

**Untersuchung mikrobieller Glasbildner für die
Biostabilisierung und biomimetische Applikation in einem
Biosensor**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christoph Kurt Tanne

aus

Hansestadt Havelberg

Bonn, im November 2013

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Erwin A. Galinski
2. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Barthlott

Tag der Promotion: 17. Dezember 2013

Erscheinungsjahr: 2014

Meiner Familie

I Vorwort und Danksagung

Diese Dissertation wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs Bionik (GRK 1572) erstellt, welches sich auf die Thematik „Bionik – Interaktionen über Grenzflächen zur Außenwelt“ fokussierte. Experimentelle Arbeiten wurden am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik Potsdam-Golm durchgeführt. Die Finanzierung übernahm die Deutsche Forschungsgemeinschaft, der ich hiermit meinen Dank ausspreche.

Ich danke Prof. Dr. Erwin Galinski, dessen Leitung mir die vorliegende Arbeit erst ermöglichte. Ich danke Ihnen für die Bereitstellung des spannenden Themas und der Labore. Und ferner danke ich für den Mut sich mit der Mikrobiologie in die Sphären der Bionik zu wagen sowie dem regen Interesse an meiner Arbeit und der kompetenten Beratung während der vielen Konsultationen.

Prof. Dr. Wilhelm Barthlott möchte ich für die Ko-Betreuung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Korreferats danken. Ich danke Ihnen, dass Sie es mir ermöglichten bereits zu Beginn der Promotion von den Methoden und dem Wissen des Nees-Instituts für Biodiversität der Pflanzen profitieren zu können. Und ich danke Ihnen für die Anregungen und Ideen bezüglich meiner Dissertation und meines Präsentationsstils im Kontext des Graduiertenkollegs.

Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs danke ich, dabei vor allem den Promotionsstudenten für viele interessante Vorträge und den weiten Einblick in die Vielfalt der Bionik. Stets erinnere ich mich gern an die jährliche *Autumn School*. Weiterhin gilt ein spezieller Dank Prof. Dr. Helmut Schmitz und seiner Frau und Koordinatorin des Graduiertenkollegs PD Dr. Anke Schmitz vom Zoologischen Institut der Universität Bonn. Ich danke für die Unterstützung durch die Nanoindentierung, aber auch für das Interesse an meiner Arbeit sowie für die unzählbaren Ratschläge und Hinweise betreffend organisatorischer und bürokratischer Angelegenheiten im Graduiertenkolleg.

Dr. Carsten Teller gilt mein Dank für die bereitwillige Kooperation, wodurch mir die biosensorischen Arbeiten am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik Potsdam-Golm ermöglicht wurden. Ich danke auch für die wissenschaftlichen Diskussionen im Bereich der Biosensorik. Seiner damaligen Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Aufnahme, die wichtigen Ratschläge und Hinweise zur elektrochemischen Biosensorik sowie für die Überlassung von Material und Geräten als die Zeit knapp wurde. An diese arbeits- und ereignisreiche Zeit in Golm denke ich gern zurück.

Ich danke Hans-Jürgen Ensikat vom Nees-Institut für Biodiversität der Pflanzen der Universität Bonn für die elektronenmikroskopische Unterstützung und die vielen hilfreichen Hinweise. Dr. Stefan Kehraus und der Arbeitsgruppe König vom Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Bonn danke ich für die Unterstützung mittels NMR-Spektroskopie. Dr. René Fakoussa danke für die Bereitstellung von Geräten sowie die interessanten Berichten aus der Welt der Mikrobiologie.

Ein großes Dankeschön gilt vor allem meiner Arbeitsgruppe am IfMB der Universität Bonn, die mich fernab meiner Heimat in ein geradezu familiäres Verhältnis aufnahm und stets eine gute Arbeitsatmosphäre garantierte. Euch allen danke ich für das lebhaftes und humorvolle Miteinander, für die Demonstration der rheinländischen Lebenskultur und selbstredend für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und Hilfestellungen.

Speziell danke ich Birgit Amendt für die Aufbesserung meiner mikrobiologischen Fertigkeiten und die vielen nützlichen Kniffe im Laboralltag. Und ich danke Dir für das Wissen über die bioverfahrenstechnische Anwendbarkeit von *Elephas maximus* und *Loxodonta africana* zur Herstellung von Zellulose-Multischichten. Marlene Hecker danke ich für die Hilfestellung zum ALF trotz Elternzeit. Bei Dr. Mathias Kurz bedanke ich mich für den erleichternden Wissenseinstieg in die Welt der kompatiblen Solute. Ein großes Dankeschön gilt Elisabeth Schwab für die wertvolle Unterstützung zur Erlangung wichtiger Arbeitsergebnisse. Danke für Deine stetige Hilfsbereitschaft und das humoristische Feedback.

Unserer schöpferisch begabten Elisabeth Witt danke ich für wertvolle Kommentare zu dieser Dissertation und die Unterrichtung in der Bioreaktortechnik. Und Danke für Deine Geduld bei selbst banalen Fragen zur zielsicheren Aufenthaltswahrscheinlichkeit jeglicher labortechnischer Materie. Der vielfältig engagierten Kati Waßmann danke ich für facettenreiche Denkanstöße zu dieser Arbeit sowie für den wissenschaftlichen und freundschaftlichen Dialog im Alltag. Ich danke Dir auch für das spannende Hobby des Chilipflanzen-Anbaus. Dieses wird wohl noch viele Früchte tragen. Der guten Laune in Person Britta Seip danke ich für stetige Kommunikationsfreudigkeit und zahlreiche Fachdiskussionen. Weiterhin will ich Andrea Meffert und Sinje Vielgraf für einen sehr amüsanten sowie informativen Start in die Welt der Mikrobiologie danken. Ich danke Euch für Eure aufgeweckte Art den Arbeitsalltag zu gestalten. Kathi Moritz danke ich für die tatkräftige Unterstützung als Werkstudentin sowie für unterhaltsame Tee-Pausen durch lebhaftere Kommentare zum Laboralltag. Momo Soga und Tassilo van Ooyen danke ich für fachliche und abwechslungsreiche Gespräche sowie für das aktive Interesse an meiner Arbeit zum Thema Glasbildung, was mich oft motivierte, auch wenn das Glas mit dem ich am meisten zu tun hatte letztlich der Laborabwasch war. Jhonny Correa danke ich für wissenschaftliche Gespräche und den kameradschaftlichen Umgang im Arbeitsalltag. Michael Michalik danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz als Werkstudent, auch wenn es mal sehr spät, sehr früh oder gar beides wurde. Weiterhin bedanke ich mich für die vielen feierabendlichen Gespräche auf wissenschaftlicher und freundschaftlicher Ebene sowie der großzügigen Gastfreundlichkeit. Elmar Kopp danke ich für die praktische Hilfe im Institutsalltag und viele freundschaftliche Gespräche. Allen weiteren Institutsmitgliedern des IfMB Bonn danke ich für das angenehme Miteinander und die allzeitliche Hilfsbereitschaft. Aus dem Kreise meiner Berliner Freunde danke ich insbesondere Martin Kluth für die wertvolle Unterstützung auf dem Gebiet der Bioinformatik.

Ein spezieller Dank gilt meinem langjährigem Freund und Kumpel Marvin Lange für das aktive Interesse an meiner Promotionsarbeit und die vielen ideenreichen und unterhaltsamen Konversationen nach Feierabend. Und vor allem geht an dieser Stelle ein großes Dankeschön an meine Familie. Dabei will ich besonders meinem Bruder Johannes Tanne danken, der mit den vier einfachen Worten „Komm doch zu uns!“ den Weg nach Golm ebnete. Ich danke Dir außerdem für das gemeinsame Durchstehen der Doktorandenzeit mit all seinen Höhen und Tiefen und ich freue mich schon jetzt auf den Tag, an dem wir uns gegenseitig mit „Hallo, Dr. Tanne!“ begrüßen können. Auch aus der Ferne wart Ihr alle stets für mich da und habt mich auf dem holprigen Weg meiner Bonner Zeit begleitet. Dafür, dass ihr immer ein Ohr für mich hatte und mich fortwährend unterstützt, danke ich Euch von Herzen.

II Inhaltsverzeichnis

I	Vorwort und Danksagung	I
II	Inhaltsverzeichnis	III
III	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VII
1	Abbildungsverzeichnis	VII
2	Tabellenverzeichnis	IX
IV	Einleitung	1
1	Begriffserklärung Vitrifikation	1
1.1	Klassifizierung fester Materie anhand der submikroskopischen Struktur.....	1
1.2	Vitrifikation – Verwechslungsgefahren im wissenschaftlichem Sprachgebrauch	2
1.3	Die biologische Glasbildung als Überlebensmechanismus	2
2	Ökonomische Relevanz trockenstabilisierter Biomaterialien	4
2.1	<i>Anhydrobiotic Engineering</i> (biotechnologische Trockenstabilisierung)	4
2.2	Konservierung von Biomolekülen	4
2.3	Konservierung prokaryotischer Zellen	5
2.4	Konservierung eukaryotischer Systeme (Zellen, Gewebe, Organe)	5
3	Dehydrierungsbedingte Zellschäden und Trockentoleranzmechanismen.....	6
3.1	Dehydrierungsbedingte Zellschäden.....	6
3.2	Anpassungsmechanismen zur Kompensation der Dehydrierung	7
4	Hypothesen zum Prinzip der natürlichen Trockenstabilisierung	13
4.1	Wasserersatzhypothese („ <i>water replacement hypothesis</i> “)	13
4.2	Vitrifikationshypothese („ <i>vitrification hypothesis</i> “).....	14
4.3	Wassereinschlusshypothese („ <i>water entrapment hypothesis</i> “).....	17
4.4	NADES-Hypothese („ <i>natural deep eutectic solvent hypothesis</i> “)	20
5	Ein bionischer Ansatz aus der Mikrobiologie	22
5.1	Potentiell vitrifizierungsfähiger Modellorganismus.....	23
5.2	Bionik in der Biosensorik.....	24
6	Zielstellung der Arbeit	26
V	Material und Methoden	27
1	Verwendete Bakterienstämme	27
2	Nährmedien.....	27
2.1	Synthetische Minimalmedien	27

2.2	Komplexmedien.....	28
2.3	Agarplatten.....	29
3	Kultivierungsmethoden	29
3.1	Stammhaltung der Bakterien	29
3.2	Vorkultivierung.....	29
3.3	Hauptkultivierung.....	30
3.4	Trockenstressexperimente (<i>In-Vivo</i> -Studien).....	32
4	Puffer, Lösungen und Suspensionen	33
4.1	Lösungen für die Kultivierung	33
4.2	Lösungen für die isokratische HPLC	33
4.3	Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten.....	34
4.4	Puffer und Lösungen für Vitrifikationsexperimente	36
4.5	Puffer, Lösungen und Suspensionen der Biosensorik	37
5	Präparative Methoden	39
5.1	Zellernte	39
5.2	Auswaschen von Salzen aus den geernteten Zellen	39
5.3	Lyophilisierung für die Gewinnung von Biotrockenmasse (Gefriertrocknung)	40
5.4	Trocknung im Vakuumkonzentrator für die Gewinnung von Biotrockenmasse.....	40
5.5	Mikroextraktion nach Bligh und Dyer (Bligh und Dyer, 1959)	40
5.6	Solutextraktion und Probenvorbereitung für die ¹³ C- und ³¹ P-NMR-Spektroskopie .	41
5.7	Präparationsmethoden der Proteinbiochemie	41
5.8	Hydrolyse von Polyphosphaten.....	45
5.9	Präparation künstlicher Solutmatrizes für die Mikroskopie und Nanoindentation ..	46
5.10	Einschluss von Lactatdehydrogenase (LDH) in Solutmatrizes.....	46
5.11	Präparationsmethoden für die Biosensorik	47
6	Analytische Methoden.....	50
6.1	Photometrische Methoden	50
6.2	Proteinbiochemische Analytik.....	51
6.3	Zellviabilitätstest	54
6.4	Werkstoffprüfverfahren	54
6.5	Chromatographische Methoden	55
6.6	Spektroskopische Methoden	56
6.7	Mikroskopische Methoden	58

6.8	Elektrochemische Methoden	59
7	Bioinformatische Datenbanken, Software und Webapplikationen	63
8	Verwendete Chemikalien	64
VI	Ergebnisse	66
1	Biologie – Ergebnisse aus dem Studium des Modellorganismus	67
1.1	Untersuchung von <i>H. elongata</i> und <i>E. coli</i> im Komplexmedium	67
1.2	Untersuchung von <i>H. elongata</i> im synthetischen Medium	71
1.3	Elementarspektroskopische Betrachtung von <i>H. elongata</i>	78
1.4	Bioinformatische Analyse bakterieller Proteome	79
1.5	Experimentelle Untersuchung bakterieller Proteine	84
2	Applizierte Vitrifikation – Ergebnisse zur kontrollierten Glasbildung	88
2.1	<i>In-vivo</i> -Applikation der Vitrifikation in <i>H. elongata</i>	88
2.2	<i>In-vitro</i> -Erzeugung organischer Solutmatrizes	89
2.3	Mechanische Materialprüfung <i>in vitro</i> erzeugter Gläser	91
2.4	Biostabilisierung des Modellenzym Lactatdehydrogenase durch Vitrifikation	92
3	Biosensorik – Ergebnisse zur biomimetische Applikation in einem Biosensor	98
3.1	Etablierung eines Glucose-Biosensors auf Basis von Kohlenstoffnanoröhren	98
3.2	Optimierung des Biosensors für die Integration der Ectoine	104
3.3	Charakterisierung des Biosensors	108
3.4	Biomimetische Applikation von kompatiblen Soluten im Biosensor	113
VII	Diskussion	116
1	Diskussion der Ergebnisse aus biologischen Studien	116
1.1	Bakterielle Vitalität unter temperaturdynamischen Bedingungen	116
1.2	Bedeutung anorganischer Komponenten in dehydrierungsgestressten Zellen	119
1.3	Vergleich eines nicht-halophilen und eines halophilen Proteoms	121
1.4	Bioinformatische Suche nach potentiellen Hydrophilinen	122
1.5	Experimentelle Suche nach potentiellen Hydrophilinen	123
1.6	Fazit aus den biologischen Studien	124
2	Diskussion der Ergebnisse zur applizierten Vitrifikation	125
2.1	<i>In-vivo</i> -Studie zur induzierten Vitrifikation durch Hydroxyectoin in <i>H. elongata</i>	125
2.2	Artifizielle Solutmatrizes (<i>in vitro</i>) – Kristallisations- und Vitrifikationstendenzen	127
2.3	Materialwissenschaftliche Prüfung der mechanischen Werkstoffeigenschaften	128
2.4	Stabilisierung der Lactatdehydrogenase während der beheizten Trocknung	130

2.5	Xeroprotektive Wirkung von Solut- und Solut-Protein-Matrizes auf die LDH	131
2.6	Fazit zur applizierten Vitrifikation (<i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>)	133
3	Diskussion zur biomimetischen Anwendung kompatibler Solute in einem Biosensor ...	135
3.1	Biosensorik	135
3.2	Auswirkung der MWCNT-Modifizierung	135
3.3	Immobilisierung des Enzyms und Realisierung des direkten Elektronentransfers..	136
3.4	Optimierung der Biosensors und Integration der Ectoine	138
3.5	Charakterisierung des Biosensors	140
3.6	Biomimetische Trockenstabilisierung	142
3.7	Fazit zur Biosensorik.....	143
VIII	Ausblick	144
IX	Zusammenfassung	147
X	Literaturverzeichnis.....	149
XI	Abkürzungsverzeichnis	167
1	Material und Methoden	167
2	Größen und Einheiten.....	169
3	Sonstiges	171
XII	Anhang	172

III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphologische Festkörperzustände (A und C) in die eine Flüssigkeit (B) übergehen kann.	1
Abb. 2: Inkluden (Termiten nach dem Hochzeitsflug und deren Flügel) in baltischem Bernstein (Wichard, 2009).	3
Abb. 3: Strukturformeln wichtiger kompatibler Solute.	8
Abb. 4: Hypothetische Sekundärstruktur der LEA-Protein-Gruppe 3 im hydrierten und dehydrierten Zustand.	11
Abb. 5: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Wasserersatzhypothese.	14
Abb. 6: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Vitrifikationshypothese.	15
Abb. 7: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Polymorphismushypothese.	16
Abb. 8: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Wassereinschlusshypothese.	18
Abb. 9: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Verankerungshypothese.	20
Abb. 10: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der NADES-Hypothese.	22
Abb. 11: Konstruktionsprinzip eines biosensorischen Bauelements.	24
Abb. 12: Fotografische Aufnahmen einer unmodifizierten Elektrode (A) und einer Elektrode mit biokatalytisch aktivem Bio-Nanokomposit (B).	49
Abb. 13: Schematischer Aufbau der Messzelle mit Dreielektrodensystem für die Zyklovoltammetrie.	59
Abb. 14: Beispielhafte und vereinfachte Darstellung der zykvoltammetrischen Untersuchung eines quasi-reversiblen Redoxprozesses.	61
Abb. 15: Anzahl vitaler Zellen von <i>H. elongata</i> und <i>E. coli</i> während der temperaturdynamischen Fermentation.	68
Abb. 16: Via HPLC beobachtete Veränderungen des intrazellulären Gehalts an kompatiblen Soluten (A) und anorganischen Ionen (B) in <i>H. elongata</i> in Abhängigkeit von der Wachstumsphase bei der jeweiligen Mediumtemperatur.	70
Abb. 17: Intrazellulärer Gehalt an Ectoin, Hydroxyectoin sowie Kalium- und Natriumionen in spätstationären <i>H. elongata</i> -Zellen in Abhängigkeit von der Salinität des Mediums und der Kultivierungstemperatur.	72
Abb. 18: Temperaturdynamische Fermentation mit <i>H. elongata</i> im synthetischem Medium. ...	73
Abb. 19: Intrazelluläre Konzentrationen von Soluten und anorganischen Ionen in <i>H. elongata</i> -Zellen aus den Proben I bis VII der temperaturdynamische Fermentation im synthetischen Medium.	74

Abb. 20: ^{13}C -NMR-Spektrum der Probe V aus der temperaturdynamischen Fermentation im synthetischen Medium.	75
Abb. 21: Phosphationenkonzentration der hydrolytisch behandelten und unbehandelten Proben I bis VII.	76
Abb. 22: ^{31}P -NMR-Spektrum der Probe V.	77
Abb. 23: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme sowie Elementarspektrum von <i>H. elongata</i>	78
Abb. 24: Relative Aminosäurehäufigkeit (A) im <i>H. elongata</i> - und <i>E. coli</i> -Proteom und deren Verhältnisse (B).	79
Abb. 25: Relative Häufigkeit von Proteinen mit einem bestimmten $[\text{Glu}+\text{Asp}]/[\text{Lys}+\text{Arg}]$ -Verhältnis in den Proteomen von <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i> (A) und Vergleich periplasmatischer Proteine der beiden Organismen (B).	80
Abb. 26: Streudiagramme des Glycingehalts gegenüber der Hydrophilie der Proteine ganzer Proteome.	82
Abb. 27: Hydrophilie-Profil und Aminosäurekomposition des Proteins E1V347 aus <i>H. elongata</i>	83
Abb. 28: SDS-PA-Gele zum Vergleich des Gesamtzellproteins und hitzeselektierter Proteine aus <i>E. coli</i> (A, A', B und B') und <i>H. elongata</i> (C, C', D und D') in Abhängigkeit von der Salzkonzentration während der Kultivierung.	84
Abb. 29: Expressionsmuster kleiner Proteine von <i>H. elongata</i> bei Variation von Salinität und Kultivierungstemperatur.	86
Abb. 30: Wachstumsverhalten (A) und molares Solutverhältnis (B) von <i>H. elongata</i> in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperierung.	88
Abb. 31: Überlebensraten der <i>H. elongata</i> -Zellen unter harschen Trocknungsbedingungen.	89
Abb. 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen artifizierter Solutmatrizes.	90
Abb. 33: Mechanische Kenngrößen (A - Elastizitätsmodul, B - Härte) von Trehalose- und Hydroxyectoingläsern.	91
Abb. 34: Relative Enzymaktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.	92
Abb. 35: Relative Enzymaktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Kombination mit speziellen Proteinen.	94
Abb. 36: Relative Enzymaktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Abhängigkeit des Einschlussmaterials.	95
Abb. 37: Voltammetrische Signale einer blanken Goldstabelektrode und einer MWCNT-modifizierten Goldstabelektrode.	99
Abb. 38: Voltammetrische Untersuchung einer MWCNT-modifizierten Elektrode im weiten Scanbereich.	100
Abb. 39: Voltammetrische Untersuchung einer MWCNT-modifizierten Elektrode mit immobilisierter Glucose-Oxidase im weiten Scanbereich.	102
Abb. 40: Konzept des Biosensors, welcher auf der GOD-Immobilisation via Einschlussverfahren basiert.	103
Abb. 41: Prinzip der Analytdetektion des GOD-MWCNT-Biosensors.	103

Abb. 42: Voltammetrische Untersuchungen des GOD-MWCNT-Biosensors (MWCNT aus Ethanolsuspension) mit eingeschlossener Glucose-Oxidase.	105
Abb. 43: Voltammetrische Untersuchungen des GOD-MWCNT-Biosensors (MWCNT aus Ethanolsuspension) mit eingeschlossener und kovalent gekoppelter Glucose-Oxidase.....	106
Abb. 44: Voltammetrische Untersuchungen des GOD-MWCNT-Biosensors (MWCNT aus PBS-Suspension) mit eingeschlossener Glucose-Oxidase.....	107
Abb. 45: Voltammetrische Untersuchungen von GOD-MWCNT-Biosensoren mit immobilisierter Glucose-Oxidase mit 0 mM und 5 mM Glucose in Lösung unter aeroben (A) und anaeroben (B) Bedingungen.....	108
Abb. 46 Amperometrisches Stromsignal des GOD-MWCNT-Biosensors in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.	109
Abb. 47: Prinzip des Elektronentransfermechanismus vom Substrat zur Elektrode in drei Schritten.	110
Abb. 48: Voltammetrisches Verhalten eines GOD-MWCNT-Biosensors in Abhängigkeit von der Scanrate.....	111
Abb. 49: Graphische Ermittlung des formalen Potentials des enzymatische gebundenen FAD/FADH ₂ eines Biosensor.	112
Abb. 50: Oxidationspeakstrom-Verhalten verschieden modifizierter Biosensoren bei prolongierter Trocknungszeit (bei 37 °C).	113
Abb. 51: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des rekonstruierten Biosensors.....	114
Abb. 52: Vergleich des Aziditätslevels (A) und der Glycin-Hydrophilie-Werte von ribosomalen Proteinen in <i>E. coli</i> K12 und <i>H. elongata</i> WT.	122
Abb. 53: Vergleich des Aminosäuregehalts von bovinem Serumalbumin (BSA; UniProt-Akzession: P02769) und Gelatine Typ A (Babel, 1996).....	131
Abb. 54: Prinzip der Redoxprozesse im Biosensor	137

2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Anwendungen von trockenstabilisierten Bakterien in diversen Arbeitsfeldern und die zur Trocknung genutzten Methoden (García, 2011).	5
Tab. 2: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme.	27
Tab. 3: Heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstanten von GOD-CNT-basierten Biosensoren.	141
Tab. 4: Potentielle Hydrophilie (Glycingehalt > 6 mol%, Hydrophilie > 1) in <i>E. coli</i> und <i>H. elongata</i>	172
Tab. 5: Auflistung und Klassifizierung einiger, kompatibler Solute.....	173

IV Einleitung

1 Begriffserklärung Vitrifikation

1.1 Klassifizierung fester Materie anhand der submikroskopischen Struktur

Vitrifikation (auch Vitrifizierung) ist die wissenschaftliche Bezeichnung der Glasbildung. Gläser umfassen alle Feststoffe, die auf atomarer bzw. molekularer Ebene betrachtet keine räumliche Fernordnung aufweisen. Ihre innere Struktur wird als nicht-kristallin bzw. amorph bezeichnet, da sie keine bevorzugte Orientierung und nur unregelmäßige Muster zeigen (Abb. 1 C). Das Gegenstück sind demnach kristalline Stoffe, die eine hochgradig geordnete Gitterstruktur mit periodisch wiederkehrenden Mustern auszeichnet (Abb. 1 A). In der Festkörperforschung unterteilt man feste Materie prinzipiell nur in kristalline und glasartige Stoffe. Dies änderte sich erst mit der Entdeckung von Quasikristallen (geordnete, jedoch aperiodische Strukturen), für deren Entdeckung 2011 der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde. Auf sie wird hier nicht speziell eingegangen.

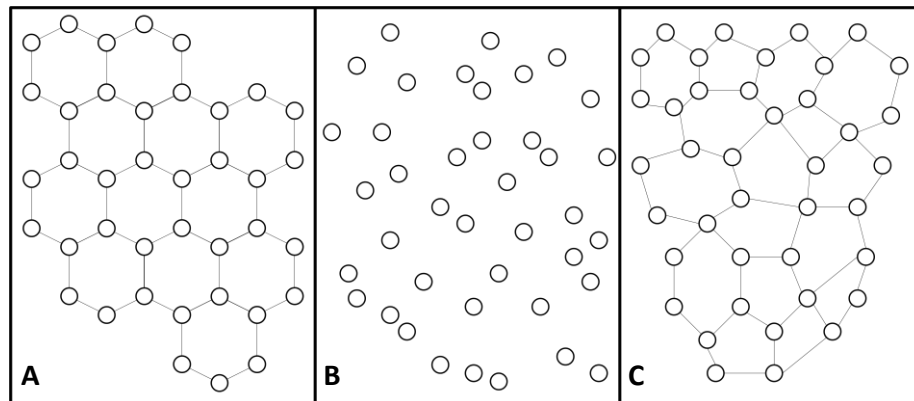


Abb. 1: Morphologische Festkörperzustände (A und C) in die eine Flüssigkeit (B) übergehen kann.

In Flüssigkeiten (B), wie Lösungen oder Schmelzen, sind einzelne Partikel (Atome, Moleküle, Polymere) frei beweglich und zufällig angeordnet. Beim Übergang in die Festphase bilden sie periodisch geordnete Kristalle (A) oder amorphe Gläser (C).

Die Bildung eines Glases geht stets von einem Zustand meist zufällig angeordneter Partikel hoher molekularer Beweglichkeit aus (Abb. 1 B). In der Regel sind dies Flüssigkeiten wie Lösungen oder Schmelzen. Beim Vitrifikationsprozess handelt es sich nun um den Phasenübergang dieser Flüssigkeit in einen glasartigen, festen Zustand durch den rapiden Anstieg der Viskosität. Mit dem Übergang in die feste Phase verlieren die Partikel ihre hohe Mobilität. Jedoch bleibt das Charakteristikum der zufälligen Anordnung erhalten. Die Umsetzung der Vitrifikation ist auf verschiedene Weise realisierbar. Der Entzug thermischer Energie führt zum Erstarren einer Lösung oder Schmelze. Für diese Arbeit ist die Möglichkeit der Glasbildung durch die Entfernung des Lösungsmittels (Dehydrierung) jedoch relevanter.

1.2 Vitrifikation – Verwechslungsgefahren im wissenschaftlichem Sprachgebrauch

Spricht man von Gläsern, werden damit zunächst Silikatgläser assoziiert, wie man sie von Fenstergläsern oder Trinkbehältnissen kennt. Denn diese Gläser haben für den Menschen die größte ökonomische Relevanz. Als Sammelbegriff sind Gläser jedoch nicht auf eine spezielle Materialgruppe beschränkt. Es existieren anorganische wie auch organische Gläser. So werden beispielsweise metallische Gläser zur militärischen Anwendung oder zur Beschichtung von Golfschlägern genutzt (Hofmann, 2013). Viele Kunststoffe und Keramiken sind größtenteils amorph strukturiert und damit im Glaszustand. Selbst bei dem natürlich vorkommenden Bernstein handelt es sich morphologisch gesehen um ein Glas. Dieses Glas biologischen Ursprungs teilte in der germanischen Sprache („glasa“, latinisiert „glessum“) noch die etymologische Herkunft der heutigen Bezeichnung amorpher Strukturen (Gläsern), wie Tacitus in seiner *Germania* (etwa 98 n. Chr.) berichtete (Bacmeister, 1868). Gläser sind also wie deren Gegenstücke (Kristalle) universell in Natur und Technik vorzufinden. Jedoch kann die Vielseitigkeit des „Glas“-Begriffes vor allem bei interdisziplinärer Zusammenarbeit, welche für die Entwicklung von Zukunftstechnologien immer bedeutsamer wird, leicht zu Irrtümern führen. Hier kann die breite Auslegung des Begriffes Glasbildung zu Verwirrungen und Missverständnissen führen. Denn die Bezeichnung Vitrifikation ist zwar in vielen Wissenschaftsbereichen langjährig geläufig, doch meist sind völlig unterschiedliche Sachverhalte gemeint.

Die „Vitrifikation radioaktiv belasteter Materialien“ beispielsweise beschreibt eine langfristige und hoch-effiziente Versiegelungsmethode durch den Einschluss in ein wasserfestes Silikatglas (Morrey *et al.*, 1993; Ojovan und Lee 2005, 2011). Wasser selbst kann durch schockartiges Gefrieren auf extrem niedrige Temperaturen in den amorphen Glaszustand überführt werden. Auch hier spricht man standardmäßig von Vitrifizierung und macht sie sich bei der Kryokonservierung von Eizellen und Embryonen sowie bei der Kryo-Elektronenmikroskopie zu Nutze (Smith *et al.*, 2011; Glaeser, 2008). In dieser Arbeit wird eine Form der mikrobiologischen Glasbildung behandelt. Damit ist nicht die Ausbildung von Silikatstrukturen gemeint, wie man sie bei Diatomeen und Radiolarien findet (Coradin und Lopez, 2003), sondern es wird die zytosolische Vitrifikation als Überlebensmechanismus behandelt, der der sogenannten Kryptobiose zugeordnet wird.

1.3 Die biologische Glasbildung als Überlebensmechanismus

Kryptobiose bedeutet sinngemäß „verborgenes Leben“ (Clegg, 2001). Darunter werden Überlebensmechanismen spezialisierter Organismen zusammengefasst. Diesen wird dadurch die Adaptation an extreme abiotische Stressbedingungen ermöglicht, die in ihrem Ausmaß bei den meisten Lebewesen zu irreversiblen Schäden bis hin zum Zelltod führen. Auslöser sind Umweltfaktoren wie Kälte, starke Dehydrierung, hohe Salinitäten oder dem Sauerstoffmangel. Den jeweiligen Anpassungsformen ist gemeinsam, dass sie in einer starken Reduzierung der metabolischen Aktivität resultieren, so dass diese kaum noch nachweisbar ist (Keilin, 1959). Somit handelt es sich um Dormanzzustände, die einen temporären Wachstums- und Entwicklungsstopp implizieren. Lebewesen in der Kryptobiose weisen daher nicht die typischen Merkmale lebender Strukturen auf, sondern ähneln eher der unbelebten Natur (Clegg, 2001). Je nach Art des auslösenden Umweltfaktors werden die Formen der Kryptobiose unterschiedlich benannt und wurden 1959 ausführlich von David Keilin beschrieben. (Keilin, 1959).

Die beiden wohl am besten erforschten Formen der Kryptobiose sind die Kryobiose als Antwort auf sehr niedrige Temperaturen (Kältestarre) sowie die Anhydrobiose als Reaktion auf nahezu vollständige Austrocknung (Trockenstarre). Beiden Formen ist gemeinsam, dass die auslösenden Umweltextreme im Entzug des freien Wassers resultieren und die Stressantwort jeweils in der zytosolischen Vitrifikation liegt. Die durch Gefrieren induzierte Kryobiose wird durch Vitrifikation des intrazellulären Wassers realisiert und trägt somit zur Vermeidung der Eiskristallbildung bei. Hingegen resultiert die Anhydrobiose in der Vitrifikation des verbleibenden Biomaterials bei starkem Wasserverlust. In beiden Fällen basieren die gebildeten Gläser auf organischen Protektiva (Schutzstoffen). In beiden kryptobiotischen Zuständen führt die Vitrifikation zur langfristigen Konservierung des Organismus. Dies geschieht durch die Stabilisierung der strukturellen Integrität und dem simultanen Erhalt der Funktionalität von Biomolekülen. Somit handelt es sich nur um temporär bestehende Überdauerungsstadien. Somit sind diese Prozesse reversibel. Sobald es zur Erwärmung bzw. Rehydrierung kommt, gehen die Zellen wieder in den metabolisch aktiven Zustand über.

Als Reaktion auf die fast vollständige Dehydrierung, stellt die Anhydrobiose eine Anpassung an die extremste Form des Wasserverlusts dar (Billi und Potts, 2002; Rebecchi *et al.*, 2007). Selbst Lebewesen im kryobiotischen Zustand können nach der Vitrifikation des Zellwassers noch allmählich austrocknen. Hier vermutet man den Grund, warum die Anpassungsmechanismen in kryo- und anhydrobiotischen Lebewesen meist sehr ähnlich sind. Meist impliziert die Anhydrobiose auch Kryo- und Anoxibiose (Kryptobiose bei Sauerstoffmangel) sowie die Resistenz gegenüber erhöhten Temperaturen, organischen Lösungsmitteln, starkem Druck und ionisierender Strahlung (Crowe *et al.*, 1992; Rebecchi *et al.*, 2007).

Die Anhydrobiose ist wohl die am häufigsten anzutreffende Form der Kryptobiose. Sie reicht von sehr einfachen biologischen Strukturen wie Pollen und Sporen über Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen bis hin zu hoch komplexen Mehrzellern wie Tardigraden (Bärtierchen), den Larven von *Polypedilum vanderplanki* (eine Zuckmückenart) und Wiederauferstehungspflanzen.

In anschaulicher und repetitiver Weise wird insbesondere die anhydrobiotische Vitrifikation oftmals anhand der Analogie zu in Bernstein eingeschlossenen und langfristig konservierten Insekten erklärt, wie beispielhaft in Abb. 2 abgebildet (Sussich *et al.*, 2001; Lerbret *et al.*, 2005a; Cesàro, 2006; Jain und Roy, 2008; Fedorov *et al.*, 2011). Die Gemeinsamkeiten zeigen sich in dem mechanischen Einschluss biologischer Einheiten in eine feste, amorphe Matrix, wodurch das sensitive Biomaterial über einen langen Zeitraum vor schädlichen abiotischen Faktoren geschützt bleibt. Die anhydrobiotische Vitrifikation ist darüber hinaus durch Rehydrierung reversibel sowie struktur- und aktivitätserhaltend.



Abb. 2: Inklusen (Termiten nach dem Hochzeitsflug und deren Flügel) in baltischem Bernstein (Wichard, 2009).

Die mechanische Immobilisierung und langfristige Konservierung von Insekten innerhalb der amorphen Matrix eines Bernsteins ist eine anschauliche Analogie zur Vitrifikation während der Anhydrobiose. Sie wurde daher innerhalb des letzten Jahrzehnts zu einem präferierten Beispiel, um die biologischen Vitrifikation fassbar zu beschreiben.

2 Ökonomische Relevanz trockenstabilisierter Biomaterialien

Biologisch aktive Funktionseinheiten sind vor allem für die Lebensmittelindustrie, Landwirtschaft sowie für die Medizin bzw. Pharmazie interessant. Meist sind dies Biomoleküle, ganze Zellen oder komplexe Zellsystemen (Gewebe, Organe), die entweder einer biologischen Quelle entstammen oder biotechnologisch erzeugt werden. Sie umfassen ein breites Anwendungsspektrum, wodurch ihre kommerzielle und wissenschaftliche Bedeutung beträchtlich ist. 2005 betrug ihr wirtschaftlicher Wert bereits 500 Milliarden US-Dollar pro Jahr, mit steigender Tendenz (Potts, 2005). Außerhalb ihres physiologischen Milieus sind solche sensitive Biomaterialien verstärkt vielen, abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Gerade Proteine (Enzyme, Impfstoffe) sind in wässriger Lösung eher labil (Lerbret *et al.*, 2012). Die wirtschaftliche Globalisierung fördert die Nachfrage nach optimierten Methoden zur langfristigen Biostabilisierung zu entwickeln. Das biophysikalische Wissen zur Reduzierung denaturierender Bedingungen wird dadurch extrem wertvoll.

2.1 *Anhydrobiotic Engineering* (biotechnologische Trockenstabilisierung)

Generell wird Kühltechnik zur Konservierung empfindlicher Biomaterialien verwendet. Doch können kälteinduzierte Schäden und wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen zur Inaktivierung bis Degradation führen. Nachteilig ist zudem der hohe Energieaufwand zur Aufrechterhaltung der Kühlkette während der Lagerung und des Transports. In der Praxis impliziert dies erhöhten Personal- und Arbeitsaufwand sowie die Notwendigkeit zusätzlichen, technischen Wissens. Die Tatsache, dass sich die Kryotechnik nur in begrenztem Umfang rentiert, förderte die Entwicklung von Methoden zur Konservierung durch Trocknung, um energie- und kosteneffizientere Konservierung in einem breiteren Temperaturspektrum zu ermöglichen. Die biotechnologische Trockenstabilisierung sensitiver Biomaterialien unter Verwendung der Kenntnis des anhydrobiotischen Prinzips prägte innerhalb der letzten zwei Dekaden den Begriff *Anhydrobiotic Engineering* (de Castro *et al.*, 2000; Tunnacliffe *et al.*, 2001). Im einfachsten Fall besteht dieses in der Wahl und ausreichenden Synthese eines passenden Wasserersatzes (Clegg, 2001). Die Einfachheit dieser Methode eröffnete ein breites Applikationsspektrum zur Stabilisierung einzelner Biomoleküle sowie ganzer Zellen. Dennoch ist fraglich, ob die Imitation des anhydrobiotischen Prinzips durch derartige Methoden tatsächlich so simpel ist (Clegg, 2001). Daher befasst sich das *Anhydrobiotic Engineering* weiterhin mit gentechnischen Konzepten, um die Synthese xeroprotektiver Solute oder die Expression speziellen Stressproteinen in artfremden Zellen zu realisieren (Julca *et al.*, 2012). Nachfolgend werden die Biomaterialien behandelt, deren Trockenstabilisierung von ökonomischer Relevanz ist.

2.2 Konservierung von Biomolekülen

Die Halbwertszeit von Biomolekülen ist in wässriger Lösung meist gering (Arakawa *et al.*, 2001, 2007). Daher wird die Trockenkonservierung zunehmend bedeutender. Dies betrifft Biomoleküle wie therapeutische Proteine, Impfstoffe, Enzyme und Hormone. Sie sind daher vor allem für medizinische, pharmazeutische sowie bio- und lebensmitteltechnologische Applikationen relevant (Aguilera und Karel, 1997; Conrad *et al.*, 2000). Dabei bestimmen sowohl Trocknungsmethode als auch Wirkstoffformulierung die Stabilität amorpher Pharmazeutika (Abdul-Fattah *et al.*, 2007). Viele Trocknungsmethoden sind für empfindliche Biomoleküle ungeeignet oder nicht ökonomisch, wie die zeitintensive Lufttrocknung (Julca *et al.*, 2012). Innovative Techniken, wie die schonende Vakuum-Schaum-Trocknung, sind daher z. B. in der Pharmazie vorteilhafter (Hajare *et al.*, 2009).

2.3 Konservierung prokaryotischer Zellen

Die effektive Konservierung von Prokaryoten beinhaltet den Erhalt der Vitalität und der genetischen Stabilität (Julca *et al.*, 2012). Sie werden vor allem als Referenzstämme für Qualitätskontrollen in Pharmazie und Lebensmittelindustrie genutzt sowie für die Instandhaltung von Stammsammlungen (Morgan *et al.*, 2006). Meist werden sie durch periodische Subkultivierung oder Kryotechnik gelagert. Dies impliziert erhöhten arbeitstechnischen und finanziellen Aufwand. Daher gewinnt die Trocknung von Bakterien stetig an Relevanz. Neben Lyophilisationstechniken (Gefriertrocknung) werden vor allem Sprüh- und Wirbelschichttrocknung zur Konservierung von Prokaryoten genutzt. In Tab. 1 ist dargestellt wie breit das Anwendungsspektrum dieser Trocknungsmethoden bereits in den Bereichen Medizin, Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie ist (García, 2011).

Tab. 1: Anwendungen von trockenstabilisierten Bakterien in diversen Arbeitsfeldern und die zur Trocknung genutzten Methoden (García, 2011).

Trocknungs- methode	Applikationsfeld		
	Medizin	Landwirtschaft	Lebensmittelindustrie
Sprühtrocknung	probiotische Kulturen	biologische Schädlingsbekämpfung von Insekten und Nematoden	Polysaccharidproduktion
	therapeutischer Nutzen		probiotische Lebensmittel
Gefriertrocknung (Lyophilisation)	Behandlung von Darmkrankheiten	Biodüngung durch N ₂ -Fixierung	Starterkulturen für die Lebensmittelproduktion
	Impfstoffherstellung	Verkapselung von Bakterien zur Förderung des Pflanzenwachstums	
Wirbelschicht- trocknung	Verkapselung probiotischer Bakterien	Biopestizide	Optimierung der Konservierung von Milchsäurebakterien

Die Gefriertrocknung ist eine der bevorzugten Techniken zur Konservierung von Mikroorganismen (Morgan *et al.*, 2006). Gravierend ist jedoch die Kombination von niedrigen Temperaturen und Wasserentzug. Daraus resultierender Stress (Eiskristallbildung, stark pH-Wertschwankungen, Phasentrennungen) führt schnell zur irreversiblen Inaktivierung des biologischen Materials (Lerbret *et al.*, 2012). Daher eignet sie sich nur für ausreichend stabile Organismen. Die Trockentoleranz sensitiver Mikroorganismen kann jedoch durch geeignete Methoden gesteigert werden. Dies beinhaltet die genetische Selektion (Training durch die mehrfache Einwirkung eines Stressfaktors), die Akkumulation intrazellulärer Protektiva (durch natürliche Aufnahme bzw. *de-novo*-Synthese), die Verwendung extrazellulärer Protektiva (als Additive bzw. durch Sekretion) oder die Manipulation des Zellmetabolismus (vor dem Trockenstress) (Potts, 2005).

2.4 Konservierung eukaryotischer Systeme (Zellen, Gewebe, Organe)

Ein einfaches und gleichzeitig ökonomisch relevantes Beispiel trockenstabilisierter Eukaryoten sind Zellen getrockneter Backhefe, wie man sie alltäglich kommerziell erwerben kann. Jedoch ist die Konservierung eukaryotischer Systeme ebenso für die Human- und Veterinärmedizin interessant. Denn die technischen Fortschritte in der medizinischen Zellbiologie, Gentechnik sowie der Gewebs- und Organtransplantation begünstigen die Entwicklung von zeit- und kosteneffizienten Methoden zur Langzeitkonservierung (Julca *et al.*, 2012). Auf diesem Gebiet wird die Kryotechnik noch bevorzugt angewendet (Scott *et al.*, 2005). Diese umfasst kontrolliertes Gefrieren und die kaltebedingte Vitrifikation für die eiskristallfreie Kryokonservierung (Fahy *et al.*, 2004).

Diese Methoden werden bisher nur für Blut- und Keimzellen routiniert eingesetzt. Nachteile sind das hohe Energiekosten, kälteinduzierte Zellschäden sowie die Toxizität vieler Kälteschutzstoffe. Daher befindet sich die Kryokonservierung komplexer Zellsysteme nach wie vor in der Entwicklung.

Dennoch existieren bereits erste Forschungsansätze eukaryotische Zellsysteme trocken zu konservieren. Denn vorteilhaft sind die Möglichkeiten raumtemperierter Lagerung, geringere Energiekosten, die flexiblere Handhabung und eher ungiftige Schutzstoffe. Ansätze befassen sich mit der Trockenstabilisierung von Blutzellen, Gewebematrizes und zellbasierter Biosensoren (Bloom *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2005; Arav und Natan, 2012). Von Forschungserfolgen würde hier besonders die regenerative Medizin profitieren. Das notwendige Wissen zunächst durch die Analyse natürlicher Prinzipien zu gewinnen und für technisch anzuwenden, ist die Aufgabe der Bionik. Daher folgen in den nächsten Kapiteln eine detaillierte Betrachtung der natürlichen Trockenstabilisierung und die Vorstellung eines bionischen Ansatzes zur Biostabilisierung und der Applikation eines nur wenig erforschten Vitrifikationssystem in einem Biosensor.

3 Dehydrierungsbedingte Zellschäden und Trockentoleranzmechanismen

Kryo- und anhydrobiotischen sowie halophilen Organismen ist gemeinsam, dass ihre Lebensweise eine präventive Adaptation an starke Dehydrierung und deren Folgeeffekten erfordert. Folgen können bspw. das Auskristallisieren gelöster Stoffe, Änderungen des intrazellulären pH-Wertes und der Ionenstärke sowie dadurch bedingte Proteinpräzipitation sein (Sun und Leopold, 1997). Starke Dehydrierung kann zu gravierenden Zellschäden an den wichtigsten Makromolekülen (Proteine, Nukleinsäuren) und der Biomembran führen. Vor allem die Diversität solch schädlicher Effekte, denen biologischer Systeme aufgrund ihrer Komplexität viele Angriffsmöglichkeiten bieten, führt zu enormen Zellstress, den nur wenige Organismen tolerieren können. Solche Stressfaktoren umfassen vor allem oxidativen Stress, unkontrollierte Bräunungsreaktionen sowie Schäden an Membran, Proteinen und Nukleinsäuren. Folgend werden diese primären, molekularen Stressfaktoren beschrieben. Im Anschluss werden Trockentoleranzmechanismen spezieller Organismen betrachtet.

3.1 Dehydrierungsbedingte Zellschäden

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) sind Auslöser von oxidativem Stress. Ihre Präsenz wird durch intrazellulären Wassermangel begünstigt und stellt eine wesentliche Gefahr für die Zelle dar. Radikale wie O_2^- , H_2O_2 und OH^\bullet entstehen im Zellmetabolismus (Zellatmung, Photosynthese) oder werden durch UV-nahe Strahlung generiert. Infolge starker Dehydrierung wird die Aktivität ROS-neutralisierender Enzyme (Katalase, Superoxid-Dismutase) reduziert, so dass sich ROS anreichern und verschiedene Biomoleküle schädigen können (Cabiscol *et al.*, 2000; França *et al.*, 2007; García, 2011).

Die Maillard-Reaktion ist eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion mit komplexen Reaktionsmechanismen (Hodge, 1953; Nursten, 1981). Initiiert wird sie durch die Kondensationsreaktion zwischen freien Carbonylgruppen reduzierender Zucker und primären Aminogruppen von Nukleinsäuren oder Proteinen (Garcia, 2011; Julca *et al.*, 2012). Neben erhöhten pH- und Temperaturwerten, fördert vor allem fehlendes Wasser diese Reaktion. Die daraus resultierenden Modifikationen implizieren oft einen erheblichen Funktionsverlust der betroffenen Biomoleküle. Durch die Beeinträchtigung des gesamten Metabolismus gehören Bräunungsreaktionen zu den Hauptrisiken in dehydrierten Zellen (Crowe *et al.*, 2001, 2005).

In der Biomembran führt geminderte Hydrierung zur erhöhten Packungsdichte der polaren Membranlipidköpfe (Potts, 1994). Infolge verstärken sich die van-der-Waals-Interaktionen zwischen den aliphatischen Lipidseitenketten und die Phasenübergangstemperatur der Membran steigt signifikant (Crowe *et al.*, 1992). Dies induziert den Transfer in die Gel-Phase, was bei Rehydrierung einen Phasenübergang der Membran impliziert (Potts, 1994). Diverse Membranschäden (Membranfusion, Zerreißen integraler Membranproteine, Ausfluss gelöster Stoffe) können aus solchen Schwankungen der Membranfluidität resultieren und den Organismus zusätzlich belasten (Cabiscol *et al.*, 2000).

Die Lipide der Biomembran sind zudem hochempfindlich gegenüber ROS. Deren gehäufte Präsenz führt zur Lipidperoxidation und –deesterifikation (Crowe *et al.*, 1989; Senaratna *et al.*, 1987; Hansen *et al.*, 2006). Die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren begünstigt weiterhin die Entstehung von Malondialdehyd, wodurch sekundär andere Biomoleküle wie Proteine geschädigt werden (Esterbauer *et al.*, 1991; Humphries und Szweda, 1998).

Der Verlust der stabilisierenden Hydrathülle führt bei den meisten Proteinen zu erheblichen Konformationsänderungen und stark reduzierter Aktivität (Prestrelski *et al.*, 1993). Beispielsweise bilden sich irreversibel intramolekulare Disulfide (Levitt, 1980; Kranner und Grill, 1997). Auch oxidativer Stress führt zur Proteindenaturierung (Hansen *et al.* 2006). Neben Struktur- und Funktionsverlust bewirkt die Proteinoxidation eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Proteolyse (Potts, 1994; França *et al.*, 2007). Oxidative Schäden an Proteinen zählen daher zu den gravierendsten Folgen der Austrocknung (Frederickson *et al.*, 2008).

Eine ausreichende Hydrierung ist für die chemische Stabilität von Nukleinsäuren essentiell (García, 2011). Ihre Dehydrierung interferiert daher mit biochemischen Prozessen wie der Replikation, Transkription sowie der Proteinbiosynthese. Weiterhin erhöht die ROS-bedingte Pyrimidinoxidation DNA-Mutationsraten (Kranner und Birtic, 2005; Hansen *et al.*, 2006; Dadheech, 2010). Generell folgen aus diesen Beeinträchtigungen metabolische Ungleichgewichte und eine starke Belastung der ganzen Zelle (Potts, 1999, 2001).

3.2 Anpassungsmechanismen zur Kompensation der Dehydrierung

Um dem Zellschaden bei extremer Dehydrierung vorzubeugen, sind spezielle Adaptationsmechanismen erforderlich. Häufig sind sie artübergreifend sehr ähnlich (Julca *et al.*, 2012). Wahrscheinlich aufgrund der großen Ähnlichkeit in Aufbau und Funktion artverschiedener Zellen (Clegg *et al.*, 1982; Crowe *et al.*, 1992). Bei extremem Wasserentzug findet in anhydrobiotischen Lebewesen sowohl eine physiologische als auch biochemische Anpassung statt (Potts, 1994). In einigen Prokaryoten (bspw. *Deinococcus radiodurans*) existieren effektive DNA-Reparatur-Systeme oder mehrfache Genom-Kopien (Zahradka *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2007; Slade *et al.*, 2009). Häufig sind zudem diverse Antioxidationsmechanismen, die Akkumulation kompatibler Solute und die Synthese spezieller Proteine (Bailly, 2004; Crowe *et al.*, 2005; Illing *et al.* 2005; Julca *et al.* 2012). Die beiden Letzteren gehören zu den biologisch bedeutsamsten unter den folgend betrachteten Anpassungsmechanismen.

3.2.1 Synthese kompatibler Solute

Eine scheinbar simple Adaptation ist die Akkumulation großer Mengen kompatibler Solute, die teils die Funktion fehlenden Wassers ersetzen (Clegg, 2001). Sie sind oft niedermolekulare, biologisch inerte und gut wasserlösliche Verbindungen. Sie interferieren selbst molar konzentriert nicht mit dem Zellmetabolismus (Galinski, 1995). Ihre Aufnahme aus der Umgebung bzw. *de-novo* Synthese wird speziesabhängig bei extremen Salz-, Trocknungs-, Kälte oder Hitzestress ausgelöst (Brown, 1976; da Costa *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2002; Roberts, 2005). Umweltbedingt sind sie daher in extremophilen Organismen häufig und auch als „Extremolyte“ bekannt (Lentzen und Schwarz, 2006). Trockenstabilisierende Extremolyte werden als Xeroprotektiva (analog zu Kryoprotektiva für Kälteschutzstoffe) bezeichnet (Narvaez-Reinaldo, 2010; Julca *et al.*, 2012). Sie sind ubiquitär in diversen taxonomischen Gruppen nachweisbar. Je nach chemischem Charakter werden kompatible Solute verschieden kategorisiert (Kempf und Bremer, 1998; Roberts, 2005; Yancey, 2005; Empadinhas und da Costa, 2008; Santos *et al.*, 2011). Eine detaillierte Auflistung findet sich in Tab. 5 (Kapitel XII). Vor allem Kohlenhydrate und der Aminosäuren bzw. Aminosäurederivate sind als Xeroprotektiva relevant. Dazu zählen die Zucker Trehalose und Saccharose sowie die zyklischen Aminosäurederivate Ectoin und Hydroxyectoin. Ihre Strukturformeln sind in Abb. 3 dargestellt.

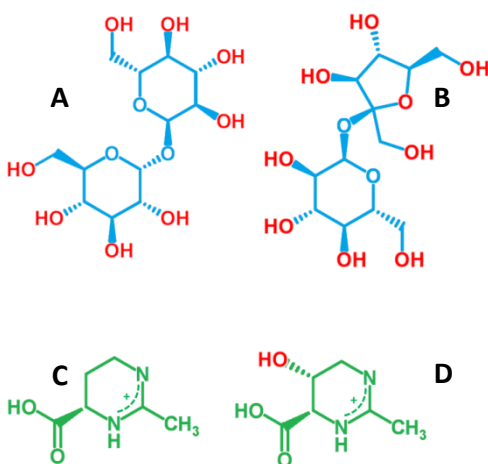


Abb. 3: Strukturformeln wichtiger kompatibler Solute.

In blau sind die beiden nicht-reduzierenden Zucker Trehalose (A) und Saccharose (B) dargestellt, welche sehr häufig in anhydrobiotischen Organismen nachgewiesen werden. In grün sind die beiden Aminosäurederivate Ectoin (C) und Hydroxyectoin (D) dargestellt. Insbesondere Hydroxyectoin schützt halophile Bakterien vor Hitze und vor starkem Wasserentzug bei hohen Salzkonzentrationen der Umgebung. Die Hydroxylierungen der Verbindungen sind rot gekennzeichnet. Sie sind typisch für Substanzen die glasbildende Eigenschaften besitzen.

3.2.1.1 Kohlenhydrate

Diese Kategorie beinhaltet die Gruppen Oligosaccharide, Zuckerderivate, Polyole und Phosphodiester. Vor allen die Oligosaccharide Saccharose und Trehalose sind für die Glasbildung relevant und werden daher häufig in anhydrobiotischen Organismen synthetisiert. Als nicht-reduzierende Zucker neigen sie während der Trocknung nicht zur oben beschriebenen Maillard-Reaktion. Solche unkontrollierten Biomolekülmodifikationen würden sonst im rehydrierten Organismus zu diversen, metabolischen Schäden führen (Crowe *et al.*, 2001, 2005; Potts, 2001, 2005). In dieser Eigenschaft vermutet man den Hauptgrund für die Häufigkeit von Trehalose und Saccharose (Crowe *et al.*, 2001, 2005). Oft werden eine oder beide Verbindungen hochkonzentriert in anhydrobiotischen Organismen detektiert (Crowe *et al.*, 1992; Clegg, 2001). Taxonomisch dokumentiert ist Trehalose für verschiedenen Bakterien (Cyanobakterien, *E. coli*) (Hershkovitz *et al.*, 1991; Potts, 1994; Dadhech, 2010), Hefen und anderen Pilzen (Wiemken, 1990; Elbein *et al.*, 2003), Nematoden (Erkut *et al.*, 2011), Rädertierchen (Caprioli *et al.*, 2004), Bärtierchen (Hengherr *et al.*, 2008), Eikapseln einige Kiemenfußkrebse (*Artemia*, *Triops*, *Daphnia*) (Clegg, 1965; Hengherr *et al.*, 2011), einer afrikanischen Zuckmückenlarve (*Polypedilum vanderplanki*) (Watanabe, 2003) sowie für niederen Pflanzen (bspw. *Selaginella lepidophylla*) (Adams *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1995).

Im Zusammenhang mit der Anhydrobiose findet man Saccharose in phototrophen Bakterien (Cyanobakterien, Schwefelpurpurbakterien) (Severin *et al.*, 1992; Welsh und Herbert, 1993), Mikroalgen (Greenway und Setter, 1979) sowie einigen Wiederauferstehungspflanzen (z. B. *Craterostigma plantagineum*) (Bianchi *et al.*, 1991; Müller *et al.*, 1997). Saccharose ist zudem wichtig für die Trockenstabilisierung von Pflanzensamen und -pollen (Koster und Leopold, 1988; Hoekstra *et al.*, 1992; Crowe, 2002). In einigen Pflanzensamen tragen Zucker der Raffinose-Familie zur Trockenschutz bei (Hincha *et al.*, 2003; Julca *et al.*, 2012). Bestimmte Zuckerderivate und Phosphodiester werden primär in thermophilen und hyperthermophilen Mikroorganismen nachgewiesen (Empadinhas und da Costa, 2008; Santos *et al.*, 2011). Polyole lassen sich eher in xerotoleranten bis xerophilen Pflanzen sowie einigen halotoleranten, eukaryotischen Mikroorganismen finden (Grant, 2004). Extrazelluläre Polysaccharide (EPS) sind Zuckerstrukturen (jedoch keine kompatiblen Solute), die die Biofilmbildung fördern und bei Trockenheit vor Membranschäden schützen (Potts, 2001). Einige Organismen kombinieren sie mit kompatiblen Soluten wie Trehalose (Hill *et al.*, 1997).

3.2.1.2 Aminosäuren und Aminosäurederivate

Diese Kategorie wird in die vier Gruppen freie Aminosäuren und zyklische, Schwefelhaltige sowie N-Acetylierte Aminosäurederivate eingeteilt. Insbesondere in Prokaryoten fungieren Aminosäuren (AS) bzw. Aminosäurederivate als kompatible Solute. Meist dienen sie als Osmolyte zur Anpassung an die erhöhte Salinität der Umgebung. In einigen Prokaryoten ist die intrazelluläre K⁺-Akkumulation die primäre Stressantwort, welche dann durch Glutamat als Gegenion kompensiert wird (Kempf und Bremer, 1998; Empadinhas und da Costa, 2008). In aerob chemoheterotrophen Prokaryoten sind oft die zyklischen Aminosäurederivate Ectoin oder Hydroxyectoin nachweisbar (Galinski *et al.*, 1985; Severin *et al.*, 1992). Sie sind typisch für halotolerante bis halophilen Bakterien. Diese überleben daher trotz starken Zellwasserentzugs in hypersaliner Umgebung. Insbesondere Hydroxyectoin eignet sich aufgrund seiner Hydroxylierung und der damit verbundenen Tendenz zur Glasbildung zudem als Xeroprotektivum.

3.2.1.3 Quartäre Amine

Zu dieser Kategorie gehört das häufige, kompatible Solute Glycinbetain, welches gelegentlich zu den AS-Derivate gezählt wird (Empadinhas und da Costa, 2008). Es ist taxonomisch sehr weit verbreitet. Vor allem Prokaryoten akkumulieren es bei osmotischer Belastung (Kempf und Bremer, 1998). Häufig sind in der Natur zudem quaternäre Amine wie Trimethylaminoxid aufzufinden. Dieses werden in Knorpelfischen (wie Haien und Rochen) als Gegenion genutzt, um hohen, intrazellulären Harnstoffkonzentrationen zu entgegen zu wirken (Yancey, 2005).

3.2.1.4 Polyhydroxyalkanoate

Polyhydroxyalkanoate (PHA) gehören zu den bioplastischen Polymeren. Sie werden in Mikroorganismen häufig als Reservestoffe akkumuliert. Von Spezies der Gattung *Halomonas* und einigen anderen Prokaryoten der Tiefsee, weiß man, dass sie PHAs gehäuft synthetisieren (Roberts, 2005; Simon-Colin *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 2009; Quillaguamán *et al.*, 2010). Dazu zählt unter anderem Poly-β-Hydroxybutyrat (Monomer: 3-Hydroxybuttersäure). Da die Akkumulation von PHAs sowohl bei osmotischem als auch bei hydrostatischem Druck initiiert wird, werden sie vereinzelt als „Piezolyte“ bezeichnet (Roberts, 2005).

3.2.2 Expression spezieller Proteine

Die Akkumulation kompatibler Solute ist für die Anhydrobiose zwar oft notwendig, jedoch meist nicht ausreichend (Julca *et al.*, 2012). In der verstärkten Expression spezieller Stressproteine vermutet man einen weiteren anhydrobiotischen Anpassungsmechanismus (Potts *et al.* 2005; Rebecchi *et al.*, 2007). Beispielsweise sind antioxidative Enzyme für das anhydrobiotische Überleben vorteilhaft, da die Kompensation von oxidativem Stress dabei eine wesentliche Herausforderung darstellt. Deswegen wird vermutet, dass Enzyme wie Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase zum Überleben der Trockenstarre essentiell sind (García, 2011; Julca *et al.*, 2012). Doch stehen im Kontext der Anhydrobiose seltener Enzyme und häufiger spezielle Protein mit stabilisierenden Charakter im Fokus. Man geht davon aus, dass vor allem die Kombination kompatibler Solute und solcher Proteine in der Bildung eines effektiv schützenden Glases resultiert (Wolkers *et al.*, 2002; Crowe *et al.* 2005; Shih *et al.*, 2008). Folgend werden Gruppen spezieller Proteine beschrieben, welche im Zusammenhang mit der natürlichen Trockentoleranz stehen.

3.2.2.1 Intrinsisch ungeordnete Proteine

Intrinsisch ungeordnete Proteine (IDP, engl. *intrinsically disordered proteins*) haben in wässriger Lösung keine Sekundärstruktur und liegen als Zufallsknäuel vor. In viele Organismen übernehmen sie wichtige Funktionen, wie der als Proteinfaltungshelfer (Tompa und Kovacs, 2010). Im Kontext der Anhydrobiose sind zwei Klassen der IDPs besonders interessant. Dies sind Anhydrine und die zu den Hydrophilinen zählenden LEA-Proteine (Chakrabortee *et al.*, 2012).

3.2.2.1.1 Hydrophiline und LEA-Proteine

Hydrophiline sind sehr hydrophil und werden oft für als anhydrobiotische Adaptation bei extremem Wasserverlust intrazellulär expremiert. Sie sind offenbar essentiell, um die De- und Rehydrierung möglichst schadfrei zu überleben (Julca *et al.*, 2012). Allen Hydrophilinen gemeinsam ist ihre niedrige Molmasse (meist < 40 kDa), der erhöhte Gehalt an Glycin (>6 mol%) und anderer kleiner Aminosäuren (Ala, Ser) sowie ein hoher Hydrophilindex (> 1) (Baker *et al.*, 1988; Battaglia *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Der hohe Anteil kleiner Aminosäuren bedingt die fehlende Sekundärstruktur und die gesteigerter Flexibilität im nativen und wassergelösten Zustand.

LEA-Proteine (engl. *late embryogenesis abundant proteins*) sind klassische Hydrophiline, die für die Umsetzung der Anhydrobiose zu den wichtigsten Proteinen zählen. Aufgrund ihrer regelmäßigen Dokumentation im Zusammenhang mit anhydrobiotischen Zellen, werde sie ebenfalls als Xeroprotektiva klassifiziert (Goyal *et al.*, 2005b; Hoekstra *et al.*, 2001). Sie übernehmen die Funktion von molekularen Chaperonen (Proteinfaltungshelfer), Hydratationspuffern, Membranstabilisatoren, Ionenbindern (durch polyanionische bzw. polykationische Bereiche) oder Antioxidantien (França *et al.*, 2007; Julca *et al.*, 2012). Meist findet man LEA-Proteine in Pflanzensamen und Wiederauferstehungspflanzen während der Trockenstarre (Ramanjulu und Bartels, 2002; Boudet *et al.*, 2006). Inzwischen wurden sie ebenso in nicht-pflanzlichen Organismen entdeckt. Hierzu gehören Nematoden (Browne *et al.*, 2002, 2004; Gal *et al.*, 2004), Rädertierchen (Denekamp *et al.*, 2009, 2010), Eikapseln von Salzkrebsen (Hand *et al.*, 2007; Sharon *et al.*, 2009) und der afrikanischen Zuckmückenlarve *Polypedilum vanderplanki* (Kikawada *et al.*, 2006). Zudem kann man sie in verschiedenen Bakterien (Stacy und Aalen, 1998; Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Battista *et al.*, 2001) wie Cyanobakterien (Close und Lammers, 1993), Schleimpilzen (Eichinger *et al.*, 2005) sowie in Hefen und anderen Pilzen (Sales *et al.*, 2000; Katinka *et al.*, 2001; Abba *et al.*, 2006) nachweisen.

Kombiniert mit Zuckern wie Saccharose oder Raffinose bilden LEA-Proteine besonders stabile Gläser (Battaglia *et al.*, 2008). Durch Sequenzähnlichkeiten bedingt, teilt man LEA-Proteine bisher in sieben Gruppen. Als Xeroprotektiva sind die Gruppen 2 und 3 besonders interessant. Alle weiteren Gruppen sind detailliert in einschlägiger Literatur beschrieben (Wise und Tunnacliffe, 2004; Battaglia *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008; Hand *et al.*, 2011).

LEA-Proteine der Gruppe 2 (Dehydrine) existieren ausschließlich in Pflanzen (Battaglia *et al.*, 2008). Ihr stark hydrophiler Charakter resultiert aus dem hohen Anteil geladener Aminosäuren sowie dem deutlich niedrigem Gehalt hydrophober Aminosäuren. Typisch ist zudem der Mangel an Tryptophan und Cystein (Julca *et al.*, 2012). Auffallend sind die sogenannten K- und Y-Segmente. Das K-Segment ist ein Lysin-reiches Sequenzmotif aus 15 Aminosäuren (Konsensussequenz: EKKGIMDKIKEKLP), das pro Protein bis zu 11-fach wiederholt wird. Das Y-Segment ist ein Sequenzmotif (Konsensussequenz: [V/T]D[E/Q]YGNP), das in bis zu 35 Repetitionen am N-Terminus zu finden ist.

LEA-Proteine der Gruppe 3 werden häufig dokumentiert. Ihre Primärstruktur wird durch repetitive Sequenzmotive aus 11 Aminosäuren charakterisiert (Dure, 1993). Dieses Sequenzmotif zeigt eine gewisse Variabilität, weshalb diese Proteingruppe subkategorisiert wird. Die wichtigsten Untergruppen sind D-7 (TAGAAKEKAXE) und D-29 ($\phi\phi$ [E/Q] $\chi\phi$ K[E/Q]K ϕ χ [E/D/Q]; ϕ charakterisiert eine hydrophobe Aminosäure), die sich durch ihre Konsensussequenz unterscheiden (Battaglia *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Den Grund für diese Diversität sieht man in der Vielfalt zu schützender Biomoleküle. Besonders für die Gruppe 3 ist die Eigenschaft charakteristisch, bei Dehydrierung reversibel vom hydrierten Zufallsknäuel in eine α -helikale Doppelwendel-Struktur zu transformieren (Battaglia *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2010). Dies ist in Abb. 4 schematisch dargestellt. LEA-Proteine der Gruppe 3 findet man nicht nur in Pflanzen, sondern auch in verschiedenen Bakterien sowie anhydrobiotischen Invertebraten (Battaglia *et al.*, 2008).

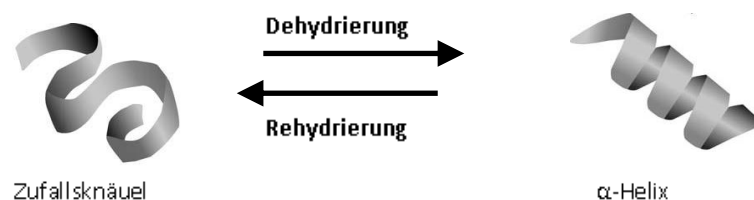


Abb. 4: Hypothetische Sekundärstruktur der LEA-Protein-Gruppe 3 im hydrierten und dehydrierten Zustand.

Die native Form der LEA-Proteine in wässriger Lösung ist aufgrund ihrer hohen Flexibilität ein Zufallsknäuel. Im dehydrierten Zustand bilden sie reversibel α -Helix- bis Doppelwendel-Strukturen aus (bezogen und modifiziert aus Cornette und Kikawada, 2011)

3.2.2.1.2 Anhydrine

Wie die LEA-Proteine gehören Anhydrine zu den IDPs. Auch Anhydrine haben einen hydrophilen Charakter, eine fehlende Sekundärstruktur in wässriger Lösung und werden mit Trockenstress assoziiert (Hand *et al.*, 2011). Generell sind sie demnach LEA-Proteinen sehr ähnlich, doch kann man sie diesen bioinformatisch nicht zuordnen. Anhydrine hat man beispielsweise in Nematoden entdeckt (Browne *et al.*, 2004; Goyal *et al.*, 2005b). Ein Trockenstress-induzierbares Anhydrin der Nematode *Aphelenchus avenae* kann sowohl Proteinaggregation verhindern als auch katalytisch aktiv sein (Endonuclease-Funktion) (Chakrabortee *et al.*, 2010).

3.2.2.2 Hydrophile LC-Bereiche (engl. *hydrophilic low complexity regions*)

Hydrophile LC-Bereiche sind lange, hydrophile Abschnitte in Proteinen mit wenig komplexer Primärstruktur (repetitive Sequenzmuster, geringe Aminosäurevielfalt). Solche Bereiche fand man häufig in Proteomen trockentoleranter, sporenbildender und halophiler Mikroorganismen (Krišco *et al.*, 2010). Für einige Organismen sind sie potentiell zum Überleben starker Dehydrierung bedeutend, da sie der Proteinaggregation bei Wassermangel konteragieren (García, 2011). Ursprünglich postulierte man, dass die Häufigkeit von hydrophilen LC-Bereichen mit dem Auftreten von IDPs korreliert. Aktuelle Studien widerlegen dieses Postulat (Chakrabortee *et al.*, 2012).

3.2.2.3 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (HSP) schützen primär anderer Proteine vor hitzeinduzierter Denaturierung und Aggregation (Goyal *et al.*, 2005a). So wird ihre Schutzfunktion eher mit Thermotoleranz assoziiert (Lindquist und Craig, 1988). Ebenso sie agieren als Chaperone (Proteinfaltungshelfer) in ungestressten Zellen (Ellis und Hartl, 2003). Zudem wurde für sei eine antioxidative Wirkung dokumentiert (França *et al.*, 2008). In vielen Spezies sind HSP-codierenden Gene hochkonserviert (Feder und Hoffmann, 1999). Die trockenstressbedingte Regulierung dieser Gene hat man in Cyanobakterien und *D. radiodurans* beobachtet (García, 2011). Daher vermutet man vermutet, dass HSPs während der Anhydrobiose und nach der Rehydrierung ebenfalls als Chaperone wirken.

3.2.3 Modifizierung der Biomembran

Die Lipide der Biomembran sind hochempfindlich hinsichtlich Austrocknungserscheinungen. Dehydrierungsbedingte Membranmodifikationen zur Steigerung der Trockentoleranz sind nur wenig erforscht (Potts, 1994; Clegg, 2001). Eine mögliche Membranmodifizierung (bspw. in Pflanzenpollen) ist ein höherer Grad ungesättigter Fettsäuren in der Biomembran (Crowe *et al.*, 1992; Hoekstra *et al.*, 2001). Dadurch sinkt deren Phasenübergangstemperatur signifikant und ein Phasenübergang wird unwahrscheinlicher (Potts, 1994). Doch sind ungesättigte Fettsäuren noch anfälliger für Lipidperoxidation und haben daher nur eine geringe Halbwertszeit (Hoekstra, 2005). In Cyanobakterien tragen die ungesättigten Fettsäuren von Membranlipiden zwar zur Osmo- und Thermotoleranz sowie zur Toleranz erhöhter Lichtlevel bei, allerdings wird die verbesserte Trockentoleranz nur vermutet (Singh *et al.*, 2002).

3.2.4 Akkumulation anorganischer Komponenten

Vor allem in gram-positiven Bakterien, die unter Bakterien die höchste Trockentoleranz aufweisen, kann die gesteigerte Akkumulation von Mn^{2+} -Ionen und ein erhöhtes Mn^{2+}/Fe^{2+} -Verhältnis beobachtet werden (Daly *et al.*, 2004; García, 2011). Mangan findet sich in allen Lebensräumen und ist wichtig für die Beseitigung von ROS (Horsburgh *et al.*, 2002). Trotzdem es für die Umsetzung der Anhydrobiose wichtig sein könnte, ist es in diesem Kontext nur wenig erforscht.

Polyphosphate, die bereits durch die unbelebte Natur generiert werden können, haben für Pro- und Eukaroyten essentielle Funktionen. Unter anderem sind sie als Energie- und Phosphatquelle sowie als Kationenbinder von Bedeutung. In einigen Prokaryoten werden Polyphosphate je nach Verfügbarkeit in großen Mengen akkumuliert und können bis zu 30 % der Biomasse stellen (Deinema *et al.*, 1985). Für viele extremophile Mikroorganismen sind sie überlebensnotwendig (Seufferheld *et al.*, 2008). Im Kontext der biologischen Glasbildung sind sie kaum erforscht, obgleich Phosphate bei Trocknung auf natürliche Weise amorph erstarren.

4 Hypothesen zum Prinzip der natürlichen Trockenstabilisierung

Nachdem man erkannt hatte, dass die Anhydrobiose primär durch die Akkumulation spezieller Xeroprotektiva realisiert wird, sind Ansätze zur Wirkungsweise dieser Xeroprotektiva postuliert worden. Zur Erklärung grundlegender Mechanismen der Anhydrobiose wurden bisher drei wesentliche Postulate aufgestellt. Dabei handelt es sich um die Wasserersatz-, die Vitrifikations- und die Wassereinschlusshypothese. Viele Erklärungsansätze dieser drei Hypothesen werden in einer vierten, jüngeren Hypothese, der Verankerungshypothese, als Verallgemeinerung zusammengefasst. Weiterhin existieren die Polymorphismus-Hypothese, die ein Spezialfall der Vitrifikationshypothese ist, und die bisher nur in Ansätzen formulierte NADES-Hypothese. Diese sechs Hypothesen beschreiben, wie die Stabilisierung trockensensitiver Biomaterialien im intrazellulären Milieu realisiert werden kann. Die genannten Postulate resultieren zum Großteil aus theoretischen und experimentellen Studien, welche sich auf polyhydroxylierte Verbindungen wie nicht-reduzierende Disaccharide fokussieren. Des Weiteren schränkt sich die Literatur bei diesen Erklärungen meist auf die Wechselwirkungen solcher Schutzstoffe mit den empfindlichsten, biomolekularen Strukturen im intrazellulären Raum ein. Dies sind die Biomembran und Proteine.

Bei der folgenden Beschreibung der Hypothesen wird die Bezeichnung „Biomolekül“ für trockensensitive Makromoleküle wie Proteine verwendet. Die von anhydrobiotischen Organismen synthetisierten Schutzstoffe, bei denen es sich per Definition ebenfalls um Biomoleküle handelt, werden weiterhin als (Xero)Protektiva oder Glasbildner bezeichnet. Diese Vorgehensweise der Bezeichnung ist übereinstimmend mit der angegebenen Literatur. Die englischsprachigen Namen der Hypothesen sind aufgrund ihrer üblichen Verwendung in Fachkreisen zusätzlich angegeben.

4.1 Wasserersatzhypothese („*water replacement hypothesis*“)

Die „*water replacement hypothesis*“ ist das am häufigsten genutzte Modell zur Erklärung der Anhydrobiose (Crowe *et al.*, 1997). Wie der Name vermuten lässt basiert diese Hypothese darauf, dass starker Wasserverlust durch die ausreichende Synthese eines passenden Protektivums kompensiert wird (Clegg *et al.*, 1982). Dieses Xeroprotektivum übernimmt folglich die strukturgebende Funktion des Wassers und sichert somit den Erhalt der biologischen Aktivität der Biomoleküle während der Trockenstarre (Clegg, 2001). Um als Analogon die stabilisierende Aufgabe des Wassers übernehmen zu können, muss das Protektivum dem Wasser zu einem gewissen Grad chemisch ähnlich sein. Schließlich ist insbesondere der hydrophobe Effekt für die strukturelle Integrität von Proteinen und Biomembranen elementar. Dieser resultiert aus dem polaren Charakter des Wassers. Daher geht die Wasserersatzhypothese davon aus, dass fehlendes Wasser durch polyhydroxylierter Verbindungen ersetzt wird. Diese gehören zu den kompatiblen Soluten (Yancey *et al.*, 1982; Somero und Yancey, 1997; Clegg, 2001). Ähnlich dem hydrophoben Effekt wechselwirken die polyhydroxylierten Verbindungen mit den polaren Gruppen von Makromolekülen wie Proteinen, so dass diese ihre natürliche Konformation beibehalten (Clegg *et al.*, 1982; Crowe *et al.*; 1998). Außerdem senkt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den polaren Köpfen von Phospholipiden die Phasenübergangstemperatur der Biomembran, wodurch diese flüssig-kristallin bleibt und Phasenübergänge sowie Membranfusionen verhindert werden (Crowe *et al.*, 1993, 1994). Daher wird diese Hypothese bevorzugt zur Erklärung der Biomembranstabilisierung während der Anhydrobiose verwendet (Francia *et al.*, 2008). Schematisch sind die postulierten Wechselwirkungen in Abb. 5 dargestellt.

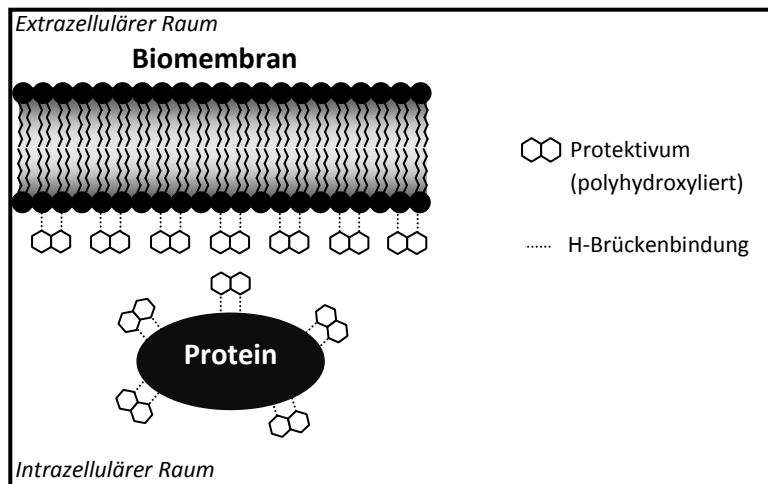


Abb. 5: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Wasserersatzhypothese.

Polyhydroxylierte Verbindungen wirken als Wasserersatz, indem sie über Hydroxylgruppen mit trocken-sensitiven Biomolekülen interagieren. Dies geschieht via Wasserstoffbrückenbindungen zu polaren Gruppen von Makromolekülen (wie Proteinen) oder den polaren Köpfen von Phospholipiden. Auf diese Weise wirken sie struktur- und funktionserhaltend. Die realen Größenverhältnisse der Komponenten sowie die Abstände zwischen den Phospholipidköpfen der Biomembran werden zugunsten der Anschaulichkeit nicht berücksichtigt.

Trehalose, Saccharose und Glycerol sind klassische Vertreter polyhydroxylierter Verbindungen. Um Makromoleküle und Membranen vor den schädlichen Folgen des Wasserentzugs zu schützen, ersetzen sie das primär hydrierende Wasser, so dass eine amorphe, zytoplasmatische Matrix gebildet wird (Sun und Leopold, 1997; Clegg, 2001). So wird die „*water replacement hypothesis*“ im Kontext der Anhydrobiose selten als alleiniges Modell verwendet. Meist wird sie im Zusammenhang mit dem zweiten wichtigen Postulat betrachtet – der „*vitrification hypothesis*.“

4.2 Vitrifikationshypothese („*vitrification hypothesis*“)

Sowohl für die Kryobiose als auch für die Anhydrobiose wird die Hypothese der biologischen Glasbildung zur Erklärung von Überdauerungsstadien angewendet. Denn der Glasbildungsprozess (Vitrifikation) wird durch die trocknungsinduzierte wie auch durch die kälteinduzierte Dehydrierung initiiert. Ein extremer Wasserverlust resultiert in der Verfestigung des verbleibenden Zellmaterials. Und extreme Kälte führt zum Erstarren des verbleibenden, intrazellulären Wassers. Gemäß der Vitrifikationshypothese findet diese Verfestigung kontrolliert unter Bildung einer amorphen, zytosolischen und bioprotektiven Glasmatrix statt (Sun und Leopold, 1997; Clegg, 2001; Crowe *et al.*, 1998, 2002; Julca *et al.*, 2012). Dazu werden bei Dehydrierung verstärkt vitrifizierende Xeroprotektiva (Vitrifikanten) akkumuliert. Solche Vitrifikanten sind kompatible Solute, wie nicht-reduzierende Disaccharide oder spezielle Proteine, die die Glasbildung fördern (Wolkers *et al.*, 1998; Shih *et al.*, 2008). Klassische Glasbildner sind daher Trehalose und Saccharose (Crowe *et al.*, 1998, 2002). Weiterhin vermutet man, dass von Bakterien synthetisierte extrazelluläre Polysaccharide in den amorphen Glaszustand übergehen können und so die Zellen extrazellulär stabilisieren (Potts, 1994; Crowe *et al.* 1998; Billi und Potts, 2002). Der Übergang in den Glaszustand findet durch das molare Aufkonzentrieren von Vitrifikanten unter extremer Viskositätssteigerung statt, so dass die Solidifikation des flüssigen Zellplasmas erreicht wird. Im hochviskosen Zustand wird die molekulare Dynamik aller Zellkomponenten stark eingeschränkt (Bellavia *et al.* 2011).

So wird die Diffusionsrate sämtlicher Biomoleküle zunehmend reduziert bis der gesamte Stoffwechsel zum Stillstand kommt (Potts, 1994, 1999). Unkontrollierte Reaktionen (u. a. Maillard-Reaktionen), die dem dehydrierten Organismus sonst schädigen würden, werden so unterdrückt, (Clegg, 2001).

Die „*vitrification hypothesis*“ ist auch als „*mechanical entrapment hypothesis*“ bekannt, da die metabolische Stasis durch die Verfestigung des Organismus ausgelöst wird (Federov *et al.*, 2010). Die mechanische Immobilisierung in einer Glasmatrix schützt die Makromoleküle vor Denaturierung, Koagulation sowie Desintegration (Green und Angell, 1989; Sakurai *et al.*, 2008). Zudem wird die innere Zufallsverteilung einer Flüssigkeit durch den amorphen Charakter des Glases beibehalten (Taylor *et al.*, 2004). Dies impliziert die Hemmung des Auskristallisierens intrazellulärer Bestandteile (bzw. die Eiskristallbildung) (Julca *et al.*, 2012). Membranen sowie Organellen werden so vor Schäden durch unkontrolliertes Kristallwachstum geschützt. Und Membranfusions- und Phasenübergangsprozesse werden unwahrscheinlicher (Sun und Leopold, 1996).

Insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Vitrifikanten, die daraus resultierende Viskositätssteigerung sowie die Höhe der Glasübergangstemperatur sind für die Effektivität der Biostabilisierung im glasartigen Zustand entscheidend. Schematisch ist die Bildung des zyttoplasmatischen Glases durch die amorph angeordneten Xeroprotektiva in Abb. 6 dargestellt.

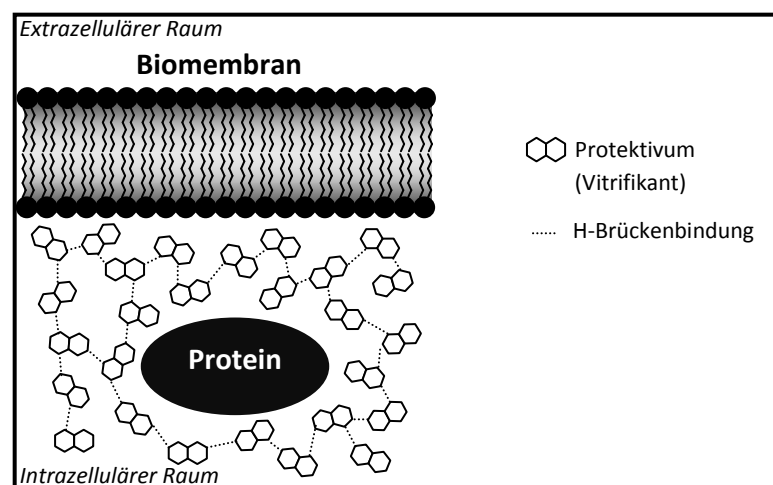


Abb. 6: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Vitrifikationshypothese.

Durch die kontrollierte Solidifikation geht das zunächst flüssige Zellinnere in eine hochviskose, amorphe Matrix über, die somit morphologisch als Glas klassifiziert wird. Diese Vitrifikation wird durch hohe Konzentrationen intrazellulärer Glasbildner gefördert. Die starken Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den vitrifizierenden Protektiva härten das Glas und verhindern Kristallisationseffekte. Resultat ist die mechanische Immobilisierung sämtlicher, intrazellulärer Biomoleküle, welche zu einer extremen Reduzierung der molekularen Beweglichkeit im Zellinneren führt. Die realen Größenverhältnisse der Komponenten sowie die Abstände zwischen den Phospholipidköpfen der Biomembran werden zugunsten der Anschaulichkeit nicht berücksichtigt.

Ein Spezialfall der Vitrifikationshypothese ist die Polymorphismus-Hypothese („*polymorphism hypothesis*“). Erstere wird hierbei als primär akzeptierte Hypothese zur Erklärung der natürlichen Trockenstabilisierung angenommen (Cesàro, 2006). Die Polymorphismus-Hypothese kann dazu als stützende Ergänzung angesehen werden (Willart *et al.*, 2002). Bereits die vorangegangenen Hypothesen basieren zum Großteil auf Studien zur Biostabilisierung durch Trehalose.

Das hier vorgestellte Gedankenmodell ist speziell für dieses Disaccharid ausgelegt, da dieses Protektivum sehr häufig ist und hochstabile Gläser bildet. Die Polymorphismus-Hypothese bezieht sich auf die Interaktionen von wenigen Wassermolekülen und Trehalose, wobei die Mobilität des Wassers und die strukturell unterschiedlichen Formen der Trehalose (Polymorphismus) betrachtet werden. Generell wirkt Wasser als Weichmacher auf Zuckergläser (Sussich *et al.*, 2010). Denn Wasser erhöht die Mobilität der Zuckermoleküle und senkt somit die Glasübergangstemperatur signifikant, wodurch Zuckergläser bereits bei geringeren Temperaturen in den flüssigen Zustand übergehen (Cesàro *et al.*, 2008). Gerade die stabilisierende Wirkung von Trehalose basiert allerdings auf seiner hohen Glasübergangstemperatur von etwa 120 °C (Lerbret *et al.*, 2005; Kilburn *et al.*, 2006; Cesàro *et al.*, 2008). Somit weist Trehalose die höchste Glasübergangstemperatur aller bekannten zuckerbasierten Protektiva auf, worauf seine bioprotektiven Eigenschaften zurückgeführt werden.

Trotz eines geringen Restwassergehalts bleibt die Glasübergangstemperatur von Trehalose hoch (Cesàro, 2006; Kilburn *et al.*, 2006). Diese Stabilität basiert auf der Eigenschaft des Zuckers den Wassergehalt zu kontrollieren, indem es die Wassermoleküle immobilisiert. Diese Eigenschaft wird durch die polymorphen Formen der Trehalose möglich. Die Polymorphismushypothese postuliert, dass dieser Zucker amorphe Matrices bildet und in diesen lokal kristalline Bereiche (Kristallite) ausbildet (Cesàro, 2006). Diese kristallinen Trehaloseformen erscheinen als hydrierte Form (Dihydrat) oder als wasserfreie (anhydrische) Form. Die einzelnen Formen sind reversibel in einander umwandelbar, wobei die Phasenübergänge abhängig von Temperatur und dem Wassergehalt sind (Sussich *et al.*, 1998, 2001; Willart *et al.*, 2002). Schematisch ist die Ausbildung der wasserspeichernden Trehalosekristallite innerhalb eines intrazellulären Trehaloseglases in Abb. 7 dargestellt.

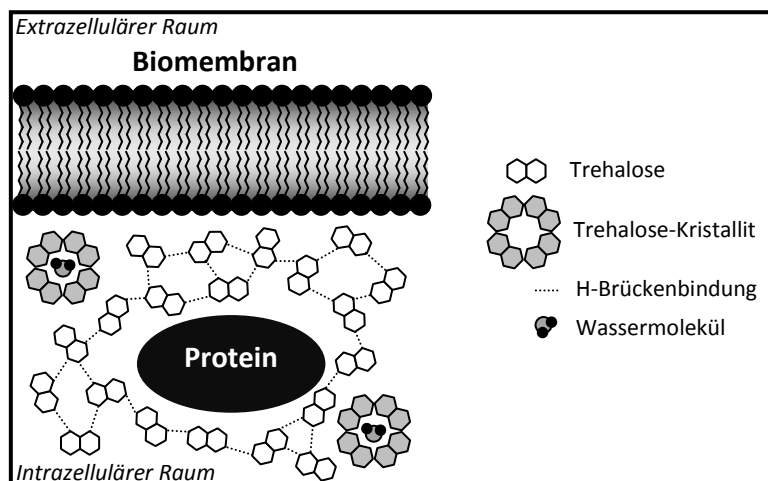


Abb. 7: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Polymorphismushypothese.

Als Spezialfall der Vitrifikationshypothese wird hier der Trehalosepolymorphismus betrachtet. Demnach wechselwirken Trehalosemoleküle spezifisch und strukturell mit Wassermolekülen durch die reversible Transformation in die polymorphen Formen. So sind Trehalosegläser eine Kombination aus einem bioprotektiven Glas und lokalen, kristallinen Bereichen. Diese Kristallite ermöglichen die Kontrolle des Restwassers und die schonende De- und Rehydrierung. Die realen Größenverhältnisse der Komponenten sowie die Abstände zwischen den Phospholipidköpfen der Biomembran werden zugunsten der Anschaulichkeit nicht berücksichtigt.

Bei der lokalen Ausbildung von Trehalose-Kristalliten in einer amorphen Trehalose-Matrix wechselt die anhydrische Form in das Dihydrat. Auf diese Weise „fangen“ die Kristallite verbleibendes Wasser aus der amorphen Phase, wodurch das Wasser nicht als Weichmacher agieren kann. Durch die Immobilisierung der Wassermoleküle können so geringe Wassermengen aufgenommen werden, ohne die Glasübergangstemperatur zu senken. Dadurch bleibt die Stabilität des Glases erhalten. Durch die Fähigkeit zur reversiblen Transformation vom Dihydrat in die anhydrische Form können die Kristallite sowohl als Speicher wie auch als Quelle des verbleibenden Wasser dienen (Kilburn *et al.*, 2006). Das reversible Umschalten zwischen den strukturell ähnlichen Formen von hydrierter und nicht-hydrierter Trehalose ermöglicht so auch eine leichte Rehydrierung. Daraus resultiert ein schonender und reversibler Dehydrierungs-Rehydrierungs-Mechanismus (Bellavia *et al.*, 2011). Zusammengefasst wird hier davon ausgegangen, dass sich die bioprotektiven Eigenschaften von Trehalose aus der Kombination eines hochstabilen Glases und der spezifischen, strukturellen Wechselwirkung von Wasser in lokalen kristallinen Bereichen ergibt (Kilburn *et al.*, 2006).

Wasserersatz- und Vitrifikationshypothese sind die beiden wichtigsten Gedankengänge zur Realisierung der Trockenstabilisierung in anhydrobiotischen Lebewesen. Jedoch schließen sich diese beiden Ansätze nicht aus. Eher besteht die Notwendigkeit beide Gedankengänge kombiniert zur Erklärung der Anhydrobiose zu verwenden (Sun und Leopold, 1997; Crowe *et al.*, 1998). In der Literatur stellt sich jedoch öfters die Frage, ob die Anhydrobiose wirklich so einfach durch diese beiden Hypothesen beschrieben werden kann (Clegg, 2001). Daher existieren weitere Hypothesen zur Erklärung der natürlichen Trockenstabilisierung, die folgend betrachtet werden.

4.3 Wassereinschlusshypothese („*water entrapment hypothesis*“)

Vorige Hypothesen betrachteten Protektivum-Biomolekül-Interaktionen. Die Wassereinschlusshypothese geht hingegen auf Wechselwirkungen zwischen Protektivum, Biomolekülen und zusätzlich den wenigen verbleibenden Wassermolekülen ein (Bellavia *et al.*, 2011). Daher ist diese Hypothese auch als „*preferential hydration hypothesis*“ oder „*water-layer hypothesis*“ bekannt. Hierbei handelt es sich um eine Ableitung aus der „*preferential exclusion theory*,“ welche versucht die Protein stabilisierende Wirkung kompatibler Solute in wässriger Lösung zu erklären, indem kompatible Solute „bevorzugt“ von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden, so dass diese nur mit Wassermoleküle wechselwirken, welche für die stabilisierende Hydrathülle nötig sind (Arakawa und Timasheff, 1982, 1985; Timasheff, 2002; Cattone *et al.*, 2002).

Daran orientiert, postuliert die Wassereinschlusshypothese, dass Xeroprotektiva zur Stabilisierung gleichfalls nicht direkt mit Biomolekülen interagieren (Cordone, 2005). Es wird angenommen, dass bei Austrocknung wenige verbleibende Wassermoleküle an der Schnittstelle zwischen Protektivum und Biomolekül „festgehalten“ und dort konzentriert werden. Dadurch bleibt die direkte Interaktion des Biomoleküls mit Wasser und somit auch die native Konformation des Biomoleküls erhalten (Belton und Gil, 1994; Cattone *et al.* 2002; Lins *et al.*, 2004). Die meisten experimentellen und theoretischen Studien, welche diese Hypothese stützen, untersuchten Wechselwirkungen zwischen nicht-reduzierenden Disacchariden (Trehalose, Saccharose) und verschiedenen Proteinen (Lysozym, Myoglobin, BSA) (Bellavia *et al.*, 2011; Lerbret *et al.*, 2012). Dadurch wird in der Literatur primär die Ansicht vertreten, dass sich die Wassereinschlusshypothese vor allem zur Erklärung von Zucker-Wasser-Protein-Interaktionen eignet, wobei die Betonung auf dem Biomolekül (Protein) liegt (Cordone *et al.*, 2007; Julca *et al.*, 2012).

Für einige Proteine wurde zwar gezeigt, dass die direkte Interaktion mit Trehalose bei geringem Wassergehalt (< 1 %) durch Wasserstoffbrückenbindungen möglich ist, so dass eine amorphe Glasmatrix das Protein schützt. Doch wurde weiter geschlussfolgert, dass Trehalose aufgrund seiner Größe und komplexen Struktur nicht mit allen Proteinregionen auf natürliche Weise wechselwirken kann, wie Wasser (Lerbret *et al.* 2012). Daher vermutet man für Proteine eine „Bevorzugung“ der Hydrierung durch verbleibende Wassermoleküle, welches an der Protein-Trehalose-Schnittstelle immobilisiert ist (Timasheff, 2002; Lerbret *et al.*, 2012). Eine solche Immobilisierung restlicher Wassermoleküle durch ein Protektivum wie Trehalose ist in Abb. 8 dargestellt.

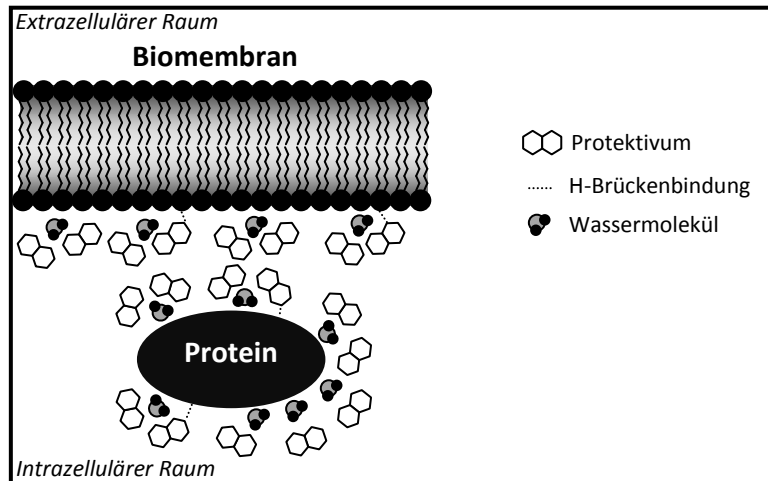


Abb. 8: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Wassereinschlusshypothese.

Hierbei werden zusätzlich die wenigen, verbleibenden Wassermoleküle berücksichtigt. Protektiva werden im Trockenzustand bevorzugt von der Biomoleküloberfläche ausgeschlossen und die Hydrierung durch die restlichen Wassermoleküle wird präferiert. Dadurch wird das restliche Wasser als ein dünner Film an der Grenze zu trockensensitiven Molekülstrukturen wie Proteinen und Membranen isoliert. Diese können dadurch im hydrierten Zustand bestehen bleiben. Die realen Größenverhältnisse der Komponenten sowie die Abstände zwischen den Phospholipidköpfen der Biomembran werden zugunsten der Anschaulichkeit nicht berücksichtigt.

Im ausgetrockneten Zustand interagiert das Protektivum so nur indirekt mit der zu schützenden Biostruktur. Weitere Studien zeigen, dass solche biologischen Strukturen auch Membranstrukturen sein können, wodurch die Wassereinschlusshypothese nicht auf die Beschreibung von Zucker-Protein-Interaktionen limitiert bleibt. Dies wurde anhand von Experimenten mit künstlichen Membransystemen demonstriert, die durch die polyhydroxylierten Verbindungen Glycerol bzw. Trehalose stabilisiert wurden (Westh, 2003; Wolkers *et al.*, 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass einige Proteine unterschiedliche Oberflächenbereiche aufweisen, von denen die einen eher mit Wasser und andere eher mit Protektiva interagieren (Federov *et al.*, 2010). In solchen Fällen kann also teilweise auch die Wasserersatzhypothese angewendet werden. Daher wird meist davon ausgegangen, dass sich die drei bis hierhin vorgestellten Hypothesen nicht zwangsläufig ausschließen. Wahrscheinlich tragen alle anteilig und ergänzend zur Erklärung der natürlichen Trockenstabilisierung empfindlicher Biomoleküle bei (Crowe *et al.*, 1998; Clegg, 2001; Julca *et al.* 2012). Dies sind jedoch die drei bekanntesten Gedankenmodelle zur Trockenstabilisierung von biologischen Strukturen.

Innerhalb der letzten Dekade kamen allerdings noch weitere Hypothesen hinzu (Bellavia *et al.*, 2011). Eine davon ist die oben genannte Polymorphismushypothese. Eine weitere ist eine Ableitung aus der Wassereinschlusshypothese. Sie wird als Verankerungshypothese („*anchorage hypothesis*“) bezeichnet. Auch hier werden die Interaktionen zwischen Protektivum, restlichem Wasser und Biomolekül (meist Proteine) im Trockenzustand berücksichtigt (Francia *et al.*, 2008). Der Fokus liegt auf dem Einfluss polyhydroxylierter Verbindungen auf das Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen (HB), welches zwischen den verbleibenden Wassermolekülen besteht.

Die Postulierung dieser Hypothese ergab sich aus zahlreichen experimentellen und theoretischen Betrachtungen von glasbildenden Systemen. Diese beinhalten Polyole und insbesondere nicht-reduzierende Zucker wie Maltose, Saccharose und Trehalose (Giuffrida *et al.*, 2006; Francia *et al.*, 2008). Solche Studien zeigen, dass Wasser-Protektivum- vor Wasser-Wasser-Wechselwirkungen präferiert werden und Glasbildner ein verstärktes Netzwerk aus HB um sich ausbilden (Lerbret *et al.*, 2005a, 2005b; Magazù *et al.*, 2004; Affouard *et al.*, 2005). Durch diese starken Wechselwirkungen destrukturieren glasbildende System das zwischen Wassermolekülen gebildeten HB-Netzwerk (Magazù *et al.*, 2010). Innerhalb des Glaszustandes vermitteln die Wassermoleküle nun die HB zwischen einzelnen Glasbildnern. Diese Interaktionen sind sehr stabil und resultieren in einem starken Einfluss auf die Struktur und somit auf die Dynamik des verbleibenden Wassers (Affouard *et al.*, 2005). Auf diese Weise zwingen Glasbildner dem Wasser eine neue Ordnung auf und reduzieren so die molekulare Mobilität der Wassermoleküle signifikant (Affouard *et al.*, 2005; Varga *et al.*, 2010). Somit bewirkt die Anwesenheit der Glasbildner eine Modifikation bestehender HB sowie die Ausbildung eines verstärkten und Wasser-vermittelten HB-Netzwerks im Glaszustand.

Die Verankerungshypothese postuliert als Folge die Verankerung von Proteinoberflächen in der Glasmatrix. Analog zur Wassereinschlusshypothese wird die Oberfläche eines eingeschlossenen Proteins mit der umgebenden Glasmatrix via Wasser vermittelter HB verknüpft (Bellavia *et al.*, 2011). Der Grund liegt wiederum in der starken Wechselwirkung von Glasbildnern und Wassermolekülen, weshalb direkte Interaktionen von Biomolekül und Protektivum nicht bevorzugt werden. Indirekte und durch Wasser vermittelte Wechselwirkungen werden daher präferiert, um eine optimale Umgebung zum Schutz vor Kälte und Trockenheit für Proteine und andere Zellbestandteile zu schaffen (Affouard *et al.*, 2005). Diese Umgebung bestimmt nun auch die internen Freiheitsgrade des Biomoleküls (Giuffrida *et al.*, 2003; Cordone *et al.*, 2005; Francia *et al.*, 2008). Folglich wird ein Protein durch das Wasser-mediatierte HB-Netzwerk eingegrenzt und dynamisch von der umgebenden Glasmatrix abhängig (Varga *et al.*, 2010; Bellavia *et al.*, 2011). Da die Glasmatrix wiederum durch das intermolekulare HB-Netzwerk verstärkt und in seiner Dynamik eingeschränkt ist, wird somit auch die Mobilität des Biomoleküls geringer. Progressiver Wasserentzug verstärkt das Netzwerk zusätzlich, wodurch die Glasmatrix zu schützende Biomoleküle zunehmend stabilisiert (Cordone *et al.* 2005, Bellavia *et al.*, 2011; Lerbret *et al.*, 2012). Der verringerte Wassergehalt reduziert somit simultan die Dynamik der Matrix und des Proteins, was makroskopisch als Anstieg der Viskosität ersichtlich wird (Cottone *et al.*, 2001; Giuffrida *et al.*, 2003, 2006; Cottone, 2007;). Auf diese Weise werden mit Wasser als Bindungsvermittler die bioprotektiven Eigenschaften von Glasbildnern durch die Formung einer schützenden Hülle aus Protektiva und des verbleibenden Wassers erklärt (Affouard *et al.*, 2005). Wasser agiert nach dieser Hypothese als Kopplungsagens („Anker“) zwischen der Proteinoberfläche und der Glasmatrix, um die molekulare Beweglichkeit des Biomoleküls zur reduzieren (Cordone *et al.*, 2005, 2007).

Aufgrund dieser Funktion der Wassermoleküle wurde diese Hypothese als Verankerungshypothese („*anchorage hypothesis*“) bekannt (Francia *et al.*, 2008). In Abb. 9 sind diese Wechselwirkungen schematisch dargestellt.

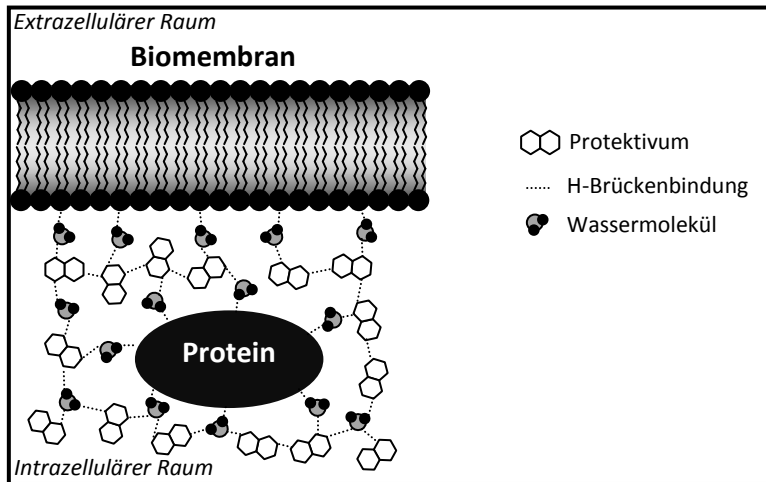


Abb. 9: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der Verankerungshypothese.

Als Ableitung aus der Wassereinschlusshypothese, werden auch hier die wenigen verbleibenden Wassermoleküle im Trockenzustand berücksichtigt. Glasbildende Protektiva beeinflussen signifikant Struktur und Dynamik des verbleibenden Wasser und bilden ein verstärktes HB-Netzwerk aus. Wassermoleküle vermitteln intermolekulare Wechselwirkungen über HB und ermöglichen die „Verankerung“ von Biomolekülen in der stabilen Glasmatrix. Die realen Größenverhältnisse der Komponenten sowie die Abstände zwischen den Phospholipidköpfen der Biomembran werden zugunsten der Anschaulichkeit nicht berücksichtigt.

Wie bereits erwähnt müssen sich die bis hierher vorgestellten Hypothesen nicht zwangsläufig ausschließen, sondern sind eher alle anteilig an der Erklärung der natürlichen Trockenstabilisierung durch Xeroprotektiva. Dabei wird die Verankerungshypothese als Verallgemeinerung der ersten drei Hypothesen verstanden (Bellavia *et al.*, 2011). Diese Hypothese postuliert weiterhin, dass durch die Modifikation der Wasserstruktur die Eiskristallbildung bei Kälte unterdrückt wird, wodurch dieses Gedankenmodell auch die Kälteschutzeigenschaften von Glasbildnern erklärt (Lerbret *et al.*, 2005a). Einige Studien bezüglich dieser Hypothese stützen zudem die Aufbesserung von Glasmatrixen durch die Kombination verschiedener glasbildender Systeme. So wurde experimentell und theoretisch ermittelt, dass ein geringer Anteil von Glycerol in einer Trehalose-Matrix das intermolekulare HB-Netzwerk zusätzlich verstärkt wird (Magazù *et al.*, 2010).

4.4 NADES-Hypothese („*natural deep eutectic solvent hypothesis*“)

Dies ist die jüngste Hypothese zur Erklärung von extremer Trocken- und Kälteresistenz. Sie basiert auf dem Prinzip eutektischer Stoffgemische. Diese entstehen, wenn die Stoffkonzentrationen der einzelnen Bestandteile in einem bestimmten Mischungsverhältnis vorliegen, so dass sie sich in einem Phasengleichgewicht befinden. Dieses sogenannte Eutektikum bildet ein festes Stoffgemisch, das durch das Phasengleichgewicht bei definierter Temperatur homogen in die flüssige Phase übergeht. Charakteristisch ist, dass die Schmelztemperatur des Eutektikums deutlich niedriger sein kann als die Schmelztemperatur der einzelnen Komponenten des Stoffgemisches. Dadurch sind bestimmte Stoffgemische möglich, die selbst bei Raumtemperatur als flüssige Schmelze vorliegen, obgleich die separierten Bestandteile auch bei höheren Temperaturen festphasig wären.

Dies führte zur Entdeckung ionischer Flüssigkeiten. Sie bestehen aus den Salzen organischer Säuren und Basen und benötigen kein Lösungsmittel, um bei relativ niedrigen Temperaturen (25 – 100 °C) flüssig zu sein. Beinhaltet ein derartiges Eutektikum neben der ionischen Komponente auch bzw. ausschließlich nicht-ionische Substanzen so spricht man von tiefeutektische Solventien (DES, engl. *deep eutectic solvents*). Sie wurden erstmals für das Stoffgemisch aus Cholinchlorid ($T_m = 302$ °C) und Harnstoff ($T_m = 133$ °C) im molaren Verhältnis von 1:2 ($T_m = 12$ °C) beschrieben (Abbott *et al.*, 2003).

Hier setzt die NADES-Hypothese an. Sie orientiert sich daran, dass bestimmte Primärmetabolite natürlichen Ursprungs ebenfalls DES bilden können. Diese Primärmetabolite sind oft einfach gebaut und können in großen Mengen sowohl in Mikroorganismen als auch in tierischen und pflanzlichen Zellen nachgewiesen werden. Viele davon zählen zu den kompatiblen Soluten. Ein Teil dieser Verbindungen kommt in sehr großen Konzentrationen vor, dass ihre Funktion als einfaches Stoffwechselintermediat fraglich erscheint. Aufgrund ihres natürlichen Vorkommens, werden aus ihnen gebildete DES natürlich-tiefeutektische Solventien (NADES, engl. *natural deep eutectic solvents*) genannt (Choi *et al.*, 2011).

Im Gegensatz zu den vorigen Hypothesen werden NADES als Flüssigkeiten postuliert, von denen Wasser einen sehr geringen Anteil ausmachen kann. Der flüssige Zustand ist durch die geringe Schmelztemperatur des Mediums begründet. Als flüssige Schmelze sind NADES daher weder kristallin noch glasartig. Diese Flüssigkeiten definieren sich durch ihre biochemische Zusammensetzung. Solche NADES-bildenden Metabolite wurden insbesondere in den auffällig ähnlichen Metabolomen von anhydrobiotischen und kältresistenten Organismen nachgewiesen. Dies führte zu der Postulierung der NADES-Hypothese. Sie besagt, dass NADES in lebenden Zellen ein drittes flüssiges Medium bilden (neben Wasser und Lipiden). Diese alternative Flüssigkeit ermöglicht es einigen Organismen extreme Bedingungen wie starkem Wasserentzug und Kälte zu überleben (Choi *et al.*, 2011; Minorsky, 2011). Ergänzend versucht sie die Biosynthese schwer wasserlöslicher Verbindungen zu erklären. In der Literatur wird demonstriert, dass NADES aus einer Vielzahl verschiedener, natürlicher Verbindungen generiert werden können. Sie können durch Zucker, Aminosäuren, Choline (an der Carbonylgruppe reduziertes Betain) sowie organische Säuren gebildet werden.

NADES werden in vier Gruppen unterteilt. Dies sind ionische Flüssigkeiten aus organischer Säure und organischer Base und Zucker-basierten NADES mit einer organischen Säure, einer organischen Base oder einer weiteren neutralen Verbindung (Dai *et al.*, 2013a). Die NADES-formenden Substanzen sind bevorzugt polyhydroxylierte bzw. polycarboxylierte Verbindungen, wodurch die natürlichen DES ein breites Polaritätsspektrum abdecken und dadurch ein Vielzahl verschiedener Verbindungen bei Wasserentzug lösen (Dai *et al.*, 2013b). Stabile NADES liegen in einem breiten Temperaturbereich im homogenen, flüssig-viskosem Zustand vor. Die Stabilität hängt dabei entscheidend vom Mischungsverhältnis ab. Der Fokus der NADES-Hypothese liegt demnach auf der biochemischen Zusammensetzung des intrazellulären Milieus. Dennoch ist diese Hypothese mit den vorigen durchaus kompatibel und zeigt einige Übereinstimmungen.

Analog zur Wasserersatzhypothese werden NADES als alternatives Lösungsmittel postuliert. Auch wenn es nicht zu Bildung eines Glases kommt teilt die NADES-Hypothese mit der Vitrifikationshypothese die Gemeinsamkeit, dass Enzyme bei sinkendem Wassergehalt reversibel und viskositätsgesteuert inaktiviert werden (Choi *et al.*, 2011). Durch NMR-Untersuchungen konnten in NADES ein intermolekulares Netzwerk aus starken HB-Wechselwirkungen beobachtet werden, die durch Wassermoleküle vermittelt werden können. Generell agiert Wasser in NADES als Weichmacher und kann in geringen Mengen (5-10 %) die Bildung von NADES unterstützen. Wasser kann somit auch ein Teil der NADES sein. Aufgrund des starken HB-Netzwerks ist es jedoch stark gebunden. Dieses Verhalten ist konform mit der Wassereinschlusshypothese und insbesondere mit der an dieser angelehnten Verankerungshypothese. In Abb. 10 sind die genannten intrazellulären Bedingungen schematisch zusammengefasst.

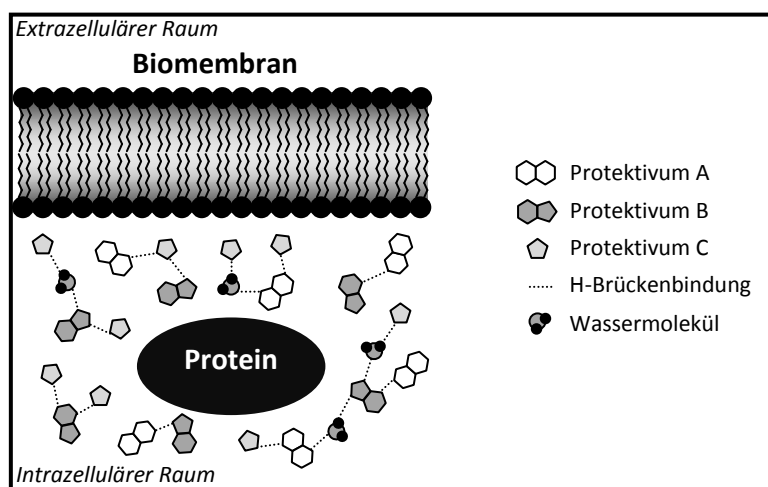


Abb. 10: Schematische Darstellung relevanter, intermolekularer Wechselwirkungen während der Anhydrobiose gemäß der NADES-Hypothese.

In Abwesenheit von Wasser werden NADES als flüssig-viskose Alternative postuliert. Die Bildung von NADES ist durch ionische Metabolite (mit sauren und basischen Gruppen) oder durch nicht-ionische Bestandteile wie polyhydroxylierte Verbindungen möglich. Somit sind NADES komplexe und biochemisch definierte Kompositionen organischer Verbindungen, die noch bei Temperaturen weit unter 100 °C flüssig sind. Die realen Größenverhältnisse der Komponenten sowie die Abstände zwischen den Phospholipidköpfen der Biomembran werden zugunsten der Anschaulichkeit nicht berücksichtigt.

5 Ein bionischer Ansatz aus der Mikrobiologie

Als interdisziplinäre Wissenschaft befasst sich die Bionik systematisch mit der technischen Realisierung und Applikation von strukturellen, prozesstechnischen sowie evolutionären Prinzipien auf der Basis von biologischen Systemen (Nachtigall, 2002). Die Orientierung an der Natur und der von dort ausgehende Wissenstransfer dient dabei der Optimierung bestehender Technologien, der Lösung technischer Problemstellungen sowie der Entwicklung innovativer Prototypen. Obgleich der Begriff „Bionik“ erst Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts geprägt wurde, sind aus der vorangegangenen Geschichte bereits zahlreiche Erfindungen und Ideen des Menschen dokumentiert, die der Bionik zugeordnet werden. Diese gehen bis in das fünfzehnte Jahrhundert auf den Bionik-Pionier Leonardo da Vinci zurück.

Bis heute ist es eher selten, dass die Mikrobiologie als Ursprung bionischer Ideen wirkt. Ein solches Beispiel, dass von den Medien als bionisch Idee verbreitete wurde, ist die Entwicklung eines hochsensiblen Feuchtigkeitssensors mit Hilfe goldbeschichteter Bakterien (Berry und Saraf, 2005).

Betrachtet man die kälte- und trockeninduzierte Vitrifikation in erster Linie als natürliche Überlebensmechanismen, so lassen sich daraus Bionik-nahe Entwicklungen ableiten. Dies betrifft die Kryokonservierung durch Vitrifikation sowie die Formulierung von Biomaterialien in amorphen Matrices als Teil des *Anhydrobiotic Engineering*. So kann beispielsweise der Einschluss von trockensensitiven Bakterien in eine Trehalosematrix mit anschließender plastischer Verkapselung als Konstruktion einer artifiziellen Makrospore betrachtet werden (Manzanera *et al.*, 2004; Vílchez *et al.*, 2008). Doch das Applikationsspektrum von Biomaterialien und der Bedarf diese trocken zu stabilisieren steigt stetig. Daher ist es naheliegend sich hier weiterhin an der Natur zu orientieren, die solche Mechanismen perfektioniert hat.

Für die Trockenkonservierung werden bevorzugt die beiden Glasbildner Trehalose und Saccharose verwendet. Zucker-basierte Vitrifikationssysteme sind daher sehr gut erforscht (Julca *et al.*, 2012). Solche Zucker sind jedoch nicht für beliebige Biomaterialien gleich gut geeignet. Und es zeigt sich das andere Xeroprotektiva oder Kombinationen daraus ähnliche oder gar bessere Ergebnisse als Zucker-basierten Systeme erbringen (Narvaez-Reinaldo *et al.*, 2010). Daher steigt die Nachfrage nach neuen Vitrifikationssystemen. Einer der am wenigsten erforschten Glasbildner, der jedoch viele protektive Eigenschaften besitzt, ist das vom halophilen Bakterium *Halomonas elongata* synthetisierte Hydroxyectoin.

5.1 Potentiell vitrifizierungsfähiger Modellorganismus

Halomonas elongata 2581^T ist ein Gram-negatives γ -Proteobakterium der Familie *Halomonadaceae*. Es toleriert NaCl-Konzentrationen bis etwa 25 % (Optimum bei 3 % NaCl bei 30 °C) und wurde erstmals 1980 beschrieben (Vreeland *et al.*, 1980). Bei starkem Wasserentzug durch hypersaline Bedingungen schützt sich dieser Organismus durch die Synthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin. Letzteres unterscheidet sich lediglich durch eine einzig Hydroxylgruppe vom Ectoin. Die Hydroxylierung wird durch einen einzigen enzymatischen Schritt realisiert. Diese Hydroxylgruppe ist ein Gemeinsamkeit des Hydroxyectoins mit bekannten Glasbildnern wie Trehalose und Saccharose. Daher lässt sich hier der Grund für die Fähigkeit zur Glasbildung vermuten.

Aufgrund der kommerziellen Produktion von Ectoin und Hydroxyectoin gehört *H. elongata* bereits zu den biotechnologisch relevanten Mikroorganismen. Dies hat den Vorteil, dass die Prozesstechnik für diesen Organismus bereits zugänglich und optimiert ist. In Bezug auf die Trockenstabilisierung von einiger Biomaterialien wurde Hydroxyectoin bereits untersucht (Manzanera *et al.*, 2004; Vílchez *et al.*, 2008). Hierbei zeigt es in einigen Fällen sogar bessere Trockenstabilisationseigenschaften aufzuweisen als Trehalose (Manzanera *et al.*, 2002, 2004). Jedoch gehen diese Studien kaum auf die Eigenschaft Hydroxyectoins zur Glasbildung ein.

In dieser Arbeit wird *H. elongata* als nanostrukturiertes System betrachtet, welches in der Lage ist durch den Glasbildner Hydroxyectoin diversen Umweltextremen (hohe Salinitäten, Trockenheit und Hitze) zu widerstehen. Hydroxyectoin kann dabei auch zur Trockenstabilisierung von Enzymen

eingesetzt werden. Dies wurde bereits für die Enzyme Lactatdehydrogenase und Phosphofruktokinase in gefriergetrocknetem Zustand untersucht (Lippert und Galinski, 1992).

Im Kontext der Vitrifikation ist dieses Nicht-Zucker-System nur wenig erforscht. Dennoch ist seine Anwendung als stabilisierendes Agens in Immunkonjugat-Teststreifen bereits patentiert (Palin *et al.*, 2011). Ein dazu unterschiedlicher Ansatz ist die Stabilisierung einer bioelektronischen Schnittstelle wie man sie z. B. in elektrochemischen Biosensoren findet.

5.2 Bionik in der Biosensorik

Ein Biosensor ist ein analytisches Werkzeug oder System, das aus einem immobilisiertem Material biologischen Ursprungs und der damit im räumlich engen Kontakt stehenden Transducer-Einheit besteht (Gronow, 1984). Das immobilisierte Biomaterial agiert als biologisches Erkennungselement. Dies können sowohl Enzyme, Antikörper, Nukleinsäuren, Organellen, ganze Zellen oder Kombination daraus sein. Vereinfacht kann man daher eine Einteilung in biokatalytisch und bioaffine Biosensoren vornehmen. Die Transducer-Einheit dient der Umwandlung des vom Erkennungselement kommenden biochemischen Signals in ein mess- und auswertbares, elektrisches Signal. Das Prinzip eines solchen Biosensors ist in Abb. 11 dargestellt. Hervorgehoben ist dabei der kritischen Schritt eine permanent stabile und kommunikative Verbindung zwischen der biologischen und der technischen Komponente herzustellen.

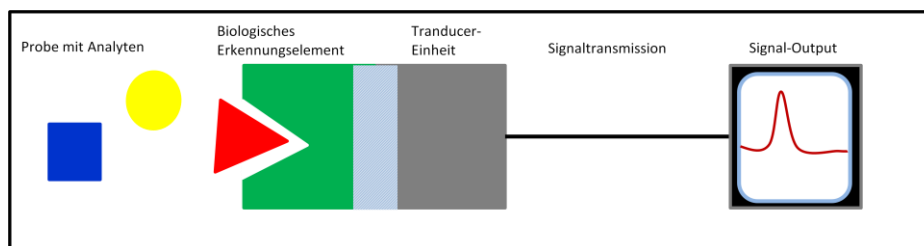


Abb. 11: Konstruktionsprinzip eines biosensorischen Bauelements.

Die Schnittstelle zwischen dem biologischem Erkennungselement und der technischen Transducer-Einheit ist markiert (). Abgesehen von der Stabilität der biologischen Komponente selbst, ist die biohybride Interaktion ein kritischer Punkt in der Konstruktion von Biosensoren.

Die Transducer-Einheit (auch Signalwandler genannt) bestimmt die Art des Biosensors. Dies ist davon abhängig, ob das biochemische Signal des Erkennungselements elektrochemisch, optisch, thermisch oder massen-sensitiv übertragen wird. Die Nutzung biochemischer Erkennungsprinzipien und die Tatsache, dass durch technische Strukturen natürliche Informationstransferprozesse nachgebildet werden, führt dazu, dass solche Biosensoren gelegentlich zur Bionik gezählt werden.

Durch die ein halbes Jahrhundert alte Forschungsgeschichte der Biosensorik teilt man elektrochemische Biosensoren in drei Generationen ein. Dies ist davon abhängig, ob der Elektronentransfer zum Nachweis des Analyts durch die Detektion eines Cosubstrat bzw. Produkts (1. Generation), einen redoxaktiven Mediator (2. Generation) oder durch den direkten Elektronentransfer vom Enzym auf die Elektrode (3. Generation) realisiert wird. Letzterer Fall stellt den modernsten und sensitivsten Typ von Biosensoren dar.

Deutliche Fortschritte in der Bioelektronik sind durch die Verwendung von nanoskalierten Materialien erreicht worden. Dazu zählen beispielsweise Quantenpunkte (engl. *quantum dots*) sowie Kohlenstoffnanoröhren (Tanne *et al.*, 2011). Solche Proteinelektroden können aufgrund ihrer elektrokatalytischen Aktivität nicht nur als Sensoren, sondern auch als Elektroden in biologischen Brennstoffzellen genutzt werden, und weisen daher ein breites Applikationsspektrum auf (Tanne *et al.*, 2010).

Kohlenstoffnanoröhren (CNT, engl. *carbon nanotubes*) gehören zu den vielversprechendsten Komponenten zur Konstruktion elektrochemischer Biosensoren (Wang, 2005). CNTs sind artifizielle, nanoskalierte Kohlenstoffkonstrukte die tubulär beschaffen sind. Idealerweise sind die Kohlenstoffatome hexagonal angeordnet. Grundsätzlich teilt man in die zwei Hauptgruppen einwandige CNTs (SWCNT, engl. *single-walled CNT*) und mehrwandige CNTs (MWCNT, engl. *multi-walled CNT*) ein (Ajayan, 1999). CNT-basierte Technologien werden seit Beginn der 1990er Jahre zunehmend in der Elektronik-, Material- und Biomedizinforschung eingesetzt (Baughman *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007). Auch für die Bionik werden CNTs fortwährend interessanter, beispielsweise um superhydrophobe Oberfläche herzustellen (Li *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer einzigartigen chemischen, mechanischen und elektrischen Eigenschaften eignen sie sich auch als Immobilisations- und Transducer-Material in Biosensoren. Sie ermöglichen dadurch oft die direkte Bioelektrokatalyse via Tunneleffekt und damit die Konstruktion von Biosensoren der dritten Generation. Dies bedingt jedoch einen engen Kontakt zur technischen Oberfläche und impliziert dadurch oft in einer starken Limitierung der biologischen Stabilität.

Über die stabilisierende Wirkung von Hydroxyectoin in verschiedenen Arten von elektrochemischen Biosensoren existieren bereits einige, wenige Berichte (Meier, 2002; Loose und Setford, 2006). Jedoch beinhaltet noch keiner dieser Sensoren CNTs. Kohlenstoffnanoröhren bieten jedoch eine passende Oberfläche zur Adsorption von organischen und heteroaromatischen Verbindungen (Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Dieser Effekt wird durch Van-der-Waals sowie durch π - π -Interaktion verursacht. Ectoine werden durch einen Mechanismus in Bakterienzellen akkumuliert, der ebenfalls von der starken Wechselwirkung mit aromatischen Systemen profitiert (Hanekop *et al.*, 2007).

Die Übertragung dieses Prinzips wird im Rahmen dieser Arbeit an einem eigens konstruierten Biosensor getestet. Dieser Biosensor basiert auf immobilisierte Glucose-Oxidase zur Detektion von Glucose. Durch das weltweite Gesundheitsproblem *Diabetes mellitus* ist diese Art von Biosensoren von enormer medizinischer und ökonomischer Bedeutung geworden (Wang, 2008). Nahe liegend ist die Tatsache, dass gerade in Biosensoren, die dem Nachweis eines Zuckers dienen, Stabilisatoren wie Trehalose oder Saccharose ungeeignet sind. Denn sie können aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zum Substrat falsch-positiven Signale implizieren. Daher erscheint die Anwendung von Ectoin und Hydroxyectoin zur Stabilisierung solcher Biosensoren sinnvoll und vielversprechend.

6 Zielstellung der Arbeit

Ausgehend von der Beobachtung, dass biologische Zuckergläser die Stabilisierung komplexer Biosysteme im Trockenzustand ermöglichen (Anhydrobiose), soll im Rahmen dieser Arbeit ein bakterielles Nicht-Zucker-System untersucht werden, das ebenfalls potentiell zur Glasbildung fähig ist.

Das halophile Bakterium *Halomonas elongata* wird im Rahmen dieser Arbeit als nano-strukturiertes Biosystem betrachtet, das durch natürliche Vitrifikation mittels Hydroxyectoin extremen Wasserentzug und Hitze überleben kann.

Zunächst sollen Veränderungen in der Physiologie des Organismus untersucht werden, die parallel zur Hydroxylierung des kompatiblen Solut Ectoin an der optimalen Konservierung des Biosystems beteiligt sind. Dazu soll der Organismus auf den Gehalt an organischen und anorganischen Ionen sowie auf die Expression spezieller Stressproteine untersucht werden.

Weiterhin sollen artifizielle Glasmatrices auf Basis potentieller Glasbildner wie Hydroxyectoin hergestellt werden. Dazu sollen Ansätze zur Bestimmung ihrer Eigenschaften ausgearbeitet werden. Dies beinhaltet die Charakterisierung der Tendenz zur Vitrifikation oder Kristallisierung, die Prüfung von Werkstoffeigenschaften sowie die Eignung zur Stabilisierung von trockensensitiven Biomaterialien wie beispielsweise enzymatisch aktiven Proteinen.

Als bionischer Ansatz soll das gewonnen Wissen genutzt werden, um zur Lösung eines technischen Problems beizutragen. Diese Problematik stellt sich durch die limitierte Stabilität biologischer Erkennungselemente in einem technischem Biosensor dar. Es soll die Konstruktion eines Biosensors umgesetzt werden. Nach der Integration stabilisierender Komponenten aus *Halomonas elongata* in das Sensorsystem, soll dieser auf seine Trockenstabilität getestet werden.

Auf diese Weise wird die Arbeit das Anwendungspotential des nur wenig erforschten Vitrifikationssystems aus einem halophilen Organismus näher beleuchten. Dadurch leistet sie einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung optimaler Applikationsansätze, welche die Stabilität großindustriell hergestellter Biopharmazeutika und nanobiotechnologischer Produkte wie elektrochemischen Biosensoren kosteneffizient und dauerhaft steigern.

V Material und Methoden

1 Verwendete Bakterienstämme

In Tab. 2 sind die beiden verwendeten Bakterienstämme aufgelistet.

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T	Wildtyp	(Vreeland <i>et al.</i> , 1980)
<i>Escherichia coli</i> DSM 498	Wildtyp K12	(Migula, 1895)

2 Nährmedien

Sämtliche Nährmedien wurden durch Lösung in H₂O_{demin} hergestellt. Der NaCl-Gehalt wurde in Abhängigkeit von Organismus und Versuchsbedingungen nachjustiert. Der prozentuale Gehalt an NaCl (w/v) in den jeweiligen Medien ist der Medienabkürzung nachgestellt. Beispielsweise bezeichnet MM63-3 % das *Minimal Medium MM63* mit einem NaCl-Gehalt von 3 % (w/v).

2.1 Synthetische Minimalmedien

2.1.1 Minimalmedium zur Kultivierung, MM63-x % nach Miller (Larsen *et al.*, 1987)

Für die Herstellung von 1 L MM63 wurden 13,61 g KH₂PO₄, 4,21 g KOH, 0,25 g MgSO₄, 1,98 g (NH₄)₂SO₄ eingewogen, in 700 mL H₂O_{demin} gelöst und anschließend 1 mL einer FeSO₄-Stammlösung (0,0011 g/mL FeSO₄) hinzugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,2 nachjustiert (per HCl bzw. KOH). Es folgte die Zugabe und Lösung einer definierten NaCl-Menge. Diese war variabel und hing von den Versuchsbedingungen ab (beispielsweise 30 g für 1 L MM63-3 %). Anschließend wurde mit H₂O_{demin} bis 900 mL aufgefüllt. Das Medium wurde nun für 20 min bei 121 °C steril autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Im letzten Schritt wurden steril 100 mL steril autoklavierte 5 g/100 mL Glucosestammlösung hinzugegeben. Das fertige Medium wurde bis zur Verwendung steril bei Raumtemperatur gelagert.

Dieses Minimalmedium diente der Kultivierung von *H. elongata* und *E. coli* zur Untersuchung akkumulierter Komponenten (bspw. Proteine, Solute, anorganische Verbindungen), die zur Biostabilisierung bei Hitze, Salzstress und Trockenheit beitragen können. Sofern es für die Hauptkultur verwendet wurde, wurde es auch für die sekundäre Vorkultur verwendet (gleiche Salinität wie Hauptkultur). Weiterhin diente es zur Herstellung von MM63-Agarplatten für die Stammhaltung der Bakterienstämme und als Verdünnungsmedium zur photometrischen Untersuchung des bakteriellen Wachstums (gleiche Salinität wie Hauptkultur).

2.1.2 Glucose-freies MM63 zur Rehydrierung getrockneter Zellen, MM63-x %-G

Die Herstellung dieses Mediums ist bis auf eine Ausnahme identisch der Herstellung des Minimalmediums MM63-x % nach Miller. Im Unterschied zu diesem wurde hier keine Glucose hinzugegeben, so dass bei der Herstellung von 1 L nach der Zugabe des NaCl nicht auf 900 mL, sondern auf 1 L mit H₂O_{demin} aufgefüllt wurde. Es wurde für 20 min bei 121 °C steril autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Das fertige Medium wurde bis zur Verwendung steril bei Raumtemperatur gelagert.

Diese Variante des *Minimal Mediums MM63* diene ausschließlich der Verdünnung und Rehydrierung von Kulturproben in Experimenten zur Trocknung von Zellen im Vakuumkonzentrator (gleiche Salinität wie Kultivierungsmedium der Hauptkultur). Die Abwesenheit einer C-Quelle stellte sicher, dass sich die Organismen während der Verdünnung bzw. Rehydrierung nicht vermehren, so dass eine möglichst sichere Aussage über die Überlebenszellzahl getroffen werden konnte.

2.2 Komplexmedien

2.2.1 AB-Medium (*antibiotic broth medium No.3*), AB-x %

Für die Herstellung dieses Mediums wurden 17,5 g *Antibiotic Broth Medium* eingewogen und in 1 L H₂O_{demin} unter Rührung gelöst. Damit enthielt das Medium bereits einen NaCl-Gehalt von 3,5 g/L. Dies war bei der Einstellung höherer Salinitäten zu beachten. Das Medium hatte automatisch einen pH-Wert von 7,2. Es wurde für 20 min bei 121 °C steril autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Das fertige Medium wurde bis zur Verwendung steril bei Raumtemperatur gelagert.

Dieses Medium wurde für die primäre Vorkultivierung und zur Herstellung von Agarplatten verwendet. Wurde es als Vorkultur verwendet, ist der NaCl-Gehalt der sekundären Vorkultur sowie der Hauptkultur eingestellt worden, damit sich die kultivierten Organismen daran adaptieren konnten. Wurde es für die Agarplattenherstellung verwendet, so dienten diese der Stammhaltung sowie der Bestimmung vitaler Zellen nach der Rehydrierung von *H. elongata* in Trocknungsexperimenten (gleiche Salinität wie Rehydrierungsmedium).

2.2.2 BHI-Medium (*brain heart infusion broth*), BHI-x %

Dieses Medium wurde durch das Lösen von 37 g *brain heart infusion broth* in 1 L H₂O_{demin} unter Rührung hergestellt. Damit enthielt das Medium bereits 5 g/L NaCl. Dies entsprach einer Salinität von 0,5 % (w/v). Für einen höheren NaCl-Gehalt wurde die entsprechende NaCl-Menge hinzugegeben (95 g/L NaCl für BHI-10 %). Das Medium hatte automatisch einen pH-Wert von etwa 7,4. Das Medium wurde nun für 20 min bei 121 °C steril autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Bis zur Verwendung wurde es bei Raumtemperatur steril gelagert.

Dieses Medium diene primär der Kultivierung von *H. elongata* und *E. coli* zur Untersuchung akkumulierter Komponenten (Proteine, Solute, anorganische Verbindungen etc.), die zur Biostabilisierung bei steigenden Temperaturen und bei Wasserentzug durch Salzstress beitragen können. Sofern es für die Hauptkultur verwendet wurde, wurde es auch für die primäre Vorkultur verwendet (gleiche Salinität wie Hauptkultur).

Ferner diente es als Verdünnungsmedium zur photometrischen Untersuchung des bakteriellen Wachstums (gleiche Salinität wie Hauptkultur) und zur Herstellung von BHI-Agarplatten zur Bestimmung von Überlebenszellzahlen, sofern die Kultivierung der Zellen in BHI vorgenommen wurde.

2.3 Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurde das jeweilige Medium vor dem Autoklavieren mit 20 g/L Agar versetzt. Anschließend wurde es für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert. Das bis zur Handhabbarkeit abgekühlte Medium (Faustregel: Handwärme) wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Unter den gleichen sterilen Bedingungen fanden die Abkühlung und die Verfestigung des Agarmediums statt. Nach dem sterilen Verschließen der Agarplatten wurden sie bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Agarplatten wurden für die Stammhaltung von bakteriellen Organismen genutzt sowie als Substrat für die Bestimmung vitaler Zellzahlen.

3 Kultivierungsmethoden

3.1 Stammhaltung der Bakterien

Die Bakterienstämme wurden als Kryokulturen bei -70 °C in der Stammsammlung des IfMB Bonn (Universität Bonn) gelagert. *E. coli* wurde auf AB-0,5 %-Agarplatten bei 37 °C und *H. elongata* auf AB-3 %-Agarplatten bei 30 °C rekultiviert. Nach der etwa 24-stündigen Inkubation für die Rekultivierung, wurden die Agarplatten luftdicht mit Parafilm verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C steril gelagert. Diese Platten konnten bis zu 3 Monaten verwendet werden. Danach wurden die Organismen auf neue MM63-Agarplatten mit der gleichen NaCl-Konzentration übertragen, gleichermaßen für 24 h inkubiert und ebenfalls steril bei 4 °C gelagert.

Bakterien aus der Stammhaltung wurden zur Inokulation von flüssigen Vorkulturmedien, sowie zur Gewinnung von Zellmaterial für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen und Elementaranalytik verwendet.

3.2 Vorkultivierung

Sämtliche Vorkulturen wurden in 50 mL fassenden Erlenmeyerkolben angelegt, die während der Inkubation steril, jedoch luftdurchlässig verschlossen waren. Die Inkubation fand stets im Thermoschüttler (Scientific innova 4230, Fa. New Brunswick, Edison, USA) bei 180 rpm statt. Die Inokulation von Vorkulturen wurde durch das sterile Überimpfen von bakteriellem Zellmaterial der Stammhaltung (Agarplatten) in das primäre Vorkulturmedium durchgeführt. Die primäre Vorkultivierung von *H. elongata* (bei 30 °C) und *E. coli* (bei 37 °C) erfolgte in ca. 25 mL flüssigen AB-Mediums für etwa 15 bis 20 h. Anschließend wurde eine sekundäre Vorkultur aus 50 mL MM63-Medium durch 1 mL der primären Vorkultur beimpft. Der NaCl-Gehalt beider Vorkulturmedien entsprach der später folgenden Hauptkultur. Dieses Verfahren galt sofern die Hauptkultur ein MM63-Medium war. War das Medium der Hauptkultur ein BHI-Medium wurde nur eine primäre Vorkultur mit gleicher NaCl-Konzentration der Hauptkultur angelegt. Inkubationszeit und Temperatur entsprach der oben beschriebenen Vorkultivierung im AB-Medium.

3.3 Hauptkultivierung

3.3.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Primär erfolgte die Kultivierung von *H. elongata* bzw. *E. coli* in sogenannten OD-Kolben. Die OD-Kolben waren modifizierte 250 mL - Weithals-Erlenmeyerkolben. Die Modifizierung dieser Kolben umfasste ein seitlich am Kolbenhals angebrachtes Glasröhrchen zur erleichterten Bestimmung der optischen Dichte, einen steril verschließbaren Glasstutzen für Probenahmen (ebenfalls am Flaschenhals) sowie einer Schikane in Bodennähe zur verbesserten Sauerstoffversorgung der geschüttelten Kulturen. Die OD-Kolben wurden während der Kultivierung mit luftdurchlässigen Silicon-Schaumkappen (Merck, Darmstadt) steril verschlossen.

Hauptkulturen wurden 1 bis 2 %ig aus der vorangegangenen Vorkulturen inokuliert (mindestens auf einen initialen OD₆₀₀-Wert von 0,1). Die Inkubation fand stets im Thermoschüttler (Scientific innova 4230, Fa. New Brunswick, Edison, USA) bei 180 rpm statt. *E. coli* wurde bei 37 °C inkubiert und *H. elongata* bei 30 °C. In Temperaturschockexperimenten, wurde die Inkubationstemperatur für *H. elongata* während der exponentiellen Phase auf 50 bzw. 54 °C hochgestellt.

Diese Kultivierungsmethode diente der Gewinnung von Zellmaterial für die proteinbiochemische Analyse, für die Analytik intrazellulärer Solute sowie zur kontrollierten Beladung von *H. elongata* mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin als Vorbereitung für Trocknungsversuche.

3.3.2 Kultivierung im 1 L - Maßstab

Für die Untersuchung des Wachstums von *E. coli* und *H. elongata* im BHI-Medium bei verschiedenen Temperaturen (37, 41 bzw. 45 °C) wurde die Fermentation im 1 L – Minifermenter durchgeführt (Ergebnisse nur im Text erwähnt). Für die Fermentation wurde ein DASGIP-Minifermentersystem (DS0500TPSS, DASGIP *Information and Process Technology* GmbH, Jülich) verwendet. Dies beinhaltete autoklavierbare Sonden zur pH-Wert-, Temperatur- und Sauerstoffmessung sowie ein Rührwerk (Rührmagnet-System) und Heizsystem. Belüftet wurde mit sterilfiltrierter Luft über eine Sauerstoffpumpe. Die pH-Regulierung und Zugabe von Antischaummittel erfolgte durch steril im Fermentersystem integrierte Spritzen, die sterile HCl, KOH bzw. Antischaummittel enthielten. Die Probenahme zur photometrischen Beobachtung des Wachstums wurde durch das im Fermenteraufsatz integrierte Probenahmerohr realisiert, welches mit einem Schlauch verlängert und steril mit einem Spritzenventil verschlossen war.

Für die Fermentation wurden 0,5 L BHI-Medium in den Minifermenter gefüllt, steril verschlossen und dieser für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für *E. coli* wurde BHI-0,5 % und für *H. elongata* BHI-10 % verwendet. Die Inokulation der Medien erfolgte unter sterilen Bedingungen auf einen OD₆₀₀-Wert von etwa 0,1 (Referenz gegen unbeimpftes BHI-Medium der jeweiligen NaCl-Konzentration). Die Fermentation wurde über 24 h bei konstanten Temperaturen durchgeführt.

3.3.3 Temperaturdynamische Fermentation im 5 L - Maßstab

Zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens, der Anzahl vitaler Zellen sowie des intrazellulären Protektiva-Gehalts in *E. coli* bzw. *H. elongata* im temperaturdynamischen Experiment (zeitlich linear ansteigende Mediumtemperatur) wurde die Fermentation im autoklavierbaren Laborfermenter ALF (Bioengineering AG, Wald, Schweiz) durchgeführt. Das Arbeitsvolumen betrug 4 L. In der Abdeckung des ALFs waren folgende Komponenten zur Wachstumsbeobachtung, Probenahme und zur Kontrolle des Fermentationsprozesses steril integriert:

- pH-Sonde (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
- Temperatur- und pO₂-Sonde (Mettler-Toledo GmbH, Urdorf)
- Turbidimetrie-Sonde (Aquasant Messtechnik AG, Bubendorf, Schweiz)
- Zugänge für die pH-Regulierung mittels steriler HCl und KOH
- Probenrohr zur sterilen Entnahme von Proben
- steriler Zuluftzugang und Abluftausgang mit Sterilfilter
- Gummistopfen für die sterile Zugabe von Antischaum über Spritzen

Nach Herstellerangaben wurde der Bioreaktor ALF mit 4 L Medium befüllt, zusammengebaut und für mindestens 20 min bei 121 °C steril autoklaviert. Für *E. coli* wurde BHI-0,5 %, für *H. elongata* BHI-10 % bzw. MM63-10 % als Kultivierungsmedium verwendet. Nach dem Abkühlen wurde der Fermenter an den externen und Regelkreis gesteuerten Heizkreislauf angeschlossen. Die initiale Temperierung erfolgte auf eine Starttemperatur von etwa 40 °C. Auftretende Schaumbildung wurde durch die sterile Zugabe von Antischaummittel (Dehysan Z 2111, Cognis Deutschland, Düsseldorf) reduziert. Die pH-Regulierung wurde via Peristaltikpumpen Regelkreis gesteuert. Die Dokumentation der Prozessparameter sowie die Steuerung von Rührung und Temperatur wurden mittels der BioLogics Software 1128-08/D BA (Bioengineering AG, Wald, Schweiz) durchgeführt. Für den graduellen Anstieg der Temperatur (1 °C/h bei Verwendung von BHI-Medium bzw. 0,4 °C/h bei Verwendung von MM63-Medium) wurde ein sogenanntes „Rezept“ (Benennung: „T-Gradient-Fermentation“) mittels dieser Software programmiert. Dieses Programm steuerte weiterhin die verminderte Rührung während der Inokulation und während der Probenentnahme der finalen Zellernte. Sobald der Bioreaktor korrekt angeschlossen war und das Programm gestartet wurde, wurde durch das Programm sequentiell dazu aufgefordert die Sollwerte der Startbedingungen zu kontrollieren, das Fermentationsmedium zu inokulieren und den Prozess zu starten.

Die Inokulation des Fermentationsmediums wurde durch die Zugabe von dicht bewachsenem Vorkulturmedium (jeweils gleiches Medium wie Hauptkultivierungsmedium) realisiert bis ein Start-OD₆₀₀-Wert von etwa 0,1 erreicht war. Die Probenahme für die separate, photometrische Bestimmung der Zelldichte, für die Bestimmung von Überlebendzellzahlen sowie für die Probenahme von HPLC- und NMR-Proben wurde steril über das in der Aufdeckung integrierte Probenrohr durchgeführt. Vor allen Probenahmen wurde das Totvolumen von etwa 5 bis 10 mL abgenommen und verworfen. Dadurch wurde Medium sicher entfernt, das sich während der Fermentation im Probenahmesystem befand und nicht exakt durch die Prozessbedingungen kontrolliert war. Das Gesamtprogramm lief über etwa 30 bzw. 45 h bis zu einer Heizwassertemperatur von etwa 60 bzw. 70 °C. Am Programmende wurde das Heizwasser langsam abgekühlt (Programm gesteuert). Der letzte Programmschritt informierte über das Ende des Fermentationsprozesses.

3.4 Trockenstressexperimente (*In-Vivo*-Studien)

Zur Untersuchung der Auswirkung der intrazellulären Vitrifikation von *H. elongata*-Zellen mit geringem und mit hohem Hydroxyectoingehalt während harscher Trocknungsbedingungen wurde wie folgt in sieben Schritten Verfahren.

1. Kultivierung: *H. elongata* wurde im Schüttelkolben (Kapitel V3.3.1) in MM63-15% kultiviert. Die Hauptkultivierung teilte sich in zwei Gruppe (im Folgenden mit A und B benannt). Gruppe A wurde konstant bei 30 °C kultiviert. Gruppe B wurde initial bei 30 °C kultiviert und in der Mitte der exponentiellen Phase auf 50 °C geschockt. Diese erhöhte Temperatur wurde für Gruppe B beibehalten. Auf diese Weise konnte der intrazelluläre Gehalt von Ectoin und Hydroxyectoin gesteuert werden. Die Kultivierung der Zellen wurde bis in die spät-stationäre Phase fortgesetzt. (etwa 4 h nach Eintritt in die stationäre Phase). Anschließend wurden 2 mL-Proben für den weiteren Verlauf des Experiments abgenommen und der Rest der Kultur abgeerntet (Kapitel V5.1).

2. Erste Verdünnung der Proben: Ein Teil der genommen 2 mL-Probe wurde in Glucose-freiem MM63-15%-G auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,1 verdünnt (und der Rest der Probe verworfen). Diese Zellsuspension wird folgend als 0,1-OD₆₀₀-Probe bezeichnet.

3. Bestimmung der initialen Zellzahl: Für die Bestimmung der initialen Anzahl vitaler Zellen wurde die 0,1-OD₆₀₀-Probe soweit durch MM63-15%-G verdünnt, dass 100 µL der größten Verdünnung zwischen 100 und 300 Zellen enthielten. Es wurde in mehreren Schritten von 1:10 verdünnt, indem die Zugabe von 100 µL 0,1-OD₆₀₀-Probe in steriles und MM63-15%-G erfolgte. 100 µL der finalen Verdünnungen (10^{-6} und 10^{-7}) wurden jeweils in Dreifachbestimmung auf AB-15%-Agarplatten nach dem Verfahren zur Bestimmung vitaler Zellen (siehe Kapitel V6.3) ausplattiert.

4. Verdünnung und Aufteilung der Proben für die Trocknung: Für die Trocknung der Bakterienzellen wurden pro Gruppe (A und B) zwei 2 mL-Mikroreaktionsgefäße (MRG) mit 100 µL der 0,1-OD₆₀₀-Probe befüllt (Dreifachbestimmung). Eines dieser MRG wurde jeweils verschlossen und bildete die ungetrocknete Kontrolle zur Untersuchung der Auswirkung von Rotation und Wärme ohne Trocknung während des Aufenthalts im Vakuumkonzentrator (ungetrocknete Kontrolle). Das zweite MRG wurde offen in den Vakuumkonzentrator gegeben. Dieses MRG enthielt für jede Gruppe jeweils die Zellen, die den harschen Trocknungsbedingungen direkt ausgesetzt waren.

5. Trocknung im Vakuumkonzentrator: Nachdem die Proben sich im Vakuumkonzentrator befanden wurde dieser verschlossen und gestartet. Die Proben befanden sich im Anschluss für 3 h bei einem Grobvakuum von 10 mbar. Die Vakuumkammer war auf 45 °C temperiert.

6. Rehydrierung: Nach dem Ende des Trocknungsprozesses wurden die getrockneten Proben mit 1 mL Glucose-freiem MM63-15%-G für etwa 3 bis 5 min und leichtem Schütteln rehydriert.

7. Bestimmung der Überlebenszellzahl: Im letzten Schritt wurden die Proben (ungetrocknete Kontrolle und rehydrierte Zellen) soweit durch MM63-15%-G verdünnt, dass 100 µL der größten Verdünnung zwischen 100 und 300 Zellen enthielten. Es wurde in mehreren Schritten von 1:10 verdünnt, indem die Zugabe von 100 µL der Proben in steriles MM63-15%-G erfolgte. 100 µL der finalen Verdünnungen (für Kontrolle 10^{-6} und 10^{-7} und für rehydrierte Zellen 10^{-5} und 10^{-6}) wurden jeweils in Dreifachbestimmung auf AB-15%-Agarplatten nach dem Verfahren zur Bestimmung vitaler Zellen (siehe Kapitel V6.3) ausplattiert.

4 Puffer, Lösungen und Suspensionen

4.1 Lösungen für die Kultivierung

FeSO₄-Stammlösung

0,0055 mg FeSO₄ *7 H₂O wurden abgewogen und in 50 mL H₂O_{demin} gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Die Lösung konnte über mehrere Monate verwendet werden.

Glucoselösung zur Herstellung von Glucose-haltigem MM63-Medium

25 g D-Glucose (Monohydrat) wurden pro 500 mL H₂O_{demin} gelöst (entspricht 5 g/ 100 mL). Die Lösung wurde für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert und bis zur Verwendung steril bei Raumtemperatur gelagert. Pro 1 L MM63-Medium wurden 100 mL dieser Lösung verwendet.

100 mM sterile KOH für die Fermentation

2,805 g KOH wurden in 500 mL H₂O_{demin} gelöst. Für die Verwendung während der Kultivierung im Bioreaktor wurde die Lauge für 20 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

100 mM sterile HCl für die Fermentation

10 mL 6 M HCl wurden mit 590 mL H₂O_{demin} vermengt. Für die Verwendung während der Kultivierung im Bioreaktor wurde die Säure für 20 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

4.2 Lösungen für die isokratische HPLC

Bligh-und-Dyer-Lösung	Methanol : Chloroform : H ₂ O _{reinst} (10:5:4, v/v)
Eluent	Acetonitril (80 %, v/v, in H ₂ O _{reinst})
Kationen-HPLC-Eluent	2 mM Weinsäure, 0,5 mM Dipicolinsäure (in H ₂ O _{reinst})
Anionen-HPLC-Eluent (1)	2 mM Phthalsäure, 7,6 % Aceton (v/v) (in H ₂ O _{reinst})
Anionen-HPLC-Eluent (2)	6 mM 4-Hydroxybenzoesäure (in H ₂ O _{reinst})
Ectoin-Standard	1 mM Ectoin in 80 % Acetonitril
Hydroxyectoin-Standard	1 mM Hydroxyectoin in 80 % Acetonitril
Trehalose-Standard	1 mM Trehalose in 80 % Acetonitril
Betain-Standard	1 mM Betain in 80 % Acetonitril
K ⁺ -Standard	1 mM KCl in Kationen-HPLC-Eluent
Na ⁺ -Standard	1 mM NaCl 99,99 Suprapur in Kationen-HPLC-Eluent
Cl ⁻ -Standard	1 mM NaCl 99,99 Suprapur in Anionen-HPLC-Eluent (1)
Mg ²⁺ -Standard	1 mM Mg ₂ Cl ₂ in Kationen-HPLC-Eluent
Ca ²⁺ -Standard	1 mM Ca ₂ Cl ₂ in Kationen-HPLC-Eluent
PO ₄ ³⁻ -Standard	1 mM Na ₂ PO ₄ in Anionen-HPLC-Eluent (2)

Kationen-HPLC-Eluent

300,15 mg Weinsäure (wasserfrei) und 83,55 mg Dipicolinsäure wurden in 1 L H₂O_{reinst} gelöst.

Anionen-HPLC-Eluent (1) für Chloridionen-Analytik

332,26 mg Phtalsäure und 95 mL 80 % Aceton (v/v) wurden in 905 mL H₂O_{reinst} gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert durch die definierte Zugabe von NaOH auf pH 5 justiert.

Anionen-HPLC-Eluent(2) für Phosphationen-Analytik

828,72 mg 4-Hydroxybenzoesäure und 250 mg LiOH wurden in 1 L H₂O_{reinst} gelöst. Das Eluent war dann auf einen pH-Wert von pH 8 justiert.

4.3 Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten**4.3.1 Puffer und Lösungen für den Zellaufschluss und Proteinaufreinigung****Resuspensionspuffer**

Für diesen Puffer wurden 1,211 g Tris und 14,61 g NaCl in 500 mL H₂O_{reinst} gelöst (20 mM Tris, 500 mM NaCl). Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt. Dieser Puffer wurde lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gelagert.

Lysozym-Stammlösung

10 mg Lysozym wurden in 1 mL H₂O_{reinst} gelöst und bis zur Verwendung bei -25 °C gelagert.

SDS-Lösung (10 %)

Zur Herstellung einer 10 %igen SDS Lösung wurden 10 g SDS in 100 mL H₂O_{reinst} gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

MgCl₂-Stammlösung

1,016 g MgCl₂*6 H₂O wurden in 100 mL H₂O_{reinst} gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

DNase I-Stammlösung

10 mg DNase I wurden in 1 mL H₂O_{reinst} gelöst. Es wurde darauf geachtet, dass die Enzymlösung nicht zu stark geschüttelt wird, da das Enzym durch mechanischen Stress inaktiviert werden kann. Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei -25 °C gelagert.

4.3.2 Puffer und Lösungen für die Proteinfällung**Gesättigte Ammoniumsulfat-Fällung**

7,54 g (NH₄)₂SO₄ wurden mit 10 mL H₂O_{reinst} in einem 15 mL-Reaktionsgefäß versetzt. Der Ansatz blieb im Wärmeschrank bei 70 °C bis der Großteil des (NH₄)₂SO₄ gelöst hat. Die Festsubstanz musste partiell ungelöst bleiben, als Zeichen der Übersättigung der Lösung. Vor der Verwendung wurde der Ansatz auf mindestens 4 °C abgekühlt.

Dialyse-Puffer

Zur Herstellung von 1 L 50 mM Tris-Dialysepuffers wurden 6,057 g Tris in 1 L H₂O_{demin} gelöst.

4.3.3 Puffer und Lösungen für die Proteinquantifizierung**BSA-Stammlösung**

Für die BSA-Stammlösung wurden 500 mg pro 1 mL in H₂O_{reinst} gelöst (Lagerung bei -25 °C).

4.3.4 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Denaturierender und Reduzierender Probenpuffer (vierfach konzentriert; 4xRSB, engl. *reducing sample buffer*) (Schägger, 2006)

Für diesen Puffer wurden 240 mg SDS, 120 μ L β -Mercaptoethanol, 600 mg Glycerol, 1 mg Coomassie Blue G250, 36,34 mg Tris und 46 μ L 6 M HCl in einem 2 mL MRG vereinigt und auf 2 mL mit H_2O_{reinst} aufgefüllt. Dies ergibt 2 mL RSB mit 12 % SDS, 6 % β -Mercaptoethanol, 30 % Glycerol, 0,05 Coomassie Blue G250 und 150 mM Tris/HCl. Dieser Puffer wurde bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bei der Verwendung wurde der 4xRSB durch die Zugabe von Probe und H_2O_{reinst} auf ein Viertel verdünnt.

APS-Lösung (10 %)

Zur Herstellung einer 10 %igen APS-Lösung wurden 50 mg Ammoniumperoxodisulfat in ein 1,5 mL-MRG eingewogen und in 500 μ L H_2O_{reinst} gelöst. War das APS durch Schütteln gelöst, konnte die Lösung direkt verwendet werden. Wurde die Lösung nicht verwendet, war sie bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ zu lagern und maximal einen Monat verwendbar.

SDS-Lösung (10 %)

Zur Herstellung einer 10 %igen SDS Lösung wurde 10 g SDS in 100 mL H_2O_{reinst} gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Laufpuffer für die Glycin-SDS-PAGE (zehnfach konzentriert)

Es wurden 30,3 g Tris, 1,44 g SDS und 10 g SDS in 1 L H_2O_{reinst} über Nacht bei Raumtemperatur gelöst. Dies ergab einen zehnfach konzentrierten Laufpuffer (250 mM Tris, 1,92 M Glycin und 1 % SDS). Ein Teil des Puffers wurde für die Verwendung auf ein Zehntel verdünnt. Er wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Sammelgelpuffer für die Glycin-SDS-PAGE (0,5 M Tris)

12,1 g Tris wurden in 200 mL H_2O_{reinst} gelöst (pH 6,8 ohne Justierung) und bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert.

Trenngelpuffer für die Glycin-SDS-PAGE (1,5 M Tris)

36,34 g Tris wurden in 200 mL H_2O_{reinst} gelöst (pH 8,8 ohne Justierung) und bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert.

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung für die Tris-Glycin-SDS-PAGE

9,8 mL Acrylamid-Lösung (40 %) wurden mit 4 mL Bisacrylamid-Lösung (2 %) vermischt und auf 20 mL mit H_2O_{reinst} aufgefüllt.

Kathodenpuffer (zehnfach konzentriert) für Tricin-SDS-PAGE

51,57 g Tricin, 34,87 g Tris, 2,88 g SDS wurden abgewogen, vereinigt und in 288 mL H_2O_{demin} gelöst. Dies ergab einen Kathodenpuffer mit 1 M Tricin, 1 M Tris und 1 % SDS. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert. Für die Verwendung wurde ein Teil dieses Puffers auf ein Zehntel verdünnt.

Anodenpuffer (zehnfach konzentriert) für Tricin-SDS-PAGE

121,14 g Tris wurden in 1 L H_2O_{demin} gelöst. Dann wurden unter Rührung vorsichtig 37,5 mL 6 M HCl hinzugegeben. Dies ergab etwa 1 L Anodenpuffer mit 1 M Tris und 0,225 M HCl. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert. Für die Verwendung wurde ein Teil dieses Puffers auf ein Zehntel verdünnt.

AB-6-Lösung (49,5 %T; 6 %C) für Tricin-SDS-PAGE

Für 100 mL dieser Lösung wurden 46,5 g Acrylamid und 3 g Bisacrylamid als Festsubstanz abgewogen, vereint und in 50,5 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

AB-3-Lösung (49,5 %T; 3 %C) für Tricin-SDS-PAGE

Für 100 mL dieser Lösung wurden 4,8 g Acrylamid und 0,15 g Bisacrylamid als Festsubstanz abgewogen, vereint und in 5,05 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Gel-Puffer (dreifach konzentriert) für Tricin-SDS-PAGE

Es wurden 14,54 mg Tris und 360 mg SDS in 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst. Dann wurden unter Rührung vorsichtig 20 mL 6 M HCl hinzugegeben. Dies ergab 120 mL dreifach konzentrierten Gelpuffer mit 1 M Tris, 1 M HCl und 0,3 % SDS (ca. pH 8,45). Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert. Dieser Puffer wurde für die Verwendung nicht verdünnt.

Coomassie-Färbelösung

Die Färbelösung zum Einfärben von Polyacrylamid-Gelen beinhaltete 17 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/v), 34 % Methanol (v/v), 0,5 % Essigsäure (v/v) und 0,1 % Coomassie-Blau G250 (w/v). Sie wurde bei 4 °C gelagert.

4.4 Puffer und Lösungen für Vitrifikationsexperimente**LDH-Stammlösung**

Für diese Stammlösung wurden 1 mg lyophilisierte L-Lactatdehydrogenase (*rabbit muscle*) in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (1 mg/ml).

Pyruvat-Lösung

22,2 mg Pyruvat wurden kurz vor der LDH-Aktivitätsbestimmung in 2 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (10 mM) und sofort verwendet. Reste der Lösung wurden verworfen.

NADH-Lösung

10,64 mg NADH wurden kurz vor der LDH-Aktivitätsbestimmung in 2 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (7,5 mM) und sofort verwendet. Reste der Lösung wurden verworfen.

PBS-Puffer (pH 7,5) für die Rehydrierung Solut-stabilisierter LDH

1,91 g PBS-Festsubstanz wurden in 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst. Der pH-Wert war automatisch auf pH 7,5 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur temperiert.

Ectoin-Stammlösung für Vitrifikationsexperimente

Es wurden 284,4 mg Ectoin in einem 2 mL-MRG eingewogen und in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (2 M). Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Hydroxyectoin-Stammlösung für Vitrifikationsexperimente

Es wurden 316,32 mg Hydroxyectoin in einem 2 mL-MRG eingewogen und in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (2 M). Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Hydroxyectoin-Glutamat-Stammlösung für Vitrifikationsexperimente

Es wurden 316,32 mg Hydroxyectoin und 101,62 mg Kalium-Glutamat in einem 2 mL-MRG eingewogen und in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (2 M Hydroxyectoin und 500 mM Kalium-Glutamat). Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Glutamat Stammlösung für Vitrifikationsexperimente

Es wurden 406,48 mg Kalium-Glutamat in einem 2 mL-MRG eingewogen und in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (2 M). Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Trehalose-Stammlösung für Vitrifikationsexperimente

Es wurden 756,66 mg Trehalose in einem 2 mL-MRG eingewogen und unter leichter Erwärmung in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (2 M). Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Saccharose-Stammlösung für Vitrifikationsexperimente

Es wurden 684,6 mg Saccharose einem 2 mL-MRG eingewogen und unter langem Schütteln in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (2 M). Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Gelatine-Stammlösung für Vitrifikationsexperimente

Es wurden 1 mg Gelatine (*porcine skin*, Typ A, Puder) in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ kurz vor dem Versuchsstart gelöst. Nach dem Versuch wurde diese Lösung nicht weiter verwendet. Gelatine vom Typ A wurde kommerziell bezogen. Die Typ-Bezeichnung bezieht sich bei Gelatine Typ A auf die Gewinnung des Ausgangsmaterials durch sauren Aufschluss unlöslichen Kollagens.

BSA-Stammlösung für Vitrifikationsexperimente

Die oben angegeben BSA-Stammlösung 500 mg/mL wurde auf 1 mg/mL mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ verdünnt. Diese Lösung wurde kurz vor dem Versuch angesetzt und danach nicht weiter verwendet.

4.5 Puffer, Lösungen und Suspensionen der Biosensorik**Lagerungspuffer für Referenzelektroden (3 M KCl)**

Es wurden 2,237 g KCl eingewogen in ein 100 mL Becherglas gegeben und in 10 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst (3 M). Das Becherglas wurde mehrfach mit Parafilm verschlossen (mit Einlassungen für die Referenzelektroden) und stets bei 4 °C gelagert.

PBS-Puffer (Mess- und Suspensionspuffer)

Es wurden 1,91 g fertige PBS-Festschubstanz in 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst. Der pH-Wert wurde mit 12 M HCl auf pH 5,9 eingestellt (2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 136,9 mM NaCl und 8,9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$). Für bestimmte Anwendungen wurde an diesem Puffer keine nachträgliche pH-Justierung vorgenommen, so dass der PBS-Puffer einen pH-Wert von pH 7,5 hatte. Jeder PBS-Puffer wurde bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur temperiert. Die Sauerstoff-freie Variante dieses Puffers wurde durch einstündige Ultraschallbadbehandlung und simultanem Unterdruck entgast und anschließender Spülung mit gasförmigem N_2 gesättigt.

 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 -Puffer

Für diesen Puffer wurden 1,742 g K_2HPO_4 und 1,361 g KH_2PO_4 eingewogen und in 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst. Der pH-Wert wurde durch H_2PO_4 und NaOH auf pH 7,2 eingestellt.

Kaliumhexacyanoferrat II und III -Stammlösung (100 mM)

Für diese Stammlösung wurden 3,68 g Kaliumhexacyanoferrat(II) und 3,29 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 100 mL KH_2PO_4 - K_2HPO_4 -Puffer (pH 7,2 ohne Justierung) gelöst. Diese Stammlösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert und für die Messung im gleichen Puffer auf 5 mM verdünnt.

GOD-Lösung (10 mg/mL)

Es wurde 1 mg Glucose-Oxidase (*Aspergillus niger*, Typ VII) wurde für die Adsorption an MWCNT und für die Immobilisation per Einschluss in 100 µL PBS-Puffer (pH 5,9) und für die chemische Kopplung durch EDC/NHS alternativ in 100 µL MES-Puffer (pH 7) gelöst. Diese Lösungen wurden an jedem Versuchstag an dem sie benötigt wurde frisch angesetzt. Reste der Lösung wurden nicht weiterverwendet.

MWCNT-Stammsuspension in Ethanol

Es wurden 10 mg mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren in ein 2 mL-MRG gegeben. Hinzu kam 1 mL unvergälltes Ethanol (96 %). Das geschlossene MRG wurde zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um die Kohlenstoffnanoröhren zu suspendieren. Die Suspension wurde bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

MWCNT-Stammsuspensionen in PBS

Es wurden 10 mg mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren in ein 2 mL MRG gegeben. Hinzu kam 1 mL PBS-Puffer (pH 5,9). Das geschlossene MRG wurde zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um die Kohlenstoffnanoröhren zu suspendieren. Die Suspension wurde bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

MWCNT-Suspension für die Elektrodenmodifikation (unmodifiziert und Solut-modifiziert)

Diese Suspensionen wurden für jeden Versuchstag frisch angesetzt und danach nicht weiter verwendet. Die 100 µL 10 mg/mL MWCNT-Stammlösung in Ethanol bzw. PBS-Puffer wurde in einem separaten 2 mL-MRG durch Zugabe von 400 µL des jeweils gleichen Suspensionsmittel auf eine 2 mg/mL MWCNT verdünnt. Bedingt durch den chemischen Charakter waren die hydrophoben MWCNT schneller und feiner in Ethanol suspendiert als in wässriger Lösung. Vor allem die feinere Verteilung der MWCNT war entscheidend für die Konstruktion eines elektrochemischen Biosensors. Wässrige Suspensionen hatten hingegen den Vorteil, dass sie sich während der Präparation schonender auf biologische Komponenten auswirkten. Für die Modifikation des technischen Elektrodenmaterials wurden bestimmte MWCNT-Suspensionen zusätzlich mit kompatiblen Soluten vermischt, um die Adsorption dieser Additive an MWCNT zu ermöglichen. Für die Modifikation wurden submolare Konzentrationen eingesetzt, da solche Konzentrationen noch die Herstellung fest adsorbierter MWCNT-Matrizes zuließen. Im Fall von Solut-modifizierten MWCNT-Ansätzen enthielt das MRG für die Verdünnung zusätzlich 14,22 mg Ectoin (200 mM), 15,816 mg Hydroxyectoin (200 mM) oder 15,816 mg Hydroxyectoin und 5,081 mg Kalium-Glutamat (200 mM Hydroxyectoin, 50 mM Kalium-Glutamat). Das geschlossene MRG wurde zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um die Kohlenstoffnanoröhren zu suspendieren. Bis zur Verwendung wurden diese Suspensionen bei Raumtemperatur gelagert.

50 mM MES-Puffer (pH 5,5 bzw. pH 7)

Es wurden 488,1 mg MES eingewogen und mL H₂O_{reinst} gelöst (50 mM). Der pH-Wert wurde mittels NaOH/HCl auf pH 5,5 bzw. pH 7 justiert. Dieser Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Kopplungspuffer (EDC-NHS-Lösung)

Für die Herstellung des Kopplungspuffers wurden EDC und NHS in zwei separate 1,5 mL-MRG eingewogen und entsprechend viel 50 mM MES-Puffer (pH 5,5) zugegeben, um jeweils eine Konzentration von 100 mM EDC bzw. 100 mM NHS zu erhalten. Das Volumen pro Lösung betrug stets weniger als 1 mL. Nach der Lösung von EDC und NHS wurden beide Lösungen in einem 2 mL MRG zu gleichen Volumenteilern vermischt, um eine Lösung mit 50 mM EDC, 50 mM NHS und 50 mM MES (pH 5,5) zu erhalten. Diese Kopplungslösung wurde stets kurz vor ihrer Verwendung angesetzt, danach sofort verwendet und Reste verworfen.

1 M Glucose-Stammlösung

360 mg Glucose wurden in 1770 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst, um 2 mL einer 1 M Glucoselösung zu erhalten. Die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur liegen gelassen, damit sich das Gleichgewicht zwischen α -D-Glucopyranose und β -D-Glucopyranose durch Mutarotation einstellen kann. Danach wurde die Lösung bei 4 °C gelagert (diese Glucoselösung wurde nicht autoklaviert).

Piranha-Lösung für die Reinigung von Goldstabelektroden

Die Herstellung dieser Lösung wurde innerhalb eines Abluftsystems und mit entsprechender Schutzkleidung durchgeführt. Pro Elektrodenreinigungsprozess wurden in einem 100 mL Becherglas 3 mL konzentrierte Schwefelsäure mit 1 mL H_2O_2 (35 %) versetzt. Darin konnten bis zu 12 Goldstabelektroden simultan gereinigt werden. Diese Lösung wurde stets frisch angesetzt.

5 Präparative Methoden**5.1 Zellernte**

Zur Gewinnung der Biofeuchtmasse wurden 385 mL (maximal) Flüssigkulturen in 500 mL-Zentrifugenbecher gefüllt und austariert. Diese wurden in einer BECKMANN-Zentrifuge (Avanti™, J-20 XP) mit eingesetztem Ja-10-Rotor bei 8500 rpm (12785 g) und 20 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Entfernen von Medienrückständen wurde das gewonnene Zellpellet auf Nitrocellulosefiltern (Whatman, Maidstone, England) gleichmäßig verteilt und nach kurzer Zeit (2 bis 3 min) in eine 2 mL-MRG überführt, verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei -25 °C gelagert. Für proteinbiochemische Arbeiten wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase und für die Untersuchung des intrazellulären Gehalts an löslichen Protektiva in der stationären Wachstumsphase geerntet.

5.2 Auswaschen von Salzen aus den geernteten Zellen

Generell wurde bakterielle Biofeuchtemasse nicht durch das Auswaschen von Medienbestandteilen oder Salzen präpariert. Dies traf nur für ein spezielles Experiment der Proteinhitzefällung zu (Kapitel V5.7.2.3). Dazu wurde wie unter Kapitel V5.1 beschrieben Zellmaterial einer 10 mL *H. elongata*-Kultur in MM63-10 % NaCl abgeerntet und das Zellmaterial in 10 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert und für 1 min bei 20 °C darin gewaschen. Anschließend wurde das Zellmaterial bei 4 °C für 20 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge des Typs 5415 R (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde wie unter Kapitel V5.7.1 beschrieben verwendet (Zellaufschluss und darauffolgende Hitzefällung).

5.3 Lyophilisierung für die Gewinnung von Biotrockenmasse (Gefriertrocknung)

Für die Untersuchung des intrazellulären Gehalts an löslicher Protektiva wurden die Biofeuchtmasse aus Flüssigkulturen zunächst bei -25 °C eingefroren. Anschließend wurden die das Zellmaterial enthaltenden Behältnisse an ihrer Öffnung mit Parafilm verschlossen und die so geschaffene Abdeckung mit einigen Nadelstichen perforiert. Die Behältnisse wurden im Anschluss in die nach Herstellerangaben vorgekühlten Gefriertrocknungsanlage (Alpha I-6, Heraeus-Christ) gestellt und die Vakuumkammer verschlossen. Nach dem Erreichen eines Feinvakuums von $0,05\text{ mbar}$ wurde die Heizplatte innerhalb der Vakuumkammer auf 30 °C temperiert. Der gesamte Lyophilisationsprozess dauerte etwa 18 bis 20 h. Die Methode wurde insbesondere für größere Mengen Zellmaterials verwendet.

5.4 Trocknung im Vakuumkonzentrator für die Gewinnung von Biotrockenmasse

Wurden Organismen bei höheren Salinitäten angezogen (etwa ab 10% NaCl) wurde für die Gewinnung der Biotrockenmasse der Vakuumkonzentrator (SpeedVac) verwendet. Das verwendete System bestand aus der Vakuumkammer mit integrierter Steuereinheit (Rotations-Vakuumkonzentrator, RVC 2-25 CD plus, Christ, Osterode am Harz), einer Kühlfalle (02-SR50, Christ, Osterode am Harz) sowie einer Membranpumpe (KNF Laboport chemisch-resistente Laborpumpe mit modularem Zubehör, KNF Neuberger GmbH, Freiburg).

Das Gerät wurde für 15 min eingefahren. Anschließend wurden für die Trocknung des Zellmaterials 45 °C als Betriebstemperatur und ein Grobvakuum von 10 mbar eingestellt. Die Proben wurden in die Vakuumkammer gegeben und das System gestartet. Sie rotierten bei niedriger Drehzahl (etwa 1000 rpm) im Vakuumkonzentrator für 8 h. Empirisch wurde im Rahmen der Arbeit verifiziert, dass diese alternative Trocknungsmethode im Vergleich zur Gefriertrocknung keinen verändernden Einfluss auf die Solutkonzentration in den Zellen hatte. Der Nachteil war allerdings die stärkere Limitierung an Biomasse, die in einem Durchlauf getrocknet werden kann.

5.5 Mikroextraktion nach Bligh und Dyer (Bligh und Dyer, 1959)

Lyophilisiertes oder im Vakuumkonzentrator getrocknetes Zellmaterial wurde fein gemörsert. Vom pulverförmigen Zellmaterial wurden 30 mg abgewogen und in ein $1,5\text{ mL}$ -MRG gegeben. Weitere Arbeiten mit geöffnetem MRG wurden an der Abluftanlage durchgeführt. Es wurden $500\text{ }\mu\text{L}$ Bligh-Dyer-Lösung hinzugegeben. Diese bestand aus 10 Volumenteilen Methanol, 5 Volumenteilen Chloroform und 4 Volumenteilen $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$. Der Ansatz wurde für 5 min im Kreisschüttler bei Raumtemperatur vermischt. Es musste darauf geachtet werden, dass es nicht zu Bildung unlöslicher Agglomerate des Zellmaterials kommt. Anschließend wurden $130\text{ }\mu\text{L}$ Chloroform und $130\text{ }\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ hinzugegeben. Der Ansatz wurde für weitere 5 min im Kreisschüttler vermischt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min in der Tischzentrifuge des Typs 5415 R (Eppendorf, Hamburg) bei 10.000 rpm (9.280 g) zentrifugiert. Daraus resultierte eine Phasentrennung des Stoffgemisches. Die obere Phase ist die wässrige Methanolphase, welche die löslichen Bestandteile der Zellen enthält. Sie wurde vorsichtig abpipettiert und in einem weiteren $1,5\text{ mL}$ -MRG bis zur weiteren Verwendung bei mindestens 4 °C verwahrt.

5.6 Solutextraktion und Probenvorbereitung für die ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektroskopie

Zunächst wurde identisch nach der Mikroextraktion verfahren, wie sie im Kapitel V5.5 beschrieben ist. Dieses Verfahren wurde hier für mindestens 1 g trockenen Zellmaterials durchgeführt. Dies erfolgte durch die Aufteilung des Zellmaterials in mehrere Aliquote in 1,5 mL-MRG. Wurden pro MRG mehr als 30 mg eingewogen, mussten die Blich-Dyer-Lösung (500 µL pro 30 mg trockenen Zellmaterials) im ersten Extraktionsschritt sowie Chloroform und Wasser (130 µL pro 30 mg trockenen Zellmaterials) im zweiten Extraktionsschritt entsprechend angepasst werden. Die nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommenen Methanolphasen wurden in einem 100 mL Becherglas vereinigt. Bei Raumtemperatur und Abluft verdampften Wasser und Methanol für etwa 24 bis 48 h. Die verbleibende Festsubstanz der Extraktion wurde für die NMR-Spektroskopie vorbereitet. Dazu wurde zu dieser Festsubstanz 1 mL hochreines D₂O (schweres Wasser) hinzugeben. Die Festsubstanz wurde unter vorsichtigem Pipettieren (Vermeidung der Schaumbildung) im D₂O gelöst. In einem 2 mL-MRG wurden 5 mg NaTMSP (Natriumtrimethylsilylpropionat) eingewogen (erster, interner Standard). In dieses MRG wurde nun das im D₂O gelöste Zellextrakt überführt. In dasselbe MRG wurden nun 10 µL 100 %iges Acetonitril (v/v) hinzugegeben (zweiter, interner Standard). Die Lösung wurde mittels Vortex geschüttelt. Anschließend wurde sie in ein NMR-Probenröhrchen (Norell, Inc., Landsville, USA) überführt, verschlossen und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

5.7 Präparationsmethoden der Proteinbiochemie

5.7.1 Zellaufschluss und Gewinnung des löslichen Gesamtzellproteins

Für proteinbiochemische Untersuchungen wurden Zellen in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet (Kapitel V5.1). Sämtliche weitere Arbeiten wurden unter Kühlung durch *Crushed Ice* durchgeführt. Zu gewonnenem Zellmaterial aus 10 mL Bakterienkultur wurden 200 µL Resuspensionspuffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl), 2 µL Lysozym-Stammlösung hinzugegeben und mittels Vortex darin suspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 30 min auf Eis gelagert und zwischenzeitlich gemischt. Es wurden 10 µL 10 % SDS hinzugegeben und die Zellsuspension weitere 30 min auf Eis inkubiert. Sofern die Proteine in einem späteren Verfahren gefällt werden sollten (Kapitel V5.7.2) entfiel die Zugabe von SDS zunächst und wurde erst nach abgeschlossener Hitze-Proteinfällung vorgenommen. Im Anschluss wurden 1 µL MgCl₂-Stammlösung und 2 µL DNase-Stammlösung hinzugegeben und der Ansatz weitere 1 bis 2 h auf Eis inkubiert. Die Proben wurden für 30 min bei -25 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden sie dreimal im Eis gekühlten Ultraschallbad behandelt und zwischenzeitlich durchmischt. Zelltrümmer der lysierten Probe wurden im Anschluss in einer auf 4 °C gekühlten Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) für 30 min bei 15682 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 mL-MRG überführt und bis zur weiteren Verwendung am gleichen Versuchstag Eis gekühlt gelagert.

5.7.2 Proteinfällungsmethoden

Zur Untersuchung der Isolierbarkeit und der Expression sehr hydrophiler und hitzestabiler Proteine in *E. coli* und *H. elongata* wurden verschiedene Fällungsmethoden angewendet. In diesen Fällungsmethoden wurden Lösungen von isoliertem Gesamtzellprotein als Ausgangsmaterial verwendet. Dessen Gewinnung wird in Kapitel V5.7.1 beschrieben. Es wurde darauf geachtet, dass dabei kein SDS bei der Isolierung des löslichen Gesamtzellproteins verwendet wurde.

5.7.2.1 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung des Gesamtzellproteins

Das Aussalzen von Proteinen durch Ammoniumsulfat beruht auf der Konkurrenz der Salzionen und der Proteine um solvatisierende Wassermoleküle. Je höher die Ammoniumsulfatkonzentration ist, umso weniger solvatisierende Wassermoleküle stehen den Proteinen zur Verfügung und sie beginnen auszufallen. Bei schrittweise ansteigender Ammoniumsulfatkonzentration fallen hydrophobere Proteine als erstes aus. Hydrophilere Proteine fallen als letztes aus, da sie am stärksten mit solvatisierenden Wassermolekülen wechselwirken. Demnach sollten gesuchte, stark hydrophile Proteine erst in einer sehr späten Fraktion zu finden sein.

Für diese Fällungsmethode wurde die Isolierung von Gesamtzellprotein aus 50 mL Kultur vorgenommen, um 1 mL Gesamtzellproteinlösung zu erhalten (Kapitel V5.7.1). Die entstandenen Proben wurden permanent durch Eis gekühlt. Die Proteinlösung (1 mL) wurde in einem 2 mL MRG mit 1 mL gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde gevortext und ein Teil der gelösten Proteine fiel aus (über 5 min). Anschließend wurde die Probe in der auf 4 °C gekühlten Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) für 30 min bei 15682 *g* abzentrifugiert. Das Präzipitat bildete Fraktion A (ausgefälltes Protein bei 50 % der Ammoniumsulfatfällung). Der Überstand wurde abgenommen und 1 mL davon in ein neues 2 mL-MRG überführt. Zu diesem Überstand wurde erneut 1 mL gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gegeben. Das Gemisch wurde gevortext und ein weiterer Anteil der gelösten Proteine fiel aus (über 5 min). Anschließend wurde die Probe wiederum in der auf 4 °C gekühlten Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) für 30 min bei 15682 *g* abzentrifugiert. Das neue Präzipitat bildete Fraktion B (ausgefälltes Protein bei 75 % der Ammoniumsulfatfällung). Der Überstand wurde wiederum abgenommen und 1 mL davon in ein neues 2 mL-MRG überführt. Zu diesem Überstand wurde 0,180 mg Ammoniumsulfat gegeben, um eine 100 %ige Ammoniumsulfatsättigung zu erreichen. Das Gemisch wurde gevortext und ein weiterer Teil der gelösten Proteine fiel aus (über 5 min). Anschließend wurde die Probe wiederum in der auf 4 °C gekühlten Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) für 30 min bei 15682 *g* abzentrifugiert. Das neue Präzipitat bildet Fraktion C (ausgefälltes Protein bei 100 % der Ammoniumsulfatfällung). Der Überstand wurde abgenommen und 1 mL davon in ein neues 2 mL-MRG gegeben. Dieser Überstand bildete Fraktion D (lösliches Protein bei 100 % der Ammoniumsulfatfällung). Fraktion A bis C wurden mit Dialysepuffer auf 1 mL aufgefüllt und darin gelöst. Im Anschluss wurden die Fraktionen A bis D dialysiert, um den Gehalt an Ammoniumsulfat in den Proben signifikant zu verringern. Dazu wurden die Proben in ein Stück Dialyseschlauch (ZelluTrans, Roth) überführt und verschlossen. Die im Dialyseschlauch befindlichen Proben wurden in ein Behältnis mit 1 L Dialysepuffer gegeben und über 15 h bei 4 °C unter langsamer Rührung dialysiert. Dieser Dialyseschritt wurde für weitere 5 h und mit neuem Dialysepuffer wiederholt. Darauf folgte der zweite Wechsel des Dialysepuffers, worauf die Proben für weitere 5 h dialysiert wurden. Im Anschluss wurden die Proben in neue 2 mL-MRG überführt und bis zur weiteren Verwendung Eis gekühlt gelagert.

5.7.2.2 Fraktionierte Fällung mit organischen Lösungsmitteln

Organische Lösungsmittel (wie Methanol und Aceton) sind mit Wasser beliebig mischbar. Sie können ebenfalls die Solvationskraft gelöster Proteine verringern. Durch die Variation der Anteile organischer Lösungsmittel in der Proteinlösung kann so eine fraktionierte Fällung erreicht werden.

Hierbei bleiben hydrophobere Proteine am ehesten gelöst. Demnach sollten stark hydrophile Proteine bereits bei kleineren Konzentrationen organischen Lösungsmittels ausfallen.

Für diese Fällungsmethode wurde die Isolierung von Gesamtzellprotein aus 100 mL Kultur vorgenommen, um 2 mL Gesamtzellproteinlösung zu erhalten (Kapitel V5.7.1). Die entstandenen Proben wurden während dieses Verfahrens permanent durch Eis gekühlt. Die Fällung durch organische Lösungsmittel fand in zwei Ansätzen statt. Dazu wurde jeweils 1 mL der Proteinlösung zwei 15 mL-Reaktionsgefäße gegeben.

Zur ersten Proteinlösung (1 mL) wurden 0,5 mL Aceton und 0,5 mL Methanol gegeben. Dieser Ansatz wurde für 20 h bei -25 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz in der auf 4 °C gekühlten Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) für 20 min bei 15682 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein 2 mL-MRG überführt. Das Präzipitat bildete Fraktion I und der Überstand Fraktion II.

Zur zweiten Proteinlösung (1 mL) wurden 2 mL Aceton und 1 mL Methanol gegeben. Dieser Ansatz wurde gleichfalls für 20 h bei -25 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz in der auf 4 °C gekühlten Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) für 20 min bei 15682 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 2 mL davon in ein 2 mL-MRG überführt. Das Präzipitat bildete Fraktion III und der Überstand Fraktion IV.

Die Fraktionen I bis IV wurden im Anschluss im Abluftsystem getrocknet. Fraktion I und III (Präzipitate) wurden für 12 h bei Raumtemperatur getrocknet. Fraktion II und IV (Überstände) wurden für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Dadurch wurden organische Lösungsmittelbestandteile aus der Probe beseitigt. Die trockenen Fraktionen I bis IV wurden anschließend in 1 mL Resuspensionpuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

5.7.2.3 Hitze-Fällung von Gesamtzellprotein

200 μL isolierte oder durch Fällung gewonnene Proteinlösung (SDS-frei!) wurden in einem 1,5 mL MRG verschlossen und für 30 min bei 90 °C im Thermoschüttler (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die ausgefällten Bestandteile der Probe wurden im Anschluss in einer auf 4 °C gekühlten Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) für 30 min bei 15682 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 mL-MRG überführt, nun mit 10 μL 10 % SDS versetzt und bis zur weiteren Verwendung am gleichen Versuchstag Eis gekühlt gelagert (mindestens jedoch 30 min).

Für einen speziellen Fall der Hitze-Fällung des Gesamtproteins wurde bakterielles Zellmaterial verwendet, aus dem die Salze ausgewaschen wurden (Kapitel V5.2). Zellmaterial derselben Kultur wurde zusätzlich als Referenz verwendet und dazu der Waschschrift ausgelassen. Der Aufschluss der Zellen sowie die Gewinnung des Gesamtzellproteins wurde wie unter Kapitel V5.7.1 durchgeführt.

Die Hitze-Fällung des Proteins verlief darauf folgend wie bereits oben beschrieben. Im Unterschied dazu wurden jedoch variierte Fällungszeiten und -temperaturen verwendet. Angewendet wurden 30 min, 1h oder 2h Hitze-Fällung bei 99 °C im Thermoschüttler (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg). Das Abzentrifugieren der ausgefällten Bestandteile, die Abnahme des Überstands sowie die weitere Präparation der Proben erfolgte anschließend wie oben beschrieben.

5.7.3 Probenpräparation für die SDS- PAGE

Bevor Proteinproben für die SDS-PAGE verwendet werden konnten, mussten sie vorbehandelt werden. Die verwendeten Proteinlösungen stammen direkt aus der Isolierung von Gesamtzellprotein, aus den Überständen hitzegefällten Gesamtzellproteins, aus Proteinfaktionen oder den Überständen hitzegefällter Proteinfaktionen (Kapitel V5.7.2). Nach Quantifizierung der Proteinkonzentration (Kapitel V6.2.1) wurde ein Teil der Proteinlösung, $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ und 4xRSB in einem 40 μL -Ansatz so zusammengemischt, dass der RSB auf ein Viertel verdünnt wurde und die Proteinkonzentration 20 μg pro 10 μL betrug. Die Proben wurden für 5 min bei 90 °C im Thermoschüttler (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nachdem die Proben abgekühlt waren, konnten sie für die SDS-PAGE verwendet werden.

5.7.4 Präparation von Polyacrylamidgelen für die diskontinuierliche SDS-PAGE

Für die Herstellung von Polyacrylamidgelen wurden dafür vorgesehene Gußkammern (bestehend aus zwei trennbaren Glasplatten) verwendet und im zugehörigen Halterungsrahmen fixiert. Das Material gehörte zum SDS-PAGE-Systems Mini-Protean III (BioRad, Hercules, Californien, USA). Bei sämtlichen Arbeiten mit Acrylamiden wurden an einem separaten Arbeitsplatz sowie mit entsprechendem Arbeitsschutz gearbeitet (aufgrund der Verwendung karzinogene Stoffe).

5.7.4.1 Herstellung von Gelen für die Glycin-SDS-PAGE

Herstellung des 13 %igen Trenngels (für 2 Gele)

Für die Herstellung von Trenngelen wurden 2,5 mL Trenngelpuffer, 6,5 mL Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung und 100 μL 10 %ige SDS-Lösung in einem 15 mL-MRG zusammengeführt. Das Gemisch wurde mit 900 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ auf 10 mL aufgefüllt. Für den Start der Polymerisationsreaktion wurden 50 μL 10 %ige APS-Lösung als Radikalstarter und 5 μL TEMED als Katalysator hinzugegeben. Die Lösung wurde vermischt und es wurden direkt etwa 3,5 mL der Lösung in die Gelkammer gegeben. Mit unvergällten, 70 %igen Ethanol (v/v) wurden die Oberfläche der noch flüssigen Trenngellösung in der Gelkammer geglättet und Luftblasen beseitigt. Anschließend wurde gewartet bis das Gel polymerisiert war. Danach wurde restliches Ethanol mit fusselfreien Papierstücken entfernt.

Herstellung des 4 %iges Sammelgels (für 2 Gel)

Für die Herstellung des Sammelgels wurden 1,25 mL Sammelgelpuffer, 1 mL Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung und 50 μL 10 %ige SDS-Lösung in einem 15 mL-MRG zusammengeführt. Das Gemisch wurde mit 2,7 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ auf 5 mL aufgefüllt. Für den Start der Polymerisationsreaktion wurden 50 μL 10 %ige APS-Lösung als Radikalstarter und 5 μL TEMED als Katalysator hinzugegeben. Die Lösung wurde gemischt und es wurden etwa 1 bis 1,5 mL der Lösung über das Trenngel in die Gelkammer gegeben. Anschließend wurde der Kunststoffkamm zur Erzeugung der Geltaschen in die Gelkammer mit der noch flüssigen Sammelgellösung gegeben. Danach wurde die Polymerisation des Gels abgewartet.

5.7.4.2 Herstellung von Gelen für die Tricin-SDS-PAGE

Für diesen PAGE-Typ wurden die Lösungen für Trenn-, Abstands- und Sammelgel separat hergestellt und nacheinander in der Gelkammer polymerisiert. Es folgt die Beschreibung zur Herstellung des Gesamtgels. Die angegebenen Volumina sind für die Herstellung von vier Gelen ausreichend.

Trenngel (16 %T, 16 M Harnstoff)

Es wurden 5 mL der AB-6-Lösung, 5 mL des dreifach konzentrierten Gelpuffers, 5,4 g Harnstoff und 1 mL H₂O_{reinst} in einem 50 mL-MRG vereinigt und solange gemischt bis sich der Harnstoff gelöst hat. Um den Harnstoff zu lösen, darf die Lösung nicht erwärmt werden. Anschließend wurden für den Polymerisationsstart 50 µL 10 %ige APS-Lösung und 5 µL TEMED hinzugeben und vermischt. Pro Gelkammer wurde die Trenngellösung eingefüllt bis sie eine Höhe von etwa 5 cm erreicht hat. Mit unvergällten, 70 %igen Ethanol (v/v) wurde die Oberfläche der Trenngellösung in der Gelkammer geglättet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das nicht verdunstete Ethanol mit fusselfreien Papierstücken entfernt.

Abstandsgel (10 %T)

Für das Abstandsgel (10 %T) wurden 1 mL AB-3-Lösung und 1,667 mL des dreifach konzentrierten Gelpuffers in einem 15 mL-MRG vereinigt und gemischt. Anschließend wurden für den Polymerisationsstart 25 µL 10 %ige APS-Lösung und 2,5 µL TEMED hinzugeben und das Lösungsgemisch vermischt. Pro Gelkammer wurde nun die Abstandsgellösung eingefüllt bis sie die Höhe von etwa 1,5 bis 2 cm erreicht hat. Mit unvergällten, 70 %igen Ethanol (v/v) wurde die Oberfläche der Abstandsgellösung in der Gelkammer geglättet. Nach Abschluss der Polymerisation wurde nicht verdunstetes Ethanol mit fusselfreien Papierstücken entfernt.

Sammelgel (4 %T)

Für das Sammelgel (4 %T) wurden 0,5 mL AB-3-Lösung und 1,5 mL des dreifach konzentrierten Gelpuffers in einem 15 mL-MRG vereinigt. Anschließend wurden für den Polymerisationsstart 45 µL 10 %ige APS-Lösung und 4,5 µL TEMED hinzugeben und die Lösung vermischt. Pro Gelkammer wurde darauf die Abstandsgellösung eingefüllt bis sie eine Höhe von etwa 1,5 cm erreicht hatte. Anschließend wurde der Kunststoffkamm zur Erzeugung der Geltaschen in die Gelkammer mit der noch flüssigen Sammelgellösung gegeben und es wurde gewartet bis die Polymerisation abgeschlossen war.

5.8 Hydrolyse von Polyphosphaten

Die Möglichkeit zur Detektion von Polyphosphaten via Anionen-HPLC war nur durch die Hydrolyse der Polyphosphate und der anschließenden Detektion der erhöhten Konzentration einzelner Phosphate möglich. Um im Zellextrakt (Kapitel V5.5) enthaltene Polyphosphate nachzuweisen wurden 100 µL des Zellextrakts in ein 1,5 mL-MRG gegeben, verschlossen, mit Parafilm abgedichtet und für 5 Tage bei 60 °C im Thermoschüttler (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Proben gevortext um kondensierte Flüssigkeit am MRG-Deckel mit der Probe zu vereinen. Zusätzlich fand eine Gewichtskontrolle statt, um einen Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung ausschließen zu können. Anschließend wurde der Gehalt von Orthophosphat wie unter Kapitel V6.5 beschrieben durchgeführt.

5.9 Präparation künstlicher Solutmatrizes für die Mikroskopie und Nanoindentation

Für die Erzeugung solcher Solutmatrizes wurden 2 M Lösungen der zu untersuchenden Solute in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ hergestellt (Ausnahme: 2 M Hydroxyectoin inklusiv 0,5 M Kalium-Glutamat). Es wurden jeweils 3 μL auf ein etwa 4 cm^2 Polystyrolstück pipettiert und im Heizschrank (Ecocell MMM Medenter Einrichtung GmbH) bei 60 °C für 2 h luftgetrocknet. Bei dieser Temperatur findet eine schnelle Trocknung statt.

Für die Untersuchung der mechanischen Kenngrößen (Elastizitätsmodul und Härte) wurden 10 μL 2 M Hydroxyectoin- bzw. Trehaloselösung auf ein etwa 4 cm^2 großen Teflonplättchen in dafür vorgesehene Vertiefungen gegeben und bei 1, 4 und 8 Tage im Exikator mit Kieselgel gelagert. Die Herstellung von geeigneten Trehalose- und Hydroxyectoingläsern durch zweistündige Trocknung bei 60 °C war auf der eher rauen Teflonoberfläche nicht möglich, da dieses Verfahren bereits nach einstündiger Trocknung für Trehalose in ausgeprägten *Cracking* (Bruch- und Rissbildung) und für Hydroxyectoin in gehäufte Kristallisation resultierte.

5.10 Einschluss von Lactatdehydrogenase (LDH) in Solutmatrizes

Die stabilisierende Wirkung von potentiellen Glasbildnern wurde unter Verwendung des Modelenzym Lactatdehydrogenase (*rabbit muscle*) untersucht. Die zugehörigen Versuche wurden in 96-Well Mikrotiterplatten (96-WMP) aus Polystyrol durchgeführt. Lyophilisierte LDH und kompatible Solute waren in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ und PBS-Pufferangesetzt, um insbesondere während der Trocknung den Einfluss auskristallisierender Salze auszuschließen. Erst für die Rehydrierung und den Aktivitätstest wurde PBS-Puffer (pH 7,5) verwendet. Die Untersuchung der LDH-Stabilisierung gliedert sich in drei Experimente:

a) Untersuchung der Eigenstabilisierung der LDH

Dieser Versuch fand in vier Ansätzen statt. Die Ansätze beziehen sich auf die Variation der Enzymlösungen mit den LDH-Konzentrationen 0,05 mg/ml, 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$. (LDH-Konzentrationen <1 mg/mL wurden durch die Verdünnung der 1 mg/mL-LDH-Stammlösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ erzeugt.)

b) Untersuchung der LDH-Stabilisierung durch spezielle Proteine

Dieser Versuch fand ebenfalls in vier Ansätzen statt und die Variation der Ansätze bezog sich auf die zusätzliche Anwesenheit eines speziellen Proteins zur Stabilisierung der LDH. Jeder Ansatz enthielt 0,05 mg/mL LDH. Der erste Ansatz diente als Kontrolle und es wurde hier kein zusätzliches Protein hinzugegeben. Im zweiten Ansatz wurde die LDH-Konzentration verdoppelt. Diese wiederholte Eigenstabilisierung diente dem Vergleich zur Stabilisierung durch spezielle Proteine. Im dritten Ansatz wurde die Gesamtproteinkonzentration durch Zugabe einer äquivalenten Menge an BSA verdoppelt. Im dritten Ansatz wurde die Gesamtproteinkonzentration durch Zugabe einer äquivalenten Menge an Gelatine Typ A verdoppelt. Gelatine wird in dieser Arbeit aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung als Hydrophilin-Analog bezeichnet.

c) Untersuchung der LDH-Stabilisierung durch Solutmatrizes sowie durch Matrizes aus der Kombination von Solut und dem Hydrophilin-Analog Gelatine

Dieser Versuch gliederte sich in 14 Ansätze. Die Variation bestand in der Verwendung von kompatiblen Soluten und der Kombination von kompatiblen Soluten mit dem Hydrophilin-Analog Gelatine (*porcine skin*, Typ A) zur Stabilisierung der LDH. Jeder Ansatz enthielt eine maximale LDH-Konzentration von 0,05 mg/mL. Als Kontrolle diente unstabilierte LDH in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$. Weitere sechs Ansätze beinhalteten 0,05 mg/mL LDH-Lösungen in 1 M Trehalose, 1 M Saccharose, 1 M Ectoin, 1 M Hydroxyectoin, 1 M Glutamat sowie 1 M Hydroxyectoin inklusiv 0,25 M Glutamat. Parallel zu diesen sieben Ansätzen (inklusive Kontrolle) wurde jeweils ein identischer Ansatz unter zusätzlicher Verwendung einer zur LDH-Konzentration äquivalenten Menge des Hydrophilin-Analogs Gelatine Typ A durchgeführt. Daraus ergaben sich insgesamt die 14 Ansätze.

Standard-Protokoll der LDH-Stabilisierungsexperimente

Es folgt die Beschreibung, wie in den Experimenten a, b und c verfahren wurde. Vom zu untersuchenden Ansatz wurden 10 μL der LDH-Lösung (modifiziert oder unmodifiziert) vorsichtig und präzise in die Mitte eines Wells platziert. Es wurde darauf geachtet, dass sämtliche Tropfen möglichst die gleiche Form aufweisen, um den Trocknungsverlauf der LDH-Lösungen pro Well möglichst konstant zu halten. Dies wurde für jeden Ansatz sechsfach durchgeführt.

Auf diese Weise wurden pro Versuch (Experiment a, b und c) zeitgleich vier 96-WMP bestückt. Die erste 96-WMP wurde ohne Trocknung direkt für die Bestimmung der initialen LDH-Aktivität genutzt und vermessen (Kapitel V6.1.2). Die drei verbleibenden 96-WMP wurden jeweils für 2h, 4h bzw. 6 h bei 60 °C im Heizschrank (Ecozell MMM Medenter Einrichtung GmbH) luftgetrocknet. Nach Ablauf der Trocknungszeit wurde die jeweilige 96-WMP dem Heizschrank entnommen. Im Anschluss fand die Rehydrierung der Ansätze dieser 96-WMP bei 25 bis 27 °C (nach Angabe des Plattenlesegeräts) sowie die Bestimmung der verbleibenden LDH-Aktivität statt (Kapitel V6.1.2).

5.11 Präparationsmethoden für die Biosensorik

Sämtliche biosensorische Präparationsarbeiten wurden am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Forschung in Potsdam-Golm durchgeführt; mit Ausnahme der Rekonstruktion von Biosensorkompositen für REM-Aufnahmen (Kapitel V6.7.2), welche am IfMB Bonn durchgeführt wurden.

5.11.1 Elektrodenreinigung

Vor jeder Konstruktion eines Biosensors wurden die Goldstabelektroden gereinigt. Aufgrund der Verwendung stark reaktiver Flüssigkeiten wurden sämtliche Arbeiten während der Elektrodenreinigung mit entsprechender Schutzkleidung und innerhalb eines Abluftsystems durchgeführt. Die Goldstabelektroden wurden in ein 100 mL-Becherglas mit 4 mL Piranha-Lösung gestellt (Goldoberfläche in der Piranha-Lösung) und für 15 Minuten bei 100 °C gekocht. Es schloss sich eine 15minütige Ultraschallbadbehandlung an. Danach wurde die Piranha-Lösung durch frische 4 mL Piranha-Lösung ersetzt. Dieser Ansatz wurde weitere 15 Minuten bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurde die Goldstabelektroden in 4 mL H_2SO_4 (96 %) auf Raumtemperatur abgekühlt. Im letzten Schritt wurden die Elektroden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gewaschen und anschließend mit N_2 -Gas getrocknet. Bis zur Verwendung wurde jede Elektrode mit einem 500 μL -MRG abgedeckt.

5.11.2 MWCNT-Modifikation der Goldstabelektroden

Mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (MWCNT) wurden an die Goldoberfläche von Goldstabelektroden physikalisch adsorbiert. Die MWCNTs dienten als Transducermaterial, um die elektrische Kommunikation zwischen Enzym und Goldoberfläche zu realisieren. Zur Evaluierung der Stabilität sowie zur Untersuchung der Empfindlichkeit bezüglich eines redoxaktiven Stoffes (KHCF I und II) oder betreffend Glucose-haltiger Lösung von MWCNT-Schichten wurden MWCNT-modifizierte Elektroden ohne immobilisiertes Enzym verwendet. Die MWCNT-Beschichtungen wurden hergestellt indem 5 μL der 2 mg/mL MWCNT-Suspension (in Ethanol bzw. PBS-Puffer) auf die Goldoberfläche der Elektrode pipettiert wurde. Dabei wurde auf eine möglichst gleichmäßige Verteilung der MWCNTs geachtet. Das Lösungsmittel wurde durch Inkubation im Heizschrank bei 37 °C für 30 min verdampft. Anschließend wurde auf die gleiche Weise eine zweite MWCNT-Schicht (ebenfalls aus 5 μL 2 mg/mL MWCNT) gleichmäßig auf die erste MWCNT-Schicht aufgebracht und das Lösungsmittel im gleichen Verfahren verdampft. Danach wurden die modifizierten Elektroden mittels 500 μL -MRG verkappt und bei Raumtemperatur bis zur Vermessung gelagert.

5.11.3 Immobilisation der Glucose-Oxidase (GOD)

Diverse Immobilisationstechniken wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet, um den Elektronentransfer zwischen Enzym und Goldoberfläche zu realisieren. Dabei dienten MWCNT simultan sowohl als Transducer- als auch als Immobilisationsmaterial.

a) Adsorption

Für die Adsorption der GOD wurden Goldstabelektroden wie unter Kapitel V5.11.2 beschrieben modifiziert. Anschließend wurde 20 μL der 10 mg/mL GOD-Lösung auf die MWCNT-Schicht pipettiert. Zur Vermeidung der Verdunstung des Lösungsmittels wurden jede Elektrode mit einem 500 μL -MRG verkappt und aufrecht für 24 h bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur gelagert. Nach Ablauf der 24 h wurde der Tropfen vorsichtig abgenommen. Die nicht adsorbierte Enzymmenge wurde durch dreimaliges Waschen in je 1 mL Messpuffer (PBS-Puffer, pH 5,9) abgewaschen. Im Anschluss wurden die Elektroden zykl voltammetrisch untersucht (Ergebnis nur im Text).

b) Kovalente Kopplung

Die kovalente Kopplung basierte auf der Carbodiimid-Methode durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) zur Kopplung von Carboxylgruppen mit Aminogruppen. Das Carbodiimid EDC ist ein Aktivierungsreagenz, das Carboxylgruppen aktiviert. Diese werden durch Zugabe von NHS in einen hydrolysestabilen NHS-Ester umgewandelt, der mit der Aminogruppe (bspw. von einem Protein) reagieren kann. Für die kovalente Kopplung der GOD wurden Goldstabelektroden wie unter Kapitel V5.11.2 beschrieben modifiziert. Die Kopplung des Enzyms erfolgte an die Oberfläche der zweiten MWCNT-Schicht. Nur für die Prüfung des mediatierten Elektronentransfers wurden auf einer Elektrode 5 μL 40 mM Ferrocen (in Ethanol) auf den MWCNTs durch Trocknung bei 37 °C abgeschieden und das Enzym anschließend kovalent gekoppelt (Ergebnis für diesen einen Fall nur im Text erwähnt). Alternativ zur Kopplung an die zweite MWCNT-Schicht erfolgte die Kopplung bereits an der ersten MWCNT-Schicht, worauf die zweite MWCNT-Schicht wie unter Kapitel V5.11.3 c folgte. Im letzteren Fall handelte es sich um die kombinierte Immobilisation durch kovalente Kopplung und Einschluss.

Um das Enzym kovalent zu koppeln wurden zunächst die Carboxylgruppen der MWCNT durch 10 μL 50 mM EDC aktiviert und die aktivierten Gruppen durch 50 mM NHS gegen Hydrolyse stabilisiert. Dies geschah durch Inkubation für 15 min im Kopplungspuffer. Der Tropfen wurde anschließend vorsichtig abpipettiert und 10 μL 10 mg/mL GOD in MES (pH 7) auf die chemisch aktivierte MWCNT-Oberfläche gegeben. Die Elektrode wurde zur Vorbeugung der Verdunstung und Verunreinigung durch Staubpartikel mit einem 500 μL -MRG verkappt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Enzymlösung abpipettiert und die Elektrode dreimalig in je 1 mL Messpuffer (PBS-Puffer, pH 5,9) gewaschen. Danach konnte die zykelvoltammetrische Vermessung der Elektrode erfolgen.

c) Einschlussverfahren – Erzeugung von Bio-Nanokompositen

Für dieses Verfahren wurden zunächst 50 μL 2 mg/mL MWCNT-Suspension (unmodifiziert bzw. Solut-modifiziert, Kapitel V4.5) verwendet, wobei die MWCNTs entweder in Ethanol (96 %) und in PBS-Puffer (pH 5,9) suspendiert waren. Diese 50 μL wurden mit weiteren 50 μL des gleichen Suspensionsmittels versetzt. Dadurch halbierte sich sowohl die MWCNT-Konzentration auf 1 mg/ml als auch die Solutkonzentration (Ectoin und Hydroxyectoin auf 100 mM sowie Glutamat auf 25 mM).

Zur Umsetzung des Enzymeinschlusses wurden 10 μL von einer dieser MWCNT-Suspensionen genutzt um eine erste Schicht Kohlenstoffnanoröhren auf die Goldoberfläche der Elektrode aufzutragen und für 30 Minuten bei 37 °C einzutrocknen. Anschließend wurde diese Schicht mit 10 μL 10 mg/ml Glucose-Oxidase Lösung vollständig benetzt und wiederum für 30 Minuten eingetrocknet. Darauf folgten weitere 10 μL der MWCNT-Suspension (gleiche Suspension, die für die erste MWCNT-Schicht angewendet wurde), welche wiederum für 30 Minuten bei 37 °C eingetrocknet wurde, um eine zweite und die GOD einschließende MWCNT-Schicht zu erzeugen. Erst danach wurden die Elektroden mit einem 500 μL -MRG verkappt und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor der zykelvoltammetrischen bzw. amperometrischen Vermessung dieser Elektroden, wurden sie dreimalig in je 1 mL Messpuffer (PBS-Puffer, pH 5,9) gewaschen. In Abb. 12. sind die Elektrodenoberflächen einer unmodifizierten Elektrode (A) und nach diesem Kapitel beschriebene präparierten Elektrode (B) abgebildet.

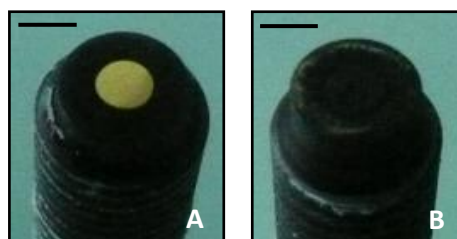


Abb. 12: Fotografische Aufnahmen einer unmodifizierten Elektrode (A) und einer Elektrode mit biokatalytisch aktivem Bio-Nanokomposit (B).

Beide Elektroden sind im trockenen Zustand abgebildet. Die modifizierte Elektrode (B) basiert auf der GOD-Immobilisierung im Einschlussverfahren (MWCNT für Präparation in PBS-Puffer). Der schwarze Balken in den fotografischen Aufnahmen entspricht in Bezug auf die Elektroden einer Länge von 2 mm.

5.11.4 Rekonstruktion von Bio-Nanokompositen des Biosensor für REM-Aufnahmen

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Biosensor-Kompositen wurde identisch verfahren wie unter Kapitel V5.11.3 c (Einschlussverfahren) beschrieben. Die Kohlenstoffnanoröhren (unmodifiziert bzw. Solut-modifiziert) waren in PBS (pH 5,9) suspendiert. Die Bio-Nanokomposite wurden jedoch nicht auf Goldstabelektroden erzeugt, sondern auf ein etwa 1 cm^2 großes und dünn mit Gold besputtertes Siliziumsubstrat aufgetragen. Bevor diese im Rasterelektronenmikroskop untersucht werden konnten, wurden sie dreimalig mit je $1 \text{ mL H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gewaschen, um Pufferbestandteile von der Oberfläche zu entfernen.

6 Analytische Methoden

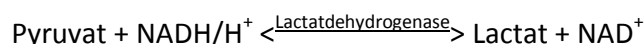
6.1 Photometrische Methoden

6.1.1 Photometrische Wachstumsbestimmung

Die Beobachtung bakteriellen Wachstums wurde durch die photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gegen das unbeimpfte Kultivierungsmedium untersucht. Dazu wurde das Photometer (Novaspec II, Pharmacia, Uppsala, Schweden) genutzt. Der speziell dafür angebrachte Seitenarm von Schüttelkolben wurde bis zu einem OD_{600} -Wert von etwa $0,5$ genutzt, um die optische Dichte der Kultur zu bestimmen. Bei höheren OD_{600} -Werten während der Kultivierung im Schüttelkolben oder Bioreaktor wurde steril ein Probe aus den Kulturen genommen, zehnfach durch steriles Kultivierungsmedium verdünnt und in einer Küvette photometrisch bei 600 nm vermessen (gegen steriles Kultivierungsmedium).

6.1.2 LDH-Stabilitätstest (Rehydrierung und Aktivitätstest)

Die Lactatdehydrogenase (LDH) gehört zu den Modellenzymen, die in enzymatischen Nachweisverfahren, Biosensoren und Stabilitätstests am häufigsten Anwendung finden. Ein Grund dafür ist der recht leicht zu beobachtende Reaktionsablauf, der von der LDH katalysierten Substratumsetzung. Das Enzym katalysiert unter physiologischen Bedingungen die Reduktion von Pyruvat zu Lactat (exergone Reaktion). Dabei wird der Cofaktor NADH/H^+ zu NAD^+ oxidiert, wie in der folgenden Reaktionsgleichung dargestellt:



Im Gegensatz zur oxidierten Form besitzt die reduzierte Form des Cofaktors neben dem gemeinsamen Absorptionsmaximum bei 260 nm einen zusätzlichen Absorptionspeak bei 340 nm . Photometrisch können so beide Formen unterschieden und die Oxidation des Cofaktors nachgewiesen werden. Aufgrund der äquivalenten Umsetzung von Cofaktor und Substrat kann indirekt die Reduktion des Pyruvats durch die Lactatdehydrogenase beobachtet werden. Die Enzymaktivität lässt sich dadurch aus der zeitabhängigen Umsetzung des NADH/H^+ über die Abnahme der photometrischen Absorption bei 340 nm berechnen.

Die Wirkung einiger bakteriell erzeugter Protektiva auf dieses Enzym wurde bereits in Bezug auf die Biostabilisierung während der Gefriertrocknung beschrieben (Lippert und Galinski, 1992). In dieser Arbeit wurde das Modellenzym LDH in Solut- bzw. Solut-Gelatine-Matrizes durch Lufttrocknung bei 60 °C eingeschlossen (Kapitel V5.10), um den Zusammenhang zwischen der Tendenz zur Glasbildung bzw. Kristallisation und derer biostabilisierenden Eigenschaften untersuchen zu können.

Die Aktivitätsbestimmung fand in separat präparierten 96-WMP statt (Trocknung für 0, 2, 4 und 6 h; Kapitel V5.10), so dass die Platten nach der Aktivitätsbestimmung nicht weiter verwendet wurden und jeweils nur die Restaktivität für eine definierte Trocknungszeit repräsentierten. Die Trocknungszeit von 0 h bezieht sich auf ungetrocknete LDH, die nicht rehydriert werden musste. Die Rehydrierung der eingeschlossenen LDH erfolgte mit raumtemperierten PBS-Puffer (pH 7,5) innerhalb von 1 bis 2 Minuten. Die photometrische Dokumentation der biokatalysierten Reaktion wurde durch ein Plattenlesegerät (infinite M 200, Tecan, Crailsheim) realisiert. Das Arbeitsvolumen pro Well betrug 200 µL und beinhaltete bei Messungsstart 1 mM Pyruvat, 0,75 mM NADH/H⁺ und 2,5 µg/mL LDH (ausgehend von 0,05 mg/mL in den initialen 10 µL-Ansätzen) im PBS-Puffer (pH 7,5). Im Versuch zur Eigenstabilisierung der LDH wurden nach der Rehydrierung aus bestimmten Wells ein definiertes Volumen abgenommen. Die betroffenen Wells beinhalteten LDH-Ausgangskonzentrationen (im 10 µL-Ansatz) von > 0,05 mg/mL. Das abgenommene Volumen wurde in weiteren Wells verdünnt, da sehr hohe Enzymkonzentrationen den Umsatz des Pyruvats zu schnell für die photometrische Untersuchung umsetzten. Durch die Verdünnung bezog sich der nachfolgende Aktivitätstest stets auf die gleiche Enzymkonzentration (2,5 µg/mL im Arbeitsvolumen von 200 µL pro Well).

6.2 Proteinbiochemische Analytik

Zu den Proteinbiochemischen Arbeiten gehören die Proteinquantifizierung sowie zwei Arten der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), welche sich hinsichtlich der verwendeten Gele und der Leitionen im Laufpuffer unterscheiden (Glycin- und Tricin-SDS-PAGE).

6.2.1 Proteinquantifizierung mittels BCA-Assay

Der Proteingehalt von Proben, die in der PAGE analysiert werden sollten, wurde mittels BCA-Assay bestimmt. Dabei handelte es sich um eine empfindliche Nachweismethode, die Proteinkonzentrationen im Bereich von 0,5 bis 1,5 µg/mL photometrisch bestimmen kann (Smith, *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1985; Stoscheck, 1990). Der Assay basierte auf der temperaturabhängige Reduktion zweiwertiger Kupferionen durch die Peptidbindungen in Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Die Menge reduzierter Kupferionen war proportional zum Proteingehalt. Die einwertigen Kupferionen bildeten mit Bicinchoninsäure einen Farbkomplex, der bei 562 nm photometrisch detektiert werden konnte. Für diesen Nachweis wurde ein „BCA Protein Assay Kit“ (Uptima, Montluçon, Frankreich) verwendet, der in 96-WMP durchgeführt wurde. Darin wurde der Assay nach Herstellerangaben auf Proben unbekannter Proteinkonzentration angewandt. Die Proben wurden für den Assay etwa 1:50 bis 1:100 verdünnt. Die parallele Applikation des Tests auf definierten BSA-Konzentrationen diente der Erstellung einer linearen Kalibrationskurve. Durch diese konnte die unbekannte Proteinkonzentration der Proben durch mindestens dreifache Bestimmung pro Probe genau bestimmt werden. Die photometrische Auslesung der 96-WMP erfolgte via Plattenlesegerät (infinite M 200, Tecan, Crailsheim).

6.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die analytische Methode PAGE diente der Auftrennung von Proteinen in einer Trägermatrix. Die Auftrennung der Proteine hängt dabei von deren Ladung, Form und Größe sowie von der Beschaffenheit des Trennmediums (pH-Wert, Struktur) ab. Die denaturierende und reduzierende Variante der PAGE (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen in primärer Abhängigkeit von deren molekularen Masse und der Beschaffenheit des Trennmediums (Laemmli, 1970). Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Durchführung der PAGE das SDS-PAGE-System Mini-Protean III (BioRad, Hercules, Californien, USA) verwendet, um das lösliche Gesamtprotein und Hitze-stabile Protein zu untersuchen.

6.2.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die Analyse durch SDS-PAGE bedingt eine Vorbehandlung der Proben (Kapitel V5.7.3). Dabei werden die Proteine durch Hitze, durch die anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) und durch ein Reduktionsmittel denaturiert und reduziert. Reduktionsmittel wie β -Mercaptoethanol und Dithiothreitol spalten die Disulfidbrücken in Proteinen und bewirken somit die Monomerbildung von Proteinen. SDS bindet nicht-kovalent an Proteine (etwa 1,4 g pro 1 g Protein) und bewirkt somit eine negative Gesamtladung des Proteins, die in etwa proportional zur Proteinmasse ist. Dadurch haben alle Proteine annähernd das gleiche Masse-zu-Ladung-Verhältnis, stoßen sich elektrostatisch von einander ab und werden nach Hitzeeinwirkung linearisiert. Die Vorbehandlung resultiert in der Auflösung von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine, so dass alle Proteine der Probe ellipsoid vorliegen.

Als Trennmedium für vorbehandelten Proteine dienten speziell dafür präparierten Polyacrylamid-Gele (Kapitel V5.7.4). Diese Gele waren innerhalb einer Gelkammer im geeigneten Laufpuffer (Kapitel V4.3.4) eingelegt, der Elektrolyte enthielt. Das Anlegen einer elektrischen Spannung im Elektrophoresesystem führte zum Aufbau eines elektrischen Feldes, das die Migration der Elektrolyte und der anionischen SDS-Protein-Komplexe durch das Trennmedium bewirkte. Da Form und Masse-zu-Ladung-Verhältnis aller Proteine gleich war, hing die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine nur noch von deren Masse und den Bedingungen im Trennmedium ab. Die Trennmedien bestanden hauptsächlich aus einem Sammel- und einem Trenngelbereich. Im Sammelgel befanden sich die Proben zu Beginn der PAGE. Es wies einen neutralen pH-Wert auf und diente dem Aufkonzentrieren der Proteine, bevor diese ins Trenngel wanderten. Das Trenngel hatte einen leicht basischen pH-Wert. Hier fand die eigentliche Auftrennung der Proteine nach deren molekularen Größe statt. Die Gele wurden durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid-Monomeren und dem Quervernetzer Bisacrylamid erzeugt. Diese Reaktion wird durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und durch den Katalysator TEMED beschleunigt. Menge und Verhältnis der Monomere bestimmten die Maschengröße im Gel. Engmaschige Gele mit hohem Vernetzungsgrad konnten durch höhere Monomerkonzentrationen hergestellt werden und lassen größere Proteine das Trennmedium langsamer passieren. Die Totalkonzentration beider Monomere wird durch %T angegeben, schließt also Acrylamid und Bisacrylamid ein. Der Vernetzungsgrad wird hingegen durch %C angegeben und bezieht sich nur auf die Konzentration des Quervernetzers (engl. *crosslinker*) Bisacrylamid an der Gesamtmenge beider Monomere. Somit resultiert eine Verdünnung zwar in einer Änderung von %T, aber nicht von %C, da der Anteil des Bisacrylamids an der gesamten Monomermenge gleich bleibt.

Während der PAGE lief separat ein Proteinmarker mit den Proben mit. Er beinhaltete Proteine bekannter Molekularmasse und diente als Referenz zur Größenbestimmung der Probenproteine.

Standardmäßig wurde die SDS-PAGE in einem Tris-Glycin-Puffer (Laufpuffer) durchgeführt (Laemmli, 1970). Diese sogenannte Glycin-SDS-PAGE wurde in dieser Arbeit für die Untersuchung des löslichen Gesamtzellproteins verwendet. Pro Probenflasche wurden 10 µL der vorbehandelten Proben verwendet (entspricht 20 µg Protein, Kapitel V5.7.3).

Für den Start der Elektrophorese wurden die Gel in die Laufkammern nach Herstellerangaben eingebaut und mit dem Tris-Glycin-Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden Proben und Proteinmarker in die Geltaschen gegeben. Anschließend wurde eine Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply PS 3002, Gibco BRL, Maryland, USA) an die verschlossene Gelkammer angeschlossen. Bei einer Spannung von 60 V durchwanderten die Proben das Sammelgel und wurden fokussiert. Sobald die Proben ins Trenngel übergangen wurde eine Spannung von 100 V angelegt, um das Proteingemisch aufzutrennen. Auf diese Weise konnte Proteinmuster im Bereich von etwa 25 bis 250 kDa eindimensional untersucht werden.

6.2.4 Tricin-SDS-PAGE für die Analyse kleiner Proteine (Schägger, 2006)

Mit dieser Methode war es möglich Proteine im Größenbereich von 1 bis 50 kDa hochaufgelöst zu analysieren. Anders als bei der Glycin-SDS-PAGE wurden Tricin-haltige Gelpuffer verwendet und die Trägermatrix beinhaltete zusätzlich ein Abstandsgel, das sich zwischen Sammel- und Trenngel befand. Das Abstandsgel erzeugte eine Art Gradient nach Maschengröße zwischen Sammel- und Trenngel. Hier wurden auch größere Proteine zurückgehalten und deren Eintritt ins Trenngel verzögert. Dadurch wurden primär kleine Proteine (> 50 kDa) im Trenngel klar aufgeteilt. Ein weiterer Unterschied zur Glycin-SDS-PAGE bestand in der Verwendung eines Tris-Tricin-Puffersystems als Laufpuffer (Kapitel V4.3.4). Dabei war in Kathoden- und Anodenpuffer zu unterscheiden. Der Tricin-haltige Kathodenpuffer befand sich in der inneren Gelkammer, während der Tricin-freie Anodenpuffer sich in der äußeren Gelkammer befand. Weiterhin wurden andere Proteinmarker genutzt, die primär kleine Proteine (1 bis 50 kDa) enthielten. Für das Gießen der Gele und die Elektrophorese selbst war im Vergleich zur Glycin-SDS-PAGE keine spezielle Apparatur nötig. Auch der prinzipielle Ablauf der Elektrophorese blieb bis auf längere Laufzeiten gleich. Nach der Zugabe der Proben und Marker in die Tricin-SDS-PA-Gele wurde die Elektrophoresekammer verschlossen und an die Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply PS 3002, Gibco BRL, Maryland, USA) angeschlossen. Bei 30 V durchwanderten die Proteine das Sammelgel und gelangten schließlich ins Abstandsgel. Nach etwa 3 bis 4 h befanden sich die Proteine im Abstandsgel. Innerhalb von weiteren 4 bis 6 h Stunden migrierten die Proben durch das Trenngel bei 60 V. Bevor die Lauffront den unteren Trenngelrand erreichte wurde der Prozess gestoppt.

6.2.5 Gelfärbung und Entfärbung

Nach dem Stopp der Elektrophorese und dem Abbau der Gelapparatur wurden die Gele zunächst durch Waschschriffe in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ vom SDS-Puffer gereinigt. Anschließend lagerten die Gele für 1 h in einer Coomassie-Färbelösung, um die Proteine im Gel nachträglich zu fixieren und die Proteinbanden sichtbar zu machen. Überschüssiges und nicht gebundenes Coomassie-Blau wurde durch weitere Waschschriffe in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ entfernt.

6.2.6 Trocknung und Lagerung von Polyacrylamid-Gelen

Zu Dokumentationszwecken wurden die Gele der Glycin-SDS-PAGE auf Whatman-Papier bei 80 °C für etwa 4 h im Vakuumtrockner (*Gel Dryer*, MGD-4534, VWR, Staufen) getrocknet. Die trockenen Gele wurden bei Raumtemperatur gelagert. Gele der Tricin-SDS-PAGE konnten aufgrund des hohen Monomergehalts und der starken Vernetzung nicht getrocknet werden. In dieser Arbeit wurden diese Gele in speziellen Kunststofftaschen verschweißt und bei 4 °C gelagert.

6.3 Zellviabilitätstest

Zur Bestimmung des Anteils vitaler Zellen wurden Lebendzellzahlbestimmungen durchgeführt. Diese basierten auf der einfachen Methode des Ausplattierens eines definierten Volumens verdünnter Probe auf Agarplatten. Außer für Proben aus der Fermentation im Bioreaktor mit BHI-Medium (hier wurden BHI-Agarplatten verwendet) wurden ausschließlich AB-Agarplatten verwendet (NaCl-Konzentration entsprach jeweils dem Kultivierungsmedium). Die Proben wurden vor dem Ausplattieren verdünnt, um sich einer Konzentration von 100 bis 300 Zellen pro 100 µL zu approximieren. Von den verdünnten Proben wurden 100 µL gleichmäßig und spiralförmig auf die Agarplatten pipettiert. Die Platten wurden für 24 bis 48 h inkubiert (abhängig von der Salinität).

6.4 Werkstoffprüfverfahren

6.4.1 Nanoindentierung

Bei der Nanoindentierung handelt es sich um ein Werkstoffprüfverfahren zur Bestimmung von Härten und Elastizitätsmoduln (E-Moduln) in sehr dünnen Schichten. Härte und E-Modul sind Kenngrößen (keine physikalischen Größen), die ein Material bezüglich dessen Verformung beschreiben. Die Härte spiegelt den mechanischen Widerstand wieder, dem das Material dem Eindringen eines härteren Körpers entgegensetzt. Dadurch findet nur eine Bewertung der plastischen Verformung statt. Der Elastizitätsmodul gibt hingegen an, wie stark ein Stoff einer elastischen Verformung entgegenwirkt. Je größer diese Kennwerte sind, umso stärker wirken sie der jeweiligen Verformung entgegen.

Während der Nanoindentation wird eine Diamantspitze in die zu prüfende Schicht eingedrückt. Es wird die aufgebrachte Kraft und die Eindringtiefe simultan gemessen. Dadurch kann eine Kräfteindringkurve (Belastung-Entlastung-Kurve) erstellt werden. Durch die bekannte Geometrie der Diamantspitze kann die lastabhängige Kontaktfläche und daraus die Härte ermittelt werden (Quotient aus maximaler Kraft und Kontaktfläche). Aus der sich ergebenden Entlastungskurve der Kräfteindringkurve kann über die Kontaktsteifigkeit und der Kontaktfläche der E-Modul berechnet werden (Oliver und Pharr, 1992). Der Messkopf, in dem die Diamantspitze sitzt, beinhaltet einen Dreiplattenkondensator und wird in einem Rasterkraftmikroskop angebracht. Die Kraft, die beim Anlegen einer elektrischen Spannung an dem Kondensator entsteht, bewirkt, dass die mittlere Kondensatorplatte den Stift mit der Diamantspitze zur Probenoberfläche bewegt. Aus der Verschiebung der mittleren Kondensatorplatte resultiert eine Änderung der Kapazität, aus deren Daten Kraftaufwand und Eindringtiefen kalkuliert werden können.

In dieser Arbeit wurden Trehalose- und Hydroxyectoinmatrizes (präpariert nach Kapitel V5.9) via Nanoindentierung untersucht. Die Nanoindentierung wurde am Zoologischen Institut der Universität Bonn durchgeführt. Durchführung und Auswertung der Experimente wurden mittels eines nanomechanischem Testsystems (TriboScope, Hystron, Minneapolis, Minnesota, USA) bei Umgebungstemperatur realisiert. Das System war schwingungsfrei. Indentiert wurde mit einer Die Diamantspitze dreiseitigen Berkovich-Diamantspitze. Die Kalibrierung erfolgte durch ein Polymethacrylat-Substrat mit bekannter Härte und E-Modul (Erstellung einer geeigneten Areafunktion). Das Maximum des Belastungsbereich (*Peakforce*) betrug 2500 μN und Eindringtiefen lagen zwischen 200 und 1500 nm.

6.5 Chromatographische Methoden

Die Chromatographie ist eine empfindliche Methode zur Auftrennung und Analyse von molekularen Gemischen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die isokratische HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) verwendet. Bei dieser Methode wird ein Analytgemisch in einer mobilen Phase (Laufmittel bzw. Eluent) unter hohem Druck über eine stationäre Phase geleitet. Durch Interaktionen mit mobiler und stationärer Phase stellen sich unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte für die Analyte zwischen den beiden Phasen ein. Dies führt zur verschiedenen Retentionszeiten, so dass die Analyte sukzessive eluiert werden. Auf diese Weise können die Analyte in Abhängigkeit verschiedener Parameter (Größe, Struktur, Polarität) separiert und anschließend detektiert werden.

In dieser Arbeit wurden Zellextrakte aus der Mikroextraktion (Kapitel V5.5) mittels HPLC untersucht. Diese dienten entweder der Analytik organischer Solute (Mono- bzw. Oligosaccharide, Polyole, Aminosäuren und deren Derivate) oder anorganischer Ionen im Extrakt. Für beide Analytgruppen war das HPLC-System prinzipiell gleich aufgebaut (siehe unten). Unterscheidungen fanden sich sowohl in der Trennsäule, dem verwendeten Laufmittel als auch und der Detektionsmethode. Die Aufnahme und Auswertung sämtlicher HPLC-Daten erfolgte durch die Software ChromQuest Version 5.0. Die Trennsäule zum Nachweis organischer Solute bestand aus einer Kieselgelmatrix, die mit Aminogruppen modifiziert war. Diese waren mit der Trägermatrix durch Propylketten als Abstandhalter verbunden. Als Laufmittel diente 80 %iges Acetonitril (v/v) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$. Die Detektion der sukzessiv eluierten Solute erfolgte zerstörungsfrei via UV- und RI-Detektor bei einer Flussrate von 1 mL/min.

Beim Nachweis von anorganischen Ionen wurden verschiedene Trennsäulen und Laufmittel verwendet. Die Detektion der Ionen erfolgt stets durch einen Leitfähigkeitsdetektor. Die Analyse von Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) erfolgt im Weinsäure-Dipicolinsäure-Eluent auf einer speziellen Kationen-Trennsäule (Flussrate 0,6 mL/min). Die Anionenanalytik erfolgte mittels einer speziellen Anion-Trennsäule. Für Chloridionen wurde ein Phtalsäure-Aceton-Eluent und für Phosphationen ein Hydroxybenzoesäure-LiOH-Eluent verwendet (jeweils Flussrate 1,6 mL/min). Um auf die anfangs unbekanntes Analyte einer Probe rückschließen zu können wurden Standardlösungen bekannter Solute bzw. Ionen vermessen.

Sämtliche Laufmittel wurden vor ihrer Verwendung durch leichten Unterdruck und paralleler Ultraschallbehandlung entgast. Acetonitril-Laufmittel wurde bei Raumtemperatur und wässrige Eluenten bei 4 °C gelagert.

HPLC-Equipment zum Nachweis organischer Solute:

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

HPLC-Equipment zum Nachweis anorganischer Ionen:

- Vakuum-Membranentgaser Spectra System SCM1000 (Thermo Scientific)
- Pumpe Spectra System P1000 (Thermo Scientific)
- Probenaufgabe Rheodyne Injector Nr. 7125 mit Probenschleife 20 µL (Rheodyne Inc.)
- Kationen-Vorsäule (Metrosept Cation 1-2 IC, Metrohm)
- Anionen-Vorsäule (PRP-X100, 10 µm, 123x4 mm, Metrohm)
- Kationen-Trennsäule (Metrosept Cation 1-2 IC, Metrohm)
- Anionen-Trennsäule (PRP-X100, 10 µm, 123x4 mm, Metrohm)
- Leitfähigkeitsdetektor Conducto Monitor (Thermo Scientific)
- RI-Detektor Refractormonitor (Milton Roy)
- UV-Detektor Accela PDA Detector (Thermo scientific)

6.6 Spektroskopische Methoden

6.6.1 UV/Vis-Spektroskopie

Mittels UV/Vis-Spektroskopie können Stoffe auf ihre Absorptionseigenschaften im gesamten ultravioletten und visuellen Spektralbereich untersucht werden. Diese Methode wurde dazu genutzt sowohl 96-MTP als auch in Wells befindliche Verdünnungen verschiedener Solute und Proteine auf ihre Absorptionsspektrum zu untersuchen, damit Interferenz im photometrischen LDH-Assay ausgeschlossen werden können.

6.6.2 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die Kernresonanzspektroskopie ist eine hochauflösende Analysemethode (Auflösung auf atomarer Ebene). Diese Methode ermöglicht die Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome und der Interaktion von Nachbaratomen. Daraus ergibt sich, dass sowohl molekulare Strukturen und Dynamiken als auch die Konzentration von Molekülen bestimmt werden können.

Die NMR-Spektroskopie nutzt den Eigendrehimpuls (Kernspin), den die meisten Atomkerne aufweisen. Als bewegte Ladungsträger führt dieser zu einem magnetischem Moment, das nur diskrete Orientierungen annehmen kann. Dieses magnetische Moment lässt sich jedoch nur bei bestimmten Isotopen beobachten. Es lässt sich nämlich nur bei Kernen finden, die entweder eine ungerade Anzahl von Protonen oder Neutronen oder wenn beide Nukleonen in ungerader Anzahl vorhanden sind. Von diesen sind insbesondere ^1H -Wasserstoffatome (natürliches Isotopenverhältnis 99,98857 %), ^{13}C -Kohlenstoffatome (natürliches Isotopenverhältnis: 1,1 %) und ^{31}P -Phosphoratome (natürliches Isotopenverhältnis 100 %) interessant. Nur solche Isotope mit einem magnetischen Moment sind der NMR-Spektroskopie auch zugänglich.

Unter dem äußeren Einfluss eines starken Magnetfeldes teilen sich die Kernspinniveaus auf, das heißt die Atomkerne richten sich parallel oder antiparallel zu diesem äußeren Magnetfeld aus. Die parallele Ausrichtung (α -Zustand) ist energetisch günstiger als der antiparallele Zustand (β -Zustand). Der energetische Unterschied zwischen diesen beiden Zuständen liegt im Radiowellenbereich. Wird ein Kern mit Radiowellenfrequenz angeregt, die der Frequenz des Kernspins entsprechen, kommt es zum Resonanzfall (magnetische Kernresonanz). Die Resonanzfrequenzen von Atomkernen hängen jedoch von der Abschirmung durch die elektronische Umgebung und von magnetischen Wechselwirkungen mit benachbarten Atomkernen ab. Dies macht man sich für die Strukturaufklärung durch die NMR-Spektroskopie nutzbar. Dabei wird die durch die elektronische Umgebung bedingte chemische Verschiebung in Relation zu einer Vergleichssubstanz (wie NaTMS) ermittelt und in ppm angegeben. Grundlegend basiert das Messverfahren darauf, dass sich die Probe in einem homogenen Magnetfeld befindet. Zu diesem senkrecht wirkt ein hochfrequentes, elektromagnetisches Wechselfeld für eine kurze Dauer (wenige μs). Dieser elektromagnetische Impuls regt mit allen Radiofrequenzen nahe der Eigenfrequenz des Kernspins gleichzeitig an. Die auf die kurze Anregung folgende Relaxation ermöglicht die Aufnahme eines sogenannten FID-Signals (freier Induktionszerfall, engl. *free induction decay*) in Form einer gedämpften Schwingung. Aus diesem FID-Signal wird durch mathematische Operation (Fourier Transformation) das NMR-Spektrum berechnet.

Durchführung der ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Die Proben für die ^{13}C - und die ^{31}P -NMR-Spektroskopie wurden wie unter Kapitel V5.6 beschrieben präpariert. Sie wurden am Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Bonn durch das NMR-Spektrometer (Bruker Avance 300DPX) analysiert. Für den ^{13}C -Kanal betrug die Messfrequenz 75,46 MHz und für den ^1H -Entkopplungskanal 300 MHz. Als Vergleichssubstanz diente NaTMS, auf die die Messwerte kalibriert wurden. Den Methylgruppen des NaTMS wurde eine chemische Verschiebung von 0 ppm zugeordnet. Die Messfrequenz für die ^{31}P -NMR-Spektroskopie waren 121,5 MHz. Für diese Messung wurde extern auf Triphenylphosphat (-17,8 ppm) referenziert. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgt durch die Software WIN-NMR (Bruker).

6.6.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die EDX-Spektroskopie (engl. *energy dispersive X-ray spectroscopy*) ist eine materialanalytische Methode und diente der Charakterisierung der elementaren Zusammensetzung von Proben. Wie bei der Rasterelektronenmikroskopie wird hier im Hochvakuum ein Elektronenstrahl erzeugt und auf die Probe gestrahlt (Details im Kapitel V6.7.2). Allerdings fährt dieser Elektronenstrahl nicht in einem Raster über die Probe, sondern wird auf die zu untersuchende Stelle der Probe fokussiert. Wechselwirken die eingestrahlten Elektronen mit kernnahen Elektronen der Probe, können dies aus ihrer Position gebracht werden. Die entstandene Lücke wird sofort von einem Elektron höheren Energieniveaus besetzt, wobei Energie in Form von Röntgenstrahlung frei wird. Die Intensität der ausgestrahlten Röntgenstrahlung ist charakteristisch für den jeweilige Übergang und das betroffene Atom, wodurch man auf das Element schließen kann. Die Energien der Röntgenstrahlung werden mittels geeigneter Halbleiterdetektoren aufgenommen und für die Erstellung des elementaren Spektrums der bestrahlten Stelle analysiert.

Proben für die EDX-Spektroskopie wurden am Nees-Institut für Biodiversität von Pflanzen der Universität Bonn untersucht. Bei den Proben handelte es sich ausschließlich um bakterielles Zellmaterial von einer AB-10%-Agarplatte. Die zu untersuchenden Proben wurden durch ein kommerziell erhältlichen Kohlenstoffleitstab auf einen Aluminiumsubstrat fixiert und dünn (ca. 30 bis 50 nm) mit Silber bzw. Gold beschichtet (Balzers Union SCD 040, Balzers-Pfeifer GmbH, Aßlar). Anschließend fand die Analyse der Probe in der Vakuumkammer des Elektronenmikroskops (CAMBRIDGE Stereoscan 200 SEM, Zeiss GmbH, Oberkochen) statt, dass sowohl der EDX-Spektroskopie als auch der Erstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen diente.

6.7 Mikroskopische Methoden

Mikroskopische Methoden wurden in dieser Arbeit genutzt, um biologisches Material, Vitrifikations- sowie Kristallisationseigenschaften von Soluten als auch die Verteilung von mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren im rekonstruierten Bio-Nanokomposit des Biosensor zu untersuchen.

6.7.1 Durchlichtmikroskopie

Die Durchlichtmikroskopie wurde primär genutzt, um die Beschaffenheit künstlich erzeugter Solutmatrices sowie deren Tendenz zur Glasbildung, Kristallisation, zu Lufteinschlüssen oder *Cracking* (Bruch- und Rissbildung) zu untersuchen. Mikroskopische Aufnahmen entstanden mit Hilfe des Leica DMLB Lichtmikroskops (Leica, Wetzlar) unter Verwendung eines HCPL Fluotar Objektivs (10x/0,3) einer Leica-Digitalkamera (Leica, DC 300F, Wetzlar). Die Bildbearbeitung erfolgte durch die Software Photo Impact 4.2 (Ulead, Braunschweig). Sekundär wurde diese Methode zur Kontrolle der bakteriellen Zellmorphologie genutzt.

6.7.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (SEM, engl. *scanning electron microscopy*) ist eine mikroskopische Methode, die die Untersuchung von Strukturen im μm - bis in den nm-Bereich ermöglicht. Die zu untersuchende Probe befindet sich während der Untersuchung im Hochvakuum. Aus einer Elektronenquelle (bspw. Glühkathode) treten Elektronen, die durch das Anlegen elektrischer Spannung gebündelt und beschleunigt werden und so in einem Elektronenstrahl resultieren.

Die Abrasterung der Probe durch den fokussierten Elektronenstrahl wird durch elektromagnetische Spulen gesteuert. Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probenoberfläche kommt es zu verschiedenen Wechselwirkungen deren Analyse Auskunft über die Beschaffenheit der Probe geben. Elektronenmikroskopisch werden dazu meist Sekundärelektronen genutzt, die nach dem Eintreffen der Primärelektronen des Elektronenstrahls aus der Probe austreten. Die Sekundärelektronen werden durch einen Teilchendetektor aufgefangen und die Information wird anschließend in eine optische Abbildung verarbeitet. Da die Sekundärelektronen nur aus der obersten Schicht stammen, wird so die Topographie der Probe abgebildet.

Proben für die SEM wurden am Nees-Institut für Biodiversität von Pflanzen der Universität Bonn untersucht. Bei den Proben handelte es sich entweder um bakterielles Zellmaterial von einer AB-10%-Agarplatte oder der Rekonstruktion des biosensorischen Bio-Nanokomposits. Die zu untersuchenden Proben wurden durch ein kommerziell erhältlichen Kohlenstoffleittab auf einen Aluminiumsubstrat fixiert und anschließend mit einer etwa 30 bis 50 nm dicken Silber- oder Goldschicht beschichtet (Balzers Union SCD 040, Balzers-Pfeifer GmbH, Aßlar). Anschließend wurde die Probe in der Vakuumkammer des Elektronenmikroskops (CAMBRIDGE Stereoscan 200 SEM, Zeiss GmbH, Oberkochen) untersucht.

6.8 Elektrochemische Methoden

6.8.1 Zyklovoltammetrie

Die Zyklovoltammetrie ist eine analytische Methode, die hauptsächlich der Untersuchung von reversiblen Redoxprozessen an der Phasengrenze zwischen Elektrode und Elektrolytlösung dient. Durch sie ist sowohl die Analytik der Thermodynamik von Redoxprozessen als auch die der Kinetik von Elektronentransferreaktionen möglich. Der Messaufbau zur Durchführung zykvoltammetrischer Messungen besteht aus einer Messzelle aus chemisch inerten, nicht-leitfähigem Material (z. B. Teflon) in die ein Dreielektrodensystem integriert ist (Abb. 13).

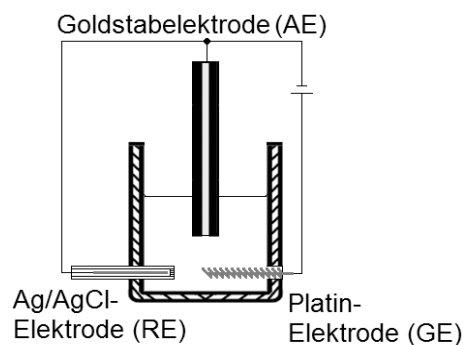


Abb. 13: Schematischer Aufbau der Messzelle mit Dreielektrodensystem für die Zyklovoltammetrie.

Die Elektroden sind mit Bezeichnung und Funktion angegeben: AE – Arbeitselektrode, RE – Referenzelektrode, GE – Gegenelektrode.

Bei den drei Elektroden handelt es sich um Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode. Alle drei Elektroden befinden sich in einer elektrolytischen Messlösung. Die Messzelle selbst befindet sich zudem in einem Faraday'schem Käfig, da externe, elektromagnetischer Strahlung mit dem empfindlichen System interferiert. Die drei Elektroden sind an einen Computer gesteuerten Potentiostaten angeschlossen. Auf diese Weise werden die elektrischen Parameter als auch die Aufnahme der Messdaten möglich.

Die Arbeitselektrode ist die wichtigste Elektrode im System, da an ihr die zu untersuchenden Redoxprozesse ablaufen. Meist besteht sie aus einem inerten Edelmetall wie Platin oder Gold. Aufgrund der Empfindlichkeit der Methode ist daher insbesondere die Reinigung der Arbeitselektrode nach jeder Messung wichtig (Kapitel V5.11.1). Die Gegenelektrode ist häufig ein gedrehter Platindraht. Nur zwischen ihr und der Arbeitselektrode wird ein Strom fließen. Die durch die Spiralform erzeugte Vergrößerung der Gegenelektrodenoberfläche dient der Minderung des kapazitiven Widerstandes, der dadurch vernachlässigbar klein wird. Die Zyklovoltammetrie wird auch Dreiecksspannungsmethode genannt, da zwischen AE und GE eine Spannung angelegt wird, die zwischen zwei definierten, elektrischen Umkehrpotentialen linear über die Zeit variiert. Daraus ergibt sich ein dreieckförmiger Potential-Zeit-Verlauf. Durch diesen periodischen Verlauf sind Ausgangs- und Endpotential pro Periode gleich. Daher spricht man von zyklischer Voltammetrie.

Zur Festlegung dieses Potentialbereichs und der Umkehrpotentiale ist ein Bezugspunkt notwendig. Dazu dient die stromlose Referenzelektrode. Die Referenzelektrode ist häufig eine Kalomel- oder eine Silber-Silberchloridelektrode. Mit ihr wird der elektrische Potentialnullpunkt im System festgelegt. Daher ist die Angabe des Bezugssystems bei allen zykovoltammetrischen Daten wichtig. Die sogenannte Spannungsvorschubgeschwindigkeit (auch Scanrate genannt) beschreibt den Betrag der elektrischen Potentialänderung pro Zeiteinheit. Langsame Scanraten ermöglichen eher die Beobachtung von Elektronentransferprozessen.

Die gesamte zykovoltammetrische Messung findet in einem ruhenden Elektrolyten statt. Sobald sich die Arbeitselektrode in der elektrolytischen Lösung befindet baut sich an ihr eine elektrochemische Doppelschicht auf. Die Dreiecksspannung verursacht einen Stromfluss, der zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode fließt. Ohne Anwesenheit eines redoxaktiven Stoffes wird nur ein Strom beobachtet der durch die Auf- und Umladung der elektrochemischen Doppelschicht entsteht. Dies ist der sogenannte Ladestrom.

Ist ein redoxaktiver Stoff in der Messlösung enthalten, wird dieser sukzessive bei einem charakteristischen Potential umgesetzt. Dabei ist der Nachschub des zu oxidierenden bzw. reduzierenden Stoffes zur Elektrode diffusionskontrolliert. Die Umsetzung der Redoxspezies hat eine Änderung des Stromsignals zur Folge (durch die Aufnahme bzw. Abgabe von Elektronen an der Arbeitselektrode). Der hier gemessene Strom ist der sogenannte Faraday'sche Strom. In einem Zyklovoltammogramm (beispielhaft in Abb. 14) werden die gemessenen Stromsignale in Abhängigkeit von dem angelegten Potential aufgetragen. Ist ein redoxaktiver Stoff in der Lösung enthalten setzt sich das Stromsignal aus Ladestrom und Faraday'schem Strom zusammen. Der elektrochemische Stoffumsatz innerhalb der ruhenden Elektrolytlösung bedingt die Verarmung der redoxaktiven Spezies direkt vor der Arbeitselektrode wodurch sich eine Diffusionsschicht aufbaut.

Deren steigende Dicke resultiert in einer Hemmung der Diffusion des redoxaktiven Stoffes zur Elektrode, wodurch das Stromsignal betragsmäßig abfällt und zeitlich betrachtet in einem Peak resultiert (diffusionslimitierter Stromfluss). Dies gilt sowohl für die Oxidation als auch für die Reduktion. Handelt es sich um einen quasi-reversiblen Redoxprozess sind Oxidations- und Reduktionspeak symmetrisch zueinander (siehe Abb. 14).

Der Übertritt von Elektronen zwischen fester Elektrode und gelöster Redoxspezies ist ein heterogener Elektronentransfer. Dessen Geschwindigkeit hängt u. a. von der Elektrodenoberflächenbeschaffenheit, dem Lösungsmittel und der Redoxspezies selbst ab. Sie wird durch die heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante k_s charakterisiert.

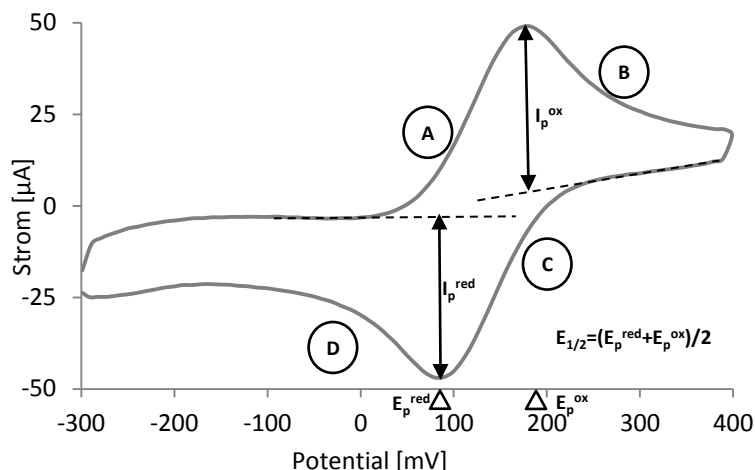


Abb. 14: Beispielhafte und vereinfachte Darstellung der zykvoltammetrischen Untersuchung eines quasi-reversiblen Redoxprozesses.

Gekennzeichnet sind der Oxidations- und Reduktionspeakstrom (I_p^{ox} und I_p^{red}) sowie Oxidations- und Reduktionspeakpotentiale (E_p^{ox} und E_p^{red}). Weiterhin ist die Berechnung des Mittelpunktspotentials ($E_{1/2}$) vermerkt. Anmerkungen zum spannungsabhängigem Stromverhalten: A – Anstieg des Oxidationsstroms durch elektrochemische Umsatz der reduzierten Substanz; B – Abnahme des Oxidationsstroms durch Diffusionslimitierung; C – Anstieg des Reduktionsstroms durch elektrochemischen Umsatz der oxidierten Substanz; D – Abnahme des Reduktionsstroms durch Diffusionslimitierung.

In dieser Arbeit wurden Goldstabelektroden (CHI *working electrode* CHI101P, IJ Cambria Scientific, Burry Port, Großbritannien), Platin-Draht-Gegenelektroden (Fraunhofer IBMT, Potsdam-Golm) und Ag/AgCl-Referenzelektroden (CHI *reference electrode* CHI111P, IJ Cambria Scientific, Burry Port, Großbritannien) verwendet. Diese wurden über einen CHI-Potentiostaten (IJ Cambria Scientific, Burry Port, Großbritannien) durch die zugehörige CHI-Software (IJ Cambria Scientific, Burry Port, Großbritannien) gesteuert. Die Auswertung der der zykvoltammetrische Daten erfolgte durch MS Excel 2007.

Die Zykvoltammetrie wurde zur Charakterisierung von Elektrodenmodifizierungen mit und ohne immobilisierte Glucose-Oxidase genutzt. Somit war diese sensitive Methode entscheidend für die Entwicklung des Biosensors. Weiterhin diente sie der Charakterisierung der Elektronentransferkinetik zwischen Enzym und Elektrode. Für zykvoltammetrische Messungen, wurden die nach Kapitel V5.11 präparierten Elektroden in die Messzelle eingebaut und 2 mL PBS-Puffer (pH 5,9) bzw. 2 mM Kaliumhexacyanoferrat-Lösung in die Messzelle gegeben. Anschließend wurde eine definierte Anzahl von Messzyklen im reinen PBS-Puffer durchgeführt, bis das zykvoltammetrische Signal stabil war.

In solchen Fällen unterschied sich ein Folgezyklus im Stromverhalten kaum noch vom vorangegangenen Zyklus. Anschließend wurde eine definierte Konzentration an Glucose dazu gegeben und die Zyklen wiederholt (sofern angegeben). In Experimenten, in denen Kaliumhexacyanoferrat genutzt wurden, wurde ohne die Zugabe von Glucose gearbeitet und die Arbeitselektrode nur einmalig vermessen. Für die Untersuchung der Elektronentransferkinetik wurde im gleichen Verfahren gearbeitet (ebenfalls ohne die Zugabe von Glucose). Allerdings wurde die definierte Anzahl von Zyklen zur Untersuchung des biosensorischen Systems bei verschiedenen Scanraten wiederholt (10 bis 200 mV/s).

6.8.2 Amperometrie

Die Amperometrie ist eine anwendungsnahe Methode zur Quantifizierung von chemischen Verbindungen durch deren elektrochemische Umsetzung. Dies geschieht bei einem festen Potential, das sich folglich über die Zeit nicht ändert. Das Ergebnis ist ein gemessener Stromfluss über die Zeit (Strom-Zeit-Kurve), der sich in Abhängigkeit von der elektrochemischen Umsetzung an der Elektrode ändert. Durch Titrationsverfahren können auf diese Weise sowohl Konzentrationsbestimmungen als auch Konzentrationsabhängigkeiten untersucht werden. Aufbautechnisch existiert bei der amperometrischen Messung kaum ein Unterschied zur Zyklovoltammetrie (Kapitel V6.8.1). Der wichtigste Unterschied besteht darin, dass sich die Elektrolytlösung durch einen Rührmechanismus (via Rührfisch) in Bewegung befindet. Dadurch wird der Aufbau einer Diffusionsschicht an der Arbeitselektrode verhindert. Somit sind Reduktion- bzw. Oxidationsströme nur noch konzentrationsabhängig und nicht mehr diffusionskontrolliert.

Diese Methode wurde für die Untersuchung der Substratabhängigkeit des biosensorischen Systems genutzt. Die nach Kapitel V5.11.3 c präparierte Elektrode wurde in die Messzelle eingebaut und 2 mL PBS-Puffer (pH 5,9) in die Messzelle gegeben. Der Rührmechanismus wurde durch einen Rührfisch und einen Magnetrührer realisiert. Es wurde auf eine möglichst gleichmäßige Rührung geachtet. Die Steuerung der amperometrischen Messung sowie die Aufnahme der Messdaten wurden durch die CHI-Software (IJ Cambria Scientific, Burry Port, Großbritannien) durchgeführt. Nach dem Messungsstart wurde bei einem fixen Potential von -450 mV gewartet bis das Stromsignal annähernd stabil ist. Im Anschluss wurde Glucose in die Messlösung titriert, um die Glucosekonzentration in der Messlösung sukzessive um 200 μM zu erhöhen.

6.8.3 Lagerung der Elektroden

Referenzelektroden

Um die Verdampfung der Kaliumchlorid-Lösung zu vermeiden wurde das Becherglas mehrfach mit Parafilm verschlossen. Durch kleine Öffnungen in der Parafilmschicht wurden die Referenzelektroden gesteckt, damit deren sensorischer Bereich in der KCl-Lösung lag. Der gesamte Ansatz wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Arbeitselektroden

Diese Elektroden wurden nach ihrer Vermessung grob mit einem fussselfreien Tuch gereinigt. Vor der nächsten Modifizierung mussten sie chemisch gereinigt werden (Kapitel V5.11.1). Präventiv wurden die Elektroden zum Schutz vor Verunreinigungen oder Beschädigungen der Goldoberfläche mit 500 µL-MRG verkapt und bei Raumtemperatur gelagert.

Gegenelektroden

Gegenelektroden wurden nach ihrer Benutzung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gespült und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und gelagert.

7 Bioinformatische Datenbanken, Software und Webapplikationen

Datenbanken

Datensätze der Proteome von *H. elongata* WT und *E. coli* K12 wurden von der Datenbank UniProtKB (www.uniprot.org) bezogen.

Die farbige Abbildung der Glucose-Oxidase wurde von *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org>) bezogen.

Chemische Strukturformeln wurden aus der freien Datenbank Chemspider bezogen (<http://www.chemspider.com/>) oder von der Internetpräsenz von Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/>). Die Abbildung der mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhre wurde hingegen von der Internetpräsenz des *World Technology Evaluation Center* bezogen (<http://www.wtec.org>).

Software

Diese Datensätze wurden durch ein Ad-Hoc-Programm in Java so formatiert, dass ein einfacher Zugriff auf die Aminosäurekomposition jedes Proteins der Organismen möglich war. Auf dieser Basis wurden via Microsoft Office Excel 2007 Glycin-vs-Hydrophilie-Plots erstellt.

Webapplikationen

Das Hydrophilie-Profil wurde (auch Kyte-Doolittle-Plot genannt) via der Webapplikation Kyte-Doolittle-Hydrophathy-Plot (<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>) erstellt.

Die wahrscheinliche Lokalisierung eines speziellen Proteins aus *H. elongata* WT innerhalb einer Zelle anhand wurde durch die bioinformatische Webapplikation Psort-B (<http://www.psort.org/>) realisiert.

8 Verwendete Chemikalien

Fertigmedien und Medienzusätze

D-Glucose * H₂O (für die Biochemie)
Antibiotic broth medium No. 3
Brain Heart Infusion Broth
Select Agar
 Antischaum

Vitrifikationsexperimente

Ectoin (≥ 99 %)
 Hydroxyectoin
 D(+)-Trehalose Dihydrat (≥ 99 %)
 Saccharose
 Kalium-Glutamat
 Gelatine (*porcine skin*, Typ A, Puder)
 Pyruvat
 NADH

Salze

(NH₄)₂SO₄(reinst)
 CaCl₂ * 2 H₂O (*p. a.*)
 FeSO₄ * 7 H₂O (*p. a.*)
 KCl (reinst)
 KH₂PO₄ (*p. a.*)
 Kaliumhexacyanoferrat (I)
 Kaliumhexacyanoferrat (II)
 MgCl₂ * 6 H₂O (reinst)
 MgSO₄ * 7 H₂O (*p. a.*)
 NaCl (*p. a.*)
 NaCl 99,99 Suprapur(R)

Säuren und Basen

HCl (6 M)
 H₂SO₄
 H₂O₂ (30 %)
 H₂PO₄
 NaOH (*p.a.*)
 Phthalsäure
 4-Hydroxybenzoesäure
 Lithiumhydroxyd (Monohydrat)
 DL-Weinsäure (wasserfrei)
 Pyridin-2,6-dicarbonsäure (Dipicolinsäure)

Vertrieb

Merck, Darmstadt
 Oxoid LTD., Hampshire (Großbritannien)
 Oxoid LTD., Hampshire (Großbritannien)
 Gibco BRL, Paisly (Großbritannien)
 Dehysan Z 2111 Cognis, Düsseldorf

bitop AG, Witten
 Isolat aus *H. elongata* DSM
 Fluka, Buchs (Schweiz)
 Roth, Karlsruhe
 Sigma, Deisenhofen
 Sigma-Aldrich, Steinheim (G1890)
 Roth, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, Steinheim

Roth, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Fluka, Buchs (Schweiz)
 Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich,, Milwaukee (USA)
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim

Lösungsmittel

Aceton
 Acetonitril (*HPLC gradient grade*)
 Chloroform (LiChrosolv)
 Ethanol
 D₂O

Puffer und Pufferzusätze

Bromphenolblau
 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)
 PBS (*Phosphate buffered Saline*) Puffer
 KH₂PO₄
 K₂HPO₄
 Tris

Enzyme

Glucose-Oxidase (*Aspergillus niger*, Typ VII)
 Lactatdehydrogenase (*rabbit muscle*, Lyophilisat)
 Lysozym
 DNase I
 RNase

Proteinchemisches Arbeiten

40 % Acrylamid (40 %, flüssig)
 40 % Acrylamid (Festsubstanz)
 Ammoniumpersulfat (≥98 %)
 Bisacrylamid (2 %, flüssig)
 Bisacrylamid (Festsubstanz)
 Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard
 Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™
 β-Mercaptoethanol
 Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer
 Tricin
 Bovines Serumalbumin (BSA)
 Page Blue Protein Staining Solution
 Sodiumdodecylsulfat (SDS) (*research grade*)

Biosensorik

Multi-walled Carbon Nanotubes (NC3101)
 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
 N-Hydroxysuccinimid
 Ferrocen

Kits

BCA-Assay: Protein Quantification Kit

Vertrieb

Merck, Darmstadt
 VWR, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Roth, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, Steinheim (G2133)
 Sigma-Aldrich, Steinheim (61309)
 MBI Fermentas, Vilinius, Litauen
 MBI Fermentas, Vilinius, Litauen
 MBI Fermentas, Vilinius, Litauen
 Merck, Darmstadt
 Serva, Heidelberg
 BioRad, Hercules (USA)
 Merck, Darmstadt
 Serva, Heidelberg
 BioRad, Hercules (USA)
 BioRad, Hercules (USA)
 Roth, Karlsruhe
 BioRad, Hercules (USA)
 Roth, Karlsruhe
 Uptima, Montluçon (Frankreich)
 MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen
 Serva, Heidelberg
 NANOCYL™, Sambreville, Belgien
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Uptima, Montluçon (Frankreich)

VI Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln wird dargestellt, wie diese Arbeit beim Studium der biologischen Grundlagen beginnt und über den Transfer des gewonnenen Wissens zur biomimetischen Applikation des Trockenstabilisierungsprinzips in einem Biosensor gelangt.

Im Sinne der Bionik beschäftigt sich Kapitel 1 daher zunächst mit dem Modellorganismus, dem moderat halophilen Bakterium *Halomonas elongata*. Dieser Mikroorganismus wird bezüglich seiner biochemischen Reaktion auf dehydrierungsbedingten und thermischen Stress (Hypersalinität und Hitze) untersucht. Insbesondere die Akkumulation kompatibler Solute und anorganischer Ionen wird dabei betrachtet. Weiterhin wird *H. elongata* sowohl bioinformatisch als auch experimentell auf die Expressionsfähigkeit von potentiellen Hydrophilinen untersucht.

Nach dem Studium der biologischen Grundlagen wird in Kapitel 2 die Applikation des Vitrifikationsprinzips demonstriert, indem zunächst die Vitrifikation künstlich in *H. elongata* ausgelöst wird. Der von innen verglaste Organismus wird anschließend auf seine Toleranz gegenüber harschen Trocknungsbedingungen analysiert. Darauf folgt die Fertigung artifizierender Solutmatrizes (ohne den Modellorganismus), um deren Tendenz zur Glasbildung oder zur Kristallisation zu untersuchen. Zudem werden die wichtigsten Glasbildner (Trehalose und Hydroxyectoin) auf ihre mechanischen Eigenschaften geprüft. Mittels eines geeigneten Modellenzym (Lactatdehydrogenase) werden Solutmatrizes zusätzlich auf ihre bioprotektiven Eigenschaften getestet. Dabei wird parallel das Hydrophilin-Analog Gelatine in Kombination mit diesen Soluten angewendet.

Das finale Kapitel 3 behandelt schließlich die Anwendung des gewonnenen Wissens auf einen elektrochemischen Biosensor. Dieser basiert auf mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren (MWCNT) und immobilisierter Glucose-Oxidase. Dazu wird ein solcher Biosensor zunächst *ad hoc* konstruiert, optimiert und charakterisiert. Abschließend wird die Integration bioprotektiver Solute im Biosensor realisiert und dessen Aktivität nach prolongierter Trocknung untersucht.

1 Biologie – Ergebnisse aus dem Studium des Modellorganismus

1.1 Untersuchung von *H. elongata* und *E. coli* im Komplexmedium

1.1.1 Temperaturdynamische Fermentation im Komplexmedium

Wie in der Bionik üblich bildet die Untersuchung des mikrobiellen Vitrifikationsprinzips den Ausgangspunkt dieser Arbeit. Das Kapitel IV2.3 beschrieb bereits, wie sich die bakterielle Trockentoleranz durch die Initiierung der Akkumulation von Protektiva verbessern lässt (Potts, 2005). Dies ist auch mit *H. elongata* möglich. Sowohl intrazelluläre Ectoin- als auch Hydroxyectoinlevel sind durch hypersaline und hochtemperaturige Bedingungen beeinflussbar (Ures, 2005; Meffert, 2011).

Die temperaturdynamische Fermentation (Fermentation mit linearem Temperaturanstieg über die Zeit) diente dazu bakteriellen Organismen ein bevorstehendes Austrocknungsereignis zu suggerieren. Solche Experimente wurden in Anlehnung an temperaturdynamische Experimente mit dem Darmbakterium *Escherichia coli* durchgeführt (Van Derlinden *et al.*, 2010). Die Analyse der Zellvitalität und zytosolisch gelöster Substanzen in den gestressten Zellen kann Hinweise auf spezielle Anpassungsmechanismen liefern.

Es wurden zwei separate Fermentationen wie im Kapitel V3.3.3 beschrieben in einem 5 L-Bioreaktor durchgeführt. Als Referenz wurde das Bakterium *E. coli* K12, welches den Glasbildner Trehalose synthetisieren kann, nach Literaturangaben in BHI-0,5%-Medium kultiviert (Van Derlinden *et al.*, 2010). Als diesbezüglich neuer Ansatz wurde *H. elongata* im hypersalinen BHI-10%-Medium temperaturdynamisch kultiviert, um die Hydroxyectoinsynthese zu initiieren. Durch die Programmierung der Fermentationsanlage stieg die Temperatur des Kultivierungsmediums kontrolliert um etwa 1 °C/h über einen Temperaturbereich von 42 °C bis 68 °C. Für die Beobachtung des Wachstumsverhaltens wurden stündlich die OD₆₀₀-Werte der Kulturen bestimmt und stündlich bis zweistündlich Proben entnommen, um die Anzahl vitaler Zellen zu bestimmen.

In Abb. 15 sind die Ergebnisse beider temperaturdynamischer Fermentationen zusammengefasst. Um die Absterbephase (und damit die Temperaturtoleranzschwelle) deutlich zu machen wurden die OD₆₀₀-Werte in Relation zu den gezählten koloniebildenden Einheiten (KBE) der Vitalzellbestimmung gesetzt (linke Ordinatenachse). Diese Werte sind in Abhängigkeit von der Mediumtemperatur abgebildet. Aufgrund der zeitlich linear ansteigenden Temperatur (1 °C/h) ist die Temperaturänderung von 1 K äquivalent dem Zeitintervall von 1 h (Abszisse). Weiterhin erfolgt die relative Angabe der intrazellulären Zusammensetzung von kompatiblen Soluten in *H. elongata* zu fixen Zeitpunkte (rechte Ordinatenachse).

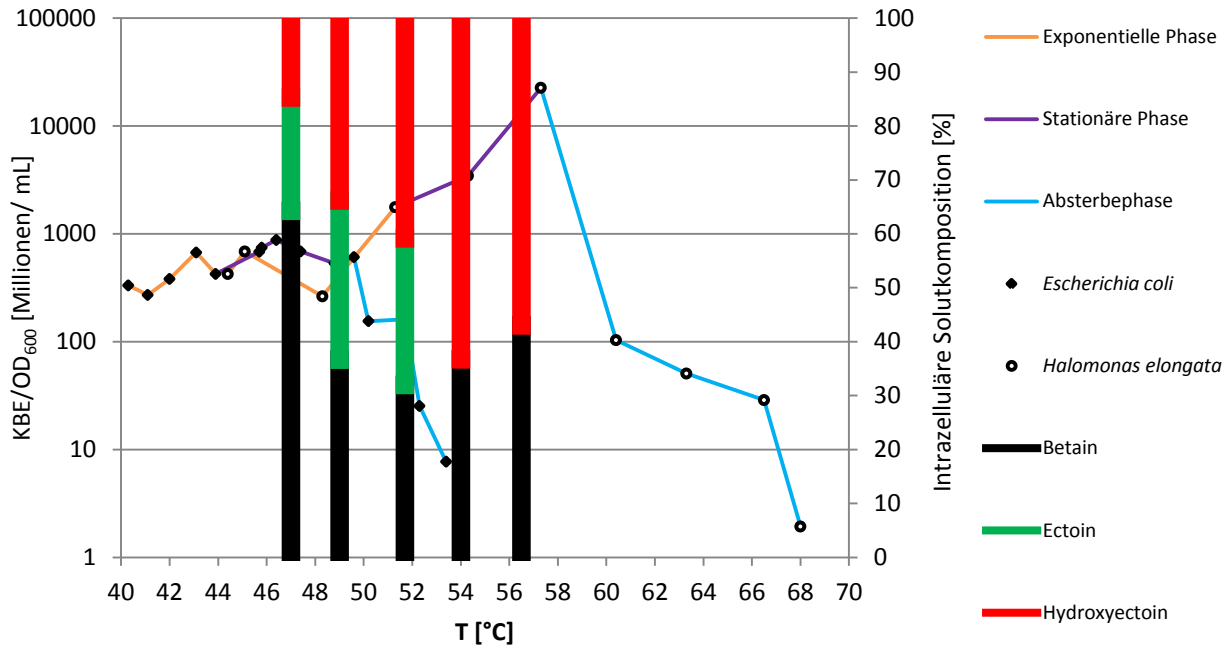


Abb. 15: Anzahl vitaler Zellen von *H. elongata* und *E. coli* während der temperaturdynamischen Fermentation.

Die Anzahl vitaler Zellen wird als KBE (Koloniebildende Einheiten) im Verhältnis zum gemessenen OD₆₀₀-Wert dargestellt, wodurch die Absterbephase sichtbar wird (Einfachbestimmung). Die Fermentation fand für *E. coli* in BHI-0,5 % und für *H. elongata* in BHI-10 % statt. Die Temperatur wurde als linearer Gradient um 1 °C/h erhöht. Zusätzlich ist die relative Zusammensetzung von in *H. elongata* detektierten, intrazellulären Soluten angegeben.

E. coli geht ab etwa 44 °C und für *H. elongata* ab etwa 51 °C in die stationäre Phase über. Ab diesen Temperaturen ändern sich die photometrischen Messwerte (OD₆₀₀-Werte) zur Beobachtung des Wachstums der Organismen nur minimal (nicht dargestellt). Daher sind Änderungen der KBE/ODE₆₀₀-Werte (Abb. 15) alleinig durch die veränderte Vitalität verursacht, so dass in der Absterbephase erwartungsgemäß kleiner werdende KBE/OD₆₀₀-Werte zu beobachten sind. Der Glucosegehalt im Medium wurde jedoch nicht bestimmt. Daher lässt sich nicht sicher feststellen, ob der Übergang in die stationäre Phase durch Nährstoffmangel oder durch die Temperatur bedingt ist. Es wird berichtet, dass *E. coli* unter konstanter Temperierung bereits bei 45 °C ein gehemmes Wachstumsverhalten in BHI-0,5 % aufweist (Van Derlinden *et al.*, 2008). Somit wäre zu vermuten, dass der Übergang in die stationäre Phase für *E. coli* temperaturbedingt war.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in vorrausgegangenen Experimenten hingegen demonstriert werden, dass *E. coli* K12 DSM 498 die Kultivierung in BHI-Medium bei konstant 45 °C ohne verändertes Wachstumsverhalten relativ zu 37 °C und 41 °C durchläuft (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht dargestellt). Daher ist die stationäre Wachstumsphase von *E. coli* eher durch den Verbrauch der Kohlenstoffquelle begründet. Während der dazu parallelen Kultivierung von *H. elongata* (in BHI-10 %, nicht temperaturdynamisch) wurden bei konstant 45 °C ebenfalls keine Unterschiede im Wachstum relative zu geringeren Kultivierungstemperaturen (37 °C und 41 °C) beobachtet (nicht dargestellt). Jedoch wurde im Verlauf dieser Vorexperimente die Kultivierung bei konstant 51 °C (BHI-10%) nicht untersucht, so dass sich der temperaturbedingte Übergang in die stationäre Phase von *H. elongata* im temperaturdynamischen Experiment nicht ausschließen lässt.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass ein manuell induzierter Temperaturschock von 30 °C (diese Arbeit, Abb. 30 A) bzw. 37 °C (Meffert, 2011) auf 50 °C während der exponentiellen Wachstumsphase (in MM63-10 %) nicht in einer Hemmung des Wachstumsverhaltens resultiert. Beachtet man, dass die temperaturdynamische Fermentation in einem komplexen Medium (bei 10 % NaCl) stattfand und dieses Zellen eher stabilisiert (Morgan *et al.*, 2006), ist auch für *H. elongata* der Verbrauch der Kohlenstoffquelle die wahrscheinliche Ursache für den Übergang in die stationäre Phase.

Das Absterben der Zellen ist für den hier verwendeten *E. coli*-Stamm bereits ab 50 °C zu beobachten. Über 54 °C sind keine vitalen Zellen nachweisbar. Damit konnte die in der Literatur postulierte *E. coli*-Subpopulation, welche im gleichen Experiment Temperaturen bis 60 °C überlebt, nicht nachgewiesen werden (Van Derlinden *et al.*, 2010). Weiterhin zeigte sich, dass *E. coli* zwar Betain aus dem Medium akkumuliert, jedoch nicht den Glasbildner Trehalose synthetisiert (nicht dargestellt).

H. elongata überlebt dagegen deutlich höhere Temperaturen. Erst ab etwa 57 °C beginnt der Organismus abzusterben. Auch über 60 °C finden sich noch wenige, vitale Zellen. Durch die Analyse der relativen Zusammensetzung von intrazellulären, kompatiblen Soluten wurde in den *H. elongata*-Zellen Betain, Ectoin und Hydroxyectoin nachgewiesen. In der exponentiellen Wachstumsphase besteht der größte Anteil der drei Solute aus akkumuliertem Betain (60 %). Der verbleibende Solutanteil besteht aus annähernd gleichen Teilen synthetisierten Ectoins und Hydroxyectoins. Ab einer Mediumtemperatur von 54 °C ist Ectoin nicht mehr in den Zellen nachweisbar, so dass das Solutespektrum ab dieser Temperatur aus etwa 65 % Hydroxyectoin und 35 % Betain besteht. Auffällig ist, dass mit dieser intrazellulären Solutkomposition eine signifikante Zunahme der Anzahl vitaler *H. elongata*-Zellen während der stationären Phase (zwischen 52 und 58 °C) beobachtet werden kann.

Eine mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie, welche die OD₆₀₀-Werte der Kultur beeinflusst, fand innerhalb dieses Experiments nicht statt. Allerdings reduzierte sich der gemessene OD₆₀₀-Wert zwischen 54 °C und 58 °C um etwa 13 %. Dies kann nur bedingt ein Grund für die erhöhte Anzahl vitaler Zellen sein, da sich die Vitalzellzahl um den Faktor 10 erhöht. Wahrscheinlicher ist es daher, dass die Zellen aufgrund ihrer intrazellulären Solutzusammensetzung eine erhöhte Vitalität aufwiesen und dadurch toleranter gegenüber dem Ausplattierungsstress waren. Diese Annahmen bleiben jedoch spekulativ.

Bei 58,6 °C können zwar noch lebende Zellen, aber keine kompatiblen Solute in den entnommenen Proben nachgewiesen werden. Es ist jedoch bekannt, dass natürliche Gläser aus mehreren Komponenten bestehen können. Daher untersucht das nächste Kapitel den Gehalt zytosolisch gelöster Stoffe etwas näher.

1.1.2 Gelöste Bestandteile im Zytosol von *H. elongata*

Wie unter Kapitel IV3.2 beschrieben adaptieren sich extremophile Organismen über spezielle Anpassungsmechanismen an abiotische Stresseinflüsse wie Hitze, Trockenheit und erhöhte Salinität der Umgebung. Dazu gehört einerseits die Akkumulation von Glasbildnern und anderen kompatiblen Soluten. Weiterhin kann die Akkumulation anorganischer Ionen wichtige Hinweise auf eine Stressantwort liefern. Daher wurden *H. elongata*-Zellen aus der temperaturdynamischen Fermentation im Komplexmedium neben kompatiblen Soluten auf den Gehalt an anorganischen Ionen via HPLC untersucht. Die Ergebnisse der Probenanalyse aus exponentieller (Exp), stationärer (StP) und Absterbephase (AbP) sind in Abb. 16 zusammen mit der jeweiligen Mediumtemperatur dargestellt.

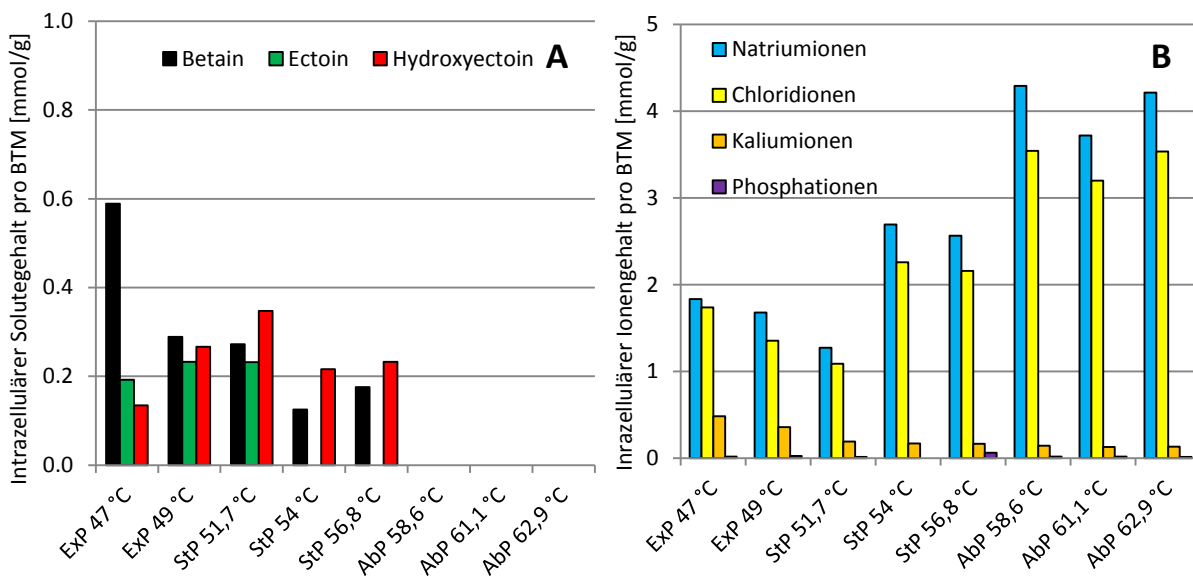


Abb. 16: Via HPLC beobachtete Veränderungen des intrazellulären Gehalts an kompatiblen Soluten (A) und anorganischen Ionen (B) in *H. elongata* in Abhängigkeit von der Wachstumsphase bei der jeweiligen Mediumtemperatur.

Analysiert wurde die Biotrockenmasse (BTM). Die Probenahme fand zeitlich aufeinander folgend während der temperaturdynamischen Fermentation (1 °C/h) in BHI-10 % statt. Die Temperaturänderungen um ca. 2 °C zwischen zwei Probenanalysen ist repräsentativ für den Zeitabstand von 2 h. Zusätzlich ist die jeweilige Wachstumsphase angegeben (Exp – exponentielle Phase; StP – stationäre Phase; AbP – Absterbephase).

In Abb. 16 A sind die absoluten Messwerte der intrazellulären Solute dargestellt. Deutlich erkennbar ist, dass Betain zu Beginn in großen Mengen akkumuliert wird. Die Akkumulation findet wahrscheinlich aus dem Medium statt. Ectoin wird nur bis zum Übergang in die stationäre Phase in signifikanten Mengen nachgewiesen und ab einer Mediumtemperatur von 54 °C nicht mehr nachweisbar. Hydroxyectoin ist in allen Proben bis zur Absterbephase detektierbar. In der stationären Phase wird es zum primären kompatiblen Solut, was auf seine besondere Bedeutung in der Stressantwort deutet. Der Gesamtgehalt an intrazellulären Soluten nimmt innerhalb der stationären Phase jedoch ab. In der Absterbephase sind keine Solute mehr nachweisbar.

In Abb. 16 B sind die absoluten Messwerte des anorganischen Ionengehalts abgebildet. Die Messwerte ergeben sich sowohl aus dem intrazellulären Ionengehalt, als auch aus Ionengehalt des Zwischenzellmediums der Probe. Daher beziehen sich die Messwerte auf intra- und extrazelluläre Ionen. Es ist deutlich erkennbar, dass Natrium- und Chloridionen in allen Proben die höchsten Messwerte aufweisen. Diese sind auch im Medium am höchsten konzentriert. Das Verhältnis von Na^+ - zu Cl^- -Ionen bleibt annähernd gleich und liegt bei $1:1,17 \pm 0,05$. Mit dem Verschwinden von Ectoin kommt es zeitgleich zu einem Anstieg von Na^+ - und Cl^- -Ionen (54°C). Sobald auch die übrigen kompatiblen Solute (Hydroxyectoin und Betain) nicht mehr nachweisbar sind und die Zellen beginnen abzusterben, steigt der NaCl-Gehalt ein weiteres Mal ($58,6^\circ\text{C}$). Der Anstieg der Na^+ - zu Cl^- -Ionen ist wahrscheinlich durch das zusätzliche Einströmen des hypersalinen Mediums in die Zellen begünstigt.

Der Gehalt intrazellulärer Kaliumionen ist zu Beginn der Fermentation maximal und nimmt im Verlauf des Experiments kontinuierlich ab. Der Gehalt zytosolischer Phosphationen ist kontinuierlich gering und verbleibt stetig an der unteren Nachweisgrenze des Messsystems. In geringer Konzentration werden diese Ionen erst beim Übergang in die Absterbephase ($56,8^\circ\text{C}$) verzeichnet. Phosphationen scheinen in diesem Experiment nicht für die Stressanpassung von Bedeutung zu sein. Calcium-, Magnesium- sowie Sulfat-Ionen konnten im Zellextrakt nicht in signifikanten Mengen nachgewiesen werden.

Diese Experimente sind durch publizierte Versuche inspiriert worden (Van Derlinden *et al.*, 2010). Doch insbesondere komplexe Medien wie das nährstoffreiche BHI-Medium haben bereits einen positiven Einfluss auf die Toleranz von Prokaryoten gegenüber einem weiten Spektrum von abiotischen Stressfaktoren (García, 2011). Mit dem Fokus auf das Stressverhalten von *H. elongata* wurde das Experiment wiederholt und der Organismus in ähnlicher Weise unter Verwendung eines synthetischen Mediums kultiviert.

1.2 Untersuchung von *H. elongata* im synthetischen Medium

1.2.1 Variation von Wasseraktivitäts- und Temperaturstress im synthetischen Medium

Im Vorversuch zu einer weiteren temperaturdynamischen Fermentation mit *H. elongata* wurde der Organismus unter Variation der NaCl-Konzentration im synthetischen Medium untersucht (MM63-3, 10 und 15 %; 100 mL im Schüttelkolben). Der Organismus wurde bei 30°C (optimale Wachstumstemperatur bei 3 % NaCl) kultiviert. Zu jeder 30°C -temperierten Mediensalinität wurde parallel die Kultivierung unter Anwendung eines Temperaturschocks in der exponentiellen Phase von 30°C auf 54°C vorgenommen. Die hohe Kultivierungstemperatur wurde in solchen Parallelansätzen bis zur Zellernte beibehalten.

Das Zellmaterial der spätstationären Phase wurde via HPLC auf intrazelluläre Bestandteile analysiert. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse sind in Abb. 17 zusammengefasst.

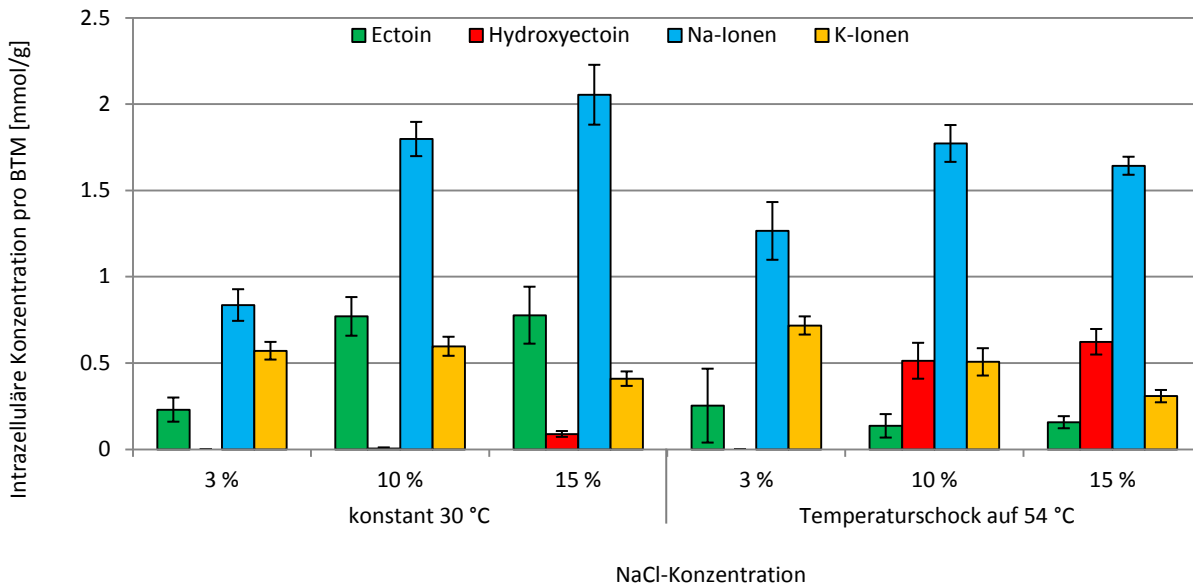


Abb. 17: Intrazellulärer Gehalt an Ectoin, Hydroxyectoin sowie Kalium- und Natriumionen in spätstationären *H. elongata*-Zellen in Abhängigkeit von der Salinität des Mediums und der Kultivierungstemperatur.

Die Zellen wurden in MM63-3 %, -10 % und -15 % bei 30 °C sowie unter Temperaturschock (von 30 °C auf etwa 54 °C in der exponentiellen Wachstumsphase) kultiviert. Die Standardabweichungen ergeben der Dreifachbestimmung von drei unabhängigen Kulturen.

Unter konstanter Temperierung von 30 °C ist Ectoin intrazellulär das primäre Solut und steigt mit dem NaCl-Gehalt des Mediums, um den Organismus vor osmotischem Stress zu schützen. Der Gehalt intrazellulären Natriums nimmt mit der Salinität der Umgebung bei beiden Temperierungsvarianten zu. Eine Ausnahme findet sich beim Temperaturschock-Experiment unter Kultivierung in MM63 %. Dies muss durch den Organismus kompensiert werden.

Kalium wird wahrscheinlich zusammen mit Glutamat als Gegenion als eine weitere Salzstressantwort akkumuliert (neben der Ectoinsynthese). Bei der 30 °C-Kultivierung sinkt der Gehalt von Kalium erst bei hoher Salinität (15 % NaCl). Hier beginnt der Organismus außerdem Ectoin in Hydroxyectoin umzuwandeln, das bei hohen Salinitäten wahrscheinlich die Kalium-Glutamat-Akkumulation als Schutzmechanismus ersetzt. Wird ein Temperaturschock in der exponentiellen Phase angewandt, ist dieser Effekt noch deutlicher. Hydroxyectoin wird hierbei zum primären Solut (10 und 15 % NaCl), während der intrazelluläre Kaliumgehalt weiter abnimmt.

Dieses Ergebnis unterstreicht die besondere Rolle von Hydroxyectoin in *H. elongata*, wenn starker abiotischer Stress wie hohe Salinitäten und Hitze auf den Organismus wirkt. Hydroxyectoin wird dann aus Ectoin synthetisiert. Um den Einfluss der Temperatur während der Kultivierung im synthetischen Medium genauer zu untersuchen, wurde ein weiteres temperaturdynamisches Experiment durchgeführt.

1.2.2 Temperaturdynamische Fermentation im synthetischem Medium

Die temperaturdynamische Fermentation mit *H. elongata* fand in diesem Experiment im synthetischen Medium (MM63-10 %) statt. Durch Mangel an komplexen Verbindungen im Medium ist der Organismus auf die *de-novo*-Synthese von kompatiblen Soluten angewiesen. Dies bedingt reduzierte Wachstumsraten dieses Bakteriums in einem solchen Medium (Ures, 2005). Daher wurde die Temperaturdynamik in diesem Experiment auf konstante 0,4 °C/h angepasst, um dem Organismus die Adaptation an das saline Milieu zu ermöglichen. Eine schnellere Temperaturdynamik resultiert in der Inhibierung des bakteriellen Wachstums (nicht dargestellt). Der Verlauf der temperaturdynamischen Fermentation im synthetischen Medium ist in Abb. 18 unter Kennzeichnung wichtiger Probenahmen abgebildet.

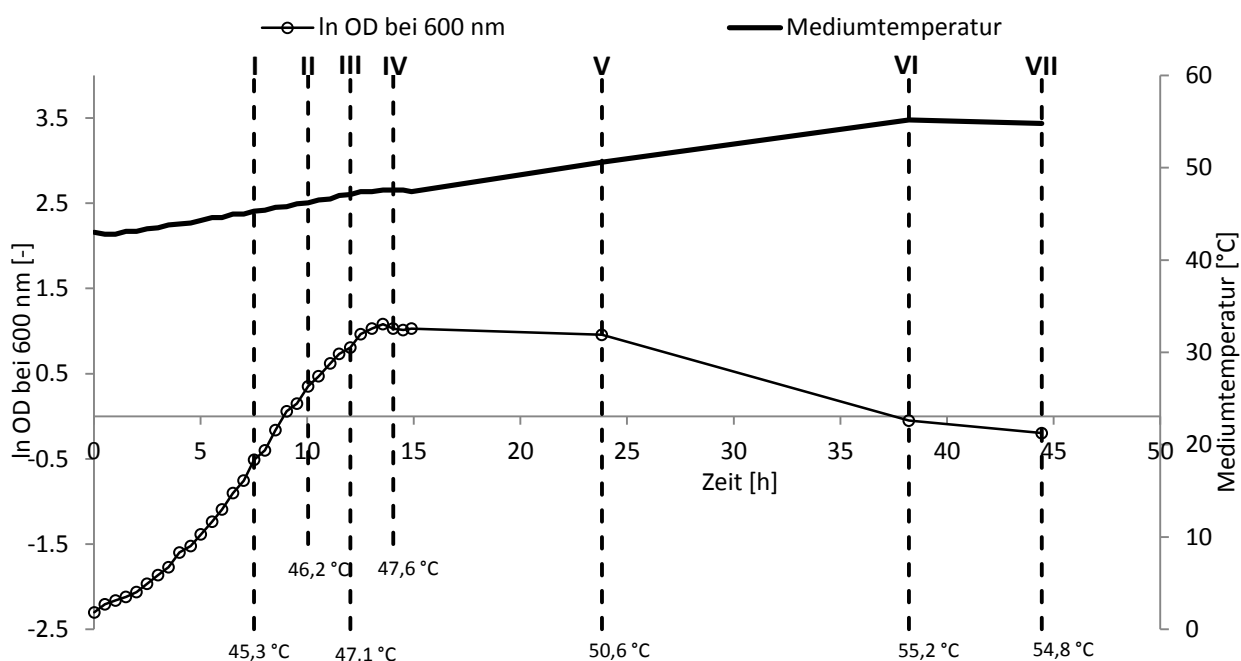


Abb. 18: Temperaturdynamische Fermentation mit *H. elongata* im synthetischem Medium.

Der Fermentationsversuch fand in MM63-10 % statt. Der Temperaturgradient betrug 0,4 °C/h. Dargestellt sind der natürliche Logarithmus der optischen Dichte (bei 600 nm) sowie das Verhalten der Mediumtemperatur. Zusätzlich sind Zeitpunkte (---) von Probenahmen mit der jeweiligen Mediumtemperatur markiert und durch römische Zahlen (I bis VII) durchgehend nummeriert.

Es ist ersichtlich, dass das halophile Bakterium auch unter temperaturdynamischen Bedingungen im synthetischen Medium wachsen kann. Die Wachstumsrate im synthetischen Medium ist mit $0,23 \text{ h}^{-1}$ deutlich geringer als im Komplexmedium ($0,93 \text{ h}^{-1}$). Wie in Abb. 18 dargestellt, wurden zu definierten Zeitpunkten Proben für die Analytik entnommen (römisch nummeriert). Dazu ist die jeweilige Mediumtemperatur angegeben. Im Gesamtverlauf der Medientemperatur fällt die Abnahme gegen Ende der Fermentation auf. Sie ist durch repetitive Probenahmen und durch technische Parameter des Bioreaktors bedingt. Vitale Zellen konnten noch bis zur Probenahme V registriert werden (nicht dargestellt). In späteren Probenahmen waren keine vitalen Zellen im Kultivierungsmedium nachweisbar. Im weiteren Verlauf sollen die nummerierten Proben auf ihren Gehalt an intrazellulären Soluten und anorganischen Ionen analysiert werden.

1.2.3 Analytik intrazellulärer Solute und anorganischer Ionen

Proben, die während der temperaturdynamischen Fermentation genommen wurden, sind via HPLC auf intrazellulär gelöste Bestandteile analysiert worden. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 zusammengefasst.

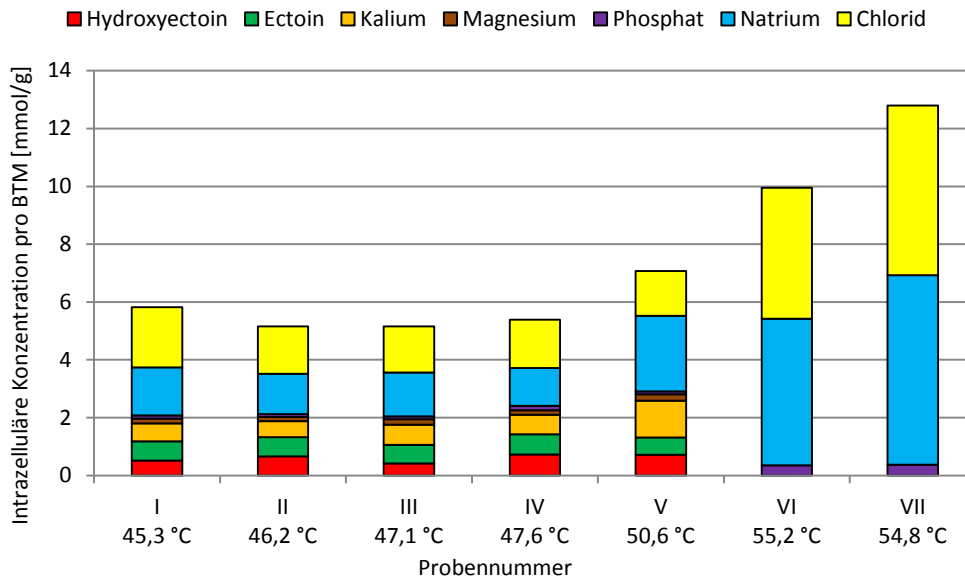


Abb. 19: Intrazelluläre Konzentrationen von Solute und anorganischen Ionen in *H. elongata*-Zellen aus den Proben I bis VII der temperaturdynamische Fermentation im synthetischen Medium.

Es muss beachtet werden, dass die Messwerte der gelösten Bestandteile (insbesondere der anorganische Ionen) durch Mediumreste im Zellzwischenraum der Probe beeinflusst sind. Daher schließen die Messwerte intrazelluläre und extrazelluläre Bestandteile ein. Die höchsten Stoffkonzentrationen werden für Natrium- und Chloridionen nachgewiesen. Solch hohe Konzentrationen sind durch das hypersalinen Milieu (10 % NaCl) begünstigt, das durch die Minderung der Wasseraktivität dazu dient Austrocknungsbedingungen zu approximieren.

Ab 55,2 °C sind keine kompatiblen Solute mehr nachweisbar. Zeitgleich nimmt der Gehalt an NaCl zu und erhöht sich nochmals bei weiter ansteigender Temperatur. Der progressive Anstieg von NaCl in der Probe könnte durch Bindung an hitzedenaturiertes Protein begünstigt sein. In den Proben VI und VII sind weiterhin nur noch Phosphationen nachweisbar. Über den gesamten Fermentationsverlauf werden Phosphat- und Magnesiumionen nur in kleinen Konzentrationen nachgewiesen. In abgestorbenen Zellen (Proben VI und VII) sind nur Phosphationen noch in leicht erhöhter Konzentration nachweisbar.

Der Gehalt von Kaliumionen im Zellinneren bleibt annähernd konstant und nimmt erst von Probe IV auf Probe V zu. Es ist möglich, dass die erhöhten Kaliumwerte durch das Einfließen des kaliumreichen Mediums in die Zellen oder durch die Bindung von Kalium an hitzedenaturiertes Protein begünstigt sind. Die Glutamatkonzentration befand sich allerdings unterhalb der unteren Nachweisgrenze des HPLC-Systems (Verwendung eines anderen Detektors als für den Ectoin- und Hydroxyectoinnachweis).

Ectoin und Hydroxyectoin sind in annähernd gleichem Verhältnis bis zur Probe V nachweisbar. Entgegen dem vorangegangenen Experiment ändert sich dieses Verhältnis nicht signifikant. Beide Protektiva sind wahrscheinlich für die Toleranz der äußeren Bedingungen wichtig.

In den Proben VI und VII sind keine kompatiblen Solute nachweisbar. Dies ist wahrscheinlich durch das Absterben der Zellen und durch das Ausfließen der Solute bedingt. Die letzte Probe in der noch vitale Zellen und Anzeichen einer Stressantwort nachweisbar waren ist Probe V. Um Hinweise auf weitere Anpassungsmechanismen zu erhalten wurde diese im nächsten Schritt via ^{13}C -NMR-Spektroskopie genauer untersucht (siehe Abb. 20).

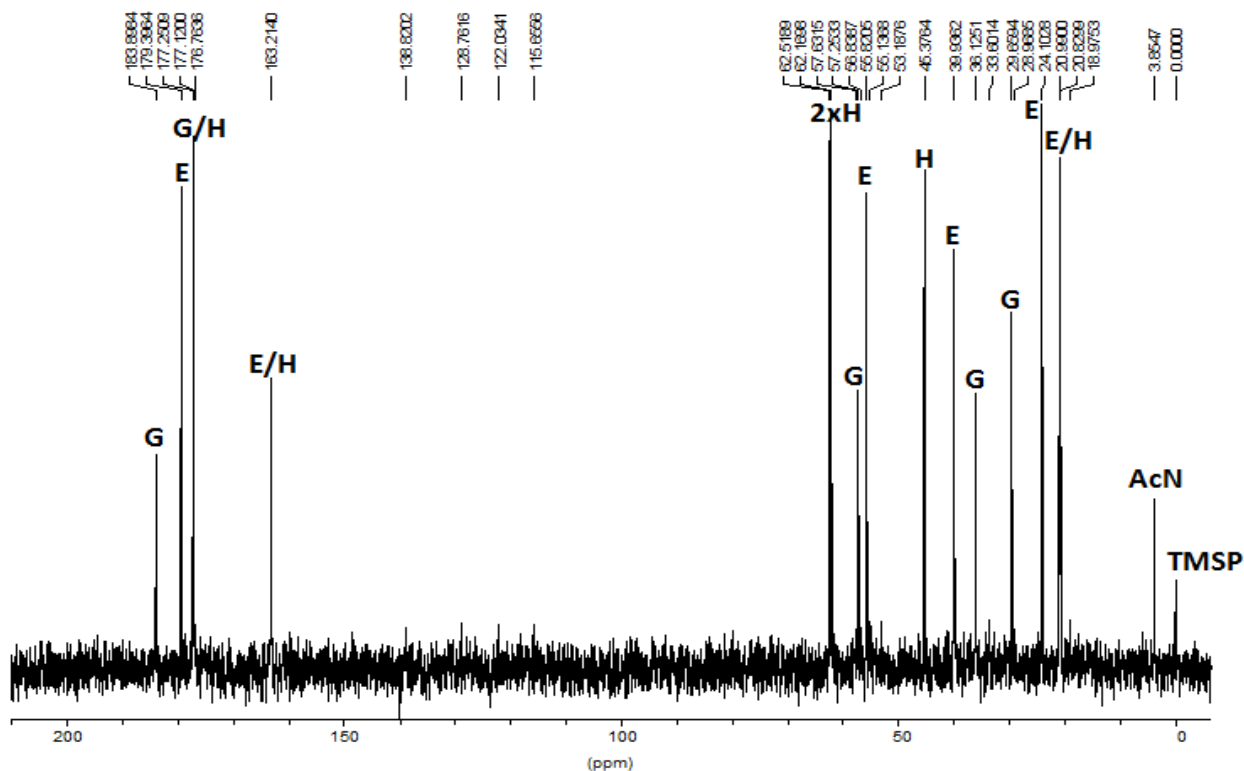


Abb. 20: ^{13}C -NMR-Spektrum der Probe V aus der temperaturdynamischen Fermentation im synthetischen Medium.

Im Spektrum markiert sind die detektierten Solute Ectoin (E), Hydroxyectoin (H), Glutamat (G) sowie die internen Standards Acetonitril (AcN) und Trimethylsilylpropionat (TMSP).

Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind neben den internen Standards drei weitere Substanzen erkennbar. Wie bereits durch die HPLC bestätigt, werden sowohl Ectoin als auch Hydroxyectoin im Zellmaterial nachgewiesen. Zusätzlich ist durch dieses Spektrum erkennbar, dass auch Glutamat in die Zellen akkumuliert wurde. Weitere organische Solute, die auf einen Anpassungsmechanismus deuten könnten, sind nicht nachweisbar gewesen.

1.2.4 Ortho- und Polyphosphatnachweis

Die ^{13}C -NMR-Analyse lieferte keine Hinweise darauf, dass weitere niedermolekulare Kohlenstoffverbindungen (neben Ectoin, Hydroxyectoin und Glutamat) in *H. elongata* zur Adaptation an erhöhte Temperaturen und geringe Wasseraktivitäten vorhanden sind. Wie im Kapitel IV3.2.4 beschrieben können allerdings auch Polyphosphate in die prokaryotische Stressantwort (als Reaktion auf extreme abiotische Umwelteinflüsse) involviert sein. Polyphosphate waren nicht via HPLC nachweisbar. Jedoch können sie durch fünftägige Hydrolyse bei 60 °C zu Monophosphationen (Orthophosphat) aufgetrennt werden (siehe Kapitel V5.8). Ein erhöhter Orthophosphatgehalt wäre dann per HPLC detektierbar. Daher wurden Teile der Proben I bis VII hydrolytisch behandelt und erneut via HPLC vermessen. Der Vergleich der Orthophosphatkonzentrationen ist in Abb. 21 für die Proben vor und nach der hydrolytischen Behandlung dargestellt.

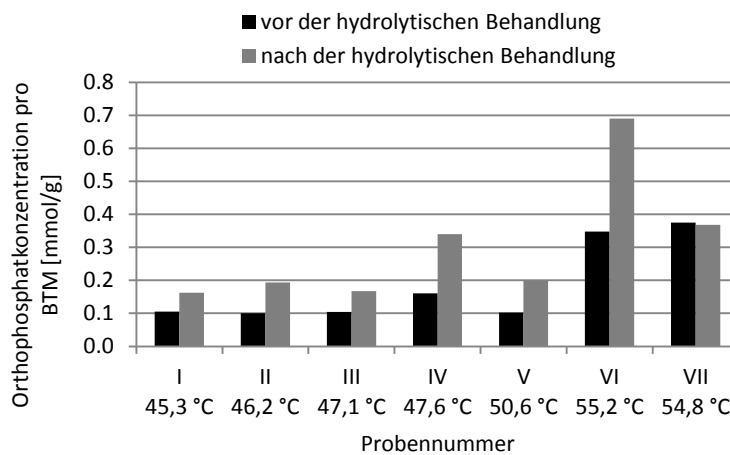


Abb. 21: Phosphationenkonzentration der hydrolytisch behandelten und unbehandelten Proben I bis VII.

Die Proben stammen aus der temperaturdynamischen Fermentation im synthetischen Medium. Zusätzlich zur Probennummerierung ist die jeweilige Mediumtemperatur angegeben.

Wie in Abb. 21 deutlich ersichtlich, werden nach der hydrolytischen Behandlung in fast allen Proben nahezu verdoppelte Orthophosphatkonzentrationen detektiert. Sie lassen die Anwesenheit von Polyphosphaten in den untersuchten Proben vermuten. Bereits in Probe VI steigt der intrazelluläre Orthophosphatgehalt an, was auf die gesteigerte Porosität der Biomembran und auf das Einströmen von phosphatgepufferten Medium deutet. Probe VII liegt in der späten Absterbephase, sodass ein Großteil intrazellulär gelöster Stoffe vermutlich ausgeflossen ist und so kaum noch ein signifikanter Unterschied zwischen den Orthophosphatkonzentrationen gemessen werden kann.

Zur eindeutigen Identifikation von Polyphosphaten ist die unbehandelte Probe V zusätzlich per ^{31}P -NMR-Spektroskopie untersucht worden (ohne Hydrolyse möglicher Polyphosphate). Das erhaltene ^{31}P -NMR-Spektrum ist in Abb. 22 abgebildet. Auffällig ist das P-markierte Signal, welches den Gehalt an Orthophosphat in der Probe verifiziert. PP-markiert ist die theoretische Position des Polyphosphatsignals (Stover *et al.*, 1994). Aus dem Fehlen dieses Signals kann abgeleitet werden, dass sich kein Polyphosphat in der Probe befindet. Zusätzliches Orthophosphat, das nach der hydrolytischen Behandlung detektiert wurde, stammt daher vermutlich nicht aus Polyphosphaten. Mit diesem Ergebnis wird somit die Akkumulation von Polyphosphate als Stressantwort ausgeschlossen.

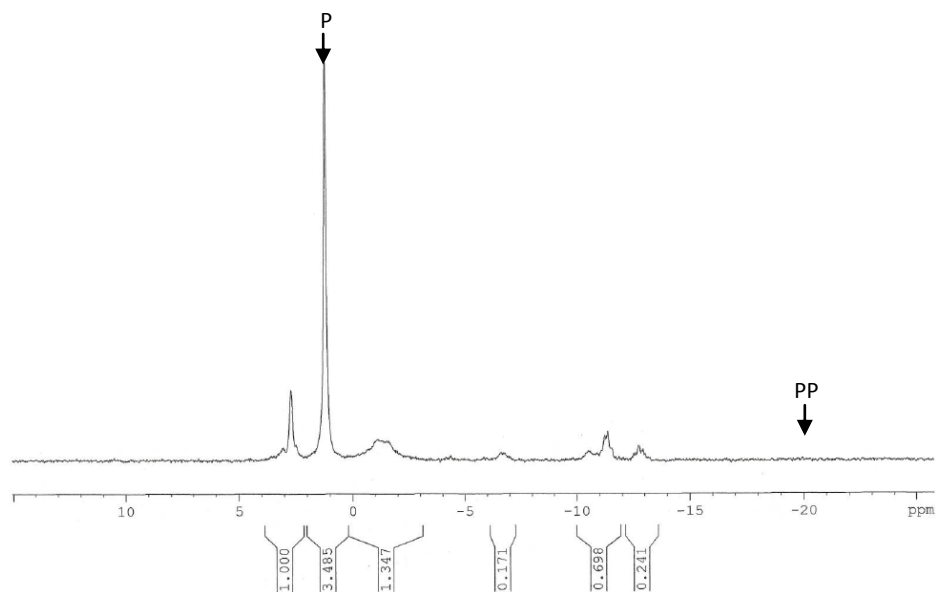


Abb. 22: ^{31}P -NMR-Spektrum der Probe V.

P markiert den Nachweis von Orthophosphat (monomeres Phosphat). **PP** markiert die theoretische Position des Polyphosphatsignals. Das Fehlen dieses Signals bestätigt die Abwesenheit von Polyphosphaten in der Probe V. Die Referenz erfolgte extern auf Triphenylphosphat bei -17,8 ppm.

1.3 Elementarspektroskopische Betrachtung von *H. elongata*

Wie in Kapitel IV3.2.4 beschrieben kann die Akkumulation verschiedener anorganischer Ionen oder Moleküle als biologische Reaktion auf dehydrierungsbedingten Stress eine Rolle spielen. Phosphate wurden im vorangegangenen Kapitel bereits betrachtet. Um Hinweise auf die Akkumulation weiterer anorganischer Komponenten zu erhalten wurde Zellmaterial von *H. elongata* von einer 24-stündig inkubierten (30 °C) AB-10 % -Agarplatte via EDX-Spektroskopie untersucht. Zur Kontrolle der Morphologie wurde dieselbe Probe rasterelektronenmikroskopisch betrachtet. In Abb. 23 sind sowohl die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme als auch das erhaltene Elementarspektrum abgebildet.

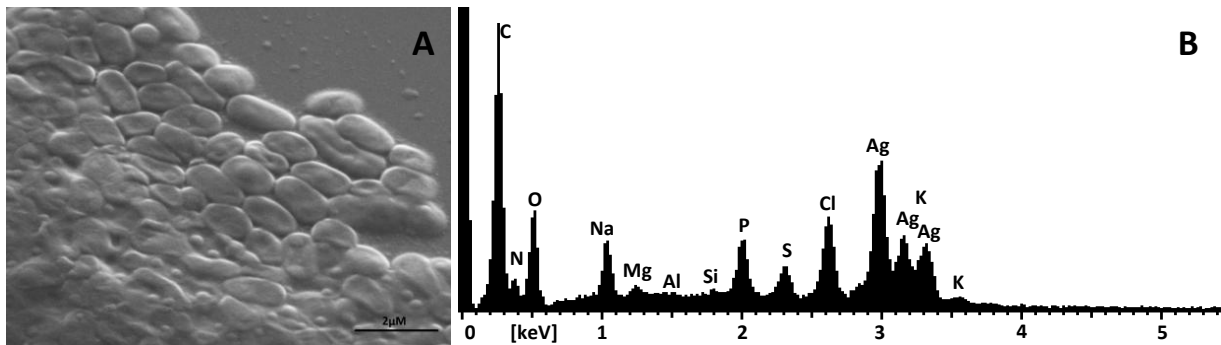


Abb. 23: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme sowie Elementarspektrum von *H. elongata*.

Das Zellmaterial stammt von einer 24-stündig inkubierten (30 °C) AB-10%-Agarplatte. Die Zellen wurden für die elektronenmikroskopische Aufnahme mit Silber besputtert. Die qualitative Analyse der elementaren Zusammensetzung der *H. elongata*-Zellen wurde mit derselben Probe durchgeführt.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt, dass die untersuchten Zellen die flache Form der Zellen resultiert aus der Behandlung zur Silberbeschichtung der Zellen. Die qualitative Analyse des Elementarspektrums zeigt, dass sich zunächst die typischen Elemente biologischer Materie (Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Phosphor) signifikant nachweisen lassen. Weitere charakteristische Signale ergeben sich für Natrium, Magnesium, Schwefel, Chlor und Kalium. *H. elongata* akkumulierte demnach keine weiteren anorganischen Ionen oder Verbindungen.

Silbersignale sind durch die Beschichtung bedingt und verdecken lediglich die Kaliumsignale. Dies wurde durch goldbeschichtete Proben verifiziert (nicht dargestellt). Aluminium und Silizium sind zusätzlich markiert, da sich hier falsch-positive Signale ergeben können, die durch den technischen Aufbau oder Verunreinigungen (Staub) bedingt sind.

1.4 Bioinformatische Analyse bakterieller Proteome

1.4.1 Vergleich des *E. coli*- und des *H. elongata*-Proteoms

Bis hierhin durchgeführten Experimente untersuchten die Akkumulation kompatibler Solute und anorganischer Ionen als Antwort auf erhöhte Temperaturen und saline Dehydrierung. Wie in Kapitel IV3.2.2 vorgestellt, können auch spezielle Proteine in die eine solche Stressantwort involviert sein. Derartige Proteine (z. B. Hydrophiline) sind oft sehr klein und sehr hydrophil. Der Gehalt an geladenen Aminosäuren bedingt die Hydrophilie. Ein proteomweiter Anstieg der Hydrophilie kann so eine Adaptation an ein dehydrierendes Milieu (Hypersalinität) darstellen. Daher ist der Vergleich eines halophilen und eines nicht-halophilen Proteoms interessant.

Vor kurzem wurden die Sequenzierungsdaten des *H. elongata*-Genoms veröffentlicht (Schwibbert *et al.*, 2011). Dies ermöglichte es, die Aminosäurekompositionen der Proteome von *E. coli* (nicht-halophil) und *H. elongata* (halophil) zu ermitteln und zu vergleichen. Sie sind in Abb. 24 als relative Häufigkeiten und als Vergleich zwischen den Organismen dargestellt.

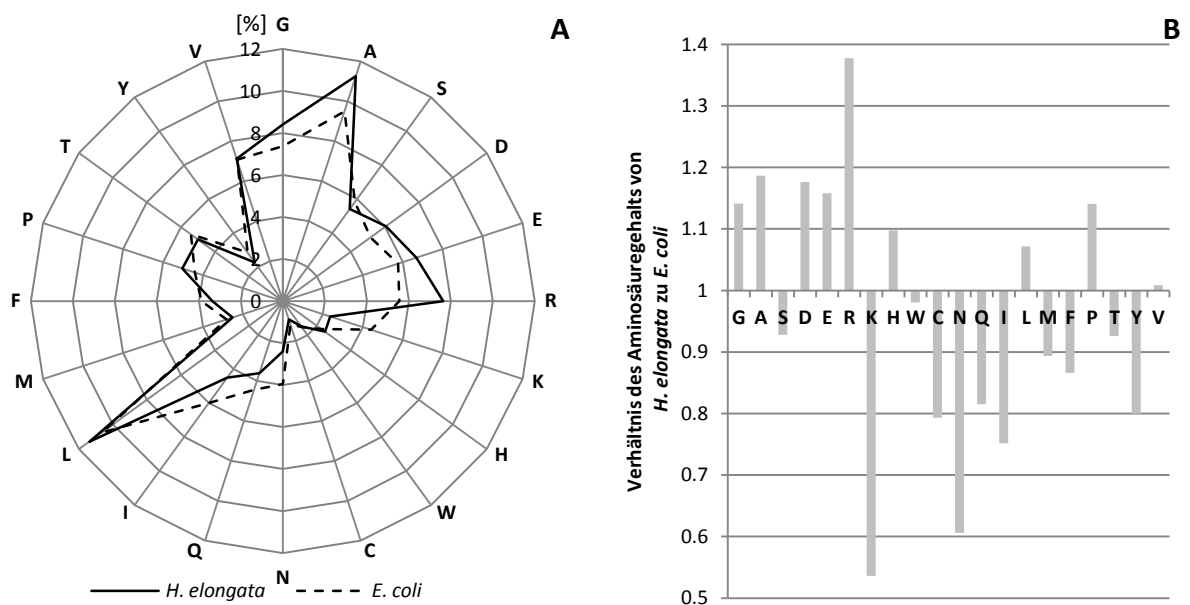


Abb. 24: Relative Aminosäurehäufigkeit (A) im *H. elongata*- und *E. coli*-Proteom und deren Verhältnisse (B).

Im Netzdiagramm (A) werden die relativen Häufigkeiten der Aminosäuren pro Proteom dargestellt. Die Verhältnisse (B) der Aminosäureanteile von *H. elongata* zu *E. coli* verdeutlichen die Unterschiede (ein Verhältnis von 1 deutet auf gleichen Aminosäuregehalt in beiden Proteomen; >1 impliziert einen höheren und <1 einen niedrigeren Aminosäuregehalt im *H. elongata*-Proteom). Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben: G (Glycin), A (Alanin), S (Serin), D (Asparaginsäure), E (Glutaminsäure), R (Arginin), K (Lysin), H (Histidin), W (Tryptophan), C (Cyctein), N (Asparagin), Q (Glutamin), I (Isoleusin), L (Leucin), M (Methionin), F (Phenylalanin), P (Prolin), T (Threonin), Y (Tyrosin) und V (Valin).

H. elongata zeigt einen höheren Anteil sehr kleiner Aminosäuren Glycin (G) und Alanin (A) (Abb. 24 A). Dadurch liegt die Summe der kleinsten und Hydrophilin-typischen Aminosäuren (G, A und S) in *H. elongata* bei etwa 25,1 % und in *E. coli* bei 22,7 %. Auch die eher kleine Aminosäure Prolin (P) kommt verhältnismäßig häufiger im *H. elongata*-Proteom vor.

Anteile der sauren Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure (D und E) sind in *H. elongata* ebenfalls höher und summieren sich auf etwa 12,8 % des Proteoms (bei *E. coli* nur 10,8 %). Während der Unterschied im Gehalt der beiden basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) in *E. coli* nur gering ist (etwa 5,5 % R und 4,4 % K) sind die beiden Werte für *H. elongata* deutlich unterschiedlich (7,6 % R und 2,4 % K). Histidin macht in beiden Organismen nur etwa 2,3 bis 2,5 % des Proteoms aus. Mit Ausnahme des hydrophoben Leucins (L), das in beiden Organismen die häufigste Aminosäure ist, sind alle weiteren Aminosäuren, die gänzlich zu den ungeladen Aminosäuren gehören, vergleichbar oft (W und V) oder verhältnismäßig seltener (C, N, Q, I, M, F, T und Y) im *H. elongata*-Proteom vorhanden (Abb. 24 B).

Vor allem der relativ höhere Gehalt an sauren Aminosäuren deutet auf ein eher saures Proteom von *H. elongata*. Um zu untersuchen, wie sich dies auf die Azidität des Proteoms auswirkt, wurde der Gehalt der sauren Aminosäuren Glutaminsäure (Glu) und Asparaginsäure (Asp) mit dem Gehalt der basischen Aminosäuren Lysin (Lys) und Arginin (Arg) für jedes Protein der bakteriellen Proteome verglichen. Das sich für jedes Protein ergebende Verhältnis $[Glu+Asp]/[Lys+Arg]$ diente als Kriterium zur Ermittlung der Häufigkeit von Proteinen, die einen bestimmten Verhältniswert annehmen. Verhältniswert von 1 findet man bei neutralen Proteinen (gleicher Gehalt von sauren und basischen Aminosäuren). Werte < 1 sind repräsentativ für eher basische Proteine und Werte > 1 für eher saure Proteine. Die relative Häufigkeit der Proteine mit einem bestimmten $[Glu+Asp]/[Lys+Arg]$ -Verhältnis ist in Abb. 25 A für *E. coli* und *H. elongata* dargestellt. Da sich die Umweltbedingungen eines Lebensraums (wie Salinität) vor allem auf periplasmatische Proteine auswirken, wurden die als „periplasmatisch“ annotierten Proteine gesondert betrachtet. Die sich für sie ergebenden $[Glu+Asp]/[Lys+Arg]$ -Verhältnisse wurden dem Gehalt saurer Aminosäuren pro Protein in Abb. 25 B gegen übergestellt.

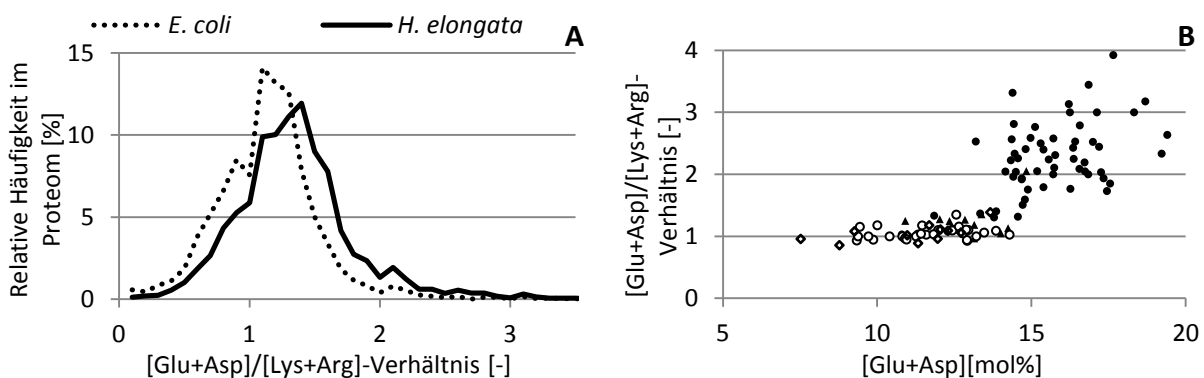


Abb. 25: Relative Häufigkeit von Proteinen mit einem bestimmten $[Glu+Asp]/[Lys+Arg]$ -Verhältnis in den Proteomen von *E. coli* und *H. elongata* (A) und Vergleich periplasmatischer Proteine der beiden Organismen (B).

Periplasmatischen Proteine (B) werden für beide Organismen in bindende und sonstige (nicht-bindende) Proteine differenziert: ○ - periplasmatische Bindeproteine (*E. coli*), ◇ - sonstige periplasmatische Proteine (*E. coli*), ● - periplasmatische Bindeproteine (*H. elongata*), ▲ - sonstige periplasmatische Proteine (*H. elongata*).

Es zeigt sich in Abb. 25 A, dass das halophile Proteom von *H. elongata* im Vergleich zu *E. coli* eine leichte Verschiebung zu höheren [Glu+Asp]/[Lys+Arg]-Verhältnissen aufweist. Dies impliziert, dass das *H. elongata*-Proteom einen leicht saureren Charakter als das *E. coli*-Proteom aufweist. Dadurch ist vermutlich ein Großteil der Proteine in dem halophilen Organismus hydrophiler als in *E. coli*. Noch deutlicher wird dieser Unterschied bei der Betrachtung der als „periplasmatisch“ annotierten Proteine in den beiden Organismen (Abb. 25 B). Vor allem die periplasmatischen Bindepoteine in *H. elongata* differenzieren sich deutlich von denen in *E. coli* durch hohe [Glu+Asp]/[Lys+Arg]-Verhältnisse ($> 1,5$), die meist durch den verhältnismäßig höheren Gehalt saurer Aminosäuren (> 13 mol%) verursacht werden. Der leicht saurere Charakter des halophilen Proteoms ist wahrscheinlich auf eine bessere Adaptation von *H. elongata* an die geringe Wasseraktivität und der hohen Ionenstärke seines hypersalinen Habitats zurückzuführen.

1.4.2 Identifizierung potentieller Hydrophilie in *E. coli* und *H. elongata*

Bioinformatische Methoden erleichtern auch die Identifikation spezieller Proteine innerhalb eines Proteoms. So wird durch sie die expressionsunabhängige Suche nach potentiellen Hydrophilinen im Proteom eines Organismus möglich. Die Identifizierung potentieller Hydrophilie ist durch einen erhöhten Glycingehalt (> 6 mol%) und durch einen hohen Hydrophilie-Index (> 1) möglich (siehe Kapitel IV3.2.2.1.1). Die Hydrophilie eines Proteins berechnet sich aus dem Durchschnitt der einzelnen Hydrophiliewerte der Aminosäuren eines Proteins (Kyte und Doolittle, 1982). Diese Kriterien erfassen mit hoher Sicherheit potentielle Hydrophilie und wurden bereits genutzt, um den Organismus *E. coli* W3110 auf potentielle Hydrophilie zu untersuchen (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

Durch ein *ad hoc* erstelltes Programm in Java konnten die Proteome der Organismen *E. coli* K12 und *H. elongata* in Bezug auf Aminosäuregehalt und Hydrophilie einzelner Proteine bioinformatisch analysiert werden. In keinem der Proteome waren Proteine als Hydrophilin, LEA-Protein oder potentielles Hydrophilin bzw. LEA-Protein annotiert. Zur Identifikation potentieller Hydrophilie wurde der prozentuale Glycingehalt gegen die Hydrophilie der Proteine aufgetragen. Die sich ergebenden Streudiagramme sind für *E. coli* und *H. elongata* in Abb. 26 dargestellt.

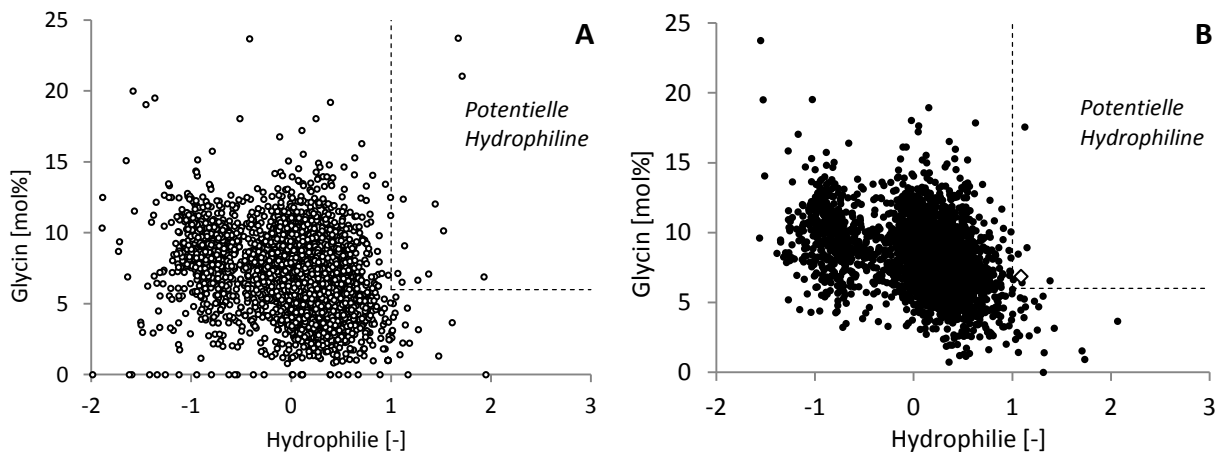


Abb. 26: Streudiagramme des Glycingehalts gegenüber der Hydrophilie der Proteine ganzer Proteome.

Die Daten berechnen sich aus der bioinformatischen Analyse der Proteome von *E. coli* K12 (A) und *H. elongata* (B). Die Klassifizierung potentieller Hydrophiline wird durch den Glycingehalt > 6 mol% und einen mittleren Hydrophilie-Wert > 1 vorgenommen. Diese Grenzen für potentielle Hydrophiline sind markiert (- - -). Für *H. elongata* (B) ist zusätzlich das putative und uncharakterisierte Protein E1V347 markiert (\diamond).

In den Streudiagrammen beziehen sich negative Hydrophiliewerte auf eher hydrophobe Proteine und positive Werte auf eher hydrophile Proteine. Daher sind weit im positiven Hydrophilie-Bereich die Klassifizierungsgrenzen für potentielle Hydrophiline markiert. Nach diesen Kriterien finden sich in *E. coli* 11 potentielle Hydrophiline, von denen 4 uncharakterisiert sind. In *H. elongata* finden sich 9 potentielle Hydrophiline, von denen 5 putative und uncharakterisierte Proteine sind (detaillierte Auflistung im Anhang, Tab. 4).

Unter den bereits annotierten Proteinen der möglichen Hydrophiline sind nur in *H. elongata* über die Hälfte (5 von 9) assoziiert mit Nukleinsäurewechselwirkungen (ribosomale und Ribosom-assoziierte Proteine sowie DNA-Bindeproteine). Vor allem der hohe Anteil basischer Aminosäuren (typisch für solche Proteine) verursacht hier einen erhöhten Hydrophilie-Wert.

Die Streudiagramme zeigen, dass sich in beiden Organismen potentielle Hydrophiline finden lassen. Bei der genaueren Betrachtung dieser Proteine fällt eines besonders auf. Es handelt sich dabei um das putative und uncharakterisierte Protein E1V347 aus *H. elongata*. Dieses wird im Folgenden genauer betrachtet.

1.4.3 Eigenschaften des uncharakterisierten Proteins E1V347 aus *H. elongata*

Das uncharakterisierte Protein E1V347 (putatives Protein) aus *H. elongata* gehört zu den Proteinen aus *H. elongata*, die anhand ihres Glycingehalts und ihrer Hydrophilie als potentielle Hydrophilinen klassifiziert wurden. Es besteht zu 6,9 % aus Glycin und hat einen Hydrophiliewert von etwa 1,1. Aufgrund des hydrophilen Charakters in Kombination mit der geringen Größe (ca. 14 kDa) und dem eher sauren isoelektrischen Punkt (theoretischer pI bei 4,6) weist dieses Protein bereits eine Reihe typischer Merkmale von Hydrophilinen auf. In Abb. 27 sind zusätzlich das Hydrophilie-Profil und die Aminosäurezusammensetzung dieses Proteins dargestellt.

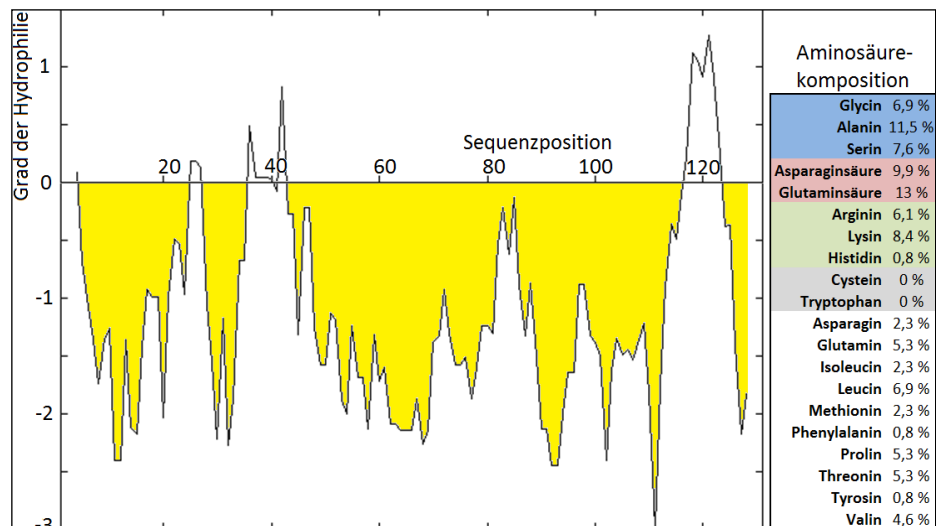


Abb. 27: Hydrophilie-Profil und Aminosäurekomposition des Proteins E1V347 aus *H. elongata*.

Das Hydrophilie-Profil wurde nach dem Kyte-Doolittle-Algorithmus erstellt und ist über die Positionen der Aminosäuresequenz des Proteins E1V347 dargestellt (Kyte und Doolittle, 1982). Für die Erstellung des Profils wurde eine Fensterschrittweite von 12 gewählt. Zusätzlich ist die prozentuale Aminosäurezusammensetzung des Proteins E1V347 angegeben und bestimmte Aminosäuren sind farblich hervorgehoben: sehr kleine Aminosäuren (blau), saure Aminosäuren (rot), basische Aminosäuren (grün), fehlende Aminosäuren (grau).

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Protein primär einen hydrophilen Charakter aufweist (gelbe Bereiche). Daher wird es wahrscheinlich zytosolisch lokalisiert sein. Dies wurde durch die bioinformatische Webapplikation Psort-B bestätigt. Hier berechnet sich für das Zytosol die höchste Lokalisierungswahrscheinlichkeit für dieses Protein (Gardy *et al.*, 2003).

Weiterhin fällt auf, dass das Protein E1V347 einen großen Anteil weiterer kleiner Aminosäuren beinhaltet wie Alanin (11,5 %) und Serin (7,6 %). Damit liegt der Gesamtgehalt kleiner, Hydrophilintypischer Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin) bei 26 % und macht damit fast ein Drittel des Proteins aus. Der hydrophile Charakter basiert vor allem auf dem hohen Gehalt an sauren Aminosäuren (Glutamin- und Asparaginsäure), der bei etwa 22,9 % liegt. Basische Aminosäuren machen insgesamt etwa 15,3 % des Proteins aus. Daher bestehen etwa 38,2 % des Proteins aus geladenen Aminosäuren. Ähnlich den in pflanzlichen Organismen auffindbaren Dehydrinen (LEA-Proteingruppe 2, siehe Kapitel IV3.2.2.1.1) fehlen diesem Proteins die Aminosäuren Tryptophan und Cystein.

1.5 Experimentelle Untersuchung bakterieller Proteine

1.5.1 Hitzegesteuerte Fraktionierung für die thermoselektive Proteinisolierung

Bioinformatisch wurde zuvor gezeigt, dass potentielle Hydrophiline theoretisch durch *E. coli* und *H. elongata* expremierbar sind. Durch ihre hohe Hydrophilie sind sie hitzestabiler als die meisten anderen Proteine. Diese Eigenschaft (Löslichkeit bei hohen Temperaturen) kann man nutzen, um Hydrophiline relativ einfach zu isolieren (Ried und Walker-Simmons, 1994; Wolkers *et al.*, 2001). Sofern derartige Proteine expremiert werden, sollten sie demnach thermoselektiv aus dem Gesamtzellprotein isolierbar sein (als nicht-gefällte Fraktion). Daher wurde das Gesamtzellprotein des nicht-halophilen Bakteriums *E. coli* und des halophilen Bakteriums *H. elongata* auf hitzestabile Proteine untersucht, um herauszufinden, ob sich potentielle Hydrophiline auf diese Weise isolieren lassen. Für die Gewinnung des Zellmaterials wurden diese Organismen im synthetischen Medium (MM63) mit definierter NaCl-Konzentration kultiviert. *E. coli* wurde bei konstant 37 °C und *H. elongata* bei konstant 30 °C kultiviert. Die Präparation des Gesamtzellproteins erfolgte wie im Kapitel V5.7 beschrieben. Ein Teil des SDS-freien Gesamtzellproteins wurde für die Selektion hitzestabiler Proteine für 30 min bei 90 °C inkubiert und gefällte Proteine abzentrifugiert. Weiterhin gelöste Proteine wurden als hitzestabile und hitzelösliche Proteine klassifiziert. Gesamtzellprotein und der hitzestabile Anteil des Gesamtzellproteins wurden via SDS-PAGE analysiert und verglichen. Die entstandenen SDS-PA-Gele sind in Abb. 28 dargestellt.

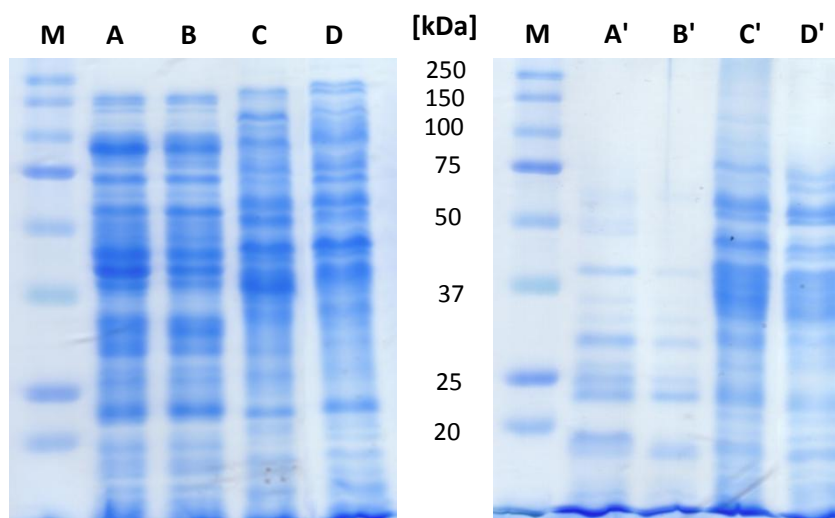


Abb. 28: SDS-PA-Gele zum Vergleich des Gesamtzellproteins und hitzeselektierter Proteine aus *E. coli* (A, A', B und B') und *H. elongata* (C, C', D und D') in Abhängigkeit von der Salzkonzentration während der Kultivierung.

Der Proteinstandard ist mit M markiert. Banden des Gesamtzellproteins sind mit A, B, C und D gekennzeichnet. Banden hitzestabiler Proteine sind durch A', B', C' und D' gekennzeichnet. Die Hitzefällung erfolgte bei 90 °C für 30 min. Hitzestabile (weiterhin gelöste) Bestandteile wurden für die SDS-PAGE verwendet. Das verwendete Zellmaterial stammt aus der Kultivierung im synthetischen Medium (MM63) mit definierter Salzkonzentration: A/A' – *E. coli* (0,5 % NaCl), B/B' – *E. coli* (2 % NaCl), C/C' – *H. elongata* (2 % NaCl), D/D' – *H. elongata* (10 % NaCl).

Durch die abgebildeten Gele werden Gesamtzellprotein und hitzestabile Proteine der Organismen *E. coli* und *H. elongata* verglichen, die bei verschiedenen Salzkonzentrationen kultiviert wurden. *E. coli* wurde in MM63-0,5 % und MM63-2 % kultiviert. Weiterhin auch *H. elongata* in MM63-2 % kultiviert, um die Organismen bei gleicher NaCl-Konzentration des Mediums vergleichen zu können. Zusätzlich wurde *H. elongata* in MM63-10 % kultiviert, um die Expressionsmuster unter dehydrierungsbedingtem Stress zu untersuchen.

Durch Abb. 28 wird erkennbar, dass unabhängig von der Salinität aus dem Gesamtzellprotein beider Organismen stets ein hitzestabiler Anteil isoliert und aufgetrennt werden konnte. Eine tatsächliche Fraktionierung und Anreicherung kleiner (< 50 kDa) hitzestabiler Proteine konnte jedoch nur für *E. coli* beobachtet werden. Dies verifiziert die Umsetzung der gezielten Selektion hitzestabiler Proteine aus einem Gesamtprotein. Für *H. elongata* lässt sich nur eine leichte Reduzierung des Gesamtzellproteins durch die Hitzebehandlung, jedoch keine Fraktionierung hitzestabiler Proteine feststellen. Dieses Ergebnis ist konform mit der Beobachtung verminderter Proteinpräzipitation während der Hitzebehandlung des Zellysats aus *H. elongata* im Vergleich zu Zellysats aus *E. coli*. Daher war die gezielte Selektion und Fraktionierung kleiner, hitzestabiler Proteine für *H. elongata* nicht erfolgreich.

Höheren Salzkonzentrationen während der Kultivierung führen innerhalb einer Spezies nicht zu signifikanten Änderungen der Expressionsmuster im Gesamtzellprotein relativ zu geringeren Mediensalinitäten. Gleiches gilt für die Expression spezieller und hitzestabiler Proteine, die dadurch nicht nachgewiesen werden kann. Die Vermutung, dass die Salzkonzentration des Kultivierungsmediums einen Einfluss auf die Selektion hitzestabiler Proteine haben könnte, kann durch die Kultivierung von *E. coli* und *H. elongata* in MM63-2 % ausgeschlossen werden, da auch hier nur für *E. coli* eine Umsetzung der hitzeselektiven Proteinfractionierung beobachtet werden kann. Dies berücksichtigt jedoch noch nicht die Stabilisierung der Proteine durch intrazellulär akkumulierte Salze. Versuche zum Auswaschen intrazellulär akkumulierter Salze aus *H. elongata*-Zellen (Kapitel V5.2) durch die Behandlung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resultierte ebenfalls nur in der Reduzierung des gesamten Proteingehalts, jedoch nicht in einer Proteinfractionierung (Ergebnis nicht dargestellt).

Weitere Versuche wurden vorgenommen, um potentielle Hydrophiline in *H. elongata* isolieren zu können (Ergebnisse nicht dargestellt). Dazu gehört die prolongierte Hitzebehandlung (30 min, 1 h, 2 h) bei erhöhter Temperatur (99 °C) (Kapitel V5.7.2.3). Auch hier war nur die Reduzierung des gesamten Zellproteins zu beobachten. Weiterhin wurden alternative Methoden der Proteinfractionierung getestet, die Proteine anhand ihrer Hydrophobizität selektieren. Darunter fallen die fraktionierte Fällung durch Ammoniumsulfat (Kapitel V5.7.2.1) und die fraktionierte Fällung durch organische Lösungsmittel (Kapitel V5.7.2.2). Unabhängig von der Kombination mit einer zusätzlichen Hitzebehandlung konnte keine dieser beiden Proteinfractionierungsmethoden eine eindeutige Fraktionierung der Proteine aus *H. elongata* erzielen. Die Methodvalidierung fand durch die Referenz mittels Zellysats aus *E. coli* statt. Zusammengefasst war der experimentelle Nachweis kleiner und besonders hydrophiler Proteine in *H. elongata* durch die thermoselektive Proteinisolierung nicht möglich.

1.5.2 Expressionsmuster kleiner Proteine

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die hitzeselektive Isolation kleiner, hydrophiler Proteine (< 40 kDa) aus dem Gesamtzellprotein von *H. elongata* nicht möglich war. Eine alternative Möglichkeit die gesuchten Proteine nachzuweisen besteht in der Anwendung von Methoden, die das Expressionsmuster sehr kleiner Proteine detaillierter auflösen. Die gewöhnliche Glycin-SDS-PAGE, die bisher verwendet wurde, ist dazu nicht in der Lage. Expressionsmuster kleiner Proteine lassen sich jedoch durch eine modifizierte Variante der SDS-PAGE untersuchen. Dabei ist Tricin statt Glycin das Leition (Schägger, 2006). Die Durchführung der Tricin-SDS-PAGE ist in Kapitel V6.2.4 beschrieben.

Um die dehydrierungsbedingte Expression kleiner, hydrophiler Proteine zu fördern wurde *H. elongata* im synthetischen Medium (MM63) unter Variation der Salzkonzentration (3 %, 10 %, 15 % NaCl) kultiviert. Die Kultivierung wurde einerseits bei konstanten 30 °C durchgeführt. Parallele Ansätze gleicher Salinität wurden bei initialer Temperierung von 30 °C und einem Temperaturschock auf 54 °C in der Mitte der exponentiellen Phase durchgeführt. Die Zellernte erfolgte darauf in der späten exponentiellen Phase. Nach dem Aufschluss der Zellen und der Präparation des Gesamtzellproteins wurden die Proben in der Tricin-SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse separiert. Das Ergebnis ist in Abb. 29 dargestellt.

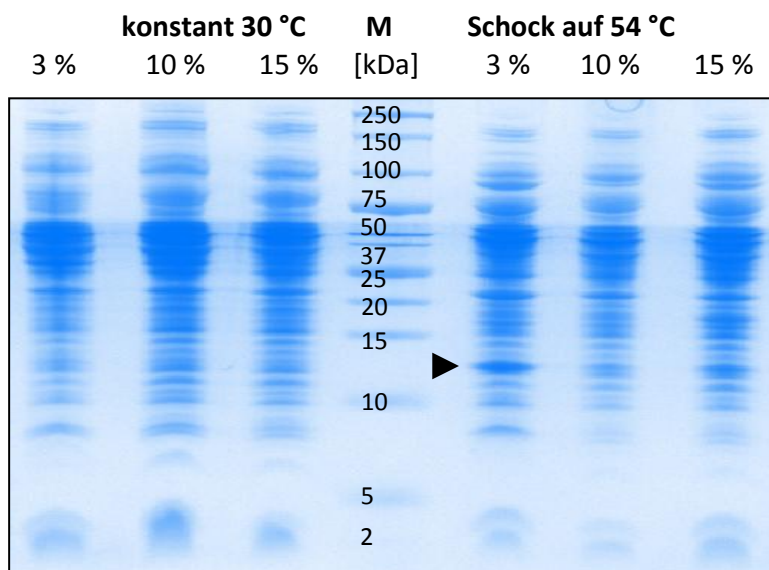


Abb. 29: Expressionsmuster kleiner Proteine von *H. elongata* bei Variation von Salinität und Kultivierungstemperatur.

H. elongata wurde in MM63 bei unterschiedlichen Salinitäten (3 %, 10 % und 15 % NaCl) kultiviert. Die erste Experimentreihe erfolgte bei konstanter Kultivierungstemperatur von 30 °C. In der zweiten Versuchsreihe erfolgte die Temperierung bis zur Mitte der exponentiellen Phase bei 30 °C und wurde dann auf 54 °C erhöht. Die Zellernte erfolgte in beiden Versuchsreihen in der späten, exponentiellen Phase. Markiert (►) ist die einzige Proteinbande, die auf die signifikant erhöhte Expression eines kleinen Proteins hinweist.

Wie Abb. 29 zeigt wird das Expressionsmuster sehr kleiner Proteine im Bereich von 2 bis 25 kDa detailliert aufgelöst. Unabhängig von der Salinität kann bei konstanter Kultivierungstemperierung von 30 °C in *H. elongata* keine deutlich verstärkte Expression kleiner Proteine beobachtet werden.

Durch den Temperaturschock in der zweiten Versuchsreihe (von 30 °C auf 54 °C) ändern sich die Expressionsmuster kaum. Deutlich auffällig ist jedoch eine Proteinbande zwischen 10 und 15 kDa, die auf die verstärkte Expression eines kleinen Proteins bei verstärktem Temperaturstress hinweist. Diese wird nur bei geringer Salzkonzentration (3 % NaCl) beobachtet. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um die verstärkte Expression eines speziellen Stressproteins handelt. Das Expressionslevel dieses Proteins unter Kultivierung mit Temperaturschock reduziert sich deutlich bei erhöhten Salinitäten des Mediums (10 % und 15 % NaCl).

Durch die Untersuchungen bakterieller Proteine wurde somit demonstriert, dass es experimentell nicht möglich war potentielle Hydrophiline sicher nachzuweisen. Demnach kann für *H. elongata* die dehydrierungsbedingte Expression potentieller Hydrophiline in betrachteten Größenbereich nicht bestätigt werden.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die von *H. elongata* synthetisierten, kompatiblen Solute als Reaktion auf thermischen und dehydrierungsbedingten Stress bedeutsamer sind als die zusätzliche Expression spezieller Stressproteine. Daher soll im Folgenden geprüft werden, wie sich der durch thermische und hyperosmotische Bedingungen kontrollierte Gehalt des Glasbildners Hydroxyectoins auf die Trockenresistenz von *H. elongata* auswirkt. Ein erhöhter Hydroxyectoinanteil im Zytosol sollte dann in der intrazellulären Vitrifikation und der verbesserten Trockentoleranz des Mikroorganismus resultieren.

2 Applizierte Vitrifikation – Ergebnisse zur kontrollierten Glasbildung

2.1 *In-vivo*-Applikation der Vitrifikation in *H. elongata*

Die intrazelluläre Vitrifikation, wie sie in anhydrobiotischen Zellen stattfindet, wird durch stark erhöhte Konzentrationen von Glasbildnern im Zellinneren und die darauf folgende Dehydrierung der Zellen realisiert (siehe Kapitel IV4.2). Um den intrazellulären Hydroxyectoingehalt zu kontrollieren und die Möglichkeit zur intrazellulären Vitrifikation zu untersuchen, wurde *H. elongata* bei verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert. Die Kultivierung wurde im synthetischen Medium mit 15 % NaCl (MM63-15 %) durchgeführt. Dies diente der Erzeugung dehydrierender Bedingungen. Eine Kultur wurde konstant auf 30 °C temperiert. Die zweite wurde initial bei 30 °C und ab der exponentiellen Phase bei 50 °C hochtemperiert (Temperaturschock).

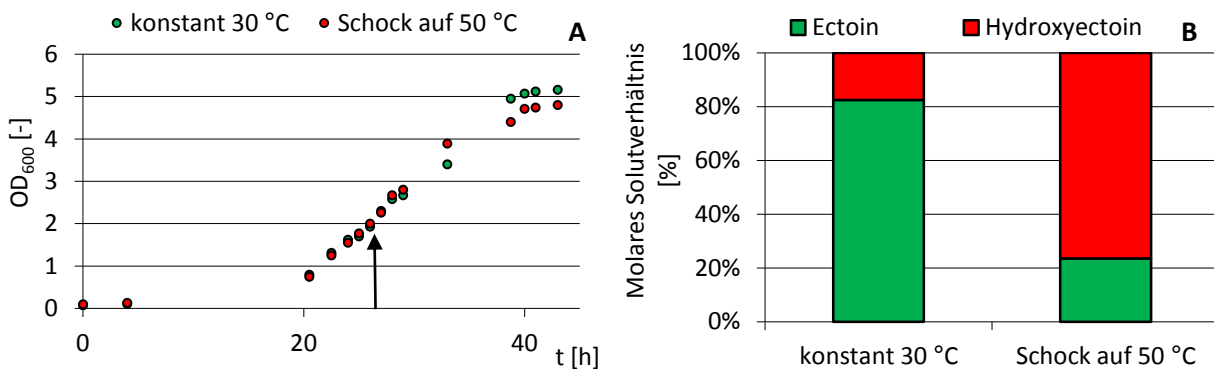


Abb. 30: Wachstumsverhalten (A) und molares Solutverhältnis (B) von *H. elongata* in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperierung.

H. elongata wurde in MM63-15 % kultiviert und in beiden Ansätzen initial bei 30 °C kultiviert. Der zweite Ansatz wurde ab der Mitte der exponentiellen Phase durch einen Temperaturschock auf 50 °C hochtemperiert (Pfeilmarkierung in A). Das molare Solutverhältnis (B) verdeutlicht das Konzentrationsverhältnis der beiden Solute zueinander in der frühstationären Phase.

In Abb. 30 A sind die zugehörigen Wachstumskurven ersichtlich, welche sich trotz Unterschieden in der Temperierung kaum differenzieren. Die Kulturen wurden in der frühstationären Phase (4 h nach Übergang) geerntet. Es wurden Zellextrakte angefertigt und die intrazellulären Bestandteile via HPLC analysiert. Das intrazelluläre Verhältnis von Ectoin und Hydroxyectoin ist in Abb. 30 B dargestellt. Es ist offensichtlich, dass die Kombination von erhöhter Salinität und Hitze die Umsetzung von Ectoin in die hydroxylierte Form induziert, so dass der Hydroxyectoinanteil von 20 % auf 75 % steigt. Dies ist der Anpassungsstrategie an die natürlichen Umgebungsbedingungen dieses extremophilen Organismus zuzuordnen.

Die Überlebensfähigkeit wurde von Zellen mit diesem intrazellulären Solutgehalt unter harschen Trocknungsbedingungen untersucht. Die Zellen wurden für 3 h und bei 45 °C und 10 mbar im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen (Überlebensrate) wurde von einer initialen Probe (Kontrolle vor der Trocknung), von einer ungetrockneten Probe (ungetrocknete Kontrolle) und von getrockneten Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen im Glucose-freien MM63-15 % für kurze Zeit rehydriert und auf Agarplatten ausplattiert. Detailliert ist diese Methodik im Kapitel V3.4 beschrieben. Die ermittelten Überlebensraten sind in Abb. 31 zusammenfassend dargestellt.

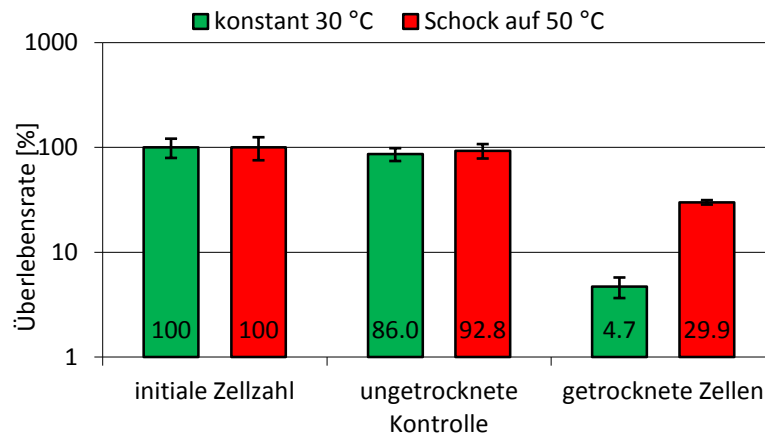


Abb. 31: Überlebensraten der *H. elongata*-Zellen unter harschen Trocknungsbedingungen.

Die Zellen entstammen der Kultivierung in MM63-15 % und der Temperierung bei konstant 30 °C bzw. dem Temperaturschock von 30 auf 50 °C in der exponentiellen Phase. Die Trocknung der Zellen fand für 3 h bei 45 °C und 10 mbar im Vakuumkonzentrator statt. Standardabweichungen ergeben sich aus der Dreifachbestimmung separater Zellproben.

Aus der Kontrolle (initiale Zellzahl) resultiert die Bestimmung der Lebendzellzahl aus völlig vitalen Zellen mit 100 %. In der ungetrockneten Kontrolle (im Vakuumkonzentrator, jedoch im geschlossenen Reaktionsgefäß) finden sich bereits leicht gesenkte Überlebendzellzahlen. Diese Zellen wurden nur durch bestimmte Faktoren beeinflusst, die durch den verlängerten Aufenthalt in der Trocknungskammer bedingt waren (leichte Rotation, Beheizung, Sauerstoff- und Nährstoffmangel). Zellen, die den harschen Trocknungsbedingungen ausgesetzt waren weisen signifikant geminderte Überlebensraten auf. Nur knapp 5 % der Zellen, welche bei konstant 30 °C kultiviert wurden, überleben. Es stellte sich heraus, dass der hohe intrazelluläre Hydroxyectoingehalt in einer sechsfach gesteigerten Überlebensrate resultierte. Diese betrug damit nahezu 30 % bei einem Hydroxyectoin-Ectoin-Verhältnis von 4 zu 1. Dies weist auf den beträchtlichen Stabilisierungseffekt durch den Vitrifikanten hin.

2.2 *In-vitro*-Erzeugung organischer Solutmatrizes

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass ein hoher, intrazellulärer Solutanteil an Hydroxyectoin die Überlebensraten von trockengestressten *H. elongata*-Zellen signifikant steigert. Als bionischer Ansatz dieser Arbeit soll Hydroxyectoin nun zur Biostabilisierung und zur biomimetischen Anwendung in einem Biosensor genutzt werden. Dazu ist es zunächst notwendig die Eigenschaften dieses kompatiblen Solut bezüglichen der Glasbildung zu untersuchen. Um dies zu ermöglichen wurden artifizielle Solutmatrizes aus Hydroxyectoin und anderen kompatiblen Soluten gefertigt. Dazu gehören die klassischen Glasbildner Trehalose und Saccharose. Weiterhin wurden Solutmatrizes aus Ectoin hergestellt.

Bei der Untersuchung des Modellorganismus im synthetischen Medium fiel auf, dass auch Glutamat in die Stressantwort auf dehydrierende Bedingungen involviert sein kann. Es wurde vermutet, dass das Hydroxyectoin : Glutamat-Verhältnis in *H. elongata* etwa 4:1 entspricht. Daher wurden Hydroxyectoin in Kombination mit Glutamat in diesem Verhältnis und zusätzlich Solutmatrizes, die ausschließlich aus Glutamat bestanden untersucht.

Zur Herstellung der Solutmatrizes wurden 2 M Lösungen der kompatiblen Solute verwendet. Eine Ausnahme stellt die Lösung von 2 M Hydroxyectoin und 0,5 M Glutamat dar. Da die Lufttrocknung bei Raumtemperatur nur sehr langsam abläuft und sie daher auch ökonomisch uninteressant ist, wurde eine hohe Temperatur gewählt, um ein schnelles Trocknen der Gläser zu erreichen. Die Glasübergangstemperaturen werden für Trehalose mit etwa 120 °C und etwa für Saccharose mit etwa 75 °C kalkuliert (Simperler *et al.*, 2006). Daher wurde die Trocknungstemperatur mit 60 °C etwas niedriger gewählt. Bei dieser Temperatur wurden die Matrizes für 2 h im Heizschrank getrocknet (siehe Kapitel V5.9). Die auf einem ebenen Polystyrolplättchen erzeugten Solutmatrizes waren nach 2 h fest und wurden lichtmikroskopisch untersucht. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 32 dargestellt.

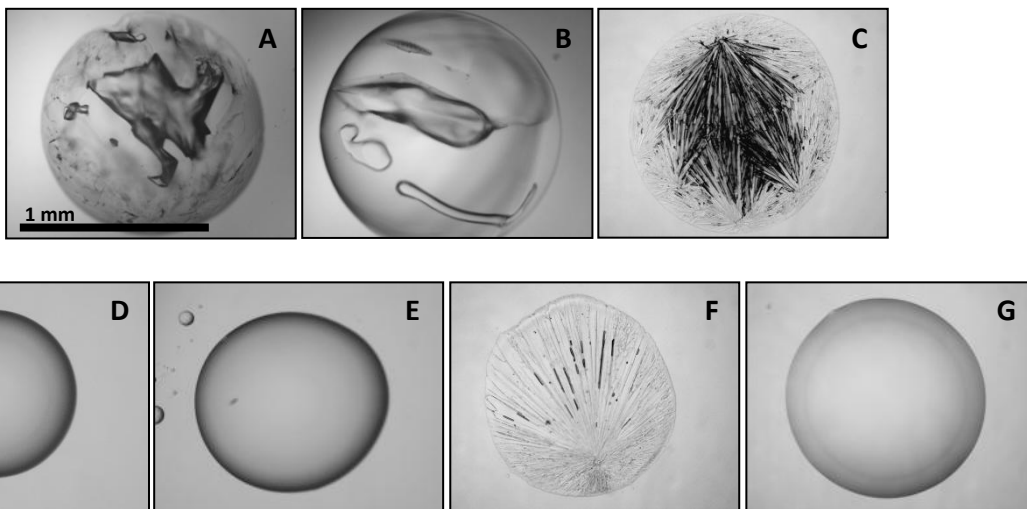


Abb. 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen artifizierender Solutmatrizes.

Abgebildet sind Matrizes von Trehalose (A), Saccharose (B), Ectoin (C), Hydroxyectoin (D), Hydroxyectoin in Kombination mit Glutamat im Verhältnis 4:1 (E), Hydroxyectoin mit Kristallbildung (F) und Glutamat (G). Der Durchmesser der Matrizes beträgt etwa 1 mm. Die Fertigung erfolgte durch zweistündige Trocknung von 3 μ L-Tropfen bei 60 °C im Heizschrank. Maßstabslinie (1 mm) gilt für alle Abbildungen A bis G.

Durch die Untersuchung der Tendenz zur Glasbildung bzw. Kristallisation fällt auf, dass Trehalose (A) und Saccharose (B) klare Gläser bilden. Regelmäßig konnte bei solchen Gläsern *Cracking* (Brüche und Risse im Glas), jedoch niemals Kristallisation beobachtet werden. Wie in Abb. 32 C beispielhaft gezeigt, zeigte Ectoin stets deutlich ausgeprägte Kristallisation, die von mehreren Kristallisationskeimen ausging. Dahingegen konnte mittels Solutmatrizes aus Hydroxyectoin (D) und Hydroxyectoin-Glutamat-Matrizes (E) häufig die Bildung eines klaren Glases reproduziert werden. In einigen Fällen wurde in Hydroxyectoin-basierten Gläsern auch partielle Kristallisationsbereiche, jedoch kein *Cracking* beobachtet. Kristallisationseffekte gingen in solchen Fällen nur von einem Kristallisationskeim aus (F). Glutamat-Matrizes wiesen die besten Glasbildungseigenschaften auf (G). In mehrfachen Versuchen konnte weder das Auskristallisieren noch *Cracking* beobachtet werden.

2.3 Mechanische Materialprüfung *in vitro* erzeugter Gläser

Die Überlebensstrategie mittels Anhydrobiose basiert nach der Vitrifikationshypothese vor allem auf der mechanischen Stabilisierung biologischer Strukturen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, wie sich bestimmte mechanische Kenngrößen von Hydroxyectoin- und Trehalosegläsern verhalten. Dazu wurden 10 μL 2 M Lösung der beiden Glasbildner auf ein Teflonplättchen pipettiert und für 1, 4 bzw. 8 Tage im Kieselgel-beladenen Exikator eingetrocknet. Anschließend wurden Elastizitätsmodul (E-Modul) und Härte der beiden Gläser via Nanoindentierung bestimmt. Die Fertigung der Gläser war nach dem Prinzip der zweistündigen Trocknung bei 60 °C auf dem Teflonplättchen nicht möglich, da sie nicht in indentierbaren Glasmatrixen resultierte (starkes *Cracking* bei Trehalose und häufige Kristallisation bei Hydroxyectoin). Indentiert wurde stets in ebene, homogen glasartige und somit kristallfreie Bereiche. In Abb. 33 sind die Ergebnisse der Nanoindentierung zusammengefasst.

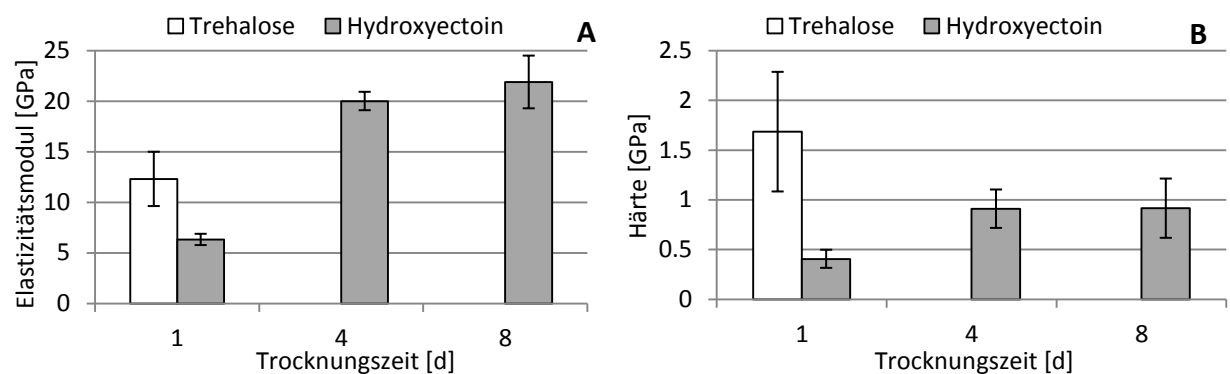


Abb. 33: Mechanische Kenngrößen (A - Elastizitätsmodul, B - Härte) von Trehalose- und Hydroxyectoingläsern.

Die Bestimmung der mechanischen Kenngrößen erfolgte via Nanoindentierung (n=6). Die Gläser wurden auf einem 4 cm² großen Teflonsubstrat mit separaten Vertiefungen für die Gläser erzeugt. Die Gläser entstanden durch Trocknung für 1, 4 und 8 Tage in einem Kieselgel-beladenen Exikator bei Umgebungstemperatur. Trehalosegläser konnten nur nach eintägiger Trocknung im Exikator untersucht werden.

Trotz hoher Standardabweichung zeigt Trehalose die höchste mechanische Belastbarkeit nach eintägiger Trocknung. Dies betrifft sowohl E-Modul als auch Härte. Längere Trocknungszeiten (4 und 8 Tage) resultierten in verstärkt ausgebildetem *Cracking* der Trehalosegläser, wodurch diese nicht mehr indentierbar waren. Das Hydroxyectoinglas weist nach eintägiger Trocknung nur etwa die halbe elastische Belastbarkeit und etwa ein Viertel der Härte des Trehaloseglases auf. Hydroxyectoingläser sind auch bei prolongierter Trocknungszeit noch indentierbar. Nach viertägiger Trocknung vervierfacht sich die elastische Belastbarkeit und verdoppelt sich die Härte des Hydroxyectoinglases. Beide Kenngrößen bleiben auch nach achttägiger Trocknung ähnlich hoch. Die elastische Belastbarkeit liegt für beide Gläser damit im Bereich der Elastizitätsmoduln von Holz (etwa 7 bis 20 GPa).

Die Bestimmung des Wassergehalts der erzeugten Gläser erfolgte nicht im Rahmen dieser Arbeit. Daher kann nur darüber spekuliert werden, ob das Hydroxyectoinglas Wasser langsamer verliert als Trehalose und daher erst nach mehrtägiger Trocknung höhere Kennwerte erreicht.

2.4 Biostabilisierung des Modellenzyms Lactatdehydrogenase durch Vitrifikation

2.4.1 Eigenstabilisierung

Kapitel VI.2.1 verdeutlichte die Eignung des Vitrifikanten Hydroxyectoin im Gegensatz zum Osmotikum Ectoin zur Stabilisierung des bakteriellen Systems *H. elongata* unter harschen Trocknungsbedingungen. Das Potential, selbst komplexe und nanostrukturierte Systeme trocken zu stabilisieren, macht vitrifizierende Substanzen für die biotechnologische Anwendung so interessant. Daher untersuchen die folgenden Versuche die Trocken- und Hitzestabilisierung eines Modellenzyms durch artifizielle Gläser. Als Modellenzym wurde das Redoxenzym Lactatdehydrogenase (LDH) gewählt. Dieses ist ein bevorzugt verwendeter Biokatalysator zur Demonstration stabilisierender Effekt durch kompatible Solute unter verschiedenen abiotischen Stresseinflüssen (Lippert und Galinski, 1992).

Zunächst werden dazu der destabilisierende Effekt mehrstündiger Trocknung bei 60 °C und die Grenzen der Eigenstabilisierung durch erhöhte LDH-Konzentration untersucht, um die Eignung der LDH als Modellenzym zu demonstrieren. Dies geschieht noch in Abwesenheit glasbildender Stabilisatoren. Der Trocknungsversuch wurde wie im Kapitel V6.1.2 beschrieben durchgeführt. Die LDH-Konzentration (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$) wurde variiert und getrocknetes Enzym wurde in PBS (pH 7,5) rehydriert. In Abb. 34 sind die Ergebnisse der Aktivitätstests vor der Trocknung (0 h) und nach Trocknung und Rehydrierung (2, 4 und 6 h) zusammengefasst.

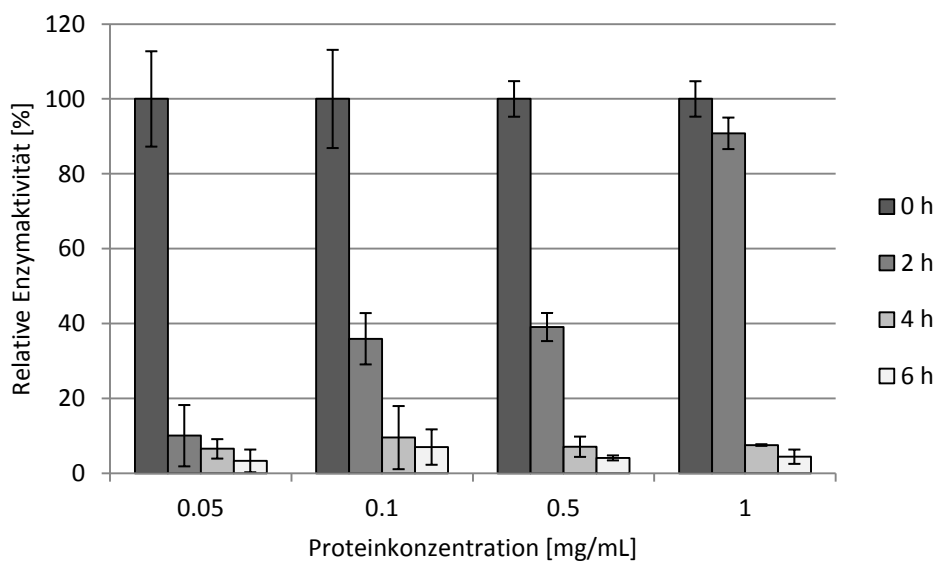


Abb. 34: Relative Enzymaktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Die relativen Enzymaktivitäten beziehen sich auf die LDH vor der Trocknung (0 h) sowie nach mehrstündiger Trocknung (2, 4 und 6 h) bei 60 °C und anschließender Rehydrierung in PBS (pH 7,5). Für den Aktivitätstest wurden 10 mM Pyruvat und 0,75 mM NADH eingesetzt. Spektroskopisch wurde die Abnahme der NADH-Konzentration durch enzymatisch katalysierte Oxidation bei 340 nm und 25 °C beobachtet. Die Standardabweichungen ergeben sich aus mindestens vier bis maximal sechs separaten Aktivitätsbestimmungen.

In der Abb. 34 sind die Restaktivitäten nach mehrstündiger Trocknung relativ zur Aktivität des ungetrockneten Enzyms angegeben. Unabhängig von der Enzymkonzentration kann stets ein Abnahme der Restaktivität und damit eine Destabilisierung des Biokatalysators beobachtet werden. Die kleinste LDH-Konzentration (0,05 mg/mL) weist die schnellste Inaktivierung auf, so dass nach 2 h Trocknung nur noch etwa 10 % der ursprünglichen Aktivität beobachtet werden. Bereits eine Verdopplung auf 0,1 mg/mL führt zu einer erhöhten Restaktivität nach zweistündiger Trocknung auf etwa 35 %. Ein ähnliches Ergebnis resultiert nach dem Eintrocknen von 0,5 mg/mL des Enzyms. Wird eine sehr hohe Enzymkonzentration von 1 mg/mL für die Trocknung verwendet, so nimmt die Restaktivität nach zweistündiger Trocknung auf nur knapp 90 % ab. Dies ist wahrscheinlich durch Eigenstabilisierungseffekte, die aus hohen Proteinkonzentrationen resultieren, begründet. Allen applizierten Enzymkonzentrationen gemeinsam ist die Inaktivierung auf etwa 10 bis 15 % nach 4 h und auf etwa 5 bis 10 % nach 6 h Trocknung.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die thermisch- und trockenbedingte Destabilisierung am schnellsten auf gering konzentriertes Enzym auswirkt. Daher wird in weiteren Versuchen die protektive Wirkung spezieller Additive auf 0,05 mg/mL LDH-Proben untersucht.

2.4.2 Stabilisierung durch spezielle Proteine

Der vorige Versuch veranschaulichte die Eignung der LDH als Modellenzym und auch die Tatsache, dass bereits eine erhöhte Konzentration des biokatalytischen Proteins selbst zu einer gewissen Stabilisierung beitragen kann (Eigenstabilisierung). Im folgenden Versuch wurde untersucht, wie sich die Anwesenheit verschiedener Proteine auf die Trockenstabilität der LDH auswirkt. Der Versuch wurde wie in Kapitel V6.1.2 beschrieben durchgeführt.

Als unstabilierte Referenz wurde die niedrige LDH-Konzentration von 0,05 mg/mL eingesetzt. In weiteren Ansätzen wird eine äquivalente Menge der zu untersuchenden Proteinen hinzugefügt, so dass sich die Gesamtproteinkonzentration pro Ansatz verdoppelt. Die zu untersuchenden Proteine sind zum einen die LDH selbst, BSA und Gelatine (*porcine skin*, Typ A, Puder).

Das Enzym selbst als Stabilisator zu verwenden dient primär als Referenz (Eigenstabilisierung). Das Globulin BSA wurde eingesetzt, da es als klassischer Vertreter für die Stabilisierung gelöster Proteine in diversen Testverfahren bekannt ist. In *H. elongata* konnten keine konkreten Hinweise auf die Expression eines speziellen und potentiell stabilisierenden Proteins gefunden werden, so dass Gelatine vom Typ A (Herstellung durch sauren Aufschluss) aufgrund seiner Aminosäurekomposition als Hydrophilin-Analog verwendet wurde.

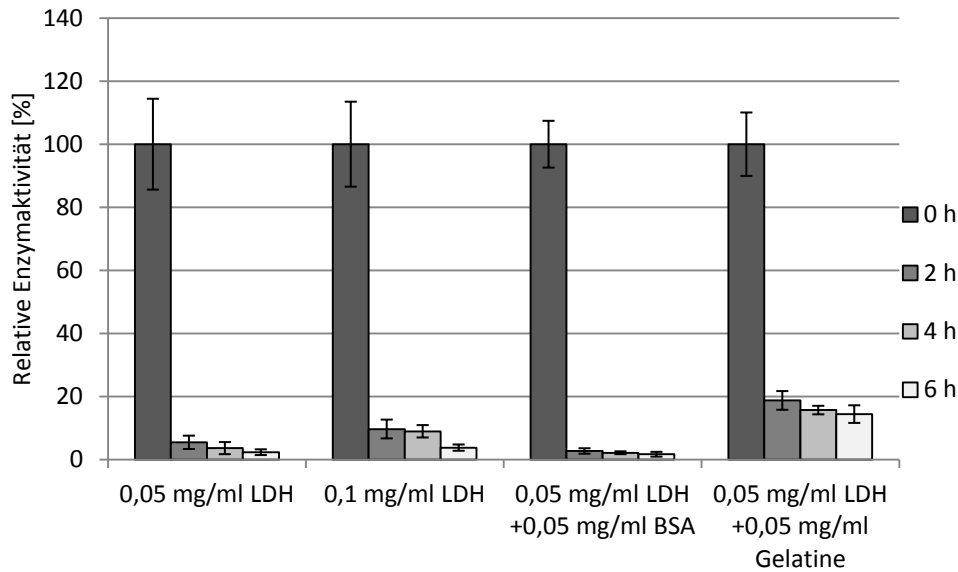


Abb. 35: Relative Enzymaktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Kombination mit speziellen Proteinen.

Die LDH wurde kombiniert mit der LDH selbst (Eigenstabilisierung), BSA und Gelatine vom Typ A. Die relativen Enzymaktivitäten beziehen sich auf die LDH vor der Trocknung (0 h) sowie nach mehrstündiger Trocknung (2, 4 und 6 h) bei 60 °C und anschließender Rehydrierung in PBS (pH 7,5). Für den Aktivitätstest wurden 10 mM Pyruvat und 0,75 mM NADH eingesetzt. Spektroskopisch wurde die Abnahme der NADH-Konzentration durch enzymatisch katalysierte Oxidation bei 340 nm und 25 °C beobachtet. Die Standardabweichungen ergeben sich aus mindestens vier bis maximal sechs separaten Aktivitätsbestimmungen.

In Abb. 35 sind die Ergebnisse der Aktivitätstests als Werte relativ zur Aktivität der ungetrockneten Variante dargestellt. Zeitangaben, die im Folgenden in Klammern gesetzt hinter Prozentangaben stehen, beziehen sich auf die Trocknungszeit bei 60 °C. Daran schloss sich die Rehydrierung und Aktivitätsbestimmung an.

Im unstabilisierten Zustand sinkt die Aktivität des Enzyms durch die Trocknung rapide. Sie nimmt mit der Trocknungsdauer auf 5,4 % (2 h) über 3,6 % (4 h) auf 2,1 % (6 h) ab. Wie im Kapitel VI.2.4.1 resultiert die Verdopplung der LDH-Konzentration in einer gewissen Eigenstabilisierung, so dass Restaktivitäten von 9,7 % (2 h), 8,9 % (4 h) und 3,8 % (6 h) bestimmt wurden. Nach zweistündiger Trocknung unterscheidet sich die Restaktivität deutlich im Vergleich zum Vorversuch (0,1 mg/mL in Abb. 34). An dieser Stelle lässt sich ein methodischer Fehler vermuten, da sich die Standardabweichungen nicht überschneiden. Bei längerer Trocknung (4 h und 6 h) liegen die bestimmten Restaktivitäten wieder im Bereich der Standardabweichung des Vorversuchs.

Durch den Zusatz von BSA konnte keine Stabilisierung des Enzyms erreicht werden. Hier nimmt die Aktivität der LDH am schnellsten ab. Sie beträgt zunächst nur noch 2,7 % (2 h) und fällt über 2,1 % (4 h) auf 1,7 % (6 h). Dies deutet eher auf eine destabilisierende Wirkung des BSA auf die LDH während der Trocknung hin. Die effektivste Stabilisierung der LDH konnte mit dem Hydrophilin-Analog Gelatine Typ A erreicht werden. Hier beträgt die Restaktivität zunächst noch etwa 19 % (2 h) und nimmt nur langsam über 15,7 % (4 h) auf 14,4 % (6 h) ab. Dieses Ergebnis unterstreicht die Eignung der Gelatine vom Typ A als Hydrophilin-Analog. Im weiteren experimentellen Verlauf werden ausgewählte kompatible Solute auf ihre bioprotektive Wirkung auch in Kombination mit diesem Hydrophilin-Analog untersucht.

2.4.3 Stabilisierung durch Solute-Protein-Matrizes

Die beiden vorigen Versuchen (Kapitel VI2.4.1 und VI2.4.2) demonstrierten die Eignung der LDH als Modellenzym für Stabilisierungsexperimente und die Möglichkeit Gelatine vom Typ A als Hydrophilin-Analog zu verwenden. Im nächsten Versuch sollte der Biokatalysator in künstlich erzeugte Solutmatrizes eingeschlossen werden, wie sie in Kapitel VI2.2 vorgestellt wurden. Dabei wurde die bioprotektive Wirkung der Matrizes untersucht. Als Solute wurden nieder-molekulare Substanzen gewählt, die in gestressten *H. elongata*-Zellen nachgewiesen wurden. Dies sind Ectoin, Hydroxyectoin und Kalium-Glutamat (siehe Kapitel VI1.2.2). Anhydrobiotische Lebewesen akkumulieren weitere kompatible Solute ebenfalls in molaren Konzentrationen als Antwort auf extreme Dehydrierung. Dazu zählen insbesondere die klassischen Glasbildner Saccharose und Trehalose, welche als Referenz in das Experiment einbezogen wurden. Das Enzym wurde in die erzeugten Solutmatrizes eingeschlossen. Zusätzlich wurde pro Solutmatrix ein paralleler, Gelatine-unterstützter Ansatz durchgeführt, um sich der Beschaffenheit natürlich vorkommender Solut-Protein-Matrizes zu approximieren (siehe Kapitel IV3.2.2). Dabei ist die eingesetzte Menge der Gelatine identisch der verwendeten Enzymmenge. Die durch Trocknung erzeugten Matrizes wurden vor der Rehydrierung bezüglich der Tendenz zur Glasbildung und Kristallisation untersucht. Deren Auswirkung auf die Enzymstabilisierung wurde nach der Rehydrierung durch die Aktivitätsbestimmung analysiert. Jedoch konnte der Restwassergehalt in Gläsern im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden.

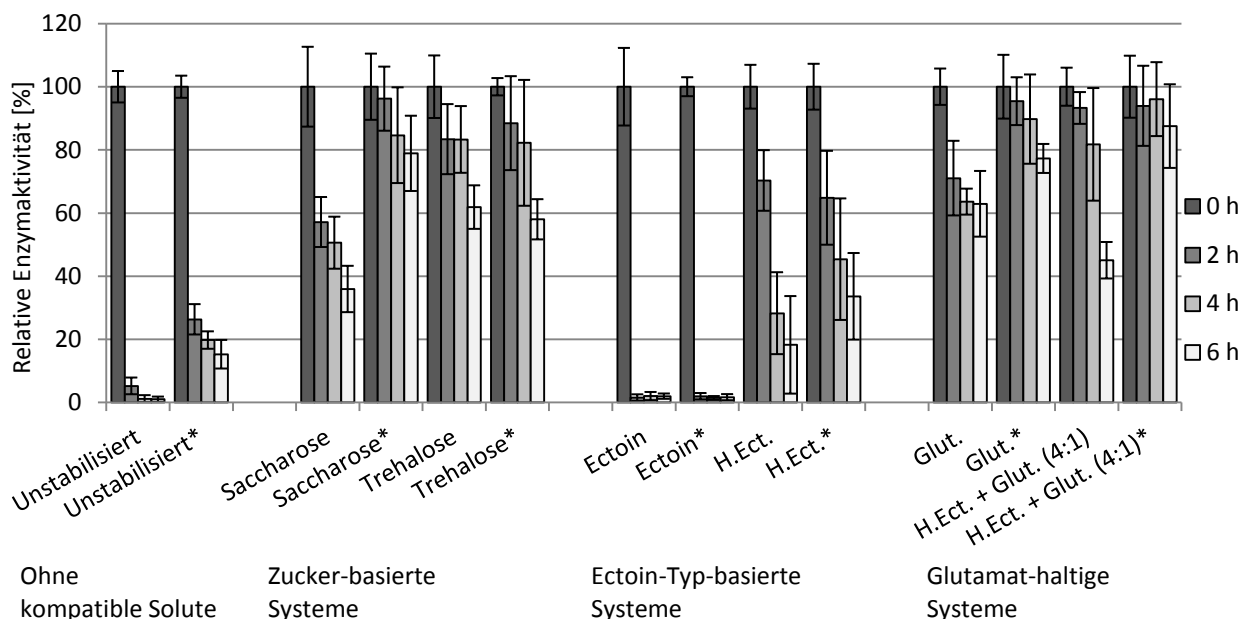


Abb. 36: Relative Enzymaktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Abhängigkeit des Einschlussmaterials.

Die Einschlussmaterialien zur Erzeugung der Solutmatrizes waren Saccharose, Trehalose, Ectoin, Hydroxyectoin (H.Ect.), Glutamat (Glut.) und Hydroxyectoin in Kombination mit Glutamat im Verhältnis 4:1. Zusätzlich wurde parallel das Hydrophilin-Analog Gelatine vom Typ A eingesetzt (*). Dessen Konzentration war identisch der LDH-Konzentration. Die relativen Enzymaktivitäten beziehen sich auf die LDH vor der Trocknung (0 h) sowie nach mehrstündiger Trocknung (2, 4 und 6 h) bei 60 °C und anschließender Rehydrierung in PBS (pH 7,5). Für den Aktivitätstest wurden 10 mM Pyruvat und 0,75 mM NADH eingesetzt. Spektroskopisch wurde die Abnahme der NADH-Konzentration durch enzymatisch katalysierte Oxidation bei 340 nm und 25 °C beobachtet. Die Standardabweichungen ergeben sich aus mindestens vier bis maximal sechs separaten Aktivitätsbestimmungen.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 36 zusammengefasst. Die Resultate sind paarweise geordnet. Jedem Ansatz ohne Gelatine folgt jeweils der Gelatine-unterstützte Ansatz (markiert mit *). Pro Ansatz werden die ermittelten Aktivitäten als Relativangaben zur Aktivität ohne Trocknung (100 %) dargestellt. Als Referenzen sind Messungen des unstabilisierten Enzyms und des ausschließlich durch Gelatine stabilisierten Enzyms zu sehen. Diese Ergebnisse stimmen mit den vorigen Beobachtungen aus den Vorversuchen in Kapitel VI2.4.1 und VI2.4.2 überein.

Als klassische Vitrifikanten wurden die Zuckersysteme Saccharose und Trehalose in Bezug auf die Enzymstabilisierung untersucht. Keines der Zucker-basierten Gläser zeigte in diesem Versuch makroskopische Anzeichen von Kristallisierung oder *Cracking*. Ist das Enzym in Saccharose eingeschlossen verringert sich die Aktivität mäßig langsam und beträgt nach 6 h noch 35 % (57 %, 50 % bzw. 35 % nach 2 h, 4 h bzw. 6 h). Durch den zusätzlichen Einsatz des Hydrophilin-Analogs wird eine deutliche Verbesserung mit nur gering reduzierten Aktivitäten erreicht (96 %, 84 % bzw. 79 % nach 2 h, 4 h bzw. 6 h). Die Solut-Protein-Kombination führt bei Saccharose dazu, dass die ermittelten Restaktivitäten größer sind als die Summe der einzelnen Restaktivitäten bei separater Verwendung von Gelatine und Saccharose. Am auffälligsten ist dieser synergistische Effekt nach 6 h, wo ein Zusatz von etwa 28 % berechnet wird.

Trehalose weist bereits ohne den Zusatz von Gelatine eine sehr effektive Trockenstabilisierung auf, die der Wirkung der Saccharose-Gelatine-Matrix ähnelt (83 %, 83 % bzw. 61 % nach 2 h, 4 h bzw. 6h). Im Gegensatz zu Saccharose kann mit der zusätzlichen Verwendung des Hydrophilin-Analogs keine signifikante Verbesserung erzielt werden (88 %, 82 % bzw. 58 % nach 2 h, 4 h bzw. 6 h). Die beiden Varianten der Trehalose-basierten Gläser konnten das Enzym nach 6 h nur bis zu einer 60 %igen Restaktivität stabilisieren, so dass langfristig die Kombination von Saccharose und Gelatine (ca. 80 %ig Restaktivität) einen verbesserten Hitze- und Trockenschutz gewährleistet.

Wird das in *H. elongata* gefundene chemische Chaperon Ectoin in Reinstform für die Stabilisierung der Lactatdehydrogenase verwendet, wird kein stabilisierender Effekt beobachtet. Im Vergleich zur unstabilisierten Referenz wird eher eine zügige Destabilisierung des Enzyms beobachtet (1,5 %, 2 % bzw. 2 % nach 2 h, 4 h bzw. 6h). Dieser Effekt tritt selbst unter zusätzlicher Applikation von Gelatine auf (2 %, 1,4 % bzw. 1,7 % nach 2 h, 4 h bzw. 6h). Unabhängig von der Trocknungsdauer befinden sich sämtliche Restaktivitäten bei Werten zwischen 1,4 und 2 %. Auffällig war bei beiden Varianten, dass stets deutliche Kristallisationseffekte zu beobachten waren. Diese Ergebnisse belegen, dass Ectoin für die Trockenstabilisierung bei erhöhten Temperaturen ungeeignet ist.

Wurde die hydroxylierte Form des Ectoins zur Erzeugung von Glasmatrixen verwendet, kann eine signifikante Verbesserung der Enzymstabilisierung beobachtet werden. Die verbleibenden Aktivitäten nach den Trocknungen ähneln (bei Berücksichtigung der Standardabweichung) den Werten der Saccharose-Gläser (70 %, 28 % bzw. 18 % nach 2 h, 4 h bzw. 6h). Innerhalb von Hydroxyectoinmatrixen wurde teils Glasbildung und teils auch partielle Kristallisation beobachtet. Durch HPLC-Messungen konnte bestimmt werden, dass das verwendete Hydroxyectoin eine 1 %ige Verunreinigung an Ectoin aufwies. Dies könnte als Kristallisationskeim innerhalb eines Hydroxyectoinglases wirken. Matrixen mit solchen Kristallisationsbereichen wiesen meist eine geringere Aktivität auf und verursachen dadurch die großen Standardabweichungen. Eine Verbesserung durch die zusätzliche Verwendung des Hydrophilin-Analogs kann nach längeren Trocknungszeiten beobachtet werden (65 %, 45 % bzw. 33 % nach 2 h, 4 h bzw. 6h).

Kapitel VI1.2.2 demonstrierte, dass in salz- und hitzestressen *H. elongata*-Zellen neben Ectoin und Hydroxyectoin zusätzlich Glutamat detektiert werden kann. Dies war Anlass für die Untersuchung von Glutamat-haltigen Gläsern. Die alleinige Verwendung von Glutamat resultierte nach der Trocknung stets in makroskopisch kristall- und rissfreien, klaren Gläsern. Solche Gläser führten zu einem deutlichen Erhalt der LDH-Aktivität. Nach zweistündiger Trocknung ist die Enzymstabilisierung durch Glutamat identisch der Stabilisierung durch Hydroxyectoin. Bei prolongierter Trocknungszeit werden mit Glutamat hingegen bessere Ergebnisse erzielt (71 %, 64 % bzw. 63 % nach 2 h, 4 h bzw. 6 h). Die zusätzliche Verwendung von Gelatine verbessert den bioprotektiven Effekt des Glutamats deutlich (95 %, 90 % bzw. 77 % nach 2 h, 4 h bzw. 6 h). Es wird hier jedoch kein synergistischer Stabilisierungseffekt beobachtet.

Hydroxyectoin-Glutamat-Gläser wurden im Verhältnis 4:1 erzeugt und sind an die Verhältnisse intrazellulärer Konzentrationen gestresster *H. elongata*-Zellen angelehnt. Derartige Gläser sind in ihrer Wirkung ähnlich den Glutamat-Gelatine-Gläsern außer bei längerer Trocknungsdauer, wo kleinere Werte beobachtet wurden (93 %, 82 % bzw. 45 % nach 2 h, 4 h bzw. 6 h). Dieser Effekt wird durch die zusätzliche Verwendung von Gelatine aufgehoben und es konnte so die effektivste Stabilisierung der Lactatdehydrogenase erzielt werden (93 %, 96 % bzw. 88 % nach 2 h, 4 h bzw. 6 h). Ähnlich dem Saccharose-Gelatine-Glas ist die Restaktivität nach 6 h Trocknung 27 % höher als die einfache Summe der ausschließlichen Stabilisierung durch Gelatine und des Solutglases. Insgesamt nimmt die Enzymaktivität unter Verwendung des Hydroxyectoin-Glutamat-Glases kaum ab.

3 Biosensorik – Ergebnisse zur biomimetische Applikation in einem Biosensor

3.1 Etablierung eines Glucose-Biosensors auf Basis von Kohlenstoffnanoröhren

In den vorangegangenen Kapiteln wurde das extremophile Bakterium *H. elongata* als biologisches Modell vorgestellt. Als Vorbild aus der Natur wurden die von ihm synthetisierten Schutzstoffe untersucht. In weiteren Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Hydroxyectoin allein sowie dessen Kombination mit Glutamat in einer effektiven Biostabilisierung von Zellen und Enzymen resultiert. Dies wurde durch die intrazelluläre Vitrifikation von *H. elongata*-Zellen und durch die Vitrifikation des Modellenzym Lactatdehydrogenase während der beheizten Trocknung demonstriert.

Nach der Untersuchung der Biologie ist der Transfer des Wissens zur Lösung eines technischen Problems Kernpunkt der Bionik. Die Stabilisierung biologischer Komponenten spielt in vielen wissenschaftlichen und industriellen Bereichen eine bedeutende Rolle. Insbesondere biohybride Systeme wie Biosensoren sind auf eine effiziente Wechselwirkung des biologischen Erkennungselements mit der Transducer-Einheit angewiesen. Als Transducereinheit werden vor allem in elektrochemischen Biosensoren bevorzugt Gold und Kohlenstoffnanoröhren (CNT) eingesetzt. In diese ist zumeist ein Redoxenzym, wie Glucose-Oxidase, immobilisiert. In elektrochemischen Biosensoren, die auf Redoxenzymen als Erkennungselement basieren, dient die Messung transferierter Elektronen (Strom) zur Detektion des Analyten. Die Untersuchung eines solchen Biosensors in Verbindung mit den vorgestellten Schutzstoffen des extremophilen Bakteriums *H. elongata* ist bezüglich verschiedener Punkten interessant:

- Adsorptionsfähigkeit der Ectoine an aromatische Strukturen wie CNTs
- Auswirkung der Ectoine auf das elektrochemische Verhalten des Biosensors
- Möglichkeit zur reduzierten Inaktivierung des biologischen Erkennungselements, welche durch die Immobilisation im unphysiologischen Milieu verursacht wird
- Möglichkeit der prolongierten Trockenlagerung, auch bei höheren Temperaturen

Um diese Punkte zu untersuchen, war es zunächst notwendig einen möglichst einfachen und funktionsfähigen Biosensor *ad hoc* zu konstruieren. In diesen sollten während des Aufbaus die benannten Schutzstoffe integriert und deren Wirkung untersucht werden. Der Vorteil der eigenständigen Konstruktion des Sensors liegt in der Kontrolle sämtlicher Aufbaukriterien, wie Art der Bauelemente und Aufbaubedingungen, die sich letztlich auf das Sensorverhalten auswirken. Als Basis des Biosensors wurden Goldelektroden gewählt. Diese sollten mittels einer Schicht Kohlenstoffnanoröhren modifiziert werden. Anschließend sollte das biologische Erkennungselement Glucose-Oxidase daran immobilisiert werden. Im Falle eines funktionsfähigen Biosensors sollte dann der Einfluss der chemischen Chaperone in einem solchen System untersucht werden.

3.1.1 Einfluss von Kohlenstoffnanoröhren-Modifizierung

Die Basis des Biosensors bildet eine Goldstabelektrode. Im ersten Konstruktionsschritt wurde deren Goldoberfläche mit einer Schicht mehrwandiger Kohlenstoffnanoröhren (MWCNT, engl. *multi-walled carbon nanotubes*) modifiziert. Diese fungieren aufgrund ihrer nanoskalierten Struktur sowie ihrer elektrischen Leitfähigkeit als Transducer im sensorischem System. So soll später der Elektronentransfers zwischen Redoxenzym und Elektrode ermöglicht werden. Die physikalische Adsorption der MWCNTs erfolgte wie im Kapitel V5.11.2 beschrieben. Um den Effekt der Modifikation auf die elektrochemischen Prozesse an der Elektrodenoberfläche zu untersuchen, wurden eine unmodifizierte sowie eine MWCNT-modifizierte Goldstabelektrode mittels Zyklovoltammetrie untersucht. Die Untersuchung wurde sowohl ohne als auch mit einem redoxaktiven Stoff in Lösung durchgeführt. Als Redoxreagenz wurde Kaliumhexacyanoferrat verwendet, da dieses quasi-reversibel an der Elektrode umsetzbar ist.

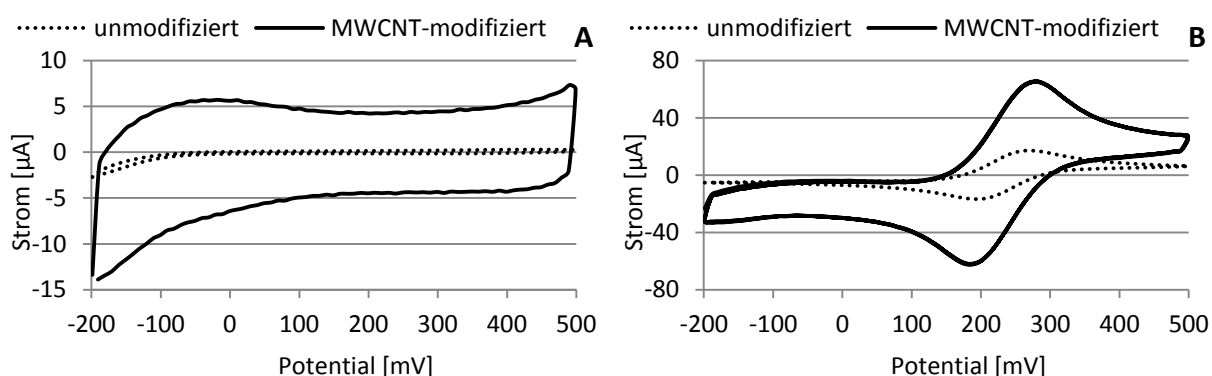


Abb. 37: Voltammetrische Signale einer blanken Goldstabelektrode und einer MWCNT-modifizierten Goldstabelektrode.

A – ohne redoxaktiven Stoff in Lösung, **B** - in Anwesenheit von 5 mM Kaliumhexacyanoferrat II und III (es sind zwei Zyklen der blanken Goldstabelektrode und vier Zyklen der MWCNT-modifizierten Elektrode dargestellt). Messung in PBS-Puffer (pH 7,5), Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl).

In Abb. 37 A ist das Ergebnis der Redoxreagenz-freien Messung dargestellt. Mit jeder Elektrode wird nur der kapazitive Strom (Ladestrom) gemessen, welcher durch die Umladung der elektrochemischen Doppelschicht an der Elektrode entsteht. Dieser ist bei der MWCNT-modifizierten Elektrode signifikant größer, was auf die Vergrößerung der Elektrodenoberfläche durch die MWCNT-Modifikation zurückzuführen ist.

In Abb. 37 B sind die Zyklovoltammogramme beider Elektroden in Anwesenheit von Kaliumhexacyanoferrat dargestellt. Durch die elektrochemische Umsetzung des redoxaktiven Stoffs an der Elektrode werden Faraday'sche Ströme gemessen, welche zur Entstehung charakteristischer Peaks führen. Der quasi-reversible Redoxprozess wird mittels beider Elektrodentypen beobachtet. Es lässt sich das Oxidationspeakpotential bei 200 mV und das Reduktionspeakpotential bei etwa 270 mV ablesen. Damit berechnet sich ein formales Redoxpotential (E_f°) von etwa $E_f^\circ = [(E_p^{\text{ox}} + E_p^{\text{red}})/2] = 235 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl 1 M KCl).

Aus der Untersuchung der MWCNT-modifizierten Elektrode sind vier aufeinander folgende Zyklen abgebildet. Sie überlagern sich und sind nahezu identisch. Dies verdeutlicht die Stabilität der MWCNT-Modifikation. Somit ist eine einfache physikalische MWCNT-Adsorption gut geeignet, um Redoxprozesse an der Elektrode zu untersuchen. Es ist zudem offensichtlich, dass mittels der MWCNT-modifizierten Elektrode etwa vierfach höhere Peakströme detektiert werden (relativ zur unmodifizierten Elektrode), obwohl in beiden Messdurchführungen die Konzentration des redoxaktiven Stoffs identisch ist. Dies ist vermutlich ebenfalls der Vergrößerung der sensorischen Oberfläche durch die MWCNT-Modifikation zuzuordnen und bestätigt die erfolgreiche Empfindlichkeitssteigerung des Sensors durch die MWCNT-Modifizierung.

3.1.2 Elektrochemische Untersuchung einer MWCNT-modifizierten Goldelektrode

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoffnanoröhren als leitfähiges Transducermaterial genutzt werden können und zudem die sensorische Empfindlichkeit steigern. Im fertiggestellten Biosensor sollen sie später den Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode vermitteln. Der initiale Elektronendonator wird jedoch das Substrat Glucose sein. Im Biosensor sollte Glucose nicht bereits durch die MWCNT-Schicht oxidiert werden. Daher wurde das sensorische System im nächsten Versuch ohne immobilisiertes Enzym, jedoch in Ab- und Anwesenheit von Glucose in der Messlösung zykl voltammetrisch untersucht.

Die elektrochemische Messung wurde in einem breiten Potentialbereich (-600 bis 600 mV) durchgeführt. Der negative Potentialbereich wurde betrachtet, da bei solchen Potentialen der direkte Elektronentransfer vom Enzym zur Elektrode im Biosensor stattfinden kann. Hier liegt das Redoxpotential des Coenzym (FAD/FADH₂) der Glucose-Oxidase (etwa um -400 mV; vs. Ag/AgCl 1 M KCl). Zu höheren Potentialen hin wird die Oxidation des Substrats an der MWCNT-modifizierten Elektrode wahrscheinlicher. Daher wurde die Messung weit in den positiven Potentialbereich fortgesetzt, um mögliche Potentiale zu identifizieren, ab denen die Oxidation von Glucose durch die MWCNT-Modifikation selbst begünstigt wird. Die erste Messung wurde in PBS-Puffer (pH 5,9) vorgenommen. Anschließend wurde eine Glucosekonzentration von 5 mM in der Messlösung eingestellt und die Messung wiederholt.

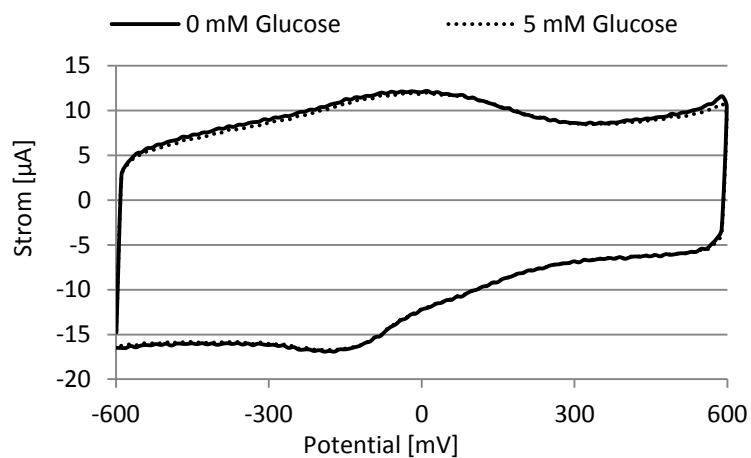


Abb. 38: Voltammetrische Untersuchung einer MWCNT-modifizierten Elektrode im weiten Scanbereich.

Die Elektrode wurde mit 0 mM und 5 mM Glucose in Lösung untersucht. Messung in PBS-Puffer (pH 5,9), Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl).

In Abb. 38 sind die Zyklovoltammogramme der Elektrodenvermessungen in Ab- und Anwesenheit von 5 mM Glucose dargestellt. Das detektierte Stromsignal zeigt ausschließlich kapazitive Stromsignale (Ladestrom). Signifikante Redoxstrompeaks, welche auf Redoxprozesse an der Elektrode schließen könnten, werden auch in Anwesenheit von Glucose nicht beobachtet. Die Anwesenheit von Glucose in der Messlösung zeigt keinen signifikanten Einfluss auf das Stromverhalten. Die maximalen Stromdifferenzen beider Zyklovoltammogramme betragen etwa 4,5 % bei positiven und etwa 1 % bei negativen Strömen (bei -300 mV). Es kann davon ausgegangen werden, dass Glucose nicht an der Elektrode umgesetzt wurde.

3.1.3 Immobilisierung des Redoxenzym Glucose-Oxidase

In den beiden vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass Kohlenstoffnanoröhren als leitfähiges Transducermaterial genutzt werden können. Weiterhin zeigten sie keine katalytische Aktivität, welche die Glucoseoxidation im untersuchten Potentialbereich begünstigt. Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die MWCNT-Schicht als Immobilisationsmaterial genutzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Immobilisationsmethoden getestet, um einen funktionsfähigen Biosensor zu konstruieren. Als schonende Variante der Immobilisation wurde geprüft, ob das Enzym über 16 h bei 4 °C bzw. 25 °C (Enzym in PBS, pH 5,9) an die MWCNTs adsorbiert werden kann. So präparierte Elektroden zeigten keine biokatalytische Aktivität (keine modulierten Stromsignale in Gegenwart von Glucose). Wahrscheinlich war das Enzym nicht fest genug an den MWCNTs gebunden. Ein engerer und stabilerer Kontakt von Enzym und MWCNT-Schicht ist durch kovalente Kopplungsmethoden möglich. Dazu wurde versucht das Enzym über EDC/NHS kovalent an die Carboxylgruppen der Kohlenstoffnanoröhren zu koppeln. Ein direkter Elektronentransfer konnte auch hier nicht beobachtet werden.

Durch den zusätzlichen Einsatz von Ferrocen (klassischer Elektronen-Mediator in Biosensoren der zweiten Generation), konnte in Anwesenheit von Glucose mediatierter Elektronentransfer beobachtet werden. Dies verifizierte, dass die Glucose-Oxidase kovalent an die Kohlenstoffnanoröhren gekoppelt werden kann und zudem ihre biokatalytische Aktivität beibehält. In amperometrischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass Ferrocen-modifizierte Elektroden bereits als nicht-enzymatisches System auf Glucose mit einem positiven Stromsignal reagieren. Dieses Falsch-Positiv-Verhalten war der Grund zum Ausschluss des Mediator-basierte Ansatzes zur Konstruktion des Biosensors.

Da die bisher erzielten Ergebnisse nicht zu verwendbaren Biosensor führten wurde als nächstes geprüft, ob sich das Enzym durch Kohlenstoffnanoröhren einschließen lässt. Dazu wurde der Biosensor wie in Kapitel V5.11.3 c beschrieben präpariert. Die Zyklovoltammogramme eines so aufgebauten Biosensors in Ab- und Anwesenheit von 5 mM Glucose sind in Abb. 39 dargestellt.

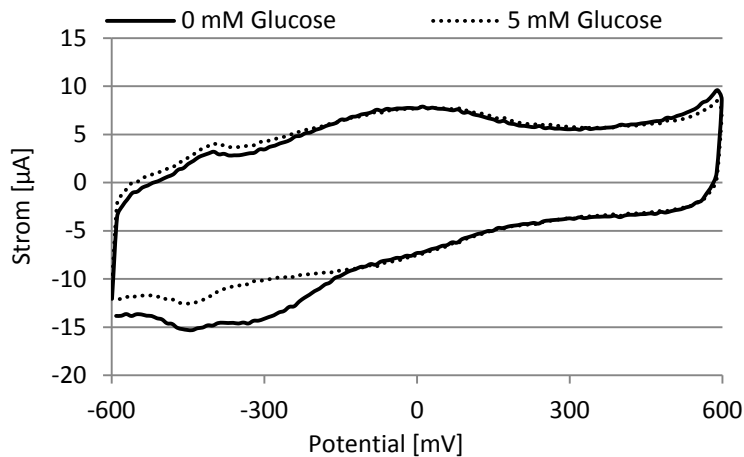


Abb. 39: Voltammetrische Untersuchung einer MWCNT-modifizierten Elektrode mit immobilisierter Glucose-Oxidase im weiten Scanbereich.

Die Elektrode wurde mit 0 mM und 5 mM Glucose in Lösung untersucht. Messung in PBS-Puffer (pH 5,9), Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl).

Im positiven Potentialbereich kann bei Anwesenheit von Glucose keine Stromänderung beobachtet werden. Dieser Bereich wird daher in weiteren Versuchen nicht weiter untersucht. Durch die Messung im Glucose-freien Puffer können ein Oxidationspeak bei -400 mV und ein Reduktionspeak bei etwa -450 mV festgestellt werden. Dies deutet auf die Reduktion bzw. Oxidation des FAD bzw. FADH_2 im Enzym hin. Die Zugabe von Glucose (5 mM) führt zu einer Modulation des Stromsignals. Sowohl Oxidations- als auch Reduktionspeakströme nehmen positiverer Werte an. Dies deutet drauf hin, dass der Elektronenfluss zwischen Enzym und der Elektrode durch die enzymatisch katalysierte Glucoseoxidation beeinflusst wird. Somit ist eine so konstruierte Elektrode biosensorisch aktiv. Das Konzept des nun funktionsfähigen Biosensors sowie die Detektionsmethode des Analyten sollen im nächsten Kapitel genauer beschrieben werden. Voltammetrische Untersuchungen finden ab hier nur noch im negativen Potentialbereich (-600 bis -100 mV) statt.

3.1.4 Konzept des Biosensors

Der strukturelle Aufbau des Biosensors ist in Abb. 40 schematisch dargestellt. Für den Aufbau wird zuerst eine Schicht mehrwandiger Kohlenstoffnanoröhren physikalisch auf der Goldelektrodenoberfläche adsorbiert. Im gleichen Verfahren wird darauf eine Schicht Glucose-Oxidase aufgebracht. Die Adsorption einer zweiten MWCNT-Schicht führt zur effektiven Immobilisierung des Enzyms. Der Einschluss zwischen zwei MWCNT-Schichten verhindert das Ausschwemmen des Enzyms während analytischer Messungen. Bei erfolgreicher Immobilisierung und gleichzeitig beibehaltender Bioaktivität des Enzyms kann Glucose nun von dem Bio-Nanokomposit umgesetzt werden.

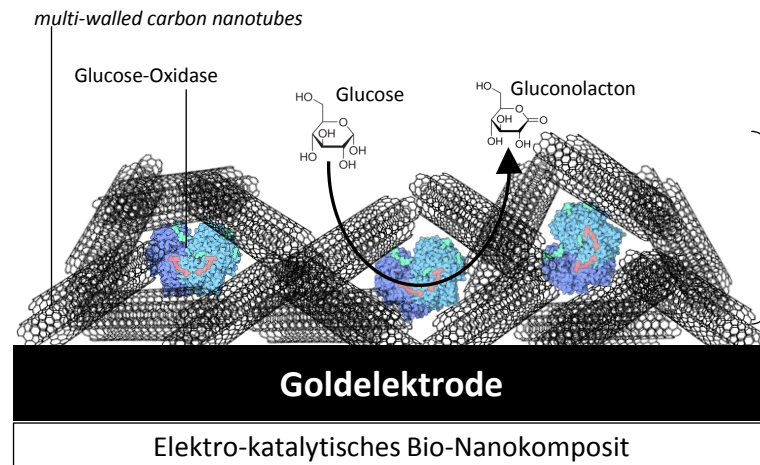


Abb. 40: Konzept des Biosensors, welcher auf der GOD-Immobilisation via Einschlußverfahren basiert.

Die realen Größenverhältnisse der einzelnen Komponenten werden aus Gründen der Anschaulichkeit nicht berücksichtigt.

Die Umsetzung der Glucose (Oxidation) führt zur Reduktion des Cofaktors FAD im elektroaktiven Zentrum des Enzyms zu $FADH_2$. Beim Anlegen eines passenden Potentials können diese Elektronen via Tunneleffekt durch die schützende Proteinhülle auf die Elektrode übertragen werden (Marcus und Sutin, 1985; Marcus, 1993; Jose *et al.*, 2012). Dadurch wird $FADH_2$ wieder zu FAD oxidiert und das aktive Zentrum wird frei für die nächste Glucoseoxidation. Die Kohlenstoffnanoröhren dienen zunächst als Elektronenakzeptor sowie als Elektronenleiter zur Goldelektrode. Die Fabrikation einer so arbeitenden Proteinelektrode zeigte die beste Reproduzierbarkeit in ihrer Aktivität. Für eine detaillierte Charakterisierung des Biosensors wurden voltammetrische Messungen im Bereich von -600 bis -100 mV durchgeführt. Eine solche Beispielmessung ist in Abb. 41 A dargestellt.

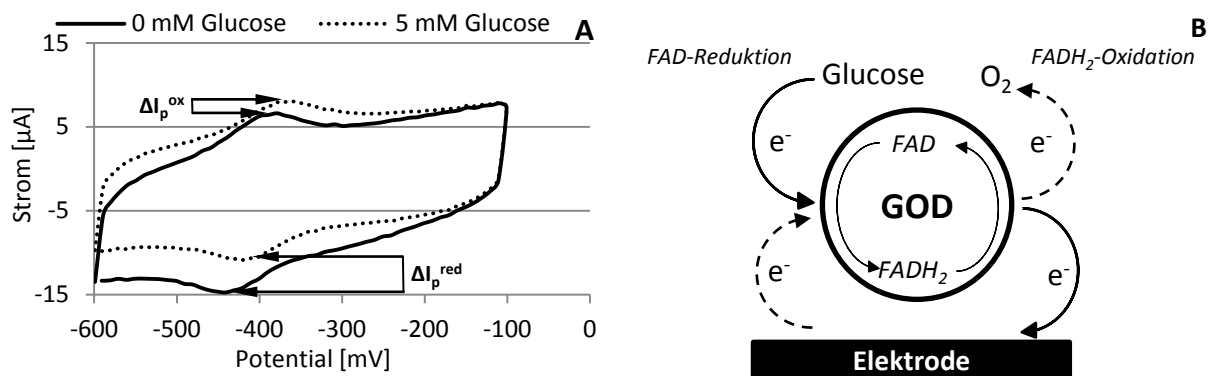


Abb. 41: Prinzip der Analytdetektion des GOD-MWCNT-Biosensors.

A - Dargestellt ist die biosensorische Detektion von Glucose via Zyklovoltammetrie mit 0 mM und 5 mM Glucose in Lösung. Messung in PBS-Puffer (pH 5,9), Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl).

B - Prinzip der Redoxprozesse zwischen Substrat, Enzym und Elektrode. Die durchgezogenen und gestrichelten Pfeillinien zeigen, dass sowohl der Oxidations- also auch der Reduktionsprozess des $FADH_2$ bzw. FAD auf zwei alternative Weisen möglich ist. Durchgezogene Pfeillinien markieren den Elektronenfluss vom Substrat bis zur Elektrode, welcher entscheidend von der Effektivität der Elektrokommunikation zwischen Enzym und Elektrode abhängt.

Die beiden Zyklovoltammogramme in Abb. 41 A zeigen die Stromantwort des Sensors in An- sowie in Abwesenheit von 5 mM Glucose in der Messlösung. Es wurde eine langsame Spannungsvorschubsgeschwindigkeit (Scanrate) von 10 mV/s verwendet, um den Elektronentransfer zur Elektrode zu ermöglichen. Es sind deutliche Oxidations- und Reduktionspeaks bei jeweils -390 sowie -440 mV erkennbar. Diese Strompeaks können dem direkten Elektronentransfer zwischen FAD/FADH₂ im aktiven Zentrum des Enzyms und der Elektrode zugeordnet werden. Zudem werden in Gegenwart von Glucose modulierte Peakströme (I_p) beobachtet.

Abb. 41 B stellt schematisch das Prinzip der Redoxprozesse zwischen dem Substrat Glucose, dem Enzym Glucose-Oxidase und der Goldelektrode dar. Während der Reduktion kompetieren Elektrode und Glucose mit einander. Als natürliches Substrat des Enzyms hat Glucose leichteren Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms. Daher kommt es zu einer betragsmäßigen Verringerung des Reduktionspeakstroms in Gegenwart von Glucose. Es ist offensichtlich, dass die Änderung im Reduktionspeakstrom (I_p^{red}) größer ist als die Änderungen im Oxidationspeakstrom (I_p^{ox}). Die Änderung im Oxidationspeakstrom ist mit 1,5 μA daher deutlich kleiner als die Änderung des Reduktionspeakstrom (3 μA). Im Fall der FADH₂-Oxidation agiert die Elektrode als Elektronenakzeptor. Damit wird der Transfer der Elektronen vom eigentlichen Analyt (Glucose) zur Elektrode fortgesetzt. Daher ist die Beschaffenheit des elektrischen Kontakts zwischen Biomolekül und Elektrodenoberfläche hier von besonderer Bedeutung. Diese Art des Elektronentransfers (Oxidationsstrom) ist somit für die Charakterisierung der Elektrokommunikation im Bio-Nanokomposit wesentlich repräsentativer als der Reduktionsstrom und wird daher für spätere Analysen verwendet. Gerade bei dieser direkten Form der Elektrokommunikation ist ein sehr geringer Abstand zwischen dem elektroaktiven Zentrum des Enzyms und der Elektrodenoberfläche entscheidend für einen effektiven Elektronentransfer. Einerseits können daher Konformationsänderungen des Enzyms durch die Bildung des Enzymsubstratkomplexes in Anwesenheit von Glucose für die elektrodische Oxidation des Enzyms nachteilig sein. Andererseits muss auch beachtet werden, dass der Verlust eines Teils der Elektronen an molekularen Sauerstoff möglich ist, wie Abb. 41 B zeigt.

3.2 Optimierung des Biosensors für die Integration der Ectoine

3.2.1 Biosensor basierend auf MWCNT-Ethanol suspension

Bis hierhin lässt sich festhalten, dass ein funktionsfähiger GOD-MWCNT-Biosensor etabliert werden konnte. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit ist jedoch die Übertragung des Prinzips der biologischen Trockentoleranz zur Lösung eines technischen Problems. Das Problem stellt sich durch die limitierte Stabilität des Enzyms in dem unphysiologischen Milieu des Biosensors und der Trockenlagerung eines solchen biohybriden Systems dar. Eine mögliche Lösung des Problems wurde in der Applikation natürlicher Biostabilisatoren vermutet. Solche wurden in den vorangegangenen Kapiteln untersucht und ihre Wirkung demonstriert. Der nächste Schritt beinhaltet die Integration der untersuchten Schutzstoffe aus *H. elongata* in die Biosensorkonstruktion. Diese waren das Osmotikum Ectoin und der Glasbildner Hydroxyectoin.

Dazu wurden verschiedene Ansätze von MWCNT-Suspensionen in Ethanol hergestellt, um die MWCNT-Schicht für den Einschluss der Glucose-Oxidase zu erzeugen. In Ethanol lassen sich

hydrophobe Kohlenstoffnanoröhren sehr gut suspendieren, weswegen es gegenüber einer wässrigen Suspension bevorzugt wird. Die verbesserte Suspension begünstigt zudem eine effektive Immobilisation des Enzyms mit engem Kontakt zu MWCNT-Schicht. Als Kontrolle diente eine unmodifizierte MWCNT-Ethanol suspension. Der zweite und dritte Ansatz war mit Ectoin bzw. Hydroxyectoin so gesättigt, dass eine vollständige Lösung in eine Konzentration von 200 mM resultieren. Ectoin ist allerdings nur bis zu einer Konzentration von etwa 35 mM in Ethanol löslich. Für die Löslichkeit von Hydroxyectoin in Ethanol ist bisher keine Angabe aus der aktuellen Literatur nachweisbar. Nachweislich ist Hydroxyectoin in Methanol weniger löslich als Ectoin. Daher kann auch von einer geringeren Löslichkeit in Ethanol ausgegangen werden. Ungelöstes Ectoin bzw. Hydroxyectoin lag daher suspendiert in den jeweiligen Ansätzen vor. Alle drei Sensortypen wurden sonst im gleichen Verfahren wie unter Kapitel V5.11.3 c beschrieben hergestellt.

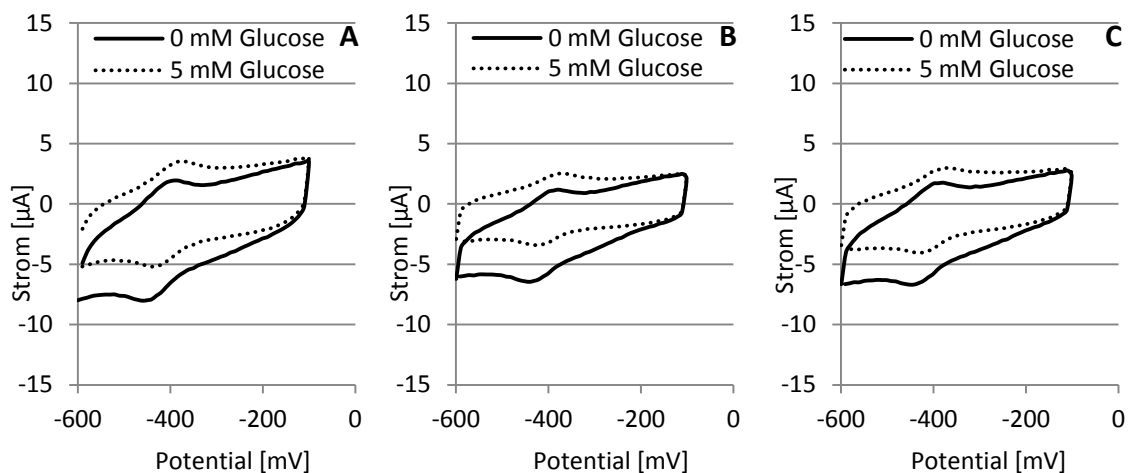


Abb. 42: Voltammetrische Untersuchungen des GOD-MWCNT-Biosensors (MWCNT aus Ethanol suspension) mit eingeschlossener Glucose-Oxidase.

Gemessen wurde mit 0 mM und 5 mM Glucose in Lösung. Messung in PBS-Puffer (pH 5,9), Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl). Kohlenstoffnanoröhren aus Ethanol suspension, A - unmodifiziert, B - 100 mM Ectoin-modifiziert, C - 100 mM Hydroxyectoin-modifiziert. Jeweils eine Beispielmessung von drei Elektroden.

Abb. 42 zeigt beispielhaft für jede dieser Elektroden zykelvoltammetrische Vermessungen. Die Elektroden wurden in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von 5 mM Glucose untersucht. Auffällig ist, dass die unterschiedlichen Zykelvoltammogramme nicht den identischen Verlauf zeigen. Faraday'sche Peakströme liegen hier im Bereich zwischen -8 und 5 μA . Sie hängen stark von der erzeugten MWCNT-Fläche und der immobilisierten Enzymmenge ab. Dadurch konnten sie um 1 bis 2 μA um die angegebenen Grenzen schwanken (nicht explizit dargestellt). Für jeden Sensortyp kann beobachtet werden, dass die charakteristische Form der Zykelvoltammogramme auch nach mehreren Zyklen erhalten bleibt. Dies impliziert, dass Ectoin- und Hydroxyectoin-modifizierte Sensorkomposite in der Messlösung stabil bleiben.

Darüber hinaus behält das Enzym in allen drei Fällen die katalytische Aktivität. Insgesamt haben die Ectoine keinen verändernden Einfluss auf das Redoxsignalverhalten des GOD-MWCNT-Biosensors. Es werden keine zusätzlichen Redoxpeaks detektiert, die Potentiale vorhandener Redoxpeaks verschieben sich nicht und auch die Peakströme weisen keine signifikante Modulation auf. Um die direkte Bioelektrokatalyse zu verbessern sollte im nächsten Schritt die Enzymimmobilisierung durch Einschluss mit der kovalenten Kopplung an die MWCNTs kombiniert werden.

3.2.2 Kovalente Kopplung der Enzymzweischicht an MWCNT

Ein schneller Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode resultiert in der Verbesserung des sensorischen Signals. Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des direkten Elektronentransfers kann durch kovalente Kopplungsmethoden realisiert werden. Sie ermöglichen den räumlich engeren Kontakt zwischen Biomolekül und Elektrode. Durch die kovalente Kopplung des Enzyms an die oberste MWCNT-Schicht konnte kein direkter Elektronentransfer beobachtet werden. Hingegen ist der direkte Elektronentransfer bei der Applikation des Enzyms als Zwischenschicht beobachtet worden. Als Optimierung sollte nun die Kombination von kovalenter Kopplung und Einschlussverfahren geprüft werden. Dazu wurden Biosensoren wie unter Kapitel V5.11.3 b beschrieben präpariert. Dies wurde mit unmodifizierten sowie Ectoin- und Hydroxyectoin-modifizierten MWCNTs getestet.

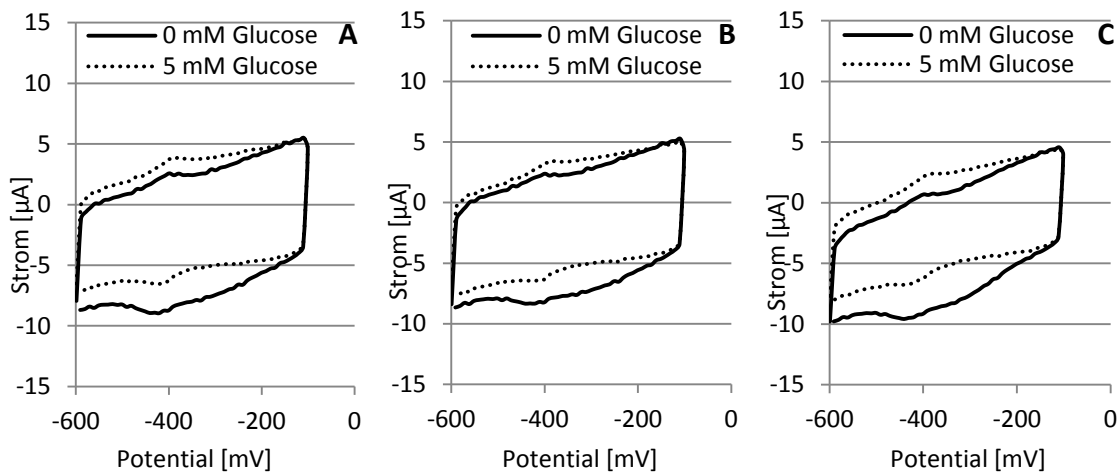


Abb. 43: Voltammetrische Untersuchungen des GOD-MWCNT-Biosensors (MWCNT aus Ethanol suspension) mit eingeschlossener und kovalent gekoppelter Glucose-Oxidase.

Gemessen wurde mit 0 mM und 5 mM Glucose in Lösung. Messung in PBS-Puffer (pH 5,9), Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl). Kohlenstoffnanoröhren aus Ethanol suspension, A - unmodifiziert, B – 100 mM Ectoin-modifiziert, C – 100 mM Hydroxyectoin-modifiziert. Jeweils eine Beispielmessung von drei Elektroden.

Abb. 43 zeigt die zykl voltammetrischen Messungen solcher Elektroden in An- sowie in Abwesenheit von 5 mM Glucose. Es ist ersichtlich, dass es Glucose-abhängig zu erhöhten Peakströmen kommt. Diese Beobachtung des direkten Elektronentransfers zeigt, dass das Enzym trotz des chemischen Stresses (durch die Kopplungsmethode) aktiv bleibt. Die Modulation der Ströme fällt in Anwesenheit von Glucose jedoch geringer aus als im vorangegangenen Versuch (Kapitel VI3.2.1). Einerseits kann der chemische Stress für die reduzierte Signaländerung verantwortlich sein. Andererseits ist es möglich, dass sich die chemische Modifikation nachteilig auf die Leitfähigkeit der MWCNTs auswirkt, so dass der direkte Elektronentransfer erschwert wird. Ectoin bzw. Hydroxyectoin führen auch hier zu keiner signifikanten Änderung des Stromverhaltens.

In diesem Versuch konnte keine Verbesserung des Sensorverhaltens erzielt werden, daher wurde in folgenden Experimenten auf die kovalente Kopplung des Enzyms verzichtet. Es blieb jedoch das Problem geringer Löslichkeit der kompatiblen Solute in Ethanol. Die kompatiblen Solute wären nach diesem Verfahren kaum als chemisches Chaperone verfügbar. MWCNT-Ethanol suspensionen haben zusätzlich den Nachteil, dass es zur Schädigung des Enzyms beim Auftragen der zweiten MWCNT-Schicht kommen kann. Daher wurde als nächstes untersucht, inwiefern eine wässrige MWCNT-Suspension für die Biosensorpräparation verwendbar ist.

3.2.3 Biosensor basierend auf MWCNT-PBS-Suspension

Sämtliche bisher vorgestellten Biosensoren basierten auf der Verwendung von MWCNT-Ethanol suspensionen, während der Präparation. Um Schadeffekte des Ethanol auf das Enzym ausschließen zu können, wurde im nächsten Versuch Ethanol als Suspensionsmittel durch wässrigen PBS-Puffer ersetzt. Der Vorteil dieser Präparationsvariante liegt zudem in der sehr guten Löslichkeit der kompatiblen Solute im wässrigen Milieu. Für den Versuch wurden drei MWCNT-Ansätze hergestellt und für die Biosensorpräparation verwendet. Dies umfasste unmodifizierte MWCNTs sowie jeweils MWCNT-Ansätze in 100 mM Ectoin und 100 mM Hydroxyectoin.

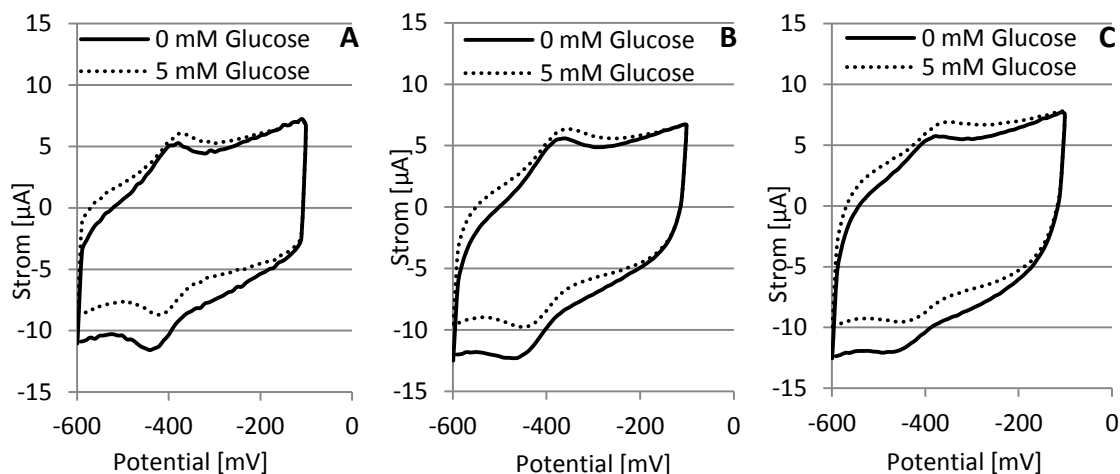


Abb. 44: Voltammetrische Untersuchungen des GOD-MWCNT-Biosensors (MWCNT aus PBS-Suspension) mit eingeschlossener Glucose-Oxidase.

Gemessen wurde mit 0 mM und 5 mM Glucose in Lösung. Messung in PBS-Puffer (pH 5,9), Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl). Kohlenstoffnanoröhren aus PBS-Suspension, A - unmodifiziert, B - 100 mM Ectoin-modifiziert, C - 100 mM Hydroxyectoin-modifiziert. Jeweils eine Beispielmessung von fünf Elektroden pro Modifizierungsvariante.

Abb. 44 zeigt die zykelvoltammetrischen Messungen solcher Biosensoren in An- und Abwesenheit von 5 mM Glucose. Die Zykelvoltammogramme sind der Ethanol-Präparationsvariante ähnlich (Kapitel VI.3.2.1). In Anwesenheit der kompatiblen Solute kann keine signifikante Änderung im zykelvoltammetrischen Signalverlauf beobachtet werden. Ferner wird auch hier der direkte Elektronentransfer in Anwesenheit von Glucose beobachtet. Daraus kann geschlossen werden, dass die Glucose-Oxidase im engen Kontakt zur technischen Oberfläche steht. Nach der Zugabe von Glucose war die Modulation des Oxidationspeakstroms etwas geringer (im Vergleich zur Ethanol suspension-Variante). Dennoch war die biosensorische Kompositschicht während der gesamten Messung mechanisch stabil (keine Ablösung) und erzeugte hier gezeigte Ergebnisse mit hoher Reproduzierbarkeit. Dadurch demonstrieren diese Versuche, dass mittels MWCNT-PBS-Suspension präparierte Biosensoren konstruierbar und bioaktiv sind. Sie bieten die Vorteile, dass sich kompatible Solute vollständig in der MWCNT-Suspension lösen lassen. Außerdem können so Protein-destabilisierende Effekte durch Ethanol ausgeschlossen werden. So präparierte Proteinelektroden wurden im Folgenden näher charakterisiert.

3.3 Charakterisierung des Biosensors

3.3.1 Biosensorische Analytdetektion im Sauerstoff-freien Milieu

Alle bisherigen Biosensoren wurden in sauerstoffhaltigem PBS-Puffer (pH 5,9) vermessen. Daher wird vermutlich ein Teil der Elektronen aus der Glucoseoxidation auf Sauerstoff übertragen und ginge somit für das detektierte Stromsignal verloren, wodurch bisher Reduktionspeakstrom Änderungen stets größer waren als die Änderungen des Oxidationspeakstroms. Demnach sollten sich die Peakstromänderungen bei der zykovoltammetrischen Vermessung eines Biosensors im Sauerstoff-freien Messpuffer angleichen. Für die Untersuchung des Biosensors unter aeroben und anaeroben Bedingungen wurde zusätzlich zum sauerstoffhaltigen Puffer ein sauerstoffarmer und N_2 -gesättigter Puffer hergestellt (Kapitel V4.5). Die Messung jeweils eines Biosensors in diesen beiden Messpuffertypen ist in Abb. 45 dargestellt.

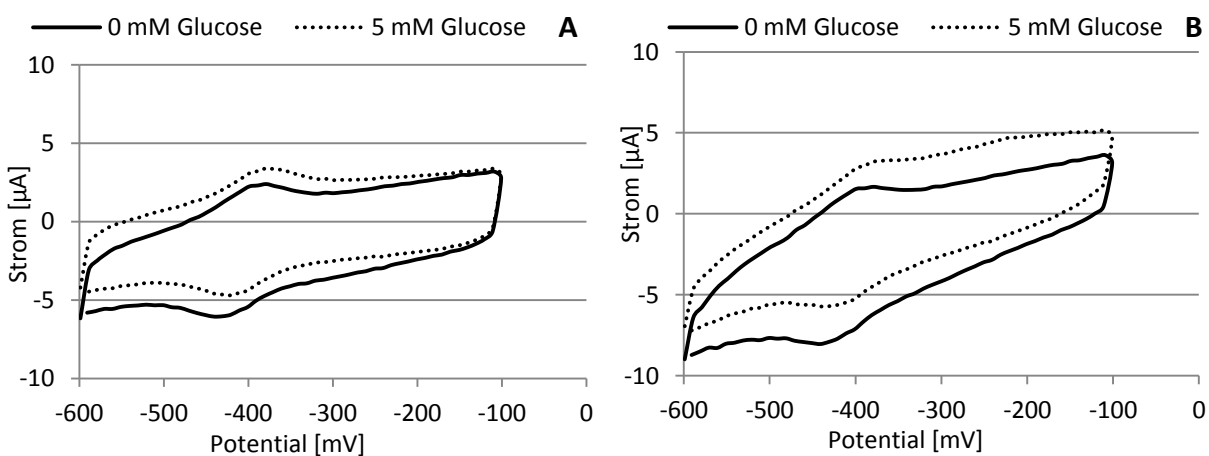


Abb. 45: Voltammetrische Untersuchungen von GOD-MWCNT-Biosensoren mit immobilisierter Glucose-Oxidase mit 0 mM und 5 mM Glucose in Lösung unter aeroben (A) und anaeroben (B) Bedingungen.

Die aerobe Messung wurde in sauerstoffhaltigem PBS-Puffer (pH 5,9) durchgeführt. Für die anaerobe Messung wurde dieser Puffer entgast und N_2 -gesättigt. Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl). Einfachmessungen.

Unter aeroben Bedingungen (Abb. 45 A) zeigt sich das zykovoltammetrische Verhalten, wie es bei identisch präparierten Biosensoren bereits zuvor beobachtet wurden (unmodifizierter Biosensor Kapitel VI3.2.3). Die Änderung des Oxidationspeakstroms beträgt etwa $0,9 \mu\text{A}$ und die des Reduktionsstroms $1,3 \mu\text{A}$. Unter anaeroben Bedingungen (Abb. 45 B) wird ersichtlich, dass die diffusionsbedingte Abnahme des Oxidationsstroms in Anwesenheit von Glucose nicht beobachtet werden kann. Daher bildete sich in diesem Fall (bei Anwesenheit von Glucose) kein vollständiger Oxidationspeak aus, da das FAD des Enzyms stetig durch die biokatalysierte Glucoseoxidation zu $FADH_2$ reduziert wird. Der Oxidationsstrom bleibt bis zum Umkehrpotential (-100 mV) in Anwesenheit von Glucose zu erhöhten Strömen moduliert. Daher kann angenommen werden, dass im aeroben Milieu die $FADH_2$ -Oxidation tatsächlich durch die Anwesenheit von Sauerstoff negativ beeinflusst wird, so dass bei Potentialen über dem Oxidationspotential des $FADH_2$ nur noch begrenzt durch die elektrodische Oxidation des $FADH_2$ möglich ist.

Ferner würde man unter anaeroben Bedingungen eine Angleichung der Änderungen der Peakströme erwarten. Diese wird hier nicht beobachtet. Die Änderung des Oxidationspeakstroms beträgt etwa $1,6 \mu\text{A}$ und die des Reduktionsstroms $2,3 \mu\text{A}$. Das Verhältnis der Oxidations- und Reduktionspeakstromänderungen berechnet sich für beide Sensoren mit $0,69$. Unabhängig von der Sauerstoffkonzentration erreicht die Oxidationspeakstromänderung also nur etwa 69% der Reduktionspeakstromänderung.

Dieses gleiche Peakstromverhältnis könnte darin begründet sein, dass Änderungen im Reduktionspeakstrom stets durch die Konkurrenz mit dem natürlichen Substrat Glucose begünstigt wird. Hingegen sind Änderungen im Oxidationspeakstrom (im aeroben wie im anaeroben Milieu) wesentlich von der direkten elektrischen Kommunikation zwischen Enzym und Elektrode abhängig (siehe Abb. 41 B), so dass bspw. die Auswirkung von Konformationsänderungen des Enzyms (z.B. durch die Bindung des Substrats) hier am eher zu auswirken und durch vergrößerte Abstände zu verringerte Ströme führen. Alle weiteren Experimente werden unter aeroben Bedingungen durchgeführt (wie bei kommerziellen Glucose-Sensoren). Dies ermöglicht auch die amperometrische Untersuchung des Biosensors unter Detektion des Sauerstoffreduktionsstroms.

3.3.2 Amperometrische Messung

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Biosensor durch voltammetrische Messungen charakterisiert und optimiert. Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Stromsignals von der Glucosekonzentration wurde eine amperometrische Vermessung des Biosensors vorgenommen. Wie bei kommerziellen Biosensoren üblich wird hierbei die Abnahme des Sauerstoffreduktionsstroms in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration gemessen. Dieses Messverfahren wurde unter konstantem Rühren der Messlösung durchgeführt, damit eine konstante Diffusionsschichtdicke ausgebildet werden konnte. So wurde das Ansprechverhalten des Sensors nicht durch eine wachsende Diffusionsschicht vermindert.

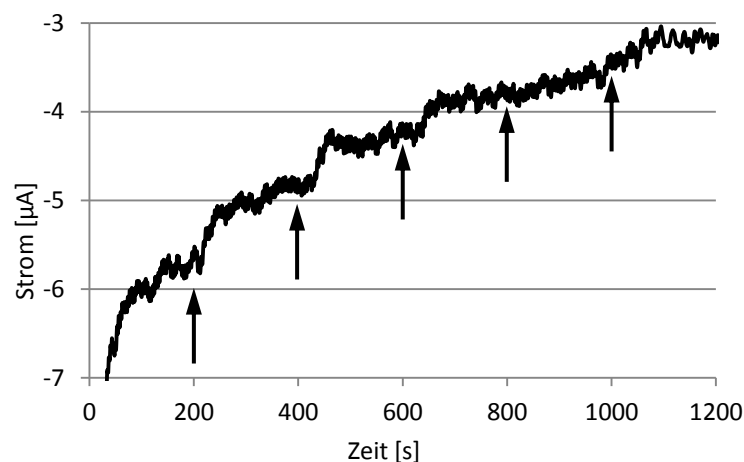


Abb. 46 Amperometrisches Stromsignal des GOD-MWCNT-Biosensors in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.

Die Pfeile weisen auf die Zeitpunkte der sukzessiven Glucosekonzentrationserhöhung (etwa $200 \mu\text{M}/200 \text{s}$). Messung in PBS-Puffer (pH 5,9) unter konstantem Rühren, fixes Potential bei -450mV , vs. Ag/AgCl (1 M KCl). MWCNT aus PBS-Suspension.

Abb. 46 zeigt die amperometrische Untersuchung des konstruierten Biosensors während der sukzessiven Zugabe einer Glucoselösung (je 0,2 mM). Die Zugabe von Glucose führte zu einem erhöhten Stromsignal. Die abnehmende Stärke der Signaländerung deutet auf einen Sättigungseffekt hin. Bei einer Glucosekonzentration von etwa 1 mM wird diese Sättigung erreicht. Die Abhängigkeit des Stromsignals von der Substratkonzentration bestätigt die erfolgreiche Enzymimmobilisierung und die biokatalytischen Aktivität des Bio-Nanokomposits.

Aus dieser amperometrischen Messung konnte ein lineares Signalverhalten im Konzentrationsbereich von etwa 0,2 bis 0,6 mM Glucose beobachtet werden, in welchem Glucose sensitiv nachgewiesen werden kann. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Biosensor für amperometrischen Nachweismethoden (bewegte Messlösung, zeitabhängige Analytdetektion) geeignet ist und somit prinzipiell in Durchflusszellen als Analytdetektor genutzt werden kann. Als letztes Kriterium zur Charakterisierung des Biosensors soll im folgenden Kapitel die Elektronentransferkinetik des Biosensors betrachtet werden.

3.3.3 Elektronentransferkinetik des Biosensors

Für die Empfindlichkeit des Biosensors ist es wichtig, dass sein Ansprechverhalten kurz ist. Dafür ist die Realisierung eines schnellen Elektronentransfers entscheidend. Darin ist auch die Verwendung der Kohlenstoffnanoröhren begründet, da der Elektronentransfer durch Tunneleffekte beschleunigt ablaufen kann. Ein erhöhtes elektrisches Signal wird nach der Substratoxidation durch die Übertragung der Elektronen zur Elektrode beobachtet. Das Übertragen der Elektronen von der Glucose bis zur Goldelektrode läuft in drei Schritten ab. Schematisch ist die Reihenfolge des Ladungstransfers in Abb. 47 dargestellt.

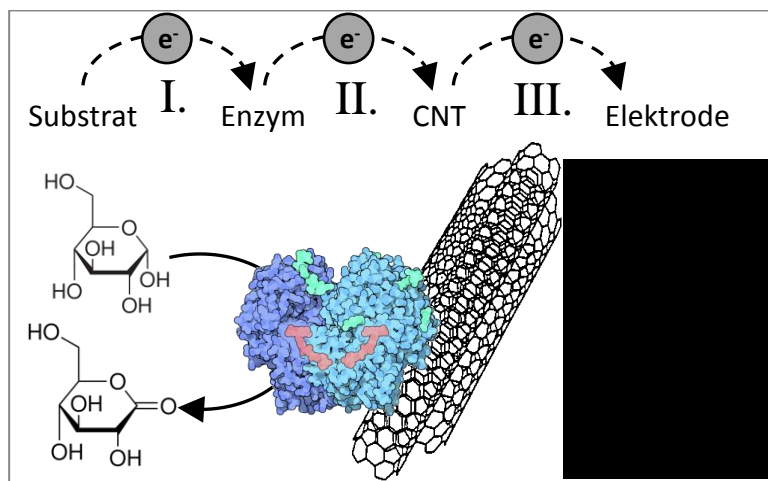


Abb. 47: Prinzip des Elektronentransfermechanismus vom Substrat zur Elektrode in drei Schritten.

Zuerst findet durch enzymatische Oxidation die Übertragung der Elektronen von der Glucose auf den Cofaktor FAD in der Glucose-Oxidase statt. Im zweiten Schritt werden die Elektronen via Tunneleffekt durch die schützende Proteinhüllen vom reduzierten Cofaktor auf die Kohlenstoffnanoröhren übertragen. Der dritte und letzte Transferschritt ist der von den Kohlenstoffnanoröhren auf die Goldelektrode.

Es kann davon ausgegangen werden, dass der erste und letzte Schritt sehr schnell ablaufen. Ersterer Elektronentransfer basiert auf einem natürlichen Prozess, der durch die hohe Spezifität des Biokatalysators ermöglicht wird. Beim letzten Schritt handelt es sich um die Elektronenleitung zwischen zwei Materialien mit hoher elektrischer Leitfähigkeit. Der gesamte Elektronentransfermechanismus erfährt seine Geschwindigkeitslimitierung daher durch den mittleren Schritt. Hierbei handelt es sich um die eigentliche biohybride Schnittstelle des Systems. Das biologische Erkennungselement kommuniziert hier mit einem technischen, nicht-natürlichen Elektronenakzeptor.

Im Folgenden wird die Ermittlung der Geschwindigkeit des Elektronentransferprozesses demonstriert. Zur Evaluierung der Übertragungsgeschwindigkeit von Elektronen wird die sogenannte heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante k_s berechnet. Dies erfolgt indem zunächst das formale Potential des FAD innerhalb der immobilisierten Glucose-Oxidase bestimmt wird. Dazu wird der Biosensor bei verschiedenen Scanraten im Bereich von 50 bis 200 mV/s untersucht.

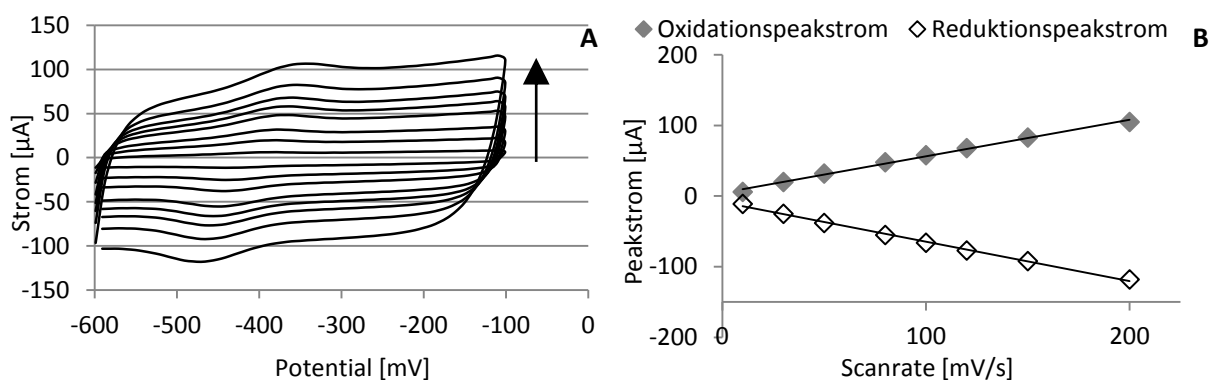


Abb. 48: Voltammetrisches Verhalten eines GOD-MWCNT-Biosensors in Abhängigkeit von der Scanrate.

A - Voltammetrische Signal des Biosensors bei verschiedenen Scanraten , (10, 30, 50, 80, 100, 120, 150 und 200 mV/s). Der Pfeil weist im positiven Strombereich auf die Richtung größer werdender Scanraten der Zyklovoltammogramme. MWCNT aus PBS-Suspension.

B - Verhalten der Oxidations- und Reduktionspeakströme in Abhängigkeit von der Scanrate. Messungen in phosphathaltiger Salzlösung (pH 5,9), vs. Ag/AgCl (1 M KCl). MWCNT aus PBS-Suspension.

In Abb. 48 A ist die zykl voltammetrische Untersuchung eines Biosensors dargestellt. Erkennbar ist, dass es mit sukzessiver Erhöhung der Scanrate zur Detektion erhöhter Stromsignale kommt. Dies begründet sich in der Abhängigkeit kapazitiver und Faraday'scher Ströme von der Scanrate. Sowohl Oxidations- als auch Reduktionspeakströme steigen linear mit der Scanrate an, wie in Abb. 48 B ersichtlich. Dies deutet auf einen Oberflächen-kontrollierten Prozess hin. Oxidationspeakpotentiale bewegen sich zwischen 355 bis 390 mV und Reduktionspeakpotentiale zwischen 435 und 470 mV. Es ist offensichtlich, dass die Peakseparation scanratenabhängig ist und mit der Scanrate größer wird. In Abb. 49 ist diese Abhängigkeit dargestellt.

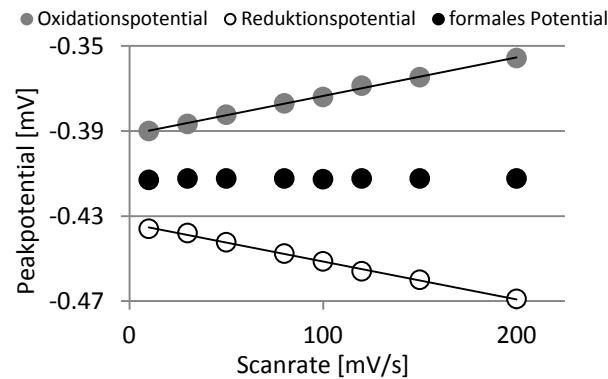


Abb. 49: Graphische Ermittlung des formalen Potentials des enzymatische gebundenen FAD/FADH₂ eines Biosensor.

Messungen in PBS-Puffer (pH 5,9), vs. Ag/AgCl (1 M KCl). MWCNT aus PBS-Suspension.

Aus den hier berechneten Mittelpunktpotentialen kann via Interpolation das formale Redoxpotential des enzymatisch gebundenen FAD/FADH₂ ermittelt werden. Dieses liegt bei 412,5 mV (durch drei unabhängige Elektroden bestimmt). Die Peakseparation ist kleiner als 200 mV und weist auf einen schnellen Elektronentransfermechanismus hin.

Für die Berechnung der Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante k_s wurde daher das entsprechende Modell (Peakseparation $\Delta E_p < 200$ mV) nach Laviron verwendet (Laviron, 1979; Liu *et al.*, 2010). Durch die Betrachtung der Verhältnisse der Redoxpeakpotentiale $[(E_p^{red} - E_f^o)/(E_p^{ox} - E_f^o)]$ ergibt sich in Abhängigkeit von der Scanrate stets ein Verhältnis von 1. Dies impliziert einen idealen Symmetriefaktor von $\alpha = 0,5$ (Laviron, 1979; Eckmann *et al.*, 2010). Über ein Nomogramm (zweidimensionales Diagramm zur graphischen Ermittlung mathematischer Werte) konnte über $\alpha = 0,5$ und die Peakseparation ΔE_p der Parameter m in Abhängigkeit von der Scanrate ermittelt werden (Pacios-Pujadó, 2012). Mit diesem Parameter konnte durch den Grenzwert der scanratenabhängigen Funktion $k_s = mnFv/RT$ (v ist die Scanrate; die Anzahl der übertragenen Elektronen ist $n=2$; F ist die Faraday-Konstante; T ist die Temperatur und R die universelle Gaskonstante) Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers k_s mit $3,23 \pm 0,25$ s⁻¹ bestimmt (Laviron, 1979; Xu *et al.*; 2003).

Für Glucose-Oxidase, die in MWCNT immobilisiert wurde, ist dieser Wert ähnlich bzw. leicht größer als Angaben in der Literatur (Cai, 2004; Deng *et al.*, 2008, 2009; Gutierrez *et al.*, 2012). Dieses Ergebnis bestätigt einen gut funktionierenden Biosensor mit effektiver Elektrokommunikation zwischen Enzym und Elektrode, welcher mit Sensoren aus der Literatur vergleichbar ist. Im nächsten Schritt sollte die Trockentoleranz des Biosensors untersucht werden. Gleichzeitig sollte getestet werden, welchen Einfluss die chemischen Chaperone auf die Trockenstabilität haben.

3.4 Biomimetische Applikation von kompatiblen Soluten im Biosensor

3.4.1 Einfluss der Ectoine auf den Glucose-Biosensor

Der bionische Ansatz dieser Arbeit beschreibt die Übertragung des natürlichen Prinzips der Trockenstabilisierung durch glasbildende Verbindungen auf ein technisches System. Dazu wurden die MWCNTs mit Vitrifikanten modifiziert, um eine künstliche Vitrifikation des Bio-Nanokomposits zu ermöglichen. Als Kontrolle dienten Biosensoren mit unmodifizierten MWCNTs. Als separate Modifikationen kamen weiterhin MWCNT-Suspensionen mit 100 mM Ectoin, 100 mM Hydroxyectoin bzw. das Zweikomponentensystem 100 mM Hydroxyectoin mit 25 mM Glutamat zum Einsatz. Die Evaluierung der Biosensoraktivitäten wurde durch die Analyse der Änderung in den Oxidationspeakströmen vorgenommen. Änderungen des Reduktionspeakstroms wurden wie bereits begründet nicht für die Evaluierung herangezogen.

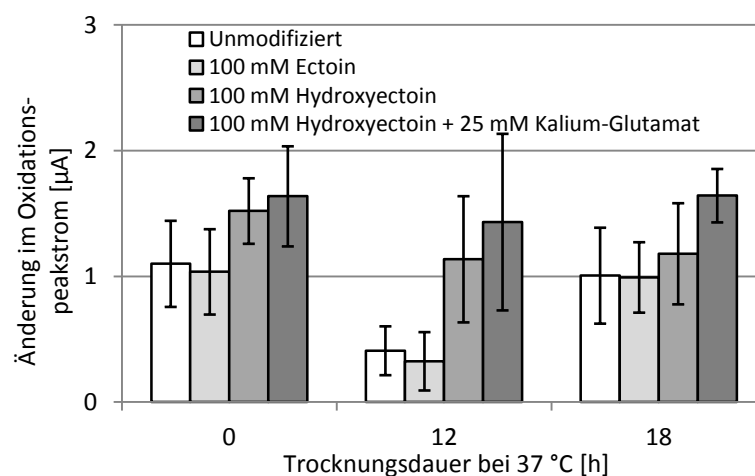


Abb. 50: Oxidationspeakstrom-Verhalten verschieden modifizierter Biosensoren bei prolongierter Trocknungszeit (bei 37 °C).

Vergleich der Änderungen im Oxidationspeakstrom nach der Zugabe von 5 mM Glucose. Nicht einberechnet ist die präparationsbedingte Trocknungszeit von 1,5 h. Messung in PBS-Puffer (pH 5,9), Scanrate 10 mV/s, vs. Ag/AgCl (1 M KCl). MWCNT aus PBS-Suspension. Standardabweichungen ergeben sich aus jeweils fünf unabhängigen Messungen mit unterschiedlichen Elektroden.

Abb. 50 zeigt die Änderungen der verschieden modifizierten Biosensoren bei variierender Trocknungszeit von 0 h, 12 h und 18 h (nicht einberechnet sind 1,5 h Trocknungszeit aus der Biosensorpräparation). Unmodifizierte Biosensoren sind auch nach 18 h noch stabil. Das Signalverhalten Ectoin-modifizierter Sensoren korreliert über die Trocknungszeit mit der Kontrolle. Die Oxidationspeakströme beider Sensortypen betragen kurz nach der Präparation, sowie nach 18 h Trocknung etwa 1 µA. Jedoch gibt es einen Signaleinbruch bei beiden Sensortypen von etwa 50 bis 70 % nach 12 h Trocknung. Die höchsten Stromsignale werden bei Hydroxyectoin-modifizierten Biosensoren beobachtet. Dies gilt insbesondere wenn es als Zwei-Komponenten-System zusammen mit Glutamat eingesetzt wird. Die Stromsignale sind stets bis zu 50 % höher gegenüber der Kontrolle. Sie betragen etwa 1 bis 1,5 µA. Nach 12 h Trocknung wird auch hier ein Signaleinbruch beobachtet. Dieser ist hier von schwächerer Ausprägung.

Es bleibt die Frage offen, ob die verbesserte Signalantwort in einer Enzymstabilisierung, einer Verbesserung des Elektronentransfers oder in eine Kombination von beidem begründet ist. Beides wäre für die weitere Applikation in einem Biosensor vorteilhaft. Ein verbesserter Elektronentransfer könnte beispielsweise durch eine feinere Verteilung der MWCNTs verursacht werden. Kohlenstoffnanoröhren und ihre Verteilung können im Rasterelektronenmikroskop untersucht werden. Die Möglichkeit, dass die Zusätze einen Einfluss auf die MWCNT-Verteilung haben, soll im nächsten Abschnitt als finaler Punkt dieser Arbeit betrachtet werden.

3.4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der MWCNT-Schicht des Biosensors

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Bio-Nanokomposite wurden diese auf einer ebenen Goldoberfläche rekonstruiert. Anschließend wurden sie mit einer etwa 30 bis 40 nm dicken Goldschicht besputtert. Abb. 51 zeigt die REM-Abbildungen der rekonstruierten Bio-Nanokompositschicht des Biosensors.

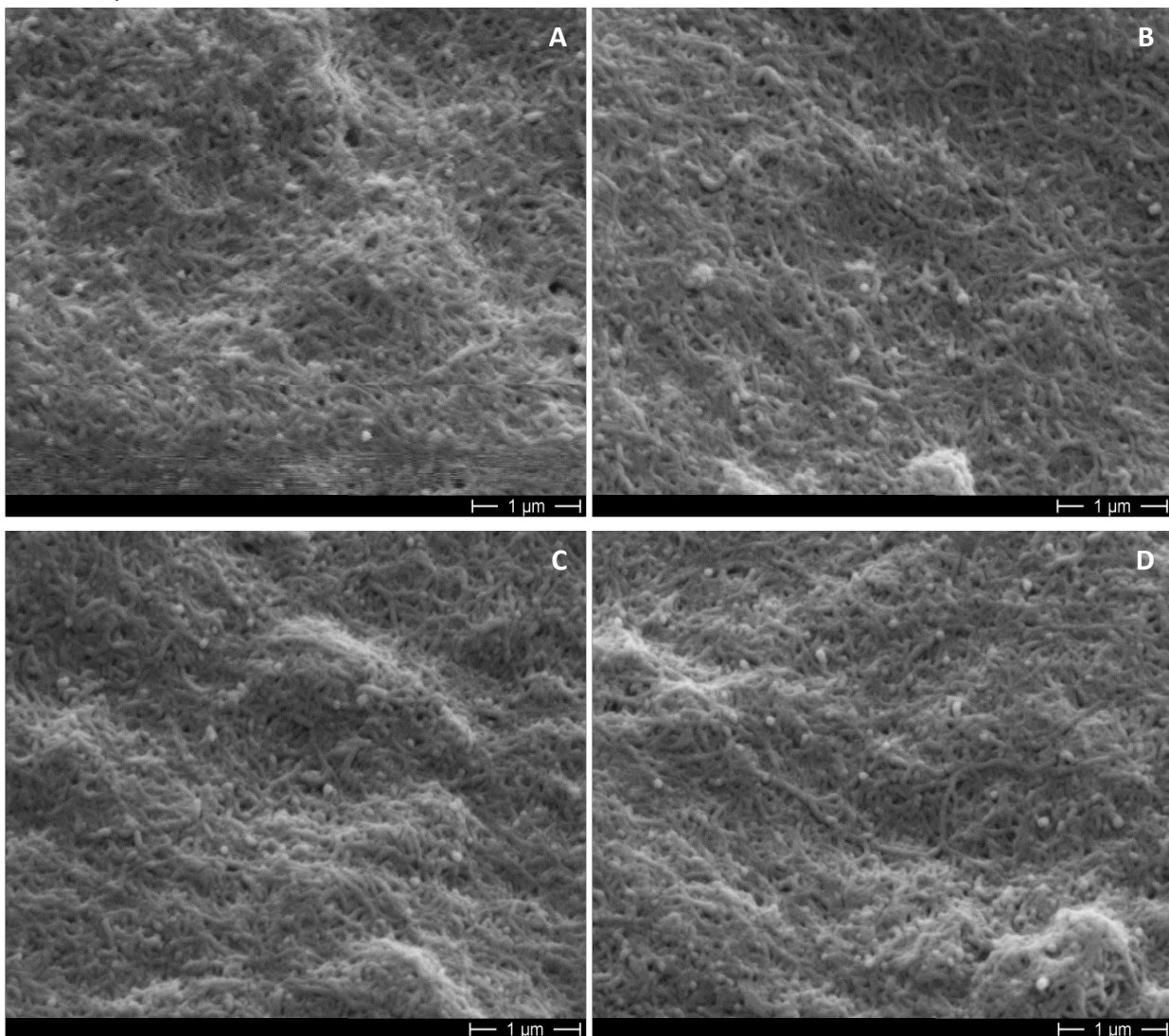


Abb. 51: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des rekonstruierten Biosensors.

Aufnahmen bei 20100-facher Vergrößerung. A - unmodifiziert, B – 100 mM Ectoin-modifiziert, C – 100 mM Hydroxyectoin-modifiziert, D – 100 mM Hydroxyectoin- und 25 mM Glutamat-modifiziert.

Deutlich ist die poröse und dreidimensionale Struktur der MWCNTs zu erkennen. Die leitfähige, poröse MWCNT-Matrix eignet sich hervorragend für die Immobilisation des Enzyms. Diese Matrix ermöglicht direkten Elektronentransfer vom aktiven Zentrum des Enzyms zur Bioelektrode. Signifikant ist auch das sehr große Aspektverhältnis (Längen-Breite-Verhältnis) der Kohlenstoffnanoröhren. Sie weisen eine fädige Struktur auf und liegen nicht als kurze Segmente vor. Die MWCNT-Matrix kann so gut für die Biomolekül-Immobilisierung genutzt werden. Dies bestätigte die erfolgreiche Präparation der MWCNTs durch Ultraschall. Außerdem ist die starke Vernetzung der lange MWCNTs wichtig für die Stabilität der Schicht. In allen Biosensortypen ist die porige Struktur gut sichtbar. Diese gewährleistet, dass das Substrat Glucose zum Enzym diffundieren kann.

Die Anwendung verschiedener Solutmodifizierung lässt durch Abb. 51 nicht auf eine signifikante Änderung der MWCNT-Verteilung in Abhängigkeit der Solute schließen. Vereinzelt Anhebungen des MWCNT-Netzwerks wurden auf allen vier Bio-Nanokompositen beobachtet und sind daher nicht auf die Solute zurückzuführen. Es muss beachtet werden, dass durch das Sputtern eine etwa 30 bis 40 nm dicke Goldschicht auf den MWCNTs liegt. So sind bei allen Biosensortypen unter 20100-facher Vergrößerung keine charakteristischen Unterschiede in der Verteilung sichtbar. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auf Basis dieser Ergebnisse ein Einfluss der Solute auf die MWCNT-Verteilung nicht eindeutig verifiziert werden kann.

VII Diskussion

Das halophile Bakterium *H. elongata* benötigt aufgrund seines bevorzugten Lebensraums (hypersalines Milieu) effektive Anpassungsmechanismen, um unter extremen Wasserentzug hauszuhalten. Als Produzent des Glasbildners Hydroxyectoin wird vermutet, dass dieser Organismus zur intrazellulären Vitrifikation und somit zur Anhydrobiose befähigt ist.

Im Rahmen der bionischen Forschung soll in dieser Arbeit diskutiert werden, ob und wie Hydroxyectoin als glasbildendes Xeroprotektivum (Trockenschutzstoff) verwendet werden kann und in welchem Ausmaß sich dies in den bioprotektiven Eigenschaften zeigt. Dies wird im Folgenden auf der Grundlage der Ergebnisse aus den biologischen Studien, der applizierten Vitrifikation sowie der biomimetischen Anwendung in einem Biosensor diskutiert.

1 Diskussion der Ergebnisse aus biologischen Studien

1.1 Bakterielle Vitalität unter temperaturdynamischen Bedingungen

Umwelteinflüsse der unbelebten Natur, die Organismen in negativer Weise beeinflussen gelten als abiotische Stressfaktoren. Dazu gehören typischerweise Hitze, Kälte, extreme pH-Werte, Nährstoffmangel sowie geringe Wasseraktivitäten durch zu hohen Salzgehalt der Umgebung oder Trockenheit (Iordachescu und Imai, 2011). Hitze, die zur Verdunstung von Wasser führt und dadurch simultan die Ionenstärke erhöht, kann den aquatischen Organismen im betroffenen Milieu ein potentiell bevorstehendes Austrocknungsereignis signalisieren. Das Überleben eines Organismus hängt nun von einer schnellen Anpassungsfähigkeit ab. Eine Form der Adaptation ist die Akkumulation bzw. *de-novo*-Synthese chemischer Chaperone. Diese können den Erhalt der Vitalfunktionen deutlich verbessern (Welsh und Brown, 1996). Solche Protektiva, die vor hitzeinduzierter Destabilisierung schützen sind teils als Xeroprotektiva bekannt (Hottiger *et al.*, 1987; Lippert und Galinski, 1992; Elbein *et al.*, 2003).

Die Toleranz von Mikroorganismen gegenüber hohen Temperaturen und Trockenheit spielt auch unter dem Aspekt der Lebensmittelsicherheit eine nicht zu vernachlässigende Rolle (Breeuwer *et al.*, 2003; Van Derlinden *et al.*, 2010). Einige Studien führten temperaturdynamische Experimente im Bioreaktor mit dem *E. coli*-Stamm K12 MG1655 (ATCC47076) als Modellorganismus für einen pathogenen *E. coli*-Stamm durch. Hierbei wurde postuliert, dass eine Temperaturstress-resistente Subpopulation des Darmbakteriums *E. coli* existiert, welche Temperaturen bis zu 65 °C überlebt (Van Derlinden, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der mikrobiologischen Glasbildung als Antwort auf abiotischen Stress untersucht. Aus den Ergebnissen der oben genannten Studie ließ sich vermuten, dass in einigen Zellen ein solch vitrifikationsähnlicher Prozess initiiert wurde, um den erhöhten Temperaturanstieg und die bevorstehenden Austrocknung zu tolerieren. Es ist zu vermuten, dass die Vitrifikation unter temperaturdynamischen Bedingungen durch Glasbildner wie Trehalose oder Hydroxyectoin induziert werden kann. Unter diesem Aspekt wurden Versuche nach dem Protokoll der zitierten Studie mit *E. coli* und *H. elongata* durchgeführt. Denn es ist bekannt, dass *E. coli* in der Lage ist den Glasbildner Trehalose zu synthetisieren (Strom und Kaasen, 1993).

Im Gegensatz zu *E. coli* synthetisiert der halophile Modellorganismus *H. elongata* bei Salz- und insbesondere bei zusätzlichem Hitze-Stress den Glasbildner Hydroxyectoin (Wohlfarth *et al.*, 1990). Somit war für dieses Experiment einzig die Fähigkeit zur Bildung von Trehalose bzw. Hydroxyectoin hinreichend. Die Kultivierung wurde mit dem Stamm *E. coli* K12 DSM 498 (ATCC23716) bzw. *H. elongata* DSM 2581^T durchgeführt.

Nach der temperaturdynamischen Fermentation im Komplexmedium zeigte sich, dass in *E. coli*-Zellen nur das kompatible Solut Betain und keine Trehalose nachweisbar war. Anscheinend interferierte die Gegenwart von Betain im Komplexmedium mit der Trehalosesynthese des Bakteriums. Diese Korrelation fehlender Trehalose mit der präferierten Betainakkumulation stimmt zudem mit den Berichten der Literatur überein (Larsen *et al.*, 1987; Cayley *et al.*, 1993). Demnach schließt dies die trehalosegesteuerte Vitrifikation der *E. coli*-Zellen im durchgeführten Experiment aus. Daraus kann für die Akkumulation von Betain keine Hitzeresistenz geschlussfolgert werden, da die Zellen frühzeitig im BHI-0,5 % absterben (vitale Zellen bis 52 °C). Dieses Ergebnis widerspricht der oben genannten temperaturdynamischen Studie und zeigt, dass der Nachweis einer hitzeresistenten *E. coli*-Subpopulation nicht reproduziert werden konnte (Van Derlinden *et al.*, 2010). Es ist anzunehmen, dass die Akkumulation des Glasbildners Trehalose eine deutliche Verbesserung der Hitzeresistenz implizieren würde. Denn Trehalose wird in Bakterien und anderen Organismen als Anpassung an abiotischen Stress sowohl in Form von Hitze, Trockenheit als auch erhöhten Salzgehalt synthetisiert (Francia *et al.*, 2008). Aktuelle Studien bestätigen zudem, dass die salzinduzierte Trehalosesynthese in resistenteren *E. coli*-Zellen gegenüber Hitze resultiert (Pleitner *et al.*, 2012). Diese Tatsache unterstreicht die Relevanz der Art des kompatiblen Solut in Zusammenhang mit der Toleranz gegenüber abiotischem Stress.

Die temperaturdynamische Fermentation mit *H. elongata* war im Vergleich dazu ein neuer Ansatz. Als halophiles Lebewesen ist dieses Bakterium auf ein gewisses Salinitätslevel seiner Umgebung angewiesen. Zur Realisierung eines verbesserten Wachstums und dehydrierender Bedingungen wurde *H. elongata* in BHI-10 % kultiviert, um durch geringere Wasseraktivitäten die Hydroxyectoinsynthese auszulösen (Ures, 2005). *H. elongata* demonstrierte im Gegensatz zu *E. coli* eine deutlich verbesserte Toleranz gegenüber dem steten Temperaturanstieg (vitale Zelle bis 57 °C). Die Gründe lassen sich in Unterschieden der Solutakkumulation vermuten. *H. elongata* akkumulierte zunächst viel Betain, da dieses energiesparend aus dem Medium aufgenommen werden konnte. Erst bei Erhöhung des abiotischer Stresses (Nährstoffmangel, Hitze, Salzstress) nahm der Anteil von Ectoin und Hydroxyectoin zu.

Nach dem Verschwinden von Ectoin waren nur noch Hydroxyectoin und Betain in den Zellen akkumuliert. Diese Solutkomposition resultiert in einem signifikanten Anstieg vitaler Zellen. Einschränkend muss beachtet werden, dass sich dieses Ergebnis aus einer Einfachbestimmung von vitalen Zellen ergab. Daher lassen sich aus den Daten lediglich Tendenzen des temperaturabhängigen Vitalitätsverhaltens ableiten.

Die Vitalzellzahlbestimmung impliziert für die ohnehin thermisch und osmotisch gestressten Zellen zusätzlichen Stress durch die rapide Änderung der äußeren Bedingungen. Erst Zellen mit höherem Hydroxyectoinanteil erreichten die höchste Anzahl vitaler Zellen im Stressexperiment. Ein Wachstum der Zellen konnte aufgrund der stationären Phase ausgeschlossen werden. Zudem stieg der OD-Wert der Probe nicht signifikant (nicht dargestellt). Bei gleichbleibender Zelldichte im Kultivierungsmedium resultiert die Steigerung daher alleinig aus der verbesserten Vitalität der Zellen. Die Gründe liegen vermutlich bei der intrazellulären Solutkomposition. Dies war also nicht als eine Vermehrung der Zellen, sondern als ein verbesserte Stresstoleranz zu deuten. Hydroxyectoin ließ die Zellen wahrscheinlich nicht nur Hitze- und Salzstress, sondern auch den zusätzlichem Stress des Ausplattierens eher tolerieren. Die nachgewiesene Kombination von Betain, Hydroxyectoin und Ectoin könnte ein Hinweis auf flüssige NADES sein. Denn aus Betain lassen sich in Kombination mit verschiedenen Primärmetaboliten NADES bilden (Dai *et al.* 2013a). Generell bleiben die Gründe der erhöhten Vitalität jedoch spekulativ. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob diese Steigerung der Vitalität auch im synthetischen Medium zu beobachten ist. Dies sollte im Rahmen weiterführender Arbeiten detailliert untersucht werden.

Zu hohe Umgebungstemperaturen führen zur Destabilisierung, Aggregation und Denaturierung von Proteinen. Daher resultiert Temperaturstress in gehemmten Wachstum oder Zelltod. Zudem geht Hitzestress stets mit oxidativem Stress einher, da Hitzestress zu einem Ungleichgewicht von Produktion und Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies führt (Van Derlinden *et al.*, 2010). Die Kombination kompatibler Solute schien *H. elongata* demnach vor einer Vielzahl von abiotischen Stressfaktoren zu schützen. Das Absterben der *H. elongata*-Zellen trat ab etwa 58 °C ein und korrelierte mit dem Anstieg an Natrium- und Chloridionen in den Zellen. Der stark erhöhte Gehalt dieser Ionen im Zytosol sowie das Fehlen der kompatiblen Solute während der Absterbephase, deuteten auf eine gesteigerte Porosität der Biomembran hin. Dies begünstigte das Einfließen von Medienbestandteile in die Zelle. Dadurch equilibrierte sich das Zellinnere mit dem äußeren Milieu. Die Tatsache, dass sich der Gehalt von Na⁺- und Cl⁻-Ionen bei höheren Temperaturen noch weiter erhöhte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Ionen durch hitzedenaturiertes Protein gebunden wurden. Es muss beachtet werden, dass sich der hier gemessene Gehalt anorganischer Ionen (wie Na⁺ und Cl⁻) aus intrazellulär akkumulierten Ionen und aus Ionen des Zwischenzellwassers der Probe zusammensetzt. In weiterführenden Arbeiten sollte daher eine genaue quantitative Analyse von intra- und extrazellulären Ionen durchgeführt werden.

Wird das gleiche temperaturdynamische Experiment mit *H. elongata* unter Verwendung eines synthetischen Mediums wiederholt, zeigt dessen Population ein langsames Wachstumsverhalten und eine geringere Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen. Dies verdeutlicht die Relevanz extrazellulärer Stabilisationsfaktoren für die Vitalität der Zellen, die in den Trockentoleranzhypothesen allerdings nur wenig beachtet wird. Die Wahl des Mediums hat einen großen Einfluss auf die Stresstoleranz von Prokaryoten gegenüber Hitze und Trockenheit (Morgan *et al.*, 2006; García, 2011). So kann das Medium bereits Solute wie Betain enthalten, die von Bakterien als Protektiva aufgenommen werden können. Desweiteren kann der Gehalt solcher Protektiva bakterielle Zellen zusätzlich von außen stabilisieren.

Während des temperaturdynamischen Experiments im synthetischen Medium blieb das Ectoin-Hydroxyectoin-Verhältnis nahezu konstant. Beide Solute waren in etwa gleichen molaren Konzentrationen nachweisbar (Temperaturgradient von etwa 45 °C bis 50 °C innerhalb von etwa 13 h; stationäre Phase ab 47 °C). In einer Studie zur Erfassung des Hydroxyectoingehalts in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur (in MM63-10 %) wurde publiziert, dass Ectoin im Temperaturbereich von 30 °C bis 40 °C das primäre kompatible Solute in *H. elongata* ist (Meffert, 2011). Die gleiche Studie zeigte in Korrelation zum oben genannten Ergebnis, dass das intrazelluläre Solutverhältnis von Ectoin und Hydroxyectoin bei 45 °C (in MM63-10 %) in etwa 1:1 entspricht. Allerdings steigt der Gehalt von Hydroxyectoin im temperaturdynamischen Experiment nicht weiter an und bleibt auch bei höheren Temperaturen bei etwa 50 % (Kapitel VI1.2.3, Abb. 19). Scheinbar lässt sich erst durch die in der genannten Studie protokollierten Schockexperimente (Temperaturschock auf 50 °C in der exponentiellen Wachstumsphase) der Hydroxyectoingehalt auf über 70 % erhöhen (Meffert, 2011). Daraus lässt sich schließen, dass ein langsamer Temperaturanstieg (0,4 °C/h) im synthetischen Medium kaum oder nur sehr langsam die verstärkte Hydroxylierung von Ectoin auslöst. Auch in Temperaturschock-Experimenten (Kapitel VI1.2.1) bestätigt sich, dass ein rapider Temperaturanstieg unter dehydrierenden Bedingungen (Hypersalinität von 10 % bzw. 15 % NaCl) eher in einer verstärkten Produktion des Glasbildners Hydroxyectoin resultiert.

In späteren Verlauf des temperaturdynamischen Experiments im synthetischen Medium wurden bereits ab etwa 55 °C (Proben VI und VII) eine deutliche Abnahme des OD₆₀₀-Wertes und das Fehlen vitaler Zellen beobachtet. Dies deutete auf das Überschreiten der Temperaturtoleranzschwelle des Organismus in diesem Medium hin. Kompatible Solute waren in den Zellen nicht mehr nachweisbar, was auf den Verlust der Solute durch die gesteigerte Porosität der Biomembran schließen ließ. Erhöhte Na⁺- und Cl⁻-Konzentrationen in den Zellen sind daher nicht als Stressantwort, sondern als Einfließen des Mediums in die Zellen zu deuten. Der leicht gesteigerter Phosphationen-Gehalt stützt die Hypothese das phosphatgepuffertes Medium in die Zellen einfluss. Auch hier muss beachtet werden, dass die Messwerte für anorganische Ionen sowohl aus dem Gehalt intrazellulär akkumulierter Ionen als auch durch die Ionen des Zellzwischenwassers der Probe ergaben.

1.2 Bedeutung anorganischer Komponenten in dehydrierungsgestressten Zellen

Während der temperaturdynamischen Fermentation im synthetischen Medium wurde Orthophosphat in *H. elongata* detektiert. Die hydrolytische Behandlung von Proben ließ, auf weitere phosphathaltige Verbindungen schließen. Insbesondere anorganische Polyphosphate waren diesbezüglich interessante Kandidaten. Denn vor allem in extremophilen Bakterien sind sie wichtig, um starke Dehydrierung (durch hohe Salinität der Umgebung oder Austrocknung), UV-Strahlung, barometrischen Druck sowie extreme pH- und Temperaturwerte tolerieren zu können (Seufferheld *et al.*, 2008). Phosphate erstarren zudem stets amorph und könnten daher in die bakterielle Glasbildung involviert sein. Via ³¹P-NMR-Spektroskopie konnte nur Orthophosphat bestätigt werden. Polyphosphate waren nicht nachweisbar. Dies lässt sich nur so interpretieren, dass anorganische Polyphosphate nicht akkumuliert wurden und daher unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in *H. elongata* nicht zur Stresstoleranz beitragen. Nach der Hydrolyse zusätzlich detektierte Phosphate entstammen wahrscheinlich organischen Verbindungen von denen Endgruppenphosphate hydrolytisch abgespalten wurden.

Die elementarspektroskopische Untersuchung von *H. elongata*-Zellen erbrachte keine Hinweise auf die zusätzliche Akkumulation von weiteren Komponenten wie bspw. Spurenelementen. Durch HPLC- und durch die elementarspektroskopische Analyse lässt sich ausschließen, dass *H. elongata* unter dehydrierenden Bedingungen (*H. elongata* von AB-10%-Agarplatte) weitere anorganische Ionen oder Moleküle in signifikanten Mengen akkumulierte. Diese Schlussfolgerung stimmt mit publizierten Daten (qualitativ) überein, wobei früh exponentielle *H. elongata*-Zellen aus Minimalmedium mit 20 % NaCl analysiert wurden (Oren *et al.*, 2002).

Auch Mangan spielt für einige Bakterien eine wichtige Rolle in der Trockentoleranz (Daly *et al.*, 2010; García, 2011). Es ist insbesondere für die Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies wichtig, die durch Hitze und Dehydrierung bedingt verstärkt auftreten (Horsburgh *et al.*, 2002). Für *H. elongata* können zwar Mangantransport-Regulatoren prognostiziert werden (Schwibbert *et al.*, 2011). Jedoch fand sich weder in den Ergebnissen dieser Arbeit oder in den bisherigen Literaturdaten Hinweise auf die verstärkte Manganakkumulation in salz- oder hitzestressen *H. elongata*-Zellen.

Das temperaturdynamische Experiment im synthetischen Medium ließ die Akkumulation von Magnesium vermuten, welches jedoch nur gering konzentriert war. Magnesiumwerte werden für *H. elongata* nur selten publiziert und sie werden in solchen Fällen eher als gering eingestuft (Ventosa *et al.*, 1998). Divalente Ionen scheinen dennoch für die Anpassung an niedrige Wasseraktivitäten eine wichtige Rolle zu spielen. So wird die Korrelation der Akkumulation solcher Ionen mit dem halophilen Charakter einiger Bakterien und Archaeen (*Escherichia coli*, *Vibrio costicola*, *Halobacterium volcanii*, *Halobacterium cutirubrum*) postuliert (Medicis *et al.*, 1986). *H. elongata* wird als moderat halophiles Bakterium eingestuft. Daher sind kompatible Solute für die Anpassung an starken Wasserentzug vermutlich bedeutender.

Werte für intrazelluläres Kalium waren bei geringen Temperatur- und Salinitätswerten zunächst am höchsten (Kapitel VI.1.2.1). Diesbezüglich korrelieren die Ergebnisse der temperaturdynamischen Fermentation im kaliumarmen Komplexmedium mit Experimenten im synthetischen Minimalmedium unter Variation von Salinität und Temperatur (nicht-temperaturdynamisch). Während der temperaturdynamischen Fermentation im synthetischen Medium war die Temperaturänderungen wahrscheinlich nicht ausreichend rapide, um eine Änderung intrazellulärer Kaliumwerte zu beobachten. Denn bei Anwendung eines Temperaturschocks (auf 54 °C) oder hoher Salinität (15 % NaCl) war die intrazelluläre Kaliumkonzentration niedriger. Die Reduzierung intrazellulärer Kaliumkonzentrationen ist vermutlich über die Anwesenheit bestimmter kompatibler Solute gekoppelt. Die Dominanz der Kaliumionen bei geringen NaCl-Konzentrationen und der Wechsel zur Ectoinakkumulation bei höheren NaCl-Konzentrationen stimmt mit den Literaturdaten überein (Kraegeloh und Kunte, 2002). Die Werte intrazellulärer Ectoin- und Hydroxyectoinkonzentrationen korrelieren dabei mit publizierten Angaben unter den gleichen Kultivierungsbedingungen (Ures, 2005; Meffert, 2011). Mit der intrazellulären Kaliumionenkonzentration änderte sich auch die des Gegenions Glutamat. Beide Konzentrationen liegen in einem konstanten Verhältnis von 2,4:1 vor (Kraegeloh und Kunte, 2002). Daher ließ sich ein Wechsel von Glutamat auf die Ectoine vermuten, weil deren Akkumulation unter den sich ändernden Bedingungen wahrscheinlich eine adäquatere Anpassungsform darstellt.

Mit steigender Salinität und konstanter Temperatur (30 °C) war Ectoin das dominante Solute im zytoplasmatischen Raum. Wurde zudem ein Temperaturschock appliziert, stieg der Hydroxyectoingehalt in den Zellen und die Kaliumwerte sanken rapide. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die besondere Bedeutung von Hydroxyectoin in den salz- und hitzestressten Zellen. Hydroxyectoin wirkte vermutlich als Wasserersatz und Faltungshelfer. Es lässt sich ein ähnliches Wirken bei Trockenheit vermuten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden anorganische Komponenten für die bionische Anwendung nicht weiter betrachtet.

1.3 Vergleich eines nicht-halophilen und eines halophilen Proteoms

Der Vergleich des nicht-halophilen Proteoms von *E. coli* und des halophilen Proteoms von *H. elongata* wurde bezüglich der Aminosäurekomposition durchgeführt. Auch wenn *H. elongata* einen leicht niedrigeren Gehalt der kleinen Aminosäure Serin aufweist, ist der Gehalt der anderen beiden sehr kleinen Aminosäuren (Glycin und Alanin) deutlich höher. Gleiches trifft für die sauren Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure) zu. Die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin sind in ihrer Summe in beiden Organismen nahezu gleich häufig. Auffällig ist jedoch, dass in *H. elongata* Arginin den deutlich höheren Anteil dieser beiden basischen Aminosäuren ausmacht (76 %, im Gegensatz zu ca. 55 % bei *E. coli*). Diese Betrachtung der Proteome lässt keine Rückschlüsse auf einzelne Proteine zu. Es lässt sich jedoch vermuten, dass der höhere Anteil sehr kleiner Aminosäuren im *H. elongata*-Proteom auf einen eher flexibleren Charakter der Proteine deutet. Der höhere Gehalt saurer Aminosäuren, weist auf ein leicht saureres Proteom im Vergleich zu *E. coli*. Einschränkend ist zu erwähnen, dass die proteomische Aziditätsverschiebung in Halobakterien deutlich ausgeprägter ist. Dennoch ist das Proteom von *H. elongata* im Vergleich zum nicht-halophilen *E. coli* etwas hydrophiler ist. Der allgemein hydrophilere Proteincharakter kann zur Erklärung erhöhter Osmo- und Xerotoleranzen beitragen. Die leicht erhöhte Azidität des Proteoms stellt vermutlich eine Adaptation an das ionische Milieu dar. Es bleibt jedoch spekulativ, ob dies auch ein Hinweis auf eine erhöhte Ionenstärke im Zytoplasma von *H. elongata* ist.

Generell ist der höhere Gehalt saurer Aminosäuren typisch für Proteine aus halophilen Organismen (Ventosa *et al.*, 1998). Diese Beobachtung korreliert mit dem Ergebnis der Aziditätsverschiebung, die im Vergleich der Proteome auffällt (Kapitel VI.1.4.1, Abb. 25 A). Höhere Gesamtladungen und die höhere Hydrophilie sind charakteristisch für eine erhöhte Flexibilität in Proteinen (Radivojac *et al.*, 2004). Eine solch erhöhte Flexibilität und Hydrophilie wird insbesondere durch die Anhäufung von hydrophilen LC-Bereichen (*low complexity*-Bereich) für die Proteome von xerotoleranten und halophilen Organismen postuliert (Krišco *et al.*, 2010). Dabei ist der genaue Mechanismus noch unklar. Inwiefern die zu beobachtenden Aminosäurekomposition essentiell für die jeweiligen Organismen ist, bleibt jedoch diskutabel, da vor allem die Tertiärstruktur und die Exposition der Aminosäurereste in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde (Fukuchi *et al.*, 2003).

Die bioinformatische Betrachtung spezieller Proteingruppen, könnte daher detaillierte Information über die Zusammenhänge zwischen Proteincharakteristika und der Anpassungsfähigkeit an dehydrierende Bedingungen erbringen. Am ehesten würde sich hierzu der Vergleich von Hitzeschockproteinen eignen. Denn es wird vermutet, dass sie nicht nur thermoreguliert sind, sondern vermutlich auch chaperonähnlich während der De- und Rehydrierung wirken (siehe Kapitel IV.3.2.2.3). Allerdings ist die Anzahl der annotierten Hitzeschockproteine sowohl in *E. coli* (6) als auch in *H. elongata* (3) sehr gering. Sie sind daher für eine repräsentative Aussage ungeeignet.

Eine weitere interessante Proteingruppe stellen periplasmatische Proteine dar (vor allem Bindeproteine), da sie eher den hypersalinen und dehydrierenden Bedingungen der Umgebung ausgesetzt sind. Hier ist der saurere und dadurch auch hydrophilere Charakter solcher Proteine in *H. elongata* offensichtlich, was auf die verbesserte Anpassung an das ionische Milieu schließen lässt (Kapitel VI1.4.1, Abb. 25 B). Die untersuchten periplasmatischen Proteine können allerdings nicht die Aziditätsverschiebung des Gesamtproteoms erklären, da deren $[\text{Glu}+\text{Asp}]/[\text{Lys}+\text{Arg}]$ -Verhältnisse größer als 1,5 sind. Denn Proteine mit diesen Werten finden sich im *H. elongata*-Proteom nur in geringer Anzahl (Kapitel VI1.4.1, Abb. 25 A). Kritisch bleibt weiterhin zu betrachten, dass nur als „periplasmatisch“ annotierte Proteine analysiert wurden. Dennoch deckt sich dieses Ergebnis mit ähnlichen Vergleichen der periplasmatischen Proteine zwischen halophilen und nicht-halophilen Bakterien (Oren *et al.*, 2005).

Ribosomale Proteine stellen eine zytoplasmatische Proteingruppe dar, von denen aufgrund ihrer wichtigen Funktion am ehesten ein Adaptation an starken Wasserverlust zu erwarten wäre. Betrachtet man jedoch deren Aziditätscharakter sowie den Glycingehalt über die Hydrophilie, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der ribosomalen Proteine von *E. coli* und *H. elongata* finden (Abb. 52). Dies deutet nicht auf eine spezielle Adaptation dieser Proteine an geringe Wasseraktivitäten hin. Auch wenn einzelne ribosomale Proteine in *H. elongata* saurer sind als in *E. coli*, lassen die gleichen Verteilungen aller ribosomalen Proteine (bezüglich der Azidität) zudem nicht auf eine erhöhte Ionenstärke im Zytoplasma von *H. elongata* schließen.

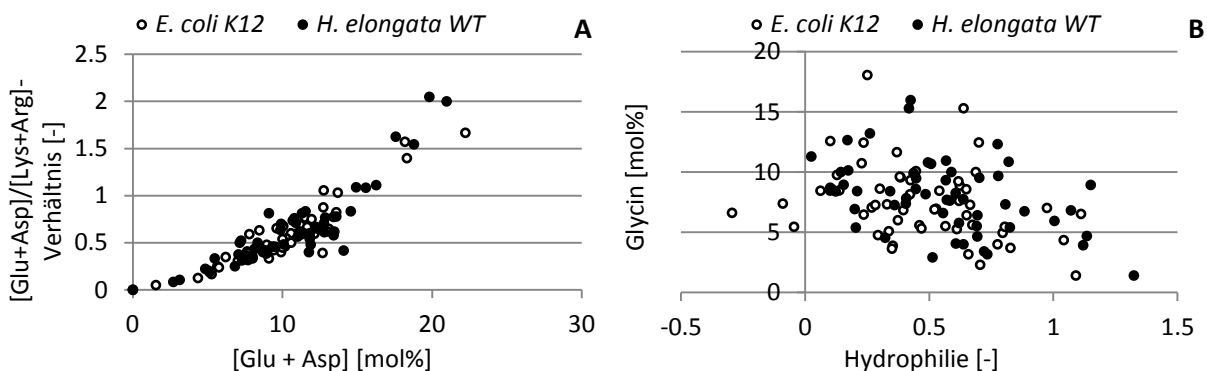


Abb. 52: Vergleich des Aziditätslevels (A) und der Glycin-Hydrophilie-Werte von ribosomalen Proteinen in *E. coli* K12 und *H. elongata* WT.

1.4 Bioinformatische Suche nach potentiellen Hydrophilinen

Derzeitig sind sowohl in *E. coli* als auch in *H. elongata* keine Proteine als LEA-Protein-ähnlich oder als Hydrophilin annotiert. Daher wurden alle Proteine der Organismen auf Glycingehalt und Hydrophilie untersucht. Dies sind typische Kriterien zur Identifikation von potentiellen Hydrophilinen (siehe Kapitel IV3.2.2.1.1). Es stellte sich heraus, dass sich für beide Organismen potentielle Hydrophilinen postulieren lassen, wobei sich deren Anzahl pro Organismus kaum unterscheidet (11 in *E. coli* und 9 in *H. elongata*). Davon sind in beiden Organismen nur wenige uncharakterisiert (5 in *E. coli* und 4 in *H. elongata*). Somit sind beide Organismen nicht nur in der Lage einen Glasbildner zu synthetisieren (Trehalose bzw. Hydroxyectoin), sondern sind potentiell auch befähigt spezialisierte Stressproteine zu exprimieren. Die Bildung von Protein-unterstützten Glasmatrixen würde in diesem Fall für beide Organismen anhydrobiotische Überlebensstrategien erklären (Wolkers *et al.*, 1998; Shih *et al.*, 2008).

Unabhängig vom Glycingehalt, finden sich in beiden Organismen nur etwa 30 Proteine mit einem Hydrophilie-Wert über 1. Diese sind in *E. coli* mit nur etwa 0,6 % und in *H. elongata* mit ca. 0,9 % am gesamten Proteom beteiligt. Die Charakterisierung potentieller Hydrophilie über Hydrophilie-Werte zeigt sich somit als hochselektive Methode, um den Suchraum für solche Proteine effektiv einzuschränken (Battaglia *et al.*, 2008). Drei der selektierten Proteine aus *E. coli*, sind durch publizierte Daten bereits theoretisch und experimentell als xeroprotektive Hydrophilie publiziert (jedoch nicht annotiert) (Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 2005).

Bei genauer Betrachtung der potentiellen Hydrophilie von *H. elongata* viel das putative und uncharakterisierte Protein E1V347 besonders auf. Es gehört zu den hydrophilsten Proteinen innerhalb des Proteoms, ist zudem sehr klein (etwa 14 kDa) und weist einen sehr hohen Gehalt an Hydrophilin-typischen Aminosäuren auf. Dazu gehören Glycin, Alanin, Serin (kleine Aminosäuren) sowie Glutamin- und Asparaginsäure (saurer Aminosäuren). Mit einem theoretischen pI von 4,6 ist das Protein als sauer einzustufen. Dieses potentielle Hydrophilin aus *H. elongata* erfüllt daher am ehesten die Kriterien eines xeroprotektiven Proteins. Die zytosolische Lokalisierung des putativen und uncharakterisierten Proteins E1V347 spricht zudem für ein Protein, das als intrazellulärer Stabilisator fungiert. Im Zytosol würde es so einen Großteil wichtiger Zellbestandteile durch die Förderung der Vitrifikation schützen können. Viele Charakteristika des Proteins stützen zwar diese Theorie. Die Hydrophilin-Funktion bleibt allerdings eine hypothetische Annahme, welche experimentell bestätigt werden müsste. Eine detaillierte und molekularbiologisch Untersuchung dieses Proteins konnte innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Auch wenn die Proteine direkt nicht vergleichbar sind, finden sich Eigenschaften wie die geringer Molekulargröße, erhöhte Glycin- und vor allem Alaninwerte sowie der hohe Gehalt an sauren Aminosäuren beispielsweise ebenso in einem LEA-Protein (Hydrophilin) aus dem trockenresistenten Bakterium *Deinococcus radiodurans* (UniProt-Akzession: Q9RV58) (White *et al.*, 1999).

1.5 Experimentelle Suche nach potentiellen Hydrophilinen

Die hitzesteuerte Proteinfractionierung wurde bereits als Methode zur thermoselektiven Isolation von sehr hydrophilen Proteinen wie Hydrophilinen und den zugehörigen LEA-Proteinen publiziert (Ried und Walker-Simmons, 1994; Wolkers *et al.*, 2001). Auf das Gesamtzellprotein von *E. coli* konnte diese Methode erfolgreich angewendet werden (Kultivierung in MM63-0,5 %). Hingegen war dies mit dem Gesamtzellprotein aus *H. elongata* unter Verwendung der gleichen Methode nicht möglich. Die Prolongation der Fällungstemperatur und -dauer erbrachte keine Verbesserung der Ergebnisse. Auch nach der Kultivierung bei geringer Salinität (MM63-2 %) blieben sämtliche *H. elongata*-Proteine hitzestabil, wohingegen *E. coli*-Proteine (ebenfalls MM63-2 %) weiterhin thermoselektiv fraktioniert werden konnten. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich annehmen, dass die Hitzestabilität den Charakteristika des halophilen Proteoms selbst zugeschrieben werden kann. Auch wenn das *H. elongata*-Proteom nur eine leichte Aziditätsverschiebung im Vergleich zu *E. coli* zeigt, scheint der hydrophilere Charakter des Proteoms mit der Hitzestabilität zu korrelieren und könnte ein Grund für die erhöhte Temperaturtoleranz von *H. elongata* sein.

Da die thermoselektive Isolation potentieller Hydrophiline aus dem *H. elongata*-Proteom nicht erfolgreich war, wurden die Expressionsmuster kleiner Proteine im Detail analysiert. Denn auch die Molekülgröße ist ein wichtiges Kriterium zur Identifizierung von Hydrophilinen (Battaglia *et al.*, 2008). Unter alleiniger Variation der Wasseraktivität (Kultivierung in MM63-3 %, 10 % bzw. 15 % bei 30 °C) konnten keine Hinweise auf die dehydrierungsbedingte Steigerung der Expression einzelner, sehr kleiner Proteine gefunden werden. Ein zusätzlicher Hitzeschock in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase, ließ nur bei niedriger Salinität (und damit weniger dehydrierenden Bedingungen) die verstärkte Expression eines kleinen Proteins von etwa 12 bis 15 kDa erkennen. In diesem Größenbereich ist zwar auch das bioinformatisch als potentielles Hydrophilin identifizierte E1V347 einzuordnen. Dennoch handelt sich hierbei wahrscheinlich eher um ein Hitzeschockprotein ohne protektive Wirkung bei zunehmender Dehydrierung. Denn mit zunehmender Salinität reduzierte sich die Bande dieses zunächst auffälligen Proteins. Ferner kann das potentielle Hydrophilin E1V347 nicht sicher der auffälligen Proteinbande zugeordnet werden. Denn die bioinformatischen Proteomdaten zeigen, dass *H. elongata* potentiell etwa 200 Proteine im Größenbereich von 12 bis 15 kDa exprimieren kann. Die Abnahme des Expressionslevels korrelierte zudem mit der Steigerung der Hydroxyectoinsynthese unter ansteigendem salinem und thermischen Stress (Kapitel VI1.2.1, Abb. 17). Eine Stressadaptation durch Hydrophilinexpression kann daher nicht angenommen werden. Eher weisen auch diese Ergebnisse auf die besondere Rolle des kompatiblen Solut Hydroxyectoin als Reaktion auf thermischen und dehydrierungsbedingten Stress hin.

1.6 Fazit aus den biologischen Studien

Es wurde demonstriert, dass der Modellorganismus *H. elongata* im Vergleich zum nicht-halophilen Bakterium *E. coli* nicht nur extremere Salinitäten sondern auch höhere Temperaturen (Anzeichen bevorstehender Austrocknung) toleriert. Für den Erhalt der Vitalität scheint intrazelluläres Hydroxyectoin verantwortlich zu sein. Dieses ermöglicht dem Organismus die Vitrifikation und somit das Überleben bei stark dehydrierenden Bedingungen. Dies wird durch Berichte gestützt, die publizieren, dass sich Hydroxyectoin besser zur Trockenstabilisierung von sensitiven Biomaterialien eignet als Trehalose (Manzanera *et al.*, 2002). Insgesamt bestätigt sich damit die Annahme, dass vor allem kompatible Solute für die Biostabilisierung in *H. elongata* entscheidend sind. Die hohe Vitalität bei intrazellulär akkumuliertem Hydroxyectoin lässt vermuten, dass die hydroxylierte Form des Ectoins gut zur Biostabilisierung unter dehydrierenden Bedingungen geeignet ist. Die dabei zu beobachtende Solutkomposition aus etwa gleich viel Ectoin, Hydroxyectoin sowie Betain (im Komplexmedium) deutet möglicherweise auf ein intrazelluläres NADES-System. NMR-spektroskopisch detektiertes Glutamat unterstützt die Vermutung, dass es sich wahrscheinlich um Mehrkomponentensysteme handelt, die im Organismus bioprotektiv fungieren. Solche xeroprotektiven Kombinationen aus hydroxylierten und carboxylierten Verbindungen könnten gleichermaßen ein Hinweis auf viskose jedoch eher flüssige NADES sein (Dai *et al.*, 2013a, 2013b). Im Rahmen der Verankerungshypothese wurden zudem experimentell und theoretisch ermittelt, dass Mehrkomponentensysteme mit mindestens einem Glasbildner (im publizierten Fall Trehalose kombiniert mit Glycerol) durch die verstärkte Ausbildung eines stabilen HB-Netzwerks biostabilisierend wirken (Magazù *et al.*, 2010). Eindeutige Hinweise auf die Akkumulation spezieller anorganischer Komponenten als Antwort auf den Wasserentzug konnten nicht beobachtet werden. Dies betrifft vor allem Polyphosphate und divalente Ionen.

Primär deuten die Ergebnisse der biologischen Studien darauf, dass die Akkumulation von kompatiblen Soluten einen wesentlicheren Anpassungsmechanismus auf dehydrierungsbedingten Stress darstellt als die Expression spezieller Stressproteine. Solche Proteine konnten in *H. elongata* zwar theoretisch prognostiziert jedoch experimentell nicht nachgewiesen werden. Allerdings weist das Proteom von *H. elongata* einen leicht erhöhten Aziditätscharakter und einen höheren Gehalt an sehr kleinen Aminosäuren wie Glycin und Alanin auf. Dies könnte zur erhöhten Temperaturtoleranz beitragen. Die vielen geladenen Aminosäuren im Proteom begünstigen zudem die Ausbildung eines stabilisierenden HB-Netzwerkes (Verankerungshypothese) bei Dehydrierung. Ferner kann ein hydrophileres Proteom die Hitzestabilität des Gesamtzellproteins erklären, wodurch potentielle Hydrophiline in dieser Arbeit nicht isolierbar waren. Das Ausbleiben der erhöhten Expression sehr kleiner Proteine, wäre in diesem Kontext ein Hinweis darauf, dass eine Adaptation an dehydrierende Bedingungen nicht durch spezielle Proteine, sondern eher durch das gesamte Proteom stattgefunden hat. Einschränkend muss ergänzt werden, dass die ausschließliche Betrachtung der proteomweiten Aminosäurekomposition nicht die Analyse von expositionierten Aminosäuren eines Proteins berücksichtigt und bleibt daher kritisch zu sehen. Dies schließt die Beteiligung spezieller Proteine in die Toleranz gegenüber dehydrierenden Bedingungen jedoch nicht aus, sie ist allerdings scheinbar der Bedeutung von kompatiblen Solute bzw. Glasbildnern unterzuordnen.

2 Diskussion der Ergebnisse zur applizierten Vitrifikation

2.1 *In-vivo*-Studie zur induzierten Vitrifikation durch Hydroxyectoin in *H. elongata*

Die biologischen Studien dieser Arbeit betätigten, dass die Steuerung der äußeren Kultivierungsbedingungen die Kontrolle der intrazellulären Akkumulation xeroprotektiver Verbindungen ermöglicht. Dies ist konform mit publizierten Erkenntnissen zur bakteriellen Trockentoleranzsteigerung (Potts, 2005; García, 2011). Wie sich zeigte ist das intrazelluläre Vorkommen von glasbildenden Substanzen wahrscheinlich nicht alleinig ausreichend, jedoch zumindest essentiell, um dehydrierende Bedingungen zu tolerieren (Tunnacliffe *et al.*, 2001). Um in *H. elongata*-Zellen unterschiedliche Konzentrationslevel der Ectoine (Osmotikum Ectoin und Vitrifikant Hydroxyectoin) zu induzieren, wurde der Organismus unter salinem Stress und verschiedener Temperierung kultiviert. Dadurch wurde den Zellen ein Austrocknungsereignis durch hohe Salinität (MM63-15 %) und einen rapiden Temperaturanstieg (Schock von 30 °C auf 50 °C in der exponentiellen Phase) suggeriert.

Der plötzliche Temperaturanstieg resultierte nicht in einem veränderten Wachstum der Bakterienpopulation im Vergleich zur Kultivierung bei 30 °C (Kapitel VI.2.1, Abb. 30 A). Dieses Wachstumsverhalten korreliert mit den publizierten Erkenntnissen einer aktuellen Studie (Meffert, 2011). Es lässt sich durch die Änderung des Hydroxyectoinlevels von 20 % auf 75 % erklären (Kapitel VI.2.1, Abb. 30 B). Alternativ kann dieser Wachstumseffekt auch so interpretiert werden, dass solche Temperaturerhöhungen das Wachstumsverhalten von *H. elongata* begünstigen können, eine schnelleres Wachstum jedoch durch den salinen Stress kompensiert wird.

Diese Veränderung in der Solutkomposition hatte einen signifikanten Einfluss auf den Erhalt der Zellvitalität unter harschen Trocknungsbedingungen, so dass Zellen mit deutlich höherem Hydroxyectoingehalt etwa sechsfach höherer Überlebensrate aufwiesen (Kapitel VI2.1, Abb. 31). Hier scheint es so, dass Hydroxyectoin die intrazelluläre Vitrifikation und somit die Anhydrobiose ermöglichte. Zentrifugaler Stress (durch Rotation) und Sauerstoffmangel während der Vakuumtrocknung konnten im Vergleich zum Trockenstress vernachlässigt werden. Dies wurde durch die ungetrocknete Kontrolle bestätigt, wobei auch hier Zellen mit höherem Hydroxyectoin-Anteil eher vitale Zellen aufwiesen. Die biologische Studien dieser Arbeit demonstrierten, dass neben den Ectoinen und Glutamat weitere Komponenten, die für die Glasbildung in dehydrierungsgestressten *H. elongata*-Zellen relevant sein könnten (wie niedermolekulare organische Verbindungen, anorganische Ionen oder Hydrophiline), experimentell nicht nachweisbar waren. Dies unterstützt die Vermutung, dass Hydroxyectoin besser als Xeroprotektivum geeignet ist als das Osmotikum Ectoin, wie durch die Trocknung von *H. elongata*-Zellen demonstriert wurde. Die einzige weitere niedermolekulare Verbindung, die daher ebenfalls einen Einfluss haben könnte wäre Glutamat. Dieses war innerhalb dieses Experiments nicht nachweisbar. Aus den biologischen Studien war ersichtlich, dass das Hydroxyectoin : Kaliumionen-Verhältnis bei etwa 2:1 lag (Kapitel VI1.2.1, Abb. 17). In *H. elongata* liegen Kaliumionen zu Glutamat angeblich in einem konstanten Verhältnis von etwa 2,4:1 vor (Kraegeloh und Kunte, 2002). Daher lässt sich vermuten, dass nicht nur das Hydroxyectoin : Ectoin-Verhältnis 1:4 war, sondern dass sich auch das Hydroxyectoin : Glutamat-Verhältnis in etwa zwischen 1:4 und 1:5 vermuten lässt. Diese drei Solute sind wahrscheinlich primär für die Trockenstabilisierung in *H. elongata* verantwortlich, wobei zumindest ein hoher intrazellulärer Ectoingehalt die Trockentoleranzschwelle eher mindert.

Die Trocknung von *H. elongata*-Zellen fand in Ansätzen von 0,1 mL mit maximal 10^6 bis 10^7 Zellen statt. Eine gewisse Eigenstabilisierung durch die Menge der Zellen ist denkbar und kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Ergänzend ist zu erwähnen, dass unter zusätzlicher Verwendung von extrazellulär stabilisierenden Glasbildnern (Trehalose bzw. Hydroxyectoin) und geringerem Trockenstress (Grobvakuumtrocknung bei 30°C für etwa 2 h) die Überlebensraten von Gram-negativen Bakterien (wie *E. coli*) in Höchstwerten von 60 bis 90 % resultieren können (García de Castro *et al.*, 2000). Dazu ist einschränkend zu sagen, dass die rein extrazelluläre Anwendung von kompatiblen Soluten (unter dehydrierenden Bedingungen) meist zu einer simultanen Akkumulation dieser Solute in die Zellen führt, da die meisten Prokaryoten hochaffine Aufnahmesysteme für kompatible Solute besitzen (Kempf und Bremer, 1998). Im Fall von *H. elongata* ist so (durch die schnellen Aufnahmesysteme bedingt) bspw. nicht die ausschließlich extrazelluläre Vitrifikation via Saccharose möglich (Kraegeloh, 2003). Für *E. coli* wurde bereits publiziert, dass Betain, Ectoin, Hydroxyectoin sowie Saccharose schnell aufgenommen werden (Louis *et al.*, 1994). Jedoch besitzt auch *H. elongata* effektive Aufnahme-Systeme für Ectoin und Hydroxyectoin (Grammann *et al.*, 2002). Entsprechend wären molekularbiologisch erzeugte Knockout-Mutanten notwendig, um die Effektivität von extra- und intrazellulärer Stabilisierung verschiedener Solute separat zu beurteilen. Dies war jedoch nicht Teil dieser Arbeit.

2.2 Artificielle Solutmatrizes (*in vitro*) – Kristallisations- und Vitrifikationstendenzen

Die Untersuchung der Vitrifikation durch hohe intrazelluläre Konzentrationen bestimmter kompatibler Solute ließ sich in bakteriellen Organismen aufgrund ihrer Größe nicht umsetzen. Daher wurde getestet, ob sich die postulierten Gläser artifiziell herstellen lassen. In Orientierung an die biologischen Studien wurden hohe Solutkonzentrationen eingesetzt (2 M). Die beheizte Lufttrocknung (2 h bei 60 °C) erwies sich als geeignetes und schnelles Verfahren, um reproduzierbar feste Solutmatrizes zu erzeugen. Lufttrocknung bei Raumtemperatur stellte sich als deutlich zeitaufwendiger heraus und resultierte nur für Trehalose und Saccharose in festen Solutmatrizes. Mit der beschriebenen Methode konnten hochviskose Gläser durch Trehalose, Saccharose, Hydroxyectoin und Glutamat erzeugt werden. Durch manuelle Prüfung kurz nach der Trocknung konnte geprüft werden, dass solche Gläser fest (hochviskos) und nicht flüssig (geringe Viskosität) waren. Daher wird die Glasübergangstemperatur der Glasbildner vermutlich über 60 °C liegen. Die Glasübergangstemperatur wird für Trehalose mit etwa 120 °C und für Saccharose mit etwa 75 °C berechnet (Simperler *et al.*, 2006). Obgleich Ectoin eher zur Kristallisation tendiert, wird für dessen nicht-kristalline Bereiche eine Glasübergangstemperatur von 42 °C und für Hydroxyectoin 87 °C vermutet (Elena Golovina, Universität Wageningen, Niederlande; persönliche Mitteilung). Ein flüssiger Zustand konnte für Ectoin in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da es nach der Trocknung primär auskristallisierte.

Offensichtlich war, dass die beiden klassischen Glasbildner Trehalose und Saccharose häufig deutliche *Cracking*-Muster (Bruch- und Rissbildung) aufwiesen. Solches *Cracking*-Verhalten wird für Trehalose (Dihydrat) auch bei Trocknung unter niedriger relativer Luftfeuchtigkeit beobachtet und muss beachtet werden, wenn Trehalose als Biostabilisator verwendet wird, da der daraus resultierende mechanische Stress empfindliche Biostrukturen schädigt (Aksan und Toner, 2004; Jones *et al.*, 2006). Solches *Cracking*-Verhalten hängt selbst von der Beschaffenheit der Oberfläche ab, auf welcher die Glasmatrizes hergestellt werden (Adams *et al.* 2008).

Sehr auffällig war die Neigung des Ectoins zu kristallisieren. Es konnten stets Kristallisationsmuster beobachtet werden, die von mehreren Kristallisationskeimen ausgingen. hydroxyectoinbasierte Matrizes (mit und ohne Glutamat) sowie reine Glutamat-Matrizes resultierten häufiger in klaren und homogenen Gläsern. Gelegentlich konnten Kristallisationseffekte in hydroxyectoinbasierten Gläsern beobachtet werden. Die meist nur von einem einzigen Kristallisationskeim ausgingen. Dies sind offensichtlich Hinweise darauf, dass Hydroxyectoin eher zur Glasbildung neigt bzw. diese fördert. Das verwendete Hydroxyectoin war zu 99 % rein und wies einen Ectoinanteil von 1 % auf (via HPLC verifiziert). Die Tendenz des Ectoins zur Kristallisation kann daher als Ursache für die partielle Kristallisationserscheinungen in Hydroxyectoingläsern vermutet werden. Da die Kristallisation in hydroxyectoinbasierten Matrizes dennoch reduziert auftrat, lässt sich schlussfolgern, dass Hydroxyectoin die Kristallisation eher inhibiert und daher als Glasbildner bezeichnet werden kann. Dieses Experiment demonstrierte, dass sich Glasmatrizes nicht nur durch nicht-reduzierende Disaccharide artifiziell unter beheizter Trocknung fertigen lassen. Die Bildung von Hydroxyectoingläsern unterstützt zudem die Vermutung, dass die Hydroxylierung der organischen Verbindungen die Vitrifikation zu begünstigen scheint. Jedoch demonstrierte die reproduzierbar Erzeugung von Glutamatgläsern, dass eine ausgeprägte Vitrifikationsfähigkeit einer organischen Verbindung die Hydroxylierung nicht zwangsläufig erfordert.

Die Bildung fester, amorpher und homogener Gläser durch die postulierten Glasbildner stützt die Vitrifikationshypothese, welche vor allem auf mechanische Stabilisierung und Immobilisierung sensitiver Biomoleküle basiert, um deren Kinetik zu reduzieren. Denn mechanischer Stress, der durch Kristallwachstum oder *Cracking* verursacht wird, würde sensitive Biomoleküle eher schädigen.

2.3 Materialwissenschaftliche Prüfung der mechanischen Werkstoffeigenschaften

Unter dem Aspekt der mechanischen Stabilisierung via Vitrifikation sowie aus verfahrenstechnischer Sicht war die Prüfung mechanischer Werkstoffeigenschaften ein wichtiger Punkt zur Charakterisierung der Gläser. Das Prüfverfahren der Nanoindentierung wurde nur mit Trehalose- und Hydroxyectoingläsern durchgeführt. Die Nanoindentierung einzelner Bakterien oder deren Strukturen waren aufgrund der geringen Größe nicht möglich. Zudem erfordert diese Methode möglichst ebene und homogene Probenoberflächen, damit diese indentierbar sind. Daher wurden die Gläser auf einer speziellen Teflonscheibe hergestellt.

Die beheizte Trocknung (bei 60 °C) konnte auf diesem Probenträger nicht für die Glasbildung genutzt werden. Denn Trehalose neigte dabei verstärkt zum *Cracking* und Hydroxyectoin tendierte häufiger zur Kristallisation. Die reproduzierbare Erzeugung indentierbarer Gläser war so nicht möglich. Wahrscheinlich begünstigt die eher raue Oberfläche des Probenträgers diese Effekte während der beheizten Trocknung. Glasmatrixes konnten auf dem Probenträger jedoch über 1, 4 bis 8 Tage im Kieselgel-beladenen Exikator bei Raumtemperatur erzeugt werden. Trehalosegläser waren nur nach eintägiger Trocknung prüfbar, da längere Trocknung in intensivem *Cracking* resultierte. Dies verdeutlicht noch einmal die Abhängigkeit der Beschaffenheit getrockneter Proben von den äußeren Bedingungen und demonstriert, dass bereits die Beschaffenheit der Probenträgeroberfläche einen Einfluss auf deren Vitrifikationsverhalten hat (Adams *et al.* 2008).

E-Modul und Härte wurden dennoch von einigen Gläsern bestimmt. Vereinfacht formuliert entspricht das E-Modul dem Widerstand gegen eine elastische Verformung und die Härte dem Widerstand gegen eine plastische Verformung durch einen härteren Körper. Entsprechend kennzeichnen niedrigere Werte eher elastische bzw. eher (plastisch) weiche Materialien.

Nach eintägiger Trocknung zeigte sich, dass Hydroxyectoingläser etwa doppelt so elastisch (halber E-Modul) und 75 % weicher als Trehalosegläser waren. Die hohe mechanische Festigkeit, die bereits nach kurzer Trocknung mit Trehalosegläsern erreicht wurden, ist wahrscheinlich ein Grund dafür, warum dieses Disaccharid so weit in der Natur verbreitet ist. Denn dadurch wird eine rapide Reduzierung der molekularen Kinetik innerhalb eines kurzen Zeitraums möglich. Das E-Modul von Hydroxyectoin erreichte nach viertägiger Trocknung die doppelte, elastische Widerstandskraft von Trehalose. Die Härte stieg jedoch nur auf den halben Wert des Trehaloseglases. Da Wasser in solchen organischen Gläsern als Weichmacher agiert (siehe Polymorphismus- und NADES-Hypothese), ist zu vermuten, dass der zunächst elastischere und weichere Charakter des Hydroxyectoins durch Restwasser verursacht wurde, das über die andauernde Trocknung sukzessive entfernt wurde. Der Restwassergehalt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Er könnte in weiterführenden Arbeiten durch Methoden wie dem Karl-Fischer-Verfahren quantifiziert werden.

Die hohe elastische Festigkeit und das Ausbleiben von *Cracking* ließen sich als Gründe dafür vermuten, weshalb Hydroxyectoin biologische Strukturen teils besser stabilisiert als Trehalose (Manzanera *et al.*, 2002). Es muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass sich sowohl Proben als auch Trocknungsbedingungen stark unterscheiden, wodurch die Ergebnisse mit publizierten Daten allein über die Beschaffenheit der Gläser nicht vergleichen lassen.

Vergleicht man die Kennwerte der künstlich erzeugten Gläser mit denen von natürlichen Strukturen, so entsprechen die E-Moduln beider Gläser etwa dem verschiedener Holzarten (bspw. Kiefer, Eiche) (Niemz, 1993; Rijdsijk und Laming, 1994). Die durch Vitrifikation realisierte zytoplasmatische Solidifikation führt zu einer erhöhten mechanischen Belastbarkeit des biologischen Systems (Kapitel III. 5.2). Da es sich um latentes Leben handelt, kann dieses nicht auf mechanisch wirkende Änderungen in der Umgebung (z. B. Druckanstieg) physiologisch oder motorisch reagieren. Daher ist eine gewisse, mechanische Festigkeit der Gläser in dieser Hinsicht von besonderer Bedeutung. Doch sind für anhydrobiotische Zellstrukturen solche mechanischen Kennwerte kaum bekannt. Die materialwissenschaftliche Untersuchung der inneren Struktur von Pollen der Gemeinen Fichte (*Picea albies*) ergab E-Moduln von etwa 3,4 GPa und Härten um 0,15 GPa (Wille, 2011). Die Kennwerte dieses anhydrobiotischen Systems sind damit deutlich kleiner als die der untersuchten Gläser. Die eher niedrigeren Kennwerte, werden wahrscheinlich durch weitere vitrifikationsfördernde Verbindungen verursacht. Hierzu könnten Hydrophiline zählen, wie man sie in ähnlichen biologischen Strukturen (Pollen, jedoch von *Brassica napus*) findet (Wolkers *et al.*, 2001). Etwas elastischere und weichere Gläser, die zusätzlich durch hydrophile Polymerverbindungen vermittelt werden scheinen daher besonders geeignet zu sein, um die Trockenstabilisierung von biologischen Strukturen zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die künstlich erzeugten Gläser bzw. Solutmatrizes nur dann untersucht, wenn die Ergebnisse unter Verwendung der angegebenen Methoden reproduzierbar waren. Dennoch muss einschränkend erwähnt werden, dass die reproduzierbare Fertigung bioprotektiver Gläser eine multidimensionale Problemstellung ist. Dies bedeutet, dass das finale Ergebnis von vielen verschiedenen Bedingungen abhängig ist (Ragoonanan und Aksan, 2008). Dies ist insbesondere für die praktische Anwendung und aus ökonomischer Sicht relevant. Diese Parameter umfassen die Solutkomposition, -reinheit und -konzentration, Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit, Druck, Luftzirkulation, Probengeometrie, Probenträgeroberfläche, Oberflächenspannung der Probe im flüssigen Zustand, räumlicher Trocknungsverlauf, Phasenseparationen und dem chemischen Charakter der zu stabilisierenden Komponente. Dies ist nur eine kleine Auswahl der zu beachtenden Einflüsse, welche sich zudem oft gegenseitig bedingen. Es ist daher festzuhalten, dass die Beurteilung von Stabilisationseffekten zwar entscheidend vom Soluttyp abhängt, jedoch nicht alleinig auf diese zurückgeführt werden kann. Damit zeigt sich, dass die Materialprüfungsergebnisse dieser Arbeit erst am Anfang der Werkstoffcharakterisierung organischen Gläsern stehen. Sie müssten in weiterführenden Arbeiten fortgesetzt werden, um die Korrelation mit den Stabilisierungseffekten der Gläser zu überprüfen.

2.4 Stabilisierung der Lactatdehydrogenase während der beheizten Trocknung

Bevor die stabilisierende Wirkung von Matrices aus verschiedenen kompatiblen Soluten untersucht wurde, wurde das Modellenzym Lactatdehydrogenase (LDH, *rabbit muscle*) zunächst auf seine Fähigkeit zur Eigenstabilisierung untersucht. Denn es ist bekannt, dass hohe Proteinkonzentrationen dieses Enzyms bereits vor abiotischem Stress wie Gefrier-Auftau-Zyklen schützen können (Lippert und Galinski, 1992). Dabei wurden die Mittelwerte der Aktivitäten des ungestressten Enzyms auf 100 % gesetzt und folgende Restaktivitäten darauf bezogen. Es stellte sich heraus, dass die Eigenstabilisierung des Enzyms auch unter beheizter Trocknung (60 °C für 2 h, 4 h bzw. 8 h) mit der Enzymkonzentration korreliert. Jedoch wurde das Enzym auch bei hoher Konzentration (1 mg/ml) nach 4 h bei 60 °C um 90 % inaktiviert. Dies verdeutlichte die Eignung dieses Enzyms für Stabilitätsstudien. Aufgrund der gewissen Eigenstabilisierung und aufgrund der schnellen Enzymkinetik wurden nur geringe LDH-Konzentrationen eingesetzt, um in folgenden Versuchen Stabilisierungseffekte zu untersuchen.

Experimente zur Eigenstabilisierung erbrachten Hinweise, dass die Trockenstabilisierung der LDH durch Proteine möglich ist. Wie in Kapitel IV3.2.2 dargestellt sind in die natürliche Trockenstabilisierung vor allem sehr hydrophile Proteine involviert, die zur Bildung einer stabilen Glasmatrix beitragen (Battaglia *et al.*, 2008). Der Vergleich von unstabiler LDH mit der Stabilisierung durch Proteine bzw. Protein-ähnliche Verbindungen wurde durch die Verdopplung der Gesamtproteinkonzentration durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Wirkung der Eigenstabilisierung mit der Trockenstabilisierung durch bovines Serumalbumin (BSA) und durch das Hydrophilin-Analog Gelatine (*porcine skin*, Typ A) verglichen werden. Es stellte sich sicher heraus, dass BSA sich eher destabilisierend wirkt. Gelatine konnte dem trockenungsbedingten Aktivitätsabfall zwar nur begrenzt entgegen wirken, jedoch stabilisierte es das Enzym relativ zur Eigenstabilisierung doppelt so effektiv und die Restaktivität reduzierte sich mit progressivem Trocknungsverlauf nur sehr langsam. Dadurch wurde gezeigt, dass sich Gelatine als Hydrophilin-Analog eignet. Es lässt sich vermuten, dass dies durch einige Gemeinsamkeiten mit typischen Hydrophilinen bedingt ist. So ist die Aminosäurezusammensetzung teilweise der Komposition ähnlich, wie sie für Hydrophiline postuliert wird. Dies betrifft vor allem den Gehalt sehr kleiner Aminosäuren wie Alanin und Glycin, sowie den erhöhten Anteil geladener bzw. polarer Aminosäuren im Vergleich zu dem nur geringen Anteil hydrophober Aminosäuren (siehe Abb. 53). Die Hauptkomponenten der Gelatine (Glycin, Prolin und Hydroxyprolin) ermöglichen zudem den Strukturbruch im Peptidstrang, wodurch sich gute Voraussetzungen für eine erhöhte Flexibilität der Peptidketten ergeben. Dies wäre ein weiteres Kriterium, das Gelatine mit Hydrophilinen teilt. BSA mangelt es dagegen an solch kleinen Aminosäuren und weist relativ zu Gelatine einen recht hohen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (insbesondere Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Valin) und Cystein auf (siehe Abb. 53).

BSA ist mit etwa 600 Aminosäuren ca. 70 kDa groß. Hingegen geht man davon aus, dass Gelatine (Kollagenfibrillen) aus etwa 1000 Aminosäuren bestehen (Bear, 1952; Piez und Miller, 1974). Die Molekülgröße scheint demnach eine untergeordnete Rolle bezüglich der xeroprotektiven Wirkung zu spielen. Daher erklärt die unterschiedliche Aminosäurekomposition vermutlich eher, weshalb hydrophile Gelatine bei thermalem Trockenstress stabilisierend wirken kann und hydrophobes BSA die Thermotoleranz in Lösung begünstigt (Chang und Mahoney, 1995).

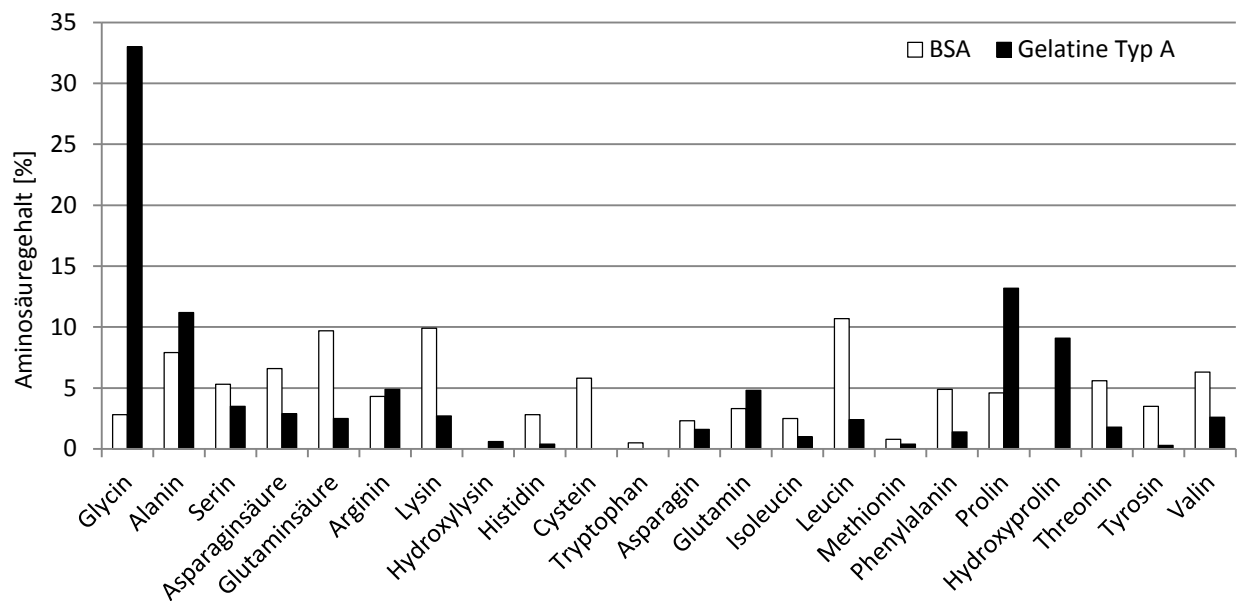


Abb. 53: Vergleich des Aminosäuregehalts von bovinem Serumalbumin (BSA; UniProt-Akzession: P02769) und Gelatine Typ A (Babel, 1996).

2.5 Xeroprotektive Wirkung von Solut- und Solut-Protein-Matrizes auf die LDH

Die Applikation der Vitrifikation zur Trockenstabilisierung der LDH während der beheizten Trocknung (bei 60 °C) wurde unter Verwendung von bekannten Glasbildnern und anderen kompatiblen Soluten durchgeführt. Parallel wurde zu jedem Solut eine Variante unter zusätzlicher Verwendung von Gelatine als Hydrophilin-Analog durchgeführt. Die Instabilität der unstabilierte LDH sowie die Stabilisierung durch Gelatine wurden reproduziert und dienten als Referenz. Das Enzym und die Gelatine waren mit jeweils 0,05 mg/ml im Vergleich zu den 2 M Solutkonzentrationen extrem gering konzentriert. Daher ist der stabilisierende Effekt allein durch Gelatine bereits signifikant und kann seinem hydrophilen und flexiblen Charakter zugeordnet werden.

Biologische Zuckergläser aus Saccharose und Trehalose demonstrierten wie erwartet deutlich xeroprotektive Wirkung. Dies unterstreicht die Tatsache, dass diese beiden Glasbildner in der Natur so verbreitet sind. Bei der Kombination von Saccharose und Gelatine lässt sich nach prolongierter Trocknung (6 h bei 60 °C) ein synergistischer Effekt beobachtet, so dass die Aktivität des Enzyms um etwa 28 % höher ist als durch die Summierung der separaten Stabilisierungseffekte der beiden Komponenten errechnet wird. Durch die Kombination von Saccharose und dem Hydrophilin-Analog wurden Glasmatrizes von Pflanzensamen und Wiederauferstehungspflanzen approximiert. Bezüglich Temperatur, Feuchtigkeit und Dauer gehören solche pflanzlichen Gläser zu den effektivsten xeroprotektiven Maßnahmen, die in der Natur nachweisbar sind (Buitink und Leprince, 2004, 2008). Daher zeigten solche Gläser wahrscheinlich auch ein etwas höheres Stabilisierungspotential bei längerer Trocknung als Trehalosegläser. Diese Effektivität ist auf den synergistischen Effekt zurückzuführen. Unabhängig vom Gelatinezusatz wies trehalosestabilisierte LDH stets hohe Restaktivitäten auf. Trehalose wird häufiger und Saccharose seltener in anhydrobiotischen Tieren nachgewiesen (Julca *et al.*, 2013). Zudem werden Hydrophiline und die zugehörigen LEA-Protein in expremierter Form vor allem in pflanzlichen Strukturen und eher seltener in tierischen Zellen entdeckt (siehe Kapitel IV3.2.2.1.1).

Diese Hinweise deuten mit den hier dargestellten Ergebnissen daraufhin, dass bestimmte Glasbildner (wie in diesem Fall Trehalose) für die maximale bioprotektive Wirkung nicht auf hydrophilinartige Proteine angewiesen sind. Ein Grund könnte durch die Polymorphismus-Hypothese (Kapitel IV4.2) erklärt werden, welche postuliert, dass partielle Trehalosekristallite im Trehaloseglas einen schonenderen Dehydrierungs-Rehydrierungs-Mechanismus ermöglichen (Bellavia *et al.*, 2011). Zumindest in Lösung kann man für Trehalose in Kombination mit Hydrophilinen synergistische Effekte bezüglich der Hitzestabilität der Citrat-Synthase beobachten (Goyal *et al.*, 2005a).

Signifikante Unterschiede ergaben sich bei der Verwendung der beiden Ectoine (Ectoin und Hydroxyectoin). Unabhängig von der Gelatine-Anwendung sind die Restaktivitäten der LDH unter Verwendung von Ectoin bereits nach kurzer Trocknungsdauer geringer als die der unstabilisierten LDH. Dies deutete auf einen Destabilisierungseffekt von Ectoin bei sehr geringen Wasseraktivitäten. Dieser schien sowohl die Aktivität der LDH als auch die xeroprotektive Wirkung des Hydrophilin-Analogs zu beeinflussen. Alternativ ist zu vermuten, dass die Glasübergangstemperatur nicht kristallisierten Ectoins (42 °C) überschritten wurde, so dass es im flüssigen Zustand vorlag und die LDH auf diese Weise nicht mechanisch stabilisiert werden konnte (Elena Golovina, Universität Wageningen, Niederlande; persönliche Mitteilung).

Bei Verwendung der hydroxylierten Form war die xeroprotektive Wirkung deutlich erkennbar. Hydroxyectoin stabilisiert etwa ähnlich effektiv wie Saccharose. Dieser Effekt wird durch das Hydrophilin-Analog noch verstärkt. Der größte Unterschied zwischen den beiden Ectoinen war die Tendenz des Ectoins zur Kristallisation und die des Hydroxyectoins zur Glasbildung. Die Postulierung, dass vor allem die Kristallisation einen starken Einfluss auf die xeroprotektive Wirkung hat, wird dadurch gestützt, dass partielle Kristallisationserscheinungen in Hydroxyectoin ebenfalls zu geminderten Restaktivitäten führten. Dies ist auch der Grund für die hohen Standardabweichungen bei der Verwendung von hydroxyectoinbasierten Gläsern. Da die Hydroxyectoinlösung eine einprozentige Ectoin-Verunreinigung beinhaltete, lässt sich nicht genau feststellen, ob die partielle Kristallisation vom Hydroxyectoin ausging oder ob das Ectoin die Kristallisation anregte. Dieses Ergebnis demonstrierte dennoch, dass Hydroxyectoin wie klassische Glasbildner als effektives Xeroprotektivum verwendet werden kann.

Die Untersuchung der xeroprotektiven Wirkung von Glutamat ergab sich aus der Beobachtung, dass es die einzige weitere, niedermolekulare Komponente war, die in dehydrierungsgestressten *H. elongata*-Zellen nachweisbar war. Unabhängig vom Gelatine-Zusatz bildeten Glutamat-Gläser stets klare und homogene Gläser und schützten das Enzym bei längerer Trocknungsdauer sogar besser als Hydroxyectoin. Die zusätzliche Verwendung des Hydrophilin-Analogs resultierte in Restaktivitäten, wie sie mittels Trehalose erreicht wurden. Dies verdeutlicht, dass selbst Glutamat durch die Bildung eines Glases das Enzym schützen kann. Die Tatsache, dass in reinen Glutamatgläsern keine Kristallisationserscheinungen zu beobachten waren, stützt die Hypothese, dass die Bildung eines amorphen Glas essentiell für die Trockenstabilisierung ist.

Aus den Schlussfolgerungen zur Beurteilung der intrazellulären Vitrifikation (Kapitel VII.2.1) wurden ferner Hydroxyectoin : Glutamat-Verhältnisse von 4:1 für die Glasbildung appliziert. Mit dieser Kombination wurden die Gläser mit der höchsten xeroprotektiven Wirkung gefertigt. Unter zusätzlicher Verwendung des Hydrophilin-Analogs Gelatine war der xeroprotektive Einfluss dieser Kombination so effektiv, dass kaum noch eine signifikante Abnahme der LDH-Aktivität erfolgte. Dies kann dem synergistischen Effekt zugeordnet werden, der neben den Saccharose-Gelatine-Gläsern nur in Hydroxyectoin-Glutamat-Gelatine-Gläsern zu beobachten war. Dieser Effekt erhöhte die Restaktivität nach der längsten Trocknungsdauer um 27 %. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Mehrkomponentensysteme eine wichtige Rolle bei der Umsetzung eines bioprotektiven Glases einnehmen. Solche Kombinationen aus Hydroxyectoin und weiteren Komponenten (wie Gelatine oder Glutamat) zur Erzeugung biostabilisierender Gläser bedürfen fortführender Studien, um das Potential solcher Mehrkomponentensystem im Detail zu erfassen. Ferner muss einschränkend erwähnt werden, dass auch für solche Gläser der Restwassergehalt nicht bestimmt wurde. Dieser könnte jedoch entscheidend für die Stabilisierung der LDH sein. Möglicherweise verhindern bioprotektive Gläser das Unterschreiten eines kritischen Minimums an Restwasser. Dies sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

2.6 Fazit zur applizierten Vitrifikation (*in vivo* und *in vitro*)

Die Hydroxyectoin-vermittelte Anwendung der Vitrifikation ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* möglich. Die *In-vivo*-Studien demonstrierten, dass *H. elongata* durch hohe, intrazelluläre Hydroxyectoinlevel in der Lage ist selbst harsche Trocknungsbedingungen zu überleben. Wahrscheinlich bildet Hydroxyectoin zusammen mit Glutamat ein stabiles Glas in der Zelle. Intrazellulären Konzentrationen der Solute wurden dabei extern gesteuert.

In Orientierung an biologische Gläser anhydrobiotischer Zellstrukturen konnten durch die applizierte Vitrifikation artifizielle Glasmatrixes *in vitro* hergestellt werden. Ausgangspunkt waren dabei hochkonzentrierte Solutlösungen, wie sie auch in trockentoleranten Zellen nachweisbar sind. Es stellte sich heraus, dass die Herstellung von Gläsern sowohl im Exikator als auch durch die beheizte Trocknung möglich ist. Der Zeitaufwand ist im ersteren Fall deutlich höher. Die Ergebnisse unterschiedliche Trocknungsverfahren zeigen, dass zur Fertigung homogener und stabiler Gläser nicht jedes Verfahren gleich gut geeignet ist. Außer für die Nanoindentierung wurde die beheizte Trocknung zur Herstellung der Solutmatrixes gewählt, da sie weniger Zeitaufwendig ist und der *In-vivo*-Applikation der Vitrifikation in *H. elongata* am nächsten kommt.

Zuckerbasierte Gläser und Ectoin-Matrixes wiesen deutliche Zeichen von *Cracking* oder Kristallisation auf. Dies macht sie für das schnelle Fertigungsverfahren der beheizten Trocknung ungeeignet. Solute wie Hydroxyectoin und Kalium-Glutamat, die in temperatur- und dehydrierungsgestressten *H. elongata*-Zellen nachgewiesen wurden, konnten hingegen reproduzierbar für die Fertigung homogener und klarer Gläser verwendet werden. Zwar wiesen hydroxyectoinbasierte Gläser teilweise Kristallisationseffekte auf. Hier ist der Grund jedoch in der einprozentigen Ectoin-Verunreinigung zu vermuten. Die Kristallisation war jedoch nur partiell und daher räumlich begrenzt. Dies unterstützt die Vermutung, dass Hydroxyectoin eher zur Vitrifikation neigt und dadurch der Kristallisation entgegenwirkt.

Die Glasübergangstemperaturen der Gläser konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft werden. Sie sind für hydroxyectoin- und glutamatbasierte Gläser dennoch hoch genug, um die applizierte Vitrifikation durch beheizte Lufttrocknung zu ermöglichen. Diese ist zeitlich weniger aufwendig als die Lufttrocknung bei Raumtemperatur und beinhaltet nicht die Kombination aus Kälte- und dehydrierungsbedingten Stress der Gefriertrocknung (Julca *et al.*, 2012).

Die Untersuchung der mechanischen Kenngrößen zeigte, dass Hydroxyectoingläser zunächst etwas elastischer und weicher als Trehalosegläser waren. Sie wurden mit prolongierter Trocknung jedoch mechanisch fester. Dies ist wahrscheinlich auf den progressiven Entzug weiterer Wassermoleküle zurückzuführen, die in biologischen Gläsern als Weichmacher agieren. Die geprüften Gläser waren dennoch fester als die amorphen Strukturen, die man in anhydrobiotischen Strukturen wie Pollen findet. Gründe könnten die Anwesenheit hydrophiler Proteine oder die feste Ummantelung des Pollenglases sein, die einem weiteren Wasserentzug entgegen wirkt. Der Restwassergehalt *in vitro* erzeugte Gläser wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft und sollte in fortführenden Arbeiten untersucht werden, da bioprotektive Gläser wahrscheinlich, dass Unterschreiten eines kritischen Restwasserminimums verhindern.

Im Kontext der Trockenstabilisierung der Lactatdehydrogenase (*rabbit muscle*) wurden bioprotektive Effekte von kompatiblen Soluten und speziellen Proteinstrukturen untersucht. Die LDH selbst erwies sich trotz eines gewissen Potentials zur Eigenstabilisierung als geeignetes Enzym zur Demonstration xeroprotektiver Effekte verschiedener Additive. Gelatine kann aufgrund seines hydrophilen und flexiblen Charakters als Hydrophilin-Analog verwendet werden. Es weist daher selbst xeroprotektive Eigenschaften auf. Synergistische Effekte konnten durch die Kombination von Gelatine mit Saccharose (Approximation an Zuckergläser aus anhydrobiotischen Pflanzen und Pflanzensamen) und mit der in *H. elongata* nachweisbaren Kombination aus Hydroxyectoin und Glutamat beobachtet werden. Dies spricht für die Kombination von hydrophilen Polymerverbindungen mit kompatiblen Soluten im Sinne effektiver Trockenstabilisierung. Solche Gläser zeigten das höchste Potential bezüglich der xeroprotektiven Wirkung und stabilisierten effektiver als trehalosebasierte Gläser. Derartige Kombinationen von Hydroxyectoin mit weiteren glasbildenden Komponenten sollten in fortführenden Arbeiten optimiert werden, um das Potential solcher Mehrkomponentensysteme detailliert zu prüfen.

Die *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien zeigten daher, dass Gläser aus Hydroxyectoin und Glutamat sowohl einzelne Proteine als auch komplexe Zellstrukturen bei extremem Trockenstress schützen können. Die Komponenten Ectoin und BSA, die als Stabilisatoren in Lösung (bei Gefrieren oder höheren Temperaturen) bekannt sind, waren als Xeroprotektiva ungeeignet und wiesen bei trockenungsbedingter Dehydrierung destabilisierende Effekte auf. Dies verdeutlicht, dass weniger hydrophile und nicht-hydroxylierte sowie zur Kristallisation tendierende Additive nicht zur Trockenstabilisierung geeignet sind. Ferner lässt sich vermuten, dass nicht-kristalline Bereiche in Ectoinmatrizes während der Trocknung bei 60 °C durch die Überschreitung der Glasübergangstemperatur (42 °C) vermutlich flüssig waren, so dass die LDH in solchen Bereichen nicht mechanisch stabilisiert werden konnte. Die xeroprotektive Wirkung von biologischen Gläsern basiert daher wahrscheinlich sowohl auf dem chemischen Charakter (z. B. Hydroxylierung) als auch auf der Fähigkeit zur mechanischen Stabilisierung (hochviskose, amorphe Matrix) der Glasbildner.

Es muss kritisch beachtet werden, dass Trocknungsvorgänge komplexe Prozesse sind wodurch die klar definierte und reproduzierbare Fertigung von Solutmatrizes zu einer multidimensionalen Problematik wird. Dies schließt physikalische, chemische und gegebenenfalls biologische Parameter ein. Dennoch lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass die Ectoine in zwei verschiedenen Weisen dem Problem des Wasserverlusts begegnen. Ectoin wirkt wahrscheinlich aufgrund seiner Hygroskopie feuchtigkeitserhaltend und schützt daher vor der Abwesenheit von Wasser selbst, wodurch es für die kosmetische Industrie ökonomisch relevant wurde (Motitschke *et al.*, 2000; Meffert, 2011). Hingegen schützt Hydroxyectoin biologische Komponenten während der fast vollständigen Abwesenheit von Wasser. Aufgrund der Hydroxylierung wirkt es vermutlich einerseits als Wasserersatz. Andererseits ist es jedoch die mechanische Stabilisierung durch die Bildung eines hochviskosen Glases, die die molekulare Dynamik innerhalb der Glasmatrix extrem reduziert und so sämtliche Reaktionsabläufe und Abbauprozessen stoppt (Aksan und Toner, 2004).

3 Diskussion zur biomimetischen Anwendung kompatibler Solute in einem Biosensor

3.1 Biosensorik

Die Detektion von Glucose ist sowohl in der biochemischen und klinischen Forschung, in der Lebensmittelindustrie als auch in der biotechnologischen Anwendung von besonderer Bedeutung (Zargoosh *et al.*, 2012). Häufig wird der Nachweis über immobilisierte Glucose-Oxidase (Typ VII aus *Aspergillus niger*) in einem elektrochemischen Biosensor realisiert. Dies ist vor allem in der hohen Substratspezifität und der Historie der Biosensorik begründet. Daher ist dieses Enzym von großer kommerzieller Bedeutung. Die Forschung der elektrochemischen Biosensorik fokussiert sich schon seit über einer Dekade auf die Integration von Nanomaterialien wie Kohlenstoffnanoröhren (Guisseppi-Elie *et al.*, 2002; Wang, 2005). In biohybriden Sensoren ist die Stabilität des biologischen Erkennungselements entscheidend für die Funktionalität. Sie ist jedoch limitiert durch das unphysiologische Milieu. Diese Einschränkung stellt einen Engpass für innovative Entwicklungen dar. Bioprotektiva, die in *H. elongata*-Zellen nachgewiesen werden konnten (Ectoin, Hydroxyectoin und Kalium-Glutamat), sind vielversprechende Kandidaten, um die biologische Komponente in einem Biosensor effektiv zu schützen. Als biomimetischer Ansatz wurde dies getestet und dazu *ad hoc* ein Biosensor basierend auf mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren (MWCNT) und immobilisierter Glucose-Oxidase konstruiert.

3.2 Auswirkung der MWCNT-Modifizierung

Die Basis aller Sensoren dieser Arbeit waren unmodifizierte Goldstabelektroden. Die MWCNT-Modifikation auf solchen Goldoberflächen kann durch das Aufwachsen der Kohlenstoffnanoröhren oder durch chemische Adsorption erfolgen, wenn die MWCNTs entsprechende funktionelle Gruppen (z. B. Thiolgruppen) tragen. In dieser Arbeit wurde sich für die einfache Variante der physikalischen Adsorption (durch Trocknung bei 37 °C) entschieden. Es wurde gezeigt, dass diese Methode in stabilen MWCNT-Schichten auf der Goldoberfläche resultiert. Die physikalische Haftung basiert primär auf Van-der-Waals-Kräfte und wird durch die große Oberfläche des MWCNT-Konstrukts begünstigt.

Die MWCNT-Modifizierung solcher Elektroden wurde zunächst ohne Enzym untersucht. Die MWCNTs funktionieren primär als Transducer, da sie aufgrund ihrer besonderen elektrischen Eigenschaften und aufgrund ihrer Skalierung die Elektrokommunikation zwischen Enzym und Elektrode effektiv vermitteln können.

Die elektrochemischen Prozesse, welche an der Elektrodenoberfläche stattfinden, wurden unter Verwendung redoxaktiven Kaliumhexacyanoferrats untersucht. Der quasi-reversible Umsatz konnte durch unmodifizierte und MWCNT-modifizierte Elektroden realisiert werden. Dabei erreichte die MWCNT-modifizierte Goldelektrode deutlich größere Ströme und daher auch einen schnelleren Umsatz der redoxaktiven Substanz. Die höhere Sensivität ist auf die Vergrößerung der sensorischen Oberfläche durch die MWCNTs zurückzuführen. Der Versuch bestätigte zudem die mechanische Stabilität der MWCNT-Modifizierung. Denn während vorangegangener Waschschriffe und während der voltametrischen Vermessung waren keine makroskopisch erkennbaren Ablösungen der MWCNT-Schicht zu beobachten. Die mechanische Stabilität der MWCNT-Schicht ist wahrscheinlich auf starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Kohlenstoffnanoröhren zurückzuführen.

3.3 Immobilisierung des Enzyms und Realisierung des direkten Elektronentransfers

Die Untersuchung der MWCNT-Modifizierung bestätigte, dass die hier verwendete Methode der physikalischen Adsorption geeignet war, um die MWCNT-Modifizierung auf der Goldelektrode zu erzeugen. Zur eigentlichen Erkennung des Analyten Glucose sollte das Redoxenzym Glucose-Oxidase als biologisches Erkennungselement in diese MWCNT-Schicht immobilisiert werden. Es ist zwar bereits berichtet worden, dass nicht-enzymatische MWCNT-Sensoren Glucose nachweisen können (Ye *et al.*, 2004). In solchen Fällen weisen die technischen Nanomaterialien selbst katalytische Aktivität auf und bewirken so die Oxidation der Glucose. Oft wird dies jedoch erst durch zusätzliche Bedingungen wie der Alignierung und Funktionalisierung der MWCNTs oder die Verwendung weiterer Nanopartikel möglich (Rong *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Jiang und Zhang, 2010). Die voltametrische Untersuchung der ausschließlich MWCNT-modifizierten Goldelektrode (dieser Arbeit) ergab, dass die MWCNT-Modifikation ohne Enzym in einem weiten Potentialbereich (-600 bis 600 mV) nicht die Glucoseoxidation und damit auch nicht den Nachweis des Analyten ermöglicht. Damit lässt sich festhalten, dass in späteren Elektroden mit immobilisierter Glucose-Oxidase, Stromänderungen nicht durch die katalytische Aktivität der MWCNTs, sondern eher durch die direkte Bioelektrokatalyse begründet werden können.

Die effektive Kommunikation zwischen dem Enzym und der Elektrode wird in modernen Biosensoren der dritten Generation durch den direkten Elektronentransfer ermöglicht. Die Wahrscheinlichkeit, dass Elektronen direkt zwischen dem elektroaktiven Zentrum, welches sich oft tief im Proteininneren befindet, und der Elektrode übertragen werden, hängt von vielen Faktoren ab. Die Distanz zwischen dem elektroaktiven Zentrum und der Elektrodenoberfläche hat jedoch den größten Einfluss (Marcus und Sutin, 1985; Marcus, 1993; Jose *et al.*, 2012).

Verschiedene Immobilisationsmethoden wurden getestet, um den direkten Elektronenfluss zwischen Enzym und Elektrode zu realisieren. Weder die schonende Variante der Adsorption noch die kovalente Kopplung des Enzyms konnten die elektrochemische Glucose-Detektion ermöglichen. Gründe lassen sich in einem zu großem Abstand zur Elektrode oder im chemischen Stress (durch die kovalente Kopplungsmethode bedingt) vermuten. Unter allen getesteten Immobilisationsverfahren resultierte nur das Einschussverfahren in der Realisierung eines biokatalytisch aktiven Sensors.

Diverse Vorteile dieser Immobilisationsvariante sind wahrscheinlich die Gründe dafür. Dazu gehört, dass die Ablösung der Enzyme durch Auswascheffekte vermindert wird, so dass größere Enzymmengen effektiv immobilisiert werden können. Weiterhin hat das Enzym durch den Einschluss nicht nur oberflächlich Kontakt zum Transducer-Material, da die MWCNTs den Biokatalysator räumlich vollständig umgeben. Daher wird durch diesen engen Kontakt zwischen Enzym und MWCNTs der Elektronentransfer wahrscheinlicher. Zudem ist diese Methode relativ schonend, da kein chemischer Stress für eine kovalente Kopplung auf das Enzym ausgewirkt wird. Ausschlaggebend war jedoch vor allem die hohe Reproduzierbarkeit des charakteristischen Messsignalverhaltens der Biosensoren, die unter Verwendung dieser Immobilisationsvariante hergestellt wurden.

Solche Biosensoren ließen im negativen Potentialbereich deutliche Peakströme erkennen. Sie sind der Redoxreaktion des enzymgebundenen FAD/FADH₂ zu zuordnen, was auf einen direkten Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode schließen lässt. Dies impliziert, dass die räumliche Nähe von MWCNTs und Enzym klein genug war, um einen Tunneleffekt durch die schützende Proteinhülle zu ermöglichen. Bei Anwesenheit von Glucose in der Messlösung modulierten sich die Peakströme. Daraus kann geschlossen werden, dass das Enzym auch nach der Immobilisierung katalytisch aktiv war. So konnten Elektronen aus der Glucose über das Enzym zur Elektrode fließen (Abb. 54). Dies bedeutet außerdem, dass das MWCNT-Gerüst weitmaschig genug war, um die Diffusion kleinerer Moleküle wie Glucose zu gewährleisten.

Die Erklärung zur Konzipierung und Funktion des Biosensors stellte bereits dar, wie sich die modulierten Peakströme in Gegenwart von Glucose ergaben (Kapitel VI3.1.4). Größere Änderungen im Reduktionspeakstrom waren durch die Konkurrenz zwischen Substrat und Elektrode um die FAD-Reduktion erklärbar. Die FAD-Reduktion konnte sowohl beim Erreichen eines passenden Potentials durch die Elektrode als auch potentialunabhängig durch die enzymatisch katalysierte Glucoseoxidation erfolgen. In letzterem Fall wurde FAD zu FADH₂ reduziert und konnte so nicht mehr durch die Elektrode reduziert werden. Wie in Abb. 54 noch einmal zu sehen, konnte Glucose sich im Gegensatz zum Elektrodenmaterial frei bewegen.

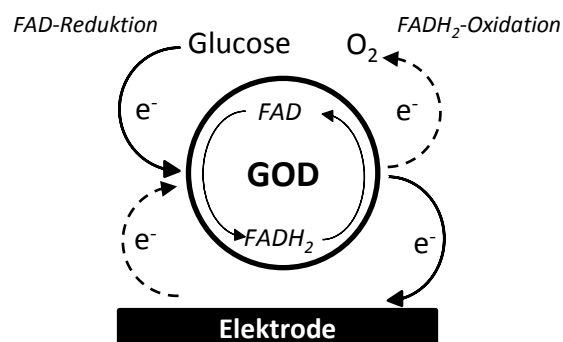


Abb. 54: Prinzip der Redoxprozesse im Biosensor

Die durchgezogenen und gestrichelten Pfeillinien zeigen, dass sowohl der Oxidations- also auch der Reduktionsprozess des FADH₂ bzw. FAD auf zwei alternative Weisen möglich ist. Durchgezogene Pfeillinien markieren den Elektronenfluss vom Substrat bis zur Elektrode, welcher entscheidend von der Effektivität der Elektrokommunikation zwischen Enzym und Elektrode abhängt.

Weiterhin ist Glucose das natürliche Substrat der Glucose-Oxidase und hatte somit einfacheren Zugang zum elektroaktiven Zentrum des Enzyms. Daher fällt die elektrodische Reduktion in Anwesenheit von Glucose geringer aus. Dies resultiert in der betragsmäßigen Verringerung des Reduktionspeakstroms (I_p^{red}) in Anwesenheit von Glucose. Somit wird die Änderung im Reduktionspeakstrom primär durch die bevorzugt ablaufende FAD-Reduktion via Glucose realisiert.

Die kleineren Oxidationsstromänderungen können auf einen zu hohen Abstand vom elektroaktiven Zentrum zur Elektrode begründet sein. Permanente Konformationsänderungen des Enzyms bei Kontakt mit der unphysiologischen und hydrophoben Oberfläche können weitere Gründe für den geminderten Elektronentransfer bei der elektrodischen FADH₂-Oxidation sein (Zhao *et al.*, 2010). Biosensoren der dritten Generation basieren jedoch auf dem direkten Elektronenfluss vom Analyt bis zur Elektrode. Daher ist der Oxidationsstrom für die Beurteilung der Elektrokommunikation im Bio-Nanokomposit relevanter. Die Höhe des Oxidationsstroms charakterisiert damit eher die Effektivität des Elektronentransfers vom Substrat bis zur Elektrode.

Es ist zu beachten, dass für jede biosensorische Messung innerhalb dieser Arbeit jeweils ein einzelner Biosensor hergestellt und dessen Signalantwort in Gegenwart von Glucose untersucht wurde. Somit ist jeder Biosensor eine Einzelanfertigung. Dies führt dazu, dass Peakpotentiale im Vergleich verschiedenen Biosensoren um +/-10 bis 20 mV variieren können. Hauptursache dafür sind wahrscheinlich Unterschiede in der Nano-Struktur des Biosensors. Dies betrifft sowohl Abstände als auch Schichtdicken. Im nanoskalierten Maßstab ließ sich die Struktur durch die angewandten Methoden jedoch nicht definiert kontrollieren.

In Anwesenheit von Glucose verschieben sich Oxidations- und Reduktionspeak um etwa 20 mV zu größeren Potentialen. In Abwesenheit vom Substrat liegt das Enzym in seiner natürlichen Konformation vor. Das Enzym hat eine fixe räumliche Verteilung, die sich in An- und Abwesenheit von Glucose unterscheidet. Sofern Glucose in der Lösung ist kommt es stets zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Aus dieser Substratbindung folgt eine Konformationsänderung des Enzyms. Dadurch ändern sich die Abstände zwischen elektroaktivem Zentrum und Elektrode (im Vergleich zum Zustand bei Abwesenheit von Glucose). Diese kleinen Abstandsänderungen sind ausreichend, um zu bewirken, dass ein höheres Potential für die Übertragung der Elektronen erreicht werden muss. Dies verursacht daher vermutlich verschobene Oxidations- und Reduktionspeakpotentiale (Marcus und Sutin, 1985; Marcus, 1993).

3.4 Optimierung der Biosensors und Integration der Ectoine

Neben der Realisierung des Elektronentransfers ist die Stabilität der biologischen Komponente eine entscheidende Herausforderung bei der Konstruktion von Biosensoren. GOD-enthaltende Biosensoren werden meist bei 4 °C gelagert, da solche Biosensoren nur limitierte Halbwertszeiten (mehrere Tage) aufweisen (Wu *et al.*, 2009; Wang *et al.* 2012). Das unphysiologische Milieu und der enge Kontakt zu einer stark hydrophoben Oberfläche können Ursachen für die geminderte Stabilität von MWCNT-basierten Biosensoren sein. Daher erscheint die Integration von bioprotektiven Substanzen in einem Biosensor vielversprechend. Xeroprotektive Verbindungen könnten zusätzlich die Trockenstabilisierung des Biosensors ermöglichen. Damit bietet sich die Möglichkeit der Inaktivierung des biologischen Erkennungselements effektiv zu entgegenzuwirken.

Bei Verwendung eines geeigneten Xeroprotektivums könnten Biosensoren auch in Umgebungen höherer Temperatur exponiert werden und gleichzeitig stabil bleiben. Die Trockenlagerung wäre in diesem Fall enorm kosteneffizient. Publikationen über die Realisierung der direkten Bioelektrokatalyse zwischen der Glucose-Oxidase und MWCNTs sind zwar zahlreich. Jedoch steht meist die Effektivität des Elektronentransfers im Vordergrund. Die langfristige Stabilität wird eher selten betrachtet. Und meist werden die Biosensoren bei 4 °C in wässriger Lösung und nicht trocken gelagert.

Über die stabilisierende Wirkung von Hydroxyectoin in verschiedenen Arten von elektrochemischen Biosensoren existieren bereits einige wenige Berichte (Meier, 2002; Loose und Setford, 2006). Jedoch beinhaltet noch keiner dieser Sensoren Kohlenstoffnanoröhren. Diese Nanopartikel bieten eine passende Oberfläche zur Adsorption von organischen und heteroaromatischen Verbindungen (Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Dieser Effekt wird durch Van-der-Waals sowie durch π - π -Interaktion verursacht. Ectoine werden durch einen Mechanismus in Bakterienzellen akkumuliert der ebenfalls von der starken Wechselwirkung dieser Solute mit aromatischen Systemen profitiert (Hanekop *et al.*, 2007). Daher erschien es vielversprechend diese kompatiblen Solute durch Adsorption in die MWCNT-Schicht eines elektrochemischen Biosensors zu integrieren. Die Adsorptionseffekte der Ectoine an MWCNTs in Lösung konnten innerhalb dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da die adsorbierte Menge der Ectoine an MWCNTs so gering war, dass sie mit der verwendete HPLC-Methode nicht präzise bestimmt werden konnte. Die Adsorption im trockenen Zustand lässt sich dadurch nicht ausschließen, bleibt jedoch hypothetisch.

Unter Integration der beiden genannten kompatiblen Solute wurde geprüft, ob der Biosensor seine Aktivität beibehält und ob er sich weiter optimieren lässt. Erste Biosensoren dieser Arbeit basierten auf der Verwendung von MWCNT-Ethanol-Suspensionen. Biokatalytisch aktive Sensoren konnten auf diese Weise sowohl durch Einschluss der GOD als auch durch die Kombination von Einschluss und kovalenter Kopplung hergestellt werden. Mit beiden Varianten konnte gezeigt werden, dass der direkte Elektronentransfer in Anwesenheit von Glucose zu beobachtet ist. Auffällig war eine gewisse Variation der voltammetrischen Signalstärke beim Vergleich verschiedener Biosensoren. Dies war darin begründet, dass jeder Biosensor eine Einzelanfertigung war und konnte daher nicht den Einflüssen der kompatiblen Solute zugeschrieben werden. Menge und Verteilung von MWCNTs ließen sich mit den verwendeten Methoden dieser Arbeit im nanoskalierten Bereich nur limitiert kontrollieren. Gleiches galt somit auch für die GOD-Verteilung innerhalb des MWCNT-Netzwerks. Dies führte zur Variation in der sensorisch sensitiven Oberfläche und der Stärke der Signalantwort. Obwohl die kovalente Kopplung das Enzym dauerhaft an die MWCNTs koppelte, waren die Peakstromsignale deutlich kleiner. Es ist zu vermuten, dass das Enzym durch die chemische Behandlung an Aktivität verlor. Daher wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Aufgrund der leichteren Suspensionsfähigkeit wurde anfangs Ethanol als MWCNT-Suspensionsmittel verwendet. Die beiden Solute Ectoin und Hydroxyectoin waren allerdings nur minimal in organischen Lösungsmitteln löslich. Weiterhin besitzt Ethanol Protein denaturierende Eigenschaften, die zu späteren Folgeschäden führen konnten. Aus diesen beiden Gründen wurde geprüft, ob sich Biosensoren auch unter Verwendung einer MWCNT-PBS-Suspension herstellen lassen. Mit dieser schonenden Variante konnten ebenfalls Biosensoren reproduzierbar gefertigt werden. Bei gleicher Glucosekonzentration in der Messlösung war die Peakstromänderung unter Verwendung der MWCNT-Ethanol-Suspension jedoch etwas größer.

Sehr wahrscheinlich war dies auf eine suboptimale Verteilung der MWCNTs zurückzuführen. Denn im wässrigen Milieu tendieren MWCNTs stärker zum Agglomerieren. In Ethanol verteilen sich MWCNTs hingegen wesentlich feiner, wodurch eine bessere Verteilung des MWCNT-Netzwerks erreicht werden konnte. Dies ermöglichte einen verminderten Abstand zwischen MWCNT und Protein und begünstigte den Elektronentransfer.

Dennoch bot die Verwendung der MWCNT-PBS-Suspension verschiedene Vorteile. Auch wenn Biosensoren, welche durch MWCNT-Ethanol-Suspension hergestellt wurden, aktiv waren, konnte eine destabilisierende Wirkung durch Ethanol während der Präparation nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere für die langfristige Trockenlagerung wären destabilisierende Nachwirkungen durch Ethanol von Nachteil. Weiterhin konnten unter Verwendung des wässrigen Suspensionsmittels kompatible Solute vollständig in der MWCNT-Suspension gelöst werden. Es waren keine signifikante Unterschiede zwischen unmodifizierten, Ectoin-modifizierten oder Hydroxyectoin-modifizierten Biosensoren im Signalverhalten zu erkennen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Anwesenheit der kompatiblen Solute zum einen keine Diffusionsbarriere für das Enzymsubstrat darstellt. Und ferner ermöglicht ihre Anwesenheit im Bio-Nanokomposit weiterhin den direkten Elektronentransfer vom Enzym zur Elektrode. Zusammengefasst scheinen Ectoin und Hydroxyectoin hier keine hemmende Wirkung auf die Sensoraktivität zu haben. Daher können sie ohne weiteres in solchen Biosensoren appliziert werden. Ergänzend ist zu erwähnen, dass fortführende Arbeiten die Applikation der Solute in der Enzymlösung (unter Variation der Konzentration) prüfen sollten, um die möglichen Auswirkungen auf das Stabilitätsverhalten und den Elektronentransfer zu untersuchen.

3.5 Charakterisierung des Biosensors

Es wurde gezeigt, dass die Ectoine in den Biosensor integriert werden können. Anschließend wurde der unmodifizierte und auf MWCNT-PBS-Suspension basierende Biosensor detaillierter charakterisiert. Der Sensor wurde unter anaeroben Bedingungen vermessen, das amperometrische Signalverhalten wurde untersucht und die Elektronentransferkinetik betrachtet. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Charakterisierungen für Ectoin-modifizierte Biosensoren nicht mehr durchgeführt werden. Unter anaeroben Bedingungen zeigte sich das die Abnahme des Oxidationspeakstroms nur in geringem Ausmaß beobachtet werden konnte, so dass sich nur ein geringer Oxidationspeak ausbildete und die Stromänderung in Anwesenheit von Glucose bis zum Umkehrpotential (-100 mV) zu erhöhten Strömen moduliert blieb. Dies impliziert, dass der Oxidationsstrom nicht mehr durch den Verlust von Elektronen an Sauerstoff beeinflusst war, woraus ein permanenter Elektronenfluss von der Substratquelle bis zur Elektrode ermöglicht wurde. Da sich die Peakverhältnisse unter anaeroben Bedingungen nicht änderten und die Höhe der Oxidationspeakströme nicht wesentlich zunahm, kann die Auswertung voltammetrischen Messungen in aerobem Milieu über die Oxidationspeakstromhöhen erfolgen. Hierbei scheint der Verlust von Elektronen an Sauerstoff sich noch nicht auszuwirken. Einschränkend muss ergänzt werden, dass dieses Signalverhalten unter anaeroben Bedingungen teils publizierten voltammetrischen Untersuchungen auf MWCNT-immobilisierter Glucose-Oxidase widerspricht (Deng *et al.* 2009; Wu *et al.* 2009). Allerdings kann dies bereits auf Unterschiede im Immobilisierungsverfahren zurückgeführt werden. In den zitierten Studien wurde bspw. zusätzlich Cellulose bzw. Nafion für die Immobilisierung des Enzyms verwendet.

Die amperometrische Untersuchung basierte auf der Messung des Sauerstoffreduktionsstroms an der Elektrode, welcher in Konkurrenz mit dem Sauerstoffverbrauch der GOD stand. Die sukzessive Zugabe von Glucose resultierte daher in einem Stromanstieg. Im Anstiegsverhalten war ein Sättigungseffekt erkennbar, wobei die Sättigung bei etwa 1 mM Glucose erreicht war. Aus dieser Substratabhängigkeit des amperometrischen Stromsignals kann geschlossen werden, dass der Elektronenfluss biokatalytisch gesteuert war. Unabhängig von der Signalintensität ähnelt das Stromsignal dem von Glucose-Oxidase, die in einem MWCNT-Cellulose-Komposit immobilisiert ist (Wu *et al.*, 2009).

Als letztes wurde die Elektronentransferkinetik des Biosensors charakterisiert. Wie bereits erwähnt, hängt die Wahrscheinlichkeit des direkten Elektronentransferprozesses entscheidend vom Abstand des elektroaktiven Zentrums zur Elektrode ab. Häufig ist dieser bereits durch die umgebende Peptidstruktur so groß, dass ein Tunneln der Elektronen aus dem Enzym kaum noch möglich ist. Mit dem hier konstruierten Biosensor wurde der direkte Elektronentransfer jedoch reproduzierbar beobachtet. Die Elektronentransferkinetik hängt jedoch von einigen weiteren Unterschieden ab und wird daher auch durch das räumliche Milieu bestimmt. Um die sogenannte heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante des *ad hoc* konstruierten Biosensors zu bestimmen wurde die Methode nach Laviron verwendet (Laviron, 1979). Durch die Anwendung dieses Verfahrens zeigte sich, dass Oxidations- und Reduktionspeakströme linear abhängig gegenüber der Scanrate verhielten (Kapitel VI.3.3, Abb. 48).

Dies ließ auf oberflächenkontrollierte und quasi-reversible Redoxprozesse schließen (Bard und Faulkner, 2001). Demnach geht weder oxidiertes noch reduziertes Enzym in die Lösung verloren. Die Elektronentransferrate wurde für den Biosensor in dieser Arbeit mit $3,23 \pm 0,25 \text{ s}^{-1}$ berechnet. Im Vergleich zu ähnlichen Biosensoren ist der Elektronentransfer als relativ schnell einzuordnen und charakterisiert den Elektronentransfer dieses Biosensors als effizient (siehe Tab. 3). Folglich war es sinnvoll einen solchen Biosensor zusätzlich durch die Anwendung von Xeroprotektiva langfristig und trockenstabil lagern zu können.

Tab. 3: Heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstanten von GOD-CNT-basierten Biosensoren.

$k_s [\text{s}^{-1}]$	Enzym	CNT-Typ	Kopplung	Referenz
9	GOD	alignierte SWCNT	Rekonstitution an FAD	Liu <i>et al.</i> , 2005
4,6	GOD	N-dotierte MWCNT	Adsorption bei 4 °C	Deng <i>et al.</i> , 2009
3,23	GOD	MWCNT	Einschluss	diese Arbeit
3,3	GOD	ionisch funktionalisierte SWCNT	Adsorption bei 4 °C	Zhang <i>et al.</i> , 2007
2,9	GOD	MWCNT	Einschluss	Gutierrez <i>et al.</i> , 2012
1,96	GOD	N-dotierte MWCNT	Adsorption bei 4 °C	Jia <i>et al.</i> , 2005
1,7	GOD	SWCNT	Adsorption bei 4 °C	Guisseppi-Elie <i>et al.</i> , 2002
1,56	GOD	B-dotiert CNT	Adsorption bei 4 °C	Deng <i>et al.</i> , 2008
1,45	GOD	MWCNT	Einschluss	Cai, 2004
0,3	GOD	alignierte SWCNT	kovalente Kopplung	Liu <i>et al.</i> , 2005

3.6 Biomimetische Trockenstabilisierung

Als bionischer Ansatz dieser Arbeit wurde geprüft, ob sich das natürliche Prinzip der Biostabilisierung durch glasbildende Verbindungen auf ein technisches System wie den hier vorgestellten Biosensor übertragen lässt. Dazu wurden Biosensoren mit unmodifizierten, Ectoin-, Hydroxyectoin- sowie Hydroxyectoin-Glutamat-modifizierten MWCNTs hergestellt und unter prolongierter Trocknung (bei 37 °C) von 0 (ohne weitere Trocknung), 12 und 18 h untersucht. Die dünnen MWCNT-Schichten der Biosensoren wurden visuell als trocken klassifiziert. Temperaturen über 37 °C wurden für die Präparation der Biosensoren nicht verwendet, um die thermale Denaturierung der Glucose-Oxidase (vor allem während der Entwicklung des Biosensors) auszuschließen (Gouda *et al.*, 2003). Zudem ist die Stabilität des Enzyms bei 37 °C potentiell für die *In-Vivo*-Applikation von Biosensoren (z. B. im Menschen) interessant. Der Einfluss von mehrtägiger Trocknung dieser Biosensoren war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Sehr auffällig war der Signaleinbruch nach zwölfstündiger Trocknung, der bei allen Biosensor-Modifikationen zu beobachten war. Die Gründe dafür lassen sich nur vermuten. So könnte die Veränderung der Porosität des MWCNT-Netzwerks nach den ersten 12 h Trocknung bspw. zu vergrößerten Abständen zwischen Enzym und Elektrode geführt haben und so den Elektronentransfer reduzieren. Zunehmender Wasserentzug bei weiterer Trocknung (18 h) verstärkt die Interaktion der MWCNTs untereinander, führt zu Spannungen im Komposit und kann so letztlich wieder in einem kompakteren Einschluss des Enzyms und verringerten Abständen zum leitfähigen Material resultieren. Dies ist eine wahrscheinliche Erklärung für den erneuten Anstieg der Stromsignale.

Evaluiert wurden die Biosensoren über den Vergleich der Oxidationspeakstromänderungen, da hierbei der Elektronenfluss vom Substrat (Glucose) bis zum finalen Elektronenakzeptor (der Elektrode) fortgesetzt wurde. Daher charakterisiert der Oxidationsstrom die Effektivität der Elektrokommunikation im Bio-Nanokomposit repräsentativer als der Reduktionsstrom. Die Ergebnisse deuteten darauf, dass sich Hydroxyectoin positiv auf die Änderungen des Oxidationspeakstroms auswirkt. Wohingegen unmodifizierte und Ectoin-modifizierte Biosensoren die geringsten Peakstromänderungen aufwiesen. Signifikante Unterschiede, wie sie durch die *In-Vitro*-Stabilisierung der LDH bei 60 °C beobachtet wurden (deutliche Destabilisierung in Gegenwart von Ectoin), konnten durch die Applikation der Ectoine in Biosensoren nicht beobachtet werden. Dies könnte durch die geringere Trocknungstemperatur (37 °C) erklärt werden, die unter den Glasübergangstemperaturen von Ectoin und Hydroxyectoin lag. Fortführende Studien sollten das Stabilitätsverhalten von Ectoin-modifizierten Biosensoren überprüfen, die durch Trocknung bei höheren Temperaturen (wie 60 °C) hergestellt wurden.

Höhere Oxidationspeakströme unter Verwendung von Kalium-Glutamat konnten nicht auf eine erhöhte Kaliumkonzentration nahe der Elektrode zurückgeführt werden, da diese im Vergleich zur Ionenstärke des Messpuffers vernachlässigbar war. Chemisch betrachtet, war die Hydroxylierung vermutlich die Ursache für die bessere Stabilität des Biosensors. Man vermutete auch für MWCNT-Cellulose-modifizierte Biosensoren, dass die OH-Gruppen der Cellulosemoleküle im Biosensor stabilisierend wirken (Wu *et al.*, 2009).

Es ist allerdings genauso plausibel, dass Hydroxyectoin ähnlich einem Lösungsmittel-Vermittler einen Einfluss auf die MWCNT-Verteilung selbst hat. Auf diese Weise könnte die veränderte Verteilung des MWCNT-Netzwerks selbst eine mechanische Stabilisierung des Enzyms bewirken oder einen effektiveren Elektronentransfer ermöglichen. Die elektronenmikroskopische Betrachtung des Bio-Nanokomposits war nur oberflächlich möglich und ließ keine Hinweise auf die veränderte Verteilung der MWCNTs unter Verwendung von Hydroxyectoin finden. Sowohl eine Steigerung der Stabilität als auch eine Verbesserung des Elektronentransfers wären vorteilhaft für die Konstruktion eines elektrochemischen Biosensors.

3.7 Fazit zur Biosensorik

Für diese Arbeit wurde erfolgreich ein Biosensor auf Basis von MWCNTs und immobilisierter Glucose-Oxidase *ad hoc* konstruiert. Der Biosensor arbeitete mediatorfrei und ermöglichte den direkten Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode. Er war daher ein Biosensor der dritten Generation. Weiterhin wurde der Biosensor optimiert, so dass auf die Verwendung des organischen Lösungsmittels Ethanol verzichtet werden konnte und so kompatible Solute vollständig in MWCNT-Suspensionen gelöst werden konnten. Durch die Betrachtung der Elektronentransferkinetik ist der Biosensor eher als Sensor mit schnellem Elektronentransfer einzuordnen. Der Einfluss kompatibler Solute (Ectoin, Hydroxyectoin und Glutamat), die in das biosensorische System integriert wurden, wurde überprüft. Biosensoren, die mit Hydroxyectoin modifiziert waren, tendierten zu einem verbesserten Signalverhalten im Vergleich zu unmodifizierten oder Ectoin-modifizierten Biosensoren. Dabei blieb die Frage offen, ob dies durch biostabilisierende Effekte oder einen positiven Einfluss auf die technischen MWCNTs und den Elektronentransfer verursacht wurde. Ein biostabilisierender Effekt könnte sowohl chemisch durch die Hydroxylgruppen des Hydroxyectoins als auch mechanisch durch eine günstige Verteilung der MWCNTs begünstigt sein. Eine hydroxyectoinbedingte Verfeinerung des MWCNT-Netzwerks kann zudem für einen effizienteren Elektronentransfer verantwortlich sein. Die gesteigerte Stabilität der biologischen Komponente und der effektivere Elektronentransfer wären gleichermaßen vorteilhaft für die Konstruktion von elektrochemischen Biosensoren.

VIII Ausblick

Als bionisch angelegte Arbeit tangiert diese einen weiten und vor allem interdisziplinären Themenbereich. Daher sind die Optionen für fortsetzende Forschungsansätze vielfältig. In allen drei Bereichen (Biologie, applizierte Vitrifikation und Biosensorik) ergaben sich interessante Anregungen zur wissenschaftlichen Fortsetzung des Themas dieser Arbeit.

Biologie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das halophile Bakterium *H. elongata* auf seine Fähigkeit zur Vitrifikation untersucht. Das Spektrum von Biostabilisatoren (wie kompatiblen Soluten) ist jedoch sehr breit. Daher erscheint es empfehlenswert weitere extremophile Organismen auf xeroprotektive Anpassungsmechanismen zu untersuchen. Beispielsweise war es innerhalb dieser Arbeit nicht möglich den Modellorganismus in Hinblick auf den Einfluss von Polyhydroxyalkanoaten zu untersuchen. Auch die Lipidkomposition sollte in Bezug auf die Trockentoleranz analysiert werden. Hier lassen sich ebenfalls anhydrobiotische Adaptationen vermuten.

Weiterhin wäre die molekularbiologische Untersuchung des putativen und uncharakterisierten Proteins E1V347 aus *H. elongata* interessant, dass innerhalb dieser Arbeit als potentielles Hydrophilin klassifiziert wurde. Dies könnte beispielsweise durch die heterologe Expression des entsprechenden Gens in *E. coli* umgesetzt werden. Anschließend könnten Experimente bezüglich der Osmo- und Thermotoleranz Hinweise auf das bioprotektive Potential dieses Proteins liefern. Im Rahmen eines solchen Projekts wäre es zudem relevant, die verstärkte Proteinexpression eines kleinen Proteins zu untersuchen und das Protein zu identifizieren, welches im Rahmen dieser Arbeit in *H. elongata* bei niedriger Salinität jedoch hoher Temperatur (in MM63-3 % und Temperaturschock von 30 °C auf 50°C) auffällig war.

Die temperaturdynamische Fermentation mit einer Knockout-Mutante von *H. elongata*, die keine Hydroxyectoin synthetisieren kann, könnte die besondere Rolle des Hydroxyectoins bei der Adaptation an abiotischen Stress (wie Hypersalinität und Hitze) präziser hervorheben. In diesem Kontext könnten weitere kompatible Solute supplementiert und auf ihre bioprotektive Wirkung unter temperaturdynamischen und hypersalinen Bedingungen überprüft werden.

Applizierte Vitrifikation

Aus den Erkenntnissen der applizierten Vitrifikation ergab sich die größte Vielfalt an Forschungsansätzen. In diesem Zusammenhang sollen wesentliche Informationen zunächst hervorgehoben werden. Diese Arbeit lieferte initiale Forschungsansätze zur applizierten Vitrifikation mit Hydroxyectoin. Daher wurden xeroprotektive Effekte nur über relative kurze Zeiträume untersucht. Vom ökonomischen Standpunkt gesehen ist vor allem die langfristige Trockenstabilisierung (Tage, Wochen, Monate) relevant. Daher sollte eine hier ansetzende Projektplanung sich intensiv mit den verfügbaren und erforderlichen Zeitkapazitäten sowie der Menge des nötigen Probenmaterials befassen. Die wichtigsten äußeren Parameter (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Luftzirkulation und Art des Probenträgers) sollten präzise kontrolliert werden, um wertvolle Erkenntnisse über die Effektivität der applizierten Vitrifikation gewinnen.

Zur Untersuchung der applizierten Vitrifikation wären *in vivo*-Studien zur Trockentoleranz von *E. coli* K12 sinnvoll. Dazu wäre vorab saliner Stress nötig, um das intrazelluläre Trehaloselevel zu erhöhen.

Es lässt sich nicht ausschließen, dass in dehydrierungs- und hitzestressen *H. elongata*-Zellen neben Hydroxyectoin nicht auch andere Adaptationsmechanismen induziert werden, die ebenfalls zur Trockentoleranzsteigerung beitragen können. Daher sollten Modellsysteme wie trehalosedefiziente *E. coli*-Stämme unter Supplementierung alternativer kompatibler Solute (darunter die Ectoine) kultiviert werden. Gleichermaßen kann die heterologe Expression potentieller Hydrophiline durch solche *E. coli*-Mutanten geprüft werden. Die anschließende Anwendung von harschen Trocknungsbedingungen (analog dem Protokoll dieser Arbeit) würde wertvolle Informationen zur xeroprotektiven Wirkung der kompatiblen Solute und potentieller Hydrophiline liefern. Ferner kann auf diese Weise geprüft werden, inwiefern die alleinige Anwesenheit von Hydroxyectoin die Trockenstabilisierung ermöglicht. Im Rahmen solcher *in vivo*-Studien wäre ein detailliertes Stabilisationsprofil durch feiner abgestufte Hydroxyectoinlevel in einem Modellsystem sehr aufschlussreich. Für solche Untersuchungen könnten Mutanten von *H. elongata* verwendet werden, die hydroxyectoindefizient sind und solche, die in der Lage sind sehr hohe intrazelluläre Mengen an Hydroxyectoin zu akkumulieren.

Die Untersuchung organischer Solutmatrizes und deren Verwendung als bioprotektive Umhüllung von trockensensitiven Enzymen führten zu zahlreichen Ideen für weitere Forschungsansätze. In erster Linie wären weitere *In-vitro*-Studien zur Erzeugung solcher Matrizes durch potentiell bioprotektive Komponenten interessant. Dazu zählen in erster Linie weitere kompatible Solute (z. B. Prolin und Hydroxyprolin), polyionische Verbindungen (Polyglutamat, Polylysin) sowie potentielle Hydrophiline aus *H. elongata* und weitere Hydrophilin-Analoga (charakterisiert durch hohen Gehalt an Glycin, Alanin und sauren bzw. polaren Aminosäuren). Wichtig wäre es zudem den Restwassergehalt im Verlauf der Vitrifikation zu untersuchen, da ein gewisses Level von Restwasser in organischen Gläsern entscheidend für die biostabilisierende Wirkung sein kann. Beachtet werden sollten ebenso Kombinationen aus den genannten Komponenten, wie sie auch in einigen Mikroorganismen nachweisbar sind (z. B. Saccharose und Prolin in Mikroalgen sowie Trehalose und Saccharose in Cyanobakterien). Ferner sollten Kompositionen aus Hydroxyectoin, Ectoin, Glutamat und Betain in Bezug auf ihre bioprotektive Wirkung im Trockenzustand detailliert untersucht und optimiert werden

Eine detaillierte Analyse von Vitrifikations-, Kristallisations-, *Cracking*-Tendenzen sowie die räumliche Verteilung eingeschlossener Komponenten könnte durch Phasenkontrastmikroskopie oder durch den Einschluss fluoreszierender Verbindungen (kleine Fluorophore, *green fluorescent protein*) erfolgen. Weiterhin sollten die Hygroskopie sowie Schmelz- bzw. Glasübergangstemperaturen von Solutmatrizes betrachtet werden. Für die Untersuchung der bioprotektiven Wirkung bei Einschluss sind die Modellenzyme Lactatdehydrogenase und Citrat-Synthase empfehlenswert. Diese Enzyme könnten unter Anwendung alternativer kompatibler Solute auch in Lösung auf thermalbedingtes Aggregationsverhalten untersucht werden.

Durch die aktuelle Postulierung sogenannter NADES, wäre außerdem die Erzeugung dieser flüssigen jedoch fast wasser- und lipidfreien Medien auf Basis der Ectoine interessant. Dieses Forschungsfeld liegt zwar außerhalb der applizierten Vitrifikation, jedoch werden tiefeutektische Schmelzen natürlichen Ursprungs für zahlreiche Anwendungen vorteilhaft.

Biomimetische Anwendung

Die biomimetische Anwendung fokussierte sich in dieser Arbeit auf elektrochemische und MWCNT-basierte Biosensoren. Die Ansätze dazu lagen in der vorangegangenen Masterarbeit und der Tatsache, dass die Akkumulation der Ectoine in vielen Bakterien auf der Wechselwirkung mit aromatischen Systemen basiert. Die Ectoine wurden auf ihre xeroprotektive Wirkung im Biosensor untersucht, da die Stabilität ein wichtiges Kriterium für Biosensoren darstellt, wodurch sich eine gewisse ökonomische Relevanz ergibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stabilität des Biosensors nur nach mehrstündiger Trocknung bei 37 °C betrachtet. Für eine detaillierte Charakterisierung des Biosensors und der in ihm applizierten Solute würde die Stabilitätsprüfung über mehrere Tage weitere wertvolle Erkenntnisse liefern. Ferner ist naheliegend auch höhere Solutkonzentrationen und Trocknungstemperaturen während der Biosensorherstellung zu applizieren. Dadurch könnten die Auswirkungen der Ectoine auf die Aktivität des bioelektronischen Bauelements genauer geprüft werden. Weiterhin ist die Glycosilierung der Glucose-Oxidase (*Aspergillus niger*, Typ VII) zwar für deren Stabilität relevant. Sie erschwert jedoch zusätzlich den Elektronentransfer im Biosensor. Interessant wäre, ob sich diese Glucose-Oxidase (bspw. durch *E. coli*) heterolog ohne Glycosilierung exprimieren und aufreinigen lässt. Sollte eine solche Glucose-Oxidase im Biosensor aktiv, jedoch aufgrund der fehlenden Glycosilierung instabil sein, wäre die Anwendung von Glasbildnern eine vielversprechende Option das Enzym zu stabilisieren.

Ferner sind auch Ansätze zur Stabilisierung von Biopharmazeutika (wie bspw. Impfstoff) attraktiv, um eine biomimetische Anwendung der Trockenstabilisierung durch Glasbildner zu demonstrieren. Ein einfaches System wäre die Trockenstabilisierung von Antikörpern. Diese könnten nach der Trocknung spektroskopisch (mittels ELISA) auf den Erhalt ihrer bioaffinen Bindung geprüft werden. Auch eine intensivere Erforschung der Trockenstabilisierung von Liposomen wäre profitabel. Denn diese dienen in der Pharmaindustrie zur Formulierung von Arzneistoffen. Entsprechend bedeutsam wäre eine kosteneffiziente Lagerung. Nachdem solche Liposomen mit und ohne Xeroprotektiva getrocknet wären, könnten sie durch verschiedene Verfahren auf ihre Permeabilität geprüft werden. Stets müsste dazu eine entsprechende Komponente noch vor der Trocknung in die Liposomen eingeschlossen werden. Die Verwendung fluoreszierender Verbindungen wäre eine einfache Methode, um die Liposomen nach der Trocknung auf ihre Permeabilität zu prüfen. Ferner können ökonomisch relevante Makromoleküle wie Enzyme und Nukleinsäuren in die Liposomen eingeschlossen werden. Nachweisverfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität bzw. Methoden auf Basis der Polymerasekettenreaktion können dann auf getrocknete und anschließend rehydrierte Liposomen angewendet werden, um die Stabilität der Liposomen zu überprüfen.

Eine weitere biomimetische und vor allem verfahrenstechnische Herausforderung resultiert aus der genaueren Betrachtung von Lebewesen in der Anhydrobiose. Sie haben oft nicht nur die Vitrifikation des Zellinneren gemeinsam. Meist sind die verglasten Biostrukturen durch mehrschichtige und begrenzt wasserdurchlässige Systeme umgeben. Einfache Beispiele dafür sind Pflanzensamen, Bärtierchen im Tönchenstadium, Pollen und Endosporen. Intensivierte bionische Orientierung erfordert daher die Prüfung geeigneter *Coatings* (bspw. durch Kunststoffe oder Biopolymere). Diese können das innere Glas vor weiterer Austrocknung, Strahlung, ungewolltem Eindringen von Feuchtigkeit und biologischem Abbau schützen. Weiterhin kann ein geeignetes *Coating* die Freigabe der Inhaltsstoffe kontrollieren. Dies ist sowohl für die pharmakologische als auch für die agrarwirtschaftliche Anwendung relevant.

IX Zusammenfassung

Im Sinne der bionischen Forschung setzt sich diese Arbeit mit dem Prinzip der natürlichen Trockenstabilisierung durch alternative Vitrifikationssysteme auseinander. Die Vitrifikation ist hierbei durch die temporäre Ausbildung organischer Gläser (bspw. Zuckergläser) zur Stabilisierung biologischer Systeme im trockenen Zustand definiert. Das Resultat ist in eine Art Dormanzzustand (motorische und metabolische Inaktivität). Diese Form der Glasbildung zeichnet sich ferner durch Reversibilität bei Rehydrierung und den Erhalt der Bioaktivität der verglasten Komponenten aus.

Die Applikation vitrifizierender Substanzen wurde hinsichtlich der biotechnologischen Trockenstabilisierung (*anhydrobiotic engineering*) als auch im Rahmen der Nanobiotechnologie (Biosensorik) realisiert. Dadurch liefern die Erkenntnisse dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur kosteneffizienten Lagerung von trocknungsempfindlichen Biosystemen sowie biologischen Wirkstoffen und Erkennungselementen. Daraus eröffnen sich vielversprechende Perspektiven für die Pharmazie, Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie.

Die Basis dieser Arbeit sind biologische Studien zum moderat halophilen Modellorganismus *Halomonas elongata*, der hier als nano-strukturiertes Biosystem mit anhydrobiotischem Vitrifikationspotential betrachtet wird. Die biotechnologische Relevanz dieses Bakteriums impliziert hierbei den bioverfahrenstechnischen Vorteil für industrielle Prozesse.

Als extremophiles Bakterium überlebt *H. elongata* eher Bedingungen wie hohe Temperaturen und geringe Wasseraktivitäten (Anzeichen bevorstehender Austrocknung) als andere Organismen. Entscheidend für die Überlebensfähigkeit ist offenbar der intern auftretende Glasbildner Hydroxyectoin. Die simultane Akkumulation von Hydroxyectoin und Kalium-Glutamat im Zellinneren deutet ferner darauf hin, dass vitrifizierende Mehrkomponentensysteme maßgeblich an der Trockentoleranzsteigerung beteiligt sein können.

Als Nicht-Zucker-System ist dieser Mechanismus im Kontext der Anhydrobiose nur wenig erforscht. Im Vergleich zu nicht-halophilen Bakterien (wie *E. coli*) weist das Proteom des halophilen Bakteriums *H. elongata* zudem einen leicht sauren Charakter auf. Dieses Charakteristikum deckt sich tendenziell mit sogenannten Hydrophilinen (spezialisierten Proteinen, die vor Austrocknung schützen). Andere Komponenten die zur Glasbildung in *H. elongata* zusätzlich beitragen könnten, waren experimentell nicht nachweisbar (keine Hydrophiline und keine Polyphosphate oder andere anorganische Verbindungen). Damit lässt sich nicht ausschließen, dass weitere Komponenten zur natürlichen Trockenstabilisierung beitragen.

Versuche zur *in vivo* applizierten Vitrifikation ermöglichten die intrazelluläre Verglasung von *H. elongata*-Zellen. Zellen, welche primär mit dem Glasbildner Hydroxyectoin beladen waren, waren bis zu sechsfach trockentoleranter als Zellen, welche vorwiegend das Osmotikum Ectoin akkumuliert hatten.

Daraus hervorgehende *In-vitro*-Studien demonstrierten die Fertigung artifizieller Gläser auf Basis von Hydroxyectoin sowie dem Zwei-Komponenten-System Hydroxyectoin und Glutamat. Solche Gläser zeigten weniger Anzeichen von *Cracking* als Gläser aus Trehalose oder Saccharose (klassische Xeroprotektiva). Ectoin bildete keine amorphen Gläser, sondern kristallisierte stets aus. Dies verdeutlicht, dass die Hydroxylierung des Ectoins die Glasbildung begünstigt.

Um die stabilisierende Wirkung solch temporärer, organischer Gläser zu demonstrieren wurden Trocknungsexperimente mit dem temperatur- und trockensensitiven Enzym Lactatdehydrogenase durchgeführt. Verfahrenstechnisch vorteilhaft erwies sich die geringere Viskosität hochkonzentrierter Hydroxyectoinlösungen im Vergleich zur zuckerbasierten Variante. Die Verglasung des Enzyms war durch die schnelle Methode der beheizten Lufttrocknung realisierbar.

Während unstabilisierte und Ectoin-modifizierte Lactatdehydrogenase schnell durch Hitze und Trockenheit destabilisiert wurden, führten sämtliche Glasbildner (Saccharose, Trehalose, Hydroxyectoin, Glutamat) zu einer deutlichen Biostabilisierung. Weiterhin konnten unter Verwendung der Hydrophilin-analogen Peptidstruktur Gelatine bereits in geringen Mengen stabilisierende Effekte beobachtet werden. Um das Phänomen natürlich auftretender Gläser zu approximieren, wurde gezeigt, dass Matrices aus Glasbildnern und dem Hydrophilin-Analog zu einer gesteigerten Biostabilisierung führen. Die effektivste Biostabilisierung wurde durch das Zwei-Komponenten-System aus Hydroxyectoin und Glutamat in Kombination mit Gelatine erreicht. Es resultierte in einem fast vollständigen Erhalt der enzymatischen Aktivität nach mehrstündiger Trocknung. In einem solchen Glas war das Ergebnis dem synergistischen Stabilisierungseffekt zuzuschreiben, der sonst nur mittels Saccharose-Gelatine-Kombination zu beobachten war, welche an Gläser extrem xerotoleranter Pflanzen und Pflanzensamen orientiert war. Problematisch erwies sich die einprozentige Verunreinigung der Hydroxyectoin-Ansätze mit Ectoin, welche zur Bildung kristalliner Bereiche in den Gläsern führen konnte und so nicht den vollen biostabilisierenden Effekt von Hydroxyectoin gewährleistete. Solche Kristallisationserscheinungen wurden offenbar durch den Glasbildner Hydroxyectoin gehemmt, da sie in dessen Gegenwart nur partiell auftraten.

Im weiteren Verlauf des bionischen Ansatzes wurde sich auf das technische Problem der Instabilität von Biosensoren unter Trockenlagerung fokussiert. Dazu wurde ein elektrochemischer Glucose-Biosensor auf Basis von mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren (MWCNT) *ad hoc* konstruiert. MWCNTs wurden verwendet, da vermutet wird, dass bioprotektives Ectoin und Hydroxyectoin mit aromatischen Systemen gut wechselwirken können und so besonders fest an MWCNTs adsorbieren. Als Nachweissystem für eine Kohlenhydratverbindung sind zuckerbasierte Verbindungen für dessen Stabilisierung eher ungeeignet.

Solut-bedingte Unterschiede in der Verteilung der MWCNTs konnten durch REM-Aufnahmen nicht bestätigt werden. In Trocknungsversuchen mit einzelnen Solut-modifizierten Biosensoren zeigte sich, dass Biosensoren, welche mit Hydroxyectoin bzw. mit Hydroxyectoin und Glutamat modifiziert waren, die höchste Aktivität und Stabilität aufwiesen. Es bleibt die Frage offen, ob dies durch einen Stabilisierungseffekt oder durch einen Elektronenfluss begünstigenden Einfluss der Glasbildner auf die MWCNTs bedingt ist. Beides ist für die Konstruktion wirkungsvoller Biosensoren vorteilhaft.

Unter dem Aspekt, dass sich durch die Verwendung von Xeroprotektiva das Spektrum immobilisierbarer Erkennungselemente und der Erhalt der Bioaktivität erweitern lässt, verbreitert sich auch das Spektrum biosensorisch nachweisbarer Analyte. Selbstredend ist dies für die Entwicklung innovativer Analyseverfahren zum Schadstoff-, Wirkstoff- und Drogennachweis von Vorteil.

X Literaturverzeichnis

Abba S, Ghignone S, Bonfante P. A dehydration-inducible gene in the truffle *Tuber borchii* identifies a novel group of dehydrins. *BMC Genomics*, 2006, 7: 39.

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 2003: 70–71.

Abdul-Fattah AM, Kalonia DS, Pikal MJ. The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: Product quality implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 96: 1886–1916.

Adams DR, Toner M, Langer R. Microflow and Crack Formation Patterns in Drying Sessile Droplets of Liposomes Suspended in Trehalose Solutions. *Langmuir*, 2008, 24: 7688–7697.

Adams RP, Kendall E, Kartha KK. Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1990, 18: 107–110.

Affouard F, Bordat P, Descamps M, Lerbret A, Magazù S, Migliardo F, Ramirez-Cuesta A, Telling M. A combined neutron scattering and simulation study on bioprotectant systems. *Chemical Physics*, 2005, 317: 258–266.

Aguilera JM, Karel M. Preservation of biological materials under desiccation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1997, 37: 287–309.

Ajayan PM. Nanotubes from carbon. *Chemical reviews*, 1999, 99: 1787–1800.

Aksan A, Toner M. Isothermal desiccation and vitrification kinetics of trehalose-dextran solutions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2004, 20: 5521–5529.

Alpert P. The Limits and Frontiers of Desiccation-Tolerant Life. *Integrative and Comparative Biology*, 2005, 45: 685–695.

Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, Carpenter JF. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced drug delivery reviews*, 2001, 46: 307–326.

Arakawa T, Timasheff S. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, 1985, 47: 411–414.

Arakawa T, Tsumoto K, Kita Y, Chang B, Ejima D. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino acids*, 2007, 33: 587–605.

Arakawa T, Timasheff SN. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry*, 1982, 21: 6545–6552.

Arav A, Natan D. Freeze Drying of Red Blood Cells: The Use of Directional Freezing and a New Radio Frequency Lyophilization Device. *Biopreservation and Biobanking*, 2012, 10: 386–394.

Babel W. Gelatine-ein vielseitiges Biopolymer. *Chemie in unserer Zeit*, 1996, 30: 86–95.

Bacmeister LA. *Die Germania ...* Uebersetzt von A. Bacmeister. Neff-Verlag, 1868.

Bailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 2004, 14: 93–107.

- Baker J, van dennSteele C, Dure L, III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, 1988, 11: 277–291.
- Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York: Wiley, 2001, 2nd ed. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2001, 38: 1364–1365.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, Campos F, Covarrubias AA. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *PLANT PHYSIOLOGY*, 2008, 148: 6–24.
- Battista J, Park M, McLemore A. Inactivation of Two Homologues of Proteins Presumed to Be Involved in the Desiccation Tolerance of Plants Sensitizes *Deinococcus radiodurans* 5R16 to Desiccation. *Cryobiology*, 2001, 43: 133–139.
- Baughman RH, Zakhidov AA, Heer WA de. Carbon nanotubes-the route toward applications. *Science*, 2002, 297: 787–792.
- Bear RS. The structure of collagen fibrils. *Advances in protein chemistry*, 1952, 7: 69–160.
- Bellavia G, Giuffrida S, Cottone G, Cupane A, Cordone L. Protein Thermal Denaturation and Matrix Glass Transition in Different Protein–Trehalose–Water Systems. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115: 6340–6346.
- Belton PS, Gil AM. IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers*, 1994, 34: 957–961.
- Berry V, Saraf RF. Self-Assembly of Nanoparticles on Live Bacterium: An Avenue to Fabricate Electronic Devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44: 6668–6673.
- Bianchi G, Gamba A, Murelli C, Salamini F, Bartels D. Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal*, 1991, 1: 355–359.
- Billi D, Potts M. Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology*, 2002, 153: 7–12.
- Biswas A, Patra A, Paul AK. Production of poly-3-hydroxyalkanoic acids by a moderately halophilic bacterium, *Halomonas marina* HMA 103 isolated from solar saltern of Orissa, India. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2009, 56: 125–143.
- Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochemistry and Cell Biology*, 1959, 37: 911–917.
- Bloom FR, Price P, Lao G, Xia JL, Crowe JH, Battista JR, Helm RF, Slaughter S, Potts M. Engineering mammalian cells for solid-state sensor applications. *Biosensors & bioelectronics*, 2001, 16: 603–608.
- Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larre C, Satour P, Leprince O. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant physiology*, 2006, 140: 1418–1436.
- Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of applied microbiology*, 2003, 95: 967–973.
- Brown AD. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 1976, 40: 803.

- Browne JA, Dolan KM, Tyson T, Goyal K, Tunnacliffe A, Burnell AM. Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic cell*, 2004, 3: 966–975.
- Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A. Anhydrobiosis: Plant desiccation gene found in a nematode. *Nature*, 2002, 416: 38.
- Buitink J, Leprince O. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology*, 2004, 48: 215–228.
- Buitink J, Leprince O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes rendus biologies*, 2008, 331: 788–795.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2000, 3: 3–8.
- Cai C, Chen J. Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes. *Analytical Biochemistry*, 2004, 332: 75–83.
- Caprioli M, Krabbe Katholm A, Melone G, Ramlov H, Ricci C, Santo N. Trehalose in desiccated rotifers: a comparison between a bdelloid and a monogonont species. *Comparative biochemistry and physiology*, 2004, 139: 527–532.
- Cayley S, Lewis BA, Record MT, JR. Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 1992, 174: 1586–1595.
- Cesàro A. Carbohydrates: All dried up. *Nature Materials*, 2006, 5: 593–594.
- Cesàro A, Giacomo O de, Sussich F. Water interplay in trehalose polymorphism. *Food Chemistry*, 2008, 106: 1318–1328.
- Chakrabortee S, Meersman F, Kaminski Schierle GS, Bertocini CW, McGee B, Kaminski CF, Tunnacliffe A. Catalytic and chaperone-like functions in an intrinsically disordered protein associated with desiccation tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107: 16084–16089.
- Chakrabortee S, Tripathi R, Watson M, Schierle GSK, Kurniawan DP, Kaminski CF, Wise MJ, Tunnacliffe A. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular bioSystems*, 2012, 8: 210–219.
- Chang BS, Mahoney RR. Enzyme thermostabilization by bovine serum albumin and other proteins: evidence for hydrophobic interactions. *Biotechnology and applied biochemistry*, 1995, 22 (Pt 2): 203–214.
- Chaplin MF. Water: its importance to life. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2001, 29: 54–59.
- Chaplin MF. Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7: 861–866.
- Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, Witkamp G, Verpoorte R. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *PLANT PHYSIOLOGY*, 2011, 156: 1701–1705.
- Clegg JS. The origin of trehalose and its significance during the emergence of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. *Comparative biochemistry and physiology*, 1965, 14: 135–143.

Clegg JS. Cryptobiosis — a peculiar state of biological organization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 128: 613–624.

Clegg JS, Seitz P, Seitz W, Hazlewood CF. Cellular responses to extreme water loss: The water-replacement hypothesis. *Cryobiology*, 1982, 19: 306–316.

Close T, Lammers PJ. An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *PLANT PHYSIOLOGY*, 1993, 101: 773–779.

Conrad PB, Miller DP, Cielenski PR, Pablo JJ de. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 2000, 41: 17–24.

Coradin T, Lopez PJ. Biogenic Silica Patterning: Simple Chemistry or Subtle Biology? *ChemBioChem*, 2003, 4: 251–259.

Cordone L, Cottone G, Giuffrida S. Role of residual water hydrogen bonding in sugar/water/biomolecule systems: a possible explanation for trehalose peculiarity. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2007, 19: 205110.

Cordone L, Cottone G, Giuffrida S, Palazzo G, Venturoli G, Viappiani C. Internal dynamics and protein–matrix coupling in trehalose-coated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2005, 1749: 252–281.

Cornette R, Kikawada T. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. *IUBMB life*, 2011, 63: 419–429.

Cottone G. A Comparative Study of Carboxy Myoglobin in Saccharide–Water Systems by Molecular Dynamics Simulation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111: 3563–3569.

Cottone G, Ciccotti G, Cordone L. Protein–trehalose–water structures in trehalose coated carboxy-myoglobin. *The Journal of Chemical Physics*, 2002, 117: 9862.

Crowe JH. Is There a Single Biochemical Adaptation to Anhydrobiosis? *Integrative and Comparative Biology*, 2002, 42: 497–503.

Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis, part 1. *BIOPHARM-EUGENE*, 1993, 6: 28.

Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 1992, 54: 579–599.

Crowe JH, McKersie BD, Crowe LM. Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. *Biochimica et biophysica acta*, 1989, 979: 7–10.

Crowe J, Crowe L, Wolkers W, Oliver A, Ma X, Auh J, Tang M, Zhu S, Norris J, Tablin F. Stabilization of Dry Mammalian Cells: Lessons from Nature. *Integrative and Comparative Biology*, 2005, 45: 810–820.

Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 1998, 60: 73–103.

Crowe JH, Clegg JS, Crowe LM. Anhydrobiosis: the water replacement hypothesis. In: Reid, David S. (Hg.). *The Properties of Water in Foods ISOPOW 6*. Springer US, 1997: 440–455.

- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers WF, Tablin F. The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. *Cryobiology*, 2001, 43: 89–105.
- Crowe JH, Leslie SB, Crowe LM. Is Vitrification Sufficient to Preserve Liposomes during Freeze-Drying? *Cryobiology*, 1994, 31: 355–366.
- Crowe LM. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 131: 505–513.
- da Costa MS, Santos H, Galinski EA. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 1998, 61: 117–153.
- Dadheech N. Desiccation tolerance in cyanobacteria. *Afr J Microbiol Res*, 2010, 4: 1584–1593.
- Dai Y, van Spronsen J, Witkamp G, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 2013a, 766: 61–68.
- Dai Y, Witkamp G, Verpoorte R, Choi YH. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius L.* *Analytical Chemistry*, 2013b, 85: 6272–6278.
- Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Venkateswaran A, Hess M, Omelchenko MV, Kostandarithes HM, Makarova KS, others. Accumulation of Mn (II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*, 2004, 306: 1025–1028.
- Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Kiang JG, Fukumoto R, Lee D, Wehr NB, Viteri GA, Berlett BS, Levine RL. Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. *PloS one*, 2010, 5: e12570.
- Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Leapman RD, Lai B, Ravel B, Li SW, Kemner KM, Fredrickson JK. Protein Oxidation Implicated as the Primary Determinant of Bacterial Radioresistance. *PLoS Biology*, 2007, 5: e92.
- Deinema MH, van Loosdrecht M, Scholten A. Some Physiological Characteristics of *Acinetobacter spp.* Accumulating Large Amounts of Phosphate. *Water Science & Technology*, 1985, 17: 119–125.
- Denekamp NY, Reinhardt R, Kube M, Lubzens E. Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in Nondesiccated, Encysted, and Diapausing Embryos of Rotifers. *Biology of Reproduction*, 2010, 82: 714–724.
- Denekamp NY, Thorne MAS, Clark MS, Kube M, Reinhardt R, Lubzens E. Discovering genes associated with dormancy in the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis*. *BMC Genomics*, 2009, 10: 108.
- Deng C, Chen J, Chen X, Xiao C, Nie L, Yao S. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23: 1272–1277.
- Deng S, Jian G, Lei J, Hu Z, Ju H. A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25: 373–377.
- Dure L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal*, 1993, 3: 363–369.
- Eckermann AL, Feld DJ, Shaw JA, Meade TJ. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coordination chemistry reviews*. 2010, 254: 1769–1802.

Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G, Rajandream M, Sucgang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper A, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Louseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 2005, 435: 43–57.

Elbein A, Pan Y, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 2003, 13: 17R.

Ellis RJ, Hartl F. Protein Folding and Chaperones. In: D. N. Cooper (ed.), *Nature encyclopedia of the human genome*. Nature Publishing Group, London., 2003: 806–810.

Empadinhas N, da Costa MS. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2008, 11: 151–161.

Erkut C, Penkov S, Khesbak H, Vorkel D, Verbavatz J, Fahmy K, Kurzchalia TV. Trehalose Renders the Dauer Larva of *Caenorhabditis elegans* Resistant to Extreme Desiccation. *Current Biology*, 2011, 21: 1331–1336.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 1991, 11: 81–128.

Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, Zendejas E. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*, 2004, 48: 157–178.

Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 1999, 61: 243–282.

Fedorov MV, Goodman JM, Nerukh D, Schumm S. Self-assembly of trehalose molecules on a lysozyme surface: the broken glass hypothesis. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13: 2294.

Franca MB, Panek AD, Eleutherio ECA. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative biochemistry and physiology*, 2007, 146: 621–631.

Francia F, Dezi M, Mallardi A, Palazzo G, Cordone L, Venturoli G. Protein–Matrix Coupling/Uncoupling in “Dry” Systems of Photosynthetic Reaction Center Embedded in Trehalose/Sucrose: The Origin of Trehalose Peculiarity. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130: 10240–10246.

Fredrickson JK, Li SW, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Zhai M, Sulloway HM, Scholten JC, Brown MG, Balkwill DL, Daly MJ. Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *The ISME Journal*, 2008, 2: 393–403.

Fukuchi S, Yoshimune K, Wakayama M, Moriguchi M, Nishikawa K. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *Journal of molecular biology*, 2003, 327: 347–357.

Gal T, Glazer I, Koltai H. An 5LEA6 group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Letters*, 2004, 577: 21–26.

- Galinski EA. Osmoadaptation in Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1995, 37: 273–328.
- Galinski EA, Pfeiffer HP, Truper HG. 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 / FEBS*, 1985, 149: 135–139.
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *The Journal of biological chemistry*, 2000, 275: 5668–5674.
- García AH. Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications. *Journal of Biosciences*, 2011, 36: 939–950.
- Garcia de Castro A, Bredholt H, Strom AR, Tunnacliffe A. Anhydrobiotic Engineering of Gram-Negative Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4142–4144.
- Gardy JL, Spencer C, Wang K, Ester M, Tusnady GE, Simon I, Hua S, deFays K, Lambert C, Nakai K, Brinkman FSL. PSORT-B: Improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic acids research*, 2003, 31: 3613–3617.
- Giuffrida S, Cottone G, Cordone L. Role of Solvent on Protein-Matrix Coupling in MbCO Embedded in Water-Saccharide Systems: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Biophysical Journal*, 2006, 91: 968–980.
- Giuffrida S, Cottone G, Librizzi F, Cordone L. Coupling between the Thermal Evolution of the Heme Pocket and the External Matrix Structure in Trehalose Coated Carboxymyoglobin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107: 13211–13217.
- Glaeser RM. Cryo-Electron Microscopy of Biological Nanostructures. *Physics Today*, 2008, 61: 48.
- Gouda MD, Singh SA, Rao AGA, Thakur MS, Karanth NG. Thermal inactivation of glucose oxidase mechanism and stabilization using additives. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278: 24324–24333.
- Goyal K, Walton LJ, Browne JA, Burnell AM, Tunnacliffe A. Molecular anhydrobiology: identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis. *Integrative and comparative biology*, 2005b, 45: 702–709.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *The Biochemical journal*, 2005a, 388: 151–157.
- Grammann K, Volke A, Kunte HJ. New Type of Osmoregulated Solute Transporter Identified in Halophilic Members of the Bacteria Domain: TRAP Transporter TeaABC Mediates Uptake of Ectoine and Hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184: 3078–3085.
- Grant WD. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2004, 359: 1249–1267.
- Grazia Cottone, Cordone L, Ciccotti G. Molecular Dynamics Simulation of Carboxy-Myoglobin Embedded in a Trehalose-Water Matrix. *Biophysical Journal*, 2001, 80: 931–938.
- Green JL, Angell CA. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *The Journal of Physical Chemistry*, 1989, 93: 2880–2882.

Greenway H, Setter TL. Accumulation of Proline and Sucrose during the First Hours after Transfer of *Chlorella emevsonii* to High NaCl. *Functional Plant Biology*, 1979, 6: 69–79.

Gronow M. Biosensors. *Trends in Biochemical Sciences*, 1984, 9: 336–340.

Guisseppi-Elie A, Lei C, Baughman RH. Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes. *Nanotechnology*, 2002, 13: 559.

Gutierrez F, Rubianes MD, Rivas GA. Dispersion of multi-wall carbon nanotubes in glucose oxidase: Characterization and analytical applications for glucose biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 161: 191–197.

Hajare A, More H, Pisal S. Vacuum foam drying: New technology for preservation of sensitive biomolecules. *Pharma Times*, 2009, 38: 28–30.

Han Y, Quan GB, Liu XZ, Ma EP, Liu A, Jin P, Cao W. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization. *Cryobiology*, 2005, 51: 152–164.

Hand SC, Jones D, Menze MA, Witt TL. Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *Journal of experimental zoology*, 2007, 307: 62–66.

Hand SC, Menze MA, Toner M, Boswell L, Moore D. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annual Review of Physiology*, 2011, 73: 115–134.

Hanekop N, Hoing M, Sohn-Bosser L, Jebbar M, Schmitt L, Bremer E. Crystal structure of the ligand-binding protein EhuB from *Sinorhizobium meliloti* reveals substrate recognition of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine. *Journal of molecular biology*, 2007, 374: 1237–1250.

Hansen JM, Go Y, Jones DP. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2006, 46: 215–234.

Hengherr S, Heyer AG, Brümmer F, Schill RO. Trehalose and Vitreous States: Desiccation Tolerance of Dormant Stages of the Crustaceans *Triops* and *Daphnia*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2011, 84: 147–153.

Hengherr S, Heyer AG, Kohler H, Schill RO. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades-evidence for divergence in responses to dehydration. *The FEBS journal*, 2008, 275: 281–288.

HersHKovitz N, Oren A, Cohen Y. Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matrix water stress. *Applied and environmental microbiology*, 1991, 57: 645–648.

Hill D, Keenan T, Helm R, Potts M, Crowe L, Crowe J. Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 9: 237–248.

Hincha DK, Zuther E, Heyer AG. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et biophysica acta*, 2003, 1612: 172–177.

Hodge JE. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1953, 1: 928–943.

- Hoekstra FA. Differential Longevities in Desiccated Anhydrobiotic Plant Systems. *Integrative and Comparative Biology*, 2005, 45: 725–733.
- Hoekstra FA, Crowe JH, Crowe LM, ROEKEL T, VERMEER E. Do phospholipids and sucrose determine membrane phase transitions in dehydrating pollen species? *Plant, Cell and Environment*, 1992, 15: 601–606.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 2001, 6: 431–438.
- Hofmann DC. Bulk Metallic Glasses and Their Composites: A Brief History of Diverging Fields. *Journal of Materials*, 2013, 2013: 1–8.
- Horsburgh MJ, Wharton SJ, Karavolos M, Foster SJ. Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends in Microbiology*, 2002, 10: 496–501.
- Hottiger T, Boller T, Wiemken A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS letters*, 1987, 220: 113–115.
- Humphries KM, Szweda LI. Selective Inactivation of α -Ketoglutarate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase: Reaction of Lipoic Acid with 4-Hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*, 1998, 37: 15835–15841.
- Illing N, Denby K, Collett H, Shen A, Farrant J. The Signature of Seeds in Resurrection Plants: A Molecular and Physiological Comparison of Desiccation Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues. *Integrative and Comparative Biology*, 2005, 45: 771–787.
- Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 377–403.
- Iordachescu M, Imai R. Trehalose and Abiotic Stress in Biological Systems. In: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*, Prof. Arun Shanker (Ed.). InTech, 2011.
- Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 2008: NA.
- Jia N, Liu L, Zhou Q, Wang L, Yan M, Jiang Z. Bioelectrochemistry and enzymatic activity of glucose oxidase immobilized onto the bamboo-shaped CN_x nanotubes. *Electrochimica acta*, 2005, 51: 611–618.
- Jiang L, Zhang W. A highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on CuO nanoparticles-modified carbon nanotube electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25: 1402–1407.
- Jones MD, Hooton JC, Dawson ML, Ferrie AR, Price R. Dehydration of trehalose dihydrate at low relative humidity and ambient temperature. *International journal of pharmaceutics*, 2006, 313: 87–98.
- Jose MV, Marx S, Murata H, Koepsel RR, Russell AJ. Direct electron transfer in a mediator-free glucose oxidase-based carbon nanotube-coated biosensor. *Carbon*, 2012, 50: 4010–4020.
- Julca I, Alaminos M, González-López J, Manzanera M. Xeroprotectants for the stabilization of biomaterials. *Biotechnology Advances*, 2012, 30: 1641–1654.
- Karen J. Wiechelmann, Robert D. Braun, Jimmie D. Fitzpatrick. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 1988, 175: 231–237.

Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretilade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivarès CP. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 2001, 414: 450–453.

Keilin D. The problem of anabiosis or latent life, 1959.

Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of microbiology*, 1998, 170: 319–330.

Kikawada T, Nakahara Y, Kanamori Y, Iwata K, Watanabe M, McGee B, Tunnacliffe A, Okuda T. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 348: 56–61.

Kilburn D, Townrow S, Meunier V, Richardson R, Alam A, Ubbink J. Organization and mobility of water in amorphous and crystalline trehalose. *Nature Materials*, 2006, 5: 632–635.

Koster KL, Leopold AC. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *PLANT PHYSIOLOGY*, 1988, 88: 829–832.

Kraegeloh A. Untersuchungen zur Osmoregulation von *Halomonas elongata*: Identifizierung und Charakterisierung von Aufnahmesystemen für Kalium und organische Solute. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2003.

Kraegeloh A, Kunte HJ. Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 2002, 6: 453–462.

Kranner I, Birtic S. A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 2005, 45: 734–740.

Kranner I, Grill D. Desiccation and the subsequent recovery of cryptogams that are resistant to drought. *PHYTON-HORN-*, 1997, 37: 139–150.

Kriško A, Smole Z, Debret G, Nikolić N, Radman M. Unstructured Hydrophilic Sequences in Prokaryotic Proteomes Correlate with Dehydration Tolerance and Host Association. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 402: 775–782.

Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 1982, 157: 105–132.

Larsen PI, Sydnos LK, Landfald B, Strom AR. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Archives of microbiology*, 1987, 147: 1–7.

Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1979, 101: 19–28.

Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 72: 623–634.

Lerbret A, Bordat P, Affouard F, Descamps M, Migliardo F. How Homogeneous Are the Trehalose, Maltose, and Sucrose Water Solutions? An Insight from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005a, 109: 11046–11057.

- Lerbret A, Affouard F, Hédoux A, Krenzlin S, Siepmann J, Bellissent-Funel M, Descamps M. How Strongly Does Trehalose Interact with Lysozyme in the Solid State? Insights from Molecular Dynamics Simulation and Inelastic Neutron Scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116: 11103–11116.
- Lerbret A, Bordat P, Affouard F, Guinet Y, Hédoux A, Paccou L, Prévost D, Descamps M. Influence of homologous disaccharides on the hydrogen-bond network of water: complementary Raman scattering experiments and molecular dynamics simulations. *Carbohydrate Research*, 2005b, 340: 881–887.
- Levitt J. Responses of plants to environmental stress: Chilling, freezing, and high temperature stresses. 2 Auflage. Reihe: Physiological ecology, 1980.
- Li Y, Huang XJ, Heo SH, Li CC, Choi YK, Cai WP, Cho SO. Superhydrophobic Bionic Surfaces with Hierarchical Microsphere/SWCNT Composite Arrays. *Langmuir*, 2007, 23: 2169–2174.
- Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 1988, 22: 631–677.
- Lins RD, Pereira CS, Hünenberger PH. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2004, 55: 177–186.
- Lippert K, Galinski E. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 37: 61–65.
- Liu J, Chou A, Rahmat W, Paddon-Row MN, Gooding JJ. Achieving direct electrical connection to glucose oxidase using aligned single walled carbon nanotube arrays. *Electroanalysis*, 2005, 17: 38–46.
- Liu L, Shen B, Shi J, Liu F, Lu G, Zhu J. A novel mediator-free biosensor based on co-intercalation of DNA and hemoglobin in the interlayer galleries of alpha-zirconium phosphate. *Biosensors & bioelectronics*, 2010, 25: 2627–2632.
- Loose E, Setford S. Stabilisation of Electrochemical Biosensors using Hypersolutes. In: *BioMed'06: Proceedings of the 24th IASTED international conference on Biomedical engineering*, 2006.
- Louis P, Trüper HG, Galinski EA. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41: 684–688.
- Luo XI, Xu JJ, Du Y, Chen HY. A glucose biosensor based on chitosan–glucose oxidase–gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*. 2004, 334: 284–289.
- Magazù S, Maisano G, Migliardo F, Mondelli C. Mean-Square Displacement Relationship in Bioprotectant Systems by Elastic Neutron Scattering. *Biophysical Journal*, 2004, 86: 3241–3249.
- Magazù S, Migliardo F, Affouard F, Descamps M, Telling MTF. Study of the relaxational and vibrational dynamics of bioprotectant glass-forming mixtures by neutron scattering and molecular dynamics simulation. *The Journal of Chemical Physics*, 2010, 132: 184512.
- Manzanera M, Garcia de Castro A, Tondervik A, Rayner-Brandes M, Strom AR, Tunnacliffe A. Hydroxyectoine Is Superior to Trehalose for Anhydrobiotic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 4328–4333.
- Manzanera M, Vilchez S, Tunnacliffe A. Plastic Encapsulation of Stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 3143–3145.

Manzanera M, Vilchez S, Tunnacliffe A. High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233: 347–352.

Marcus R, Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 1985, 811: 265–322.

Marcus RA. Electron transfer reactions in chemistry: theory and experiment (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1993, 32: 1111–1121.

Medicis ED, Paquette J, Gauthier JJ, Shapcott D. Magnesium and manganese content of halophilic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 1986, 52: 567–573.

Meffert A. Die Hydroxylierung von Ectoin und Derivaten durch die Hydroxylase EctD aus *Halomonas elongata*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011.

Meier S. Entwicklung eines Multianalysensensors zur Bestimmung der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose für die Vor-Ort-Überwachung von Gärprozessen. Dissertation, Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 2002.

Migula W. *Bacteriaceae* (Stäbchenbakterien). In: Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Teil I, Abteilung Ia, Ed.: A. Engler, 1985: 20-30, W. Engelmann, Leipzig.

Minorsky PV. On the Inside. *PLANT PHYSIOLOGY*, 2011, 156: 1653–1654.

Morgan C, Herman N, White P, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66: 183–193.

Morrey E, Elliott M, Tingey J. Laboratory-scale vitrification and leaching of Hanford high-level waste for the purpose of simulant and glass property models validation, 1993.

Motitschke L, Driller H, Galinski E. Ectoin and ectoin derivatives as moisturizers in cosmetics. US Patent 6,060,071, 2000.

Müller J, Boller T, Wiemken A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science*, 1995, 112: 1–9.

Müller J, Sprenger N, Bortlik K, Boller T, Wiemken A. Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the *Gesneriaceae*. *Physiologia Plantarum*, 1997, 100: 153–158.

Nachtigall W. Bionik: Grundlagen und Beispiele für Ingenieure und Naturwissenschaftler. Springer DE, 2002.

Nakahara Y, Imanishi S, Mitsumasu K, Kanamori Y, Iwata K, Watanabe M, Kikawada T, Okuda T. Cells from an anhydrobiotic chironomid survive almost complete desiccation. *Cryobiology*, 2010, 60: 138–146.

Narvaez-Reinaldo JJ, Barba I, Gonzalez-Lopez J, Tunnacliffe A, Manzanera M. Rapid Method for Isolation of Desiccation-Tolerant Strains and Xeroprotectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76: 5254–5262.

Niemz P. Physik des Holzes und der Holzwerkstoffe, 1993.

Nursten HE. Recent developments in studies of the maillard reaction. *Food Chemistry*, 1981, 6: 263–277.

- Ojovan MI, Lee WE. An introduction to nuclear waste immobilisation, 2005.
- Ojovan MI, Lee WE. Glassy Wasteforms for Nuclear Waste Immobilization. Metallurgical and Materials Transactions A, 2011, 42: 837–851.
- Oliver W, Pharr G. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. Journal of Materials Research, 1992, 7: 1564–1583.
- Oren A, Heldal M, Norland S, Galinski EA. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. Extremophiles : life under extreme conditions, 2002, 6: 491–498.
- Oren A, Larimer F, Richardson P, Lapidus A, Csonka LN. How to be moderately halophilic with broad salt tolerance: clues from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. Extremophiles : life under extreme conditions, 2005, 9: 275–279.
- Pacios-Pujadó M. Carbon nanotubes as platforms for biosensors with electrochemical and electronic transduction. Springer, 2012.
- Palin WJ, Davis AH, Piasio RN, Piasio ER, Reinemann BC. Organic non-sugar compounds for protection of biologically active molecules and conjugate labels and methods of use thereof. US Patent App. 12/974,715, 2011.
- Piez KA, Miller A. The structure of collagen fibrils. Journal of supramolecular structure, 1974, 2: 121–137.
- Pleitner A, Zhai Y, Winter R, Ruan L, McMullen LM, Ganzle MG. Compatible solutes contribute to heat resistance and ribosome stability in *Escherichia coli* AW1.7. Biochimica et biophysica acta, 2012, 1824: 1351–1357.
- Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes, 1994.
- Potts M. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. European Journal of Phycology, 1999, 34: 319–328.
- Potts M. Desiccation tolerance: a simple process? Trends in Microbiology, 2001, 9: 553–559.
- Potts M. Desiccation Tolerance of Prokaryotes: Application of Principles to Human Cells. Integrative and Comparative Biology, 2005, 45: 800–809.
- Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. Biophysical Journal, 1993, 65: 661–671.
- Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85: 1687–1696.
- Radivojac P, Obradovic Z, Smith DK, Zhu G, Vucetic S, Brown CJ, Lawson JD, Dunker AK. Protein flexibility and intrinsic disorder. Protein science : a publication of the Protein Society, 2004, 13: 71–80.
- Ramanjulu S, Bartels D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. Plant, cell & environment, 2002, 25: 141–151.

Raschke TM. Water structure and interactions with protein surfaces. *Current Opinion in Structural Biology*, 2006, 16: 152–159.

Rebecchi L, Altiero T, Guidetti R. Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance, 2007.

Reyes JL, Campos F, Wei HU, Arora R, Yang Y, Karlson DT, Covarrubias AA. Functional dissection of Hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell & Environment*, 2008, 31: 1781–1790.

Reyes JL, Rodrigo M, Colmenero-Flores JM, Gil J, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment*, 2005, 28: 709–718.

Ried JL, Walker-Simmons MK. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLANT PHYSIOLOGY*, 1993, 102: 125–131.

Rijsdijk JF, Laming PB. Physical and related properties of 145 timbers: information for practice. Springer, 1994.

Roberts MF. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems*, 2005, 1: 1–30.

Rong L, Yang C, Qian Q, Xia X. Study of the nonenzymatic glucose sensor based on highly dispersed Pt nanoparticles supported on carbon nanotubes. *Talanta*, 2007, 72: 819–824.

Sakurai M, Furuki T, Akao K, Tanaka D, Nakahara Y, Kikawada T, Watanabe M, Okuda T. Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105: 5093–5098.

Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2000, 1463: 267–278.

Santos H, da Costa MS. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology*, 2002, 4: 501–509.

Santos H, Lamosa P, Borges N, Gonçalves L, Pais T, Rodrigues M. Organic Compatible Solutes of Prokaryotes that Thrive in Hot Environments: The Importance of Ionic Compounds for Thermostabilization. In: Horikoshi (Hg.) 2011 – *Extremophiles Handbook*, 2011: 497–520.

Schägger H. Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 2006, 1: 16–22.

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. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Environmental Microbiology*, 2011, 13: 1973–1994.

Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfusion medicine reviews*, 2005, 19: 127–142.

Senaratna T, McKersie BD, Borochoy A. Desiccation and Free Radical Mediated Changes in Plant Membranes. *Journal of Experimental Botany*, 1987, 38: 2005–2014.

Seufferheld MJ, Alvarez HM, Farias ME. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 5867–5874.

- Severin J, Wohlfarth A, Galinski EA. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138: 1629–1638.
- Sharon MA, Kozarova A, Clegg JS, Vacratsis PO, Warner AH. Characterization of a group 1 late embryogenesis abundant protein in encysted embryos of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biochemistry and Cell Biology*, 2009, 87: 415–430.
- Shih M, Hoekstra FA, Hsing YC. Late embryogenesis abundant proteins. *Advances in Botanical Research*, 2008, 48: 211–255.
- Shimizu T, Kanamori Y, Furuki T, Kikawada T, Okuda T, Takahashi T, Mihara H, Sakurai M. Desiccation-Induced Structuralization and Glass Formation of Group 3 Late Embryogenesis Abundant Protein Model Peptides. *Biochemistry*, 2010, 49: 1093–1104.
- Simperler A, Kornherr A, Chopra R, Bonnet PA, Jones W, Motherwell WDS, Zifferer G. Glass transition temperature of glucose, sucrose, and trehalose: an experimental and in silico study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, 110: 19678-19684.
- Simon-Colin C, Raguénès G, Cozien J, Guezennec J. *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Journal of applied microbiology*, 2008, 104: 1425–1432.
- Singh SC, Sinha RP, Hader DP. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta protozoologica*, 2002, 41: 297–308.
- Slade D, Lindner AB, Paul G, Radman M. Recombination and Replication in DNA Repair of Heavily Irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell*, 2009, 136: 1044–1055.
- Smith GD, Motta EE, Serafini P. Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 2011, 23: 298–306.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985, 150: 76–85.
- Somero GN, Yancey PH. Osmolytes and Cell-Volume Regulation: Physiological and Evolutionary Principles. *Comprehensive Physiology*, 1997.
- Stacy RAP, Aalen RB. Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of Group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, 1998, 206: 476–478.
- Stoscheck CM. Quantitation of protein. In: Deutscher, Murray P. (Hg.). *Guide to Protein Purification*, 1990, 182: 50–68.
- Stover FS, Bulmahn JA, Gard JK. Polyphosphate separations and chain length characterization using minibore ion chromatography with conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, 1994, 688: 89–95.
- Strom AR, Kaasen I. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular microbiology*, 1993, 8: 205–210.
- Sun WQ, Leopold AC. Cytoplasmic Vitrification and Survival of Anhydrobiotic Organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1997, 117: 327–333.

- Sun WQ, Leopold AC, Crowe LM, Crowe JH. Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophysical Journal*, 1996, 70: 1769–1776.
- Sussich F, Skopec CE, Brady J, Cesàro A. Reversible dehydration of trehalose and anhydrobiosis: from solution state to an exotic crystal? *Carbohydrate Research*, 2001, 334: 165–176.
- Sussich F, Skopec CE, Brady JW, Cesàro A. Water mobility in the dehydration of crystalline trehalose. *Food Chemistry*, 2010, 122: 388–393.
- Sussich F, Urbani R, Princivalle F, Cesàro A. Polymorphic Amorphous and Crystalline Forms of Trehalose. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120: 7893–7899.
- Tanne C, Göbel G, Lisdat F. Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/O₂-biofuel cell. *Biosensors & bioelectronics*, 2010, 26: 530–535.
- Tanne J, Schäfer D, Khalid W, Parak WJ, Lisdat F. Light-Controlled Bioelectrochemical Sensor Based on CdSe/ZnS Quantum Dots. *Analytical Chemistry*, 2011, 83: 7778–7785.
- Taylor MJ, Song YC, Brockbank KGM. Vitrification in Tissue Preservation: New Developments. In: Fuller BJ (Hg.) – *Life in the Frozen State*, 2004: 603–642.
- Timasheff SN. Protein Hydration, Thermodynamic Binding, and Preferential Hydration. *Biochemistry*, 2002, 41: 13473–13482.
- Tompa P, Kovacs D. Intrinsically disordered chaperones in plants and animals. *Biochemistry and Cell Biology*, 2010, 88: 167–174.
- Tunnacliffe A, Garcia de Castro A, Manzanera M. Anhydrobiotic engineering of bacterial and mammalian cells: is intracellular trehalose sufficient? *Cryobiology*, 2001, 43: 124–132.
- Ures A. Identifizierung und Charakterisierung des Ectoin-Hydroxylasegens *ectD* aus *Halomonas elongata* DSM 2581^T. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2005.
- Van Derlinden E, Bernaerts K, van Impe JF. Dynamics of *Escherichia coli* at elevated temperatures: effect of temperature history and medium. *Journal of applied microbiology*, 2008, 104: 438–453.
- Van Derlinden E, Lule I, Bernaerts K, van Impe J. Quantifying the heterogeneous heat response of *Escherichia coli* under dynamic temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108: 1123–1135.
- Varga B, Migliardo F, Takacs E, Vertessy B, Magazù S, Telling MTF. Study of solvent–protein coupling effects by neutron scattering. *Journal of Biological Physics*, 2010, 36: 207–220.
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62: 504–544.
- Vílchez S, Tunnacliffe A, Manzanera M. Tolerance of plastic-encapsulated *Pseudomonas putida* KT2440 to chemical stress. *Extremophiles*, 2008, 12: 297–299.
- Vreeland R, Litchfield C.D., Martin E.L., Elliot E. *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1980, 30: 485–495.
- Wang J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis*, 2005, 17: 7–14.

- Wang J. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*, 2008, 108: 814–825.
- Wang L, Zhu D, Duan L, Chen W. Adsorption of single-ringed N-and S-heterocyclic aromatics on carbon nanotubes. *Carbon*, 2010, 48: 3906–3915.
- Watanabe M. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206: 2281–2286.
- Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell stress & chaperones*, 1996, 1: 109–115.
- Welsh DT, Herbert RA. Identification of organic solutes accumulated by purple and green sulphur bacteria during osmotic stress using natural abundance ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 1993, 13: 145–149.
- Westh P. Unilamellar DMPC Vesicles in Aqueous Glycerol: Preferential Interactions and Thermochemistry. *Biophysical Journal*, 2003, 84: 341–349.
- White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, Moffat KS, Qin H, Jiang L, Pamphile W, Crosby M, Shen M, Vamathevan JJ, Lam P, McDonald L, Utterback T, Zalewski C, Makarova KS, Aravind L, Daly MJ, Minton KW, Fleischmann RD, Ketchum KA, Nelson KE, Salzberg S, Smith HO, Venter JC, Fraser CM. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science (New York, N, 1999, 286: 1571–1577.*
- Wichard W. Taphozöosen im baltischen Bernstein. *Denisia*, 2009, 26: 257–266.
- Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1990, 58: 209–217.
- Willart JF, Gusseme A de, Hemon S, Descamps M, Leveiller F, Rameau A. Vitrification and Polymorphism of Trehalose Induced by Dehydration of Trehalose Dihydrate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106: 3365–3370.
- Wille A. Materialwissenschaftliche Charakterisierung 1. der Schwungfeder von *Bubo bubo* und 2. der Pollen von *Picea abies*. *Hochschulschrift, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*, 2011.
- Wise MJ, Tunnacliffe A. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in plant science*, 2004, 9: 13–17.
- Wohlfarth A, Severin J, Galinski EA. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *Journal of General Microbiology*, 1990, 136: 705–712.
- Wolkers WF, McCready S, Brandt WF, Lindsey GG, Hoekstra FA. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2001, 1544: 196–206.
- Wolkers WF, Oldenhof H, Alberda M, Hoekstra FA. A Fourier transform infrared microspectroscopy study of sugar glasses: application to anhydrobiotic higher plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1998, 1379: 83–96.
- Wolkers WF, Oldenhof H, Glasmacher B. Dehydrating phospholipid vesicles measured in real-time using ATR Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 2010, 61: 108–114.

- Wolkers WF, Tablin F, Crowe JH. From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comparative biochemistry and physiology*, 2002, 131: 535–543.
- Wu X, Zhao F, Varcoe JR, Thumser AE, Avignone-Rossa C, Slade RCT. Direct electron transfer of glucose oxidase immobilized in an ionic liquid reconstituted cellulose-carbon nanotube matrix. *Bioelectrochemistry*, 2009, 77: 64–68.
- Xu X, Songqin L, Huangxian J. A novel hydrogen peroxide sensor via the direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on colloidal gold modified screen-printed electrode. 2003. *Sensors*, 3: 350–360.
- Yancey PH. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208: 2819–2830.
- Yancey PH, Clark M, Hand S, Bowlus R, Somero G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 1982, 217: 1214–1222.
- Yang W, Thordarson P, Gooding JJ, Ringer SP, Braet F. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*, 2007, 18: 412001.
- Ye J, Wen Y, Zhang W de, Ming Gan L, Xu GQ, Sheu F. Nonenzymatic glucose detection using multi-walled carbon nanotube electrodes. *Electrochemistry Communications*, 2004, 6: 66–70.
- Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbeck D, Petranovic M, Lindner AB, Radman M. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature*, 2006, 443: 569–573.
- Zargoosh K, Shamsipur M, Hossienkhani S, Asghari S, Qandalee M, others. Highly sensitive glucose biosensor based on the effective immobilization of glucose oxidase/carbon-nanotube and gold nanoparticle in nafion film and peroxyoxalate chemiluminescence reaction of a new fluorophore. *Talanta*, 2012, 93: 37–43.
- Zhang S, Shao T, Kose HS, Karanfil T. Adsorption kinetics of aromatic compounds on carbon nanotubes and activated carbons. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 2012, 31: 79–85.
- Zhang W, Chen J, Jiang L, Yu Y, Zhang J. A highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on NiO-modified multi-walled carbon nanotubes. *Microchimica Acta*, 2010, 168: 259–265.
- Zhang Y, Shen Y, Han D, Wang Z, Song J, Li F, Niu L. Carbon nanotubes and glucose oxidase bionanocomposite bridged by ionic liquid-like unit: Preparation and electrochemical properties. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 23: 438–443.
- Zhao H, Sun J, Song J, Yang Q. Direct electron transfer and conformational change of glucose oxidase on carbon nanotube-based electrodes. *Carbon*, 2010, 48: 1508–1514.

XI Abkürzungsverzeichnis

1 Material und Methoden

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
-G	Glucose-frei
4xRSB	4-fach konzentrierter RSB (siehe RSB)
96-WMP	96 Well Mikrotiterplatte
AB	<i>Antibiotic Broth No. 3</i> (Medium)
AcN	Acetonitril
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode
ALF	Autoklavierbarer Laborfermenter
APS	Ammoniumperoxodisulfat (Radikalstarter)
AS	Aminosäure
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-Dicarbonsäure
Betain	Glycinbetain
BHI	<i>brain heart infusion</i>
Bisacrylamid	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
BSA	bovines Serumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CNT	Kohlenstoffnanoröhren (engl. <i>carbon nanotubes</i>)
D ₂ O	Deuteriumoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> DSM 498 (Wildtyp K12)
Ectoin	(S)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
GOD	Glucose-Oxidase
<i>H. elongata</i>	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 ^T (Wildtyp)
H ₂ O _{demin}	demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

HSP	Hitzeschockprotein
Hydroxyectoin	(S-S)-2-Methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure
KCl	Kaliumchlorid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LDH	L-Lactatdehydrogenase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MM63	<i>Minimal Medium 63</i>
MM63-15%–G	glucosefreies <i>Minimal Medium 63</i> mit 15 % NaCl
MRG	Mikroreaktionsgefäß
MWCNT	mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (engl. <i>multi-walled carbon nanotubes</i>)
NaCl	Natriumchlorid
Na-TMSP	Natrium-Trimethylsilylpropionat
NHS	N-Hydroxysuccimid
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
N-Terminus	Amino-Terminus (eines Peptids oder Proteins)
OD-Kolben	Seitenhalskolben
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphathaltige Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RI	Brechungsindex (engl. <i>refractive index</i>)
RNAse	Ribonuclease
RSB	reduzierender Probenpuffer (engl. <i>reducing sample buffer</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SWCNT	einwandige Kohlenstoffnanoröhren (engl. <i>single-walled carbon nanotubes</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (Polymerisierungskatalysator)
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett (Strahlung)
WT	Wildtyp

2 Größen und Einheiten

%	Prozent
% (v/v)	prozentuale Volumenkonzentration
% (w/v)	prozentuale Massenkonzentration (Massenanteil pro Volumen)
%C	Konzentration des Quervernetzers (Vernetzungsgrad)
%T	Totale Monomerkonzentration
°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
μs	Mikrosekunde
C	Coulomb
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
E _f [°]	formales Redoxpotential
E _p	Peakpotential
E _p ^{ox}	Oxidationspeakpotential
E _p ^{red}	Reduktionspeakpotential
F	Faraday-Konstante (96485,3399 C/mol)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (als Angabe für die relative Zentrifugalbeschleunigung)
h	Stunde
I _p	Peakstrom
I _p ^{ox}	Oxidationspeakstrom
I _p ^{red}	Reduktionspeakstrom
J	Joule
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
mbar	Millibar

mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mol%	Molprozent
mV	Millivolt
mV/s	Millivolt pro Sekunde
n	Anzahl der übertragenen Elektronen
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
ppm	<i>parts per million</i>
R	Universelle Gaskonstante (8,3144621 J/mol K)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
T	Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
V	Volt
α	Symmetriefaktor
ΔE _p	Peakpotential

3 Sonstiges

Abb.	Abbildung
bspw.	beispielsweise
Dr.	Doktor
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Dtl.	Deutschland
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
HB	Wasserstoffbrückenbindung
IfMB	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (Bonn)
lat.	Lateinisch
NADES	natürliche tiefeutektische Solventien (engl. <i>natural deep eutectic solvents</i>)
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PD	Privatdozent
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderen
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

XII Anhang

Tab. 4: Potentielle Hydrophilie (Glycingehalt > 6 mol%, Hydrophilie > 1) in *E. coli* und *H. elongata*.

Organismus	Anzahl der AS	Molekulare Masse [kDa]	Glycin [mol%]	Hydrophilie [-]	Bezeichnung	Annotation
<i>E. coli</i>	46	5,38	6,52	1,11	P0A7P5	<i>50S ribosomal protein L34</i>
	45	5,10	6,67	1,27	P68191	<i>Stationary-phase-induced ribosome-associated protein</i>
	29	3,45	6,90	1,93	P02338	<i>Protamine-like protein</i>
	169	19,06	7,10	1,38	P0A8H6	<i>Der GTPase-activating protein YihI</i>
	112	13,13	7,14	1,07	P0ADN2	<i>UPF0438 protein yifE</i>
	55	6,51	9,09	1,14	P0AFW2	<i>Ribosome modulation factor</i>
	69	8,33	10,14	1,53	P68206	<i>UPF0337 protein yjbJ</i>
	108	13,26	12,04	1,44	P64542	<i>Uncharacterized protein ypeC</i>
	105	11,39	12,38	1,12	Q9JMR2	<i>Uncharacterized protein yubN</i>
	57	5,88	21,05	1,71	P56614	<i>Uncharacterized protein ymdF</i>
59	6,00	23,73	1,67	P21361	<i>Uncharacterized protein yciG</i>	
<i>H. elongata</i>	109	12,56	6,42	1,10	E1V9A3	<i>Putative uncharacterized protein</i>
	61	6,61	6,56	1,38	E1VAW4	<i>Putative uncharacterized protein</i>
	377	41,92	6,63	1,01	E1V824	<i>Putative solute/DNA competence effector protein</i>
	44	5,12	6,82	1,07	E1VCI7	<i>50S ribosomal protein L34</i>
	131	14,24	6,87	1,09	E1V347	<i>Putative uncharacterized protein</i>
	129	15,14	6,98	1,09	E1V804	<i>K04762 ribosome-associated heat shock protein Hsp15</i>
	437	48,84	8,47	1,06	E1V335	<i>Putative uncharacterized protein</i>
	56	6,39	8,93	1,15	E1V9P5	<i>50S ribosomal protein L32</i>
	205	22,29	17,56	1,13	E1V5N6	<i>K03111 single-strand DNA-binding protein</i>

Tab. 5: Auflistung und Klassifizierung einiger, kompatibler Solute.

Kohlenhydrate	
<i>Oligosaccharide</i>	Trehalose, Saccharose (Sucrose), Raffinose-Familie
<i>Zuckerderivate</i>	Mannosylglycerat (Firoin), Mannosylglyceramid, Mannosylglucosylglycerat, Glucosylglycerat, Glucosylglucosylglycerat, Di-N-Acetylglucosaminphosphat
<i>Polyole</i>	Arabitol, Glycerol, Mannitol, <i>myo</i> -Inositol, Sorbitol
<i>Phosphodiester</i>	Diglycerolphosphat, Glycero-Phospho-Inositol, Di- <i>myo</i> -Inositolphosphat (DIP), Dimannosyl-di- <i>myo</i> -Inositolphosphat (Mannosyl-DIP)
Aminosäuren und Aminosäurederivate	
<i>Freie Aminosäuren</i>	Glycin, Alanin, Prolin, Glutamin, Glutamat, Hydroxyprolin
<i>Zyklische AS-Derivate</i>	Ectoin, Hydroxyectoin
<i>Schwefelhaltige AS-Derivate</i>	Hypotaurin, Taurin, Dimethylsulfoniopropionat (DMSP)
<i>N-Acetylierte AS-Derivate</i>	N-Acetyllysin, N-Acetylnithin, N-Acetylglutaminyglutaminamid (NAGGN), N-Acetyldiaminobutyrat
Quaternäre Amine	
Glycin-Betain (Betain), Trimethylaminoxid (TMAO), Cholin- <i>O</i> -Sulphat, Glycerophosphorylcholine (GPC), Carnitin	
Polyhydroxyalkanoate	
Poly- β -Hydroxybutyrat (Monomer: 3-Hydroxybuttersäure)	

Liste der Publikationen

- Tanne C, Göbel G, Lisdat F (2010). Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/O₂-biofuel cell. *Biosensors & Bioelectronics* 26(2): 530-535
- Tanne C, Göbel G, Lisdat F (2010). New protein anode based on MWCNT-bound (PQQ)-GDH and application in a glucose/O₂-powered biofuel cells (Poster). The International Congress of Pacific Basin Society, PacificChem 2010, Honolulu, Hawaii, USA, 15.-20. Dezember 2010
- Tanne C, Göbel G, Lisdat F (2010). Development of a new MWCNT-modified (PQQ)-GDH electrode with potential application in a glucose/O₂-biofuel cell (Poster). Engineering of functional Interfaces, Workshop EnFI 2010, Marburg, Deutschland, 15.-16. Juli 2010
- Göbel G, Tanne C, Lisdat F (2010). Membrane-free Enzymatic Biofuel Cell based on MWCNT-modified Gold (Poster). 13th International Conference on Electroanalysis, ESEAC 2010, Gijon, Spanien, 20.-24. Juni 2010
- Tanne C, Lisdat F (2010). Establishment of PQQ-GDH-electrode-contacts by means of multi-walled carbon nanotubes (Poster). 13th International Conference on Electroanalysis, ESEAC 2010, Gijon, Spanien, 20.-24. Juni 2010
- Tanne C, Göbel G, Lisdat F (2011). Entwicklung einer Glucosedehydrogenase-basierten Anode und deren Anwendung in einer Glucose / O₂-Biobrennstoffzelle. TH-Wildau - Wissenschaftliche Beiträge 10: 13-22
- Tanne C, Galinski E (2012). Elucidation of potential vitrificants of *Halomonas elongata* DSMZ 2581^T with regard to desiccation tolerance and bio-inspired use as interface protectants (Poster). Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Tübingen, Deutschland, 18.-21. März 2012
- Tanne C, Teller C, Galinski E (2013). Biosensor Stability - Application of Hydroxyectoine in Carbon Nanotube-based Bioelectronics (Poster). Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM) in collaboration with the Royal Netherlands Society for Microbiology (KNVM), Bremen, Deutschland, 10.-13. März 2013
- Galinski E, Korsten A, Seip B, Tanne C (2013). The chemistry of survival (Vortrag). Halophiles 2013, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA, 23.-27. Juni 2013