmiden gearbeitet wurde, wurden die Primer der Sequenzierung von der Firma gestellt. Es wurde jeweils ein Primer ausgewählt der in der plasmidcodierten Promotorsequenz bindet und ins Gen hinein verlängert wird.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit H₂O_{demin.} angesetzt.

Tabelle 8: Lösungen und Puffer, die für die Proteinbiochemie verwendet wurden.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
4x RSB	50 mM Tris-HCl, 20 % (w/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 1,25 % (v/v) Mercaptoethanol
Acrylamid-Mix	32,7 mL 30 % Acrylamid, 10,0 mL Bis-Acrylamid, H ₂ O _{reinst} ad 50 mL
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
DNase-Stammlösung	1 % (w/v) DNaseI
IPTG-Stammlösung	500 mM IPTG, sterilfiltriert
Laufpuffer für SDS-PAGE	BioRad 10x Tris/Glycin/SDS-Puffer, 1:10 mit H ₂ O _{demin.} verdünnt
Lysozym-Stammlösung	100 mg Lysozym/mL
MgCl ₂ -Lösung	60 mM MgCl ₂
Resuspensionspuffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Sammelgelpuffer	500 mM Tris-HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
SDS-Lösung	10 % Na-Dodecylsulfat (w/v) in H ₂ O

2.6.2 Gesamtzellproteinaufreinigung

(nach Brünig, 2005, modifiziert)

Nach der Anzucht von *E. coli* BL21 (DE3) p266L wurde zur Überprüfung der Expression der T7 RNA-Polymerase eine Gesamtzellproteinaufreinigung durchgeführt. Zunächst wurden die Zellpellets in 200 µL Resuspensionspuffer aufgenommen und resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde dem Ansatz 2 µL der Lysozymstammlösung zugegeben und die Suspension im Anschluss durch Vortexen gemischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und in regelmäßigen Abständen invertiert. Zur Proteindenaturierung wurden 10 µL 10 %iger SDS-Lösung (w/v) hinzupipettiert und der Ansatz für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Entfernung der DNA wurden zudem 2 µL DNase-Stammlösung und 0,8 µL MgCl₂-Lösung verwendet und die Proben weitere 1,5 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellysate für eine Stunde bei -20 °C eingefroren und anschließend drei Mal 45 Minuten im eisgekühlten Ultraschallwasserbad behandelt. Zelltrümmer und unlösliche Proteine wurden in einer darauffolgenden Zentrifugation (13.000 rpm, 30 Minuten, 4 °C) pelletiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen und in frische Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse (BCA-Test und SDS-PAGE) bei -20 °C gelagert.

2.6.3 BCA-Test

Für eine nachfolgende SDS-PAGE wurde die Proteinkonzentration der Proben zunächst mit Hilfe des BCA-Tests ermittelt, da diese, zur besseren Vergleichbarkeit, alle in der gleichen Konzentration eingesetzt werden sollten. Das eingesetzte Test-Kit (Uptima, Montluçon, Frankreich) kombiniert die klassische Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure als Detektionssystem (Smith *et al.*, 1985). Bei der Biuret-Reaktion gehen zweiwertige Kupferionen in alkalischer Lösung einen Komplex mit den Peptidbindungen der Proteine ein. Dabei werden die Cu²⁺ des Komplexes zu Cu⁺ reduziert, die im nächsten Schritt mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex ausbilden, der einen kolorimetrischen Farbnachweis ermöglicht.

Für die Proteinbestimmung wurden die Proben stets 1:100 mit H₂O_{reinst} verdünnt. Der Test wurde anschließend in Vierfachbestimmung in Multititerplatten mit BSA (bovine serum albumin) als Standard (Konzentrationen von 50-500 µg/mL) nach Angaben des

Herstellers durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Ansätze bei 60 °C wurden die Proben im Plattenlesegerät (infinite M200, Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 550 nm vermessen. Anhand der aus dem BSA-Standard berechneten Regressionsgeraden wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

2.6.4 Bradford-Test

Die Proteinkonzentration des S30-Zellextraktes wurde mit Hilfe des Bradford-Testes (BioRad, Protein Assay) bestimmt. Der Nachweis beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G250 an Proteine in saurer Lösung. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist damit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung (Bradford, 1976).

Zur Proteinbestimmung wurden die Proben 1:5000 mit H₂O_{demin.} verdünnt und der Test in Doppelbestimmung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurde auch hier BSA (Konzentrationen von 1-20 µg/mL) verwendet. Die Proben wurden mit dem Bradford Reagenz versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde im UV-Vis-Spektrophotometer (Agilent Technologies, Cary 100 UV-Vis) die Absorption der Proben bei 595 nm bestimmt. Anhand der aus dem BSA-Standard bestimmten Regressionsgeraden wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes verwendet (Lämmli, 1970). Im Vergleich zu Agarosegelen bilden Polyacrylamidgele Poren definierterer Größe, die durch das eingesetzte Verhältnis von Acrylamid zu Bis-Acrylamid bestimmt werden kann. Der Gesamtanteil an Acrylamid reguliert die Dichte der Vernetzung, so dass die Auflösungsleistung der Gele mit zunehmender Acrylamidkonzentration zunimmt. Neben der Porengröße ist auch die Eigenladung und Tertiärstruktur der Proteine entscheidend für die Auftrennung. Um diese Einflüsse zu minimieren kann die Elektrophorese unter denaturierenden (Einsatz von SDS) und reduzierenden (Einsatz von DTT (Dithiothreitol)) Bedingungen durchgeführt werden. Das Detergenz SDS (engl.: sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) bindet über hydrophobe Wechselwirkungen an die Proteine und bewirkt dadurch die Auffaltung der Tertiärstruktur (Bhuyan, 2010). Bei höheren Konzentrationen werden durch die sich abstoßenden Ladungen auch Sekundärstrukturen aufgelöst. Im Sättigungsbereich werden pro Gramm Polypeptid etwa 1,4 g SDS gebunden (Lottspeich und Engels, 2006), so dass ein konstantes Ladungs-

Masse-Verhältnis entsteht. Liegen im Protein zusätzlich inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken vor, werden diese durch den Einsatz von DTT reduziert, um die Auftrennung nach der Proteingröße im elektrischen Feld zu erzielen.

Probenvorbereitung

Alle Proben für die SDS-PAGE wurden vor dem Auftragen mit denaturierendem und reduzierendem Probenpuffer (4x RSB) versetzt und für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Für die Analyse ribosomaler Proteine wurden 20 pmol Ribosomen eingesetzt. Für die Proben aus Gesamtzellproteinaufreinigungen und der Ribosomenaufreinigung wurde zunächst mit Hilfe des BCA-Tests (vgl. 2.6.3) die Proteinkonzentration bestimmt und anschließend jeweils 20 µg Protein auf das Gel geladen.

Gelelektrophorese und Färbung

Die Gelelektrophorese wurde in Gelkammern der Firma BioRad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 9 angegeben. Der Lauf erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 60 V (Electrophoresis Power Supply PS3001, GibcoBRL) im Sammelgel und 100 V im Trenngel.

Tabelle 9: Zusammensetzung von SDS-PAGEs zur Analyse von Gesamtzellproteinproben oder Ribosomenaufreinigungen

	Gesamtzellproteinprobe	Ribosomenprobe
<u>Trenngel:</u>	T = 13 %	T = 14,8 %
Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL
Acrylamid-Mix	6,5 mL	7,4 mL
SDS (10 % (w/v))	0,1 mL	0,1 mL
H ₂ O _{reinst}	0,9 mL	-
<u>Sammelgel:</u>		
Sammelgelpuffer	1,25 mL	1,25 mL
Acrylamid-Mix	1,0 mL	1,0 mL
SDS (10 % (w/v))	0,05 mL	0,05 mL
H ₂ O _{reinst}	2,7 mL	2,7 mL
Zum Polymerisieren:		
APS (10 % (w/v)): 10 µL/mL Gellösung		
TEMED: 1 µL/mL Gellösung		

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 60 Minuten in Coomassie-Färbelösung (Page Blue Protein Staining Solution, Fermentas, St. Leon-Rot) unter Schütteln (IKA

Vibrax, VWR, Staufen) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte dann in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ über Nacht. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

2.7 Isolierung bakterieller Ribosomen

Alle Lösungen für die Isolierung bakterieller Ribosomen wurden mit doppelt autoklaviertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ in RNase-freien Gefäßen angesetzt. Glaswaren wurden über Nacht bei 180 °C sterilisiert, Plastikwaren, sofern sie nicht vom Hersteller steril geliefert wurden, doppelt autoklaviert. Üblicherweise werden den Puffern, die für die Isolierung von Ribosomen verwendet werden etwa 5 mM β -Mercaptoethanol zugesetzt um ein reduzierendes Milieu aufrechtzuerhalten. Da β -Mercaptoethanol jedoch DSC-Messungen stören kann (Cooper *et al.*, 2000), wurden alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer ohne diesen Zusatz verwendet.

Tabelle 10: Puffer und Lösungen für die Isolierung bakterieller Ribosomen

Puffer	Zusammensetzung
10 %/30 % Saccharosegradienten-Puffer (nach AG Steitz)	20 mM HEPES-KOH pH 7,5, 30 mM NH_4Cl , 1 mM Mg-Acetat, 0,25 mM Na-EDTA, pH 8,0, 10 % bzw. 30 % Saccharose (w/v)
10 %/30 % Saccharosegradienten-Puffer (nach Mackey <i>et al.</i> 1991), modifiziert	20 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM MgCl_2 , 150 mM NH_4Cl , 10 % bzw. 30 % Saccharose (w/v)
10 % /40 % Saccharosegradienten-Puffer	20 mM HEPES-KOH pH 7,5, 30 mM NH_4Cl , 6 mM Mg-Acetat, 0,25 mM Na-EDTA pH 8,0, 5 mM β -Mercaptoethanol, 10 % bzw. 40 % Saccharose (w/v)
Lagerpuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NH_4Cl
Resuspensionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl_2
Saccharosekissenpuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 1 M NH_4Cl , 37,8 % Saccharose
Untereinheitenpuffer (nach Mackey <i>et al.</i> 1991)	20 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM MgCl_2 , 150 mM NH_4Cl
Untereinheitenlagerpuffer (nach AG Steitz)	20 mM HEPES-KOH pH 7,5, 30 mM NH_4Cl , 6 mM Mg-Acetat

Zur Bestimmung des Schmelzpunktes bakterieller Ribosomen wurden diese aus den Zellen von *E. coli* K12 und *H. elongata* Wt isoliert. Die Zellen wurden zunächst in einem Komplexmedium angezogen und im letzten Drittel der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. In dieser Wachstumsphase enthalten die Zellen eine hohe Dichte an intakten, aktiven (vgl. 1.6.4) Ribosomen und gleichzeitig ermöglicht es die Ernte einer hohen Zahl an Zellen. Daher wurden die Kulturen, sowohl *E. coli* als auch *H. elongata*, bei einer OD_{600} von 0,75-0,95 geerntet. Normalerweise wird in der Ribosomenaufreinigung β -Mercaptoethanol eingesetzt um reduzierende Bedingungen zu erreichen. Allerdings

kann β -Mercaptoethanol die DSC-Messung stören (Cooper *et al.*, 2000) und wurde deshalb nicht zur Aufreinigung eingesetzt.

2.7.1 Aufreinigung von kruden 70S-Ribosomen

(nach Mackey *et al.*, 1991, modifiziert)

Für die Aufreinigung von kruden 70S-Ribosomen wurden die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Zellen zunächst in Zell-Resuspensionspuffer (vgl. Tabelle 10) (3 mL/g Zellen) resuspendiert. Anschließend wurde die erhaltene Zellsuspension im vorgekühlten Ultraschall (Sonifier cell disruptor B15, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA) mit einem Pausenzeitintervall von 30 % aufgeschlossen (1 min/mL Suspension). Zelltrümmer wurden in zwei Ultrazentrifugationsschritten (Rotor 70Ti, 27.000 rpm , 20 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Beckman Coulter) entfernt. Der aus diesen Zentrifugationsschritten entstandene Überstand wurde nachfolgend auf ein Saccharosekissen überschichtet (13 mL Saccharosekissen-Puffer, 13 mL Zentrifugationsüberstand) und erneut zentrifugiert (Rotor 70Ti, 38.500 rpm , 18 h , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen und die Zentrifugenröhrchen für fünf Minuten mit der Öffnung nach unten auf ein Papiertuch gestellt. Dadurch sind Proteine und eventuell noch vorhandene Zelltrümmer, die nicht zum eigentlichen Ribosomenpellet gehörten, abgeflossen und konnten im Anschluss leicht abgewaschen werden. Das Pellet aus kruden 70S-Ribosomen selbst wurde anschließend in 2 mL Lagerpuffer durch 30-minütiges Schütteln (IKA Vibrax, VWR, Staufen) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ resuspendiert. Die resuspendierten Ribosomen wurden vereinigt und eventuell vorhandene unlösliche Partikel pelletiert (Rotor 70Ti, 5.900 rpm , 10 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nach der Konzentrationsbestimmung (vgl. 2.7.4) wurden die kruden 70S Ribosomen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse im dynamischen Differenzkalorimeter oder der Aufreinigung der ribosomalen Untereinheiten gelagert. Nach diesem Aufreinigungsschritt liegen alle ribosomalen Komplexe gleichzeitig in der Suspension vor: 30S- und 50S-Untereinheiten genauso wie die 70S- und, je nach Erntezeitpunkt der Kultur, auch 100S-Ribosomen.

2.7.2 Herstellung von Saccharosegradienten

Saccharosegradienten wurden zur Aufreinigung der ribosomalen Untereinheiten und zur Analyse von Polysomenprofilen verwendet. Mit Hilfe eines mechanischen Gradientenmischers wurden Saccharosegradienten von 10 % bis 30 % (für ribosomale Untereinheiten) oder von 10 % bis 40 % (für Polysomenprofile) Saccharose hergestellt. Die fertigen Gradienten wurden anschließend mindestens zwei Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bevor die zu analysierenden Proben darauf überschichtet wurden.

2.7.3 Aufreinigung der ribosomalen Untereinheiten

Zur Aufreinigung ribosomaler Untereinheiten müssen zunächst Bedingungen geschaffen werden, die zur Dissoziation der 70S-Komplexe in die beiden Untereinheiten führen. In einer anschließenden Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation können die Untereinheiten und verbliebenen 70S-Komplexe anhand ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften voneinander getrennt werden.

Zu Beginn der Arbeit wurden die ribosomalen Untereinheiten nach dem Protokoll von Mackey *et al.* (modifiziert) aufgereinigt (Mackey *et al.*, 1991). Später wurde zusätzlich eine ähnliche Methode verwendet, die insbesondere auf einem anderen Puffersystem basiert (Laborprotokoll AG Steitz, Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University).

Untereinheitenreinigung nach (Mackey *et al.*, 1991)

Aufgereinigte, krude 70S-Ribosomen aus 10 L *E. coli*-LB-Kultur wurden zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend mit Untereinheiten-Puffer, der lediglich 1 mM Mg^{2+} -Ionen enthält (nach Mackey *et al.* 1991) gewaschen. Durch die Senkung der Mg^{2+} -Konzentration wird die Dissoziation der 70S-Komplexe erleichtert. Die aufgetauten Ribosomen wurden mit dem Puffer versetzt und anschließend in der Ultrazentrifuge (Rotor 70Ti, 36.800 rpm, 4 °C, 3 h) zwei Mal abzentrifugiert. Das Pellet aus der Zentrifugation wurde anschließend in 5 mL Untereinheiten-Puffer resuspendiert und in einen vorbereiteten Dialyseschlauch (Zellutrans, MWCO 3.500, Roth, Karlsruhe) überführt. Die Ribosomen wurden zur weiteren Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration 24 h gegen 2 L Untereinheiten-Puffer bei 4 °C unter Rühren dialysiert. Ein Pufferwechsel wurde nach 12 h durchgeführt.

Zur Auftrennung der dissoziierten ribosomalen Untereinheiten wurden diese auf einen Saccharosegradienten überschichtet (Gradientenpuffer nach Mackey *et al.* 1991) und anschließend zentrifugiert (Rotor 70Ti, 21.800 rpm, 4 °C, 16 h). Nach der Zentrifugation wurden 1 mL-Fractionen (von oben) abgenommen und nach geeigneter Verdünnung der Proben die Absorption bei 260 nm (Specord 210, Analytik Jena, Jena) bestimmt. Die Absorption jeder Fraktion wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen und anschließend die Peakfraktionen vereinigt. Die vereinigten Proben wurden mit Untereinheiten-Puffer aufgefüllt und wiederum abzentrifugiert (Rotor 70Ti, 43.500 rpm, 4 °C, 19 h). Die Pellets dieser Zentrifugation wurden in Untereinheiten-Puffer resuspendiert, erneut auf vorbereitete Saccharosegradienten überschichtet und eine weitere Gradientenzentrifugation durchgeführt. Die daraus aufgereinigten ribosomalen

Untereinheiten wurden in Untereinheiten-Puffer aufgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Untereinheitenaufreinigung nach Laborprotokoll AG Steitz

Die kruden 70S-Ribosomen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und für 20 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Dadurch dissoziieren die 70S-Komplexe in die Untereinheiten (Tamaoki und Miyazawa, 1966). Zudem enthielt der Gradientenpuffer ebenfalls lediglich 1 mM Mg^{2+} -Ionen. Dies trägt ebenfalls zur Dissoziation der 70S-Komplexe bei. Nach der Inkubation der Ribosomen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden maximal 70 A_{260} Ribosomen pro Gradient überschichtet und diese anschließend zentrifugiert (Rotor SW41, 28.300 rpm , 4 h , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, geringe Beschleunigung, ohne Bremse).

Die Analyse der Saccharosegradienten erfolgte nach Beendigung der Zentrifugation bei einer Wellenlänge von 260 nm . Die Gradienten für die Aufreinigung ribosomaler Untereinheiten wurden dafür manuell in Fraktionen von $250\text{ }\mu\text{L}$ aufgeteilt. Dazu wurden vom zentrifugierten Gradienten jeweils $250\text{ }\mu\text{L}$ -Fraktionen von oben abgenommen und in $1,5\text{ mL}$ -Reaktionsgefäße überführt. Diese Fraktionen wurden anschließend in Doppelbestimmung am Plattenlesegerät (Epoch Spectrophotometer mit Microspot-Platte, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) gegen den Puffer ohne Saccharose bei 260 nm auf den RNA-Gehalt vermessen. Die Absorption jeder Fraktion wurde anschließend gegen die Fraktionsnummer aufgetragen und die Peakfraktionen gepoolt.

Die gepoolten Fraktionen wurden anschließend erneut abzentrifugiert (Rotor 70Ti, 38.500 rpm , 22 h , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und die dabei entstandenen Pellets in Untereinheiten-Lagerpuffer resuspendiert. Die isolierten Untereinheiten wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.7.4 Konzentrationsbestimmung isolierter Ribosomen und -untereinheiten

Die Konzentration isolierter Ribosomen sowie der ribosomalen Untereinheiten wurde durch spektrophotometrische Messungen bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrophotometer (Specord 210, Analytik Jena, Jena) bestimmt. Dafür wurde zunächst die Absorption des Lagerpuffers gemessen und der Mittelwert aus vier Messungen als Referenz bestimmt. Die Ribosomensuspension wurde zur Messung um den Faktor $1:1000$ mit dem Puffer verdünnt und anschließend die Absorption gemessen.

Für reine RNA gilt: $1\text{ A}_{260} \triangleq 40\text{ }\mu\text{g RNA/mL}$.

Damit ergibt sich für Ribosomen, die lediglich zu 2/3 aus RNA bestehen: $1 A_{260} \triangleq 60 \mu\text{g}$ Ribosomen/mL. Ribosomen haben ein Molekulargewicht von 2,5 MDa (entspricht $2,5 * 10^6 \text{ g/mol}$). Daraus berechnet sich die Konzentration für photometrisch vermessene Ribosomen wie folgt:

$$1 A_{260} \triangleq 0,06 \text{ g} * L^{-1} / (2,5 * 10^6 \text{ g} * \text{mol}^{-1}) = 24 * 10^{-9} \text{ mol/L}$$

Laut Literatur liegt der Wert für $1 A_{260}$ bei 23 pmol/mL (McNicholas *et al.*, 2000) beziehungsweise bei 25 pmol/mL (Thomas *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration der kruden 70S-Ribosomen daher jeweils mit $1 A_{260} = 24 \text{ pmol/mL}$ bestimmt. Bei isolierten 30S- und 50S-Untereinheiten entspricht $1 A_{260} = 69 \text{ pmol/mL}$ beziehungsweise 34,5 pmol/mL (McNicholas *et al.*, 2000).

Alle Messungen wurden in Vierfachbestimmung durchgeführt und anschließend das arithmetische Mittel gebildet.

2.7.5 Aufreinigung ribosomaler RNA

Für die Aufreinigung ribosomaler RNA wurden krude 70S-Ribosomen als Ausgangsmaterial verwendet (vgl. 2.7.1). 200 μL Ribosomensuspension wurden mit 4 mL Puffer α versetzt, kurz invertiert und sofort mit 500 μL 10 %iger SDS-Lösung (w/v) gemischt. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt und anschließend mit 4 mL Phenol überschichtet. Anschließend wurde die Probe unter mehrmaligem Invertieren 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C und 4000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg). Je 500 μL der RNA-haltigen Oberphase wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert und mit 500 μL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) überschichtet und durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt zur Phasentrennung wurden 400 μL der RNA-haltigen Oberphase in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und mit 50 μL Na-Acetatlösung und 1 mL eiskaltem Ethanol (99,8 %) versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei -20 °C. Nach der Fällung wurden die Proben für 10 Minuten bei 9.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA-Pellets in der SpeedVac (Savant ISS110, Thermo Scientific) für etwa 30 Minuten getrocknet. Die trockenen Pellets wurden in je 50 μL 1x TE-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.6 Konzentrationsbestimmung von ribosomaler RNA

Die Konzentration der aufgereinigten ribosomalen RNA wurde am Spektrophotometer (Specord 210, Analytik Jena, Jena) bei einer Wellenlänge von 260 nm analog der

Konzentrationsbestimmung für Ribosomen bestimmt (vgl. 2.7.4). Als Umrechnungsfaktor wurde der Wert für reine RNA verwendet.

2.8 Kalorimetrie

Alle Lösungen für die Isolierung bakterieller Ribosomen wurden mit doppelt autoklaviertem H_2O_{reinst} in RNase-freien Gefäßen angesetzt. Glaswaren wurden über Nacht bei 180 °C sterilisiert, Plastikwaren, sofern sie nicht vom Hersteller steril geliefert wurden, doppelt autoklaviert.

Tabelle 11: Puffer und Lösungen für die Kalorimetrie

Puffer	Zusammensetzung
1,5 M Trehalosestammlösung	1,5 M Trehalose in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl
2 M Saccharosestammlösung	2 M Saccharose in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl
2 M Betainstammlösung	2 M Betain in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl
2 M Ectoinstammlösung	2 M Ectoin in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl
2 M Hydroxyectoinstammlösung	2 M Hydroxyectoin in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl
2 M Ureastammlösung	2 M Urea in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl
5 M NaCl-Stammlösung	5 M NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl
2 M KCl-Stammlösung	2 M KCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl

Das Ziel der Kalorimetrie (Latein: calor = Wärme und griech.: metrium = messen) ist die Bestimmung von Wärmemengen, die während einer biologischen, chemischen, oder physikalischen Reaktion aufgenommen (endotherm) oder abgegeben (exotherm) werden. Die Messung wird in einem Kalorimeter durchgeführt. Für die unterschiedlichen Anwendungen gibt es viele verschiedene Arten von Kalorimetern. Ihnen gemeinsam ist lediglich der prinzipielle Aufbau in ein Messsystem, welches die Probe und eventuell dessen Lösungsmittel enthält, und die Umgebung des Messsystems. Dabei kann das Messsystem von der Außenwelt abgeschlossen sein oder Kontakt zu ihr haben, die Proben reichen über die gesamte Bandbreite biologischer, chemischer und physikalischer Materialien und entsprechend unterschiedlich sind auch die eingesetzten Probenvolumina.

2.8.1 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Dynamische Differenzkalorimetrie (engl. differential scanning calorimetry, DSC) wird zur Charakterisierung des thermodynamischen Verhaltens von Interaktionen in

Makromolekülen über die Induktion von Veränderungen durch eine ansteigende oder absinkende Temperatur verwendet. Dafür werden eine Probe sowie eine Referenzprobe gleichzeitig in einem zuvor bestimmten Temperaturprogramm analysiert und die Differenz der dabei freiwerdenden Wärmemengen zwischen der Probensubstanz und der Referenzprobe bestimmt. Das dynamische Differenzkalorimeter (engl. differential scanning calorimeter, DSC) besteht dazu aus zwei voneinander unabhängigen Messzellen. Diese werden verschlossen, sodass die Messung in einem geschlossenen System erfolgt und kein Austausch mit der Umgebung stattfinden kann. Neben einer guten Wärmeleitfähigkeit des Kammermaterials ist auch eine gute Isolierung der Zellen notwendig, damit Temperaturschwankungen der Umgebung des Geräts die Messungen nicht beeinflussen können.

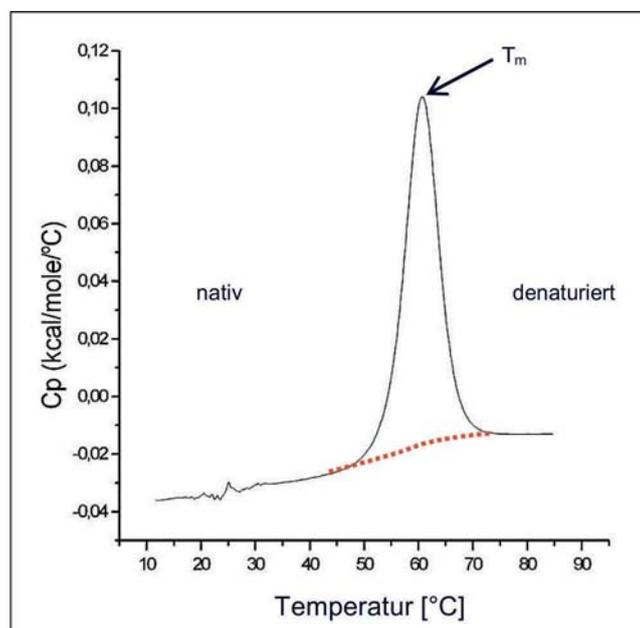


Abbildung 7: Denaturierungsverhalten von RNase A in einer DSC-Messung

Die Messung wurde nach (Poklar et al., 1999) mit 4 mg RNase A/mL durchgeführt. Gestrichelt ist außerdem der theoretische Verlauf der Basislinie gezeigt, wie sie für die Integration des Peaks angewendet würde.

Abbildung 7 zeigt einen solchen Verlauf einer DSC-Messung mit RNase A. Die Messung zeigt deutlich den Charakter eines zwei-Phasen-Modells: nativ oder denaturiert. Das Biomolekül liegt in Lösung immer in einem Gleichgewicht zwischen seiner nativen und seiner denaturierten Form vor. Bei niedrigen Temperaturen liegt das Gleichgewicht auf der Seite der nativen Form, bei hohen Temperaturen auf der Seite der denaturierten Form. Mit Hilfe einer DSC-Messung kann durch die konstante Erhöhung der Temperatur die Umwandlung von der nativen in die denaturierte Form verfolgt und die dabei freiwerdende Energiemenge gemessen werden. Sobald alle Moleküle der Probe, in

diesem Fall der RNase A, denaturiert vorliegen, wird auch bei einer weiteren Temperaturerhöhung nicht mehr Energie frei. Daher erscheint die Messung als Peak.

Vor der Denaturierung liegt das Energieniveau der Probe niedriger als nach der Reaktion. Da nach der Denaturierung auch die hydrophoben Seitenketten des Proteins offen zugänglich sind, hat die Probe zu diesem Zeitpunkt eine höhere Wärmekapazität.

Am höchsten Punkt der Messung liegt der Schmelzpunkt T_m . An diesem Punkt liegen gleich viele Proteine im nativen wie im denaturierten Zustand vor.

Mit Hilfe des Kalorimeters wird über den gesamten Verlauf der Messung die Wärmekapazität (C_p) der Probenlösung im Vergleich zur Referenzlösung bestimmt. Dabei wird das Gerät so gesteuert, dass die Temperaturdifferenz zwischen der Proben- und Referenzzelle während der Messung konstant bei null gehalten wird. Der Unterschied in der Energiemenge, die dafür benötigt wird, wird kontinuierlich über die Temperatur aufgezeichnet und ist die Differenz der Wärmekapazität der beiden Lösungen. Um aus einer DSC-Messung die Enthalpie der Reaktion ΔH_{cal} zu bestimmen wird durch Integration die Fläche unter dem Peak (vgl. 2.8.3) bestimmt.

2.8.2 Kalorimetrie an ganzen Zellen, Ribosomen und isolierten ribosomalen Untereinheiten

Die kalorimetrischen Messungen an ganzen Zellen, Ribosomen und deren isolierten Untereinheiten wurden in der vorliegenden Arbeit an einem VP-DSC-Mikrokalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die Messzellen des Geräts bestehen aus einer Tantallegierung und haben ein Volumen von etwa 0,5 mL (Microcal). Die Steuerung des Gerätes erfolgte über das mitgelieferte Programm VPViewer (MicroCal, Northampton, MA, USA). Das Programm zeigt exotherme Reaktionen in der Probenzelle als negatives, endotherme Reaktionen als positives Signal.

Zur Messung ganzer Zellen wurden die Zellen nach der Ernte bei LB-Kulturen im gleichen Medium bzw. bei Zellen aus MM63 in MM63 ohne Glucose resuspendiert. Ribosomen wurden direkt vor der jeweiligen Messung von -50 °C auf Eis aufgetaut und mit Lagerpuffer auf eine Konzentration von $1\text{ }\mu\text{M}$ verdünnt. Ribosomale Untereinheiten wurden in einer Konzentration von $0,25\text{ }\mu\text{M}$ (30S) bzw. $0,17\text{ }\mu\text{M}$ (50S) in Untereinheiten-Lagerpuffer (aus Aufreinigung in HEPES-Puffer) bzw. $1\text{ }\mu\text{M}$ (30S) und $1,38\text{ }\mu\text{M}$ (50S) in Untereinheiten-Puffer (aus Aufreinigung in Tris-HCl-Puffer) verdünnt. Zur Messung der Proben in Kombination mit kompatiblen Soluten wurden die Ribosomen erst kurz vor der Messung in den vorbereiteten Puffer verdünnt und die Proben im Anschluss direkt ins Kalorimeter geladen.

Nach der Beladung der Zellen wurde für die Messungen ein Druck von 30 psi (entspricht 2,07 bar) eingestellt. Alle Messungen wurden bei einer konstanten Temperaturerhöhung von 1 °C/min und stets gegen die gleiche Pufferzusammensetzung wie die Probe durchgeführt, so dass alle Unterschiede in den Messungen lediglich von der zu analysierenden Probe stammen. Die unterschiedlichen Messprogramme sind in Tabelle 12 gezeigt. Es wurden von allen Messungen zwei Hochheizprogramme gemessen. Durch die Abkühlung nach dem ersten Programm können reversibel denaturierte Moleküle renaturieren. So lassen sich reversible Denaturierungen im zweiten Zyklus sichtbar machen.

In den Messungen mit Ribosomen und den isolierten Untereinheiten wurde die zweite Messung als Referenz für die erste Messung verwendet. Die Denaturierung der Ribosomen ist ein irreversibler Schritt. Durch die Verwendung der zweiten Messung als Referenz wird gewährleistet, dass die gleichen Komponenten in der gleichen Konzentration vorhanden sind und eventuell reversible Reaktionen, wie die Zurückfaltung einzelner rRNAs, von der Messung subtrahiert werden.

Tabelle 12: Programme zur Messung von Ribosomen, Ribosomenuntereinheiten und ganzen Zellen im dynamischen Differentialkalorimeter

Probentyp	Zyklus	Starttemperatur [°C]	Endtemperatur [°C]	Scanrate
Ribosomen und ribosomale Untereinheiten	1	25	85	1 °C/min
	2	25	85	1 °C/min
Ganze Zellen	1	25	100	1 °C/min
	2	25	100	1 °C/min

Vor der ersten Messung wurden die Proben- und die Messzelle durch einen 15-minütigen Vorlauf bei 25 °C äquilibriert. So ist sichergestellt, dass die Probe und die Referenz zu Beginn der Messung die gleiche Temperatur haben.

2.8.3 Analyse der kalorimetrischen Messungen - Anpassung nach Gauß

Die kalorimetrischen Messungen wurden zunächst mit Hilfe des Programms MicroCal Origin 5.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA) analysiert. Dafür wurde, wenn nicht anders angegeben, die Referenz subtrahiert und die Energiemenge auf die eingesetzte Probenkonzentration normiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Programms eine Basislinienanpassung durchgeführt (vgl. Abbildung 7). Die daraus resultierenden Daten wurden in das Programm Origin Pro 8 kopiert. Unter Zuhilfenahme der Funktion „fit multi-peaks“ wurden Messungen von Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten einer

Kurvenanpassung nach Gauß unterzogen, da von einer Gleichverteilung der Denaturierungsereignisse während der Messung ausgegangen wurde. Bei der Anpassung von Messungen mit kruden 70S-Ribosomen wurde von drei Denaturierungsereignissen ausgegangen.

Durch die Bestimmung der Basislinie wird auch die Bestimmung der Enthalpie ΔH_{cal} der Messung möglich. Der in der Messung bestimmte Wert C_p steht für die Energiedifferenz, die benötigt wird um die Proben temperatur im Vergleich zur Referenztemperatur um 1 °K zu erhöhen. Die Integration des Peaks ergibt die Umwandlungsenergie ΔH_{cal} (Bruylants *et al.*, 2005), die benötigt wird um das Protein in der Probenzelle zu denaturieren.

2.9 In vitro-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurden alle Lösungen und Puffer in doppelt autoklaviertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ angesetzt. Glaswaren wurden über Nacht bei 180 °C gebacken, Plastikwaren, die nicht steril geliefert wurden, wurden ebenfalls zwei Mal autoklaviert.

Tabelle 13: Puffer und Lösungen für die *in vitro*-Transkription

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
NTP-Mix	25 mM ATP, 25 mM CTP, 25 mM GTP, 25 mM UTP, pH mit KOH auf 7,0 einstellen
Promega T7 Ribomax Puffer (5x)	400 mM Tris-HCl, pH 7,6 MgCl ₂ -Konzentration muss je nach Template variiert werden 10 mM Spermidin 200 mM DTT
T7 RNA-Polymerase	4,95 mg/mL in 50 % Nickel Puffer A, 50 % Glycerin
Ectoinstammlösung	3,5 M Ectoin
Hydroxyectoinstammlösung	3,5 M Hydroxyectoin
Nickel-Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl
Nickel-Puffer B	20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol

Die *in vitro*-Transkription beschreibt eine Methode zur gezielten Synthese der RNA eines Zielgens. Vor das Zielgen wird ein bestimmter Promotor (meist ein Phagenpromotor wie SP6 oder T7) kloniert. Anschließend kann mit der entsprechenden Polymerase die Transkription des Zielgens in RNA durchgeführt werden. Dabei handelt es sich nicht zwangsläufig um die Synthese von mRNA. Oft wird RNA auch für die Verwendung in Hybridisierungs- oder Strukturaufklärungsstudien hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro*-Transkription mit dem T7-System durchgeführt.

2.9.1 Die T7 RNA-Polymerase P266L

Die T7 RNA-Polymerase ist ein monomeres Enzym (Niles *et al.*, 1974). Sie stammt ursprünglich aus dem Phagen T7 und wurde erstmals im Jahr 1970 beschrieben (Chamberlin und McGrath, 1970). Für die *in vitro*-Transkriptionsexperimente wurde die T7 RNA-Polymerase P266L (Guillerez *et al.*, 2005) verwendet. In dieser ist das Prolin an Position 266 des Enzyms gegen ein Leucin ausgetauscht. Dies führt zu einer schwächeren Bindung des Enzyms an den Promotorbereich.

Um definierte Transkripte zu synthetisieren müssen alle RNA-Polymerasen DNA auf zwei unterschiedliche Arten binden: zunächst spezifisch während der Erkennung der Promotorsequenz und später, während der Elongation, unspezifisch. Die Umwandlung von einem Modus in den anderen geschieht dabei an der ITS, der *initially transcribed sequence*, und wird durch sehr langsame Prozessivität, die oftmals zur Entlassung von verkürzten Transkripten (*abortive transcripts*) führt, charakterisiert, bevor das Enzym zur Elongation wechseln kann. Der Aminosäureaustausch in der verwendeten Polymerase führt über die geschwächte Promotorbindung zu einer geringeren Rate an verkürzten Transkripten. So kann die Polymerase leichter in den Elongationsmodus übergehen, und da die Zeit, die die Polymerase braucht um den Promotor zu verlassen, oftmals der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Transkription ist, wird die Menge der Zieltranskripte erhöht (Guillerez *et al.*, 2005).

2.9.2 Aufreinigung der T7 RNA-Polymerase

Für die Aufreinigung der T7 RNA-Polymerase wurden die Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) p266L zunächst in 3 mL Resuspensionspuffer pro Gramm Zellmaterial resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension im gekühlten Ultraschall (Sonifier Cell Disruptor B15, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA) bei 30 % Leistung aufgeschlossen (etwa 1 Minute pro mL Suspension). Anschließend wurden unlösliche Proteine und Zelltrümmer in einer Zentrifugation (10.000 g, 4 °C) entfernt. Der klare Überstand wurde dann mit 1 mL Ni-NTA-Agarose Aufschwämmung (Qiagen, Hilden) pro 10 mL Lysat versetzt und für 2 h bei 6 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das Zelllysate in Glasröhrchen mit Fritte überführt. Dadurch wird die Ni-NTA-Agarose aufgehalten, nicht gebundene Proteine fließen durch die Fritte ab. Das C-terminal getaggte Protein bleibt an die Agarose gebunden. In mehreren Waschschritten mit Puffer zunächst ohne, und dann mit 20 mM Imidazol und anschließend 50 mM Imidazol wurde die Säule gewaschen und so lose gebundene Proteine eluiert. Die endgültige Elution der T7 RNA-Polymerase erfolgte mit 100 mL Puffer mit 100 mM Imidazol. Über ein Konzentratorröhrchen (Millipore, MWCO 30.000 Da) wurde das Protein auf 1 mL

eingengt (Zentrifugation bei 4.500 rpm, JA-10 Rotor, Beckman Coulter, 4 °C). Nach dem Einengen wurde zunächst bei 280 nm im Spektrophotometer (Specord 210, Analytik Jena, Jena) die Konzentration des Proteins bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des Proteins liegt bei $1,4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (King *et al.*, 1986). Anschließend wurde die Proteinsuspension 1:1 mit sterilem Glycerin versetzt und zu 100 μL aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -50 °C gelagert.

2.9.3 Durchführung der *in vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde als run-off Reaktion durchgeführt. Dazu wurden die verwendeten Plasmide hinter dem letzten Codon des Zielgens mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert (vgl. 2.5.4). Dadurch fällt die Polymerase am Ende des Zielgens von der DNA ab und die RNA-Transkripte haben eine definierte Länge.

Für die Durchführung der *in vitro*-Transkription wurden Ansätze mit 25 μL Endvolumen gewählt. Die Zusammensetzung eines *in vitro*-Transkriptionsansatzes ist in Tabelle 14 gezeigt.

Tabelle 14: Zusammensetzung eines *in vitro* Transkriptionsansatzes

Komponente	Menge
Promega T7-Ribomax-Puffer (5x)	5 μL
NTPs (25 mM)	5 μL
T7 RNA-Polymerase	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Linearisierte Plasmid-DNA	20-40 mg/mL
RNase-Inhibitor	0,5 μL
Ectoin- oder Hydroxyectoinstammlösung (3,5 M)	1,78 -7,12 μL (0,25-1,0 M Endkonzentration)
	ad. 25 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$

Diese Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert und anschließend bei 30 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 13.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Die so gewonnene mRNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.10 Zellfreie Protein-Synthese

Nach (Seidelt *et al.*, 2009), modifiziert nach Thakral, unveröffentlicht

Alle Puffer und Lösungen für die zellfreie Protein Synthese wurden in H₂O_{DEPC} angesetzt. Dazu wurde H₂O_{reinst} über Nacht mit 0,1 % (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt und unter Rühren inkubiert. DEPC inaktiviert eventuell im Wasser vorhandene RNasen irreversibel und wurde durch Autoklavieren (3 h, 121 °C) wieder entfernt, da es durch die Hitzeeinwirkung in Wasser und Ethanol zerfällt.

Tabelle 15: verwendete Puffer und Lösungen in der zellfreie Protein Synthese

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Endkonzentration
Aminosäuren I (D)	150 mM L-Aspartat, pH-Wert mit HCl auf 1,5 eingestellt	Je 2 mM
Aminosäuren II (E, R)	150 mM L-Glutamat, 150 mM L-Tyrosin, pH-Wert mit NaOH auf 12,5 eingestellt	Je 2 mM
Aminosäuren III (N, Q, F)	150 mM L-Asparagin, 150 mM L-Glutamin, 150 mM L-Phenylalanin, zum Lösen auf etwa 60 °C erwärmen	Je 2 mM
Aminosäuren IV (K, R, H, M, G, V, W)	150 mM L-Lysin, 150 mM L-Arginin, 150 mM L-Histidin, 150 mM L-Methionin, 150 mM Glycin, 150 mM L-Valin, 150 mM L-Tryptophan, zum Lösen auf etwa 60 °C erwärmen	Je 2 mM
Aminosäuren V (A, T, S, P, I, C, L)	150 mM L-Alanin, 150 mM L-Threonin, 150 mM L-Serin, 150 mM L-Prolin, 150 mM L-Isoleucin, 150 mM L-Cystein, 150 mM Leucin	Je 2 mM
ATP	100 mM ATP, pH mit KOH auf 7,0 eingestellt	1,2 mM
Betainstammlösung	4 M Betain in 236 mM Bis-Tris-Acetat Puffer pH 7,0	0-1000 mM
Bis-Tris-Acetat-Puffer	2 M Bis-Tris, pH 7,0 mit Essigsäure eingestellt	100 mM
Coenzym A	52 mM Coenzym A	0,26 mM
CTP, GTP, UTP	Je 100 mM CTP, GTP und UTP, pH-Wert mit KOH auf 7,0 eingestellt	Je 0,85 mM
DTT-Stammlösung	2 M DTT	
Ectoinstammlösung	3,5 M Ectoin in 236 mM Bis-Tris-Acetat Puffer pH 7,0	0-1000 mM
Folinsäure	3400 µg/mL	34 µg/mL
Hydroxyectoinstammlösung	3,5 M Hydroxyectoin in 236 mM Bis-Tris-Acetat-Puffer pH 7,0	0-1000 mM
Kanamycin	600 µM Kanamycin	1,2 µM
K-Glutamat, Ammoniumglutamat Stammlösung	3 M K-Glutamat, 230 mM Ammoniumglutamat	130 mM K-Glutamat 10 mM Ammoniumglutamat
Luciferase-Stabilisierungs-Puffer	70 mM HEPES, pH 7,7 7 mM MgSO ₄ 3 mM DTT 1 % (w/v) BSA	
Mg-Glutamat	1 M Mg-Glutamat	15 mM
NAD	33 mM NAD (Nicotinamidadenindinukleotid)	0,33 mM
Natriumoxalat	200 mM Natriumoxalat	8 mM
Natriumpyruvat	1000 mM Natriumpyruvat	60 mM

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Endkonzentration
Putrescin	100 mM Putrescin	1 mM
S30-Puffer	10 mM Tris, pH 8,2 mit Essigsäure eingestellt 14 mM Mg-Acetat 60 mM K-Acetat 2 mM DTT	
Saccharosestammlösung	2 M Saccharose in 236 mM Bis-Tris-Acetat-Puffer pH 7,0	0-1000 mM
Spermidin	150 mM Spermidin	1,5 mM
Trehalosestammlösung	1,5 M Trehalose in 236 mM Bis-Tris-Acetat-Puffer pH 7,0	0-500 mM
Tris-Acetat-Puffer	2 M Tris, pH mit Essigsäure eingestellt (4 verschiedene Varianten, pH 7,5; pH 8,0; pH 8,5; pH 9,0)	100 mM
tRNA	34,12 mg/mL <i>E. coli</i> MRE-600 tRNA (unbeladen)	170,6 µg/mL

Die zellfreie Protein Synthese ist eine Methode zur Expression von Proteinen ohne die Integrität einer lebenden Zelle. Dabei gibt es zwei verschiedene Ansätze: das 2005 vorgestellte PURE-System (protein synthesis using recombinant elements) (Shimizu *et al.*, 2005), in dem alle Komponenten zunächst rekombinant exprimiert und aufgereinigt und dann in definierten Konzentrationen in die Reaktion eingesetzt werden, oder die Herstellung eines kruden Zellextraktes der jegliche Zellkomponenten enthält, die sich nach einer einstündigen Zentrifugation bei 30.000 g im Überstand (S30-Extrakt) befinden (Nirenberg und Matthaei, 1961). Mit beiden Systemen kann eine gekoppelte *in vitro*-Transkription-Translation durchgeführt werden. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System beruht auf der Verwendung eines S30-Zellextraktes.

2.10.1 Herstellung des S30-Zellextraktes

E. coli KC6 Δ ssrA Δ smpB (Seidelt *et al.*, 2009)

Der Zellextrakt von *E. coli* KC6 Δ ssrA Δ smpB wurde nach (Seidelt *et al.*, 2009) hergestellt und freundlicherweise von Dr. Axel Innis, Yale University, zur Verfügung gestellt.

H. elongata

Die Zellen von *H. elongata* (vgl. 2.3.2) wurden nach der Ernte in ein steriles Becherglas überführt und bei Raumtemperatur in einigen mL S30-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (11.000 rpm, 30 Minuten, 4 °C, Beckman Coulter, Rotor 70Ti) und der dabei entstandene Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 6 mL S30-Puffer/g Zellmaterial resuspendiert und im Ultraschall-Gerät (Branson Sonifier 450, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA)

aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurde dem Extrakt DTT zu einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt. Das Lysat wurde zwei Mal bei 30.000 g zentrifugiert (Rotor 70Ti, 20.200 rpm, 30 Minuten, 4 °C) und der Überstand der zweiten Zentrifugation in einem 50 mL-Falcon überführt. Zur Degradierung der endogenen mRNA wurde der Zellextrakt dann 80 Minuten bei 280 rpm und 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt unter Rühren bei 4 °C 40 Minuten gegen das 40-fache Volumen S30-Puffer dialysiert (Spectra/Por 4 membrane, MWCO 12.000-14.000, Spectrum Laboratories Inc, Rancho Dominguez, CA, USA). Nach der Dialyse wurde der Extrakt in ein 50 mL-Falcon überführt und kurz abzentrifugiert (7400 rpm, 10 Minuten, 4 °C, Rotor 70Ti). Der fertige Zellextrakt wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration des Extraktes wurde mit Hilfe des Bradford Protein Tests (vgl. 2.6.4) bestimmt.

2.10.2 Durchführung der zellfreien Protein-Synthese

Für die zellfreie Protein-Synthese wurde der S30-Zellextrakt in einer Endkonzentration von 9,9 mg Protein/mL eingesetzt. Neben der aufgereinigten T7 RNA-Polymerase (50 µg/mL Ansatz, freundlicherweise von Joe Watson, Yale University zur Verfügung gestellt) und dem zirkulären Plasmid pIVEX2.3d_luc (15 mg/mL, freundlicherweise von Durga Thakral, Yale University zur Verfügung gestellt) wurden auch alle 20 L-Aminosäuren, die vier Nukleotidtriphosphate und weitere Energieüberträger sowie DNA- und RNA-stabilisierende Substanzen zugegeben. Als Überträger der Formylgruppe für die Startaminosäure Formyl-Methionin wurde Folinsäure verwendet. Oxalat wurde eingesetzt um die Umsetzung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat zu verhindern, da dies eine ATP-Falle wäre. Außerdem wurden aufgereinigte, jedoch unbeladene tRNAs eingesetzt. Der Zellextrakt enthält alle weiteren benötigten Faktoren, wie beispielsweise die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Als Reporterprotein wurde die auf dem eingesetzten Plasmid pIVEX2.3d_luc codierte Leuchtkeifer-Luciferase verwendet.

Zur Bestimmung des Effekts kompatibler Solute auf die zellfreie Protein Synthese wurden die Solute Betain, Ectoin, Hydroxyectoin, Saccharose und Trehalose ausgewählt und in unterschiedlichen Konzentrationen bis 1000 mM in die Reaktionen eingesetzt.

Die Ansätze wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen (30 °C, 37 °C und 42 °C) für 90 Minuten. Danach wurden die Reaktionen durch Inhibierung der Ribosomen mit Kanamycin (Endkonzentration von 1,2 µM) abgestoppt und die Ansätze anschließend in den Nachweis der Luciferase-Aktivität eingesetzt.

2.10.3 Nachweis der Luciferase-Aktivität

Der Nachweis der Aktivität der zuvor in der Zell-freien Protein Synthese exprimierten Leuchtkäfer-Luciferase erfolgte mit Hilfe des Steady Glo Luciferase Assay Systems (Promega, Madison, WI, USA) am Plattenleser (Synergy 4, BioTek, Winooski, VT, USA). Dazu wurden 75 μL Luciferase-Stabilisierungspuffer (Novac *et al.*, 2004) in 96-well-Multititerplatten vorgelegt und die Reaktionsansätze dazu pipettiert. Im Plattenleser wurde zunächst die Hintergrundlumineszenz bestimmt. Anschließend wurden mit dem Dispenser des Plattenlesers 15 μL des Nachweisreagenz zur ersten Probe pipettiert, die Platte 5 Sekunden geschüttelt und anschließend 10 Sekunden lang die Lumineszenz gemessen. Dann erst wurde die nächste Probe gemessen. Alle Reaktionen wurden in 3-fach-Bestimmung durchgeführt und das arithmetische Mittel der Messwerte gebildet.

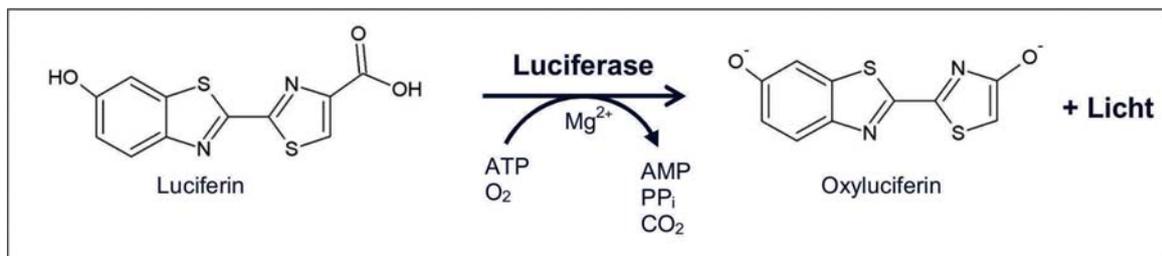


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der Luciferase

Luciferin wird von der Leuchtkäfer-Luciferase unter Verbrauch von ATP und O₂ decarboxyliert. Es entsteht Oxyluciferin in einem energetisch angeregten Zustand, das unter Abgabe eines Photons wieder in seinen Grundzustand fällt.

2.11 Polysomen-Profile

Für die Analyse der Polysomen-Profile während der zellfreie Protein Synthese wurden Reaktionen mit einem Volumen von 50 μL angesetzt und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration 1,2 μM) abgestoppt und sofort auf vorbereitete Saccharosegradienten (10 -40 %) überlagert und zentrifugiert (4 h, 30.000 rpm, 4 °C, Rotor SW32.1 Ti).

Die Saccharosegradienten wurden analysiert indem mit einer Pumpe (rabbit plus peristaltic pump, Rainin Instruments, Emeryville, CA, USA) die Gradienten durch eine Glaskapillare von unten beginnend durch einen UV-Detektor (Pharmacia LKB Control Unit UV-1, Pharmacia, Uppsala, Schweden) gezogen wurden. Die bei 260 nm detektierten Profile wurden auf einem Schreiber (Pharmacia rec-482 chart recorder, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgezeichnet.

2.12 Verwendete Chemikalien

Nährboden- und Medienzusätze	Reinheitsgrad	Hersteller
Carbenicillin, Na-Salz	Für die Biochemie	Roth (Karlsruhe)
Caseinhydrolysat (NZamin)		Roth (Karlsruhe)
D-Glucose * H ₂ O	Für die Biochemie	Merck (Darmstadt)
Glycerin	> 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt		Roth (Karlsruhe)
Select Agar		Gibco BRL (Paisly, Schottland)

Salze	Reinheitsgrad	Hersteller
K ₂ HPO ₄	> 98 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
KH ₂ PO ₄	> 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
NaCl	> 99,5 %	Fluka (Buchs, Schweiz)

Solute	Reinheitsgrad	Hersteller
Betain	> 98,0 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ectoin	> 99,0 % > 96,0 %	Isolat aus <i>H. elongata</i> , AG Galinski Bitop AG (Witten) Bitop AG (Witten)
Harnstoff	99,5 %	Sigma
Hydroxyectoin	> 95,0 %	Isolat aus <i>Marinococcus halophilus</i> , AG Galinski Bitop AG (Witten)
Saccharose (RNase-frei)	≥99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Trehalose * 2 H ₂ O	>99,0 %	Roth (Karlsruhe)

Chemikalien für molekulargenetische Arbeiten	Reinheitsgrad	Hersteller
1 kbp DNA-Leiter		Fermentas (St. Leon-Rot)
100 bp plus DNA-Leiter		Fermentas (St. Leon-Rot)
Agarose		Roth (Karlsruhe)
Agarose	Für die analytische Nucleinsäureelektrophorese	Merck (Darmstadt)
Bis-Tris	>99 %	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau		Sigma (Deisenhofen)
CaCl ₂	99,5 %	Merck (Darmstadt)
dNTP-Mix (2 mM)		Fermentas (St. Leon-Rot)
EDTA	> 99,0	Merck (Darmstadt)
Eisessig	100 %	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd	37 %	Roth (Karlsruhe)
Gel Red		Biotium (Hayward, CA, USA)
Glycerin	>99,5 %	Roth (Karlsruhe)
IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid)		Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Reinst.	Merck (Darmstadt)
MOPS	99,8 %	Calbiochem (La Jolla, CA, USA)
Na-Acetat	>99,5	Fluka (Buchs, Schweiz)

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
RNA High Range RNA Ladder	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
SYBR Gold	Invitrogen (Paisley, UK)

Chemikalien für proteinbiochemische Arbeiten	Reinheitsgrad	Hersteller
Acrylamid	(30 %ige Lösung)	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	100 %	BioRad (Hercules, CA, USA)
Bis-Acrylamid	2 %ige Lösung	Merck (Darmstadt)
Bovine Serum Albumin (BSA) Lösung für den BCA-Test		Uptima (Montluçon, Frankreich)
BSA für Bradford-Test		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dithiothreitol	>99 %	Sigma (Deisenhofen)
Imidazol	≥ 99,0 %	Roth (Karlsruhe)
Ni-NTA His-Bind Superflow		Qiagen (Hilden)
Page Blue Protein Staining Solution		Fermentas (St. Leon-Rot)
Prestained™ Protein Marker		Fermentas (St. Leon-Rot)
SDS-PAGE Laufpuffer		BioRad (Hercules, CA, USA)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Research grade	Serva (Heidelberg)
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin)	p. a.	Roth (Karlsruhe)

Chemikalien für die zellfreie Protein Synthese	Reinheitsgrad	Hersteller
Adenosintriphosphat (ATP)	98 %	GE healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Ammoniumglutamat		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Bis-Tris	> 99 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Coenzym A	Hydrate from yeast >85 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Cytosintriphosphat (CTP)	98 %	GE healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Dithiothreitol		American Bioanalytical (Natick, MA, USA)
<i>E. coli</i> MRE600 tRNA	> 85 %	Roche (Mannheim)
Essigsäure		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Folinsäure		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Glycin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Guanosintriphosphat (GTP)	98 %	GE healthcare (Piscataway, NJ, USA)
HEPES	> 99,5 %, p. a.	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Ultrapure for molecular biology	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Kaliumglutamat		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Kanamycin		USB Corp (Santa Clara, CA, USA)
L-Alanin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Arginin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Asparagin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Aspartat		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Cystein		Sigma (St. Louis, MO, USA)

L-Glutamin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Glutamat		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Histidin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Isoleucin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Leucin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Lysin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Methionin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Phenylalanin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Prolin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Serin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Threonin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Tryptophan		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Tyrosin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Valin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Magnesiumacetat		VWR International (West Chester, PA, USA)
Magnesiumglutamat		Sigma (St. Louis, MO, USA)
MgSO ₄	> 98 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Natriumoxalat	> 99,5 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Natriumpyruvat		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Putrescin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Spermidin		Sigma (St. Louis, MO, USA)
Uraciltriphosphat (UTP)	> 98 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Chemikalien für die Ribosomenisolierung	Reinheitsgrad	Hersteller
Magnesiumacetat	> 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
MgCl ₂	> 98,0 %	Merck (Darmstadt)
Na-EDTA	>99,0 %	Merck (Darmstadt)
NH ₄ Cl	Pur	Merck (Darmstadt)
Saccharose	>99,5, RNase /DNase frei	Roth (Karlsruhe)
Tris	99,9 %	Roth (Karlsruhe)
HEPES	>99,5 %	Roth (Karlsruhe)

Verwendete Enzyme	Hersteller
RNase Inhibitor	Roche (Mannheim)
FastAP	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNase I (RNase-frei)	Roche (Mannheim)
<i>Pfu</i> Polymerase	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot) New England Biolabs (Schwalbach)
RNaseA	Fermentas (St. Leon-Rot)
T7 RNA-Polymerase	Expressionsplasmid p266L Aufreinigung AG Steitz und diese Arbeit
RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

Kits	Hersteller
Steady Glo Luciferase Assay Reagent	Promega
BCA-Assay: protein quantification kit	Uptima (Montluçon, Frankreich)
Bradford Protein Assay	BioRad, (Hercules, CA, USA)
Gel Extraktion Kit	Peqlab (Erlangen)
Peqlab peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab (Erlangen)
Pure Link HiPure Plasmid Filter DNA Purification Kit	Invitrogen (Paisley, UK)

Reinigungsmittel	Hersteller
Drano Power Gel	SC Johnson GmbH (Erkrath)
RNase Away	Uptima (Montluçon, Frankreich)

2.13 Software und Internet-basierte Computerprogramme

- ACD/ChemSketch: Version 12.01 Advanced Chemistry Development Inc. Toronto, Kanada
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (Altschul *et al.*, 1990)
- Clone Manager 9: Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA
- Endmemo: <http://www.endmemo.com/bio/gc.php>
- ExPASy Proteomics Server: <http://www.expasy.org/> (Artimo *et al.*, 2012)
- Gen 5: Version 2.0, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
- Magellan: Version 6.5 Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
- MicroCal Origin: Version 5.0 MicroCal, Northampton, MA, USA
- NanoDrop 1000 3.8.1 Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
- OriginPro 8: Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA
- ProtParam tool: <http://web.expasy.org/protparam/> ExPASy Proteomics Server (Artimo *et al.*, 2012)
- RNAfold web Server: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi> (Zuker und Stiegler, 1981)
- Translate tool: <http://web.expasy.org/translate/> ExPASy Proteomics Server (Artimo *et al.*, 2012)
- VPViewer: MicroCal, Northampton, MA, USA

3 Ergebnisse

Die Wirkung kompatibler Solute auf ganze Zellen und insbesondere Proteine ist gut untersucht (vgl. 1.3.2). Anders verhält sich dies beim Effekt der Solute auf Nucleinsäuren. Insbesondere bei der Wirkung auf RNAs sind nur sehr wenige Ergebnisse publiziert. Etwas mehr Daten sind für die Wirkung auf dsDNA erhältlich. Diese weisen zumeist auf eine Destabilisierung durch die Solute hin (Lapidot *et al.*, 1999; Kurz, 2008). Zum Effekt der Solute auf Komplexe aus Proteinen und Nucleinsäuren hingegen sind bisher keine Daten publiziert worden. In der vorliegenden Arbeit soll daher ein erster Einblick in die Wirkung kompatibler Solute auf Protein-Nucleinsäure-Komplexe gewonnen werden. Als Modellsystem wurden dafür Ribosomen ausgewählt. Durch ihre zentrale Rolle in der Proteinsynthese und damit auch in der Adaptation an veränderte (Stress-)Bedingungen sind sie wichtige Zellbestandteile, die das Überleben der Zellen mitbestimmen. Man würde also zunächst eine Stabilisierung der Ribosomen durch kompatible Solute erwarten. Andererseits bestehen Ribosomen zu rund $\frac{2}{3}$ aus ribosomaler RNA und aufgrund der bisher publizierten Ergebnisse zur Wirkung auf DNA und RNA muss auch eine Destabilisierung durch die Solute in Betracht gezogen werden (Lapidot *et al.*, 1999; Lambert und Draper, 2007; Kurz, 2008; Lambert *et al.*, 2010). Die zweite ribosomale Komponente hingegen, die ribosomalen Proteine, halten den Abstand der rRNAs zueinander aufrecht und bewahren so ihrerseits, zumindest unter physiologischen Bedingungen, die Stabilität der Ribosomen. So würde sich bereits eine Stabilisierung der Proteine durch die Solute positiv auf die Gesamtstabilität des Komplexes auswirken.

Insgesamt gliedert sich die vorliegende Arbeit in zwei Hauptteile: zum einen in kalorimetrische Analysen zur Wirkung verschiedener kompatibler Solute auf Ribosomen und zum anderen in funktionale Analysen, die die Effekte verschiedener Solute auf zellfreie Protein-Synthesen untersuchen.

3.1 Kalorimetrische Messungen an intakten Zellen und Zellextrakten

3.1.1 Kalorimetrische Messungen an intakten Zellen

Kalorimetrische Messungen an intakten Zellen zur Bestimmung der Schmelztemperatur verschiedener Zellbestandteile werden bereits seit mehreren Jahrzehnten durchgeführt. Mackey *et al.* haben 1991 erstmals eine Studie publiziert, die die Signale der Messung einzelnen Zellkomponenten zuordnet. Seitdem sind mehrere Studien publiziert, die in verschiedenen Organismen die Denaturierungstemperatur, insbesondere der Ribosomen, untersuchen und auch versuchen die Überlebensrate hitzestresser

Zellen mit der Denaturierung der einzelnen Zellkomponenten zu korrelieren (vgl. 1.6.5). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst ganze Zellen im Kalorimeter untersucht, um zunächst die Denaturierungstemperatur der *E. coli*-Ribosomen im natürlichen Umfeld zu untersuchen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Zellen zunächst im gleichen Medium angezogen wie bei Mackey (Komplexmedium) und in der exponentiellen Phase vorsichtig geerntet. Zwar geben Mackey *et al.* dazu keine Informationen, da jedoch während dieser Phase die meisten Ribosomen pro Zelle vorliegen (vgl. 1.6.4), wurde diese Wachstumsphase für alle Ganzzellmessungen gewählt. Nach der Ernte wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in die DSC-Messung eingesetzt.

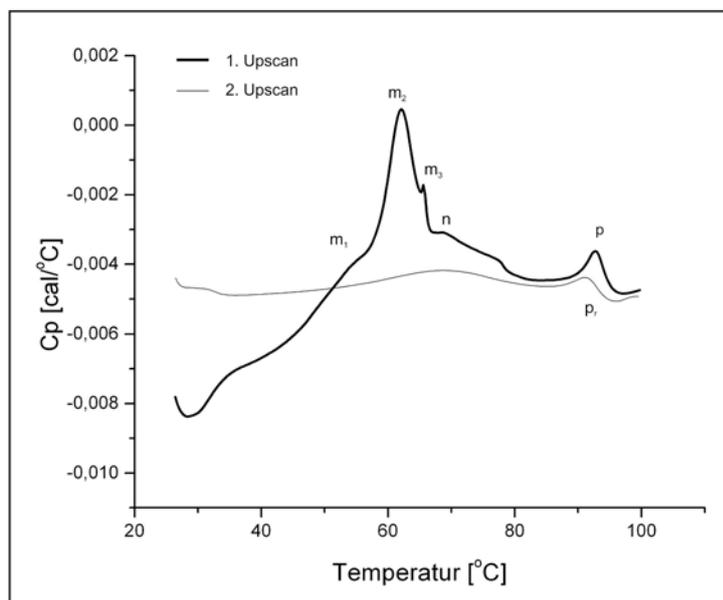


Abbildung 9: DSC-Messung an intakten Zellen von *E. coli* K12 angezogen in Komplexmedium

Zellen von *E. coli* K12 wurden in Komplexmedium nach (Mackey *et al.*, 1991) angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase vorsichtig geerntet und nach Resuspension in frischem Medium gegen dieses im Kalorimeter analysiert. Die erste Messung ist fett gedruckt, die Reaktionen des zweiten Aufheizens sind dünn dargestellt. Es wird deutlich, dass lediglich die mit „p“ gekennzeichnete endotherme Reaktion bei etwa 92 °C reversibel denaturiert. Auf der Y-Achse ist die Wärmekapazität aufgetragen. Da hier ganze Zellen in die Messung eingesetzt wurden, ist die Normierung auf Molaritäten nicht möglich. Einige Denaturierungsereignisse sind nach (Mackey *et al.*, 1991) benannt.

Die DSC-Messung (vgl. Abbildung 9) zeigt mehrere endotherme Denaturierungsereignisse zwischen etwa 40 °C und 95 °C. Davon ist jedoch nur die Denaturierung bei etwa 92 °C reversibel, erkennbar an der erneuten Denaturierung im zweiten Aufheizvorgang. Alle anderen Zellkomponenten denaturieren irreversibel. Fünf dieser Denaturierungsereignisse sind analog zu Mackey *et al.* 1991 benannt: die

Signale, die mit m_1 und m_2 gekennzeichnet sind, stellen nach Mackey die Denaturierungsereignisse der 30S- und 50S-Untereinheiten dar. Peak m_3 und n werden der Denaturierung der 70S-Komplexe und der rRNA zugeordnet, wobei nicht klar ist, welches Signal welchem Makromolekül entspricht. Der reversible, mit p und p_r gekennzeichnete Peak steht für die Denaturierung der DNA. Diese Messung ist konform zu den von Mackey *et al.* publizierten Messung an *E. coli*-Zellen. Jedoch sollten im Folgenden die Zellen gezielt mit kompatiblen Soluten beladen werden, so dass die Verwendung des Komplexmediums ungünstig war, da die Zellen dann viel Betain aus dem Hefeextrakt des Mediums akkumulieren. Daher wurden die Zellen in Minimalmedium angezogen und zunächst Messungen ohne zusätzlich supplementierte Solute durchgeführt. Auch diese Zellen wurden in der exponentiellen Phase (bei der gleichen optischen Dichte) geerntet und in frischem Medium resuspendiert. Dieses Medium enthielt jedoch keine Glucose, da diese während des Aufheizvorganges vermutlich mit dem im Medium befindlichen Phosphat reagieren würde und diese Reaktion als zusätzliches Signal im Thermogramm erscheinen würde. Auch hier wurde die Messung gegen das Medium durchgeführt.

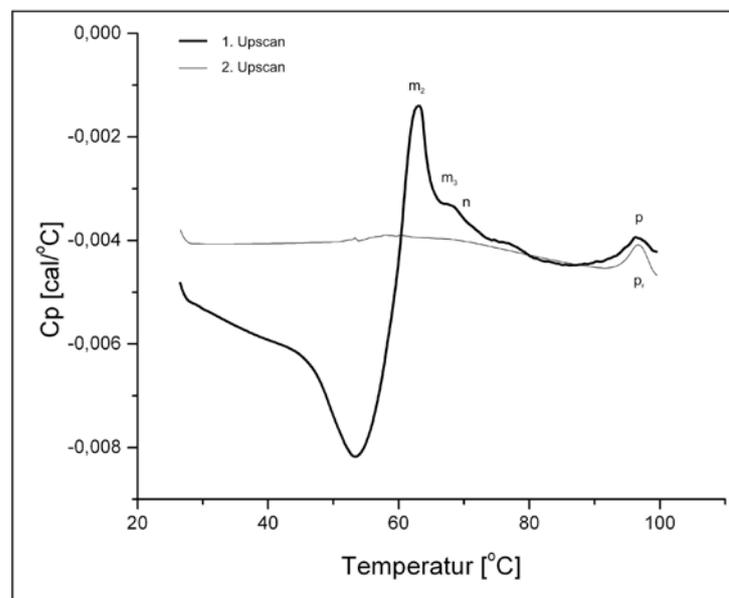


Abbildung 10: DSC-Messung an intakten Zellen von *E. coli* K12 angezogen in Minimalmedium

Zellen von *E. coli* K12 wurden in Minimalmedium mit 1 % (w/v) NaCl angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase vorsichtig geerntet und anschließend im gleichen Medium (ohne Glucose) resuspendiert und im Kalorimeter analysiert. Die erste Messung ist fett dargestellt, der zweite Aufheizvorgang dünn. Auch hier sind einige Signale nach (Mackey *et al.*, 1991) benannt. Die Y-Achse zeigt die Wärmekapazität während der Denaturierungsreaktionen. Da jedoch ganze Zellen in die Messung eingesetzt wurden, ist die Normierung auf Molaritäten nicht möglich.

Im Vergleich zur Messung der in Komplexmedium angezogenen Zellen (vgl. Abbildung 9) fallen mehrere Unterschiede auf: einerseits ein prominenter, negativer exothermer Peak zwischen etwa 45 °C und etwa 55 °C und andererseits wird deutlich, dass Peak p nach rechts verschoben ist. Im Vergleich zur Messung mit Zellen aus Komplexmedium verschiebt sich das Signal der DNA-Denaturierung um mehr als 4 °C auf etwa 96,8 °C. Die den Ribosomen zugeordneten Signale m_{1-3} und n verschieben sich ebenfalls nach rechts, allerdings sind die Zuordnungen in diesen Messungen sehr kompliziert, so dass beispielsweise in dieser Messung kein Signal zu sehen ist, das m_1 zugeordnet werden kann. Vermutlich wird diese Denaturierungsreaktion hier von der Denaturierung anderer Komponenten überdeckt. Auch in dieser Messung wird die Reversibilität der DNA-Denaturierung, jedoch die Irreversibilität der Ribosomendenaturierung deutlich.

Im Bereich zwischen 45 °C und 55 °C, in dem in dieser Messung ein negatives Signal zu sehen ist, zeigt die Messung mit den Zellen aus dem Komplexmedium einen leichten, stetigen Anstieg des Energieniveaus. Laut Mackey denaturieren in diesem Bereich die Membranen und Lipide (vgl. auch Abbildung 5). Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass die Zellen aufplatzen und sich das Cytoplasma mit dem Medium vermischt. Eine solche Reaktion wäre im Kalorimeter vermutlich sichtbar.

3.1.2 Kalorimetrische Messungen an lysierten Zellen

Die Frage, ob die akkumulierten Solute einen Einfluss auf diese Reaktion haben, wurde untersucht, indem die Zellen erneut in den gleichen Medien angezogen, geerntet und resuspendiert wurden. Dieses Mal wurden die Zellen allerdings vor der Messung durch Zugabe von Lysozym und einer 3x 15-minütigen Behandlung im Ultraschallbad lysiert und so analysiert.

Bei den im Komplexmedium angezogenen Zellen (vgl. Abbildung 11, links) ist weiterhin ein endothermer Peak zwischen 40 °C und 50 °C zu sehen, während bei den Zellen aus dem Minimalmedium (vgl. Abbildung 11, rechts) auch bei den lysierten Zellen eine exotherme Reaktion auftritt. Auffällig ist jedoch bei den lysierten Zellen aus dem Komplexmedium die deutlich geringere Temperatur bei der die Ribosomen denaturieren. Dieser Effekt tritt bei den Zellen aus Minimalmedium nicht ein. Hier ändert sich die Schmelztemperatur nur gering. Zudem ist der deutliche DNA-Peak bei etwa 92 °C in der Komplexmediumsprobe nicht zu sehen, in der Minimalmediumprobe tritt er erwartungsgemäß bei 95 °C auf.

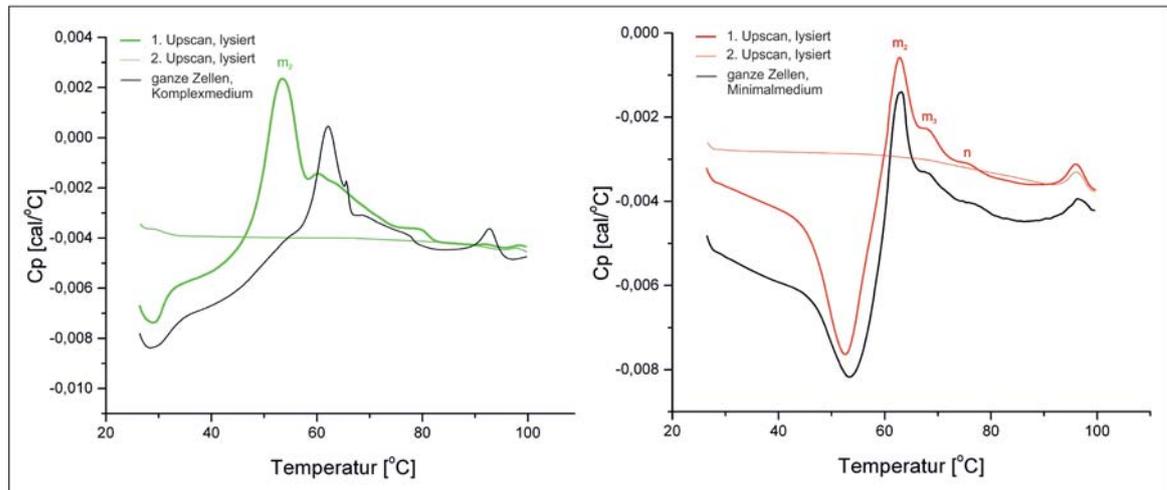


Abbildung 11: DSC-Messung lysierter Zellen von *E. coli* K12 in Komplexmedium oder Minimalmedium

E. coli K12 wurde zunächst in Komplexmedium (links) beziehungsweise Minimalmedium (rechts) bis zur exponentiellen Phase angezogen und vorsichtig geerntet. Die Zellen wurden im entsprechenden Medium resuspendiert und anschließend durch Lysozymzugabe und Ultraschallbehandlung lysiert. Die DSC-Messung wurde gegen das Resuspensionsmedium durchgeführt. Der erste Aufheizvorgang ist in grün bzw. rot fett, der zweite in grün bzw. rot dünn dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind außerdem die 1. Aufheizvorgänge der jeweiligen Vergleichsmessung mit ganzen Zellen in schwarz dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Wärmekapazität an. Durch die Verwendung von Zellysaten ist eine Normierung auf Molaritäten nicht möglich.

Da die Unterschiede in den Messungen zwischen Zellen aus Komplexmedium und Minimalmedium also offensichtlich nicht vom Aufplatzen der Zellmembran rührt, muss hier ein anderer Vorgang zu Grunde liegen, der das unterschiedliche Denaturierungsverhalten während der kalorimetrischen Messungen verursacht. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde darauf jedoch nicht weiter eingegangen. Im nächsten Schritt wurden hingegen Zellen gezielt mit kompatiblen Soluten beladen und der Effekt bestimmter Solute auf die Denaturierung untersucht.

3.1.3 Kalorimetrische Messungen an beladenen Zellen

In einem kürzlich erschienenen Artikel von Pleitner *et al.* beschreiben die Autoren kalorimetrische Messungen an *E. coli* AW1.7 (Pleitner *et al.*, 2012). Die Zellen wurden in Komplexmedium mit 0 % (w/v) NaCl beziehungsweise 4 % (w/v) NaCl angezogen. Die Autoren zeigen, dass sich bei Zellen, die bei 4 % gewachsen waren, der Ribosomenpeak m_2 im DSC-Thermogramm um etwa 3 °C zu höheren Temperaturen verschiebt. Dies führen die Autoren auf die erhöhte Konzentration akkumulierter kompatibler Solute zurück.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen von *E. coli* K12 gezielt mit kompatiblen Soluten beladen und anschließend im Kalorimeter analysiert. Die Zellen wurden dafür bei 1 % (w/v) NaCl in Minimalmedium angezogen, wie auch in den bereits gezeigten Messungen. Werden unter diesen Umständen keine Solute extrazellulär angeboten, synthetisiert und akkumuliert *E. coli* Trehalose. Zwar ist 1 % Salz noch keine „echte“ Stresssituation für die Zellen, es genügt jedoch um sie zur Akkumulation der Solute zu zwingen (vgl. Abbildung 13). Ganz bewusst wurde hier kein höherer Salzstress angelegt, da die Zellen ansonsten auch andere Stressbewältigungsstrategien einschalten würden. Dies aber erschwert den Vergleich der Messungen untereinander zusätzlich.

Zunächst wurden Zellen in Minimalmedium supplementiert mit 5 mM Betain angezogen. Die Zellen akkumulieren das Betain intrazellulär (vgl. Abbildung 13), ähnlich wie bei der Anzucht im Komplexmedium.

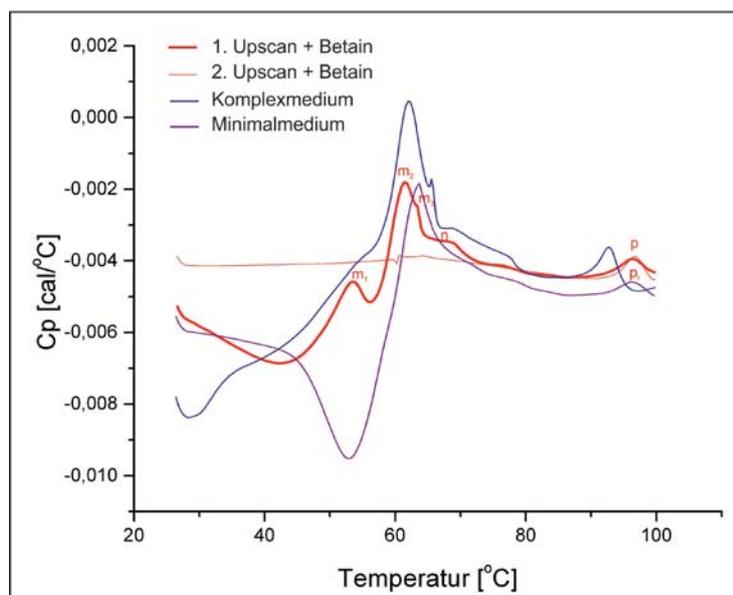


Abbildung 12: DSC-Messung mit intakten Zellen von *E. coli* K12 mit Betain supplementiert, in Minimalmedium und in Komplexmedium angezogen

Zellen von *E. coli* K12 wurden in Minimalmedium mit 5 mM Betain (Endkonzentration im Medium) supplementiert bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, vorsichtig geerntet und nach Resuspendierung in Minimalmedium (ohne Glucose) gegen dieses im DSC analysiert. Der erste Aufheizvorgang ist in rot und fett, der zweite in rot und dünn gedruckt. Zusätzlich sind hier die beiden ersten Aufheizvorgänge der bereits in den Abbildungen Abbildung 9 Abbildung 10 dargestellten Messungen von Zellen aus Komplexmedium (hier in blau) und Zellen aus Minimalmedium (hier in lila) gezeigt. Die Y-Achse zeigt die Wärmekapazität während der Denaturierungsreaktion an. Da ganze Zellen in die Messungen eingesetzt wurden, konnte die Energiemenge nicht auf Molaritäten normiert werden.

Die in Minimalmedium mit Betain supplementierten Zellen (Abbildung 12) zeigen wiederum ein anderes Denaturierungsmuster als die Zellen aus dem Komplexmedium oder Minimalmedium. Hier tritt der mit m_1 gekennzeichnete Peak (53,5 °C) sehr deutlich

hervor, wodurch der exotherme Peak, der in Abbildung 10 deutlich wurde, stark verringert wird. Die Schmelztemperatur der genomischen DNA (Signal p und p_r) liegt, genau wie bei der Vergleichsmessung der Zellen aus Minimalmedium, bei 96,7 °C. Das akkumulierte Betain verändert hier also nicht die DNA-Schmelztemperatur. Hingegen verschieben sich die ebenfalls den Ribosomen zugeordneten Peaks m_2 , m_3 und n deutlich zu geringeren Temperaturen, sowohl im Vergleich zu den Zellen aus Komplexmedium als auch zu Zellen aus Minimalmedium.

Um zu bestimmen wie viel der kompatiblen Solute in den verschiedenen angezogenen Zellen intrazellulär akkumuliert wird, wurden Zellen unter den gleichen Bedingungen angezogen und nach der Gefriertrocknung und Mikroextraktion nach Bligh und Dyer (1959) die Solutkonzentration mit Hilfe der HPLC bestimmt.

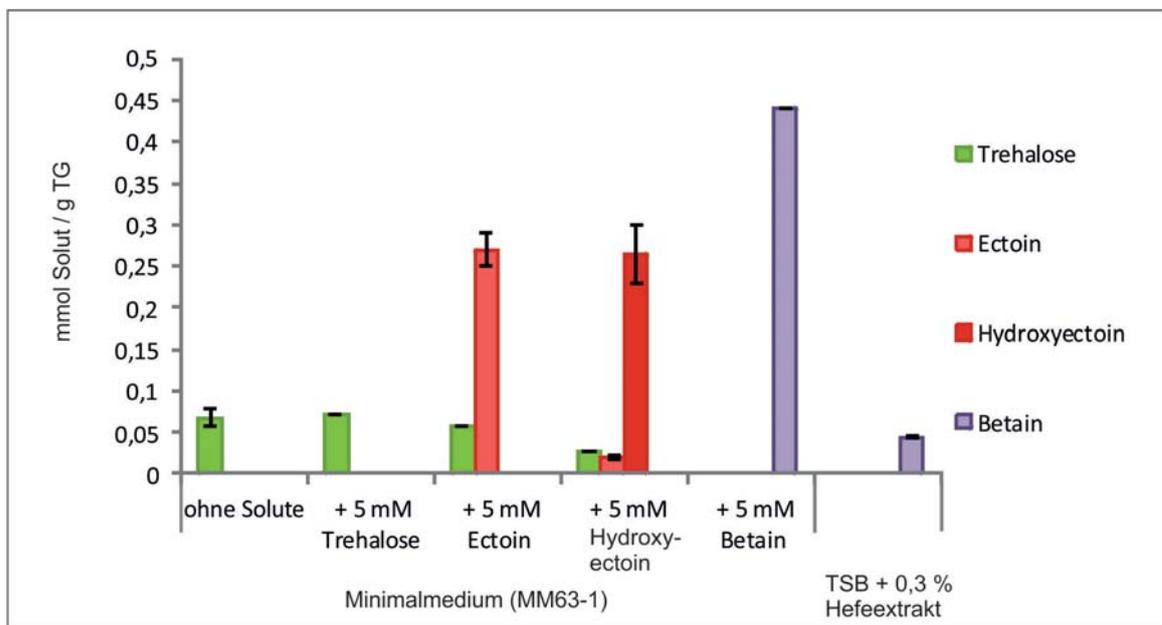


Abbildung 13: Intrazelluläre Solutkonzentration von *E. coli* K12 angezogen in verschiedenen Medien

E. coli K12 wurde für die DSC-Messungen in unterschiedlichen Medien (MM63-1 und TSB) angezogen. Zusätzlich wurden einige Kulturen in Minimalmedium zusätzlich mit je 5 mM Soluten supplementiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,7 wachsen gelassen und nach der Ernte gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Zellen nach Bligh & Dyer (1959) extrahiert und der intrazelluläre Solutgehalt mit Hilfe der HPLC analysiert. Hier sind die intrazellulären Gehalte von Trehalose (grün), Ectoin (hellrot), Hydroxyectoin (dunkelrot) und Betain (lila) in mmol Solut pro Gramm Trockengewicht dargestellt.

Die HPLC-Analyse der intrazellulären Solutkonzentrationen zeigt zunächst, dass *E. coli* K12 auch ohne die zusätzliche Gabe von außen intrazellulär Trehalose akkumuliert (siehe Abbildung 13). Erwartungsgemäß steigert die zusätzliche Supplementierung mit Trehalose die intrazelluläre Konzentration nicht, da *E. coli* K12 nicht in der Lage ist

Trehalose aufzunehmen (Louis *et al.*, 1994). Sobald Ectoin und Hydroxyectoin supplementiert werden, reduziert sich, ebenfalls erwartungsgemäß, die intrazelluläre Trehalosekonzentration. Ectoin und Hydroxyectoin werden bei den gewählten Bedingungen in einer Konzentration von etwa 0,27 mmol/g Trockengewicht (TG) akkumuliert. Betain wird im Vergleich in deutlich höheren Mengen von etwa 0,45 mmol/g TG akkumuliert, allerdings nur wenn die Zellen in Minimalmedium angezogen wurden. Die Zellen, die im Komplexmedium angezogen wurden, akkumulierten weniger als 0,5 mmol/g TG, also etwa 1/10 der Menge der Zellen in Minimalmedium.

Neben der bereits gezeigten DSC-Messung von Zellen, die mit Betain supplementiert wurden, wurden auch noch die mit Ectoin und Hydroxyectoin supplementierten Zellen in DSC-Messungen eingesetzt. Die Zellen, die mit Trehalose supplementiert wurden, wurden hier nicht weiter analysiert, da diese Zellen sich intrazellulär nicht von den nicht-supplementierten Zellen unterscheiden.

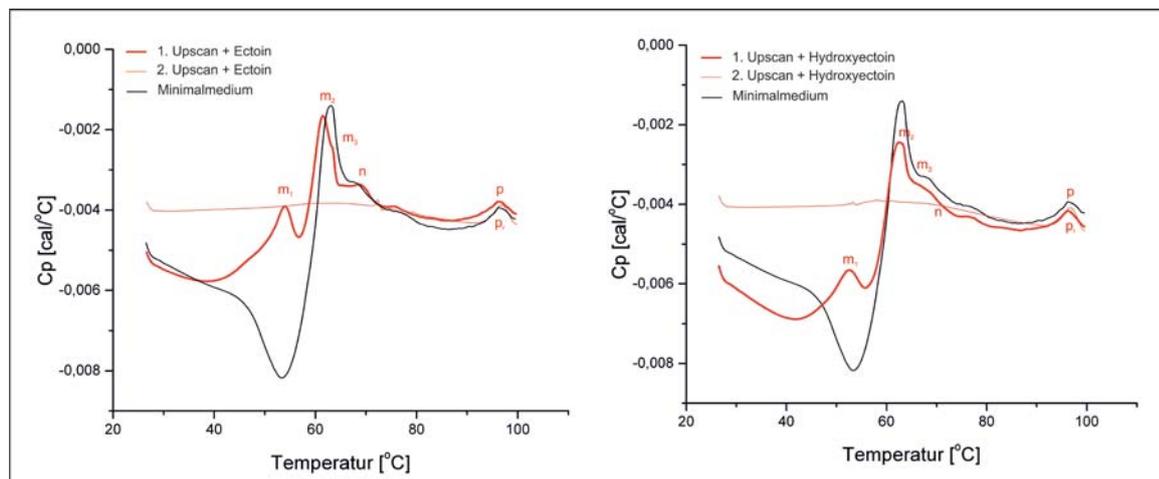


Abbildung 14: DSC-Messungen an ganzen Zellen von *E. coli* K12 in Minimalmedium supplementiert mit Ectoin oder Hydroxyectoin

E. coli K12 wurde in Minimalmedium supplementiert mit 5 mM (Endkonzentration) Ectoin (links) bzw. Hydroxyectoin (rechts) bis zur exponentiellen Phase angezogen, vorsichtig geerntet, in Minimalmedium ohne Glucose resuspendiert und in die DSC-Messung gegen das Medium eingesetzt. In beiden Abbildungen ist der erste Aufheizvorgang rot und fett und der zweite rot und dünn gedruckt. In schwarz ist außerdem, zum besseren Vergleich die Messung der Zellen aus Minimalmedium ohne Zusätze dargestellt. Auf der Y-Achse ist in [cal/°C] die Wärmekapazität aufgetragen. Durch die Verwendung ganzer Zellen ist hier die Normierung auf Molaritäten nicht möglich.

Sowohl mit Ectoin (Abbildung 14, links) als auch mit Hydroxyectoin (Abbildung 14, rechts) zeigt sich das positive, endotherme Signal bei etwa 53 °C. Mit Ectoin liegt die Signalspitze bei 53,9 °C, während sie mit Hydroxyectoin bei lediglich 52,7 °C liegt. Die Peakspitze des zweiten Peaks (m_2) andererseits liegt mit Ectoin bei 61,3 °C, während sie mit Hydroxyectoin bei 62,5 °C liegt. Anders als bei diesen Peaks verändert jedoch weder

die Akkumulation von Ectoin noch von Hydroxyectoin die Schmelztemperatur der genomischen DNA. Diese denaturiert bei beiden Proben bei 96,7 °C.

Um festzustellen, welcher Teil der Zelle für den positiven Peak der supplementierten Zellen aus Minimalmedium verantwortlich ist, wurden die Messungen bis zum Ende dieses ersten Signals durchgeführt und dann abgebrochen. Die Probe wurde aus dem Gerät entfernt, die Zellen im Ultraschall aufgeschlossen und anschließend alle unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Sollte es sich also um die Denaturierung eines bestimmten Proteinkomplex handeln, die diesen Peak hervorruft, so sollten die Proteine jetzt denaturiert in der unlöslichen Fraktion vorliegen. Diese Fraktionen wurden zur Analyse auf eine SDS-PAGE aufgetragen (hier nicht gezeigt) und das Bandenmuster anschließend verglichen. Es ergaben sich keinerlei sichtbare Unterschiede in den Bandenmustern der unlöslichen Fraktionen der supplementierten Zellen im Vergleich zu nicht-supplementierten Zellen, die die gleiche Behandlung durchlaufen hatten. Somit bleibt fraglich welcher Teil der Zellen dieses positive Signal bei etwa 54 °C verursacht.

Wie aus den HPLC-Daten (Abbildung 13) hervorgeht, akkumulieren die Zellen auch bereits bei 1 % (w/v) NaCl geringe Mengen Trehalose. Nachdem Meffert (Meffert, 2011) den trehalosedefizienten Stamm *E. coli* MC4100 Δ otsB konstruierte, wurde dieser ebenfalls für die Messung an intakten Zellen in Minimalmedium angezogen.

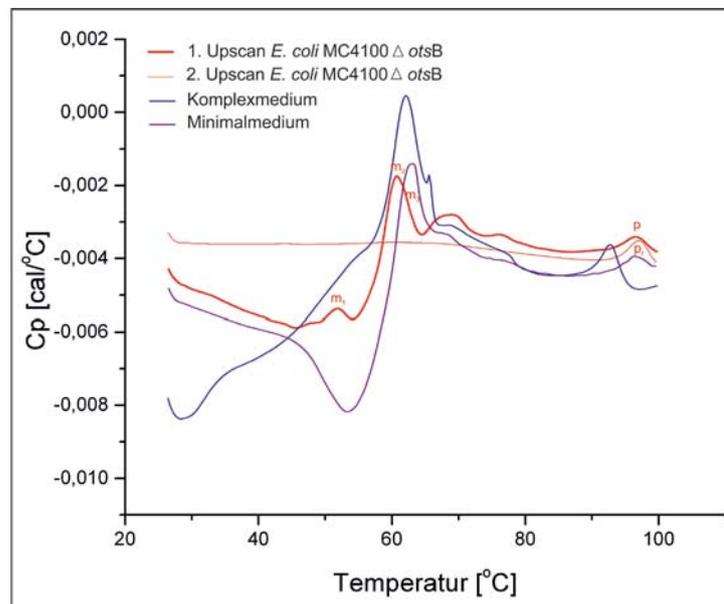


Abbildung 15: DSC-Messung an intakten Zellen von *E. coli* MC4100 Δ otsB

E. coli MC4100 Δ otsB wurde in Minimalmedium mit 1 % NaCl bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen und anschließend vorsichtig geerntet. Das Zellpellet wurde in MM63-1 ohne Glucose resuspendiert und in die DSC-Messung eingesetzt. Der erste Aufheizvorgang ist in rot und fett, der zweite Aufheizvorgang in rot und dünn gedruckt. Zusätzlich sind die beiden ersten Aufheizvorgänge der Zellen in Minimalmedium (lila) und Komplexmedium (blau) gezeigt. Auf der Y-Achse ist in [cal/°C] die Wärmekapazität aufgetragen. Durch die Verwendung ganzer Zellen ist hier die Normierung auf Molaritäten nicht möglich.

Bei der Messung intakter Zellen von *E. coli* MC4100 Δ otsB (Abbildung 15) zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Messungen der Zellen, die mit Ectoin oder Hydroxyectoin supplementiert angezogen wurden. Auch hier tritt das mit m_1 gekennzeichnete Signal deutlich hervor. Die Peakspitze liegt bei 51,7 °C. Auch die Denaturierungsreaktion die den zweiten Peak verursacht tritt bei diesen Zellen bei einer geringeren Temperatur, bei 60,6 °C auf. Die Schmelztemperatur dieses Peaks bei *E. coli* K12 angezogen in MM63-1 liegt mit 62,8 °C mehr als 2 °C höher. Die Schmelztemperatur der DNA liegt bei diesen Zellen bei 96,8 °C und damit nur unwesentlich höher als bei den anderen analysierten Zellen.

Die Ganzzellmessungen sind, wie auch aus den vorhergegangenen Abbildungen deutlich wird, aufgrund der vielen, teilweise bei gleichen Temperaturen stattfindenden, Denaturierungsereignisse der unterschiedlichen Zellkomponenten nur schwer zu interpretieren. Zwar bieten Ganzzellmessungen den Vorteil, dass die Ribosomen, zumindest bis zum Aufplatzen der Zellmembran, im natürlichen Milieu des Cytoplasmas analysiert werden, trotzdem wurde zur besseren Analysierbarkeit im Folgenden dazu übergegangen die Ribosomen zu isolieren und so das Testsystem, indem weniger Komponenten analysiert werden, zu vereinfachen.

3.2 Kalorimetrie an bakteriellen Ribosomen

3.2.1 Isolierung bakterieller Ribosomen

Für die Analyse der bakteriellen Ribosomen mussten diese aus den Zellen isoliert werden. Die Methode wurde zunächst für Ribosomen von *E. coli* K12 etabliert und später auch auf Ribosomen aus *H. elongata* übertragen. Die gesamte Aufreinigung erfolgte mit 10 mM $MgCl_2$, einer Konzentration bei der die ribosomalen 70S-Komplexe stabil aufgereinigt werden können. Die Zellen wurden zunächst lysiert und das Zelllysate anschließend mehrfach zentrifugiert um zunächst die unlöslichen Zelltrümmer zu entfernen. Zur Isolierung der Ribosomen wurde das klare Zelllysate auf ein Saccharosekissen überschichtet und wiederum zentrifugiert. Die schweren Ribosomen wandern schneller als alle anderen Zellkomponenten durch das Saccharosekissen und fanden sich als klares, farbloses Pellet am Boden des Röhrchens. Darüber hatten sich weitere Proteine in einem bräunlich-milchigen Pellet angesammelt. Dieses obere Pellet wurde entfernt und die Ribosomen in Puffer resuspendiert.

Die erfolgreiche Aufreinigung wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert. Dabei erleichtern markante Banden die Identifizierung der ribosomalen Proteine. Als Indikator der 30S-Untereinheit dient beispielsweise das S1-Protein. Dieses ist mit einer Größe von

etwa 61 kDa das größte der 53 ribosomalen Proteine. Die nächst kleineren ribosomalen Proteine liegen bei rund 30 kDa und kleiner. Die Größen aller weiteren ribosomalen Proteine, sowohl aus *E. coli* als auch aus *H. elongata* sind im Anhang in Tabelle 22 und Tabelle 23 angegeben. Einen guten Vergleich wie das Muster der ribosomalen Proteine aussieht bietet zudem die Publikation von Sun *et al.*, 1972.

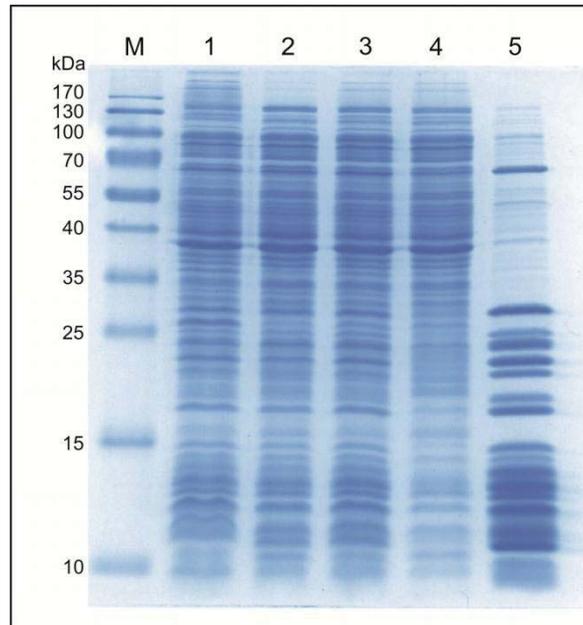


Abbildung 16: Analyse der Proteinfractionen in den verschiedenen Aufreinigungsschritten von Ribosomen aus *E. coli* K12

In diesem SDS-Polyacrylamidgel (14,8 %) wurden die Proteine aus den einzelnen Aufreinigungsschritten der Ribosomenisolierung aus *E. coli* K12 analysiert. Für die Aufreinigung wurden Zellen verwendet, die nach 2/3 der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden. Diese Zellen wurden mit einer Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und anschließend in zwei Zentrifugationsschritten (Probe 2+3) die Zelltrümmer vom klaren Zelllysate (Probe 1) getrennt. Durch die folgende Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen wurden die Ribosomen von den restlichen Proteinen getrennt (Probe 4 = Überstand, Probe 5 = resuspendiertes Ribosomenpellet). Jeweils 20 µg Protein wurden auf die SDS-PAGE aufgetragen. M: Proteinmarker

Die Aufreinigung von kruden Ribosomen aus *E. coli* K12 war erfolgreich. Die SDS-PAGE in Abbildung 16 zeigt in der letzten Spur das charakteristische Bandenmuster ribosomaler Proteine. Die Proben 1 - 3 (Zelllysate, Überstand nach der ersten bzw. zweiten Zentrifugation) unterscheiden sich kaum voneinander, obwohl in Probe 1 das Zelllysate ohne vorherige Zentrifugation aufgetragen wurde. Bei Probe 4, dem Überstand nach der Ultrazentrifugation durch das Saccharosekissen wird insbesondere im Bereich der kleineren Proteine deutlich, dass die ribosomalen Proteine entfernt wurden. Die aufgereinigten Ribosomen sind nur gering mit anderen Proteinen kontaminiert, wie die schwachen Banden zwischen dem S1-Protein (61 kDa) und den restlichen ribosomalen

Proteinen (ab 30 kDa) erkennen lassen. Dabei könnte es sich um Ribosomen-assoziierte Proteine handeln, die nicht zu den 53 fest mit der rRNA verbundenen ribosomalen Proteinen gezählt werden. Wie Sell (Sell, 2013) zeigte finden sich am Ende der Aufreinigung durch die Verwendung des Saccharosekissens etwa 10 - 20 mM Saccharose in den aufgereinigten Ribosomen.

Ribosomen die nach dieser Methode aufgereinigt wurden werden krude Ribosomen genannt. Die Präparation beinhaltet also neben dem 70S-Komplex auch die 30S- und 50S-Untereinheiten. Für die Trennung der einzelnen Komplexe voneinander sind weitere Zentrifugationsschritte notwendig, die die Ausbeute weiter verringern. Für die Analyse der Untereinheiten wurden diese Schritte durchgeführt (vgl. 3.2.8). Bei allen Messungen, in denen 70S-Ribosomen analysiert wurden, wurden jedoch diese kruden Ribosomen eingesetzt.

Das für die Aufreinigung von Ribosomen aus *E. coli* etablierte Protokoll wurde auf die Aufreinigung der Ribosomen aus *Halomonas elongata* übertragen. Dabei wurden auch die Pufferbedingungen so wie bei *E. coli* belassen.

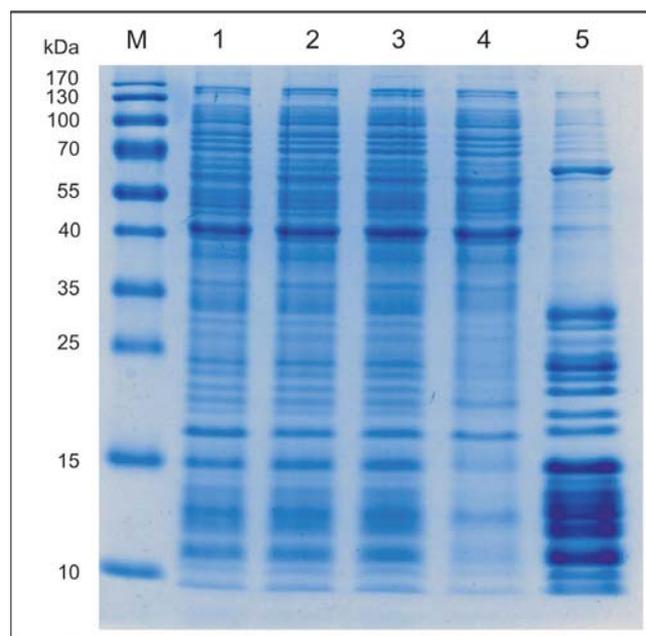


Abbildung 17: Analyse der Proteinfraktionen in den verschiedenen Aufreinigungsschritten von Ribosomen aus *H. elongata*

Aufgetragen auf diese SDS-PAGE (14,8 %) sind Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte für Ribosomen aus *H. elongata*. Die Zellen wurden zunächst lysiert (Probe 1) und anschließend zwei Mal abzentrifugiert um die unlöslichen Zelltrümmer zu entfernen (Überstände der Zentrifugationen sind Proben 2 + 3). Im letzten Schritt wurde das klare Zelllysate auf ein Saccharosekissen überschichtet und die Ribosomen durch Ultrazentrifugation von den restlichen Proteinen und sonstigen Zellbestandteilen getrennt (Überstand = Probe 4, resuspendiertes Ribosomenpellet = Probe 5). M = Proteinmarker.

Die SDS-PAGE in Abbildung 17 zeigt deutlich, dass die Methode der Ribosomenaufreinigung erfolgreich auf Ribosomen aus *H. elongata* übertragen werden konnte. Wiederum, wie bereits in Abbildung 16 beobachtet, ähneln sich die Proteinmuster der ersten drei Proben stark. In Spur 4 ist der Überstand nach der Zentrifugation durch das Saccharosekissen aufgetragen, Spur 5 enthält die resuspendierten Ribosomen. Die Anreicherung der ribosomalen Proteine im Vergleich zum Zelllysat ist gut sichtbar. Das erwartete, charakteristische Protein-Bandenmuster ist auch hier vorhanden, obwohl hier ebenfalls geringe Kontaminationen durch andere, vermutlich ebenfalls Ribosomen-assoziierte Proteine, zu erkennen sind. Auch bei diesen Ribosomen handelt es sich um krude Ribosomen.

3.2.2 Kalorimetrie an isolierten Ribosomen

Im Vergleich zu den bisher gezeigten Ganzzellmessungen wurden im Folgenden Daten mit aufgereinigten Ribosomen im Kalorimeter erhoben. Die Bestimmung der Thermostabilität bakterieller Ribosomen im DSC wird bereits seit vielen Jahren, unter verschiedenen Gesichtspunkten, durchgeführt. Dabei wurden die Ribosomen jedoch immer lediglich im Puffer gemessen, die Modulation des Lösungsmittels durch kompatible Solute hingegen wurde bisher nicht betrachtet.

Zunächst wurden die aufgereinigten Ribosomen ohne kompatible Solute im Kalorimeter analysiert. Abbildung 18 zeigt den ersten und zweiten Aufheizvorgang der Messung von Ribosomen aus *E. coli* über den Temperaturbereich von 25 - 85 °C.

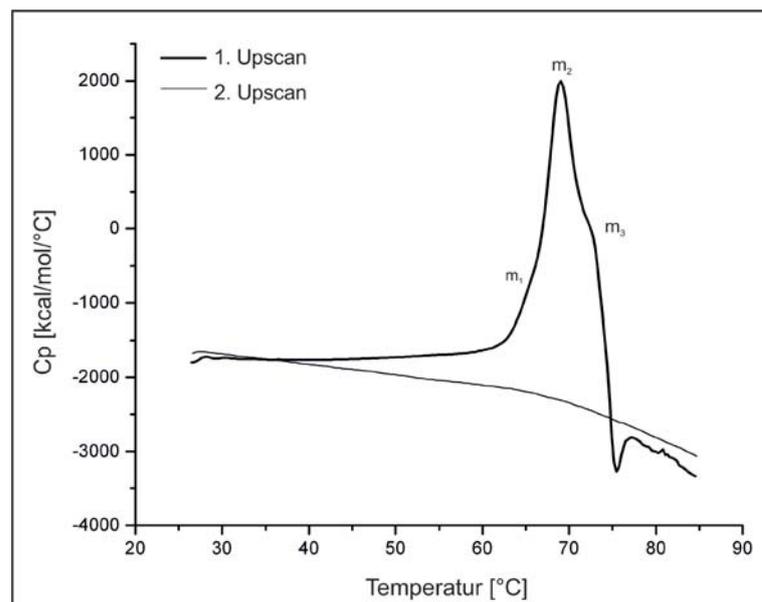


Abbildung 18: DSC-Messung an aufgereinigten *E. coli*-Ribosomen

Für diese Messung wurden 1 μ M krude *E. coli*-Ribosomen in Lagerpuffer im Kalorimeter analysiert. Dargestellt sind sowohl der erste Upscan (fett) als auch der zweite Upscan (dünn). Beim zweiten Upscan sind keinerlei Reaktionen mehr zu erkennen, die Denaturierung im ersten Aufheizvorgang war irreversibel. Zusätzlich sind die Denaturierungsreaktionen nach (Mackey et al., 1991) benannt.

Die Denaturierung der Ribosomen beginnt bei etwa 62 °C mit einem Maximum bei 69 °C und fällt dann stark ab (vgl. Abbildung 18). Das Ende der Denaturierungsreaktion liegt bei etwa 75 °C. Der zweite Aufheizvorgang zeigt keine Reaktion. Daher wurde der zweite Aufheizvorgang als Referenz des ersten Upscans verwendet. Eventuelle reversible Reaktionen werden so nicht beachtet. Weiterhin sind die Denaturierungsereignisse m_1 - m_3 nach Mackey *et al.* benannt.

Diese kalorimetrische Messung der aufgereinigten Ribosomen aus *E. coli* sieht den bereits publizierten Messungen von Mackey *et al.* und Bonincontro *et al.* durchaus ähnlich (Mackey *et al.*, 1991; Bonincontro *et al.*, 1998). Die Unterschiede erklären sich dadurch, dass Mackey *et al.* eine andere Art von Kalorimeter verwendet haben und für ihre Messungen Pasten, also viel höhere Konzentrationen, einsetzen mussten. Bei Bonincontro *et al.* hingegen ist der Unterschied, dass die Autoren die Mg^{2+} -Konzentration auf lediglich 0,08 mM verringert haben. Da Mg^{2+} -Ionen jedoch essentiell für den Zusammenhalt der ribosomalen Untereinheiten sind, wurde in allen Messungen der vorliegenden Arbeit die hohe Magnesiumkonzentration beibehalten um die Bedingungen der Messung näher am Natürlichen zu belassen. In einem weiteren Schritt wurde überprüft, wie reproduzierbar die Thermogramme von Messungen unterschiedlicher Aufreinigungen sind.

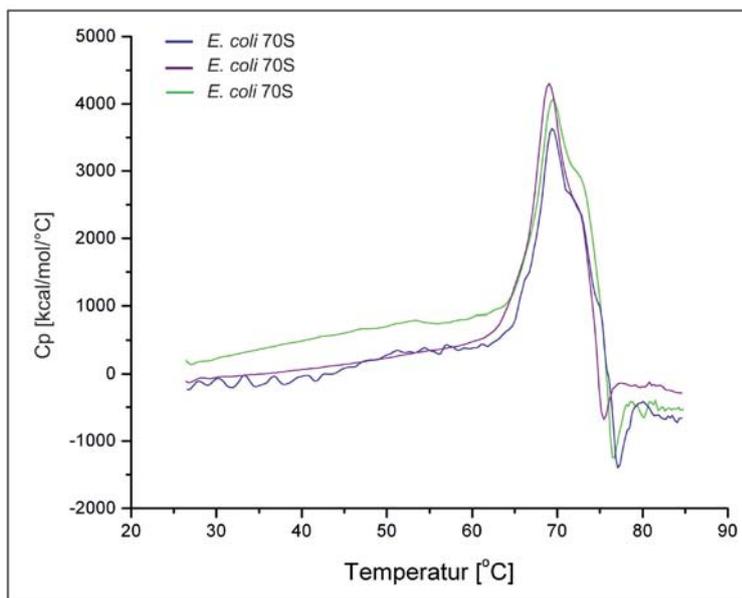


Abbildung 19: Reproduzierbarkeit von DSC-Messungen an kruden Ribosomen

Drei Messungen von kruden *E. coli*-Ribosomen aus unterschiedlichen Aufreinigungen sind hier miteinander verglichen. Diese Messungen wurden auf kcal/mol/°C normiert. In jede Messung wurden 1 μ M Ribosomen eingesetzt.

Wie aus Abbildung 19 hervorgeht sind die kalorimetrischen Messungen an aufgereinigten Ribosomen gut reproduzierbar. Offensichtlich liegen die Messungen nicht ganz genau übereinander. Dies liegt jedoch an der hohen Sensitivität des Geräts, das auch geringe Unterschiede im Denaturierungsverhalten aufzeichnet. Sobald die Bedingungen nur leicht verändert werden, wird dies im Thermogramm sichtbar, wie in Abbildung 19 deutlich wird. Hier wurden deshalb Messungen an Ribosomen miteinander verglichen, die einerseits zu unterschiedlichen Zeitpunkten der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden und somit auch aus unterschiedlichen Aufreinigungen hervorgingen.

Bei Mackey *et al.* wird beschrieben, dass die Ribosomen nach der Aufreinigung bis zur Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Es wurde jedoch nicht gezeigt, ob das Einfrieren und die anschließende Lagerung einen Einfluss auf die Ribosomen hat, also ob Unterschiede im Thermogramm auftreten im Vergleich zu Ribosomen, die nach der Aufreinigung direkt analysiert wurden. Um dies zu überprüfen wurden einerseits Ribosomen direkt nach der Aufreinigung gemessen und andererseits Ribosomen aus der gleichen Aufreinigung eingefroren und für mehrere Tage bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert bevor sie ebenfalls analysiert wurden.

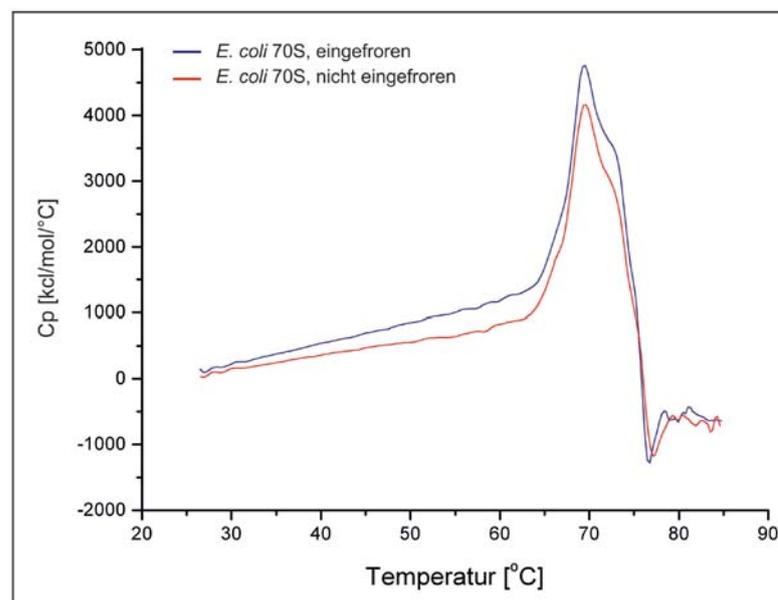


Abbildung 20: Vergleich eingefrorener und nicht-eingefrorener Ribosomen

In diese Messungen wurden je $1\text{ }\mu\text{M}$ Ribosomen eingesetzt. In rot ist hier die Messung der Ribosomen gezeigt, die direkt nach der Aufreinigung im Kalorimeter gemessen wurden. Die in blau dargestellte Messung hingegen zeigt das Thermogramm der Ribosomen, die mehrere Tage bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

Die Vergleichsmessungen zeigen, dass das Einfrieren und Lagern keinen Einfluss auf die Messung, also das Denaturierungsverhalten der Ribosomen, hat. Im Folgenden wurden die Ribosomen aufgereinigt, bei -50 °C gelagert und bei Bedarf vorsichtig für die DSC-Messungen aufgetaut.

3.2.3 Schmelzpunkt ohne kompatible Solute

Die DSC-Messungen wurden mit Hilfe von Kurvenanpassungen nach Gauß analysiert um die Schmelztemperaturen der einzelnen Vorgänge besser vergleichen zu können. Dabei wurde entsprechend den Daten von Mackey *et al.* und Bonincontro *et al.* von drei voneinander unabhängigen Denaturierungsereignissen ausgegangen. Zudem zeigte eine Kurvenanpassung mit der Annahme von drei Denaturierungsereignissen eine bessere Übereinstimmung mit der Messung als die Anpassung mit zwei oder vier Ereignissen (hier nicht gezeigt).

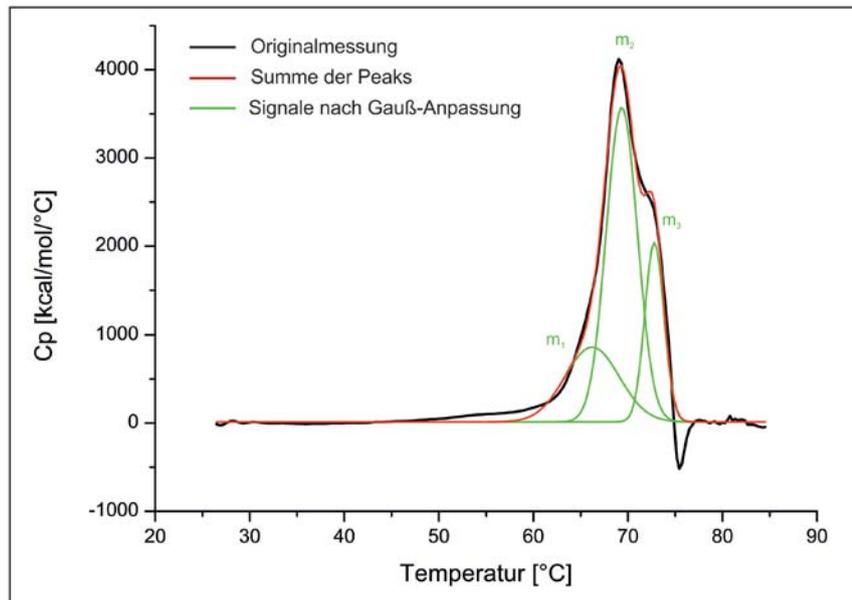


Abbildung 21: Kurvenanpassung nach Gauß an einer DSC-Messung mit *E. coli*-Ribosomen

Exemplarisch ist hier eine Kurvenanpassung nach Gauß an der in Abbildung 19 gezeigten Messung dargestellt. Zunächst wurde von der Originalmessung der zweite Upscan als Referenz subtrahiert. Danach wurden eine Basislinienanpassung und anschließend die Kurvenanpassung nach Gauß durchgeführt. In schwarz sind die Rohdaten nach der Basislinienanpassung gezeigt. Die Anpassung nach Gauß wurde auf der Annahme von drei voneinander unabhängigen Denaturierungsereignissen durchgeführt. In grün sind die drei Signale (m_1 , m_2 und m_3) dargestellt, die demnach der Messung zugrunde liegen. Werden diese in grün dargestellten Signale aufaddiert, ergibt sich die rote Kurve. Die Maxima der dargestellten Signale liegen bei $66,2\text{ °C}$ (m_1), $69,4\text{ °C}$ (m_2) und $72,8\text{ °C}$ (m_3).

Die Kurvenanpassung nach Gauß zeigt eine gute Übereinstimmung der Summe (rot) der drei Signale (grün) mit der Originalmessung nach der Basislinienanpassung (schwarz). Je besser die rote Linie auf der schwarzen Linie liegt, desto besser ist die Anpassung

der Kurve. Die drei Denaturierungsereignisse, die der Messung zugrunde liegen, haben ihre Maxima, also ihre Schmelzpunkte T_m bei 66,2 °C (m_1), 69,4 °C (m_2) und 72,8 °C (m_3). Die folgende Tabelle vergleicht die Schmelzpunkte mehrerer Messungen an *E. coli*-Ribosomen mit den von Mackey und Bonincontro publizierten Daten zur Denaturierung von Ribosomen.

Tabelle 16: Vergleich der Schmelztemperaturen von Ribosomen aus dieser Arbeit mit Literaturwerten

Verglichen werden die Schmelztemperaturen der Denaturierungsereignisse der bereits in Abbildung 19 gezeigten DSC-Messungen an aufgereinigten Ribosomen (unterschiedliche Aufreinigungen) von *E. coli* nach der Gauß-Anpassung. Die Benennung m_1 - m_3 erfolgte wie in Abbildung 21 gezeigt. Die Daten von (Mackey *et al.*, 1991) wurden aus Tabelle 3 der Publikation entnommen. (Bonincontro *et al.*, 1998) nennen für die Messung von 70S-Ribosomen lediglich zwei Schmelztemperaturen.

Organismus	T_m [°C]			Gesamtfläche unter dem Peak (ΔH_{cal}) [kcal/mol]	Quelle
	m_1	m_2	m_3		
<i>E. coli</i> K12	66,2 ± 1,66	69,4 ± 0,05	72,8 ± 0,06	25912 ± 6985	diese Arbeit
<i>E. coli</i> K12	65,8 ± 0,35	69,8 ± 0,09	73,5 ± 0,10	24490 ± 2900	diese Arbeit
<i>E. coli</i> K12	66,1 ± 0,66	69,5 ± 0,13	73,0 ± 0,32	22063 ± 5583	diese Arbeit
<i>E. coli</i> NCTC8164	65,6	74,0	75,9	n.d.	(Mackey <i>et al.</i> , 1991)
<i>E. coli</i> MRE600	67,8	73,7		n.d.	(Bonincontro <i>et al.</i> , 1998)
<i>H. elongata</i> Wt	65,4 ± 0,10	69,1 ± 0,05	71,9 ± 0,09	15144 ± 1026	diese Arbeit
<i>H. elongata</i> Wt	65,4 ± 0,11	69,1 ± 0,03	72,2 ± 0,04	10939 ± 372	diese Arbeit
<i>H. elongata</i> Wt	65,8 ± 0,19	69,4 ± 0,07	72,2 ± 0,06	10267 ± 753	diese Arbeit

Die Publikation von Mackey *et al.* gibt auch einen ersten Aufschluss darüber welcher Teil der kruden Ribosomen bei welcher Temperatur denaturiert. Bereits vor Mackeys Publikation wurde vermutet, dass die ribosomalen Untereinheiten unterschiedlich stabil sind. Leon & Brock zeigten mit Hilfe spektroskopischer Messungen an erhitzten Ribosomen, dass die 30S-Untereinheit instabiler ist als die 50S-Untereinheit. Die 50S-Untereinheit wiederum ist instabiler als der 70S-Komplex (Leon und Brock, 1967). Diese Tendenz konnten Mackey *et al.* bestätigen (Mackey *et al.*, 1991). Mackey ordnet die Denaturierung der 30S-Untereinheit dem Peak m_1 und die Denaturierung der 50S-Untereinheit dem Peak m_2 zu. Weiter wird Peak m_3 der Denaturierung der 70S-Komplexe zugeschrieben. Allerdings zeigt Bonincontro später, dass die 50S-Untereinheit in zwei voneinander unabhängigen Reaktionen denaturiert und führt

zudem an, dass die gemessene Denaturierungsenthalpie eher zur RNA-Komponente der Ribosomen passt als zum Proteinteil. Wie Bonincontro bereits beschrieb wird auch in diesen Daten deutlich, dass die 30S-Untereinheit unregelmäßig denaturiert. Bonincontro nennt dies „floppy“ (Bonincontro *et al.*, 1998): Während die Kurvenanpassungen für die Peaks m_2 und m_3 sowohl für *E. coli* als auch für *H. elongata* maximale Abweichungen von $\pm 0,32$ aufweisen, ist die Anpassung bei Peak m_1 mit einer Abweichung von bis zu $\pm 1,66$ deutlich ungenauer. Für die folgenden Analysen wurde das arithmetische Mittel aus mehreren Messungen ohne Solute gebildet. Für Ribosomen aus *E. coli* ergeben sich so diese Schmelzpunkte: 30S = $65,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0,22 \text{ }^\circ\text{C}$), 50S = $69,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0,21 \text{ }^\circ\text{C}$) und 3. Peak = $73,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0,29 \text{ }^\circ\text{C}$) und ein Flächeninhalt von 22100 kcal/mol ($\pm 2417 \text{ kcal/mol}$).

Neben der Analyse der Ribosomen von *E. coli* wurden auch die Ribosomen von *H. elongata* im DSC untersucht. Für die Messung wurden die gleichen Bedingungen gewählt.

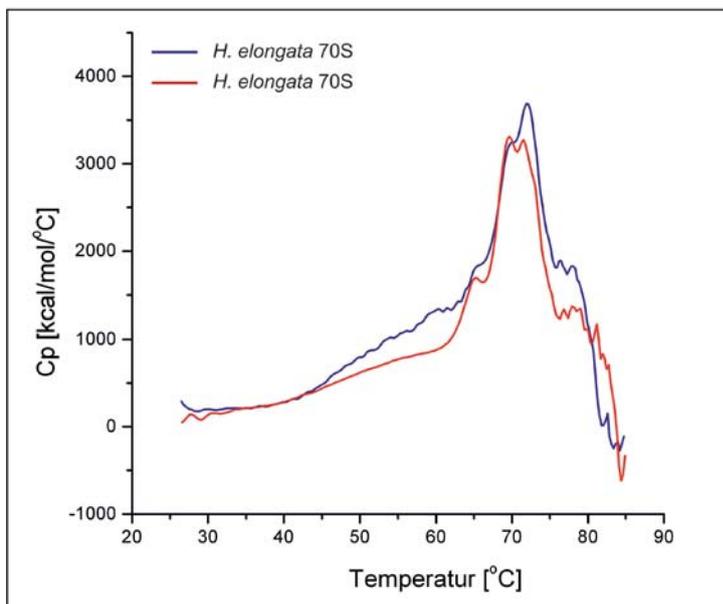


Abbildung 22: Reproduzierbarkeit der kalorimetrischen Messungen an *H. elongata*-Ribosomen

Gezeigt sind zwei DSC-Messungen an kruden 70S-Ribosomen von *H. elongata* aus verschiedenen Aufreinigungen. Der zweite Upscan wurde als Referenz subtrahiert (keine reversiblen Reaktionen erkennbar) und die Daten auf die eingesetzte Konzentration von $1 \mu\text{M}$ normiert.

Im Vergleich zu den in Abbildung 19 gezeigten Messungen an kruden Ribosomen aus *E. coli* sind diese Messungen an kruden Ribosomen aus *H. elongata* nicht so gut reproduzierbar. Es wird jedoch deutlich, auch anhand der bereits in Tabelle 16 gezeigten Denaturierungstemperaturen, dass die Spitzen der Peaks bei den gleichen

Temperaturen liegen. Zudem wird, wiederum im Vergleich zu den *E. coli*-Ribosomen, deutlich, dass hier nach der dritten Denaturierungsreaktion eine weitere, stark exotherme Reaktion abläuft. Bisher sind keinerlei DSC-Messungen an aufgereinigten Ribosomen aus halophilen Organismen publiziert und die publizierten Daten von *E. coli*- und *L. monocytogenes*-Ribosomen zeigen ein solches Muster nicht. Außerdem ist zu bemerken, dass die Messungen insgesamt unruhig wirken. Für die weiteren Analysen wurden die Datenpunkte bis zum Ende der dritten Denaturierung verwendet und ebenfalls einer Kurvenanpassung nach Gauß unterzogen.

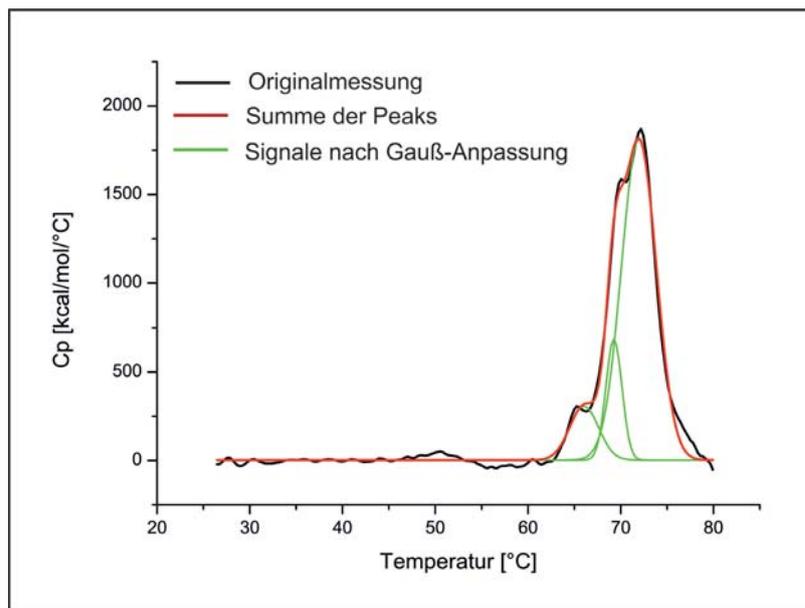


Abbildung 23: Kurvenanpassung nach Gauß an DSC-Messung von kruden 70S-Ribosomen aus *H. elongata*

Nach einer Basislinienanpassung wurde eine der in Abbildung 22 gezeigten DSC-Messungen an kruden *H. elongata*-Ribosomen mit Hilfe einer Kurvenanpassung nach Gauß analysiert. Hier wurde, genau wie bei den Ribosomen von *E. coli*, von drei voneinander unabhängigen Denaturierungsreaktionen ausgegangen. Es wurden nur die Datenpunkte bis 80 °C berücksichtigt, da die stark exotherme Reaktion, die in Abbildung 22 deutlich wird, die Kurvenanpassung behindert. In schwarz ist der Datensatz dargestellt, der in die Kurvenanpassung eingesetzt wurde, in Grün die drei Denaturierungsreaktionen, die demnach der Messung zugrunde liegen. Die Summe der Peaks ist in Rot dargestellt. Die Maxima der drei Peaks liegen bei 66,0 °C, 69,3 °C und 71,9 °C.

Bei dieser Kurvenanpassung ist auffällig (Abbildung 23), dass, anders als bei der Kurvenanpassung der Messung an *E. coli*-Ribosomen, der zweite Peak deutlich kleiner ist als der dritte Peak. Zudem ist der erste Peak viel deutlicher sichtbar als bei den *E. coli*-Ribosomen. Während dort noch spekuliert werden konnte, ob dieser Peak an dieser Stelle überhaupt existiert, ist hier eindeutig die endotherme Denaturierung einer Komponente zu erkennen. Aus allen durchgeführten DSC-Messungen an

H. elongata-Ribosomen ohne Solute wurde für die Schmelztemperaturen das arithmetische Mittel gebildet und mit folgenden Schmelzpunkten weiter gearbeitet: 30S-Peak = 65,6 °C ($\pm 0,18$ °C), 50S-Peak = 69,2 °C ($\pm 0,15$ °C) und 3. Peak = 72,1 °C ($\pm 0,12$ °C). Die bestimmte Enthalpie der Messungen schwankte stark, auch weil die Basislinienanpassung bei den Messungen mit *H. elongata*-Ribosomen schwieriger war und von Hand nachbearbeitet werden musste. Hier können sich große Fehler allein dadurch gebildet haben. Das arithmetische Mittel der Flächeninhalte über die analysierten Messungen beträgt 11545 kcal/mol (± 2114 kcal/mol). Dies ist deutlich weniger Energie, die während der Denaturierung der gleichen Menge Ribosomen gebraucht wird, als dies bei den Ribosomen aus *E. coli* der Fall ist.

Der Umstand, dass die einzelnen Signale bei der Messung der Ribosomen von *H. elongata* so gut voneinander getrennt sind, bietet den Vorteil, dass die Messungen folgendermaßen weiter analysiert werden konnten: In mehreren Durchläufen wurden die Ribosomen im Kalorimeter bis zu einer bestimmten Temperatur erwärmt, die Messung dann abgebrochen und die Probe abzentrifugiert. Insbesondere denaturierte Proteine lassen sich so von nativem Protein trennen. Die denaturierten Proteine im Pellet wurden resuspendiert, während der Überstand mit den noch nicht denaturierten Molekülen in eine weitere DSC-Messung eingesetzt wurde, die bei einer höheren Temperatur abgestoppt wurde.

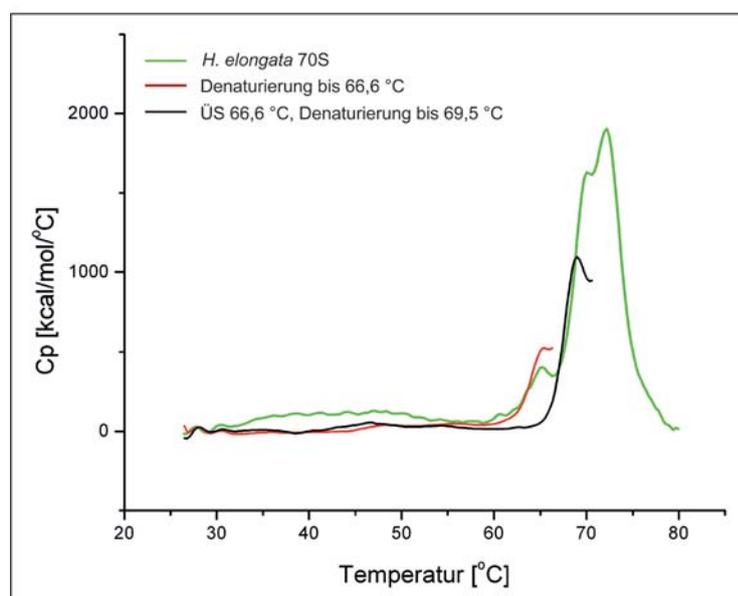


Abbildung 24: Abgebrochene DSC-Messungen an *H. elongata*-Ribosomen

Nach der Bestimmung der Schmelztemperatur der einzelnen Signale wurden 1 μ M *H. elongata*-Ribosomen im DSC im ersten Durchlauf (rot) bis 66,6 °C erwärmt. Die Probe wurde anschließend aus dem Gerät entnommen, abzentrifugiert und der Überstand in die nächste Messung eingesetzt (schwarz). Diese wurde bei 69,5 °C abgestoppt. Es wird deutlich, dass die Denaturierungsreaktionen voneinander unabhängig sind.

ebenfalls im Kalorimeter analysiert. Dazu wurde, zur besseren Vergleichbarkeit, die rRNA im gleichen Puffer gemessen wie die aufgereinigten Ribosomen. Zudem wurde die Integrität der aufgereinigten rRNA in einer FAGE (hier nicht gezeigt) überprüft. Es waren deutlich zwei Banden für die 16S- und die 23S-rRNA sichtbar.

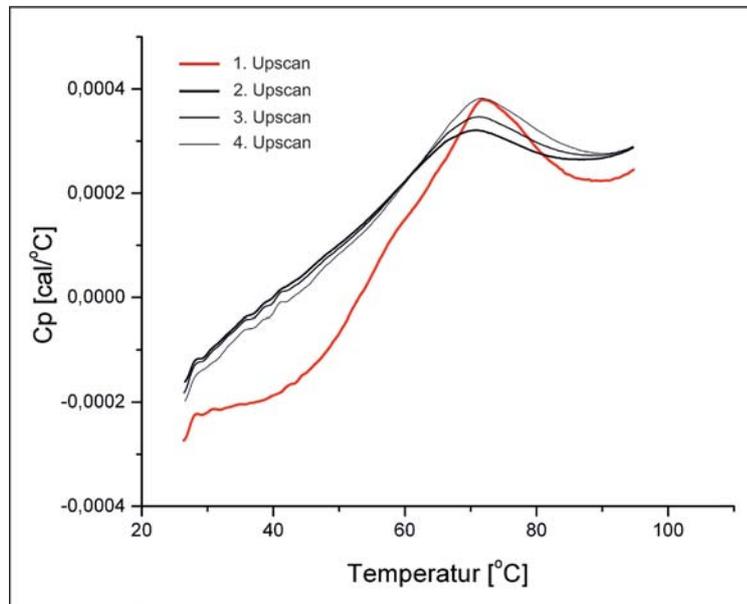


Abbildung 26: DSC-Messung aufgereinigter rRNA aus *E. coli*

Aus *E. coli*-Ribosomen wurde rRNA aufgereinigt und die Thermostabilität dieser im Kalorimeter untersucht. Deutlich wird die reversible Denaturierung der RNA in den weiteren gezeigten Upscans der gleichen rRNA-Probe. Diese Upscans jedoch unterscheiden sich von der ersten Denaturierung der rRNA dadurch, dass sie eine andere Form aufweisen. Diese ist jedoch über mehrere Scans reversibel und reproduzierbar.

Hier zeigt sich die Reversibilität der Denaturierung der ribosomalen RNA. Anders als in den DSC-Messungen der mit den ribosomalen Proteinen komplexierten Untereinheiten oder 70S-Komplexen ist hier in weiteren Upscans ebenfalls eine Denaturierung zu sehen. Der zweite Upscan zeigt ein anderes Denaturierungsmuster als der erste Upscan. Da dieses Muster sich jedoch in weiteren Upscans wiederholt, könnte es sein, dass die rRNA während des Abkühlens zwar nicht mehr ihre ursprüngliche Konformation einnimmt, sondern eine andere, reversible Konformation annimmt.

Einerseits spricht diese reversible Denaturierung der ribosomalen RNA gegen die Theorie, dass der dritte Peak der Ribosomenmessung von der Denaturierung der rRNA stammt. Andererseits ist es aber auch möglich, dass die denaturierten Proteine in der Messung ganzer Ribosomen die Renaturierung der rRNA behindern.

Insgesamt konnte nicht festgestellt werden, welcher Anteil der Ribosomen für den dritten Peak der Denaturierung verantwortlich ist. Genauso ist noch unklar, welcher Bestandteil

die exotherme Reaktion in der Messung mit *Halomonas*-Ribosomen nach dem dritten Peak verursacht. Daher werden die Peaks im Folgenden 30S, 50S und 3. Peak benannt, um dies kenntlich zu machen.

3.2.4 Kalorimetrie an isolierten Ribosomen mit verschiedenen Konzentrationen kompatibler Solute

Nach der Bestimmung der Denaturierungstemperaturen isolierter Ribosomen in Puffer wurden im Anschluss die Bedingungen des Lösungsmittels durch die Zugabe kompatibler Solute modifiziert. In der Publikation von Pleitner wird gezeigt, dass die Denaturierungstemperatur der Ribosomen *in vivo* zu höheren Temperaturen verschoben wird, wenn die Zellen zuvor kompatible Solute akkumuliert hatten (Pleitner *et al.*, 2012). Daher stellt sich die Frage, ob diese Stabilisierung der Ribosomen durch die akkumulierten Solute hervorgerufen wird und ob der Effekt auch *in vitro* beobachtet werden kann.

Für diese Analysen wurden die folgenden kompatiblen Solute ausgewählt: (Glycin-)Betain, Trehalose, Saccharose, Ectoin und Hydroxyectoin. Als Kontrolle wurde Urea verwendet, da dieses Molekül einerseits viele Gemeinsamkeiten mit kompatiblen Soluten hat (klein, organisch und in hohen Konzentrationen in Wasser löslich) andererseits aber bekannt ist, dass es eine destabilisierende Wirkung auf Proteine hat. Betain ist ein sehr universelles Solut und zudem in großen Mengen in den komplexen Mediumbestandteilen Hefeextrakt und Pepton enthalten und somit das hauptsächlich akkumulierte Solut von Zellen, die in solchen Medien angezogen werden. Da Pleitner *et al.* für die Anzucht ihrer Zellen Komplexmedium verwendet haben, konnten sie in ihren Zellen entsprechend hohe Konzentrationen von Betain nachweisen (Pleitner *et al.*, 2012). Der Zucker Trehalose ist das natürliche Solut von *E. coli* und wurde aus diesem Grund in die Analysen mit einbezogen. Zum Vergleich wurde hier Saccharose ausgewählt, ein Solut das eigentlich eher bei Pflanzen verbreitet ist. Neben Betain und den beiden Zuckern wurden auch die beiden natürlichen kompatiblen Solute von *H. elongata*, Ectoin und Hydroxyectoin, untersucht. *E. coli* ist in der Lage, bis auf Trehalose (Louis *et al.*, 1994), alle diese kompatiblen Solute über spezialisierte Transportsysteme aufzunehmen und intrazellulär zu akkumulieren. Für *Halomonas elongata* ist die Aufnahme von Betain, Ectoin und Hydroxyectoin ebenfalls bekannt. Die Aufnahme von Trehalose und Saccharose konnte für *H. elongata* durch Wachstumsversuche mit diesen beiden Zuckern als einziger C-Quelle ebenfalls gezeigt werden (siehe Anhang). Im Folgenden werden zunächst die Effekte der ausgewählten kompatiblen Solute auf Ribosomen aus *E. coli* und anschließend aus *H. elongata* gezeigt. Da hier erstmals die Wirkung kompatibler Solute auf Biomoleküle untersucht

wird, die auch tatsächlich aus den jeweiligen Organismen aufgereinigt wurden, stellte sich die Frage, ob es eine gezielte Wirkung der Solute auf die Zielmoleküle gibt oder ob die Wirkung auf die Ribosomen beider Spezies gleich ist und die Solute auf den Protein-Nukleinsäurekomplex an sich wirken.

3.2.5 Effekt kompatibler Solute auf die Thermostabilität isolierter Ribosomen aus *Escherichia coli* K12

Zunächst wurden die Effekte kompatibler Solute auf Ribosomen aus *E. coli* untersucht, da für die Ribosomen aus diesem Organismus bereits einige wenige kalorimetrische Daten, jedoch ohne kompatible Solute, vorlagen. Exemplarisch werden hier zunächst die Daten und damit die Effekte, die mit unterschiedlichen Saccharose- und Hydroxyectoinkonzentrationen erzielt wurden, dargestellt. Die Ribosomen wurden stets erst kurz vor der Messung mit den Soluten versetzt.

Saccharose

Für die Analyse wurde Saccharose in Endkonzentrationen zwischen 0,25 M und 1,75 M in die Messungen eingesetzt.

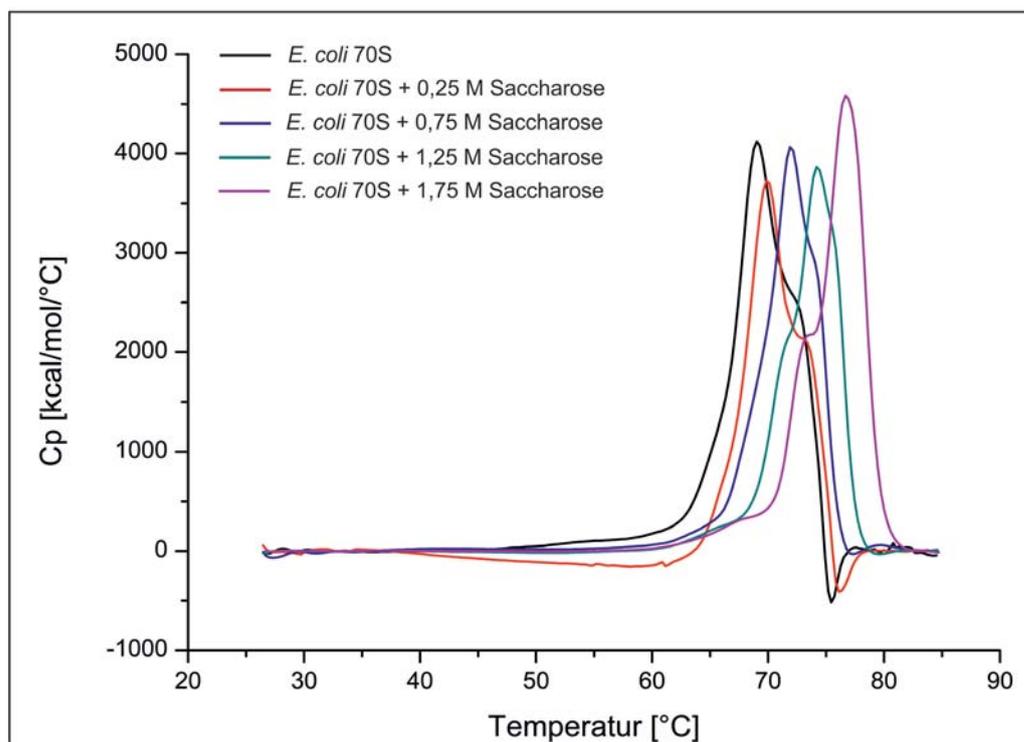


Abbildung 27: Effekt unterschiedlicher Konzentrationen Saccharose auf die Thermostabilität aufgereinigter Ribosomen aus *E. coli*

Für die kalorimetrischen Messungen wurden 1 μ M aufgereinigte *E. coli*-Ribosomen mit unterschiedlichen Konzentrationen Saccharose versetzt. Gezeigt ist hier ein Vergleich der Messung ohne Saccharose (schwarz) mit Messungen mit 0,25 M (rot), 0,75 M (blau), 1,25 M (türkis) und 1,75 M Saccharose (lila).

Die Zugabe von Saccharose zu den Ribosomen führt, wie in Abbildung 27 deutlich wird, zur Verschiebung der Peaks zu höheren Temperaturen. Lediglich vier der analysierten Konzentrationen sind hier gezeigt, da die Kurven ansonsten nur noch schwer voneinander zu unterscheiden sind. Es zeigt sich, dass der erste Peak, der bei der Messung ohne Solute zunächst nur schwer zu sehen ist, mit steigender Saccharosekonzentration immer deutlicher hervortritt. Der dritte Peak hingegen verschiebt sich weniger und ist bei der höchsten Konzentration von 1,75 M kaum noch zu sehen ist. Auch diese Daten wurden in eine Kurvenanpassung nach Gauß eingesetzt. Tabelle 17 gibt die dabei ermittelten Schmelzpunkte sowie die Fläche unter dem Gesamtpeak wieder.

Tabelle 17: Schmelztemperaturen der einzelnen Peaks bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen Saccharose zu aufgereinigten Ribosomen aus *E. coli*

Die Schmelztemperaturen wurden mit Hilfe von Kurvenanpassungen nach Gauß aus den DSC-Messungen bestimmt. Dazu wurde die Saccharose in Endkonzentrationen zwischen 0,25 M und 1,75 M in die Messungen mit jeweils 1 µM aufgereinigten, kruden Ribosomen eingesetzt. Die angegebenen Fehler der Schmelzpunkte sind die vom Programm ausgegebenen Fehler der Kurvenanpassung. Die Gesamtfläche unter dem Peak wurde durch Integration der Kurve bestimmt.

Endkonzentration Saccharose [M]	30S	50S	3. Peak	Gesamtfläche unter dem Peak (ΔH_{cal})
0,25	66,3 ± 0,36	70,0 ± 0,04	73,5 ± 0,06	20426
0,5	69,7 ± 0,15	71,1 ± 0,03	73,8 ± 0,04	22743
0,75	70,3 ± 0,15	72,2 ± 0,04	74,4 ± 0,04	22691
1,0	72,1 ± 0,05	73,3 ± 0,07	75,1 ± 0,06	25526
1,25	72,8 ± 0,07	74,2 ± 0,08	75,8 ± 0,08	21475
1,5	73,6 ± 0,10	75,1 ± 0,10	76,5 ± 0,10	19726
1,75	74,6 ± 0,12	76,1 ± 0,13	77,4 ± 0,16	25325

Auch in der Kurvenanpassung zeigt sich, was die kalorimetrischen Messungen bereits vermuten ließen. Die Schmelztemperaturen T_m der jeweiligen Ribosomenkomponenten verschieben sich durch die Zugabe von Saccharose zu deutlich höheren Temperaturen. Insbesondere der 30S-Peak zeigt mit einer Schmelzpunktsteigerung von 66,3 °C auf 74,6 °C den stabilisierenden Einfluss der Saccharose. Die Fläche unter dem Peak hingegen verändert sich nur geringfügig. Diese Schwankungen liegen im Bereich des Fehlers.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden diese Daten in ein Balkendiagramm (vgl. Abbildung 28) übertragen. Die Schmelztemperaturen der drei Peaks sind auf der linken Y-Achse, der Flächeninhalt des Gesamtpeaks auf der rechten Y-Achse aufgetragen.

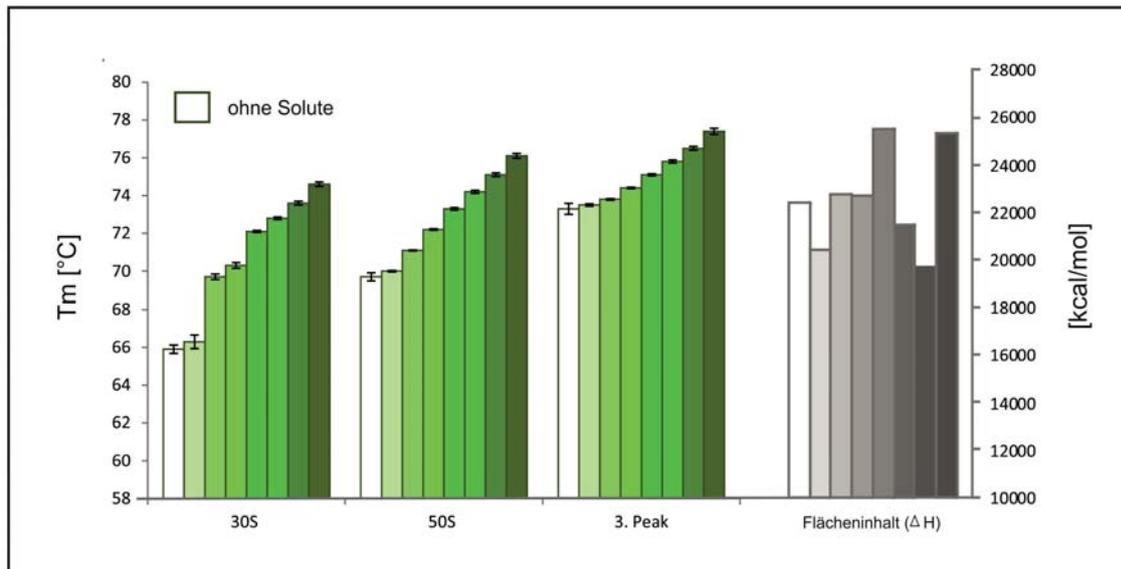


Abbildung 28: Schmelzpunkte der drei Denaturierungsreaktionen von *E. coli* K12-Ribosomen mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen

Die in Abbildung 27 gezeigten kalorimetrischen Messungen an aufgereinigten Ribosomen von *E. coli* wurden mit Hilfe der Kurvenanpassung nach Gauß analysiert. Die Schmelzpunkte der Peaks sind hier aufgetragen (linke Y-Achse). Zusätzlich sind die Flächen unter dem Peak (ΔH) dargestellt (rechte Y-Achse). Die Messungen wurden mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen von 0,25 M bis 1,75 M durchgeführt. Der jeweils erste grüne Balken steht für 0,25 M Saccharose, danach steigert sich die Saccharosekonzentration in 0,25 M-Schritten je Balken. Die angegebenen Fehler sind die vom Programm ausgegebenen Fehler der Kurvenanpassung. Die Gesamtfläche unter dem Peak wurde durch Integration des Gesamtpeaks bestimmt.

Hydroxyectoin

Das natürliche Solut von *H. elongata* wurde für die kalorimetrischen Messungen an aufgereinigten kruden *E. coli*-Ribosomen, genau wie Saccharose, in Endkonzentrationen zwischen 0,25 M bis 1,75 M eingesetzt.

Aus Abbildung 29 wird ersichtlich, dass die Erhöhung der Hydroxyectoinkonzentration, anders als die Steigerung der Saccharosekonzentration, zu einer Steigerung des Maximums des Hauptpeaks führt. Während die Messung ohne Solute ein Maximum bei etwa 4000 kcal/mol/°C aufweist, steigt das Maximum mit 1,75 M Hydroxyectoin auf über 8000 kcal/mol/°C. Zudem sind die Schultern der Signale mit steigender Konzentration immer schlechter zu erkennen. Eine Verschiebung der Signale zu höheren Temperaturen, wie in Abbildung 27 mit Saccharose gezeigt, ist hier nicht erkennbar.

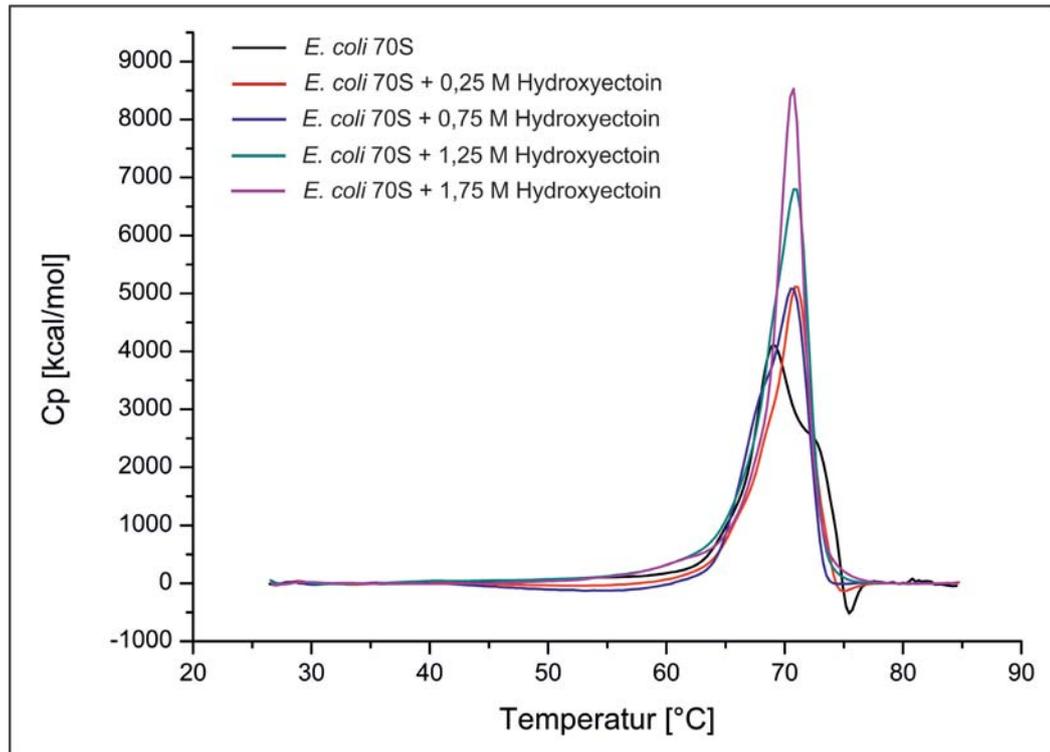


Abbildung 29: Effekt steigender Hydroxyectoinkonzentrationen auf die Thermostabilität aufgereinigter Ribosomen aus *E. coli*

Für die kalorimetrischen Messungen wurden $1\ \mu\text{M}$ aufgereinigte *E. coli*-Ribosomen mit unterschiedlichen Konzentrationen Hydroxyectoin versetzt. Gezeigt ist hier ein Vergleich der Messung ohne Hydroxyectoin (schwarz) mit Messungen mit 0,25 M (rot), 0,75 M (blau), 1,25 M (türkis) und 1,75 M Hydroxyectoin (lila).

Anschließend wurden die Messdaten wieder mit Hilfe der Gauß-Anpassung analysiert. Die dabei ermittelten Schmelzpunkte und Flächeninhalte sind in Tabelle 18 gezeigt. Wiederum wird deutlich, dass der Peak der 30S-Denaturierung nur schwer zu bestimmen ist. Hier schwankt der Wert stark. Die Schmelzpunkte der anderen Signale jedoch sind gut bestimmbar, wie die angegebenen Fehler der Kurvenanpassung zeigen. Bei Betrachtung des Flächeninhalts unter dem Gesamtpeak fällt wiederum, wie bereits in Abbildung 29 vermutet, eine Steigerung der zur Denaturierung der Ribosomen aufgenommenen Energie auf. Die Enthalpie (ΔH) der Reaktion liegt ohne zugesetzte Solute bei etwa 24000 kcal/mol und steigt bei der Zugabe von 1,5 M Hydroxyectoin auf ein Maximum von etwa 38000 kcal/mol.

Tabelle 18: Schmelztemperaturen aufgereinigter *E. coli*-Ribosomen unter Zusatz verschiedener Hydroxyectoinkonzentrationen

Die gezeigten Schmelztemperaturen wurden mit Hilfe von Kurvenanpassungen nach Gauß aus den DSC-Messungen ermittelt. In die Messungen mit 1 μ M aufgereinigten *E. coli*-Ribosomen wurde Hydroxyectoin in Endkonzentrationen zwischen 0,25 M bis 1,75 M eingesetzt. Die angegebenen Fehler der Schmelzpunkte sind die vom Programm ausgegebenen Fehler der Kurvenanpassung. Zur Bestimmung der Gesamt-Fläche wurde die Kurve integriert. n.d. = not determined: aufgrund großen Fehlers nicht betrachtet.

Endkonzentration Hydroxyectoin [M]	30S	50S	3. Peak	Gesamtfläche unter dem Peak (ΔH_{cal})
0,25	67,5 \pm 0,36	68,5 \pm 0,8	71,1 \pm 0,05	24163
0,5	64,3 \pm 2,36	68,4 \pm 0,13	71,0 \pm 0,05	26984
0,75	n.d	68,6 \pm 0,27	71,0 \pm 0,05	25938
1,0	63,4 \pm 1,08	68,8 \pm 0,25	71,3 \pm 0,02	30443
1,25	66,3 \pm 0,39	69,6 \pm 0,14	71,2 \pm 0,07	34182
1,5	64,6 \pm 0,35	69,1 \pm 0,15	70,9 \pm 0,01	38428
1,75	65,1 \pm 0,26	69,7 \pm 0,03	70,7 \pm 0,01	33718

Diese Daten wurden ebenfalls in einem Balkendiagramm aufgetragen:

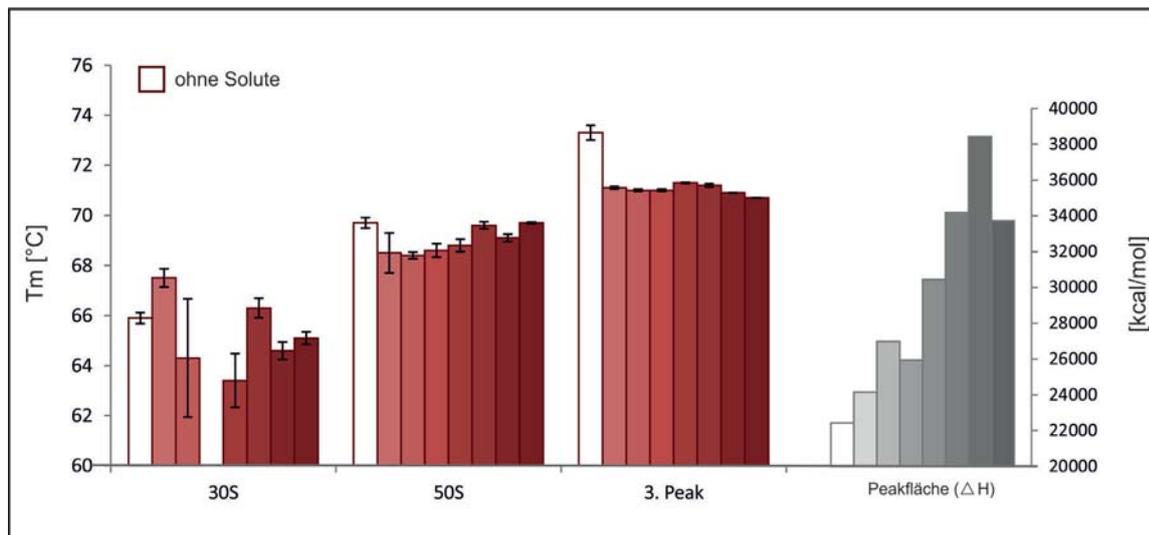


Abbildung 30: Grafische Darstellung der Schmelzpunkte der drei Denaturierungsreaktionen von *E. coli*-Ribosomen mit unterschiedlichen Hydroxyectoin-Konzentrationen

Die in Abbildung 29 gezeigten kalorimetrischen Messungen an *E. coli*-Ribosomen wurden mit Hilfe der Kurvenanpassung nach Gauß analysiert. Hier sind die ermittelten Schmelzpunkte der Peaks (linke Y-Achse) sowie die Gesamtflächen der Peaks (ΔH , rechte Y-Achse) aufgetragen. Die Messungen wurden mit Hydroxyectoin-Konzentrationen zwischen 0,25 M und 1,75 M durchgeführt. Der jeweils erste rote Balken steht für 0,25 M Hydroxyectoin, danach steigert sich die Konzentrationen in 0,25 M-Schritten je Balken. Die angegebenen Fehler sind die vom Programm ausgegebenen Fehler der Kurvenanpassung. Die Gesamtfläche unter dem Peak wurde durch Integration des Gesamtpeaks bestimmt

Die Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit zeigt bei steigender Hydroxyectoin-Konzentration kein einheitliches Bild. Die Daten lassen keine Aussage über den Einfluss auf die Schmelztemperatur zu. Hingegen zeigen die Peaks der 50S-Untereinheit und des dritten Peaks eine klare Tendenz. Bereits die Zugabe von lediglich 0,25 M Hydroxyectoin zu den Ribosomen resultiert in einer Schmelzpunktsenkung um etwa 1 °C bei der 50S-Untereinheit und sogar über 2 °C beim 3. Peak. Durch die weitere Zugabe von Hydroxyectoin steigt, zumindest bei der 50S-Untereinheit, die Schmelztemperatur jedoch wieder auf den Ausgangswert an (bei 1,75 M). Hingegen sinkt sie beim 3. Peak noch weiter ab.

Neben den Schmelztemperaturen zeigt die Abbildung aber auch den Flächeninhalt des Peaks. Anders als bei den Messungen mit Saccharose steigt die Energiemenge, die zur Denaturierung der Ribosomen gebraucht wird mit steigender Hydroxyectoin-Konzentration immer weiter an und erreicht bei 1,5 M ein Maximum. Hydroxyectoin scheint also die Temperatur der Denaturierung mit steigender Konzentration nur noch geringfügig zu beeinflussen, hat dafür aber offensichtlich einen großen Einfluss auf die gesamte Energiemenge, die während der Denaturierung gebraucht wird.

Mit Saccharose und Hydroxyectoin wurden hier die beiden verschiedenen Effekte dargestellt, die die analysierten Solute auf die Ribosomen von *E. coli* K12 gezeigt haben. Die Daten der weiteren analysierten Solute, Trehalose, Betain und Ectoin, sowie der Einfluss von Urea sind im Folgenden zur besseren Übersichtlichkeit nur noch in einem großen Balkendiagramm dargestellt (siehe Abbildung 31). Die zugehörigen Daten sind im Anhang in Tabelle 19 aufgeführt. Damit der Einfluss der Moleküle auf die aufgereinigten Ribosomen deutlich wird, sind in diesem Diagramm die Differenzen der Schmelztemperaturen dargestellt. Die Schmelztemperatur ohne Solute wurde von der Schmelztemperatur mit Solut subtrahiert. Ein positiver Wert steht damit für eine Steigerung der Schmelztemperatur durch Solutzugabe, ein negativer Wert für die Senkung der Schmelztemperatur.

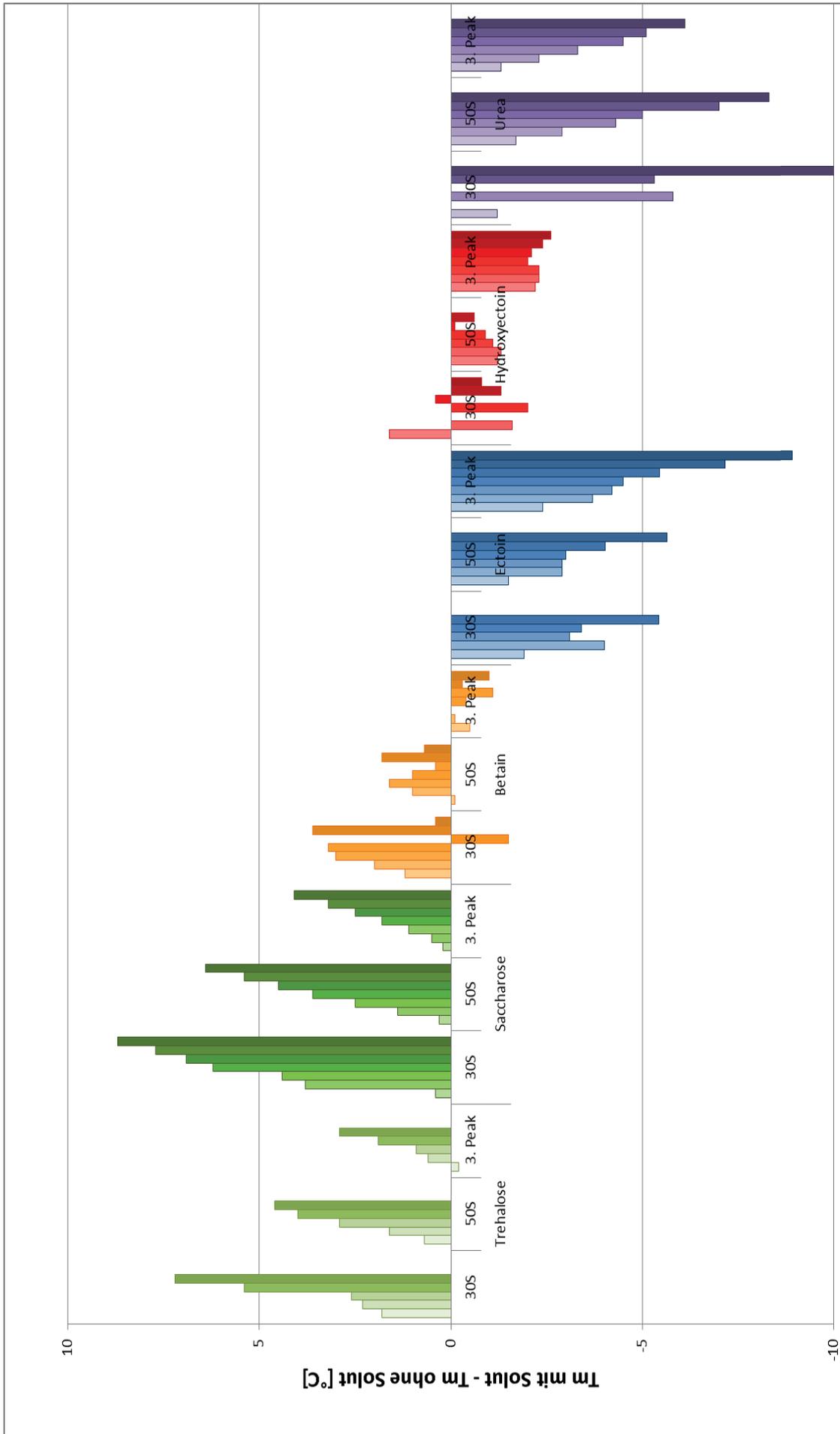


Abbildung 31: Differenzen der Schmelztemperaturen der einzelnen Denaturierungsereignisse mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten

Dargestellt sind die Differenzen in den Schmelztemperaturen der drei jeweiligen Denaturierungsereignisse während der DSC-Messung aufgereinigter Ribosomen aus *E. coli* mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten in ansteigenden Konzentrationen. Der Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,25 M bis 1,75 M. Der jeweils erste Wert einer Gruppe bezeichnet den Temperaturunterschied bei einer Solutendkonzentration von 0,25 M. Danach steigt mit jedem weiteren gezeigten Wert die eingesetzte Konzentration um weitere 0,25 M. Trehalose wurde lediglich bis zu einer Endkonzentration von 1,25 M analysiert.

Trehalose

Ähnlich wie Saccharose zeigt auch das zweite untersuchte Disaccharid, Trehalose, eine stabilisierende Wirkung auf die Ribosomen. Mit dem natürlichen kompatiblen Solut von *E. coli* konnten Temperaturunterschiede in den Schmelzpunkten von mehr als 5 °C beobachtet werden. Aufgrund der geringeren Löslichkeit von Trehalose konnten die Messungen jedoch nur bis zu einer maximalen Konzentration von 1,25 M durchgeführt werden. Zwar zeigte sich in den Kurvenanpassungen wiederum die Schwierigkeit der Anpassung des 30S-Peaks, die Tendenz des Temperaturanstiegs zeigt sich trotzdem sehr klar. Bei den Peakflächen zeigte sich keine eindeutige Tendenz. Die Enthalpie der Reaktion wird offensichtlich nicht beeinflusst.

Betain

Als nächstes wurde der Einfluss des kompatiblen Soluts Betain auf die Thermostabilität der Ribosomen untersucht. Zum Vergleich mit Pleitner *et al.* (Pleitner *et al.*, 2012), die die Zellen in Komplexmedium angezogen hatten, wurde hier auch der Effekt dieses kompatiblen Soluts auf isolierte Ribosomen aus *E. coli* analysiert. Betain ist sehr gut löslich und konnte in Konzentrationen von 0,25 M bis 1,75 M (Endkonzentration, 0,25 M-Schritte) in die DSC-Messungen mit Ribosomen eingesetzt werden. Im Vergleich zu den beiden bisher analysierten Zuckern besitzt Betain keine freien Hydroxylgruppen.

Es wird deutlich, dass Betain die Schmelztemperatur T_m der einzelnen Peaks der Ribosomen beeinflusst. Allerdings zeigte sich hier sehr deutlich die Schwierigkeit die Schmelztemperatur des 30S-Peaks zu bestimmen. Die Schmelztemperatur der 30S- und 50S-Peaks steigt in allen Konzentrationen an. Die Schmelzpunktsenkung im 30S-Peak mit 1,25 M Betain ist vermutlich auf die Probleme der Kurvenanpassung des 30S-Peaks zurückzuführen. Dahingegen ist beim 3. Peak eindeutig die Senkung der Schmelztemperatur T_m zu beobachten. Bei allen untersuchten Konzentrationen liegt die T_m unter der T_m ohne Solute. Anders als auf die Schmelztemperaturen scheint Betain keinen Einfluss auf die Enthalpie (ΔH) der Denaturierung zu haben. Die Peakflächen verändern sich über den gesamten Konzentrationsbereich nur gering.

Ectoin

Ectoin ist ebenfalls, genau wie Hydroxyectoin, ein natürliches kompatibles Solut von *H. elongata*. Beide Solute können von *E. coli* unter Stressbedingungen über spezialisierte Transporter aufgenommen und im Cytoplasma akkumuliert werden (vgl. 1.1.2). Strukturell besteht der einzige Unterschied zwischen Ectoin und Hydroxyectoin in der Hydroxylgruppe am C₅-Atom des Rings. Trotz dieses nur geringen Unterschiedes konnte bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass die Wirkung von Ectoin

und Hydroxyectoin auf Proteine und DNA unterschiedlich ausgeprägt sein kann (Lippert und Galinski, 1992; Kurz, 2008).

Der Trend, den Ectoin auf die Stabilität der Ribosomen zeigt, ist eindeutiger als dies bei Hydroxyectoin der Fall ist. Ectoin senkt die Denaturierungstemperatur aller drei Reaktionen. Bereits bei 0,25 M Ectoin wird die Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit um fast 2 °C gesenkt. Zwar ist auch hier wieder, wie bereits bei den anderen gezeigten Datensätzen, die Bestimmung der Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit schwierig, aber diese destabilisierende Wirkung zeigt sich auch bei der Denaturierung der 50S-Untereinheit und dem 3. Peak. Wiederum ist jedoch keine Wirkung auf die Fläche unter dem Peak, also die Enthalpie der gesamten Denaturierungsreaktion, zu beobachten.

Urea

Als Kontrolle, ob die Änderung der Konzentration der freien Wassermoleküle in den bisher gezeigten DSC-Messungen einen Einfluss auf die Stabilität der Ribosomen nimmt, wurde im Folgenden Urea in den gleichen Konzentrationen eingesetzt und die Denaturierungstemperaturen bestimmt. Urea zählt nicht zu den kompatiblen Soluten, da es anders als kompatible Solute mit Makromolekülen interagiert.

Die Daten zeigen deutlich die erwartete destabilisierende Wirkung von Urea auf die aufgereinigten Ribosomen. Alle drei Denaturierungsreaktionen treten mit erhöhter Harnstoff-Konzentration bei geringeren Temperaturen auf. Mit 1,5 M Urea, der höchsten Konzentration bei der noch eine Kurvenanpassung möglich war, sinkt die Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit um etwa 11 °C. Auch die Schmelztemperaturen der beiden anderen Peaks sinken, etwa 8 °C bei der 50S-Untereinheit und immer noch mehr als 6 °C beim 3. Peak.

3.2.6 Effekt kompatibler Solute auf die Thermostabilität isolierter Ribosomen aus *Halomonas elongata* Wt

Zum Vergleich wurden im nächsten Schritt die aufgereinigten Ribosomen aus *H. elongata* mit den gleichen kompatiblen Soluten versetzt und wiederum die Auswirkungen auf die Thermostabilität untersucht. Diese Daten werden der Einfachheit halber im Folgenden lediglich als Balkendiagramm in Abbildung 32 dargestellt.

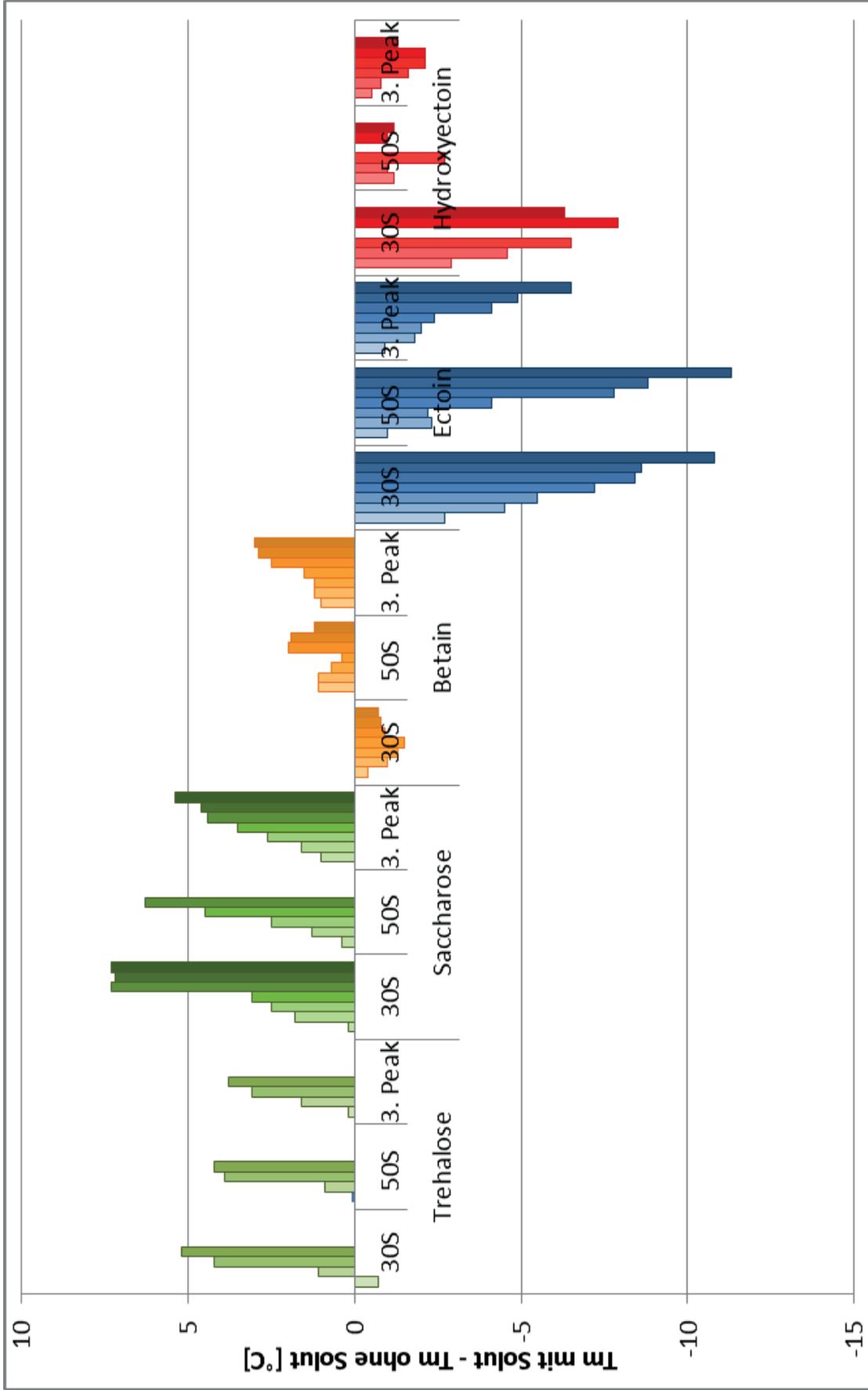


Abbildung 32: Differenzen der Schmelztemperaturen der einzelnen Denaturierungsereignisse an *H. elongata*-Ribosomen mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten

Dargestellt sind die Differenzen in den Schmelztemperaturen der drei jeweiligen Denaturierungsereignisse während der DSC-Messung aufgereinigter Ribosomen aus *H. elongata* mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten in ansteigenden Konzentrationen.

Bei den DSC-Messungen mit aufgereinigten *H. elongata*-Ribosomen fiel zunächst auf, dass die bei Messungen an sich deutlich ruhiger aussahen, sobald kompatible Solute zugegeben wurden. Alle Daten, die dem Diagramm in Abbildung 32 zugrunde liegen, sind im Anhang in Tabelle 20 aufgeführt.

Saccharose und Trehalose

Die beiden Disaccharide Saccharose und Trehalose zeigen beide, wie auch bereits bei den Ribosomen aus *E. coli* beobachtet, eine stabilisierende Wirkung auf die Ribosomen aus *H. elongata*.

Mit Trehalose steigert sich die Schmelztemperatur des 30S-Peaks zwar etwas weniger als bei den *E. coli*-Ribosomen, im Gegensatz dazu verschiebt sich jedoch der 3. Peak etwas mehr in Richtung höherer Temperaturen. Das gleiche Bild ergibt sich bei der Zugabe von Saccharose. Der 30S-Peak wird geringer stabilisiert als bei *E. coli*-Ribosomen, während der 3. Peak sich weiter verschiebt.

Anders als bei den Messungen mit *E. coli*-Ribosomen scheint jedoch die Zugabe der Zucker zu den *H. elongata*-Ribosomen auch eine Wirkung auf die Enthalpie der Reaktion zu haben. Wie aus Tabelle 20 im Anhang hervorgeht steigt, insbesondere mit Saccharose (auch weil hier ein weiterer Konzentrationsbereich untersucht werden konnte) die Peakfläche, also die Energie die während der Denaturierung der Ribosomen dem System entzogen wird. Bei Trehalose könnte man noch von einer Steigerung der Enthalpie im Rahmen des Fehlers ausgehen, bei Saccharose hingegen ist eindeutig eine Steigerung zu sehen. Bei der höchsten analysierten Konzentration von 1,75 M Saccharose beträgt die Energiemenge etwa 24000 kcal/mol Ribosomen, während ohne Saccharose im Schnitt 11000 kcal/mol während der Denaturierung gebraucht werden.

Betain

Das kompatible Solut Betain wird von *H. elongata* akkumuliert wenn es im Medium vorliegt. Studien in dem *H. elongata* nah verwandten Stamm *C. salexigens* zeigten zudem, dass daraufhin auch die Synthese der zelleigenen Solute Ectoin und Hydroxyectoin herabreguliert wird (Calderon *et al.*, 2004). Die Schmelztemperaturen der *H. elongata*-Ribosomen mit Betain zeigen ein eindeutigeres Bild als die Ribosomen von *E. coli*. Bei *Halomonas elongata* sinkt durch die Betainzugabe die Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit, während die Schmelztemperaturen der 50S-Untereinheit und des 3. Peaks steigen.

Ectoin

Die Zugabe von Ectoin zu den Ribosomen aus *H. elongata* führt zu einer konzentrationsabhängigen Senkung der Schmelztemperatur aller drei Denaturierungsreaktionen. Dabei werden die 30S- und 50S-Untereinheiten etwa gleich stark destabilisiert, die Denaturierungstemperatur des dritten Peaks sinkt zwar auch, jedoch nicht so stark wie die ersten beiden. Bei 1,75 M Ectoin ist eine maximale Senkung der Schmelztemperatur von etwa 12 °C bei der 50S-Untereinheit zu beobachten. Die Enthalpie der Reaktion (vgl. Tabelle 20) erhöht sich bei den höchsten getesteten Ectoinkonzentrationen leicht im Vergleich zu den Messungen ohne zugesetzte Solute.

Hydroxyectoin

Beim *H. elongata*-eigenen Solut Hydroxyectoin ist eindeutig die Tendenz der Destabilisierung der Ribosomen zu erkennen. Insbesondere die Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit wird mit maximal 8 °C (bei 1,5 M Hydroxyectoin) massiv gesenkt. Andererseits ist die Destabilisierung der beiden anderen Reaktionen nicht so stark und bewegt sich mit einer T_m -Senkung von etwa 2,5 °C in einem ähnlichen Bereich, wie es auch schon für *E. coli*-Ribosomen gezeigt wurde (vgl. Abbildung 31). Ebenfalls anders als bei den *E. coli*-Ribosomen ist, dass bei den *Halomonas elongata*-Ribosomen die Wirkung auf die Enthalpie der Reaktion nur sehr gering ist und innerhalb des Fehlers der Kurvenanpassung liegt.

3.2.7 Effekt von Salzen auf die Thermostabilität von Ribosomen

Die bisherigen Daten zeigen ein durchaus uneinheitliches Bild des Effekts der kompatiblen Solute auf die Thermostabilität der Ribosomen. Sowohl im Hinblick auf die Wirkung der Solute auf die isolierten Ribosomen als auch im Vergleich der beiden Organismen. Auch hier konnten Unterschiede der kompatiblen Solute auf die Protein-Nukleinsäurekomplexe beobachtet werden. In diesem Abschnitt soll zunächst der Effekt von Salzen auf die Thermostabilität der Ribosomen untersucht werden. Insbesondere bei *E. coli*, der keine hohe Salztoleranz aufweist, ist davon auszugehen, dass die Ribosomen in ihrem natürlichen Milieu nicht mit hohen Salzkonzentrationen in Berührung kommen. Anders könnte dies bei dem halophilen Organismus *H. elongata* sein. Die Zellen akkumulieren zwar kompatible Solute als Schutz gegen den Wasserverlust, bei schnellen Veränderungen der Osmolarität ist es aber auch vorstellbar, dass bei hohen Salinitäten zunächst Ionen ins Cytoplasma gelangen. Vermutlich werden diese durch spezialisierte Pumpen in der Membran hinterher wieder aus der Zelle

heraus transportiert. Die genaue Konzentration, die jedoch in den Zellen toleriert oder vielleicht sogar benötigt wird, ist jedoch noch nicht bekannt.

3.2.7.1 Schmelzpunkt ohne kompatible Solute

E. coli

Die Ribosomen von *E. coli* wurden mit steigenden Konzentrationen NaCl versetzt und im Kalorimeter die Thermostabilität untersucht.

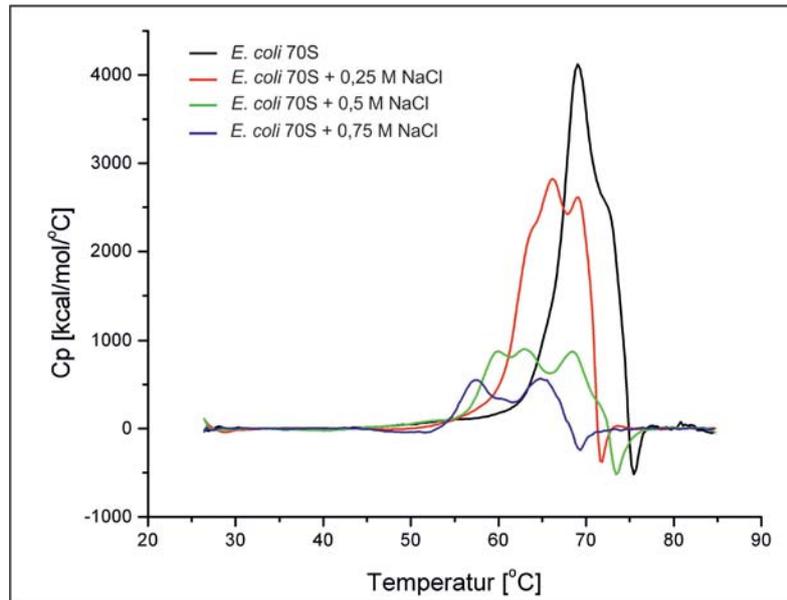


Abbildung 33: Effekt unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen auf die Thermostabilität aufgereinigter Ribosomen aus *E. coli*

Aufgereinigte Ribosomen aus *E. coli* K12 wurden vor der Messung im Kalorimeter mit verschiedenen Konzentrationen NaCl versetzt und anschließend die Thermostabilität bestimmt. Eingesetzt wurden 1 μ M Ribosomen und NaCl-Konzentrationen zwischen 0,25 M bis 0,75 M.

Die Messungen zeigen deutlich eine Destabilisierung der Ribosomen durch die Zugabe steigender Konzentrationen NaCl. Bereits 0,25 M NaCl (\cong 1,46 % (w/v)) verringern die Schmelztemperatur der drei Peaks enorm auf 64,4 °C (30S), 67,3 °C (50S) und 69,6 °C (3. Peak). Das entspricht jeweils einer Schmelzpunktsenkung um etwa 2 °C. Trotzdem sind in dieser Messung weiterhin drei distinkte Peaks zu erkennen. Die Messungen mit noch höheren NaCl-Konzentrationen sind dann jedoch nicht weiter auswertbar. Insgesamt ist durch die weitere Erhöhung der NaCl-Konzentration die weitere Senkung der Schmelztemperatur erkennbar. Auch sinkt die Fläche unter dem Peak deutlich, so dass hier auch auf Basis der Enthalpie die Destabilisierung der Ribosomen durch das zugesetzte NaCl offensichtlich wird.

H. elongata

Der gleiche Versuch wurde auch mit aufgereinigten Ribosomen von *H. elongata* durchgeführt. Offensichtlich reagieren die Ribosomen von *H. elongata* anders auf die Zugabe des Salzes als die Ribosomen von *E. coli*.

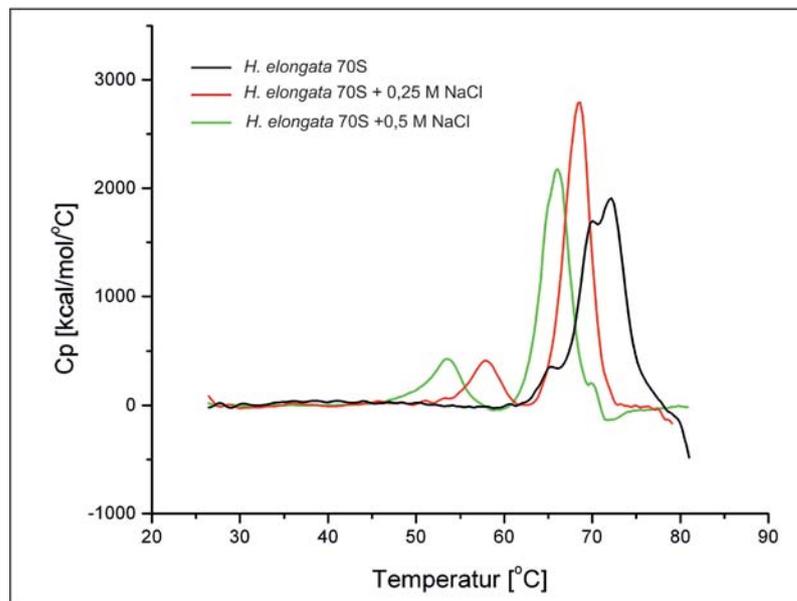


Abbildung 34: DSC-Messung an *H. elongata*-Ribosomen mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen

Aufgereinigte, krude 70S-Ribosomen (1 μ M) aus *H. elongata* (schwarz) wurden mit 0,25 M NaCl (rot) bzw. 0,5 M NaCl (grün) versetzt und anschließend der Effekt des Salzes auf die Thermostabilität der Ribosomen im Kalorimeter analysiert.

Eindeutig reduziert sich die Anzahl der Peaks von drei auf nur noch zwei. Die Schmelztemperaturen sinken auf 57,5 °C und 68,3 °C mit 0,25 M NaCl und sogar auf 53,4 °C und 65,8 °C mit 0,5 M NaCl. Um festzustellen welche Komponente welchen Peak verursacht wurde eine weitere Messung mit 0,25 M NaCl durchgeführt und nach dem ersten Peak abgestoppt. Wie bereits unter 3.3.1 erläutert wurde die Probe abzentrifugiert und die denaturierte sowie die native Fraktion mit einer SDS-PAGE analysiert.

Die SDS-PAGE zeigt ein unterschiedliches Bandenmuster für die beiden Fraktionen. In der ersten Fraktion (denaturiert) ist eindeutig ein Protein etwas unterhalb der 75 kDa Bande zu erkennen. Dieses Protein fehlt bei der nativen Fraktion. Auch die beiden Bandenmuster sprechen dafür, dass es sich bei der denaturierten Fraktion um die Proteine der 30S-Untereinheit, bei der nativen Fraktion um die Proteine der 50S-Fraktion handelt. Einen guten Vergleich, wie das Bandenmuster von ribosomalen Proteinen aussieht bietet die Publikation von Sun *et al.* (Sun *et al.*, 1972). Dort sind die

ribosomalen Proteine verschiedener Zellen in SDS-PAGEs analysiert. Wie später beschrieben (vgl. Abschnitt 3.8) kann das Bandenmuster von *H. elongata* gut mit dem Bandenmuster von *E. coli* verglichen werden.

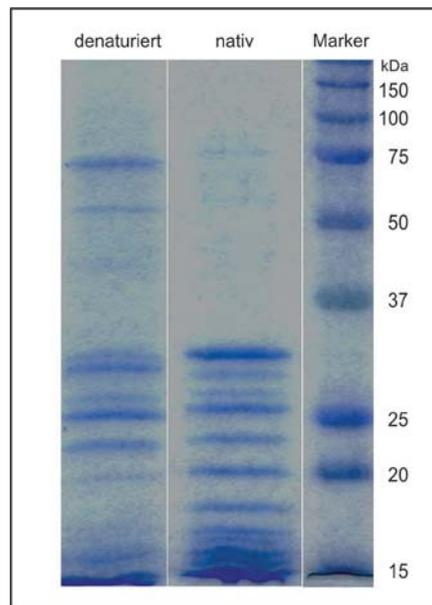


Abbildung 35: SDS-PAGE zur Analyse der denaturierten und nativen Fraktion nach Upscan mit 0,25 M NaCl

H. elongata-Ribosomen wurden mit 0,25 M NaCl versetzt und die Messung nach dem ersten Peak bei 61 °C abgebrochen. Die Probe wurde abzentrifugiert und das Pellet in 1 %iger SDS-Lösung resuspendiert. Im Pellet befanden sich die Proteine, die während der Erwärmung auf maximal 61,0 °C denaturiert sind und somit den ersten Peak verursachten. In der nativen Fraktion, also dem Überstand nach der Zentrifugation befinden sich die Proteine, die noch im nativen Zustand vorliegen.

Wie aus Abbildung 35 hervorgeht scheint NaCl also, die *H. elongata*-Ribosomen, im Vergleich zu den *E. coli*-Ribosomen anders zu destabilisieren, so dass nur noch die einzelnen Untereinheiten vorliegen. Da vermutet wird, dass in den Zellen von *H. elongata* jedoch physiologisch eher K^+ vorkommt wurde auch die Reaktion der *H. elongata* Ribosomen auf KCl hin untersucht.

Bei der Zugabe von KCl zu *H. elongata*-Ribosomen zeigt sich das gleiche Bild wie bereits bei der Zugabe von NaCl (siehe Abbildung 36). Wiederum treten zwei distinkte Peaks auf, deren Schmelztemperatur mit zunehmender KCl-Konzentration immer weiter sinkt. Interessanterweise sinkt die Denaturierungstemperatur der Ribosomen mit KCl nicht so stark ab wie mit NaCl. Die Schmelztemperaturen liegen mit 0,25 M KCl immer noch bei 59,4 °C und 71,2 °C und sinken mit 0,5 M KCl auf 56,3 °C und 69,5 °C. Auch mit KCl wurden Messungen durchgeführt, die nach dem ersten Peak abgestoppt wurden. Die SDS-PAGE (hier nicht gezeigt) zeigte das gleiche Bild wie die der NaCl-Probe (vgl.

Abbildung 35). Beide Salze zeigen also einen viel stärkeren Effekt auf die Schmelztemperatur des ersten Peaks als auf den zweiten Peak.

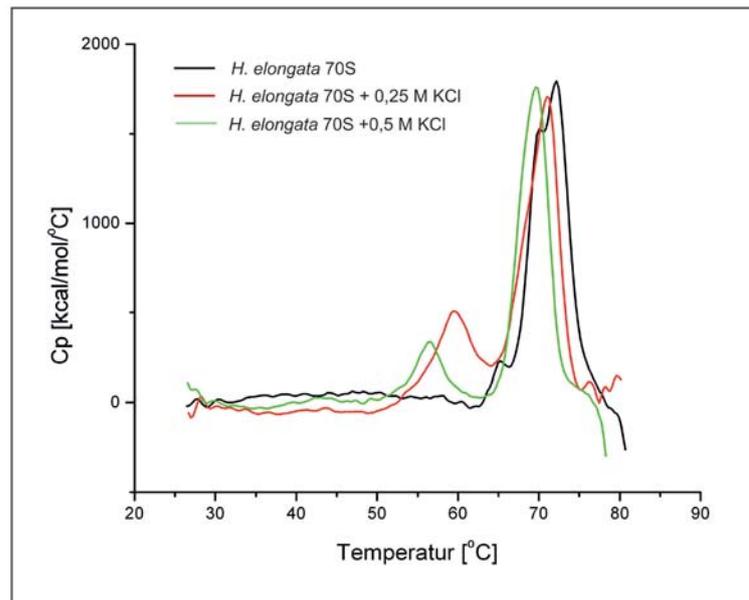


Abbildung 36: Thermostabilität aufgereinigter 70S-Ribosomen aus *H. elongata* unter KCl-Einfluss

Aufgereinigte, krude 70S-Ribosomen (1 μM) aus *H. elongata* (schwarz) wurden mit 0,25 M KCl (rot) bzw. 0,5 M KCl (grün) versetzt und der Effekt des Salzes auf die Thermostabilität der Ribosomen anschließend im Kalorimeter analysiert.

Insgesamt konnte sowohl für die Ribosomen von *E. coli* als auch von *H. elongata* gezeigt werden, dass die getesteten Salze eine destabilisierende Wirkung auf den Protein-Nukleinsäure-Komplex zeigten. Dabei sind die Effekte auf die *E. coli*-Ribosomen jedoch grundsätzlich verschieden von den Effekten auf Ribosomen des halophilen Organismus *H. elongata*.

3.2.7.2 Schmelzpunkt mit kompatiblen Soluten

Um die Wirkung kompatibler Solute weiter zu untersuchen wurden die aufgereinigten Ribosomen mit NaCl versetzt. Zusätzlich wurden in diesen Messungen kompatible Solute zugesetzt und der Effekt der Solute auf die durch die Salze destabilisierten Ribosomen im Kalorimeter untersucht.

E. coli K12

Zunächst werden wieder die Effekte auf *E. coli*-Ribosomen betrachtet. Dafür wurden die beiden Solute Saccharose und Hydroxyectoin ausgewählt, da diese bereits in den vorangegangenen Messungen ohne NaCl den anschaulichsten Effekt (vgl. 3.2.2) auf das Denaturierungsverhalten der Ribosomen zeigten.

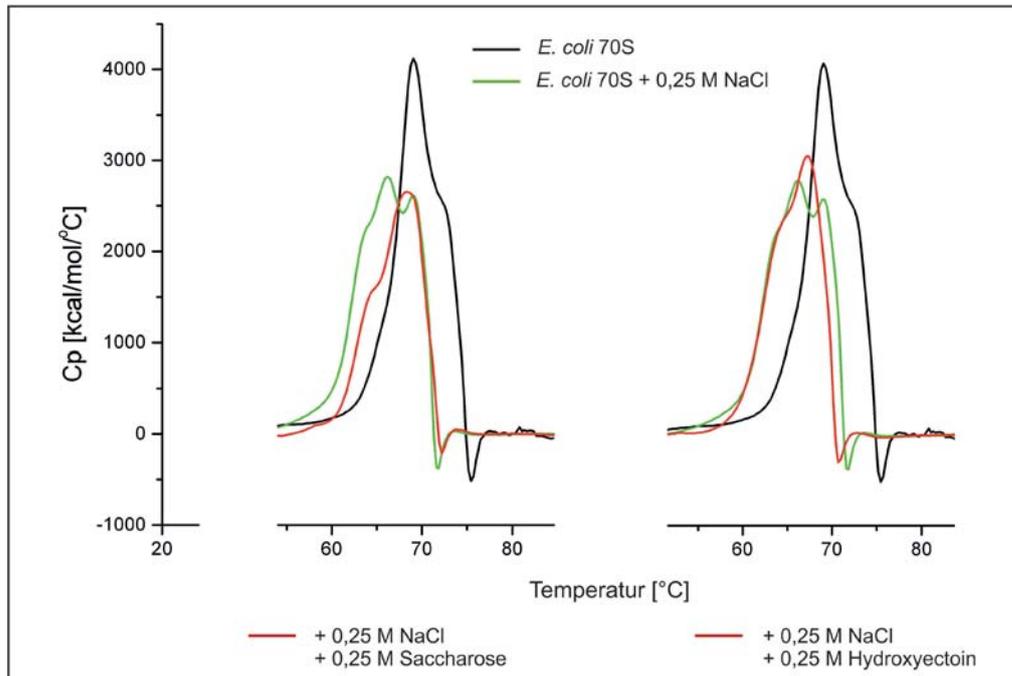


Abbildung 37: Effekt von kompatiblen Soluten auf die Thermostabilität NaCl-gestresster Ribosomen aus *E. coli* K12

Gezeigt ist der Vergleich der DSC-Messungen an kruden, aufgereinigten Ribosomen von *E. coli* ohne Zusätze (schwarz), mit 0,25 M NaCl (grün) und der Kombination aus 0,25 M NaCl und 0,25 M Saccharose (rot, links) beziehungsweise 0,25 M NaCl und 0,25 M Hydroxyectoin (rot, rechts).

Abbildung 37 (links) zeigt, dass durch die Zugabe von Saccharose der Gesamtpeak zu höheren Temperaturen verschoben wird. Die Schmelztemperaturen der drei Peaks verschieben sich um bis zu $0,8^\circ\text{C}$ (50S-Peak auf $68,1^\circ\text{C}$). Dabei sinkt allerdings die Enthalpie ΔH_{cal} der Reaktion von etwa 23000 kcal/mol auf nur noch 17000 kcal/mol . Durch die Zugabe von Hydroxyectoin zu den NaCl-gestressten Ribosomen (siehe Abbildung 37, rechts) wird eine weitere Senkung des Schmelzpunktes deutlich. Hier zeigt sich wiederum die destabilisierende Wirkung von Hydroxyectoin. Anders als bei Saccharose steigt die Enthalpie der Reaktion leicht an.

Beide Solute zeigen in Bezug auf den Einfluss auf die Denaturierungstemperatur den gleichen Effekt wie auch schon ohne NaCl (vgl. Abbildung 28 und Abbildung 30). Ist NaCl jedoch vorhanden, so ändern sich die Einflüsse der beiden getesteten Solute auf die Enthalpien der Reaktionen. Während Saccharose ohne NaCl keinen Einfluss auf die Enthalpie zeigte, reduziert sich mit NaCl die zur Denaturierung benötigte Energie deutlich. Bei Hydroxyectoin wurde ohne NaCl eine Steigerung der Enthalpie beobachtet, dies ist mit NaCl ebenfalls nicht der Fall. Zwar ist der Effekt geringer als bei Saccharose, trotzdem sinkt die Enthalpie auf etwa 21000 kcal/mol .

Um zu testen, ob höhere Konzentrationen Hydroxyectoin die Enthalpie der Reaktion wieder steigern können, wurden die Ribosomen wiederum mit 0,25 M NaCl und dieses

Mal mit 1,5 M Hydroxyectoin versetzt. Mit 1,5 M Hydroxyectoin konnte in den Messungen ohne Solute die höchste Enthalpie nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30).

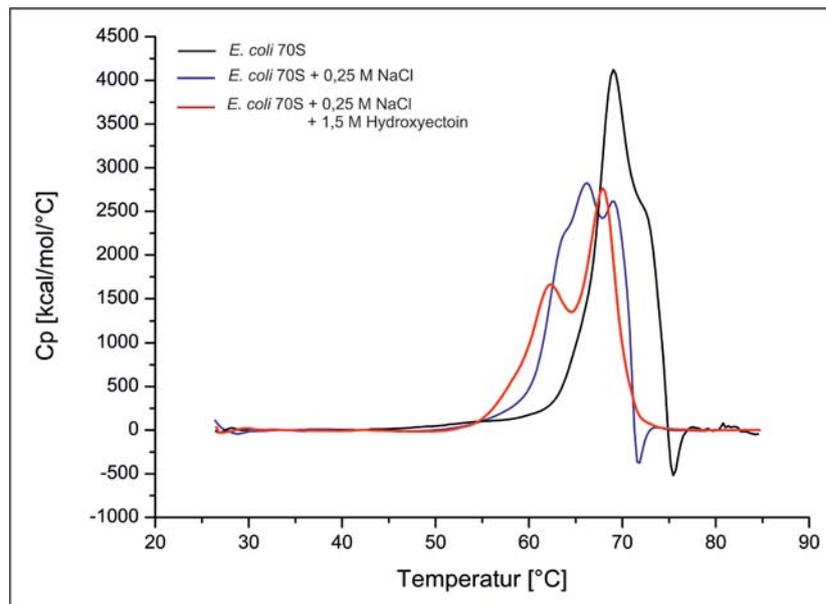


Abbildung 38: Einfluss von 1,5 M Hydroxyectoin auf NaCl-gestresste *E. coli* K12-Ribosomen

Gezeigt ist ein Vergleich der DSC-Messungen von aufgereinigten, kruden 70S-Ribosomen aus *E. coli* K12 ohne Solute (schwarz), mit 0,25 M NaCl (blau) und der Messung mit 0,25 M NaCl in Kombination mit 1,5 M Hydroxyectoin (rot).

Mit 1,5 M Hydroxyectoin zeigt sich eine zusätzlich destabilisierende Wirkung auf die Thermostabilität der Ribosomen. Die Schmelztemperatur der einzelnen ribosomalen Untereinheiten wird deutlich weiter gesenkt. Die Schmelzpunkte der Peaks liegen bei 57,7 °C, 62,5 °C und 67,9 °C. Damit sinkt die Schmelztemperatur des ersten Peaks durch die Zugabe dieser hohen Konzentration Hydroxyectoin um mehr als 8 °C im Vergleich zu den Schmelztemperaturen die mit Ribosomen ohne Solute erreicht wurden.

Beide Solute zeigen, trotz der Anwesenheit von NaCl und der somit weiteren Veränderung der Lösungsmiteleigenschaften, die gleichen Effekte auf die Denaturierungstemperatur der Ribosomen wie bereits in Abschnitt 3.4.1 gezeigt. Die Steigerung der Enthalpie durch die höhere Hydroxyectoinkonzentration wurde hingegen in Kombination mit NaCl nicht beobachtet.

H. elongata Wt

Zum Vergleich wurden die gleichen Bedingungen auch auf die Ribosomen von *H. elongata* angewendet. Dabei ist interessant zu untersuchen, ob sich das Denaturierungsverhalten durch die Solutzugabe wieder dem ursprünglichen Verlauf annähert.

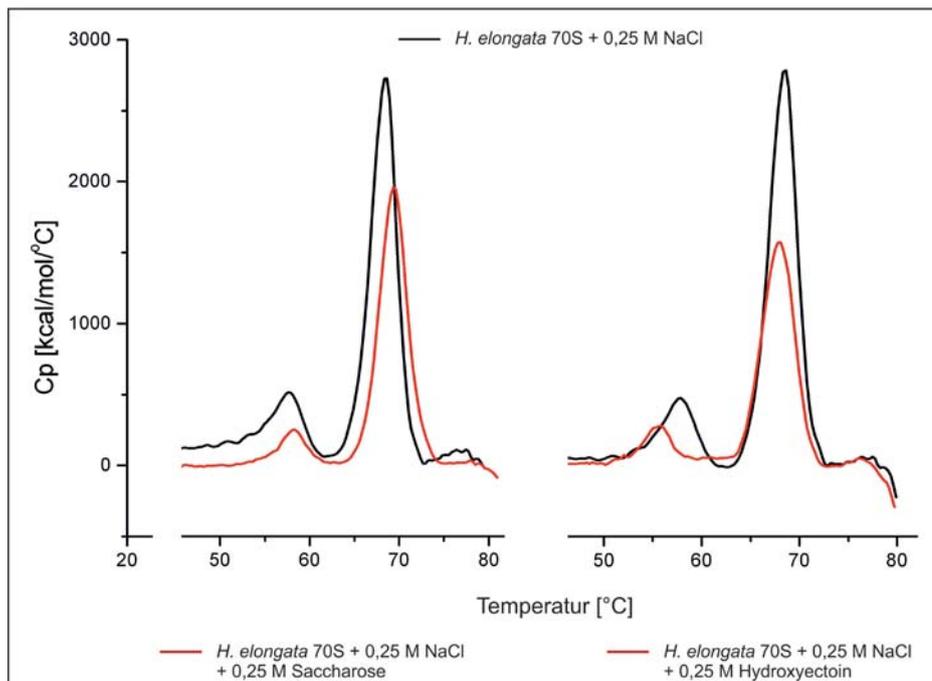


Abbildung 39: Effekt kompatibler Solute auf die Thermostabilität NaCl-gestresster Ribosomen aus *H. elongata* Wt

Gezeigt ist der Vergleich der DSC-Messungen an kruden *H. elongata*-Ribosomen mit 0,25 M NaCl (schwarz) und der Kombination aus 0,25 M NaCl mit 0,25 M Saccharose (rot, links) bzw. 0,25 M NaCl mit 0,25 M Hydroxyectoin (rot, rechts).

Genau wie bei den Messungen ohne NaCl zeigt auch die Messung mit NaCl in Kombination mit Saccharose einen Anstieg der Schmelztemperaturen der Peaks. Die Denaturierungstemperatur des ersten Peaks steigt von 57,7 °C (mit 0,25 M NaCl) auf 58,3 °C (0,25 M NaCl + 0,25 M Saccharose), die des zweiten Peaks verschiebt sich von 68,4 °C (mit 0,25 NaCl) auf 69,4 °C (0,25 M NaCl + 0,25 M Saccharose). Die Zugabe von Hydroxyectoin hingegen senkt die Schmelztemperaturen noch weiter auf 55,4 °C und 67,9 °C. Wiederum zeigen beide Solute hier die gleiche Tendenz wie bereits bei den Messungen ohne NaCl. Neben den Schmelztemperaturen zeigen die beiden Messungen aber auch, dass sich auch durch Zugabe der Solute das Denaturierungsprofil nicht ändert. Bei beiden Messungen sind zwei distinkte Signale zu erkennen. Ein dritter Peak wie in den Messungen ohne NaCl ist hingegen nicht zu sehen.

3.2.8 Wirkung kompatibler Solute auf die Schmelztemperaturen aufgereinigter ribosomaler Untereinheiten

Nach den Messungen an ganzen Ribosomen sollte im nächsten Schritt die Thermostabilität isolierter ribosomaler Untereinheiten bestimmt werden, um die Effekte, die bei den bisherigen Messungen beobachtet wurden, zu bestätigen. Hierbei wurden die ribosomalen Untereinheiten nach zwei verschiedenen Protokollen aufgereinigt: einerseits

in einem Tris-HCl-basierten Puffersystem (Mackey *et al.*, 1991) und andererseits in einem HEPES-basierten Puffersystem (Laborprotokoll AG Steitz, Yale University) (vgl. 2.7.3). Da die Isolierung ribosomaler Untereinheiten ein sehr aufwendiger Prozess mit nur geringen Ausbeuten ist, wurde die Aufreinigung in der vorliegenden Arbeit auf die ribosomalen Untereinheiten aus *E. coli* beschränkt.

3.2.8.1 Isolierung ribosomaler Untereinheiten

Zur Isolierung ribosomaler Untereinheiten wurden aufgereinigte, krude 70S-Ribosomen von *E. coli* K12 als Ausgangsmaterial verwendet. Die Reduzierung der Mg^{2+} -Ionenkonzentration auf 1 mM destabilisiert den 70S-Komplex und führt somit zur einfacheren Dissoziation in die Untereinheiten.

Die erfolgreiche Isolierung wurde anhand von SDS-PAGEs überprüft. Als Vergleich diente einerseits die Auftrennung ribosomaler Proteine in einer SDS-PAGE gezeigt in Sun *et al.* sowie die Daten aus Tabelle 22 und Tabelle 23 im Anhang (Sun *et al.*, 1972). Die hier gezeigte SDS-PAGE zeigt die Aufreinigung der ribosomalen Untereinheiten mit dem HEPES-Puffer basierten System. Die SDS-PAGE der ribosomalen Untereinheiten, die nach dem zweiten Aufreinigungsprotokoll isoliert wurden, ist im Anhang in Abbildung 70 gezeigt.

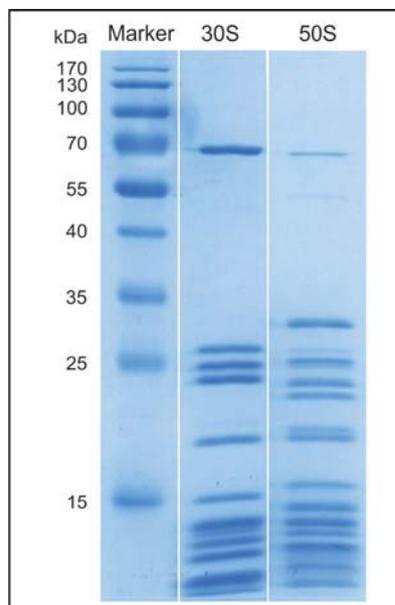


Abbildung 40: SDS-PAGE mit isolierten ribosomalen Untereinheiten aus *E. coli* K12

Die verschiedenen Fraktionen des Saccharosegradienten wurden vereinigt, erneut abzentrifugiert und zur Analyse des Bandenmusters der ribosomalen Proteine auf die SDS-PAGE (14,8 %) aufgetragen. 30S = vereinigte Probe aus den Fraktionen des ersten Peaks des Gradienten, 50S = vereinigte Probe aus den Fraktionen des zweiten Peaks des Gradienten. Das charakteristische S1-Protein der 30S-Untereinheit ist in beiden Proben zu erkennen. Die Konzentration ist jedoch bei der 30S-Probe deutlich höher. Das S1-Protein der 50S-Probe ist entweder eine geringfügige Kontamination der 50S-Untereinheiten mit 30S-Untereinheiten oder nicht-dissoziierten 70S-Ribosomen.

Das Bandenmuster der beiden Peakfraktionen unterscheidet sich an mehreren Stellen eindeutig voneinander. Zunächst ist wieder das S1-Protein (~62 kDa) als Marker der 30S-Untereinheit zu erkennen. Dieses Protein kommt in beiden Fraktionen vor, jedoch ist die Konzentration in der 30S-Fraktion eindeutig höher. Das Vorkommen des Proteins in der 50S-Fraktion spricht für eine Kontamination dieser mit geringen Mengen der 30S-Untereinheit oder nicht-dissoziierten 70S-Ribosomen. Insgesamt entsprechen in beiden Proben die Bandenmuster den Erwartungen. In der 50S-Fraktion sind noch, neben dem S1-Protein, weitere geringe Kontaminationen mit Proteinen der 30S-Untereinheit zu erkennen. Insgesamt jedoch hat die Isolierung der ribosomalen Untereinheiten aus *E. coli* gut funktioniert. Diese Untereinheiten wurden für die folgenden DSC-Messungen verwendet.

3.2.8.2 Thermostabilität ribosomaler Untereinheiten und der Einfluss kompatibler Solute

Thermostabilität ribosomaler Untereinheiten

Zunächst wurde die Thermostabilität der isolierten ribosomalen Untereinheiten ohne die Zugabe kompatibler Solute im DSC analysiert. Da die ribosomalen Untereinheiten in zwei verschiedenen Puffersystemen aufgereinigt wurden, werden hier mehrere DSC-Messungen der ribosomalen Untereinheiten aus den beiden Aufreinigungsprotokollen miteinander verglichen.

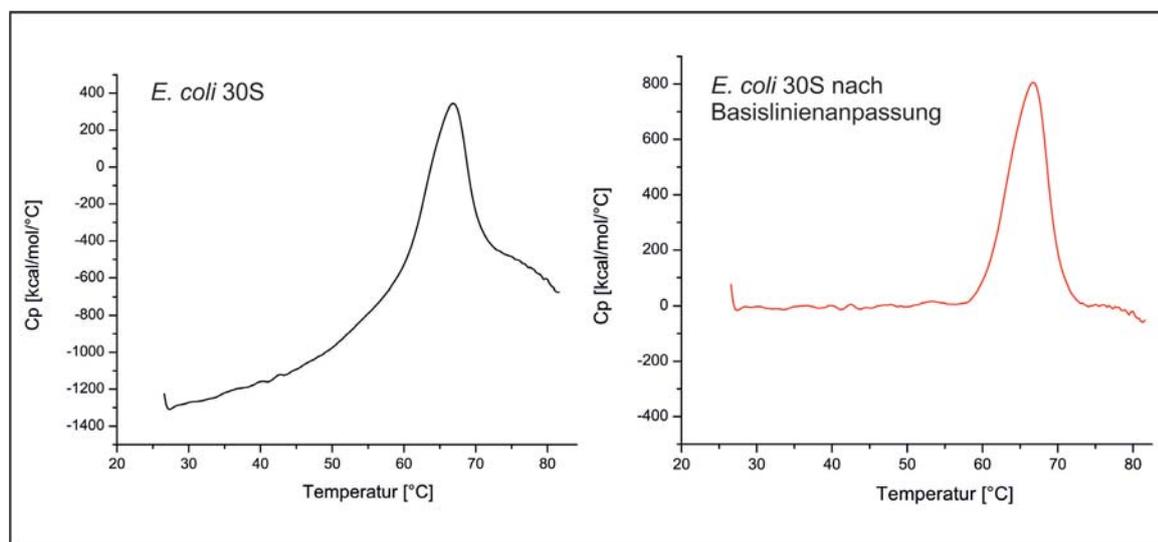


Abbildung 41: DSC-Messung isolierter 30S-Untereinheiten aus *E. coli* K12 (HEPES-Puffer)

0,25 μ M isolierte ribosomale 30S-Untereinheiten wurden in die DSC-Messung eingesetzt. Links ist die Messung ohne weitere Bearbeitung zu sehen, rechts ist die gleiche Messung nach der Basislinienanpassung gezeigt. Die Schmelztemperatur des Peaks liegt bei 66,5 °C.

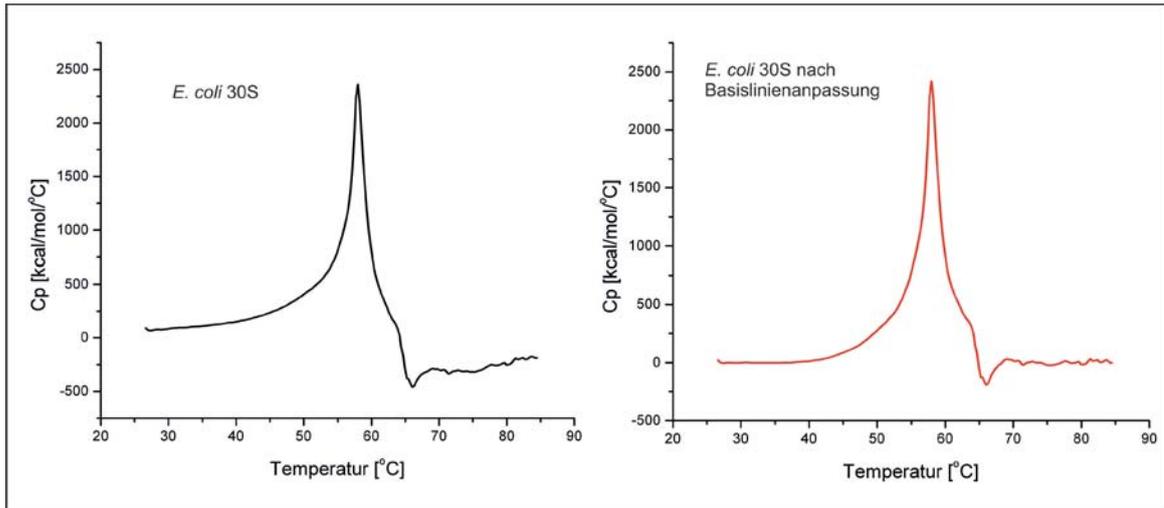


Abbildung 42: DSC-Messung isolierter ribosomaler 30S-Untereinheiten in Untereinheiten-Puffer nach (Mackey et al., 1991)

In die dargestellte DSC-Messung wurden 1 μM isolierte 30S-Untereinheiten im Tris-HCl-basierten Puffer nach (Mackey et al., 1991) eingesetzt. Links ist die unbearbeitete Messung gezeigt, rechts die gleiche Messung nach der Basislinienanpassung. Die Schmelztemperatur des Peaks liegt bei 57,9 $^{\circ}\text{C}$.

In Abbildung 41 und Abbildung 42 sind die kalorimetrischen Messungen der 30S-Untereinheiten gezeigt, die nach den beiden Aufreinigungsmethoden isoliert wurden. Die Messung mit HEPES-basiertem Puffer (vgl. Abbildung 41) zeigt einen anderen Verlauf als die Messung der 30S-Untereinheiten im Tris-HCl-basierten Puffer (vgl. Abbildung 42). Bei beiden Messungen wird jeweils lediglich ein Peak deutlich, dessen Spitze bei 66,5 $^{\circ}\text{C}$ (HEPES-Puffer) bzw. bei 57,9 $^{\circ}\text{C}$ (Tris-HCl-Puffer) liegt.

Die kalorimetrische Analyse der Denaturierung der größeren, ribosomalen 50S-Untereinheit in HEPES-Puffer Abbildung 43 Hier wird außerdem zur weiteren Analyse, welche Komponenten in den einzelnen Peaks denaturieren eine zweite Messung gezeigt, die nach dem ersten Peak abgebrochen wurde. Die denaturierte und die native Probe wurden anschließend in der gezeigten SDS-PAGE und FAGE analysiert.

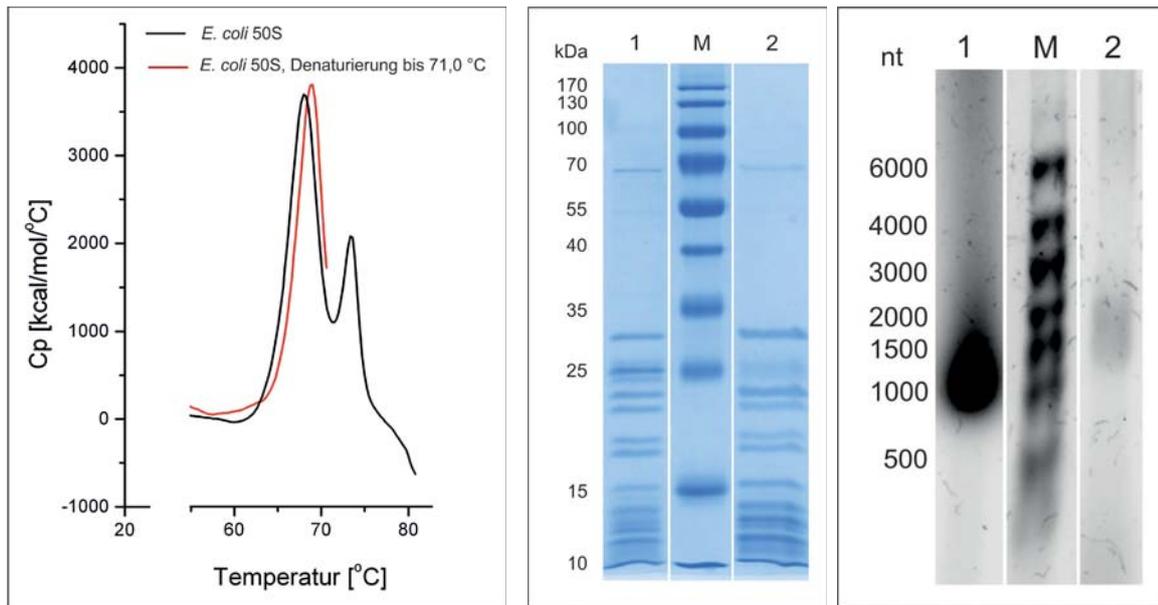


Abbildung 43: DSC-Messung an isolierten 50S-Untereinheiten aus *E. coli* in HEPES-Puffer und Analyse der nativen und denaturierten Fraktionen nach Denaturierung des ersten Peaks

Gezeigt ist eine DSC-Messung der isolierten 50S-Untereinheiten, die in HEPES-Puffer aufgereinigt wurden (schwarz). Zusätzlich ist hier eine abgebrochene Messung gezeigt, die nach der Denaturierung der ersten Reaktion abgestoppt wurde. Die Probe wurde abzentrifugiert und die beiden Fraktionen, denaturiert und nativ, sowohl auf eine SDS-PAGE (14,8 %) (Mitte) als auch eine FAGE (1,2 %) (rechts) aufgetragen. 1 = denaturierte Fraktion, 2 = native Fraktion, M = Proteingrößen-Standard.

Die Messung der in Tris-HCl-Puffer aufgereinigten 50S-Untereinheiten ist in Abbildung 44 gezeigt:

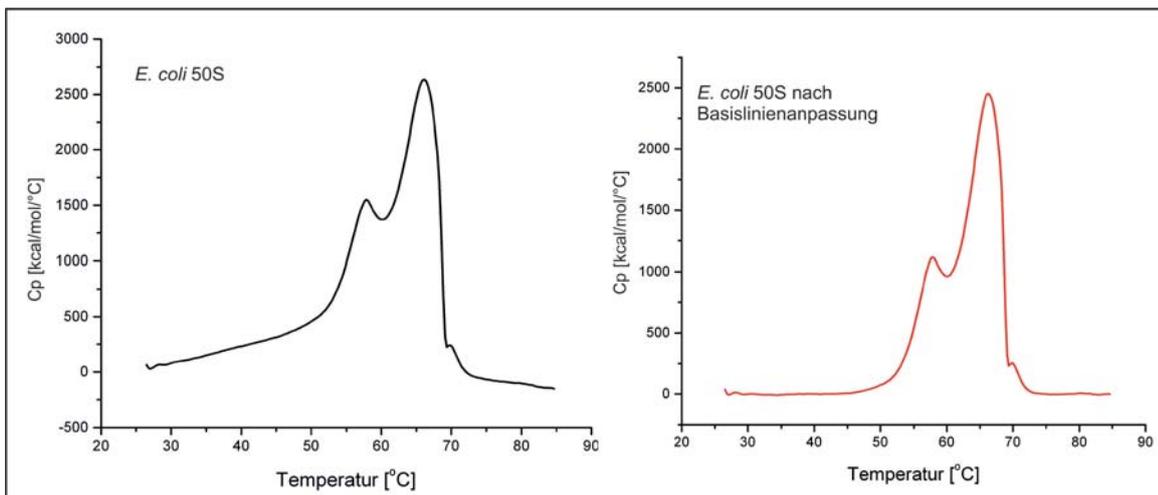


Abbildung 44: DSC-Messung isolierter 50S-Untereinheiten (nach Mackey *et al.*, 1991, Tris-HCl-Puffer)

1,38 μM isolierte ribosomale 50S-Untereinheiten wurden in diese Messungen eingesetzt. Links ist die Messung ohne weitere Bearbeitung gezeigt, rechts nach der Anpassung der Basislinie. Die Schmelztemperatur der beiden Peaks liegt bei 59,5 °C und 66,1 °C.

In beiden Puffersystemen sind bei den DSC-Messungen der 50S-Untereinheiten zwei Peaks zu sehen, die wie Bonincontro *et al* beschrieben, unabhängig voneinander denaturieren (Bonincontro *et al.*, 1998). In HEPES-Puffer denaturieren die beiden Komponenten bei 67,9 °C ($\pm 0,03$ °C) und 73,2 °C ($\pm 0,05$ °C), während sie in Tris-HCl-Puffer bereits bei 59,5 °C ($\pm 0,22$ °C) und 66,1 °C ($\pm 0,09$ °C) denaturieren. Neben den Schmelztemperaturen der Peaks zeigt Abbildung 43 auch, dass in beiden Fraktionen, sowohl der nativen als auch der denaturierten, nach der ersten Denaturierungsreaktion die ribosomalen Proteine nachgewiesen werden können. Zudem zeigt sich in der FAGE nur in der denaturierten Fraktion eindeutig eine verschmierte Bande, während in der nativen Fraktion nur eine sehr viel schwächere Bande zu erkennen ist.

Einfluss kompatibler Solute auf die Thermostabilität ribosomaler Untereinheiten

Im nächsten Schritt wurden die aufgereinigten Untereinheiten mit kompatiblen Soluten versetzt und wiederum in DSC-Messungen eingesetzt um die Verschiebung der Schmelztemperaturen zu bestimmen und den Effekt mit dem bereits beobachteten an den 70S-Komplexen vergleichen zu können. Aufgrund der geringen Ausbeute der aufgereinigten Untereinheiten musste die Analyse jedoch auf wenige Messungen beschränkt werden. Daher wurden von den getesteten Soluten nur Messungen mit einer Endkonzentration von 1 M durchgeführt. Exemplarisch sind hier die Messungen der aufgereinigten ribosomalen 50S-Untereinheit mit 1 M Betain aus beiden Puffersystemen gezeigt. Zunächst wird die Messung in HEPES-Puffer gezeigt:

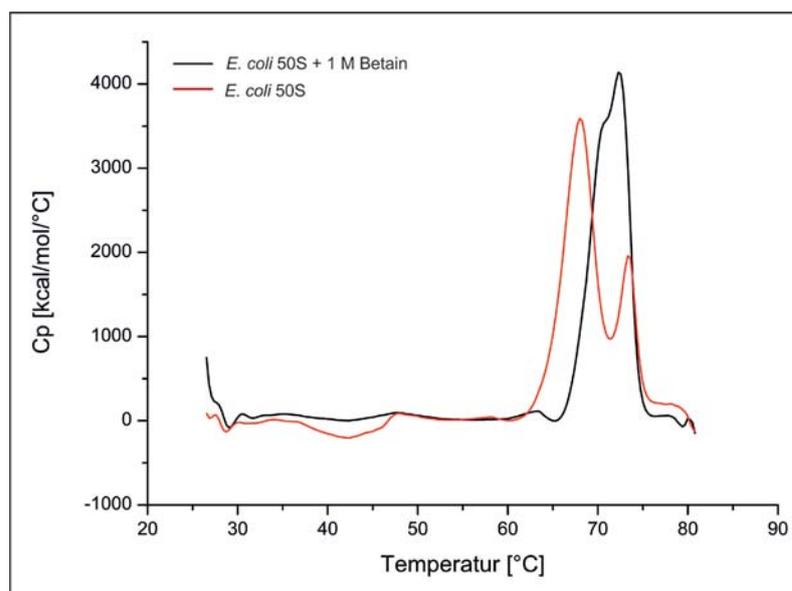


Abbildung 45: DSC-Messung mit aufgereinigten, ribosomalen 50S-Untereinheiten aus *E. coli* K12 mit und ohne 1 M Betain (HEPES-Puffer)

Die aufgereinigten 50S-Untereinheiten von *E. coli* K12 (ohne Solut, schwarz) wurden mit 1 M Betain (rot) versetzt und der Einfluss des kompatiblen Solut auf die Thermostabilität im DSC untersucht. Für beide Messungen wurden 0,17 μM 50S Untereinheit eingesetzt. Die Denaturierungstemperaturen der Messung mit 1 M Betain liegen bei 70,8 °C und 72,8 °C.

Durch die Zugabe von Betain zu den aufgereinigten 50S-Untereinheiten verschieben sich beide Peaks. Dabei verschiebt sich der erste Peak deutlich um etwa 3 °C (auf 70,8 °C, $\pm 0,07$ °C) zu höherer Temperatur, während sich der zweite Peak um lediglich etwa 0,5 °C (auf 72,8 °C, $\pm 0,04$ °C) zu niedrigeren Temperatur verschiebt. Deshalb erscheint die Messung mit Betain als Peak mit Schulter während in der Messung ohne Betain zwei distinkte Signale zu erkennen sind. Zum Vergleich zeigt Abbildung 46 die 50S-Untereinheiten aus dem gleichen Organismus in Tris-HCl-Puffer.

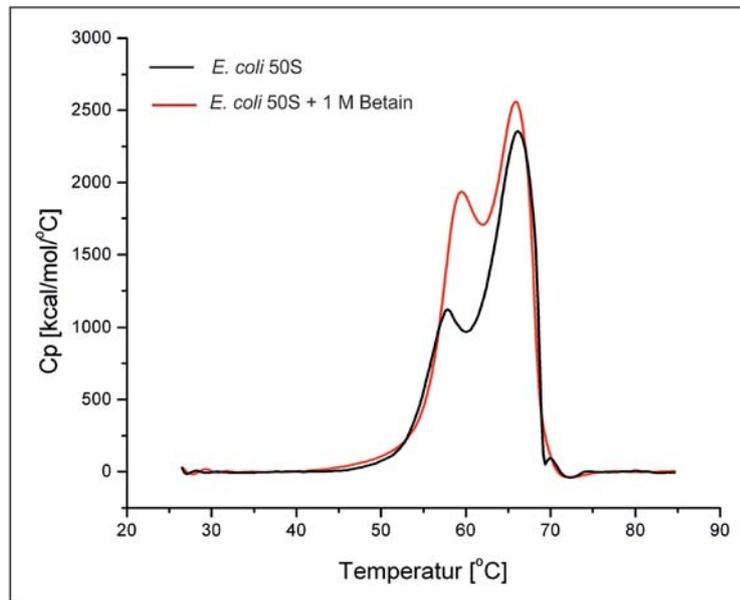


Abbildung 46: Vergleich der Thermostabilität aufgereinigter 50S-Untereinheiten ohne Solutzusatz und 50S-Untereinheit unter Einfluss von 1 M Betain (Tris-HCl-Puffer)

Dargestellt ist der Vergleich der DSC-Messungen aufgereinigter, ribosomaler 50S-Untereinheiten aus *E. coli* K12 ohne zugesetzte Solute (schwarz) mit dem Thermogramm unter Einfluss von 1 M Betain (rot). Die Schmelztemperaturen der beiden Peaks der Messung mit Betain liegen bei 60,2 °C und 66,1 °C.

Auch im Tris-HCl-basierten Puffer verändert sich durch die Zugabe von 1 M Betain das Denaturierungsverhalten der ribosomalen 50S-Untereinheiten in der kalorimetrischen Messung. Die Denaturierungstemperatur der ersten denaturierenden Komponente erhöht sich um 0,7 °C auf 60,2 °C ($\pm 0,07$), während die Schmelztemperatur des zweiten Peaks unverändert bei 66,1 °C ($\pm 0,06$) bleibt.

Wie bereits mit den 70S-Komplexen gezeigt, werden die restlichen Daten der Effekte kompatibler Solute auf die aufgereinigten Untereinheiten in einem Balkendiagramm (Abbildung 47) gezeigt und die dazugehörigen Daten im Anhang in Tabelle 21 aufgeführt. Mit beiden Puffersystemen konnten nur geringe Mengen der Untereinheiten aufgereinigt werden, so dass die Anzahl der durchgeführten Messungen stark reduziert

werden musste. Alle Messungen wurden daher nur mit einer Konzentration, 1 M Solut, durchgeführt. Von den 30S-Untereinheiten in HEPES-Puffer konnten gar keine Messungen in Kombination mit Soluten durchgeführt werden. Bei den restlichen Proben wurde die Analyse auf die Bestimmung des Einflusses von Saccharose und Hydroxyectoin beschränkt.

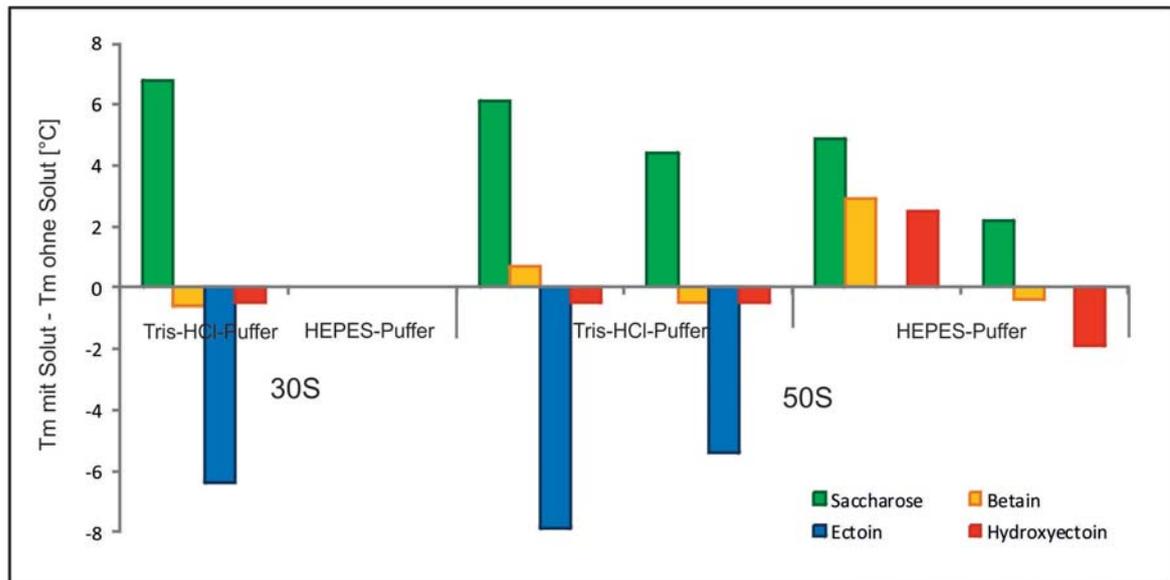


Abbildung 47: Differenzen der Denaturierungstemperaturen isolierter ribosomaler Untereinheiten unter Soluteinfluss in verschiedenen Puffersystemen

Die aufgereinigten ribosomalen Untereinheiten wurden vor der Messung mit den Soluten in 1 M Endkonzentration versetzt und anschließend der Einfluss Solute auf die Thermostabilität der Untereinheiten im Kalorimeter analysiert. Aufgetragen sind die Differenzen zwischen den Denaturierungstemperaturen mit Soluten und den Denaturierungstemperaturen des gleichen Systems ohne Solute.

Die Zugabe von 1 M Saccharose (Abbildung 47, grün) führt bei beiden Untereinheiten zur Steigerung der Schmelztemperaturen. Der maximale Effekt wird dabei bei der 30S-Untereinheit in Tris-HCl-Puffer mit einer Steigerung um etwa 7 °C beobachtet. Bei Betain ist der Trend nicht klar erkennbar. Die 30S-Untereinheit (gelb) wird leicht destabilisiert, während in beiden Puffern, wie bereits oben gezeigt (vgl. Abbildung 46 und Abbildung 47), die Denaturierungstemperatur des ersten Peaks der 50S-Untereinheiten ansteigt und des zweiten Peaks sinkt. Mit Ectoin konnten lediglich Messungen in Tris-HCl-Puffer durchgeführt werden. Hier zeigt sich, dass die T_m aller drei Peaks sinkt. Hydroxyectoin zeigt in Tris-HCl-Puffer einen leicht destabilisierenden Effekt auf die Untereinheiten. In HEPES-Puffer hingegen konnte beim ersten Peak der 50S-Untereinheit eine Erhöhung der Schmelztemperatur um etwa 1 °C beobachtet werden, während die T_m des zweiten Peaks um etwa 2 °C sinkt.

3.3 Analyse der sequenziellen Unterschiede in den Ribosomen zwischen *E. coli* und *H. elongata*

Nachdem die Ribosomen von *E. coli* K12 und *H. elongata* Wt sehr verschiedene Reaktionen auf die Zugabe von NaCl zeigten, lag die Annahme nah, dass sich die Ribosomen möglicherweise im Aufbau, also in den ribosomalen Proteinen oder der ribosomalen RNA, unterscheiden. Daher wurden die Sequenzen sowohl der rProteine als auch der rRNA beider Organismen aus den Genomdaten (NCBI, *E. coli* K12 substr. MG1655 Riley *et al.*, 2006; *H. elongata* DSM2581^T Schwibbert *et al.*, 2011) herausgesucht und miteinander verglichen.

Bei den rRNAs fiel zunächst auf, dass für *E. coli* K12 sieben rRNA-Operons (*rrnA-rrnE* und *rrnG* und *rrnH*) annotiert sind, während für *H. elongata* lediglich vier Operons (*rRNA1-rRNA4*) annotiert sind. Dabei codiert eines der *E. coli* K12 Operons (*rrnD*) für zwei 5S-rRNAs. Insgesamt sind die rRNAs nicht nur innerhalb eines Organismus sehr hoch konserviert, auch zwischen den rRNAs der beiden untersuchten Organismen konnten nur wenige Unterschiede festgestellt werden. Die Vergleiche der rRNAs sind im Anhang in den Abbildung 60 bis 63 dargestellt.

Beim Vergleich der ribosomalen Proteine aus *E. coli* und *H. elongata* wurden sowohl die Anzahl der Aminosäuren und somit die Größe der Proteine (in kDa) als auch ihr theoretischer isoelektrischer Punkt (pI) analysiert. Die Daten sind, sortiert nach den Untereinheiten aus denen die Proteine stammen, im Anhang in den Tabelle 22 und 23 angegeben. Insgesamt sind die Proteine sich weitgehend sehr ähnlich. Zumeist unterscheiden sie sich in der Länge lediglich um 2-3 Aminosäuren, und auch der theoretische isoelektrische Punkt unterscheidet sich bei den meisten Proteinen um nicht mehr als 0,5 Einheiten. Dabei konnte auch keine Tendenz beobachtet werden, dass die Proteine eines Organismus insgesamt einen niedrigeren isoelektrischen Punkt aufwiesen als die des anderen Organismus. Für alle in *E. coli* annotierten ribosomalen Proteine konnte in der annotierten Sequenz von *H. elongata* ein homologes Protein gefunden werden.

Zwei ribosomale Proteine jedoch unterschieden sich bei den beiden Organismen stark voneinander: die Proteine L10 und L25. Beide sind Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit.

3.3.1 Die ribosomalen Proteine L10 und L25 in *E. coli* und *H. elongata*

Die beiden ribosomalen Proteine L10 und L25 sind die einzigen, die beim Vergleich der Sequenzen und Eigenschaften der ribosomalen Proteine aus *E. coli* und dem halophilen Organismus *H. elongata* aufgrund ihrer Verschiedenheit auffielen. Beide sind, wie ihr Name bereits verrät, Bestandteile der großen ribosomalen Untereinheit.

Das ribosomale Protein L10

Das ribosomale Protein L10 interagiert im Ribosom vermutlich mit dem L7/L12-stalk (Ban *et al.*, 2000) und liegt damit eher auf der Außenseite des Ribosoms. In *E. coli* ist das Protein 165 Aminosäuren lang und 17,7 kDa groß. Der isoelektrische Punkt liegt mit 9,04 im leicht basischen Bereich, anders hingegen beim homologen Protein aus *H. elongata*: Dieses ist zwar mit 167 Aminosäuren ähnlich lang und mit 18,2 kDa nur wenig schwerer, der isoelektrische Punkt liegt jedoch mit 5,81 im schwach sauren pH-Bereich. Die Sequenzen der beiden Proteine stimmen zu 73 % überein. Der Vergleich der beiden Sequenzen ist im Anhang in Abbildung 63 gezeigt. Die Unterschiede in diesen ribosomalen Proteinen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

Das ribosomale Protein L25

L25 ist ebenfalls auf der Oberfläche der Ribosomen lokalisiert (Lotti *et al.*, 1989) und bindet spezifisch die kleine 5S rRNA (Stoldt *et al.*, 1999). Beim Vergleich der Proteinsequenzen fiel dieses Protein direkt auf, da es sich in *E. coli* und *H. elongata* stark unterscheidet. Das Protein aus *E. coli* ist 94 Aminosäuren lang und 10,7 kDa schwer mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 9,6. Das Protein aus *H. elongata* hingegen ist mit 217 Aminosäuren und 23,8 kDa mehr als doppelt so lang und doppelt so schwer wie das homologe Protein aus *E. coli*. Zudem liegt der isoelektrische Punkt des Proteins mit 4,7 im sauren Bereich.

Sequenzvergleiche der beiden Proteine ergaben, dass das *E. coli*-Protein dem N-terminalen Teil des *H. elongata*-Proteins homolog ist. Dieser Teil bindet auch im Protein von *H. elongata* die 5S rRNA. Andererseits ist das L25 aus *H. elongata* aber auch dem allgemeinen Stressprotein CTC (catabolic controlled) aus *B. subtilis* homolog. Dieses wird in *B. subtilis* in Stresssituationen vermehrt exprimiert und findet sich dann in der ribosomalen Fraktion (Völker *et al.*, 1994).

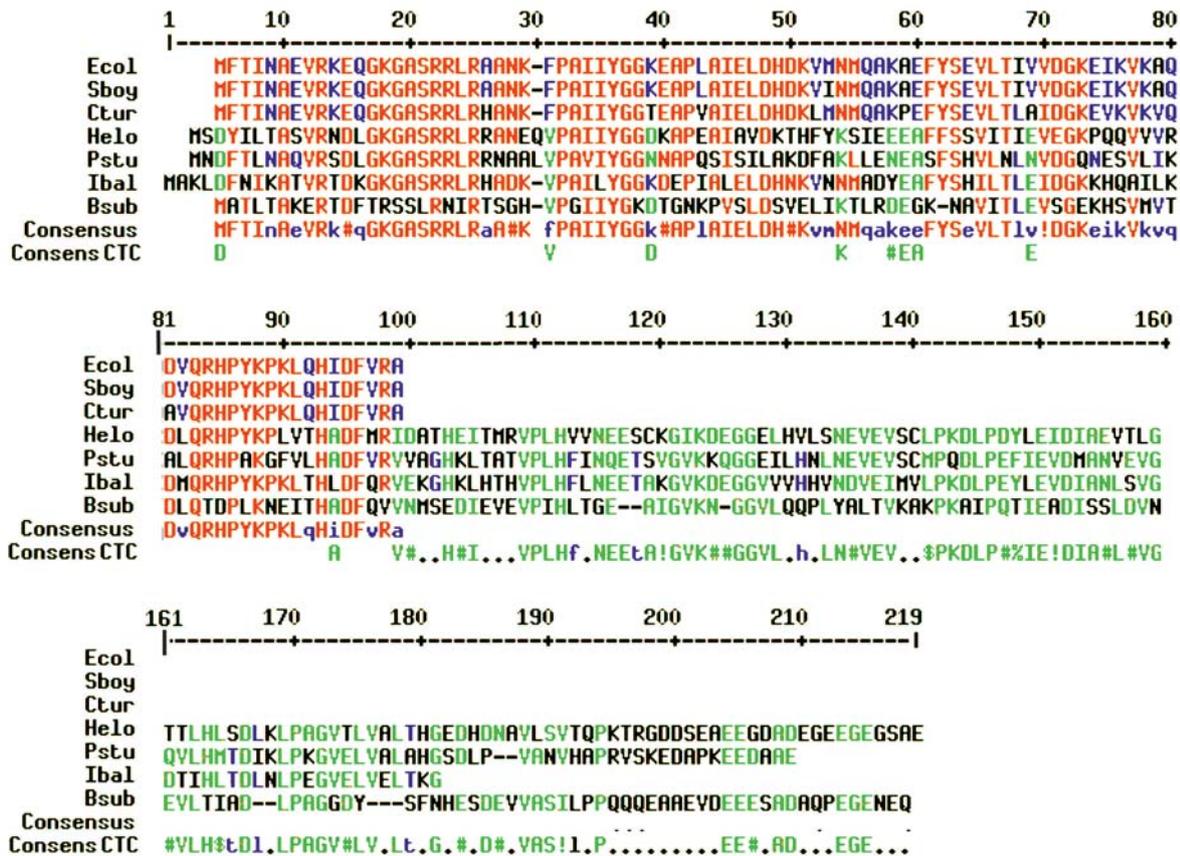


Abbildung 48: Multialignment der Aminosäuresequenzen der ribosomalen Proteine L25 aus verschiedenen Organismen

Dargestellt ist ein mit MultAlin (Corpet, 1988) hergestellter Sequenzvergleich des ribosomalen Proteins L25. In *E. coli* und nah verwandten Stämmen ist das Protein lediglich rund 95 Aminosäuren lang, während es in vielen anderen Organismen, wie *H. elongata* und *B. subtilis* mit rund 220 Aminosäuren deutlich länger ist. In *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass das Protein gleichzeitig eine Funktion als allgemeines Stressprotein (CTC, für catabolic controlled) erfüllt. Der Sequenzvergleich zeigt zwei verschiedene Consensus-Sequenzen an: zum einen die Consensus-Sequenz für die kürzere L25-Variante, wie sie in *E. coli* vorkommt, und zum anderen die Consensus-Sequenz für die längere L25/CTC-Variante, wie sie in *H. elongata* und *B. subtilis* vorkommt. In rot sind alle Aminosäuren dargestellt, die in beiden Varianten hoch konserviert (mind. 90 %) vorliegen, in blau die Aminosäuren, die in mindestens 50 % der Sequenzen vorkommen. In den langen Versionen des Proteins sind zusätzlich Aminosäuren in grün dargestellt. Diese zeigen eine Konservierung von mindestens 50 % in diesen Proteinen an, unabhängig von der Sequenz der kurzen Variante.

Consensus-Symbole: !: I oder V; \$: L oder M; %: F oder Y; #: N, D, Q, E, B oder Z

Ecol: *E. coli* K12; **Sboy:** *Shigella boydii* CDC 3083-94; **Ctur:** *Cronobacter turicensis* z3032; **Helo:** *H. elongata* DSM 2581^T; **Pstu:** *Pseudomonas stutzeri* A1501; **Ibal:** *Idiomarina baltica* OS145; **Bsub:** *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. BSP1

Der Sequenzvergleich der ribosomalen Proteine aus *E. coli*, *H. elongata* und *B. subtilis* zeigt deutlich die Ähnlichkeit der Sequenzen im N-terminalen Bereich über alle analysierten Organismen und andererseits auch die Ähnlichkeit des *H. elongata*-Proteins mit dem Stressprotein CTC aus *B. subtilis* (siehe Abbildung 48). Neuere Studien zeigten, dass dieses Protein für das Überleben der Zellen nicht essentiell ist, allerdings weisen diese Studien darauf hin, dass sich das Wachstum der Zellen verlangsamt und die Zellen

eine geringere Hitzetoleranz aufweisen (Korepanov *et al.*, 2007). Der Einfluss des ribosomalen Proteins L25 auf die Thermostabilität sowohl von *E. coli*- als auch von *H. elongata*-Ribosomen wurde im Rahmen einer an diese Arbeit angegliederten Diplomarbeit näher untersucht (Ebisch, 2012).

3.3.2 Heterologe Expression des ribosomalen Proteins L13

Wie in Abschnitt 4.8.1 für das ribosomale Protein L25 gezeigt, können ribosomale Proteine neben ihrer Funktion im Ribosom auch weitere Aufgaben in der Zelle erfüllen. Diese „extra ribosomal functions“ werden für viele ribosomale Proteine seit längerem diskutiert (Wool, 1996; Warner und McIntosh, 2009). Nach einer Studie von Tanaka *et al.* aus dem Jahr 2001 macht die heterologe Expression des ribosomalen Proteins L13 aus *Chlamydomonas* W-80 *E. coli* widerstandsfähiger gegen Salz- und Kältestress (Tanaka *et al.*, 2001). Das ribosomale Protein L13 ist einem Protein homolog, das zuerst in humanen Mammakarzinomzellen nachgewiesen wurde. Dort wird es BBC1 (breast basic conserved 1) genannt (Jain *et al.*, 2004).

Das ribosomale Protein L13 aus der großen ribosomalen Untereinheit ist ein Protein des „early ribosome assembly“-Prozesses, wird also bereits früh im Reifungsprozess der Ribosomen benötigt. In Zusammenarbeit mit Evan Stephens (Universität von Queensland, Brisbane, Australien) wurde ein in *E. coli* exprimierbarer Vektor kloniert, der unter Kontrolle des Lac-Promotors das für L13 codierende Gen *rpM* aus *Chlamydomonas* W-80 trägt (Klonierungsschema und Vektorkarte im Anhang). Gleichzeitig wurde auch versucht ebenfalls die Gene aus *E. coli* K12 und *H. elongata* in dieses Vektorrückgrat zu klonieren um einen direkten Vergleich des Effekts auf die Ribosomen zu ermöglichen. Diese sind der eukaryotischen Variante homolog wie Phua *et al.* nachwiesen, auch wenn die eukaryotische Variante etwa 1/3 länger ist als die prokaryotische (Phua *et al.*, 1989).

Die Gene wurden mittels PCR mit den Primern EcolL13_for und EcolL13_rev bzw. HeloL13_for und HeloL13_rev bzw. BBC1_NcoI_f und BBC1_HindIII_r erfolgreich amplifiziert (hier nicht gezeigt) (Klonierungsschema im Anhang in Abbildung 64). Dabei wurden mit den Primern die Restriktionsschnittstellen *NcoI* (5'-Ende) und *BglII* (3'-Ende), bzw. bei der *bbc1*-Klonierung *NcoI* (5'-Ende) und *HindIII* (3'-Ende), in das PCR-Produkt eingefügt. Nach der Hydrolyse des Vektors und der PCR-Produkte mit diesen Restriktionsenzymen wurde eine Ligation durchgeführt, das Ligationsprodukt in kompetente *E. coli* DH5 α transformiert und die Zellen auf Selektivnährmedien ausgestrichen. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Klone von der Agarplatte in 5 mL LB-1 + 100 Carb gepickt und wiederum bei 37 °C über Nacht unter

Schütteln inkubiert. Aus den gewachsenen Kulturen wurden die Plasmide isoliert und anschließend durch Hydrolyse mit *Xba*I und *Ava*I (pQE60_L13_EcoI und pQE60_L13_Helo) bzw. *Av*II (pQE60_L13_Chla) die Klonierung überprüft. Für alle drei Plasmide wurden dabei die erwarteten DNA-Fragmente nachgewiesen.

Die Sequenzierung dieser Plasmide ergab jedoch, dass lediglich das Plasmid pQE60_L13_Chla die richtige Sequenz aufwies. Bei pQE60_L13_EcoI fiel auf, dass ein Teil der im Vektorrückgrat liegenden Promotorsequenz im Laufe der Klonierung verloren ging. Dies scheint ein bekanntes Problem dieses Vektors zu sein (Konny Bauer, Sequiserve, Vaterstetten, persönliche Mitteilung). Die Klonierung von pQE60_L13_Helo hingegen ergab, dass bereits das ligierte Fragment falsch amplifiziert wurde (alle Sequenzvergleiche sind im Anhang in den Abbildung 65 bis 68 aufgeführt). Daraufhin wurden die Untersuchungen zunächst lediglich mit dem Plasmid pQE60_L13_Chla durchgeführt und der erneute Versuch der Klonierung der beiden anderen Plasmide vorläufig zurückgestellt.

Genau wie bei Tanaka *et al.* wurden die Zellen von *E. coli* DH5 α pQE_L13_Chla in LB-Medium mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen angezogen und das Wachstum der Kulturen anhand der optischen Dichte verfolgt. Zur Expression des Proteins wurde den Kulturen bei einer optischen Dichte von etwa 0,4 IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt. Als Kontrolle wurden sowohl Zellen von *E. coli* DH5 α als auch *E. coli* DH5 α pQE60 im gleichen Medium angezogen. Insgesamt wurden die Zellen in LB-Medium mit NaCl-Konzentrationen zwischen 1 % - 8 % NaCl (w/v) angezogen. Dabei konnte kein Unterschied festgestellt werden zwischen den Zellen, die das ribosomale Protein exprimierten und den Zellen, die als Kontrolle verwendet wurden, weder in der Wachstumsrate noch in der erreichten End-OD der Kulturen. Ein weiterer Versuch, den Effekt des Proteins in den Zellen in Minimalmedium mit 1 % - 4 % NaCl (w/v) nachzuweisen, blieb ebenfalls erfolglos. Da bereits bei diesem Versuch kein Effekt auf die Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden auch die Klonierungen der beiden anderen Plasmide nicht weiter verfolgt.

3.4 Zellfreie Protein-Synthese

Mit der zellfreien Protein-Synthese (ZFPS) beginnt der zweite Teil des Ergebnisteils der vorliegenden Arbeit. Nach der kalorimetrischen Bestimmung der Wirkung kompatibler Solute auf bakterielle Ribosomen steht in diesem Abschnitt die funktionale Analyse im Vordergrund.

Organismen, die zum Schutz vor osmotischem Stress die „compatible-solute“-Strategie verfolgen akkumulieren kompatible Solute in ihrem Cytoplasma bis hin zu molaren

Konzentrationen. Die Wirkung dieser akkumulierten Solute wurde bisher vielfach *in vitro* an Modellenzymen untersucht. Aus diesen vielfältigen Versuchen ist die stabilisierende Wirkung der kompatiblen Solute auf Proteine bekannt. Auch die wenigen publizierten Untersuchungen zum Einfluss der Solute auf RNA wurden lediglich mit artifiziellen RNA-Molekülen *in vitro* durchgeführt.

Mit Hilfe der zellfreien Protein-Synthese kann der Effekt kompatibler Solute auf den gesamten Reaktionsablauf beginnend bei der Transkription der DNA bis hin zur Translation der mRNA sowie aller dafür notwendigen Zwischenschritte untersucht werden. Da hier mit einem offenen System der Proteinexpression gearbeitet wird, können die Versuchsbedingungen direkt modifiziert werden. Damit können die Bedingungen der Expression besser definiert werden als dies bei einer *in vivo* Expression möglich ist. Zudem können auch Substanzen untersucht werden, die entweder von Zellen nicht aktiv akkumuliert werden, oder auch Substanzen, die lebenden Zellen schaden würden.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete System wurde von Thakral nach Seidelt *et al.* modifiziert (Seidelt *et al.*, 2009; Thakral, 2012) und war zu Beginn der Arbeiten bereits für die Inkubationszeit, die Konzentrationen aller verwendeten Einzelkomponenten, sowie die Menge des Nachweisreagenz' der Luciferase-Reaktion optimiert. Zusammen mit Thakral wurde zusätzlich im Rahmen der vorliegenden Arbeiten die optimale Konzentration der eingesetzten T7 RNA-Polymerase bestimmt, die das Gen der Luciferase in die zugehörige mRNA transkribiert.

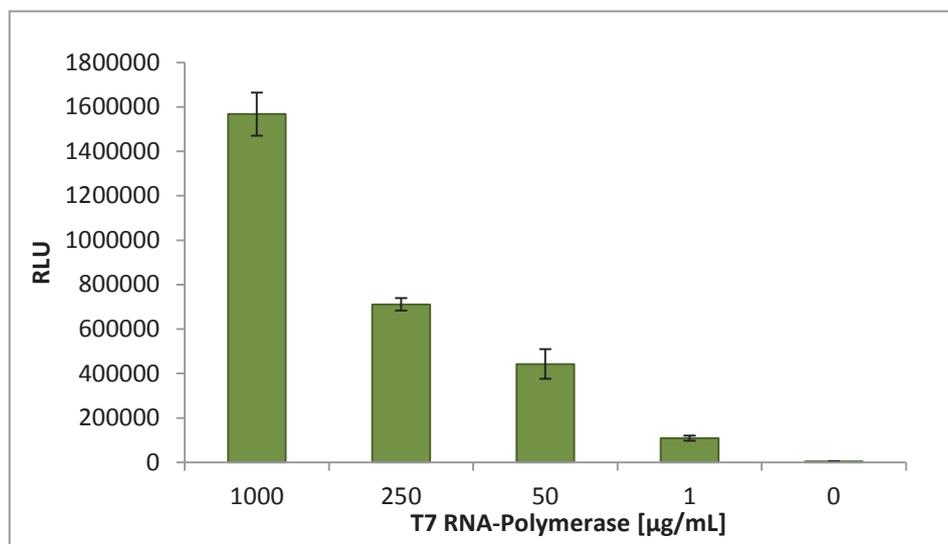


Abbildung 49: Bestimmung der optimalen T7 RNA-Polymerasekonzentration

Zur Bestimmung der optimalen T7 RNA-Polymerasekonzentration wurden die Reaktionen mit unterschiedlichen Mengen der aufgereinigten T7 RNA-Polymerase versetzt und anschließend bei 30 °C 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der exprimierten Luciferase über die Menge des emittierten Lichts bestimmt. Alle Reaktionen wurden in 3-fach-Bestimmung durchgeführt. RLU = relative light units in Lichtblitze pro Sekunde, Hintergrund bereinigt.

Es wurden verschiedene Konzentrationen der RNA-Polymerase zwischen 1 µg/mL bis 1000 µg/mL getestet (siehe Abbildung 49). Mit allen Konzentrationen konnte die Luciferase aktiv exprimiert werden. Für die weiteren Versuche wurde 50 µg T7 RNA-Polymerase/mL Reaktion als Standard festgelegt, da hier wenig T7 RNA-Polymerase verwendet werden konnte, die Expression der Luciferase jedoch schon deutlich von Hintergrundrauschen zu unterscheiden war.

3.4.1 Aktivität des ZFPS-Systems bei unterschiedlichen Temperaturen

Zunächst wurde die Aktivität des Systems ohne den Zusatz kompatibler Solute bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen bestimmt. Nach Spirin & Swartz liegt die höchste Produktivität des Systems bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C (Spirin und Swartz, 2008a). Die Aktivität der Luciferase wurde anschließend bei Raumtemperatur bestimmt, um lediglich den Einfluss der Inkubationstemperatur, nicht aber den der Messtemperatur in die Analyse einzubeziehen.

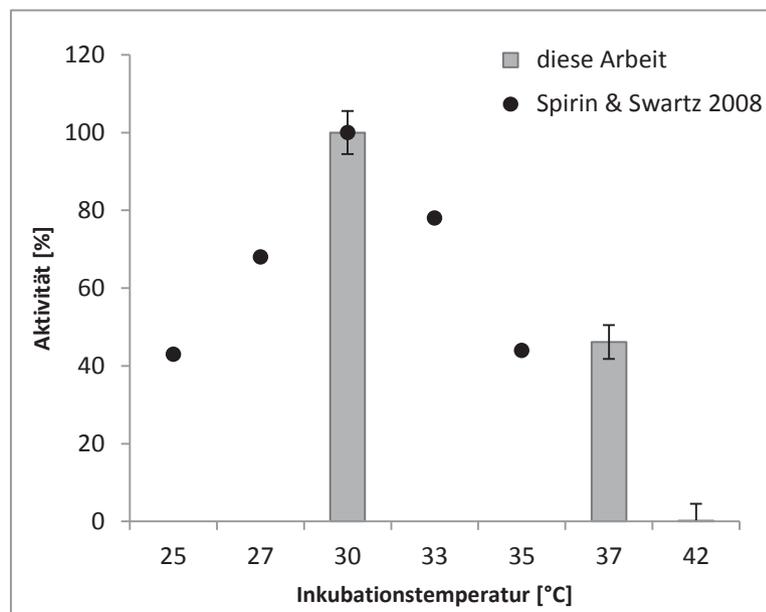


Abbildung 50: Aktivität der zellfreien Protein-Synthese bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Dargestellt sind die Unterschiede in der Luciferaseaktivität wenn das System bei verschiedenen Temperaturen inkubiert wird. Getestet wurden 30 °C, 37 °C und 42 °C. Zum Vergleich sind die Daten von Spirin & Swartz angegeben, die ebenfalls mit einem *E. coli*-basierten System die Aktivität der Luciferase nachgewiesen haben (Spirin und Swartz, 2008a) (Messpunkte aus der Abbildung ermittelt). Alle Messungen wurden in 3-fach-Bestimmung durchgeführt und die Aktivität bei 30 °C als 100 % gesetzt.

Die höchste Aktivität des Systems wird bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C erreicht. Die Steigerung der Temperatur auf 37 °C, also eigentlich der optimalen Wachstumstemperatur von *E. coli*, führt zu einer drastischen Verringerung der Luciferase-Aktivität auf nur noch etwa 50 %. Bei einer Inkubationstemperatur von 42 °C

ist nur noch eine sehr geringe Aktivität nachweisbar. Da die Bestimmung der Luciferase-Aktivität bei allen Proben bei der gleichen Temperatur durchgeführt wurde, bedeutet eine geringere Aktivität also dass weniger korrekt gefaltetes Protein exprimiert wurde, das die Reaktion katalysieren kann.

Als Vergleich wurden auch die von Spirin & Swartz publizierten Daten ihres ZFPS-Systems, ebenfalls mit Luciferase als Reporterprotein, gezeigt. Auch hier wird deutlich, dass die höchste Aktivität des Systems bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C erreicht werden kann. In diesem System findet die Reduktion der Aktivität um 50 % bereits bei einer Inkubationstemperatur von etwa 35 °C statt.

Diese verschiedenen Inkubationstemperaturen wurden im Folgenden teilweise auch in den Versuchen mit kompatiblen Soluten verwendet. Da für die Solute auch eine protektive Wirkung während Hitzestress publiziert wurde, wurden Reaktionen bei 30 °C als Standardbedingung, Inkubationen bei 37 °C und 42 °C als Versuche unter Thermostress betrachtet.

3.4.2 Zellfreie Protein-Synthese mit einem Zellextrakt aus *H. elongata* Wt

Wie bei den Versuchen zur thermischen Stabilität von aufgereinigten Ribosomen, sollte auch die zellfreie Protein-Synthese sowohl mit Zellextraktionen von *E. coli* als auch von *H. elongata* durchgeführt werden. Die zellfreie Protein-Synthese mit *H. elongata*-Zellextrakt wurde zunächst analog der Reaktion mit *E. coli*-Zellextrakt durchgeführt und zunächst die Aktivität des Systems bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C bestimmt. Unter diesen Bedingungen (pH 7,0) konnte jedoch keine Aktivität der Luciferase nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt). Daher wurde im nächsten Schritt der pH-Wert der Reaktion variiert.

Durch die Erhöhung des pH-Wertes während der Reaktion konnte erstmalig eine zellfreie Protein-Synthese mit *H. elongata*-Zellextrakt erfolgreich nachgewiesen werden. Das Optimum liegt mit dem *H. elongata*-Zellextrakt bei etwa pH 8 (siehe Abbildung 51). Einerseits ist jedoch der Fehler der sich aus den Daten berechnete sehr groß. Andererseits ist die Menge des emittierten Lichts sehr gering im Vergleich zu den Lichtmengen, die die in Zellextrakt aus *E. coli* exprimierte Luciferase zeigt (vgl. Abbildung 49). Da es sich bei *H. elongata* um einen halophilen Organismen handelt und somit die Möglichkeit besteht, dass die cytoplasmatischen Proteine, die für die Aktivität der zellfreien Protein-Synthese eine Rolle spielen, eine geringe Salzkonzentration zur Aktivität benötigen, wurde in einem weiteren Versuch getestet, ob die Zugabe geringer Mengen NaCl einen Einfluss auf die Expression des Reporterproteins zeigt.

Wie aus Abbildung 51 hervorgeht wird die Expression des Proteins durch die Erhöhung der NaCl-Konzentration in *H. elongata* nicht verbessert. Die Aktivität sinkt hingegen im Vergleich zu den Reaktionen ohne Salz.

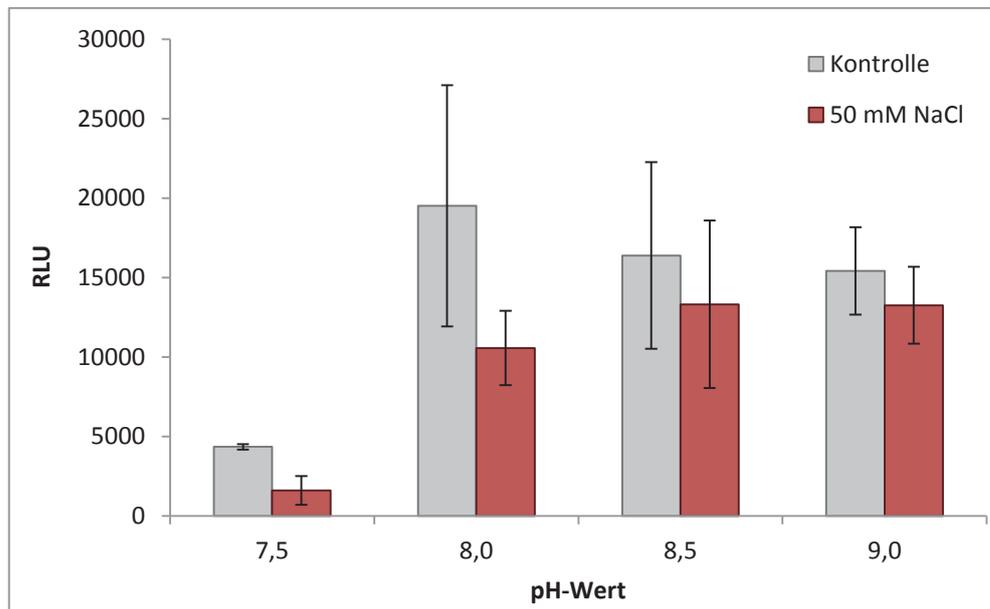


Abbildung 51: Luciferase-Expression mit *H. elongata*-Zellextrakt unter NaCl-Einfluss

Mit dem aus *H. elongata* Wt hergestellten Zellextrakt wurde die zellfreie Protein-Synthese bei verschiedenen pH-Werten zwischen 7,5 bis 9,0 durchgeführt (grau). Alle anderen Komponenten wurden in den Konzentrationen eingesetzt, wie sie für das *E. coli*-System etabliert wurden. Die Mg^{2+} -Konzentration wurde nicht optimiert, hier wurden 15 mM verwendet. Zusätzlich wurde allen Reaktionsansätzen RNase-Inhibitor (10 U/mL) zugesetzt, um die Aktivität der *H. elongata* eigenen RNasen zu inhibieren. Außerdem sind hier die Daten der Ergebnisse mit 50 mM NaCl bei den verschiedenen pH-Werten gezeigt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei Reaktionen. RLU = relative light units in Lichtblitze pro Sekunde, Hintergrund bereinigt.

Bei näherer Betrachtung des verwendeten Cytomim-Energiergenerationssystems fällt auf, dass die benötigten Enzyme aus dem Gärungsstoffwechsel von *E. coli* stammen. Anders als *E. coli* ist *H. elongata* jedoch nicht zur Gärung befähigt. Ein Sequenzabgleich der entsprechenden Gene aus *E. coli* mit dem Genom von *H. elongata* brachte erwartungsgemäß keine Übereinstimmung, sodass im Zellextrakt von *H. elongata* die Energieträger vermutlich nicht regeneriert werden konnten. Somit konnten in den Reaktionen wahrscheinlich lediglich die im Extrakt enthaltenen Energieträger verbraucht und somit nicht mehr Protein exprimiert werden. Für die zellfreie Protein-Synthese mit *H. elongata* müsste also vermutlich ein neues Energiergenerationssystem etabliert werden. Daher wurden keine weiteren Untersuchungen an diesem System mit Zellextrakt aus *H. elongata* durchgeführt.

3.4.3 Einfluss kompatibler Solute auf die zellfreie Protein-Synthese

Um den Einfluss kompatibler Solute auf die zellfreie Protein-Synthese zu untersuchen, wurden die Reaktionen nach dem Standard-Protokoll angesetzt und die kompatiblen Solute in Endkonzentrationen zwischen 0,25 M bis 1,0 M verwendet. Zunächst wurden Trehalose, Saccharose, Ectoin, Hydroxyectoin und Betain untersucht, also die gleichen Solute, wie auch schon bei der Bestimmung der Thermostabilität der Ribosomen. Dabei ist interessant, ob durch diese Modifikation des Lösungsmittels die Expression des Reporterproteins verbessert wird. In einem kürzlich erschienenen Artikel von Kai *et al.* wurde GFP (green fluorescent protein) als Reporterprotein aus dem gleichen Vektor wie in dem hier beschriebenen System exprimiert und unter anderem der Effekt von Betain und Ectoin auf das System untersucht (Kai *et al.*, 2013). Die Autoren zeigen, dass Betain und Ectoin bis zu einer Konzentration von 150 mM bzw. 100 mM keinen Einfluss auf die GFP-Expression haben und höhere Konzentrationen das System stören.

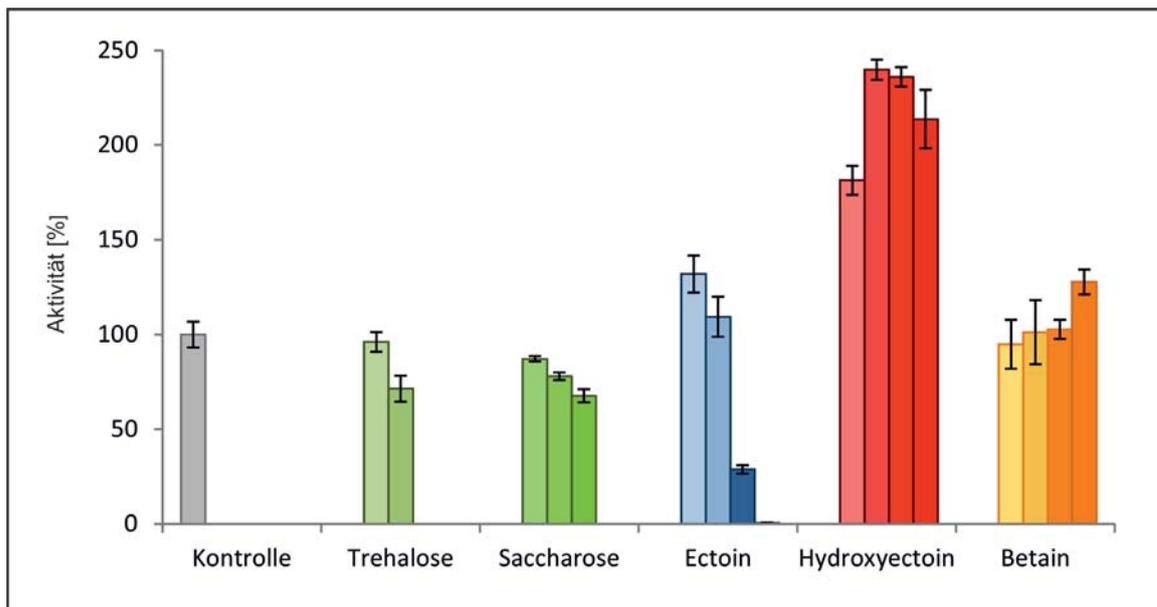


Abbildung 52: Einfluss ausgewählter kompatibler Solute auf die zellfreie Protein-Synthese

Die Reaktionen der zellfreien Protein-Synthese wurden mit ansteigenden Konzentrationen verschiedener kompatibler Solute versetzt. Die Reaktionen wurden für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert und durch Zugabe des Ribosomen-inhibierenden Antibiotikums Kanamycin abgestoppt. Anschließend wurde die Aktivität des exprimierten Reporterproteins Luciferase im Luminometer gemessen. Die Aktivität wurde gegen die Aktivität der Kontrollreaktion ohne zugesetzte Solute aufgetragen. Die Daten stellen die Mittelwerte aus mindestens drei Bestimmungen dar. Der untersuchte Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,25 M bis 1,0 M Solut. Der erste Balken steht dabei jeweils für die Aktivität bei einer Endkonzentration von 0,25 M Solut, danach steigt mit jedem Balken die Endkonzentration um weitere 0,25 M an. Bei Trehalose und Saccharose konnten, aufgrund der geringeren Löslichkeitsgrenze, lediglich Endkonzentrationen von 0,5 M bzw. 0,75 M erreicht werden.

Die Aktivität der Luciferase in der Kontrolle wurde hier auf 100 % normiert und alle anderen Daten damit verglichen. Es wird deutlich, dass sich Trehalose- und Saccharosekonzentrationen über 0,25 M negativ auf die Aktivität der Luciferase auswirken. Bei Betain ist zunächst kein Effekt sichtbar, erst mit steigender Konzentration ist ein leichter Anstieg zu erkennen.

Die beiden Ectoine, Ectoin und Hydroxyectoin, zeigen unterschiedliche Wirkungen auf das Expressionssystem. Bei der geringsten hier getesteten Konzentration, 0,25 M, steigern beide zunächst die Aktivität. Dabei steigert Ectoin die Aktivität auf 130 %, Hydroxyectoin sogar auf 180 %. Mit weiterer Erhöhung der Ectoinkonzentration kommt es jedoch zu einer inhibierenden Wirkung während mit Hydroxyectoin die Aktivität ihr Maximum zwischen 500-700 mM Hydroxyectoin (mit bis zu 240 % Aktivität) zeigt. Bei 1 M Hydroxyectoin sinkt dann wieder die Aktivität (siehe Abbildung 52).

3.4.4 Einfluss von Ectoin und Hydroxyectoin auf die zellfreie Protein-Synthese

Weil Ectoin und Hydroxyectoin so interessante, unterschiedliche Ergebnisse geliefert haben, wurden weitere Versuche, insbesondere mit geringeren Konzentrationen, durchgeführt, um die Wirkung weiter zu analysieren.

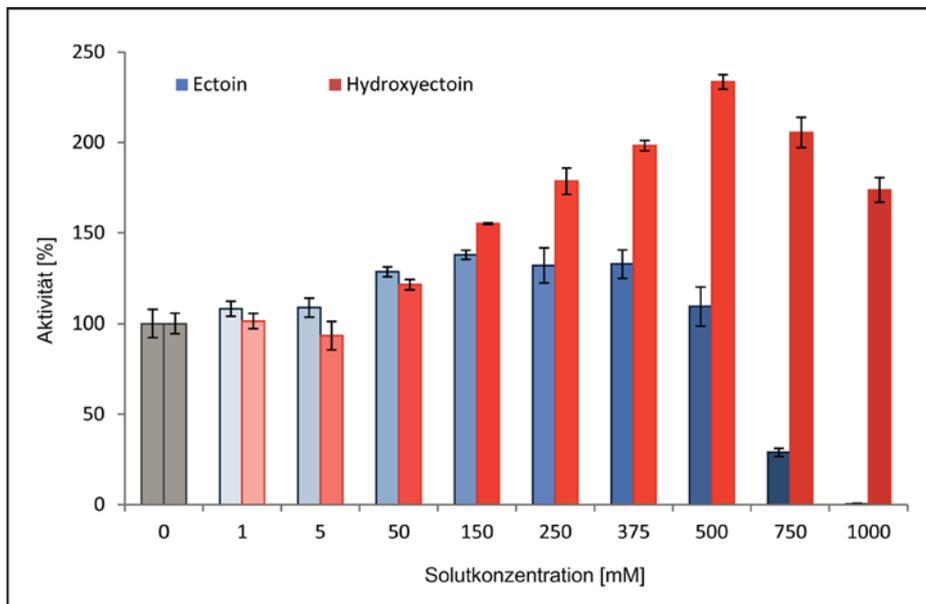


Abbildung 53: Einfluss der Ectoine auf die Expression der Luciferase in der zellfreien Protein-Synthese bei Inkubation bei 30 °C

Die zellfreie Protein-Synthese wurde erneut, mit weiteren Konzentrationen der Ectoine bei 30 °C durchgeführt. Die Aktivität der Kontrolle wurde auf 100 % und die restlichen Messdaten darauf normiert. In blau ist der Effekt ansteigender Konzentrationen Ectoin zu sehen, in rot die Wirkung höherer Hydroxyectoinkonzentrationen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei Reaktionen.

Hier bestätigt sich die konzentrationsabhängige Steigerung der Luciferase-Aktivität durch die Zugabe der Ectoine. Mit Ectoin wird die höchste Steigerung mit 150 mM erreicht. Bei Hydroxyectoin hingegen wird die höchste Aktivität bei 500 mM gemessen. Bei beiden Ectoinen ist bereits bei 50 mM eine Steigerung der Aktivität zu erkennen. Auch hier wird wiederum deutlich, dass die Aktivierung durch Hydroxyectoin deutlich besser funktioniert als mit Ectoin. Durch Zugabe von Hydroxyectoin in einer Endkonzentration von 1000 mM nach Abstoppen der Reaktion durch Kanamycingabe wurde außerdem untersucht, ob Hydroxyectoin einen Einfluss auf die Aktivität der Luciferase selbst hat. Hier zeigte sich eine leichte Verringerung der emittierten Lichtmenge auf etwa 87 % der Aktivität der Kontrollreaktion, die mit der gleichen Menge $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ versetzt wurde um Konzentrationsunterschiede auszuschließen.

Zusätzlich wurde auch der Effekt auf die zellfreie Protein-Synthese während höherer Temperaturen untersucht. Wie in Abbildung 50 gezeigt, hat die Reaktion bei einer Inkubation bei 30 °C ihr Optimum. Da insbesondere Hydroxyectoin bereits in den kalorimetrischen Versuchen eine stabilisierende Wirkung auf die Ribosomen zeigte (Steigerung der Denaturierungsenthalpie ΔH), wurde hier auch die Wirkung der beiden Ectoine auf die zellfreie Protein-Synthese unter höheren Inkubationstemperaturen analysiert.

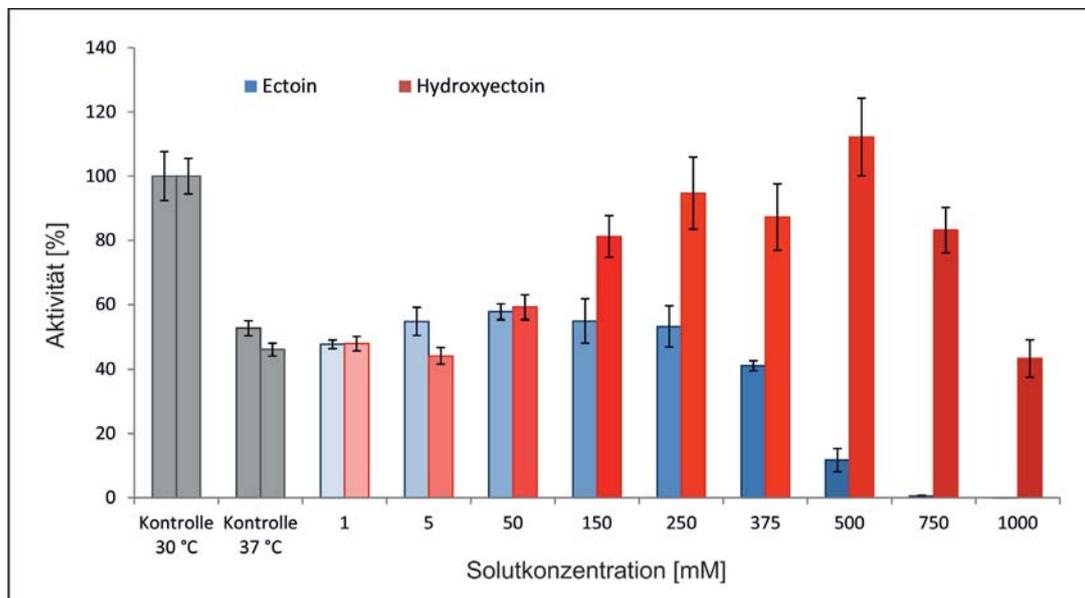


Abbildung 54: Zellfreie Protein-Synthese bei 37 °C mit ansteigenden Ectoin- und Hydroxyectoinkonzentrationen

Die Reaktionen wurden analog zu den Reaktionen in Abbildung 53 angesetzt und anschließend bei 37 °C inkubiert. Neben der Kontrollreaktion die bei 37 °C inkubiert wurde, ist hier auch die Kontrollreaktion gezeigt, die bei 30 °C inkubiert wurde. Auf diese Reaktion wurden die restlichen Daten normiert. In blau sind die mit ansteigenden Ectoinkonzentrationen, in rot die mit ansteigenden Hydroxyectoinkonzentrationen erzielten Aktivitäten der Luciferase dargestellt. Alle Daten stellen die Mittelwerte aus drei Reaktionen dar.

Bei der Inkubation der Reaktion bei 37 °C, also unter Temperaturstress, ist keine Stabilisierung des Systems durch Ectoin mehr erkennbar. Die maximale Aktivität liegt bei 50 mM im Bereich des Fehlers der Kontrolle. Bei Hydroxyectoin hingegen wurde die höchste Aktivität wiederum bei 500 mM detektiert. Bei dieser Konzentration werden ähnliche Luciferasesignale gemessen, wie bei der Kontrollreaktion, die bei lediglich 30 °C inkubiert wurde.

Neben 30 °C und 37 °C wurden auch Reaktionen mit Ectoin und Hydroxyectoin bei 42 °C inkubiert (vgl. Abbildung 73). Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den bereits gezeigten Daten mit niedrigeren Temperaturen. Insgesamt ist jedoch die Menge des exprimierten Proteins bei 42 °C sehr gering, so dass die Lichtausbeuten nicht mit den bisher gezeigten Daten vergleichbar sind.

Aufgrund eines Fehlers während der Aufreinigung von Ectoin und Hydroxyectoin sind außerdem, eigentlich ungeplant, weitere Daten entstanden, die den Einfluss von Salz und Hydroxyectoin auf die zellfreie Protein-Synthese beschreiben. Nachträglich wurde festgestellt, dass eine Charge des verwendeten Soluts mit Salz kontaminiert war. Mit Hilfe der HPLC wurde die tatsächliche eingesetzte Konzentration von Hydroxyectoin bestimmt. Dabei konnte nicht genau bestimmt werden, ob es sich bei dem Salz um NaCl oder KCl handelte, da die Na⁺- und K⁺-Ionen zur gleichen Zeit von der Säule eluieren. Anhand der ebenfalls analysierten Cl⁻-Ionen-Konzentration konnte jedoch auf die Salzkonzentration zurückgeschlossen werden.

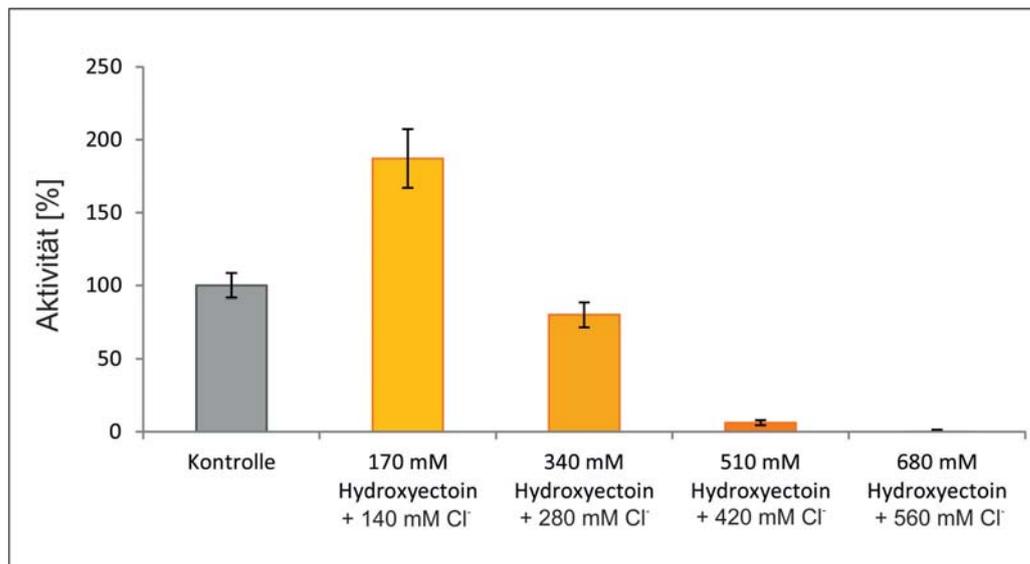


Abbildung 55: Einfluss von Salz und Hydroxyectoin auf die Expression der Luciferase in der zellfreien Protein-Synthese

Dargestellt ist die Aktivität der in der zellfreien Protein-Synthese exprimierten Luciferase in % im Vergleich zur Kontrollreaktion ohne Zusätze. Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert und mit ansteigenden Konzentrationen Hydroxyectoin zusammen mit Salz (KCl oder NaCl, siehe Text) versetzt. Alle Daten sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

Es zeigt sich, dass das System trotz der hohen Salzkonzentration von 140 mM in Kombination mit 170 mM Hydroxyectoin die Luciferase stabil exprimiert und dabei sogar höhere Konzentrationen erreicht werden als in der Kontrolle. Selbst die Zugabe von 280 mM Salz kann durch die gleichzeitige Anwesenheit von 340 mM Hydroxyectoin immer noch das Level der Luciferaseaktivität der Kontrollreaktion gehalten werden. Erst bei weiterer Erhöhung der Salz- und Hydroxyectoinkonzentration sinkt die Aktivität bis hin zu einer kompletten Inhibierung.

3.4.5 Einfluss der Ectoine auf die *in vitro*-Transkription

Um zu bestimmen, welche der Reaktionen der zellfreien Protein-Synthese durch die Zugabe der Ectoine, insbesondere von Hydroxyectoin, stabilisiert werden, wurde im nächsten Schritt eine run-off *in vitro*-Transkription durchgeführt. Dafür wurde das in der zellfreien Protein-Synthese verwendete Plasmid pIVEX2.3d_luc zunächst mit dem Restriktionsenzym *Xho*I linearisiert und anschließend mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase die Luciferase-mRNA transkribiert. Das Transkriptionsprodukt wurde dann in einer denaturierenden Formaldehyd-Gelelektrophorese (FAGE) aufgetrennt.

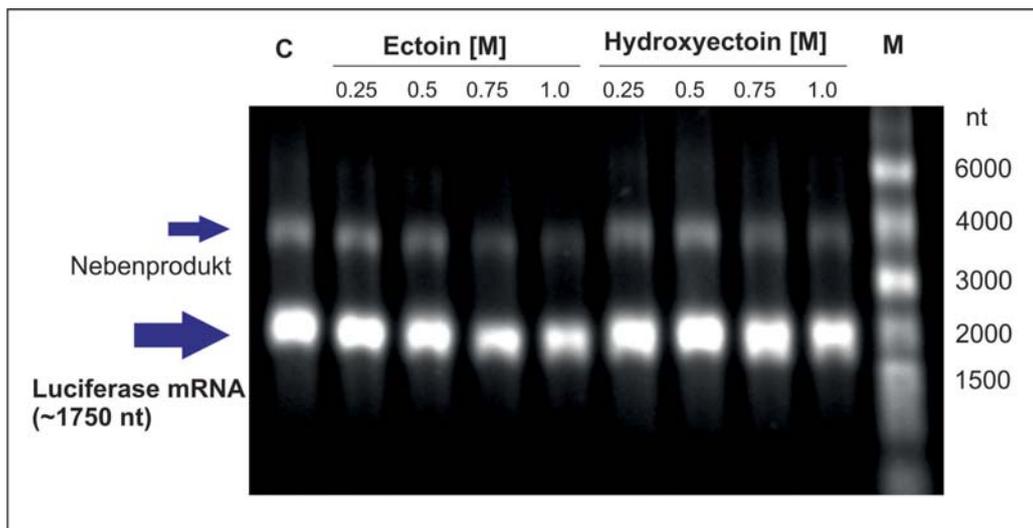


Abbildung 56: Formaldehyd-Gelelektrophorese (1,2 % Agarose) der *in vitro*-Transkription der Luciferase mRNA unter Einfluss von steigenden Ectoin- oder Hydroxyectoinkonzentrationen

Für die Analyse des Einflusses von Ectoin und Hydroxyectoin auf die run-off *in vitro*-Transkription wurde das in der zellfreien Protein-Synthese verwendete Plasmid pIVEX2.3d_luc mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase transkribiert und die mRNA in einer Formaldehyd-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Lauf mit SYBRgold gefärbt. Als Größenstandard wurde ein ssRNA-Marker aufgetragen. Das erwartete mRNA-Fragment der Luciferase hat eine Größe von etwa 1750 Nukleotiden (nt). In die Reaktionen wurden jeweils vier verschiedene Ectoin- oder Hydroxyectoinkonzentrationen, von 0,25 M bis 1,0 M, eingesetzt. Neben dem erwarteten Produkt ist auch eine Bande bei etwa 4000 nt zu erkennen, die in allen Proben auftritt. Die Reaktionen wurden für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert. C = Kontrollreaktion, M = ssRNA-Größenstandard.

Zum Vergleich wurden auch Reaktionen mit unterschiedlichen Ectoin- oder Hydroxyectoinkonzentrationen angesetzt und die Produkte ebenfalls in der FAGE analysiert. Die Reaktion wurde, genau wie in der zellfreien Protein-Synthese, für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert.

Wie aus Abbildung 56 ersichtlich wird, wird durch Zugabe von Ectoin oder Hydroxyectoin die Menge der Luciferase-mRNA-Transkripte während der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase nicht erhöht. Bei hohen Konzentrationen, 750 mM und 1000 mM bei Ectoin bzw. 1000 mM bei Hydroxyectoin, ist sogar eine leichte Abnahme der Transkriptmenge zu erkennen.

Die Reaktionen in Abbildung 56 wurden 90 Minuten lang inkubiert. Es wäre also möglich, dass in einem Teil der Proben die Reaktion früher beendet war als in den restlichen Proben, beispielsweise weil alle eingesetzten Nukleotide bereits verbraucht waren. Bis zum Ende der Inkubation hätten dann auch die restlichen Proben diesen Zustand erreichen können, so dass im Gel kein Unterschied zwischen den Reaktionen zu erkennen ist. Daher wurden die Reaktionen analog zu den in Abbildung 56 analysierten Proben neu angesetzt und dieses Mal bei 30 °C für lediglich 15 Minuten inkubiert. Die Auftrennung in einer FAGE ergab das gleiche Bild wie für die Proben, die 90 Minuten lang inkubiert wurden. Die Zugabe von Ectoin oder Hydroxyectoin zu den *in vitro*-Transkriptionen zeigt also im für die zellfreie Protein-Synthese wichtigen Bereich bis 500 mM Endkonzentration keinen Einfluss auf die Transkriptmenge.

3.4.6 *In vitro*-Transkription von *ectC*

Nachdem die *in vitro*-Transkription für die mRNA der Luciferase etabliert war, wurde zusätzlich noch der Effekt auf eine weitere Transkriptionsreaktion, der für das die Ectoinsynthese-codierenden Gen *ectC*, untersucht. Dabei stellte sich die Frage, ob einerseits auch hier kein Einfluss auf die Transkriptmenge zu sehen ist, ob also der Ectoin- oder Hydroxyectoinfluss während der Reaktion wirklich nicht gegeben ist. Andererseits könnte Ectoin (und eventuell auch Hydroxyectoin) als Endprodukt der Reaktion der Ectoinsynthese einen Einfluss auf die Konformation der DNA oder RNA haben und so die Reaktion hemmen oder aktivieren.

Als Expressionsplasmid wurde pET22b(+)_*ectC*_lang_PstI verwendet, da hier das Gen der Ectoinsynthese aus *Pseudomonas stutzeri* unter Kontrolle des T7 RNA-Promotors steht und die Aktivität des exprimierten Enzyms bereits nachgewiesen wurde (Seip, 2009). Auch diese Reaktion wurde als run-off Reaktion durchgeführt. Das Plasmid wurde zuvor ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *XhoI* linearisiert. Die Schnittstelle für *XhoI* liegt hier direkt hinter dem Stoppcodon des Gens. Die Ansätze wurden, genau wie bei

der mRNA-Transkription der Luciferase, für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert und anschließend die Transkripte in einer denaturierenden FAGE (hier nicht gezeigt) sowie in einem nicht denaturierenden Standard-Agarosegel analysiert (siehe Abbildung 58).

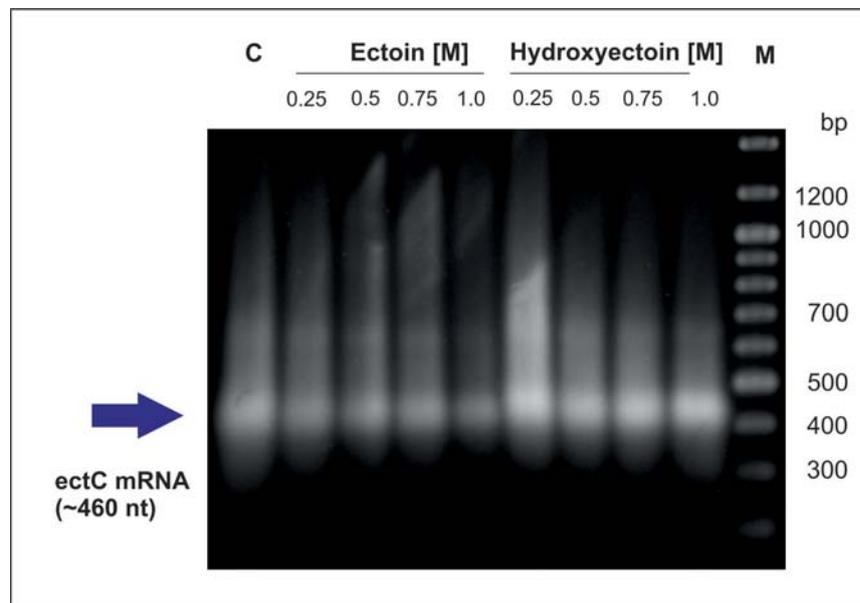


Abbildung 57: Nicht-denaturierendes Agarosegel (1 %ig) zur Analyse der *in vitro*-Transkription von pET-22b(+)_ectC_lang_PstI

Das Expressionsplasmid pET-22b(+)_ectC_lang_PstI codiert für das Gen der Ectoinsynthese (*ectC*) aus *Pseudomonas stutzeri* unter Kontrolle des T7 Promotors (Seip, 2009). Für die *in vitro*-Transkription wurde das Plasmid zunächst mit Hilfe des Restriktionsenzym *XhoI* linearisiert und anschließend mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase das Gen transkribiert. Die erwartete Größe der transkribierten mRNA liegt bei etwa 460 Nukleotiden. Neben der Standardreaktion wurden auch *in vitro*-Transkriptionsreaktionen mit ansteigenden Ectoin- oder Hydroxyectoinkonzentrationen, von 0,25 M bis 1,0 M, versetzt. Die wurden die Transkripte auf ein nicht-denaturierendes Agarosegel aufgetragen, um festzustellen, ob die unterschiedlichen Ectoin- und Hydroxyectoinkonzentrationen eine Konformationsänderung der mRNA bewirken und die Transkripte somit ein verändertes Laufverhalten zeigen. C = Kontrollreaktion, M = DNA-Größenstandard.

Die Auftrennung der *ectC*-Transkripte im nicht-denaturierenden Agarosegel zeigt gleichzeitig zwei wichtige Informationen: Einerseits zeigt sich, dass sich die Menge der Transkripte mit Ectoin leicht verringert im Vergleich zur Kontrolle und mit Hydroxyectoin leicht erhöht. Andererseits zeigt sich aber auch, dass, zumindest unter den hier gewählten Bedingungen, keine Veränderung im Laufverhalten der Transkripte durch den Einfluss von Ectoin oder Hydroxyectoin zu beobachten ist.

3.4.7 Analyse von Polysomen-Profilen

Um weiteren Einblick in die Wirkung von Hydroxyectoin auf die zellfreie Protein-Synthese zu gewinnen wurden die Polysomen-Profile der Reaktionen analysiert. Dafür wurden zunächst Reaktionen im größeren Maßstab (50 µL) angesetzt und anschließend

wiederum bei 30 °C, jedoch lediglich für 30 Minuten, inkubiert. Diese Reaktionen wurden durch Zugabe von Kanamycin abgestoppt und vorsichtig auf vorbereitete, vorgekühlte Saccharosegradienten (10 %-40 % Saccharose (w/v)) überschichtet. Diese wurden anschließend für vier Stunden in der Ultrazentrifuge bei 115.000 x g (30.000 rpm in SW32.1 Ti) zentrifugiert. Zur Analyse wurden die Gradienten, mit der höchsten Saccharosekonzentration beginnend, durch ein UV-Photometer gesaugt und die Absorption bei 260 nm fortlaufend detektiert.

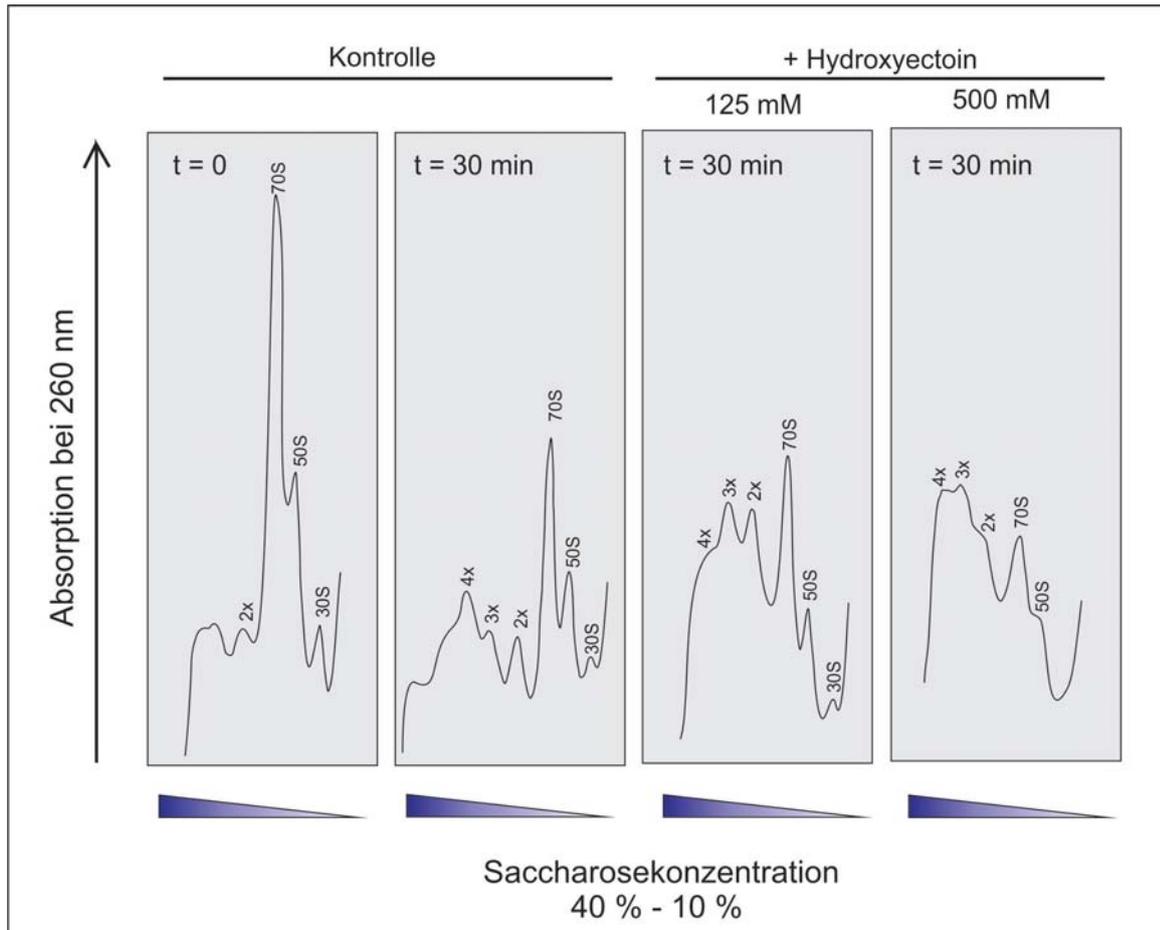


Abbildung 58: Analyse der Polysomen-Profile von Reaktionen der zellfreien Protein-Synthese mit Hydroxyectoin

50 μ L-Reaktionen der zellfreien Protein-Synthese wurden für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert und die Reaktionen dann durch die Zugabe von Kanamycin inhibiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde dann auf Saccharosegradienten (10 %-40 % (w/v)) überschichtet und die Gradienten bei 115.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten mit Hilfe eines UV-Photometers bei 260 nm analysiert. Dargestellt sind hier vier unterschiedliche Polysomen-Profile aus Reaktionen, die unter verschiedenen Bedingungen inkubiert wurden. Die beiden linken Profile sind die Kontrollen. Die Probe des ersten Profils wurde direkt nach Zugabe der letzten Komponente mit Kanamycin inhibiert, die Probe des zweiten Profils wurde für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert und erst dann abgestoppt. Bei den beiden rechten Profilen wurde Hydroxyectoin zur Reaktion gegeben, 125 mM beim dritten Profil, 500 mM beim vierten. Die Zahlen an den Peaks geben an, welche ribosomale Untereinheit bzw. wie viele Ribosomen pro Molekül mRNA gebunden sind.

So wurden Polysomen-Profile analysiert, von Reaktionen, die unter vier verschiedenen Bedingungen inkubiert wurden. Als Kontrollen wurden zwei verschiedene Reaktionen verwendet, die beide alle notwendigen Komponenten der Reaktion enthielten: eine Reaktion wurde direkt nach Zugabe der letzten Komponente durch Kanamycin inhibiert, die zweite Reaktion wurde, wie die Proben auch, 30 Minuten bei 30 °C inkubiert und dann die Ribosomen inhibiert. Für die Wirkung von Hydroxyectoin wurden ebenfalls verschiedene Reaktionsbedingungen analysiert. Die erste Reaktion wurde mit 125 mM Hydroxyectoin, die zweite mit 500 mM Hydroxyectoin supplementiert.

In der ersten Kontrolle, die nicht inkubiert wurde, sind verhältnismäßig viele 70S-Komplexe zu sehen und weniger Polysomen, also mehrerer Ribosomen, die an ein Molekül mRNA gebunden sind. Dies verändert sich in der zweiten Kontrolle. Hier verringert sich die Anzahl der 70S-Komplexe und es werden mehr Disomen (zwei Ribosomen pro mRNA), Trisomen und Tetrasomen (drei bzw. vier Ribosomen pro mRNA) detektiert. Durch die Zugabe von 125 mM Hydroxyectoin vergrößert sich insgesamt der Peak dem die Di-, Tri- und Tetrasomen zugrunde liegen. Dies kann bei weiterer Erhöhung der Hydroxyectoinkonzentration auf 500 mM weiter bestätigt werden. Es scheinen also unter Hydroxyectoineinfluss mehr Ribosomen pro Molekül mRNA gebunden zu werden.

4 Diskussion

Seit der Entdeckung des ersten kompatiblen Solut Betain eines halophilen Organismus vor mehr als drei Jahrzehnten (Galinski & Trüper, 1982) wurde viel Energie und Mühe darauf verwendet, die Wirkung dieser Moleküle zu untersuchen. Sowohl durch ihre stabilisierende Wirkung auf Proteine als auch die wachstumsfördernde Eigenschaft auf prokaryotische Zellen (vgl. 1.3) sind sie mittlerweile in den Fokus der biotechnologischen und auch der pharmazeutischen Industrie gerückt (Lentzen und Schwarz, 2006). Während jedoch Proteine stabilisiert werden, scheinen die Solute DNA eher zu destabilisieren (Lapidot *et al.*, 1999; Kurz, 2008). Es wird vermutet, dass im Cytoplasma stets eine gewisse Salzkonzentration vorhanden ist (Galinski, unveröffentlicht). Da Ionen die Stabilität (Schmelzpunkt) der DNA enorm steigern (Kurz, 2008), ist die destabilisierende Wirkung der Solute sinnvoll, damit DNA- und RNA-Polymerasen die DNA weiterhin aufschmelzen und transkribieren können.

Die Wirkung der kompatiblen Solute auf RNA ist nur wenig untersucht. Insgesamt scheint die Stabilität der RNA von der ionischen Umgebung (insbesondere der Konzentration der Mg^{2+} -Ionen), dem eingesetztem Solut und auch der Konformation der RNA selbst abzuhängen (Lambert und Draper, 2007; Lambert *et al.*, 2010). Dabei sind die unterschiedlichen Konformationen vielseitiger als von DNA. Während DNA durch den doppelsträngigen, antiparallelen Aufbau normalerweise in Helices vorliegt, kann RNA einzelsträngig, in Doppelsträngen oder auch anderen Konformationen wie drei- oder viersträngigen Helices vorliegen (Moore, 1999), die wiederum mit dem restlichen RNA-Molekül interagieren können und damit eine komplexere Struktur ergeben als die DNA-Helices. In Ribosomen werden diese komplizierten dreidimensionalen Strukturen der ribosomalen RNA durch die ribosomalen Proteine stabilisiert (Ban *et al.*, 2000). Diese sorgen dafür, dass die sich abstoßenden negativen Ladungen der Phosphatrückgrate nicht zum Auseinanderbrechen der katalytisch aktiven rRNA führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung kompatibler Solute auf diese komplexen Biomoleküle untersucht und dabei der Bogen gespannt von der Kalorimetrie an intakten Zellen sowie isolierten Ribosomen bis hin zur zellfreien Expression eines Reporterproteins unter Soluteinfluss. Ribosomen wurden also einerseits als Modell für die Wirkung kompatibler Solute auf natürliche RNA-Proteinkomplexe und andererseits in ihrer physiologischen Funktion als Orte der Proteinbiosynthese betrachtet.

4.1 Kalorimetrie an intakten Zellen und Zellextrakten

Für die Kalorimetrie an intakten Zellen und Zellextrakten wurde insbesondere die Arbeit von Mackey als Anhaltspunkt verwendet (Mackey *et al.*, 1991). Mackey hat sowohl intakte Zellen als auch einzelne Zellbestandteile kalorimetrisch untersucht und damit erstmals Anhaltspunkte geliefert, bei welcher Temperatur welche Zellkomponenten denaturieren (vgl. Abbildung 5). Diese, als auch eine weitere Studie von Anderson *et al.*, hatten das Ziel die Temperatur zu bestimmen, bei der die Zellen thermisch inaktiviert werden. Dies ist insbesondere in der Lebensmittel-verarbeitenden Industrie wichtig. Mackey und Anderson konnten einen Zusammenhang identifizieren zwischen der Anzahl überlebender Zellen und einem irreversiblen Denaturierungsvorgang zwischen 55 °C und 60 °C. Dank weiterer Untersuchungen von Mackey konnten diese Denaturierungsereignisse der Denaturierung der Ribosomen zugeordnet werden.

Insgesamt muss bei allen betrachteten kalorimetrischen Daten bedacht werden, dass es sich, sowohl bei den Messungen an intakten Zellen und Zelllysaten als auch bei den kalorimetrischen Messungen an isolierten Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten, immer um die Analyse der Denaturierung hochkomplexer Strukturen handelt. So zeigt jede Messung immer die Summe der endothermen und exothermen Vorgänge, so dass eine Reaktion auch von einer anderen überdeckt werden kann. Die beobachteten thermodynamischen Effekte sind so auch immer der Nettoeffekt zwischen verschiedenen Gruppen im Molekül und der Interaktion dieser Gruppen mit dem Solvens.

4.1.1 Kalorimetrie an intakten Zellen und Zelllysaten angezogen in verschiedenen Medien

Im Unterschied zu den bisher publizierten kalorimetrischen Messungen von Mackey, Anderson und später auch Pleitner wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst auch der Einfluss des Anzuchtmediums untersucht (Mackey *et al.*, 1991; Anderson *et al.* 1993, Pleitner *et al.*, 2012). Alle Autoren ziehen ihre Zellen in Komplexnährmedien an und messen sie auch teilweise in diesem. Da in der vorliegenden Arbeit die Zellen gezielt mit kompatiblen Soluten beladen werden sollten, um den Effekt dieser Moleküle *in vivo* auf die thermische Stabilität der zellulären Komponenten zu untersuchen, wurde im ersten Schritt untersucht, ob das Anzuchtmedium der Zellen einen Effekt auf den Verlauf der Messung zeigt. Dabei wurde im Bereich zwischen 30 °C-55 °C (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10) ein interessanter Unterschied detektiert. Während die Messung in Komplexmedium den Messungen von Mackey *et al.* und Pleitner *et al.* ähnelt, zeigt die Messung der Zellen aus Minimalmedium einen exothermen Verlauf in diesem Bereich. In beiden Messungen ist diese Reaktion jedoch irreversibel wie die dargestellten zweiten Upscans zeigen.

Da in diesem Bereich sowohl der Übergang der Membranen und Lipide in den flüssigen Zustand als auch die Denaturierung zumindest der kleinen ribosomalen Untereinheit vermutet wurde (vgl. Abbildung 5), wurden die Zellen im nächsten Schritt erneut in diesen Medien angezogen und vor der DSC-Messung lysiert. Da die Proben nicht abzentrifugiert wurden, kann zwar so nicht der Phasenübergang der Lipide an sich aus den Messungen ausgeschlossen werden, es wurde jedoch vermutet, dass die detektierte Reaktion in Zusammenhang mit dem Aufplatzen der Zellen und der Vermischung des Cytoplasmas mit dem umgebenden Medium steht. Die Analyse der Zelllysate bestätigte diese Vermutung allerdings nicht (vgl. Abbildung 11). Zwar verschiebt sich in den Zellen aus Komplexmedium der den Ribosomen zugeordnete Peak zu geringeren Temperaturen, der grundsätzliche Verlauf im Bereich zwischen 30 °C - 55 °C ändert sich jedoch nicht.

4.1.2 Thermische Stabilität zellulärer Komponenten in supplementierten Zellen

Im nächsten Schritt wurden die Zellen in Minimalmedium angezogen und gezielt mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten supplementiert. Da *E. coli* K12 nicht in der Lage ist aktiv Trehalose aufzunehmen (Louis *et al.*, 1994), wurden die Zellen hier mit Betain, Ectoin und Hydroxyectoin supplementiert. Die Messungen dieser supplementierten Zellen zeigen wiederum ein neues Bild. Hier trat mit allen drei untersuchten kompatiblen Soluten ein Peak (gekennzeichnet mit m_1) bei etwa 53 °C auf (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 14), der bei den Proben aus un-supplementiertem Zellen nicht beobachtet wurde. Nach Mackey könnte es sich bei diesem Peak um die Denaturierung der kleinen ribosomalen Untereinheit handeln (Mackey *et al.*, 1991). Dies spricht für eine Senkung der Schmelztemperatur der 30S Untereinheit durch Betain, Ectoin und Hydroxyectoin.

Pleitner *et al.* zeigten, dass sich bei Zellen, die bei einer Salinität von 4 % (w/v) NaCl angezogen wurden, der den Ribosomen zugeordnete Peak zu höheren Temperaturen verschiebt. Zudem beobachteten sie bei diesen Zellen eine höhere Temperaturtoleranz als bei Zellen, die ohne den Zusatz von NaCl angezogen wurden (Pleitner *et al.*, 2012). Geht man also davon aus, dass die irreversible Denaturierung der Ribosomen die maximale Überlebenstemperatur bestimmt (Pace und Campbell, 1967; Gaucher *et al.*, 2008), so sprechen diese Ergebnisse für die Stabilisierung der Ribosomen in Folge von durch die erhöhten Salzkonzentrationen in der Zelle hervorgerufenen Anpassungen. Pleitner *et al.* kommen zu dem Schluss, dass diese Stabilisierung der Ribosomen durch die intrazellulär akkumulierten kompatiblen Solute bewirkt wird. Allerdings haben Pleitner *et al.* die Zellen nicht nur in Komplexmedium angezogen, und somit erwartungsgemäß eine recht komplexe Zusammensetzung der cytoplasmatischen Solute beobachtet (vgl. Pleitner *et al.*, 2012, supplement data), sondern auch Kulturen aus der stationären

Wachstumsphase verwendet und nicht, wie für die Analyse von Ribosomen üblich, Kulturen aus der exponentiellen Phase. In der stationären Phase jedoch schützen Zellen ihre Ribosomen vor enzymatischem Abbau beispielsweise durch die Bildung von 100S-Komplexen (vgl. 1.6.4). Ein weiteres interessantes Detail ist, dass durch die Verwendung von Übernacht-Kulturen nicht sichergestellt werden kann, dass die Zellen sich bereits gleich lang in der stationären Phase befanden. So wäre es möglich, dass die Kulturen, die bei 0 % NaCl angezogen wurden, bereits länger stationär waren, als die Kulturen, die bei 4 % NaCl angezogen wurden. Vermutlich beschreiben die von Pleitner *et al.* gezeigten Messungen daher den Effekt einer komplexen Mischung kompatibler Solute auf Ribosomen aus möglicherweise unterschiedlich gestressten Zellen.

Der einzige weitere Peak, der in den kalorimetrischen Messungen an intakten Zellen eindeutig zugeordnet werden kann, ist der Peak der Denaturierung der genomischen DNA. Die Peaks liegen bei allen Zellen aus Minimalmedium, ob supplementiert oder nicht, mit etwa 97 °C etwa vier Grad Celsius höher als bei den Zellen aus Komplexmedium. Die Analyse des Solutgehalts der Proben zeigt, dass im Unterschied zu den Proben aus Komplexmedium, die nur geringe Mengen Betain enthielten, die Zellen aus Minimalmedium höhere Konzentrationen kompatibler Solute akkumulierten (vgl. Abbildung 13). Dies ist nicht verwunderlich, da die Zellen im Komplexmedium ohne zusätzliche Salze angezogen wurden, während das Minimalmedium immerhin 1 % (w/v) NaCl enthielt. Somit scheint zunächst der Zusammenhang zwischen der erhöhten Solutkonzentration und der höheren DNA-Schmelztemperatur zu bestehen, was den bisher diskutierten Daten widerspräche. Andererseits könnte auch das durch das Medium eingebrachte NaCl selbst einen Einfluss auf die Denaturierungstemperatur der DNA nehmen. Das Mineralsalzmedium enthielt 1 % NaCl (w/v) (entspricht 170 mM) und bereits für 100 mM NaCl konnte eine Schmelzpunktsteigerung von dsDNA um etwa 9 °C gezeigt werden (Kurz, 2008). Da kompatible Solute den Schmelzpunkt wiederum senken, ist dies eine wahrscheinliche Erklärung für die Verschiebung des DNA-Peaks.

4.2 Kalorimetrie an isolierten Ribosomen

Um die Frage des Einflusses der kompatiblen Solute auf die Thermostabilität der Ribosomen weiter zu verfolgen, musste das Analysesystem vereinfacht werden. Bei der Analyse der Denaturierung der intakten Zellen kann einerseits die intrazelluläre Konzentration der kompatiblen Solute nicht gezielt gesteuert und zudem andererseits auch nur über die Erhöhung der externen Salinität variiert werden. Die Erhöhung der externen Salinität allerdings würde wiederum andere zelluläre Prozesse aktivieren, die den Vergleich der Daten noch schwieriger machen. Weiterer Nachteil der Messung

intakter Zellen ist, dass nur die Solute analysiert werden können, die von den Zellen aktiv akkumuliert werden. Somit ist insbesondere die Analyse von Trehalose schwierig, da *E. coli* K12 nicht in der Lage ist Trehalose aus dem Medium aufzunehmen (Louis *et al.*, 1994) und zudem zu Beginn der Arbeiten noch kein trehalosedefizienter *E. coli*-Stamm vorlag. Somit hätte der Einfluss der intrazellulär vorhandenen Trehalose immer in alle Betrachtungen mit einbezogen werden müssen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Schritt weitergegangen und die Stabilität isolierter Ribosomen sowie der Einfluss kompatibler Solute auf diese untersucht.

Dabei liegt es zunächst nahe die Thermostabilität der Ribosomen mit ihrer Funktionalität gleichzusetzen. Allerdings sind die Ribosomen für die Zellen so immens wichtige Makromoleküle, dass die Zellen unterschiedliche Wege zur Stabilisierung entwickelt haben (z.B. Ablagerung in 100S-Partikel, vgl. 1.6.4). Die Bildung von 100S-Komplexen beispielsweise geht zudem mit einer strukturellen Veränderung der Ribosomen einher (Polikanov *et al.*, 2012). Die vorliegende Arbeit untersucht jedoch lediglich die Stabilität der Ribosomen, unterschiedliche Konformationen konnten dabei nicht betrachtet werden. Daher wurden die Ribosomen stets im gleichen Medium angezogen und in der gleichen Wachstumsphase geerntet, um möglichst vergleichbare Proben zu erhalten. Gleichzeitig werden die Ribosomen, zumindest in diesem ersten Teil der Betrachtung, nicht in ihrer Funktionalität als Orte der Proteinsynthese betrachtet, sondern eher als biologische Makromoleküle, die sowohl einen Protein- als auch einen RNA-Anteil enthalten. Der Einfluss der kompatiblen Solute auf diese Makromoleküle soll daher hier zunächst ohne den Hintergrund der Funktionalität betrachtet werden.

4.2.1 Thermostabilität isolierter Ribosomen aus *E. coli* und *H. elongata*

Die Isolierung von kruden 70S-Ribosomen aus *E. coli* K12 konnte erfolgreich etabliert und erstmals auf den halophilen Organismus *H. elongata* übertragen werden. Mit diesen Ribosomen wurden zunächst kalorimetrische Bestimmungen ihrer Thermostabilität ohne Soluteinfluss durchgeführt. Die Thermogramme zeigen bei den Ribosomen beider Organismen keine reversiblen Denaturierungen (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 22). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das Einfrieren der Ribosomen nach der Aufreinigung keinen Einfluss auf die Thermostabilität hat (vgl. Abbildung 20).

Für die kalorimetrischen Analysen wurden die Ribosomen in Lagerpuffer nach Mackey *et al.* verdünnt. Dieser enthält 10 mM Mg^{2+} -Ionen, die sowohl für die Stabilität der ribosomalen Untereinheiten als auch für den Zusammenhalt der 70S-Komplexe wichtig sind (u.a. Chao, 1957; Tissières, 1959). Tabelle 16 zeigt die T_m der drei Signale, die mit *E. coli*- und *H. elongata*-Ribosomen beobachtet wurden. Die in der vorliegenden Arbeit

beobachteten Denaturierungstemperaturen liegen im gleichen Temperaturbereich wie die von Mackey *et al.* berichteten. Der Unterschied ergibt sich vermutlich durch die Verwendung gänzlich verschiedener kalorimetrischer Systeme. Die Messungen von Mackey *et al.* wurden in einem Kalorimeter durchgeführt, in dem Pasten gemessen werden, während in der vorliegenden Arbeit ein Mikrokalorimeter verwendet wurde, das nur flüssige Proben messen kann. Weiter sind in dieser Tabelle die Denaturierungstemperaturen angegeben, die nach Bonincontro *et al.* bei der kalorimetrischen Bestimmung von Ribosomen gemessen werden (Bonincontro *et al.*, 1998). Hier werden, im Gegensatz zu Mackey und der vorliegenden Arbeit, lediglich zwei Denaturierungstemperaturen genannt. Allerdings verwendet Bonincontro mit 0,8 mM eine sehr viel geringere Mg^{2+} -Konzentration für die Analyse der Ribosomen. In einer Arbeit von 1993 zeigt Bonincontro, dass die Reduzierung der Mg^{2+} -Ionenkonzentration nicht unbedingt zur Dissoziation der 70S-Komplexe führt, auch wenn die Autoren selbst bemerken, dass durch die Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration sowohl die Untereinheiten als auch die 70S-Komplexe mehr Ethidiumbromid binden können, die rRNA also offener zugänglich ist (Bonincontro *et al.*, 1993). Möglicherweise verändert die geringe Mg^{2+} -Konzentration also die Struktur des Ribosoms, so dass in den anschließenden Messungen lediglich zwei Übergänge detektiert werden können.

Durch Abstoppen der Messungen konnte gezeigt werden, dass die ribosomalen Proteine der 30S- bzw. 50S-Untereinheit nach dem ersten bzw. zweiten Peak der Reaktion denaturiert vorliegen (vgl. Abbildung 24 und 26). Wie sowohl Mackey *et al.* als auch Leon *et al.* zeigten, ist die 30S-Untereinheit instabiler als die 50S-Untereinheit (Leon und Brock, 1967; Mackey *et al.*, 1991). Für den dritten Peak wurde zunächst angenommen, es handele sich um die Denaturierung von 70S-Ribosomen. Dagegen sprechen jedoch die angefertigte SDS-PAGE, die nur wenige Proteine in der entsprechenden Probe aufweist (vgl. Abbildung 25) und andererseits Beobachtungen zur Stabilität bakterieller Ribosomen, die bereits in den 1960er Jahren publiziert wurden (Tamaoki und Miyazawa, 1966). Die Autoren zeigen, dass die Inkubation von *E. coli*-Ribosomen bei erhöhten Temperaturen zur Dissoziation der 70S-Komplexe führt. Bei der DSC-Messung werden die kruden 70S-Ribosomen, über längere Zeit bei höheren Temperaturen inkubiert und die Dissoziation in die Untereinheiten ist demnach wahrscheinlich.

Somit stellt sich die Frage, welcher Teil der Ribosomen beim zweiten und dritten Peak denaturiert. Die SDS-PAGE zeigt die denaturierten ribosomalen Proteine der beiden Untereinheiten. Möglicherweise denaturieren diese Proteine während dieser ersten beiden endothermen Prozesse, lösen sich aber nicht von den rRNAs ab. Die dritte Denaturierungsreaktion könnte dann die Denaturierung der rRNA sein. Zwar wurde für

die Denaturierung der rRNA eine Reversibilität des Aufschmelzprozesses beobachtet (Abbildung 26), die in den Messungen mit kruden Ribosomen nicht beobachtet wurde, es wäre jedoch denkbar, dass die ribosomalen Proteine auch nach der Denaturierung noch an die rRNA gebunden sind und somit eine Renaturierung verhindern.

Interessant ist jedoch, dass bei der Denaturierung isolierter 30S-Untereinheiten ebenfalls nur ein Peak detektiert wird, während es bei der Denaturierung der 50S-Untereinheiten ebenfalls zwei Peaks sind (vgl. Abbildungen 43 und 44). Diese drei Peaks zusammengenommen ergeben die drei Peaks, die bei der Denaturierung der 70S-Ribosomen detektiert werden. Es stellt sich allerdings die Frage, wenn die rRNA getrennt von den Proteinen der jeweiligen Untereinheit denaturiert, warum wird dann in der Analyse der Thermostabilität der 30S-Untereinheit nur ein Peak detektiert? In einer Publikation von Tal 1969 wird diskutiert, dass die Ribosomen eventuell in mehreren Schritten aufschmelzen (Tal, 1969), indem die Ribosomen zunächst aus ihrer kompakten Struktur in eine offenere Struktur übergehen, die aus rRNA besteht an die die ribosomalen Proteine noch angebunden sind. Dazu passen die abgebrochene Messung der 50S-Untereinheit in Kombination mit der SDS-PAGE und der FAGE in Abbildung 43. In der SDS-PAGE werden sowohl in der denaturierten als auch in der nativen Fraktion Proteine detektiert. In der FAGE hingegen ist insbesondere in der denaturierten Probe eine stark leuchtende, weitläufige Bande zu erkennen. Der für die Färbung der FAGE verwendete Farbstoff SYBR Gold kann auch in geringem Maße Proteine anfärben (Firma Invitrogen, persönliche Mitteilung). Allerdings zeigt die SDS-PAGE eine ähnliche Proteinkonzentration in beiden Proben, die in der FAGE nur geringfügig sichtbar ist. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Bande von der rRNA stammt. Möglicherweise sind die denaturierten Proteine noch an die rRNA komplexiert. Dies würde auch das veränderte Laufverhalten erklären, da die 23S-rRNA eigentlich eine Größe von rund 2900 nt aufweist.

Ein auffälliger Unterschied zwischen den DSC-Messungen an Ribosomen von *E. coli* und *H. elongata* fällt bei der Betrachtung der Reaktionsenthalpien ins Auge. Während zur Denaturierung der *E. coli*-Ribosomen ohne zugesetzte Solute die Reaktion etwa 22000 kcal/mol verbraucht, denaturieren die *H. elongata*-Ribosomen mit lediglich 11500 kcal/mol. Dabei könnte es sich jedoch um ein Artefakt der Messungen handeln. Beim Vergleich der Abbildung 22 mit Abbildung 23 zeigt sich, dass nach der Denaturierung des 3. Peaks möglicherweise eine weitere Denaturierungsreaktion stattfindet, die so in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Würde die Basislinie während der Kurvenanpassung also anders gelegt, läge die Denaturierungsenthalpie der

H. elongata Ribosomen deutlich höher. Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, welche Reaktion diesen Peak verursacht.

Die für die Stabilität der Ribosomen außerdem wichtige Mg^{2+} -Ionenkonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit nicht variiert. Stattdessen wurde durch die Zugabe kompatibler Solute untersucht, ob diese durch die Modulation des Lösungsmittels einen eher stabilisierenden oder eher destabilisierenden Einfluss auf die thermische Stabilität der Ribosomen haben. Da Mg^{2+} -Ionen jedoch eine wichtige Rolle für die Konformation der rRNA spielen (Klein *et al.*, 2004), kann die Veränderung der Konzentration auch zu einer Veränderung der Stabilität des Ribosomenkomplexes und damit des Denaturierungsverhaltens führen. Wie in den Messungen mit isolierten ribosomalen Untereinheiten gezeigt werden konnte, denaturieren die Untereinheiten bei verringerten Mg^{2+} -Konzentrationen früher (vgl. Abbildungen 42 und 44), Messungen nach Mackey *et al.*, in Tris-HCl-Puffer mit 1 mM $MgCl_2$).

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten kalorimetrischen Messungen an den kruden 70S-Ribosomen wurden in einem Tris-basierten Puffer nach Mackey *et al.* durchgeführt. Im Prinzip wird Tris-Puffer in kalorimetrischen Analysen jedoch ungern verwendet, da der pH-Wert des Puffers stark von der Temperatur abhängt (Good *et al.*, 1966). Da die Ionenzusammensetzung aber ein immens wichtiger Faktor bei der Bestimmung der Stabilität von Nukleinsäuren ist (Draper, 2004; Lambert und Draper, 2007; Kurz, 2008) und in allen publizierten Daten zur Thermostabilität bakterieller Ribosomen mit Tris-Puffern gearbeitet wurde (Mackey *et al.*, 1991; Bonincontro *et al.*, 1998; Blasi *et al.*, 2000), wurden die hier gezeigten Messungen zur besseren Vergleichbarkeit der Daten ebenfalls in diesem Puffer durchgeführt. Die Analyse der Thermostabilität der Ribosomen sollte jedoch in weiteren Arbeiten auch in anderen Puffersystemen untersucht werden. Lediglich bei den Messungen isolierter ribosomaler Untereinheiten wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderes Puffersystem (HEPES-Puffer) verwendet. Es zeigte sich, dass die Schmelztemperaturen beider ribosomaler Untereinheiten in diesem Puffer höher und damit näher an den mit kruden 70S-Ribosomen detektierten Werten lagen. Andererseits enthielt dieser Puffer auch 6 mM Mg^{2+} , im Vergleich zu 1 mM im Tris-HCl-Puffer. Zudem wurde im Aufreinigungsprotokoll mit dem HEPES-Puffer auf die Verwendung von Cl^- -Ionen verzichtet und stattdessen Acetat als Gegenion verwendet. Insgesamt stellt sich damit auch die Frage, ob der Einfluss des pH-Wertes (durch die höhere pH-Wert-Konstanz des HEPES-Puffers) auf die Stabilität der Ribosomen zweitrangig ist im Vergleich zum Einfluss der verwendeten Mg^{2+} -Konzentration (Cox *et al.*, 1972). Zwar verwenden Bonincontro *et al.* auch geringere Mg^{2+} -Konzentrationen, andererseits messen sie, wie oben bereits diskutiert, in

Pasten. Für detailliertere Aussagen müssen weitere Analysen erfolgen, die die Abhängigkeit der ribosomalen Stabilität von der Temperatur und dem pH-Wert (dem Puffersystem) in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Ionenkonzentration bestimmen.

Die Denaturierungstemperatur der Ribosomen wird in der Literatur oftmals mit der maximal tolerierten Temperatur der Zellen korreliert (Pace und Campbell, 1967; Anderson *et al.*, 1991; Stephens und Jones, 1993). In *E. coli* und *H. elongata* denaturieren die Proteine der 30S-Untereinheit bei einer Temperatur von etwa 65 °C. Dies scheint weit über der tolerierten Temperatur zu liegen und frühere Studien bestätigen, dass diese Temperatur je nach untersuchtem Organismus um bis zu 30 °C höher liegen kann als die maximal tolerierte Temperatur (Pace und Campbell, 1967). Für *E. coli* konnte eine neuere Studie jedoch zeigen, dass die Zellen, je nach vorheriger Behandlung, selbst bei 60 °C noch Wachstum aufweisen können (van Derlinden *et al.*, 2010). In Hitzeschock-Experimenten an stationären *E. coli*-Kulturen konnte Sell (unpublizierte Daten, persönliche Kommunikation) zeigen, dass die Zahl der Zellen sich bei einer 6 minütigen Inkubation bei 60 °C um lediglich 0,55 log cfu/mL reduzierte. Zwar wurden diese Versuche unter der Einwirkung von 3 % NaCl (w/v) durchgeführt, trotzdem korrelieren diese Temperaturen mit der Denaturierungstemperatur der ribosomalen 30S-Untereinheit erstaunlich gut.

4.2.2 Einfluss kompatibler Solute auf die Thermostabilität isolierter Ribosomen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der kompatiblen Solute Trehalose, Saccharose, Betain, Ectoin und Hydroxyectoin auf die Thermostabilität bakterieller Ribosomen untersucht. Für alle ausgewählten Solute liegen Daten zur Stabilisierung von Proteinen *in vitro* vor, nur für manche sind Daten zum Effekt auf RNA verfügbar (unter anderem: Lippert und Galinski, 1992; Göller und Galinski, 1999; Knapp *et al.*, 1999; Lambert und Draper, 2007).

Die beiden Zucker **Trehalose** und **Saccharose** zeigten auf die Ribosomen beider untersuchten Spezies, *E. coli* K12 und *H. elongata* Wt, und auch auf die isolierten ribosomalen Untereinheiten in beiden verwendeten Puffern, einen stabilisierenden Effekt. Die Schmelztemperaturen der jeweiligen Denaturierungsereignisse konnten, unter den gewählten Bedingungen, um bis zu maximal 8 °C (bei der Denaturierung der 30S-Untereinheit bei Messung mit kruden 70S-Ribosomen) zu höheren Temperaturen verschoben werden (vgl. Abbildung 27, Abbildung 31, Abbildung 47, Tabelle 19 und Tabelle 21). Bei den 70S-Ribosomen beider Organismen konnte auch beobachtet werden, dass Saccharose die Schmelztemperaturen mehr verschiebt als Trehalose. Hingegen ist ein Anstieg der Reaktionsenthalpie durch die Zugabe der beiden Zucker bei

H. elongata-, jedoch nicht bei *E. coli*-Ribosomen zu erkennen. Die von Sell beobachtete Restmenge Saccharose aus der Aufreinigung der Ribosomen (Sell, 2013) sollte also in der nachgewiesenen Menge (20 mM) keinen Einfluss auf die Stabilität zeigen, zumal die Ribosomen vor der Messung stets mindestens 1:20 in den jeweiligen Puffer verdünnt wurden.

In den Jahren 2007 und 2010 wurden aus der Arbeitsgruppe um David Draper zwei Studien zur Stabilität unterschiedlicher RNA-Moleküle unter Soluteinfluss publiziert (Lambert und Draper, 2007; Lambert *et al.*, 2010). Die Autoren diskutieren, dass insbesondere Saccharose und TMAO einen ähnlichen Effekt sowohl auf die Stabilität der RNA, wie auch auf die Stabilität von Proteinen zeigen. Daher ist durch Saccharose sowohl die Stabilisierung der Protein-Ribonukleinsäure-Interaktion als auch eine Stabilisierung der ribosomalen Proteine, die dann wiederum die Stabilität der rRNA fördern können, denkbar, genau wie die alleinige Stabilisierung der rRNA.

Da TMAO in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, kann zum Effekt auf RNA-Proteinkomplexe hier keine Aussage getroffen werden. TMAO ist jedoch **Betain** strukturell recht ähnlich. Beide haben zwar keine freie Hydroxylgruppe, sind aber beide quartäre Ammoniumverbindungen mit jeweils drei an den Stickstoff gebundenen Methylgruppen. Lambert und Draper zeigen, dass Betain unterschiedliche Wirkung auf die Stabilität verschiedener RNA-Tertiärstrukturen haben kann und diskutieren, dass Mg^{2+} -Ionen mit der Carboxylgruppe des Betains möglicherweise eine Ionenbindung eingehen könnte. Die dadurch reduzierte Mg^{2+} -Konzentration könnte den teilweise destabilisierenden Charakter des Solut auf die unterschiedlichen RNA-Konformationen erklären (Lambert und Draper, 2007). Insbesondere die Denaturierung der 30S-Untereinheit bei den *E. coli*-Ribosomen war allerdings in den Messungen schwer zu analysieren. Während die Daten bei *E. coli* eine Stabilisierung der 30S- und 50S-Untereinheiten und eine Destabilisierung der dritten Denaturierungsreaktion vermuten lassen, zeigen die Ribosomen von *H. elongata* ein anderes Bild. Hier sinkt die Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit, während die der 50S-Untereinheit und des dritten Peaks steigt. Die Kurvenanpassung der *H. elongata*-Ribosomen ist, insbesondere bei der Schmelztemperatur der 30S-Untereinheit, einfacher zu interpretieren, da sich hier, wie auch bei den restlichen Messungen mit *H. elongata*-Ribosomen (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 23) dieser Peak klar von den beiden anderen Peaks abhebt. Bei der Zugabe von Betain zu den ribosomalen Untereinheiten zeigt sich, dass in Tris-HCl-Puffer die 30S-Untereinheit leicht destabilisiert wird. Bei der 50S-Untereinheit zeigt sich jedoch in beiden Puffern die Tendenz, dass der erste Peak stabilisiert (bei HEPES-Puffer sogar sehr deutlich), die zweite Komponente jedoch destabilisiert wird. Für die 50S-

Untereinheit ist dies die gleiche Tendenz wie bei den kruden 70S-Ribosomen (vgl. Abbildung 31). Die Destabilisierung der 30S-Untereinheit durch Betain wurde hingegen nur bei den kruden 70S-Ribosomen aus *H. elongata* beobachtet.

Neben der Bestimmung der Thermostabilität mit TMAO und Betain konnte eine weitere Studie zeigen, dass diese beiden Solute die Effizienz der Rekonstitution der großen ribosomalen Untereinheit aus *in vitro* transkribierter 5S- und der 23S-rRNA sowie der 50S-rProteinfraction steigert (Semrad und Green, 2002). Da die Rekonstitution von Ribosomen ein klar geordneter Prozess ist, in dem hierarchisch festgelegt ist welches Protein in welchem Stadium mit der rRNA oder anderen ribosomalen Proteinen interagieren muss (Shajani *et al.*, 2011), sprechen diese Ergebnisse für eine Favorisierung der Interaktion der Proteine mit der RNA in Gegenwart dieser beiden Solute.

Die beiden weiteren untersuchten kompatiblen Solute, **Ectoin und Hydroxyectoin**, sind sich strukturell ebenfalls sehr ähnlich und waren bisher nicht Gegenstand publizierter Analysen zur RNA-Stabilität. Beide bewirken bei den Ribosomen aus beiden Organismen, also auch im natürlichen Produzenten *H. elongata*, *in vitro* eine Senkung der Denaturierungstemperatur aller drei Denaturierungsereignisse. Dieser Effekt wurde auch bei den isolierten Untereinheiten aus *E. coli* beobachtet. Die Zugabe von 1 M Ectoin senkte hier die Schmelztemperaturen um 6-7 °C und zeigt damit einen stärkeren Effekt als er mit den kruden 70S-Ribosomen beobachtet wurde, bei denen die Zugabe von Ectoin die Schmelztemperatur um maximal 4,5 °C senkte.

Bei den *E. coli*-Ribosomen mit Hydroxyectoin wurde außerdem eine Besonderheit beobachtet. Durch die Zugabe von Hydroxyectoin sinkt zwar einerseits die Schmelztemperatur um wenige Grad Celsius, andererseits erhöht sich die Enthalpie der gesamten Denaturierungsreaktion. Diese Steigerung der zur Denaturierung verbrauchten Energie ist ein Hinweis auf eine Stabilisierung des Komplexes aus RNA und Proteinen. Die Enthalpie der Reaktion steht mit der freien Gibb'schen Energie über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung in Verbindung:

$$\Delta G = \Delta H_{\text{cal}} - T_m \Delta S + \Delta C_p \left[(T - T_m) - T * \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right]$$

Am Schmelzpunkt T_m der Reaktion ist: $\Delta C_p \left[(T - T_m) - T * \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] = 0$. Die Gleichung vereinfacht sich damit auf: $\Delta G = \Delta H_{\text{cal}} - T_m \Delta S$.

Damit hängt die freie Reaktionsenergie hängt also direkt auch von der Temperatur und der Entropieänderung der Reaktion ab. Am Schmelzpunkt T_m der Reaktion gilt gleichzeitig $\Delta G = 0$. So ergibt sich durch Umstellen der Gleichung:

$$\Delta S = \Delta H_{\text{cal}}/T_m$$

Da hier allerdings nur die Enthalpien der Gesamtreaktionen bestimmt wurden, lässt sich die Entropie der Reaktion nicht genau bestimmen. Weil die Schmelztemperatur der Denaturierungen aber nur um wenige Grad sinkt, lässt sich zumindest aussagen, dass die Entropie der Gesamtreaktion durch die Zugabe von Hydroxyectoin steigt. Zwar können hier keine konkreten Daten erhoben werden, insgesamt ist der Effekt der Entropiesteigerung jedoch in diesem Falle gleichzusetzen mit einer Steigerung der Unordnung des Systems nach der Denaturierung. Hydroxyectoin steigert also vermutlich einerseits die Stabilität des Komplexes, da aber keine Steigerung der Schmelztemperatur beobachtet werden konnte, steigert Hydroxyectoin andererseits scheinbar auch die Entropie des denaturierten Zustandes.

Bereits bei DSC-Messungen an RNase A wurde beobachtet, dass Hydroxyectoin die Enthalpie der Reaktion steigern kann. Allerdings wurde eine vergleichbare Enthalpiesteigerung auch für das ebenfalls getestete Betain beobachtet (Knapp *et al.*, 1999). Zudem wurde in diesen Versuchen, anders als bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, auch eine Steigerung der Schmelztemperatur beobachtet.

Es stellt sich insgesamt die Frage, warum manche dieser Solute, für die alle eine proteinstabilisierende Wirkung gezeigt wurde, auf Ribosomen einen destabilisierenden Effekt zeigen. Als natives Solut stabilisiert lediglich der Zucker Trehalose die Ribosomen von *E. coli*. Die nativen Solute von *H. elongata* destabilisieren hingegen sogar die aufgereinigten Ribosomen des eigenen Organismus. Geht man davon aus, dass die Integrität der Ribosomen die maximale Überlebenstemperatur der Zellen bestimmt, so wurde gerade bei Hydroxyectoin eine stabilisierende Wirkung erwartet. Für *H. elongata* konnte gezeigt werden, dass die Zellen unter Hitzestress das akkumulierte Ectoin zu Hydroxyectoin hydroxylieren (Wohlfarth *et al.*, 1990; Ures, 2005; Meffert, 2011). Weiter zeigten Tanne & Galinski, dass *H. elongata* mit viel intrazellulär akkumuliertem Hydroxyectoin in Trocknungsversuchen eine höhere Überlebensrate aufweist als die Zellen, die zuvor Ectoin akkumulierten (Tanne und Galinski, 2012). Zwar destabilisiert Hydroxyectoin die Ribosomen, andererseits zeigte sich, insbesondere mit den *H. elongata*-Ribosomen, eine stärkere Temperatursensitivität wenn die Ribosomen mit Ectoin versetzt wurden im Vergleich zu den mit Hydroxyectoin versetzten Ribosomen. Manzanera *et al.* zeigten aber auch, dass *E. coli* zwar bessere Überlebensraten zeigt,

wenn Hydroxyectoin vor der Trocknung extrazellulär zu den Zellen gegeben wird, intrazellulär ist jedoch die Akkumulation des Zuckers Trehalose, für den in der vorliegenden Arbeit eine stabilisierende Wirkung gezeigt werden konnte, für die Überlebensrate förderlicher, als die Akkumulation von Hydroxyectoin (Manzanera *et al.*, 2004).

Insgesamt ist eine Stabilisierung der Ribosomen, geht man von ihrem prinzipiellen Aufbau aus, auch dadurch zu erklären, dass eine Stabilisierung der ribosomalen Proteine auch gleichzeitig einer Stabilisierung des gesamten Protein-RNA-Komplexes gleichzusetzen ist. Da die ribosomalen Proteine die Integrität der Ribosomen durch das Abschirmen der sich abstoßenden negativen Ladungen der RNA-Phosphatrückgrate bestimmen, könnte eine Stabilisierung dieser Proteine den Gesamtkomplex stabilisieren. Da für alle hier untersuchten Solute jedoch bereits eine proteinstabilisierende Wirkung nachgewiesen werden konnte, könnte die stabilisierende Wirkung der Zucker also einem weiteren, zusätzlichen Mechanismus folgen. Wie bereits bei der Wirkung von Betain angesprochen, könnten die stabilisierend wirkenden Solute auch die Interaktion zwischen der rRNA und den ribosomalen Proteinen unterstützen.

Nach der „preferential exclusion“-Theorie von Arakawa und Timasheff (vgl. 1.4.1) interagieren die kompatiblen Solute nicht direkt mit der Oberfläche der Moleküle, sondern werden sogar von der Hydrathülle ausgeschlossen. Dieser Ausschluss führt zu einem positiveren $\Delta\Delta G$. Das Auffalten der Proteine benötigt dadurch also mehr Energie und stabilisiert so die native Form (Gekko und Timasheff, 1981; Arakawa und Timasheff, 1983, 1983; Arakawa und Timasheff, 1985). Zwar baut diese Theorie auf Daten auf, die die Interaktion von Proteinen mit kompatiblen Soluten beschreiben, aber Theorien zur Wirkung der Solute auf Nukleinsäuren, insbesondere RNA, sind noch nicht ausreichend entwickelt und bauen ebenfalls auf diese Überlegungen auf (Kurz, 2008). Neuere Forschungen zeigen den Ausschluss von Ectoin aus der Hydrathülle zweier Proteine (Yu und Nagaoka, 2004; Yu *et al.*, 2007).

Werden die kompatiblen Solute also von der Hydrathülle der Ribosomen ausgeschlossen, so würden die hydrophoben Seitenketten weiter im Innern des Moleküls gehalten und der Komplex somit stabilisiert. Diese Überlegung kommt den Überlegungen der Arbeitsgruppe um Wayne D. Bolen und ihrer Theorie des „osmophoben Effekts“ entgegen (Bolen und Baskakov, 2001). Demnach würde das Ribosom durch die Anwesenheit der hohen Solutkonzentrationen in eine kompaktere Struktur übergehen, da durch eine Denaturierung der Anteil zugänglichen Proteinrückgrates ansteigt. Dieser Anstieg allerdings ist durch die hohen Solutkonzentrationen thermodynamisch ungünstig, da das Rückgrat sich schlechter in den Soluten lösen lässt als das native Protein. Dies

bewirkt eine Stabilisierung der nativen Konformation, die sich in der Steigerung der Denaturierungstemperatur äußert.

Ein offensichtlicher Unterschied zwischen den stabilisierend wirkenden Zuckern und den, zumindest teilweise, destabilisierend wirkenden Ectoinen ist die Anzahl freier Hydroxylgruppen. Die Zucker haben jeweils acht, während Hydroxyectoin lediglich eine, und Ectoin gar keine freie Hydroxylgruppe besitzt. Daher läge es nahe die Wirkung durch die „water replacement“-Theorie der Arbeitsgruppe um James S. Clegg zu erklären. In dieser Theorie wird die stabilisierende Wirkung der Solute auf eine Interaktion der freien Hydroxylgruppen mit der Proteinoberfläche zurückführt (Clegg *et al.*, 1982). Die freien Hydroxylgruppen der Zucker könnten also die Hydrathülle der Ribosomen besser ersetzen als die Ectoine.

Alle drei Theorien gehen also von einem Effekt der kompatiblen Solute auf die Oberfläche der Zielmoleküle aus, jedoch mit unterschiedlichen Ausgangs-Annahmen. Während die „preferential exclusion“-Theorie und der „osmophobe Effekt“ von einer indirekten Wirkung über den Ausschluss von der Hydrathülle und somit thermodynamische Effekte ausgehen, vermutet die „water replacement“-Theorie eine direkte Interaktion der Solutmoleküle mit der Moleküloberfläche. Allerdings wurden die Arbeiten von Clegg bei sehr hohen Solutkonzentrationen und gleichzeitig geringen Wasseraktivitäten durchgeführt und gelten somit nur für den Trockenzustand. Da diese Bedingungen hier nicht erfüllt wurden, kann die „water-replacement“-Theorie für die vorliegende Fragestellung nicht angewendet werden. Auch die beiden verbleibenden Theorien haben den Nachteil, dass sie für die Wirkung kompatibler Solute auf Proteine aufgestellt wurden.

Sell konnte in ihren Untersuchungen zum Einfluss inkompatibler Solute auf die Thermostabilität von *E. coli*-Ribosomen zeigen, dass die Denaturierungstemperatur durch die Zugabe von Kreatin gesenkt wird (Sell, 2013). Zudem konnte Sell nach Zugabe von Kreatin zu den Ribosomen mit Hilfe von „Gel-Shift“-Experimenten eine Interaktion des inkompatiblen Soluts mit den Ribosomen nachweisen. Durch die Zugabe von Kreatin wanderten die ribosomalen Komplexe im Spannungsfeld des Agarosegels weniger weit als die unbehandelten Ribosomen. Diese Versuche wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch mit kompatiblen Soluten durchgeführt (nicht gezeigt). Hier konnte keine Veränderung des Laufverhaltens durch Zugabe eines der fünf in der vorliegenden Arbeit getesteten kompatiblen Solute nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Sell, die im gleichen Versuchsaufbau mit inkompatiblen Soluten, einen Effekt nachweisen konnte, spricht diese Beobachtung wiederum gegen die direkte Interaktion der kompatiblen Solute mit den Zielmolekülen.

Bei der Wirkung kompatibler Solute auf Nukleinsäuren wird allerdings unterschieden zwischen der Stabilisierung der nativen Form, also bei der DNA beispielsweise der doppelsträngigen Helix, und der Stabilisierung der denaturierten Form, in diesem Fall des DNA-Einzelstranges. Senken die Solute die Schmelztemperatur einer Nukleinsäure, so kann es sich dabei also sowohl um die Destabilisierung des Doppelstranges, als auch um die Stabilisierung des Einzelstranges handeln.

4.2.3 Effekt von Salzen auf die Thermostabilität isolierter Ribosomen

Bei Zusatz von Salzen zu den Ribosomen von *E. coli* und *H. elongata* ergeben sich unterschiedliche Effekte auf das Denaturierungsverhalten (vgl. Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 36). Während die Ribosomen des halophilen Organismus *H. elongata* distinkt in nur noch zwei Reaktionen denaturieren (vgl. Abbildung 35), ergeben sich bei den *E. coli*-Ribosomen diffuse Denaturierungsmuster. Hier bleiben weiterhin, zumindest bei den geringeren Konzentrationen, drei Peaks sichtbar. Die Zugabe von NaCl bzw. KCl führt bei den Ribosomen beider Organismen zur konzentrationsabhängigen Senkung der Schmelzpunkte

Entweder verschiebt sich also bei *H. elongata*-Ribosomen der Schmelzpunkt des dritten Peaks so weit zu höheren Temperaturen, dass die Denaturierung außerhalb des analysierten Temperaturbereichs liegt oder das charakteristische Muster der Denaturierung der 50S-Untereinheit (zwei Peaks) verändert sich durch die erhöhten Ionenstärken. Um dies zu analysieren sollten die Messungen zunächst über einen weiteren Temperaturbereich wiederholt werden. Weiter sollten Messungen mit aufgereinigten 50S-Untereinheiten unter Salzeinfluss durchgeführt werden, um die Möglichkeit des veränderten Denaturierungsverhaltens zu analysieren. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, ob der Effekt der Ionen sich direkt während des Zusammenpipettierens der Proben ergibt, oder ob der Effekt erst durch die erhöhte Temperatur induziert wird. Um dies zu untersuchen, könnten weiterführende Studien die Stabilität der Ribosomen mit Hilfe von Saccharosegradientenzentrifugationen, Titrationskalorimetrie oder light scattering-Experimenten untersuchen.

Hier stellt sich zunächst die Frage, ob beide Ionen negativ auf die Stabilität der Ribosomen wirken, oder ob eines der Ionen einen dominanten Effekt hat. Positiv geladene Ionen sind an die Ribosomen komplexiert und tragen dort zur Stabilität des Komplexes bei (Klein *et al.*, 2004). Daher wird vermutet, dass eher die Anionen für die destabilisierende Wirkung der Salze verantwortlich sind. Schon seit langem ist bekannt, dass insbesondere die Cl⁻-Ionenkonzentration einen wichtigen Einfluss auf die Interaktion von Proteinen mit Nukleinsäuren hat (Leirimo *et al.*, 1987). So konnten Brady

et al. bereits 1984 beobachteten, dass die Zugabe höherer Cl⁻-Ionenkonzentrationen die aus unterschiedlichen Pflanzen isolierten Ribosomen destabilisiert (Brady *et al.*, 1984). Sie zeigten mit Hilfe von Saccharosegradienten-Zentrifugationen, dass die Zugabe von KCl, insbesondere in Konzentrationen über 125 mM, die Stabilität der Ribosomen umgekehrt proportional beeinflusst.

Andererseits sind auch Ribosomen bekannt, die auf bestimmte Ionenkonzentrationen angewiesen sind. So zum Beispiel die Ribosomen des halophilen Archaeobakteriums *Halobacterium cutirubrum* (mittlerweile umbenannt in *Halobacterium salinarum*) (Bayley und Kushner, 1964). Diese Ribosomen brauchen hohe Ionenkonzentrationen von etwa 4 M KCl um ihre Konformation aufrechtzuerhalten. *H. salinarum* ist ein Vertreter der „salt-in“-Strategie und akkumuliert daher cytoplasmatisch viele Ionen. Werden diese Ribosomen in Medien geringerer Ionenstärke überführt, zerfallen sie schneller. Ähnlich wie für das Proteom der halophilen „salt-in“-Vertreter bekannt ist, dass es einen saureren Charakter aufweist (Mevarech *et al.*, 2000), könnte auch das Bedürfnis dieser Ribosomen nach höherer Ionenstärke auf eine biophysikalische Anpassung der Struktur zurückgeführt werden. Neben den Vergleichen der ribosomalen Proteine aus *E. coli* und *H. elongata* (vgl. 4.3) wurden auch die ribosomalen Proteine von *Salinibacter ruber* analysiert (vgl. Tabelle 24). Diese Zellen sind die einzigen bekannten aeroben Eubakterien, die osmotischem Stress mit der „salt-in“-Strategie begegnen (Antón *et al.*, 2002; Oren *et al.*, 2002). Während sich beim Vergleich von *E. coli* und *H. elongata* lediglich zwei ribosomale Proteine deutlich voneinander unterschieden (vgl. 3.3) wiesen die ribosomalen Proteine von *S. ruber* insgesamt einen auffällig saureren Charakter auf, als die Proteine der anderen beiden Organismen (vgl. Tabelle 24). Weitere Untersuchungen, auch zur Stabilität aufgereinigter Ribosomen unter hohen Ionenstärken, sollten erfolgen, um diesen Beobachtung weiter nachzugehen

4.2.4 Effekt kompatibler Solute auf die Thermostabilität NaCl-gestresster Ribosomen

In den Messungen, die die NaCl-gestressten Ribosomen mit den kompatiblen Soluten kombinieren, wird deutlich, dass beide getesteten Solute (Saccharose und Hydroxyectoin) den gleichen Einfluss auf die Thermostabilität der Ribosomen aus *E. coli* und *H. elongata* zeigen, wie es auch mit nicht-gestressten Ribosomen beobachtet wurde (vgl. Abbildung 37-39). Entgegen der Erwartung konnte allerdings auch eine hohe Konzentration Hydroxyectoin die Enthalpie der Reaktion mit *E. coli*-Ribosomen nicht so steigern wie es bei den Bestimmungen ohne Salz beobachtet wurde (vgl. Abbildung 38).

Neben dem Einfluss von KCl testeten Brady *et al.* auch den Einfluss von Prolin und Betain auf die Stabilität der pflanzlichen KCl-gestressten Ribosomen (Brady *et al.*, 1984).

Sie konnten dabei keinen positiven Effekt, weder von Prolin noch von Betain, auf die durch KCl destabilisierten Ribosomen feststellen, obwohl die Versuche mit einem KCl-Solut-Verhältnis von 1:50 durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse passen zu den hier gezeigten Beobachtungen der Thermostabilität der bakteriellen Ribosomen. Der Destabilisierung des Gesamtkomplexes kann durch die Zugabe der Solute anscheinend nicht entgegengewirkt werden. Der Effekt auf die Denaturierungstemperatur der Komponenten hingegen bleibt erhalten.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang nochmals die Messungen mit Ribosomen aus *H. elongata*, die durch die Zugabe von Salzen ein verändertes Denaturierungsmuster ausweisen, so könnte dies auf eine Verdrängung der stabilisierenden Mg^{2+} -Ionen, die die Stabilität der Untereinheiten gewährleisten, zurückzuführen sein. Werden diese Ionen also durch andere, nicht geeignete Ionen, verdrängt, so werden die RNA-RNA- und Protein-RNA-Interaktionen gestört und dadurch destabilisiert. Eine kompensatorische Wirkung dieser möglichen Verdrängungsreaktion durch die kompatiblen Solute konnte nicht beobachtet werden. Anders scheint es sich mit der Thermostabilität der ribosomalen Untereinheiten zu verhalten. Hier zeigen sich die gleichen Effekte der beiden getesteten Solute. Lediglich die Schmelztemperatur ist verringert im Vergleich zu den Messungen mit kruden 70S-Ribosomen.

4.2.5 Vergleich der Daten aus den Ganzzellmessungen mit den Erkenntnissen der *in vitro*-Messungen

Wie aus den Messungen mit aufgereinigten Ribosomen hervorgeht, stabilisieren die Zucker die Ribosomen, während die Ectoine die Ribosomen destabilisieren. Überträgt man diese Erkenntnisse auf die bereits diskutierten Messungen an ganzen Zellen, so zeigt sich, dass auch hier bei den Zellen, die mit den Ectoinen supplementiert wurden, der mit m_1 gekennzeichnete Peak auftritt, während bei den nicht-supplementierten Zellen dieser Peak vermutlich im zweiten Ribosomenpeak m_2 enthalten ist. Diese Zellen akkumulieren jedoch Trehalose die, wie bereits diskutiert, die Ribosomen *in vitro* stabilisiert. Daher wurde getestet, ob sich bei Zellen, die nicht mehr in der Lage sind, Trehalose zu synthetisieren (*E. coli* MC4100 $\Delta otsB$) (Meffert, 2011), der Peak m_1 wieder zu geringeren Temperaturen verschiebt (vgl. Abbildung 15). Genau wie bei den Messungen mit supplementierten Zellen zeigte sich hier eine endotherme Reaktion m_1 und gibt damit einen guten Hinweis, dass die akkumulierte Trehalose eventuell *in vivo* zur Stabilisierung der Ribosomen beiträgt. Die Peakspitze lag mit den trehalosedefizienten Zellen bei 51,7 °C, und damit bei einer geringeren Temperatur als bei den supplementierten Zellen (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 14). Diese Zellen müssen jedoch vermutlich aufgrund der fehlenden Trehalose andere kompatible Solute

akkumulieren. Für *H. elongata* konnte gezeigt werden, dass ein Stamm, der nicht mehr in der Lage war sein natürliches Solut Ectoin zu synthetisieren, stattdessen vermehrt Glutamat akkumuliert (Göller *et al.*, 1998). Glutamat ist auch in *E. coli* ein weit verbreitetes kompatibles Solut, das insbesondere in der primären Stressantwort der Zellen eine wichtige Rolle spielt (Dinnbier *et al.*, 1988). Weitere kompatible Solute, wie beispielsweise Glutamat, wurden jedoch nicht in die *in vitro*-Messungen der Ribosomen eingesetzt. Um diesen Zusammenhang genauer zu analysieren, müssten zunächst die cytoplasmatisch akkumulierten Solute aus *E. coli* MC4100 Δ *otsB* über eine FMOC-HPLC-Analyse bestimmt werden. Im Anschluss daran könnten weitere DSC-Messungen an isolierten Ribosomen einen genaueren Aufschluss darüber geben, ob die beobachteten Effekte auf die entsprechenden Solute zurückführbar sind.

Insgesamt fällt auf, dass die *in vitro* mit kompatiblen Soluten versetzten Ribosomen den gleichen Effekt auf die Thermostabilität aufwiesen, wie die Ribosomen die mit diesen Soluten *in vivo*, durch gezielte Supplementierung der Zellen, in Kontakt kamen. Mit Hilfe des trehalosedefizienten Stammes konnte insbesondere gezeigt werden, dass die Ribosomen ohne den Einfluss des Zuckers eine geringere Temperaturstabilität haben. Die Ectoine zeigen ebenfalls, wie auch in den *in vitro*-Messungen, einen destabilisierenden Effekt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass möglicherweise der Einfluss des akkumulierten Betains die Denaturierung der Ribosomen der Zellen aus Komplexmedium verändert, was zu einem endothermen Verlauf der Messung führt im Vergleich zum exothermen Verlauf der Messung an Zellen aus Minimalmedium.

4.3 Unterschiede in den Ribosomen von *E. coli* und *H. elongata*

4.3.1 Vergleich der ribosomalen RNA

Die vier bzw. sieben Kopien in *H. elongata* und *E. coli* der rRNAs sind untereinander hoch konserviert. Der Sequenzvergleich der drei rRNAs zwischen *E. coli* und *H. elongata* zeigt Sequenzähnlichkeiten von etwa 90 % (die Sequenzidentität liegt bei mindestens 80 %) über alle drei ribosomalen RNAs. Die Sequenzen sind über weite Teile hoch konserviert, während in kleinen Bereichen die Sequenzähnlichkeit sehr gering ist. Da bereits gezeigt wurde, dass die Interaktion der RNA mit den sie komplexierenden Ionen auch von der Struktur der RNA abhängt (Draper, 2004; Lambert und Draper, 2007), wäre es an dieser Stelle interessant zu untersuchen, wo im Ribosom diese unterschiedlichen Sequenzen lokalisiert sind. Interagieren genau diese Sequenzen mit ribosomalen Proteinen, so könnte sich dadurch eine veränderte Stabilität ergeben. Genauso könnte die Veränderung der Sequenzen auf der Außenseite eine Veränderung der Interaktion

mit dem Lösungsmittel oder auch der Mg^{2-} -vermittelten Interaktion der Untereinheiten zum 70S-Komplex ergeben.

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Beschreibung der Merkmale von Nukleinsäuren ist ihr GC-Gehalt. Während bei der 5S-rRNA aus *E. coli* der GC-Gehalt mit 64,2 % deutlich höher liegt als bei *H. elongata* mit 59,6 %, liegen die GC-Gehalte der beiden größeren rRNAs aus *H. elongata* jeweils etwa 2 % höher als bei den *E. coli*-rRNAs. Nach Galtier *et al.* 1999 spricht ein höherer GC-Gehalt in der rRNA durch die höhere Stabilität der GC-Bindung für ein höheres Temperaturmaximum der Zellen. Die für *E. coli* und *H. elongata* bestimmten GC-Gehalte unterscheiden sich jedoch nicht stark voneinander und liegen mit etwa 55 % auch nicht auffällig hoch. Ob der leicht höhere GC-Gehalt der 16S- und 23S-rRNA von *H. elongata* einen Zufall oder eine Tendenz über mehrere halophile Organismen darstellt müssen weitere Analysen zum GC-Gehalt der rRNA zeigen.

4.3.2 Vergleich der ribosomalen Proteine

Bei den ribosomalen Proteinen fielen zwei Proteine der großen ribosomalen Untereinheit auf. Das Protein L10, das zusammen mit dem L7/L12-stalk das ribosomale Protein L8 bildet, sowie das Protein L25, das eine Bindedomäne für die 5S-rRNA aufweist (Ban *et al.*, 2000; Korepanov *et al.*, 2004). Zwar konnte im Vergleich der restlichen ribosomalen Proteine keine Tendenz nachgewiesen werden, dass die ribosomalen Proteine von *H. elongata* saurer sind als die von *E. coli*, genau bei diesen beiden Proteinen ist dies jedoch der Fall. Insbesondere von Organismen, die zur Anpassung an Salzstress die „salt-in“-Strategie verfolgen (vgl. 1.1.1), ist bekannt, dass ihr Proteom einen saureren Charakter aufweist (Mevarech *et al.*, 2000) um die Proteinintegrität und -aktivität bei den hohen cytoplasmatischen Ionenstärken gewährleisten zu können. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Unterschied der beiden ribosomalen Proteine aus *H. elongata* also ebenfalls um eine Anpassung an das Leben unter erhöhtem osmotischen Stress.

Die Unterschiede an L10 wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt, auch wenn L10 vermutlich für die Aktivität des gesamten Ribosoms ein wichtiges Protein ist. Es verbindet den L7/L12-stalk mit dem Rest der 50S-Untereinheit (Ban *et al.*, 2000). Dieser L7/L12-stalk wiederum interagiert mit den Elongationsfaktoren und spielt daher in der ribosomalen Aktivität eine wichtige Rolle.

Interessanter allerdings als das ribosomale Protein L10, war für die vorliegende Arbeit das ribosomale Protein L25. Bereits früher wurde berichtet, dass *E. coli* eine verkürzte Variante des Proteins codiert (Stoldt *et al.*, 1998). Diese Region bindet die 5S-rRNA (Stoldt *et al.*, 1999) und die Sequenzvergleiche lassen auf eine ähnliche Wirkung in *H. elongata* schließen (vgl. Abbildung 48). Die C-terminale Verlängerung in *H. elongata*

ist als CTC-Protein, einem stressinduzierten Protein, aus *B. subtilis* bekannt (Schmalisch *et al.*, 2002).

In knout-out Experimenten konnten Korepanov *et al.* zeigen, dass dieses ribosomale Protein nicht essentiell für das Überleben der Zellen ist. Sie berichten außerdem, dass Zellen, deren Gen für L25 durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette inaktiviert wurde, eine verringerte Wachstumsrate aufweisen und die Fähigkeit der Proteinsynthese reduziert war (Korepanov *et al.*, 2007). Die Autoren diskutieren, dass diese verringerte Proteinsynthese der Grund für die geringere Wachstumsrate sein könnte. Zudem beobachteten sie eine erhöhte Temperatursensitivität der Zellen (Korepanov, persönliche Mitteilung). Demnach zeigten die Zellen bei einer Anzuchttemperatur über 32 °C kein Wachstum mehr.

In einer an die vorliegende Arbeit angegliederten Diplomarbeit (Ebisch, 2012) wurde daher der Einfluss von L25 auf die Thermostabilität von Ribosomen untersucht. Ebisch konnte in DSC-Messungen an L25-defizienten Ribosomen (Korepanov *et al.*, 2007) eine verringerte Thermostabilität im Vergleich zu Ribosomen mit L25 zeigen. In anschließenden Komplementationsversuchen wurden die beiden ribosomalen Proteine (aus *E. coli* und *H. elongata*) plasmidcodiert in den L25-Mangelmutanten exprimiert und weitere Analysen durchgeführt. Den von Korepanov berichteten Effekt auf die maximale Wachstumstemperatur der L25-defizienten Zellen konnte Ebisch nicht reproduzieren. Die Zellen zeigten auch bei einer Anzuchttemperatur von 42 °C noch moderates Wachstum. Durch die Expression des L25 aus *E. coli* konnte bei allen untersuchten Temperaturen (30 °C, 37 °C und 42 °C) die Wachstumsrate gesteigert werden, während durch die Expression des L25 aus *H. elongata* die Wachstumsrate nur bei 37 °C, jedoch nicht bei 30 °C gesteigert werden konnte (Ebisch, 2012).

Aus diesen Komplementationsmutanten konnte Ebisch erfolgreich Ribosomen isolieren und zumindest in den mit L25 aus *E. coli* komplementierten Zellen das Protein in den Ribosomen nachweisen. Die DSC-Messungen zeigen, dass die Komplementation der L25-defizienten Ribosomen sowohl mit dem homologen als auch mit dem heterologen Protein zu einer Erhöhung der Denaturierungstemperatur führt. Dabei konnten jedoch nicht die Werte erreicht werden, die mit nativen Ribosomen beobachtet wurden. Zudem lässt sich aus den Daten nicht ablesen, ob eines der beiden Proteine einen besseren Effekt hat als das andere. Es sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die diesen Effekt, nicht nur auf die Thermostabilität, sondern auch auf die Gesamtstabilität des ribosomalen Komplexes sowie die Aktivität der Ribosomen, eventuell auch unter Stress untersuchen. Korepanov führt zudem die Überlegung an, dass L25 eventuell einen Einfluss auf das Recycling der Ribosomen haben könnte. Auch hier könnten

weitere Studien, mit beiden Varianten, Aufschluss über die Funktion des Proteins in den Ribosomen geben.

4.4 Zellfreie Protein-Synthese

Die zellfreie Protein-Synthese wurde in der vorliegenden Arbeit als zweite Methode gewählt, um die Einflüsse der kompatiblen Solute auf die Ribosomen zu untersuchen. Dabei wurde ein kombiniertes System aus *in vitro*-Transkription und *in vitro*-Translation verwendet, das alle Prozesse beinhaltet, die auch in intakten Zellen zur erfolgreichen Expression eines Proteins ablaufen müssen. Der Hauptunterschied zur natürlichen Proteinexpression *in vivo* liegt in der Abwesenheit der Zellwand, sodass die Reaktionen frei zugänglich vorliegen. Dies bietet den Vorteil, dass die Bedingungen, unter denen diese Prozesse ablaufen, direkt modifiziert und so einfacher der Effekt einzelner Veränderungen der Bedingungen untersucht werden können. Im Vergleich zur Proteinexpression im Cytoplasma liegen die Komponenten jedoch während der zellfreien Protein-Synthese verdünnt vor (Underwood *et al.*, 2005), sodass die Reaktion *in vitro* selbst unter optimalen Bedingungen stets langsamer abläuft als *in vivo*.

Da aus den DSC-Messungen bereits der Einfluss der unterschiedlichen Solute auf die Thermostabilität der Ribosomen bekannt war, wurde im ersten Schritt die Temperaturabhängigkeit der Expression des Reporterproteins untersucht, um einerseits die optimalen Bedingungen und andererseits die Bedingungen unter Temperaturstress zu bestimmen. Auch wenn das verwendete System Unterschiede zum System von Spirin und Swartz aufweist, so konnte doch die gleiche Temperaturabhängigkeit der Expression der Luciferase gezeigt werden (Spirin und Swartz, 2008a). Zwar ist die Aktivität der Luciferase temperaturabhängig (Ueda *et al.*, 1994), es wurde jedoch nur die Expression unter den verschiedenen Inkubationstemperaturen durchgeführt, die Messung des exprimierten Proteins fand immer unter den gleichen Bedingungen statt.

4.4.1 Zellfreie Protein-Synthese in *H. elongata* S30-Zellextrakt

Bei den Versuchen zur zellfreien Protein-Synthese mit *H. elongata* S30-Zellextrakt konnte gezeigt werden, dass erst durch die Erhöhung des pH-Wertes die Expression der Luciferase funktionierte (vgl. Abbildung 51). Zwar ist die gemessene Aktivität bei pH 8,0 am höchsten, andererseits sind die Fehler der Bestimmung relativ groß, sodass hier nur festgestellt werden kann, dass eine Erhöhung des pH-Wertes auf mindestens pH 8,0 einen positiven Einfluss hat. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beobachtung, dass auch die heterolog exprimierte Ectoinsynthese aus *H. elongata* die höchste Aktivität bei pH 9,0 aufweist (Witt, 2012). Möglicherweise weist das Cytoplasma von *H. elongata*

nativ einen höheren pH-Wert auf als *E. coli*, so dass die zur Expression des Reporterproteins benötigten Komponenten keine, oder zumindest nicht genug, Aktivität zeigen konnten um die aktive Luciferase zu exprimieren.

Da es sich bei *H. elongata* um einen halophilen Organismus handelt, wurde hier auch der Effekt von NaCl auf die zellfreie Protein-Synthese untersucht. Das System enthielt durch die verwendeten Puffer bereits 68 mM Na⁺-Ionen, wobei auf die Verwendung von Cl⁻-Ionen gezielt verzichtet wurde. Durch den Zusatz von 50 mM NaCl konnte keine Aktivierung des Systems beobachtet werden (vgl. Abbildung 51). Insbesondere im niedrigeren pH-Bereich, pH 7,5 und pH 8,0, reduziert sich die Aktivität stark. In den beiden höheren getesteten pH-Werten hingegen, pH 8,5 und pH 9,0, ist der negative Effekt nicht so stark, auch wenn die Aktivität mit zusätzlichem NaCl immer noch unter der Aktivität ohne NaCl liegt. Insgesamt konnte erstmals die zellfreie Expression eines Reporterproteins in einem aus *H. elongata* hergestellten Zellextrakt nachgewiesen werden. Da das verwendete Cytomim-Energiergenerationssystem in *H. elongata* jedoch nicht funktioniert, sollten für weitere Untersuchungen an der zellfreien Protein-Synthese mit *H. elongata* also zuerst ein neues Energiergenerationssystem etabliert werden.

In vitro-Translations-Reaktionen mit Ribosomen aus halophilen Organismen wurden bereits in den 1970er und 1980er Jahren aus der Gruppe um Donn Kushner publiziert (Wydro *et al.*, 1977; Kamekura und Kushner, 1984; Choquet *et al.*, 1989). So zeigen sie, dass die *in vitro*-Translation mit Ribosomen aus *Vibrio costicola* durch zu hohe Cl⁻-Konzentrationen inhibiert wird, weil die Cl⁻-Ionen die Anbindung der ribosomalen 30S-Untereinheit an die mRNA inhibieren (Kamekura und Kushner, 1984; Choquet *et al.*, 1989). Andererseits zeigten sie auch, dass diese Effekte bei der Proteinsynthese durch Zugabe von Betain oder Glutamat zum Teil kompensiert werden können (Choquet *et al.*, 1989). Interessanterweise wiesen jedoch Ribosomen, die mit inhibierenden NaCl-Konzentrationen gewaschen wurden, in der anschließenden *in vitro*-Translationsreaktion sogar eine höhere Aktivität auf als Ribosomen, die diesem Stress nicht ausgesetzt wurden. Dies ist könnte Hinweis sein, dass die erhöhte NaCl-Konzentration die Interaktion der rRNA mit den ribosomalen Proteinen nicht beeinträchtigt.

Ähnlich wie die Überlegungen zur heterologen Expression halophiler Proteine in *H. elongata* oder anderen Organismen (Kurz *et al.*, 2010; Witt, 2012), die sich durch hohe cytoplasmatische Ionenstärken auszeichnen, könnte die zellfreie Protein-Synthese in Zellextrakten aus diesen Organismen eine interessante Methode zur Synthese halophiler Proteine werden. Durch die direkte Zugänglichkeit zur Proteinexpression könnte diese Methode Möglichkeiten der Erforschung halophiler Proteine eröffnen. So könnten der Reaktion ungewöhnliche oder radioaktiv markierte Aminosäuren zugesetzt

werden, die in das exprimierte Protein eingebaut werden. Genauso ist auch die Erforschung des Effekts steigender Ionenstärken oder spezifischer Solutkonzentrationen auf zentrale zelluläre Prozesse halophiler Organismen, wie die Transkription oder Translation spezifischer DNA- bzw. RNA-Moleküle ein möglicher weiterer Schritt.

4.4.2 Zellfreie Protein-Synthese mit *E. coli* S30-Zellextrakt

Die Untersuchungen zum Einfluss kompatibler Solute auf die zellfreie Protein-Synthese wurden mit dem von Thakral nach Seidelt *et al.* etablierten System mit einem Zellextrakt aus *E. coli* durchgeführt (Seidelt *et al.*, 2009; Thakral, 2012). Da *E. coli* in der Lage ist alle der hier getesteten kompatiblen Solute cytoplasmatisch zu akkumulieren, und somit alle cytoplasmatischen Moleküle, wie auch die Ribosomen, von den Soluten umgeben sind stellt sich die Frage, ob die Anwesenheit der Solute deren Funktionalität beeinflusst.

Unter Standardbedingungen, bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C, zeigten die Ectoine über einen weiten Konzentrationsbereich einen positiven Effekt auf die Expression der Luciferase, während die beiden Zucker bei Konzentrationen über 250 mM einen negativen Einfluss zeigten (vgl. Abbildung 52). Mit Betain konnte erst mit sehr hohen Konzentrationen ein leichter Anstieg der RLU beobachtet werden. Da mit den Ectoinen der größte Effekt erzielt wurde, wurde deren Einfluss näher untersucht. Insgesamt konnte mit Hydroxyectoin bei einer Endkonzentration von 500 mM der beste Effekt erzielt werden. Dabei stieg die Luciferase-Aktivität auf ein Maximum von 240 % im Vergleich zu der Kontrolle. Ectoin zeigte zwar auch eine positive Wirkung, hier konnten jedoch maximal Steigerungen auf 130 % (bei 150 mM) beobachtet werden.

Da die zelluläre Synthese von Hydroxyectoin oftmals bei Temperaturstress beobachtet werden konnte (Severin *et al.*, 1992; Garcia-Esteba *et al.*, 2006; Meffert, 2011), wurde der Effekt der beiden Ectoine auf die zellfreie Protein-Synthese auch unter erhöhten Temperaturen untersucht. Wie bereits bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C beobachtet, zeigte sich auch bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C ein besserer Effekt mit Hydroxyectoin als mit Ectoin. Die besten Ergebnisse konnten hier wiederum mit einer Endkonzentration von 500 mM erzielt werden (vgl. Abbildung 54). Die Aktivität lag annähernd in dem Bereich der bei einer Inkubation unter Standardbedingungen ohne Solute erreicht wurde. Zwar zeigte die weitere Steigerung der Temperatur auf 42 °C ebenfalls einen stark stabilisierenden Effekt durch Hydroxyectoin, allerdings war die Menge des emittierten Lichts hier insgesamt sehr gering (vgl. Abbildung 72). Die Menge der exprimierten Luciferase liegt weit unter der Menge, die mit 30 °C oder 37 °C erzielt werden konnte. Insgesamt zeigte sich jedoch der Trend, dass die Stabilisierung des Systems mit Hydroxyectoin besser funktioniert als mit Ectoin. Insbesondere bei erhöhten

Temperaturen zeigte sich mit Ectoin eine geringere Aktivität, während mit Hydroxyectoin die Aktivität im Vergleich zur Kontrolle immer noch erhöht wurde.

Bereits 2003 wurde eine Studie veröffentlicht, die den Einfluss von Betain auf eine zellfreie Protein-Synthese mit Kaninchen-Reticulocyten-Lysat untersuchte (Brigotti *et al.*, 2003). Hier wurde auch der Einfluss erhöhter osmotischer Aktivitäten auf das System, sowie die Möglichkeit des inhibierenden Effekts unterschiedlicher Salze durch die Betainzugabe zu kompensieren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Betain die Translationsrate um 40-50 % erhöht. In einem weiteren Versuch wurde die Osmolarität des Systems konstant gehalten und durch unterschiedliche Mengen KCl und Betain eingestellt. Hier zeigte sich, dass 25 mM KCl bei Zugabe von 100 mM Betain die Aktivität nicht beeinflusst. Auch Choquet *et al.* berichten, dass der inhibitorische Effekt der Cl⁻-Ionen in der *in vitro*-Translation in *V. costicola*-Lysat durch Betain teilweise kompensiert werden kann (Choquet *et al.*, 1989). Die höchste Aktivität konnte dabei gemessen werden, wenn Betain in Kombination mit Glutamat, beides natürliche Solute von *V. costicola*, verwendet wurde. Daher müssten weiterführende Experimente auch die Kombination mehrerer Solute untersuchen.

Erst kürzlich wurde eine Studie zum Effekt verschiedener kompatibler Solute auf die zellfreie Protein-Synthese veröffentlicht, die ebenfalls ein *E. coli*-basiertes System und das Cytomin-Energiereregulationssystem verwendet (Kai *et al.*, 2013). Der Hauptunterschied zwischen dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten System und dem von Kai *et al.* untersuchten System liegt in der Wahl des Reporterproteins. In der vorliegenden Arbeit wurde die Luciferase als Reporterprotein verwendet, Kai *et al.* verwenden ein modifiziertes GFP. Beide Proteine sind gängige Reporterproteine. Der Vorteil der Luciferase ist, dass das Protein im Gegensatz zum GFP direkt nach der Expression aktiv vorliegt, während GFP erst noch sauerstoffabhängig in die aktive Form gefaltet werden muss. In beiden Systemen wurde das Plasmid pIVEX2.3d als Expressionsplasmid verwendet, die Gene sind also unter dem gleichen Promotor codiert.

Kai *et al.* testeten unterschiedliche Substanzen, für die eine Protein-stabilisierende Wirkung bekannt ist. Unter anderem wurden hier auch die kompatiblen Solute Ectoin, Betain, Trehalose und Saccharose untersucht. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit konnte für die beiden Zucker Trehalose und Saccharose eine konzentrationsabhängige Hemmung der Reaktion beobachtet werden. Die Zugabe von Trehalose senkte in allen untersuchten Konzentrationen die Aktivität, während die Zugabe von bis zu 6 % (w/v) (entspricht etwa 175 mM) Saccharose keinen sichtbaren Effekt auf die Aktivität zeigte, höhere Konzentrationen führten jedoch ebenfalls zur Hemmung der Reaktion. Ein ähnlicher Effekt wurde mit Betain und Ectoin beobachtet. Beide zeigten in

Konzentrationen bis 100 mM keinen Einfluss, höhere Konzentrationen hemmten ebenfalls die Reaktion (Kai *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die höchste Aktivitätssteigerung mit Ectoin bei etwa 150 mM beobachtet. Zudem war die beobachtete Hemmung der Reaktion nicht so stark, wie in dem von Kai *et al.* verwendeten System. Der Effekt von Hydroxyectoin wurde bei Kai *et al.* nicht untersucht und somit in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde, neben dem Einfluss von Hydroxyectoin alleine, durch die Verwendung von salzkontaminiertem Hydroxyectoin, auch die kompensatorische Wirkung des Solut auf die zellfreie Protein-Synthese unter Cl⁻-Einfluss analysiert (vgl. Abbildung 55). Zwar konnte durch die anschließende HPLC-Analyse des Hydroxyectoins die genaue Zusammensetzung des Salzes nicht bestimmt werden, die wichtige Cl⁻-Ionenkonzentration (Kamekura und Kushner, 1984) konnte jedoch analysiert werden. Es zeigte sich, dass selbst bei Zugabe von 140 mM Cl⁻ der stabilisierende Einfluss von lediglich 170 mM Hydroxyectoin ausreicht um 200 % Aktivität zu erreichen. Die doppelte Menge Cl⁻ und Hydroxyectoin zeigt immer noch eine Aktivität von etwa 100 %. Die weitere Erhöhung der eingesetzten Konzentrationen von Cl⁻ und Hydroxyectoin zeigen dann allerdings eine deutliche Hemmung der Reaktion. Hier müssten für detailliertere Aussagen zur Kompensationsaktivität von Hydroxyectoin weitere unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse getestet werden.

Insgesamt ist die zellfreie Protein-Synthese an sich ein sehr komplexes System, mit vier Hauptreaktionen in denen Proteine, RNA- und DNA-, sowie die Ribosomen als RNA-Protein-Komplexe koordiniert und ihre Stabilität gewährleistet werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht einzugrenzen, ob es sich bei der Wirkung der Solute um eine Wirkung auf das gesamte System handelt, oder ob einzelne Strukturen oder Reaktionen mehr beeinflusst werden als andere.

4.4.3 Einfluss der Ectoine auf die *in vitro*-Transkription von *luc*

Im ersten Schritt wurde der Einfluss der Ectoine auf die erste Reaktion der Luciferase-Expression, die Transkription, untersucht. Diese wurde *in vitro* als run-off-Reaktion durchgeführt. In Bakterien findet die Transkriptions-Translations-Reaktion normalerweise gekoppelt statt. Die RNA-Polymerase transkribiert die mRNA, an die sich die Ribosomen direkt anlagern können. So kann die mRNA noch nicht fertig transkribiert sein, während die Ribosomen bereits mit der Translation beginnen. Im vorliegenden System wurde jedoch mit der T7 RNA-Polymerase gearbeitet, die aus dem Phagen T7 stammt. Diese Polymerase arbeitet wesentlich schneller als bakterielle RNA-Polymerasen und transkribiert somit die DNA in kürzerer Zeit als dass die Ribosomen bereits während der

Transkription daran binden könnten (Spirin und Swartz, 2008b). Es kommt vermutlich zu einer Akkumulation der fertigen mRNA in der Reaktion, so dass im engeren Sinne hier nicht von einer gekoppelten Translation-Transkription gesprochen werden kann. Im weiteren Sinne wird damit jedoch verdeutlicht, dass die Transkription gleichzeitig mit der Translation in der Reaktion abläuft (Spirin und Swartz, 2008b).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ectoine keinen Anstieg der Menge der transkribierten mRNA bewirken (vgl. Abbildung 56). Bei Zugabe von 0,75 M und 1,0 M Ectoin konnte sogar eine Verringerung der mRNA-Menge beobachtet werden. Auch eine deutliche Verringerung der Inkubationszeit von 90 Minuten, wie in der zellfreien Protein-Synthese, auf lediglich 15 Minuten zeigte keinen Unterschied in der mRNA-Menge zwischen der Kontrolle und den Proben mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin. Die Ectoine beschleunigen die Reaktion also nicht zusätzlich. Es ist daher davon auszugehen, dass während der zellfreien Protein-Synthese in allen Reaktionen die gleiche Menge der mRNA transkribiert wurde. Da die Ectoine die Transkriptionsreaktion nicht, oder, bei hohen Ectoinkonzentrationen, zumindest nicht positiv, beeinflussen kann, bei der Betrachtung der Wirkung der Ectoine auf die zellfreie Protein-Synthese die Transkription vernachlässigt werden. Damit verbleiben drei weitere Hauptreaktionen (Translation, Aminoacyl-tRNA-Synthese und Energieregeneration), die die Ectoine beeinflussen könnten.

Insgesamt ist jedoch auch die Analyse des Effekts der Ectoine auf die *in vitro*-Transkription an sich interessant, da es sich hier wiederum um die Interaktion eines Proteins mit einer Nukleinsäure unter Soluteinfluss handelt. Zudem ist bisher nur wenig über die Regulation der Ectoinbiosynthesegene bekannt. Daher wurde, zusätzlich zur Expression der Luciferase, auch die Expression der Ectoinsynthase aus *P. stutzeri* untersucht.

4.4.4 Einfluss der Ectoine auf die *in vitro*-Transkription von *ectC*

Das hier analysierte Gen der Ectoinsynthase *ectC* aus *P. stutzeri* ist, genau wie das Gen der Luciferase, unter einem T7 RNA-Polymerase-abhängigen Promotor codiert. Im nicht-denaturierenden Agarosegel zeigte sich einerseits eine leichte Verringerung der Transkriptmenge mit Ectoin und andererseits eine leichte Erhöhung der Menge mit Hydroxyectoin (vgl. Abbildung 57). Die Transkription des Gens wurde jedoch nicht unter dem natürlichen Promotor durchgeführt, so dass keine Aussagen über die Interaktion der Ectoine damit gemacht werden können. Interessant ist trotzdem, dass die RNA-Menge der Ectoinsynthase mit zunehmender Ectoinkonzentration leicht sinkt. Hier müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die untersuchen, ob es sich hierbei

möglicherweise um eine Endprodukts-Hemmung handeln könnte. Dabei sollte sowohl der Effekt untersucht werden, wenn das Gen unter seinem natürlichen Promotor codiert ist, als auch weitere Untersuchungen an dem T7-Promotor-kontrollierten System. Somit könnten eventuell Rückschlüsse gezogen werden, ob die Solute die Konformation oder Stabilität des DNA-Templates oder der transkribierten mRNA verändern.

Unter den gewählten Bedingungen konnte keine Veränderung im Laufverhalten der *ectC*-Transkripte festgestellt werden, die für eine Änderung der Konformation unter Soluteinfluss gesprochen hätten. Für die Transkription der Gene zur Synthese osmotisch aktiver Substanzen in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass hier die Kaliumglutamat-Konzentration eine wichtige Rolle in der Aktivität der RNA-Polymerase spielt (Gralla und Vargas, 2006). Dieses wird von *E. coli* als erste Stressantwort auf hyperosmotische Veränderungen der Umgebung akkumuliert (Dinnbier *et al.*, 1988). Es wird diskutiert, dass diese erhöhten cytoplasmatischen Kaliumglutamat-Konzentrationen die Transkription von σ^{70} -regulierten Genen inhibieren und gleichzeitig die Transkription von σ^{38} -regulierten Genen aktivieren (Lee und Gralla, 2004). Für weitere *in vitro*-Transkriptions-Experimente sollten also neben den kompatiblen Soluten auch die Effekte eventuell akkumulierter Ionen analysiert werden. Möglicherweise verändert sich die Interaktion der Solute mit der RNA oder DNA wenn diese zuvor durch Ionen in ihrer Stabilität oder Konformation beeinflusst wurden.

4.4.5 Polysomen-Profile

Da kein signifikanter Effekt der Ectoine auf die Transkription gezeigt werden konnte, wurden im nächsten Schritt die Polysomen-Profile der zellfreien Protein-Synthese unter unterschiedlichen Bedingungen analysiert. Dabei zeigte sich, dass durch die Zugabe von Hydroxyectoin die Peaks der freien Untereinheiten und der 70S-Ribosomen abnehmen, während die Peaks der Polysomen zunehmen (vgl. Abbildung 58). Dies zeigt sich insbesondere beim Vergleich der Kontrolle, die 30 Minuten inkubiert wurde, mit der Reaktion die mit 125 mM Hydroxyectoin versetzt wurde. Zwar zeigt sich lediglich eine geringe Verschiebung von Disomen hin zu Tri- und Tetrasomen, doch kann die Bindung mehrerer Ribosomen pro Molekül mRNA dann trotzdem dazu führen, dass mehr Protein, in diesem Fall Luciferase, translatiert wird.

Die Frage stellt sich, welchen Effekt Hydroxyectoin auf das System hat, dass sich mehr Ribosomen an ein Molekül mRNA binden. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die mRNA durch Hydroxyectoin besser vor Degradierung durch natürliche Prozesse oder Abbau durch RNasen geschützt wird. Im Vergleich zu DNA ist RNA insbesondere durch die Hydroxylgruppe am C₂-Atom der Ribose instabiler. Diese kann spontan eine

Reaktion mit dem Phosphatrest eingehen, sodass ein Kettenbruch entsteht. Untersuchungen zur Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen konnten zeigen, dass die Zugabe von Hydroxyectoin eine komplette Inhibition der Reaktion bewirkt (Malin *et al.*, 1999). In der gleichen Studie wurde auch der Effekt von Hydroxyectoin auf die Aktivität einer RNase auf Hefe-RNA analysiert. Dabei konnte kein Schutz der RNA vor Degradierung durch die zugesetzte RNase nachgewiesen werden. Auch bei der durchgeführten *in vitro*-Transkription konnte kein Hinweis auf die Stabilisierung der mRNA durch die Ectoine beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine stabilisierende Wirkung von Hydroxyectoin auf die mRNA, andererseits wurden die Untersuchungen von Malin *et al.* lediglich mit einer Art RNA und auch nur einer Art RNase und die *in vitro*-Transkription unter Zugabe eines RNase-Inhibitors durchgeführt, während die zellfreie Protein-Synthese einen komplexen Zellextrakt verwendet. Insgesamt müssten weitere Untersuchungen erfolgen, die den Effekt von Hydroxyectoin auf die Stabilität der RNA analysieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der hier beleuchtet werden soll ist, dass die *E. coli*-Zellen, die für die Herstellung des S30-Zellextraktes verwendet wurden, *ssrA*- und *smpB*-Deletionsmutanten sind (Seidelt *et al.*, 2009). Während der Translation einer mRNA kann es vorkommen, dass durch die Interaktion der synthetisierten Aminosäurekette mit dem Tunnel des Ribosoms oder durch Schleifenbildung der mRNA das Ribosom angehalten wird (Ramu *et al.*, 2009). Das Ribosom kann sich in dieser Situation jedoch nicht von selbst von der mRNA lösen. Die Gene *ssrA* und *smpB* codieren für eine kleine RNA (small stable RNA A) bzw. das Protein SmpB (small protein B) (Karzai *et al.*, 2000), die diesen Komplex auflösen können und das unfertig translatierte Protein zum Abbau durch Proteasen markieren. Versuche der zellfreien Protein-Synthese mit S30-Zellextrakt aus *E. coli* KC6 (Calhoun und Swartz, 2006), also Zellen die diese beiden Gene nicht deletiert hatten, zeigten keinen Einfluss der Ectoine auf die Luciferaseexpression (hier nicht gezeigt). Da bei der Zellextraktherstellung der physiologische Zustand der Zellen vor der Ernte entscheidend ist, könnte es einerseits sein, dass die für diesen Zellextrakt verwendeten Zellen nicht in optimaler Verfassung waren. Andererseits ist es auch möglich, dass die Ectoine, insbesondere Hydroxyectoin, eine positive Wirkung auf die attenuierten Ribosomen in den Versuchen mit dem *E. coli* KC6 $\Delta ssrA \Delta smpB$ -Zellextrakt haben und so zur vermehrten Expression der Luciferase beitragen.

Genauso könnte Hydroxyectoin aber auch direkt oder indirekt die Anlagerung der Ribosomen an die mRNA erleichtern oder den mRNA-Ribosomen-Komplex stabilisieren. Würde Hydroxyectoin die Mg^{2+} -vermittelte Interaktion der rRNA der beiden Untereinheiten destabilisieren, so führte dies zu einer vermehrten Dissoziation der im

Zellextrakt vorliegenden 70S-Komplexe. Diese Erhöhung der Konzentration freier 30S-Untereinheiten könnte dann bereits zu einer vermehrten Bildung des 30S-Initiationskomplexes führen. Die Destabilisierung der 70S-Komplexe durch die Zugabe von Hydroxyectoin sollte in weiterführenden Arbeiten beispielsweise durch die Analyse in Saccharosegradienten weiter analysiert werden. Neben der Menge freier 30S-Untereinheiten ist aber auch die Bildung des 30S-Initiationskomplexes sowie dessen Anlagerung an die mRNA ein kompliziertes Zusammenspiel vieler weiterer Proteine, die die Interaktion der 30S-Untereinheit mit der mRNA vermitteln (vgl. 1.6.2). So würde bereits die Stabilisierung eines dieser Proteine durch Hydroxyectoin indirekt die Menge der an die mRNA angelagerten Ribosomen erhöhen. Denkbar ist aber auch die Verbesserung der Interaktion der aktiv translatierenden Ribosomen mit der mRNA durch Hydroxyectoin. Auch hier sind weitere Experimente vonnöten, die diese Überlegungen überprüfen.

5 Ausblick

5.1 Einfluss kompatibler Solute auf die Thermostabilität

Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass durch die Supplementierung von *E. coli* mit Ectoin, Hydroxyectoin und Betain die Schmelztemperatur der Ribosomen *in vivo* gesenkt wird und die Denaturierungstemperatur der Ribosomen oftmals mit der Überlebenstemperatur der Zellen korreliert wird, stellt sich die Frage, ob mit diesen Soluten supplementierte Zellen eine geringere Temperaturtoleranz aufweisen. In weiteren Experimenten sollte daher zunächst geklärt werden, ob dieser Zusammenhang beobachtet werden kann. Dazu könnten einerseits analog zu Meffert (Meffert, 2011) „Hitzeschock“-Experimente durchgeführt werden oder andererseits auch untersucht werden, ob sich durch die stetige Erhöhung der Temperatur ein Einfluss auf die intrazelluläre Solutzusammensetzung (vgl. Meffert, 2011) und -menge beobachten lässt.

Neben diesen Wachstumsexperimenten sollten zudem Versuche zur Überlebensfähigkeit der supplementierten Zellen (in Minimalmedium) durchgeführt werden. Analog zu den, von Anderson *et al.* (1991) und Stephens *et al.* (1993) durchgeführten Versuchen, könnten die Zellen im Kalorimeter gezielt bis zur gewünschten Temperatur erhitzt und danach die Anzahl der noch vermehrungsfähigen Zellen bestimmt werden. Verändert sich die Temperatur bei der die Zellen ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren, könnte dies auf die (de-)stabilisierende Wirkung des supplementierten Solut zurückgeführt werden. Besonders interessant wäre hier die Analyse der Überlebensfähigkeit von *H. elongata* unter Einfluss von Ectoin oder Hydroxyectoin. Da der Organismus unter Hitzestress das akkumulierte Ectoin hydroxyliert (Meffert, 2011) und hier gezeigt werden konnte, dass Hydroxyectoin die Schmelztemperatur der Ribosomen nicht so stark senkt wie Ectoin könnte dies auch ein erster Hinweis auf die Wirkung des Solut *in vivo* sein und zur Erklärung der von Tanne und Galinski (2012) beobachteten erhöhten Überlebensrate der Zellen bei Akkumulation von Hydroxyectoin beitragen.

Zur weiteren Bestimmung der Thermostabilität isolierter, bakterieller Ribosomen sollten als nächstes Messungen an aufgereinigten 70S-Ribosomen durchgeführt werden. Es werden zwei verschiedene Typen 70S-Ribosomen unterschieden: einerseits „loosely bound“ und andererseits „tightly coupled“ (Blaha *et al.*, 2000; Briganti *et al.*, 2000). Während „loosely bound“-Ribosomen durch die Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration auf 6 mM dissoziieren, widerstehen „tightly coupled“-Ribosomen dieser Bedingung. Mit den „tightly bound“-Ribosomen konnte in *in vitro*-Translations-Experimenten eine

Funktionalität nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den „loosely bound“-Ribosomen (Noll *et al.*, 1973). Mit „tightly bound“-Ribosomen könnte zunächst in einer Saccharosegradienten-Zentrifugation die Frage geklärt werden, ob die Solute einen Einfluss auf die Dissoziation der 70S-Komplexe haben.

Zusätzlich sollten auch weitere Puffersysteme sowie verschiedene Mg^{2+} -Konzentrationen untersucht und der Effekt der Solute auf die Ribosomen unter diesen veränderten Bedingungen analysiert werden. Außerdem zeigen die Versuche zur zellfreien Protein-Synthese und die Aktivitätsbestimmungen der Ectoinsynthese aus *H. elongata* (Witt, 2012) eine verbesserte Aktivität bei leicht basischen pH-Werten zwischen 8,5 bis 9,0. Daher sollten weitere Messungen an *H. elongata*-Ribosomen in Puffern mit höheren pH-Werten durchgeführt werden. Da die Solute nur im neutralen pH-Bereich zwitterionisch vorliegen könnten sie durch die Erhöhung des pH-Wertes in die positiv geladene Form übergehen und damit auch andere Eigenschaften aufweisen.

In den Analysen der Thermostabilität der bakteriellen Ribosomen zeigten die kompatiblen Solute teilweise einen stabilisierenden und teilweise einen destabilisierenden Effekt. Es stellt sich immer noch die Frage, warum *H. elongata* als natürliche Solute die Ectoine akkumuliert, wenn diese die Ribosomen destabilisieren und somit womöglich zu einer verringerten Temperaturtoleranz beitragen. Möglicherweise wirken die Solute jedoch nur auf die Ribosomen destabilisierend, die aus ungestressten Zellen isoliert wurden. Neuere Studien zeigen eine Variabilität der ribosomalen Zusammensetzung und diskutieren eine dadurch hervorgerufene funktionelle Spezialisierung der Ribosomen (Gilbert, 2011). So konnte für den halophilen Organismus *Haloarcula marismortui* gezeigt werden, dass die Zellen eine andere, GC-reichere, rRNA exprimieren und in die Ribosomen einbauen wenn sie bei höheren Temperaturen angezogen wurden, jedoch nicht wenn die Salzkonzentration des Mediums erhöht wurde (López-López *et al.*, 2007). Für *E. coli* konnte außerdem gezeigt werden, dass die Zellen kleinere Ribosomen exprimieren, wenn die Translation durch die Zugabe des Antibiotikums Kasugamycin inhibiert wird (Kaberina *et al.*, 2009). Bestimmte mRNAs werden trotz des Antibiotikums translatiert. Diese stehen nicht unter der Kontrolle einer Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) sondern werden von lediglich 61S großen Ribosomen „leaderless“ translatiert. Im Unterschied zu den gut untersuchten 70S-Ribosomen weisen diese Ribosomen kleinere Untereinheiten auf und enthalten sechs der ribosomalen Kernproteine nicht (Kaberina *et al.*, 2009). Daher sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob einerseits in *H. elongata*, dessen Genom für insgesamt vier rRNA-Operons codiert, und *E. coli*, dessen Genom sogar für sieben rRNA-Operons codiert, ebenfalls eine solche stressbedingte Varianz der

Ribosomen nachgewiesen werden kann und ob andererseits die kompatiblen Solute eine andere Wirkung auf die Thermostabilität der Ribosomen aus gestressten Zellen zeigen. Zudem ist für mittlerweile alle Domänen die Translation von „leaderless“-mRNA bekannt. Möglicherweise könnten die kompatiblen Solute auch eine Wirkung auf die Interaktion der ribosomalen Untereinheiten mit der „leaderless“-mRNA (oder auch SD-Sequenz-mRNA) haben und so eine protektive Wirkung über die favorisierte Translation bestimmter mRNAs entfalten.

Neben den beiden in der vorliegenden Arbeit analysierten Organismen könnte auch die Analyse der Ribosomen aus *S. ruber* interessante Erkenntnisse liefern. Hier könnte eine Analyse der Thermostabilität mit und ohne Soluteinfluss Aufschluss darüber geben, ob die Wirkung der kompatiblen Solute auf die Ribosomen von der Oberflächenladung der Protein-Nukleinsäure-Komplexe beeinflusst wird. Die Vergleiche der Proteine aus *E. coli* und *H. elongata* zeigten zwar, bis auf die beiden bereits diskutierten Proteine L10 und L25, keine auffälligen Unterschiede, andererseits könnten bereits einige wenige anders geladene Proteine den Oberflächencharakter der Ribosomen verändern (Tadeo *et al.*, 2009). So zeigten die Ribosomen trotz der hohen Ähnlichkeit gänzlich unterschiedliche Reaktionen auf die Zugabe von Salzen während der kalorimetrischen Analyse. Da, wie Tadeo *et al.* zumindest für Proteine aus Organismen, die die „salt-in“-Strategie verfolgen, zeigen konnten (Tadeo *et al.*, 2009), ausschließlich die sauren Aminosäurereste der Proteinoberfläche für die Salztoleranz eines Proteins verantwortlich ist, sollte der Zusammenhang zwischen der Position der Unterschiede und dem Einfluss von Salzen, Soluten oder erhöhter Temperatur näher betrachtet werden.

Bei den Ribosomen beider Organismen konnte eine konzentrationsabhängige, stabilisierende Wirkung der getesteten Zucker Trehalose und Saccharose nachgewiesen werden. Beide Zucker sind Disaccharide und weisen acht freie Hydroxylgruppen auf. Um den stabilisierenden Effekt von Zuckern und insbesondere den Einfluss der Hydroxylgruppen auf die Thermostabilität der Ribosomen zu testen könnten weitere Zucker, die mehr oder weniger freie Hydroxylgruppen aufweisen in die Messungen eingesetzt werden. Hängt die Stabilisierung mit der Anzahl interagierender Hydroxylgruppen zusammen, so sollten sich länger-kettige Saccharide bereits in geringeren Konzentrationen durch höhere Stabilisierungsfähigkeiten auszeichnen, während Monosaccharide in höheren Konzentrationen eingesetzt werden müssten um den gleichen Effekt zu erzielen. Zwar konnte dieser Zusammenhang für Proteine nicht gezeigt werden (Back *et al.*, 1979), für Nukleinsäuren und Protein-Nukleinsäure-Komplexe hingegen liegen keine Daten vor. Die Daten zur RNA- und DNA-Stabilität (Lambert und Draper, 2007; Kurz, 2008; Lambert *et al.*, 2010) sowie die Untersuchungen

der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass die Effekte kompatibler Solute auf Proteine nicht direkt auf Nukleinsäuren und Protein-Nukleinsäure-Komplexe übertragbar sind. Zudem sollten weitere Arbeiten durchgeführt werden, die den Effekt der Hydroxylierung kompatibler Solute und die damit verbundene Veränderung der physikalischen Eigenschaften analysieren. Zunächst könnte mit Hilfe von DNA- oder auch RNA-Schmelzkurven der Effekt der nicht-hydroxylierten und hydroxylierten Solute auf DNA untersucht werden. Im weiteren Schritt sollte dann auch der Effekt auf die Thermostabilität der Ribosomen analysiert werden.

Neben den bereits getesteten kompatiblen Soluten sollten in weiterführenden Experimenten insbesondere kompatible Solute aus thermophilen Organismen, wie beispielsweise Mannosylglycerat oder Di-Glycerol-Phosphat, getestet werden. Diese sind meistens, anders als die zwitterionischen Solute mesophiler Organismen, negativ geladen (Santos und Da Costa, 2002). Da in der vorliegenden Arbeit die Thermostabilität der Ribosomen untersucht wurde, könnten kompatible Solute, die von Zellen bei hohen Temperaturen akkumuliert werden, eine positive Wirkung aufweisen. Für Trehalose, die das Hauptsolut in vielen Stämmen des Thermophilen *Thermus* ist (Nunes *et al.*, 1995), konnte in der vorliegenden Arbeit bereits ein stabilisierender Effekt auf die Ribosomen nachgewiesen werden.

Um die Wirkung der kompatiblen Solute auf die Ribosomen weiter zu untersuchen, sollten neben den bereits diskutierten kalorimetrischen Messungen auch andere biophysikalische Methoden zum Einsatz kommen. Kommt es durch die Anwesenheit der kompatiblen Solute tatsächlich zu einer Art Umformung des Moleküls in eine kompaktere Struktur (vgl. 1.4.2) so könnte man diese Veränderung vermutlich in Kristallen der Ribosomen nachweisen. Erste Versuche zur Kristallisation von Ribosomen mit Hydroxyectoin zeigten keinen Unterschied im Wachstum der Kristalle (Ivan Lomakin, persönliche Information). Eine weitere mögliche Methode diese Veränderung zu messen ist „dynamic light scattering“. Bei dieser Methode werden die Dimensionen der Probe mit Hilfe gestreuten Lichts bestimmt. Messungen an Ribosomen mit und ohne kompatible Solute könnten so eventuell eine Verringerung der Größe des Partikels nachweisen.

5.2 Zellfreie Protein-Synthese

Nachdem die ersten beiden Reaktionen der zellfreien Protein-Synthese, *in vitro*-Transkription und *in vitro*-Translation bereits analysiert wurden, könnten zugesetzten Solute auch Effekte auf die beiden verbleibenden Reaktionen haben. In der dritten Hauptreaktion, der Aminoacyl-tRNA-Synthese, werden die tRNAs von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit den Aminosäuren beladen. Auch hier könnte ein stabilisierender

Effekt durch die zugegebenen kompatiblen Solute eine Steigerung der Gesamtaktivität des Systems bewirken. So wäre die Stabilisierung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen selbst, aber auch die Stabilisierung der tRNAs, der einzelnen Aminosäuren oder die Verbesserung der Interaktion aller drei während der Bindung der Aminosäuren an die tRNAs von Vorteil für die Gesamtreaktion. Hier müsste überprüft werden, ob nach Beendigung der Reaktion noch genügend funktionelle tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sowie Aminosäuren vorliegen oder ob während der Reaktion eventuell ein Mangel einer dieser Komponenten auftritt, der durch eine Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-katalysierte Stabilisierung abgemildert werden kann.

Wie bei der zellfreien Protein-Synthese mit *H. elongata*-Zellextrakt gezeigt wurde, spielt die Energieregeneration für eine hohe Proteinausbeute während der Reaktion eine wichtige Rolle und stellt die vierte Hauptreaktion des Systems dar. Wird die Integrität und Aktivität der an dieser Reaktion beteiligten Komponenten länger aufrechterhalten, so könnten die in der Reaktion verbrauchten Energieüberträger so lange regeneriert werden bis das gesamte Pyruvat verbraucht ist. Hier sollte in weiterführenden Experimenten die Pyruvat- oder ATP/NAD-Menge über einen zeitlichen Verlauf analysiert werden, auch um zu testen, ob die Ectoine einen Einfluss auf die Stabilität dieser Energieträger haben.

Die verwendete Magnesiumkonzentration während der zellfreien Protein-Synthese ist ein wichtiger Faktor für die Aktivität des gesamten Systems (Spirin und Swartz, 2008b). Für die Reaktion ohne Solute wurde die optimale Magnesiumkonzentration für den verwendeten S30-Zellextrakt auf 15 mM bestimmt (Thakral, 2012). Es stellt sich jedoch die Frage, ob der Einfluss der Solute eventuell die benötigte (optimale) Magnesiumkonzentration verändert. Wie Lambert *et al.* zeigen konnten, beeinflusst das compatible Solut TMAO die Konformation einer Modell-RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen so, dass die Nukleinsäure trotzdem in ihre natürliche Konformation gefaltet wird (Lambert *et al.*, 2010). Neben Nukleinsäuren können aber auch Proteine, wie die hier verwendete Luciferase, Mg^{2+} -abhängig sein. Da auch zu hohe Mg^{2+} -Konzentrationen die zellfreie Protein-Synthese stören können, sollten weitere Untersuchungen erfolgen, die den Effekt unterschiedlicher Mg^{2+} -Konzentrationen auf die zellfreie Protein-Synthese unter Soluteinfluss testen.

Neben der Mg^{2+} -Konzentration könnten die Ectoine auch auf die Faltung der Luciferase wirken. Verändern die Solute die Reaktion so, dass das exprimierte Protein sich besser falten kann, trägt auch dies zur höheren Aktivität bei. Insbesondere bei erhöhten Temperaturen ist auch denkbar, dass das exprimierte Protein durch die Solute länger in der aktiven Konformation stabilisiert wird und deshalb höhere Aktivitäten nachgewiesen wurden. In weiterführenden Arbeiten sollte im nächsten Schritt die Gesamtmenge des

exprimierten Proteins untersucht werden. Dazu könnte das Gen der Luciferase entweder mit einem Tag versehen und in die Expression in einem Western Blot nachgewiesen oder radioaktiv markierte Aminosäuren eingesetzt werden, die so die Quantifizierung erlauben.

Analog zu der Wirkung der kompatiblen Solute auf eine PCR (Lapidot *et al.*, 1999) ist bei der *in vitro*-Transkription auch ein stabilisierender Effekt auf die RNA-Polymerase oder ein destabilisierender Effekt auf die dsDNA denkbar. Daher sollte zur weiteren Analyse versucht werden, die Menge der unter Soluteinfluss transkribierten mRNA genauer zu quantifizieren. Dies könnte beispielsweise mit RiboGreen[®] (Invitrogen) erfolgen. Dieses bindet RNA-Fragmente von mindestens 50 nt und kann über die Messung der Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Um die Stabilität der synthetisierten mRNA zu verfolgen könnten auch radioaktiv markierte Nukleotide eingesetzt werden. Damit könnte die mRNA verschiedenen Stresssituationen wie erhöhten Temperaturen oder Ionenstärken ausgesetzt werden und der Einfluss der Solute auf die Stabilität analysiert werden. Da neben der Stabilität aber auch die Konformation eine wichtige Rolle für die anschließende Translation spielt, sollte auch der Einfluss der Solute auf die Konformation der mRNAs untersucht werden. In diesem Zusammenhang könnte auch der Effekt erhöhter K⁺-Glutamatkonzentrationen, wie sie Zellen als erste Stressantwort auf steigende Salinitäten akkumulieren (Lee und Gralla, 2004; Gralla und Vargas, 2006) untersucht werden. Ähnlich wie in den Messungen von Lambert & Draper könnten auch RNA-Schmelzkurven-Analysen (Lambert und Draper, 2007) durchgeführt werden, um einen besseren Einblick in die Konformation der mRNA unter Soluteinfluss zu erhalten.

Führt die Zugabe der Ectoine zur mRNA zu einer Konformationsänderung dieser, so könnte dies auch einen Einfluss auf die Translation der mRNA haben. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Zugabe von Hydroxyectoin zur zellfreien Protein-Synthese der Luciferase zu einer höheren Anzahl gebundener Ribosomen pro Molekül mRNA. Neben weiteren Soluten, deren Effekt auf die Ribosomen über Polysomen-Profile analysiert werden müsste, sollte auch geklärt werden, ob durch eine eventuelle Konformationsänderung der mRNA durch die Solute die SD-Sequenz der mRNA für den 30S-Initiationskomplex (vgl. 1.6.2) möglicherweise besser zugänglich vorliegt.

Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung der kompatiblen Solute auf die Ribosomen und insbesondere den Einfluss auf die Aktivität dieser zu analysieren, bietet die Verwendung eines S100-Zellextraktes im Vergleich zum hier verwendeten S30-Zellextrakt. Die Herstellung eines S100-Zellextraktes ist gleich der Herstellung des S30-Zellextraktes,

lediglich im letzten Schritt wird der Zellextrakt nicht nur bei 30.000 x g, sondern bei 100.000 x g zentrifugiert. Dadurch werden die Ribosomen pelletiert und in den Extrakt können andere Ribosomen eingesetzt und damit deren Aktivität untersucht werden. Durch die Verwendung des S100-Zellextraktes in der zellfreien Protein-Synthese sollte im ersten Schritt die Aktivität hitzestresser Ribosomen analysiert werden. Dazu könnten die Ribosomen mit und ohne Solute beispielsweise im Kalorimeter bis kurz vor den Beginn der Denaturierung der 30S-Untereinheit erwärmt werden und diese Ribosomen anschließend in die Reaktion eingesetzt werden. Neben den Ribosomen aus ungestressten Zellen könnten auch Ribosomen aus gestressten Zellen aufgereinigt und in die Reaktion mit den S100-Extrakt eingesetzt werden. Sollte sich die Adaption der Ribosomen an die Stresssituationen bestätigen (Gilbert, 2011), könnten kompatible Solute auf diese adaptierten Ribosomen eine andere Wirkung zeigen als auf nicht-adaptierte Ribosomen.

6 Zusammenfassung

Neben der osmotischen Wirkung kompatibler Solute ist ihr stabilisierender Effekt auf Proteine bei Salz- oder Temperaturstress gut belegt. Anders ist der Wissensstand bei der Wirkung kompatibler Solute auf Nukleinsäuren. Erste Erkenntnisse deuten auf eine Destabilisierung von DNA und RNA-Sekundärstrukturen, während RNA-Tertiärstrukturen teilweise stabilisiert werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung des Effekts kompatibler Solute auf prokaryotische Ribosomen im Hinblick auf ihre thermische Stabilität, da diese sowohl Protein- als auch RNA-Anteile vereinen. In mehreren Publikationen wird die Bedeutung der Ribosomen für das Überleben der Zellen diskutiert, da ihre Integrität aufgrund der zentralen Stellung als Proteinfabriken der Zellen vermutlich die obere Temperaturgrenze des Überlebens der Zellen bestimmt.

Durch kalorimetrische Messungen an intakten Zellen konnte gezeigt werden, dass bereits das Anzuchtmedium einen großen Einfluss auf das Denaturierungsverhalten der zellulären Bestandteile hat. Insbesondere die Denaturierung der 30S-Untereinheit erfolgte bei Verwendung des Mineralsalzmediums erst bei höheren Temperaturen.

Um das Testsystem zu vereinfachen wurden krude Ribosomen aus *Escherichia coli* aufgereinigt. Diese Methode konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgreich auf die Ribosomen des halophilen Organismus *Halomonas elongata* übertragen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Ribosomen beider Organismen in kalorimetrischen Messungen reproduzierbar in drei voneinander unabhängigen Reaktionen denaturieren. Der erste Peak konnte der Denaturierung der 30S-Untereinheit zugeordnet werden, während die beiden anderen Peaks vermutlich von der Denaturierung der 50S-Untereinheit stammen. Dabei kommt entweder eine getrennte Denaturierung der ribosomalen Proteine und der rRNA oder eine zweistufige Aufschmelzung des Protein-rRNA-Komplexes in Betracht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der beiden Zucker Trehalose (0,25 M - 1,25 M Endkonzentration) und Saccharose, der Ectoine (Ectoin und Hydroxyectoin) sowie Betain (je 0,25 M - 1,75 M Endkonzentration) auf die Denaturierung der Ribosomen beider Organismen, sowie isolierter Untereinheiten aus *E. coli* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zucker die Schmelztemperaturen der Denaturierungsreaktionen erhöhen, während die Ectoine die Schmelztemperaturen senken. Außerdem konnte bei den Ribosomen aus *E. coli* mit Hydroxyectoin eine deutliche Steigerung der Reaktionsenthalpie durch erhöhte Hydroxyectoinkonzentrationen beobachtet werden. Dies spricht, da gleichzeitig die Schmelztemperatur

nur wenig sinkt, zusätzlich für eine Entropiesteigerung je mehr Hydroxyectoin im Messsystem vorhanden ist.

Da es sich bei *H. elongata* um einen halophilen Organismus handelt, dessen cytoplasmatisches Milieu vermutlich teilweise erhöhte Ionenstärken aufweist, wurde auch der Effekt von NaCl (und bei *H. elongata* auch KCl) auf die Ribosomen untersucht. Während die Zugabe von NaCl zu *E. coli*-Ribosomen zu einer diffusen Denaturierung führt, weisen die Ribosomen von *H. elongata* durch die Zugabe beider getesteter Salze, NaCl und KCl, ein distinktes Denaturierungsmuster mit nur noch zwei Peaks auf. Die Zugabe kompatibler Solute zu diesen Salz-gestressten Ribosomen führt lediglich zu einer Verschiebung der Denaturierungstemperatur, in die für das getestete Solut charakteristische Richtung, jedoch nicht zu einer Rückführung der Denaturierungsreaktion zu dem Muster das ohne Salz beobachtet wurde.

Nachdem die Effekte kompatibler Solute auf isolierte Ribosomen analysiert wurden, sind auch die Beobachtungen in den Messungen an intakten Zellen erklärbar. Vermutlich wurden in den Zellen die Ribosomen durch die akkumulierten Solute, entsprechend der Wirkung des jeweiligen Soluts, stabilisiert oder destabilisiert. Dies wurde in den Messungen insbesondere an der Denaturierung der 30S-Untereinheit deutlich.

Neben den kalorimetrischen Messungen wurden auch bioinformatische Analysen der Unterschiede der Ribosomen aus *E. coli* und *H. elongata* angestellt. Dabei konnten signifikante Unterschiede insbesondere in zwei der 53 ribosomalen Proteine festgestellt werden. Sowohl das ribosomale Protein L10 als auch L25 weisen in *E. coli* einen deutlich basischen Charakter auf, während die Proteine in *H. elongata* sauer sind. Beim L25 konnte außerdem eine C-terminale Verlängerung der *H. elongata*-Variante beobachtet werden. Diese ist einem aus *Bacillus subtilis* bekannten Stressprotein homolog. Weitere Arbeiten dazu wurden in einer angegliederten Diplomarbeit (Ebisch, 2012) durchgeführt.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem Effekt der kompatiblen Solute auf die Aktivität der Ribosomen. Dazu wurde eine zellfreie Protein-Synthese mit Luciferase als Reporterprotein genutzt und die Solute in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Während die Zucker in hohen Konzentrationen (>250 mM) die Aktivität senkten, konnte mit den Ectoinen eine Steigerung beobachtet werden. Unter Standardbedingungen (Inkubation bei 30 °C) wurde mit Ectoin eine maximale Aktivität bei Zusatz von 150-250 mM (etwa 130 % im Vergleich zur Kontrolle), mit Hydroxyectoin (500 mM) sogar eine Steigerung auf 240 % beobachtet. Bei Steigerung der Inkubationstemperatur auf 37 °C konnte der Effekt von Ectoin nicht mehr beobachtet

werden. Hydroxyectoin hingegen zeigte weiterhin einen positiven Effekt auf die Expression der Luciferase bei Zusatz von 500 mM.

Insgesamt umfasste die zellfreie Protein-Synthese vier Hauptreaktionen: *in vitro*-Transkription, *in vitro*-Translation, Aminoacyl-tRNA-Synthese und Energieregeneration. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der Ectoine nicht auf der Ebene der *in vitro*-Transkription stattfindet, da die Menge synthetisierter mRNA durch den Zusatz der Ectoine nicht erhöht wird. Mit Hilfe von Polysomen-Profilen konnte jedoch eine positive Wirkung von Hydroxyectoin auf die Anzahl Ribosomen pro mRNA beobachtet werden. Durch den Zusatz von Hydroxyectoin zur zellfreien Protein-Synthese verschob sich das Verhältnis von Disomen zu Tri- und Tetrasomen in Richtung der Tetrasomen.

Literaturverzeichnis

Anderson WA, Hedges ND, Jones MV, Cole MB (1991): Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology*: 1419–1424.

Achtman M, Wagner M (2008): Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology*: 431–440.

Allen SH, Wong K (1986): The role of magnesium and potassium ions in the molecular mechanism of ribosome assembly: hydrodynamic, conformational, and thermal stability studies of 16 S RNA from *Escherichia coli* ribosomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 249: 137–147.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.

Anderson WA, Hedges ND, Jones MV, Cole MB (1991): Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology*: 1419–1424.

Antón J, Oren A, Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Amann R, Rosselló-Mora R (2002): *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 485–491.

Antón J, Rosselló-Mora R, Rodríguez-Valera F, Amann R (2000): Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3052–3057.

Arakawa T, Timasheff SN (1983): Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 224: 169–177.

Arakawa T, Timasheff SN (1985): The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysics* 47: 411–414.

Argüelles JC (2000): Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* 174: 217–224.

Arnold RJ, Reilly JP (1999): Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 269: 105–112.

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, Castro E de, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H (2012): ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research* 40: W597–W603.

Avenaudo P, Castroviejo M, Claret S, Rosenbaum J, Mégraud F, Ménard A (2004): Expression and activity of the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318: 739–745.

Back JF, Oakenfull D, Smith MB (1979): Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18: 5191–5196.

Ban N, Nissen P, Hansen JL, Moore PB, Steitz TA (2000): The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905–920.

Baross JA, Deming JW (1983): Growth of 'black smoker' bacteria at temperatures of at least 250 °C. *Nature* 303: 423–426.

Bartels D, Salamini F (2001): Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology* 127: 1346–1353.

Barth S, Huhn M, Matthey B, Klimka A, Galinski EA, Engert A (2000): Compatible solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 66: 1572–1579.

Bayley ST, Kushner DJ (1964): The ribosomes of the extremely halophilic bacterium *Halobacterium cutirubrum*. *Journal of Molecular Biology* 9: 654–669.

Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2010): Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330: 1203–1209.

Bertani G (1951): Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62: 293–300.

Beyer N, Driller H, Bünger J (2000): Ectoine, an innovative, multifunctional, active substance for the cosmetic industry. *SOWF J* 126: 26–29.

Bhuyan AK (2010): On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers* 93: 186–199.

Blaaha G, Stelzl U, Spahn CMT, Agrawal RK, Frank J, Nierhaus KH (2000): Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods in Enzymology* 317: 292–309.

Blasi M, Bonincontro A, Cinelli S, Onori G, Risuleo G (2000): Structural stability of ribosomes subjected to RNase treatment evidenced by dielectric spectroscopy and differential scanning microcalorimetry. *Biophysical Chemistry* 83: 73–78.

Bligh EG, Dyer WJ (1959): A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911–917.

Bolen DW, Baskakov IV (2001): The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of Molecular Biology* 310: 955–963.

Bonincontro A, Briganti G, Giansanti A, Pedone F, Risuleo G (1993): Effects of magnesium ions on ribosomes: A fluorescence study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1174: 27–30.

Bonincontro A, Cinelli S, Mengoni M, Onori G, Risuleo G, Santucci A (1998): Differential stability of *E. coli* ribosomal particles and free RNA towards thermal degradation studied by microcalorimetry. *Biophysical Chemistry* 75: 97–103.

Borges N, Ramos A, Raven N, Sharp R, Santos H (2002): Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles* 6: 209–216.

Bovell CR, Packer L, Helgerson R (1962): Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light-scattering. *Biochimica et Biophysica Acta* 75: 257–266.

Bowers K, Mesbah N, 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.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.

Brady CJ, Gibson TS, Barlow EWR, Speirs J, Wyn Jones RG (1984): Salt-tolerance in plants. I. Ions, compatible organic solutes and the stability of plant ribosomes. *Plant, Cell & Environment* 7: 571–578.

Bremer H, Dennis PP (1987): Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. American Society for Microbiology, 2. Aufl., Washington D.C.

Briganti G, Giordano R, Londei P, Valle F (2000): Contrast analysis of the composition of ribosomes extracted with different purification procedures. *Journal of Applied Crystallography* 33: 1113–1118.

Brigotti M, Petronini PG, Carnicelli D, Alfieri RR, Bonelli MA, Borghetti AF, Wheeler KP (2003): Effects of osmolarity, ions and compatible osmolytes on cell-free protein synthesis. *Biochem J*: 369–374.

Brown AD (1976): Microbial water stress. *Bact Rev*: 803–846.

Brünig ANS (2005): Molekulargenetische und physiologische Studien zur Entwicklung eines Expressionssystems in *Halomonas elongata* DSMZ 2581^T. Universität Bonn, Diplomarbeit.

Bruylants G, Wouters J, Michaux C (2005): Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Current Medicinal Chemistry* 12: 2011–2020.

Bünger J (1999): Ectoine added protection and care for the skin. *Eur Cosmet* 7: 22–24.

Bünger J, Driller H (2004): Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* 17: 232–237.

Bursy J, Pierik AJ, Pica N, Bremer E (2007): Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 282: 31147–31155.

Calderon MI, Vargas C, Rojo F, Iglesias-Guerra F, Csonka LN, Ventosa A, Nieto JJ (2004): Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043T. *Microbiology* 150: 3051–3063.

Calhoun KA, Swartz JR (2005): An economical method for cell-free protein synthesis using glucose and nucleoside monophosphates. *Biotechnology Progress* 21: 1146-1153.

Calhoun KA, Swartz JR (2006): Total amino acid stabilization during cell-free protein synthesis reactions. *Journal of Biotechnology* 123: 193–203.

Cánovas D, Vargas C, Csonka LN, Ventosa A, Nieto JJ (1998): Synthesis of glycine betaine from exogenous choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4095–4097.

Castellani A, Chalmers AJ (1919): Manual of tropical medicine. Ed.: Williams. Wood and Co., 3. Aufl., New York.

Cech TR (2000): The ribosome is a ribozyme. *Science* 289: 878–879.

Chamberlin M, McGrath J (1970): Characterization of a T7-specific RNA polymerase isolated from *E. coli* infected with T7 phage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 35: 259–262.

Chao F (1957): Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 70: 426–431.

Choquet CG, Kamekura M, Kushner DJ (1989): In vitro protein synthesis by moderate halophile *Vibrio costicola*: site of action of Cl⁻ ions. *Journal of Bacteriology* 171: 880–886.

Clegg JS, Seitz P, Seitz W, Hazlewood CF (1982): Cellular responses to extreme water loss: The water-replacement hypothesis. *Cryobiology* 19: 306–316.

Condon C, Liveris D, Squires C, Schwartz I, Squires CL (1995): rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *Journal of Bacteriology* 177: 4152–4156.

Cooper A, Nutley MA, Wadood A (2000): Differential scanning calorimetry. In: Harding SE, Chowdhry BZ (Hrsg.), *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*. Oxford University Press, Oxford New York, 287–318.

Corpet F (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16: 10881–10890.

Correa Acosta JE (2013): Hydroxyectoin metabolism in *Halomonas elongata*. Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Dissertation.

Cox RA, Pratt H, Huvos P, Higginson B, Hirst W (1972): A study of the thermal stability of ribosomes and biologically active subribosomal particles. *Biochem J* 134: 775–793.

Crick F (1970): Central dogma of molecular biology. *Nature* 227: 561–563.

Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ (1990): Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27: 219–231.

- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistrom C (1987):** Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* 242: 1–10.
- Csonka LN (1989):** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews* 53: 121–147.
- da Costa MS, Santos H, Galinski EA (1998):** An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol*: 117–153.
- Dagert M, Ehrlich SD (1979):** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23–28.
- Deutscher MP (2003):** Degradation of stable RNA in bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 278: 45041–45044.
- Dinnbier U, Limpinsel E, Schmid R, Bakker EP (1988):** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Archives of Microbiology* 150: 349–357.
- Draper DE (2004):** A guide to ions and RNA structure. *RNA* 10: 335–343.
- Ebisch M (2012):** Untersuchungen zur Rolle des ribosomalen Proteins L25 für die Stabilität prokaryotischer Ribosomen. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Diplomarbeit.
- Euzéby JP (2013):** List of prokaryotic names with standing in nomenclature. www.bacterio.net (30.01.2013).
- Galinski EA (1986):** Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen, phototrophen Bakterien. Universität Bonn, Dissertation.
- Galinski EA (1995):** Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* 37: 273–328.
- Galinski EA, Herzog RM (1990):** The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch Microbiol* 153: 607–613.
- Galinski EA, Louis P (1999):** Compatible solutes: Ectoine production and gene expression. In: Oren A (Hrsg.), *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*, 187–202.
- Galinski EA, Pfeiffer H, Trüper HG (1985):** 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid: A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *European Journal of Biochemistry* 149: 135–139.
- Galinski EA, Trüper HG (1982):** Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiology Letters* 13: 357–360.
- Galinski EA, Trüper HG (1994):** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 95–108.

Galtier N, Tourasse N, Gouy M (1999): A nonhyperthermophilic common ancestor to extant life forms. *Science* 283: 220–221.

Garcia-Esteba R, Argandona M, Reina-Bueno M, Capote N, Iglesias-Guerra F, Nieto JJ, Vargas C (2006): The ectD Gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Journal of Bacteriology* 188: 3774–3784.

Garrels RM, Thompson ME (1962): A chemical model for sea water at 25 degrees C and one atmosphere total pressure. *American Journal of Science* 260: 57–66.

Gaucher EA, Govindarajan S, Ganesh OK (2008): Palaeotemperature trend for precambrian life inferred from resurrected proteins. *Nature* 451: 704–707.

Gekko K, Timasheff SN (1981): Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20: 4667–4676.

Giæver HM, Styrvold OB, Strøm AR (1988): Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 170: 2841–2849.

Gilbert WV (2011): Functional specialization of ribosomes? *Trends in Biochemical Sciences* 36: 127–132.

Göller K, Galinski EA (1999): Protection of a model enzyme lactate dehydrogenase/ against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. *Journal of Molecular Catalysis* 7: 37–45.

Göller K, Ofer A, Galinski EA (1998): Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 161: 293–300.

Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM (1966): Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5: 467–477.

Graf R, Anzali S, Bünger J, Pfluecker F, Driller H (2008): The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clinics in Dermatology* 26: 326–333.

Gralla JD, Vargas DR (2006): Potassium glutamate as a transcriptional inhibitor during bacterial osmoregulation. *The EMBO Journal* 25: 1515–1521.

Grimaldi D, Engel MS (2005): Evolution of insects. Cambridge University Press, New York/Cambridge.

Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A (2007): Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research* 35: e127.

Guillerez J, Lopez PJ, Proux F, Launay H, Dreyfus M (2005): A mutation in T7 RNA polymerase that facilitates promoter clearance. *PNAS* 102: 5958–5963.

Hardt M, Kempf B, Faatz E, Bremer E (1995): The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Molec. Gen. Genet.* 246: 783–796.

- Hanahan D (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166: 557–580.
- Heinrich U, Garbe B, Tronnier H (2007):** In vivo assessment of ectoin: a randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Skin Pharmacol Physiol* 20: 211–218.
- Hincha DH, Hagemann M (2004):** Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem J* 383: 277–283.
- Imhoff JF, Rodriguez-Valera F (1984):** Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *Journal of Bacteriology* 160: 478–479.
- Imhoff JF, Trüper HG (1977):** *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. *Arch Microbiol* 114: 115–121.
- Inbar L, Lapidot A (1988):** Metabolic regulation in *Streptomyces parvulus* during actinomycin D synthesis, studied with ¹³C- and ¹⁵N-labeled precursors by ¹³C and ¹⁵N nuclear magnetic resonance spectroscopy and by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Bacteriology* 170: 4055–4064.
- Jacobson A, Gillespie D (1968):** Metabolic events occurring during recovery from prolonged glucose starvation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 95: 1030–1039.
- Jain M, Tyagi SB, Thakur JK, Tyagi AK, Khurana JP (2004):** Molecular characterization of a light-responsive gene, breast basic conserved protein 1 (OsiBBC1), encoding nuclear-localized protein homologous to ribosomal protein L13 from *Oryza sativa indica*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1676: 182–192.
- Jenner L, Melnikov S, Loubresse NG de, Ben-Shem A, Iskakova M, Urzhumtsev A, Meskauskas A, Dinman J, Yusupova G, Yusupov M (2012):** Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current Opinion in Structural Biology* 22: 759–767.
- Jewett MC, Swartz JR (2004a):** Mimicking the *Escherichia coli* cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* 86: 19–26.
- Jewett MC, Swartz JR (2004b):** Rapid expression and purification of 100 nmol quantities of active protein using cell-free protein synthesis. *Biotechnology Progress* 20: 102–109.
- Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, Bratcher HB, Brehony C, Colles FM, Wimalaratna H, Harrison OB, Sheppard SK, Cody AJ, Maiden MCJ (2012):** Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* 158: 1005–1015.
- Kaberdina AC, Szaflarski W, Nierhaus KH, Moll I (2009):** An unexpected type of ribosomes induced by kasugamycin: A look into ancestral times of protein synthesis? *Molecular Cell* 33: 227–236.
- Kai L, Dötsch V, Kaldenhoff R, Bernhard F (2013):** Artificial environments for the co-translational stabilization of cell-free expressed proteins. *PLoS ONE* 8: e56637.

Kamekura M, Kushner DJ (1984): Effect of chloride and glutamate ions on in vitro protein synthesis by the moderate halophile *Vibrio costicola*. *Journal of Bacteriology* 160: 385–390.

Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, Park CB (2005): Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Letters* 579: 4775–4780.

Karzai AW, Roche ED, Sauer RT (2000): The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Mol Biol* 7: 449–455.

Kempf B, Bremer E (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* 170: 319–330.

Kigawa T, Yamaguchi-Nunokawa E, Kodama K, Matsuda T, Yabuki T, Matsuda N, Ishitani R, Nureki O, Yokoyama S (2002): Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis. *J Struct Func Genom* 2: 29–35.

Kim D, Swartz JR (2001): Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* 74: 309–316.

King GC, Martin CT, Pham TT, Coleman JE (1986): Transcription by T7 RNA polymerase is not zinc-dependent and is abolished on amidomethylation of cysteine-347. *Biochemistry* 25: 36–40.

Klammt C, Schwarz D, Lehner I, Sobhanifar S, Löhr F, Zeelen J, Glaubitz C, Dötsch V, Bernhard F (2008): Cell-free expression of integral membrane proteins for structural studies. In: Spirin AA, Swartz JR (Hrsg.), *Cell-free protein synthesis*. Wiley-VCH, Weinheim, 141–164.

Klein DJ, Moore PB, Steitz TA (2004): The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. *RNA* 10: 1366–1379.

Knapp S, Ladenstein R, Galinski EA (1999): Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes β -hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* 3: 191–198.

Kolmsee T, Delic D, Agyenim T, Calles C, Wagner R (2011): Differential stringent control of *Escherichia coli* rRNA promoters: effects of ppGpp, DksA and the initiating nucleotides. *Microbiology* 157: 2871–2879.

Korepanov AP, Gongadze GM, Garber MB (2004): General stress protein CTC from *Bacillus subtilis* specifically binds to ribosomal 5S RNA. *Biochemistry (Moscow)* 69: 607–611.

Lambert D, Draper DE (2007): Effects of osmolytes on RNA secondary and tertiary structure stabilities and RNA-Mg²⁺ interactions. *Journal of Molecular Biology* 370: 993–1005.

Lambert D, Leipply D, Draper DE (2010): The osmolyte TMAO stabilizes native RNA tertiary structures in the absence of Mg²⁺: evidence for a large barrier to folding from phosphate dehydration. *Journal of Molecular Biology* 404: 138–157.

- Lämmli UK (1970):** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lamosa P, Turner DL, Ventura R, Maycock C, Santos H (2003):** Protein stabilization by compatible solutes. Effect of diglycerol phosphate on the dynamics of *Desulfovibrio gigas* rubredoxin studied by NMR. *Eur J Biochem* 270: 4606–4614.
- Landfald B, Strøm AR (1986):** Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 165: 849–855.
- Lapidot A, Iakobashvili R, Malin G (1999):** Methods for DNA amplification and sequencing. International Patent Classification C12Q 1/68 International Publication Number WO 99/41410.
- Larsen PI, Sydne LK, Landfald B, Strom AR (1987):** Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch Microbiol* 147: 1–7.
- Lecompte O, Ripp R, Thierry J, Moras D, Poch O (2002):** Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Research* 30: 5382–5390.
- Lee J, Kaletunç G (2002):** Evaluation of the heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5379–5386.
- Lee SJ, Gralla JD (2004):** Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase. *Molecular Cell* 14: 153–162.
- Leirimo S, Harrison C, Cayley DS, Burgess RR, Record MT (1987):** Replacement of potassium chloride by potassium glutamate dramatically enhances protein-DNA interactions in vitro. *Biochemistry* 26: 2095–2101.
- Lenné T, Bryant G, Holcomb R, Koster KL (2007):** How much solute is needed to inhibit the fluid to gel membrane phase transition at low hydration? *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 1019–1022.
- Lentzen G, Schwarz T (2006):** Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 623–634.
- Leon SA, Brock TD (1967):** Effect of streptomycin and neomycin on physical properties of the ribosome. *Journal of Molecular Biology* 24: 391–404.
- Lindahl L, Zengel JM (1986):** Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* 20: 297–326.
- Lippert K, Galinski EA (1992):** Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 61–65.
- Liu Y, Bolen DW (1995):** The peptide backbone plays a dominant Role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 34: 12884–12891.
- López-López A, Benlloch S, Bonfá M, Rodríguez-Valera F, Mira A (2007):** Intragenomic 16S rDNA divergence in *Haloarcula marismortui* is an adaptation to

different temperatures. *J Mol Evol* 65: 687-696.

Lotti M, Noah M, Stöffler-Meilicke M, Stöffler G (1989): Localization of proteins L4, L5, L20 and L25 on the ribosomal surface by immuno-electron microscopy. *Molecular and General Genetics* 216: 245–253.

Lottspeich F, Engels JW (Hrsg.) (2006): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Louis P, Galinski EA (1997): Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 143: 1141–1149.

Louis P, Trüper H, Galinski EA (1994): Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 684–688.

Mackenzie KF, Singh KK, Brown AD (1988): Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 134: 1661–1666.

Mackey BM, Miles CA, Parsons SE, Seymour DA (1991): Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology* 137: 2361–2374.

Makhatadze GI, Privalov PL (1992): Protein interactions with urea and guanidinium chloride: A calorimetric study. *Journal of Molecular Biology* 226: 491–505.

Malin G, Iakobashvili R, Lapidot A (1999): Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 6920–6929.

Manzanera M, Garcia de Castro A, Tøndervik A, Rayner-Brandes M, Strøm AR, Tunnacliffe A (2002): Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4328–4333.

Manzanera M, Vilchez S, Tunnacliffe A (2004): High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiology Letters* 233: 347–352.

Marmur J (1961): A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* 3: 208–218.

Martin DD, Ciulla RA, Roberts MF (1999): Osmoadaptation in archaea. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1815–1825.

McNicholas PM, Najarian DJ, Mann PA, Hesk D, Hare RS, Shaw KJ, Black TA (2000): Evernimicin binds exclusively to the 50S ribosomal subunit and inhibits translation in cell-free systems derived from both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 1121–1126.

Meffert A (2011): Die Hydroxylierung von Ectoin und Derivaten durch die Hydroxylase EctD aus *Halomonas elongata*. Universität Bonn, Dissertation.

- Melmer G, Schwarz T (2002):** Use of compatible solutes as adjuvans for vaccines. Patent Nummer 2002049668.
- Mevarech M, Frolow F, Gloss LM (2000):** Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Thermodynamics and the* 86: 155–164.
- Microcal:** VP-DSC MicroCalorimeter. User's manual, Northampton, MA, USA.
- Migula W (1895: 20-30):** Bacteriaceae (Stäbchenbakterien). In: *Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Teil I, Abteilung Ia*, Ed.: A. Engler.
- Miller JH (1972):** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Modestova YA, Lomakina GY, Ugarova NN (2011):** Site-directed mutagenesis of cysteine residues of *Luciola mingrelica* firefly luciferase. *Biochemistry Moscow* 76: 1147-1154.
- Mohácsi-Farkas C, Farkas J, Mézáros L, Reichart O, Andrassy É (1999):** Thermal denaturation of bacterial cells examined by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 57: 409–414.
- Mondino LJ, Asao M, Madigan MT (2009):** Cold-active halophilic bacteria from the ice-sealed Lake Vida, Antarctica. *Archives of Microbiology* 191: 785-790.
- Montiel PO (1998):** Profiles of soluble carbohydrates and their adaptive role in maritime Antarctic terrestrial arthropods. *Polar Biol* 19: 250-256.
- Moore PB (1999):** The RNA folding problem. In: Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF (Hrsg.), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 381–401.
- Moore PB (2012):** How should we think about the ribosome? *Annual Review of Biophysics* 41: 1–19.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263–273.
- Mullis KB, Faloona FA (1987):** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Ray Wu (Hrsg.), *Methods in Enzymology : Recombinant DNA Part F*. Academic Press, 335–350.
- Näslund PH, Hultin T (1970):** Effects of potassium deficiency on mammalian ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 204: 237–247.
- Niles EG, Conlon SW, Summers WC (1974):** Purification and physical characterization of T7 RNA polymerase from T7-infected *Escherichia coli* B. *Biochemistry* 13: 3904–3912.
- Nirenberg MW, Matthaei JH (1961):** The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Biochemistry* 47: 1588-1602.

- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2000):** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920–930.
- Noll M, Hapke B, Noll H (1973):** Structural dynamics of bacterial ribosomes: II. Preparation and characterization of ribosomes and subunits active in the translation of natural messenger RNA. *Journal of Molecular Biology* 80: 519–529.
- Nomura M, Morgan EA, Jaskunas RS (1977):** Genetics of bacterial ribosomes. *Annual Review of Genetics* 11: 297–347.
- Novac O, Guenier A, Pelletier J (2004):** Inhibitors of protein synthesis identified by a high throughput multiplexed translation screen. *Nucleic Acids Research* 32: 902–915.
- Nunes OC, Manaia CM, da Costa MS, Santos H (1995):** Compatible solutes in the thermophilic bacteria *Rhodothermus marinus* and "*Thermus thermophilus*". *Appl Environ Microbiol* 61: 2351–2357.
- Nyyssölä A, Kerovuo J, Kaukinen P, Weymarn N von, Reinikainen T (2000):** Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *Journal of Biological Chemistry* 275: 22196–22201.
- Ohmiya Y, Tsuji FI (1997):** Mutagenesis of firefly luciferase shows that cysteine residues are not required for bioluminescence activity. *FEBS Letters* 404: 115–117.
- Ono H, Sawada K, Khunajakr N, Tao T, Yamamoto M, Hiramoto M, Shinmyo Atsuhiko, Takano M, Murooka Y (1999):** Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *Journal of Bacteriology* 181: 91–99.
- Oren A (1999a):** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 334–348.
- Oren A (1999b):** Microbiological studies in the Dead Sea: future challenges toward the understanding of life at the limit of salt concentrations. *Hydrobiologica* 405: 1–9.
- Oren A (2002):** Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht.
- Oren A (2004):** Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359: 623–638.
- Oren A (2006a):** Life at high salt concentrations. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E (Hrsg.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology and biochemistry*. Springer-Verlag, New York, 263–282.
- Oren A (2006b):** Life in saline and hypersaline environments. In: Seckbach J (Hrsg.), *Life as we know it*. Springer, 77–89.
- Oren A (2008):** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4: 2.
- Oren A, Heldal M, Norland S, Galinski EA (2002):** Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* 6: 491–498.

- Pace B, Campbell LL (1967):** Correlation of maximal growth temperature and ribosome heat stability. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 57: 1110-1116.
- Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, Iborra JL, Vargas C, Nieto JJ, Cánovas M (2010):** Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances* 28: 782–801.
- Peters P, Galinski EA, Trüper H (1990):** The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* 71: 157–162.
- Petry S, Weixlbaumer A, Ramakrishnan V (2008):** The termination of translation. *Folding and Binding / Protein-nucleic acid interactions* 18: 70–77.
- Pflücker F, Bünger J, Hitzel S, Witte G, Beck JLM, Driller H (2005):** Complete photo protection: Going beyond visible endpoints. *SÖFW Journal* 131: 20–30.
- Phua SH, Srinivasa BR, Subramanian AR (1989):** Chloroplast ribosomal protein L13 is encoded in the nucleus and is considerably larger than its bacterial homologue. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 1968–1971.
- Pincus DL, Hyeon C, Thirumalai D (2008):** Effects of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) and Crowding Agents on the Stability of RNA Hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 7364–7372.
- Pleitner A, Zhai Y, Winter R, Ruan L, McMullen LM, Gänzle MG (2012):** Compatible solutes contribute to heat resistance and ribosome stability in *Escherichia coli* AW1.7. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 1351–1357.
- Qu Y, Bolen CL, Bolen DW (1998):** Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 9268–9273.
- Ramu H, Mankin A, Vazquez-Laslop N (2009):** Programmed drug-dependent ribosome stalling. *Molecular Microbiology* 71: 811–824.
- Reed RH, Borowitzka LJ, Mackay MA, Chudek JA, Foster R, Warr SRC, Moore DJ, Stewart WDP (1986):** Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 39: 51–56.
- Rees WA, Yager TD, Korte J, Hippel PH von (1993):** Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* 32: 137–144.
- Riley M, Abe T, Arnaud MB, Berlyn MK, Blattner FR, Chaudhuri RR, Glasner JD, Horiuchi T, Keseler IM, Kosuge T, Mori H, Perna NT, Plunkett G, Rudd KE, Serres MH, Thomas GH, Thomson NR, Wishart D, Wanner BL (2006):** *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot—2005. *Nucleic Acids Research* 34: 1–9.
- Roberts MF (2005):** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1: 1–30.
- Roberts RB (1958):** *Microsomal particles and protein synthesis*. Pergamon Press, New York.

- Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis TE (1989):** Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 2. Aufl., Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences 74: 5463–5467.
- Santoro MM, Liu Y, Khan SMA, Hou L, Bolen DW (1992):** Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. Biochemistry 31: 5278–5283.
- Santos H, Da Costa MS (2002):** Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. Environmental Microbiology 4: 501–509.
- Schluenzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A (2000):** Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. Cell 102: 615–623.
- Schmalisch M, Langbein I, Stülke J (2002):** The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 4: 495–501.
- Schnoor M, Voß P, Cullen P, Böking T, Galla H, Galinski EA, Lorkowski S (2004):** Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. Biochemical and Biophysical Research Communications 322: 867–872.
- Schwibbert K, Marin-Sanguino A, Bagyan I, Heidrich G, Lentzen G, Seitz H, Rampp M, Schuster SC, Klenk H, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Kunte HJ (2011):** A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. Environmental Microbiology 13: 1973–1994.
- Seidelt B, Innis CA, Wilson DN, Gartmann M, Armache J, Villa E, Trabuco LG, Becker T, Mielke T, Schulten K, Steitz TA, Beckmann R (2009):** Structural insight into nascent polypeptide chain-mediated translational stalling. Science 326: 1412–1415.
- Seip B (2009):** Charakterisierung des Hydroxyectoin-Biosynthesegenclusters aus *Pseudomonas stutzeri* und Vergleich der Ectoinsynthese mit der anderer Organismen. Universität Bonn, Diplomarbeit.
- Seip B, Galinski EA, Kurz M (2011):** Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *Pseudomonas stutzeri* *ectABCD-ask* gene cluster. Applied and Environmental Microbiology 77: 1368–1374.
- Sell KC (2013):** Unravelling the antimicrobial features of the incompatible solutes creatine and guanidino-ectoine. Universität Bonn, Dissertation.
- Semrad K, Green R (2002):** Osmolytes stimulate the reconstitution of functional 50S ribosomes from *in vitro* transcripts of *Escherichia coli* 23S rRNA. RNA 8: 401–411.
- Severin J, Wohlfahrt A, Galinski EA (1992):** The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. Journal of General Microbiology 138: 1629–1638.
- Shajani Z, Sykes MT, Williamson JR (2011):** Assembly of bacterial ribosomes. Annual Review of Biochemistry 80: 501–526.

Shimizu Y, Kanamori T, Ueda T (2005): Protein synthesis by pure translation systems. *Methods* 36: 299–304.

Shine J, Dalgarno L (1974): The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 1342–1346.

Singer MA, Lindquist S (1998): Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell*: 639–648.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto E, KGNM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76–85.

Spieß A, Mueller N, Ivell R (2004): Trehalose is a potent PCR enhancer: Lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of taq polymerase by the disaccharide trehalose. *Clinical Chemistry* 50: 1256–1259.

Spink CH, Garbett N, Chaires JB (2007): Enthalpies of DNA melting in the presence of osmolytes. *Biophysical Chemistry* 126: 176–185.

Spirin AA, Swartz JR (Hrsg.) (2008a): Cell-free protein synthesis. Wiley-VCH, Weinheim.

Spirin AA, Swartz JR (2008b): Cell-free protein synthesis systems: historical landmarks, classification, and general methods. In: Spirin AA, Swartz JR (Hrsg.), Cell-free protein synthesis. Wiley-VCH, Weinheim, 1–34.

Steitz TA (2008): A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 242–253.

Stephens PJ, Jones MV (1993): Reduced ribosomal thermal denaturation in *Listeria monocytogenes* following osmotic and heat shocks. *FEMS Microbiology Letters* 106: 177–182.

Stoldt M, Wöhnert J, Ohlenschläger O, Görlach M, Brown LR (1999): The NMR structure of the 5S rRNA E-domain-protein L25 complex shows preformed and induced recognition. *The EMBO Journal* 18: 6508–6521.

Storey R, Wyn Jones RG (1975): Betaine and choline levels in plants and their relationship to NaCl stress. *Plant Science Letters* 4: 161–168.

Studier FW, Moffatt BA (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189: 113–130.

Sun T, Bickle TA, Traut RR (1972): Similarity in the size and number of ribosomal proteins from different prokaryotes. *Journal of Bacteriology* 111: 474–480.

Tadeo X, López-Méndez B, Trigueros T, Laín A, Castaño D, Millet O (2009): Structural basis for the amino acid composition of proteins from halophilic archaea. *PLoS Biol* 7: e1000257 EP -.

Tal M (1969): Thermal denaturation of ribosomes. *Biochemistry* 8: 424–435.

- Tamaoki T, Miyazawa F (1966):** Dissociation of ribosomes at high temperatures. *Journal of Molecular Biology* 17: 537–540.
- Tanaka S, Ikeda K, Miyasaka H (2001):** Enhanced tolerance against salt-stress and freezing-stress of *Escherichia coli* cells expressing algal *bbc1* gene. *Current Microbiology* 42: 173–177.
- Tanne C, Galinski EA (2012):** Elucidation of potential vitrificants of *Halomonas elongata* DSMZ 2581^T with regard to desiccation tolerance and bio-inspired use as interface protectants. VAAM, Posterpräsentation auf der Jahrestagung, Tübingen.
- Tartoff KD, Hobbs CA (1987):** Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Berthesda Research Laboratory Focus* 9: 12.
- Tenson T, Mankin A (2006):** Antibiotics and the ribosome. *Molecular Microbiology* 59: 1664–1677.
- Thakral D (2012):** Development of cell-free protein synthesis for the discovery and characterization of novel ribosome-binding antibiotics. Yale University, B.S /M.S. Arbeit.
- Thomas T, Kumar N, Cavicchioli R (2001):** Effects of ribosomes and intracellular solutes on activities and stabilities of elongation factor 2 proteins from psychrotolerant and thermophilic methanogens. *Journal of Bacteriology* 183: 1974–1982.
- Timasheff SN (1993):** The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? *Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structure* 22: 67–97.
- Timasheff SN (1998):** Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Advances in Protein Chemistry* 51: 355–432.
- Tissières A (1959):** Some properties of soluble ribonucleic acid from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 1: 365–IN11.
- Ueda I, Shinoda F, Kamaya H (1994):** Temperature-dependent effects of high pressure on the bioluminescence of firefly luciferase. *Biophysical Journal* 66: 2107–2210.
- Underwood KA, Swartz JR, Puglisi JD (2005):** Quantitative polysome analysis identifies limitations in bacterial cell-free protein synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* 91: 425–435.
- Ures A (2005):** Identifizierung und Charakterisierung des Ectoin-Hydroxylasegens *ectD* aus *Halomonas elongata* DSM 2581^T. Universität Bonn, Diplomarbeit.
- van Derlinden E, Lule I, Bernaerts K, van Impe JF (2010):** Quantifying the heterogeneous heat response of *Escherichia coli* under dynamic temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 108: 1123–1135.
- Vargas C, Jebbar M, Carrasco R, Blanco C, Calderon M, Iglesias-Guerra F, Nieto J (2006):** Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Journal of Applied Microbiology* 100: 98–107.

- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998):** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 504–544.
- Völker U, Engelmann S, Maul B, Riethdorf S, Völker A, Schmid R, Mach HHM (1994):** Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140: 741–752.
- Vreeland RH, Lichtfeld CD, Martin EL, Elliot E (1980):** *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 30: 485–495.
- Wada A, Igarashi K, Yoshimura S, Aimoto S, Ishihama A (1995):** Ribosome-modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214: 410–417.
- Wada A, Mikkola R, Kurland CG, Ishihama A (2000):** GrowthPhase-coupled changes of the ribosome profile in natural isolates and laboratory strains of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182: 2893–2899.
- Wang A, Bolen DW (1997):** A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* 36: 9101–9108.
- Warner JR, McIntosh KB (2009):** How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Molecular Cell* 34: 3–11.
- Welsh DT (2000):** Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 263–290.
- Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vornrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V (2000):** Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327–339.
- Witt EMHJ (2012):** Nebenreaktionen der Ectoin-Synthase aus *Halomonas elongata* DSM 2581^T und Entwicklung eines salzinduzierten Expressionssystems. Universität Bonn, Dissertation.
- Woese CL, Fox GE (1977):** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5088–5090.
- Wohlfarth A, Severin J, Galinski EA (1990):** The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *Journal of General Microbiology* 136: 705–712.
- Wohlfarth A, Severin J, Galinski EA (1990):** The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *Journal of General Microbiology* 136: 705–712.
- Wool IG (1996):** Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 164–165.
- Wydro RM, Madira W, Hiramatsu T, Kogut M, Kushner DJ (1977):** Salt-sensitive *in vitro* protein synthesis by a moderately halophilic bacterium. *Nature* 269: 824–825.

Yamamoto T, Shimizu Y, Ueda T, Shiro Y (2010): Mg²⁺ dependence of 70S ribosomal protein flexibility revealed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 285: 5646–5652.

Yu I, Jindo Y, Nagaoka M (2007): Microscopic understanding of preferential exclusion of compatible solute ectoine: Direct interaction and hydration alteration. *The Journal of Physical Chemistry B* 111: 10231–10238.

Yu I, Nagaoka M (2004): Slowdown of water diffusion around protein in aqueous solution with ectoine. *Chemical Physics Letters* 388: 316–321.

Zuker M, Stiegler P (1981): Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Research* 9: 133–148.

Zundel MA, Basturea GN, Deutscher MP (2009): Initiation of ribosome degradation during starvation in *Escherichia coli*. *RNA* 15: 977–983.

Anhang

Tabelle 19: Schmelztemperaturen der *E. coli*-Ribosomen mit unterschiedlichen kompatiblen Soluten in ansteigenden Konzentrationen

Die Schmelztemperaturen wurden mit Hilfe von Kurvenanpassungen nach Gauß aus den durchgeführten DSC-Messungen ermittelt. In die Messungen wurden jeweils 1 µM aufgereinigte krude 70S-Ribosomen eingesetzt und mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen kompatiblen Solute versetzt. Die angegebenen Fehler der Messung ohne Solut sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Messungen. Die Fehler der Messungen mit Soluten sind die Fehler, die vom Programm der Kurvenanpassung für den jeweiligen Peak ausgegeben wurden. Zur Bestimmung der Gesamtfläche unter dem Peak wurde die Kurve integriert. n. d. = not determined: aufgrund des großen Fehlers der Bestimmung nicht betrachtet.

Endkonzentration Solut [M]	30S [°C]	50S [°C]	3. Peak [°C]	Gesamtfläche unter dem Peak (ΔH_{cal}) [kcal/mol]
Ohne Solut				
0	65,9 ± 0,22	69,7 ± 0,21	73,3 ± 0,29	22426
Trehalose				
0,25	67,7 ± 0,58	70,4 ± 0,04	73,1 ± 0,06	23788
0,5	68,2 ± 0,25	71,3 ± 0,03	73,9 ± 0,0	23868
0,75	68,5 ± 1,11	72,6 ± 0,02	74,2 ± 0,01	25668
1,0	71,3 ± 0,64	73,7 ± 0,04	75,2 ± 0,02	28491
1,25	73,1 ± 0,14	74,3 ± 0,03	76,2 ± 0,03	29428
Saccharose				
0,25	66,3 ± 0,36	70,0 ± 0,04	73,5 ± 0,06	20426
0,5	69,7 ± 0,15	71,1 ± 0,03	73,8 ± 0,04	22743
0,75	70,3 ± 0,15	72,2 ± 0,04	74,4 ± 0,04	22691
1,0	72,1 ± 0,05	73,3 ± 0,07	75,1 ± 0,06	25526
1,25	72,8 ± 0,07	74,2 ± 0,08	75,8 ± 0,08	21475
1,5	73,6 ± 0,10	75,1 ± 0,10	76,5 ± 0,10	19726
1,75	74,6 ± 0,12	76,1 ± 0,13	77,4 ± 0,16	25325
Betain				
0,25	67,1 ± 1,46	69,6 ± 0,04	72,8 ± 0,04	23097
0,5	67,9 ± 1,65	70,7 ± 0,09	73,2 ± 0,09	23824
0,75	68,9 ± 1,21	71,3 ± 0,11	73,3 ± 0,04	24141
1,0	69,1 ± 0,49	70,7 ± 0,18	72,9 ± 0,03	24175
1,25	64,4 ± 0,43	70,1 ± 0,05	72,2 ± 0,01	22579
1,5	69,5 ± 1,91	71,5 ± 0,63	73,0 ± 0,07	16885
1,75	66,3 ± 0,43	70,4 ± 0,11	72,3 ± 0,01	26034

Ectoin

0,25	64,0 ± 1,33	68,2 ± 0,04	70,9 ± 0,07	25289
0,5	61,9 ± 0,70	66,8 ± 0,8	69,6 ± 0,02	27789
0,75	62,8 ± 1,28	66,8 ± 0,18	69,1 ± 0,08	23672
1,0	62,5 ± 0,36	66,7 ± 0,14	68,8 ± 0,02	27530
1,25	60,5 ± 0,53	65,7 ± 0,11	67,9 ± 0,01	19194
1,5	n. d.	64,1 ± 0,02	66,2 ± 0,01	19628
1,75	n. d.	n. d.	64,4 ± 0,03	21397

Hydroxyectoin

0,25	67,5 ± 0,36	68,5 ± 0,8	71,1 ± 0,05	24163
0,5	64,3 ± 2,36	68,4 ± 0,13	71,0 ± 0,05	26984
0,75	n.d	68,6 ± 0,27	71,0 ± 0,05	25938
1,0	63,4 ± 1,08	68,8 ± 0,25	71,3 ± 0,02	30443
1,25	66,3 ± 0,39	69,6 ± 0,14	71,2 ± 0,07	34182
1,5	64,6 ± 0,35	69,1 ± 0,15	70,9 ± 0,01	38428
1,75	65,1 ± 0,26	69,7 ± 0,03	70,7 ± 0,01	33718

Urea

0,25	64,7 ± 1,93	68,0 ± 0,04	72,0 ± 0,04	24494
0,5	n.d	66,8 ± 0,03	71,0 ± 0,08	23940
0,75	60,1 ± 0,82	65,4 ± 0,07	70,0 ± 0,05	21946
1,0	n.d.	64,7 ± 0,17	68,8 ± 0,06	23865
1,25	60,6 ± 0,34	62,7 ± 0,09	68,2 ± 0,07	n.d.
1,5	54,4 ± 1,41	61,4 ± 0,12	67,2 ± 0,17	n.d.
1,75	n.d	n.d	n.d	n.d.

Tabelle 20: Schmelztemperaturen aufgereinigter *H. elongata*-Ribosomen mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgewählter kompatibler Solute

Die Schmelztemperaturen wurden mit Hilfe von Kurvenanpassungen nach Gauß aus den durchgeführten DSC-Messungen ermittelt. In die Messungen wurden jeweils 1 µM aufgereinigte krude 70S-Ribosomen eingesetzt und mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen kompatiblen Solute versetzt. Die angegebenen Fehler der Messung ohne Solut sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Messungen. Die Fehler der Messungen mit Soluten sind die Fehler, die vom Programm der Kurvenanpassung für den jeweiligen Peak ausgegeben wurden. Zur Bestimmung der Gesamtfläche unter dem Peak wurde die Kurve integriert. n. d. = not determined: aufgrund des großen Fehlers der Bestimmung nicht betrachtet.

Endkonzentration Solut [M]	30S [°C]	50S [°C]	3. Peak [°C]	Gesamtfläche unter dem Peak (ΔH_{cal}) [kcal/mol]
Ohne Solut				
0	65,6 ± 0,18	69,3 ± 0,15	72,1 ± 0,12	11652
Trehalose				
0,25	64,9 ± 0,14	69,3 ± 0,06	72,3 ± 0,20	16848
0,5	66,7 ± 0,38	70,1 ± 0,07	73,7 ± 0,07	17614
0,75	69,8 ± 1,32	73,1 ± 0,14	75,2 ± 0,01	17744
1,0	70,8 ± 0,11	73,4 ± 0,04	75,9 ± 0,03	19307
1,25	n.d.	72,3 ± 0,08	76,4 ± 0,02	16556
Saccharose				
0,25	65,8 ± 0,16	69,9 ± 0,07	73,1 ± 0,08	13647
0,5	67,4 ± 0,36	70,5 ± 0,05	73,7 ± 0,05	17408
0,75	68,1 ± 0,28	71,7 ± 0,06	74,7 ± 0,05	18886
1,0	68,7 ± 0,17	73,7 ± 0,07	75,6 ± 0,01	19174
1,25	72,9 ± 0,05	75,5 ± 0,04	76,5 ± 0,04	20495
1,5	72,8 ± 0,07	n. d.	76,7 ± 0,02	17632
1,75	72,9 ± 0,02	n. d.	77,5 ± 0,1	23116
Betain				
0,25	65,2 ± 0,13	70,3 ± 0,05	73,1 ± 0,03	9531
0,5	64,6 ± 0,08	70,3 ± 0,08	73,3 ± 0,04	9652
0,75	64,3 ± 0,07	69,9 ± 0,06	73,3 ± 0,02	11009
1,0	64,1 ± 0,11	69,6 ± 0,08	73,6 ± 0,01	11875
1,25	64,7 ± 0,70	71,2 ± 0,37	74,6 ± 0,02	14044
1,5	64,8 ± 0,34	71,1 ± 0,20	75,0 ± 0,01	13600
1,75	64,9 ± 0,43	70,4 ± 0,20	75,1 ± 0,04	13929

Ectoin				
0,25	62,9 ± 0,04	68,2 ± 0,05	71,2 ± 0,03	10459
0,5	61,1 ± 0,05	66,9 ± 0,05	70,3 ± 0,02	10463
0,75	60,1 ± 0,12	67,0 ± 0,36	70,1 ± 0,02	10871
1,0	58,4 ± 0,23	65,1 ± 0,31	69,7 ± 0,02	11347
1,25	57,2 ± 0,33	61,4 ± 0,16	68,0 ± 0,03	10536
1,5	57,0 ± 0,25	60,4 ± 0,10	67,2 ± 0,01	13419
1,75	54,8 ± 0,73	57,9 ± 0,17	65,6 ± 0,01	14854
Hydroxyectoin				
0,25	62,7 ± 0,22	68,0 ± 0,08	71,6 ± 0,04	9582
0,5	61,0 ± 0,14	68,2 ± 0,67	71,3 ± 0,11	10081
0,75	59,1 ± 0,12	66,5 ± 0,48	70,5 ± 0,07	9751
1,0	n. d.	n. d.	70,0 ± 0,02	9471
1,25	57,7 ± 0,34	68,2 ± 0,72	70,0 ± 0,08	9163
1,5	59,3 ± 0,47	68,0 ± 0,49	70,8 ± 0,04	10316
1,75	64,6 ± 0,21	71,8 ± 0,60	73,3 ± 0,05	12251

Tabelle 21: Denaturierungstemperaturen aufgereinigter ribosomaler Untereinheiten aus *E. coli*

Ribosomale Untereinheiten wurden in der vorliegenden Arbeit nach zwei verschiedenen Methoden aufgereinigt. Daher wird in dieser Tabelle nach den Puffern, in denen die Untereinheiten während der DSC-Messung vorlagen, unterschieden. Alle Untereinheiten wurden vor der Messung mit 1 M des zu testenden Solut versetzt und anschließend sofort im Kalorimeter der Effekt des Solut auf die Schmelztemperatur analysiert. In die Messungen in Tris-HCl-Puffer wurden 1,38 mM 30S-Untereinheit bzw. 0,68 mM 50S-Untereinheit eingesetzt. Bei den Messungen in HEPES-Puffer wurden 0,25 mM 30S-Untereinheit (nur ohne Solute gemessen) bzw. 0,17 mM 50S-Untereinheit eingesetzt.

Eingesetztes Solut [1 M]	30S [°C]		50S [°C]			
	Tris-HCl-Puffer	HEPES-Puffer	Tris-HCl-Puffer		HEPES-Puffer	
Ohne Solut	57,9	66,5	59,5	66,1	67,9	73,2
Saccharose	64,7		65,6	70,5	72,8	75,4
Betain	57,3		60,2	66,1	70,8	72,8
Ectoin	51,5		51,6	60,7		
Hydroxyectoin	57,4		59	65,6	68,7	71

Tabelle 22: Vergleich der ribosomalen Proteine der 30S-Untereinheit aus *E. coli* und *H. elongata*

Für diesen Vergleich wurden die Sequenzen der ribosomalen Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit aus *E. coli* K12 MG1655 und *H. elongata* DSM2581^T aus den Genomsequenzen herausgesucht und mit Hilfe des Analyseprogramms ProtParam analysiert. Die Anzahl der codierten Aminosäuren, das theoretische Molekulargewicht und der theoretische isoelektrische Punkt den diese Analyse ergab sind hier für 21 Proteine der 30S-Untereinheit der beiden Organismen gegenübergestellt.

Name	<i>E. coli</i>			<i>H. elongata</i>		
	Anzahl AS	MG [kDa]	pI	Anzahl AS	MG [kDa]	pI
S1	557	61.2	4.89	559	61.5	4.72
S2	241	26.7	6.61	248	27.6	6.27
S3	233	26.0	10.27	232	25.8	10.15
S4	206	23.5	10.05	206	23.3	9.97
S5	167	17.6	10.11	166	17.4	10.24
S6	131	15.2	5.26	123	14.3	6.30
S7	179	20.0	10.36	156	17.9	10.40
S8	130	14.1	9.44	130	14.2	8.91
S9	130	14.9	10.94	129	14.7	10.65
S10	103	11.7	9.68	103	11.8	9.39
S11	129	13.8	11.33	128	13.5	11.40
S12	124	13.7	10.88	124	13.7	11.03
S13	118	13.1	10.78	113	13.2	10.72
S14	101	11.6	11.16	101	11.6	10.50
S15	89	10.3	10.40	89	10.4	10.07
S16	82	9.2	10.54	82	9.6	10.85
S17	84	9.7	9.64	86	9.7	9.76
S18	75	9.0	10.60	75	8.8	9.76
S19	92	10.4	10.52	91	10.2	10.62
S20	87	9.7	11.18	88	9.9	11.64
S21	71	8.5	11.15	71	8.6	10.97

Tabelle 23: Vergleich der ribosomalen Proteine der 50S-Untereinheit aus *E. coli* und *H. elongata*

Für diesen Vergleich wurden die Sequenzen der ribosomalen Proteine der großen ribosomalen Untereinheit aus *E. coli* K12 MG1655 und *H. elongata* DSM2581^T aus den Genomsequenzen herausgesucht und mit Hilfe des Analyseprogramms ProtParam analysiert. Die Anzahl der codierten Aminosäuren, das theoretische Molekulargewicht und der theoretische isoelektrische Punkt den diese Analyse ergab sind hier für die 34 Proteine der 50S-Untereinheit der beiden Organismen gegenübergestellt. Die Benennung der ribosomalen Proteine stammt aus den Anfangszeiten der Ribosomenforschung. Daher werden die Proteine L1-L36 benannt, L8 ist jedoch im Ribosom ein Komplex aus den Proteinen L7, L10 und L12, während L26 das gleiche Protein wie das S20 der kleinen ribosomalen Untereinheit ist. L12 ist die methylierte Form von L7.

Name	<i>E. coli</i>			<i>H. elongata</i>		
	Anzahl AS	MG [kDa]	pI	Anzahl AS	MG [kDa]	pI
L1	234	24.7	9.64	230	24.3	9.40
L2	273	29.9	10.93	276	30.3	11.34
L3	209	22.2	9.90	212	22.3	9.76

L4	201	22.1	9.72	202	21.8	9.93
L5	179	20.3	9.49	179	20.4	9.69
L6	177	18.9	9.71	176	19.0	9.49
L7	121	12.3	4.60	124	12.7	4.37
L8						
L9	149	15.8	6.17	148	15.8	4.73
L10	165	17.7	9.04	167	18.2	5.81
L11	142	14.9	9.64	143	14.9	9.07
L12	gleich L7			gleich L7		
L13	142	16.0	9.91	142	16.0	9.70
L14	123	13.5	10.43	123	13.6	11.29
L15	144	15.0	11.18	144	15.0	10.60
L16	136	15.3	11.22	137	15.5	11.43
L17	127	14.4	11.05	127	14.6	10.06
L18	117	12.8	10.42	116	12.6	10.93
L19	115	13.1	10.62	118	13.3	10.23
L20	118	13.5	11.47	117	13.4	11.74
L21	103	11.6	9.85	103	11.5	9.47
L22	110	12.2	10.23	110	12.1	10.20
L23	100	11.2	9.94	98	12.6	9.70
L24	104	11.3	10.21	105	11.6	9.99
L25	94	10.7	9.60	217	23.8	4.67
L26						
L27	85	9.1	10.58	85	9.0	10.80
L28	78	9.0	11.42	78	9.0	11.47
L29	63	7.3	9.98	63	7.4	9.98
L30	59	6.5	10.96	60	6.6	10.27
L31	70	7.9	9.46	70	7.7	9.27
L32	57	6.4	11.03	56	6.4	11.29
L33	55	6.4	10.25	51	6.0	10.29
L34	46	5.4	13.00	44	5.1	13.00
L35	65	7.3	11.78	64	7.5	12.03
L36	38	4.4	10.69	37	4.3	11.64

Tabelle 24: Ribosomale Proteine aus *Salinibacter ruber*

Die Sequenzen der ribosomalen Proteine aus *S. ruber* wurden aus den publizierten Genomsequenzen herausgesucht und mit Hilfe des Analyseprogramms ProtParam analysiert. Für alle annotierten ribosomalen Proteine des Organismus sind hier die Ergebnisse der Analyse bezüglich Anzahl der codierten Aminosäuren, des theoretischen Molekulargewichts sowie des theoretischen isoelektrischen Punkts dargestellt. Dabei konnten die ribosomalen Proteine S13, S21 und L34-36 in der Genomsequenz nicht gefunden werden. Andererseits wurde ein mit S23 benanntes Protein in der Sequenz annotiert. Analog den bisher publizierten Daten zu ribosomalen Proteinen handelt es sich bei den Proteinen L8 und L26 der großen Untereinheit vermutlich um den Komplex aus L7, L10 und L12 bzw. die methylierte Form des S20. L12 ist daher wahrscheinlich die methylierte Form von L7.

30S-Untereinheit				50S-Untereinheit			
Name	Anzahl AS	MG [kDa]	pI	Name	Anzahl AS	MG [kDa]	pI
S1	871	96,8	4,03	L1	237	25,7	4,50
S2	364	40,4	4,62	L2	283	31,3	10,18
S3	236	26,7	10,21	L3	208	22,4	8,52
S4	200	23,7	9,69	L4	215	23,9	4,81
S5	175	18,7	10,04	L5	191	21,8	4,71
S6	202	23,5	5,75	L6	184	20,2	5,52
S7	157	18,0	9,63	L7	127	13,2	3,87
S8	133	15,0	7,88	L8			
S9	132	15,0	9,93	L9	149	16,7	4,45
S10	103	11,6	9,47	L10	178	19,8	4,35
S11	158	17,0	9,96	L11	198	21,1	8,72
S12	150	16,7	10,23	L12	gleich L7		
S13				L13	156	17,6	6,38
S14	89	10,9	10,08	L14	122	13,4	7,88
S15	88	10,5	5,59	L15	166	17,9	8,04
S16	205	23,1	4,43	L16	145	16,3	10,11
S17	102	12,0	5,59	L17	197	21,5	4,85
S18	70	8,3	8,08	L18	119	13,3	5,65
S19	97	11,3	9,79	L19	118	13,1	7,95
S20	106	12,5	10,56	L20	115	13,9	11,01
S23	120	13,9	5,09	L21	172	18,8	5,40
				L22	121	13,8	10,24
				L23	99	11,5	7,86
				L24	111	12,4	8,03
				L25	250	27,5	4,07
				L26			
				L27	86	9,3	9,63
				L28	78	8,9	10,06
				L29	82	9,9	5,51
				L30			

L31	84	9,7	4,15
L32	65	7,7	9,87
L33	54	6,4	9,58

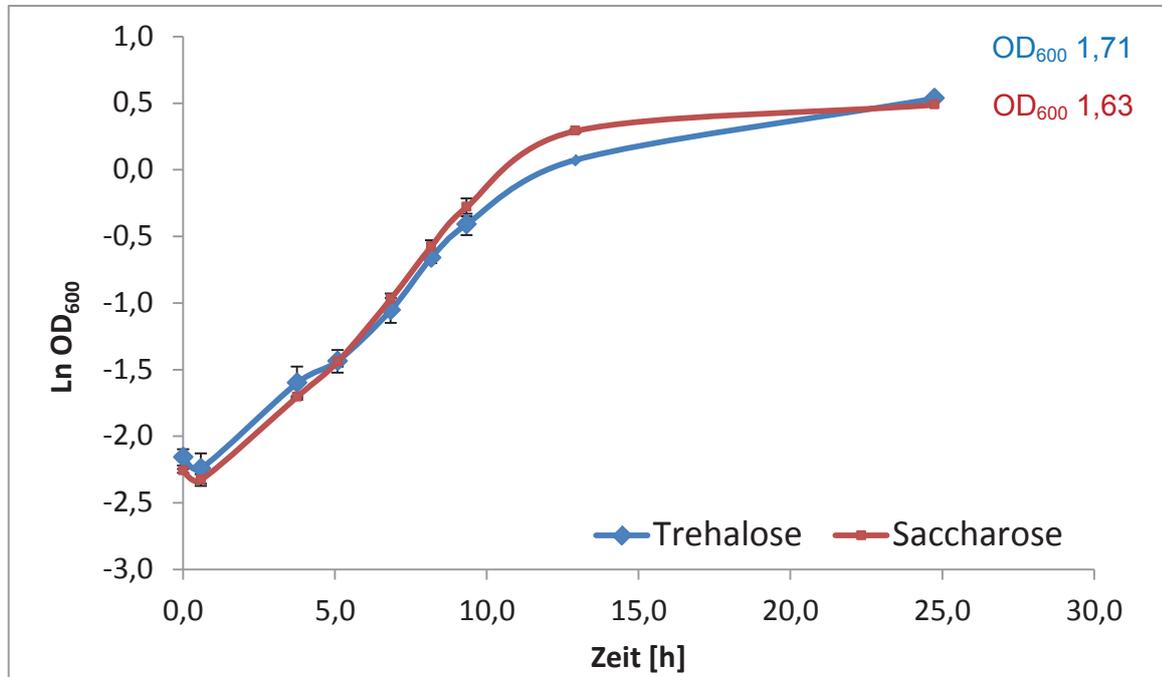


Abbildung 59: Wachstum von *H. elongata* Wt in MM63-1 mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Um zu testen, ob *H. elongata* in der Lage ist Trehalose bzw. Saccharose aufzunehmen wurden die Zellen in Minimalmedium mit 1 % NaCl (w/v) mit jeweils Trehalose oder Saccharose als einziger C-Quelle angezogen. Dafür wurden dem Medium beide Zucker mit einer Endkonzentration von 13,8 mM zugesetzt. Dies entspricht der gleichen Menge C-Quelle wie dem Medium standardmäßig über Glucose zugesetzt wird. Die Wachstumsraten der Zellen lagen mit Trehalose bei 0,24 (\pm 0,02) und mit Saccharose bei 0,28 (\pm 0,01). Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei Kulturen und die angegebenen Fehlerbalken zeigen den höchsten und niedrigsten Wert.

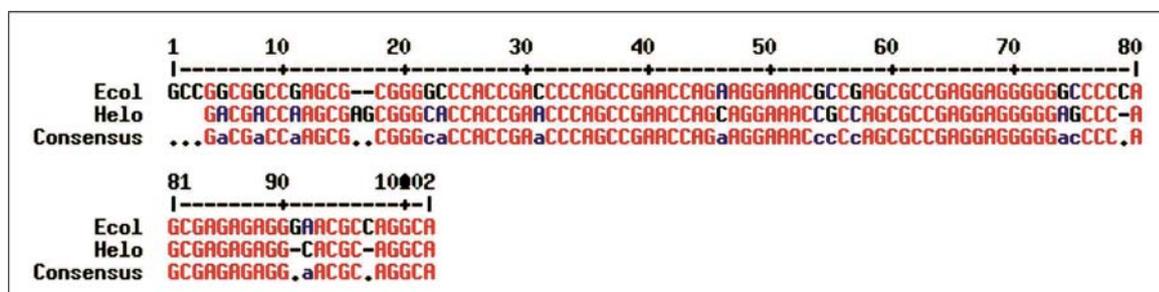


Abbildung 60: Sequenzvergleich der 5S rRNA-Gens aus *E. coli* und *H. elongata*

Dargestellt ist ein mit MultAlin (Corpet, 1988) hergestellter Sequenzvergleich des 5S rRNA-Gens aus *E. coli* und *H. elongata*. In rot sind die Basen dargestellt, die in beiden Sequenzen gleich sind, in blau die Basen der zweiten Sequenz, die sich von denen der ersten Sequenz unterscheiden.

Ecol: *E. coli* K12; Helo: *H. elongata* DSM2581^T

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
Ecol	AAAGAGAGGGACAGGCCAGAGAACCGGGCGGCAGGCCAACACAGCAGCGAACGGAAACAGGAGAGAGC--GCCGCGACGA								
Helo	AGAGGACAGGCCAGAGAACCGGGCGGCAGGCCAACACAGCAGCGAACGGAAACAGCCAGCGAGAGCGCGAG								
ConsensusAGAGGACAGGCCAGAGAACCGGGCGGCAGGCCAACACAGCAGCGAACGGAAaaGaaaaaaGC..GacGCGacaa								
	81	90	100	110	120	130	140	150	160
Ecol	GGGCGGACGGGGAGAGCGGGAAACGCCGAGGGGGGGAACACGGAAACGGAGCAACCCGCAACCGCCAGACCAAG								
Helo	CGCGGGACGGGGAGAGCAGGAAACGCCCGAGGGGGGAACACGGAAACCAAGCAACCCGCAACCGCCACGCGGGGAA								
Consensus	cGGCGGACGGGGAGAGCaaGaAACGCCcaGaaGGGGGAACaaGGAAACcaAGCAACCCGCAACCGCCcCaGaccAAa								
	161	170	180	190	200	210	220	230	240
Ecol	AGGGGACCCGGGCCCGCCACGGAGGCCAGAGGGAAGCAGAGGGGGAAACGGCCACCA--GGCGACGACCCAGCGGGCAG								
Helo	GCAAGGGCCCGGACCGCCACGGAGAGC--AGCGG--AAGCGG--GGGAAGAACGGCCACCAAGGCGACGACCCAGCGGGCAG								
Consensus	acaGGaCCCGGACCCcCACGGAGac.AGaGG.AAGCaG.GGGaGGAAACGGCCACCA.GGCGACGACCCAGCGGGCAG								
	241	250	260	270	280	290	300	310	320
Ecol	AGGAGACCGCCACACGGAAACGAGACACGGCCAGA--CCACCGGGAGGCAGCGGGGGAAGACACAGGGCGCAGGCCGAG								
Helo	AGGAGAC--AGCCACACGGGACGAGACACGGCCGAAACCCACCGGGAGGCAGCGGGGGAAGACACAGGGGGCAGCCGAC								
Consensus	AGGAGAC.AGCCACACGGaACGAGACACGGCCaGA.CCCACGGGAGGCAGCGGGGGAAGcACAGGGcGCACCCGAc								
	321	330	340	350	360	370	380	390	400
Ecol	CAGCCAGCCCGGGAAGAGAGGCC--GGGGAAG--ACCAGCGGGGAAGAGGGGAAGAAAGAACCCGCA--GACGACC								
Helo	CAGCCAGCCCGGGGAGAGAGGCCCGGGGAAGCACAGCGAGGAGAGAGCGCGGA--ACCCGCAAGGGAGACACAC								
Consensus	CAGCCAGCCCGGgaAAGAGAGGCC.CGGGGAAG.ACCAGCGaGGaAAGAGcGaGaAA..AaCCGCA.....GACaaaC								
	401	410	420	430	440	450	460	470	480
Ecol	CGCAGAGAGACCCCGGCAACCCGGCCAGCAGCCCGGGAACGGAGGGGCAAGCGAACGGAAACGGGCGAAGCG--CACG								
Helo	CGCAGAGAGACCCCGGCAACCCGGCCAGCAGCCCGGGAACGGAGGGGCAAGCGAACGGAAACGGGCGAAGCGCGCGAG								
Consensus	CGCAGAGAGACCCCGGCAACCCGGCCAGCAGCCCGGGAACGGAGGGGCaAGCGAACGGAAACGGGCGAAGCG.CaaG								
	481	490	500	510	520	530	540	550	560
Ecol	CAGGGCGGAGCAGAGGAACCCCGGGCAACCGGGAACG--CAC--GAACG--GCAAGCGAGCCGAGAGGGGGGAGAACCA								
Helo	CGGGCGAAGCCGGGGAAGCCCGGGCAACCGGGAACGGCACCGAACGAGGCAGAGGCGAGGAGGAGAGGGAGAACCC								
Consensus	caGGCGaaRacCaGaAaAaCCCGGGCAACCGGGAACG.CAC..GAACG.GcaAGaGacacGAGAGGaaGGAGAACa								
	561	570	580	590	600	610	620	630	640
Ecol	GGGAGCGGGGAAGCGAGAGACGG--AGGAACCGGGCGAAGCGGCCCGGGACGAGACGACGCAGGGCGAAGCGGG								
Helo	GGGAGCGGGGAAGCGAGAGACGGGAGGAACAGGGCGAAGCGGCC--GGACGAC--ACGACGCAGGACGGAAGCGGG								
Consensus	GGGAGCGGGGAAGCGAGAGACGG.AGGAAACaGGGCGAAGCGGCC..GGACGa.ACGACGCcAGGacGAAGCGGG								
	641	650	660	670	680	690	700	710	720
Ecol	GGAGCAACAGGAAACCCGGGACCGCCGAACCGAGCGACGGA--GGGGCCCGAGGC--GGGCCGGAGCACCGGAA								
Helo	G--AGCAACAGGAAACCCGGAGCCAGCCGAACCGAGCGACAGCCGGGGCCCGAGACCGGGCGAGACG--CAC--AA								
Consensus	G.AGCAACAGGAAACCCGGGACCGCCGAACCGAGCGACaGa..GGGGCCCGAGc.GGGCcAGaCa.CaC.AA								
	721	730	740	750	760	770	780	790	800
Ecol	GCAGCCCGGGGAGCGGCCCGAAGGAACCAAGAGAGCGGGGGCCCGCACAGCGGGGAGCAGGGAACGAGCAACG								
Helo	GCAGCCCGGGGAGCGGCCCGAAGGAACCAAGAGAGCGGGGGCCCGCACAGCGGGGAGCAGGGAACGAGCAACG								
Consensus	GCAGCCCGGGGAGCGGCCCGAAGGAACCAAGAGAGCGGGGGCCCGCACAGCGGGGAGCAGGGAACGAGCAACG								
	801	810	820	830	840	850	860	870	880
Ecol	CGAAGAACCCCGGC--GACACCAAGAACCCAGAGAGAGGGCCCGGGAACGGAA--GACAGGGCGCAGGCGCGACCGG								
Helo	CGAAGAACCCACCCGACACGGC--GAACCAAGAGAGAGGGCCCGGGAACGGAAACGACAGAGGGCGCAGGCGCGACCGG								
Consensus	CGAAGAACCCacC.GACACcaC.GAACCAAGAGAGAGGGCCCGGGAaCGcA..GACAGGGCGCAGGCGCGACCGG								
	881	890	900	910	920	930	940	950	960
Ecol	GGAAAGGGGAGCCCGCACGAGCGCACCCAC--GGCAGCGGCCGGCCGGGAACCAAGAGAGCGCCAGGAAAC--CG								
Helo	GGAAAGGGGAGCCCG--AACGAGCGCACCCCGCCAGCCAGCGACGG--CGGGAACAG--GGAGACGCCGGACAAACCG								
Consensus	GGAAAGGGGAGCCCG.AACGAGCGCACCCaC..aGCCAGCGaCcG..CGGGAACCA.GGAGACGCCaGGAaAA..CG								
	961	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
Ecol	GGGAGGGGGGA--GACGCAAGCACAGGCCACGACACAGGGCACACCGGCACAGGCGACACAAAGGAGCGACCCCGC								
Helo	GGGAGGGGGGACGACGCAAGCACAGGCCACCGG--AGGGCACACCGGCACAGGCGGACAAAGGGCAAGG--CGCG								
Consensus	GGGAGGGGGGA.GACGCAAGCACAGGCCACGac.AGGGCACACCGGCACAGGCGcaACAAaGaGaAaaG..CcGC								

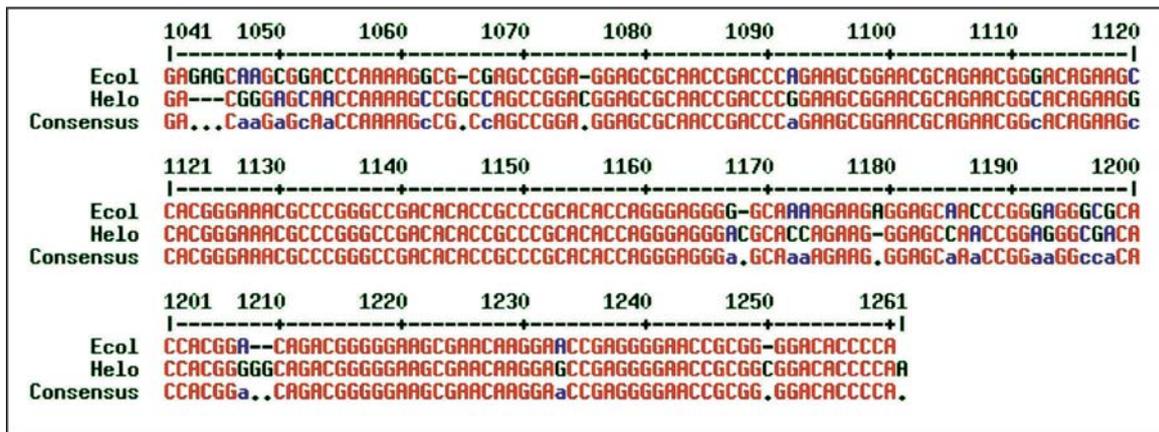
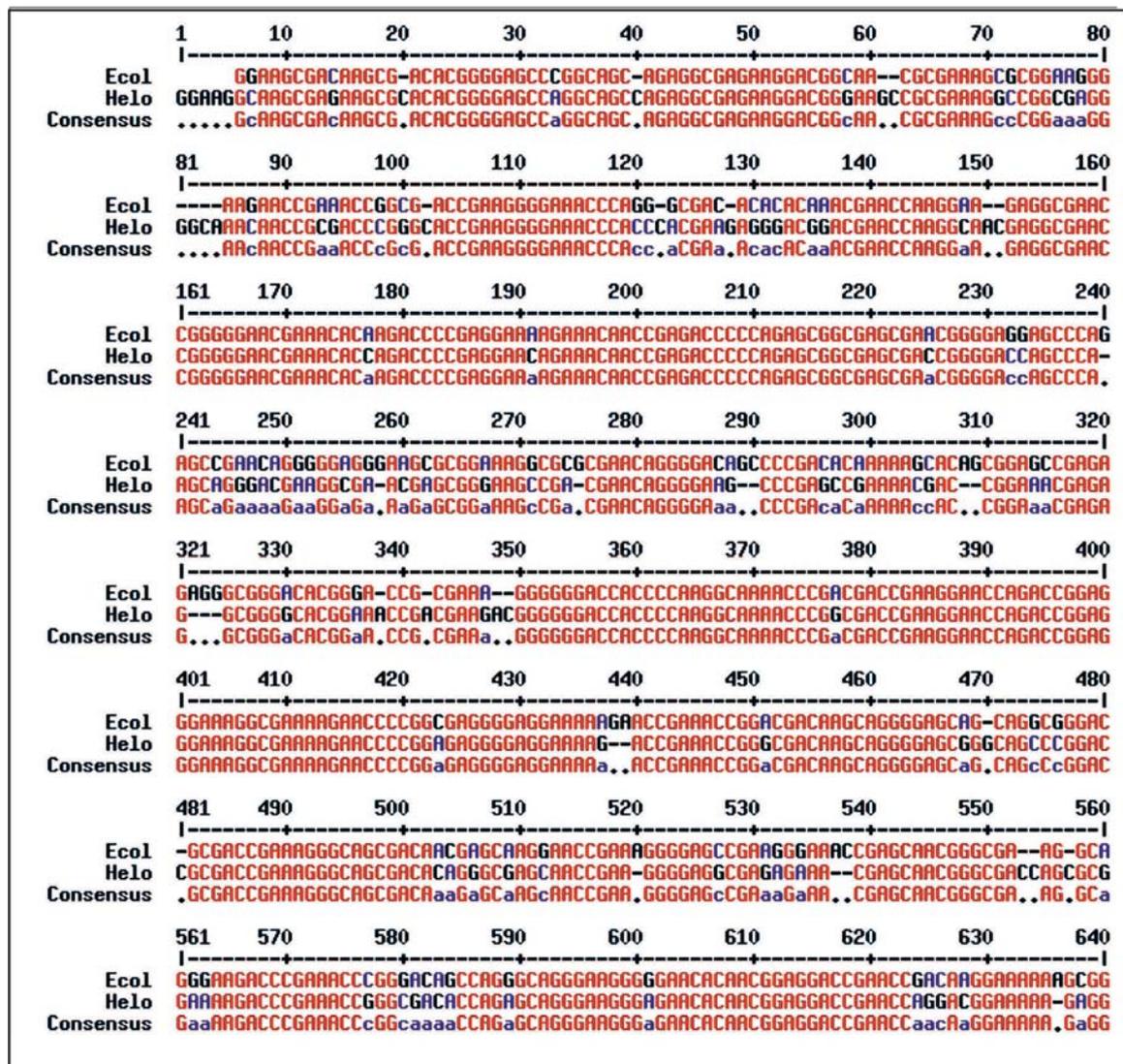


Abbildung 61: Sequenzvergleich des 16S rRNA-Gens aus *E. coli* und *H. elongata*

Dargestellt ist ein mit MultAlin (Corpet, 1988) hergestellter Sequenzvergleich des 16S rRNA-Gens aus *E. coli* und *H. elongata*. In rot sind die Basen dargestellt, die in beiden Sequenzen gleich sind, in blau die Basen der zweiten Sequenz, die sich von denen der ersten Sequenz unterscheiden.

Ecol: *E. coli* K12; Helo: *H. elongata* DSM 2581^T



	641	650	660	670	680	690	700	710	720
Ecol	AGACGGGCGGGGGAAAGGCCAACAAACCGGAGAGCGGCCCCGAAAGCAAGGAGCGCCGGAACAC-CCGGGGGAG								
Helo	AGACGGGACGGAGAAAGGC-AACAAACCGGAGAGCGGCCCCGAAAGCAAGGAGCGCCACGACACCGCCGGGGGAG								
Consensus	AGACGGGacGGaGGAAAGGC.AACAAaCCcGGAGAGCGGCCCC.GAAAGCAAGGAGCGCCcaACaaC.CCGGGGGAG								
	721	730	740	750	760	770	780	790	800
Ecol	AGCACGCGGCAGGGGGCACCCGACCCACCCAG-CAAACCGAARACCG-AGAAACACGGGAGACACAGCGGGG								
Helo	AGCACGCGGCAGGGGGCACCCGACCCACCCAGGCAACCCGAAACCGGAGCGGAGCGGGGAGACACAGCGGGG								
Consensus	AGCACGCGGCaGGGGcCACCCGaCCACCCAG.CAAACcCGAARACCG.AGaaGAcaCAGGGAGACACaCGGGG								
	801	810	820	830	840	850	860	870	880
Ecol	CAACGCCGCGAAAGAGGGAAACACCCAGACCGCAGCAGGCCCAAGCAGGAGGGGAACAGGGGGAGGCCAGAC								
Helo	CAACGCCG-GGAAAGGGAAACACCCAGACCGC-AGCAGGCCCGAAACCGGAGGGGAACAGGGGGAGGC--AGAC								
Consensus	CAACGCCG.GGAAaAGGGAAACACCCAGACCGC.AGCAGGCCcaAAaCaGGAGGGGAACAGGGGGAGGC..AGAC								
	881	890	900	910	920	930	940	950	960
Ecol	AGCCAGGAGGGGCGAAGCAGCCACAAAGAAAGCGAAGCCACGGCAGCGGCCGCGGAAAGAAACGGGGC-ARACCA								
Helo	AGCAGGAGGGGCGAAGCAGCCACAAAGAAAGCGAAGCCACAGCAGCGGCCGCGGAAAGAAACGGGGCRAACCA								
Consensus	AGCaAGaGGGCGAAGCAGCCaCAAAAGAAAGCGAAGCCaCaGGCAGCGGCCGCGGAAAGAAACGGGGC.AAACCA								
	961	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
Ecol	GCACCGAAGCGCGGACGACGACGGG-GGAGGGAGCGCGAA-GCCG-GAAGGGA-CGGA-GGACGGAGGACAGAA								
Helo	GACCGAAGCAGCGG-GC-ACCGGAGAGCGGAGGAGCGCGGACGCCGAAAGGGAGCGAAAGGCAGCGAGGACACGA								
Consensus	GcACCGAAGCaCGG..GC.ACcCaGaGaG.GGAGaGGAGCGCGaA.GCCG.GAAGGGA.CGaA.GGaCGGAGGACaCaA								
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
Ecol	GGCGAAGCGACAAAGAACGAAGAGCGGGAAAGGCCCGCCGCGAAGACCAAGGGCCGCGAACGACGGGGCAGGGAG								
Helo	GGCGAAGCGACAGAACGAAGAGGGAGGAAAGCCCGCCGCGAAGACCAAGGGC-GCGACGACCGGAGCAGAGGAG								
Consensus	GGCGAAGCGACaAGAACGAAGaGcGaGGAAaACCCcCGCCGGAAGACCAAGGGC.GCcaaccAACGGaGCaGAGGAG								
	1121	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Ecol	CGACCCAGGCGAGGCCGAAGGGCAGCGAGGGAAACAGGAACCGACGGAGCGCA--AGGGGGACGGAGAGGCA								
Helo	CGGCCCAAGGCGAGGCCGAAGGGCAGCGAGGGAAACGGCAAC-CCGACCCAGAGCGAGGGGGACAGAGAGGCA								
Consensus	CGaCCCAAGGCGAGGCCGAAGGGCAGCGAGGGAAACaGGAaAAc.aCGacaCaCGA...AGGGGGACGaAGAGGCA								
	1201	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
Ecol	GGG-CCGGGCGACGGGCCGGAA-GCGGAGGCGG--CCAGGCAACCGGAAACAGGGCGAGGAGCGAGGCGAC								
Helo	GGGAGCCAGGCG--GGGCCGGAAAGCAGAGGCGGGAAACAGGCAACCGGCCCAAGGCGAG--AGACGAGACGA								
Consensus	GGG..CCaGGCG..GGGCCcGGAA.GCaGAGGCGG...cAGGCAACCGGaaaaaAGcCGAG...AGACGAGCaCaA								
	1281	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360
Ecol	CGGGCGAGC--AACAAAGCC-CGCCCAGGAAAGCCAGCCACAGGAACACAAACGACCCCAACCGACACAGGGGCA								
Helo	CAGACCGGCGGAGCAGAGCCACGCCAGGAAAGCCAGCCAGAACAGGGGACCGACCCCAACCGACACAGGGGCA								
Consensus	CaGaCaaaGC...AaCaAGCC.CGCCAGGAAAGCCAGCaaaaaaAcacaAaCGACCCCAACCGACACAGGGGCA								
	1361	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Ecol	GGAGAGAAACCAAGGCGCAGAGAACCGGGAGGAAACAGCAAAAGGGCCGAAACGGGAGAGGACCGCGAAGGGAA								
Helo	GGAGAGAACCAAGGCGCAGAGAACCGGGAGGAAACAGCAAAAGGGCCGAAACGGGAGAGGACCGCGCAGGGAA								
Consensus	GGaGAGAAaCCaAGGCGCAGAGAACCGGGAGGAAACAGCAAAAGGGCCGAAACGGGAGAGGACCGCaAGGGAA								
	1441	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520
Ecol	G-CGACGCGGGAGC--GAACAGCGAAGAACCGCGGCGACGAAACACACAGCACGGCAACCGAAAGGGAGAA								
Helo	GGCCGCGACCGGAGCACGAGCGGCGAGAGAACAGGGCGACGAAACACACAG-ACCGCACACCGAAGCGGAGCAA								
Consensus	G.CcaGAcCgGAGC..GAaCaGCGAAGAACCGcGGCGACGAAACACACAG.ACcGCACACCGAAacGGAGCAA								
	1521	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
Ecol	CGGGGACCGCCCGGGCGGAAAGGAGGGGAGCGCAGCGAAGCC-GACGAGCCCGGAAACGGCGCCGACAAA								
Helo	GGGAGACCGCCCGGGCGGAAAGGAGGGGAA--GC CGGCGAAGCCGACGAGCCCGGAAACGGCGCCGACAAA								
Consensus	cGGaGACCGCCCGGGCGGAAAGGAGGGGa...GCaaGCGAAGCC.GACGAGCCCGGAAACGGCGCCGACAAA								
	1601	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Ecol	CGGCCAAGGAGCGAAACCGCGGAGCCGACCGACGAGGCGAAGAGGCGAGGCCCGCCACCCGAGACAGGAAAGAAC								
Helo	CGGCCAAGGAGCGAAACCGCGGAGCCGACCGACGAGGCGAAGAGGCGAGGCCCGCCACCCGAGACAGGAAAGAAC								
Consensus	CGGCCAAGGAGCGAAACCGCGGAGCCGACCGACGAGGCGAAGAGGCGaCGCCACCCGAGACAGGAAAGAAaC								

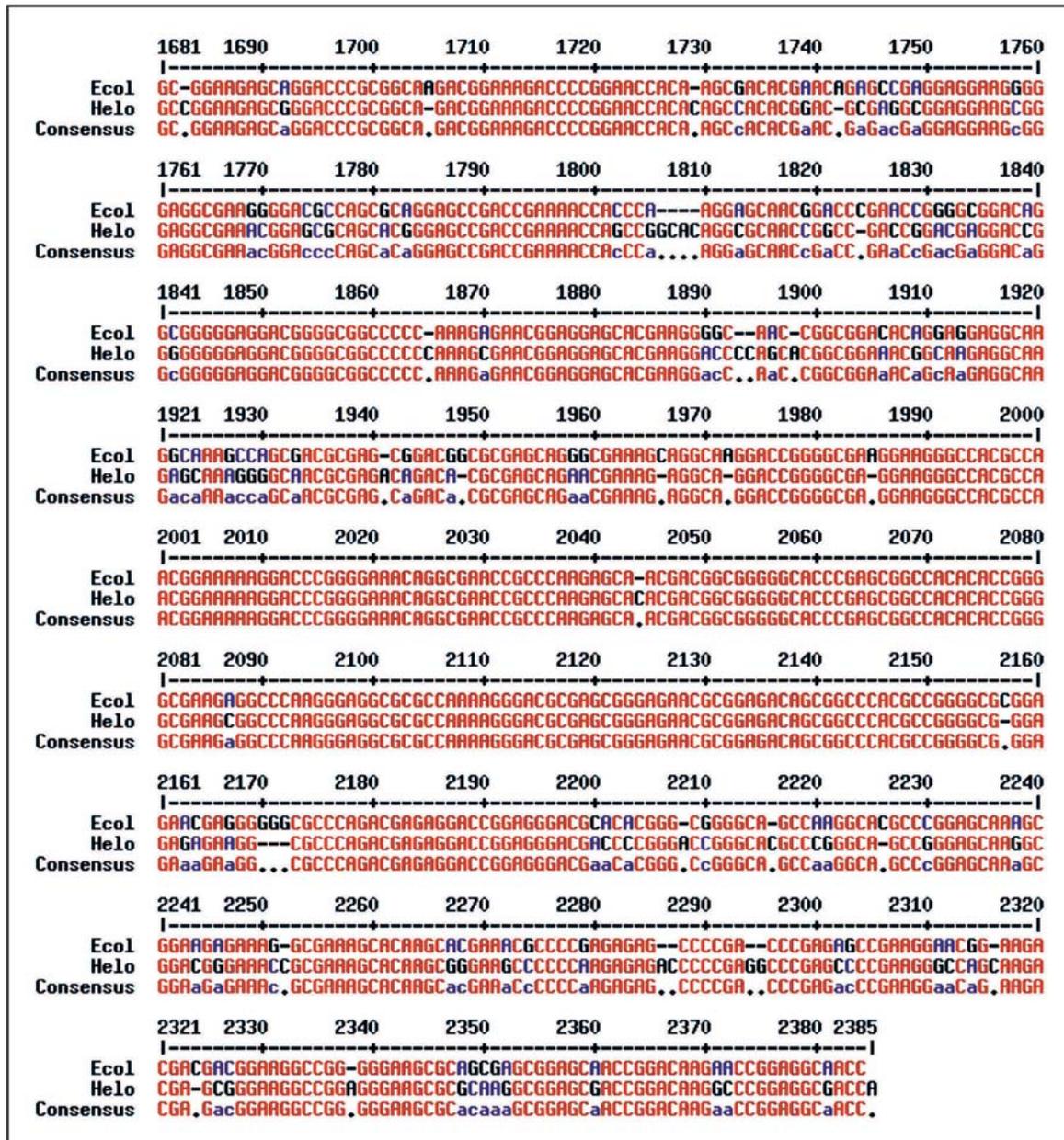


Abbildung 62: Sequenzvergleich des 23S rRNA-Gens aus *E. coli* und *H. elongata*

Dargestellt ist ein mit MultAlin (Corpet, 1988) hergestellter Sequenzvergleich des 23S rRNA-Gens aus *E. coli* und *H. elongata*. In rot sind die Basen dargestellt, die in beiden Sequenzen gleich sind, in blau die Basen der zweiten Sequenz, die sich von denen der ersten Sequenz unterscheiden.

Ecol: *E. coli* K12; Helo: *H. elongata* DSM 2581^T

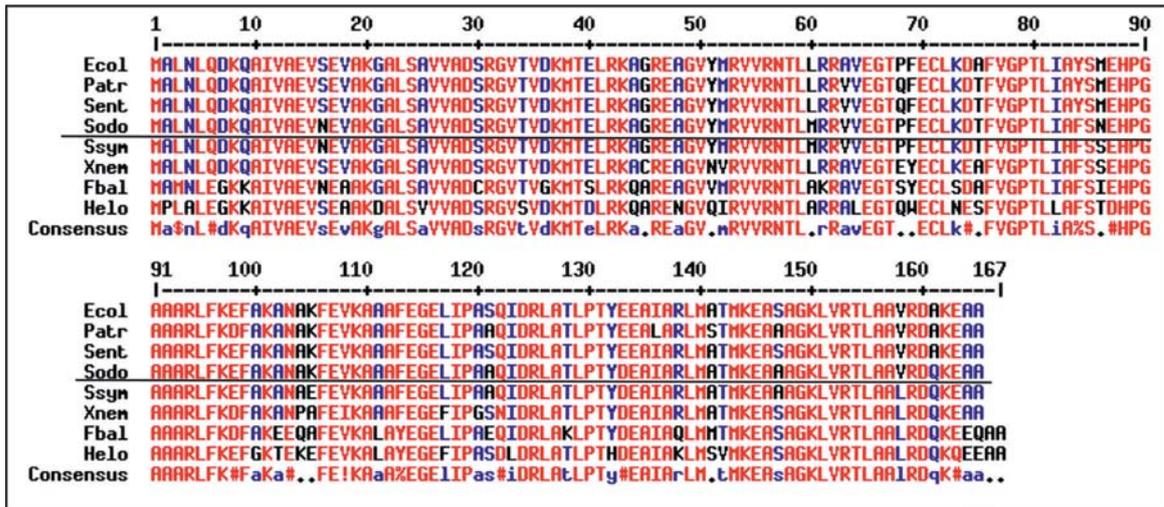


Abbildung 63: Multialignment der Aminosäuresequenzen der ribosomalen Proteine L10 aus verschiedenen Organismen

Dargestellt ist ein mit MultAlin (Corpet, 1988) hergestellter Sequenzvergleich des ribosomalen Proteins L10 aus verschiedenen Organismen. Das Protein bildet im Ribosom zusammen mit dem L7/L12-stalk den als L8 bezeichneten Komplex. Das in *E. coli* codierte Protein hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 9,04, während das homologe Protein aus *H. elongata* einen theoretischen pI von 5,81 hat. Die Aminosäuresequenzen oberhalb der eingezeichneten schwarzen Linie vertreten die Sequenzen, die hohe Sequenzähnlichkeiten mit dem in *E. coli* codierten Protein haben, die Sequenzen unterhalb weisen hohe Sequenzähnlichkeiten mit dem in *H. elongata* codierten Protein auf. In rot sind alle Aminosäuren dargestellt, die über alle verglichenen Sequenzen hoch konserviert (mind. 90 %) vorliegen, in blau die Aminosäuren, die in mindestens 50 % der Sequenzen vorkommen.

Consensus-Symbole: !: I oder V; \$: L oder M; %: F oder Y; #: N, D, Q, E, B oder Z

EcoI: *E. coli* K12; **Patr:** *Pectobacterium atrosepticum*; **Sent:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thyphimurium str. LT2; **Sodo:** *Serratia odorifera* DSM 4582; **Ssym:** *Serratia symbiotica* str. Tucson; **Xnem:** *Xenorhabdus nematophila* ATCC19061; **Fbal:** *Ferrimonas balearica* DSM 9799; **Hel0:** *H. elongata* DSM2581^T

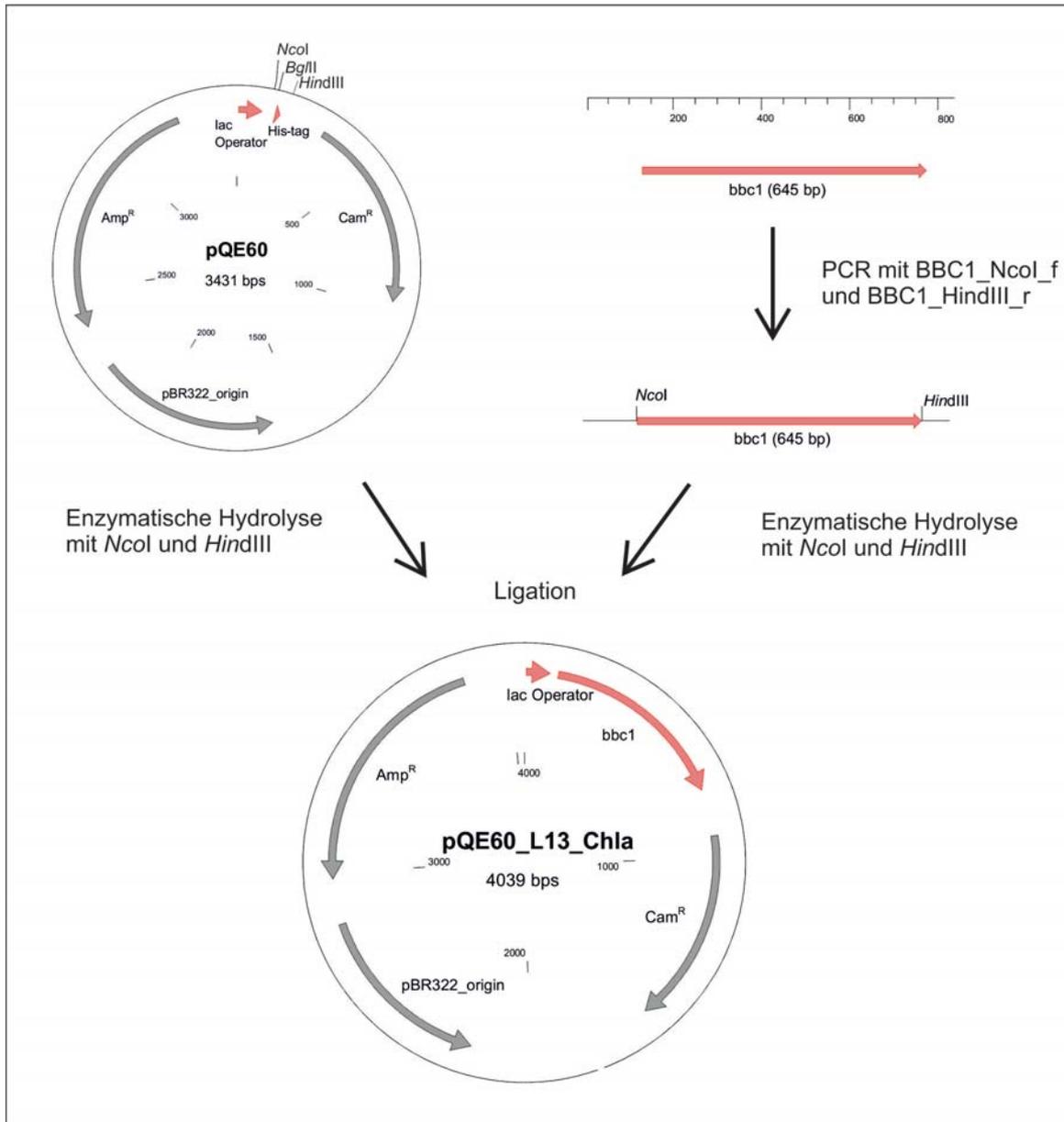


Abbildung 64: Schematische Darstellung der Klonierung des Expressionsplasmides pQE60_L13_Chla

Zur Klonierung von pQE60_L13_Chla wurde das Gen *bbc1* aus *Chlamydomonas* W-80 aus dem Plasmid pBDHP-BBC1 mit Hilfe der Primer BBC1_NcoI_f und BBC1_HindIII_r amplifiziert. Im Ausgangsplasmid codierte das Gen bereits einen His₆-Fusionstag am 3'-Ende. Mit Hilfe der Primer wurden so die Restriktionsschnittstellen *NcoI* (5'-Ende) und *HindIII* (3'-Ende) in die Gensequenz eingebracht. Anschließend wurden die Plasmid-DNA (pQE60) und die Insert-DNA mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* hydrolytisch gespalten. Die Produkte dieser Reaktion wurden mit Hilfe der T4-Ligase zum Expressionsplasmid pQE60_L13_Chla ligiert.

Die Klonierung der Plasmide pQE60_L13_EcoI und pQE60_L13_Helo erfolgte ähnlich. Hier wurden die Gene aus genomischer DNA mit den Primern EcoL13_for/EcoL13_rev bzw. HeloL13_for/HeloL13_rev amplifiziert. Da diese Gene daher keinen His₆-Fusionstag codierten, wurden mit Hilfe der Primer die Schnittstellen *NcoI* und *BglII* eingebracht. Die *BglII*-Schnittstelle ermöglicht die in-frame-Ligation des Inserts vor dem His₆-Tag codierenden Bereich des Plasmids pQE60.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
Sequ	TTTGTGAGCGGATAACAATTATATAGATTCATTGTGAGCGGATAACAATT								
L13Ch1a	CTCGAGAAATCATAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATATAGATTCATTGTGAGCGGATAACAATT								
ConsensusTTTGTGAGCGGATAACAATTATATAGATTCATTGTGAGCGGATAACAATT								
	81	90	100	110	120	130	140	150	160
Sequ	TCACACAGATTTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGGTGCAGCGGACGACATGCTGCCAACGGCCACTTCCACAGA								
L13Ch1a	TCACACAGATTTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGGTGCAGCGGACGACATGCTGCCAACGGCCACTTCCACAGA								
Consensus	TCACACAGATTTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGGTGCAGCGGACGACATGCTGCCAACGGCCACTTCCACAGA								
	161	170	180	190	200	210	220	230	240
Sequ	AGTGGCAGTTCCACGTGAGACCTGGTTCACACAGCCCGCCGCAAGCAGCGCCGCGCAGCCGCGCCGAGAGGGCC								
L13Ch1a	AGTGGCAGTTCCACGTGAGACCTGGTTCACACAGCCCGCCGCAAGCAGCGCCGCGCAGCCGCGCCGAGAGGGCC								
Consensus	AGTGGCAGTTCCACGTGAGACCTGGTTCACACAGCCCGCCGCAAGCAGCGCCGCGCAGCCGCGCCGAGAGGGCC								
	241	250	260	270	280	290	300	310	320
Sequ	AAGGCCACCTTCCCGCCCGTGGCCGGCAGCCTGAGGCCATCGTGCCTGCCAGCCGTGAGTACACACCAGCA								
L13Ch1a	AAGGCCACCTTCCCGCCCGTGGCCGGCAGCCTGAGGCCATCGTGCCTGCCAGCCGTGAGTACACACCAGCA								
Consensus	AAGGCCACCTTCCCGCCCGTGGCCGGCAGCCTGAGGCCATCGTGCCTGCCAGCCGTGAGTACACACCAGCA								
	321	330	340	350	360	370	380	390	400
Sequ	GCGCCTGGGCCGCGGCTTACCCTGGAGGAGCTGAGGAGGCCGGCATCCCGCCAGTTCCGCCCCACCGTGGGCATCG								
L13Ch1a	GCGCCTGGGCCGCGGCTTACCCTGGAGGAGCTGAGGAGGCCGGCATCCCGCCAGTTCCGCCCCACCGTGGGCATCG								
Consensus	GCGCCTGGGCCGCGGCTTACCCTGGAGGAGCTGAGGAGGCCGGCATCCCGCCAGTTCCGCCCCACCGTGGGCATCG								
	401	410	420	430	440	450	460	470	480
Sequ	CCGTGGACCACCGCCGCAAGAACCGCAGCCTGGAGACCTGCAGGCCAACGTGCAGCGCCTGAGACCTACCAGCCAGC								
L13Ch1a	CCGTGGACCACCGCCGCAAGAACCGCAGCCTGGAGACCTGCAGGCCAACGTGCAGCGCCTGAGACCTACCAGCCAGC								
Consensus	CCGTGGACCACCGCCGCAAGAACCGCAGCCTGGAGACCTGCAGGCCAACGTGCAGCGCCTGAGACCTACCAGCCAGC								
	481	490	500	510	520	530	540	550	560
Sequ	CTGGTGATCTTCCCGCCACATGAGAGAGCCAGGCCCTTCAGGCCAGCGCCGCGACTGCAGCGCCGCCAGCCAGGC								
L13Ch1a	CTGGTGATCTTCCCGCCACATGAGAGAGCCAGGCCCTTCAGGCCAGCGCCGCGACTGCAGCGCCGCCAGCCAGGC								
Consensus	CTGGTGATCTTCCCGCCACATGAGAGAGCCAGGCCCTTCAGGCCAGCGCCGCGACTGCAGCGCCGCCAGCCAGGC								
	561	570	580	590	600	610	620	630	640
Sequ	CAAGGGCGAGCTGCTGCCCTGAGGGGACCAAGCCCGCCCTGGAGCTGGTGAAGATCACCGCCGACATGAGGAGGGCA								
L13Ch1a	CAAGGGCGAGCTGCTGCCCTGAGGGGACCAAGCCCGCCCTGGAGCTGGTGAAGATCACCGCCGACATGAGGAGGGCA								
Consensus	CAAGGGCGAGCTGCTGCCCTGAGGGGACCAAGCCCGCCCTGGAGCTGGTGAAGATCACCGCCGACATGAGGAGGGCA								
	641	650	660	670	680	690	700	710	720
Sequ	GCCAGTACGGCAGCTGCGCATCGAGCGCGTGACGCCCGCCTGAGGGCATGCGCGAGAGCGCGCCGCCGACGAGGCC								
L13Ch1a	GCCAGTACGGCAGCTGCGCATCGAGCGCGTGACGCCCGCCTGAGGGCATGCGCGAGAGCGCGCCGCCGACGAGGCC								
Consensus	GCCAGTACGGCAGCTGCGCATCGAGCGCGTGACGCCCGCCTGAGGGCATGCGCGAGAGCGCGCCGCCGACGAGGCC								
	721	730	740	750	760	770	780	790	800
Sequ	GCCAAGAGGACGACAGCACCCACCACCACCCTAAGCTTAAATAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCA								
L13Ch1a	GCCAAGAGGACGACAGCACCCACCACCACCCTAAGCTTAAATAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCA								
Consensus	GCCAAGAGGACGACAGCACCCACCACCACCCTAAGCTTAAATAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCA								
	801	810	820	830	840				
Sequ	GTAAATGACCT								
L13Ch1a	GTAAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTACAGACGC								
Consensus	GTAAATGACCT.....								

Abbildung 65: Vergleich des Ergebnisses der Sequenzierung des Plasmids pQE60_L13_Ch1a mit der geplanten Sequenz

Dargestellt ist der mit MultAlin (Corpet, 1988) hergestellte Sequenzvergleich des sequenzierten Plasmids pQE60_L13_Ch1a mit der geplanten Sequenz. In grün unterstrichen ist die Promotorregion des Plasmids, in blau (oben) das ATG-Startcodon und (unten) die Sequenz des His₆-tags. Zusätzlich ist das Stopcodon in orange unterstrichen. In rot sind die Basen dargestellt, die in beiden Sequenzen gleich sind, in blau die Basen der zweiten Sequenz, die sich von denen der ersten Sequenz unterscheiden.

Sequ: Ergebnis der Sequenzierung; **L13Ch1a:** geplante Sequenz des Plasmids

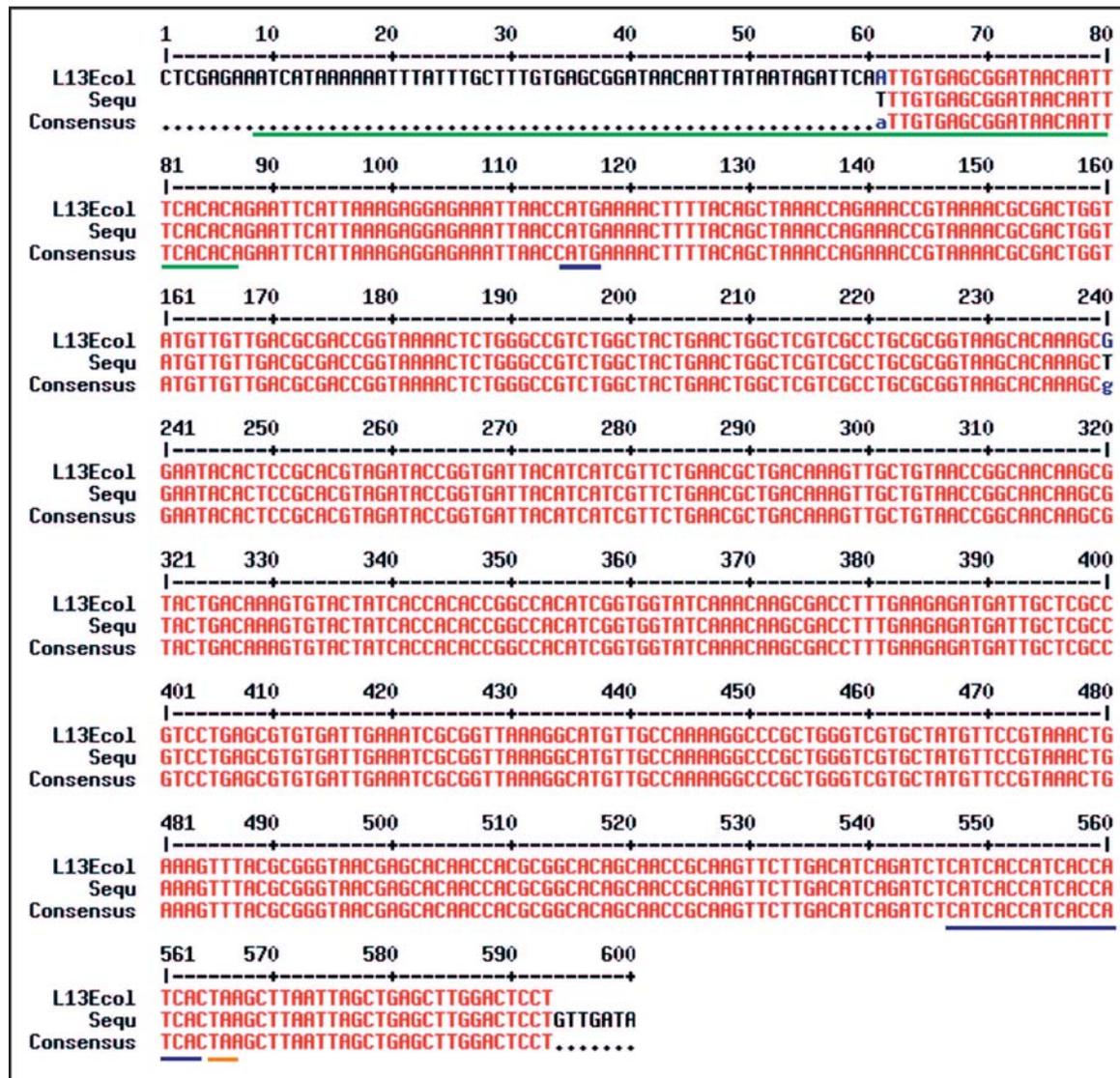


Abbildung 66: Vergleich des Ergebnisses der Sequenzierung des Plasmids pQE60_L13_Ecol mit der geplanten Sequenz

Dargestellt ist der mit MultAlin (Corpet, 1988) hergestellte Sequenzvergleich des sequenzierten Plasmids pQE60_L13_Ecol mit der geplanten Sequenz. In grün unterstrichen ist die Promotorregion des (geplanten) Plasmids, in blau (oben) das ATG-Startcodon und (unten) die Sequenz des His₆-tags. Zusätzlich ist das Stopcodon in orange unterstrichen. Im Vergleich zu dem in Abbildung 65 gezeigten Sequenzvergleich beginnt die Sequenz der Sequenzierung erst 32 Basen später. Hier fehlt dem Plasmid der erste Teil des Promotors. In rot sind die Basen dargestellt, die in beiden Sequenzen gleich sind, in blau die Basen der zweiten Sequenz, die sich von denen der ersten Sequenz unterscheiden.

Sequ: Ergebnis der Sequenzierung; **L13Ecol:** geplante Sequenz des Plasmids

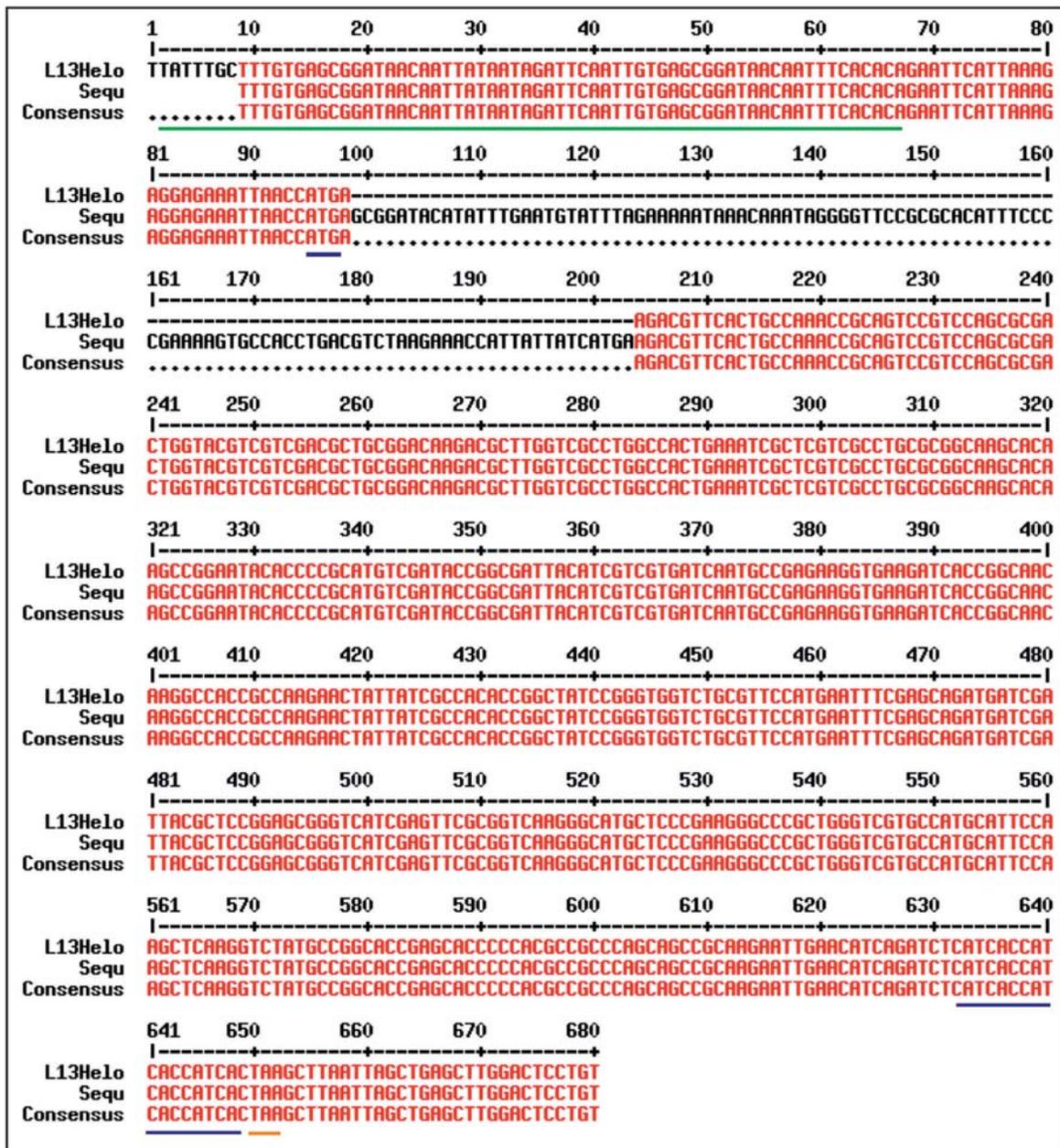


Abbildung 67: Vergleich des Ergebnisses der Sequenzierung des Plasmids pQE60_L13_Helo mit der geplanten Sequenz

Dargestellt ist der mit MultAlin (Corpet, 1988) hergestellte Sequenzvergleich des sequenzierten Plasmids pQE60_L13_Helo mit der geplanten Sequenz. In grün unterstrichen ist die Promotorregion des (geplanten) Plasmids, in blau (oben) das ATG-Startcodon und (unten) die Sequenz des His₆-tags. Zusätzlich ist das Stopcodon in orange unterstrichen. Die ersten ~100 bp des Sequenzvergleichs zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Allerdings wurde ab dem annotierten Startcodon ein Bereich von ~100bp amplifiziert, der nicht zum Gen gehört. In rot sind die Basen dargestellt, die in beiden Sequenzen gleich sind, in blau die Basen der zweiten Sequenz, die sich von denen der ersten Sequenz unterscheiden.

Sequ: Ergebnis der Sequenzierung; **L13HeLo:** geplante Sequenz des Plasmids

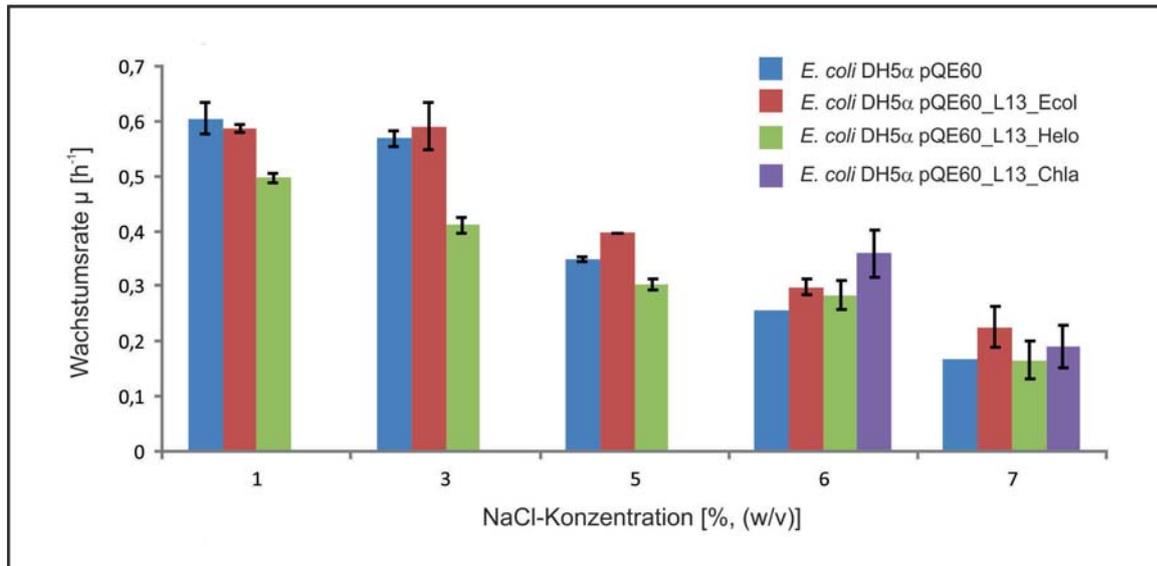


Abbildung 69: Vergleich der Wachstumsraten von *E. coli* DH5 α mit unterschiedlichen Plasmiden bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (Komplexmedium)

Die Zellen wurden in LB-Medium mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen angezogen und aus dem exponentiellen Teil der Wachstumskurve die Wachstumsrate μ ermittelt. Die Expression der Gene wurde nicht induziert, da in der Analyse des Expressionsmusters mit Hilfe einer SDS-PAGE (hier nicht gezeigt) bereits die Expression des Proteins ohne Induktion gezeigt werden konnte. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus zwei Kulturen, die angegebenen Fehler stellen jeweils den höchsten und niedrigsten Wert dar.

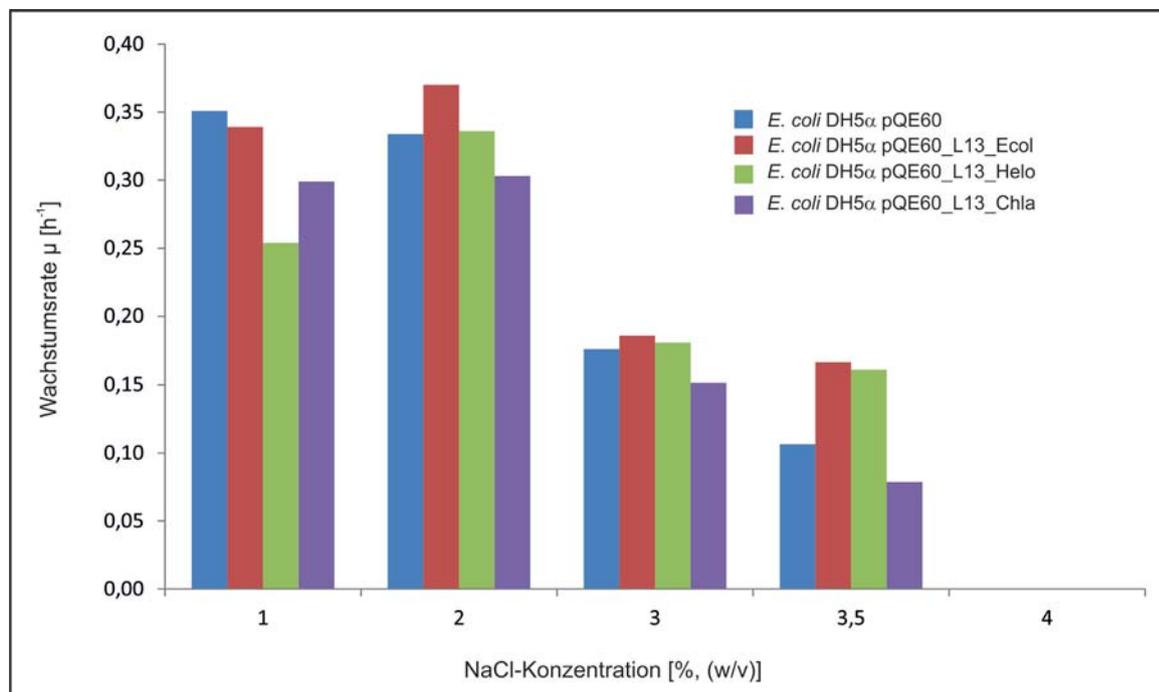


Abbildung 68: Vergleich der Wachstumsraten von *E. coli* DH5 α mit unterschiedlichen Plasmiden bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (MM63-Medium)

Gezeigt ist der Vergleich der Wachstumsraten von *E. coli* mit den L13-codierenden Plasmiden in MM63 mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen. Die Expression der Gene wurde nicht induziert, da in der Analyse des Expressionsmusters mit Hilfe einer SDS-PAGE (hier nicht gezeigt) bereits die Expression des Proteins ohne Induktion gezeigt werden konnte. Die Daten wurden in Einfachbestimmung erhoben. Bei 4 % (w/v) NaCl konnte kein Wachstum der Zellen nachgewiesen werden.

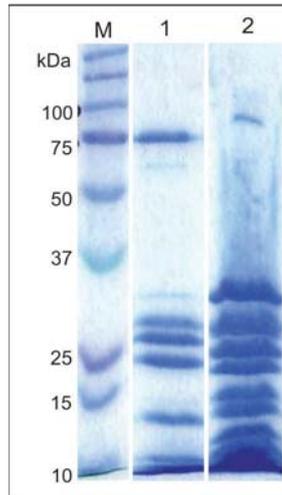


Abbildung 70: SDS-PAGE zur Analyse der Aufreinigung ribosomaler Untereinheiten aus *E. coli* K12 nach (Mackey et al., 1991) modifiziert

Für die Aufreinigung der ribosomalen Untereinheiten wurden krude 70S-Ribosomen verwendet. Durch Absenkung der Mg^{2+} -Ionenkonzentration und anschließende Ultrazentrifugation durch einen Saccharosegradienten wurden die 70S-Komplexe zunächst dissoziiert und anschließend aufgereinigt. Anhand der unterschiedlichen Bandenmuster kann die erfolgreiche Trennung und anschließende Aufreinigung der beiden ribosomalen Untereinheiten gezeigt werden. M = Proteinmarker, 1 = 30S-Untereinheit, 2 = 50S-Untereinheit

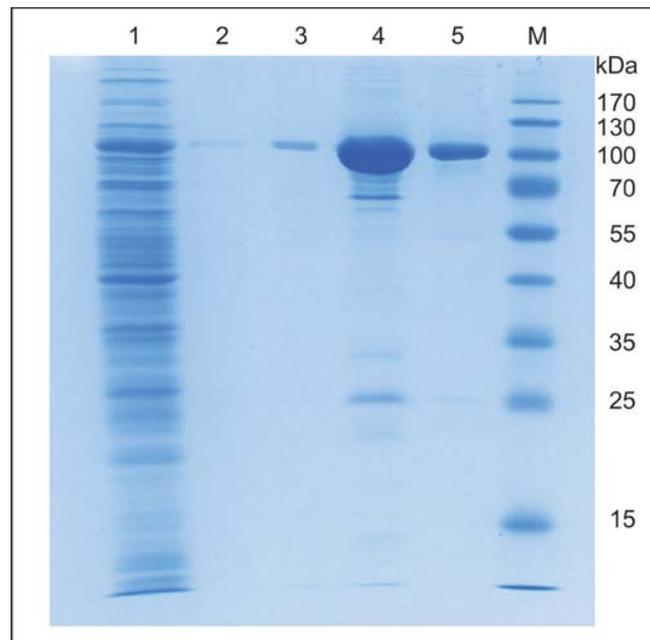


Abbildung 71: Aufreinigung der T7 RNA-Polymerase aus *E. coli* BL21(DE3) p266L

Zur Aufreinigung der T7 RNA-Polymerase wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) p266L in 2xYPTG-Medium bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 1,0 bei 600 nm im 1 L-Fermenter in 750 mL Medium angezogen. Die Expression des Proteins wurde durch Induktion mit 1 mM (Endkonzentration) IPTG durchgeführt. Die Kultur wurde vier Stunden nach Induktion der Expression geerntet. Mit Hilfe des His₆-Fusionstags wurde die exprimierte T7 RNA-Polymerase über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. 1: Durchfluss, 2-4: Waschschrte mit 0, 20 und 50 mM Imidazol, 5: Eluat, M: Proteingrößenstandard

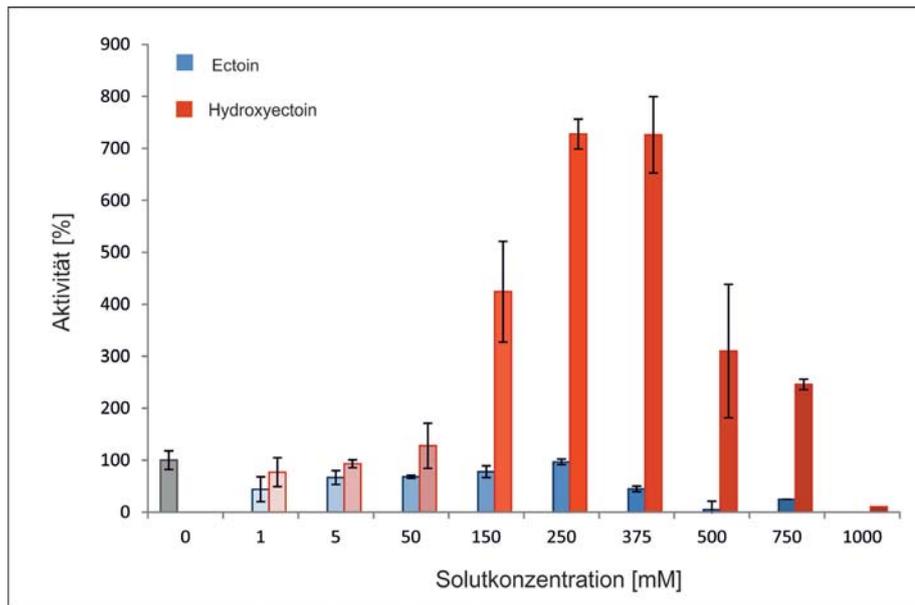


Abbildung 72: Aktivität der bei 42 °C mit unterschiedlichen Ectoin- und Hydroxyectoinkonzentrationen exprimierten Luciferase

Die zellfreie Protein-Synthese wurde bei 42 °C inkubiert und ansteigende Konzentrationen Ectoin (blau) oder Hydroxyectoin (rot) eingesetzt. Die Aktivität der exprimierten Luciferase wurde anschließend bei Raumtemperatur im Luminometer bestimmt. Die Aktivität der Kontrolle wurde als 100 % Aktivität bestimmt und die Aktivitäten der restlichen Proben darauf normiert. Die Daten stellen die Mittelwerte aus drei Reaktionen dar.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. **Erwin A. Galinski** danke ich herzlich für die Überlassung dieses interessanten, und doch an vielen Stellen sehr herausfordernden Themas, das entgegengebrachte Vertrauen sowie sein Interesse am Fortgang der Arbeit und unterstützende und ermutigende Ratschläge, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank auch für die Unterstützung und Ermöglichung zweier großartiger, lehrreicher Auslandsaufenthalte.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats danke ich Frau apl. Prof. Dr. **Christiane Dahl**.

Matthias Kurz, der mich durch seine ruhige und ausgeglichene Art immer wieder auf den Boden der Tatsachen geholt hat, gilt mein herzlicher Dank. Vielen Dank für die Idee zu diesem Promotionsprojekt und deine stete Diskussions- und Erklärungsbereitschaft, die Unterstützung in den letzten fünf Jahren und das Schreiben von zwei, drei sehr wichtigen E-Mails sowie dem Führen eines Telefonats, die den Kontakt mit Tom Steitz hergestellt und mir so den Aufenthalt in New Haven erst ermöglicht haben!

I would like to thank all the people from Yale University who supported me during my stay and made it such a great and unforgettable experience.

I owe special thanks to Prof. Dr. **Thomas A. Steitz** for his curiosity and trust in my work. I'm grateful to have gotten the chance to work with you and learn from you and your lab. Also, I'd love to emphasize my gratitude to the wonderful, amazing **Peggy Eatherton** for organizing everything before, during and even after my stay starting with my visa, to housing and lab hikes, to our little reunion in June. Thank you for being the good soul and always caring about the well-being of the group.

I'm especially indebted to **Axel Innis** for his tireless support, active interest, and many, many fruitful discussions on compatible solutes, CFPS and the combination of both during and also after my stay. I'd love to thank **Durga Thakral** for introducing me to the wonderful cell-free protein synthesis system, her enthusiasm on compatible solutes as well as being an amazing friend. I hope to meet you again soon, in New Haven, Germany, France or somewhere else in the world!

I would like to thank all members of the TAS lab for their guidance, friendship and patience, especially **Ivan Lomakin, Yury Polikanov, Paul Raccuia, Sai Seetharaman, Dan Eiler, Joe Watson, Jinzhong Lin, Dave Bulkley, Matt Gagnon, and Bill Eliason**.

At this point I also want to thank **Edwin Kets** for his guidance and patience during my stay in Boxmeer as well as for giving me the opportunity to get a short insight into a researcher's life at a pharmaceutical company. Furthermore I thank **Monique Gieben-Kirkels** for introducing me to calorimetric measurements and for patiently answering all my questions. Thanks to all the people who supported me during my stay in Boxmeer and made it a great winter.

Ein besonderer Dank gilt selbstverständlich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, ohne die die letzten fünf Jahre nicht einmal halb so lustig, lehrreich und entspannt (ja, entspannt) verlaufen wären:

Birgit Amendt, der guten Seele unserer AG, danke ich nicht nur für das gewissenhafte Organisieren und Wiederbeleben unserer vielen verschiedenen Bakterienstämme, sondern insbesondere auch für die Eröffnung neuer Horizonte: sei es Papierschöpfen aus Elefanten-Dung oder ein Ausflug auf die Dächer des Kölner Doms. **Marlene Hecker** danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft bei Fragen rund ums Kalorimeter. **Elisabeth Schwab** danke ich besonders für die Messung einiger eiliger HPLC-Proben und außerdem für ihre ruhige, ausgleichende Art, die alle aufkommenden Wogen sofort wieder glättet.

Elisabeth Witt danke ich vor allem für ihre ständige Bereitschaft geduldig meine Ideen zu diskutieren und sich in die Welt der Ribosomen einzudenken. Danke für ein jederzeit offenes Ohr, viele wertvolle Informationen, die du über den großen Teich geschickt hast und auch für die Bereicherung der institutseigenen Pflanzenwelt mit immer neuen Organismen.

Mein ganz besonderer Dank geht an **Kati Sell** für kritische Diskussionen und viele gute, daraus entstandene Ideen, das unermüdliche Bestreben die Gruppe zusammenzuhalten sowie die gute Laune und Ausgeglichenheit, durch die aufkommender Arbeitsfrust meist schnell wieder vergessen war.

Christoph Tanne, der mit so wunderbaren Kleinigkeiten wie „Ka-Fee von Häute“ oder dem „Laborelefanten“ viel Spaß und Freude in den Laboralltag gebracht hat, möchte ich herzlich für seinen schier unerschöpflichen Ideenreichtum und neue Denkanstöße danken, die viele Details noch mal von einer anderen Seite beleuchtet haben.

Anne Korsten, **Sinje Vielgraf** und **Andrea Meffert** danke ich für eine tolle Arbeitsatmosphäre, die mich bewogen hat, der Arbeitsgruppe noch ein wenig länger treu zu bleiben und viele Tipps und Tricks, die insbesondere den Start ins Doktorandenleben erleichtert haben. Dank **Jhonny Correa** habe ich gelernt, dass Bananen nur in Europa

immer fünf Ecken haben und das Bild von der außerirdischen Bananenpflanze werde ich bestimmt so schnell nicht mehr los.

Vielen Dank auch an **Kathi Moritz**, die mich besonders in der Endphase der Arbeit durch ihr Engagement und hier und da ein paar motivierende Worte immer noch mal angesport hat weiterzuarbeiten. Ein ganz herzlicher Dank geht auch an **Mirela Ebisch** für ihr Interesse und die engagierte Mitarbeit an den Ribosomen, ob nun mit oder ohne L25.

Sehr viel Unterstützung habe ich außerdem von **Barbara Thiel** erhalten. Ganz herzlichen Dank für motivierende, freundschaftliche Gespräche, deine Begeisterungsfähigkeit und Unterstützung. Ich schätze Dich als Ratgeber sehr!

Myriam Kruse danke ich für viele Gespräche und Diskussionen fachlicher und freundschaftlicher Art, Anregungen und Vorschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Elmar Kopp danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die unerschrockene Durchführung diverser Bastelprojekte.

Allen Diplomanden, Master- und Bachelorstudenten und Praktikanten sowie allen Mitarbeitern des IfMB, die mich in den letzten fünf Jahren begleitet haben, danke ich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und eine wunderschöne Zeit, an die ich mich gerne zurückerinnern werde.

Vielen Dank auch an alle meine Freunde, die, wenn immer nötig, für Ablenkung vom Labor und den Ribosomen gesorgt haben. **Christian Mamat** danke ich insbesondere herzlich für die unermüdliche Unterstützung bei PC- und sonstigen Elektronikproblemen. Bei **Kathrin Langen** und **Debby Kaminski** bedanke ich mich für viele lustige Abende mit vermutlich mittlerweile unzähligen „basic burgern“ und den institutsübergreifenden Ideen- und Methodenaustausch. Besonders danke ich meiner Mitbewohnerin und guten Freundin **Rike Jendrzewski** für ein lustiges und abwechslungsreiches WG-Leben in den letzten vier Jahren und die tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke, dass ich, ganz nebenbei, so viel von dir lernen durfte!

Mein besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern **Silvia Seip-Ristić**, **Albrecht Seip**, **Jovan „Ricki“ Ristić** und **Franziska Seip** sowie meiner Großmutter **Elfriede Neuß**, die mich immer von ganzen Herzen und mit aller Kraft unterstützt und mir stets den Rücken gestärkt haben. Danke, dass ihr mir einfach mal glaubt, dass für mich $30 + 50 = 70$ ist und ihr euch über jedes geglückte Experiment zusammen mit mir freut.