

Escherichia coli und *Synechocystis* sp.
als heterologe Produktionssysteme
für Ectoin und Hydroxyectoin

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katharina Moritz

aus

Bonn

Bonn, im Mai 2018

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

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

Tag der Promotion: 3. September 2018

Erscheinungsjahr: 2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen und Trivialnamen	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Osmoadaptation in Mikroorganismen	1
1.2 Die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin	2
1.2.1 Eigenschaften und Anwendung der Ectoine	2
1.2.2 Biosynthese von Ectoin und Hydroxyectoin	3
1.2.3 Genetische Organisation der Biosynthesegene	4
1.2.4 Industrielle Produktion der Ectoine	6
1.3 Das <i>ectABCDask</i> -Gencluster von <i>Acidiphilium cryptum</i>	7
1.4 <i>Escherichia coli</i> als heterologes Produktionssystem für Ectoine	8
1.4.1 Osmoadaptation in <i>E. coli</i>	8
1.4.2 Heterologe Produktion von Ectoin und Hydroxyectoin in <i>E. coli</i>	9
1.5 Das Cyanobakterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	10
1.5.1 Osmoadaptation in <i>Synechocystis</i>	10
1.5.2 <i>Synechocystis</i> als heterologes Produktionssystem	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits	13
2.2 Software	16
2.3 Puffer und Lösungen	17
2.4 Bakterienstämme und Plasmide	19
2.5 Expressionssysteme	20
2.6 Nährmedien und Medienzusätze	21
2.7 Bestimmung der osmotischen Konzentration	25
2.8 Kultivierungsverfahren	26
2.8.1 Stammhaltung und Reinheitskontrolle	26
2.8.2 Anzucht von <i>A. cryptum</i>	26
2.8.3 Anzucht von <i>E. coli</i>	27
2.8.3.1 Übernachtkulturen	27
2.8.3.2 Anzucht im Schüttelkolben	27
2.8.3.3 Anzucht im Fermenter	28
2.8.3.4 Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen	29
2.8.4 Anzucht von <i>Synechocystis</i>	29

2.8.5	Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern	30
2.8.6	Zellernte	30
2.9	Analytik	32
2.9.1	Gefriertrocknung	32
2.9.2	Solutextraktion nach Bligh & Dyer (1959)	32
2.9.3	Solutextraktion aus <i>Synechocystis</i>	32
2.9.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	33
2.9.4.1	Nachweis ungeladener und zwitterionischer Solute mittels isokratischer HPLC	33
2.9.4.2	Nachweis organischer Säuren, Zucker und Polyole mittels isokratischer HPLC	34
2.9.4.3	Nachweis N-reaktiver Solute mittels FMOC-ADAM-HPLC	35
2.9.5	Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie)	36
2.9.6	Enzymatischer Nachweis von Glucose	37
2.9.7	Bestimmung der Produktionsdaten	37
2.10	Molekularbiologische Methoden	38
2.10.1	Gewinnung und Quantifizierung der DNA	38
2.10.1.1	Isolierung der genomischen DNA	38
2.10.1.2	DNA-Extraktion aus <i>Synechocystis</i>	39
2.10.1.3	Isolierung der Plasmid-DNA	39
2.10.1.4	Quantifizierung der DNA	40
2.10.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.10.2.1	Standard-PCR	41
2.10.2.2	SOE-PCR (<i>splicing by overlap extension</i> PCR)	42
2.10.2.3	Kontroll-PCR	43
2.10.2.4	Primer	43
2.10.3	Agarosegelelektrophorese	43
2.10.4	Reinigung der DNA aus Agarosegelen und Restriktionsansätzen	45
2.10.5	Enzymatische Modifikation der DNA	45
2.10.5.1	Enzymatische Hydrolyse der DNA	45
2.10.5.2	Dephosphorylierung der Vektor-DNA	46
2.10.5.3	Ligation	46
2.10.6	Herstellung kompetenter Zellen	47
2.10.7	Transformation von <i>E. coli</i>	47
2.10.8	Konjugation von <i>Synechocystis</i>	48
2.10.9	Sequenzierung der DNA	49
2.10.10	RNA-Arbeiten	49
2.10.10.1	Isolierung und Reinigung der RNA	49
2.10.10.2	Quantifizierung der RNA	50
2.10.10.3	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	50
2.10.10.4	cDNA-Synthese	51
2.11	Proteinbiochemische Methoden	52
2.11.1	Proteinextraktion aus <i>E. coli</i>	52
2.11.2	Proteinextraktion aus <i>Synechocystis</i>	53
2.11.3	Gesamtproteinbestimmung	54

2.11.4	Proteinquantifizierung mittels BCA-Test	54
2.11.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.11.6	Western Blot	56
2.11.7	Aktivitätsnachweis von EctC im Rohextrakt	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Das <i>ectABCDask</i> -Gencluster von <i>A. cryptum</i>	59
3.1.1	Osmotische Anpassung von <i>A. cryptum</i>	60
3.1.1.1	Osmotische Anpassung an Natriumchlorid	60
3.1.1.2	Osmotische Anpassung an Aluminiumsulfat	61
3.1.1.3	Vergleich der osmotischen Konzentration von NaCl und Al ₂ (SO ₄) ₃	62
3.1.2	Potenzial des <i>A. cryptum</i> -Genclusters für die heterologe Expression in <i>E. coli</i>	63
3.2	Heterologe Hydroxyectoin-Produktion in <i>E. coli</i> mittels des <i>A. cryptum</i> -Genclusters	65
3.2.1	Akkumulation von Ectoin durch Mutation im Vektor pASK_ectABCD	65
3.2.2	Hydroxyectoin-Produktion mit <i>E. coli</i> pASK_ectABCDask	67
3.2.2.1	Hydroxyectoin-Produktion mit variabler C-Quelle und Salinität	68
3.2.2.2	Produktionsdaten zur optimierten Hydroxyectoin-Produktion	70
3.3	Heterologe Ectoin-Produktion in <i>E. coli</i> mittels des <i>A. cryptum</i> -Genclusters	72
3.3.1	Optimierung der Produktionsbedingungen im Schüttelkolben	73
3.3.1.1	Nährmedium und Temperatur	74
3.3.1.2	Induktionszeit	74
3.3.1.3	C-Quelle	75
3.3.1.4	NaCl-Konzentration	76
3.3.1.5	Produktionsdaten zur optimierten Ectoin-Produktion	78
3.3.2	Produktion von Ectoin mittels Fed-Batch-Fermentation	83
3.3.3	Ectoin-Produktion mit ruhenden Zellen	85
3.3.4	Steigerung der heterologen Expression von <i>ectC</i>	87
3.3.4.1	Expression von <i>ectC</i> unter Kontrolle eines separaten <i>tet</i> -Promotors	87
3.3.4.2	Expression von <i>ectC</i> mit separatem <i>tet</i> -Promotor und optimierter RBS	91
3.3.5	RNA-Analyse des <i>ectABCDask</i> -Genclusters von <i>A. cryptum</i>	97
3.3.5.1	RNA-Analyse des <i>A. cryptum</i> -Genclusters in <i>E. coli</i>	97
3.3.5.2	RNA-Analyse des <i>ectABCDask</i> -Genclusters in <i>A. cryptum</i>	99
3.3.6	Nachweis der Aktivität von EctC in <i>E. coli</i>	100
3.4	<i>Synechocystis</i> als heterologes Produktionssystem für Ectoine	104
3.4.1	Heterologe Expression von <i>ectC</i> in <i>Synechocystis</i>	105
3.4.2	Heterologe Expression des <i>ectABCD</i> -Genclusters in <i>Synechocystis</i>	108
4	Diskussion	115
4.1	Das <i>ectABCDask</i> -Gencluster von <i>A. cryptum</i>	115
4.1.1	Die Aspartokinase von <i>A. cryptum</i>	115
4.1.2	Osmotische Anpassung von <i>A. cryptum</i>	117
4.1.2.1	Geringe Toleranz gegenüber Natriumchlorid	117
4.1.2.2	Hohe Toleranz gegenüber Aluminiumsulfat	117
4.1.2.3	Vergleich der osmotischen Konzentration von NaCl und Al ₂ (SO ₄) ₃	118

4.1.2.4	Hydroxyectoin und Trehalose als Antwort auf osmotischen Stress	119
4.1.3	Potenzial des <i>A. cryptum</i> -Genclusters für die heterologe Expression in <i>E. coli</i>	120
4.2	Heterologe Produktion von Ectoinen in <i>E. coli</i> mittels des <i>A. cryptum</i> -Genclusters	121
4.2.1	Überblick zum heterologen Produktionssystem für Ectoine in <i>E. coli</i>	121
4.2.2	Charakterisierung und Optimierung des heterologen Produktionssystems	123
4.2.2.1	Akkumulation von Ectoin durch Mutation im Vektor pASK_ectABCD _m	123
4.2.2.2	Die Transaminase EctB scheint in <i>E. coli</i> essenziell zu sein	124
4.2.2.3	Geringer positiver Effekt der Aspartokinase	124
4.2.2.4	Die produzierten Ectoine werden überwiegend extrazellulär akkumuliert	125
4.2.2.5	Höchste Produktion der Ectoine bei geringer Salinität	126
4.2.2.6	Keine Produktion von Ectoinen in Komplexmedium	127
4.2.2.7	Höchste Produktausbeute und -reinheit mit Glycerin als C-Quelle	128
4.2.2.8	C-Bilanz (total) und Ertrag des heterologen Produktionssystems	130
4.2.2.9	Energiebilanz und separate C-Bilanz	131
4.2.2.10	N-Limitierung in MM63 durch erhöhten Bedarf an Stickstoff	134
4.2.2.11	Spezifische Produktivität des heterologen Produktionssystems	135
4.2.2.12	Plasmidstabilität des Produktionssystems	136
4.2.2.13	Aktivität und Gleichgewichtsreaktion der Ectoinsynthese	137
4.2.2.14	Extrazelluläre Akkumulation der Ectoin-Vorstufe ADABA	138
4.2.2.15	Fed-Batch-Fermentation	141
4.2.2.16	Ectoin-Produktion mit ruhenden Zellen	143
4.2.2.17	Steigerung der heterologen Expression von <i>ectC</i>	144
4.2.2.18	RNA-Analyse des <i>ectABCDask</i> -Genclusters von <i>A. cryptum</i>	147
4.2.3	Vergleich bisheriger Produktionssysteme für Ectoin und Hydroxyectoin	148
4.2.3.1	Vergleich der Ectoin-Produktion	149
4.2.3.2	Vergleich der Hydroxyectoin-Produktion	153
4.2.4	Weitere Untersuchungen und Optimierungen des Produktionssystems	155
4.3	<i>Synechocystis</i> als heterologes Produktionssystem für Ectoine	158
4.3.1	Hydroxyectoin-Produktion in <i>Synechocystis</i>	158
4.3.1.1	Überblick zum möglichen Biosyntheseweg in <i>Synechocystis</i>	158
4.3.1.2	Extrazelluläre Akkumulation von Hydroxyectoin	160
4.3.1.3	Effekt des Induktors IPTG	161
4.3.1.4	Genetische Stabilität der Expressionsvektoren	162
4.3.1.5	Nicht-funktionelle Expressionssysteme	163
4.3.2	Hydroxyectoin-Produktion im Vergleich zu <i>E. coli</i> und zum Donorstamm	163
4.3.3	Optimierung der heterologen Produktion in <i>Synechocystis</i>	165
5	Zusammenfassung	169
6	Literaturverzeichnis	171
7	Anhang	187

Abbildungsverzeichnis

1.1	Biosyntheseweg von Ectoin und Hydroxyectoin ausgehend von L-Aspartat	3
1.2	Genetische Organisation der Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Biosynthesegene	5
1.3	Schematische Darstellung der biotechnologischen Produktion von Ectoinen	6
1.4	Die häufigsten kompatiblen Solute in Cyanobakterien	11
3.1	Wachstum von <i>A. cryptum</i> mit steigender Salinität	60
3.2	¹³ C-NMR-Spektrum des <i>A. cryptum</i> -Zellextrakts nach Anzucht mit 3% NaCl	61
3.3	Wachstum von <i>A. cryptum</i> mit Aluminiumsulfat	62
3.4	Vergleich der osmotischen Konzentration von NaCl und Al ₂ (SO ₄) ₃	63
3.5	Vergleich der Acidität verschiedener Ectoinsynthesen	64
3.6	Sequenzvergleich der Ectoinhydroxylase	66
3.7	Vergleich von <i>E. coli</i> pASK_ectABCD2 mit bisherigen Produktionsstämmen	67
3.8	Hydroxyectoin-Produktion mit <i>E. coli</i> pASK_ectABCDask im Wachstumsverlauf	68
3.9	Heterologe Hydroxyectoin-Produktion mit variabler C-Quelle und Salinität	69
3.10	Hydroxyectoin-Konzentration und TBM bei variabler C-Quelle und Salinität	70
3.11	Produktionsverlauf mit <i>E. coli</i> pASK_ectABCD _m in MM63-1 mit Glucose	73
3.12	Einfluss der Induktionszeit auf die Ectoin-Produktion	75
3.13	Ectoin-Produktion mit verschiedenen C-Quellen	76
3.14	Ectoin-Produktion mit variabler C-Quelle und Salinität	77
3.15	Ectoin-Konzentration und TBM bei variabler C-Quelle und Salinität	78
3.16	Ectoin-Produktion mit Glycerin im Wachstumsverlauf	79
3.17	Ectoin-Produktion mit Glucose im Wachstumsverlauf	80
3.18	Wachstum und heterologe Produktion mit variablem C:N-Verhältnis	82
3.19	Heterologe Ectoin-Produktion mittels Fed-Batch-Fermentation	84
3.20	Ganzzellbiokatalyse von Aspartat und Glycerin zu Ectoin mit ruhenden Zellen	85
3.21	Konstruktion des Expressionsvektors pASK_ectAB-C	87
3.22	Produktion mit <i>E. coli</i> pASK_ectAB, pASK_ectAB-C und pASK_ectABCD _m	88
3.23	Solutkonzentration und TBM bei variabler AHT-Menge	89
3.24	SDS-PAGE zu <i>E. coli</i> pASK_ectAB-C und pASK_ectABCD _m	90
3.25	Konstruktion des Expressionsvektors pASK_ectAB-RectC	92
3.26	SDS-PAGE und Western Blot zu <i>E. coli</i> pASK_RBS-ectC-Acry	93
3.27	SDS-PAGE des löslichen Zellproteins von <i>E. coli</i> pASK_ectAB-RectC	94
3.28	Vergleich von <i>E. coli</i> pASK_ectAB-RectC und pASK_ectABCD _m	95
3.29	Solute und TBM von <i>E. coli</i> pASK_ectAB-RectC und pASK_ectABCD _m	96
3.30	Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA von <i>E. coli</i>	97
3.31	Analyse der cDNA- und RNA-Proben von <i>E. coli</i>	98
3.32	Analyse der cDNA- und RNA-Proben von <i>A. cryptum</i>	99
3.33	Nachweis der Plasmide und rekombinanten Proteine der Produktionsstämme	101

3.34	Nachweis der Aktivität von EctC im Rohextrakt der Produktionsstämme	102
3.35	Wachstum von <i>Synechocystis</i> mit Ectoin als potenzieller N-Quelle	105
3.36	Konstruktion des Expressionsvektors pRL59EH_ectC_Acry_His	106
3.37	Nachweis von EctC-His in <i>E. coli</i> XL1-Blue pRL59EH_ectC_Acry_His	107
3.38	Nachweis der Expression von <i>ectC</i> in <i>Synechocystis</i> pRL59EH_ectC_Acry_His	108
3.39	Konstruktion des Expressionsvektors pSynect2	109
3.40	Nachweis der Produktion von Ectoinen in <i>E. coli</i> XL1-Blue pSynect2	110
3.41	Nachweis des <i>ectABCD</i> -Genclusters in <i>Synechocystis</i> pSynect2	111
3.42	Konstruktion von pSynect3 und Nachweis von <i>ectC</i> in <i>Synechocystis</i>	113
4.1	Sequenzvergleich der Aspartokinase Ask	116
4.2	Schematische Darstellung des Produktionssystems für Ectoine in <i>E. coli</i>	123
4.3	Energiebilanz der Ectoin- und Hydroxyectoin-Synthese in <i>E. coli</i>	133
4.4	Ganzzellbiokatalyse von Aspartat und Glycerin zu Ectoin (He <i>et al.</i> , 2015)	143
4.5	Schematische Darstellung der Hydroxyectoin-Synthese in <i>Synechocystis</i> pSynect2	159
4.6	Vergleich der <i>codon usage</i> von <i>Synechocystis</i> und <i>P. stutzeri</i>	167
7.1	Intrazellulärer Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt	189
7.2	¹ H-NMR-Spektrum zur Ganzzellbiokatalyse mit <i>E. coli</i> pASK_ectABCD _m	190
7.3	Sequenzvergleich der Aspartokinase LysC	190
7.4	Sequenz des <i>ectABCDask</i> -Genclusters von <i>A. cryptum</i> DSM 2389 ^T	192
7.5	Sequenzausschnitt des Expressionsvektors pASK_ectAB-C	193
7.6	Sequenzausschnitt des Expressionsvektors pASK_ectAB-RectC	194
7.7	Sequenzausschnitt des Expressionsvektors pRL59EH_ectC_Acry_His	194
7.8	Sequenzausschnitt des Expressionsvektors pSynect2	195

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits	13
2.2	Verwendete Puffer und Lösungen	17
2.3	Verwendete Plasmide	19
2.4	Verwendete Bakterienstämme	20
2.5	M269 zur Anzucht von <i>A. cryptum</i>	21
2.6	LB- und 2xYT-Medium	22
2.7	MM63 zur Anzucht von <i>E. coli</i>	22
2.8	Fermentationsmedium für <i>E. coli</i>	23
2.9	BG11 zur Anzucht von <i>Synechocystis</i>	23
2.10	Vitamin- und Spurenelementlösung	24
2.11	Antibiotika	24
2.12	Gradientenprofil für die FMOC-ADAM-HPLC	36
2.13	Reaktionsansatz und PCR-Programm mit der <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	42
2.14	Reaktionsansatz und PCR-Programm mit der <i>Phusion</i> -DNA-Polymerase	42
2.15	Reaktionsansatz und PCR-Programm mit der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	43
2.16	Verwendete Primer	44
2.17	Restriktionsansatz	46
2.18	Ligationsansatz mit T4-DNA-Ligase	46
2.19	cDNA-Synthese mittels Transcriptor Universal cDNA Master Kit	51
2.20	cDNA-Synthese mittels SuperScript First-Strand Synthesis System	52
2.21	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE	55
3.1	Produktionsdaten zu <i>E. coli</i> pASK_ectABCDask in MM63-0,5 mit Glycerin	71
3.2	Produktionsdaten zu <i>E. coli</i> pASK_ectABCD _m in MM63-0,5 mit Glycerin	81
3.3	Heterologe Produktion von Hydroxyectoin mit <i>Synechocystis</i> pSynect2	112
4.1	Vergleich der Expressionsvektoren im Hinblick auf die Translation von <i>ectC</i>	146
4.2	Vergleich der Ectoin- und Hydroxyectoin-Produktion bisheriger Produktionssysteme	152
7.1	Vergleich annotierter Ectoinsynthesen in Genclustern von Vertretern der <i>Bacteria</i>	187
7.2	Ectoin-Produktion in <i>E. coli</i> pASK_ectABCD _m mit Glycerin und 0,25% NaCl	189

Abkürzungen und Trivialnamen

Physikalische Einheiten wurden entsprechend des Internationalen Einheitssystems (SI) abgekürzt. Die Bezeichnungen der Plasmide sind in Tab. 2.3 erläutert.

% (w/v)	prozentualer Massenanteil pro Volumenanteil
% (v/v)	prozentualer Volumenanteil
≥, ≤	größer gleich, kleiner gleich
α-ADABA	Nα-Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure
A ₂₆₀ , A ₂₈₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	Transporter mit <i>ATP-binding cassette</i>
ADABA	Nγ-Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure
ADAM	1-Aminoadamantan
ADP	Adenosindiphosphat
ADPC	5-Amino-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-carbonsäure
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Ask	Aspartokinase
<i>ask</i>	Gen der Aspartokinase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BG11	<i>Medium for Blue Green Algae</i>
BG11-N	BG11 ohne Stickstoffquelle (Natriumnitrat)
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTC	1,2,4,5-Benzoltetracarboxylat Natriumsalz
C-Bilanz	Kohlenstoff-Bilanz
cDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DABA	L-2,4-Diaminobuttersäure
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
EctA	L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase
<i>ectA</i>	Gen der L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase
EctB	L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase
<i>ectB</i>	Gen der L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase

EctC	Ectoinsynthase
<i>ectC</i>	Gen der Ectoinsynthase
EctC-His	Fusionsprotein aus EctC und C-terminalem His-Tag
EctD	Ectoinhydroxylase
<i>ectD</i>	Gen der Ectoinhydroxylase
Ectoin	(<i>S</i>)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure
EctR	potenzielles Regulatorprotein
<i>ectR</i>	Gen des potenziellen Regulatorproteins
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ED-Weg	Entner-Doudoroff-Weg
EMP-Weg	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMOCl	9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>gppS</i>	Gen der Glucosylglycerin-phosphat-Synthase
Glutamat-DH	Glutamat-Dehydrogenase
GmR	Gentamicinresistenz
GS/GOGAT	Glutamin-Synthetase/Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _{demin}	demineralisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
His-Tag	Protein-Tag bestehend aus sechs Histidinen
Homoectoin	4,5,6,7-Tetrahydro-2-methyl-1H-[1,3]-diazepin-4-carbonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hydroxyectoin	(<i>S,S</i>)-2-Methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
KmR	Kanamycinresistenz
LacI	Repressor des Lactose-Operons
<i>lac</i> -Promotor	Promotor des Lactose-Operons
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBG	<i>lysogeny broth</i> mit Glucose
ln OD ₆₀₀	natürlicher Logarithmus der optischen Dichte bei 600 nm
LysC	Aspartokinase, die außerhalb eines Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Biosynthese-genclusters im Genom codiert ist
M269	Medium 269
MFS-Transporter	Transporter der <i>major facilitator superfamily</i>
MM63	Minimalmedium 63
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
rRNA	ribosomale RNA
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
N-Quelle	Stickstoffquelle

OD ₆₀₀ , OD ₇₅₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bzw. 750 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCC	<i>Pasteur Culture collection of Cyanobacteria</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pI	isoelektrischer Punkt
ppm	<i>parts per million</i>
<i>psbA1</i>	Gen des D1 Proteins im Photosystem II
qPCR	quantitative PCR
RBS	Ribosomenbindestelle
RI	<i>refractive index</i> (Brechungsindex)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSB	<i>reducing sample buffer</i>
RT	reverse Transkriptase
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SD-Sequenz	Shine-Dalgarno-Sequenz
Sm/SpR	Streptomycin/Spectinomycinresistenz
SOE	<i>splicing by overlap extension</i>
Tab.	Tabelle
<i>tac</i> -Promotor	Hybrid aus <i>trp</i> -Promotor und <i>lac</i> -Promotor
TBM	Trockenbiomasse
t _d	Verdopplungszeit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>tet</i> -Promotor	Promotor des Tetracyclin-Resistenzgens <i>tetA</i>
TetR	Tetracyclin-Repressor
THF	Tetrahydrofuran
Ti-Rate	Translationsinitiations-Rate
T _m	Schmelztemperatur
TMSP	Natrium-Trimethylsilylpropionat
<i>trc</i> -Promotor	Hybrid aus <i>trp</i> -Promotor und <i>lac</i> -Promotor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
<i>trp</i> -Promotor	Promotor des Tryptophan-Operons
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Osmoadaptation in Mikroorganismen

Viele Lebensräume, wie Meerwasser, Salzseen und Salinen, sind mit einer erhöhten Salzkonzentration verbunden oder weisen ständig wechselnde Osmolaritäten auf, z.B. in Böden durch periodisch auftretende Überschwemmung und Austrocknung. Hypersaline Standorte zeichnen sich durch eine hohe Ionenstärke und somit geringe Wasseraktivität aus, was für Mikroorganismen problematisch ist, da die Verfügbarkeit von Wasser essentiell für zelluläre Prozesse ist. In Umgebungen mit geringer Wasseraktivität und dem damit verbundenen osmotischen Druck läuft eine bakterielle Zelle aufgrund ihrer semipermeablen Membran Gefahr, Wasser zu verlieren, wodurch Metabolismus und Wachstum zum Erliegen kommen würden (Brown, 1976).

Halophile und halotolerante Mikroorganismen haben zwei Strategien der Osmoadaptation entwickelt, um das osmotische Gleichgewicht zwischen Cytoplasma und umgebendem Milieu bei erhöhten Salinitäten aufrechtzuerhalten. Halophile sind auf NaCl angewiesen und haben ihr Wachstumsoptimum bei 3 % NaCl oder weitaus höheren Salinitäten, während halotolerante Vertreter nicht zwingend NaCl für das Wachstum benötigen, aber erhöhte Salzkonzentrationen tolerieren können (Kushner, 1978). Bei der sogenannten *salt-in-cytoplasm*-Strategie werden zum Ausgleich des osmotischen Drucks anorganische Ionen, vornehmlich K⁺- und Cl⁻-Ionen, im Cytoplasma akkumuliert. Diese Strategie erfordert eine weitreichende Anpassung der Zellmaschinerie an hohe intrazelluläre Ionenkonzentrationen und ist bei einigen halophilen Vertretern der *Bacteria* und *Archaea* zu finden (Galinski & Trüper, 1994).

Die zweite Strategie der Osmoadaptation, die *compatible-solute*-Strategie, ist weiter verbreitet unter den Mikroorganismen und beruht auf der intrazellulären Akkumulation organischer osmotisch aktiver Verbindungen. Diese Solute werden durch Transportsysteme aus dem umgebenden Milieu aufgenommen oder *de novo* synthetisiert (Kempf & Bremer, 1998), wobei die Aufnahme energetisch günstiger und deshalb bevorzugt ist (Oren, 1999). Die Akkumulation der Solute ist regulierbar und erlaubt eine schnelle Anpassung an wechselnde Osmolaritäten. Zudem können die Solute in molaren Konzentrationen im Cytoplasma vorliegen, ohne den Zellmetabolismus zu beeinträchtigen, und werden daher als kompatible Solute bezeichnet (Brown, 1976). Die kompatiblen Solute sind niedermolekulare, gut wasserlösliche Moleküle, von denen die meisten bei physiologischem pH-Wert elektrisch neutral sind (Galinski, 1995). Es handelt sich überwiegend um Zucker, Polyole, Aminosäuren oder Derivate dieser Stoffklassen. Neben der Osmoadaptation bieten kompatible Solute auch Schutz gegenüber anderen Umwelteinflüssen, z.B. hohe oder niedrige Temperaturen (Lentzen & Schwarz, 2006b).

1.2 Die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin

Die Ectoine, Ectoin und Hydroxyectoin, sind Derivate der Aminosäure Aspartat und werden von vielen Mikroorganismen zur Anpassung an osmotischen Stress akkumuliert. Ectoin, (*S*)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure, wurde von Galinski *et al.* (1985) in dem halophilen Schwefelpurpurbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* (mittlerweile *Halorhodospira halochloris*) entdeckt und nach diesem benannt. Hydroxyectoin, (*S,S*)-2-Methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure, wurde erstmals in dem grampositiven Bodenbakterium *Streptomyces parvulus* identifiziert (Inbar & Lapidot, 1988). Die Ectoine zählen zu den am besten untersuchten kompatiblen Soluten und sind aufgrund ihrer protektiven Eigenschaften von großem Interesse für biotechnologische Anwendungen (Pastor *et al.*, 2010).

1.2.1 Eigenschaften und Anwendung der Ectoine

Neben der osmoregulatorischen Funktion der Ectoine ist auch die Stabilisierung von Zellen während der Luft- und Gefriertrocknung bekannt (Louis *et al.*, 1994; Manzanera *et al.*, 2002, 2004). Darüber hinaus haben Ectoine eine stabilisierende Wirkung auf Proteine, wie die Modellenzyme Lactatdehydrogenase und Phosphofruktokinase, gegenüber Hitze-, Kälte-, Trocken- und Oxidationsstress (Lippert & Galinski, 1992; Göller & Galinski, 1999; Borges *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2000). Für DNA konnte ein Schutz vor Schäden durch UVA-Strahlung oder ionisierende Strahlung sowie vor dem enzymatischen Abbau durch Restriktionsendonukleasen festgestellt werden (Botta *et al.*, 2008; Hahn *et al.*, 2017; Malin *et al.*, 1999). Weiterhin haben Ectoine einen Einfluss auf Lipidmembranen, indem sie die Interaktionen zwischen den polaren Kopfgruppen mit Wassermolekülen erhöhen und somit die Membranfluidität steigern (Harishchandra *et al.*, 2010).

Die Wirkungsweise der kompatiblen Solute ist noch nicht vollständig verstanden. Für die Stabilisierung von Proteinen in wässriger Lösung wurde das Modell *preferential exclusion* aufgestellt (Arakawa & Timasheff, 1985), das kürzlich durch experimentelle Daten von Zaccai *et al.* (2016) belegt wurde. Nach diesem Modell werden kompatible Solute von der Proteinoberfläche ausgeschlossen, was zu einer bevorzugten Hydratation der Proteine, zu einer kompakteren Konformation und schlussendlich zu einer Stabilisierung der nativen Proteinstruktur führt. Die bisherigen Untersuchungen haben auch gezeigt, dass Hydroxyectoin verglichen mit Ectoin einen deutlich besseren Schutz gegenüber hohen Temperaturen und Austrocknung bietet, was auf die Hydroxylgruppe und damit verbunden auf die guten Glas-bildenden Eigenschaften von Hydroxyectoin zurückgeführt werden kann (Tanne *et al.*, 2014).

In der Molekularbiologie können Ectoine z.B. zur Verbesserung der Amplifikation und Sequenzierung von DNA eingesetzt werden, da sie die DNA-Polymerase bei hohen Temperaturen stabilisieren und den Schmelzpunkt GC-reicher DNA senken (Lapidot *et al.*, 1999). Zudem können sie als Stabilisatoren während der Proteinexpression und -lagerung dienen (Barth *et al.*, 2000). Ectoin findet schon Anwendung in einer Vielzahl von Hautpflege- und Medizinprodukten, was mit dessen

feuchtigkeitsspendender und entzündungshemmender Wirkung sowie dem Schutz gegenüber UV-Strahlung und Hautalterung zusammenhängt (Buenger & Driller, 2004; Graf *et al.*, 2008; Heinrich *et al.*, 2007; Eichel *et al.*, 2013). Aufgrund ihrer vielseitigen protektiven Eigenschaften haben Ectoine Potenzial für weitere therapeutische Anwendungen, z.B. bei Nanopartikel-induzierten Lungenentzündungen, Kolitis und neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit (Sydlik *et al.*, 2009; Abdel-Aziz *et al.*, 2013; Kanapathipillai *et al.*, 2005).

1.2.2 Biosynthese von Ectoin und Hydroxyectoin

Der Biosyntheseweg von Ectoin wurde von Peters *et al.* (1990) in *H. halochloris* und *Halomonas elongata* entdeckt und geht von Aspartat aus (vgl. Abb. 1.1). Die Aminosäure wird mittels der Aspartokinase (Ask) phosphoryliert und via Aspartat- β -semialdehyd-Dehydrogenase (Asd) zu Aspartat- β -semialdehyd reduziert, das neben Ectoin auch als Vorstufe für die Aminosäuren der Aspartat-Familie dient. Ectoin wird in drei enzymatischen Schritten aus Aspartat- β -semialdehyd synthetisiert. Zunächst entsteht durch Transaminierung mit Hilfe der L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase (EctB) L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA), die mittels der L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (EctA) in N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure (ADABA) umgewandelt wird. Im dritten Schritt katalysiert die Ectoinsynthese (EctC) die intramolekulare Kondensation von ADABA zu Ectoin. Hydroxyectoin kann durch Hydroxylierung von Ectoin mittels der Ectoinhydroxylase (EctD) synthetisiert werden (Bursy *et al.*, 2007).

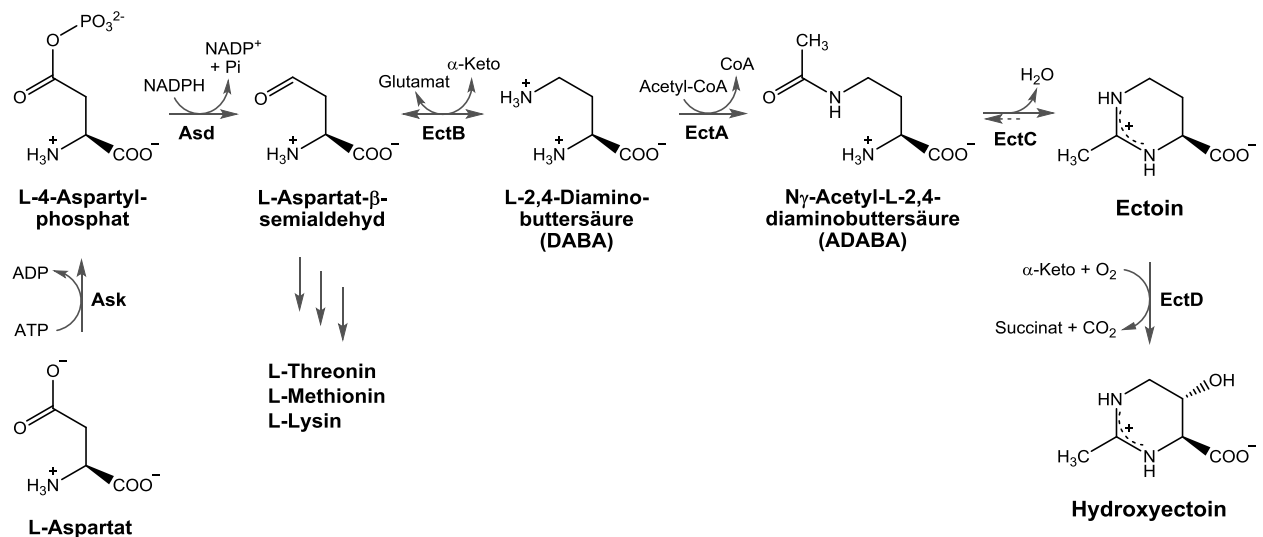


Abb. 1.1: Biosyntheseweg von Ectoin und Hydroxyectoin ausgehend von Aspartat

Ask: Aspartokinase, Asd: Aspartat- β -semialdehyd-Dehydrogenase, EctB: L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase, EctA: L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase, EctC: Ectoinsynthese, EctD: Ectoinhydroxylase, α -Keto: α -Ketoglutarat, CoA: Coenzym A

Bei der reversiblen Transaminierung von Aspartat- β -semialdehyd dient Glutamat als Aminogruppendonor. Außerdem konnten Ono *et al.* (1999) für EctB aus dem moderat halophilen *H. elongata* zeigen, dass Pyridoxalphosphat sowie K⁺-Ionen für die Aktivität erforderlich sind. EctA benötigt

Acetyl-Coenzym A für die Acetylierung von DABA und hat genau wie EctB die höchste Aktivität bei einem schwach alkalischen pH-Wert (Ono *et al.*, 1999).

EctC wurde anhand der Enzyme von *H. elongata* (Ono *et al.*, 1999; Witt *et al.*, 2011), *Acidiphilium cryptum* (Moritz, 2012), *Sphingopyxis alaskensis* (Kobus *et al.*, 2015; Widderich *et al.*, 2016b) und *Nitrosopumilus maritimus* (Widderich *et al.*, 2016a) biochemisch charakterisiert. Trotz der sehr unterschiedlichen Lebensweisen der Mikroorganismen hat EctC ein alkalisches pH-Optimum (pH 8,5-9,0). Nur im Fall des Archaeons *N. maritimus* liegt das Optimum bei pH 7,0. Ein deutlicher Unterschied besteht in der NaCl-Abhängigkeit des Enzyms. Bei *A. cryptum* und *N. maritimus* nimmt die Aktivität von EctC mit steigender Salinität ab, während bei den anderen Vertretern die Aktivität durch NaCl stimuliert wird. Kürzlich wurde anhand der Strukturanalyse des Enzyms von *S. alaskensis* bestätigt, dass EctC der Cupin-Superfamilie angehört. Zudem konnte eine Metall-Abhängigkeit des Enzyms festgestellt werden, wobei sehr wahrscheinlich Eisen als Cofaktor fungiert (Widderich *et al.*, 2016b). Darüber hinaus konnte für EctC von *H. elongata* und *A. cryptum* die Reversibilität anhand der Hydrolyse alternativer zyklischer Substrate, z.B. ADPC und Homoectoin, nachgewiesen werden (Witt *et al.*, 2011; Moritz, 2012).

EctD zählt zu den Nicht-Häm-Fe(II)- und α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und benötigt α -Ketoglutarat, molekularen Sauerstoff sowie Fe²⁺-Ionen für die Hydroxylierung von Ectoin (Bursy *et al.*, 2007). Außerdem kann das Enzym von *H. elongata* weitere Substrate, z.B. Prolin und Homoectoin, hydroxylieren (Vielgraf, 2008; Meffert, 2011). Daneben ergab die Charakterisierung von EctD aus verschiedenen Mikroorganismen ähnliche biochemische Eigenschaften im Bezug auf den pH-Wert, die Salzkonzentration (KCl, NaCl) und die Temperatur (Bursy *et al.*, 2007; Widderich *et al.*, 2014, 2016a).

1.2.3 Genetische Organisation der Biosynthesegene

Bioinformatische und phylogenetische Studien zeigen, dass die Biosynthesegene für Ectoin bzw. Hydroxyectoin fast ausschließlich in Vertretern der *Bacteria* zu finden sind (Lo *et al.*, 2009; Schwibbert *et al.*, 2011; Widderich *et al.*, 2014). Nur in wenigen Genomen der *Archaea* wurden die Gene bislang identifiziert und lediglich im Fall von *N. maritimus* konnte auch die Synthese der Ectoine nachgewiesen werden (Widderich *et al.*, 2016a). Die Enzyme der Ectoin-Biosynthese werden meist von einem *ectABC*-Gencluster codiert (vgl. Abb. 1.2). Bei manchen Bakterien sind die Gene in anderer Reihenfolge oder getrennt voneinander im Genom vorhanden (nicht gezeigt). Für einige Biosynthesegencluster wurde demonstriert, dass sie als Operon ausgehend von einem osmotisch regulierten Promotor stromaufwärts von *ectA* transkribiert werden (Kuhlmann & Bremer, 2002; Reshetnikov *et al.*, 2006; Bursy *et al.*, 2007; Kuhlmann *et al.*, 2008; Stöveken *et al.*, 2011). Andererseits sind Vertreter bekannt, z.B. *Chromohalobacter salexigens* und *H. elongata*, bei denen mehrere Promotoren innerhalb des Gencluster vorliegen und die transkriptionale Regulation komplexer ist (Calderón *et al.*, 2004; Schwibbert *et al.*, 2011).

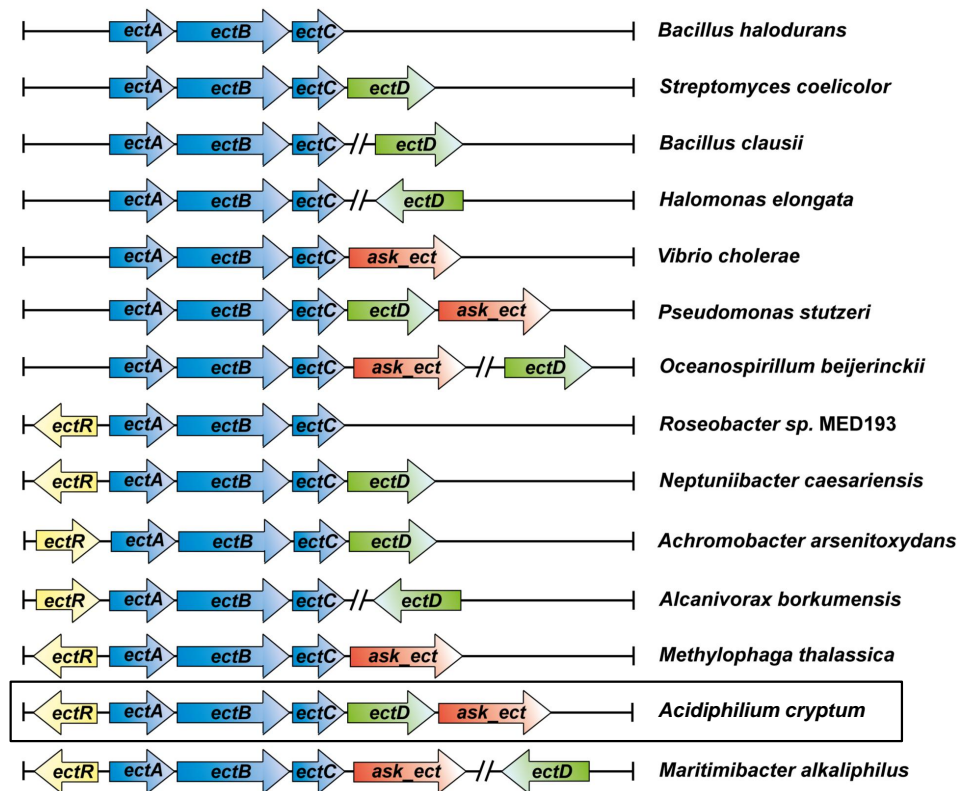


Abb. 1.2: Genetische Organisation der Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Biosynthesegene

Die am häufigsten vorkommenden Typen von Biosynthesegenclustern sind mit einem Stellvertreter gezeigt. Die Gene codieren für die L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (*ectA*), L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase (*ectB*), Ectoinsynthase (*ectC*), Ectoinhydroxylase (*ectD*), Aspartokinase (*ask_ect*) und ein potenzielles Regulatorprotein (*ectR*), modifiziert nach Widderich *et al.* (2014).

Etwa zwei Drittel aller potenziellen Ectoin-Produzenten besitzen *ectD* zur Synthese von Hydroxyectoin (Widderich *et al.*, 2014). In den meisten Fällen befindet sich das *ectD*-Gen unmittelbar stromabwärts von *ectC*, aber in manchen Bakterien, wie *H. elongata*, ist *ectD* separat vom *ectABC*-Gencluster im Genom lokalisiert (vgl. Abb. 1.2). Bei einigen Vertretern, z.B. *Pseudomonas stutzeri*, ist das Gencluster mit dem *ask*-Gen für eine Aspartokinase assoziiert. Ask unterscheidet sich von Aspartokinasen, die außerhalb des Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Genclusters im Genom codiert sind, und scheint eine spezielle Rolle für die Synthese der Ectoine zu spielen (Lo *et al.*, 2009). Darüber hinaus befindet sich in manchen Fällen, fast ausschließlich in Proteobakterien wie *A. cryptum*, ein putatives Regulatorgen *ectR* stromaufwärts von *ectA* (vgl. Abb. 1.2). Bisher wurde nur EctR des methanotrophen *Methylophilum alcaliphilum* näher charakterisiert (Mustakhimov *et al.*, 2009). Dabei handelt es sich um einen transkriptionalen Regulator, der die Expression des *ectABCask*-Operons durch Bindung an den *ectAp₁*-Promotor vor *ectA* inhibiert. Eine Besonderheit konnte bei dem Archaeon *N. maritimus* festgestellt werden, das die Gene *ectABCD* mit dem nachfolgenden Gen *mscS* cotranskribiert, welches für ein funktionelles mechanosensitives Kanalprotein codiert (Widderich *et al.*, 2016a). Mechanosensitive Kanäle erlauben bei einem Anstieg des Turgordrucks einen schnellen Ausstrom der intrazellulär akkumulierten Solute, um das osmotische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten (Berrier *et al.*, 1996; Levina *et al.*, 1999).

1.2.4 Industrielle Produktion der Ectoine

Für Ectoine besteht eine wachsende Nachfrage aufgrund ihrer protektiven Eigenschaften und der damit verbundenen vielseitigen Anwendungsgebiete. Die chemische Synthese der Ectoine ist zwar grundsätzlich möglich (Koichi *et al.*, 1991), aber zu kostenintensiv für die großtechnische Produktion mit hohem Reinheitsgrad und hoher Stereospezifität. Derzeit erfolgt die industrielle Produktion mit Hilfe des halophilen Bakteriums *H. elongata* (Kunte *et al.*, 2014). Dafür wurde zunächst das als *bacterial milking* bekannte Verfahren entwickelt (Sauer & Galinski, 1998). Im ersten Schritt werden die Ectoine mittels Fermentation von *H. elongata* bei einer hohen Salinität (10-15 % NaCl) intrazellulär angereichert, bis eine hohe Zelldichte von mehr als 40 g/L erreicht ist. Danach werden die Zellen durch Querstromfiltration vom Medium abgetrennt und durch Verdünnung mit Wasser einem hypoosmotischen Schock auf 2-3 % NaCl unterzogen, was zum schnellen Ausstrom der Ectoine über mechanosensitive Kanäle führt. Die Ectoine werden in einem zweiten Filtrationsschritt von der Biomasse getrennt, die erneut für die Fermentation eingesetzt werden kann. Die Produktreinigung umfasst die Entsalzung mittels Elektrodialyse, eine chromatographische Aufreinigung, die Kristallisation und Trocknung der Ectoine (vgl. Abb. 1.3).

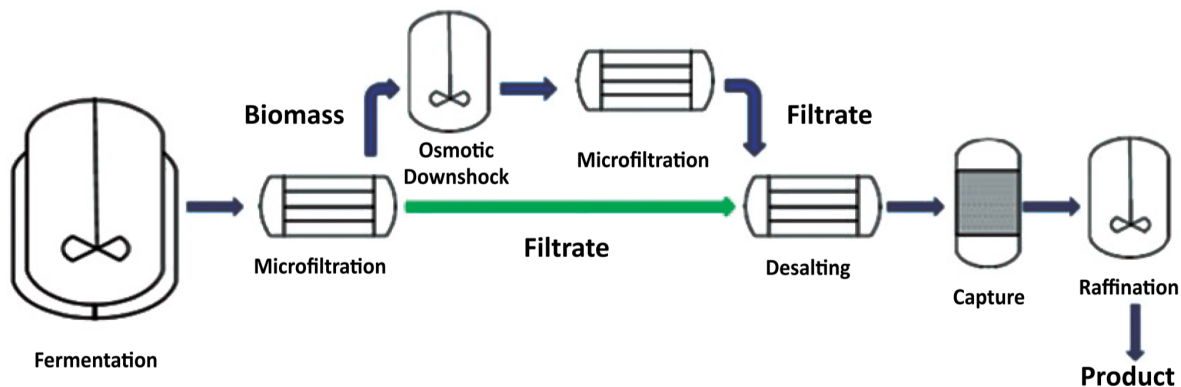


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der biotechnologischen Produktion von Ectoinen

Bei der *bacterial milking*-Methode (blaue Pfeile) werden *H. elongata*-Zellen nach Fermentation bei hoher Salinität durch Querstromfiltration konzentriert und einem osmotischen *downshock* ausgesetzt. Daraufhin werden die Ectoine ins Medium freigesetzt und mittels Filtration von der Biomasse getrennt, die erneut für die Fermentation verwendet werden kann. Die Produktreinigung umfasst Entsalzung via Elektrodialyse, chromatographische Aufreinigung, Kristallisation und Trocknung. Durch *leaky mutant*-Stämme, die Ectoine kontinuierlich ins Medium ausscheiden, kann das Verfahren vereinfacht werden (grüner Pfeil), entnommen aus Kunte *et al.* (2014).

Zur Optimierung der Produktion wurden sogenannte *leaky mutants* von *H. elongata* erzeugt, bei denen das Aufnahmesystem und der Abbauweg für Ectoin blockiert sind und daher die Solute kontinuierlich ins Medium ausgeschieden werden (Grammann *et al.*, 2002; Kunte *et al.*, 2014). Im Gegensatz zum *bacterial milking* ist hierbei die Produktion nicht vom intrazellulären Solutgehalt abhängig, wodurch weniger NaCl benötigt wird. Zudem ist die Produktreinigung vereinfacht, da der osmotische *downshock* und die zweite Filtration entfallen (vgl. Abb. 1.3).

Für die Produktion der Ectoine mit *H. elongata* ist jedoch NaCl erforderlich, da die Expression der Biosynthesegene osmotisch reguliert wird. Eine erhöhte NaCl-Konzentration ist nicht nur für die Fermentertechnik auf Dauer von Nachteil, sondern macht auch den Gewinnungsprozess teurer. Des Weiteren akkumuliert *H. elongata* Hydroxyectoin erst bei Salinitäten über 10 % NaCl und Temperaturen oberhalb von 40 °C, wobei maximal ein Anteil von 50 % am Gesamtsolutgehalt erreicht wird (Wohlfarth *et al.*, 1990; Meffert, 2011). Dadurch ist eine chromatographische Trennung von Hydroxyectoin und Ectoin erforderlich und der Produktionsprozess wird insgesamt zeit- und kostenintensiver. Aus diesen Gründen ist eine Optimierung der Ectoin- und Hydroxyectoin-Produktion von großem Interesse. In den vergangenen Jahren wurden bereits Versuche unternommen, eine salzfreie bzw. salzreduzierte Produktion der Ectoine zu erreichen. Dazu wurden vorwiegend die Modellorganismen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* als heterologe Produktionssysteme verwendet (vgl. 1.4.2).

1.3 Das *ectABCDask*-Gencluster von *Acidiphilium cryptum*

A. cryptum ist ein acidophiles α -Proteobakterium, das erstmals von Harrison *et al.* 1980 aus vermeintlichen Reinkulturen von *Thiobacillus ferrooxidans* isoliert wurde. Weiterhin ist *A. cryptum* in sauren Böden, im Abwasser, in sauren Metall-reichen Haldenabflüssen sowie Grubenwässern (*acid mine drainage*) zu finden und wächst bevorzugt bei einem pH-Wert von 2,0 bis 5,2 (Harrison *et al.*, 1980; Kishimoto & Tano, 1987). Obwohl *A. cryptum* obligat heterotroph ist, wird das Wachstum durch hohe Konzentrationen organischen Substrats gehemmt, weshalb keine Kultivierung in den üblichen Komplexmedien möglich ist (Harrison, 1981). *A. cryptum* ist fakultativ aerob und kann anaerobe Atmung mit Fe^{3+} als terminalem Elektronenakzeptor betreiben (Johnson & McGinness, 1991; Küsel *et al.*, 1999). Für den Stamm *A. cryptum* JF-5, der von Küsel *et al.* (1999) aus sauren Sedimenten isoliert wurde, konnte auch die Reduktion von Cr^{6+} - zu Cr^{3+} -Ionen nachgewiesen werden (Cummings *et al.*, 2007). Die Cr^{6+} -Reduktion dient jedoch nicht der Energiegewinnung, sondern stellt sehr wahrscheinlich einen Mechanismus zur Detoxifizierung des Schwermetalls dar. Darüber hinaus konnten Fischer *et al.* (2002) beim Typstamm *A. cryptum* DSM 2389^T (Harrison, 1981) eine durch Aluminiumionen induzierbare Aluminium-Resistenz feststellen. Beide Fähigkeiten erlauben eine Anpassung an erhöhte Konzentrationen der Metall-Ionen, die aufgrund des sauren Milieus der Habitate eine hohe Löslichkeit aufweisen.

Im vollständig sequenzierten Genom von *A. cryptum* JF-5 (GenBank CP000697) ist ein Biosynthesegencluster für Hydroxyectoin annotiert. Neben den Genen *ectABCD* ist zusätzlich das *ask*-Gen für eine Aspartokinase vorhanden. Außerdem befindet sich vor *ectA* ein potenzielles Regulatorgen *ectR*, das in entgegengesetzter Richtung zum *ectABCDask*-Gencluster orientiert ist (vgl. Abb. 1.2). Diese Organisation des Genclusters ist bislang nur bei einigen anderen α -Proteobakterien und wenigen γ -Proteobakterien zu finden (Lo *et al.*, 2009; Widderich *et al.*, 2014). Interessant ist das Gen *Acry_3013* stromabwärts von *ask*, das für einen putativen MFS-Transporter (*major facilitator*

superfamily) codiert. Jedoch ist nicht bekannt, welche Funktion der mutmaßliche Transporter in *A. cryptum* hat und ob er mit der Aufnahme oder dem Efflux der Ectoine assoziiert ist.

In der vorangegangenen Diplomarbeit konnte die Funktionalität des *ectABCDask*-Genclusters von *A. cryptum* DSM 2389^T unter Kontrolle der nativen Promotoren in *E. coli* nachgewiesen werden (Moritz, 2012). Außerdem wurden EctC des Typstamms und EctD von *A. cryptum* JF-5 näher charakterisiert (Moritz, 2012; Widderich *et al.*, 2014). Beide Enzyme haben ähnliche biochemische Eigenschaften wie EctC bzw. EctD von anderen Vertretern, mit der Ausnahme, dass die Aktivität bei geringer Salinität bzw. ohne NaCl maximal ist und mit steigender Salinität deutlich abnimmt. Demnach könnte das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* DSM 2389^T, im Folgenden als *A. cryptum* bezeichnet, für eine salzfreie Produktion der Ectoine in *E. coli* geeignet sein.

1.4 *Escherichia coli* als heterologes Produktionssystem für Ectoine

1.4.1 Osmoadaptation in *E. coli*

E. coli ist ein fakultativ anaerobes γ -Proteobakterium, das an seinem primären Standort (Darm) wechselnden Osmolaritäten ausgesetzt sein kann und zur Anpassung ein osmoregulatorisches System entwickelt hat. Allerdings wächst *E. coli* in Minimalmedium bei maximal 4 % NaCl und besitzt folglich eine relativ geringe Salztoleranz (Larsen *et al.*, 1987). Als erste Antwort auf osmotischen Stress nimmt *E. coli* K⁺-Ionen aus dem umgebenden Milieu auf und synthetisiert Glutamat als Gegenion (Dinnbier *et al.*, 1988). In der zweiten Phase der Osmoadaptation wird Trehalose *de novo* synthetisiert und ersetzt nach kurzer Zeit die K⁺-Ionen und Glutamat. Die Trehalose-Synthese wird durch die Gene *otsAB* vermittelt, wobei die Trehalose-6-phosphat-Synthase (OtsA) die Kondensation von UDP-Glucose und Glucose-6-phosphat zu Trehalose-6-phosphat katalysiert und durch K⁺-Ionen aktiviert wird (Giæver *et al.*, 1988). Trehalose-6-phosphat wird mittels der Trehalose-6-phosphat-Phosphatase (OtsB) zu Trehalose dephosphoryliert.

Darüber hinaus kann *E. coli* kompatible Solute, u.a. Glycinbetain, Prolin und Ectoin, aus dem umgebenden Milieu aufnehmen und dadurch eine höhere Salztoleranz (ca. 6 % NaCl) erlangen (Dinnbier *et al.*, 1988; Jebbar *et al.*, 1992). Durch die Aufnahme der kompatiblen Solute wird ein schneller K⁺-Ausstrom bewirkt und die Trehalose-Synthese inhibiert (Dinnbier *et al.*, 1988). Bei der Osmoadaptation in *E. coli* spielen vor allem die osmotisch regulierten Transporter ProP und ProU eine Rolle, die ursprünglich als Aufnahmesysteme für Prolin identifiziert wurden (Menzel & Roth, 1980; Csonka, 1982). Bei ProU handelt es sich um einen ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) mit hoher Affinität, während ProP ein Solut/H⁺-Symporter mit geringer Affinität ist und zu den MFS-Transportern gehört (May *et al.*, 1989; Culham *et al.*, 1993).

1.4.2 Heterologe Produktion von Ectoin und Hydroxyectoin in *E. coli*

Das Bakterium *E. coli* wird vielseitig als heterologes Expressionssystem genutzt, weil es genetisch sowie physiologisch gut untersucht ist, einfach zu handhaben ist und hohe Zelldichten erreichen kann (Shiloach & Fass, 2005). Louis & Galinski (1997) haben zum ersten Mal die *ectABC*-Gene von *Marinococcus halophilus* in *E. coli* exprimiert, wodurch der Stamm in Minimalmedium mit 5 % NaCl wachsen konnte und bis zu 140 mg Ectoin pro g Trockenbiomasse (TBM) intrazellulär akkumulierte. Eine extrazelluläre Akkumulation von Ectoin (6 g/L) konnten Schubert *et al.* (2007) erstmalig durch Expression von *ectABC* aus *C. salexigens* in *E. coli* erreichen. In den folgenden Jahren wurden weitere Produktionssysteme für die Sekretion von Ectoin entwickelt, die auf einem starken NaCl-unabhängigen Promotor basieren und teilweise mittels *metabolic engineering* optimiert wurden (He *et al.*, 2015; Ning *et al.*, 2016; Czech *et al.*, 2018). Neben *E. coli* wurde auch das grampositive Bakterium *C. glutamicum* für die heterologe Ectoin-Produktion verwendet (Becker *et al.*, 2013; Pérez-García *et al.*, 2017). Für alle Produktionsstämme dienten entweder halophile Vertreter, wie *H. elongata* und *C. salexigens*, oder das halotolerante Bakterium *P. stutzeri* als Donorstamm. Die heterologe Produktion erfolgte in allen Fällen bei geringer Salinität bzw. ohne NaCl. Durch Fed-Batch-Fermentation konnten extrazelluläre Ectoin-Konzentrationen von bis zu 25,1 g/L sowie hohe volumetrische Produktivitäten (max. 0,84 g/(L x h)) erzielt werden. Allerdings fielen die Biomasse-bezogenen Produktivitäten verhältnismäßig gering aus.

Seip *et al.* (2011) haben erstmals die *de novo*-Synthese von Hydroxyectoin in *E. coli* beschrieben. Dabei wurde das *ectABCDask*-Gencluster aus *P. stutzeri* verwendet und ein intrazellulärer Solutgehalt von ca. 80 mg/g TBM mit einem Hydroxyectoin-Anteil von 95 % erreicht. Seitdem wurden zwei heterologe Produktionssysteme basierend auf *E. coli* bzw. der Hefe *Hansenula polymorpha* entwickelt, die eine extrazelluläre Akkumulation von Hydroxyectoin bei geringer Salinität ermöglichen (Czech *et al.*, 2018; Eilert *et al.*, 2013). Jedoch war die Produktivität gering und mit dem *E. coli*-Stamm von Czech *et al.* ergab sich ein hoher Ectoin-Anteil (32 %). Im Hinblick auf die industrielle Ectoin- und Hydroxyectoin-Produktion besteht somit noch Optimierungsbedarf.

Die Produktion der Ectoine in *E. coli* DH5 α mit dem *ectABCDask*-Gencluster aus *A. cryptum* unter Kontrolle der nativen Promotoren fiel mit ca. 20 mg/g TBM relativ niedrig aus (Moritz, 2012). Aber durch Expression des Genclusters mit Hilfe eines für *E. coli* geeigneten und starken Promotors konnte eine deutlich höhere Produktion bei geringer Salinität und eine Sekretion der Ectoine erzielt werden (Bethlehem, 2015). Dabei zeigte sich, dass der Stamm *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD entgegen den Erwartungen kein Hydroxyectoin produzierte, während *E. coli* DH5 α pASK_ectABCDask fast ausschließlich Hydroxyectoin extrazellulär akkumulierte. In ersten Wachstumsversuchen mit Glucose als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) und 1 % NaCl bzw. ohne NaCl ergab sich für *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD ein Ectoin-Gehalt von rund 0,5 g/g TBM im Medium (Bethlehem, 2015). Der Hydroxyectoin-Produzent erreichte einen extrazellulären Solutgehalt von bis zu 1,3 g/g TBM. Die Produktionsstämme scheinen eine aussichtsreiche Alternative zu den bisherigen Produktionssystemen zu sein. Die Expressionsvektoren basieren auf dem Vektor pASK-IBA3 (IBA, Göttingen)

mit dem durch Anhydrotetracyclin (AHT) induzierbaren *tet*-Promotor. Dieser ermöglicht nach Zugabe geringer AHT-Mengen (0,2 µg/mL) eine hohe Expression der Biosynthesegene und wird in Abwesenheit des Induktors effektiv mittels des Repressors TetR inhibiert (Skerra, 1994).

1.5 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803, im Folgenden als *Synechocystis* bezeichnet, ist ein einzelliges Cyanobakterium und wurde aus einem Süßwassersee in Kalifornien isoliert (Stanier *et al.*, 1971). Die Energiegewinnung betreibt *Synechocystis* primär durch oxygene Photosynthese, die an den intrazellulären Thylakoidmembranen stattfindet und ähnlich zur Photosynthese bei Pflanzen ist. Bei der oxygenen Photosynthese wird Lichtenergie zu chemischer Energie in Form von ATP und NADPH umgewandelt, wobei H₂O als Elektronendonator dient und O₂ gebildet wird. ATP und NADPH werden u.a. zum Aufbau von Kohlenhydraten im Zuge der CO₂-Fixierung verwendet, die bei *Synechocystis* über den Calvin-Zyklus erfolgt. Darüber hinaus wurden *Synechocystis*-Stämme beschrieben, die neben der Verwendung von CO₂ als C-Quelle auch photoheterotroph mit Glucose wachsen können (Rippka *et al.*, 1979; Williams, 1988). Außerdem gehört *Synechocystis* zu den nicht-diazotrophen Cyanobakterien, die kein N₂ fixieren können. Weiterhin kann *Synechocystis* Speicherstoffe bilden, die in der Dunkelphase und unter Stressbedingungen als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Dazu gehören Glykogen, Polyhydroxybuttersäure (PHB) und Cyanophycin, ein Polymer aus Aspartat und Arginin (Allen, 1984).

1.5.1 Osmoadaptation in *Synechocystis*

Cyanobakterien können prinzipiell in drei Gruppen eingeteilt werden, die sich in der Salztoleranz und den vornehmlich akkumulierten kompatiblen Soluten unterscheiden (Reed *et al.*, 1986). Die Vertreter mit der niedrigsten Osmotoleranz akkumulieren Trehalose und/oder Saccharose und tolerieren rund 4 % NaCl. Cyanobakterien, die eine moderate Salztoleranz zwischen 6 und 11 % NaCl haben, akkumulieren hauptsächlich Glucosylglycerin als Antwort auf osmotischen Stress. Die am meisten halotoleranten Stämme können bei Salinitäten bis zu 16 % NaCl wachsen und synthetisieren vornehmlich Glycinbetain (vgl. Abb. 1.4). Die Synthese von Ectoin wurde bisher nicht in Cyanobakterien nachgewiesen.

Synechocystis, der zur zweiten Gruppe zählt, toleriert bis zu 7 % NaCl und akkumuliert Glucosylglycerin sowie geringe Mengen an Saccharose (Reed & Stewart, 1985). Die Synthese von Glucosylglycerin erfolgt in zwei enzymatischen Schritten und ist vergleichbar mit der Trehalose-Synthese in *E. coli* (vgl. 1.4.1). Zunächst katalysiert die Glucosylglycerin-phosphat-Synthase (GgpS) die Kondensation von ADP-Glucose und Glycerin-3-phosphat zu Glucosylglycerin-phosphat (Marin *et al.*, 1998). Im zweiten Schritt erfolgt mittels der Glucosylglycerin-phosphat-Phosphatase (GgpP) die Dephosphorylierung des Intermediats zu Glucosylglycerin (Hagemann *et al.*, 1997b). Das

Schlüsselenzym der Glucosylglycerin-Synthese, GgpS, wird durch Salz aktiviert (Marin *et al.*, 1998). Bei geringer Salinität befindet sich das Enzym bereits im Cytoplasma, aber ist durch Bindung an Nucleinsäuren inaktiviert, die in Anwesenheit von KCl und NaCl aufgehoben wird (Novak *et al.*, 2011). Darüber hinaus besitzt *Synechocystis* einen salzregulierten ABC-Transporter (Ggt) zur Aufnahme von Glucosylglycerin, über den auch Trehalose und Saccharose mit geringer Affinität transportiert werden (Mikkat *et al.*, 1996, 1997).

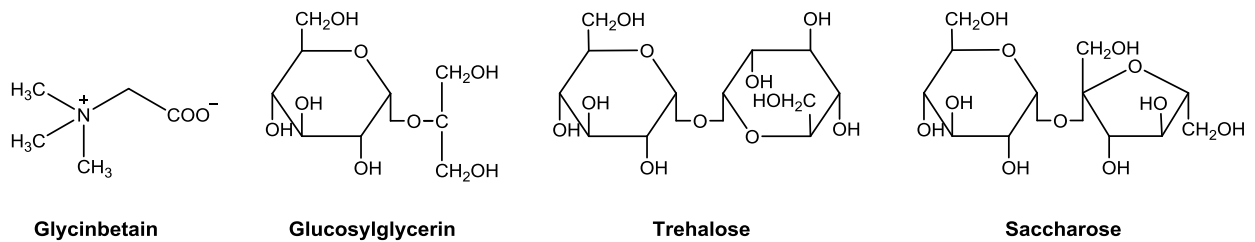


Abb. 1.4: Die häufigsten kompatiblen Solute in Cyanobakterien

Glycinbetain wird in Cyanobakterien durch Methylierung von Glycin synthetisiert. Glucosylglycerin wird aus ADP-Glucose und Glycerin-3-phosphat kondensiert. Die Trehalose-Synthese erfolgt meistens ausgehend von Glycogen und für Saccharose dienen UDP-Glucose und Fructose-6-phosphat als Vorstufen.

1.5.2 *Synechocystis* als heterologes Produktionssystem

Synechocystis war das erste Cyanobakterium, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Kaneko *et al.*, 1996). Bei Wachstum unter Standardbedingungen liegen ca. 12 Kopien des Genoms pro Zelle vor (Labarre *et al.*, 1989). Einige *Synechocystis*-Stämme sind aufgrund ihrer natürlichen Kompetenz leicht transformierbar (Grigorieva & Shestakov, 1982). Außerdem wurden schon Vektorsysteme für die genomische Integration und autonome Replikation entwickelt, die häufig auf dem *broad host range*-Plasmid RSF1010 (Scholz *et al.*, 1989) basieren. Demnach ist *Synechocystis* für die genetische Manipulation und heterologe Expression geeignet. In den vergangenen Jahren wurden bereits mehrere Versuche unternommen, *Synechocystis* als photoautotrophe Zellfabrik für biotechnologisch interessante Produkte zu nutzen (Yu *et al.*, 2013). Dazu gehörten vor allem Biokraftstoffe, z.B. Ethanol, Isobutanol und Isopren, aber auch Lactat sowie Saccharose.

Die Isobutanol-Produktion konnte durch genomische Integration zweier Gene aus *Lactococcus lactis*, *kivd* und *adhA*, unter Kontrolle des *tac*-Promotors erreicht werden (Varman *et al.*, 2013). Hierbei ergab sich nach 15-tägigem Wachstum eine extrazelluläre Konzentration von etwa 240 mg/L. Angermayr *et al.* (2012) haben einen *Synechocystis*-Stamm zur Produktion von Lactat entwickelt, der auf der NADH-abhängigen Lactat-Dehydrogenase von *Bacillus subtilis* und dem von *E. coli*-abstammenden *trc*-Promotor basiert. Durch Coexpression einer löslichen Transhydrogenase zur Erhöhung des intrazellulären NADH-Pools wurde die Produktion optimiert und eine extrazelluläre Lactat-Konzentration von 288 mg/L nach 17 Tagen erzielt. Weiterhin wurde ein Plasmid-basierter Produktionsstamm mit einem Codon-optimierten *efe*-Gen von *Pseudomonas syringae* zur Ethylen-Synthese beschrieben (Guerrero *et al.*, 2012). Ungerer *et al.* (2012) haben durch genetische

Veränderungen und optimierte Wachstumsbedingungen einen Ethylen-produzierenden Stamm mit einer Produktivität von 3,8 mg/(L x h) etabliert. Gao *et al.* (2012) haben *Synechocystis* zur Ethanol-Produktion mit der Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis* und dem Wirts-eigenen *rbc*-Promotor verwendet. Durch weitere genetische Veränderungen wurde der metabolische Fluss vermehrt Richtung Ethanol gelenkt und die bisher höchste Produktkonzentration von 5,5 g/L nach 26 Tagen erreicht. Allerdings ist *Synechocystis* wegen der geringeren Wachstumsrate, Biomasse-Produktion und Produktivität bisher nicht konkurrenzfähig zu heterotrophen Produktionssystemen von *E. coli* und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der protektiven Eigenschaften der Ectoine und der vielseitigen Anwendungsgebiete besteht eine wachsende Nachfrage der Industrie, die kompatiblen Solute zu produzieren und in verschiedenen Produkten zu vermarkten. Dafür ist eine Optimierung des bisherigen Produktionsverfahrens, das mit einem erhöhten NaCl-Bedarf und einer aufwendigen Trennung der Ectoine verbunden ist, von großem Interesse. *A. cryptum* und dessen *ectABCDask*-Gencluster waren bereits Bestandteil der vorangegangenen Diplomarbeit (Moritz, 2012). Daran anknüpfend war ein Ziel dieser Arbeit das *ectABCDask*-Gencluster in Bezug auf die Anpassung an osmotischen Stress durch NaCl bzw. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ und dessen Potenzial für eine salzfreie Produktion der Ectoine in *E. coli* näher zu untersuchen.

Anschließend an diese Experimente und die Masterarbeit von Bethlehem (2015) sollte die Ectoin- und Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* unter Verwendung des *ectABCDask*-Genclusters aus *A. cryptum* ausführlicher charakterisiert werden. Hierbei sollte auch aufgeklärt werden, warum *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD entgegen den Erwartungen kein Hydroxyectoin produziert und welchen Einfluss die Aspartokinase Ask hat. Darüber hinaus sollte das heterologe Produktionssystem mittels physiologischer sowie genetischer Methoden optimiert und die Produktion im größeren Maßstab untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die relevanten Produktionsdaten, wie die spezifische Produktivität und den Ertrag an Ectoinen, für *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD bzw. pASK_ectABCDask unter den optimierten Bedingungen zu bestimmen und somit einen besseren Vergleich mit anderen Produktionssystemen zu ermöglichen.

Das moderat halotolerante Bakterium *Synechocystis* dient als Modellorganismus für die Osmoadaptation in Cyanobakterien. Demnach ist es interessant, die Wirkung von Ectoinen gegenüber osmotischem Stress und anderen Stressfaktoren in *Synechocystis* zu untersuchen. Außerdem könnte *Synechocystis* als photoautotrophe Zellfabrik für Ectoine genutzt werden. Daher war ein Ziel dieser Arbeit erstmals die heterologe Produktion von Ectoinen in *Synechocystis* zu etablieren. Zunächst sollte ein Schlüsselenzym der Ectoin-Biosynthese, EctC, in *Synechocystis* heterolog exprimiert werden. Daran anschließend sollten Produktionsstämme für die Synthese der Ectoine unter Verwendung geeigneter Biosynthesegencluster und Vektorsysteme entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits

Chemikalien	Hersteller
Aceton ($\geq 99,9\%$)	Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril, AcN ($\geq 99,9\%$)	Merck, Darmstadt
N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure, ADABA	Isolat aus <i>H. elongata</i> WUB01, AG Galinski
Acrylamid (30 %)	Carl Roth
Adenosintriphosphat Dinatriumsalz, ATP ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar-Agar Kobe I	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
Aluminiumsulfat Octadecahydrat, Al ₂ (SO ₄) ₃ x 18 H ₂ O ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich
1-Aminoadamantan Hydrochlorid, ADAM ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich
p-Aminobenzoesäure ($\geq 99\%$)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ammoniaklösung, NH ₃ -Lösung (25 %)	Merck
Ammoniumchlorid, NH ₄ Cl ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Ammoniumeisen(III)-citrat ($\sim 18\%$ Fe)	Carl Roth
Ammoniumpersulfat, APS ($\geq 98\%$)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Ammoniumsulfat, (NH ₄) ₂ SO ₄ ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth
Anhydrotetracyclin Hydrochlorid	IBA, Göttingen
Aspartat Natriumsalz ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich
1,2,4,5-Benzoltetracarboxylat Natriumsalz, BTC	Synthese (Hort, 2014)
Biotin ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich
Borsäure, H ₃ BO ₃ ($\geq 99\%$)	Fluka
<i>Bovine serum albumin</i> , BSA	Sigma-Aldrich
BSA Fraktion V	Serva, Heidelberg
1-Brom-3-chlorpropan ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid Dihydrat, CaCl ₂ x 2 H ₂ O ($\geq 99,5\%$)	Merck
Calcium-Pantothenat ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich
Carbenicillin Dinatriumsalz ($\geq 88\%$)	Carl Roth
Casaminosäuren	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Casein	Merck
Caseinpepton (NZamin)	Carl Roth
Chloroform ($\geq 99,8\%$)	Merck
Citronensäure Monohydrat ($\geq 99,5\%$)	Merck
Cobalt(II)-nitrat, Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O ($\geq 99\%$)	Merck
Cyanocobalamin ($\geq 97\%$)	Merck
Desoxyribonukleosidtriphosphat Mix, dNTPs (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Deuteriumoxid ($\geq 99,9\%$)	Merck
L-2,4-Diaminobuttersäure Dihydrochlorid, DABA ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich

Fortsetzung Tab. 2.1

Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4 ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid, DMSO ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth
Dithiothreitol, DTT ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Ectoin	behawe Naturprodukte, Rietberg
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat, $FeSO_4 \times 7 H_2O$ ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich
Essigsäure, Eisessig (100%)	Merck
Ethanol ($\geq 99,8\%$)	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz, EDTA ($\geq 99\%$)	Carl Roth
9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid, Fmoc (97%)	Sigma-Aldrich
Formaldehydlösung (37%)	Carl Roth
GelRed	Biotium, Fremont (USA)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Gentamicinsulfat	Fluka
D-Glucose Monohydrat ($\geq 99\%$)	VWR, Darmstadt
Glutamat Natriumsalz ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich
Glycerin ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth
Glycin ($\geq 99\%$)	Merck
Glycinbetain ($\geq 98\%$)	Fluka
Hefeextrakt	Carl Roth
Hydroxyectoin ($\geq 95\%$)	Sigma-Aldrich
Isopropanol ($\geq 99,8\%$)	Carl Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, IPTG ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Kaliumacetat ($\geq 99\%$)	Merck
Kaliumchlorid, KCl ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Kaliumhydroxid, KOH ($\geq 85\%$)	Carl Roth
Kanamycinsulfat	Fluka
Kupfersulfat Pentahydrat, $CuSO_4 \times 5 H_2O$ ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Laemmli Puffer für SDS-PAGE (10x)	Serva
Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Magnesiumchlorid Hexahydrat, $MgCl_2 \times 6 H_2O$ ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat, $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ($\geq 99,5\%$)	Merck
Malat Dinatriumsalz ($\geq 98\%$)	Merck
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat, $MnCl_2 \times 4 H_2O$ ($\geq 99\%$)	Merck
Methanol ($\geq 99,9\%$)	Carl Roth
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure, MOPS ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth
N,N'-Methylenbisacrylamid, Bisacrylamid (2%)	Merck
Natriumacetat Trihydrat ($\geq 99,5\%$)	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat, Na_2CO_3 ($\geq 99,5\%$)	Merck
Natriumchlorid, NaCl ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat, SDS ($\geq 99\%$)	Serva
Natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$ ($\geq 99,5\%$)	Fluka
Natriumhydroxid, NaOH ($\geq 99\%$)	Merck
Natriumlactat-Lösung ($\sim 50\%$)	Merck
Natriummolybdat Dihydrat, $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$ ($\geq 98\%$)	Merck
Natriumnitrat, $NaNO_3$ ($\geq 99,5\%$)	Merck
Natriumthiosulfat, $Na_2S_2O_3$ ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich

Fortsetzung Tab. 2.1

Natrium-Trimethylsilylpropionat, TMSP ($\geq 98\%$)	Merck
Nicotinamid ($\geq 99,5\%$)	Fluka
Nitroblautetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, NBT/BCIP-Lösung	Roche, Mannheim
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth
Polyethylenglycol 3350, PEG 3350	Sigma-Aldrich
Pyridoxal Hydrochlorid ($\geq 99,5\%$)	Merck
Pyruvat Natriumsalz ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Quick Coomassie Stain	Generon, Slough (England)
RiboRuler High Range RNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Salzsäure, HCl (37%)	Carl Roth
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄ (95-97%)	Merck
Spectinomycin Dihydrochlorid ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich
Taurin ($\geq 99\%$)	Fluka
Tetrahydrofuran, THF ($\geq 99,9\%$)	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Thiamin Hydrochlorid ($\geq 99\%$)	Fluka
D-Trehalose Dihydrat ($\geq 99\%$)	Carl Roth
TRI-Reagenz	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris ($\geq 99,9\%$)	Carl Roth
N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure, TES ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Triton X-100	Fluka
Tween-20	Merck
Zinksulfat Heptahydrat, ZnSO ₄ x 7 H ₂ O ($\geq 99\%$)	Fluka
Enzyme	Hersteller
Desoxyribonuklease I, DNase I	Sigma-Aldrich
DNase I RNase-frei (1 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific
Lysozym	Carl Roth
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific
<i>Phusion</i> High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific
Ribonuklease A, RNaseA	Carl Roth
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific
Thermosensitive Alkaline Phosphatase, FastAP (1 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase (5 Weiss U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific
Kits	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	VWR
Monarch DNA Gel Extraction Kit	New England BioLabs, Ipswich (USA)
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Transcriptor Universal cDNA Master Kit	Roche
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Irvine (USA)

2.2 Software

- **ChemDraw**, Prime Version 16.0.1.4, PerkinElmer, Waltham (USA)
- **Chromas**, Version 2.6.5, Technelysium, South Brisbane (Australien)
- **ChromQuest**, Version 5.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
- **Clone Manager**, Basic Version 9.0, Scientific & Educational Software, Denver (USA)
- **MestReNova**, Version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostela (Spanien)
- **Primer Designer**, Version 3.0, Scientific & Educational Software
- **SnapGene**, Version 4.1.9, GSL Biotech, Chicago (USA)

- **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*), Altschul *et al.* (1990),
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Stand: 16.03.18
- **BPROM** (*prediction of bacterial promoters*), Softbarry, Solovyev & Salamov (2011),
<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>,
 Stand: 18.09.17
- **Clustal Omega**, EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*), Sievers *et al.* (2011),
<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, Stand: 16.03.18
- **Codon Usage Database**, Nakamura *et al.* (2000), <http://www.kazusa.or.jp/codon/>,
 Stand: 18.09.17
- **EMBOSS Needle** (*European Molecular Biology Open Software Suite*), EMBL-EBI, Needleman & Wunsch (1970), https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, Stand: 16.03.18
- **ProtParam tool**, ExPASy, Gasteiger *et al.* (2005), <https://web.expasy.org/protparam/>,
 Stand: 18.09.17
- **GCUA** (*Graphical Codon Usage Analyser*), Fuhrmann *et al.* (2004), <http://gcu.schoedl.de/>,
 Stand: 18.09.17
- **KEGG** (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), <http://www.genome.jp/kegg/>,
 Stand: 16.03.18
- **MultAlin**, Corpet (1988), <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, Stand: 16.03.18
- **NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,
 Stand: 16.03.18
- **NNPP** (*Neural Network Promoter Prediction*), Reese (2001),
http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html, Stand: 18.09.17
- **Primer3web**, Untergasser *et al.* (2012), Version 4.1.0, <http://primer3.ut.ee/>, Stand: 28.03.17
- **PromBase**, Rangannan & Bansal (2011), <http://nucleix.mbu.iisc.ernet.in/prombase/>,
 Stand: 18.09.17
- **RBS Calculator**, Version 2.0, Salis *et al.* (2009), Espah Borujeni *et al.* (2014),
<https://salislab.net/software/>, Stand: 14.03.18
- **Translate tool**, ExPASy, <https://web.expasy.org/translate/>, Stand: 16.03.18

2.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Puffer und Lösungen (vgl. Tab. 2.2) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

Tab. 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen

Ganzzellbiokatalyse	
Reaktionspuffer G	100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7, 100 mM Aspartat, 100 mM Glycerin
Solutextraktion	
Bligh & Dyer-Lösung	Methanol/Chloroform/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ (10:5:4 v/v)
isokratische HPLC	
Laufmittel (NH_2)	80 % (v/v) Acetonitril in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$
Laufmittel (Aminex)	0,02 N H_2SO_4 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$
FMOC-ADAM-HPLC	
Boratpuffer	0,5 M Borsäure in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, pH 7,7 (mit 1 N NaOH eingestellt)
FMOC-Reagenz	1 mM FMOC in Aceton
ADAM-Reagenz	40 mM ADAM in Boratpuffer, 1:1 mit Aceton verdünnt
Natriumacetat-Puffer	50 mM Natriumacetat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, pH 4,2
Laufmittel A	80 % (v/v) Natriumacetat-Puffer, 20 % (v/v) Acetonitril, 0,5 % (v/v) THF
Laufmittel B	20 % (v/v) Natriumacetat-Puffer, 80 % (v/v) Acetonitril
$^1\text{H-NMR}$	
Lösungsmittel	Deuteriumoxid mit 10 mM BTC, 4 °C
Isolierung der genomischen DNA	
TES-Puffer	5 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM NaCl, pH 8,0
SDS-Lösung	20 % (w/v) SDS
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat, pH 4,8
DNA-Extraktion aus <i>Synechocystis</i>	
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
Plasmid-Isolierung ohne Säulenreinigung	
Puffer 1	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 % (w/v) RNaseA, pH 8,0, 4 °C
Puffer 2	200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS, pH 12,5
Puffer 3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5, 4 °C
PCR	
dNTP-Lösung	2 mM dNTPs in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, -20 °C
Glycinbetain-Lösung	5 M Glycinbetain in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, -20 °C
Agarosegelelektrophorese	
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,6 % (v/v) Eisessig, pH 8,0
6 x Ladepuffer	10 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 60 % (v/v) Glycerin, pH 7,6, 4 °C
Ligation	
ATP-Stammlösung	10 mM ATP in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, -20 °C

Fortsetzung Tab. 2.2

Herstellung kompetenter Zellen

CaCl ₂ -MgSO ₄ -Lösung	70 mM CaCl ₂ , 20 mM MgSO ₄ , in H ₂ O _{reinst} , getrennt autoklaviert
TSS	10 % (w/v) PEG 3350, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgSO ₄ in LB-Medium, pH 6,5, sterilfiltriert

Denaturierende Agarosegelelektrophorese

10 x MOPS-Puffer	0,4 M MOPS, 0,1 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA in H ₂ O _{reinst} , pH 7,0
------------------	---

Proteinextraktion aus *E. coli*

Resuspensionspuffer	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0
Lysozym-Stammlösung	10 % (w/v) Lysozym in H ₂ O _{reinst} , -20 °C
SDS-Lösung	10 % (w/v) SDS
DNaseI-Stammlösung	1 % (w/v) DNaseI in H ₂ O _{reinst} , -20 °C
MgCl ₂ -Lösung	50 mM MgCl ₂

Proteinextraktion aus *Synechocystis*

Lysepuffer	25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM EDTA, pH 7,4
------------	---

SDS-PAGE

Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Acrylamid-Mix	32,7 mL Acrylamid (30 %), 10 mL Bisacrylamid (2 %), H ₂ O _{demin} ad 50 mL, 4 °C
APS-Lösung	10 % (w/v) APS, 4 °C
1 x Laufpuffer	10 x Laemmli Puffer (Serva), 1:10 in H ₂ O _{demin}
Ladepuffer (4 x RSB)	4,5 mL Sammelgelpuffer, 5 mL Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 3,86 % (w/v) DTT, Spatelspitze Bromphenolblau, H ₂ O _{reinst} ad 10 mL, -20 °C

Western Blot

Towbin-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, ca. pH 8,3 (nicht titrieren)
TBS-Puffer	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
Blockierungslösung	1 % (w/v) Casein, 3 % (w/v) BSA Fraktion V in TBS-Puffer, pH 7,5
TBSTT-Puffer	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,5, 0,05 % (v/v) Tween-20, 0,2 % (v/v) TritonX-100
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , pH 9,4

Aktivitätstest

Reaktionspuffer A	50 mM Tris-HCl, 0,5 % (w/v) NaCl in H ₂ O _{reinst} , pH 8
-------------------	---

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 2.3 und 2.4 aufgelistet.

Tab. 2.3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pASK-IBA3	<i>tet</i> -Promotor, Tet-Repressor, Strep-Tag, AmpR	IBA (Göttingen)
pASK_ectABCD (pASK_ectABCD _m) ¹	pASK-IBA3 mit <i>ectABCD</i> aus <i>A. cryptum</i> , Mutation T353C in <i>ectD</i> , AmpR	Bethlehem (2015)
pASK_ectABCDask	pASK-IBA3 mit <i>ectABCDask</i> aus <i>A. cryptum</i> , AmpR	"
pASK_ectABCD2	pASK-IBA3 mit <i>ectABCD</i> aus <i>A. cryptum</i> , AmpR	diese Arbeit
pASK_ectACD	pASK_ectABCD _m , 120 bp in <i>ectB</i> deletiert, AmpR	"
pASK_ectAB	pASK-IBA3 mit <i>ectAB</i> aus <i>A. cryptum</i> , AmpR	"
pASK_ectAB-C	pASK_ectAB mit <i>ectC</i> aus <i>A. cryptum</i> inkl. separatem <i>tet</i> -Promotor, AmpR	"
pET-22b_ectC_Acr_His	pET-22b(+) mit <i>ectC</i> aus <i>A. cryptum</i> inkl. C-terminalem His-Tag, AmpR	Moritz <i>et al.</i> (2015)
pASK_RBS-ectC-Acry	pASK-IBA3 mit <i>ectC</i> aus <i>A. cryptum</i> inkl. C-terminalem His-Tag und RBS aus pET-22b(+), AmpR	diese Arbeit
pASK_ectAB-RectC	pASK_ectAB mit <i>ectC</i> aus <i>A. cryptum</i> inkl. separatem <i>tet</i> -Promotor und RBS aus pET-22b(+), AmpR	"
pRL59EH-Ω	RSF1010-Derivat, <i>tac</i> -Promotor, Lac-Repressor, AmpR, Ω-Kassette mit Sm/SpR	Black & Wolk (1994)
pRL59EH_ectC_Acry_His	pRL59EH-Ω mit <i>ectC</i> aus <i>A. cryptum</i> inkl. C-terminalem His-Tag, AmpR, Sm/SpR	diese Arbeit
pSynect1	pRL59EH-Ω mit <i>ectABCD</i> aus <i>A. cryptum</i> , AmpR, Sm/SpR	"
pSB01	pUC18 mit <i>ectABCDask</i> aus <i>P. stutzeri</i> , AmpR	Seip <i>et al.</i> (2011)
pRL59EH_ectD'_pstu	pRL59EH-Ω mit terminalem Bereich von <i>ectD</i> aus <i>P. stutzeri</i> , AmpR, Sm/SpR	diese Arbeit
pSynect2	pRL59EH-Ω mit <i>ectABCD</i> aus <i>P. stutzeri</i> , AmpR, Sm/SpR	"
pVZ322	RSF1010-Derivat, KmR, GmR	Zinchenko <i>et al.</i> (1999)
pSynect3	pVZ322 mit <i>ectABC</i> aus <i>A. cryptum</i> inkl. <i>psbA1</i> -Promotor aus <i>Synechocystis</i> , KmR, GmR	diese Arbeit

¹ Das Plasmid wurde in dieser Arbeit aufgrund der Mutation als pASK_ectABCD_m bezeichnet

Tab. 2.4: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Acidiphilium cryptum</i> DSM 2389 ^T	Wildtyp	Harrison (1981)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Wildtyp	Grigorieva & Shestakov (1982)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δ GK2	Δ gppS, Km ^R	Marin <i>et al.</i> (1998)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δ GS2	Δ gppS, Sm/Sp ^R	Marin <i>et al.</i> (1998)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15	Hanahan (1983)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB lacI</i> ^q Δ M15 <i>Tn10</i> (Tet ^R)]	Stratagene (San Diego, USA)
<i>Escherichia coli</i> S17-1	RP4-2 (Tc::Mu)(Km::Tn7), <i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR</i> , Sm ^R	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , λ (DE3)	Studier & Moffatt (1986)

2.5 Expressionssysteme

In dieser Arbeit wurden drei induzierbare Expressionssysteme verwendet, die auf dem Prinzip des Tetracyclin-Operons (*tet*-Operon) bzw. des Lactose-Operons (*lac*-Operon) basieren.

pASK-IBA3 Für die heterologe Produktion von Ectoinen in *E. coli* DH5 α wurden die von Bethlehem (2015) hergestellten Expressionsvektoren pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCdask sowie neu konstruierte Vektoren auf Basis von pASK-IBA3 verwendet. Die Gene stehen unter Kontrolle des *tet*-Promotors, der nach Induktion durch geringe AHT-Mengen (0,2 μ g/mL) eine hohe Expression ermöglicht und in Abwesenheit des Induktors effektiv mittels des Repressors TetR inhibiert wird (Skerra, 1994). TetR ist auch auf dem pASK-Vektor codiert und wird konstitutiv exprimiert. AHT bindet etwa 35-mal stärker an den Repressor als der natürliche Induktor Tetracyclin und hat eine geringere antibiotische Wirkung (Degenkolb *et al.*, 1991; Rasmussen *et al.*, 1991).

pRL59EH- Ω Vektoren auf Basis von pRL59EH- Ω wurden zur heterologen Expression in *Synechocystis* und *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Gene stehen unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der ein Hybrid aus dem *trp*- und *lac*-Promotor darstellt (de Boer *et al.*, 1983) und in beiden Stämmen funktionell ist (Ferino & Chauvat, 1989). Die Expression wird mittels des Repressors LacI, der ebenfalls auf dem Vektor codiert ist, inhibiert, wobei trotzdem eine Basalexpression erfolgt. Durch Zugabe des künstlichen Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) kann die Repression aufgehoben und die Expression induziert werden.

pET-System *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His diente als Positivkontrolle für die Detektion von EctC mittels Western Blot und den Nachweis der EctC-Aktivität im Rohextrakt. Das Gen *ectC* steht unter Kontrolle des starken T7-Promotors, der ursprünglich aus dem

Bakteriophagen T7 stammt. *E. coli* BL21 (DE3) enthält im Genom das Gen für die hochselektive T7-RNA-Polymerase, deren Transkription durch den *lacUV5*-Promotor, eine mutierte Version des *lac*-Promotors, kontrolliert wird. Nach Induktion durch IPTG kann die Transkription von *ectC* mittels der exprimierten T7-RNA-Polymerase erfolgen (Studier & Moffatt, 1986).

2.6 Nährmedien und Medienzusätze

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Nährmedien und Medienzusätze mit H₂O_{demin} angesetzt. Flüssigmedien wurden bis zur Verwendung bei Raumtemperatur und Agarplatten bei 4 °C gelagert.

Nährmedium für *A. cryptum*

Medium 269 (M269, modifiziert nach Harrison, 1981) enthielt 0,1 - 0,7 % (w/v) Glycerin oder Glucose Monohydrat als C-Quelle. Dafür wurden 50 x konzentrierte Stammlösungen angesetzt und separat autoklaviert. Die Hefeextrakt-Stammlösung (3 % w/v) wurde ebenfalls separat autoklaviert und anschließend wurden alle Komponenten vereinigt (vgl. Tab. 2.5). Für 2%ige Agarplatten wurden Lösung 1 in 485 mL H₂O (2 x konzentriert) und 4 % (w/v) Agar in 500 mL getrennt autoklaviert. Danach wurden die Lösungen vereinigt und mit 10 mL Hefeextrakt-Stammlösung sowie 20 mL 5 %ige Glycerin-Stammlösung versetzt. Für die Anzucht mit 10, 50, 100 bzw. 300 mM Al₂(SO₄)₃ wurde jeweils eine 2 x konzentrierte Al₂(SO₄)₃-Lösung in H₂O mit 0,25 g K₂HPO₄ pro L (pH 3) angesetzt und sterilfiltriert. Anschließend wurde die 2 x konzentrierte Al₂(SO₄)₃-Lösung mit 2 x konzentriertem M269 (außer K₂HPO₄ 1 x konzentriert) im Verhältnis 1:1 gemischt.

Tab. 2.5: M269 zur Anzucht von *A. cryptum* (L⁻¹)

1.	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g
	KCl	0,1 g
	K ₂ HPO ₄	0,5 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
	pH 3 (H ₂ SO ₄)	
	NaCl	0 - 6 % (w/v)
	H ₂ O	ad 970 mL
2.	Hefeextrakt	0,3 g
		10 mL Stammlösung
3.	C-Quelle	variabel
		20 mL Stammlösung

Nährmedien für *E. coli*

LB-Medium (*lysogeny broth*, modifiziert nach Bertani, 1951) wurde für molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden sowie die Stammhaltung von *E. coli* verwendet (vgl. Tab. 2.6). Für Agarplatten wurde das Medium mit 2 % (w/v) Agar autoklaviert und falls erforderlich danach

mit Antibiotika versetzt. Zur Herstellung von LBG-Medium wurde LB-Medium mit 2 g Glucose Monohydrat pro L angesetzt. Das 2 x YT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) wurde zur Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode und für die Transformation verwendet (vgl. Tab 2.6).

Tab. 2.6: LB- und 2 x YT-Medium für *E. coli* (L⁻¹)

	LB	2 x YT
Caseinpepton	10 g	16 g
Hefeextrakt	5 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
pH	7,2	7,2

Das Minimalmedium 63 (MM63, Larsen *et al.*, 1987, modifiziert nach Miller, 1972) wurde mit 0-1 % (w/v) NaCl angesetzt (vgl. Tab. 2.7). Im Folgenden ist die NaCl-Konzentration der Medienbezeichnung als Zahl angehängt, z.B. MM63-0,5 steht für MM63 mit 0,5 % (w/v) NaCl. Für MgSO₄ und FeSO₄ wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 250 mg/mL bzw. 1,1 mg/mL verwendet. Als C-Quelle enthielt MM63 hauptsächlich 50 mM Glycerin oder 25 mM Glucose. Dazu wurden 20 x konzentrierte Stammlösungen angesetzt und separat von den restlichen Medienbestandteilen autoklaviert. Alternativ dienten Lactat, Pyruvat, Acetat, Malat, Aspartat und Glutamat einzeln bzw. in Kombination mit Glycerin oder Glucose als C-Quelle (vgl. 3.3.1.3).

Tab. 2.7: MM63 zur Anzucht von *E. coli* (L⁻¹)

1.	KH ₂ PO ₄	13,61 g
	KOH	4,21 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
		1 mL Stammlösung
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0011 g
		1 mL Stammlösung
	pH 7,1 (KOH)	
	NaCl	0-1 % (w/v)
	H ₂ O	ad 950 mL
2.	C-Quelle	variabel
		50 mL Stammlösung

Zur Herstellung des ungepufferten Fermentationsmediums (vgl. Tab. 2.8) wurden die Lösungen 1 - 3 separat autoklaviert und anschließend vereinigt. Die FeSO₄-Stammlösung (5 mg/mL) wurde sterilfiltriert und zu den anderen Komponenten gegeben. Im Fermentationsverlauf wurde autoklavierte 5 M Glycerin-Stammlösung nach Bedarf zugegeben.

Tab. 2.8: Fermentationsmedium für *E. coli* (L⁻¹)

1.	NH ₄ Cl	3,82 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,80 g
	pH 7,5 (KOH)	
	NaCl	5,00 g
	H ₂ O	ad. 900 mL
2.	KH ₂ PO ₄	1,54 g
	H ₂ O	ad. 50 mL
3.	Glycerin	4,65 g
	H ₂ O	ad. 50 mL
4.	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
		2 mL Stammlösung

Nährmedium für *Synechocystis*

Für die Anzucht von *Synechocystis* wurde das BG11-Medium (*Medium for Blue Green Algae*) modifiziert nach Rippka *et al.* (1979) verwendet (vgl. Tab. 2.9). Für die Medienkomponenten 1 - 7 wurden 200 x konzentrierte Stammlösungen angesetzt und separat autoklaviert. Stammlösung 7 wurde dunkel gelagert. Zur Herstellung von 1 L BG11 wurden 5 mL jeder Stammlösung und 1 mL Spurenelementlösung (vgl. Tab. 2.10) zu 964 mL H₂O gegeben. Bei Bedarf wurden 0,1 - 2 % (w/v) NaCl hinzugefügt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und hatte nach dem Abkühlen einen pH-Wert von 7,5 - 8,0. Für BG11-N wurde BG11-Medium ohne NaNO₃ angesetzt.

Tab. 2.9: BG11 zur Anzucht von *Synechocystis*

BG11-Flüssigmedium		L ⁻¹	BG11-Agarplatten	
1.	NaNO ₃	1,5 g	2 x BG11	
2.	K ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	31,3 mg	Stammlösung 1 - 7	je 5 mL
3.	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75 mg	Spurenelementlösung	1 mL
4.	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	36 mg	Na ₂ S ₂ O ₃	3 g
5.	EDTA	1,1 mg	1 M TES (pH 8)	10 mL
6.	Na ₂ CO ₃	40 mg	H ₂ O	ad 500 mL
7.	Citronensäure	6 mg	2 x Agar	
	Ammoniumeisen(III)-citrat	6 mg	Agar	15 g
8.	Spurenelementlösung	1 mL	H ₂ O	ad 500 mL

Vor dem Animpfen wurde NaHCO₃ in einer Endkonzentration von 5 mM zum BG11-Medium gegeben. Dafür wurde eine 1 M Stammlösung sterilfiltriert und in Aliquots á 2 mL bei -20 °C gelagert. Für Agarplatten (1,5 % w/v) wurden 2 x BG11 und 2 x Agar getrennt autoklaviert und anschließend 1:1 gemischt (vgl. Tab. 2.9). Danach wurden NaHCO₃ (5 mM Endkonzentration) und falls erforderlich Antibiotika zugegeben. Die Agarplatten wurden dick gegossen (ca. 40 mL/Platte), um ein zu schnelles Austrocknen während der Stammlagerung zu vermeiden.

Medienzusätze

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medienzusätze sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Vitaminlösung Für die Kultivierung der Thiamin-auxotrophen Stämme *E. coli* DH5 α und XL1-Blue in MM63 wurde pro L Medium 1 mL Vitaminlösung (VA-Lösung nach Imhoff & Trüper, 1977) zugegeben. Die VA-Lösung (vgl. Tab. 2.10) wurde bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Spurenelementlösung Für die Herstellung von BG11 wurde pro L Medium 1 mL Spurenelementlösung (Rippka *et al.*, 1979) zugegeben (vgl. Tab. 2.10), die bei 4 °C gelagert wurde.

Tab. 2.10: Vitamin- und Spurenelementlösung

VA-Lösung	L ⁻¹	Spurenelementlösung	L ⁻¹
Biotin	100 mg	H ₃ BO ₃	2,86 g
Nicotinamid	350 mg	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,81 g
Thiamin Hydrochlorid	300 mg	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	222 mg
p-Aminobenzoesäure	200 mg	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	390 mg
Pyridoxal Hydrochlorid	100 mg	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	79 mg
Calcium-Pantothenat	100 mg	Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	49 mg
Cyanocobalamin	50 mg		

Antibiotika Für die Kultivierung der *Synechocystis*-Mutanten Δ GK2 und Δ GS2 sowie der Plasmid-tragenden *E. coli*- und *Synechocystis*-Stämme wurden die jeweiligen Antibiotika vor dem Animpfen zum Medium gegeben (vgl. Tab. 2.11). Dafür wurden 1000x konzentrierte Stammlösungen in H₂O_{reinst} angesetzt und in Aliquots á 2 mL bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.11: Antibiotika

Stamm	Vektor	Antibiotikum	Endkonzentration im Medium [μ g/mL]
<i>E. coli</i>	pASK-Vektoren	Carbenicillin	100
<i>E. coli</i>	pRL59EH-Vektoren	Carbenicillin	100
		+ Spectinomycin	10
		+ Streptomycin	1
<i>E. coli</i>	pVZ322-Vektoren	Kanamycin	25
		+ Gentamicin	7,5
<i>Synechocystis</i>	pRL59EH-Vektoren	Spectinomycin	35
		+ Streptomycin	1
<i>Synechocystis</i>	pVZ322-Vektoren	Kanamycin	25
		+ Gentamicin	5
<i>Synechocystis</i> Δ GK2	-	Kanamycin	50
<i>Synechocystis</i> Δ GK2	pSynect2	Kanamycin	25
		+ Spectinomycin	10
<i>Synechocystis</i> Δ GS2	-	Spectinomycin	20
<i>Synechocystis</i> Δ GS2	pSynect3	Kanamycin	25
		+ Spectinomycin	10
		+ Gentamicin	5

Induktor Im Fall von *E. coli*-Stämmen mit pASK-Vektoren erfolgte die Induktion der heterologen Expression durch Zugabe von AHT (0,2 - 0,6 µg/mL Endkonzentration). Dafür wurde eine AHT-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/mL in reinem Ethanol angesetzt und bei -20 °C dunkel gelagert. Bei *E. coli*- und *Synechocystis*-Stämmen mit pRL59EH-Vektoren sowie bei *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration), wofür eine 100 mM Stammlösung in H₂O_{reinst} verwendet wurde.

Kompatible Solute Für das Wachstum von *E. coli* in MM63 mit 2 mM Glycinbetain wurde eine 200 mM Stammlösung in H₂O_{reinst} angesetzt. Für die Anzucht von *Synechocystis* in BG11-N mit 9 mM Ectoin als potentieller N-Quelle wurde eine 0,9 M Stammlösung in H₂O_{reinst} verwendet.

2.7 Bestimmung der osmotischen Konzentration

Die osmotische Konzentration von M269 mit NaCl und Al₂(SO₄)₃ wurde mittels Dampfdruckosmometer (Knauer Nr. 11.00, Berlin) und Gefrierpunktsmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) ermittelt. Beim Dampfdruckosmometer befinden sich zwei hochempfindliche Temperatursensoren (Thermistoren) in einer mit Lösungsmitteldampf gesättigten Messzelle. Auf einen Thermistor wird das reine Lösungsmittel und auf den anderen die zu untersuchende Lösung getropft. Da der Dampfdruck der Lösung mit gelösten Stoffen niedriger ist als der des reinen Lösungsmittels, kondensiert Lösungsmitteldampf auf den Thermistor mit dem Lösungstropfen. Die frei werdende Kondensationswärme bewirkt eine messbare Temperaturänderung, die proportional zur Stoffmenge der Lösung ist. Bei der Messung der osmotischen Konzentration mittels Gefrierpunktsmometer wird ausgenutzt, dass eine Lösung mit gelösten Stoffen bei einer geringeren Temperatur gefriert als das reine Lösungsmittel und die Gefrierpunktserniedrigung proportional zur Stoffmenge ist. Die zu untersuchende Lösung wird in einem Kunststoffgefäß mit einem Thermistor zur Temperaturmessung unter den Gefrierpunkt abgekühlt. Bei einer definierten Temperatur wird das Gefrieren der Lösung durch Eintauchen einer Nadel mit Eiskristallen initiiert. Durch die frei werdende Kristallisationswärme steigt die Temperatur der Lösung an, wobei die maximal erreichte Temperatur dem Gefrierpunkt der Lösung entspricht.

Mit beiden Methoden wurde die Osmolalität (Osmol/kg) von M269 mit 0,1 % Glycerin und 20 - 900 mM NaCl bzw. Al₂(SO₄)₃ gemessen. Die Osmolalität des Mediums ohne Zusatz von NaCl und Al₂(SO₄)₃ wurde von den Messwerten abgezogen. Die Bestimmung mittels Dampfdruckosmometer erfolgte bei 37 °C, ansonsten wurden die Messungen mit beiden Osmometern gemäß der Herstellerangaben durchgeführt.

2.8 Kultivierungsverfahren

2.8.1 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

E. coli* und *A. cryptum Die Langzeitlagerung der Bakterien erfolgte in Kryokulturen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zur Reaktivierung wurden *E. coli*-Stämme auf LB-Agarplatten, falls erforderlich mit Antibiotika (vgl. Tab. 2.11), und *A. cryptum* auf M269-Agarplatten ausgestrichen sowie bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank (B 6420, Heraeus Instruments, Hanau) inkubiert. Im Fall von *A. cryptum* erfolgte die Inkubation 3-5 Tage und bei *E. coli* über Nacht. Stammkulturen wurden bis zu sechs Wochen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und danach auf frische Agarplatten überimpft, außer Plasmid-tragende *E. coli*-Stämme, die maximal zwei Wochen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und für erneute Experimente aus der Kryokultur reaktiviert wurden.

Synechocystis Die langfristige Lagerung von *Synechocystis* erfolgte auf Agarplatten und in Standkulturen basierend auf BG11-Medium (ggf. mit Antibiotika, Tab. 2.11). Agarplatten wurden 5-7 Tage bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer konstanten Beleuchtungsstärke von $15\text{--}25\text{ }\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ im Lichtbrutschrank (RUMED 1201, Rubarth Apparate, Laatzen, mit Philips Glühlampen Standard 40 Watt) inkubiert. Dabei waren die Agarplatten mit Leucopore-Band (Duchefa, Haarlem, Niederlande) gegen zu schnelles Austrocknen des Agars versehen. Für die Standkulturen wurden 50 mL BG11-Medium in 100 mL-Weithalskolben auf eine optische Dichte bei 750 nm (OD_{750}) von 0,15-0,2 mit Zellmaterial aus einer Flüssigkultur oder von der Agarplatte angeimpft. Die Kulturen wurden im Thermoschüttler (Innova 4230, New Brunswick, Edison, USA, mit Philips Leuchtstoffröhre TL 13 Watt/840) bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 130-150 rpm und einer Beleuchtungsstärke von $20\text{--}50\text{ }\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ bis zu einer OD_{750} von ca. 1 angezogen.

Anschließend wurden die Agarplatten und Standkulturen auf der Laborbank bei $5\text{--}20\text{ }\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ im Tag-Nacht-Rhythmus gelagert. *Synechocystis* Wildtyp wurde nach 6-8 Wochen überimpft, während für Kulturen mit Antibiotika nach spätestens vier Wochen frische Standkulturen hergestellt wurden. Kryokulturen in BG11 mit 8% (v/v) DMSO wurden mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Reinheitskontrolle Zur Überprüfung auf Kontamination einzelner Kulturen wurden diese mikroskopiert und im Fall von *Synechocystis* zusätzlich 100 μL auf BG11-Agarplatten mit 0,2% (w/v) Glucose sowie 0,02% (w/v) Casaminsäuren ausgestrichen und im Dunkeln bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.8.2 Anzucht von *A. cryptum*

Für Wachstumsversuche wurden Flüssigkulturen von *A. cryptum* in sogenannten OD-Kolben angezogen, wobei es sich um modifizierte Weithals-Erlenmeyerkolben handelt. Durch das seitlich an den Kolben angebrachte Glasrohr konnte die OD der Kultur bei 600 nm (OD_{600}) ohne vorherige Probennahme photometrisch bestimmt werden (vgl. 2.8.5). Außerdem besitzt der OD-Kolben eine mit einem Schraubdeckel verschließbare Öffnung, über die während des Wachstums Probennahmen

und Supplementierungen erfolgen konnten. Für eine ausreichende O₂-Versorgung enthielt der OD-Kolben Schikanen und wurde mit einer Silikon-Schaumstoffkappe (Merck, Darmstadt) verschlossen.

A. cryptum wurde in M269 (pH 3) mit 0,1 - 0,7 % Glycerin oder Glucose als C-Quelle bei 37 °C und 180 rpm im Thermoschüttler (AI 70, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) kultiviert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Anzucht in M269 mit 0,1 % Glycerin. Für die Vorkulturen wurden 20 - 50 mL Medium in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit Zellmaterial von der Agarplatte beimpft und über Nacht bzw. für mehrere Tage inkubiert. Für die Wachstumsversuche wurden Hauptkulturen in 250 mL-OD-Kolben inkl. 100 - 150 mL M269 mit der entsprechenden Vorkultur auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,05 - 0,1 angeimpft und bis zur stationären Phase kultiviert. Dabei enthielt das Medium 1 - 6 % NaCl, 10 - 300 mM Al₂(SO₄)₃ oder keinen Zusatz. Bei Wachstum mit 50 mM Al₂(SO₄)₃ wurde eine Vorkultur inkl. 10 mM Al₂(SO₄)₃ verwendet und für Hauptkulturen mit 100 bzw. 300 mM Al₂(SO₄)₃ erfolgte eine Vorkultivierung mit 50 mM Al₂(SO₄)₃, um eine lange lag-Phase zu vermeiden. Für die ¹³C-NMR-Spektroskopie wurden insgesamt 4 L M269 mit 3 % NaCl bzw. 300 mM Al₂(SO₄)₃ á 0,5 L-Kulturen in 1 L-OD-Kolben kultiviert.

2.8.3 Anzucht von *E. coli*

Für die Kultivierung der Thiamin-auxotrophen Stämme *E. coli* DH5 α und XL1-Blue in Minimalmedium wurde 1 mL Vitaminlösung pro L Medium zugegeben. Plasmid-tragende Stämme wurden mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert (vgl. 2.11). Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Anzucht von *E. coli* bei 37 °C und 180 rpm im Thermoschüttler.

2.8.3.1 Übernachtskulturen

Für die Plasmid-Isolierung aus frisch transformierten *E. coli*-Stämmen wurden Kulturröhrchen mit 3 - 5 mL LB- oder LBG-Medium befüllt, mit einer gut vereinzelt Kolonie von der Selektionsplatte beimpft und über Nacht inkubiert. Übernachtskulturen für andere molekularbiologische Methoden wurden in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit 20 - 50 mL Komplexmedium und Zellmaterial von der Agarplatte angezogen.

2.8.3.2 Anzucht im Schüttelkolben

Die Vorkulturen der *E. coli*-Stämme wurden in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit 30 - 50 mL des jeweiligen Mediums und Zellmaterial von der Agarplatte für 15 - 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Vorkulturen in der Regel bei geringer Umdrehungszahl abzentrifugiert und nach Entfernen des Kulturüberstands in frischem Medium vorsichtig resuspendiert (vgl. 2.8.6).

Für die Wachstumsversuche mit *E. coli* im Schüttelkolben wurden OD-Kolben verwendet (vgl. 2.8.2). Falls nicht anders erwähnt, wurden für die Hauptkulturen 100 mL MM63 in 250 mL-OD-Kolben mit resuspendierten Zellen der jeweiligen Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,1

angepflegt und bis zur stationären Phase kultiviert. Dabei dienten vornehmlich 50 mM Glycerin oder 25 mM Glucose als C-Quelle. Alternativ wurden Lactat, Pyruvat, Acetat, Malat, Aspartat und Glutamat einzeln bzw. in Kombination mit Glycerin oder Glucose als C-Quelle für die Ectoin-Produktion getestet. Für manche Wachstumsversuche wurde MM63 mit 100 mM Glycerin oder mit 150 mM Glycerin sowie der doppelten Stickstoffmenge verwendet. Darüber hinaus enthielt MM63 0-1 % NaCl. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Hauptkulturen von *E. coli* DH5 α -Stämmen mit pASK-Vektoren zur Induktion der heterologen Expression bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,35 mit AHT versetzt (0,2 μ g/mL Endkonzentration). Bei einigen Wachstumsversuchen erfolgte die Induktion mit einer AHT-Konzentration von 0,4 oder 0,6 μ g/mL.

Im Fall von *E. coli* XL1-Blue mit pRL59EH-Derivaten und *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His wurde die heterologe Expression bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 mit IPTG induziert (0,5 mM Endkonzentration). Außerdem wurde XL1-Blue in MM63 mit Glucose kultiviert und die Hauptkulturen wurden mit der jeweiligen Vorkultur, ohne vorherige Zentrifugation, auf eine OD₆₀₀ von 0,08-0,1 angepflegt.

Wenn erforderlich, wurden im Wachstumsverlauf 1-10 mL Kultur aus den Hauptkulturen steril entnommen und für die HPLC-Analyse (Medienüberstand und ggf. Zellpellet) bzw. Proteinanalyse (Zellpellet) abzentrifugiert (vgl. 2.8.6). Für die Produktion im Wachstumsverlauf in MM63-1 mit Glucose wurden 400 mL-Kulturen von *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCask in 1 L-OD-Kolben kultiviert.

2.8.3.3 Anzucht im Fermenter

Für die Ectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m im größeren Maßstab unter kontrollierten Wachstumsbedingungen wurde ein 1 L-Fermenter mit Temperatursteuerung und Rührvorrichtung (DASGIP, Jülich) verwendet. Der Fermenter wurde inkl. der pH-Sonde (Mettler Toledo, Gießen) und befüllt mit H₂O_{demin} nach Herstellerangaben autoklaviert. In Anlehnung an MM63 wurde ein ungepuffertes Fermentationsmedium mit 0,5 % NaCl und einer Anfangskonzentration von 50 mM Glycerin verwendet (vgl. 2.8). Die Vorkultur wurde in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben mit 50 mL Fermentationsmedium inkl. Tris/HCl zur Pufferung (12 g/L) und Zellmaterial von der Agarplatte für 15-24 h angezogen. Für die Fermentation wurden 700 mL Medium mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 angepflegt und der pH-Wert manuell mit 2 M KOH auf 7,1 eingestellt. Die Kultur wurde mit einer Heizmanschette auf 37 °C temperiert und mit 300-350 rpm mittels Magnetrührer durchmischt. Die sterile Luftzufuhr erfolgte über einen Kompressor (DK50 Plus, Ekom, Ahrensburg) und anschließenden Sterilfilter. Der pH-Wert wurde während der Fermentation mittels pH-Sonde kontrolliert und automatisch über Regelkreis-regulierte Peristaltikpumpen mit 1 M HCl bzw. 2,7 M NH₃-Lösung auf 6,9-7,1 eingestellt. Auftretende Schaumbildung wurde durch sterile Zugabe von Antischaum (Dehysan Z 2111, Cognis Deutschland, Düsseldorf) reduziert. Für die OD₆₀₀-Messung und die HPLC-Analyse der Medienüberstände wurden im Wachstumsverlauf 2 mL-Proben

über das im Fermenter integrierte Probennahmerohr entnommen. Die Induktion der heterologen Expression erfolgte bei einer OD_{600} von ca. 0,35 mit AHT (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Endkonzentration). Im Verlauf der Fermentation wurden mehrmals 3 - 5 mL 5 M Glycerin-Stammlösung manuell zugegeben. Weiterhin erfolgte im späteren Wachstumsverlauf eine erneute Zugabe von Carbenicillin und AHT.

2.8.3.4 Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen

Die Ganzzellbiokatalyse von Ectoin aus Aspartat und Glycerin mit ruhenden Zellen von *E. coli* pASK_ectABCD_m wurde in Anlehnung an die Arbeiten von He *et al.* (2015) durchgeführt. Vorkultur und Hauptkultur wurden in MM63-1 mit Glucose, wie zuvor beschrieben, angezogen (vgl. 2.8.3.2). Allerdings erfolgte die Induktion mit AHT bei einer OD_{600} von etwa 0,6 und die Hauptkultur wurde anschließend für 7 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert (vgl. 2.8.6) und in Reaktionspuffer G (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7, 100 mM Aspartat, 100 mM Glycerin) resuspendiert. Der Reaktionsansatz, 50 mL im 250 mL-Erlenmeyerkolben, wurde auf eine OD_{600} von ca. 5 eingestellt. Die Ganzzellbiokatalyse erfolgte 40 h bei 30 °C und 180 rpm. Für die HPLC-Analyse wurden in regelmäßigen Zeitabständen 1 mL-Proben steril entnommen und abzentrifugiert (vgl. 2.8.6).

2.8.4 Anzucht von *Synechocystis*

Die ΔggpS -Mutanten und Plasmid-tragenden *Synechocystis*-Stämme wurden mit den jeweiligen Antibiotika angezogen (vgl. Tab. 2.11). Für die Kultivierung wurden 100 mL- oder 250 mL-Weithalskolben mit Wattestopfen bzw. Silikon-Schaumstoffkappen und 50 bzw. maximal 150 mL BG11-Medium verwendet. *Synechocystis* wurde photoautotroph mit einer konstanten Beleuchtungsstärke von 20 - 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 30 °C und 130 - 150 rpm im Thermoschüttler angezogen. Die Vorkulturen der verschiedenen *Synechocystis*-Stämme wurden aus den entsprechenden Standkulturen (vgl. 2.8.1) auf einen OD_{750} -Wert von bis zu 0,2 angeimpft. Wenn erforderlich, wurden die Vorkulturen für die weitere Verwendung unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert (vgl. 2.8.6). Die Hauptkulturen wurden aus einer exponentiell oder spät exponentiell wachsenden Vorkultur (OD_{750} 0,7 - 1,0) auf eine Start- OD_{750} von 0,15 - 0,2 angeimpft und bis zur Zellernte ($OD_{750} > 1$) oder dem erneuten Überimpfen mehrere Tage kultiviert. Für einige Wachstumsversuche enthielt das BG11-Medium 20 - 340 mM NaCl (0,1 - 2 %). Die Hauptkulturen der *Synechocystis*-Stämme mit pRL59EH- Ω -Vektoren wurden beim Animpfen mit IPTG (0,5 mM Endkonzentration) supplementiert oder ohne Induktor angezogen.

Darüber hinaus wurde das Wachstum von *Synechocystis* Wildtyp und ΔggpS -Mutanten auf BG11-Agarplatten mit 2 % NaCl untersucht. Dazu wurden die Agarplatten mit 100 μL Kultur oder Zellmaterial von der Agarplatte beimpft, mit luftdurchlässigem Leucopore-Band verschlossen und 5 - 10 Tage bei 30 °C und einer Beleuchtungsstärke von 15 - 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Lichtbrutschrank inkubiert. Selektionsplatten wurden nach der Konjugation von *Synechocystis*

(vgl. 2.10.8) unter den gleichen Bedingungen über Nacht inkubiert.

Für die Wachstumsversuche von *Synechocystis* in BG11 ohne Natriumnitrat (BG11-N) mit Ectoin als potenzieller N-Quelle erfolgte die Anzucht zunächst in BG11 unter den zuvor genannten Bedingungen. Bei Erreichen einer OD_{750} von 0,6-0,8 wurden die Kulturen unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert (vgl. 2.8.6) und das Zellpellet mit BG11-N gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in BG11-N mit 0-100 mM NaCl resuspendiert und die Kulturen auf eine OD_{750} von ca. 0,4 eingestellt. Das Wachstum erfolgte entweder ohne N-Quelle (Negativkontrolle) oder mit 9 mM Ectoin als potenzieller N-Quelle (BG11-N +E), was der gleichen Stickstoffmenge wie bei BG11 in Form von Natriumnitrat entspricht (0,25 g N/L). Als positive Wachstumskontrolle wurde *Synechocystis* unter den gleichen Bedingungen in BG11 kultiviert. Die Kulturen wurden 5-10 Tage, wie zuvor beschrieben, inkubiert und beobachtet, ob Wachstum stattfindet.

2.8.5 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern

Zur Beobachtung des Wachstums von *E. coli* und *A. cryptum* wurde in regelmäßigen Zeitabständen die OD_{600} im OD-Kolben oder in 1 mL-Kunststoffküvetten gegen das jeweilige Medium als Leerwert mit einem Photometer (Novaspec II, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt. Falls nicht anders vermerkt, erfolgte die Messung im OD-Kolben unverdünnt über das seitliche Glasrohr. Die lineare Beziehung zwischen OD_{600} und Zelldichte der Kultur war bis zu einem Wert von etwa 0,4 gegeben. Die Methode der Direktmessung wurde als ausreichend angesehen, um den Wachstumsverlauf aufzuzeichnen und das Wachstum der Kulturen zu vergleichen. Im Fall von *Synechocystis* wurde die OD_{750} stets in 1 mL-Küvetten gegen BG11-Medium photometrisch bestimmt.

Bei der Messung in der Küvette wurden die Kulturen ab einem OD-Wert von ca. 0,4 mit dem entsprechenden Medium verdünnt. Zur Darstellung des Wachstumsverlaufs wurde der natürliche Logarithmus der OD-Werte gegen die Zeit aufgetragen. Die Wachstumsrate μ wurde anhand der höchsten Steigung in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt. Bei vorheriger Messung im OD-Kolben wurden nur OD-Wert bis 0,4 zur Berechnung der Wachstumsrate miteinbezogen. Die Verdopplungszeit t_d ergab sich aus $\ln(2)/\mu$. Bei Wachstumsversuchen wurde der pH-Wert der Kulturüberstände nach der Zellernte bestimmt. Dazu wurden pH-Indikatorstäbchen (Merck) oder ein pH-Meter (Knick, Berlin) gemäß der Herstellerangaben verwendet.

2.8.6 Zellernte

Wenn nicht anders erwähnt, erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur.

Ernte für anschließende Wachstumsversuche Vorkulturen von *E. coli* und die Hauptkultur für die Ganzzellbiokatalyse wurden unter sterilen Bedingungen in 50 mL-Falcon-Röhrchen 12 min bei $4.500 \times g$ zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 mit Rotor BS4402, Thermo Scientific). Der Medienüberstand wurde verworfen, das Zellpellet vorsichtig in 1-2 mL frischem Medium resuspendiert und

zum Animpfen der Hauptkulturen verwendet (vgl. 2.8.3.2). Für die Ganzzellbiokatalyse wurden die Zellen in Reaktionspuffer G überführt (vgl. 2.8.3.4). Die Zentrifugation von *Synechocystis*-Kulturen für anschließende Wachstumsversuche erfolgte standardmäßig in sterilen 50 mL-Falcon-Röhrchen bei 4.000 x *g* für 10 min (Heraeus Megafuge). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet für die weitere Verwendung in frischem BG11-Medium oder BG11-N vorsichtig resuspendiert (vgl. 2.8.4).

Ernte für die HPLC-Analyse Wenn nicht anders angegeben, wurden Hauptkulturen für die HPLC-Analyse in der stationären Phase geerntet. Die Ernte großer Kulturvolumina (100 - 500 mL) erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation bei 8.500 rpm (ca. 11.000 x *g*) und 20 °C in einer Beckman-Zentrifuge (J2-HS mit Rotor JA-14, Beckman Coulter, Brea, USA). Vom Medienüberstand wurde 1 mL für die HPLC-Analyse abgenommen und bei -20 °C gelagert. Das feuchte Zellpellet wurde auf einem Glas-Mikrofaserfilter (VWR) ausgestrichen, um überschüssiges Medium aus den Zellzwischenräumen zu entfernen. Anschließend wurde das Zellmaterial vom Filter in ein Reaktionsgefäß geeigneter Größe überführt und für die Gefriertrocknung bei -20 °C eingefroren.

Im Fall von *Synechocystis* erfolgte die Zentrifugation von bis zu 40 mL Kultur in Falcon-Röhrchen für 15 min bei 6.000 x *g* (Heraeus Megafuge) und bei größeren Kulturvolumina in Zentrifugenbechern für 20 min bei 8.500 rpm (ca. 11.000 x *g*) und 20 °C (Beckman-Zentrifuge). Der Überstand wurde bis auf 1 mL Probe für die HPLC-Analyse verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 - 2 mL BG11 resuspendiert und in einem 2 mL-Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert, um den Verlust an Zellmaterial zu minimieren. Die Zentrifugation erfolgte 5 min bei 10.000 x *g* in der Tischzentrifuge (Eppendorf 5418, Hamburg). Danach wurde der Überstand quantitativ entfernt und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Proben aus dem Wachstumsverlauf von *E. coli* (1 - 2 mL) wurden im 2 mL-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 10.000 x *g*, 2 min) und 1 mL Überstand für die HPLC-Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

Ernte für die Protein-, DNA- und RNA-Analyse Kleine Probenvolumina (≤ 10 mL) wurden in einem 2 mL-Reaktionsgefäß, ggf. in mehreren Schritten, bei 10.000 x *g* und 1 - 5 min in der Tischzentrifuge geerntet. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das Zellpellet entweder direkt weiter behandelt oder bei -20 °C gelagert. Für die Protein- und DNA-Extraktion aus größeren *Synechocystis*-Kulturproben (20 - 40 mL) erfolgte die Zellernte im Falcon-Röhrchen wie zuvor für die HPLC-Analyse beschrieben. *E. coli*- und *A. cryptum*-Kulturen für die RNA-Analyse wurden in sterilen 50 mL-Falcon-Röhrchen 15 min bei 6.000 x *g* und 4 °C zentrifugiert (Avanti J-20 XP mit Rotor JA-10, Beckman Coulter).

2.9 Analytik

2.9.1 Gefriertrocknung

Für die Gewinnung der Trockenbiomasse (TBM) und für die Solutextraktion wurde das Zellmaterial gefriergetrocknet, wobei den gefrorenen Zellen durch Sublimation schonend das Wasser entzogen wurde. Falls erforderlich, wurden auch Medienüberstände und andere Proben gefriergetrocknet. Die Gefriertrocknung der gefrorenen Zellpellets bzw. Proben erfolgte 12-24 h in der Anlage Alpha I-6 der Firma Christ (Osterode) bei einem Hochvakuum von 0,05 Millibar und 20-30 °C.

2.9.2 Solutextraktion nach Bligh & Dyer (1959)

Zur Bestimmung des intrazellulären Solutgehalts mittels HPLC (vgl. 2.9.4) wurden die wasserlöslichen Solute nach einem Verfahren von Bligh & Dyer (1959, modifiziert nach Galinski, 1986) aus dem gefriergetrockneten Zellmaterial extrahiert. Diese Methode ermöglicht die Trennung von hydrophoben und hydrophilen Zellbestandteilen in einem Zwei-Phasen-System bestehend aus Chloroform und einem Wasser-Methanol-Gemisch. Proteine und andere makromolekulare Zellbestandteile werden an der Grenzschicht zwischen Chloroform und wässriger Phase ausgefällt. Zunächst wurden 500 µL Bligh & Dyer-Lösung zu 30 mg des gefriergetrockneten und gemörserten Zellmaterials gegeben und 15 min bei Raumtemperatur auf einem Rotationsschüttler (IKA-Vibrax-VXR, Typ VX2E, Janke & Kunkel, Staufen) inkubiert. Nach Zugabe von 130 µL Chloroform und 130 µL H₂O_{reinst} wurde der Ansatz weitere 15 min geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz zentrifugiert (Tischzentrifuge, 10.000 rpm, ca. 8600 x g, 5 min) und die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, das bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert wurde. Für kleinere Mengen an Zellmaterial (10-20 mg) wurden die Volumina der verwendeten Reagenzien halbiert. Für die ¹³C-NMR-Spektroskopie (vgl. 2.9.5) wurden in mehreren Ansätzen 60 mg gefriergetrocknetes Zellmaterial und die doppelten Mengen eingesetzt.

2.9.3 Solutextraktion aus *Synechocystis*

Für *Synechocystis* wurde neben der Solutextraktion nach Bligh & Dyer (1959) zum Vergleich eine weitere Extraktionsmethode (modifiziert nach Mikkat *et al.*, 1997) verwendet. Mit beiden Methoden ergaben sich annähernd gleiche Ergebnisse bei der anschließenden HPLC-Analyse der Zellextrakte. Das gefriergetrocknete oder feuchte Zellpellet wurde zur Extraktion der Solute in 0,5 mL 80%igem (v/v) Ethanol für 3 h bei 65 °C inkubiert und zwischendurch gemischt. Anschließend wurde der Ansatz 10 min in der Tischzentrifuge bei 14.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet in 0,5 mL Ethanol (80%) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und gefriergetrocknet (vgl. 2.9.1). Der gefriergetrocknete Ansatz wurde in 1 mL H₂O_{reinst} aufgenommen und mit 0,5 mL

Chloroform gemischt, um Proteine und andere makromolekulare Zellbestandteile abzutrennen. Nach Zentrifugation (14.500 x g, 15 min) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und erneut mit 0,5 mL Chloroform gewaschen sowie zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase ggf. in einem Vakuumkonzentrator (SpeedVac Savant ISS110, Thermo Scientific) eingengt und bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert.

2.9.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) ist ein Verfahren zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von gelösten, niedermolekularen Substanzen. Dazu wird die zu untersuchende Stoffprobe in einem geeigneten Laufmittel (mobile Phase) unter hohem Druck über eine dicht gepackte Trennsäule (stationäre Phase) gepumpt. Bei der isokratischen HPLC bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase konstant, während bei der HPLC mit einem Gradientenprofil das Lösungsmittelgemisch im Verlauf der Elution verändert wird. Die in der Probe enthaltenen Substanzen interagieren aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften (z.B. Größe, Polarität) verschieden stark mit der stationären Phase, wodurch sie unterschiedlich schnell von der Säule eluieren. Die Elution wird über nachgeschaltete Detektoren verfolgt, wobei sich für jede Verbindung eine charakteristische Retentionszeit ergibt. Die Identifizierung und Quantifizierung der aufgetrennten Substanzen erfolgt durch Vergleich der Signale mit denen von Standardverbindungen bekannter Konzentration.

Die Zellextrakte und Medienüberstände wurden zum Nachweis ungeladener und zwitterionischer Solute mittels isokratischer HPLC untersucht (vgl. 2.9.4.1). Im Fall von *E. coli* und *Synechocystis* wurden die Medienüberstände und ggf. Zellextrakte zur Identifizierung von Aminosäuren und anderen N-reaktiven Soluten zusätzlich via Fmoc-ADAM-HPLC mit Gradientenprofil analysiert (vgl. 2.9.4.3). Die Quantifizierung von ADABA und Ectoin in den Proben des EctC-Aktivitätstests (vgl. 2.11.7) erfolgte ebenfalls mit beiden HPLC-Methoden. Falls erforderlich, wurden die Medienüberstände der Produktionsstämme mittels einer weiteren isokratischen HPLC-Methode speziell für organische Säuren und Zucker untersucht (vgl. 2.9.4.2). Steuerung und Auswertung der HPLC-Messungen erfolgte mit der Software ChromQuest 5.0.

2.9.4.1 Nachweis ungeladener und zwitterionischer Solute mittels isokratischer HPLC

Zum Nachweis wasserlöslicher Substanzen, die bei physiologischem pH-Wert keine Nettoladung besitzen, wurde eine isokratische HPLC mit Brechungsindex (RI)- und UV-Detektion verwendet (Galinski, 1986). Mit dieser Methode wurden vornehmlich Ectoin, Hydroxyectoin und Trehalose quantifiziert. Als stationäre Phase diente eine Reversed-Phase-Kieselgelmatrix, deren Hydroxylgruppen über hydrophobe Abstandshalter (Propylketten) mit polaren endständigen Aminogruppen verknüpft waren. Als mobile Phase wurde 80%iges (v/v) Acetonitril mit einem physiologischen pH-Wert verwendet.

Aufbau der HPLC-Anlage

- Entgaser (SpectraSystem SCM1000, Thermo Scientific)
- Pumpe (SpectraSystem P100, Thermo Separation Products)
- Probenaufgabeeventil (Rheodyne Injector Nr. 7125, Probenschleife 20 μ L, Rheodyne LLC)
- Vorsäule (LiChrospher 100 NH₂, 5 μ m, LiChroCART 4-4, Merck)
- Trennsäule (LiChrospher 100 NH₂, 5 μ m, LiChroCART 125-4, Merck)
- UV-Detektor (SpectraSystem UV1000, 210 nm, Thermo Separation Products)
- RI-Detektor (Shodex RI-71, Showa Denko K.K.)

Probenvorbereitung Zellextrakte wurden 1:4 - 1:10 und Medienüberstände 1:5 - 1:20 mit 80%igem Acetonitril verdünnt. Die Proben des Aktivitätstests von EctC waren bereits 1:1 mit Acetonitril (100%) verdünnt und wurden zusätzlich 1:20 mit 80%igem Acetonitril verdünnt. Die verdünnten Proben wurden vor der Messung 5 min in der Tischzentrifuge bei ca. 10.000 x *g* zentrifugiert.

HPLC-Messung Die Trennung der Substanzen erfolgte mit einer Flussrate von 1 mL/min bei Raumtemperatur. Die Konzentration der Probenbestandteile wurde durch Messung entsprechender Standardverbindungen (1 - 2,5 mM) ermittelt.

2.9.4.2 Nachweis organischer Säuren, Zucker und Polyole mittels isokratischer HPLC

Für den Nachweis von Glucose, Glycerin und der organischen Säuren Acetat, Pyruvat, Lactat sowie Malat mittels isokratischer HPLC wurde die Trennsäule Aminex HPX-87H (Bio-Rad) verwendet. Das Säulenmaterial ist speziell für die Trennung von organischen Säuren sowie Kohlenhydraten geeignet und besteht aus einer polymerbasierten Matrix mit einem Vernetzungsgrad von 8%, an die Protonen gebunden sind. Als mobile Phase diente 0,02 N H₂SO₄ und die Elution der Substanzen wurde mit einem RI- sowie einem UV-Detektor verfolgt.

Aufbau der HPLC-Anlage

- Entgaser (SpectraSystem SCM1000, Thermo Scientific)
- Pumpe (SpectraSystem P1000, Thermo Scientific)
- Probenaufgabeeventil (Rheodyne Injector Nr. 7125, Probenschleife 20 μ L, Rheodyne LLC)
- Trennsäule (Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, 9 μ m, Bio-Rad)
- UV-Detektor (Accela PDA Detector Thermo Scientific)
- RI-Detektor (refractoMonitor IV, Milton Roy)

Probenvorbereitung Die Medienüberstände wurden je nach Wachstumsphase 1:4 - 1:20 mit 0,02 N H₂SO₄ verdünnt und vor der Messung abzentrifugiert (ca. 10.000 x *g* 5 min).

HPLC-Messung Die Messung wurde mit einer Flussrate von 0,6 mL/min bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Quantifizierung der Probenbestandteile wurden entsprechende Standardverbindungen mit einer Konzentration von 5 - 10 mM gemessen.

2.9.4.3 Nachweis N-reaktiver Solute mittels FMOC-ADAM-HPLC mit Gradientenprofil

Die FMOC-ADAM-HPLC mit Gradientenprofil ermöglicht eine Analyse von N-reaktiven Verbindungen, wie primären und sekundären Aminen, und stellt somit eine geeignete Methode zum Nachweis von Aminosäuren dar (Einarsson *et al.*, 1983; Betnér & Földi, 1988; Kunte *et al.*, 1993). In dieser Arbeit wurde die Methode hauptsächlich zur Detektion von Aspartat, Glutamat und der Aminosäurederivate ADABA sowie DABA verwendet. Die zu untersuchenden N-reaktiven Verbindungen werden durch Reaktion mit 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC) derivatisiert und können mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors nachgewiesen werden (Einarsson *et al.*, 1983). Überschüssiges FMOC und dessen hydrolytisches Nebenprodukt werden durch Reaktion mit 1-Aminoadamantan (ADAM) minimiert, um Signalüberlagerungen mit den FMOC-derivatisierten Verbindungen zu unterbinden (Betnér & Földi, 1988). Als stationäre Phase wurde eine Reversed-Phase-Kieselgelmatrix verwendet. Als mobile Phase diente Laufmittel A bestehend aus 80 % (v/v) Natriumacetat-Puffer, 20 % (v/v) Acetonitril und 0,5 % (v/v) THF, das im Verlauf der Messung mit Laufmittel B (20 % Natriumacetat-Puffer, 80 % Acetonitril) gemischt wurde.

Aufbau der HPLC-Anlage

- Entgaser (SpectraSystem SCM1000, Thermo Scientific)
- Pumpe (SpectraSystem P2000, Thermo Separation Products)
- Probenaufgabe (Autosampler SpectraSystems AS3000, Probenschleife 100 μL , Probenhalter 4 °C, Säulenofen 45 °C, Thermo Separation Products)
- Vorsäule (LiChrospher 100 RP-8, 5 μm , LiChroCART 4-4, Merck)
- Trennsäule (Superspher 60 RP-8, 4 μm , LiChroCART 125-4, Merck)
- Fluoreszenzdetektor (SpectraSystem FL3000, 254 nm (ex.), 316 nm (em.), Thermo Separation Products)

Probenvorbereitung Zellextrakte wurden 1:20 und Medienüberstände 1:20-1:50 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ verdünnt. Proben aus dem EctC-Aktivitätstest (vgl. 2.11.7), die schon 1:1 mit Acetonitril (100 %) verdünnt waren, wurden zusätzlich 1:200-1:1000 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ verdünnt. Die verdünnten Proben wurden zentrifugiert (ca. 10.000 x g, 5 min) und die Vorsäulenderivatisierung mit FMOC durchgeführt. Zunächst wurden 40 μL der Probe mit 40 μL Boratpuffer versetzt, in dem 25 μM Taurin als interner Standard zur Kontrolle der Derivatisierung und Probenauftragung enthalten war. Nach Zugabe von 80 μL FMOC-Reagenz wurde der Reaktionsansatz 45 s auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wurden 100 μL ADAM-Reagenz zugegeben und der Ansatz erneut 45 s geschüttelt. Durch Zugabe von 140 μL Laufmittel A wurde der Ansatz vervollständigt und nochmals gemischt. Die derivatisierten Proben wurden bis zur Messung im Autosampler bei 4 °C aufbewahrt.

HPLC-Messung Die Trennung der Substanzen erfolgte mit einer Flussrate von 1,25 mL/min, einer Säulentemperatur von 45 °C und einem Laufmittelgradienten (vgl. Tab. 2.12). Zur Quantifizierung der Probenbestandteile wurden Standardverbindungen mit einer Konzentration von 25 μM derivatisiert und gemessen.

Tab. 2.12: Gradientenprofil für die FMOC-ADAM-HPLC

Zeitpunkt [min]	0	15	30	40	42	47	49	51
Laufmittel A [%]	100	91	70	40	0	0	100	100
Laufmittel B [%]	0	9	30	60	100	100	0	0

2.9.5 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie, *nuclear magnetic resonance*) ist eine Methode mit atomarer Auflösung, die zur Strukturaufklärung von Molekülen, zum Nachweis von Inhaltsstoffen einer Probe und deren Quantifizierung verwendet werden kann. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Atomkerne mit einer ungeraden Protonen- und/oder Neutronenzahl, u.a. die Isotope ^1H und ^{13}C , einen Eigendrehimpuls (Kernspin) besitzen. Der Kernspin ist mit einem magnetischen Moment verbunden, das im Fall des ^1H - und ^{13}C -Kerns in einem starken extern angelegten Magnetfeld zwei Zustände einnehmen kann. Dabei hat der parallel zum äußeren Magnetfeld gerichtete Spinzustand ein niedrigeres Energieniveau als der antiparallele Zustand und die Energiedifferenz zwischen beiden Orientierungen ist proportional zur Stärke des angelegten Magnetfelds. Durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen einer Frequenz, deren Energie der Differenz zwischen den beiden Spinzuständen entspricht, können Übergänge vom niedrigeren zum höheren Energiezustand induziert werden und es kommt zur Resonanz. Anschließend stellt sich durch Relaxation wieder ein Energiegleichgewicht ein, wobei die Atomkerne Energie einer bestimmten Frequenz (Resonanzfrequenz) abgeben, die gemessen werden kann.

Für Atomkerne der gleichen Art ergeben sich abhängig von ihrer chemischen Umgebung geringfügig unterschiedliche Resonanzfrequenzen. Ursache dafür ist ein lokales Magnetfeld am jeweiligen Atomkern, das in seiner Stärke vom äußeren Magnetfeld abweichen kann, z.B. durch den Einfluss der elektronischen Umgebung des Kerns oder die magnetische Wechselwirkung benachbarter Atomkerne. Die Resonanzfrequenzen werden nicht als absolute Werte, sondern als chemische Verschiebung bezogen auf eine Standardsubstanz in ppm (*parts per million*) angegeben. Anhand der chemischen Verschiebungen und der entsprechenden Signale in einem NMR-Spektrum sind Rückschlüsse auf die chemische Struktur eines Moleküls möglich.

Die Zellextrakte von *A. cryptum* nach Anzucht mit 3% NaCl bzw. 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ wurden mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert. Weiterhin wurde eine ^1H -NMR-Analyse im Zuge der Ganzzellbiokatalyse mit *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD_m durchgeführt.

Probenvorbereitung für die ^{13}C -NMR-Spektroskopie Aus dem gefriergetrockneten Zellmaterial von *A. cryptum* (ca. 1 g) wurden die Solute in mehreren Ansätzen extrahiert (vgl. 2.9.2). Die Zellextrakte wurden vereinigt und unter dem Abzug getrocknet. Der getrocknete Ansatz wurde in 1 mL Deuteriumoxid aufgenommen und mit 5 mg Natrium-Trimethylsilylpropionat (TMSP) als internem Standard gemischt. Weiterhin wurden 10 μL Acetonitril und 10 μL Methanol als Kontrollsignale für die NMR-Messung zugegeben.

Probenvorbereitung für die $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$ Die letzten drei Überstandsproben der Ganzzellbiokatalyse (25-40 h) hatten entsprechend der HPLC-Analyse eine ähnliche Zusammensetzung und wurden vereinigt, um eine möglichst hohe Konzentration der Solute für die NMR-Messung zu erhalten. Die Probe wurde gefriergetrocknet und danach in 0,5 mL Deuteriumoxid mit dem Natriumsalz der 1,2,4,5-Benzoltetracarbonsäure (BTC) als internem Standard in einer Endkonzentration von 10 mM resuspendiert.

NMR-Messung Die Messungen wurden im Institut für Pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn mit dem NMR-Spektrometer Avance 300DPX (Bruker, Billerica, USA) durchgeführt. Die Messfrequenz betrug 75,46 MHz für den ^{13}C -Kanal und 300 MHz für den ^1H -Kanal. Die Eichung der Messwerte erfolgte durch den internen Standard TMSP ($^{13}\text{C-NMR}$) bzw. BTC ($^1\text{H-NMR}$). Für die Datenanalyse wurde das Programm MestReNova 8.0.1 verwendet und die Zuordnung der Signale erfolgte durch Vergleich mit den NMR-Spektren von Standardverbindungen.

2.9.6 Enzymatischer Nachweis von Glucose

Der Glucosegehalt der Zellextrakte von *A. cryptum* wurde mit einem enzymatischen UV-Test (Roche) nach Herstellerangaben bestimmt. Glucose wird mittels der Hexokinase in Gegenwart von ATP zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert, das anschließend via Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert wird, wobei NADPH entsteht. Die Menge des gebildeten NADPH ist äquimolar zur Konzentration an Glucose im Ansatz, die durch photometrische Messung der Absorption von NADPH bei 340 nm ermittelt werden kann.

2.9.7 Bestimmung der Produktionsdaten

Intrazellulärer und extrazellulärer Solutgehalt Zur Bestimmung des intrazellulären Solutgehalts ($\mu\text{mol/g TBM}$) wurde die mittels HPLC-Analyse erhaltene Solutkonzentration des Zellextrakts mit dem Volumen der wässrigen Phase nach der Solutextraktion multipliziert und durch die eingesetzte Menge an TBM dividiert. Dementsprechend wurde für die Berechnung des extrazellulären Solutgehalts (mmol/g TBM) die Solutkonzentration des Medienüberstands auf die nach der Zellernte erhaltene TBM und das entsprechende Kulturvolumen bezogen.

Ertrag Der Ertrag $Y_{(X+E)/S}$ bzw. $Y_{(X+H)/S}$ (g/g) ergab sich aus der Summe der gebildeten TBM (X) und der extrazellulären Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Konzentration (E, H) dividiert durch die Menge an verbrauchter C-Quelle (S). Zusätzlich wurde der Ertrag $Y_{E/S}$ bzw. $Y_{H/S}$ (g/g) bestimmt, der nur der Menge an produzierten Soluten pro g C-Quelle entspricht.

Spezifische Produktivität Für die Bestimmung der spezifischen Produktivität ($\text{mg}/(\text{g TBM} \times \text{h})$) von *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCDask wurde die Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Produktion im Wachstumsverlauf betrachtet und die extrazelluläre Solutkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten mittels HPLC gemessen. Die TBM wurde entweder direkt durch Ernte eines bestimmten Kulturvolumens und anschließende Gefriertrocknung bestimmt

oder anhand der OD_{600} (gemessen in der Küvette) und der Korrelation $TBM \text{ (g/L)} = 0,439 \times OD$ (Bolten *et al.*, 2007) ermittelt. Die spezifische Produktivität wurde jeweils aus der Differenz der Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Konzentration zweier benachbarter Datenpunkte dividiert durch die mittlere TBM und Zeitdifferenz bestimmt. Aus dem Verlauf der Produktivitäts-Werte konnte die maximale spezifische Produktivität entnommen werden, die der höchsten Zunahme der extrazellulären Solutkonzentration pro g TBM und Stunde entspricht.

Kohlenstoff-Bilanz Die Kohlenstoff-Bilanz (C-Bilanz) wurde unter der Annahme eines C-Gehalts von 48 % in der TBM von *E. coli* berechnet (Folsom & Carlson, 2015). Die C-Bilanz (total) von *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCDask ergab sich aus der Summe des C-Gehalts in der gebildeten TBM und den extrazellulär akkumulierten Ectoinen dividiert durch den C-Gehalt der eingesetzten Menge an Glycerin. Die separate C-Bilanz für die Produktion der TBM bzw. der Ectoine wurde mit Hilfe des Kontrollstamms *E. coli* DH5 α pASK-IBA3 bestimmt, der unter den gleichen Wachstumsbedingungen angezogen wurde und 1 g TBM aus 2,66 g Glycerin gebildet hatte. Dementsprechend konnte für die Produktionsstämme ermittelt werden, wie viel C-Quelle in den Aufbau der TBM geflossen war und welche Menge an C-Quelle für die Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Produktion zur Verfügung stand.

Stickstoff-Bilanz Die Stickstoff-Bilanz (N-Bilanz) der Produktionsstämme wurde aus dem N-Gehalt in der TBM und den extrazellulären Ectoinen bezogen auf die Menge an eingesetzter N-Quelle berechnet. Dabei wurde ein C:N-Verhältnis von 48 zu 12 % in der TBM von *E. coli* angenommen (Folsom & Carlson, 2015).

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Gewinnung und Quantifizierung der DNA

2.10.1.1 Isolierung der genomischen DNA

Die Isolierung der genomischen DNA aus *A. cryptum* erfolgte anlehnend an die Methode von Marmur (1961). Zunächst wurden 8 mL Kultur nacheinander in einem 2 mL-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (10.000 x g, 3 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 mL TES-Puffer (5 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM NaCl, pH 8) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 0,8 mL TES-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 20 μ L SDS-Lösung (20 %, w/v) hinzugegeben und der Ansatz nach mehrmaligem Invertieren 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur DNA-Extraktion wurde das Zellysate mit 0,3 mL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und das Reaktionsgefäß kräftig geschüttelt. Die Phasentrennung in eine wässrige Phase, eine Lösungsmittelphase und eine Interphase mit präzipitierten Proteinen und anderen Zellbestandteilen wurde durch Zentrifugation (14.500 x g, 10 min) erreicht. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion mehrmals

wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung und 1 Volumen eiskaltem Isopropanol. Der Ansatz wurde mind. 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend zentrifugiert ($14.500 \times g$, 5 min). Im folgenden Waschschrift wurde das DNA-Pellet mit 0,5 mL eiskaltem Ethanol (70 %, v/v) versetzt und erneut zentrifugiert ($14.500 \times g$, 5 min). Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das DNA-Pellet 10 min bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Anschließend wurde die DNA in $50\text{ }\mu\text{L}$ sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.10.1.2 DNA-Extraktion aus *Synechocystis*

Für die DNA-Extraktion aus *Synechocystis* wurden mind. 10 mL Kultur mit einer $\text{OD}_{750} \geq 1$ abzentrifugiert (vgl. 2.8.6). Das Zellpellet wurde mit 1 mL TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gewaschen und 5 min in der Tischzentrifuge bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen in $300\text{ }\mu\text{L}$ TE-Puffer resuspendiert und in ein $1,5\text{ mL}$ -Reaktionsgefäß mit ca. 150 mg Silica Beads (0,1 mm, BioSpec) überführt. Nach Zugabe von $350\text{ }\mu\text{L}$ Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) wurde das Reaktionsgefäß mit Parafilm dicht verschlossen und drei- bis fünfmal 20 s geschüttelt (ca. 4500 rpm, Silamat S6, Ivoclar Vivadent). Der Ansatz wurde nach jedem Durchgang 3 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Extraktion erfolgte die Phasentrennung durch 5-minütige Zentrifugation bei $16.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Biofuge fresco, Heraeus Instruments). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Falls erforderlich, wurde erneut Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung zugegeben, die Probe kräftig geschüttelt und zentrifugiert. Zur DNA-Fällung wurde die wässrige Phase mit 1 mL eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt, das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und für mind. 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation ($16.000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde das DNA-Pellet mit 1 mL 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert ($16.000 \times g$, Raumtemperatur, 2 min). Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das DNA-Pellet vollständig bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Schließlich wurde die DNA in $30\text{ - }50\text{ }\mu\text{L}$ TE-Puffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.10.1.3 Isolierung der Plasmid-DNA

Plasmid-Isolierung ohne Säulenreinigung Die Plasmid-Isolierung aus frisch transformierten *E. coli*-Stämmen für eine anschließende Restriktionsanalyse erfolgte durch alkalische Lyse ohne Reinigung über eine Säule. Von einer in Komplexmedium gewachsenen Übernachtskultur wurden $1,5\text{ - }3\text{ mL}$ in einem $1,5\text{ mL}$ -Reaktionsgefäß zentrifugiert ($10.000 \times g$, 1 min) und der Überstand quantitativ entfernt. Das Zellpellet wurde in $200\text{ }\mu\text{L}$ Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mg/mL RNase A, pH 8) resuspendiert. Durch Zugabe von $200\text{ }\mu\text{L}$ Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS, pH 12,5) und Invertieren des Reaktionsgefäßes erfolgte die alkalische Lyse. Nach max. 2 min wurde der Ansatz zur Neutralisation mit Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) versetzt und erneut

durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Mittels Zentrifugation für 3 min bei $14.500 \times g$ wurden die präzipitierten Zellbestandteile von der Plasmid-DNA getrennt. Der Überstand wurde mit $500 \mu\text{L}$ Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert ($14.500 \times g$, 3 min). Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde die obere wässrige Phase in ein Reaktionsgefäß mit $500 \mu\text{L}$ eiskaltem Isopropanol überführt und dieses mehrmals invertiert. Nach der anschließenden Zentrifugation ($14.500 \times g$, 3 min) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit $500 \mu\text{L}$ eiskaltem Ethanol (70 %, v/v) gewaschen. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert ($14.500 \times g$, 1 min), der Überstand quantitativ entfernt und das DNA-Pellet vollständig bei 60°C getrocknet. Danach wurde die Plasmid-DNA in $50 \mu\text{L}$ sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Plasmid-Isolierung mit Säulenreinigung Plasmid-DNA, die für die Klonierung oder Sequenzierung verwendet werden sollte, wurde mit dem Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) aus Flüssigkultur extrahiert. Die Extraktion erfolgte auch mittels alkalischer Lyse, aber die Plasmid-DNA wurde anschließend über eine Säule gereinigt. Pro Ansatz wurden max. 3 mL Kultur in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß abzentrifugiert ($10.000 \times g$, 1 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in $600 \mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert. Die Extraktion und Reinigung der Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Elution der Plasmid-DNA wurde der Elutions-Puffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ auf 50°C vorgewärmt, 30-50 μL auf die Säulenmatrix gegeben und diese 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.10.1.4 Quantifizierung der DNA

Die DNA-Konzentration wurde entweder photometrisch (BioSpectrometer, Eppendorf) oder anhand der Fluoreszenzintensität im Agarosegel ermittelt. Die Messung mittels BioSpectrometer erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die DNA-Probe ggf. mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ verdünnt, ein Volumen von $4 \mu\text{L}$ eingesetzt und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ als Leerwert gemessen. Die DNA-Konzentration ergab sich anhand der Korrelation, dass eine Lösung mit $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ doppelsträngiger DNA bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm einen A_{260} -Wert von 1 hat. Durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm konnte eine Verunreinigung der DNA-Probe mit Proteinen festgestellt werden, die aufgrund der aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Ein hoher Reinheitsgrad der DNA-Probe wurde bei einem Verhältnis von etwa 1,8 angenommen.

Für die Ligation (vgl. 2.10.5.3) wurde häufig die Konzentration der DNA-Probe in einem Agarosegel (vgl. 2.10.3) mit Hilfe eines geeigneten DNA-Größenstandards abgeschätzt. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität der zu quantifizierenden DNA-Bande mit der Intensität einer ähnlich großen Markerbande bekannter Konzentration verglichen. Hierbei konnte auch überprüft werden, ob die enzymatische Hydrolyse der Plasmid-DNA unvollständig war und zusätzliche Hydrolyseprodukte in der DNA-Probe enthalten waren. Für die Ligation wurde die molare

Konzentration der DNA-Probe nach folgender Formel ermittelt, wobei für ein Basenpaar eine durchschnittliche molare Masse von 660 g/mol angenommen wurde:

$$\text{Molarität der DNA [mol/}\mu\text{L]} = \frac{\text{Konzentration der DNA g/}\mu\text{L}}{660 \text{ g/mol} \times \text{Anzahl der Basenpaare des DNA-Fragments}}$$

2.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von DNA *in vitro* (Mullis *et al.*, 1986). Für die PCR werden zwei gegenläufige Oligonukleotide (Primer) benötigt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren. Die PCR ist eine zyklische Reaktionsfolge aus Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und Elongation, durch deren mehrfache Wiederholung das gewünschte DNA-Fragment in kurzer Zeit exponentiell vermehrt werden kann. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA durch hohe Temperaturen ($> 90^\circ\text{C}$) in ihre Einzelstränge getrennt, weshalb eine thermostabile DNA-Polymerase erforderlich ist. Die Anlagerung der Primer an die komplementären DNA-Bereiche erfolgt nach Absenken der Temperatur entsprechend der Länge und Nukleotidsequenz der Primer. Bei der Elongation wird mittels der DNA-Polymerase der DNA-Doppelstrang ausgehend von den freien 3'-Enden der Primer und komplementär zum vorhandenen Einzelstrang gebildet. In dieser Arbeit wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet, wobei die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das PCR-Programm entsprechend der Herstellerangaben gewählt wurden. Die Komponenten des PCR-Ansatzes wurden in einem 200 μL -Reaktionsgefäß auf Eis zusammenpipettiert und die PCR erfolgte in einem Thermocycler (MyCycler, Bio-Rad).

2.10.2.1 Standard-PCR

Zur Amplifikation von DNA für die Klonierung der Expressionsvektoren wurde entweder die *Pfu*-DNA-Polymerase oder bei größeren DNA-Fragmenten ($> 2 \text{ kb}$) die *Pfu*-ähnliche *Phusion* High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet (Thermo Fisher Scientific). Beide Enzyme besitzen eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, wodurch die Fehlerrate bei der PCR verringert ist. Die PCR erfolgte entsprechend der Angaben in Tab. 2.13 bzw. 2.14. Für die *Pfu*-DNA-Polymerase wurde die Annealing-Temperatur um 5°C geringer als die niedrigere Schmelztemperatur (T_m) des Primerpaares gewählt. Die Elongationszeit wurde mit 2 min/kb entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments festgelegt. Bei der PCR mit der *Phusion*-DNA-Polymerase wurde eine um 3°C höhere Annealing-Temperatur verglichen mit dem niedrigeren T_m -Wert der Primer und eine Elongationszeit von 15-30 s/kb verwendet. Bei einem T_m -Wert $\geq 69^\circ\text{C}$ wurde der Annealing-Schritt weggelassen und der PCR-Zyklus mit der *Phusion*-DNA-Polymerase bestand nur aus Denaturierung und Elongation.

Tab. 2.13: Reaktionsansatz und PCR-Programm mit der *Pfu*-DNA-Polymerase

Komponenten	Volumen [μL]	Programmschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit
10 x <i>Pfu</i> -Puffer + MgSO_4	5	1. Initiale Denaturierung	95	2 min
2 mM dNTPs	5	2. Zyklus (30 x)		
10 μM 5'-Primer	2,5 - 5	Denaturierung	95	30 s
10 μM 3'-Primer	2,5 - 5	Annealing	$T_m - 5$	30 s
10 - 500 ng/ μL DNA	1	Elongation	72	2 min/kb
5 M Glycinbetain	0 - 10	3. Finale Elongation	72	10 min
2,5 U/ μL <i>Pfu</i> -Polymerase	0,5	4. Kühlung	4	∞
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	ad 50			

Tab. 2.14: Reaktionsansatz und PCR-Programm mit der *Phusion*-DNA-Polymerase

Komponenten	Volumen [μL]	Programmschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit
5 x HF-Puffer	10	1. Initiale Denaturierung	98	30 s
2 mM dNTPs	5	2. Zyklus (30 x)		
10 μM 5'-Primer	2,5	Denaturierung	98	10 s
10 μM 3'-Primer	2,5	Annealing	$T_m + 3$	20 s
10 - 500 ng/ μL DNA	1	Elongation	72	15 - 30 s/kb
5 M Glycinbetain	0 - 10	3. Finale Elongation	72	10 min
2 U/ μL <i>Phusion</i> -Polymerase	0,5	4. Kühlung	4	∞
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	ad 50 μL			

2.10.2.2 SOE-PCR (*splicing by overlap extension PCR*)

Mittels der SOE-PCR (*splicing by overlap extension PCR*) können zwei oder mehrere DNA-Moleküle ohne enzymatische Hydrolyse und anschließende Ligation miteinander verknüpft werden (Horton *et al.*, 1989). In dieser Arbeit wurde die SOE-PCR für die Fusion verschiedener Promotoren mit *ectC* bzw. *ectABC* von *A. cryptum* verwendet. Zunächst wurden die zwei zu fusionierenden DNA-Fragmente separat in einer Standard-PCR vervielfältigt (vgl. 2.10.2.1) und über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (vgl. 2.10.4). Dabei waren der 3'-Primer zur Amplifikation des vorderen Promotor-Fragments und der 5'-Primer für das hintere DNA-Fragment komplementär zueinander (SOE-Primer). Bei der anschließenden SOE-PCR wurden die beiden gebildeten PCR-Produkte in äquimolaren Mengen als Template eingesetzt und konnten über die komplementäre DNA-Sequenz hybridisieren. Außerdem kamen bei der SOE-PCR die Primer zum Einsatz, die das gewünschte Fusionsprodukt flankierten und die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen enthielten. Je nach Größe des Fusionsprodukts wurde die SOE-PCR wie zuvor beschrieben mit der *Pfu*- oder *Phusion*-DNA-Polymerase durchgeführt (vgl. 2.10.2.1).

2.10.2.3 Kontroll-PCR

Zur Kontrolle der konjugierten *Synechocystis*-Stämme und für die Test-PCR mit RNA- und cDNA-Proben wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Diese Polymerase besitzt keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm wurden gemäß der Angaben des Herstellers gewählt (vgl. Tab. 2.15). Die Annealing-Temperatur war 5 °C geringer als der niedrigere T_m -Wert des Primerpaares und die Elongationszeit betrug 1 min/kb.

Tab. 2.15: Reaktionsansatz und PCR-Programm mit der *Taq*-DNA-Polymerase

Komponenten	Volumen [μL]	Programmschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit
10 x <i>Taq</i> -Puffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	1. Initiale Denaturierung	95	2 min
2 mM dNTPs	2,5	2. Zyklus (25 - 35 x)		
10 μM 5'-Primer	1,25 - 2,5	Denaturierung	95	30 s
10 μM 3'-Primer	1,25 - 2,5	Annealing	$T_m - 5$	30 s
10 - 500 ng/ μL DNA	0,5 - 2	Elongation	72	1 min/kb
5 M Glycinbetain	0 - 5	3. Finale Elongation	72	5 - 10 min
5 U/ μL <i>Taq</i> -Polymerase	0,5	4. Kühlung	4	∞
$\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	ad 25			

2.10.2.4 Primer

Die für die Klonierung, Test-PCR und Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tab. 2.16 aufgeführt. Die Primer wurden mittels der Software Primer Designer 3.0 bzw. Primer3web 4.1.0 entworfen oder anhand der DNA-Sequenz manuell abgeleitet und von Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.10.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld, wobei die Moleküle aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats zur Anode wandern. In dieser Arbeit wurde die Agarosegelelektrophorese zur Größenbestimmung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der DNA verwendet. Für DNA-Moleküle ≤ 500 bp wurde eine Agarose-Konzentration von 1 % (w/v) gewählt und ansonsten ein 1,5 %iges Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1 x TAE-Puffer gelöst und in die Gelkammer mit Kamm gegossen (Biometra Horizon 58, Analytik Jena) Nach Polymerisierung des Agarosegels wurde dieses vollständig mit 1 x TAE-Puffer überschichtet und der Gelkamm entfernt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6 x Ladepuffer versetzt. Zur Größenbestimmung wurde zusätzlich ein DNA-Größenstandard

Tab. 2.16: Verwendete Primer

Die Nukleotidsequenzen, Schmelztemperaturen (T_m in °C) und Restriktionsschnittstellen (RS) der Primer sind aufgeführt. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen. f: 5'-Primer, r: 3'-Primer

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	RS	T_m	Referenz
Primer für die Klonierung und ggf. Test-PCR sowie Sequenzierung				
f_acry_Xba	att <u>tct aga</u> cgg tgg cgc tgc gtc	<i>XbaI</i>	66,1	Bethlehem (2015)
r_ectD_acry_Hind	att <u>aag ctt</u> tcg gag cca tgc tca tgc	<i>HindIII</i>	65,0	"
r_ectAB_Nco	att <u>cca tgg</u> cag agt ccg gat gat cat g	<i>NcoI</i>	66,6	diese Arbeit
f_pASK_Ptet	gac tca aga cga tag tta ccg ga		60,6	"
r_Ptet_SOE	gga tga tca tgt ttc gat ttt tgt cga ac		62,4	"
f_ectC_SOE_E	gtt cga caa aaa tcg aaa cat gat cat cc		62,4	"
r_ectC_Hind	att <u>aag ctt</u> gga tag aga tcg tcc at	<i>HindIII</i>	58,1	"
f_Ptet_Nco	att <u>cca tgg</u> tgg cca gat gat taa ttc ct	<i>NcoI</i>	63,9	"
T7Promotor Primer (f)	taa tac gac tca cta tag g		50,2	AG Galinski
His_rev_Hind	att <u>aag ctt</u> gcg gtg gca gca gcc aac t	<i>HindIII</i>	68,0	Witt (unveröffentlicht)
r_RBS-ectC_Hind	att <u>aag ctt</u> tca ggc cgc ctc gcc ga	<i>HindIII</i>	68,0	diese Arbeit
f_ectC_Acry_eco	att <u>gaa ttc</u> cat atg atc atc cgg act ct	<i>EcoRI</i>	62,4	"
rev_pet_kpnI	att <u>ggt acc</u> gcc aac tea gct tcc ttt cg	<i>KpnI</i>	68,1	Dörfler (2014)
f_acry_kpn	att <u>ggt acc</u> cgg tgg cgc tgc	<i>KpnI</i>	65,7	diese Arbeit
rev_acry_bam	cac <u>tcg gat</u> cca tgc tca tgc c	<i>BamHI</i>	64,0	Moritz (2012)
f_pstu_bam	agg aac gcc <u>tgg atc</u> cgg tcg t	<i>BamHI</i>	65,8	diese Arbeit
r_pstu_sal	att <u>gtc gac</u> cat cgc ctc aga gat a	<i>SalI</i>	63,0	"
f_pstu_kpn	att <u>ggt acc</u> tgt gcg gat atg cct a	<i>KpnI</i>	63,0	"
r_pstu_bam	aga cga ccg <u>gat cca</u> ggc gtt c	<i>BamHI</i>	65,8	"
f_PpsbA1_Pst	att <u>ctg cag</u> cac aac cag gca gta ttt tg	<i>PstI</i>	65,3	"
r_psbA1_SOE	acc gcg ctg ccg cag gtt taa gct tgg at		70,9	"
f_ectC_SOE_S	atc caa gct taa acc tgc ggc agc gcg gt		70,9	"
r_ectABC_Xba	att <u>tct aga</u> gcg acg gat aga gat cgt c	<i>XbaI</i>	65,1	"
Primer für die Test-PCR und ggf. Sequenzierung				
f_ectA_R	atc ttc gtc tgg cag gtc g		58,8	diese Arbeit
r_ectA_R	gtc ctt tcg tgc tgg ttc g		58,8	"
ectC_Acr_for	gtg <u>cat atg</u> atc atc cgg act ctg aag gag	<i>NdeI</i>	68,1	Amendt (unveröffentlicht)
ectC_Acr_rev	att <u>ctc gag</u> ggc cgc ctc gcc gac c	<i>XhoI</i>	72,8	"
r_ectB_R2	ctt gac gat ctc gcc atc tg		59,4	diese Arbeit
r_ectC_R	ctc gat ggt gcc ctc tcc		60,5	"
Primer für die Sequenzierung				
Acry2 (f)	cta ctg cac cgc gat cc		57,6	Moritz (2012)
Acry3 (f)	cca ttt ctg gag cga tga		53,7	"
Acry4 (f)	ctg agc gac gag cag ac		57,6	"
seq1_pMKB2 (r)	gga gag atg gaa ctc ctt gt		57,3	diese Arbeit
rev_acry_ask	tgt tgc tct agg cgg tgg gc		63,4	"
r_ectB_R	aag tcg agt cca tga gcg at		57,3	"
f_ectB_seq	act acc gca tgc agt tca cc		59,4	"
PstC_neu_for	ggt atc cca tat gat cgt cag aac cct	<i>NdeI</i>	65,0	Seip (2009)
pASK_for	gag tta ttt tac cac tcc ct		53,2	IBA
pASK_rev	cgt tta ccg cta ctg cg		55,2	"
pASK-IBAw	ttt acc act ccc tat cag tg		55,2	Sequiserve
pASK-IBArv	tag cgg taa acg gca gac		56,0	"

(GeneRuler 1 kb oder 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 70-90 Volt (Power Supply E122, Consort, Turnhout, Belgien). Zur Dokumentation der DNA-Auftrennung wurde das Agarosegel 5-20 min mit dem fluoreszierenden Farbstoff GelRed (Biotium) gefärbt und kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gewaschen. Anschließend konnten die DNA-Banden im UV-Durchlicht betrachtet und fotografiert werden (Gel Imager, Intas, Göttingen). Falls erforderlich, wurde die DNA aus dem Agarosegel ausgeschnitten und für die weitere Verwendung gereinigt (vgl. 2.10.4).

2.10.4 Reinigung der DNA aus Agarosegelen und Restriktionsansätzen

PCR-Produkte und ggf. hydrolysierte DNA wurden nach der Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.10.3) aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des peqGOLD Gel Extraction Kits (Peqlab) oder des Monarch DNA Gel Extraction Kits (New England BioLabs) gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Dazu wurde das Gelstück in einem geeigneten Puffer bei 50-60 °C vollständig gelöst und die DNA anschließend in mehreren Waschschritten über eine Silikamembran gereinigt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte durch Zugabe von 20-50 μL vorgewärmten Elutions-Puffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min und anschließende Zentrifugation. Für die Ligation (vgl. 2.10.5.3) wurde die DNA aus Restriktionsansätzen meist direkt mit einem der beiden Extraktions-Kits gereinigt. Hierfür wurde der Restriktionsansatz mit dem 2- bis 4-fachen Volumen des Puffers gemischt und die DNA über die Säule gereinigt.

2.10.5 Enzymatische Modifikation der DNA

2.10.5.1 Enzymatische Hydrolyse der DNA

Zur Vorbereitung der Ligation von Vektor- und Insert-DNA und zur Restriktionsanalyse konstruierter Vektoren wurde die DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific) hydrolysiert. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen Typ II hydrolysieren DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, die meist sechs Basenpaare umfassen und palindromisch sind. Für die Ligation erfolgte der Restriktionsverdau in einem 30-40 μL -Ansatz für 3 h. Restriktionsanalysen der konstruierten Plasmide wurden in einem Gesamtvolumen von 10 oder 15 μL für ca. 1,5 h durchgeführt (vgl. Tab. 2.17). Dabei wurden für die eingesetzten Restriktionsenzyme die vom Hersteller angegebenen Mengen, Temperaturen und Puffer gewählt. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung nach Herstellerangaben oder im Fall von *PstI* durch Reinigung der DNA aus dem Restriktionsansatz (vgl. 2.10.4) abgestoppt.

Tab. 2.17: Restriktionsansatz

Komponenten	für Ligation [μL]	für Restriktionsanalyse [μL]
DNA	15	2
10 x Puffer	3 - 4	1 - 1,5
10 U/ μL Restriktionsenzym(e)	1 - 2	0,5 - 1
H ₂ O _{reinst}	ad 30 - 40	ad 10 - 15

2.10.5.2 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Die Vektor-DNA wurde mittels einer alkalischen Phosphatase (FastAP, Thermo Fisher Scientific) dephosphoryliert, um eine Religation der linearisierten Vektor-DNA während der Ligation zu verhindern. Im Anschluss an die enzymatische Hydrolyse der Vektor-DNA wurde der Ansatz mit 1 U FastAP versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms wurde durch 5-minütige Inkubation bei 75 °C erreicht. Danach erfolgte die Reinigung der Vektor-DNA aus dem Restriktionsansatz (vgl. 2.10.4).

Nach Hydrolyse des Vektors pASK_ectABCD_m mit dem Restriktionsenzym *Bsu15I* wurde keine Dephosphorylierung durchgeführt, da der linearisierte Vektor wieder religieren sollte.

2.10.5.3 Ligation

Die Ligation der hydrolysierten Vektor- und Insert-DNA erfolgte mittels der T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific), die Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxylende und dem 5'-Phosphatende der DNA bildet. Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 oder 30 μL gemäß den Herstellerangaben angesetzt (vgl. Tab. 2.18). Vektor- und Insert-DNA wurden abhängig von ihrer Größe zueinander in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:6 eingesetzt. Für die Religation des mit *Bsu15I* hydrolysierten Vektors pASK_ectABCD_m wurden 20 μg Vektor-DNA verwendet. Die Reaktionsansätze wurden entweder 11 h bei 16 °C im Thermocycler oder 1 - 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase bei 65 °C für 10 min und der Ligationsansatz wurde direkt für die Transformation von *E. coli* verwendet (vgl. 2.10.7) oder bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.18: Ligationsansatz mit T4-DNA-Ligase

Komponenten	Menge
Vektor-DNA	10 - 100 ng
Insert-DNA	2:1 - 6:1 zur Vektor-DNA
10 x Ligase-Puffer	2 - 3 μL
10 mM ATP	2 - 3 μL
5 U/ μL T4-DNA-Ligase	0,5-1 μL
H ₂ O _{reinst}	ad 20 - 30 μL

2.10.6 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Transformation wurden kompetente Zellen der *E. coli*-Stämme DH5 α , XL1-Blue und S17-1 mittels zwei verschiedener Methoden hergestellt. Die Prozedur erfolgte unter sterilen Bedingungen auf Eis und die verwendeten Lösungen waren auf 4 °C vorgekühlt.

CaCl₂-Methode nach Dagert & Ehrlich (1979) Zunächst wurden 70 mL 2 x YT-Medium im OD-Kolben mit einer Übernachtskultur von *E. coli* (vgl. 2.8.3.1) 1 %ig angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte in sterilen Zentrifugenbechern bei 5.000 x *g* und 4 °C für 6 min. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 10,5 mL CaCl₂-MgSO₄-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5.000 x *g*, 4 °C, 10 min) wurde das Zellpellet in 3,5 mL CaCl₂-MgSO₄-Lösung aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz mit 875 μ L Glycerin versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Zellsuspension in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen á 200 μ L aliquotiert und bis zur Transformation (vgl. 2.10.7) bei -70 °C gelagert.

TSS-Methode nach Chung *et al.* (1989) Die Methode erlaubt eine Transformation der Zellen mit DNA direkt nach Zugabe von TSS (*transformation and storage solution*), ohne dass ein Hitzeschock erforderlich ist. Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden 50 mL LB-Medium mit einer Übernachtskultur von *E. coli* 1 %ig angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Anschließend wurde die Kultur in einem sterilen Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (1000 x *g*, 4 °C, 10 min) und der Überstand vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde in 5 mL TSS (10 % w/v) PEG 3350, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgSO₄ in LB, pH 6,5) resuspendiert, der Ansatz in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen á 200 μ L aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

2.10.7 Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation handelt es sich um die Aufnahme freier DNA, z.B. Plasmid-DNA, durch Bakterienzellen. Dieser Vorgang ist bei *E. coli* unter natürlichen Bedingungen ineffizient. Daher wurde die Kompetenz zur DNA-Aufnahme durch chemische Behandlung der Zellen mit CaCl₂ oder Polyethylenglycol (PEG) gesteigert (vgl. 2.10.6). Die bei -70 °C gelagerten kompetenten *E. coli*-Zellen (200 μ L) wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des gesamten Ligationsansatzes oder 3-5 μ L Plasmid-DNA 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgten ein Hitzeschock der Zellen bei 42 °C für 90 s und eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Zur Regeneration der Zellen wurde der Transformationsansatz mit 600 μ L 2 x YT-Medium gemischt und bei 37 °C und 180 rpm 1-1,5 h inkubiert. Anschließend wurden 100 μ L des unverdünnten sowie des zehnfach mit 2 x YT-Medium verdünnten Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit den erforderlichen Antibiotika ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde abzentrifugiert (10.000 x *g*, 1 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und ebenfalls auf Selektivnährmedium ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss

wurde die Plasmid-DNA aus den transformierten Stämmen isoliert (vgl. 2.10.1.3) und mittels Restriktionsanalyse sowie Sequenzierung überprüft (vgl. 2.10.5.1 und 2.10.9).

2.10.8 Konjugation von *Synechocystis*

Bei der Konjugation handelt es sich um die DNA-Übertragung von einer Donor- auf eine Rezipientenzelle über direkten Zellkontakt. In dieser Arbeit wurden die Expressionsvektoren mittels Konjugation in *Synechocystis* Wildtyp bzw. in die $\Delta ggpS$ -Mutanten ($\Delta GK2$, $\Delta GS2$) eingebracht (modifiziert nach Kunte & Galinski, 1995). Dabei diente *E. coli* S17-1 als Donorstamm, der die für den konjugativen Transfer erforderlichen *tra*-Gene besitzt (Simon *et al.*, 1983). Die zu konjugierenden *Synechocystis*-Stämme wurden 3-5 Tage vor der Konjugation in BG11-Medium, im Fall der $\Delta ggpS$ -Mutanten mit dem jeweiligen Antibiotikum, angezogen (vgl. 2.8.4).

Für die Hauptkultur von *E. coli* S17-1 mit dem zu übertragenden Plasmid wurden 30 mL LB-Medium inkl. der jeweiligen Antibiotika 2%ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 400 μ L *E. coli*-Kultur in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (6.000 x *g*, 2 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 400 μ L LB-Medium ohne Antibiotikum gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 400 μ L LB-Medium (ohne Antibiotikum) resuspendiert und 600 μ L Kultur des zu konjugierenden *Synechocystis*-Stamms (OD_{750} 0,6 - 0,8) zugegeben. Im Fall der $\Delta ggpS$ -Mutanten wurde die Kultur, wie zuvor für *E. coli* beschrieben, zunächst abzentrifugiert und mit BG11 ohne Antibiotikum gewaschen. Die Suspension aus Donor- und Rezipientenstamm wurde zentrifugiert (6.000 x *g*, 5 min). Währenddessen wurden 400 μ L LB-Medium auf einer BG11-Agarplatte (ohne Antibiotikum) verteilt und nach einigen Minuten Einwirkzeit wurde ein Nitrocellulosefilter (0,45 μ m) aufgelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Schließlich wurde die Zellsuspension mittig auf den Filter aufgetragen und die Agarplatte über Nacht bei 30 °C im Licht inkubiert (vgl. 2.8.4).

Der Filter wurde in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt, 800 μ L BG11 wurden zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Filter gelöst. Danach wurden 100 μ L der unverdünnten sowie der zehnfach mit BG11 verdünnten Zellsuspension auf BG11-Agarplatten mit den erforderlichen Antibiotika ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde abzentrifugiert (6.000 x *g*, 1 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und ebenfalls auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden mehrere Tage bei 30 °C im Licht inkubiert, bis vereinzelte grüne Kolonien sichtbar waren und auf frische Selektionsplatten überimpft werden konnten. Anschließend wurde die Gesamt-DNA aus den konjugierten *Synechocystis*-Stämmen extrahiert (vgl. 2.10.1.2) und mittels PCR überprüft, ob der Expressionsvektor vorhanden war (vgl. 2.10.2.3).

2.10.9 Sequenzierung der DNA

Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) oder Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tab. 2.16 aufgeführt, wobei die Standard-Primer pASK-IBAfW und pASK-IBArV von der Firma Sequiserve bereitgestellt wurden. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit dem Programm Chromas 2.6.5 und für den Sequenzvergleich wurde das Online-Tool MultAlin (Corpet, 1988) oder EMBOSS Needle (Needleman & Wunsch, 1970) verwendet.

2.10.10 RNA-Arbeiten

Zur Inaktivierung von RNasen wurden $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ und die benötigten Verbrauchsmaterialien vor der Verwendung doppelt autoklaviert, sofern diese nicht vom Hersteller steril geliefert wurden. Außerdem wurden die RNA-Arbeiten mit Handschuhen an der Sterilbank oder falls erforderlich unter dem Abzug durchgeführt und die Arbeitsflächen zuvor mit RNase Away (Carl Roth) gereinigt.

2.10.10.1 Isolierung und Reinigung der RNA

Anzucht Für die RNA-Analyse wurden die *E. coli*-Stämme in 100 mL MM63-0,5 mit Glycerin kultiviert (vgl. 2.8.3.2) und die heterologe Expression bei einer OD_{600} von etwa 0,3 mit AHT (0,4 $\mu\text{g/L}$) induziert. Die Anzucht von *A. cryptum* erfolgte in 50 mL M269 mit 0,5 % Glycerin und 3 % NaCl (vgl. 2.8.2). In der spät exponentiellen Phase, bei einem OD_{600} -Wert von ca. 1, wurden die Zellen in 50 mL-Falcon-Röhrchen geerntet (6.000 x g, 4 °C, 15 min).

RNA-Extraktion Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen erfolgte mit TRI-Reagenz (Sigma-Aldrich) und basierte auf einem einzelnen Extraktionsschritt mit einer sauren Mischung aus Guanidiniumtiocyanat für die Protein-Denaturierung, Phenol sowie Chloroform oder 1-Brom-3-chlorpropan (Chomczynski & Sacchi, 1987). Nach der Ernte wurde das Zellpellet auf Eis in 1 - 2 mL TRI-Reagenz resuspendiert und entweder bis zur weiteren Durchführung bei -70 °C gelagert oder direkt in 2 mL-Reaktionsgefäßen á 1 mL aliquotiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 μL 1-Brom-3-chlorpropan zu jedem Ansatz wurde dieser gemischt und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation (12.000 x g, 4 °C, 10 min) ergab sich eine Phasentrennung in eine wässrige RNA-haltige Phase, eine Interphase mit DNA sowie eine rötliche organische Phase mit Proteinen. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei die wässrigen Phasen gleicher Ansätze vereinigt wurden. Zur Fällung der RNA wurde 1 Volumen Isopropanol zugegeben, der Ansatz 10 s durch Vortexen gemischt (Labinco L46, Breda, Niederlande) und 10 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (12.000 x g, 4 °C, 10 min) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 1 mL 75 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (8.000 x g, 4 °C, 5 min). Danach wurde der Überstand quantitativ entfernt und das Pellet 10 - 15 min bei Raumtemperatur getrocknet.

DNase-Verdau Um DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde das getrocknete RNA-Pellet in 90 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert und mit 10 μL 10 x DNase-Puffer sowie 2 μL DNase I (RNase-frei, Thermo Fisher Scientific) versetzt. Nach 2-stündiger DNA-Hydrolyse bei 37 °C wurden erneut 2 μL DNase I zugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde inkubiert.

Reinigung Im Anschluss an die DNA-Hydrolyse wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Reaktionsansatz aufgereinigt. Zur Elution der RNA von der Säule wurde diese zweimal mit 20-50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ beladen und zentrifugiert. Danach wurde die Konzentration sowie Reinheit der RNA-Probe ermittelt (vgl. 2.10.10.2), ein Teil des Ansatzes bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten und die restliche RNA in Aliquots bei -70 °C aufbewahrt.

Kontroll-PCR Zur Überprüfung auf DNA-Kontamination wurden 100-200 μg gereinigte Gesamt-RNA als Template in eine PCR mit spezifischen Primern für kleine DNA-Bereiche der Expressionsvektoren bzw. genomischen DNA eingesetzt (vgl. 2.10.2.3). Dabei diente ein PCR-Ansatz mit Vektor-DNA oder genomischer DNA als Positivkontrolle. Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (vgl. 2.10.3). Falls in der Probe mit Gesamt-RNA ein PCR-Produkt sichtbar war, wurde die ursprüngliche RNA-Probe erneut mit DNase I verdaut und anschließend wieder gereinigt.

2.10.10.2 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm, wie zuvor beschrieben (vgl. 2.10.1.4). Die RNA-Konzentration ergab sich anhand der Korrelation, dass ein A_{260} -Wert von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entspricht. Bei der Messung wurde auch die Reinheit der RNA-Probe überprüft, wobei ein hoher Reinheitsgrad bei einem A_{260}/A_{280} -Verhältnis von ca. 2 angenommen wurde.

2.10.10.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle wurde die präparierte Gesamt-RNA mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese analysiert. Einzelsträngige RNA kann Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden, die das Laufverhalten im Agarosegel beeinflussen und die Auftrennung entsprechend der Größe verfälschen können. Daher wurden ein Agarosegel mit Formaldehyd und ein Ladepuffer mit Formamid zur Denaturierung der RNA-Moleküle verwendet. Für ein 1%iges Agarosegel wurden 0,3 g Agarose in 21,6 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ durch Erhitzen gelöst und die Lösung auf etwa 60 °C abgekühlt. Anschließend wurden 3 mL 10 x MOPS-Puffer und 5,4 mL 37% Formaldehyd zugegeben und das Gel in die Gelkammer mit Kamm gegossen. Die zu analysierenden RNA-Proben (1,5-2,5 μg) und der RNA-Größenstandard (Riboruler High Range RNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) wurden mit 2 x Ladepuffer des Herstellers versetzt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Danach wurden die Proben auf das Gel geladen und die Elektrophorese mit 1 x MOPS-Puffer als Laufpuffer bei

80-90 Volt durchgeführt. Zur Visualisierung der RNA wurde das Agarosegel mit GelRed gefärbt (vgl. 2.10.3).

2.10.10.4 cDNA-Synthese

Mittels der reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann ausgehend von einem RNA-Molekül der komplementäre DNA-Strang (cDNA) synthetisiert werden. Durch eine anschließende PCR mit der cDNA als Template und spezifischen Primern für das Gen von Interesse ist der Nachweis der entsprechenden mRNA möglich. Außerdem kann die cDNA in eine quantitative PCR (qPCR) eingesetzt werden, um die relative mRNA-Menge eines bestimmten Gens im Vergleich zu einem Referenzgen zu bestimmen. Hierbei ist es auch möglich, die reverse Transkription und quantitative PCR in einem Schritt mit der RNA als Template durchzuführen (RT-qPCR). In dieser Arbeit wurde die aus *E. coli* und *A. cryptum* isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, um in einer anschließenden PCR mit spezifischen Primern für das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* die Länge der mRNA-Transkripte zu untersuchen. Für die RNA-Proben der *E. coli*-Stämme wurde das Transcriptor Universal cDNA Master Kit (Roche) verwendet und im Fall der präparierten RNA von *A. cryptum* erfolgte die cDNA-Synthese zusätzlich mit dem SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Die cDNA-Synthese wurde mit *random* Hexamer-Primern im Thermocycler gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (vgl. Tab. 2.19 bzw. 2.20). Neben dem Reaktionsansatz mit der zu untersuchenden RNA-Probe und der reversen Transkriptase (+RT), wurde auch ein Ansatz ohne Enzym (-RT) zur Kontrolle der RNA-Probe auf DNA-Kontamination verwendet. Weiterhin wurde mit einem Kontrollansatz ohne RNA (-K) überprüft, ob die RT und anderen Reaktionskomponenten frei von Verunreinigungen sind. Als Positivkontrolle für die reverse Transkription diente die vom Hersteller mitgelieferte Kontroll-RNA.

Tab. 2.19: cDNA-Synthese mittels Transcriptor Universal cDNA Master Kit

Für jede RNA-Probe wurde ein Ansatz mit bzw. ohne reverse Transkriptase (+/-RT) verwendet und zusätzlich wurde eine Kontrollreaktion ohne RNA (-K) angesetzt.

Reaktionsansatz	Volumen [μ L]			Temperaturprofil	[$^{\circ}$ C]	[min]
	+ RT	- RT	- K			
RNA (ca. 1 μ g)	2-7	2-7	-	1. Primer Annealing	25	5
5 x Reaktionspuffer	4	4	4	2. Reverse Transkription	55	30
20 x RT	1	-	1	3. Inaktivierung	85	5
H ₂ O _{reinst}	ad 20	20	20	4. Kühlung	4	∞

Im Anschluss an die reverse Transkription wurde mittels Kontroll-PCR und Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.10.2.3 und 2.10.3) überprüft, ob die cDNA-Synthese erfolgreich war und die Proben frei von DNA-Verunreinigungen waren. Dazu wurden spezifische Primer zur Amplifikation kurzer DNA-Bereiche des *ectABCDask*-Genclusters von *A. cryptum* verwendet. Neben den verschiedenen cDNA-Syntheseansätzen wurde Plasmid- oder genomische DNA als Template eingesetzt und diente

als Positivkontrolle für die PCR. Schließlich wurde durch PCR mit der cDNA als Template und spezifischen Primern für *ectAB* bzw. *ectABC* untersucht, ob die entsprechenden Kotranskripte gebildet wurden.

Tab. 2.20: cDNA-Synthese mittels SuperScript First-Strand Synthesis System

Für jede RNA-Probe wurde ein Ansatz mit bzw. ohne reverse Transkriptase (+/- RT) verwendet und zusätzlich wurde eine Kontrollreaktion ohne RNA (-K) angesetzt.

Reaktionsansatz	Volumen [μL]		
1. Ansatz A	+ RT	- RT	- K
0,5 μg RNA	1,5	1,5	-
10 mM dNTPs	1	1	1
50 ng/ μL Primer	1	1	1
H ₂ O _{reinst}	ad 10	10	10
2. Inkubation 5 min bei 65 °C und 1 min auf Eis			
3. Ansatz B			
10 x RT-Puffer	2		
25 mM MgCl ₂	4		
0,1 M DTT	2		
40 U/ μL RNaseOUT	1		
4. Ansatz B zu Ansatz A geben, mischen und 2 min bei 25 °C inkubieren			
5. Zugabe von 1 μL RT zu Ansatz + RT und - K bzw. 1 μL H ₂ O _{reinst} zu Ansatz - RT			
Temperaturprofil	[°C]	[min]	
1. Primer Annealing	25	10	
2. Reverse Transkription	42	50	
3. Inaktivierung	70	15	
4. Kühlung	4	∞	

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Proteinextraktion aus *E. coli*

Anzucht und Probennahme Für die Analyse der heterologen Expression des *ectABCDask*-Genclusters auf Proteinebene wurden die verschiedenen *E. coli* DH5 α -Stämme in MM63-0,5 mit Glycerin angezogen und die Expression durch AHT induziert (vgl. 2.8.3.2). *E. coli* XL1-Blue pRL59EH_ectC_Acry_His und BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His (Positivkontrolle) wurden zum Nachweis der *ectC*-Expression in LB-Medium kultiviert und die Induktion erfolgte mit IPTG (vgl. 2.8.3.2). Kurz vor Zugabe des Induktors und in verschiedenen Zeitabständen nach Induktion wurden 5-10 mL Kultur steril entnommen und abzentrifugiert (vgl. 2.8.6).

Gewinnung des löslichen Zellproteins Das lösliche Zellprotein wurde nach einer Methode von Brünig (2005) aus den Zellpellets gewonnen. Zunächst wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in

200 μL Resuspensionspuffer (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8) aufgenommen. Für die Zellyse wurden 2 μL Lysozym-Stammlösung zugegeben und der Ansatz unter mehrmaligem Vortexen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 10 μL SDS-Lösung (10 % w/v) versetzt und erneut 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 μL DNaseI-Stammlösung und 1 μL 50 mM MgCl_2 wurde die im Ansatz enthaltene DNA 1 - 2 h auf Eis hydrolysiert. Im Anschluss wurde die Probe mind. 30 min bei -20°C eingefroren, danach 45 min im eisgekühlten Ultraschallbad (Sonorex TK 52, Bandelin, Berlin) inkubiert und zwischendurch kräftig geschüttelt. Durch 30-minütige Zentrifugation bei $16.000 \times g$ und 4°C wurden unlösliche Proteine und Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand mit dem löslichen Zellprotein wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde ggf. zur Analyse der unlöslichen Proteinfraction aufgehoben.

Gewinnung der unlöslichen Proteinfraction Das nach der Proteinextraktion erhaltene Pellet wurde zur Aufreinigung der unlöslichen Proteine gemäß einem modifizierten Protokoll von Tetsch (2001) behandelt. Das Pellet wurde zweimal mit 500 - 750 μL Resuspensionspuffer gewaschen und zentrifugiert ($14.500 \times g$, 5 min). Danach wurde das Pellet je nach Größe in 0,1 - 1 mL 1 %iger SDS-Lösung resuspendiert und 1,5 - 2 h bei 80°C und 750 rpm im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend konnte die Probe direkt für die weitere Analyse verwendet werden.

2.11.2 Proteinextraktion aus *Synechocystis*

Für den Nachweis der Expression von *ectC* auf Proteinebene wurden *Synechocystis* pRL59EH_ectC_Acry_His und der Wildtyp (Negativkontrolle) in 50 mL BG11 sowohl mit als auch ohne IPTG angezogen und bei einer OD_{750} von 0,6 - 0,8 geerntet (vgl. 2.8.4 und 2.8.6). Für die Proteinextraktion wurde das Zellpellet mit 1 mL Lysepuffer (25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0,5 mM EDTA, pH 7,4) gewaschen und zentrifugiert ($8000 \times g$, 5 min). Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 300 μL Lysepuffer resuspendiert, 5 μL DNaseI-Stammlösung zugegeben und die Probe gemischt. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit ca. 150 mg Silica Beads (0,1 mm, BioSpec) überführt und dieses mit Parafilm dicht verschlossen. Zur Zellyse wurde der Ansatz fünfmal 20 s geschüttelt (ca. 4500 rpm, Silamat S6, Ivoclar Vivadent) und nach jedem Durchgang 3 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Silica Beads durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert und der Proteinextrakt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch die anschließende Zentrifugation ($16.000 \times g$, 4°C , 30 min) wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand mit dem löslichen Zellprotein wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet mit der unlöslichen Proteinfraction wurde durch Zugabe von 500 μL Lysepuffer und erneuter Zentrifugation ($16.000 \times g$, 4°C , 5 min) gewaschen. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 200 μL Lysepuffer resuspendiert. Die Proteinproben wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

2.11.3 Gesamtproteinbestimmung

Zur Quantifizierung des Gesamtproteins wurde das Zellpellet aus 2 mL Kultur oder die proteinhaltige Interphase aus der Bligh & Dyer-Extraktion (vgl. 2.9.2) verwendet. Das Zellpellet bzw. die Interphase wurde vollständig getrocknet, mit 0,5 mL 0,1 M NaOH versetzt und gevortext. Die Proben wurden ca. 2 h bei 75 °C und 600 rpm im Thermomixer inkubiert. Falls erforderlich, erfolgte zur Homogenisierung zusätzlich eine Inkubation im Ultraschallbad (5 - 15 min). Anschließend konnten die Zellysate direkt für die Bestimmung des Gesamtproteins mittels BCA-Test verwendet werden (vgl. 2.11.4).

2.11.4 Proteinquantifizierung mittels BCA-Test

Die Proteinkonzentration wurde in einem kolorimetrischen Test mit Bicinchoninsäure (BCA) bestimmt, der eine Kombination der Biuret-Reaktion mit BCA als Detektionssystem darstellt (Smith *et al.*, 1985). Cu^{2+} -Ionen werden durch Reaktion mit den Peptidbindungen von Proteinen in alkalischer Lösung zu Cu^+ -Ionen reduziert. Die Cu^+ -Ionen bilden mit BCA einen stabilen violett gefärbten Chelatkomplex, der einen kolorimetrischen Proteinnachweis erlaubt. Die Farbbildung ist proportional zum Proteingehalt, der anhand eines Proteinstandards bekannter Konzentration ermittelt werden kann.

Der BCA-Test wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (VWR) in einer Mikrotiterplatte gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Proteinproben wurden zwischen 1:5 und 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ verdünnt. Als Standard diente das Protein BSA (*bovine serum albumin*), das in definierten Konzentrationen von 50 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in die Messung eingesetzt wurde. Die Absorption der Proben wurde bei 550 nm in einem Plattenlesegerät (Infinite M200, Tecan Deutschland, Crailsheim) gemessen. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen anhand der BSA-Standardkurve bestimmt.

2.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit SDS (*sodium dodecyl sulfate*) ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Die PAGE erfolgt unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von SDS sowie Dithiothreitol (DTT), um den Einfluss der Eigenladung und Tertiärstruktur von Proteinen auf das Laufverhalten im Polyacrylamidgel zu minimieren. Mittels DTT werden die intra- und intermolekularen Disulfidbrücken der Proteine reduziert. Das anionische Detergens SDS unterbindet die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Proteine und maskiert deren Eigenladung. Dadurch weisen die Proteine eine negative Gesamtladung auf. Um eine starke Fokussierung der Proteinbanden zu erreichen, kann zusätzlich eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt werden. Bei dieser Methode werden die Proteine zuerst in einem Sammelgel (pH 6,8)

fokussiert und anschließend in einem höher konzentrierten Trenngel (pH 8,8) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Polyacrylamidgele setzen sich aus den Komponenten Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid zusammen. Acrylamid polymerisiert in Anwesenheit freier Radikale zu langen Ketten, die mittels Bisacrylamid quervernetzt werden. Bei der Reaktion dient N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumpersulfat (APS) stellt die freien Radikale bereit. Die Porengröße des Gels wird durch die Gesamtkonzentration von Acrylamid und Bisacrylamid (T in % w/v) sowie durch den Anteil des Quervernetzers Bisacrylamid an der Gesamtkonzentration (C in % w/v) bestimmt. Die SDS-PAGE erfolgte in Gelkammern der Firma Bio-Rad (Mini-PROTEAN) nach Angaben des Herstellers.

Herstellung des Polyacrylamidgels Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tab. 2.21 aufgeführt. Zunächst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit 70 %igem (w/v) Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation des Gels und Entfernen des Ethanols wurde das Sammelgel über das Trenngel gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Anschließend wurde die Gelkammer mit 1 x Laufpuffer befüllt.

Tab. 2.21: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE
Das Volumen beider Ansätze war ausreichend für zwei Polyacrylamidgele.

Trenngel (T = 13 %, C = 2 %)		Sammelgel (T = 4 %, C = 2 %)	
Trenngelpuffer	2,5 mL	Sammelgelpuffer	1,25 mL
Acrylamid-Mix	6,5 mL	Acrylamid-Mix	1 mL
10 % (w/v) SDS	0,1 mL	10 % (w/v) SDS	0,05 mL
H ₂ O _{reinst}	ad 10 mL	H ₂ O _{reinst}	ad 5 mL
zur Polymerisation beider Gele			
10 % (w/v) APS	50 µL		
TEMED	10 µL		

Gelelektrophorese Wenn nicht anders erwähnt, wurde von den Proteinproben ein Volumen mit 20 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit denaturierendem und reduzierendem Ladebuffer (4x RSB) versetzt, 5-10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Zur Größenbestimmung wurde ein Protein-Größenstandard (PageRuler Unstained Low Range oder Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Für die Fokussierung der Proteine im Sammelgel wurde eine Spannung von 60 Volt angelegt (Power Supply EPS 500/400, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die anschließende Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 100 Volt.

Detektion der Proteine Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel kurz in H₂O_{demin} gewaschen. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte entweder mittels Western Blot (vgl. 2.11.6) oder Coomassie-Färbung (Quick Coomassie Stain, Serva). Das Gel wurde 1 h in der Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Die Hintergrundfärbung wurde anschließend durch mehrere Waschstschritte mit H₂O_{demin}

entfernt. Das Gel wurde fotografiert und zur Konservierung auf Whatman-Papier mittels Vakuumtrockner (Gel Dryer MGD-4534, VWR) mind. 2 h bei 80 °C getrocknet. Das theoretische Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurde mit dem ProtParam tool (ExpASy) ermittelt und die entsprechenden Proteinbanden im Gel anhand des Größenstandards zugeordnet.

2.11.6 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Übertragung der mittels SDS-PAGE in einem Gel aufgetrennten Proteine auf ein geeignetes Trägermaterial, z.B. Nitrocellulosemembran, die eine anschließende Immunodetektion bestimmter Proteine durch spezifische Antikörper ermöglicht. In dieser Arbeit wurde der Western Blot anlehnd an die Methode von Towbin *et al.* (1979) zum Nachweis des mit einem His-Tag fusionierten EctC-Proteins von *A. cryptum* verwendet.

Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektrophorese, wobei die durch SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wandern. Danach wurde die verbliebene Bindekapazität der Nitrocellulosemembran durch geeignete Proteine, z.B. BSA, blockiert. Bei der anschließenden Immunodetektion wurde zunächst ein primärer Antikörper zur spezifischen Bindung an das nachzuweisende Protein (Antigen), hier mittels His-Tag, eingesetzt. Im zweiten Schritt wurde der primäre Antikörper durch einen sekundären Antikörper gebunden, an den eine alkalische Phosphatase (AP) für den kolorimetrischen Nachweis gekoppelt war. Als Substrat für die AP wurde 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) in Kombination mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) verwendet (Blake *et al.*, 1984). BCIP bildet nach AP-vermittelter Dephosphorylierung und anschließender Dimerisierung einen blauen wasserunlöslichen Farbstoff. Durch die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente wird NBT zu einem blauvioletten Farbstoff reduziert und trägt zur Verstärkung der Farbreaktion bei, die eine Detektion der von den Antikörpern gebundenen Proteine ermöglicht.

Proteintransfer Zunächst wurden sechsmal Whatman-Papier und einmal Nitrocellulosemembran (Protran BA83, Whatman, Dassel) auf Gelgröße zurechtgeschnitten und 1 h in Towbin-Puffer inkubiert. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Proteingel ebenfalls 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Für den Proteintransfer wurde das Gel um 180 °C waagrecht gedreht, auf einen Stapel aus dreimal Whatman-Papier gelegt und die Membran sowie drei weitere Whatman-Papiere aufgelegt. Der Stapel wurde Luftblasen-frei und mit der Membran zur Anode gerichtet in die Blot-Kammer (Owl Separation Systems, Thomas Scientific, Swedesboro, USA) gelegt. Der Proteintransfer erfolgte 30-35 min bei 15 Volt. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel zur Kontrolle mit Coomassie gefärbt und die Membran mit den übertragenen Proteinen über Nacht in Blockierungslösung unter leichtem Schütteln auf dem Rotationsschüttler inkubiert.

Immunodetektion Alle Inkubationszeiten erfolgten unter leichtem Schütteln auf dem Rotationsschüttler. Im Anschluss an die Blockierung der Membran wurde diese zweimal 10 min mit TBSTT-Puffer und einmal 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 3 µg des primären

Antikörpers (His Tag Monoclonal Antibody, Merck) in 25 mL Blockierungslösung gelöst und mit der Membran 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran, wie zuvor beschrieben, gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Goat Anti-Mouse IgG AP Conjugate, Merck) wurde in 25 mL TBS-Puffer mit 1 % (w/v) Casein sowie 10 % (w/v) Magermilchpulver 1:5000 verdünnt und mit der Membran 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran fünfmal 10 min mit TBSTT-Puffer gewaschen. Schließlich wurde die Membran in ein 50 mL-Falcon-Röhrchen überführt, 10 mL AP-Puffer mit 0,2 mL NBT/BCIP-Lösung zugegeben und die Membran unter leichtem Schwenken gefärbt, bis Proteinbanden sichtbar waren.

2.11.7 Aktivitätsnachweis von EctC im Rohextrakt

Der Aktivitätstest mit Rohextrakten der verschiedenen *E. coli* DH5 α -Produktionsstämme sollte Aufschluss darüber geben, ob in der stationären Phase, in der unter manchen Wachstumsbedingungen ADABA extrazellulär detektiert werden konnte, EctC noch aktiv vorliegt. *E. coli* DH5 α pASK-IBA3 diente als Negativkontrolle und BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His als Positivkontrolle für den Nachweis der EctC-Aktivität.

Anzucht Die Stämme wurden in MM63-0,5 mit Glycerin kultiviert (vgl. 2.8.3.2). Die heterologe Expression von *ectC* wurde bei den Stämmen mit pASK-Vektoren durch AHT (0,6 μ g/mL) und im Fall von *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His mittels 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellernte erfolgte 18 h nach Induktion in der stationären Phase und von der Positivkontrolle wurde zusätzlich eine Kultur 7 h nach IPTG-Zugabe geerntet (11.000 x g, 20 °C, 20 min). Für die Plasmid-Isolierung wurden 3 mL Kultur separat abzentrifugiert (vgl. 2.8.6) und für die HPLC-Analyse wurde 1 mL Medienüberstand bei -20 °C verwahrt.

Gewinnung des Rohextrakts Nach der Ernte wurde das Zellpellet in 5 mL Reaktionspuffer A (50 mM Tris-HCl, 0,5 % NaCl, pH 8) auf Eis resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in einem vorgekühlten Ultraschallgerät (Sonifier Cell Disruptor B15, Branson, Danbury, USA) für 1-2 min/mL Zellsuspension mit einem Pausenzeitintervall von 50 %. Anschließend wurde für die SDS-PAGE eine Probe des gewonnenen Rohextrakts bei -20 °C gelagert und der restliche Ansatz bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

Reaktionsansatz in Tris-Puffer Für den Aktivitätstest wurden 250 μ L Reaktionspuffer A inkl. 160 mM ADABA in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen Rohextrakt gemischt, so dass der Reaktionsansatz eine Endkonzentration von 80 mM ADABA als Substrat für EctC aufwies. Als Negativkontrolle diente neben dem Reaktionsansatz mit Rohextrakt von *E. coli* DH5 α pASK-IBA3 auch ein Ansatz ohne Rohextrakt, der stattdessen 250 μ L Reaktionspuffer A ohne ADABA enthielt. Nach dem Reaktionsstart durch Zugabe des Rohextrakts wurden die Ansätze 30 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probennahme (20 μ L) erfolgte unmittelbar nach Reaktionsstart und anschließend in variablen Zeitabständen, wobei der Reaktionsansatz zuvor gründlich gemischt wurde. Die Proben wurden zum Abstoppen der Reaktion mit 20 μ L Acetonitril (100 %) versetzt

und zur Bestimmung der ADABA- und Ectoin-Konzentration mittels HPLC analysiert (vgl. 2.9.4).

Reaktionsansatz im Medienüberstand Neben dem Tris-Puffer wurden auch Medienüberstände aus verschiedenen Experimenten, z.B. der Fed-Batch-Fermentation, als Basis für den Aktivitätstest verwendet, die eine ADABA-Konzentration von bis zu 15 mM aufwiesen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μL Rohextrakt zu 400 μL Überstand gestartet. Zum Vergleich, ob EctC im verwendeten Medium generell aktiv ist, diente MM63-0,5 mit 100 mM ADABA, das mit Rohextrakt der Positivkontrolle versetzt wurde. Die weitere Durchführung erfolgte wie zuvor für den Reaktionsansatz in Tris-Puffer beschrieben.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Produktion der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin im Zusammenhang mit drei unterschiedlichen Mikroorganismen behandelt. Das Hydroxyectoin-Biosynthesegencluster (*ectABCDask*-Gencluster) des acidophilen Bakteriums *A. cryptum* wurde im Hinblick auf die Anpassung an osmotischen Stress durch NaCl bzw. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ und dessen Potenzial für die Produktion von Ectoinen in *E. coli* näher betrachtet. Daran anknüpfend wurde *E. coli* als heterologes Produktionssystem für Ectoin bzw. Hydroxyectoin unter Verwendung des *A. cryptum*-Genclusters und geringer Salinitäten untersucht. Darüber hinaus wurden erste Versuche zur heterologen Produktion von Ectoinen in dem Cyanobakterium *Synechocystis* unternommen.

3.1 Das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum*

A. cryptum und dessen *ectABCDask*-Gencluster zur Synthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin waren bereits Bestandteil der vorangegangenen Diplomarbeit (Moritz, 2012). Dabei konnte erstmals die metabolische Funktionalität des Genclusters bestätigt werden. Bisher wurde nur das Genom des von Küsel *et al.* (1999) beschriebenen Isolats *A. cryptum* JF-5 vollständig sequenziert (GenBank CP000697). Deshalb wurde das verwendete *ectABCDask*-Gencluster des Typstamms *A. cryptum* DSM 2389^T im Zuge dieser Arbeit sequenziert (vgl. Abb. 7.4 im Anhang). Der Sequenzvergleich zwischen *A. cryptum* DSM 2389^T und JF-5 ergab 32 Unterschiede und somit eine Übereinstimmung der Nukleotidsequenz von 99,3%. Die Aminosäuresequenzen von EctA und EctD sind bei beiden Stämmen identisch, während EctB vier, EctC zwei und Ask zwei nicht übereinstimmende Aminosäuren aufweisen (vgl. Abb. 7.4).

Bei der physiologischen Charakterisierung von *A. cryptum* in vorherigen Experimenten (Moritz, 2012) erwies sich Glycerin als geeignetere C-Quelle als Glucose, welche standardmäßig zur Kultivierung von *A. cryptum* verwendet wird. Bei der Anzucht mit Glycerin statt mit Glucose erreichte *A. cryptum* nicht nur höhere Wachstumsraten, sondern tolerierte auch höhere Salinitäten im Medium. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass *A. cryptum* bei höheren Glycerin- und Glucose-Konzentrationen als der von Harrison (1981) empfohlenen Menge von 0,1% C-Quelle wachsen kann und entsprechend höhere Zelldichten erreicht (Daten nicht gezeigt). Ein wachstumshemmender Effekt, wie zuvor für Glucose über 0,1% beschrieben wurde (Harrison, 1981), konnte hierbei nicht beobachtet werden (getestet bis 0,7%). Die folgenden Experimente zur osmotischen Anpassung von *A. cryptum* an NaCl und $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ sollten zeigen, welche Rolle dabei das *ectABCDask*-Gencluster spielt, und wurden aufgrund der genannten Vorteile mit Glycerin als C-Quelle durchgeführt.

3.1.1 Osmotische Anpassung von *A. cryptum*

3.1.1.1 Osmotische Anpassung an Natriumchlorid

Wachstumsversuche in M269 mit steigender Salinität zeigten, dass *A. cryptum* nur eine relativ niedrige Salztoleranz aufweist. Bei 5 % NaCl war die Wachstumsrate mit $0,04 \text{ h}^{-1}$ (t_d ca. 17 h) um das Vierfache geringer im Vergleich zum Wachstum ohne NaCl (vgl. Abb. 3.1). Bereits oberhalb einer NaCl-Konzentration von 2 % nahm die Wachstumsrate deutlich ab und bei 6 % NaCl war kein Wachstum zu beobachten (nicht gezeigt).

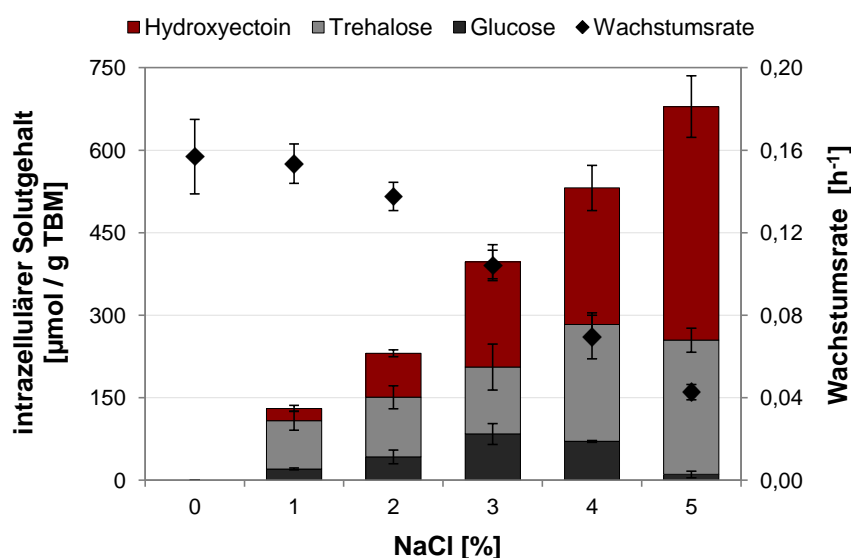


Abb. 3.1: Wachstum von *A. cryptum* mit steigender Salinität

Nach Anzucht in M269 mit steigender Salinität und Ernte in der stationären Phase wurden die Solute aus den Zellen extrahiert. Die Zellextrakte wurden mittels HPLC analysiert und der intrazelluläre Solutgehalt ($\mu\text{mol/g}$ Trockenbiomasse (TBM)) sowie die Wachstumsrate (h^{-1}) ermittelt. Trehalose und Hydroxyectoin wurden per HPLC und Glucose enzymatisch quantifiziert. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist dargestellt.

Als Anpassung an den osmotischen Stress synthetisierte *A. cryptum* hauptsächlich Trehalose und Hydroxyectoin, deren intrazellulärer Gehalt mit steigender Salinität zunahm (vgl. Abb. 3.1). Der Trehalose-Gehalt stieg bei 5 % verglichen mit 1 % NaCl um den 2,5-fachen Wert auf insgesamt $240 \mu\text{mol/g TBM}$ an. Die Produktion von Hydroxyectoin zeigte eine deutlich stärkere Antwort auf den osmotischen Stress und nahm um den Faktor 20 zu. Demgegenüber konnte Ectoin, das als Vorstufe für Hydroxyectoin dient, nur in geringen Mengen ($< 10 \mu\text{mol/g TBM}$) in den Zellextrakten detektiert werden (nicht dargestellt). Glucose war ebenfalls in den Zellen nach Anzucht mit Glycerin als C-Quelle nachweisbar (bis zu $85 \mu\text{mol/g TBM}$ bei 3 % NaCl).

Eine ^{13}C -NMR-Spektroskopie sollte Aufschluss über mögliche weitere organische Solute geben, die nicht mittels der verwendeten HPLC-Methode detektiert werden konnten. Abbildung 3.2 zeigt das NMR-Spektrum eines Zellextrakts von *A. cryptum* nach Anzucht mit 3 % NaCl. Neben den zuvor genannten Soluten konnte lediglich noch Glutamat identifiziert werden, das mit ca. $25 \mu\text{mol/g TBM}$ einen kleinen Anteil am gesamten Solutgehalt ausmachte.

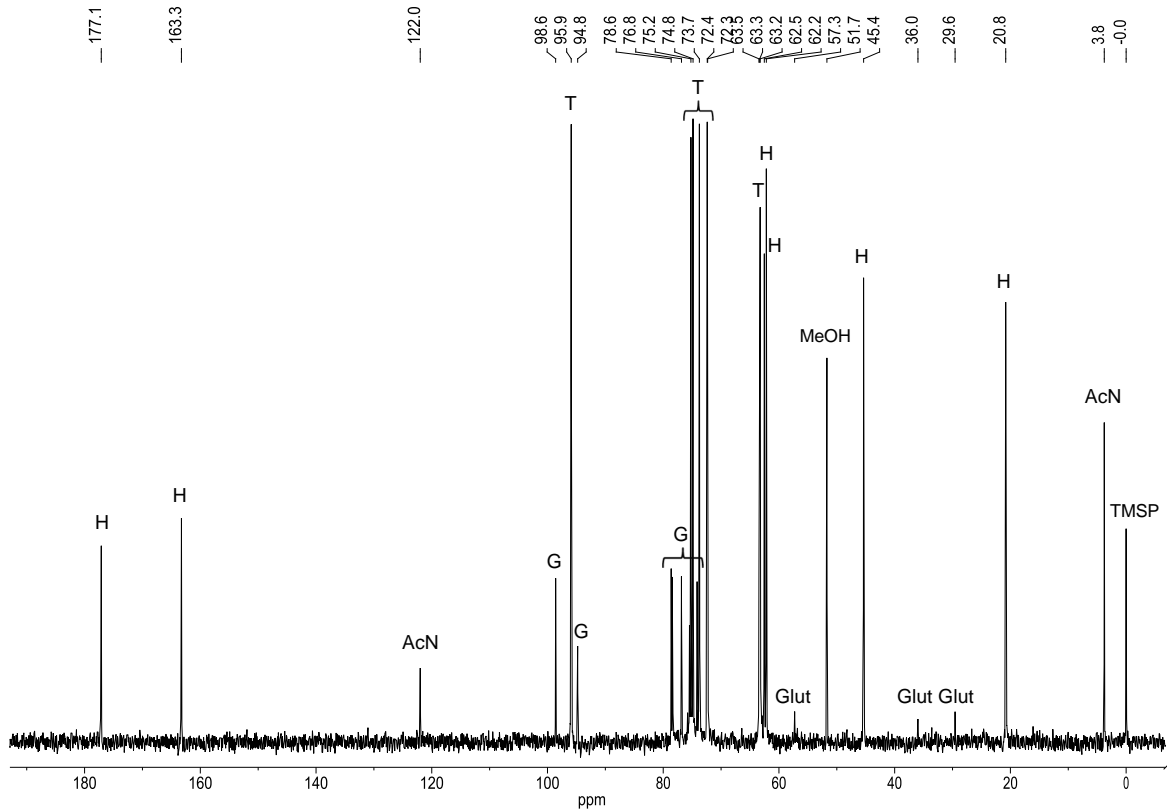


Abb. 3.2: ^{13}C -NMR-Spektrum des *A. cryptum*-Zellextrakts nach Anzucht mit 3% NaCl
 Die Solute wurden aus Zellen der stationären Phase extrahiert. Der Zellextrakt wurde mit dem internen Standard Na-Trimethylsilylpropionat (TMSP), Acetonitril (AcN) und Methanol (MeOH) vermessen. Neben den Standardsignalen konnten Signale für Hydroxyectoin (H), Trehalose (T), Glucose (G) und Glutamat (Glut) identifiziert werden. Die Signale der Carboxylgruppen von Glutamat (ca. 177 und 183 ppm) waren wegen der geringen Konzentration nicht sichtbar.

3.1.1.2 Osmotische Anpassung an Aluminiumsulfat

Neben NaCl wurde auch der Effekt von $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ auf das Wachstum von *A. cryptum* und die Akkumulation von kompatiblen Soluten analysiert. Hierbei kam nicht nur der osmotische Stress durch die hohe Ionenkonzentration, sondern zusätzlich die Toxizität von Aluminium zum Tragen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der für *A. cryptum* beschriebenen Aluminium-Resistenz (Fischer *et al.*, 2002) und der Fähigkeit zur Synthese von Ectoinen sollte untersucht werden. Die Wachstumsversuche zeigten, dass eine Konzentration zwischen 10 und 100 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ zu einer erhöhten Wachstumsrate im Vergleich zum Wachstum ohne $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ führte (0,21 vs. 0,16 h^{-1}). Bei Anzucht mit 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ hingegen hatte *A. cryptum* eine deutlich niedrigere Wachstumsrate (vgl. Abb. 3.3). *A. cryptum* konnte noch bei ca. 400 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ wachsen, aber, trotz Vorkultivierung mit 50 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, erst nach einer 15-stündigen lag-Phase und mit einer Wachstumsrate unter 0,05 h^{-1} (nicht gezeigt). Bei der Kultivierung mit 50 bis 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, für die ebenfalls Vorkulturen inkl. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ verwendet wurden, war keine nennenswerte lag-Phase zu beobachten. Nach 72 Stunden Wachstum mit 400 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ hatte *A. cryptum* nur eine OD_{600} von ca. 0,4 erreicht und die Biomasse war zu niedrig für eine Extraktion der Solute.

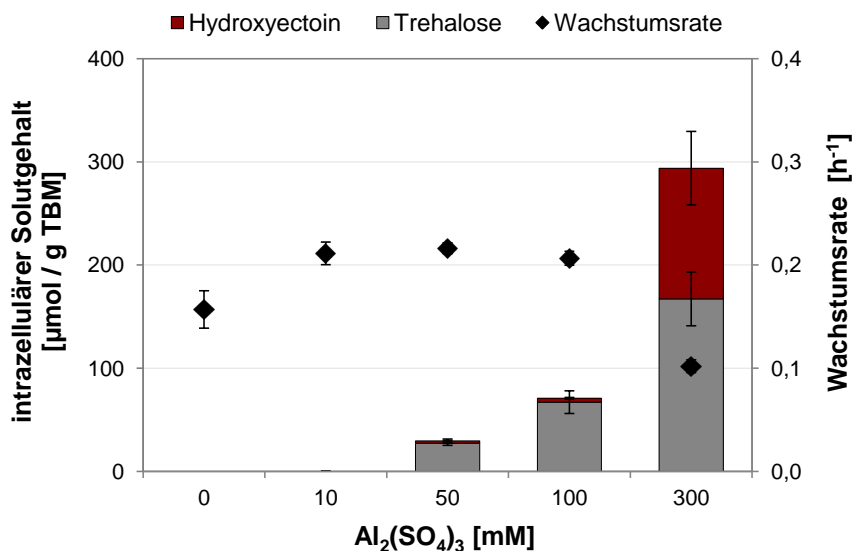


Abb. 3.3: Wachstum von *A. cryptum* mit Aluminiumsulfat

Nach Anzucht in M269 mit steigender $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ -Konzentration und Ernte in der stationären Phase wurden die Solute aus den Zellen extrahiert. Die Zellextrakte wurden mittels HPLC analysiert und der intrazelluläre Solutgehalt ($\mu\text{mol/g}$ Trockenbiomasse (TBM)) sowie die Wachstumsrate (h^{-1}) bestimmt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist dargestellt.

Mittels HPLC konnte die Synthese von Trehalose sowie Hydroxyectoin und eine Zunahme des intrazellulären Solutgehalts abhängig von der $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ -Konzentration festgestellt werden. Der Trehalose-Gehalt stieg kontinuierlich an, während Hydroxyectoin nur bei 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ in signifikanten Mengen von *A. cryptum* akkumuliert wurde (vgl. Abb. 3.3). Entsprechend zum Wachstum mit NaCl machte Glutamat mit ca. 10 $\mu\text{mol/g}$ TBM nur einen sehr kleinen Anteil am intrazellulären Solutgehalt aus (nicht gezeigt). Ectoin konnte ebenfalls nur in vernachlässigbaren Mengen nachgewiesen werden. Glucose wurde, anders als bei Anzucht mit NaCl, nicht von *A. cryptum* im Cytoplasma akkumuliert. Darüber hinaus konnten keine weiteren organischen Solute mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie von Zellen nach Anzucht mit 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ detektiert werden (nicht dargestellt).

3.1.1.3 Vergleich der osmotischen Konzentration von NaCl und $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Die osmotische Konzentration von NaCl und $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ wurde bestimmt, um den osmotischen Effekt beider Verbindungen auf das Wachstum von *A. cryptum* besser vergleichen zu können. Die Osmolalität (Osmol/kg) von M269 mit steigenden molaren NaCl- bzw. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ -Konzentrationen wurde mittels Gefrierpunktsosmometer und Dampfdruckosmometer gemessen (vgl. Abb. 3.4). Im Fall von NaCl stieg die osmotische Konzentration linear mit der Molarität an und war entsprechend der Anzahl der osmotisch aktiven Teilchen etwa doppelt so hoch. Die Messungen mit $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ zeigten, dass eine lineare Beziehung zwischen Osmolalität und Molarität nur bis etwa 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ besteht. Außerdem fiel die Osmolalität, vor allem bei molaren Konzentrationen bis 500 mM, nicht so hoch aus, wie anhand der Teilchenzahl zu erwarten gewesen wäre. Beide Methoden lieferten für NaCl annähernd gleiche osmotische Konzentrationen, wobei

mittels Dampfdruckosmometer die Messwerte etwas höher waren. Für $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ergaben sich bis zu einer Molarität von 300 mM sehr ähnliche Osmolalitäten. Darüber hinaus wurden mit dem Gefrierpunktosmometer jedoch deutlich höhere Messwerte ermittelt.

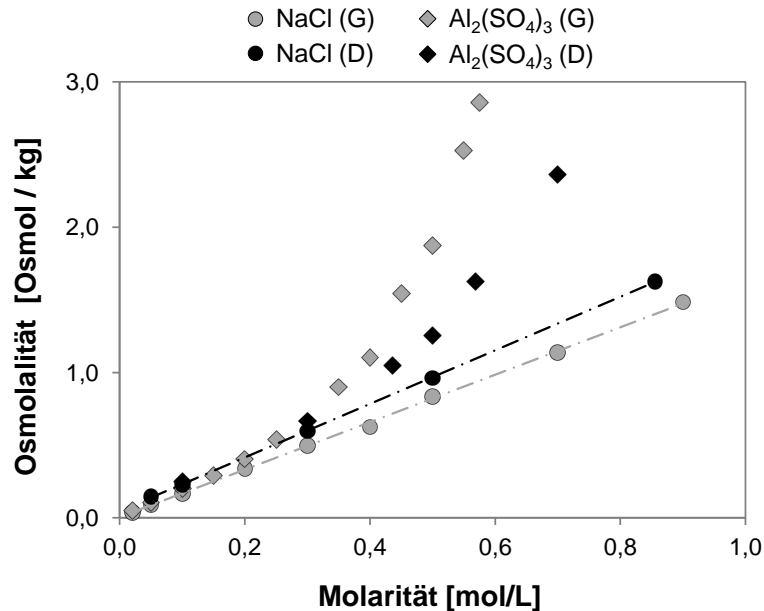


Abb. 3.4: Vergleich der osmotischen Konzentration von NaCl und $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Die Osmolalität (Osmol/kg) von M269 mit steigender NaCl- bzw. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ -Konzentration (mol/L) wurde mittels Gefrierpunktosmometer (G) und Dampfdruckosmometer (D) bestimmt. Dargestellt sind die Messwerte abzüglich der Osmolalität des Mediums ohne Zugabe von NaCl bzw. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

Bei Molaritäten bis 300 mM waren die osmotischen Konzentrationen in M269 mit NaCl bzw. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ sehr ähnlich (vgl. Abb. 3.4). Demnach sind von den zuvor ermittelten Wachstumsdaten zu *A. cryptum* die bei Anzucht mit 2% NaCl (342 mM) und 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ vergleichbar (ca. 0,6 Osmol/kg). *A. cryptum* erreichte in M269 mit 2% NaCl eine etwas höhere Wachstumsrate ($0,14 \text{ h}^{-1}$) als mit 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ($0,1 \text{ h}^{-1}$), während der Gesamtsolutgehalt ca. 20% geringer war (230 vs. 290 $\mu\text{mol/g}$ TBM). Aber unter beiden Wachstumsbedingungen ergab sich ein Verhältnis der akkumulierten Solute Trehalose und Hydroxyectoin von etwa 1,5:1 (vgl. Abb. 3.1 und 3.3).

3.1.2 Potenzial des *A. cryptum*-Genclusters für die heterologe Expression in *E. coli*

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass *A. cryptum* nur eine geringe Toleranz gegenüber osmotischem Stress besitzt und nicht zu den halophilen Vertretern gezählt werden kann, obwohl es ein *ectABCDask*-Gencluster zur Synthese von Ectoinen besitzt. Gleichzeitig konnte die Synthese von Hydroxyectoin bereits bei niedrigen osmotischen Konzentrationen beobachtet werden. Das sind erste Anzeichen dafür, dass das Gencluster von *A. cryptum* für die heterologe Produktion von Ectoinen in *E. coli*, ebenfalls ein Bakterium mit niedriger Salztoleranz, geeignet ist.

In vorherigen *in vitro*-Experimenten mit EctC von *A. cryptum* und dem moderat halophilen Bakterium *H. elongata* im direkten Vergleich zeigte sich, dass das Enzym von *A. cryptum* die

höchste spezifische Aktivität ohne NaCl aufweist und die Aktivität mit steigender Salinität abnimmt (Moritz, 2012). Demgegenüber benötigt EctC von *H. elongata* NaCl für eine maximale spezifische Aktivität. Weiterhin fiel beim Vergleich der Aminosäuresequenz auf, dass EctC von *A. cryptum* einen deutlich geringeren Anteil saurer Aminosäuren und damit verbunden einen höheren theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 6,03 hat. Das Enzym von *H. elongata* hingegen weist einen ausgeprägten sauren Charakter und einen niedrigeren theoretischen pI von 4,87 auf, was häufig auf Proteine halophiler Vertreter zutrifft und mit der Salzabhängigkeit in Zusammenhang gebracht wird (Ventosa *et al.*, 1998; Oren & Mana, 2002).

Um EctC von *A. cryptum* noch besser einordnen zu können, wurden 80 in einem Ectoïn- bzw. Hydroxyectoïn-Gencluster annotierte Ectoïnsynthasen von Vertretern der *Bacteria* mit bekannter Genomsequenz hinsichtlich ihrer Acidität verglichen (vgl. Abb. 3.5, Tab. 7.1 im Anhang). Die Acidität ergibt sich aus der Anzahl saurer Aminosäuren (Aspartat, Glutamat) abzüglich der basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin) bezogen auf die Gesamtzahl der Aminosäuren und ist ein Maß für den sauren Charakter eines Proteins. Unter den betrachteten Proteinen besitzt EctC von *A. cryptum* fast die geringste Acidität (3%). EctC von *H. elongata* ist hingegen mit einer Acidität von 10% am anderen Ende der Skala zu finden, wo weitere Vertreter mit hoher Salztoleranz bzw. halophile Bakterien eingeordnet sind. Die Erkenntnisse zu EctC von *A. cryptum* zeigen, dass es nicht zu den halophilen Proteinen gezählt werden kann. Das ist ein weiterer Hinweis dafür, dass das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* ein vielversprechender Kandidat für die heterologe Produktion von Ectoïnen in *E. coli* bei geringer Salinität ist.

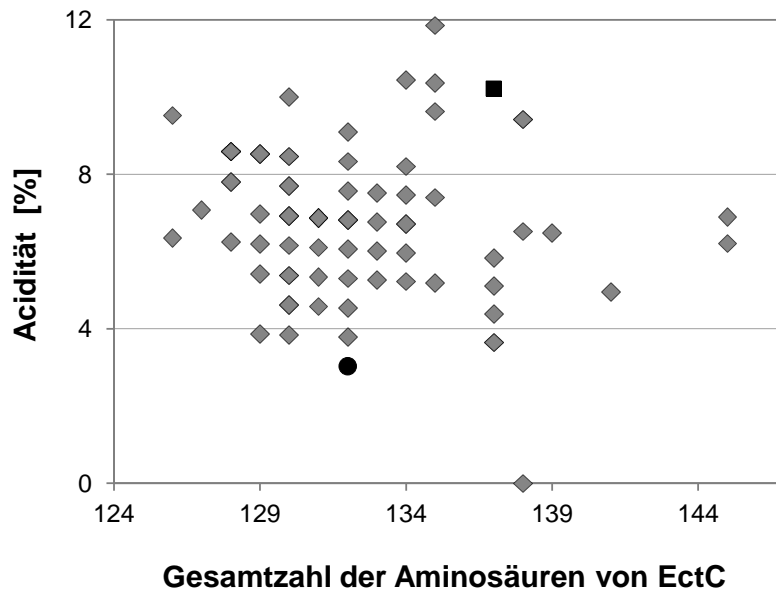


Abb. 3.5: Vergleich der Acidität verschiedener Ectoïnsynthasen

80 in einem Ectoïn-Gencluster annotierte Ectoïnsynthasen von Vertretern der *Bacteria* mit bekannter Genomsequenz (NCBI) wurden hinsichtlich ihrer Acidität verglichen (vgl. auch Tab. 7.1 im Anhang). Die Acidität ergibt sich aus den sauren Aminosäuren (Aspartat, Glutamat) abzüglich der basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin) dividiert durch die Gesamtzahl der Aminosäuren des Proteins. EctC von *A. cryptum* (schwarzer Kreis) und *H. elongata* (schwarzes Quadrat) sind hervorgehoben.

3.2 Heterologe Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* mittels des *A. cryptum*-Genclusters

Das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* wurde bereits unter Kontrolle der putativen Promotorsequenzen stromaufwärts von *ectA* in *E. coli* DH5 α exprimiert (Moritz, 2012). Die Hydroxyectoin-Produktion fiel zwar relativ gering aus, aber es zeigte sich, dass Hydroxyectoin schon bei niedriger Salinität (1 % NaCl) synthetisiert wird. In einem nächsten Schritt sollte die heterologe Expression des *A. cryptum*-Genclusters unter Kontrolle eines für *E. coli* geeigneteren und starken Promotors erfolgen. Dazu wurden die Gene in den Vektor pASK-IBA3 mit dem AHT-induzierbaren *tet*-Promotor eingebracht und die Produktionsstämme *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD sowie pASK_ectABCDask konstruiert (Bethlehem, 2015). Bei ersten Wachstumsversuchen in Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle und 1 % NaCl bzw. ohne NaCl konnte eine hohe Produktion und Akkumulation der Ectoine im Medium festgestellt werden (bis zu 1,3 g/g TBM). Darauf aufbauend sollte in dieser Arbeit die heterologe Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* DH5 α unter Verwendung des *A. cryptum*-Genclusters weiter untersucht und optimiert werden. Dafür wurde ausschließlich der Stamm *E. coli* DH5 α verwendet, der zur vereinfachten Schreibweise der Produktionsstämme im gesamten Kapitel 3.2 nur mit *E. coli* bezeichnet wird.

3.2.1 Akkumulation von Ectoin durch Mutation im Vektor pASK_ectABCD

Der Produktionsstamm *E. coli* pASK_ectABCD synthetisierte entgegen den Erwartungen kein Hydroxyectoin, sondern akkumulierte Ectoin in hoher Konzentration und zusätzlich geringe Mengen N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure (ADABA) im Medium. Daher wurden die Expressionsvektoren pASK_ectABCD und pASK_ectABCDask zunächst durch Sequenzierung hinsichtlich möglicher Mutationen in der Nukleotidsequenz geprüft. Für pASK_ectABCD ergab sich eine Punktmutation in *ectD* an Position 353 (C statt T), die mit einem Aminosäureaustausch (L118P) in EctD einhergeht.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Proteins mit der von EctD des Donorstamms *A. cryptum* DSM 2389^T und anderen Ectoinhydroxylasen wurde herangezogen, um die Mutation in EctD von *E. coli* pASK_ectABCD bewerten zu können (vgl. Abb. 3.6). Der Aminosäureaustausch L118P betrifft nicht direkt eine konservierte Aminosäure, aber liegt in unmittelbarer Nähe zur Consensus-Sequenz und zu Aminosäuren, die in verwandten Ectoinhydroxylasen an der Ligandenbindung im aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt sind (Reuter *et al.*, 2010; Höppner *et al.*, 2014). Die Mutation in *ectD* könnte demnach ein Grund für die Inaktivität von EctD und somit auch für das Ausbleiben der Hydroxyectoin-Produktion im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD sein.

3 Ergebnisse

<i>E. coli</i> pASK_ectABCD	-MDDLPSRREPTPSLLPRHDPVVHGRWAPGAPLSDEQTRFYDTNGYLVLENVFDPAEIALLOSG	64
<i>A. cryptum</i>	-MDDLPSRREPTPSLLPRHDPVVHGRWAPGAPLSDEQTRFYDTNGYLVLENVFDPAEIALLOSG	64
<i>P. stutzeri</i>	MQADLYPSRQEDQPSWQERLDPVYRSDLLENAPIAAEI LVERFERDGYLVIPNLFSADEVAlFRAE	65
<i>P. zucineum</i>	MTEdlYPSRvSkPAWQPRIDPVAHSRWTPeAPISAEQhVMfERDGYLVLENLFSAAEVATLQRE	65
<i>S. baderi</i>	-MKDIYPSRHAAMAeFSPrLDpVVhSEwNEaAPiGAQQaEQfERDGYLVLEDMFSDeeVAFLOqE	64
<i>S. alaskensis</i>	-MQDLPSRQrADAEmRPlDpVVHsEWtNdAPiSARQAAAFrDRDGYIVLEdIFSADEVaFLOqA	64
	*:**** * ** : ** : : : **:*: : : * * : *	
<i>E. coli</i> pASK_ectABCD	SMDLLANPAGLDRETI I TERGSDEVRSIF AIHAQNEllGrLAADSRIAGVArF [*] LDDdVYIHQsR	129
<i>A. cryptum</i>	SMDLLANPAGLDRETI I TERGSDEVRSIF AIHAQNEllGrLAADSRIAGVArFLLDDdVYIHQsR	129
<i>P. stutzeri</i>	LERMQRDPFAVAGSGKTIKEPDSGAIRSVF AIHKDNElFARVAADERTAGIARFI LGGDLVYHQSr	130
<i>P. zucineum</i>	LERMkRMPAsLETETTLIAEPGSgALrSVF AIHAQnrlfGrLAADerLVsVarHLLgDevYIHQSR	130
<i>S. baderi</i>	AGKLLADpAALeaEtVITEPGsREvRSIF AIHAQsRvLARLAADerLAGvArFLLgDevYIHQSR	129
<i>S. alaskensis</i>	AGNLADpAALdADtIVTEpQsNEIrSI [*] F EIHQSPvMARLAADARLADvArFLLgDevYIHQsR	129
	* * * : * : : * * : * * : : * : **	
<i>E. coli</i> pASK_ectABCD	LNYKPGFDGKEFYWHSDfETW [*] HVEDGMPRRALSMsILLAENTAnngPLMVIpGSHrKYLTcVGE	194
<i>A. cryptum</i>	LNYKPGFDGKEFYWHSDfETW [*] HVEDGMPRRALSMsILLAENTAnngPLMVIpGSHrKYLTcVGE	194
<i>P. stutzeri</i>	MNFKPGFTGKEFYWHSDfETW [*] hIEDGMPRRCLSCsILLTdnEPHngPLMLMpgShkHYVRcVGA	195
<i>P. zucineum</i>	LNYKSGFDGReFYWHSDfETW [*] HVEDGMPRRALSMsvQLADnHAvngPLMVMpGsqRtYVscVGE	195
<i>S. baderi</i>	LNYKPGFQGREFYWHSDfETW [*] HVEDGMPRRALSMsvLLAE [*] NTpHngPLMLIpGShrAFltcVGA	194
<i>S. alaskensis</i>	LNYKPGFkGREFYWHSDfETW [*] HVEDGMPRRALSMsvLLAE [*] NTpHngPLMVIpGShrTYLTcVGE	194
	: * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>E. coli</i> pASK_ectABCD	TPENHYRSSLKQeYGVpDrEmLtalASdHGivApTgkAgTVVlFDCNTMHG [*] SNGnITPfPRsNA	259
<i>A. cryptum</i>	TPENHYRSSLKQeYGVpDrEmLtalASdHGivApTgkAgTVVlFDCNTMHG [*] SNGnITPfPRsNA	259
<i>P. stutzeri</i>	TPENHYEKSLrKQeIgiPdqnsLselASrFgIdCATgPAGsvVfFDCNTMHG [*] SNGnITPsARsNL	260
<i>P. zucineum</i>	TPEDHYKQSLrKQeYGVpDRdSLArLaEtCGivApTgPAGsvVlFDCNTMHG [*] SNGnITPfPRANA	260
<i>S. baderi</i>	TPEDHYRtSLkQeYGVpDEdSLAElaRHgIvApTgKpGSvVlFDCNVMHG [*] SNGnITPfPRANA	259
<i>S. alaskensis</i>	TPDDHYLSSLKQeYGVpDEeSLAElaRHgIvApTgKpGTvIlFDCnLMHG [*] SNGnITPfPRANA	259
	** : : * * * : * * * * : * : * : * * * * * * * : : * : * * * * * * * * : *	
<i>E. coli</i> pASK_ectABCD	FFVFNAKANSLvEFPfGPKSRrPDFIADRAF-TTVDIVKGLVRRERAA	306
<i>A. cryptum</i>	FFVFNAKANSLvEFPfGPKSRrPDFIADRAF-TTVDIVKGLVRRERAA	306
<i>P. stutzeri</i>	FYVYNHVDNAVQAPfCEQkPRPAFvAereNfKPLDIRPQYL-----	302
<i>P. zucineum</i>	FIVYNSvSNrLVepfGGRAPrPEfIATREGfEPLTAMGGDLAEGRAA-	307
<i>S. baderi</i>	FLVYNAVSNrLAAPfGVERPRPEfVATrGEPrAIAPISGLLLEEAPA-	306
<i>S. alaskensis</i>	FLVYNAVSNrLEKpfGVEKPRPwFLARrGEPALRVERGpLVETVPA-	306
	* : * : * * : * * * * * : * * * :	

Abb. 3.6: Sequenzvergleich der Ectoinhydroxylase

Um den Aminosäureaustausch L118P in EctD von *E. coli* pASK_ectABCD einzuordnen (rot markiert), wurde die Aminosäuresequenz mit der von EctD des Donorstamms *A. cryptum* DSM 2389^T, von *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190^T, *Phenylobacterium zucineum* HLK1, *Sphingobium baderi* DE-13 und *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 mittels Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) verglichen. Konservierte Aminosäuren sind mit einem Stern und Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften mit einem Doppelpunkt markiert. Die Consensus-Sequenz ist unterstrichen und Aminosäuren, die an der Ligandenbindung beteiligt sind (Reuter *et al.*, 2010; Höppner *et al.*, 2014), sind grau markiert.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde der Expressionsvektor pASK_ectABCD, wie zuvor von Bethlehem (2015) beschrieben, erneut konstruiert. Dazu wurden die Gene *ectABCD* mit den Primern *f_acry_Xba* und *r_ectD_acry_Hind* aus genomischer DNA von *A. cryptum* amplifiziert und über die mit den Primern eingefügten Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III in den Vektor pASK-IBA3 stromabwärts des *tet*-Promotors integriert (nicht dargestellt). Der neu konstruierte Expressionsvektor pASK_ectABCD2 wies entsprechend der Sequenzierungsergebnisse keine Mutation auf.

Wachstumsversuche mit *E. coli* pASK_ectABCD2 zeigten, dass dieser Stamm in der Lage ist Hydroxyectoin zu produzieren, und bestätigten die Annahme, dass die Mutation in pASK_ectABCD tatsächlich mit einem Funktionsverlust von EctD einhergeht. Im Vergleich zu den bisherigen Produktionsstämmen *E. coli* pASK_ectABCD und pASK_ectABCdask konnte bei Anzucht in MM63-0,5 mit Glucose kein wesentlicher Unterschied der Wachstumsrate und des extrazellulären Gesamtsolutgehalts festgestellt werden (vgl. Abb. 3.7). Anders als *E. coli*

pASK_ectABCD produzierte der Stamm mit pASK_ectABCD2 hauptsächlich Hydroxyectoin (8,8 mmol/g TBM). Ectoin machte mit 2 mmol/g TBM ca. 20% des Solutgehalts aus. Damit war der Ectoin-Anteil etwa doppelt so hoch wie bei dem Produktionsstamm mit Aspartokinase Ask (pASK_ectABCDask), was schlussendlich mit einer geringeren Ausbeute an Hydroxyectoin einhergeht. Für das Wachstum mit Glycerin als C-Quelle ergaben sich ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt). Deshalb wurde *E. coli* pASK_ectABCDask für weitere Experimente zur Hydroxyectoin-Produktion verwendet.

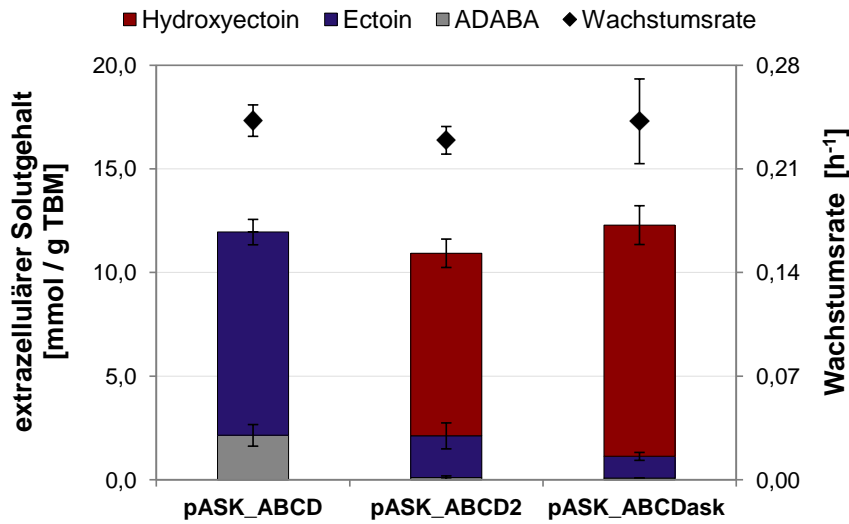


Abb. 3.7: Vergleich von *E. coli* pASK_ectABCD2 mit bisherigen Produktionsstämmen
Nach Anzucht in MM63-0,5 mit Glucose und Ernte in der stationären Phase wurden Medienüberstände von *E. coli* pASK_ectABCD2 (ohne Mutation), *E. coli* pASK_ectABCD (Mutation in *ectD*) und *E. coli* pASK_ectABCDask mittels HPLC analysiert und der extrazelluläre Solutgehalt (mmol/g Trockenbiomasse (TBM)) sowie die Wachstumsrate (h⁻¹) bestimmt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist dargestellt.

Der Produktionsstamm *E. coli* pASK_ectABCD mit der Mutation in *ectD* wird im Folgenden als *E. coli* pASK_ectABCD_m bezeichnet, um deutlich zu machen, dass dieser Stamm aufgrund der funktionslosen Ectoinhydroxylase Ectoin statt Hydroxyectoin produziert.

3.2.2 Hydroxyectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCDask

Zunächst wurde die heterologe Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCDask im Wachstumsverlauf unter den bisherigen Bedingungen in MM63-1 mit Glucose näher betrachtet, um zu ermitteln, wann Hydroxyectoin hauptsächlich produziert wird und wie hoch die spezifische Produktivität ist. Bereits kurze Zeit nach Induktion mit AHT wurde Hydroxyectoin synthetisiert und im Medium akkumuliert (vgl. Abb. 3.8 A). Die extrazelluläre Konzentration stieg im Verlauf der exponentiellen Phase kontinuierlich an, erreichte ihr Maximum beim Übergang in die stationäre Phase und blieb dann annähernd gleich. Neben Hydroxyectoin konnte eine gleichbleibende geringe ADABA-Konzentration im Medienüberstand nachgewiesen werden. Die spezifische Produktivität

für die Hydroxyectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCDask wurde aus der Differenz der Hydroxyectoin-Konzentration zweier benachbarte Datenpunkte bezogen auf die mittlere Biomasse und Zeitdifferenz bestimmt. Anhand der spezifischen Produktivität war ebenfalls die wachstumsabhängige Produktion erkennbar (vgl. Abb. 3.8 B). Die Produktivität stieg bis zum Übergang in die stationäre Phase an und nahm dann wieder deutlich ab. Die höchste spezifische Produktivität für *E. coli* pASK_ectABCDask ergab sich in der spät exponentiellen Phase und betrug 197,5 mg/(g TBM x h).

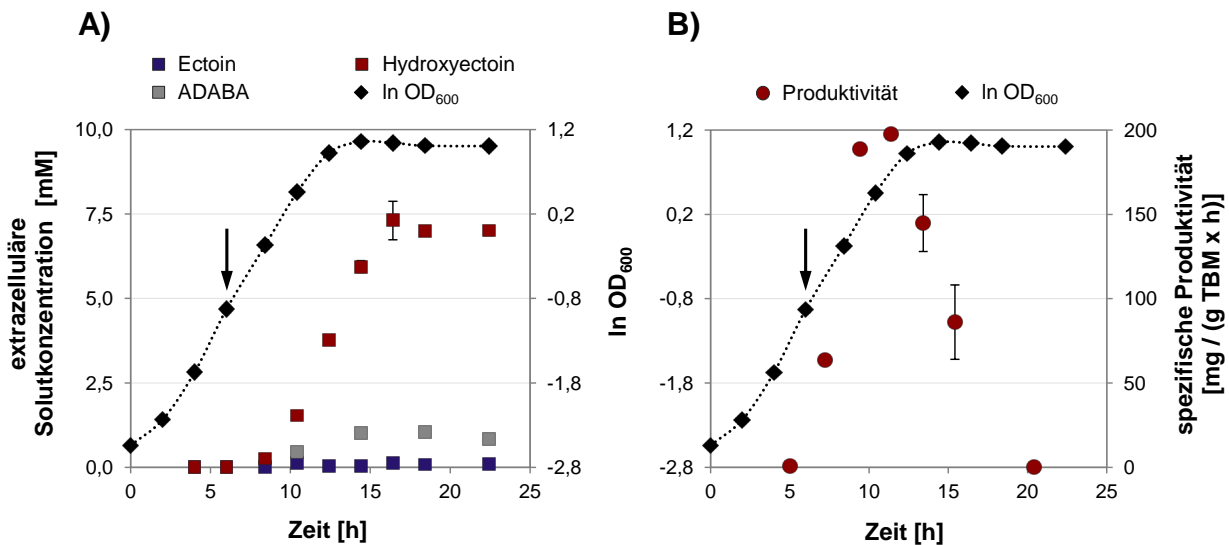


Abb. 3.8: Hydroxyectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCDask im Wachstumsverlauf
Das Wachstum in MM63-1 mit Glucose im Schüttelkolben ist anhand des natürlichen Logarithmus der OD₆₀₀ (gemessen in Küvette) gezeigt. Nach Induktion mit AHT (Pfeil) wurden Medienüberstände mittels HPLC analysiert und die extrazelluläre Solutkonzentration in mM (A) sowie die spezifische Produktivität in mg/(g Trockenbiomasse (TBM) x h) (B) bestimmt. Die Produktivität ergibt sich aus der Differenz der Hydroxyectoin-Konzentration zweier benachbarter Datenpunkte bezogen auf die mittlere Biomasse und Zeitdifferenz. Das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung ist dargestellt.

3.2.2.1 Hydroxyectoin-Produktion mit variabler C-Quelle und Salinität

Anschließend an die Experimente im Wachstumsverlauf wurde die Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCDask unter verschiedenen Wachstumsbedingungen im Schüttelkolben (Batch-Kultur) analysiert, um die Ausbeute an Hydroxyectoin weiter zu steigern. Bei Anzucht in Komplexmedium, z.B. LBG-Medium, konnte keine heterologe Produktion beobachtet werden. Deshalb diente weiterhin Minimalmedium MM63 als Basis für die Wachstumsversuche. Neben Glucose wurde Glycerin als alternative C-Quelle getestet. Abbildung 3.9 zeigt den Vergleich der Hydroxyectoin-Produktion mit beiden C-Quellen bei verschiedenen Salinitäten.

E. coli pASK_ectABCDask erreichte bei Wachstum mit Glucose bis zu 20 % höhere Wachstumsraten als mit Glycerin, wobei die Differenz bei 0,5 % NaCl am geringsten war. Mit beiden C-Quellen stieg die Wachstumsrate von 0 bis 1 % NaCl an.

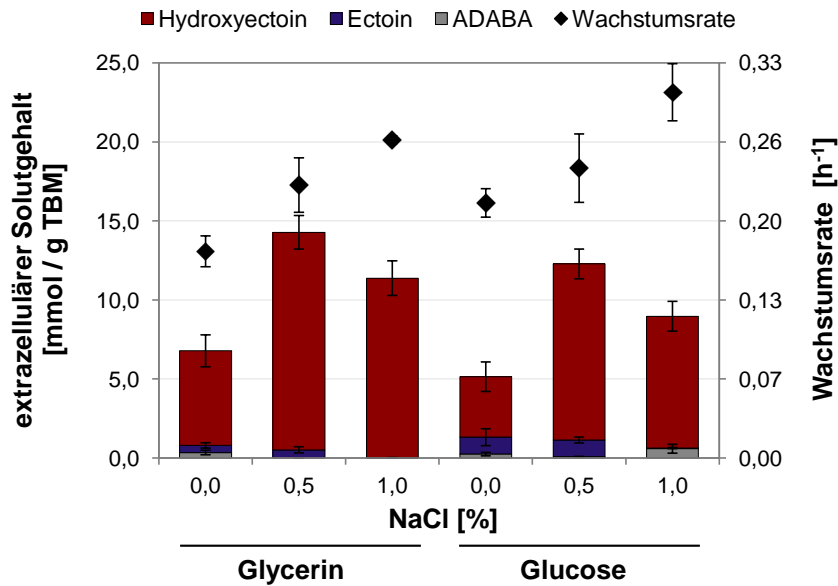


Abb. 3.9: Heterologe Hydroxyectoin-Produktion mit variabler C-Quelle und Salinität

E. coli pASK_ectABCDask wurde in MM63 mit 25 mM Glucose oder 50 mM Glycerin und 0-1 % NaCl kultiviert. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert und der extrazelluläre Solutgehalt (mmol/g Trockenbiomasse (TBM)) sowie die Wachstumsrate (h⁻¹) bestimmt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist gezeigt.

Die TBM fiel nach Ernte der Batch-Kulturen mit Glucose etwas höher aus, wobei auch hier der Unterschied zu Glycerin bei 0,5 % NaCl am kleinsten war (vgl. Abb. 3.10). Gleichzeitig konnte für die Anzucht mit Glycerin stets eine höhere extrazelluläre Hydroxyectoin-Konzentration festgestellt werden, was sich letztendlich auch im Solutgehalt bezogen auf TBM widerspiegelt (vgl. Abb. 3.9). Mit Glycerin als C-Quelle erreichte *E. coli* pASK_ectABCDask nicht nur einen 15-30 % höheren extrazellulären Solutgehalt, sondern der Anteil unerwünschter Nebenprodukte (Ectoin, ADABA) war geringer. Dies spricht trotz der niedrigeren Wachstumsrate für die Hydroxyectoin-Produktion in MM63 mit Glycerin anstelle von Glucose.

Der intrazelluläre Solutgehalt, hauptsächlich Hydroxyectoin, nahm mit steigender Salinität zu und war bei Wachstum mit Glucose tendenziell höher (vgl. Abb. 7.1 A im Anhang). Allerdings machte der intrazelluläre Hydroxyectoin-Gehalt in MM63-1 mit Glucose nur etwa 6 % und unter den anderen Bedingungen weniger als 3 % der gesamten produzierten Solute aus und ist daher zu vernachlässigen.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass der Produktionsstamm bei 0,5 % NaCl deutlich mehr Hydroxyectoin produzierte als bei Anzucht ohne NaCl. In MM63-1 mit Glycerin akkumulierte *E. coli* pASK_ectABCDask ausschließlich Hydroxyectoin im Medium (11,4 mmol/g TBM). Den höchsten Hydroxyectoin-Gehalt mit 13,8 mmol/g TBM (2,18 g/g TBM) und einem Anteil am Gesamtsolutgehalt von 96 % erreichte der Produktionsstamm in MM63-0,5 mit Glycerin.

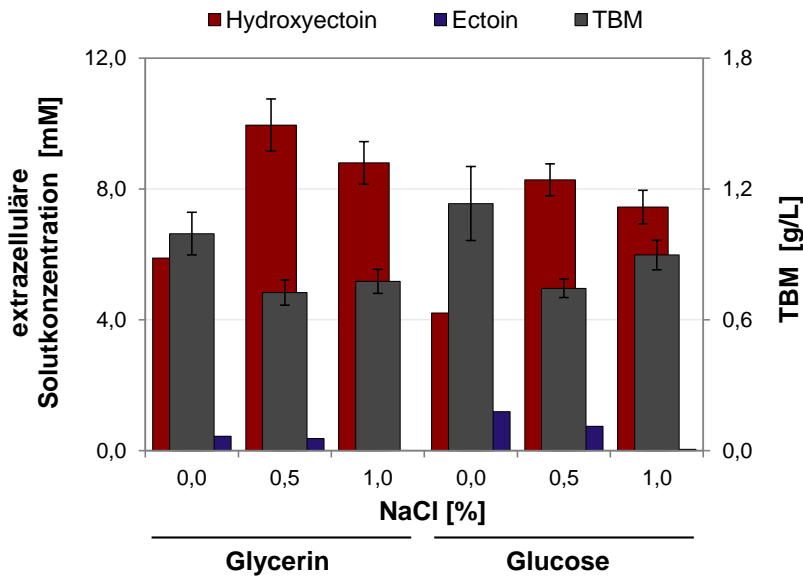


Abb. 3.10: Hydroxyectoin-Konzentration und TBM bei variabler C-Quelle und Salinität
E. coli pASK_ectABCDask wurde in MM63 mit 25 mM Glucose oder 50 mM Glycerin und 0-1 % NaCl kultiviert. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert. Die extrazelluläre Hydroxyectoin- und Ectoin-Konzentration (mM) sowie die Trockenbiomasse (TBM, g/L) sind gezeigt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten wurde bestimmt.

3.2.2.2 Produktionsdaten zur optimierten Hydroxyectoin-Produktion

Für die optimierten Bedingungen in MM63-0,5 mit Glycerin wurden die Produktionsdaten zu *E. coli* pASK_ectABCDask zusammengetragen, wobei der Ectoin-Anteil von 4 % vernachlässigt wurde (vgl. Tab. 3.1). Die spezifische Produktivität konnte für diese Wachstumsbedingungen aufgrund weniger Datenpunkte nur für den Zeitraum fünf Stunden nach Induktion (früh exponentielle Phase) ermittelt werden und beträgt 202,8 ($\pm 18,6$) mg/(g TBM x h). Dieser Wert ist wahrscheinlich unterbestimmt, da sich für die Produktion mit Glucose die höchste spezifische Produktivität in der spät exponentiellen Phase ergab (vgl. Abb. 3.8).

Die Kohlenstoff (C)- und Stickstoff (N)-Bilanz für *E. coli* pASK_ectABCDask wurde unter der Annahme eines C:N-Verhältnisses von 48 zu 12 % in der TBM von *E. coli* ermittelt (Folsom & Carlson, 2015). Bei der C-Bilanz (total) ergab sich ein Kohlenstoffgehalt von 0,35 g/L in der gebildeten TBM und 0,71 g/L im extrazellulären Produkt Hydroxyectoin, was insgesamt 58 % der eingesetzten C-Quelle (1,82 g C/L) entspricht. Da zum Zeitpunkt der Zellernte kein Glycerin mehr im Medium enthalten war, kann davon ausgegangen werden, dass die verbleibenden 42 % der C-Quelle für die Energiegewinnung benötigt wurden.

Zusätzlich wurde die separate C-Bilanz für die Produktion von TBM bzw. Hydroxyectoin berechnet. Dazu wurde der Kontrollstamm *E. coli* pASK-IBA3 herangezogen, der ebenfalls mit Antibiotikum und AHT kultiviert wurde, aber kein Hydroxyectoin produzierte und 2,66 g Glycerin pro g TBM benötigte. Dementsprechend hatte *E. coli* pASK_ectABCDask 1,92 g Glycerin (0,75 g C) für 0,72 g TBM (0,35 g C = 47 %) verbraucht. Die verbleibenden 2,73 g Glycerin (1,07 g C)

standen für die heterologe Hydroxyectoin-Produktion zur Verfügung, von denen 66 % in das Produkt (0,71 g C) geflossen sind. Demzufolge wurden drei Moleküle Glycerin (9 C) für die Biosynthese von einem Molekül Hydroxyectoin (6 C) benötigt.

Die N-Bilanz zeigte, dass ein Stickstoffgehalt von 0,09 g/L in TBM und 0,28 g/L in Hydroxyectoin vorliegt. Insgesamt wurden 88 % der eingesetzten N-Quelle (0,42 g N/L) verbraucht, so dass sich der Produktionsstamm nahe der N-Limitierung befand.

Tab. 3.1: Produktionsdaten zu *E. coli* pASK_ectABCDask in MM63-0,5 mit Glycerin

Die Produktivität wurde für den Zeitraum 5 h nach Induktion (früh exponentielle Phase) ermittelt. Kohlenstoff (C)- und Stickstoff (N)-Bilanz wurden mit einem C:N-Verhältnis von 48:12 % in der Trockenbiomasse (TBM) von *E. coli* bestimmt. Die separate C-Bilanz für TBM bzw. Hydroxyectoin wurde anhand des Ertrags von 2,66 g Glycerin/g TBM des Kontrollstamms *E. coli* pASK-IBA3 berechnet. Der Ectoin-Anteil (4 %) wurde vernachlässigt. $Y_{(X+H)/S}$: Ertrag von TBM (X) und Hydroxyectoin (H) über C-Quelle (S), $Y_{H/S}$: Ertrag von Hydroxyectoin (H) über C-Quelle (S)

Wachstumsrate [h^{-1}]	$0,23 \pm 0,02$
C-Quelle im Medium [g/L]	4,65 (1,82 C)
TBM [g/L]	$0,72 \pm 0,06$
Hydroxyectoin (extrazellulär) [g/L]	$1,57 \pm 0,13$
Ertrag $Y_{(X+H)/S}$ [g/g]	0,49
Ertrag $Y_{H/S}$ [g/g]	0,34
Hydroxyectoin (extrazellulär) [g/g TBM]	$2,18 \pm 0,17$
spezifische Produktivität [mg/(g TBM x h)]	$202,8 \pm 18,6$
C-Bilanz (total) [C in g/L]	0,35 in TBM 0,71 in Hydroxyectoin total 58 % der C-Quelle (1,82)
C-Bilanz (separat) [C in g/L]	0,75 der C-Quelle für 0,35 in TBM (= 47 %) (verglichen mit Kontrollstamm) 1,07 der C-Quelle für 0,71 in Hydroxyectoin (= 66 %)
N-Bilanz (total) [N in g/L]	0,09 in TBM 0,28 in Hydroxyectoin total 88 % der N-Quelle (0,42)

Insgesamt kann festzuhalten werden, dass *E. coli* pASK_ectABCDask in MM63 mit Glycerin als C-Quelle und geringer Salinität (0,5 % NaCl) die bisher höchste extrazelluläre Produktausbeute bei gleichzeitig minimalem Ectoin-Anteil (4 %) erreichte. Daher ist der Stamm ein vielversprechender Kandidat für die heterologe Hydroxyectoin-Produktion.

3.3 Heterologe Ectoin-Produktion in *E. coli* mittels des *A. cryptum*-Genclusters

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mit dem *ectABCDask*-Gencluster aus *A. cryptum* unter Kontrolle des AHT-induzierbaren *tet*-Promotors hohe Ausbeuten an Hydroxyectoin im Medienüberstand von *E. coli* DH5 α erzielt werden können, wurde der Schwerpunkt auf die heterologe Ectoin-Produktion gelegt. Ectoin wird bereits industriell im großen Maßstab produziert und in verschiedenen Gesundheitspflege- und Kosmetikprodukten vermarktet. Demnach besteht eine steigende Nachfrage und eine Optimierung des bisherigen Produktionsverfahrens ist von großem Interesse ist. Für *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD_m, mit den Genen *ectABCD* aus *A. cryptum* unter Kontrolle des *tet*-Promotors, konnte demonstriert werden, dass dieser Stamm aufgrund einer Mutation in *ectD* Ectoin statt Hydroxyectoin produziert und ins Medium ausscheidet (vgl. Abb. 3.7). Im Vergleich zu dem Stamm, der nur die Gene *ectABC* aus *A. cryptum* besitzt (Bethlehem unveröffentlicht), konnte in bisherigen Wachstumsversuchen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Außerdem erreichte *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD_m in ersten Experimenten bereits eine hohe Produktausbeute, weswegen dieser Stamm in der vorliegenden Arbeit für die Ectoin-Produktion verwendet wurde. Dabei sollte die heterologe Produktion unter Verwendung des *A. cryptum*-Genclusters ausführlicher charakterisiert, optimiert und die Produktion im größeren Maßstab untersucht werden. Hierfür wurde ausschließlich der Stamm *E. coli* DH5 α genutzt, der zur vereinfachten Schreibweise der Produktionsstämme im gesamten Kapitel 3.3 nur mit *E. coli* bezeichnet wird.

Mit Hilfe von *E. coli* pASK_ectABCD_m sollte zunächst überprüft werden, ob die Transaminase EctB, in diesem Fall aus *A. cryptum*, für die heterologe Produktion von Ectoin in *E. coli* essenziell ist. Für den natürlichen Ectoin-Produzenten *H. elongata* konnte gezeigt werden, dass dieser Ectoin trotz Deletion des *ectB*-Gens synthetisieren kann und folglich mindestens eine weitere geeignete Transaminase besitzt (Schwibbert *et al.*, 2011). Zur Überprüfung, ob dies auch auf *E. coli* zutrifft, wurde mittels des Restriktionsenzym *Bsu15I* ein 120 bp großes Fragment aus *ectB* im Expressionsvektor pASK_ectABCD_m entfernt, ohne den Leserahmen zu verändern, und der Vektor mit dem verkleinerten *ectB*-Gen religiert (pASK_ectACD). Der Stamm mit defektem *ectB*, *E. coli* pASK_ACD, war anders als der ursprüngliche Stamm *E. coli* pASK_ectABCD_m nicht in der Lage Ectoin zu synthetisieren. Nach Anzucht in Minimalmedium MM63 mit 1 % NaCl wurden im Medienüberstand keine Solute und im Zellextrakt lediglich das *E. coli*-eigene Solut Trehalose detektiert (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte die korrekte Nukleotidsequenz von pASK_ACD durch Sequenzierung bestätigt werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Transaminase EctB essenziell für die heterologe Ectoin-Produktion in *E. coli* ist.

3.3.1 Optimierung der Produktionsbedingungen im Schüttelkolben

Zuerst wurde die Ectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m im Wachstumsverlauf unter den bisherigen Bedingungen in MM63-1 mit Glucose charakterisiert und die spezifische Produktivität ermittelt (vgl. Abb. 3.11). Das Wachstum und die extrazelluläre Solutkonzentration zeigten einen ähnlichen Verlauf wie im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD_{ask} (vgl. Abb. 3.8). Die höchste Ectoin-Konzentration wurde beim Eintritt in die stationäre Phase erreicht. Anders als bei *E. coli* pASK_ectABCD_{ask} wurde ADABA in großen Mengen im Medium akkumuliert. In der stationären Phase waren beide Solute in einem Verhältnis von fast 1:1 im Medienüberstand vorhanden (vgl. Abb. 3.11 A). Für die spezifische Produktivität konnte bis zur spät exponentiellen Phase ein Anstieg und darauf folgend eine deutliche Abnahme beobachtet werden (vgl. Abb. 3.11 B). Die höchste spezifische Produktivität von *E. coli* pASK_ectABCD_m lag mit 172 mg/(g TBM x h) in der gleichen Größenordnung wie die des Hydroxyectoin-Produzenten (197,5 mg/(g TBM x h)). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die extrazellulär akkumulierte Vorstufe ADABA bei der Berechnung der spezifischen Produktivität nicht miteinbezogen wurde.

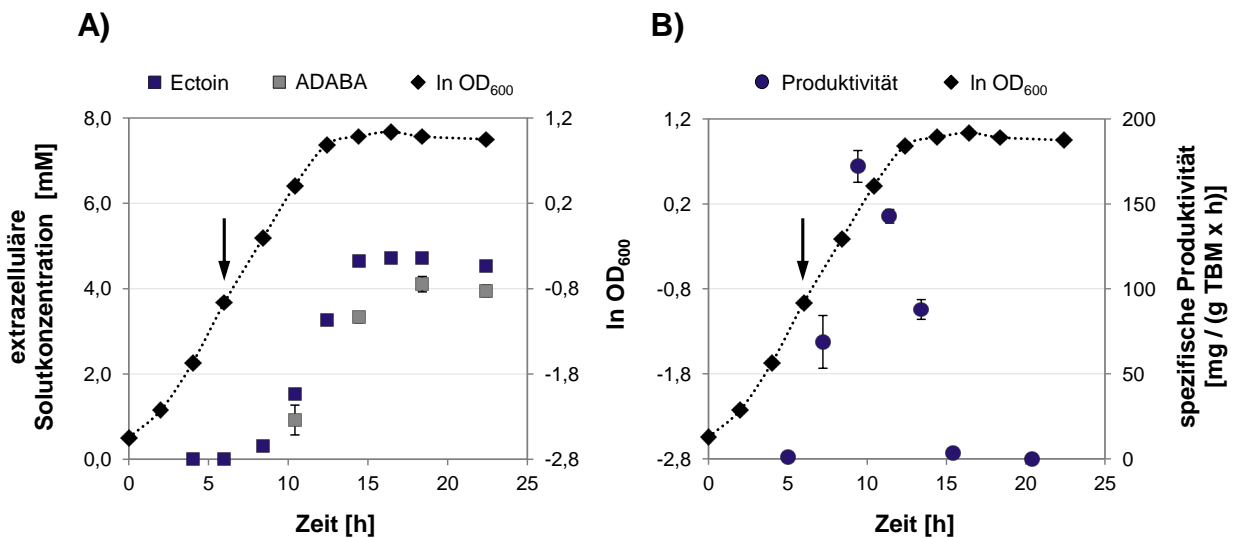


Abb. 3.11: Produktionsverlauf mit *E. coli* pASK_ectABCD_m in MM63-1 mit Glucose
 Das Wachstum in MM63-1 mit Glucose im Schüttelkolben ist anhand des natürlichen Logarithmus der OD_{600} (gemessen in Küvette) gezeigt. Nach Induktion mit AHT (Pfeil) wurden Medienüberstände mittels HPLC analysiert und die extrazelluläre Solutkonzentration in mM (A) sowie die spezifische Produktivität in mg/(g Trockenbiomasse (TBM) x h) (B) bestimmt. Die Produktivität ergibt sich aus der Differenz der Ectoin-Konzentration zweier benachbarter Datenpunkte bezogen auf die mittlere Biomasse und Zeitdifferenz. Das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung ist dargestellt.

Anhand der Ergebnisse des Wachstumsversuchs wurde deutlich, dass eine Optimierung der Produktionsbedingungen wegen der extrazellulären Akkumulation von ADABA und der damit verminderten Ausbeute an Ectoin erforderlich ist. Dazu wurde im Folgenden die heterologe Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m hinsichtlich verschiedener Wachstumsparameter näher untersucht.

3.3.1.1 Nährmedium und Temperatur

Zunächst wurde die Produktion in Komplexmedium, LBG-Medium und komplexes Nährmedium nach Ning *et al.* (2016), getestet. Unter diesen Bedingungen war es zwar möglich hohe Zelldichten und Wachstumsraten zu erreichen, aber weder Ectoin noch dessen Vorstufen wurden produziert (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle, ob sich eventuell das im Komplexmedium enthaltene Glycinbetain negativ auf die heterologe Produktion ausgewirkt haben könnte, wurde *E. coli* pASK_ectABCD_m in MM63-0,5 mit 2 mM Glycinbetain kultiviert. Im Vergleich zum Wachstum ohne Glycinbetain war kein signifikanter Unterschied in der Wachstumsrate, TBM und Ectoin-Produktion zu beobachten (nicht dargestellt). Demnach kann Glycinbetain zumindest nicht alleine der Grund für das Ausbleiben der Produktion in Komplexmedium sein. Für weitere Wachstumsexperimente wurde das Minimalmedium MM63 verwendet, das im Hinblick auf die Produktgewinnung aus dem Medienüberstand ohnehin besser für die Ectoin-Produktion geeignet ist als ein komplexes Nährmedium.

Weiterhin wurde der Einfluss einer niedrigeren Wachstumstemperatur, 32 statt 37 °C, auf die Ectoin-Produktion untersucht. Für beide Temperaturen ergab sich ein annähernd gleicher Gesamtsolutgehalt im Medienüberstand. Bei 32 °C war jedoch der Anteil an ADABA tendenziell höher (nicht gezeigt), was gegen eine verringerte Temperatur bei der heterologen Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m spricht. Eine Temperatur oberhalb von 37 °C wurde wegen der höheren Verdunstungsgefahr und Energieaufwendung nicht in Betracht gezogen.

3.3.1.2 Induktionszeit

Im Bezug auf die Produktion im großen Maßstab wäre es interessant, zunächst möglichst viel Biomasse des Produktionsstamms zu generieren und erst später die heterologe Produktion zu induzieren, um eine hohe Ausbeute an Ectoin in kurzer Zeit zu erhalten. Bei den bisherigen Wachstumsversuchen erfolgte die Induktion mit AHT relativ früh, wenn der Produktionsstamm eine OD₆₀₀ von 0,30 bis 0,35 erreicht hatte. Abbildung 3.12 zeigt, welchen Einfluss der Zeitpunkt der Induktion auf die Ectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m im Schüttelkolben (Batch-Kultur) hat. Hierbei ist eine Korrelation zwischen der Zunahme der TBM und der Abnahme der extrazellulären Ectoin-Konzentration in Abhängigkeit von der Induktionszeit erkennbar. Je später die Induktion im Wachstumsverlauf erfolgte, desto mehr Biomasse wurde gebildet und umso weniger Ressourcen standen für die Produktion von Ectoin zur Verfügung. Wenn erst bei einer OD₆₀₀ oberhalb von 2,9 induziert wurde, konnte keine Produktion von Ectoin festgestellt werden, auch nicht nach erneuter Zugabe von C- und N-Quelle. Stattdessen wurde weitere Biomasse generiert und Acetat im Medium angehäuft (nicht dargestellt). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der Produktionsstamm in folgenden Experimenten zu einem frühen Zeitpunkt, bei einer OD₆₀₀ von 0,30 - 0,35, induziert.

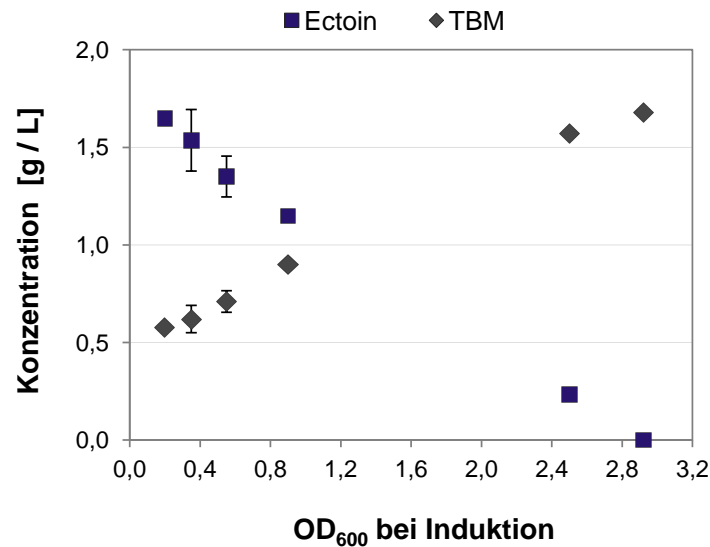


Abb. 3.12: Einfluss der Induktionszeit auf die Ectoin-Produktion

E. coli pASK_ectABCD_m wurde in MM63-0,5 mit Glycerin im Schüttelkolben kultiviert und die heterologe Produktion bei verschiedenen OD₆₀₀-Werten mit AHT induziert. Die Produktion von Trockenbiomasse (TBM) und Ectoin (extrazellulär) ist abhängig vom Zeitpunkt der Induktion dargestellt. Das arithmetische Mittel wurde für die Datenpunkte bei OD₆₀₀ 0,35 und 0,55 aus mind. drei Experimenten und bei 0,2 und 2,9 aus einer Doppelbestimmung berechnet. Die Datenpunkte bei 0,9 und 2,5 sind Einfachbestimmungen.

3.3.1.3 C-Quelle

Der Produktionsstamm *E. coli* pASK_ectABCD_m wurde mit verschiedenen C-Quellen kultiviert, um aufzuklären, welche dieser C-Quellen die höchste Ausbeute an Ectoin und gleichzeitig eine möglichst hohe Wachstumsrate erlaubt (vgl. Abb. 3.13). Neben einer C-Quelle wurden auch Kombinationen zweier C-Quellen getestet, von denen eine C-Quelle über den Citratzyklus oder direkt in die Ectoin-Synthese fließen kann. Für die Wachstumsversuche wurden gleiche Mengen der unterschiedlichen C-Quellen eingesetzt (150 mM C), außer bei den Ansätzen mit Glutamat (200 mM C), die untereinander, aber nicht direkt mit den anderen Ansätzen, vergleichbar sind.

Im Vergleich zu Glucose ergab sich bei Anzucht mit Glycerin zwar eine niedrigere Wachstumsrate, aber eine deutlich höhere Ausbeute an Ectoin, bei gleichzeitig verringerter Akkumulation der Vorstufe ADABA (vgl. Abb. 3.13). Durch die Kombination von Lactat und Glutamat konnte mit $0,27 \text{ h}^{-1}$ (t_d von 2,6 h) die höchste Wachstumsrate erzielt werden. Bei den verschiedenen Ansätzen mit Glutamat zeigte sich mit steigender Wachstumsrate ein größerer ADABA-Anteil am extrazellulären Gesamtsolutgehalt. Insgesamt war durch Zusatz von Glutamat keine Verbesserung der heterologen Produktion zu beobachten. Allerdings wurde in Kombination mit Glycerin bzw. Glucose ein Großteil des Glutamats nicht aufgenommen (18 bzw. 20 mM). In Kombination mit Lactat waren noch etwa 15 mM Glutamat im Medium übrig (nicht dargestellt). Die Anzucht mit Glycerin und Malat bzw. Acetat hatte keinen positiven Effekt, weder auf das Wachstum von *E. coli* pASK_ectABCD_m noch auf die Produktion von Ectoin.

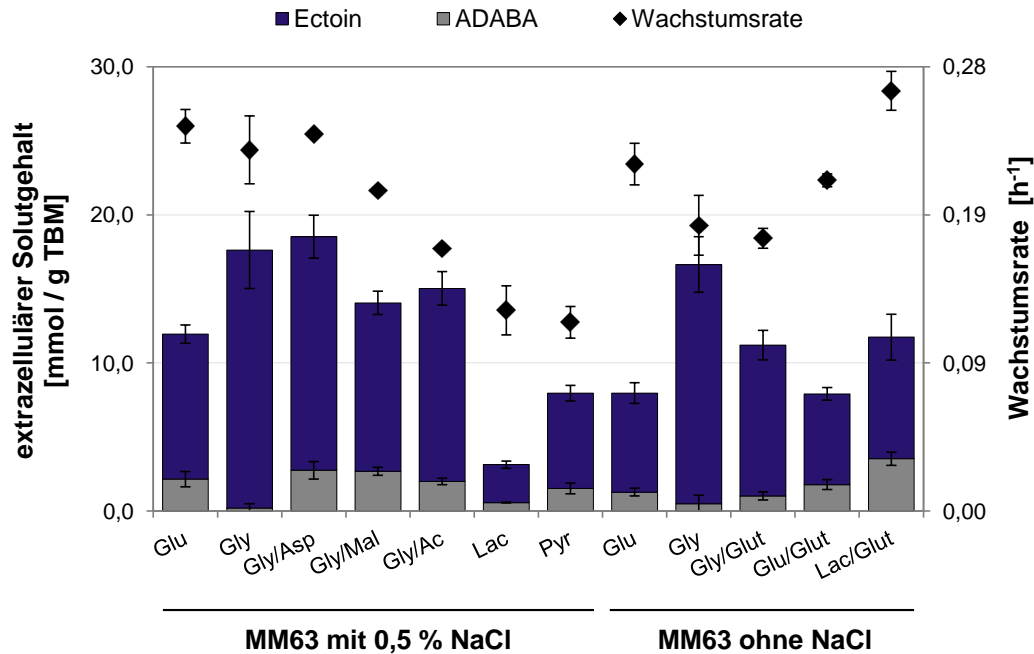


Abb. 3.13: Ectoin-Produktion mit verschiedenen C-Quellen

E. coli pASK_ectABCD_m wurde in MM63-0/0,5 mit 25 mM Glucose (Glu), 50 mM Glycerin (Gly), 25 mM Glycerin + 18,75 mM Aspartat bzw. 18,75 mM Malat (Gly/Asp, Gly/Mal), 40 mM Glycerin + 15 mM Acetat (Gly/Ac), 50 mM Lactat (Lac), 50 mM Pyruvat (Pyr) oder 25 mM Glutamat + 25 mM Glycerin, 12,5 mM Glucose bzw. 25 mM Lactat (Gly/Glut, Glu/Glut, Lac/Glut) kultiviert. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert und der extrazelluläre Solutgehalt (mmol/g Trockenbiomasse (TBM)) sowie die Wachstumsrate (h^{-1}) bestimmt. Für die Ansätze Glu, Gly, Gly/Glut, Glu/Glut und Lac/Glut ist das arithmetische Mittel aus mind. drei Experimenten und sonst aus einer Doppelbestimmung gezeigt.

Bei Kombination von Glycerin mit Aspartat, von dem aus nur noch wenige Schritte bis zum Ectoin nötig sind, war der extrazelluläre Solutgehalt etwas größer als bei Wachstum mit Glycerin als einziger C-Quelle. Der Anteil an ADABA war jedoch deutlich höher. Allerdings waren auch hier noch etwa 15 mM des eingesetzten Aspartats in der stationären Phase übrig (nicht gezeigt).

Schlussendlich erreichte der Produktionsstamm bei Anzucht mit Glycerin die mit Abstand höchste Ausbeute an Ectoin und hatte dabei eine Wachstumsrate von $0,23 \text{ h}^{-1}$ (bei 0,5 % NaCl).

3.3.1.4 NaCl-Konzentration

Schließlich wurde der Einfluss der Salinität auf die heterologe Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m in MM63 inkl. Glycerin bzw. Glucose untersucht (vgl. Abb. 3.14). Die Wachstumsrate nahm, wie im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD_{ask}, von 0 bis 1 % NaCl zu und war bei Anzucht mit Glucose bis zu 20 % höher, wobei der Unterschied zu Glycerin bei 0,5 % NaCl am kleinsten war (7 %).

Von 0 auf 0,25 % NaCl stieg der extrazelluläre Solutgehalt an und nahm darüber hinaus wieder ab. Bei Anzucht mit Glycerin anstelle von Glucose konnten wesentlich höhere Ausbeuten an Ectoin erzielt werden, die bei Wachstum ohne NaCl sogar mehr als doppelt so hoch waren.

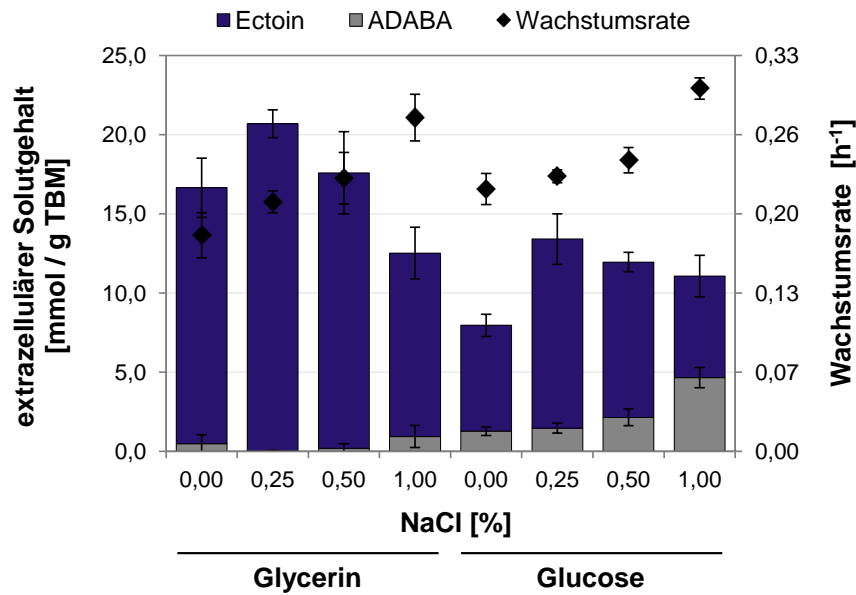


Abb. 3.14: Ectoin-Produktion mit variabler C-Quelle und Salinität

E. coli pASK_ectABCD_m wurde in MM63 mit 25 mM Glucose oder 50 mM Glycerin und 0-1 % NaCl kultiviert. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert und der extrazelluläre Solutgehalt (mmol/g Trockenbiomasse (TBM)) sowie die Wachstumsrate (h⁻¹) bestimmt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist gezeigt.

Gleichzeitig wurde bei Verwendung von Glycerin deutlich weniger ADABA im Medium akkumuliert. Bei Wachstum mit Glucose war ein Anstieg des ADABA-Gehalts mit zunehmender Salinität zu beobachten. Bei 1 % NaCl lagen ADABA und Ectoin in einem Verhältnis von fast 1:1 im Medienüberstand vor, was bereits zuvor gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.11).

Beim Vergleich der extrazellulären Solutkonzentration und TBM (vgl. Abb. 3.15) wird offensichtlich, dass mit Glycerin nicht nur die extrazelluläre Ectoin-Konzentration höher war (ca. 30-60 %), sondern auch weniger TBM gebildet wurde (15-35 %). Dadurch ergeben sich letztendlich die deutlich höheren Ausbeuten an Ectoin bezogen auf TBM (vgl. Abb. 3.14).

Der intrazelluläre Ectoin-Gehalt stieg, wie der Hydroxyectoin-Gehalt im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD_{ask}, mit der NaCl-Konzentration an und war bei Anzucht mit Glucose höher (vgl. Abb. 7.1 B im Anhang). Allerdings machte der intrazelluläre Ectoin-Gehalt unter den getesteten Bedingungen weniger als 3 % der gesamten produzierten Solute aus und ist daher zu vernachlässigen.

Im Vergleich zu *E. coli* pASK_ectABCD_{ask}, der mit 13,8 mmol/g TBM in MM63-0,5 mit Glycerin die höchste Hydroxyectoin-Ausbeute hatte, erreichte *E. coli* pASK_ectABCD_m unter den gleichen Bedingungen mit 17,4 mmol/g TBM (2,47 g/g TBM) eine 26 % höhere Ausbeute an Ectoin. Dabei ergab sich ein Ectoin-Anteil am extrazellulären Gesamtsolutgehalt von 99 %. Die Produktion konnte durch Anzucht mit 0,25 % NaCl sogar noch gesteigert werden. *E. coli* pASK_ectABCD_m erzielte einen extrazellulären Solutgehalt von 20,6 mmol/g TBM (2,93 g/g TBM) und akkumulierte ausschließlich Ectoin im Medium. Dabei betrug die Wachstumsrate 0,21 h⁻¹.

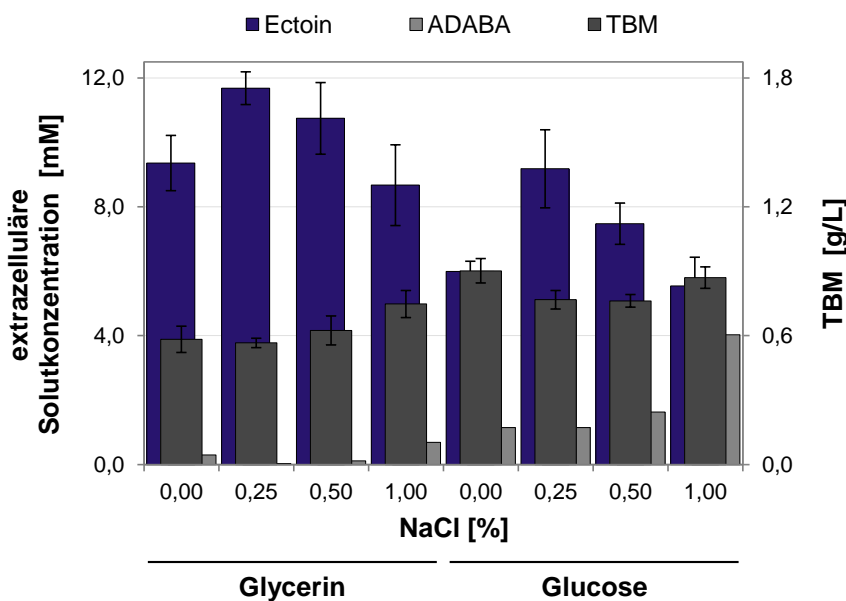


Abb. 3.15: Ectoin-Konzentration und TBM bei variabler C-Quelle und Salinität

E. coli pASK_ectABCD_m wurde in MM63 mit 50 mM Glycerin oder 25 mM Glucose und 0-1 % NaCl kultiviert. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert. Dargestellt sind die extrazelluläre Solutkonzentration (mM) und Trockenbiomasse (TBM, g/L). Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten wurde bestimmt.

3.3.1.5 Produktionsdaten zur optimierten Ectoin-Produktion

Zur Bestimmung der spezifischen Produktivität wurde *E. coli* pASK_ectABCD_m in MM63 mit Glycerin und 0,25 % NaCl, sowie zur besseren Vergleichbarkeit mit *E. coli* pASK_ectABCD_{ask} bei 0,5 % NaCl, im Schüttelkolben kultiviert und die heterologe Produktion im Wachstumsverlauf verfolgt (vgl. Abb. 3.16).

Bei beiden NaCl-Konzentrationen war der Wachstums- und Produktionsverlauf sehr ähnlich. Glycerin wurde in den ersten Stunden langsam und im späteren Verlauf deutlich schneller verbraucht (vgl. Abb. 3.16 A,C). In Korrelation dazu nahm die extrazelluläre Ectoin-Konzentration im Wachstumsverlauf zu. Beim Übergang in die stationäre Phase und zur Neige gehender C-Quelle konnten bis zu 3 mM Acetat im Medienüberstand detektiert werden. Nach 24 Stunden war sowohl Glycerin als auch Acetat vollständig aufgebraucht.

Für das Wachstum mit 0,5 % anstelle von 0,25 % NaCl ergab sich eine schnellere Abnahme der C-Quelle, eine etwas höhere Wachstumsrate und eine schnellere Ectoin-Produktion in der exponentiellen Phase, was nach 12-stündigem Wachstum deutlich sichtbar ist (vgl. Abb. 3.16 A,C). Zu diesem Zeitpunkt waren bei Anzucht mit 0,5 % NaCl schon 4,7 mM Ectoin und nur noch 27 mM Glycerin im Medium enthalten, während bei 0,25 % NaCl erst 3,2 mM Ectoin und noch 35 mM C-Quelle im Medienüberstand detektiert wurden. Gleichzeitig hatte der Produktionsstamm in MM63-0,5 schon eine OD₆₀₀ von fast 1,2 und bei 0,25 % NaCl erst ca. 1,0 erreicht.

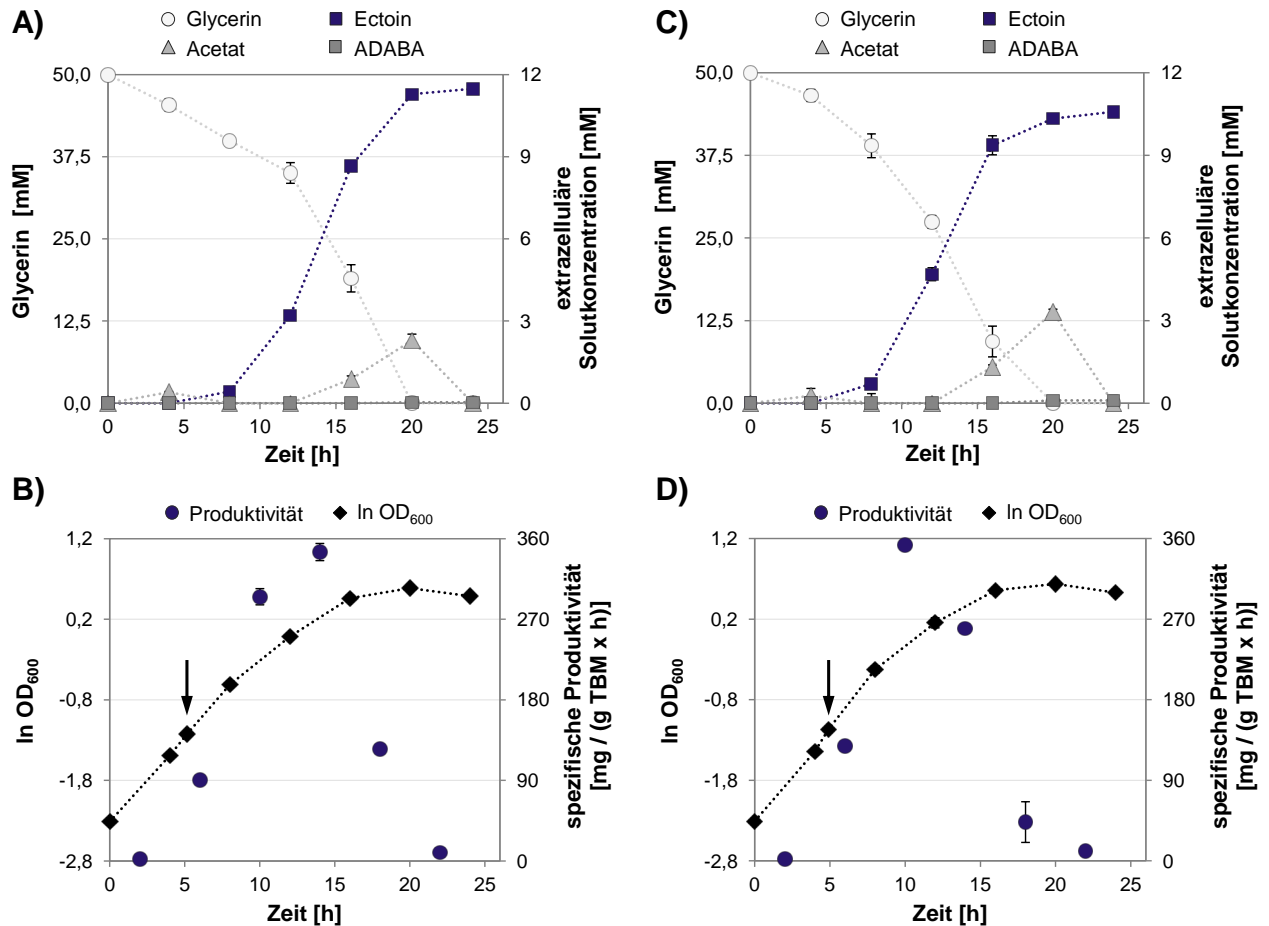


Abb. 3.16: Ectoin-Produktion mit Glycerin im Wachstumsverlauf

E. coli pASK_ectABCD_m wurde in MM63 mit Glycerin und 0,25 % (A, B) bzw. 0,5 % NaCl (C, D) im Schüttelkolben kultiviert. Nach Induktion mit AHT (Pfeil) wurden Medienüberstände mittels HPLC analysiert und der Verbrauch der C-Quelle sowie die extrazelluläre Solutkonzentration (mM) bestimmt (A, C). Die spezifische Produktivität (mg/(g Trockenbiomasse (TBM) x h)) wurde aus der Differenz der Ectoin-Konzentration zweier benachbarter Datenpunkte bezogen auf die mittlere Biomasse und Zeitdifferenz berechnet und der Wachstumsverlauf ist anhand des natürlichen Logarithmus der OD₆₀₀ (gemessen in Küvette) gezeigt (B, D). Das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung ist dargestellt.

Dies zeigte sich auch im Verlauf der Produktivität über den gesamten Wachstumsversuch (vgl. Abb. 3.16 B,D). Bei 0,5 % NaCl war die spezifische Produktivität fünf Stunden nach Induktion (mittlere exponentielle Phase) am höchsten und lag bei 352,9 mg/(g TBM x h). Bei Wachstum mit 0,25 % NaCl wurde die maximale spezifische Produktivität von 345,1 mg/(g TBM x h) neun Stunden nach Induktion (spät exponentielle Phase) erreicht.

Nach 16 Stunden Wachstum war ein Wendepunkt zu beobachten. Bei Anzucht mit 0,5 % NaCl war schon mehr Glycerin in die Biomasse geflossen und deutlich weniger C-Quelle (9 mM) für die weitere Produktion von Ectoin übrig. Demnach war nur noch eine geringe Zunahme der extrazellulären Solutkonzentration (ca. 1 mM) zu sehen. Im Fall von 0,25 % NaCl waren noch rund 20 mM Glycerin vorhanden und es konnte mehr Ectoin produziert und im Medium akkumuliert werden (etwa 3 mM), wodurch letztendlich eine höhere Produktausbeute erzielt wurde.

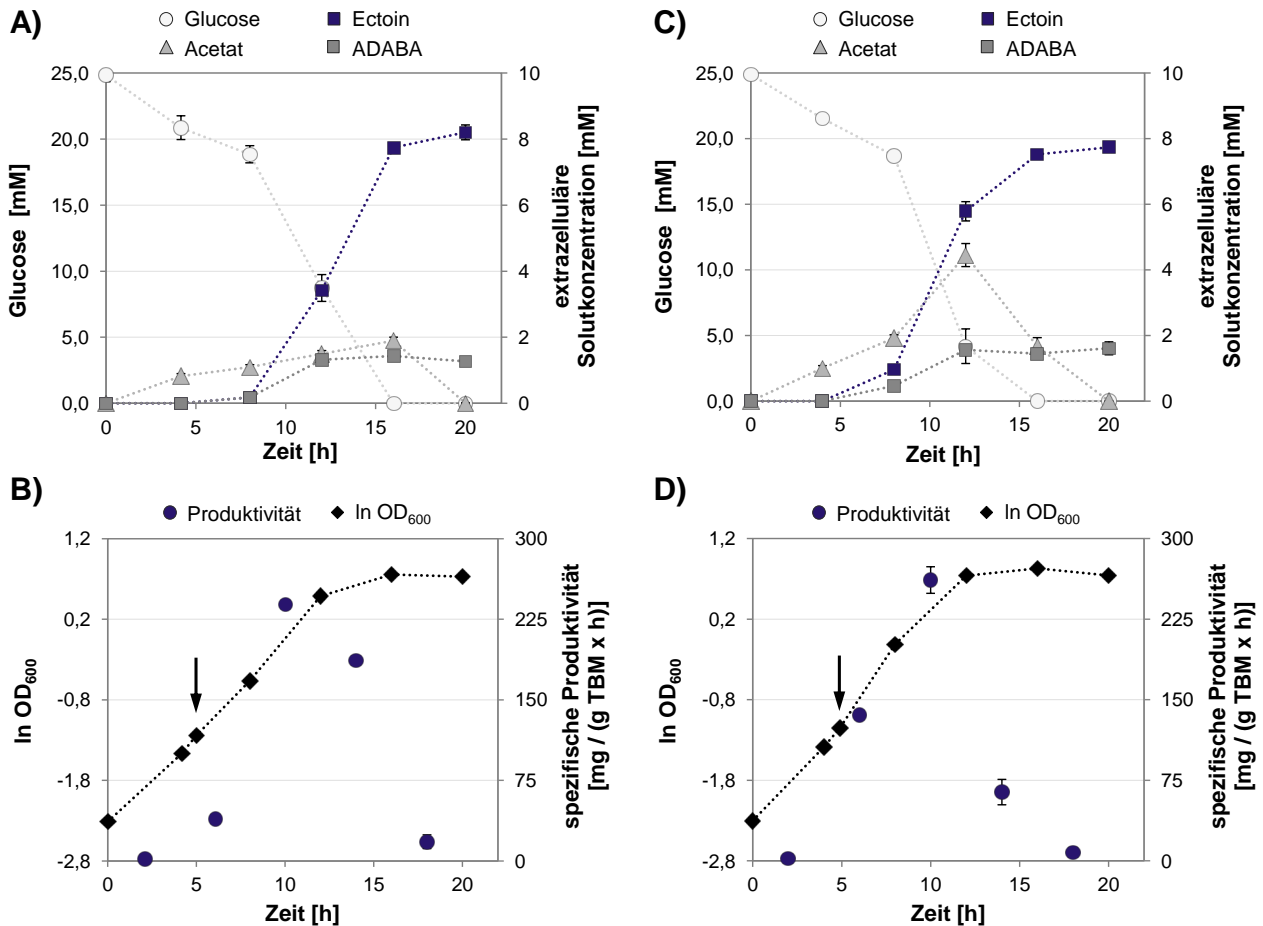


Abb. 3.17: Ectoin-Produktion mit Glucose im Wachstumsverlauf

E. coli pASK_ectABCD_m wurde in MM63 mit Glucose und 0,25 % (A, B) bzw. 0,5 % NaCl (C, D) im Schüttelkolben kultiviert. Nach Induktion mit AHT (Pfeil) wurden Medienüberstände mittels HPLC analysiert und der Verbrauch der C-Quelle sowie die extrazelluläre Solutkonzentration (mM) bestimmt (A, C). Die spezifische Produktivität (mg/(g Trockenbiomasse (TBM) x h)) wurde aus der Differenz der Ectoin-Konzentration zweier benachbarter Datenpunkte bezogen auf die mittlere Biomasse und Zeitdifferenz berechnet und der Wachstumsverlauf ist anhand des natürlichen Logarithmus der OD₆₀₀ (gemessen in Küvette) gezeigt (B, D). Das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung ist dargestellt.

Unter den gleichen Bedingungen mit Glucose statt Glycerin als C-Quelle waren die spezifischen Produktivitäten für die Ectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m niedriger, da weniger Ectoin und mehr Biomasse im gleichen Zeitraum produziert wurde (vgl. Abb. 3.17). Für 0,5 % NaCl ergab sich fünf Stunden nach Induktion eine maximale spezifische Produktivität von 261,4 mg/(g TBM x h) und für 0,25 % ein Wert von 238,6 mg/(g TBM x h). Hierbei ist zu beachten, dass bei Anzucht mit Glucose neben Ectoin zusätzlich die Vorstufe ADABA im Medium akkumuliert wurde (ca. 1,5 mM). Allerdings würden die spezifischen Produktivitäten auch unter Einbeziehung von ADABA immer noch etwas kleiner ausfallen. Neben der geringeren Produktivität und der extrazellulären ADABA-Akkumulation war ein weiterer Unterschied der schnellere Verbrauch von Glucose verglichen mit Glycerin (vgl. Abb. 3.16 und 3.17). Nach 12 Stunden Wachstum mit 0,5 % NaCl waren schon 83 % der eingesetzten Glucose verbraucht, während erst 45 % der äquimolaren Menge Glycerin verwendet worden waren. Gleichzeitig war bei Anzucht mit Glucose zu diesem Zeitpunkt bereits ADABA im Medienüberstand nachweisbar. Nach 16 Stunden war keine Glucose mehr im

Medium übrig, aber erst 81 % Glycerin verbraucht. Bei einer Salinität von 0,25 % konnten diese Unterschiede ebenfalls festgestellt werden.

In MM63 mit Glycerin und 0,25 bzw. 0,5 % NaCl waren neben der spezifischen Produktivität auch die anderen Produktionsdaten zur heterologen Ectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m ähnlich und sind für 0,5 % NaCl in Tab. 3.2 bzw. für 0,25 % in Tab. 7.2 im Anhang aufgeführt. Dabei wurden die C- und N-Bilanzen wie zuvor für die Hydroxyectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCDask berechnet (vgl. 3.2.2.2).

Entsprechend der C-Bilanz (total) für den Ectoin-Produzenten sind insgesamt 59 % der eingesetzten C-Quelle in TBM und Ectoin (extrazellulär) geflossen, während die restlichen 41 % für die Energiegewinnung verwendet wurden (vgl. Tab. 3.2). Bei der separaten C-Bilanz der TBM- und Ectoin-Produktion zeigte sich im Vergleich zum Kontrollstamm *E. coli* pASK-IBA3, dass 1,65 g Glycerin (0,64 g C) für 0,62 g TBM (0,30 g C = 47 %) verbraucht wurden. Von den verbleibenden 3 g Glycerin (1,17 g C) sind 67 % in das Produkt Ectoin (0,78 g C) geflossen. Demnach waren, wie im Fall der heterologen Hydroxyectoin-Produktion, drei Moleküle Glycerin (9 C) erforderlich, um ein Molekül Ectoin (6 C) zu synthetisieren.

Die N-Bilanz zeigte mit einem Verbrauch von 90 % der eingesetzten N-Quelle, dass sich auch *E. coli* pASK_ectABCD_m unter diesen Bedingungen nahe der N-Limitierung befand (vgl. Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Produktionsdaten zu *E. coli* pASK_ectABCD_m in MM63-0,5 mit Glycerin

Die maximale spezifische Produktivität ergab sich für den Zeitraum 3-7 h nach Induktion (mittlere exponentielle Phase, vgl. Abb. 3.16 D). Kohlenstoff (C)- und Stickstoff (N)-Bilanz wurden mit einem C:N-Verhältnis von 48:12 % in der Trockenbiomasse (TBM) von *E. coli* bestimmt. Die separate C-Bilanz für TBM bzw. Ectoin wurde anhand des Ertrags von 2,66 g Glycerin/g TBM des Kontrollstamms *E. coli* pASK-IBA3 berechnet. Der ADABA-Anteil (1 %) wurde vernachlässigt. $Y_{(X+E)/S}$: Ertrag von TBM (X) und Ectoin (E) über C-Quelle (S), $Y_{E/S}$: Ertrag von Ectoin (E) über C-Quelle (S)

Wachstumsrate [h ⁻¹]	0,23 ± 0,02
C-Quelle im Medium [g/L]	4,65 (1,82 C)
TBM [g/L]	0,62 ± 0,07
Ectoin (extrazellulär) [g/L]	1,54 ± 0,16
Ertrag $Y_{(X+E)/S}$ [g/g]	0,46
Ertrag $Y_{E/S}$ [g/g]	0,33
Ectoin (extrazellulär) [g/g TBM]	2,47 ± 0,37
spezifische Produktivität [mg/(g TBM x h)]	352,9 ± 1,3
C-Bilanz (total) [C in g/L]	0,30 in TBM 0,78 in Ectoin total 59 % der C-Quelle (1,82)
C-Bilanz (separat) [C in g/L]	0,64 der C-Quelle für 0,30 in TBM (= 47 %) (verglichen mit Kontrollstamm) 1,17 der C-Quelle für 0,78 in Ectoin (= 67 %)
N-Bilanz (total) [N in g/L]	0,08 in TBM 0,30 in Ectoin total 90 % der N-Quelle (0,42)

Bei Wachstum in MM63 mit doppelter Menge Glycerin und einem C:N-Verhältnis von ca. 8:1 (3,64 g C/0,42 g N) erreichte der Ectoin-Produzent eindeutig die N-Limitierung. Im Vergleich zum üblich verwendeten Medium mit einem C:N-Verhältnis von ca. 4:1 (1,82 g C/0,42 g N) und Eintreten der C-Limitierung wurden lediglich etwas mehr Ectoin und TBM produziert (vgl. Abb. 3.18). Außerdem waren in der stationären Phase noch etwa 40 % der C-Quelle im Medium vorhanden, während entsprechend der N-Bilanz die gesamte N-Quelle verbraucht worden war (Daten nicht gezeigt). In MM63 mit der dreifachen Glycerin-Menge und einem C:N-Verhältnis von etwa 6:1 (5,46 g C/0,84 g N) konnte die TBM verdoppelt und die extrazelluläre Solutkonzentration (3,94 g/L) um den 2,5-fachen Wert gesteigert werden. Dabei ergab sich ein hoher Anteil an ADABA (37 %). Aber auch bei diesem C:N-Verhältnis konnten noch 34 % der C-Quelle im Medienüberstand detektiert werden und entsprechend der N-Bilanz war der Produktionsstamm N-limitiert (nicht dargestellt).

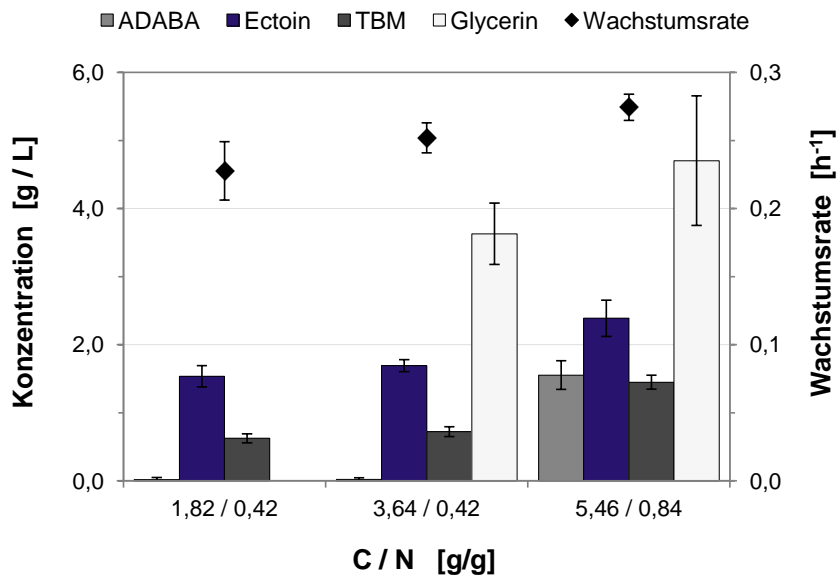


Abb. 3.18: Wachstum und heterologe Produktion mit variablem C:N-Verhältnis

E. coli pASK_ectABCD_m wurde in MM63-0,5 mit steigender Glycerin-Konzentration und einem C:N-Verhältnis von ca. 4:1 (1,82 g C/0,42 g N), 8:1 (3,64 g C/0,42 g N) bzw. 6:1 (5,46 g C/0,84 g N) kultiviert. Nach Zellernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert und die Trockenbiomasse (TBM), die extrazelluläre Solut- und Glycerin-Konzentration (g/L) sowie die Wachstumsrate (h⁻¹) bestimmt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist dargestellt.

Insgesamt konnte die heterologe Ectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m im Schüttelkolben (Batch-Kultur) durch Veränderung der Produktionsbedingungen deutlich verbessert werden. In MM63 mit 50 mM Glycerin als C-Quelle und geringer NaCl-Konzentration (0,25-0,5 %) bei 37 °C sowie einer frühen Induktion (OD₆₀₀ 0,30-0,35) wurden die bisher höchsten extrazellulären Produktausbeuten mit einem Anteil von 99-100 % Ectoin erreicht.

3.3.2 Produktion von Ectoin mittels Fed-Batch-Fermentation

Neben der Optimierung der Produktionsbedingungen im Schüttelkolben (Batch-Kultur) sollte die heterologe Ectoin-Produktion mit einer höheren Zelldichte und unter kontrollierten Wachstumsbedingungen (pH, Temperatur, O₂-Zufuhr) im 1 L-Fermenter verfolgt werden. Für die Wachstumsversuche im Schüttelkolben wurde zwar das gepufferte Minimalmedium MM63 (KH₂PO₄, KOH) mit einem pH-Wert von 7,0-7,1 verwendet, aber in der stationären Phase war der pH-Wert der Kulturen trotzdem auf 6,4-6,6 gesunken. Im Fermenter sollte eine bessere Kontrolle sowie Anpassung des pH-Werts und darüber hinaus eine günstigere O₂-Versorgung als im Schüttelkolben ermöglicht werden. Die Experimente zur Ectoin-Produktion im Schüttelkolben haben auch gezeigt, dass eine erhöhte Wachstumsrate sowie eine hohe Anfangskonzentration von Glycerin aufgrund der extrazellulären ADABA-Akkumulation von Nachteil sind. Daher wurden für die Fed-Batch-Fermentation mit *E. coli* pASK_ectABCD_m, wie unter den optimierten Bedingungen im Schüttelkolben, 50 mM Glycerin als Anfangskonzentration gewählt und erst im späteren Wachstumsverlauf erneut C-Quelle hinzugegeben.

In Anlehnung an MM63 wurde ein ungepuffertes Fermentationsmedium mit 0,5 % NaCl konzipiert, das ein anfängliches C:N-Verhältnis von 1,8:1,0 und alle Komponenten für mind. die 2,5-fache Anfangskonzentration der C-Quelle aufweist. Dabei wurde ein Verbrauch von 40 % C-Quelle für die Energiegewinnung angenommen (vgl. Tab. 3.2). Der pH-Wert wurde automatisch mit 1 M HCl bzw. 2,7 M NH₃-Lösung auf 6,9-7,1 eingestellt, wodurch im Verlauf der Fermentation eine zusätzliche N-Quelle zur Verfügung stand. Um die Plasmidstabilität und die heterologe Expression des *A. cryptum*-Genclusters über die gesamte Wachstumsdauer zu gewährleisten, wurden Carbenicillin und AHT zu Beginn und im späteren Verlauf der Fermentation zugegeben.

Die Ergebnisse zur Ectoin-Produktion im Schüttelkolben mit 0,5 % NaCl und 50 mM Glycerin konnten nach 15 Stunden Fermentation, bei Erreichen der stationären Phase, reproduziert werden. Im Schüttelkolben wurde in der stationären Phase eine extrazelluläre Ectoin-Konzentration von 10,8 mM (1,54 g/L) erzielt (vgl. Abb. 3.16 C und Tab. 3.2). Bei der Fermentation konnten nach 15 Stunden, als 50 mM Glycerin nahezu verbraucht waren, ebenfalls 1,54 g Ectoin pro L sowie eine geringe ADABA-Konzentration von 0,13 g/L im Medium detektiert werden (vgl. Abb. 3.19).

Zu diesem Zeitpunkt wurde erneut Glycerin zugegeben. Zunächst war jedoch kein Anstieg der OD₆₀₀ erkennbar und die extrazelluläre Ectoin-Konzentration nahm nur langsam zu. Stattdessen konnte eine stetig ansteigende Akkumulation der Vorstufe ADABA und von Acetat im Medium festgestellt werden. Beim vollständigen Verbrauch der C-Quelle (nach 26 h) waren 1,82 g Ectoin, 0,64 g ADABA und 0,58 g Acetat pro L im Medium vorhanden. Auch nach erneuter Zugabe von AHT und Glycerin stieg die extrazelluläre Ectoin-Konzentration nur noch geringfügig an und blieb im weiteren Fermentationsverlauf unverändert (2,06 g/L). Demgegenüber nahm die Zelldichte zu und ADABA sowie Acetat wurden weiter im Medium angehäuft. Die extrazelluläre Acetat-Konzentration nahm zwischenzeitlich, wenn Glycerin weniger wurde, wieder ab, was im Zeitraum von 37 bis 46 Stunden der Fermentation deutlich zu erkennen ist.

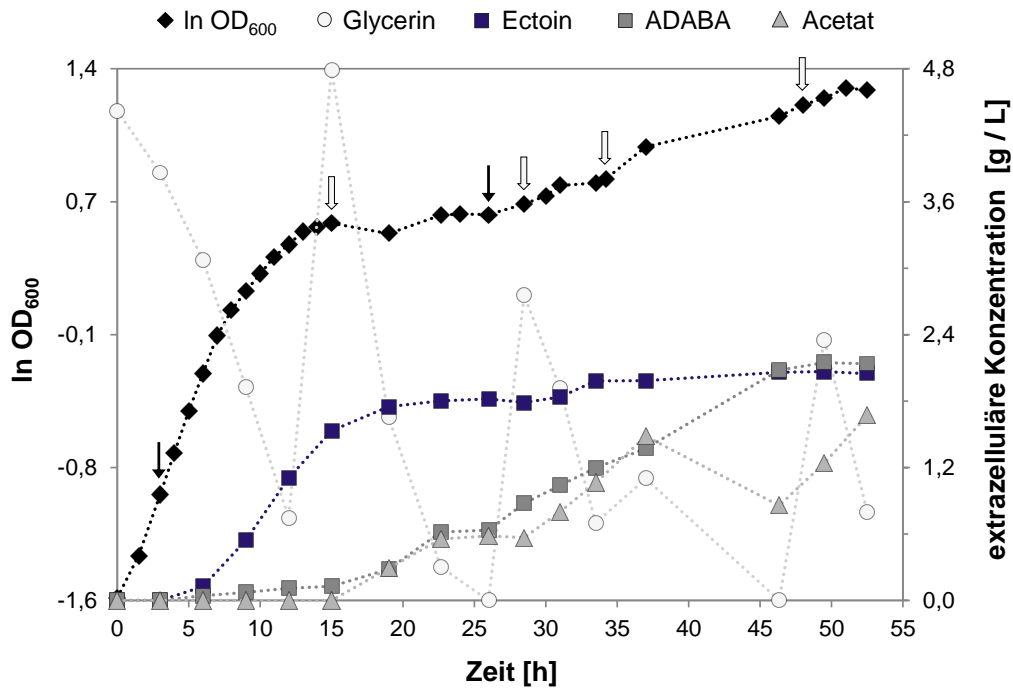


Abb. 3.19: Heterologe Ectoin-Produktion mittels Fed-Batch-Fermentation

E. coli pASK_ectABCD_m wurde in Fermentationsmedium mit Glycerin und 0,5 % NaCl unter kontrollierten Bedingungen (37 °C, 300 rpm, pH 6,9-7,1) im 1 L-Fermenter kultiviert. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl bzw. 2,7 M NH₃-Lösung eingestellt. Der Wachstumsverlauf ist anhand des natürlichen Logarithmus der OD₆₀₀ (gemessen in Küvette) gezeigt und die Zeitpunkte der AHT-Induktion (schwarze Pfeile) sowie der Zugabe von Glycerin (weiße Pfeile) sind markiert. Medienüberstände wurden mittels HPLC analysiert und der Verbrauch der C-Quelle sowie die extrazelluläre Solutkonzentration (g/L) bestimmt.

Nach 52 Stunden war auch für ADABA keine weitere Zunahme zu verzeichnen und die Fermentation wurde beendet. Schlussendlich ergaben sich eine OD₆₀₀ von 3,6 sowie eine extrazelluläre ADABA- und Ectoin-Konzentration von 2,15 bzw. 2,06 g/L. Zu diesem Zeitpunkt waren noch 0,8 g der eingesetzten C-Quelle (etwa 12,5 g/L) und 1,7 g Acetat pro L im Medium enthalten. Demnach sind ca. 75 % der verbrauchten C-Quelle in Biomasse und extrazelluläre Solute geflossen, während die restlichen 25 % für die Energiegewinnung benötigt wurden.

Bei einer erneuten Fed-Batch-Fermentation unter den gleichen Wachstumsbedingungen zeigte sich ein ähnlicher Fermentationsverlauf, bei dem nach 20-stündigem Wachstum ebenfalls kaum noch und später gar kein Ectoin mehr produziert wurde. Stattdessen nahm die Biomasse zu und ADABA sowie Acetat wurden vermehrt im Medium akkumuliert (Daten nicht gezeigt). Unter den gegebenen Wachstumsbedingungen scheint EctC nicht mehr intakt gewesen zu sein oder konnte zumindest nicht mehr die Reaktion von ADABA zu Ectoin katalysieren, so dass die Vorstufe ADABA ins Medium verloren ging und dort angehäuft wurde.

3.3.3 Ectoin-Produktion mit ruhenden Zellen

Die heterologe Ectoin-Produktion mit ruhenden Zellen wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurde sich an den Arbeiten von He *et al.* (2015) orientiert, die eine Ganzzellbiokatalyse von Aspartat und Glycerin zu Ectoin in *E. coli* BW25113 mit dem Ectoin-Gencluster aus *H. elongata* durchgeführt haben. *E. coli* pASK_ectABCD_m wurde im Schüttelkolben mit MM63 und 37 °C angezogen, bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit AHT induziert und für weitere sieben Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in Reaktionspuffer G (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7, 100 mM Aspartat, 100 mM Glycerin) überführt (OD₆₀₀ von 5). Die Ganzzellbiokatalyse mit den ruhenden Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 40 Stunden bei 30 °C und 180 rpm im Schüttelkolben (vgl. Abb. 3.20).

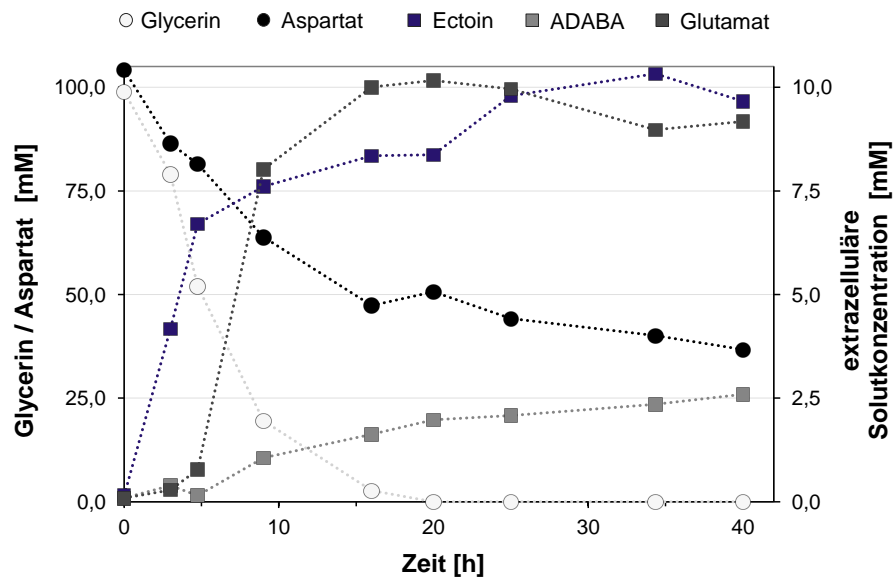


Abb. 3.20: Ganzzellbiokatalyse von Aspartat und Glycerin zu Ectoin mit ruhenden Zellen
Nach Anzucht in MM63 bei 37 °C, Induktion bei OD₆₀₀ 0,6 und weiteren 7 h Wachstum bei 30 °C wurde *E. coli* pASK_ectABCD_m geerntet und in Reaktionspuffer G (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7, 100 mM Aspartat, 100 mM Glycerin) überführt (OD₆₀₀ 5). Die Ganzzellbiokatalyse erfolgte bei 30 °C im Schüttelkolben. Überstandsproben wurden mittels HPLC analysiert und der Verbrauch des Substrats (Aspartat, Glycerin) sowie die extrazelluläre Solutkonzentration in mM bestimmt.

Die extrazelluläre Ectoin-Konzentration stieg in den ersten fünf Stunden der Ganzzellbiokatalyse steil an, nahm dann nur noch langsam zu und blieb nach 25 Stunden nahezu unverändert (ca. 10 mM). Eine Akkumulation von ADABA im Reaktionspuffer war ebenfalls zu beobachten. Allerdings stieg die extrazelluläre ADABA-Konzentration erst nach fünf Stunden an, als die Zunahme von Ectoin langsamer wurde, und lag nach 40 Stunden bei 2,5 mM. Entgegen den Erwartungen wurde auch Glutamat während der Ganzzellbiokatalyse extrazellulär akkumuliert. Dabei ergab sich ein ähnlicher Verlauf wie für Ectoin und eine Endkonzentration von etwa 9 mM. Außerdem konnte nach 20 Stunden kein Glycerin mehr in den Überstandsproben detektiert werden. Demgegenüber waren nach 40 Stunden immer noch fast 40 mM Aspartat im Reaktionspuffer vorhanden, aber mit den ruhenden Zellen erfolgte keine weitere Umsetzung zu Ectoin.

Mit einer ^1H -NMR-Spektroskopie wurde kontrolliert, ob noch weitere Verbindungen während der Ganzzellbiokatalyse im Reaktionspuffer akkumuliert wurden (vgl. Abb. 7.2 im Anhang). Dafür wurden die letzten drei Überstandsproben mit einer ähnlichen Zusammensetzung (25 - 40 h) vereinigt, um eine möglichst hohe Konzentration für die NMR-Messung zu erhalten. Anhand des ^1H -NMR-Spektrums konnten neben den bereits genannten Verbindungen noch Acetat und α -ADABA nachgewiesen werden, wobei Acetat mit etwa 20 mM in hoher Konzentration und α -ADABA nur in verschwindend geringen Mengen vorlag (vgl. Abb. 7.2).

Unter den getesteten Bedingungen, sowohl im Fermenter als auch bei der Ganzzellbiokatalyse mit ruhenden Zellen, war die heterologe Produktion von Ectoin ab einem bestimmten Zeitpunkt unterbrochen. Stattdessen wurden ADABA sowie Acetat extrazellulär akkumuliert, was auf ein Ungleichgewicht des Stoffwechsels und der heterologen Produktion hindeutet. Um zu überprüfen, ob die ausbleibende Ectoin-Produktion und gleichzeitige Anhäufung von ADABA direkt mit der Menge an EctC zusammenhängen, sollte die heterologe Expression von *ectC* gesteigert werden.

3.3.4 Steigerung der heterologen Expression von *ectC*

3.3.4.1 Expression von *ectC* unter Kontrolle eines separaten *tet*-Promotors

Zur Überprüfung, ob durch eine Steigerung der Expression von *ectC* die extrazelluläre ADABA-Akkumulation unterbunden werden kann, wurde ein neuer Expressionsvektor mit *ectAB* und *ectC* jeweils unter Kontrolle eines *tet*-Promotors konstruiert. Im bisherigen Expressionsvektor pASK_ectABCD_m befindet sich das *A. cryptum*-Gencluster unverändert stromabwärts des *tet*-Promotors. Im neuen Vektor pASK_ectAB-C sollte mit Hilfe des zusätzlichen *tet*-Promotors vor *ectC* dessen Transkriptionsrate im besten Fall erhöht werden. Die Konstruktion von pASK_ectAB-C erfolgte in einer zweistufigen Klonierung (vgl. Abb. 3.21).

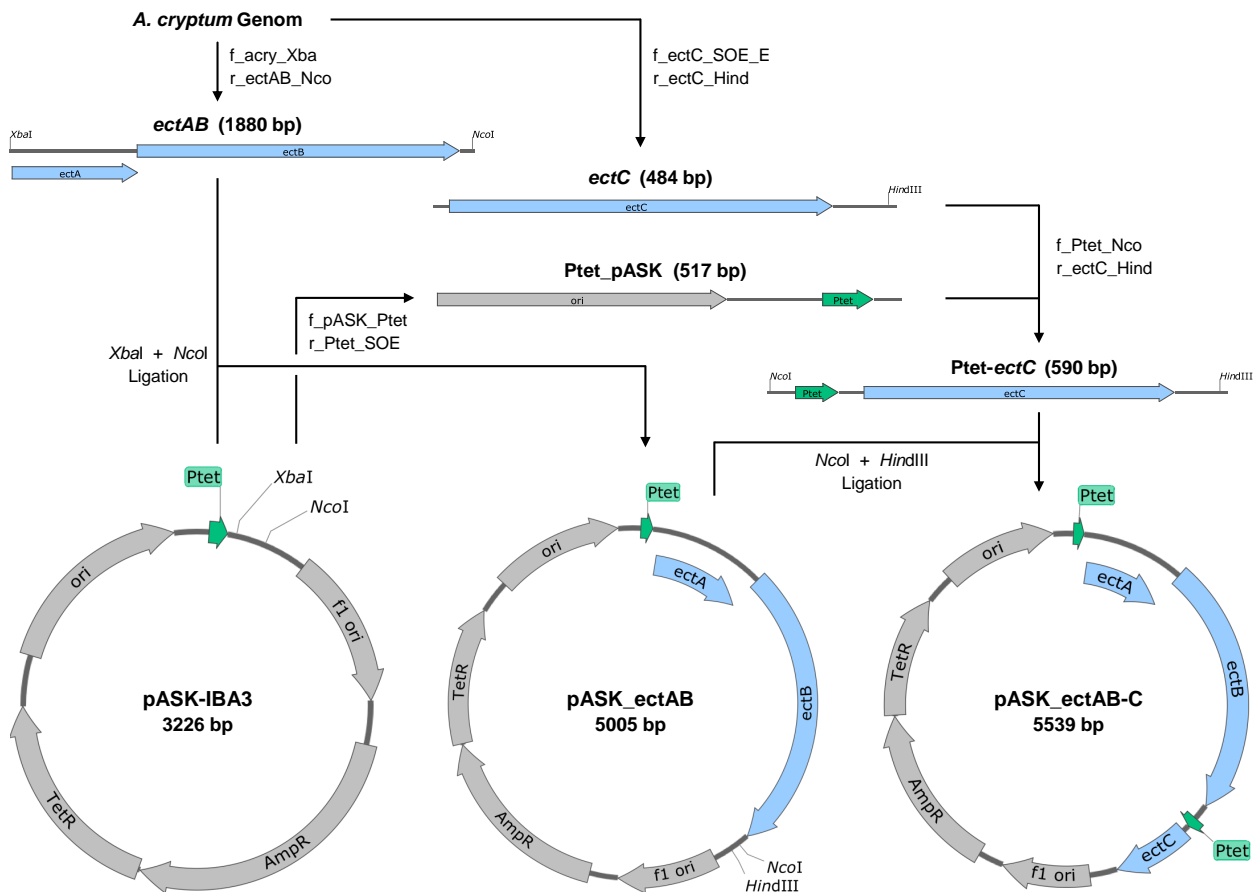


Abb. 3.21: Konstruktion des Expressionsvektors pASK_ectAB-C

Die Gene *ectAB* wurden mittels PCR aus genomischer DNA von *A. cryptum* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* sowie *NcoI* in pASK-IBA3 stromabwärts des *tet*-Promotors (Ptet) integriert. Der entstandene Vektor pASK_ectAB war Ausgangsvektor für die zweite Klonierung. Das Gen *ectC* von *A. cryptum* wurde in einer SOE-PCR mit Ptet aus pASK-IBA3 fusioniert, über die Schnittstellen *NcoI* sowie *HindIII* in pASK_ectAB stromabwärts von *ectB* eingebracht und somit der Vektor pASK_ectAB-C konstruiert. AmpR: Ampicillinresistenz, TetR: Tet-Repressor, ori: Replikationsursprung

Im ersten Schritt wurden die Gene *ectAB* mit den Primern f_acry_Xba und r_ectAB_Nco aus genomischer DNA von *A. cryptum* amplifiziert und über die mit den Primern eingefügten Restriktionsschnittstellen *XbaI* sowie *NcoI* in den Vektor pASK-IBA3 integriert. Für die PCR wurde der gleiche 5'-Primer benutzt wie im Fall von pASK_ectABCD_m, so dass der Sequenzbereich von *tet*-Promotor und *ectAB* in beiden Vektoren identisch ist. Der konstruierte Vektor pASK_ectAB diente als Ausgangsvektor für den zweiten Klonierungsschritt. Das Gen *ectC* von *A. cryptum* wurde in einer SOE-PCR mit dem *tet*-Promotor aus pASK-IBA3 fusioniert und über die zuvor eingefügten Schnittstellen *NcoI* sowie *HindIII* in den Vektor pASK_ectAB stromabwärts von *ectB* eingebracht. Die erfolgreiche Klonierung des Expressionsvektors pASK_ectAB-C und des Ausgangsvektors pASK_ectAB wurde mit Restriktionsanalysen überprüft und die korrekte Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Ein Sequenzausschnitt von pASK_ectAB-C ist in Abb. 7.5 im Anhang gezeigt. Das Gen *ectD* wurde bei der Konstruktion des neuen Expressionsvektors nicht berücksichtigt, da es für die heterologe Produktion von Ectoin in *E. coli* nicht benötigt wird.

Wachstumsversuche mit dem neuen Produktionsstamm *E. coli* pASK_ectAB-C zeigten keine Verbesserung der heterologen Ectoin-Produktion im Vergleich zum bisherigen Ectoin-Produzenten *E. coli* pASK_ectABCD_m (vgl. Abb. 3.22).

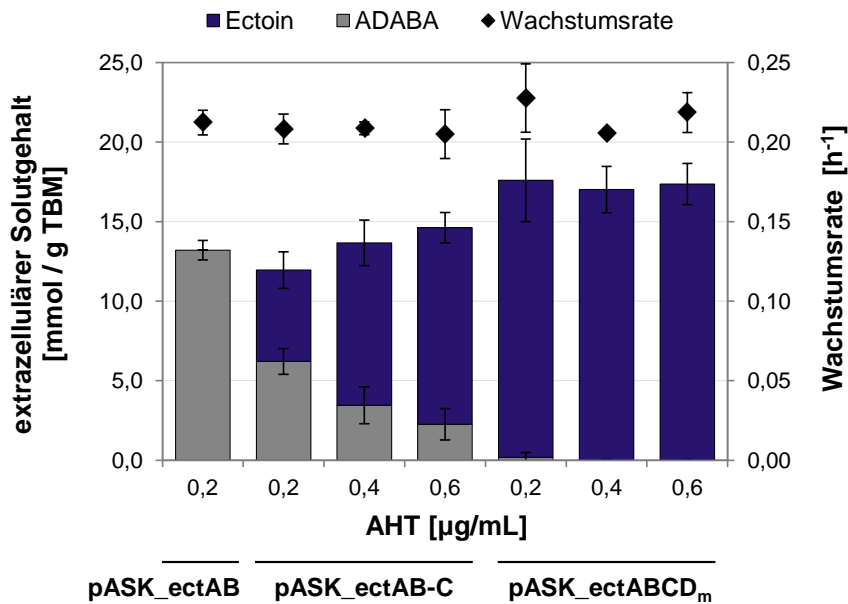


Abb. 3.22: Produktion mit *E. coli* pASK_ectAB, pASK_ectAB-C und pASK_ectABCD_m
Die Produktionsstämme wurden in MM63-0,5 mit Glycerin kultiviert. Die Induktion erfolgte mit einer AHT-Konzentration von 0,2 (Standardkonzentration), 0,4 bzw. 0,6 µg/mL. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert und der extrazelluläre Solutgehalt (mmol/g Trockenbiomasse (TBM)) sowie die Wachstumsrate (h⁻¹) bestimmt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist gezeigt.

Im Gegenteil, unter optimalen Bedingungen in MM63-0,5 mit Glycerin, die normalerweise keine ADABA-Akkumulation zur Folge haben, hatte *E. coli* pASK_ectAB-C große Mengen der Ectoin-Vorstufe im Medium angehäuft und der extrazelluläre Solutgehalt war insgesamt niedriger.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Wachstum mit Glucose, wo für *E. coli* pASK_ectABCD_m eine ADABA-Akkumulation beobachtet wurde, aber diese im Fall des neuen Produktionsstamms deutlich höher ausfiel (nicht gezeigt). Durch Erhöhung der AHT-Konzentration verschob sich bei *E. coli* pASK_ectAB-C das Verhältnis von ADABA und Ectoin zu Gunsten von Ectoin (vgl. Abb. 3.22). Allerdings ergab sich für die dreifache Menge des Induktors immer noch ein ADABA-Anteil am extrazellulären Solutgehalt von 15%. Im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD_m konnte kein Einfluss der AHT-Konzentration auf den extrazellulären Solutgehalt festgestellt werden.

Mit dem Vektor pASK_ectAB, der als Zwischenprodukt bei der Klonierung entstand, wurde erwartungsgemäß nur ADABA produziert (13,2 mmol/g TBM). Dabei fiel der extrazelluläre Solutgehalt bezogen auf TBM geringer aus als bei *E. coli* pASK_ectABCD_m, weil mehr Biomasse gebildet wurde. Die extrazelluläre Solutkonzentration hingegen war in der gleichen Größenordnung (vgl. Abb. 3.23). Bei *E. coli* pASK_ectAB-C war eine deutliche Korrelation zwischen der steigenden AHT-Menge und der abnehmenden ADABA- sowie zunehmenden Ectoin-Konzentration erkennbar. Die TBM-Produktion hingegen blieb gleich.

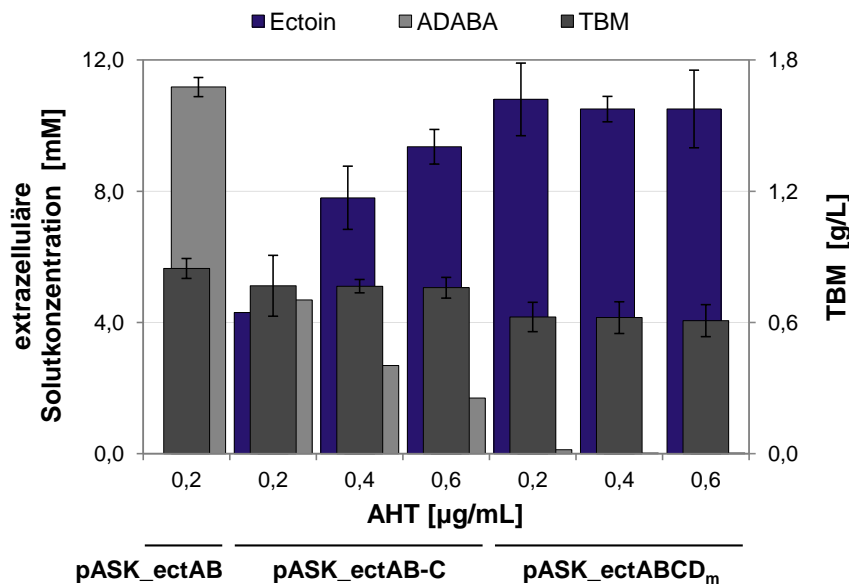


Abb. 3.23: Solutkonzentration und TBM bei variabler AHT-Menge

E. coli pASK_ectAB, pASK_ectAB-C und pASK_ectABCD_m wurden in MM63-0,5 mit Glycerin kultiviert. Die Induktion erfolgte mit einer AHT-Konzentration von 0,2 (Standardkonzentration), 0,4 bzw. 0,6 µg/mL. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert. Dargestellt sind die extrazelluläre Solutkonzentration (mM) und Trockenbiomasse (TBM, g/L). Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten wurde bestimmt.

Daran anschließend wurde die heterologe Produktion mit *E. coli* pASK_ectAB-C im direkten Vergleich zu *E. coli* pASK_ectABCD_m auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden die Produktionsstämme und *E. coli* pASK-IBA3 als Negativkontrolle in MM63-0,5 mit Glycerin kultiviert und das lösliche Zellprotein aus Kulturproben vor und nach Induktion mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abb. 3.24). Soweit die SDS-PAGE eine Beurteilung zulässt, ist kein wesentlicher Unterschied zwischen dem neuen Produktionsstamm mit *ectC* unter Kontrolle eines separaten *tet*-Promotors

und dem bisherigen Produktionsstamm auf Proteinebene zu erkennen.

Die mutmaßliche Bande von EctB (46,5 kDa) war, bis auf bei der Negativkontrolle, nach Zugabe des Induktors vorhanden und 17 Stunden nach Induktion (stationäre Phase) am stärksten ausgeprägt. EctC (14,7 kDa) konnte anhand anderer Proteinanalysen, bei denen die EctC-Bande eindeutig identifiziert wurde (vgl. Abb. 3.27), einer Bande zwischen 15 und 20 kDa zugeordnet werden. Die Negativkontrolle zeigte zwar auf der gleichen Höhe eine Proteinbande in den Proben der stationären Phase (17, 24 h), aber drei und sieben Stunden nach Induktion fehlte diese Bande. Bei den Produktionsstämmen hingegen war die Bande zu diesen Zeitpunkten vorhanden und vor Induktion nicht sichtbar. Weiterhin war für die mutmaßliche EctC-Bande eine Abnahme der Intensität 17 und 24 Stunden nach Induktion auszumachen, die im Fall von *E. coli* pASK_ectAB-C etwas deutlicher zu sein schien.

Bei der unmittelbar darüber liegenden Proteinbande, die nur in den Proben der beiden Produktionsstämmen nach AHT-Zugabe sichtbar war, könnte es sich um EctA (18,0 kDa) handeln. Zum einen unterscheidet sich das theoretische Molekulargewicht beider Proteine nur wenig voneinander. Zum anderen war die EctC-Bande auf einer höheren Position im Proteingel zu finden, als anhand des Molekulargewichts zu erwarten wäre. Die mutmaßlichen Proteinbanden von EctA, EctB und EctC waren bei beiden Stämmen auch in der unlöslichen Proteinfraction von Proben aus der stationären Phase sichtbar (nicht dargestellt).

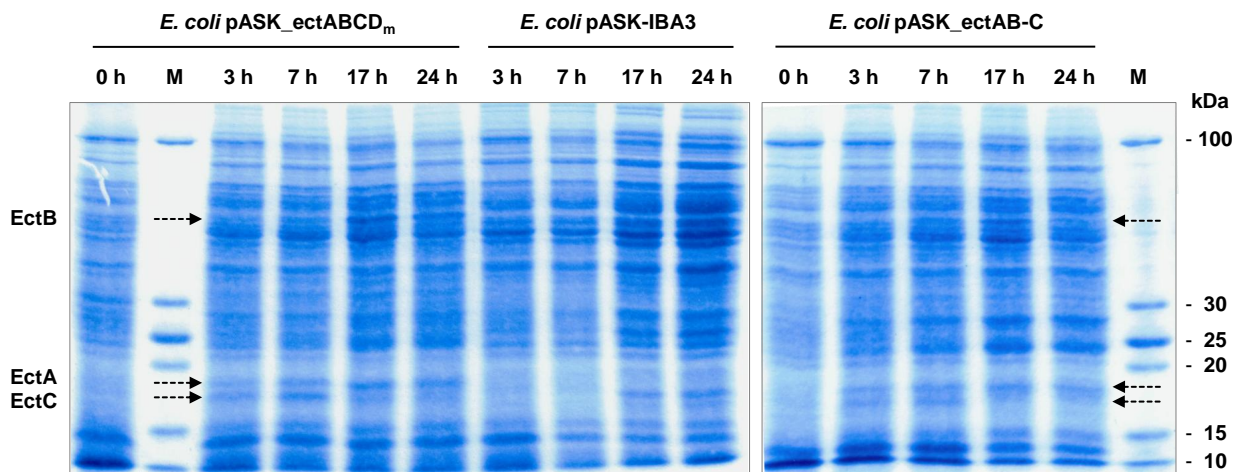


Abb. 3.24: SDS-PAGE zu *E. coli* pASK_ectAB-C und pASK_ectABCD_m

Dargestellt ist das lösliche Zellprotein (20 µg) im Wachstumsverlauf von *E. coli* pASK_ectAB-C (*ectC* mit separatem *tet*-Promotor), pASK_ectABCD_m (*ectC* direkt hinter *ectB*) und pASK-IBA3 (Negativkontrolle). Die Anzucht erfolgte in MM63-0,5 mit Glycerin. Das lösliche Zellprotein wurde aus Proben vor Zugabe von 0,4 µg AHT/mL (0 h) sowie 3, 7, 17 und 24 h nach Induktion gewonnen. Die mutmaßlichen Banden von EctA (18,0 kDa), EctB (46,5 kDa) und EctC (14,7 kDa) sind mit Pfeilen markiert. M: PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche und Proteinanalyse haben gezeigt, dass keine Steigerung der heterologen Produktion erreicht werden kann, wenn *ectC* unter Kontrolle eines separaten *tet*-Promotors exprimiert wird (pASK_ectAB-C) anstatt wie im ursprünglichen *A. cryptum*-Gencluster direkt stromabwärts von *ectB* vorzuliegen (pASK_ectABCD_m). Im Folgenden sollte die heterologe Expression von *ectC* durch eine erhöhte Translation gesteigert werden.

3.3.4.2 Expression von *ectC* mit separatem *tet*-Promotor und optimierter RBS

Bei der Initiation der Translation, einem hoch regulierten und limitierenden Schritt der Proteinbiosynthese, spielt die Ribosomenbindestelle (RBS) eine wichtige Rolle, indem sie die Bindung zwischen mRNA und 16s rRNA der 30S-Untereinheit des Ribosoms ermöglicht (Shine & Dalgarno, 1974; Steitz & Jakes, 1975). Die RBS befindet sich stromaufwärts des Startcodons in der mRNA und beinhaltet die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz), die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA des Ribosoms ist.

Zur Steigerung der Expression von *ectC* auf Translationsebene wurde neben dem separaten *tet*-Promotor zusätzlich eine optimierte RBS stromaufwärts von *ectC* eingebracht. Im Expressionsvektor pASK_ectABCD_m befindet sich die aus *A. cryptum* stammende potenzielle RBS vor *ectC* (vgl. Abb. 7.4 im Anhang). Im Fall von pASK_ectAB-C wurde zusammen mit dem *tet*-Promotor die putative RBS aus pASK-IBA3 stromaufwärts von *ectC* integriert und gleichzeitig die mutmaßliche RBS aus *A. cryptum* entfernt (vgl. Abb. 7.5 im Anhang). Für die Konstruktion des neuen Expressionsvektors pASK_ectAB-RectC wurde die RBS aus dem Vektor pET-22b(+) vor *ectC* eingefügt (vgl. Abb. 7.6 im Anhang). Diese hoch effiziente RBS stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen T7 und ermöglicht im pET-System zusammen mit dem T7-Promotor eine hohe Produktion rekombinanter Proteine. Für die Expression von *ectC* aus *A. cryptum* im pET-System (pET-22b_ectC_Acr_His) konnte in vorherigen Experimenten bereits gezeigt werden, dass EctC in großen Mengen und in aktiver Form produziert wird (Moritz, 2012).

Um die Effizienz der Translation einschätzen zu können, wurden die theoretischen Translationsinitiations-Raten (Ti-Raten) für *ectC* in den verschiedenen Expressionsvektoren mit dem Online-Tool RBS Calculator bestimmt (Salis *et al.*, 2009; Espah Borujeni *et al.*, 2014). Dabei wurde vom Transkriptionsstartpunkt des *tet*-Promotors ausgegangen, der sich im Fall von pASK_ectAB-C und pASK_ectAB-RectC vor *ectC* befindet. Bei pASK_ectABCD_m liegt dieser stromaufwärts von *ectA* und es wurde ein *ectABC*-Kotranskript angenommen. Für *ectC* im Vektor pASK_ectAB-C ergab sich mit einem relativen Wert von 106 die niedrigste theoretische Ti-Rate. Bei pASK_ectABCD_m war die theoretische Ti-Rate für *ectC* 25 mal höher (2694). Im Fall von pASK_ectAB-RectC wurde mit 43951 der höchste Wert ermittelt, der mehr als 400-fach höher ist als bei pASK_ectAB-C. Mit dieser Aussicht auf eine potenziell erhöhte Translation von *ectC* wurde der Vektor pASK_ectAB-RectC in einer zweistufigen Klonierung konstruiert (vgl. Abb. 3.25).

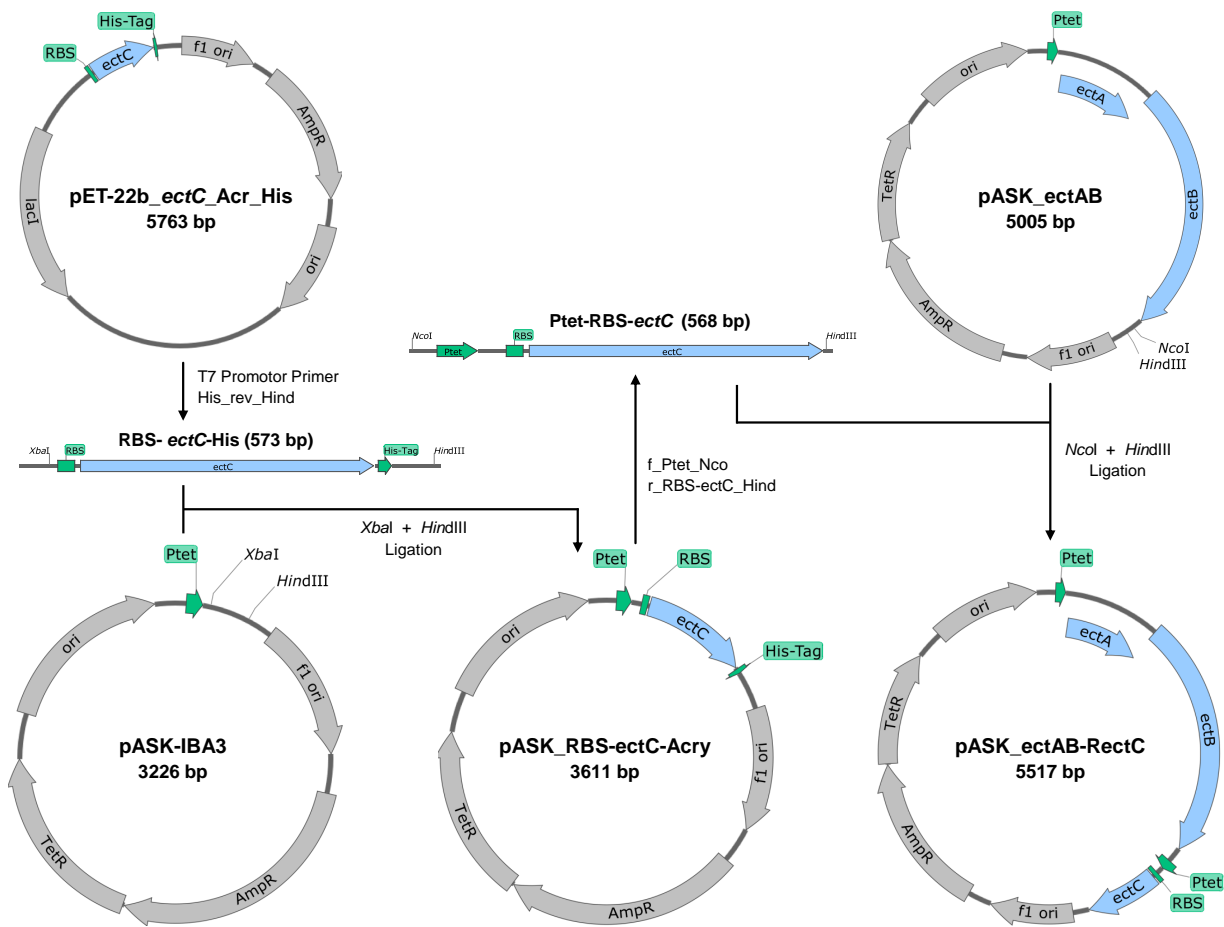


Abb. 3.25: Konstruktion des Expressionsvektors pASK_ectAB-RectC

Das Gen *ectC* wurde mit der Sequenz des C-terminalen His-Tags und der stromaufwärts gelegenen Ribosomenbindestelle (RBS) aus pET-22b_ectC_Acr_His amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* sowie *HindIII* in pASK-IBA3 stromabwärts des *tet*-Promotors (*Ptet*) eingebracht. Aus dem entstandenen Vektor pASK_RBS-ectC-Acry wurde *ectC* mit *Ptet* und RBS, aber ohne Sequenz für den His-Tag, mittels PCR amplifiziert. Das Insert wurde über die Schnittstellen *NcoI* sowie *HindIII* in den Vektor pASK_ectAB hinter *ectB* integriert und somit der Vektor pASK_ectAB-RectC konstruiert. AmpR: Ampicillinresistenz, lacI: Lac-Repressor, ori: Replikationsursprung, TetR: Tet-Repressor

Als Ausgangsvektoren für den ersten Klonierungsschritt dienten pET-22b_ectC_Acr_His und pASK-IBA3. Das aus *A. cryptum* stammende *ectC*, welches C-terminal die Sequenz für einen His-Tag besitzt, wurde mit der stromaufwärts gelegenen RBS aus dem Vektor pET-22b_ectC_Acr_His mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* sowie *HindIII* in pASK-IBA3 stromabwärts des *tet*-Promotors integriert (vgl. Abb. 3.25). Die erfolgreiche Klonierung des Vektors pASK_RBS-ectC-Acry konnte durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung bestätigt werden.

Mit dem Vektor pASK_RBS-ectC-Acry wurde zunächst die heterologe Expression von *ectC* unter den veränderten Bedingungen und unabhängig von den Genen *ectAB* untersucht. Dazu wurden Proben mit dem löslichen Zellprotein von *E. coli* pASK_RBS-ectC-Acry vor und nach

Induktion mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (vgl. Abb. 3.26). Eine deutliche Proteinbande, die weder bei *E. coli* pASK-IBA3 (Negativkontrolle) noch vor Induktion zu sehen war, konnte dem Fusionsprotein aus EctC und C-terminalem His-Tag (EctC-His) zugeordnet werden. Die Proteinbande war sowohl 6,5 Stunden als auch 18 Stunden nach Induktion am stärksten ausgeprägt und zeigte in der Probe 25 Stunden nach Induktion eine leichte Abnahme der Intensität. Außerdem konnte EctC-His in der unlöslichen Proteinfraction von Proben aus der stationären Phase detektiert werden (nicht gezeigt). Eine deutlich schwächere Bande unterhalb der von EctC-His war ebenfalls nur in Proben von *E. coli* pASK_RBS-ectC-Acry nach Zugabe des Induktors vorhanden. Diese Bande konnte auch beim Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen den His-Tag detektiert werden, was auf ein verkürztes Fusionsprotein hindeutet. Insgesamt zeigte sich anhand des Proteingels nach Coomassie-Färbung eine hohe Produktion von EctC-His, die auch mittels Western Blot bestätigt werden konnte.

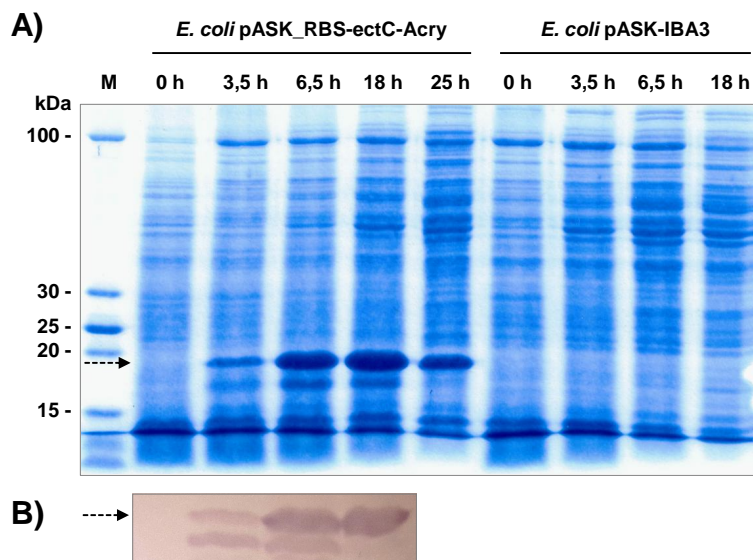


Abb. 3.26: SDS-PAGE und Western Blot zu *E. coli* pASK_RBS-ectC-Acry

Der Produktionsstamm und *E. coli* pASK-IBA3 (Negativkontrolle) wurden in MM63-0,5 mit Glycerin kultiviert. Das lösliche Zellprotein (20 µg) wurde aus Proben vor Zugabe von 0,2 µg AHT/mL (0 h) sowie 3,5, 6,5, 18 und 25 h nach Induktion mittels SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) analysiert. Die Bande des Fusionsproteins aus EctC und C-terminalem His-Tag (EctC-His, 15,8 kDa) ist mit einem Pfeil markiert. M: PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder

Im Anschluss wurde in einem zweiten Klonierungsschritt der Vektor pASK_ectAB-RectC konstruiert (vgl. Abb. 3.25). Das Gen *ectC* wurde zusammen mit dem *tet*-Promotor und der RBS, aber ohne die Sequenz für den His-Tag, aus dem Vektor pASK_RBS-ectC-Acry mit den Primern f_Ptet_Nco und r_RBS-ectC_Hind amplifiziert. Danach wurde das PCR-Produkt über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* sowie *HindIII* in den Vektor pASK_ectAB stromabwärts von *ectB* integriert. Die erfolgreiche Klonierung des Expressionsvektors pASK_ectAB-RectC wurde durch Restriktionsanalysen überprüft und die korrekte Sequenz mittels Sequenzierung bestätigt. Ein Sequenzausschnitt von pASK_ectAB-RectC ist in Abb. 7.6 im Anhang dargestellt.

Zunächst wurde die heterologe Expression der Gene *ectABC* auf Proteinebene untersucht. *E. coli* pASK_ectAB-RectC wurde unter den gleichen Bedingungen wie die beiden anderen Produktionsstämme zuvor kultiviert (vgl. 3.3.4.1) und das lösliche Zellprotein aus Proben vor und nach Induktion mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abb. 3.27).

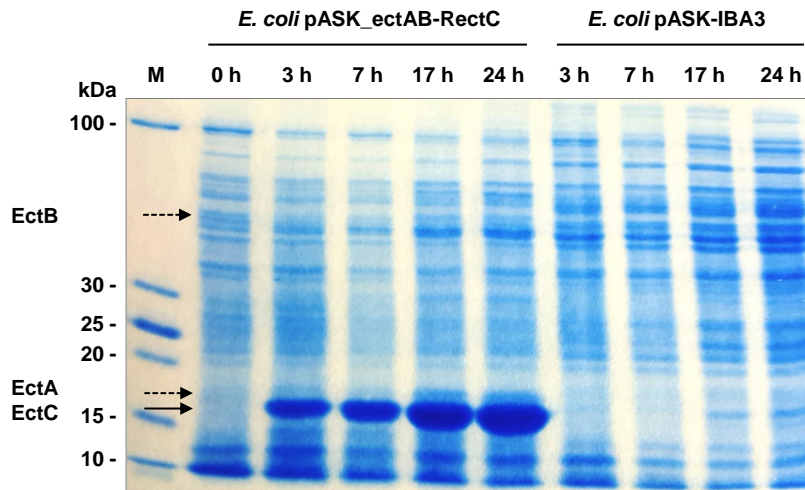


Abb. 3.27: SDS-PAGE des löslichen Zellproteins von *E. coli* pASK_ectAB-RectC

Dargestellt ist das lösliche Zellprotein (10 µg) im Wachstumsverlauf von *E. coli* pASK_ectAB-RectC (*ectC* mit separatem *tet*-Promotor und optimierter RBS) und *E. coli* pASK-IBA3 (Negativkontrolle). Die Anzucht erfolgte in MM63-0,5 mit Glycerin. Das lösliche Zellprotein wurde aus Proben vor Zugabe von 0,4 µg AHT/mL sowie 3, 7, 17 und 24 h nach Induktion gewonnen. Die potenziellen Banden von EctA (18,0 kDa), EctB (46,5 kDa) und EctC (14,7 kDa) sind mit Pfeilen markiert. M: PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder

Genau wie im Fall von *E. coli* pASK_RBS-ectC-Acry für EctC-His demonstriert werden konnte, war in den Proben von *E. coli* pASK_ectAB-RectC nach Induktion eine sehr starke Proteinbande sichtbar, deren Intensität im Wachstumsverlauf zunahm. Auf der gleichen Höhe war zwar auch bei der Negativkontrolle in den Proben der stationären Phase (17, 24 h) eine schwache Bande vorhanden, aber die Bande des Produktionsstamms konnte aufgrund der deutlichen Bandenstärke und somit hohen Proteinmenge eindeutig EctC zugeordnet werden. Hierbei zeigte sich auch für EctC ein anderes Laufverhalten im Proteingel, als anhand des theoretischen Molekulargewichts (14,7 kDa) zu erwarten wäre. Im Vergleich zu *E. coli* pASK_ectABCD_m und pASK_ectAB-C konnte die Expression von *ectC* durch den zusätzlichen *tet*-Promotor in Kombination mit der optimierten RBS deutlich gesteigert und eine wesentlich höhere Proteinmenge erzielt werden (vgl. Abb. 3.24 und 3.27). Die potenziellen Banden von EctA und EctB waren im Fall von *E. coli* pASK_ectAB-RectC nur schwach, wenn überhaupt im Proteingel zu erkennen. In der unlöslichen Proteinfraktion hingegen waren alle drei Proteine in Proben aus der stationären Phase sichtbar (nicht dargestellt).

Anschließend wurde in Wachstumsversuchen mit *E. coli* pASK_ectAB-RectC der Einfluss der gesteigerten *ectC*-Expression auf die Ectoin-Produktion untersucht. Dabei fiel auf, dass die Wachstumsrate nach Induktion etwas geringer war als vor AHT-Zugabe, was bei den anderen Produktionsstämmen nicht beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Im direkten Vergleich zu *E. coli* pASK_ectABCD_m waren bei Anzucht mit Glycerin die Ausbeuten an Ectoin bezogen auf TBM etwas höher (vgl. Abb. 3.28). Dies ist nicht auf eine höhere extrazelluläre Ectoin-Konzentration, sondern auf eine bis zu 15 % niedrigere TBM zurückzuführen (vgl. Abb. 3.29).

Allerdings war bei *E. coli* pASK_ectAB-RectC stets ein geringer Anteil an ADABA (4 %) im Medienüberstand vorhanden. Genau wie schon für *E. coli* pASK_ectABCD_m festgestellt werden konnte, zeigte sich auch im Fall des neuen Produktionsstamms kein signifikanter Einfluss der steigenden AHT-Konzentration auf die heterologe Produktion. Im Vergleich zu *E. coli* pASK_ectAB-C, der zwar auch einen zusätzlichen *tet*-Promotor, aber eine andere RBS vor *ectC* besitzt, war eine deutliche Verbesserung der Ectoin-Produktion zu beobachten (vgl. Abb. 3.22 und 3.28). Der extrazelluläre Solutgehalt war höher und der ADABA-Anteil wesentlich geringer.

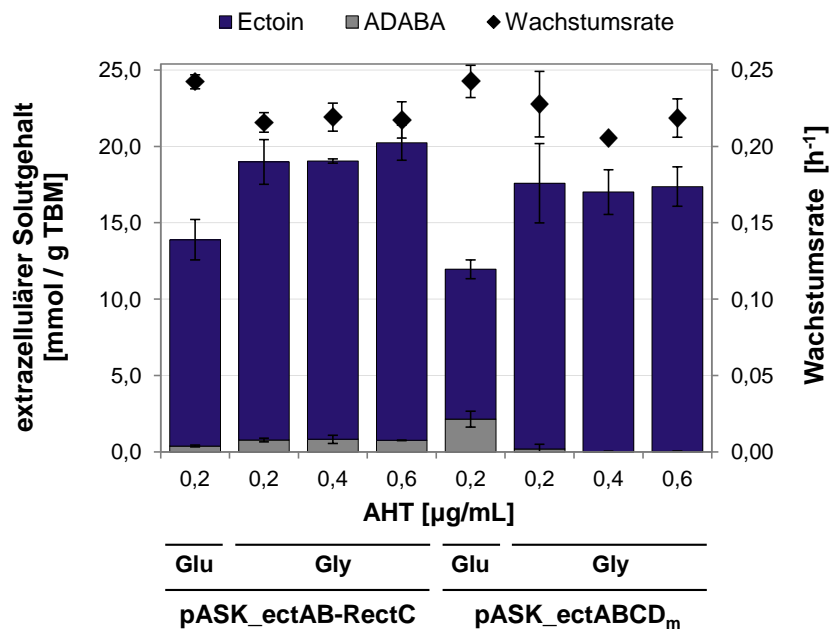


Abb. 3.28: Vergleich von *E. coli* pASK_ectAB-RectC und pASK_ectABCD_m

Die Produktionsstämmen wurden in MM63-0,5 mit 25 mM Glucose (Glu) oder 50 mM Glycerin (Gly) kultiviert. Die Induktion erfolgte mit einer AHT-Konzentration von 0,2 (Standardkonzentration), 0,4 bzw. 0,6 µg/mL. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert und der extrazelluläre Solutgehalt (mmol/g Trockenbiomasse (TBM)) sowie die Wachstumsrate (h⁻¹) bestimmt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist gezeigt.

Bei Wachstum mit Glucose zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der heterologen Produktion mit *E. coli* pASK_ectAB-RectC und pASK_ectABCD_m. Bei etwa gleicher TBM erreichte der Stamm mit gesteigerter EctC-Produktion eine geringere ADABA- und höhere Ectoin-Konzentration im Medium. Dies führte schlussendlich zu einem 16 % höheren extrazellulären Solutgehalt und einem deutlich reduzierten ADABA-Anteil von 3 % gegenüber 18 %.

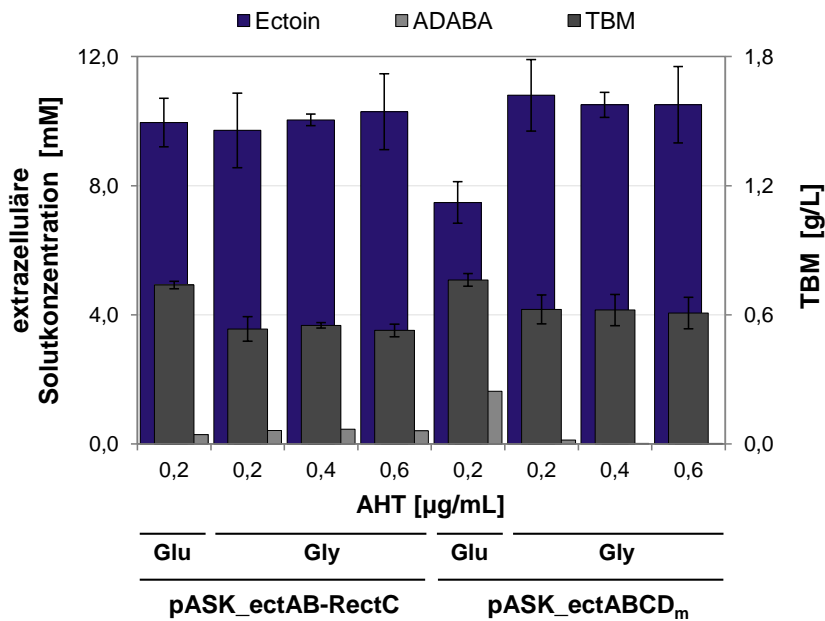


Abb. 3.29: Solute und TBM von *E. coli* pASK_ectAB-RectC und pASK_ectABCD_m. Die Produktionsstämme wurden in MM63-0,5 mit 25 mM Glucose (Glu) oder 50 mM Glycerin (Gly) kultiviert. Die Induktion erfolgte mit einer AHT-Konzentration von 0,2 (Standardkonzentration), 0,4 bzw. 0,6 $\mu\text{g/mL}$. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Medienüberstände mittels HPLC analysiert. Dargestellt sind die extrazelluläre Solutkonzentration (mM) und Trockenbiomasse (TBM, g/L) abhängig von der AHT-Menge. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten wurde bestimmt.

Insgesamt konnte anhand der Experimente demonstriert werden, dass die Steigerung der Expression von *ectC* durch einen separaten *tet*-Promotor in Kombination mit einer optimierten RBS möglich ist und zu einer deutlich höheren Proteinmenge führt. Allerdings war trotz der höheren Menge an EctC ein kleiner ADABA-Anteil im Medium nachweisbar. Bei Anzucht mit Glucose konnte eine höhere Ectoin-Ausbeute durch die gesteigerte *ectC*-Expression erzielt werden. Unter den optimierten Bedingungen (Glycerin als C-Quelle) war die heterologe Produktion vergleichbar zu der des Produktionsstamms *E. coli* pASK_ectABCD_m, für den sich eine deutlich schwächere EctC-Bande im Proteingel ergab. Im Folgenden wurden weitere Untersuchungen zum *A. cryptum*-Gencluster auf Transkriptionsebene und zur Aktivität von EctC, vor allem im Hinblick auf die extrazelluläre ADABA-Akkumulation, unternommen.

3.3.5 RNA-Analyse des *ectABCDask*-Genclusters von *A. cryptum*

Zwei Aspekte sollten im Hinblick auf die heterologe Ectoin-Produktion mit dem *A. cryptum*-Gencluster auf Ebene der Transkription untersucht werden. Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie die Transkription des Genclusters erfolgt und ob ein *ectABC*-Kotranskript gebildet wird, sollte die Länge der mRNA-Transkripte analysiert werden. Bisher konnten mittels bioinformatischer Datenanalyse nur zwei potenzielle σ^{70} -abhängige Promotoren stromaufwärts von *ectA* identifiziert werden (Moritz, 2012), was auf die Bildung einer polycistronischen mRNA hindeutet. Außerdem sollte die Transkription der einzelnen Gene mittels RT-qPCR quantifiziert und die Transkriptionsraten bei den verschiedenen Produktionsstämmen verglichen werden.

3.3.5.1 RNA-Analyse des *A. cryptum*-Genclusters in *E. coli*

Die Produktionsstämme und *E. coli* pASK-IBA3 (Negativkontrolle) wurden unter Bedingungen mit einer hohen Ectoin-Ausbeute (MM63-0,5 mit Glycerin) kultiviert und fünf Stunden nach Induktion in der spät exponentiellen Phase geerntet, um eine möglichst große Menge der mRNA zu erhalten. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und zur Qualitätskontrolle mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese analysiert (vgl. Abb. 3.30).

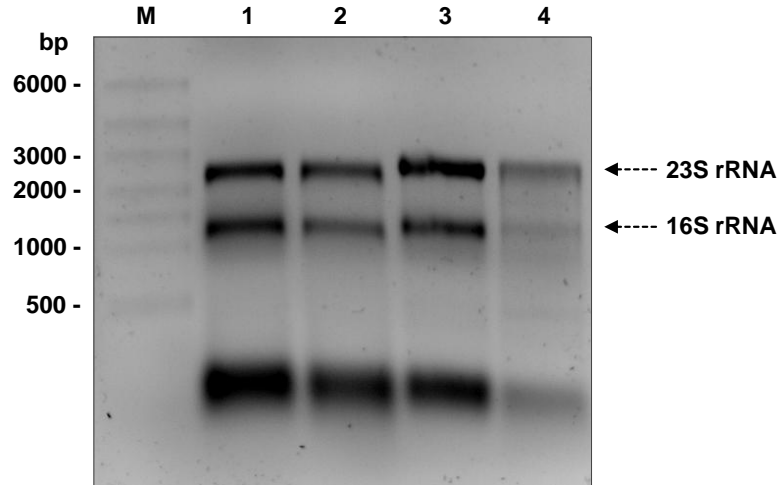


Abb. 3.30: Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA von *E. coli*

Dargestellt ist ein denaturierendes Agarosegel (1% in 1x MOPS + Formaldehyd) mit 2-2,5 μg Gesamt-RNA von *E. coli* pASK_ectABCD_m (1), pASK_ectABCDask (2), pASK_ectAB-RectC (3) und pASK-IBA3 (4). Die RNA wurde nach Anzucht in MM63-0,5 mit Glycerin und Ernte 5 h nach Induktion (0,4 μg AHT/mL) aus den Zellen isoliert. Die Banden der 23S rRNA (2,9 kb) und 16S rRNA (1,5 kb) sind mit Pfeilen markiert. M: RiboRuler High Range RNA Ladder

Hierbei zeigten sich die für intakte Gesamt-RNA typischen Banden der 23S rRNA (2,9 kb) und 16S rRNA (1,5 kb). Eine weniger distinkte Bande war unterhalb von 0,5 kb sichtbar, bei der es sich um RNA-Moleküle mit geringem Molekulargewicht handeln könnte. Für das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm ergab sich ein Wert von 2-2,1, was auf einen hohen Reinheitsgrad

der RNA-Proben hindeutet. Bei der PCR mit der Gesamt-RNA als Template und spezifischen Primern für das Gen der 16S rRNA von *E. coli* sowie für das *A. cryptum*-Gencluster waren keine DNA-Produkte im Agarosegel sichtbar (nicht dargestellt). Dies lässt darauf schließen, dass die RNA-Proben weder mit genomischer noch mit Vektor-DNA verunreinigt waren.

Um die Länge der mRNA-Transkripte des *A. cryptum*-Genclusters bestimmen zu können, wurde die Gesamt-RNA mit einer reversen Transkriptase (RT) und *random* Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Bei der anschließenden PCR von *ectA* zeigten, bis auf *E. coli* pASK-IBA3, sowohl die cDNA-Ansätze mit als auch ohne Zugabe der RT das entsprechende 300 bp-Fragment (vgl. Abb. 3.31 A). Auch bei der PCR mit anderen Primern für das Gencluster und nach Wiederholung der cDNA-Synthese ergaben sich mit den Negativkontrollen (cDNA-Ansatz ohne RT) entsprechende PCR-Produkte. Dies deutet auf eine Kontamination der cDNA-Ansätze mit Vektor-DNA hin.

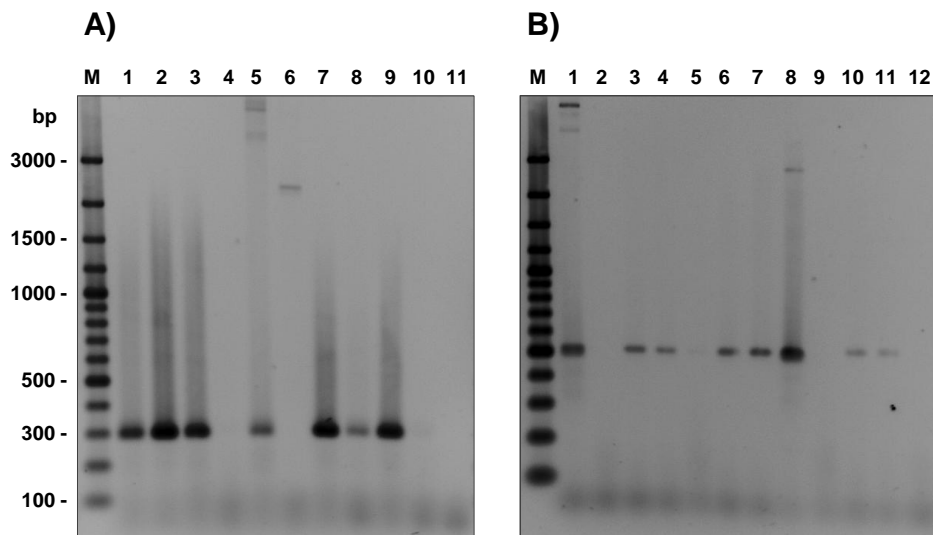


Abb. 3.31: Analyse der cDNA- und RNA-Proben von *E. coli*

A) PCR von *ectA* mit den Primern *f_ectA_R* und *r_ectA_R* (300 bp). Als Template dienten cDNA-Ansätze mit bzw. ohne reverse Transkriptase (+/- RT) von *E. coli* pASK_ectABCD_m (1/7), pASK_ectABCDask (2/8), pASK_ectAB-RectC (3/9) und pASK-IBA3 (4/10), Vektor-DNA pASK_ectABCD_m als Positiv- (5) und pASK-IBA3 als Negativkontrolle (6), sowie ein cDNA-Ansatz ohne RNA (11). **B)** PCR mit den Primern *f_pASK_Ptet* und *r_Ptet_SOE* für ein 517 bp-Fragment des Vektorrückgrats. Als Template dienten von *E. coli* pASK_ectABCD_m, pASK-IBA3 bzw. pASK_ectAB-RectC jeweils RNA (2, 5, 9), cDNA-Ansatz + RT (3, 6, 10) und cDNA-Ansatz - RT (4, 7, 11), Vektor-DNA pASK_ectABCD_m (1) und pASK-IBA3 (8) als Positivkontrolle, sowie ein cDNA-Ansatz ohne RNA (12). 1,5%ige Agarosegele in 1x TAE, M: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

Daraufhin wurde eine PCR mit cDNA bzw. Gesamt-RNA als Template und spezifischen Primern für das Vektorrückgrat von pASK-IBA3 durchgeführt, die nur bei einer Kontamination mit Vektor-DNA ein Produkt ergeben sollte. Die Ergebnisse waren widersprüchlich, da im Fall der cDNA-Ansätze mit bzw. ohne RT das 517 bp lange PCR-Produkt sichtbar war, während bei Einsatz der Gesamt-RNA als Template keine DNA-Bande vorlag (vgl. Abb. 3.31 B). Mit der präparierten RNA von *E. coli* war daher keine weitere Analyse der Transkripte und Transkriptionsraten möglich.

In einem neuen Versuch sollte die RNA aus *A. cryptum*, dem Donorstamm des *ectABCDask*-Genclusters, extrahiert und analysiert werden. Bei *A. cryptum* liegt das Gencluster genomisch vor und nicht wie im Fall von *E. coli* auf einem Expressionsvektor mit hoher Kopienzahl, was die RNA-Extraktion und Entfernung der DNA erleichtern sollte.

3.3.5.2 RNA-Analyse des *ectABCDask*-Genclusters in *A. cryptum*

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurde *A. cryptum* in M269 mit 3% NaCl kultiviert und in der spät exponentiellen Phase geerntet. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine relativ hohe Hydroxyectoin-Produktion (vgl. Abb. 3.1), so dass von einer Expression des *ectABCDask*-Genclusters ausgegangen werden kann und eine ausreichende Menge der entsprechenden mRNA zu erwarten ist. Die Qualität der präparierten RNA wurde mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese überprüft und zeigte das typische Bandenmuster, wie bei *E. coli* (vgl. Abb. 3.30). Für den Reinheitsgrad ergab sich anhand des A_{260}/A_{280} -Verhältnisses ein ähnlich guter Wert von 2,1. Zur Kontrolle auf DNA-Kontamination wurde die Gesamt-RNA als Template in die PCR mit spezifischen Primern für das Gencluster eingesetzt, wobei keine PCR-Produkte detektiert werden konnten (nicht gezeigt).

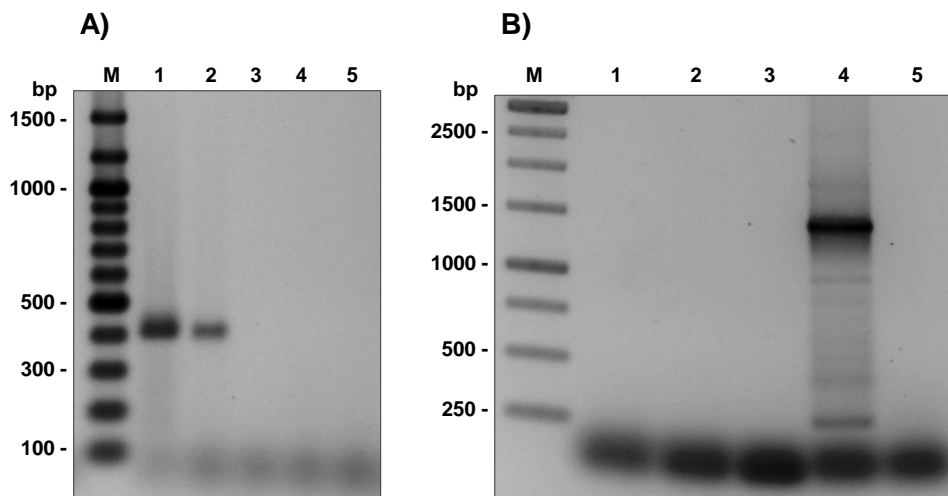


Abb. 3.32: Analyse der cDNA- und RNA-Proben von *A. cryptum*

A) PCR von *ectC* mit den Primern *ectC_Acr_for* und *ectC_Acr_rev* (411 bp). Als Template dienten genomische DNA als Positivkontrolle (1), der cDNA-Ansatz mit bzw. ohne reverse Transkriptase (+/- RT) (2/3), ein cDNA-Ansatz ohne RNA (4) sowie Gesamt-RNA von *A. cryptum* (5). 1,5%iges Agarosegel in 1x TAE, M: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder **B)** PCR von *ectAB* mit den Primern *f_ectA_R* und *r_ectB_R2* (1499 bp). Als Template dienten der cDNA-Ansatz +/- RT (1/2), ein cDNA-Ansatz ohne RNA (3), Vektor-DNA pASK_ectABCD_m als Positivkontrolle (4) sowie Gesamt-RNA von *A. cryptum* (5). 1%iges Agarosegel in 1x TAE, M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Die Synthese der cDNA erfolgte wie im Fall von *E. coli* und auch hier waren in der nachfolgenden PCR bei den Negativkontrollen (cDNA-Ansatz ohne RT) DNA-Produkte im Agarosegel vorhanden. Daher wurde die reverse Transkription mit einem anderen cDNA-Synthese-Kit wiederholt. In der

anschließenden PCR mit spezifischen Primern für *ectC* ergab sich erwartungsgemäß nur beim cDNA-Ansatz mit RT ein 411 bp langes DNA-Fragment (vgl. Abb. 3.32 A). Die gleichen Ergebnisse waren bei der PCR von *ectA* zu beobachten, was für eine erfolgreiche cDNA-Synthese aus der Gesamt-RNA von *A. cryptum* spricht. Demnach könnten die zuvor widersprüchlichen Ergebnisse möglicherweise mit dem verwendeten cDNA-Synthese-Kit zusammenhängen.

Schließlich sollte eine PCR mit spezifischen Primern für *ectAB* bzw. *ectABC* Aufschluss darüber geben, ob die entsprechenden Kotranskripte gebildet wurden. In beiden Fällen zeigte der cDNA-Ansatz mit RT nicht das zu erwartende PCR-Produkt, so dass kein *ectAB*- bzw. *ectABC*-Kotranskript nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 3.32 B für die PCR von *ectAB*). Allerdings kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die möglichen Kotranskripte bei der cDNA-Synthese nicht vollständig umgeschrieben wurden und somit bei der PCR nicht erfasst werden konnten.

3.3.6 Nachweis der Aktivität von EctC in *E. coli*

Ein Aktivitätstest mit Rohextrakten der verschiedenen Produktionsstämme aus der stationären Phase sollte Aufschluss darüber geben, ob zu diesem Zeitpunkt EctC noch aktiv vorliegt. Dieser Aspekt ist vor allem für die Produktionsbedingungen interessant, bei denen eine erhöhte Akkumulation von ADABA aufgetreten war. Mit *E. coli* pASK_ectABCD_m konnte beispielsweise während der Fed-Batch-Fermentation nach ca. 20 Stunden keine signifikante Produktion von Ectoin mehr beobachtet werden, während die Vorstufe ADABA kontinuierlich im Medium angehäuft wurde (vgl. Abb. 3.19). Für *E. coli* pASK_ectAB-C konnte selbst bei Induktion mit der dreifachen AHT-Konzentration noch eine relativ hohe extrazelluläre ADABA-Akkumulation festgestellt werden (vgl. Abb. 3.22). Auch im Fall von *E. coli* pASK_ectAB-RectC ergab sich trotz erhöhter EctC-Produktion ein ADABA-Anteil von etwa 4% (vgl. Abb. 3.28). Für den Aktivitätsnachweis von EctC wurden die Produktionsstämme und *E. coli* pASK-IBA3 als Negativkontrolle in MM63-0,5 mit Glycerin kultiviert und 18 Stunden nach Induktion in der stationären Phase geerntet. Als Positivkontrolle wurde mit *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His EctC aus *A. cryptum* inkl. C-terminalem His-Tag (EctC-His) produziert, das bereits erfolgreich in vorherigen Aktivitätstests eingesetzt worden war (Moritz, 2012).

Bei der Zellernte wurden parallel 3 mL Kultur zur Extraktion der Plasmid-DNA verwendet, um einen Hinweis auf die Plasmidstabilität in den Kulturen aus der stationären Phase zu erhalten. Mittels Agarosegelelektrophorese der DNA-Proben konnte in allen Fällen der entsprechende Expressionsvektor nachgewiesen werden, (vgl. Abb. 3.33 A). Demzufolge waren unter den getesteten Bedingungen noch Plasmid-tragende Zellen in der stationären Phase vorhanden. Aber eine Aussage über deren Anteil an der Gesamtzellzahl konnte nicht getroffen werden.

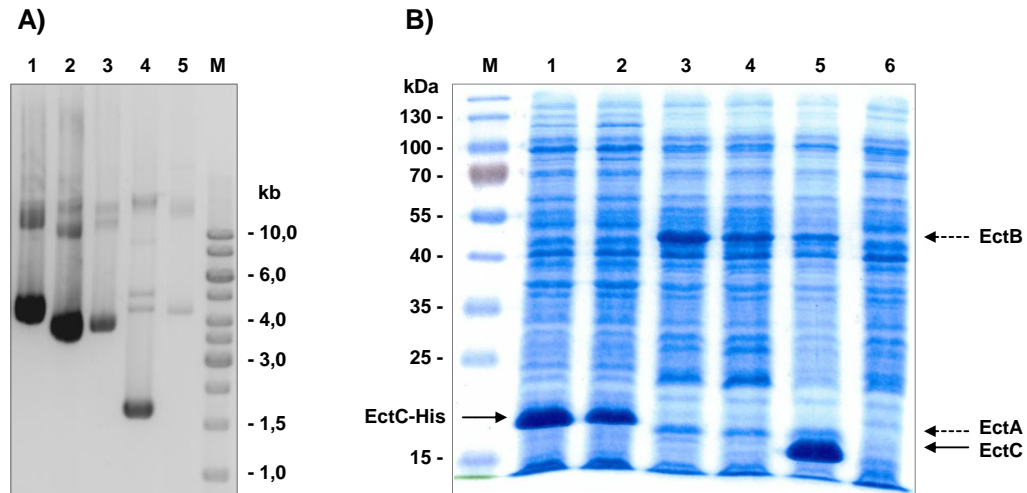


Abb. 3.33: Nachweis der Plasmide und rekombinanten Proteine der Produktionsstämme

Die Anzucht erfolgte in MM63-0,5 mit Glycerin und die Ernte 18 h nach Induktion mit 0,6 µg AHT/mL (pASK-Vektoren) bzw. 0,5 mM IPTG (pET-Vektor). **A)** Agarosegel (1% in 1xTAE) mit der Plasmid-DNA von *E. coli* pASK_ectABCD_m (1), pASK_ectAB-C (2), pASK_ectAB-RectC (3), pASK-IBA3 (4) und *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His (5). M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder **B)** SDS-PAGE der Rohextrakte (20 µg Protein) von *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His 7 h und 18 h nach Induktion (1, 2) sowie von *E. coli* pASK_ectAB-RectC (3), pASK_ectAB-C (4), pASK_ectAB-RectC (5) und pASK-IBA3 (6). Das Fusionsprotein aus EctC und C-terminalem His-Tag (EctC-His, 15,8 kDa), EctC (14,7 kDa) sowie die mutmaßlichen Banden von EctA (18 kDa) und EctB (46,5 kDa) sind mit Pfeilen markiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder

Weiterhin wurden die Rohextrakte der Produktionsstämme mittels SDS-PAGE begutachtet (vgl. Abb 3.33 B). Hierbei war keine Differenzierung zwischen löslichem und unlöslichem Protein möglich, da der Rohextrakt das gesamte Zellprotein enthielt. Sowohl *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His als auch *E. coli* pASK_ectAB-RectC zeigten erwartungsgemäß eine ausgeprägte Bande für EctC-His bzw. EctC. Bei den anderen Produktionsstämmen war EctC nur schwach, wenn überhaupt im Proteingel zu erkennen. Die potenziellen Banden von EctA und EctB konnten wie zu erwarten war weder bei *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His noch bei *E. coli* pASK-IBA3 detektiert werden, aber waren bei den anderen Produktionsstämmen im Proteingel sichtbar.

Der Aktivitätstest erfolgte in Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, 0,5% NaCl, pH 8) bei Raumtemperatur und die Reaktion wurde durch Zugabe des Rohextrakts gestartet. Dabei waren 80 mM ADABA als Substrat für EctC im Reaktionsansatz enthalten. Unter diesen Bedingungen konnte in vorherigen Experimenten mit dem gereinigten Enzym eine Aktivität nachgewiesen werden (Moritz, 2012). In den Reaktionsansätzen mit Rohextrakt der EctC-produzierenden Stämme war eine Abnahme der ADABA- und eine Zunahme der Ectoin-Konzentration im Zeitverlauf zu beobachten (vgl. Abb. 3.34). Im Kontrollansatz ohne Rohextrakt blieb die Substratkonzentration unverändert und mit dem Rohextrakt von *E. coli* pASK-IBA3 war nur eine geringe unspezifische Umsetzung von ADABA zu Ectoin (< 4 mM) erfolgt (nicht gezeigt). Demnach konnte die Aktivität von EctC unter den gegebenen Bedingungen im Rohextrakt nachgewiesen werden.

Die Umsetzung von ADABA zu Ectoin war unterschiedlich schnell. Allerdings enthielten die

Reaktionsansätze etwas variierende Mengen an Gesamtzellprotein und der Proteinanteil von EctC in den Rohextrakten war nicht bekannt. Daher waren weder ein direkter Vergleich der Reaktion noch eine Bestimmung der spezifischen Aktivität möglich. Mit den Rohextrakten der Positivkontrolle und des Produktionsstamms *E. coli* pASK_ectAB-RectC, für die sich eine deutliche EctC-Bande im Proteingel zeigte, waren bereits nach 2,5 Stunden 95 % ADABA zu Ectoin umgesetzt. Trotzdem konnte auch nach einer Reaktionszeit von 30 Stunden keine weitere Umsetzung des restlichen Substrats nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.34 A, B). Im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD_m, bei dem nur eine sehr schwache Bande für EctC zu sehen und weniger Gesamtzellprotein im Ansatz enthalten war, ergab sich nach 2,5 Stunden ein Umsatz von 60 % Substrat. Nach 30 Stunden konnte mit 94 % Ectoin und 6 % ADABA etwa das gleiche Verhältnis festgestellt werden (vgl. Abb. 3.34 C). Bei *E. coli* pASK_ectAB-C, wo sich ebenfalls nur eine schwache EctC-Bande zeigte, aber mehr Gesamtzellprotein eingesetzt worden war, hatte das Enzym nach fünf Stunden etwa 50 % und nach 30 Stunden 90 % des Substrats umgesetzt (vgl. Abb. 3.34 D).

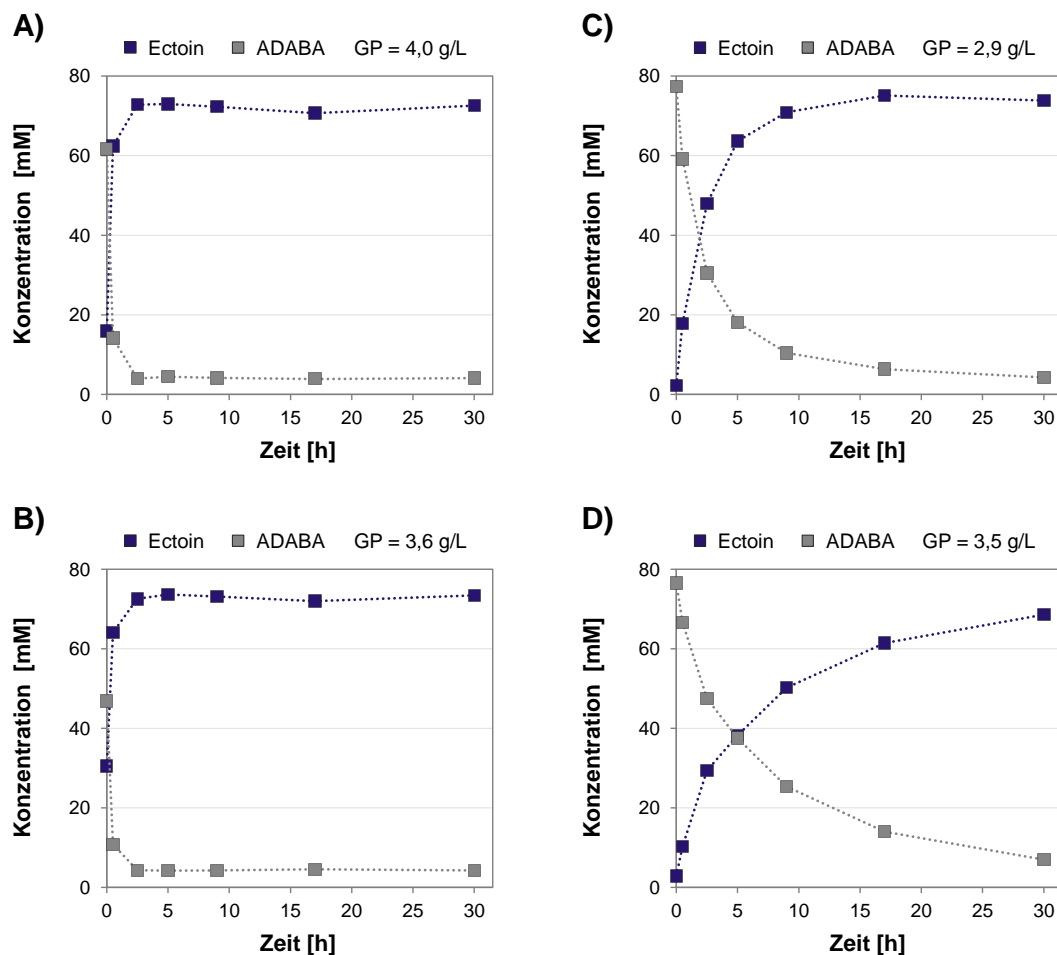


Abb. 3.34: Nachweis der Aktivität von EctC im Rohextrakt der Produktionsstämme
 Dargestellt sind die ADABA- und Ectoin-Konzentration (mM) im Verlauf des Aktivitätstests mit Rohextrakten der Positivkontrolle *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His (A) sowie von *E. coli* pASK_ectAB-RectC (B), pASK_ectABCD_m (C) und pASK_ectAB-C (D). Der Aktivitätstest erfolgte in Puffer (50 mM Tris-HCl, 0,5 % NaCl, pH 8) mit 80 mM ADABA bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Rohextrakt gestartet, wobei die Ansätze etwas variierende Mengen an Gesamtzellprotein (GP) enthielten.

Darüber hinaus wurden Medienüberstände aus vorherigen Experimenten, in denen bis zu 15 mM ADABA enthalten waren, mit den Rohextrakten von *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His und *E. coli* pASK_ectABCD_m auf eine EctC-vermittelte Reaktion getestet. Unter diesen Bedingungen konnte ebenfalls eine Umsetzung von ADABA zu Ectoin beobachtet werden, wobei wie zuvor nach 30 Stunden ein ADABA-Anteil von 5-6 % im Reaktionsansatz vorlag (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass unter den getesteten Bedingungen noch aktive Ectoin-synthese von *E. coli* pASK_ectABCD_m, pASK_ectAB-RectC sowie pASK_ectAB-C im Rohextrakt nachgewiesen werden konnte, der von Kulturen aus der stationären Phase (18 Stunden nach Induktion) stammte. Zu diesem Zeitpunkt wurde bei vorherigen Experimenten die heterologe Produktion in Batch-Kultur beendet und im Fall von *E. coli* pASK_ectAB-C eine erhöhte ADABA-Akkumulation festgestellt. Der Aktivitätstest zeigte, dass das eingesetzte Substrat ADABA, selbst bei einer schnellen Umsetzung und nach 30 Stunden Reaktionszeit, nicht vollständig zu Ectoin umgesetzt wurde, sondern etwa 5-6 % im Reaktionsansatz vorhanden waren. Die Ergebnisse deuten auf ein Reaktionsgleichgewicht zwischen ADABA und Ectoin hin, das mit einem Verhältnis von 1 zu 16-20 deutlich auf Seiten des Ectoins liegt.

3.4 *Synechocystis* als heterologes Produktionssystem für Ectoine

Synechocystis gehört zu den moderat halotoleranten Cyanobakterien und kann durch Synthese und intrazelluläre Akkumulation des kompatiblen Soluts Glucosylglycerin bis zu 7 % NaCl tolerieren (Reed & Stewart, 1985). Daher sind Untersuchungen zur Wirkung von Ectoinen als Anpassung an osmotischen Stress bei *Synechocystis* interessant. Außerdem ist die Vorstellung verlockend *Synechocystis* als heterologes Produktionssystem für die Synthese von biotechnologisch interessanten Produkten, wie den Ectoinen, mit Hilfe von Licht und CO₂ zu nutzen.

Mittels bioinformatischer Datenanalysen wurde zunächst untersucht, ob *Synechocystis* über Transportsysteme für Ectoin und Enzyme zum Abbau des kompatiblen Soluts verfügt. Beide Aspekte könnten vor allem im Hinblick auf eine möglichst hohe Produktion und Sekretion des Produkts ins Medium von Nachteil sein. *E. coli* besitzt Transportsysteme, u.a. ProP und ProU, zur Aufnahme eines breiten Spektrums an kompatiblen Soluten, darunter auch Ectoin (Jebbar *et al.*, 1992). Anhand von Sequenzvergleichen mit *E. coli* K-12 konnte das Gen für das ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters im Genom von *Synechocystis* identifiziert werden, das 40 % Ähnlichkeit zu dem des ABC-Transporters ProU von *E. coli* hat. Bisher sind aber keine Studien zum möglichen Transport von Ectoin in *Synechocystis* bekannt. Mikkat *et al.* konnten einen salzregulierten ABC-Transporter für Glucosylglycerin in *Synechocystis* nachweisen, über den auch Saccharose und Trehalose mit geringer Affinität transportiert werden (Mikkat *et al.*, 1996, 1997).

Weiterhin wurde ein Sequenzvergleich mit *H. elongata* DSM 2581^T durchgeführt, der Ectoin als C- und N-Quelle nutzen kann und bei dem die in den Ectoin-Abbau involvierten Gene identifiziert wurden (Schwibbert *et al.*, 2011). Dabei konnte für eine Threonin-Dehydratase von *Synechocystis* eine 35 %ige Ähnlichkeit zu der Threonin-Dehydratase EutB von *H. elongata* festgestellt werden. Allerdings ist die Funktion von EutB im Abbauweg von Ectoin bisher noch nicht eindeutig geklärt. Für die anderen Abbaugene, *doeABCD* und *eutC*, konnten keine Gene mit entsprechender Funktion im Genom von *Synechocystis* identifiziert werden.

In Wachstumsversuchen mit BG11 ohne Natriumnitrat, aber mit Ectoin als potenzieller N-Quelle, zeigte *Synechocystis* genau wie in BG11-N ohne Zusatz von Ectoin kein Wachstum (vgl. Abb. 3.35). Die Kulturen waren nicht, wie im Fall der Positivkontrolle in BG11 mit Natriumnitrat, dunkelgrün gefärbt, sondern zeigten eine auffällig hellgrüne bis gelbliche Färbung. Diese lässt auf eine einsetzende Chlorose schließen, bei der die photosynthetischen Pigmente abgebaut werden und die u.a. durch Stickstoffmangel eingeleitet wird (Schwarz & Forchhammer, 2005). Das Wachstum wurde sowohl ohne als auch mit NaCl im Medium untersucht, um eine mögliche Salzabhängigkeit des potenziellen Aufnahmesystems für Ectoin zu berücksichtigen. Aber unter allen getesteten Bedingungen ist *Synechocystis* in BG11-N mit Zusatz von Ectoin nicht gewachsen (vgl. Abb. 3.35). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ectoin nicht aufgenommen und/oder als N-Quelle genutzt werden kann.

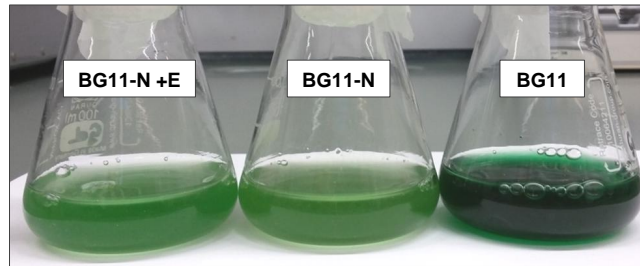


Abb. 3.35: Wachstum von *Synechocystis* mit Ectoin als potenzieller N-Quelle

Gezeigt sind Kulturen in BG11-N mit 9 mM Ectoin als potenzieller N-Quelle (BG11-N +E), BG11-N (Negativkontrolle) und BG11 (Positivkontrolle) nach 8 Tagen Inkubation bei 30 °C und ca. 30 $\mu\text{mol Photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Das Medium enthielt 20 mM NaCl und wurde auf eine Start-OD₇₅₀ von ca. 0,4 eingestellt.

Für die heterologe Produktion von Ectoinen in *Synechocystis* wurde neben dem *ectABCD*-Gencluster von *A. cryptum*, das bereits näher untersucht wurde, alternativ das halotolerante γ -Proteobakterium *P. stutzeri* als Donorstamm verwendet. *P. stutzeri* ist im Hinblick auf seine Salztoleranz physiologisch vergleichbar zu *Synechocystis*, was aufgrund möglicher halophiler Eigenschaften der Proteine, z.B. dem sauren Charakter, bei der heterologen Produktion von Vorteil sein könnte. Außerdem wurde das *P. stutzeri*-Gencluster bereits erfolgreich zur heterologen Produktion von Ectoinen verwendet (Seip *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2013; Czech *et al.*, 2018).

3.4.1 Heterologe Expression von *ectC* in *Synechocystis*

Zunächst sollte ein Gen aus dem Hydroxyectoin-Gencluster in *Synechocystis* eingebracht und dessen heterologe Expression untersucht werden. Dazu wurde *ectC* von *A. cryptum* ausgewählt, das bereits erfolgreich in *E. coli* exprimiert wurde. Als Ausgangsvektor diente pRL59EH (Black & Wolk, 1994), der zusätzlich eine Ω -Kassette mit einem Resistenzgen für Streptomycin und Spectinomycin aus dem Vektor pHP45 Ω (Prentki & Krisch, 1984) enthielt. Bei pRL59EH- Ω handelt es sich um einen Shuttle-Vektor mit einem *tac*-Promotor, der sowohl eine Replikation und Expression in *E. coli* als auch in *Synechocystis* erlaubt. Dadurch war es möglich, die Funktionalität der konstruierten Expressionsvektoren zunächst in *E. coli* zu prüfen. Das Gen *ectC* wurde inkl. der Sequenz des C-terminalen His-Tags mittels PCR aus dem Vektor pET-22b_ectC_Acr_His amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* sowie *KpnI* in pRL59EH- Ω stromabwärts des *tac*-Promotors integriert (vgl. Abb. 3.36). Die erfolgreiche Klonierung des Expressionsvektors pRL59EH_ectC_Acry_His konnte durch Restriktionsanalysen sowie Sequenzierung bestätigt werden und ein Sequenzausschnitt ist in Abb. 7.7 im Anhang dargestellt.

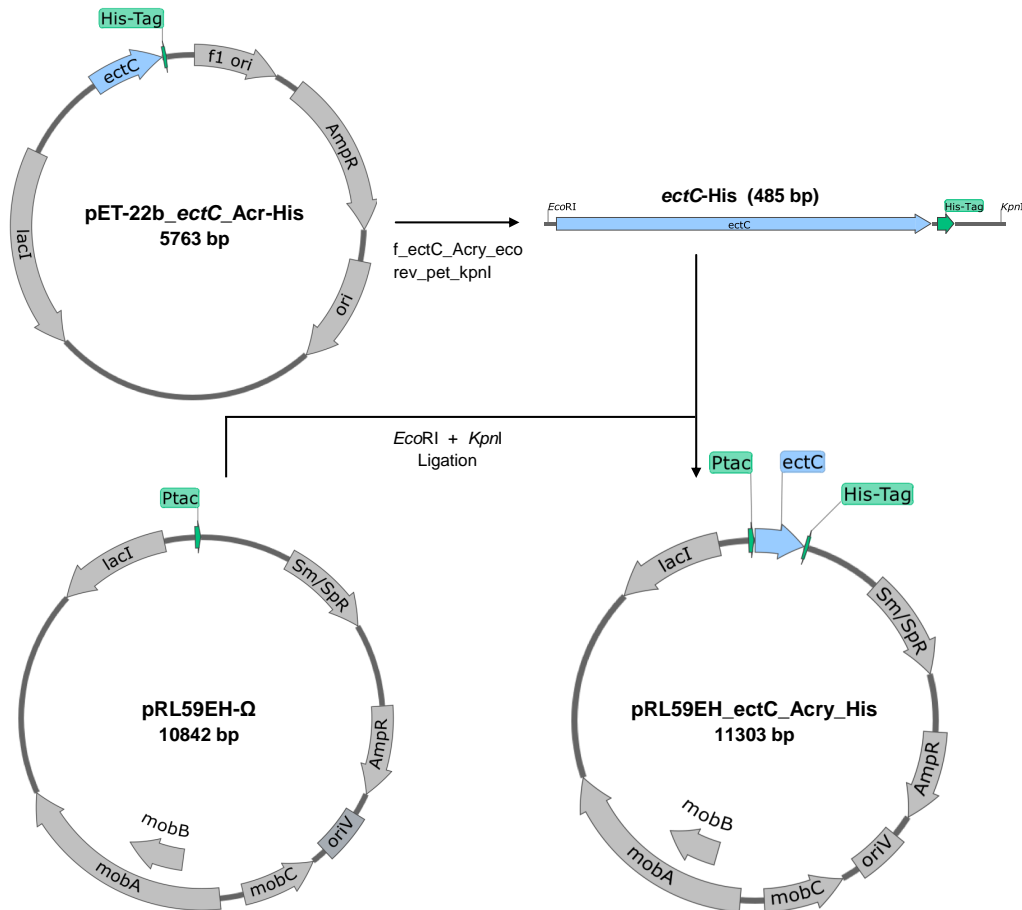


Abb. 3.36: Konstruktion des Expressionsvektors pRL59EH_ectC_Acry_His

Das Gen *ectC* von *A. cryptum* wurde inkl. der Sequenz für einen C-terminalen His-Tag mit den Primern *f_ectC_acry_eco* und *rev_pet_kpnI* aus dem Vektor pET-22b_ectC_Acr_His amplifiziert und über die Schnittstellen *EcoRI* sowie *KpnI* in den Shuttle-Vektor pRL59EH-Ω stromabwärts des *tac*-Promotors (Ptac) integriert. AmpR: Ampicillinresistenz, lacI: Lac-Repressor, mobABC: Mobilisierungsproteine, ori: Replikationsursprung, Sm/SpR: Streptomycin/Spectinomycinresistenz

Die Funktionalität des Expressionsvektors pRL59EH_ectC_Acry_His wurde zunächst in *E. coli* XL1-Blue überprüft. Dazu wurde der Produktionsstamm in LB-Medium kultiviert und das lösliche Zellprotein aus Proben vor und nach Induktion mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abb. 3.37). *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His und *E. coli* XL1-Blue pRL59EH-Ω dienten dabei als Positiv- bzw. Negativkontrolle. In den Proben von *E. coli* XL1-Blue pRL59EH_ectC_Acry_His war die Bande des Fusionsproteins EctC-His im Proteingel zu erkennen, wobei die Intensität der Proteinbande vor Induktion sehr schwach war (vgl. Abb. 3.37 A). Im Fall der Positivkontrolle ergab sich erwartungsgemäß eine deutlich ausgeprägte Bande für EctC-His und bei der Negativkontrolle war auf der gleichen Höhe keine Proteinbande vorhanden. Durch den Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen den His-Tag wurden die Ergebnisse der SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung bestätigt (vgl. Abb. 3.37 B). Demzufolge konnte gezeigt werden, dass der Expressionsvektor pRL59EH_ectC_Acry_His funktionell ist und für die folgenden Experimente mit *Synechocystis* verwendet werden kann.

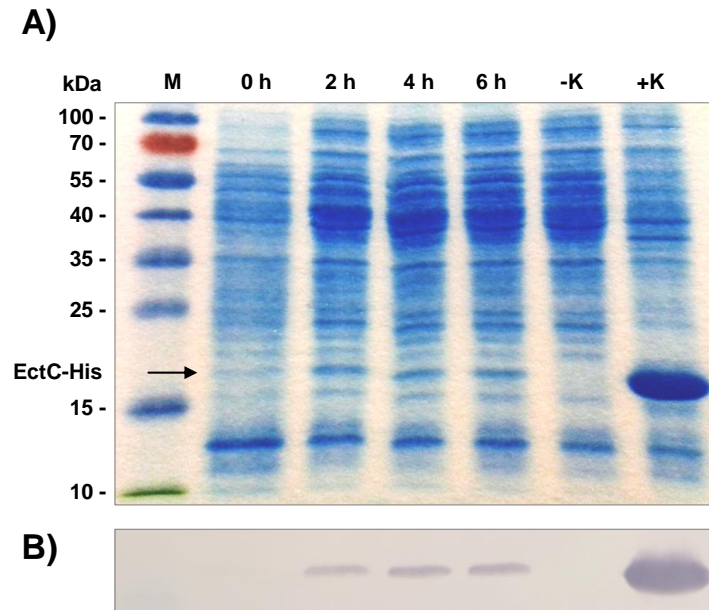


Abb. 3.37: Nachweis von EctC-His in *E. coli* XL1-Blue pRL59EH_ectC_Acry_His

Dargestellt ist die SDS-PAGE (A) und der Western Blot (B) des löslichen Zellproteins (20 µg) von *E. coli* XL1-Blue pRL59EH_ectC_Acry_His vor Induktion mit 0,5 mM IPTG (0 h) sowie 2, 4 und 6 h nach Induktion. *E. coli* XL1-Blue pRL59EH-Ω diente als Negativ- (-K) und *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acr_His als Positivkontrolle (+K), wobei jeweils 20 µg lösliches Zellprotein aus einer Probe 4 h nach Induktion aufgetragen wurden. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium. Die Bande des Fusionsproteins aus EctC und C-terminalem His-Tag (EctC-His, 15,8 kDa) ist mit einem Pfeil markiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder

Im Anschluss an die Konjugation von *Synechocystis* mit dem Expressionsvektor wurde zunächst die Gesamt-DNA des konjugierten Stamms extrahiert und das Gen *ectC* mittels PCR nachgewiesen (vgl. Abb. 3.38 A). Das zu erwartende 411 bp lange PCR-Produkt war im Ansatz von *Synechocystis* pRL59EH_ectC_Acry_His vorhanden, während bei *Synechocystis* Wildtyp keine DNA-Bande detektiert werden konnte.

Anschließend wurde *Synechocystis* pRL59EH_ectC_Acry_His in BG11 mit bzw. ohne IPTG kultiviert und das Zellprotein mittels SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert. Anhand des Proteingels nach Coomassie-Färbung war keine Aussage über die heterologe Produktion von EctC-His möglich. Denn auf der Höhe der zu erwartenden Bande von EctC-His war in allen Ansätzen von *Synechocystis*, auch im Ansatz des Wildtyps (Negativkontrolle), eine ausgeprägte Proteinbande zu sehen (vgl. Abb. 3.38 B).

Mittels Western Blot sollte überprüft werden, ob EctC-His in den Proben von *Synechocystis* pRL59EH_ectC_Acry_His vorhanden ist und von der starken Proteinbande des Wildtyps überlagert wird. Tatsächlich konnte eine schwache Bande detektiert werden, die auf der gleichen Höhe wie EctC-His in der Positivkontrolle vorhanden war und im Ansatz von *Synechocystis* Wildtyp fehlte (vgl. Abb. 3.38 C). EctC-His konnte sowohl im löslichen Zellprotein als auch in der unlöslichen Proteinfraction, unabhängig von der Induktion mit IPTG, nachgewiesen werden. Die schwache Bande deutet auf eine geringe Expression von *ectC* hin.

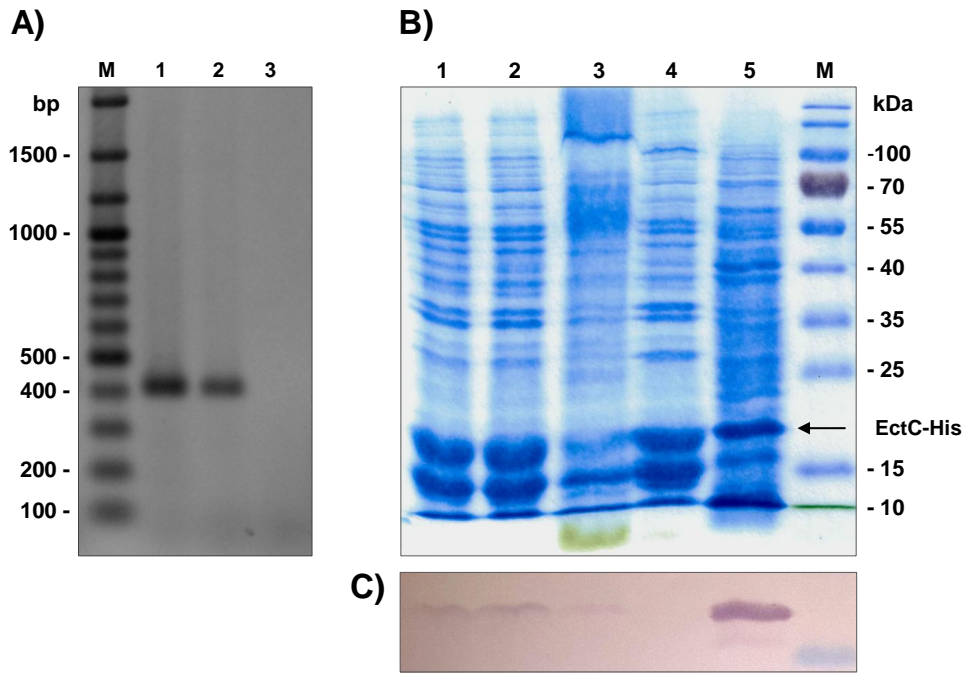


Abb. 3.38: Nachweis der Expression von *ectC* in *Synechocystis* pRL59EH_ectC_Acry_His
A) PCR von *ectC* mit den Primern *ectC_Acr_for* und *ectC_Acr_rev* (411 bp). Als Template dienen Vektor-DNA pRL59EH_ectC_Acry_His als Positivkontrolle (1), Gesamt-DNA von *Synechocystis* pRL59EH_ectC_Acry_His (2) und DNA des Wildtyps als Negativkontrolle (3). 1,5%iges Agarosegel in 1xTAE, M: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder **B)** SDS-PAGE und **C)** Western Blot des löslichen Zellproteins von *Synechocystis* pRL59EH_ectC_Acry_His in BG11 ohne bzw. mit IPTG (1, 2) und der unlöslichen Proteinfraction mit IPTG (3). Das lösliche Zellprotein des Wildtyps mit IPTG diente als Negativ- (4) und das von *E. coli* BL21 (DE3) pET-22b_ectC_Acry_His (2 h nach Induktion) als Positivkontrolle (5). Die Bande des Fusionsproteins aus EctC und C-terminalem His-Tag (EctC-His, 15,8 kDa) ist mit einem Pfeil markiert. 20 µg Protein wurden geladen. M: PageRuler Prestained Protein Ladder

Dennoch konnte mit den Ergebnissen gezeigt werden, dass der Expressionsvektor pRL59EH_ectC_Acry_His in *Synechocystis* funktionell ist und EctC aus *A. cryptum* produziert wird. Im nächsten Schritt sollte das gesamte Gencluster zur Synthese von Ectoinen in *Synechocystis* eingebracht werden.

3.4.2 Heterologe Expression des *ectABCD*-Genclusters in *Synechocystis*

Für die heterologe Produktion von Ectoinen in *Synechocystis* wurden zwei Expressionsvektoren auf Basis von pRL59EH-Ω konstruiert, pSynect1 mit dem *ectABCD*-Gencluster von *A. cryptum* und pSynect2 mit dem von *P. stutzeri*. Im Fall von pSynect1 wurde das Gencluster mit den Primern *f_acry_kpn* und *rev_acry_bam* aus genomischer DNA von *A. cryptum* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* sowie *BamHI* in pRL59EH-Ω stromabwärts des *tac*-Promotors integriert (nicht dargestellt). Für die Konstruktion von pSynect2 war eine zweistufige Klonierung erforderlich, weil bis auf *KpnI* alle weiteren Restriktionsschnittstellen stromabwärts des *tac*-Promotors von pRL59EH-Ω auch in *ectA* von *P. stutzeri* vorhanden sind. Zuerst wurde

der terminale Bereich von *ectD* mittels PCR amplifiziert, wobei der Vektor pSB01 mit dem *ectABCDask*-Gencluster von *P. stutzeri* (Seip *et al.*, 2011) als Template diente. Das PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen *Bam*HI sowie *Sal*I in pRL59EH-Ω eingebracht. Dabei wurde die in *ectD* vorliegende *Bam*HI-Schnittstelle genutzt und die *Sal*I-Schnittstelle über den 3'-Primer eingefügt. Im zweiten Klonierungsschritt wurde die verbleibende Sequenz des Genclusters mittels PCR aus pSB01 amplifiziert und über die Schnittstellen *Kpn*I sowie *Bam*HI stromabwärts des *tac*-Promotors in den zuvor konstruierten Vektor pRL59EH_ectD'_pstu integriert (vgl. Abb. 3.39).

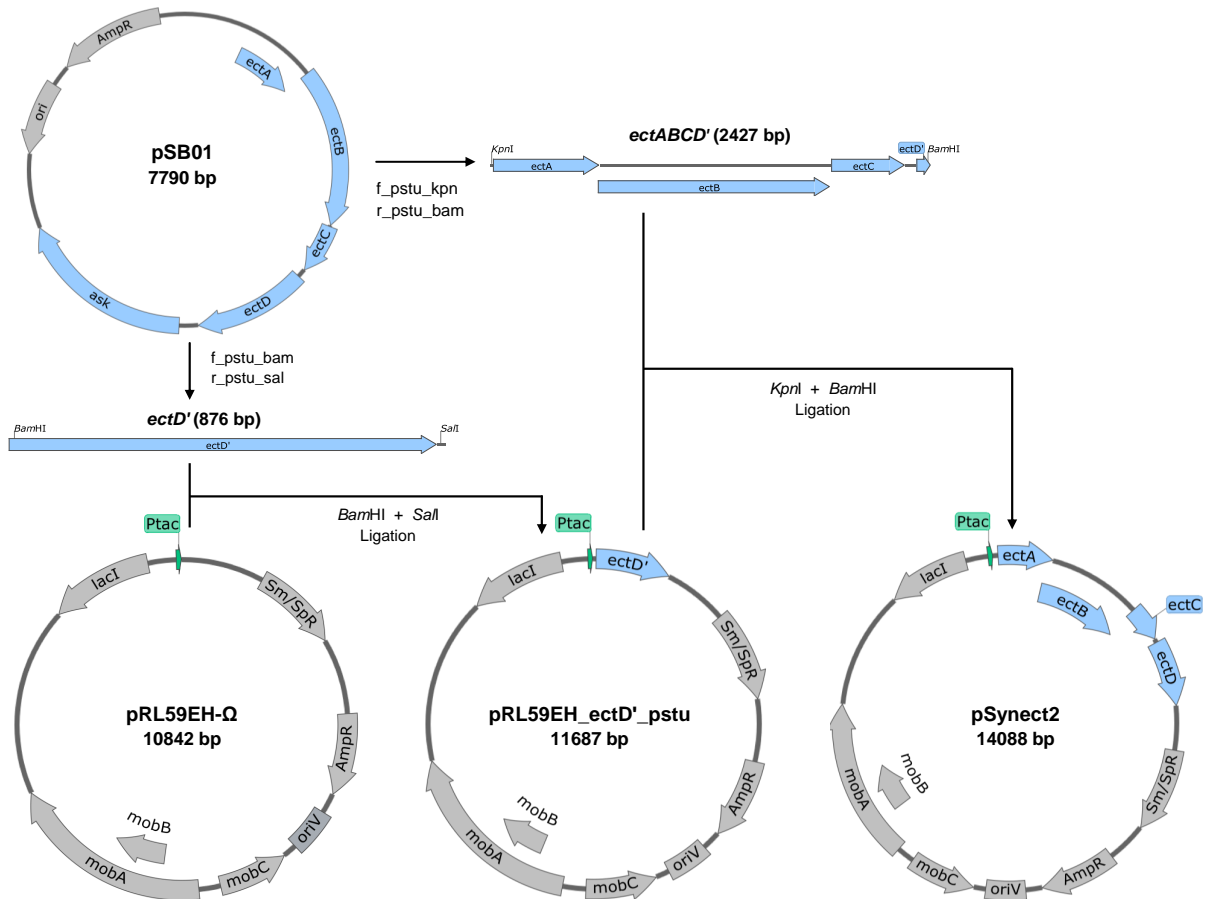


Abb. 3.39: Konstruktion des Expressionsvektors pSynect2

Der terminale Bereich von *ectD* wurde mittels PCR aus dem Vektor pSB01 mit dem *ectABCDask*-Gencluster von *P. stutzeri* amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI sowie *Sal*I in pRL59EH-Ω eingebracht. In den entstandenen Vektor pRL59EH_ectD'_pstu wurde die verbleibende Sequenz des *ectABCD*-Genclusters nach Amplifikation aus pSB01 über die Schnittstellen *Kpn*I sowie *Bam*HI stromabwärts des *tac*-Promotors (Ptac) integriert. *Bam*HI ist in *ectD* vorhanden, während die anderen Schnittstellen über die Primer eingefügt wurden. AmpR: Ampicillinresistenz, lacI: Lac-Repressor, mobABC: Mobilisierungsproteine, ori: Replikationsursprung, Sm/SpR: Streptomycin/Spectinomycinresistenz

Zunächst wurde in *E. coli* überprüft, ob die Expressionsvektoren funktionell sind und Ectoin bzw. Hydroxyectoin synthetisiert wird. Dazu wurden *E. coli* XL1-Blue pSynect1 und pSynect2 in MM63-1 kultiviert und die heterologe Expression bei einer OD₆₀₀ von 0,4 mit 0,5 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellextrakte und Medienüberstände aus der stationären Phase mittels HPLC analysiert (vgl. Abb. 3.40). In den Medienüberständen waren keine Solute nachweisbar und *E. coli* XL1-Blue pRL59EH-Ω, der als Negativkontrolle diente, produzierte erwartungsgemäß nur

Trehalose. Im Fall von *E. coli* XL1-Blue pSynect1 konnten nur minimale Mengen an Hydroxyectoin im Zellextrakt detektiert werden. Stattdessen wurde hauptsächlich Trehalose in vergleichbaren Mengen zur Negativkontrolle intrazellulär akkumuliert.

Bei *E. coli* XL1-Blue pSynect2 konnte die heterologe Produktion von Ectoin bzw. Hydroxyectoin und somit die Funktionalität des Expressionsvektors bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass bei 1 % NaCl der intrazelluläre Solutgehalt an Ectoinen viermal höher war als der Trehalose-Gehalt im Fall der beiden anderen Stämme unter den gleichen Wachstumsbedingungen. Außerdem konnte durch Verringerung der Wachstumstemperatur von 37 auf 32 °C das Verhältnis von Hydroxyectoin und Ectoin zu Gunsten der hydroxylierten Form verändert werden. Schlussendlich ergab sich ein Solutgehalt von ca. 200 µmol/g TBM mit einem Hydroxyectoin-Anteil von 98 %. In MM63 ohne NaCl konnte mit dem Expressionsvektor pSynect2 ebenfalls eine heterologe Produktion festgestellt werden, wobei der intrazelluläre Solutgehalt deutlich geringer ausfiel.

Für die folgenden Experimente mit *Synechocystis* wurde nur pSynect2 verwendet, dessen richtige Sequenz zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt wurde. Ein Sequenzausschnitt von pSynect2 ist in Abb. 7.8 im Anhang gezeigt.

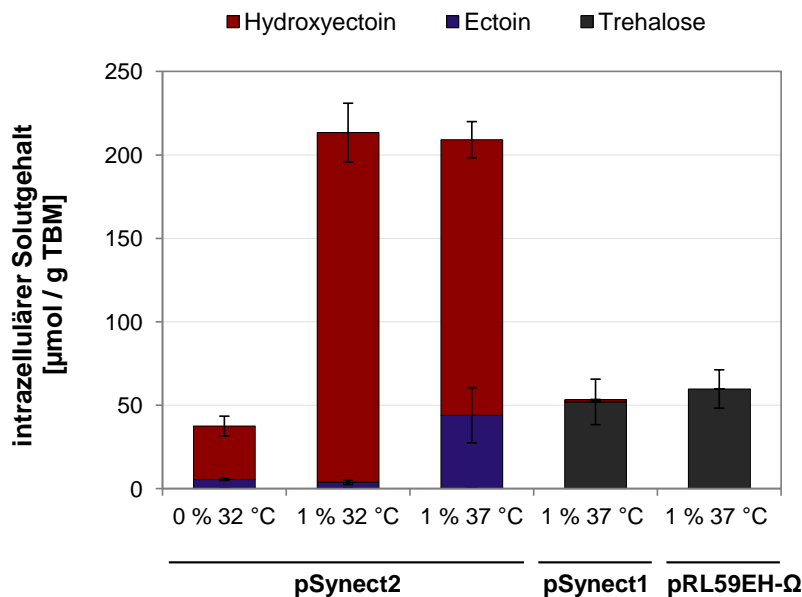


Abb. 3.40: Nachweis der Produktion von Ectoinen in *E. coli* XL1-Blue pSynect2

E. coli XL1-Blue pSynect1 (*ectABCD* aus *A. cryptum*), pSynect2 (*ectABCD* aus *P. stutzeri*) und pRL59EH-Ω (Negativkontrolle) wurden in MM63 mit 1 % oder 0 % NaCl bei 37 °C bzw. 32 °C kultiviert. Nach Induktion mit 0,5 mM IPTG (OD_{600} 0,4) und Ernte in der stationären Phase wurden die Zellextrakte mittels HPLC analysiert und der intrazelluläre Solutgehalt (µmol/g Trockenbiomasse (TBM)) bestimmt. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist gezeigt.

Der Expressionsvektor pSynect2 wurde mittels Konjugation in *Synechocystis* eingebracht. Anschließend sollte durch PCR bestätigt werden, dass das *ectABCD*-Gencluster im konjugierten Stamm vorhanden ist. In den PCR-Ansätzen mit der Gesamt-DNA von *Synechocystis* pSynect2 konnten bei der Agarosegelelektrophorese die zu erwartenden DNA-Fragmente für das Gencluster aus *P. stutzeri* detektiert und somit der Expressionsvektor nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.41).

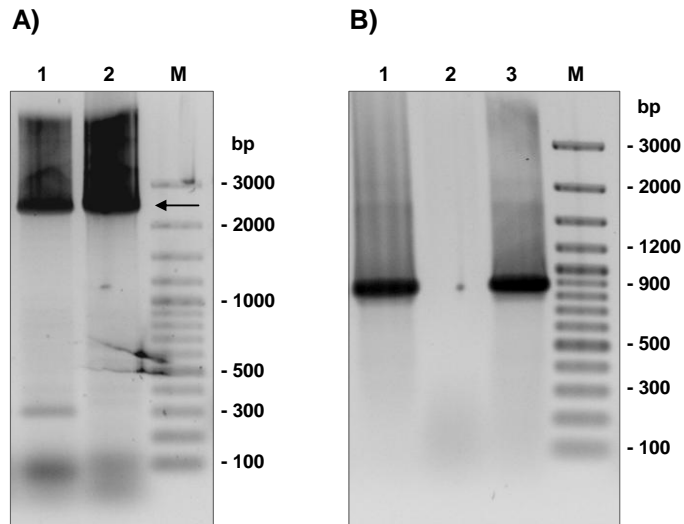


Abb. 3.41: Nachweis des *ectABCD*-Genclusters in *Synechocystis* pSynect2

A) PCR von *ectABCD* mit den Primern f_pstu_kpn und r_pstu_bam (2,4 kb). Als Template dienten Gesamt-DNA von *Synechocystis* pSynect2 (1) und Vektor-DNA pSynect2 als Positivkontrolle (2). Ansatz 1 zeigt neben dem gewünschten Produkt (Pfeil) ein unspezifisches Produkt (300 bp). **B)** PCR von *ectD* mit den Primern f_pstu_bam und r_pstu_sal (876 bp). Als Template dienten Gesamt-DNA von *Synechocystis* pSynect2 (1), DNA des Wildtyps als Negativkontrolle (2) und Vektor-DNA pSynect2 als Positivkontrolle (3). 1%ige Agarosegele in 1x TAE, M: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

Wachstumsversuche in BG11-Medium und die anschließende Analyse der Zellextrakte sowie Medienüberstände mittels HPLC zeigten, dass *Synechocystis* pSynect2 in der Lage ist Hydroxyectoin zu produzieren. Bei Wachstum in BG11 ohne NaCl wurde Hydroxyectoin sowohl intrazellulär als auch extrazellulär akkumuliert, während bei 0,5% NaCl keine Akkumulation im Medium nachgewiesen werden konnte (vgl. Tab. 3.3). Außerdem zeigte sich, wie im Fall der heterologen Expression von *ectC* (vgl. Abb 3.38), kein signifikanter Unterschied in der Hydroxyectoin-Produktion bei Anzucht mit 0,5 mM bzw. ohne IPTG (nicht dargestellt). Weiterhin konnten weder Ectoin noch andere Vorstufen mittels HPLC detektiert werden.

Bei den experimentellen Wiederholungen ergaben sich starke Schwankungen für die Hydroxyectoin-Produktion. Bei manchen Wachstumsversuchen konnten keine bzw. vernachlässigbare Produktmengen detektiert werden, vor allem dann, wenn der konjugierte Stamm schon mehrmals überimpft worden war. In diesen Fällen war, trotz Selektion mit Antibiotika, das *ectABCD*-Gencluster bei erneuter Kontrolle mittels PCR nicht mehr in der Gesamt-DNA von *Synechocystis* pSynect2 nachweisbar.

In den Zellextrakten schwankte der Hydroxyectoin-Gehalt zwischen 0,1 und 9,1 mg/g TBM und in den Medienüberständen lag die Hydroxyectoin-Konzentration bei 0 bis 21,4 mg/L, was einem Solutgehalt von bis zu 59,8 mg/g TBM entspricht. Für den extrazellulären Solutgehalt ergaben sich aufgrund der geringen TBM (0,25 - 0,45 g/L) verhältnismäßig hohe Werte.

Die höchste Hydroxyectoin-Produktion konnte nach erneuter Konjugation von *Synechocystis* mit pSynect2 erreicht werden. Dabei wurde der Solutgehalt bezogen auf TBM anhand des Gesamtproteins bestimmt und ein Proteinanteil von etwa 50 % in der TBM von *Synechocystis* angenommen (Shastri & Morgan, 2005). Demnach ergab sich intrazellulär ein Solutgehalt von 25,2 mg/g TBM und extrazellulär ein Wert von 112,5 mg/g TBM (vgl. Tab. 3.3). Eine $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zur Bestätigung dieser Ergebnisse war wegen der geringen TBM nicht möglich. Auffällig bei diesem Wachstumsversuch war, dass die Kulturen eine hellgrüne bis gelbliche Färbung statt der üblichen dunkelgrünen Farbe aufwiesen.

Tab. 3.3: Heterologe Produktion von Hydroxyectoin mit *Synechocystis* pSynect2

Zellextrakte und Medienüberstände wurden mittels HPLC analysiert und der Hydroxyectoin-Gehalt bezogen auf Trockenbiomasse (mg/g TBM) bestimmt. Bei der maximal erreichten Produktion mit einem frisch konjugierten Stamm wurde der Solutgehalt anhand des Gesamtproteins ermittelt (mg/g Protein) und in mg/g TBM unter der Annahme umgerechnet, dass 50 % Protein in der TBM von *Synechocystis* vorliegen. n: Anzahl der experimentellen Wiederholungen

intrazellulär	mg/g Protein	mg/g TBM	n
BG11 ohne NaCl		0,2 - 9,1	8
Maximum	50,4 ± 1,4	25,2 ± 0,7	2
BG11 0,5 % NaCl		0,1 - 6,2	4
extrazellulär	mg/L	mg/g TBM	n
BG11 ohne NaCl	0 - 21,4	0 - 59,8	8
Maximum	27,3 ± 1,7	112,5 ± 6,7	2
BG11 0,5 % NaCl	0	0	4

In einem weiteren Versuch sollte die heterologe Expression unter Kontrolle eines *Synechocystis*-eigenen Promotors anstatt des synthetischen *tac*-Promotors untersucht werden. Dazu wurde der Promotor des Gens *psbA1* verwendet, das für das D1 Protein im Photosystem II codiert. Als Ausgangsvektor diente der Shuttle-Vektor pVZ322 (Zinchenko *et al.*, 1999), der anders als pRL59EH- Ω keinen Promotor enthält. Weiterhin wurden nur die Gene *ectABC* von *A. cryptum* in den Vektor eingebracht, um eine Produktion von Ectoin zu erreichen.

Die Promotorregion stromaufwärts von *psbA1* wurde aus genomischer DNA von *Synechocystis* und die Gene *ectABC* aus genomischer DNA von *A. cryptum* mittels PCR amplifiziert. In der anschließenden SOE-PCR wurden beide DNA-Fragmente fusioniert und über die mit den Primern eingefügten Restriktionsschnittstellen *PstI* sowie *XbaI* in pVZ322 integriert (vgl. Abb. 3.42 A).

Die erfolgreiche Klonierung des Expressionsvektors pSynect3 wurde mittels Restriktionsanalysen überprüft und die korrekte Sequenz zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt.

Im Anschluss an die Konjugation von *Synechocystis* mit pSynect3 wurde das Gen *ectC* von *A. cryptum* mittels PCR in der Gesamt-DNA des konjugierten Stamms nachgewiesen (vgl. Abb. 3.42 B). Allerdings konnten weder in den Zellextrakten noch in den Medienüberständen von *Synechocystis* pSynect3 Ectoïn oder dessen Vorstufen mittels HPLC detektiert werden.

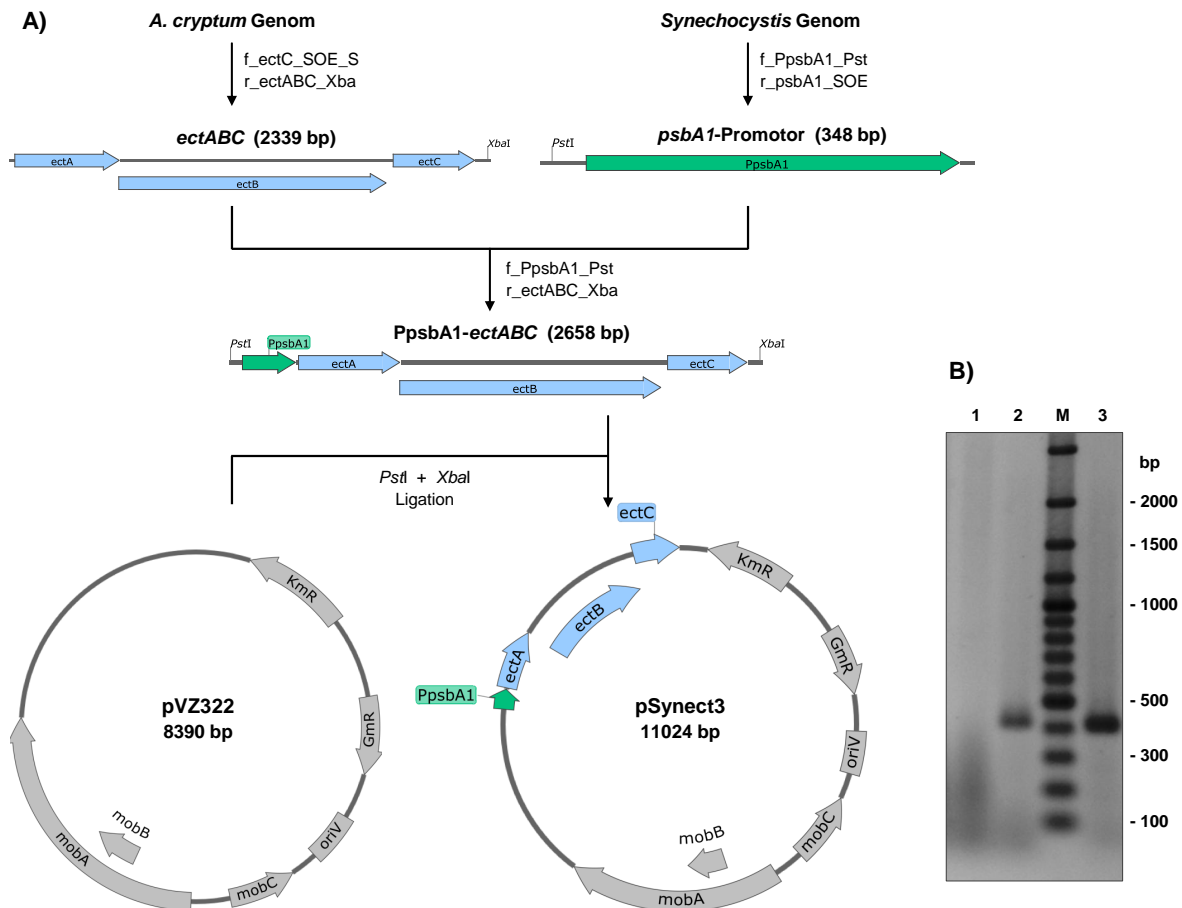


Abb. 3.42: Konstruktion von pSynect3 und Nachweis von *ectC* in *Synechocystis*

A) Für die Konstruktion von pSynect3 wurden die Gene *ectABC* von *A. cryptum* in einer SOE-PCR mit der Promotorregion des *psbA1*-Gens von *Synechocystis* (*PpsbA1*) fusioniert. Das SOE-Produkt wurde über die Schnittstellen *PstI* und *XbaI* in den Vektor pVZ322 integriert. *GmR*: Gentamicinresistenz, *KmR*: Kanamycinresistenz, *mobABC*: Mobilisierungsproteine, *ori*: Replikationsursprung. **B)** PCR von *ectC* mit den Primern *ectC_Acr_for* und *ectC_Acr_rev* (411 bp). Als Template dienten Gesamt-DNA von *Synechocystis* pSynect3 (2), DNA des Wildtyps als Negativkontrolle (1) und Vektor-DNA pSynect3 als Positivkontrolle (3). 1,5 %iges Agarosegel in 1x TAE, M: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

Schließlich wurden für die Untersuchung der heterologen Produktion von Ectoinen noch zwei Mutanten von *Synechocystis* herangezogen (Δ GK2, Δ GS2), denen das Gen *gppS* und somit die Fähigkeit zur Synthese des kompatiblen Soluts Glucosylglycerin fehlt (Marin *et al.*, 1998). Die Δ *gppS*-Mutanten können daher, anders als der Wildtyp, bei einer NaCl-Konzentration von 2 bis 3 % nicht mehr wachsen.

Mittels Konjugation wurden der Vektor pSynect2 in *Synechocystis* Δ GK2 (Kanamycinresistenz) und pSynect3 in die Mutante Δ GS2 (Spectinomycinresistenz) eingebracht und beide Mutanten auf BG11-Agarplatten mit 2 % NaCl kultiviert. *Synechocystis* Wildtyp und die Δ *gppS*-Mutanten ohne Expressionsvektor wurden unter den gleichen Bedingungen als positive bzw. negative Wachstumskontrolle angezogen. Im Fall einer ausreichenden Produktion und Wirkung der Ectoine sollten die konjugierten Δ *gppS*-Mutanten trotz 2 % NaCl wachsen können, genau wie der Wildtyp, der unter diesen Bedingungen Glucosylglycerin zur Anpassung an den osmotischen Stress synthetisiert. Der Wildtyp war erwartungsgemäß auf den Agarplatten gewachsen. Für die Δ *gppS*-Mutanten mit den Expressionsvektoren war genau wie im Fall ohne Vektor kein Wachstum zu beobachten, was auf einen unzureichenden Schutz gegenüber dem osmotischen Stress unter den getesteten Bedingungen hindeutet.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression von *ectC* aus *A. cryptum* als auch des *ectABCD*-Genclusters aus *P. stutzeri* unter Verwendung des pRL59EH- Ω -Vektors mit *tac*-Promotor in *Synechocystis* möglich ist. Mit den entwickelten Produktionsstämmen konnten zumindest geringe Mengen von EctC bzw. Hydroxyectoin nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Produktion und starken Schwankungen konnten jedoch bisher keine weiteren physiologischen Untersuchungen zur Wirkung der Ectoine in *Synechocystis* verfolgt werden.

4 Diskussion

4.1 Das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum*

In dieser Arbeit wurde das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* in Bezug auf die Anpassung an osmotischen Stress durch NaCl bzw. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ und dessen Potenzial für die Produktion von Ectoinen in *E. coli* näher charakterisiert. Die Organisation des Genclusters, wie im Fall von *A. cryptum*, ist bislang nur bei einigen anderen α -Proteobakterien und wenigen γ -Proteobakterien zu finden (vgl. 1.2.3). Eine Besonderheit ist das Gen *ask* für eine putative Aspartokinase, auf die zunächst näher eingegangen wird.

4.1.1 Die Aspartokinase von *A. cryptum*

Die Aspartokinase übernimmt eine wichtige Funktion bei der Bereitstellung von Aspartat- β -semialdehyd, das u.a. als Vorstufe für die Ectoine und die Aminosäuren der Aspartat-Familie dient (vgl. Abb. 1.1). Viele Mikroorganismen haben mehrere Aspartokinasen, die abhängig vom Bedarf der Vorstufe Aspartat- β -semialdehyd für die verschiedenen Biosynthesewege einer unterschiedlichen allosterischen Regulation unterliegen (Lo *et al.*, 2009). Bei *A. cryptum* befindet sich das Gen *ask* unmittelbar stromabwärts von *ectD* und das Stop- und Startcodon überlappen, was eine spezifische Funktion der putativen Aspartokinase für die Hydroxyectoin-Synthese impliziert. Im Genom von *A. cryptum* JF-5 (GenBank CP000697) ist neben der im *ectABCDask*-Gencluster annotierten Aspartokinase Ask (Acry_3012), die sich nur in zwei Aminosäuren von Ask des Typstamms DSM 2389^T unterscheidet, ein weiteres Gen für eine putative Aspartokinase (Acry_1008), im Folgenden LysC genannt, vorhanden. Daher ist anzunehmen, dass *A. cryptum* DSM 2389^T ebenfalls eine zweite Aspartokinase besitzt.

Ask von *A. cryptum* DSM 2389^T und LysC des Stamms JF-5 bestehen aus 488 bzw. 405 Aminosäuren und haben nur eine Übereinstimmung von ca. 20 %. Demgegenüber konnten hohe Sequenzhomologien für Ask von *A. cryptum* mit anderen in einem Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Gencluster annotierten Aspartokinasen festgestellt werden (Moritz, 2012). Dies verdeutlicht, dass die beiden putativen Aspartokinasen von *A. cryptum* zu unterschiedlichen Gruppen gehören, die von Lo *et al.* (2009) anhand bioinformatischer Daten beschrieben wurden. Demnach kann Ask zur α -Gruppe und LysC zur β -Gruppe gezählt werden.

Die *P. stutzeri*-Stämme DSM 5190^T und A1501 besitzen auch jeweils zwei verschiedene Aspartokinasen, die sich im bzw. außerhalb des *ectABCDask*-Genclusters befinden und schon näher charakterisiert wurden (Weissgerber, 2010; Stöveken *et al.*, 2011). Die Aspartokinase Ask, die bei beiden Stämmen identisch ist, umfasst 476 Aminosäuren und hat eine hohe

Übereinstimmung von 45 % mit Ask des *A. cryptum*-Genclusters (vgl. Abb. 4.1). Darüber hinaus ergeben sich für die Aspartokinase LysC von *A. cryptum* JF-5 große Sequenzhomologien zu LysC von *P. stutzeri* und *C. glutamicum* (vgl. Abb. 7.3 im Anhang). Im Fall von *A. cryptum* und *P. stutzeri* sind die Aminosäuresequenzen sogar zu 56 % identisch und zu 72 % ähnlich.

Acry_Ask	MSMAPSVEKIGGTSIAATDAVVGNVLIAGRAGRDLRYRRIFVVSAYGGITDLLLEPKKKTDAAKPPGLYAS	70
Pstu_Ask	---MHTVEKIGGTSMSRFEEVLDNIFIGRREGAALYQRIFVVSAYSGMTNLLLEHKKTGE---PGVYQR	63
	:*****:: : *: *: * * * **:****** *:***** ** : **:*	
Acry_Ask	FAADGEKGDWRDALDAVAAAMRARNEEVFGTSPERAVADDFVAARIGETRACLDDLDRLRGHGHFRLEDP	140
Pstu_Ask	FADAQSEGAWREALEGVRQRLAKNAELFSSEYELHAANQFINSRIDDASECMHSLQKLCAYGHFQLSEH	133
	** :* **:*: * * *:*:*: * * *: *: ** : * : * : * * **:*	
Acry_Ask	LATLRELLAGLGEAHSANHTALLLRARGVNAAFVDLTGWQDGRNLDLDERIRTGLDGDISATTLPIVTGY	210
Pstu_Ask	LMKVREMLASLGEAHSFNSVLALKQRGVNARLADLTGWQEQEAPLPFEEMISSHFAGFDfsRELVVATGY	203
	* :**:* ** ***** *: * *: ***** ***** * :* * : * * : * : **	
Acry_Ask	VKCSDBGMRKYDRGYTEMTFARLAVLTGAREAIHKEFHLSADPKVVGKARKIGRTNYDVTDLANL	280
Pstu_Ask	THCAEGLMNTFDRGYSEITFAQIAAATGAREAIHKEFHLSADPNLVGADKVVITIGRTNYDVADQLSNL	273
	*: * : : : *****:*****:* ********** ***** :** * ***** **:*	
Acry_Ask	GVEVIHFGAARGLRQAGIPLRVNRTFDRHDEGLICADYVSAAPRIEIVTGIRELRALQFFEQDMVGKKG	350
Pstu_Ask	GMEAIHPRAAKTLRRAGVELRIKNAFEPEHGGTLISQDYKSEKPCVEIIAGRKDVFGIEVFDQDMLGDIG	343
	: ** ** * : : **:*: **:* * * : ***** ** * * :***: * : : : * :***: *	
Acry_Ask	YDAAILDTLTKHRARIVSKSSNANAITHYLAAGGPTVRRVIADLEARFPNAEVSAPRLAMVALIGSDLSA	420
Pstu_Ask	YDMEISKLLKQLKLYVVKDSDANSITYYASGRKLNRAARLIEEQYPAAEVTVHNLAIVSAIGSDLKV	413
	** * * : : : **:* **:***:* : : * : * : * : ** * : **:*: *****	
Acry_Ask	EGCVGRALDALGAAGIGVKAMQHQRNVDIQFILDTRFDDAIRALHAALVECRAAQDGKGGTLRTAA	488
Pstu_Ask	KGILAKTVAALAEAGISIQAIHQSIQVEMQCVVNEEDYDAAIAALHRLIE---PENHGDIVAAA-	476
	:* : : : * * ** **:* : * *:*:* : : : * * ** ** **:* : * : *	

Abb. 4.1: Sequenzvergleich der Aspartokinase Ask

Die Aminosäuresequenz der im *ectABCDask*-Gencluster annotierten Aspartokinase von *A. cryptum* DSM 2389^T (Acry_Ask) wurde mit der von *P. stutzeri* DSM 5190^T (Pstu_Ask) mittels EMBOS Needle (Needleman & Wunsch, 1970) verglichen. Konservierte Aminosäuren (45 %) sind mit einem Stern und Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (19 %) mit einem Doppelpunkt markiert.

Enzymtests *in vitro* zeigten, dass Ask von *P. stutzeri* DSM 5190^T durch Kaliumglutamat und ADABA leicht aktiviert wird und nur durch Threonin deutlich inhibiert werden kann, wobei die Feedback-Inhibition durch Kombination von Threonin, Lysin und Methionin vollständig aufgehoben wird (Weissgerber, 2010). Im Vergleich dazu wurde die Aktivität von LysC durch Threonin sowie in verschiedenen Kombinationen mit Lysin und Methionin fast vollständig gehemmt. Außerdem war keine Aktivierung mittels Kaliumglutamat oder ADABA nachweisbar. Zudem konnte nur im Fall von Ask ein geringer Anstieg des relativen mRNA-Niveaus bei Wachstum mit 3 % und 5 % NaCl beobachtet werden. Für die beiden Aspartokinasen von *P. stutzeri* A1501 wurde auch eine Feedback-Inhibition mittels Threonin und bei LysC zusätzlich durch Kombination mit Lysin *in vitro* festgestellt (Stöveken *et al.*, 2011). Die Feedback-Inhibition von Ask war in Anwesenheit von 0,65 M NaCl oder KCl deutlich reduziert, was bei LysC nicht der Fall war. Anhand der Ergebnisse wurde von Weissgerber und Stöveken *et al.* geschlossen, dass beide Aspartokinasen unterschiedliche Funktionen im Stoffwechsel von *P. stutzeri* übernehmen. LysC scheint allgemein für die Biosynthese der Aminosäuren genutzt zu werden, während Ask vornehmlich eine Rolle für die Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Synthese unter osmotischen Stressbedingungen spielt, um einen

eventuellen Engpass durch das stärker Feedback-regulierte Enzym LysC zu kompensieren. Eine biochemische Charakterisierung der Aspartokinasen von *A. cryptum* könnte zeigen, ob sich für diese eine ähnliche Rollenverteilung im Stoffwechsel ableiten lässt.

4.1.2 Osmotische Anpassung von *A. cryptum*

4.1.2.1 Geringe Toleranz gegenüber Natriumchlorid

A. cryptum besitzt in M269 nur eine relativ geringe Salztoleranz von $\leq 5\%$ NaCl. Bei Anzucht mit 4% NaCl war die Wachstumsrate etwa 50% reduziert im Vergleich zum Wachstum ohne NaCl (vgl. Abb. 3.1). Die Ergebnisse sind ähnlich zu dem salzsensitiven Bakterium *E. coli*, das in MM63 bis maximal 4% NaCl wächst (Larsen *et al.*, 1987) und bei Anzucht mit 3% statt ohne NaCl eine um die Hälfte verminderte Wachstumsrate aufweist (Bestvater *et al.*, 2008). Im Vergleich dazu hat das halotolerante Bakterium *P. stutzeri* seine maximale Wachstumsrate bei 2% NaCl in MM63, wächst zudem noch bei einer Salinität von 7,5% NaCl und hat dabei nur eine 40% reduzierte Wachstumsrate gegenüber dem Maximum (Seip *et al.*, 2011). *H. elongata*, ein moderat halophiler Vertreter, kann demgegenüber in Minimalmedium mit NaCl-Konzentrationen von bis zu 20% wachsen und besitzt sein Optimum bei ca. 3% NaCl (Vreeland & Martin, 1980). Demzufolge kann das acidophile Bakterium *A. cryptum*, trotz Vorhandensein des *ectABCDask*-Genclusters zur Synthese von Hydroxyectoin, als nicht-halophil eingestuft werden,

4.1.2.2 Hohe Toleranz gegenüber Aluminiumsulfat

Bei Wachstum mit 10 bis 100 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ hatte *A. cryptum* eine ca. 30% höhere Wachstumsrate als ohne $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (vgl. Abb. 3.3). Für die Hauptkulturen mit 10 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ war die Vorkultivierung ohne $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ erfolgt, was auf einen wachstumsfördernden Effekt durch $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ hinweist. Wakao *et al.* (2002) konnten für *A. cryptum* und andere Acidophile ebenfalls erhöhte Wachstumsraten mit 20 bis 100 mM Aluminium beobachten. Der wachstumsfördernde Effekt könnte laut Wakao *et al.* u.a. mit einer möglichen Pufferwirkung von $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ zusammenhängen, da der pH-Wert der Kulturen mit $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ im Wachstumsverlauf weniger stark gesunken war als bei Wachstum ohne $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. Bei Anzucht in M269 mit 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ hatte *A. cryptum* mit $0,10 \text{ h}^{-1}$ eine etwa 50% verringerte Wachstumsrate gegenüber dem Maximum von $0,21 \text{ h}^{-1}$ (vgl. Abb. 3.3). Bei 400 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ war das Wachstum nur eingeschränkt möglich. Fischer *et al.* (2002) haben für *A. cryptum* in einem ähnlichen Medium mit 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, auch nach Vorkultivierung mit 50 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, eine Wachstumsrate von $0,125 \text{ h}^{-1}$ beschrieben.

Außerdem konnten Fischer *et al.* bei *A. cryptum* eine spezifisch durch Aluminiumionen induzierbare Aluminium-Resistenz feststellen. Bei anderen acidophilen und acidotoleranten Mikroorganismen war eine hohe Aluminium-Toleranz zu beobachten, aber ohne erkennbare Induktion (Fischer *et al.*, 2002; Kawai *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wird das Wachstum von *E. coli* bereits

durch 2,25 mM Aluminium bei pH 5,4 fast vollständig gehemmt (Guida *et al.*, 1991). Die toxische Wirkung wird vor allem den Al^{3+} -Ionen zugeschrieben und scheint u.a. mit der Substitution von Mg^{2+} -Ionen in biologischen Prozessen in Verbindung zu stehen (Macdonald & Martin, 1988). Al^{3+} -Ionen binden ATP^{4-} fast 10^7 -mal stärker als Mg^{2+} -Ionen und der Ligandenaustausch ist etwa 10^5 -mal langsamer gegenüber Mg^{2+} -Ionen. Dadurch können Mg^{2+} -abhängige Enzyme und Liganden inhibiert werden. Darüber hinaus könnten eine Bindung an DNA, Zellwand oder Membranen und die damit verbundenen negativen Effekte für die Aluminium-Toxizität bei Mikroorganismen verantwortlich sein (Piña & Cervantes, 1996). Die Tatsache, dass vor allem Acidophile eine hohe Aluminium-Toleranz aufweisen, lässt sich auf die pH-abhängige Löslichkeit der toxischen Al^{3+} -Ionen zurückführen. Bei neutralem pH-Wert liegt hauptsächlich unlösliches Aluminiumhydroxid vor, während bei $\text{pH} < 5$ überwiegend Al^{3+} -Ionen vorkommen (Martin 1986). Die Aluminium-Toleranz acidophiler Mikroorganismen stellt wahrscheinlich eine Anpassung an erhöhte Konzentrationen von Metall-Ionen in den sauren Lebensräumen, z.B. *acid mine drainage*, dar.

Potenzielle Mechanismen der Aluminium-Toleranz bzw. -Resistenz sind u.a. eine extrazelluläre oder intrazelluläre Komplexierung, eine Bindung an die Zellwand und ein aktiver Export (Piña & Cervantes, 1996). Bei *A. cryptum* wurde durch Isolierung Transposon-induzierter Aluminiumsensitiver Mutanten ein Protein gefunden, das signifikante Ähnlichkeiten zu Efflux-Systemen der RND-Familie (*resistance nodulation division*) aufweist und mit der Aluminium-Resistenz in Verbindung gebracht wird (Friedrich, 2001).

4.1.2.3 Vergleich der osmotischen Konzentration von NaCl und $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Bei der Messung der osmotischen Konzentration von M269 ergab sich für NaCl abhängig von der Anzahl der osmotisch aktiven Teilchen eine lineare Beziehung zwischen Osmolalität und Molarität (vgl. Abb. 3.4). Für $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ hingegen war nur bis ca. 300 mM eine lineare Korrelation festzustellen. Zudem fiel die osmotische Konzentration niedriger aus als entsprechend der Teilchenzahl zu erwarten war, was auf eine mögliche Interaktion von $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ mit anderen Medienkomponenten hindeutet. In M269 mit 2 % NaCl (342 mM) bzw. 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ war die osmotische Konzentration sehr ähnlich (ca. 0,6 Osmol/kg). Unter diesen Bedingungen hatte *A. cryptum* mit NaCl eine höhere Wachstumsrate und einen etwas geringeren Solutgehalt als bei Wachstum mit $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (vgl. Abb. 3.1 und 3.3). Auffällig war, dass annähernd das gleiche Verhältnis der akkumulierten Solute Trehalose und Hydroxyectoin von 1,5:1 vorlag. Für *P. stutzeri*, der ebenfalls mehrere Solute gleichzeitig im Cytoplasma akkumuliert, konnte beobachtet werden, dass der relative Anteil der Solute sogar unabhängig von der NaCl-Konzentration gleich bleibt (Seip *et al.*, 2011).

4.1.2.4 Hydroxyectoin und Trehalose als Antwort auf osmotischen Stress

A. cryptum synthetisierte hauptsächlich Hydroxyectoin und Trehalose als Antwort auf osmotischen Stress und der intrazelluläre Solutgehalt stieg mit zunehmender NaCl- bzw. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ -Konzentration an (vgl. Abb. 3.1 und 3.3). Viele andere Bakterien, die mit den Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Synthesegenen ausgestattet sind, gehören zu den halophilen Vertretern und akkumulieren vornehmlich Ectoin, Hydroxyectoin oder beide Solute in Kombination (Severin *et al.*, 1992). Die Akkumulation von Hydroxyectoin in Verbindung mit Trehalose als vorherrschende Solute, wie im Fall von *A. cryptum*, ist ungewöhnlich. Severin *et al.* (1992) haben halophile *Micrococcus*-Arten beschrieben, die Hydroxyectoin zusammen mit Trehalose intrazellulär akkumulieren, aber Ectoin als primäres Solut nutzen. *P. stutzeri* synthetisiert zur Anpassung an osmotischen Stress vorwiegend Hydroxyectoin und in geringeren Maßen N-Acetyl-glutaminylglutamin-1-amid (NAGGN) sowie Trehalose (Seip *et al.*, 2011).

Trehalose wird vor allem bei geringen Salinitäten bzw. von Mikroorganismen mit geringer Salztoleranz als kompatibles Solut genutzt (Galinski & Trüper, 1994; Reed *et al.*, 1986). Dies kann dem relativ hohen Energiebedarf verglichen mit anderen Soluten, z.B. Ectoin, zugeschrieben werden (Oren, 1999). In Übereinstimmung damit wird im Fall von *A. cryptum*, der eine geringe NaCl-Toleranz besitzt, zunächst vornehmlich Trehalose akkumuliert und mit steigender Salinität der Anteil an Hydroxyectoin erhöht (vgl. Abb. 3.1).

Neben Trehalose und Hydroxyectoin wurde auch Glutamat in geringen Mengen bei *A. cryptum* nachgewiesen. Glutamat wird bei vielen Bakterien, z.B. *E. coli*, als erste Antwort unter hyperosmotischen Bedingungen zusammen mit K^+ -Ionen im Cytoplasma akkumuliert (Dinnbier *et al.*, 1988). Bei Vertretern, die vornehmlich Ectoine *de novo* synthetisieren, kommt Glutamat in geringen Mengen vor (Severin *et al.*, 1992). Im Fall von *A. cryptum* scheint Glutamat auch eine untergeordnete Rolle bei der osmotischen Anpassung zu spielen. Bei Wachstum mit NaCl konnte eine intrazelluläre Glucose-Akkumulation von bis zu $85 \mu\text{mol/g}$ TBM nachgewiesen werden, obwohl Glycerin als C-Quelle diente. Dies könnte mit der Trehalose-Synthese zusammenhängen. Im Genom von *A. cryptum* befinden sich die putativen Gene *otsAB*, die in *E. coli* die osmotisch regulierte Trehalose-Synthese ausgehend von UDP-Glucose und Glucose-6-phosphat vermitteln (Giæver *et al.*, 1988). Ectoin konnte nur in vernachlässigbaren Mengen detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass es direkt in Hydroxyectoin umgewandelt wird und ansonsten keine Funktion bei der Osmoadaptation in *A. cryptum* hat. Dies könnte u.a. an der Organisation des Genclusters liegen. *P. stutzeri*, der auch ein *ectABCDask*-Gencluster besitzt, akkumuliert bei Salzstress ebenfalls nur geringfügige Mengen an Ectoin (Seip *et al.*, 2011).

Hydroxyectoin wurde in großen Mengen von *A. cryptum* synthetisiert, wobei jedoch nur eine geringe Salztoleranz vermittelt wurde. Bisher ist nicht bekannt, ob Hydroxyectoin neben der Osmoadaptation eine weitere Funktion zur Anpassung an die sauren Metall-reichen Lebensräume (z.B. *acid mine drainage*) hat. Der pH-Wert und die Temperatur haben unabhängig von der NaCl-Konzentration keinen Einfluss auf die Hydroxyectoin-Synthese in *A. cryptum* (Moritz, 2012).

Denkbar wäre ein direkter Effekt auf das toxische Aluminium, z.B. als Chelator. Dieser Annahme könnte mit Hilfe des Hydroxyectoin-Produzenten *E. coli* pASK_ectABCDask nachgegangen werden, da *E. coli* normalerweise keine Aluminium-Toleranz besitzt. Goltsman *et al.* (2009) haben in Biofilmen aus *acid mine drainage* acidophile Vertreter der Gattung *Leptospirillum* gefunden, die einen vollständigen Biosyntheseweg für Hydroxyectoin aufweisen, und konnten die entsprechenden Proteine detektieren. Darüber hinaus konnte mittels Metabolomanalyse der in *acid mine drainage* auftretenden Biofilme gezeigt werden, dass Hydroxyectoin häufig vorhanden ist und scheinbar vor allem in der frühen Phase der Biofilm-Bildung eine Anpassung an den erhöhten osmotischen Stress bietet (Mosier *et al.*, 2013). Insgesamt lassen die Erkenntnisse darauf schließen, dass die Produktion von Hydroxyectoin nicht auf halophile Vertreter beschränkt ist, sondern weit verbreitet ist. In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass *A. cryptum* das *ectABCDask*-Gencluster über horizontalen Gentransfer erworben hat. Allerdings unterscheidet sich der GC-Gehalt der Gene *ectABCDask* kaum von dem des *A. cryptum*-Genoms.

4.1.3 Potenzial des *A. cryptum*-Genclusters für die heterologe Expression in *E. coli*

Der bioinformatische Vergleich von EctC verschiedener Vertreter der *Bacteria* zeigte, dass das Protein von *A. cryptum* eine sehr geringe Acidität aufweist und sich dadurch deutlich von denen halophiler Bakterien unterscheidet (vgl. Abb. 3.5). Die Acidität ergibt sich aus den sauren Aminosäuren (Aspartat, Glutamat) abzüglich der basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin) bezogen auf die Gesamtzahl der Aminosäuren und ist ein Maß für den sauren Charakter eines Proteins.

Für die Proteine halophiler Archaeen, die an hohe intrazelluläre Ionenkonzentrationen angepasst sind, ist bekannt, dass sie einen Überschuss von sauren zu basischen Aminosäuren haben und folglich die Acidität hoch ist. Die sauren Aminosäuren sind vermehrt an der Proteinoberfläche und führen zu einer erhöhten negativen Oberflächenladung. Diese ermöglicht den Proteinen mit Ionen um die vorhandenen Wassermoleküle zu konkurrieren und somit die Löslichkeit der Proteine bei geringer Wasserverfügbarkeit aufrechtzuerhalten (Fukuchi *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2013).

Bei dem bioinformatischen Vergleich konnte vor allem für EctC halophiler Vertreter, z.B. *H. elongata*, eine hohe Acidität festgestellt werden, die ebenfalls mit einer Salzabhängigkeit in Verbindung gebracht werden kann. EctC von *A. cryptum* hingegen ist aufgrund der geringen Acidität nicht als halophiles Protein einzuordnen. Dies steht in Übereinstimmung mit vorherigen Aktivitätstests des Enzyms *in vitro*, bei denen eine deutliche Abnahme der Aktivität mit steigender NaCl-Konzentration beobachtet wurde (Moritz, 2012). Weiterhin zeigten die Wachstumsversuche, dass *A. cryptum* eine geringe NaCl-Toleranz hat, genau wie *E. coli*, was auf ähnliche physiologische Bedingungen im Cytoplasma hindeutet. Außerdem konnte die Hydroxyectoin-Synthese und somit die Expression der Biosynthesegene bereits bei einer geringen Salinität (1 % NaCl) festgestellt werden. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* für die Produktion der Ectoine in *E. coli* bei geringer Salinität geeignet ist.

4.2 Heterologe Produktion von Ectoinen in *E. coli* mittels des *A. cryptum*-Genclusters

Ectoine sind wegen ihrer vielseitigen protektiven Wirkung auf Biomoleküle, Zellen und Gewebe von großem Interesse für biotechnologische Anwendungen (Lentzen & Schwarz, 2006b; Pastor *et al.*, 2010). Ectoin wird bereits im industriellen Maßstab produziert und in verschiedenen Kosmetik- und Medizinprodukten eingesetzt. Die industrielle Produktion erfolgt derzeit mit Hilfe des natürlichen Ectoin-Produzenten *H. elongata* (Kunte *et al.*, 2014) und bedarf wegen dessen halophiler Lebensweise größerer Mengen an NaCl. Eine erhöhte NaCl-Konzentration ist nicht nur für die Fermentertechnik auf Dauer von Nachteil, sondern führt auch durch die erforderliche Trennung der Ectoine vom Salz zu einem zeit- und kostenintensiven Gewinnungsprozess.

Mehrere Versuche wurden bereits unternommen, um eine heterologe Produktion der Ectoine bei geringer Salinität bzw. ohne NaCl mit Hilfe eines nicht-halophilen Wirts zu erreichen und somit das Produktionsverfahren zu optimieren (vgl. 4.2.3). *E. coli* bietet sich aufgrund seiner nicht-halophilen Lebensweise und der weitreichenden Erfahrung, diesen Modellorganismus als heterologes Produktionssystem zu nutzen, für eine salzfreie Produktion der Ectoine an. Das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* ist ein vielversprechender Kandidat für die heterologe Produktion von Ectoinen in *E. coli* bei geringer Salinität (vgl. 4.1.3). Bei der Expression des *A. cryptum*-Genclusters unter Kontrolle des *tet*-Promotors in *E. coli* DH5 α konnte eine hohe Produktion der Ectoine und deren Sekretion ins Medium festgestellt werden. In ersten Wachstumsversuchen mit Glucose und 1 % NaCl bzw. ohne NaCl konnte ein extrazellulärer Solutgehalt von bis zu 1,3 g/g TBM erreicht werden (Bethlehem, 2015). In dieser Arbeit wurde das heterologe Produktionssystem für Ectoine in *E. coli* DH5 α unter Verwendung des *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* weiter charakterisiert und optimiert. Alle verwendeten Produktionsstämme basieren auf *E. coli* DH5 α und werden im gesamten Kapitel 4.2 zur vereinfachten Schreibweise nur mit *E. coli* bezeichnet.

4.2.1 Überblick zum heterologen Produktionssystem für Ectoine in *E. coli*

Zunächst wird ein Überblick über das in dieser Arbeit verwendete Produktionssystem für Ectoine in *E. coli* gegeben (vgl. Abb. 4.2). Die heterologe Produktion von Ectoin bzw. Hydroxyectoin wird durch einen Expressionsvektor auf Basis von pASK-IBA3 mit einer hohen Kopienzahl vermittelt, der das *A. cryptum*-Gencluster unter Kontrolle des starken induzierbaren *tet*-Promotors enthält. Durch Zugabe des Induktors AHT wird die Expression des Genclusters induziert und die für die Synthese der Ectoine erforderlichen Enzyme produziert.

C-Quelle Als C-Quellen wurden vorwiegend Glycerin und Glucose eingesetzt. Glucose wird in erster Linie über das Phosphotransferasesystem (PTS) aufgenommen, wobei die Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) durch Gruppentranslokation auf Glucose übertragen und Glucose-6-phosphat gebildet wird (Kundig *et al.*, 1966). In dieser Form fließt Glucose in den zentralen Stoffwechsel und über die Glykolyse in Richtung der Synthese von Ectoin bzw. Hydroxyectoin.

Glycerin wird durch erleichterte Diffusion mittels des Facilitator-Proteins GlpF aufgenommen. Im Cytoplasma wird Glycerin durch ATP-abhängige Phosphorylierung mittels der Glycerinkinase zu Glycerin-3-phosphat umgesetzt. Anschließend erfolgt die Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) mittels der Membran-assoziierten Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, wobei FADH₂ gebildet wird (Lin, 1976). Über DHAP erfolgt der Eintritt in die Glykolyse und derselbe Weg wie im Fall von Glucose führt zur Synthese der kompatiblen Solute.

Synthese der Ectoine Für die Biosynthese der Ectoine wird Aspartat benötigt, das durch Transaminierung von Oxalacetat bereitgestellt werden kann. Oxalacetat wiederum entsteht durch Carboxylierung von PEP mittels der PEP-Carboxylase oder wird aus dem Citratzyklus abgezogen. Ausgehend von Aspartat wird Aspartat- β -semialdehyd gebildet, das sowohl als Vorstufe für die Ectoine als auch für die Aminosäuren der Aspartat-Familie dient. Anschließend werden Ectoin und Hydroxyectoin mit Hilfe der rekombinanten Enzyme synthetisiert (vgl. Abb. 4.2 und 1.1). Bei der EctB-vermittelten Transaminierung handelt es sich um eine reversible Reaktion (Ono *et al.*, 1999), während die durch EctA bzw. EctD katalysierte Reaktion Acetyl-CoA bzw. O₂ benötigt und irreversibel ist. Im Fall von EctC besteht sehr wahrscheinlich eine Gleichgewichtsreaktion zwischen ADABA und Ectoin, bei der das Gleichgewicht deutlich auf Seiten der zyklischen und stabileren Form Ectoin liegt. Darauf weisen Aktivitätstests *in vitro* mit dem Enzym von *H. elongata* hin (Witt *et al.*, 2011). Der Aktivitätstest mit dem aus *A. cryptum* stammenden EctC im Rohextrakt von *E. coli* lässt ebenfalls auf ein Reaktionsgleichgewicht schließen, wobei ADABA und Ectoin in einem Verhältnis von 1 zu 16-20 detektiert wurden (vgl. 3.3.6).

Efflux der Ectoine Die *de novo*-synthetisierten Solute werden aufgrund der hohen Produktionsrate und geringen Salinität des Mediums aus den Zellen geschleust. Je nach Produktionsbedingungen und verwendetem Expressionsvektor werden ADABA, Ectoin und/oder Hydroxyectoin extrazellulär akkumuliert. Die verantwortlichen Efflux-Systeme sind bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt. *E. coli* besitzt mechanosensitive Kanäle, die bei einem Anstieg des Turgordrucks unter hypoosmotischen Bedingungen einen schnellen Ausstrom der intrazellulär akkumulierten Solute vermitteln, um das osmotische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten (Berrier *et al.*, 1996; Levina *et al.*, 1999). Andererseits konnte kürzlich für *E. coli*-Mutanten, denen die mechanosensitiven Kanäle fehlen, demonstriert werden, dass Hydroxyectoin trotzdem extrazellulär akkumuliert wird (Czech *et al.*, 2016). Demzufolge könnten in *E. coli* neben den mechanosensitiven Kanälen auch spezifische Transportsysteme für den Efflux der kompatiblen Solute verantwortlich sein.

Wiederaufnahme der Ectoine Aufnahmeexperimente haben gezeigt, dass *E. coli* nicht in der Lage ist die Ectoin-Vorstufe ADABA aufzunehmen (Voß, 2002). Dadurch ist eine hohe extrazelluläre Akkumulation von ADABA möglich, sofern die Vorstufe aus den Zellen geschleust wird. Die Tatsache, dass unter manchen Produktionsbedingungen ein Ausstrom von ADABA aufgetreten ist, wird in Kapitel 4.2.2.14 erläutert. Für Ectoin ist bekannt, dass es von *E. coli* mittels der osmotisch regulierten Transporter ProP und ProU aufgenommen werden kann (Jebbar *et al.*, 1992). Mittlerweile gibt es auch Hinweise darauf, dass die Aufnahme von Hydroxyectoin über dieselben

Transportsysteme erfolgt (Czech *et al.*, 2016). Inwiefern der dritte Transporter PutP, der nicht direkt in die Osmoregulation von *E. coli* involviert ist (Grothe *et al.*, 1986), die Aufnahme der Ectoine bei Salinitäten $\leq 1\%$ NaCl beeinflusst, ist bislang nicht untersucht worden. Aufnahmeraten von Ectoin in *E. coli* wurden bisher bei 1% NaCl oder höheren Salinitäten bestimmt, wobei die Aufnahme bei 1% NaCl mit 80-100 nmol/(min x mg Protein) erfolgt (Galinski unveröffentlicht). Bei Salinitäten $< 1\%$ NaCl, die in dieser Arbeit für die Produktion der Ectoine vornehmlich verwendet wurden, sind die Aufnahmeraten von Ectoin und Hydroxyectoin nicht bekannt.

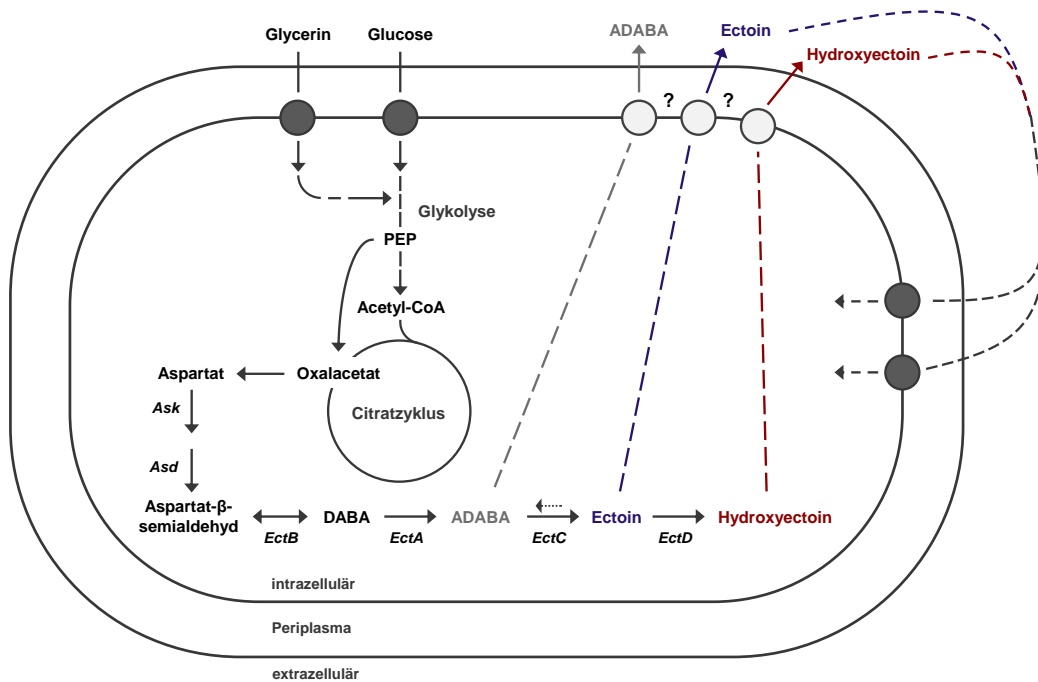


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Produktionssystems für Ectoine in *E. coli*

Die vorwiegend eingesetzten C-Quellen Glycerin und Glucose werden durch erleichterte Diffusion bzw. aktiven Transport aufgenommen und fließen über die Glykolyse in den Stoffwechsel. Ausgehend von Aspartat erfolgt die Synthese der Ectoine (vgl. Abb. 1.1). EctC stellt sehr wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen ADABA und Ectoin ein (1:16-20). Die Solute werden extrazellulär akkumuliert, wobei die verantwortlichen Efflux-Systeme noch nicht aufgeklärt sind. Anders als ADABA können Ectoin und Hydroxyectoin über die Transporter ProP, ProU und evtl. PutP aufgenommen werden, aber deren Aktivität bei $< 1\%$ NaCl wurde bisher nicht untersucht.

4.2.2 Charakterisierung und Optimierung des heterologen Produktionssystems

4.2.2.1 Akkumulation von Ectoin durch Mutation im Vektor pASK_ectABCD_m

Im Expressionsvektor pASK_ectABCD_m wurde eine Punktmutation in *ectD* identifiziert, die einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin an Position 118 zur Folge hat. Mit dem neu konstruierten Expressionsvektor ohne Mutation in *ectD* (pASK_ectABCD2) konnte nachgewiesen werden, dass der Aminosäureaustausch mit einem Funktionsverlust von EctD und somit der Produktion von Ectoin statt Hydroxyectoin einhergeht (vgl. Abb. 3.7). Der Vergleich der Aminosäuresequenz von EctD (vgl. Abb. 3.6) zeigte, dass die betroffene Aminosäure in unmittelbarer Nähe zur Consensus-Sequenz und zu Aminosäuren liegt, die in verwandten EctD-Proteinen an der

Ligandenbindung im aktiven Zentrum beteiligt sind (Reuter *et al.*, 2010; Höppner *et al.*, 2014). Dabei könnte Prolin anstelle von Leucin einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinstruktur von EctD und somit auf die Funktionalität des Enzyms haben.

Prolin ist eine zyklische Aminosäure mit einer sekundären Aminogruppe, wodurch in der Peptidbindung der Amidwasserstoff zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen fehlt. Außerdem führt die Ringstruktur von Prolin zu einer eingeschränkten und starren Konformation in der Proteinstruktur. Aufgrund dieser Eigenschaften stört Prolin die regelmäßigen Sekundärstrukturen, wie α -Helices und β -Faltblätter, indem es einen Knick bzw. eine Krümmung hervorruft, und ist bevorzugt am Übergang der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zu finden (MacArthur & Thornton, 1991). Welchen Effekt Prolin an Position 118 in EctD von *A. cryptum* tatsächlich hat, kann aufgrund der fehlenden Kristallstruktur des Proteins an dieser Stelle nicht geklärt werden.

4.2.2.2 Die Transaminase EctB scheint in *E. coli* essenziell zu sein

Der Stamm *E. coli* pASK_ectACD, bei dem ein 120 bp großes Fragment im *ectB*-Gen fehlt und somit EctB funktionslos ist, konnte kein Ectoin produzieren. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass EctB für die Ectoin-Produktion in *E. coli* essenziell ist, anders als es in dem natürlichen Ectoin-Produzenten *H. elongata* der Fall ist (Schwibbert *et al.*, 2011). Neben dem Leserahmen ist auch die Sequenz 130 bp stromaufwärts des nachfolgenden Gens *ectC* mit putativen Promotorregionen oder anderen regulatorischen Elementen im Vektor pASK_ectACD unverändert geblieben. Trotzdem kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Expression von *ectC* durch die fehlende *ectB*-Sequenz negativ beeinflusst wurde. Durch einen Nachweis der Aktivität von EctC könnte sichergestellt werden, dass das Ausbleiben der Ectoin-Produktion nicht mit einem Defekt von EctC zusammenhängt, sondern tatsächlich auf das funktionslose EctB-Protein zurückzuführen ist.

4.2.2.3 Geringer positiver Effekt der Aspartokinase auf die Hydroxyectoin-Produktion

Im direkten Vergleich von *E. coli* pASK_ectABCD2 und pASK_ectABCDask fiel der extrazelluläre Solutgehalt bei dem Produktionsstamm mit Aspartokinase Ask etwas höher aus und der Ectoin-Anteil war 50 % geringer, so dass schlussendlich eine höhere Ausbeute an Hydroxyectoin erreicht wurde (vgl. Abb. 3.7). Demnach kann von einem geringen positiven Effekt von Ask auf die heterologe Hydroxyectoin-Produktion gesprochen werden. Die Aspartokinase katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Aspartat und ist für die Bereitstellung der Vorstufe Aspartat- β -semialdehyd im Zuge der Synthese der Ectoine wichtig. *E. coli* besitzt drei Isoenzyme der Aspartokinase, die einer transkriptionalen Regulation und negativen Feedback-Regulation durch die Aminosäuren der Aspartat-Familie unterliegen (Patte, 1996). Bestvater *et al.* (2008) konnten demonstrieren, dass die Aspartokinase der limitierende Faktor (*metabolic bottle-neck*) für die heterologe Ectoin-Produktion in *E. coli* DH5 α ist, wobei die *ectABC*-Gene mit dem nativen salzinduzierten Promotor aus dem halophilen *M. halophilus* verwendet wurden. Durch eine deregul-

lierte Aspartokinase aus *C. glutamicum*, deren Expression unter Kontrolle des *tac*-Promotors stand, konnte in diesem Produktionsstamm der Flaschenhals-Effekt umgangen und die Ectoin-Produktion deutlich gesteigert werden (Bestvater *et al.*, 2008).

Im Fall von *E. coli* pASK_ectABCDask wird das Gencluster unter Kontrolle des starken AHT-induzierbaren *tet*-Promotors exprimiert, wobei keine Informationen über die Transkriptionsrate des Gens *ask* vorliegen. Falls weitere regulatorische Elemente stromaufwärts von *ask* im *A. cryptum*-Gencluster vorhanden sind, könnten diese die Expression des *ask*-Gens unter den Produktionsbedingungen in *E. coli* beeinträchtigt haben. Außerdem ist nicht bekannt, ob Ask von *A. cryptum* einer Feedback-Regulation unterliegt (vgl. 4.1.1). Darüber hinaus erreichte *E. coli* pASK_ectABCDask einen bis zu 35-mal höheren Solutgehalt im Medium als der von Bestvater *et al.* beschriebene Produktionsstamm intrazellulär aufwies (0,4 mmol/g TBM). Dies könnten mögliche Gründe für einen geringeren positiven Effekt von Ask auf das hier vorgestellte Produktionssystem für Hydroxyectoin sein. Auffällig ist jedoch, dass das heterologe Produktionssystem eine sehr hohe Produktion der Ectoine unabhängig von der im Gencluster codierten Aspartokinase oder einem deregulierten Enzym erlaubt und somit die Aktivität der *E. coli*-eigenen Aspartokinasen ausreichend zu sein scheint. Das lässt darauf schließen, dass die Aspartokinase nicht generell der limitierende Faktor für die Produktion von Ectoinen in *E. coli* DH5 α sein muss.

4.2.2.4 Die produzierten Ectoine werden überwiegend extrazellulär akkumuliert

Bei dem vorgestellten heterologen Produktionssystem wird die überwiegende Menge der produzierten Ectoine aus den Zellen geschleust und im Medium akkumuliert. Bei Anzucht mit 1 % NaCl machte der intrazelluläre Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Gehalt 3 % bzw. 6 % der gesamten produzierten Solute aus und bei geringeren Salinitäten betrug der prozentuale Anteil weniger als 1 % bzw. 3 %. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass der intrazelluläre Solutgehalt bei Anstieg der Salinität von 0 bis 1 % NaCl zunahm (vgl. Abb 7.1). Für *E. coli* ist schon länger bekannt, dass kompatible Solute, z.B. Glycinbetain oder Ectoin, proportional zur osmotischen Konzentration des Mediums intrazellulär akkumuliert werden (Le Rudulier & Bouillard, 1983; Jebbar *et al.*, 1992). Der hohe extrazelluläre Anteil der produzierten Ectoine kann zum einen auf die geringe osmotische Konzentration des Mediums (≤ 1 % NaCl) zurückgeführt werden. Zum anderen weist das heterologe Produktionssystem eine hohe Produktionsrate auf, mit spezifischen Produktivitäten von bis zu 350 mg/(g TBM x h). Beides hat einen schnellen und kontinuierlichen Ausstrom der Ectoine aus der Zelle zur Folge, um den Turgordruck anzupassen und das osmotische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Dabei ist noch nicht eindeutig aufgeklärt, ob der Efflux über mechanosensitive Kanäle und/oder spezifische Transportsysteme in *E. coli* vermittelt wird.

Weiterhin ist nicht bekannt, ob eine Wiederaufnahme der extrazellulär akkumulierten Solute bei Salinitäten unterhalb von 1 % NaCl erfolgt und diese die Effizienz des Produktionssystems aufgrund des zusätzlichen Energieaufwands beeinträchtigt. Dafür wäre es hilfreich die Aufnahme-

raten der Produktionsstämme für Ectoin bzw. Hydroxyectoin bei $< 1\%$ NaCl zu bestimmen. Für Glycinbetain konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* die anfängliche Aufnahmezeit bei Anzucht ohne NaCl deutlich geringer ist als bei $0,15\text{ M NaCl}$ (ca. $0,9\%$) und höheren Salinitäten (Perroud & Le Rudulier, 1985). Falls das auch auf Ectoin und Hydroxyectoin zutreffen sollte, die über die gleichen Transportsysteme aufgenommen werden, wäre bei $< 1\%$ NaCl eine langsame Wiederaufnahme der produzierten Solute aus dem Medium zu erwarten. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der geringen osmotischen Konzentration des Mediums und des damit verbundenen niedrigen intrazellulären Solutgehalts nur eine geringe Menge der Ectoine wieder aufgenommen wird. In Kombination mit der hohen Produktionsrate kann daher angenommen werden, dass die Wiederaufnahme der extrazellulär akkumulierten Ectoine keinen wesentlichen Einfluss auf die Effizienz des heterologen Produktionssystems hat. Dieser Annahme könnte durch heterologe Produktion der Ectoine in einem *E. coli*-Stamm ohne die entsprechenden Aufnahmesysteme ProP, ProU und PutP nachgegangen werden. Hierfür könnte z.B. *E. coli* MKH13 (Haardt *et al.*, 1995) oder der Stamm BKA-13 verwendet werden, der zusätzlich Trehalose-defizient ist (Burdziak, 2006).

4.2.2.5 Höchste Produktion der Ectoine bei geringer Salinität

Für das Produktionssystem konnte festgestellt werden, dass der extrazelluläre Solutgehalt bei einer geringen Salinität von $0,25$ bzw. $0,5\%$ NaCl höher ist als bei Anzucht ohne Salz oder mit 1% NaCl (vgl. Abb. 3.9 und 3.14). Für *E. coli* pASK_ectABCdask ergab sich eine extrazelluläre Hydroxyectoin-Konzentration von fast 10 mM bei Wachstum in MM63-0,5 mit Glycerin, was einem maximalen Solutgehalt von $13,8\text{ mmol/g TBM}$ ($2,2\text{ g/g TBM}$) entspricht. Im Fall von *E. coli* pASK_ectABCd_m konnte unter den gleichen Bedingungen eine Ectoin-Konzentration von $10,8\text{ mM}$ und ein Solutgehalt von $17,4\text{ mmol/g TBM}$ ($2,5\text{ g/g TBM}$) im Medium erreicht werden. Bei Anzucht mit $0,25\%$ NaCl fiel die Ectoin-Konzentration mit $11,7\text{ mM}$ und der Solutgehalt mit $20,6\text{ mmol/g TBM}$ ($2,9\text{ g/g TBM}$) sogar noch höher aus. Die Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCdask bei $0,25\%$ NaCl wurde nicht getestet, so dass offen bleibt, ob die Ausbeute an Hydroxyectoin ebenfalls noch größer gewesen wäre.

Die höhere Produktion bei $0,25$ bzw. $0,5\%$ NaCl ist vor allem auf die geringere Biomasse und höhere Solutkonzentration im Medium zurückzuführen, was in einem deutlichen Unterschied des Solutgehalts bezogen auf TBM resultiert. Diese Korrelation in der Batch-Kultur konnte auch im Zusammenhang mit einer variierenden Induktionszeit festgestellt werden (vgl. Abb. 3.12). Je später die Induktion erfolgte, desto mehr Biomasse konnte gebildet werden und umso weniger Ressourcen standen für die Produktion der Ectoine zur Verfügung. Beim direkten Vergleich des Produktionsverlaufs in MM63 mit $0,25$ und $0,5\%$ NaCl ist die Korrelation auch deutlich sichtbar (vgl. Abb. 3.16). Bei Anzucht mit $0,5\%$ NaCl wurde die C-Quelle schneller verbraucht, was mit einer höheren Wachstumsrate und TBM-Produktion einherging und dazu führte, dass weniger Solute produziert und im Medium akkumuliert werden konnten.

Die Korrelation von Solut- und TBM-Produktion ist auch ein Grund für die geringere Ausbeute an Hydroxyectoin mit *E. coli* pASK_ectABCDask im Vergleich zu der Ectoin-Ausbeute mit *E. coli* pASK_ectABCD_m. Eine mögliche Erklärung für die geringere Hydroxyectoin-Produktion wäre der zusätzliche O₂-Bedarf für die Hydroxylierung mittels EctD. Für *H. elongata* zeigte sich, dass die O₂-Versorgung ein limitierender Faktor der Hydroxyectoin-Produktion sein kann (Meffert, 2011; Witt, 2011). *E. coli* pASK_ectABCDask hatte jedoch kaum Ectoin intrazellulär akkumuliert (vgl. Abb. 7.1), was gegen eine reduzierte Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin spricht. Andererseits könnte es sein, dass Hydroxyectoin langsamer aus den Zellen fließt als Ectoin, was auch mit einer langsameren Produktion verbunden wäre. Im Vergleich zum intrazellulären Ectoin-Gehalt von *E. coli* pASK_ectABCD_m fiel der intrazelluläre Gehalt an Hydroxyectoin bei *E. coli* pASK_ectABCDask etwas höher aus (vgl. Abb. 7.1). Für das Wachstum mit Glycerin konnte zudem tendenziell eine langsamere Zunahme der extrazellulären Hydroxyectoin-Konzentration gegenüber der Ectoin-Konzentration beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies sind Hinweise darauf, dass der Ausstrom von Hydroxyectoin langsamer ist und somit auch die Bildungsgeschwindigkeit geringer ausfällt. Eine langsamere Hydroxyectoin-Produktion wiederum hätte zur Folge, dass mehr C-Quelle in den Aufbau der Biomasse fließt, was eine Erklärung für die höhere TBM und schlussendlich für den geringeren Solutgehalt des Hydroxyectoin-Produzenten wäre.

E. coli pASK_ectABCDask akkumulierte bei Anzucht ohne NaCl und mit 0,5 % NaCl geringe Mengen an Ectoin im Medium, während dies bei 1 % NaCl nicht der Fall war (vgl. Abb. 3.10). Eine mögliche Erklärung ist eine langsamere Aufnahme von Ectoin bei einer niedrigeren Salinität, was zumindest für Glycinbetain beobachtet werden konnte (Perroud & Le Rudulier, 1985). Dazu kommt, dass intrazellulär weniger Solute akkumuliert werden und die Aufnahmerate für Ectoin in Gegenwart von Hydroxyectoin verringert ist (Brauner, 2016). Für *E. coli* pASK_ectABCD_m ergab sich bei Wachstum mit Glucose eine NaCl-abhängige Akkumulation von ADABA im Medium (vgl. Abb. 3.15), was in Kapitel 4.2.2.14 erläutert wird.

Schließlich zeigte sich, dass die Wachstumsrate bei Anzucht ohne NaCl geringer war als bei Salinitäten von 0,25 bis 1 % NaCl. Bisher gibt es keinen Hinweis darauf, dass *E. coli* ein Bedürfnis für Natrium hat. Aber es ist bekannt, dass geringe NaCl-Konzentrationen das Wachstum fördern (Neidhardt *et al.*, 1974) und vielen Standardmedien wird daher eine geringe NaCl-Menge zugesetzt.

4.2.2.6 Keine Produktion von Ectoinen in Komplexmedium

Bei Wachstum in Komplexmedien ohne oder mit 0,5 % NaCl konnte keine Produktion der Ectoine festgestellt werden. Über die Ursachen kann nur spekuliert werden, da keine Informationen über die Expression der rekombinanten Proteine und deren Aktivität in Komplexmedium vorliegen. Die Produktion rekombinanter Proteine mit dem verwendeten Vektorsystem inkl. *tet*-Promotor ist in Komplexmedium grundsätzlich möglich (Skerra, 1994). Allerdings könnten andere putative Promotorelemente innerhalb des *A. cryptum*-Genclusters durch Bestandteile des Komplexmediums,

z.B. Glycinbetain, negativ beeinflusst und dadurch die Transkription gehemmt worden sein.

Für *ectABC* aus den moderat halophilen Bakterien *M. halophilus* und *C. salzigens* konnte eine transkriptionale Inhibierung und verminderte Ectoin-Produktion durch extern zugeführtes Glycinbetain beobachtet werden (Bestvater & Galinski, 2002; Calderón *et al.*, 2004). Seip *et al.* (2011) konnten bei der Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* unter Verwendung des *P. stutzeri*-Genclusters ebenfalls feststellen, dass diese durch Supplementierung mit Glycinbetain fast vollständig gehemmt wird. Schließlich wird auch bei *E. coli* die Trehalose-Synthese durch Glycinbetain weitestgehend unterdrückt und Glycinbetain zum osmotischen Ausgleich intrazellulär akkumuliert (Dinnbier *et al.*, 1988; Gæver *et al.*, 1988). Bei Anzucht von *E. coli* pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCDask in MM63-0,5 konnte jedoch kein negativer Effekt auf die heterologe Produktion durch Zugabe von 2 mM Glycinbetain festgestellt werden. Demnach kann Glycinbetain zumindest nicht alleine der Grund für das Ausbleiben der Produktion in Komplexmedium sein.

Eine andere Erklärung wäre, dass die Aspartokinasen von *E. coli* durch Feedback-Regulation mittels der im Komplexmedium enthaltenen Aminosäuren Lysin, Threonin oder Methionin inhiert wurden und dadurch die Vorstufe für die Ectoin-Synthese nicht zur Verfügung stand. Dagegen spricht, dass Ning *et al.* (2016) mit *E. coli* und dem *ectABC*-Gencluster von *H. elongata* ohne zusätzliche Aspartokinase eine Ectoin-Produktion in Komplexmedium erreicht haben. Allerdings fiel die Produktion bei zusätzlicher Expression einer Feedback-resistenten Aspartokinase höher aus. Im Hinblick auf die industrielle Produktion der Ectoine ist festzuhalten, dass bei einem Komplexmedium gegenüber einem Minimalmedium die Produktgewinnung aus dem Medienüberstand wegen der komplexen und nicht genau definierten Zusammensetzung aufwendiger ist. Daher lag in dieser Arbeit der Fokus auf der heterologen Produktion in Minimalmedium.

4.2.2.7 Höchste Produktausbeute und -reinheit mit Glycerin als C-Quelle

Von allen getesteten C-Quellen erwies sich Glycerin als beste Wahl für das heterologe Produktionssystem (vgl. Abb. 3.13). Die Wachstumsrate fiel zwar niedriger aus als bei anderen C-Quellen, aber dafür konnte mit Glycerin die höchste Ausbeute an Ectoin bei einer geringfügigen Menge unerwünschter Nebenprodukte erreicht werden. Bei Anzucht mit allen anderen C-Quellen hingegen wurde neben Ectoin auch ADABA in nennenswerten Mengen extrazellulär akkumuliert.

Glycerin vs. Glucose Bei der Produktion der Ectoine ausgehend von Glycerin ergaben sich eine geringere Wachstumsrate und TBM als bei Anzucht mit Glucose. Gleichzeitig konnte eine höhere extrazelluläre Solutkonzentration und somit ein deutlich höherer Solutgehalt bezogen auf TBM erreicht werden (vgl. Abb. 3.9 und 3.14). Anhand des Wachstumsverlaufs der Ectoin-Produktion zeigte sich, dass Glycerin langsamer verbraucht wird als Glucose (vgl. Abb. 3.16 und 3.17), was eine Erklärung für die geringere Wachstumsrate ist und bereits für andere *E. coli*-Stämme beobachtet wurde (Holms, 1996; Martínez-Gómez *et al.*, 2012). Ein Grund könnte die Feedback-Inhibition der Glycerinkinase durch Fructose-1,6-bisphosphat sein, wodurch der Eintritt von Glycerin in den

zentralen Stoffwechsel verzögert wird. Denn mit einer Feedback-resistenten Glycerinkinase kann *E. coli* deutlich schneller mit Glycerin wachsen (Zwaig *et al.*, 1970). Weiterhin konnten Martínez-Gómez *et al.* für *E. coli* JM101 (K12-Derivat) zeigen, dass bei Anzucht mit Glycerin, neben dem glykolytischen Metabolismus, vor allem gluconeogenetische Enzyme, Gene der allgemeinen Stressantwort und der Glyoxylatzyklus hochreguliert sind. Dadurch ist das Wachstum langsamer, aber wahrscheinlich geht weniger Kohlenstoff in Form von CO₂ im Citratzyklus verloren, sondern kann über den Glyoxylatzyklus recycelt werden (Martínez-Gómez *et al.*, 2012).

Die extrazelluläre ADABA-Akkumulation, die deutlich bei Anzucht mit Glucose, aber kaum im Fall von Glycerin, auftrat (vgl. Abb. 3.14), könnte Folge eines Überflussmetabolismus gewesen sein (vgl. auch 4.2.2.14). Bei *E. coli* tritt ein Überflussmetabolismus häufig unter Bedingungen mit hoher Wachstumsrate auf und kommt durch ein Ungleichgewicht zwischen hoher Aufnahmerate der C-Quelle und limitierter Kapazität des oxidativen Stoffwechsels zustande (Han *et al.*, 1992; Holms, 1996). Eine hohe Aufnahmerate sowie ein erhöhter Stofffluss sind auch eine mögliche Erklärung für die höhere TBM- und geringere Ectoin-Produktion bei Wachstum mit Glucose statt Glycerin. Für die Glucose-Aufnahme wird PEP benötigt und in Pyruvat umgewandelt, wodurch weniger PEP für die Ectoin-Produktion zur Verfügung steht. Dadurch ist die Ectoin-Synthese eventuell verlangsamt und die C-Quelle wird vermehrt in Richtung Biomasse-Produktion gelenkt. Im Fall von Glycerin ist kein PEP für die Aufnahme nötig. Außerdem werden ein Überflussmetabolismus und eine Anhäufung von Intermediaten vermutlich durch die geringere Wachstumsrate unterbunden, so dass schlussendlich mehr C-Quelle in die Ectoin-Produktion fließt.

Glutamat Glutamat hatte keinen positiven Einfluss auf die heterologe Ectoin-Produktion. Mit Glycerin bzw. Glucose als Kosubstrat wurden nur 20 bis 30 % des eingesetzten Glutamats aufgenommen. Für *E. coli* K-12 zeigte sich, dass der Glutamat-Transport Na⁺- und K⁺-Ionen benötigt und die Affinität des Aufnahmesystems durch Erhöhung der Na⁺-Konzentration deutlich gesteigert wird (Halpern *et al.*, 1973). Bei Anzucht von *E. coli* pASK_ectABCD_m mit Glutamat war kein NaCl im Medium enthalten. Na⁺-Ionen wurden nur in Form von Na-Glutamat bereitgestellt, was eventuell der Grund für die verminderte Glutamat-Aufnahme sein könnte. In Kombination mit Lactat wurden 40 % Glutamat aufgenommen, was mit einer höheren Na⁺-Konzentration, in Form von Na-Lactat, zusammenhängen könnte. Außerdem konnte für Lactat ein stimulierender Effekt auf die Glutamat-Aufnahme beobachtet werden (Lombardi & Kaback, 1972).

Aspartat Bei Wachstum mit Glycerin in Kombination mit Aspartat wurden nur etwa 20 % der Aminosäure aufgenommen. *E. coli* K-12 besitzt mind. zwei Aufnahmesysteme für Aspartat (Kay, 1971), für die unter den gegebenen Produktionsbedingungen jedoch kein inhibitorischer Effekt zu erwarten war. Trotz der verminderten Aspartat-Aufnahme und somit einem geringeren Verbrauch an C-Quelle, erreichte *E. coli* pASK_ectABCD_m einen etwas höheren extrazellulären Solutgehalt als bei Wachstum mit der gleichen Menge Glycerin als einziger C-Quelle (vgl. Abb. 3.13). Für die Kombination von Glycerin und Aspartat ist somit auch der Ertrag der produzierten Solute pro g verbrauchter C-Quelle mit 0,44 g/g höher als nur mit Glycerin (0,33 g/g). Demzufolge hatte

Aspartat einen stimulierenden Effekt auf die heterologe Ectoin-Produktion in *E. coli*, was bereits für andere Produktionssysteme demonstriert werden konnte (He *et al.*, 2015; Czech *et al.*, 2018). Allerdings wurde neben Ectoin auch ADABA extrazellulär akkumuliert und machte mit 15 % einen relativ hohen Anteil am Solutgehalt aus (vgl. Abb. 3.13). Außerdem ist Aspartat als Substrat im Hinblick auf die industrielle Ectoin-Produktion deutlich teurer als Glycerin.

4.2.2.8 C-Bilanz (total) und Ertrag des heterologen Produktionssystems

Bei Anzucht in MM63-0,5 mit Glycerin erreichte *E. coli* pASK_ectABCD_m gegenüber *E. coli* pASK_ectABCD_{ask} eine etwas höhere extrazelluläre Solutkonzentration (10,8 mM Ectoin vs. 10,0 mM Hydroxyectoin), aber eine etwas niedrigere TBM (0,62 vs. 0,72 g/L). Daher ergaben sich annähernd gleiche Werte für den Ertrag und die C-Bilanz (vgl. Tab. 3.1 und 3.2), wobei für die Berechnung ein Kohlenstoffgehalt von 48 % in der TBM von *E. coli* angenommen wurde (Folsom & Carlson, 2015). Entsprechend der C-Bilanz (total) sind 58 bzw. 59 % des eingesetzten Kohlenstoffs in TBM und extrazelluläre Solute geflossen. Daraus kann geschlossen werden, dass die restlichen 42 bzw. 41 % der C-Quelle für die Energiegewinnung erforderlich waren und in Form von CO₂ freigesetzt wurden. Der Kontrollstamm *E. coli* pASK-IBA3, der keine Ectoine produzieren kann, hat unter den gleichen Bedingungen 1 g TBM aus 2,66 g Glycerin gebildet. Demnach sind 46 % Kohlenstoff in TBM und 54 % in die Energiegewinnung geflossen, was verdeutlicht, dass die Produktion und Sekretion der Ectoine weniger Energie benötigen als der Aufbau der Biomasse. Dies spiegelt sich auch im Ertrag der produzierten TBM und Ectoine pro g C-Quelle wider, der bei *E. coli* pASK-IBA3 mit 0,38 g/g deutlich geringer ausfällt als beim Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Produzenten ($Y_{(X+E)/S}$ von 0,46 bzw. $Y_{(X+H)/S}$ von 0,49 g/g).

In dieser Arbeit wurden keine Wachstumsdaten zu *E. coli* DH5 α ohne Plasmid aufgenommen. Aber Martínez-Gómez *et al.* (2012) haben das Wachstum von *E. coli* JM101, ebenfalls ein K12-Derivat, in M9-Medium mit Glycerin untersucht, was als Vergleich herangezogen werden kann. *E. coli* JM101 hat 1 g TBM aus 2,22 g Glycerin generiert, was einem Ertrag von 0,45 g/g und einem Anteil von 55 % des eingesetzten Kohlenstoffs in der TBM entspricht. Demzufolge waren 45 % der C-Quelle für die Energiegewinnung notwendig. Ertrag und C-Bilanz entsprechen etwa denen von *E. coli* pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCD_{ask}, obwohl bei diesen Stämmen ein zusätzlicher Energiebedarf aufgrund der Aufrechterhaltung des Plasmids zu erwarten ist. Dies könnte auch mit dem geringeren Energieverbrauch bei der Synthese der Ectoine verglichen mit der TBM-Produktion zusammenhängen. Der Vergleich von *E. coli* JM101 ohne Plasmid und *E. coli* pASK-IBA3 zeigt jedoch, dass das Plasmid und die Selektion durch das Antibiotikum eine Belastung für die Zelle sind und sich negativ auf den Ertrag auswirken können. Aus mehreren Studien ist bekannt, dass bei Plasmid-tragenden *E. coli*-Stämmen durch die Aufrechterhaltung des Plasmids der als *metabolic burden* bezeichnete Effekt auftritt und zu einer verringerten Wachstumsrate und Biomasse führt (Seo & Bailey, 1985; Bentley *et al.*, 1990; Rozkov *et al.*, 2004; Ow *et al.*, 2006).

Der theoretisch maximale Ertrag, der bei der Umwandlung von zwei Molekülen Glycerin ($2 \times 92,1 \text{ g/mol}$) zu einem Molekül Ectoin ($142,2 \text{ g/mol}$) bzw. Hydroxyectoin ($158,2 \text{ g/mol}$) erreicht werden kann, beträgt $0,77 \text{ g/g}$ im Fall von Ectoin und $0,86 \text{ g/g}$ für Hydroxyectoin. Für den Ertrag an Ectoin bzw. Hydroxyectoin bezogen auf die eingesetzte C-Quelle ($Y_{E/S}$, $Y_{H/S}$) ergab sich ein Wert von $0,33 \text{ g/g}$ im Fall des Ectoin-Produzenten und $0,34 \text{ g/g}$ beim Hydroxyectoin-Produzenten. Der Ertrag entspricht somit 43 bzw. 40 % des theoretischen Maximums und ist relativ hoch, wenn bedacht wird, dass aus der eingesetzten C-Quelle auch TBM gebildet wurde und Energie für die allgemeinen zellulären Prozesse erforderlich war. Um den Ertrag an Ectoinen unabhängig von diesen Faktoren einschätzen zu können, wurde die separate C-Bilanz für die Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Produktion berechnet (vgl. 4.2.2.9).

4.2.2.9 Energiebilanz und separate C-Bilanz der Ectoin- und Hydroxyectoin-Produktion

Wenn die Ectoin-Synthese separat vom restlichen Metabolismus betrachtet wird, sind ein Aspartat, das über Oxalacetat bereitgestellt werden kann, ein Acetyl-CoA, ein ATP, ein NADPH und zweimal Glutamat als Aminogruppendonor erforderlich (vgl. Abb.1.1). Dabei werden Oxalacetat und Acetyl-CoA aus einer Glucose bzw. zwei Molekülen Glycerin gebildet.

H. elongata Für den natürlichen Ectoin-Produzenten *H. elongata* wurde anhand von kalorimetrischen Messungen gezeigt, dass die Umwandlung von Glucose zu Ectoin in etwa ausgeglichen ist und somit ein Ertrag von nahezu 100 % erreicht werden kann (Maskow & Babel, 2001). Schwibbert *et al.* (2011) haben basierend auf der genomischen Annotation von *H. elongata* sogar den Gewinn von einem ATP pro Ectoin postuliert. Dies wäre möglich, wenn Glucose über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP-Weg) abgebaut wird, Oxalacetat mittels Malatenzym sowie Malat-Dehydrogenase aus Pyruvat entsteht (anaplerotische Reaktion) und Stickstoff via Glutamat-Dehydrogenase (Glutamat-DH) gebunden wird. Durch das kürzlich veröffentlichte Modell zur Osmoregulation in *H. elongata*, das u.a. auf Proteomanalysen bei verschiedenen Salinitäten beruht, konnte dieser Syntheseweg jedoch nicht bestätigt werden (Kindzierski *et al.*, 2017). Bei Salzstress, wenn die Ectoin-Synthese induziert wird, ist der Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg) statt dem EMP-Weg hochreguliert, das Malat-Enzym ist nicht anaplerotisch wirksam und die Glutamat-DH ist nicht hochreguliert. Alternativ könnte Glutamat durch Kombination von Alanin-Dehydrogenase und Alanin-Transaminase bereitgestellt werden und Oxalacetat durch Carboxylierung von Pyruvat via Oxalacetat-Decarboxylase entstehen. Dann wäre nur die Energie für den Export von zwei Na^+ -Ionen nötig (ca. $0,5 - 1 \text{ ATP}$), die in Verbindung mit der Carboxylierung ins Cytoplasma gelangen. Demnach ist unter bestimmten Voraussetzungen weniger als ein ATP für die Ectoin-Synthese aus Glucose erforderlich und somit ein Ertrag nahe 100 % möglich.

E. coli Im Vergleich zu *H. elongata* wird im Zuge der Ectoin-Synthese in *E. coli* mehr NADH gebildet, aber auch mehr NADPH benötigt (vgl. Abb. 4.3), weshalb die Synthese nicht so effizient sein kann. Zum einen besitzt *E. coli*, anders als *H. elongata*, eine NADP-abhängig Glutamat-DH.

Zum anderen wird in *E. coli* Glucose primär über den EMP-Weg abgebaut, während der ED-Weg, bei dem NADPH gebildet wird, dem Abbau von Zuckersäuren, z.B. Gluconat, dient (Klingner *et al.*, 2015; Peekhaus & Conway, 1998).

Ectoin-Synthese aus Glucose Der Abbau der Glucose zu Pyruvat über den EMP-Weg liefert zwei ATP sowie zwei NADH und bei der Oxidation von einem Pyruvat zu Acetyl-CoA entsteht ein weiteres NADH (vgl. Abb. 4.3). In *E. coli* ist keine direkte Umwandlung von Pyruvat zu Oxalacetat möglich, da weder eine Pyruvat-Carboxylase noch eine Oxalacetat-Decarboxylase vorhanden ist. Die Synthese mittels des Malat-Enzyms ist unwahrscheinlich, weil die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat unter physiologischen Bedingungen begünstigt ist (Sauer & Eikmanns, 2005). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Oxalacetat mittels der PEP-Carboxylase aus PEP gebildet wird, wodurch ein ATP weniger in der Glykolyse entsteht. Unter der Annahme, dass Stickstoff in hoher Konzentration vorliegt und mittels der Glutamat-DH gebunden wird, werden bei der Umwandlung von Glucose zu Ectoin drei NADPH verbraucht und die gleiche Menge NADH generiert (vgl. Abb. 4.3). Für eine ausgeglichene Bilanz ist daher zumindest die Energie zur Regeneration von NADPH aus NADH erforderlich, wobei verschiedene Energie-abhängige Wege für die NADPH-Regeneration in Betracht kommen (Spaans *et al.*, 2015). Im günstigsten Fall könnte eine direkte Umwandlung von NADH zu NADPH mittels einer membrangebundenen Transhydrogenase erfolgen, die an die Translokation von einem Proton pro NADPH (< 1 ATP) gekoppelt ist.

Ectoin-Synthese aus Glycerin Der für Glucose beschriebene Syntheseweg könnte auch auf Glycerin als C-Quelle zutreffen, wobei durch die Oxidation von Glycerin-3-phosphat zu DHAP zusätzlich zwei FADH_2 pro gebildetem Ectoin gewonnen werden (vgl. Abb. 4.3). Die Elektronen des FADH_2 werden von der Membran-assoziierten Glycerin-3-phosphat-DH (GlpD) direkt in die Atmungskette geschleust (Yeh *et al.*, 2008). Die zwei FADH_2 können bis zu vier ATP liefern, die zur Regeneration von NADPH genutzt werden könnten. Allerdings muss bei Wachstum mit Glycerin statt Glucose generell bedacht werden, dass zusätzlich gluconeogenetische Reaktionen zum Aufbau von C_6 - und C_5 -Zuckern nötig sind, die wiederum Energie verbrauchen.

separate C-Bilanz Zur Berechnung der C-Bilanz der Produktionsstämme für die Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Synthese unabhängig von der für die TBM-Produktion wurde der Kontrollstamm *E. coli* DH5 α pASK-IBA3 herangezogen, der unter den gleichen Bedingungen nur TBM produziert. Anhand der C-Bilanz des Kontrollstamms wurde ermittelt, wie viel Glycerin die Produktionsstämme für die gebildete TBM und damit verbunden für den Energiebedarf der Gluconeogenese, der Aufrechterhaltung des Plasmids sowie sonstiger zellulärer Prozesse benötigen haben. Aus der verbleibenden Menge der eingesetzten C-Quelle ergab sich die separate C-Bilanz für die heterologe Produktion der Ectoine (vgl. Tab. 3.1 und 3.2). Von dem Kohlenstoff waren 67 bzw. 66 % im Produkt enthalten. Neben den zwei theoretisch benötigten Molekülen Glycerin wurde demnach ein weiteres Glycerin pro Ectoin bzw. Hydroxyectoin verbraucht. Ein möglicher Grund für den höheren Energieverbrauch ist die Biosynthese der rekombinanten Proteine (EctABCD/Ask) und

der damit verbundene *metabolic burden*. Dieser ist u.a. von der Größe und Kopienzahl des Vektors sowie der Expressionsstärke abhängig (Glick, 1995), kann jedoch für das heterologe Produktionssystem nicht genau beziffert werden. Außerdem ist die Energiebilanz der Ectoin-Synthese in *E. coli* davon abhängig, auf welchem Weg das verbrauchte NADPH regeneriert wird. Zudem könnte der Energiebedarf höher ausfallen, wenn die Biosynthese unter den gegebenen Bedingungen anders als zuvor beschrieben abläuft. Bei einer geringen NH_4^+ -Konzentration im späten Wachstumsverlauf könnte die N-Assimilation eventuell nicht mehr mittels der Glutamat-DH erfolgen, die einen K_m -Wert von 1,1 mM für NH_4^+ hat (Sakamoto *et al.*, 1975). Stattdessen würde *E. coli* die Glutamin-Synthetase (K_m -Wert $< 0,2$ mM, Miller & Stadtman, 1972) in Kombination mit der Glutamat-Synthase (GS/GOGAT-System) nutzen, was zusätzlich ein ATP pro Glutamat kostet. Insgesamt ist der Ertrag von 66 %, der sich anhand der separaten C-Bilanz für die Synthese der Ectoine ergibt, unter Berücksichtigung der genannten Faktoren relativ hoch.

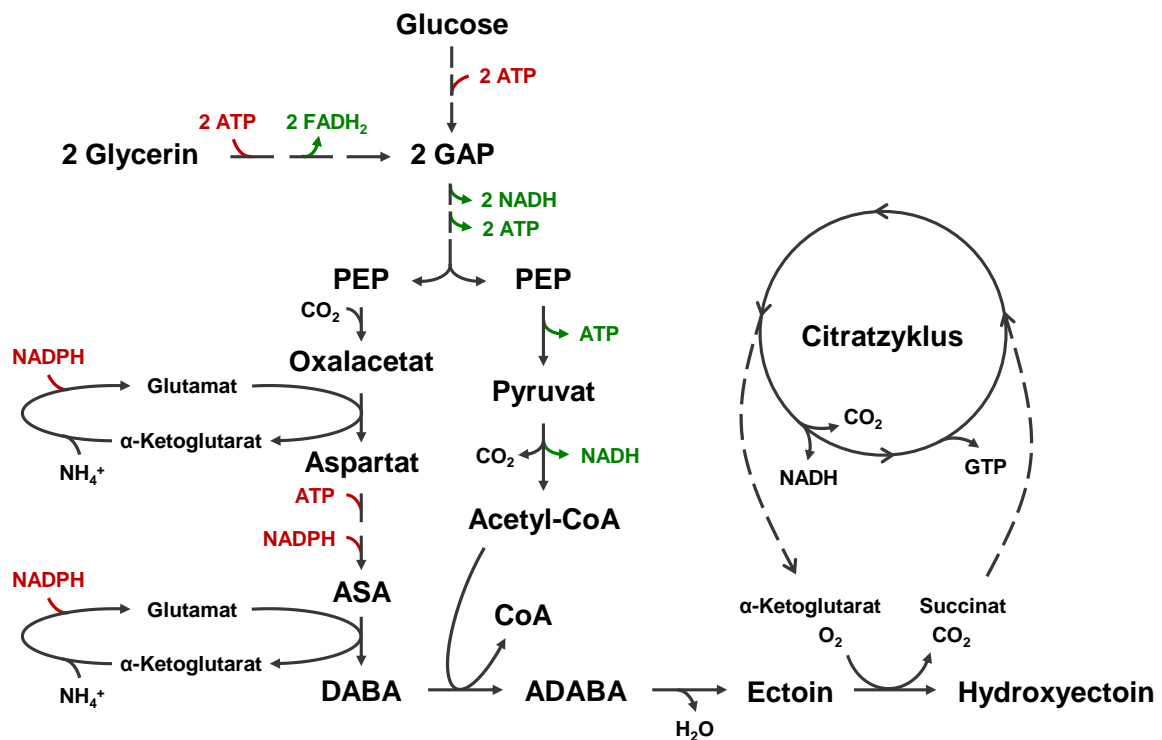


Abb. 4.3: Energiebilanz der Ectoin- und Hydroxyectoin-Synthese in *E. coli*

Unter der Annahme, dass die C-Quelle über den EMP-Weg abgebaut wird, Oxalacetat durch Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) entsteht und NH_4^+ via Glutamat-Dehydrogenase gebunden wird, ist bei der Ectoin-Synthese aus Glucose zumindest die Energie zur NADPH-Regeneration aus NADH erforderlich. Ausgehend von Glycerin können 2 FADH_2 pro gebildetem Ectoin in die Atmungskette einfließen. Bei der Hydroxyectoin-Synthese werden 1 GTP und 1 NADH weniger im Citratzyklus gebildet als im Fall von Ectoin, wenn angenommen wird, dass α -Ketoglutarat aus dem Citratzyklus bereitgestellt wird und in Form von Succinat zurückfließt. GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, ASA: Aspartat- β -semialdehyd

Vergleich zwischen Ectoin und Hydroxyectoin Die C-Bilanz für die Produktion von Ectoin und Hydroxyectoin war nahezu identisch, obwohl im Fall von Hydroxyectoin ein weiterer Reaktionsschritt mittels EctD und α -Ketoglutarat sowie O_2 als Kosubstrate erforderlich ist. Wenn davon ausgegangen wird, dass α -Ketoglutarat aus dem Citratzyklus bereitgestellt wird und in Form von Succinat wieder einfließt, werden bei der Hydroxyectoin-Synthese ein GTP und ein NADH weniger

generiert als im Fall von Ectoin (vgl. Abb. 4.3). Von den drei benötigten Glycerin-Molekülen werden zwei in Ectoin bzw. Hydroxyectoin umgewandelt und das dritte Glycerin liefert bei vollständiger Oxidation zu CO_2 im Citratzyklus 21 ATP im Fall von Ectoin und 17 ATP bei Hydroxyectoin. Diese Werte ergeben sich unter der Annahme, dass drei ATP pro NADH und zwei ATP pro FADH_2 in der Atmungskette generiert werden.

Um einschätzen zu können, inwiefern sich der Unterschied von vier ATP auf die gesamte Energiebilanz auswirkt, muss die TBM-Produktion miteinbezogen werden. Entsprechend der C-Bilanz für die TBM-Produktion sind ca. 50 % der eingesetzten C-Quelle in die TBM geflossen und das restliche Glycerin wurde veratmet. Wenn wie bei der Produktion der Ectoine von drei Glycerin ausgegangen wird, wären somit 1,5 Glycerin in der TBM enthalten und 1,5 Glycerin würden durch vollständige Oxidation im Citratzyklus 31,5 ATP liefern. Tatsächlich zeigen die C-Bilanzen, dass TBM und Ectoine nicht zu gleichen Teilen produziert wurden. Bei *E. coli* pASK_ectABCDask sind 40 % und beim Ectoin-Produzenten sogar nur 35 % der eingesetzten C-Quelle in den Aufbau der TBM geflossen, während der Rest für die Produktion der Ectoine verwendet wurde (vgl. Tab. 3.1 und 3.2). Demnach lässt sich für den Ectoin-Produzenten abschätzen, dass ausgehend von sechs Glycerin 22 ATP im Zuge der TBM-Produktion und 27 ATP bei der Ectoin-Synthese entstehen. Im Fall des Hydroxyectoin-Produzenten werden entsprechend rund 46 ATP gebildet, so dass der Unterschied nur etwa 6 % beträgt. Für die Mittelwerte der Solutkonzentration und TBM, die zur Berechnung der C-Bilanz herangezogen wurden, ergab sich eine Standardabweichung von 8 bis 11 %. Der Unterschied in der ATP-Produktion könnte daher wegen des experimentellen Fehlers nicht erkennbar sein.

4.2.2.10 N-Limitierung in MM63 durch erhöhten Bedarf an Stickstoff

Für die Berechnung der N-Bilanz der Produktionsstämme wurde ein C:N-Verhältnis von 48 zu 12 % in der TBM von *E. coli* angenommen (Folsom & Carlson, 2015). Bei Anzucht in MM63-0,5 mit Glycerin hatten *E. coli* pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCDask 90 bzw. 88 % der N-Quelle in der stationären Phase (C-limitiert) verbraucht (vgl. Tab. 3.1 und 3.2). Demnach wurde fast eine N-Limitierung erreicht. MM63 hat, genau wie in der TBM von *E. coli* angenommen, ein C:N-Verhältnis von ca. 4:1. Die Menge an Stickstoff sollte eigentlich ausreichend sein, da ein Anteil der C-Quelle auch für die Energiegewinnung benötigt wird. Unter der Annahme, dass 40 bis 50 % der C-Quelle in Form von CO_2 freigesetzt werden, sollte die Stickstoffmenge in MM63 sogar für etwa die doppelte Menge an C-Quelle ausreichen. Aber in MM63 mit doppelter Glycerin-Konzentration (C:N-Verhältnis von ca. 8:1) erreichte *E. coli* pASK_ectABCD_m eindeutig die N-Limitierung und 40 % der C-Quelle waren in der stationären Phase noch übrig. Gleichzeitig war die Produktion von Ectoin und TBM nur geringfügig höher als bei Wachstum in MM63 mit einfacher Glycerin-Konzentration (vgl. Abb. 3.18). Durch Zugabe einer höheren Menge an N-Quelle war hingegen eine Steigerung der Produktion von Ectoin und TBM möglich.

Der höhere Bedarf an Stickstoff kann dadurch erklärt werden, dass die Produktionsstämme deutlich mehr Ectoine als TBM gebildet haben, wobei ca. 80 % der N-Quelle in den extrazellulären Solutgehalt und 20 % in die TBM geflossen sind. Der Stickstoffanteil in Ectoin und Hydroxyectoin ist mit fast 20 % deutlich höher als in der TBM (ca. 12 %), so dass die Produktionsstämme mehr N-Quelle im Verhältnis zur C-Quelle benötigen haben als bei der Medienkonzeption angenommen wurde. Außerdem ist die Produktion der Ectoine mit einem geringeren Energiebedarf verbunden als der Aufbau der TBM (vgl. 4.2.2.8), wodurch insgesamt weniger C-Quelle für die Energiegewinnung verbraucht wurde und mehr C-Quelle für die Produktion der Solute und Biomasse zur Verfügung stand. Insgesamt haben die Ergebnisse der N-Bilanz gezeigt, dass das üblich verwendete MM63 mit einem C:N-Verhältnis von 4:1 nicht für das hier vorgestellte heterologe Produktionssystem geeignet ist. Durch den erhöhten Stickstoffbedarf im Zuge der Produktion der Ectoine ist für die Kultivierung der Produktionsstämme ein Medium mit einem C:N-Verhältnis von 3:1 entsprechend dem in Ectoin bzw. Hydroxyectoin besser geeignet, um eine frühzeitige N-Limitierung und Einschränkung der Produktionsleistung zu vermeiden.

4.2.2.11 Spezifische Produktivität des heterologen Produktionssystems

Mit dem hier vorgestellten Produktionssystem konnte unter optimierten Bedingungen im Schüttelkolben eine hohe extrazelluläre Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Konzentration (≥ 10 mM) in weniger als 20 Stunden nach Induktion erreicht werden. Gleichzeitig fiel die TBM-Produktion relativ gering aus. Daraus resultieren hohe spezifische Produktivitäten, wobei das Maximum in der mittleren bis spät exponentiellen Phase erzielt wurde. Für die Ectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m konnte eine maximale spezifische Produktivität von 352,9 mg/(g TBM x h) bei Anzucht in MM63-0,5 mit Glycerin erreicht werden. Unter anderen Wachstumsbedingungen (0,25 % NaCl bzw. Glucose) lag die Produktivität in der gleichen Größenordnung. Für die Hydroxyectoin-Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_{ask} ergab sich in MM63-0,5 mit Glycerin eine spezifische Produktivität von 202,8 mg/(g TBM x h). Hierbei konnte die Produktivität aufgrund weniger Datenpunkte nur für die früh exponentielle Phase ermittelt werden und ist daher sehr wahrscheinlich unterbestimmt.

Ein weiterer Grund für die geringere spezifische Produktivität ist, dass der Hydroxyectoin-Produzent weniger Solute und mehr Biomasse produziert hat als der Ectoin-Produzent, wodurch der extrazelluläre Solutgehalt bezogen auf TBM niedriger ausfiel (vgl. 4.2.2.5). Außerdem konnte für das Wachstum mit Glycerin tendenziell eine langsamere Zunahme der extrazellulären Hydroxyectoin-Konzentration gegenüber der Ectoin-Konzentration beobachtet werden (nicht gezeigt), was ebenfalls in einer geringeren Produktivität resultiert. Weitere Experimente zum Produktionsverlauf mit *E. coli* pASK_ectABCD_{ask} unter den optimierten Bedingungen wären hilfreich, um diese Beobachtung zu bestätigen und die maximale spezifische Produktivität genauer zu bestimmen.

4.2.2.12 Plasmidstabilität des Produktionssystems

Das Produktionssystem basiert auf einem Expressionsvektor mit Ampicillinresistenz. Durch den Selektionsmarker soll das Wachstum Plasmid-freier Zellen unterbunden und die Plasmidstabilität aufrechterhalten werden, die einen großen Einfluss auf die Produktivität haben kann. Der verwendete *E. coli*-Stamm DH5 α ist anders als der Wildtyp K-12 *recA*-defizient, wodurch die Rekombination der Plasmid-DNA verhindert wird und die Plasmidstabilität erhöht werden kann (Casali, 2003; Marisch *et al.*, 2013). Das Enzym β -Lactamase dient als Selektionsmarker und verleiht die Resistenz gegenüber Ampicillin und anderen β -Lactam-Antibiotika, indem es ins Periplasma transportiert wird und das Antibiotikum durch Hydrolyse des β -Lactam-Rings inaktiviert (Sykes & Matthew, 1976). Durch den fortlaufenden Abbau des Antibiotikums ist es jedoch möglich, dass Zellen ohne Plasmid überleben. Diese können aufgrund der höheren Wachstumsrate gegenüber den Plasmid-tragenden Zellen im Wachstumsverlauf zunehmen (Diaz Ricci & Hernández, 2000), was die Plasmidstabilität und heterologe Produktion reduzieren kann.

Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurde Carbenicillin statt Ampicillin verwendet, das stabiler gegenüber der Hydrolyse durch β -Lactamasen ist (Sykes & Matthew, 1976). Zudem wurden die Vorkulturen zentrifugiert und die Zellen vom Medienüberstand mit möglicherweise aktiver β -Lactamase getrennt, bevor sie für die Produktion eingesetzt wurden. Bei der Fermentation wurde Carbenicillin im Wachstumsverlauf erneut zugegeben.

In dieser Arbeit wurden Kulturproben aus der stationären Phase auf das Vorhandensein der Expressionsvektoren durch Extraktion der Plasmid-DNA und Agarosegelelektrophorese überprüft (vgl. Abb. 3.33). Die Plasmid-DNA konnte nachgewiesen werden, jedoch war keine Aussage über den Anteil der Plasmid-tragenden Zellen an der Gesamtzellzahl möglich. In einem anderen Experiment zur Plasmidstabilität des Produktionssystems wurden Kulturproben zu verschiedenen Zeitpunkten auf Agarplatten mit bzw. ohne Carbenicillin ausgestrichen, um das Verhältnis von Plasmid-tragenden Zellen zur Gesamtzellzahl zu bestimmen (Bethlehem unveröffentlicht). Dabei konnte tendenziell eine Abnahme der Plasmid-tragenden Zellen im Wachstumsverlauf festgestellt werden, wobei 20 Stunden nach Induktion noch 60 % Plasmid-tragende Zellen in der Kultur vorhanden waren.

Die Plasmidstabilität und somit auch die Produktivität könnten eventuell durch einen anderen Selektionsmarker gesteigert werden. Die Selektion mit Tetracyclin hat gegenüber Carbenicillin den Vorteil, dass der Resistenzmechanismus nicht auf dem Abbau des Antibiotikums beruht, sondern auf aktivem Transport aus der Zelle. Korpimäki *et al.* (2003) haben bei einem direkten Vergleich beobachtet, dass Tetracyclin in der Kultur deutlich stabiler ist als Carbenicillin. Dadurch kann das Wachstum Plasmid-freier Zellen reduziert werden. Alternativ zu einer Antibiotikaresistenz könnte die Plasmidstabilität durch ein Toxin/Antitoxin-System, z.B. das Hok/Sok-System (Gerdes, 1988), oder eine Stoffwechsel-abhängige Selektion gewährleistet werden. Für das verwendete Produktionssystem würde sich die Thiamin-Auxotrophie von *E. coli* DH5 α anbieten. Damit verbunden wäre bei der Anzucht in Minimalmedium die Zugabe der Vitaminlösung nicht mehr nötig.

4.2.2.13 Aktivität und Gleichgewichtsreaktion der Ectoinsynthese

Aktivität von EctC Unter manchen Produktionsbedingungen konnte neben Ectoin auch ADABA in signifikanten Mengen im Medium nachgewiesen werden (vgl. 4.2.2.14). EctC katalysiert die intramolekulare Kondensation von ADABA zu Ectoin, weshalb die extrazelluläre ADABA-Akkumulation auf eine fehlende oder zu geringe Aktivität von EctC zurückzuführen sein könnte. Der Aktivitätstest mit Rohextrakten der Produktionsstämme aus der stationären Phase zeigte, dass EctC unter den getesteten Bedingungen grundsätzlich noch aktiv war (vgl. Abb. 3.34). Trotz Nachweis der Aktivität könnte EctC jedoch ein limitierender Faktor bei der Ectoin-Produktion gewesen sein, wenn die Aktivität bzw. Proteinmenge geringer war als die von EctA und EctB, durch deren Reaktionen ADABA bereitgestellt wird. Ein Vergleich der Enzymaktivität ist wegen fehlender Informationen zu den Aktivitäten von EctA und EctB nicht möglich. Anhand der SDS-PAGE des löslichen Zellproteins kann keine eindeutige Aussage über die Proteinmenge getroffen werden. Aber bei *E. coli* pASK_ectABCD_m und pASK_ectAB-C war die mutmaßliche EctC-Bande in den Proben der stationären Phase schwächer ausgeprägt als die Proteinbanden von EctA und EctB, was auf weniger aktives EctC hindeutet und ein Grund für die Anhäufung von ADABA wäre (vgl. Abb. 3.24).

Die geringere Proteinmenge könnte mit einem schnelleren Abbau von EctC oder einer niedrigeren Translationsrate erklärt werden. Andererseits könnten sich auch die Transkriptionsraten der Gene *ectABC* unterscheiden, selbst wenn diese als Operon ausgehend von einem Promotor transkribiert werden. Das Phänomen, dass die Expression der weiter vom Promotor entfernt liegenden Gene eines Operons geringer ist als bei den nahe des Promotors gelegenen Gene wird als *natural polarity* bezeichnet und wurde u.a. für das Lactose-Operon von *E. coli* (*lacZYA*) beobachtet (Zabin & Fowler, 1970). Dabei zeigte sich, dass drei- bis fünfmal mehr β -Galactosidase (LacZ) als β -Galactosid-Transacetylase (LacA) produziert wird. Ursache dafür scheinen eine häufigere Translationsinitiation im Fall von *lacZ* und ein schnellerer Abbau der *lacA*-mRNA zu sein (Kennell & Riezman, 1977). Für das Galactose-Operon von *E. coli* konnten unterschiedlich lange mRNA-Moleküle identifiziert werden und damit verbunden ein Gradient der mRNA-Konzentration, der vom Promotor zum 3'-Ende des Operons abnimmt und wahrscheinlich durch Termination der Transkription zustande kommt (Lee *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). Eine Quantifizierung der mRNA der Gene *ectABC* war im Zuge dieser Arbeit nicht möglich (vgl. 4.2.2.18). Diese könnte Aufschluss darüber geben, ob sich die Transkriptionsraten der Gene unterscheiden und somit einen Einfluss auf die Proteinmenge haben.

Gleichgewichtsreaktion von EctC Der Aktivitätstest zeigte, dass nach 30 Stunden Reaktionszeit, trotz schneller Umsetzung von ADABA zu Ectoin, noch 5 bis 6 % des Substrats im Reaktionsansatz enthalten waren (vgl. Abb. 3.34). Dies lässt auf eine Gleichgewichtsreaktion zu Gunsten von Ectoin schließen. Für EctC aus *H. elongata* konnte auch *in vitro* festgestellt werden, dass bei der Reaktion von ADABA zu Ectoin das Gleichgewicht fast vollständig auf Seiten des Ectoins liegt (Witt *et al.*, 2011). Zuvor wurde lange Zeit angenommen, dass die EctC-vermittelte Reaktion

irreversibel ist. Aber Witt *et al.* (2011) konnten anhand der Hydrolyse alternativer Substrate, z.B. ADPC und Homoeoctoin, eindeutig die Reversibilität von EctC nachweisen. Dabei ergab sich für das Reaktionsgleichgewicht zwischen Glutamin und ADPC ein Verhältnis von 80 zu 20 %. Für EctC aus *A. cryptum* konnten durch Aktivitätstests *in vitro* ebenfalls die Reversibilität und die Gleichgewichtsreaktion zwischen Glutamin und ADPC bestätigt werden (Moritz, 2012). Demzufolge ist die verbleibende ADABA-Menge im Reaktionsansatz sehr wahrscheinlich auf ein EctC-vermitteltes Gleichgewicht zwischen ADABA und Ectoin zurückzuführen, das mit einem Verhältnis von 1 zu 16 - 20 deutlich auf Seiten der zyklischen und stabileren Form liegt. Allerdings ist eine Wiederholung des Aktivitätstests, der in Einfachbestimmung durchgeführt wurde, notwendig, um dieses Ergebnis eindeutig zu bestätigen. Welchen Einfluss die Gleichgewichtsreaktion auf die heterologe Ectoin-Produktion und die extrazelluläre ADABA-Akkumulation haben könnte, wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

4.2.2.14 Extrazelluläre Akkumulation der Ectoin-Vorstufe ADABA

ADABA ist ein Intermediat der Ectoin-Biosynthese in Mikroorganismen. Zudem wurde ADABA in wenigen Pflanzenarten nachgewiesen (Liss, 1962; Fowden, 1972), wobei die Funktion nicht bekannt ist. Eine Akkumulation von ADABA wurde bisher nur in *C. salexigens* (Cánovas *et al.*, 1997) und *H. elongata* (Witt *et al.*, 2011) nach Deletion von *ectC* beschrieben. Dabei konnte ADABA als kompatibles Solut dienen und eine Salztoleranz vermitteln. In dieser Arbeit wurde ADABA mit *E. coli* pASK_ectAB erstmals in großen Mengen heterolog produziert und extrazellulär akkumuliert (13,2 mmol/g TBM, vgl. Abb. 3.22). Aber auch für die Ectoin-produzierenden Stämme war unter manchen Wachstumsbedingungen eine Akkumulation von ADABA im Medium zu beobachten. Die Problematik besteht darin, dass ADABA nicht von *E. coli* aufgenommen werden kann (Voß, 2002) und somit keine weitere Umsetzung zu Ectoin erfolgt, wodurch schlussendlich die Ectoin-Ausbeute geringer ausfällt. Außerdem ist im Hinblick auf die Produktgewinnung eine Trennung von Ectoin und ADABA erforderlich.

Verschiedene Faktoren könnten für die extrazelluläre ADABA-Akkumulation verantwortlich sein.

Aktivität von EctC Naheliegender wäre eine zu geringe Aktivität von EctC. Der Aktivitätstest hat gezeigt, dass EctC in der stationären Phase grundsätzlich noch aktiv ist, aber das Enzym könnte trotzdem der limitierende Faktor gewesen sein (vgl. 4.2.2.13). Dadurch würde ADABA intrazellulär akkumulieren und bei Überschreiten eines gewissen Schwellenwerts aus der Zelle geschleust werden. Dies trifft sehr wahrscheinlich auf den Produktionsstamm *E. coli* pASK_ectAB-C zu, für den sich ein sehr hoher extrazellulärer ADABA-Gehalt ergab, der durch Erhöhung der AHT-Konzentration und somit der Proteinmenge deutlich reduziert werden konnte (vgl. Abb. 3.22 und Kap. 4.2.2.17). Im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD_m und pASK_ectAB-RectC hatte eine Steigerung der AHT-Konzentration keinen Einfluss auf die heterologe Produktion. Unter den getesteten Bedingungen wurde jedoch kein bzw. kaum ADABA im Medium akkumuliert, so dass nicht unbedingt ein posi-

tiver Effekt zu erwarten war. Interessant wäre bei diesen Produktionsstämmen unter Bedingungen mit hoher ADABA-Akkumulation zu testen, ob diese durch Zugabe einer höheren AHT-Menge reduziert werden kann. Für *E. coli* pASK_ectAB-RectC, bei dem die Expression von *ectC* erhöht ist, ergab sich bei Anzucht mit Glucose ein deutlich geringerer ADABA-Gehalt als bei *E. coli* pASK_ectABCD_m unter denselben Wachstumsbedingungen (vgl. Abb. 3.28). Demnach kann in diesem Fall auch ein positiver Effekt durch die höhere EctC-Menge angenommen werden. Das lässt darauf schließen, dass bei *E. coli* pASK_ectABCD_m unter bestimmten Produktionsbedingungen die Kapazitätsgrenze von EctC überschritten wird.

Erhöhter Stofffluss Bei Anzucht mit Glycerin anstelle von Glucose akkumulierte *E. coli* pASK_ectABCD_m kaum bzw. kein ADABA im Medium (vgl. Abb. 3.14), weshalb die Aktivität von EctC nicht alleine der limitierende Faktor sein kann. Glucose wird von dem Produktionsstamm schneller verbraucht als Glycerin und führt zu einer höheren Wachstumsrate (vgl. 4.2.2.7), was häufig mit einem Überflussmetabolismus und der Anhäufung von Intermediaten verbunden ist (Han *et al.*, 1992; Holms, 1996). Demnach könnte bei Wachstum mit Glucose ein erhöhter Stofffluss in der Zelle vorliegen und zusätzlich eine Anhäufung von ADABA hervorrufen. Dies könnte auch eine Erklärung für die ADABA-Akkumulation unter anderen Produktionsbedingungen sein, die schnelles Wachstum fördern. Für die Anzucht mit Glutamat zeigte sich eine Korrelation zwischen der Zunahme der Wachstumsrate und des extrazellulären ADABA-Gehalts (vgl. Abb. 3.13). Bei der Fed-Batch-Fermentation und der Ganzzellbiokatalyse wurden hohe Konzentrationen von Glycerin eingesetzt und es kam zur Anhäufung von ADABA sowie Acetat. Demzufolge führt auch eine zu hohe Glycerin-Konzentration möglicherweise zu einem Ungleichgewicht im Stoffwechsel und dem Erreichen der Kapazitätsgrenze von EctC (vgl. 4.2.2.15 und 4.2.2.16).

Reaktionsgleichgewicht Ein weiterer Grund für die extrazelluläre ADABA-Akkumulation könnte das EctC-vermittelte Reaktionsgleichgewicht zwischen ADABA und Ectoin sein (vgl. 4.2.2.13). Wenn eine hohe Ectoin-Konzentration intrazellulär vorliegt, ist durch die Einstellung des Gleichgewichts automatisch auch die ADABA-Konzentration höher und letztendlich gelangt mehr ADABA ins Medium. Bei Wachstum von *E. coli* pASK_ectABCD_m mit Glucose und steigender NaCl-Konzentrationen ist die Korrelation zwischen der Zunahme des intrazellulären Ectoin-Gehalts, bedingt durch den Anstieg der osmotischen Konzentration, und der Zunahme des extrazellulären ADABA-Gehalts deutlich zu sehen (vgl. Abb. 3.14 und 7.1). Bei 1 % NaCl war auch mit Glycerin eine nennenswerte Akkumulation von ADABA zu beobachten und mit Glucose war der ADABA-Gehalt wesentlich höher als bei geringeren Salinitäten (vgl. Abb. 3.14). Unter diesen Bedingungen waren der intrazelluläre Ectoin-Gehalt und die Wachstumsrate am höchsten, so dass vermutlich das Reaktionsgleichgewicht im Zusammenspiel mit einem erhöhten Stofffluss und einer zu geringen EctC-Aktivität ausschlaggebend waren.

Die Ergebnisse zu *E. coli* pASK_ectABC_{dask} unterstützen die Annahme, dass das Reaktionsgleichgewicht zwischen ADABA und Ectoin einen Einfluss auf die extrazelluläre ADABA-Akkumulation hat. Bei *E. coli* pASK_ectABC_{dask} wird Ectoin mittels EctD zu Hydroxyectoin

umgesetzt und dem Gleichgewicht entzogen, da es sich bei der Hydroxylierung um eine irreversible Reaktion handelt. In Übereinstimmung damit konnte nur sehr wenig Ectoin intrazellulär detektiert werden (vgl. Abb. 7.1). Aufgrund des Gleichgewichts ist auch eine geringe ADABA-Konzentration im Cytoplasma anzunehmen, was schlussendlich ein Grund für die marginale extrazelluläre ADABA-Akkumulation im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD_{ask} sein könnte (vgl. Abb. 3.9). Der intrazelluläre Solutgehalt wurde mittels isokratischer HPLC bestimmt (vgl. 2.9.4), bei der wegen Signalüberlagerungen keine genaue Detektion und Quantifizierung von ADABA möglich war. Die Zellextrakte könnten mittels FMOC-ADAM-HPLC analysiert werden, um den intrazellulären ADABA-Gehalt eindeutig zu ermitteln und der Annahme nachzugehen, dass das Reaktionsgleichgewicht zwischen ADABA und Ectoin die intrazelluläre und extrazelluläre ADABA-Konzentration beeinflusst.

ADABA-Akkumulation trotz hoher EctC-Menge Entgegen den Erwartungen ergab sich für *E. coli* pASK_ectAB-RectC, trotz der sehr hohen EctC-Produktion und -Aktivität, ein extrazellulärer ADABA-Gehalt von 4 % (vgl. Abb. 3.28). Ein möglicher Grund wäre, dass die Ectoin-Produktion schneller war als der Ausstrom von Ectoin, wodurch die intrazelluläre ADABA-Konzentration angestiegen ist und ADABA ins Medium geschleust wurde. Auffällig ist jedoch, dass der extrazelluläre ADABA-Gehalt unabhängig von der AHT-Konzentration gleich war und das Verhältnis von ADABA zu Ectoin im Medium annähernd dem vermuteten Reaktionsgleichgewicht (1:16-20) entspricht. Daher wäre eine andere Erklärung, dass EctC ins Medium gelangt ist und das Gleichgewicht eingestellt hat. Die Ectoin-Konzentration im Medium lag mit rund 10 mM im Bereich des K_m -Werts von EctC, der im Fall des Enzyms von *H. elongata* 8-11 mM und bei EctC von *S. alaskensis* 5 mM beträgt (Ono *et al.*, 1999; Widderich *et al.*, 2016b). Außerdem war der intrazelluläre EctC-Gehalt von *E. coli* pASK_ectAB-RectC sehr hoch im Vergleich zu den restlichen Proteinen (vgl. Abb. 3.27) und EctC könnte durch lysierte Zellen oder in Folge eines steigenden osmotischen Drucks ins Medium gelangt sein. Schubert *et al.* (2007) konnten für ein vergleichbares Produktionssystem einen Anstieg des extrazellulären Proteingehalts von 0,4 auf 7 % nach Induktion mit AHT feststellen. Die Vermutung könnte überprüft werden, indem die Medienproben von *E. coli* pASK_ectAB-RectC mit ADABA versetzt und auf eine EctC-vermittelte Umsetzung zu Ectoin getestet werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass eine extrazelluläre ADABA-Akkumulation unterbunden werden kann, wenn die Ectoin-Konzentration in der Zelle gering ist (niedrige Osmolarität des Mediums) und sich kein ADABA durch eine zu hohe Wachstumsrate bzw. einen erhöhten Stofffluss anhäufen kann. Dies konnte mit *E. coli* pASK_ectABCD_m bei Anzucht mit Glycerin und einer geringen Salinität (0,25-0,5 % NaCl) erreicht werden.

4.2.2.15 Fed-Batch-Fermentation

Bei der Fermentation von *E. coli* pASK_ectABCD_m ergab sich aus der Anfangskonzentration von 50 mM Glycerin eine extrazellulärer Ectoin-Konzentration von 1,54 g/L, genau wie im Schüttelkolben. Im Fermenter wurde der Ectoin-Gehalt 12 Stunden und im Kolben ca. 19 Stunden nach Induktion erreicht (vgl. Abb. 3.19 und 3.16). Insgesamt konnte bei der Fed-Batch-Fermentation mit 4,21 g/L eine hohe Solutkonzentration im Medium erzielt werden, wobei Ectoin und ADABA im Verhältnis von etwa 1:1 vorlagen. Außerdem sind ca. 75 % der verbrauchten C-Quelle in Biomasse und extrazelluläre Solute geflossen, so dass mit 25 % deutlich weniger C-Quelle für die Energiegewinnung benötigt wurde als im Schüttelkolben (41 %). Das könnte auf die pH-Kontrolle, die höhere Stickstoffmenge im Medium und die bessere O₂-Versorgung bei der Fermentation zurückgeführt werden. Problematisch hingegen war, dass der Produktionsstamm nach ca. 20 Stunden Fermentation kaum noch Ectoin produziert hat und stattdessen ADABA und Acetat im Medium angehäuft wurden.

Acetat-Akkumulation Acetat könnte durch gemischte Säuregärung entstanden sein, falls die O₂-Versorgung nicht ausreichend war. Unter aeroben Bedingungen ist bei *E. coli* eine Sekretion von Acetat zu beobachten, wenn eine hohe Substratkonzentration und/oder hohe Wachstumsrate vorliegt. Dabei ist die Acetat-Produktion vom *E. coli*-Stamm abhängig (Luli & Strohl, 1990; Shiloach *et al.*, 1996). Die Anhäufung von Acetat ist auf einen Überflussmetabolismus zurückzuführen, der durch ein Ungleichgewicht zwischen einer hohen Aufnahmerate der C-Quelle und der limitierten Kapazität des oxidativen Stoffwechsels verursacht wird (Han *et al.*, 1992; Holms, 1996). Hierbei scheint vor allem eine Sättigung des Citratzyklus entscheidend zu sein (Han *et al.*, 1992; Veit *et al.*, 2007). Acetat kann das Wachstum, die Produktion von Biomasse und von rekombinanten Proteinen inhibieren, was sich auch negativ auf die Produktivität auswirkt (Shimizu *et al.*, 1988; Luli & Strohl, 1990; Jensen & Carlsen, 1990; Shiloach *et al.*, 1996). Genau wie andere schwache organische Säuren kann Acetat in der protonierten Form die Cytoplasmamembran passieren, im Cytoplasma aufgrund des höheren pH-Werts dissoziieren und als Entkoppler der protonenmotorischen Kraft wirken (Repaske & Adler, 1981).

Bei der Fed-Batch-Fermentation mit *E. coli* pASK_ectABCD_m könnte Acetat aufgrund einer zu schnellen Fütterung mit Glycerin und somit einer zu hohen Substratkonzentration angehäuft worden sein. Die Acetat-Konzentration im Medium stagnierte oder sank zwischenzeitlich (vgl. Abb. 3.19). Dies ist dadurch zu erklären, dass Acetat wieder aufgenommen wird und in den zentralen Stoffwechsel fließt, wenn die ursprüngliche C-Quelle kaum noch vorhanden ist (Kleman & Strohl, 1994; Wolfe, 2005). Ab einer Acetat-Konzentration von ca. 5 g/L ist der inhibitorische Effekt sichtbar, aber bereits in geringeren Konzentrationen hemmt Acetat das Wachstum und die Produktion (Luli & Strohl, 1990; Jensen & Carlsen, 1990). Demnach könnten die Wachstumsrate und Ectoin-Produktion durch die Akkumulation von Acetat (max. 1,7 g/L) beeinträchtigt worden sein, obwohl *E. coli* pASK_ectABCD_m weitergewachsen ist. Eine Möglichkeit, um die Anhäufung von Acetat zu minimieren, ist die Aufnahmerate der C-Quelle zu verringern (Han *et al.*, 1992;

Holms, 1996; Fuentes *et al.*, 2013). Im Fall der Fermentation von *E. coli* pASK_ectABCD_m könnte dies eventuell schon durch eine langsamere Zugabe von Glycerin erreicht werden.

ADABA-Akkumulation Die Akkumulation von ADABA, die auch unter manchen Wachstumsbedingungen im Schüttelkolben zu beobachten war, deutet darauf hin, dass die Kapazitätsgrenze von EctC überschritten wurde (vgl. 4.2.2.14). Allerdings zeigte sich bei der Produktion mit *E. coli* pASK_ectABCD_m in Batch-Kultur, dass ADABA parallel zu Ectoin im Medium akkumuliert wurde (vgl. Abb. 3.11 und 3.17). Bei der Fed-Batch-Fermentation hingegen stieg die extrazelluläre ADABA-Konzentration an, als der Stamm kaum noch Ectoin produzierte (vgl. Abb. 3.19). Das Ausbleiben der Ectoin-Produktion deutet darauf hin, dass kein aktives EctC mehr vorhanden war. Das Enzym könnte im Verlauf der Fermentation inhibiert worden sein oder die Inaktivität wurde eventuell durch den Mangel eines Cofaktors hervorgerufen. Für EctC von *S. alaskensis* konnte eine Metall-Abhängigkeit nachgewiesen werden, wobei sehr wahrscheinlich Eisen als Cofaktor dient (Widderich *et al.*, 2016b). Eisen müsste mit 10 mg/L in ausreichender Menge im Fermentationsmedium enthalten gewesen sein (10-fach höhere Menge als in MM63). Falls das aus *A. cryptum* stammende EctC ein anderes Metall als Cofaktor benötigt, könnte dies eine mögliche Erklärung für die Inaktivität sein, da dem Medium keine Spurenelementlösung zugegeben wurde.

EctA und EctB müssen noch aktiv gewesen sein, da ADABA weiter produziert wurde. Demzufolge könnte ein Mangel des Selektionsmarkers Carbenicillin oder des Induktors AHT nur dann als möglicher Grund für die fehlende Ectoin-Produktion in Betracht kommen, wenn die Enzyme EctA und EctB noch vorhanden waren, EctC hingegen nicht mehr. Das ist denkbar, wenn EctC in geringeren Mengen gebildet wird und/oder weniger stabil ist (vgl. 4.2.2.13). Carbenicillin und AHT wurden zwar während der Fermentation erneut zugegeben (nach 26 h), aber eventuell zu spät oder zu wenig, so dass die Plasmidstabilität und/oder Expression des *A. cryptum*-Genclusters nicht mehr gewährleistet war und kein neues EctC produziert werden konnte. Die Stabilität von AHT könnte bei der länger andauernden Fermentation relevant gewesen sein. Politi *et al.* (2014) haben festgestellt, dass AHT in Minimalmedium M9 bei pH 7 und 37 °C eine Halbwertszeit von ca. 15 Stunden hat. Außerdem ist AHT lichtempfindlich (Huang & Lindblad, 2013). Anders als die Batch-Kulturen im Kolben, die im Dunkeln kultiviert wurden, erfolgte die Fermentation unter Einfluss von Tageslicht, was den Abbau von AHT beschleunigt haben könnte.

Bei der Fed-Batch-Fermentation von *E. coli* zur heterologen Produktion einer humanen Prolyl-4-Hydroxylase konnte durch wiederholte Zugabe von AHT eine Verbesserung der Produktion erreicht werden (Neubauer *et al.*, 2007). Möglichkeiten zur Optimierung der Ectoin-Produktion mittels Fed-Batch-Fermentation wären somit eine höhere bzw. häufigere AHT-Zugabe und den Fermenter vor Licht zu schützen. Dabei sollte die minimale Hemmkonzentration für *E. coli* von 2 mg/L (Rasmussen *et al.*, 1991) nicht überschritten werden. Weiterhin könnte eine langsamere Glycerin-Fütterung ausprobiert werden, um der Anhäufung von ADABA und Acetat entgegenzuwirken. Zudem sollte eine Spurenelementlösung zugesetzt werden, um sicherzustellen, dass die als potenzielle Cofaktoren benötigten Spurenelemente in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

4.2.2.16 Ectoin-Produktion mit ruhenden Zellen

Das Produktionssystem wurde zur Ectoin-Produktion mit ruhenden Zellen anlehnend an die Arbeit von He *et al.* (2015) verwendet. He *et al.* haben durch Ganzzellbiokatalyse ausgehend von Aspartat und Glycerin in *E. coli* BW25113 (K-12-Derivat) mit dem *ectABC*-Gencluster aus *H. elongata* eine hohe extrazelluläre Ectoin-Konzentration im Schüttelkolben erreicht (2,7 g/L). Gegenüber der Methode von He *et al.* wurden einige Änderungen vorgenommen, aber der Reaktionspuffer enthielt die gleiche Aspartat- sowie Glycerin-Konzentration (je 100 mM) und wurde ebenfalls auf eine OD₆₀₀ von 5 eingestellt, so dass ein Vergleich möglich ist. In den ersten fünf Stunden verlief die Ganzzellbiokatalyse mit beiden Produktionsstämmen ähnlich. Für den Stamm von He *et al.* ergab sich nach vier Stunden eine extrazelluläre Ectoin-Konzentration von etwa 0,5 g/L, was einer Produktivität von 125 mg/(L x h) entspricht (vgl. Abb. 4.4). *E. coli* pASK_ectABCD_m hatte nach 4,75 Stunden eine fast doppelt so hohe Ectoin-Konzentration erreicht und die Produktivität fiel mit 200 mg/(L x h) 60 % höher aus (vgl. Abb. 3.20). Im weiteren Verlauf der von He *et al.* durchgeführten Ganzzellbiokatalyse blieb die Produktivität nahezu konstant. Nach 24 Stunden war eine Ectoin-Konzentration von 2,7 g/L (ca. 19 mM) im Reaktionspuffer vorhanden.

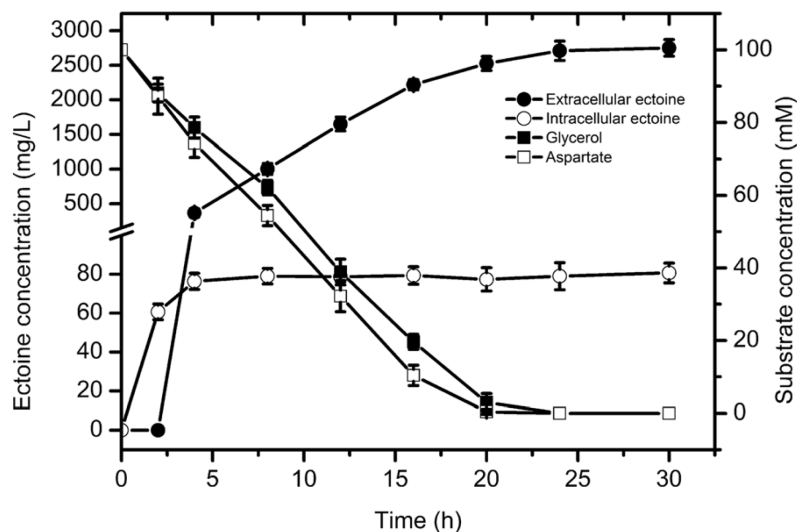


Abb. 4.4: Ganzzellbiokatalyse von Aspartat und Glycerin zu Ectoin (He *et al.*, 2015)

E. coli BW25113 mit dem *ectABC*-Gencluster aus *H. elongata* wurde verwendet. Die Ganzzellbiokatalyse erfolgte im Kolben mit Reaktionspuffer (100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7, 100 mM Aspartat, 100 mM Glycerin, 100 mM KCl) bei OD₆₀₀ 5, 30 °C und 200 rpm. Gezeigt sind der Verbrauch der Substrate Aspartat und Glycerin (mM) sowie der extrazelluläre und intrazelluläre Ectoin-Gehalt (mg/L).

Die Ganzzellbiokatalyse mit *E. coli* pASK_ectABCD_m hingegen geriet nach fünf Stunden ins Stocken (vgl. Abb. 3.20). Während die Ectoin-Konzentration nur noch langsam anstieg und nach 25 Stunden nahezu gleich blieb (10 mM), wurden ADABA (2,5 mM) und Glutamat (9 mM) im Reaktionspuffer akkumuliert. Außerdem konnten 20 mM Acetat nachgewiesen werden. Die ADABA-Akkumulation deutet darauf hin, dass die Kapazitätsgrenze von EctC überschritten wurde (vgl. 4.2.2.14). Die Anhäufung von Acetat könnte durch ein Ungleichgewicht im Stoffwechsel

und einen daraus resultierenden Überflussmetabolismus aufgetreten sein (Han *et al.*, 1992; Holms, 1996). Die Acetat-Konzentration im Reaktionsansatz könnte die ruhenden Zellen und die Ectoin-Produktion negativ beeinflusst haben. Die Tatsache, dass die Biokonversion trotz vorhandenem Substrat nachgelassen hat und nach 25 Stunden keine Umsetzung mehr zu beobachten war, könnte auch mit einer fehlenden Aktivität der rekombinanten Proteine zusammenhängen. Denn die Proteine wurden während der Ganzzellbiokatalyse nicht mehr produziert. Die unerwartete Akkumulation von Glutamat könnte durch einen Überschuss im Citratzyklus und die hohe Aspartat-Konzentration hervorgerufen worden sein. Weiterhin war überraschend, dass Aspartat mit der Zeit langsamer aufgenommen wurde und nach 40 Stunden immer noch 40 mM im Reaktionsansatz enthalten waren. Aspartat und Glutamat können ihre Aufnahme gegenseitig hemmen (Kay, 1971; Schellenberg & Furlong, 1977). Durch die wechselseitige Inhibition konnte *E. coli* pASK_ectABCD_m Aspartat eventuell nur noch eingeschränkt aufnehmen, was eine weitere Erklärung für das Nachlassen der Ectoin-Produktion wäre. Letztendlich war der Versuch, eine hohe Ectoin-Produktion durch Ganzzellbiokatalyse mit dem Produktionssystem zu erreichen, nicht erfolgreich. Die Biokonversion ausgehend von Aspartat wurde nicht weiterverfolgt, da die Aminosäure gegenüber anderen Substraten, z.B. Glycerin, relativ teuer ist und daher nicht für eine industrielle Produktion in Betracht kommt.

4.2.2.17 Steigerung der heterologen Expression von *ectC*

In dieser Arbeit wurden zwei alternative Vektoren zu pASK_ectABCD_m konstruiert, um eine Steigerung der Expression von *ectC* auf Transkriptions- und Translationsebene zu erreichen. Beim Vektor pASK_ectAB-C wird *ectC* unter Kontrolle eines separaten *tet*-Promotors exprimiert und im Fall von pASK_ectAB-RectC ist zusätzlich eine optimierte RBS stromaufwärts von *ectC* vorhanden. Im Vektor pASK_ectABCD_m befindet sich das *A. cryptum*-Gencluster unverändert stromabwärts des *tet*-Promotors. Hierbei konnte bisher nicht geklärt werden, ob die Transkription von *ectC* zusammen mit *ectA* und *ectB* ausgehend vom *tet*-Promotor erfolgt, da weder ein *ectABC*-Kotranskript nachgewiesen werden konnte noch potenzielle Promotoren vor *ectC* mittels bioinformatischer Datenanalyse identifiziert wurden (vgl. 4.2.2.18).

Durch den separaten *tet*-Promotor stromaufwärts von *ectC* könnte dessen Transkriptionsrate erhöht werden, falls *ectC* im Vektor pASK_ectABCD_m unter Kontrolle eines nativen Promotors aus *A. cryptum* steht. Im Fall eines *ectABC*-Kotranskripts wäre ebenfalls ein positiver Effekt zu erwarten, wenn die Transkription des Genclusters nicht immer vollständig beendet wird und dadurch weniger *ectC*-Transkripte vorliegen. Lee *et al.* (2008) konnten für das Galactose-Operon von *E. coli* zeigen, dass sich die mRNA-Menge der einzelnen Gene unterscheidet und dadurch wahrscheinlich die Expression der weiter vom Promotor entfernten Gene geringer ist (*natural polarity*). Bei *E. coli* pASK_ectAB-RectC sollte durch die hoch effiziente RBS aus dem Vektor pET-22b(+) die Expression von *ectC* auf Translationsebene gesteigert werden. Die RBS befindet

sich stromaufwärts des Startcodons in der mRNA und beinhaltet die SD-Sequenz, die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA ist. Die RBS ermöglicht die Bindung zwischen der 16S rRNA des Ribosoms und der mRNA (Shine & Dalgarno, 1974; Steitz & Jakes, 1975) und ist ein wichtiger Faktor für die Initiation der Translation und somit auch für die Translationsrate.

Die Expressionsvektoren unterscheiden sich nur in der Nukleotidsequenz unmittelbar vor *ectC*, während der Sequenzbereich von *ectAB* und dem stromaufwärts gelegenen *tet*-Promotor identisch ist. Daher ist anhand der Ergebnisse zu den Produktionsstämmen eine Schlussfolgerung über die Expression von *ectC* möglich.

***E. coli* pASK_ectAB-C** Mit dem Expressionsvektor pASK_ectAB-C fiel die heterologe Ectoin-Produktion deutlich geringer aus im Vergleich zu *E. coli* pASK_ectABCD_m und ADABA war in großen Mengen im Medium vorhanden (vgl. Abb. 3.22). Außerdem war die mutmaßliche EctC-Bande nur schwach ausgeprägt und die Intensität der Proteinbande nahm in den Proben der stationären Phase stärker ab als bei *E. coli* pASK_ectABCD_m (vgl. Abb. 3.24). Die verwendete Standardkonzentration des Induktors (0,2 µg/mL) sollte mehr als ausreichend sein, da eine vollständige Induktion und hohe Expression bereits bei einer AHT-Konzentration von 0,05 µg/mL erreicht wird (Lutz & Bujard, 1997). Trotzdem konnte im Fall von *E. coli* pASK_ectAB-C durch Erhöhung der AHT-Konzentration und somit der Menge an rekombinanten Proteinen die extrazelluläre ADABA-Konzentration deutlich reduziert und die Ectoin-Konzentration gesteigert werden. Dies lässt darauf schließen, dass bei dem Produktionsstamm die extrazelluläre ADABA-Akkumulation mit einer zu geringen Expression von *ectC* zusammenhängt (vgl. 4.2.2.14).

Die geringere *ectC*-Expression mit dem Vektor pASK_ectAB-C könnte darauf zurückzuführen sein, dass nicht mehr dieselbe RBS wie bei pASK_ectABCD_m stromaufwärts von *ectC* vorliegt, sondern die zusammen mit dem *tet*-Promotor eingebrachte RBS aus pASK-IBA3. Im Expressionsvektor pASK_ectABCD_m ist vor *ectC* die putative RBS aus *A. cryptum* mit der SD-Sequenz 5'-AAGGAG-3' vorhanden, die sehr ähnlich zur Consensus-Sequenz 5'-UAAGGAGGU-3' von *E. coli* ist (Gold, 1988). Außerdem umfasst der *spacer*, der Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon, sieben Nukleotide, was der für *E. coli* typischen Länge von 5 - 13 Nukleotiden entspricht (Gold, 1988). Demgegenüber hat pASK_ectAB-C mit 5'-GAG-3' eine kürzere SD-Sequenz und mit 35 Nukleotiden einen deutlich längeren *spacer* stromaufwärts von *ectC* (vgl. Tab. 4.1). Dies spiegelt sich auch in der theoretischen Ti-Rate für *ectC* wider, die im Fall von pASK_ectABCD_m 25 mal höher ist. Bei der Berechnung der theoretischen Ti-Rate mit dem RBS Calculator (Salis *et al.*, 2009; Espah Borujeni *et al.*, 2014) wird neben der RBS u.a. auch die Sekundärstruktur der mRNA miteinbezogen, die einen Einfluss auf die Effizienz der Translation haben kann.

Letztendlich könnte der Austausch der RBS in pASK_ectAB-C, trotz des *tet*-Promotors vor *ectC*, zu einer geringeren Expression und somit zur extrazellulären ADABA-Akkumulation geführt haben. Überraschend ist jedoch, dass dieselbe Sequenz aus *tet*-Promotor und RBS auch stromaufwärts von *ectA* vorliegt und die theoretische Ti-Rate mit einem relativen Wert von 5 noch geringer ausfällt. Denn eine Akkumulation von DABA, dem Substrat von EctA, konnte unter

keinen Produktionsbedingungen festgestellt werden. Demnach scheint EctA kein limitierender Faktor für die heterologe Ectoin-Produktion zu sein. Der Unterschied könnte durch die Position im Gencluster und deren Einfluss auf die Expression, die Enzymaktivität oder die Stabilität zustande kommen (vgl. 4.2.2.13).

Tab. 4.1: Vergleich der Expressionsvektoren im Hinblick auf die Translation von *ectC*

Angegeben sind die SD-Sequenz innerhalb der putativen RBS, der *spacer* (Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon) sowie die theoretische Translationsinitiations-Rate (Ti-Rate), die mit dem Online-Tool RBS Calculator bestimmt wurde.

Expressionsvektor	SD-Sequenz	<i>spacer</i> [Nukleotide]	Ti-Rate [relativer Wert]
pASK_ectABCD _m	5'-AAGGAG-3'	7	2694
pASK_ectAB-C	5'-GAG-3'	35	106
pASK_ectAB-RectC	5'-AAGGAG-3'	8	43951

***E. coli* pASK_ectAB-RectC** Im Expressionsvektor pASK_ectAB-RectC befindet sich stromaufwärts von *ectC* die SD-Sequenz 5'-AAGGAG-3' sowie ein *spacer* von acht Nukleotiden und die theoretische Ti-Rate ist wesentlich höher als bei den anderen beiden Vektoren (vgl. Tab. 4.1). Tatsächlich konnte mit pASK_ectAB-RectC die Expression von *ectC* deutlich gesteigert werden, was anhand der stark ausgeprägten EctC-Bande im Proteingel erkennbar war (vgl. Abb. 3.27). Im Vergleich zu pASK_ectAB-C konnte zudem der extrazelluläre ADABA-Gehalt auf ein Minimum reduziert werden (vgl. Abb. 3.28). Dies weist ebenfalls darauf hin, dass bei *E. coli* pASK_ectAB-C eine geringe Translation von *ectC* für die ADABA-Akkumulation verantwortlich ist. Im Vergleich zu *E. coli* pASK_ectABCD_m konnte bei Anzucht mit Glucose eine Steigerung der Ectoin-Produktion durch die erhöhte EctC-Menge erreicht werden (vgl. Abb. 3.27). Der stets vorhandene ADABA-Anteil von rund 4% kann nicht mit einer zu geringen EctC-Aktivität zusammenhängen, sondern muss eine andere Ursache haben, weil durch Erhöhung der AHT-Menge keine Reduzierung erreicht werden konnte (vgl. 4.2.2.14).

Bei Wachstum mit Glycerin war durch die gesteigerte *ectC*-Expression kein positiver Effekt auf die Ausbeute an Ectoin sichtbar (vgl. Abb. 3.27). Ein möglicher Grund könnte die N-Limitierung sein, die in dem verwendeten Medium nahezu erreicht wurde (vgl. 4.2.2.10). Des Weiteren hat die Überproduktion von EctC sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf das Wachstum und die Produktion von Ectoin sowie Biomasse. Nach Induktion mit AHT fiel die Wachstumsrate von *E. coli* pASK_ectAB-RectC etwas geringer aus. Außerdem zeigt sich anhand der C-Bilanz, dass nur 53% der C-Quelle in TBM und Ectoin geflossen sind. Demnach wurde mit 47% mehr C-Quelle für die Energiegewinnung benötigt als im Fall von *E. coli* pASK_ectABCD_m (41%). Beides deutet auf einen *metabolic burden* hin, dem *E. coli* pASK_ectAB-RectC durch die übermäßige EctC-Produktion ausgesetzt sein könnte. Durch eine hohe Produktion rekombinanter Proteine werden zusätzlich Energie und Rohstoffe benötigt, was häufig zu einem Ungleichgewicht im Stoffwechsel führt und sich auf die Physiologie der Wirtszelle auswirkt (Bentley *et al.*, 1990; Glick, 1995).

Schlussendlich ist eine hohe Menge an rekombinanten Proteinen nicht unbedingt von Vorteil, da der zusätzliche Bedarf an Ressourcen die Produktivität einschränken kann. Für *E. coli* pASK_ectABCD_m konnte unter den optimierten Produktionsbedingungen eine hohe Ectoin-Produktion und spezifische Produktivität erreicht werden, obwohl die rekombinanten Proteine nur schwach im Proteingel sichtbar waren.

4.2.2.18 RNA-Analyse des *ectABCDask*-Genclusters von *A. cryptum*

Mit der aus den *E. coli*-Stämmen extrahierten RNA war keine Aussage über die Transkription des *A. cryptum*-Genclusters möglich. Die cDNA-Ansätze ohne reverse Transkriptase (Negativkontrollen) zeigten bei der anschließenden Kontroll-PCR mit Primern für das *A. cryptum*-Gencluster und für das Vektorrückgrat entsprechende PCR-Produkte (vgl. Abb. 3.31). Dies lässt auf eine Kontamination der cDNA-Ansätze mit Vektor-DNA schließen. Im Widerspruch dazu konnte bei der PCR mit Gesamt-RNA als Template kein DNA-Produkt nachgewiesen werden. Der cDNA-Ansatz ohne RNA ergab auch kein PCR-Produkt, so dass eine Verunreinigung des cDNA-Synthese-Kits eigentlich ausgeschlossen werden kann. Andererseits zeigte sich für die Gesamt-RNA aus *A. cryptum* mit dem gleichen Kit ebenfalls ein PCR-Produkt beim cDNA-Ansatz ohne reverse Transkriptase, während dieses Problem mit einem anderen cDNA-Synthese-Kit nicht auftrat. Schlussendlich konnte nicht geklärt werden, wodurch die Kontamination in den cDNA-Ansätzen zustande gekommen ist.

Die Gesamt-RNA aus *A. cryptum* wurde in cDNA umgeschrieben, ohne dass eine Kontamination mit genomischer DNA festgestellt werden konnte. Für die PCR von *ectAB* und *ectABC* ergab sich kein PCR-Produkt (vgl. Abb. 3.32), was darauf hindeutet, dass die Gene nicht als Kotranskript vorliegen. Allerdings kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Kotranskripte gebildet wurden, aber bei der reversen Transkription nicht vollständig in cDNA umgeschrieben wurden und daher nicht mittels PCR nachweisbar waren.

Für die Bildung einer polycistronischen mRNA spricht, dass die nicht-codierenden Bereiche zwischen den einzelnen Genen im *A. cryptum*-Gencluster mit weniger als 40 bp sehr kurz sind (vgl. Abb. 7.4). Im Fall von *ectA/ectB* und *ectD/ask* überlappt das Stopcodon sogar mit dem nachfolgenden Startcodon (5'-ATGA-3'). Solche überlappenden Gene wurden in einigen Operons festgestellt, z.B. dem Tryptophan-Operon von *E. coli*, und können eine regulatorische Bedeutung haben (Oppenheim & Yanofsky, 1980; Normark *et al.*, 1983). Zwei potenzielle σ^{70} -abhängige Promotoren wurden stromaufwärts von *ectA* identifiziert (Moritz, 2012). Mit Hilfe der Online-Tools NNPP (Reese, 2001), BPROM (Solovyev & Salamov, 2011) und PromBase (Rangannan & Bansal, 2011) konnten keine Promotoren vor den anderen Genen gefunden werden. Dies weist auch darauf hin, dass das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* als Operon transkribiert wird. Jedoch wird bei den Online-Tools in erster Linie nach σ^{70} -Promotoren gesucht, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Erkennungssequenzen für andere σ -Faktoren im Gencluster vorhanden sind.

Für einige Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Gencluster wurde mittels Northern blot oder RT-PCR bestätigt, dass diese als Operon transkribiert werden. Dies trifft auf das *ectABCDask*-Gencluster von *P. stutzeri* (Stöveken *et al.*, 2011), das *ectABCask*-Gencluster von *Methylobacterium alcaliphilum* (Reshetnikov *et al.*, 2006) sowie auf die *ectABC*-Gencluster von *Bacillus pasteurii* (Kuhlmann & Bremer, 2002), *Virgibacillus sallexigens* (Bursy *et al.*, 2007) und *Virgibacillus pantothenticus* (Kuhlmann *et al.*, 2008) zu. In allen Fällen wird die Transkription osmotisch reguliert und geht meist von einem σ^{70} - bzw. σ^A -Promotor aus. Andererseits gibt es Vertreter, bei denen die transkriptionale Regulation des Genclusters komplexer ist. Calderón *et al.* (2004) konnten vor *ectA* von *C. sallexigens* zwei σ^{70} -abhängige Promotoren und einen σ^{38} -Promotor für die generelle Stressantwort identifizieren. Außerdem wurde ein σ^{32} -abhängiger Promotor stromaufwärts von *ectB* gefunden. Für das *ectABC*-Gencluster von *H. elongata* wurden die drei Einzeltranskripte sowie verschiedene Kotranskripte nachgewiesen (Stumpfe, 2003). In Übereinstimmung damit konnten ein σ^{70} - und ein σ^{38} -abhängiger Promotor vor *ectA*, ein σ^{32} -Promotor vor *ectB* sowie ein σ^{54} -Promotor vor *ectC* gefunden werden (Schwibbert *et al.*, 2011; Witt, 2011). Bisher wurden jedoch nur Transkriptionsstartpunkte stromaufwärts von *ectA* und *ectC* ermittelt.

Um aufzuklären, ob das *A. cryptum*-Gencluster als Operon transkribiert wird, müsste die RNA erneut mittels RT-PCR oder Northern Blot analysiert werden. Weiterhin könnten Transkriptionsstartpunkte im Gencluster gesucht werden, z.B. mittels 5'-RACE-PCR (Tillett *et al.*, 2000).

4.2.3 Vergleich bisheriger Produktionssysteme für Ectoin und Hydroxyectoin

Um die Leistung des hier vorgestellten Produktionssystems einordnen zu können, wurde es mit in der Literatur beschriebenen Produktionssystemen verglichen. Der Schwerpunkt wurde auf Produktionsstämme gelegt, die ebenfalls Ectoin bzw. Hydroxyectoin ins Medium sekretieren und nur wenig bzw. kein NaCl benötigen. Der Vergleich ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da sich die Produktionssysteme in einigen Aspekten unterscheiden, wie dem Wirts- und Donorstamm, dem Produktionsverfahren und der C-Quelle (vgl. Tab. 4.2). Zudem wird die Produktivität auf unterschiedliche Art und Weise in der Literatur angegeben. Ein Vergleich der volumetrischen Produktivität ist nicht sinnvoll, da mit *E. coli* pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCDask bisher noch keine Hochzelldichte-Fermentation etabliert wurde und die Biomasse pro Liter Batch-Kultur gering ausfällt. Außerdem wird bei der volumetrischen Produktivität nicht berücksichtigt, aus wie viel Biomasse die Ectoine produziert wurden und wie hoch der Verbrauch an C-Quelle war. Deshalb wurde die Biomasse-bezogene Produktivität für den Vergleich herangezogen. Dafür wurde anhand der Literaturangaben die maximale spezifische Produktivität ermittelt, also die höchste Zunahme der extrazellulären Solutkonzentration bezogen auf die entsprechende Zeitdifferenz und mittlere Biomasse. Zusätzlich wurde der Ertrag an Ectoin bzw. Hydroxyectoin bezogen auf die gesamte verbrauchte C-Quelle verglichen. Bei den verwendeten C-Quellen entspricht 1 g C-Quelle etwa 0,4 g Kohlenstoff, so dass ein direkter Vergleich des Ertrags möglich ist.

4.2.3.1 Vergleich der Ectoin-Produktion

Zur industriellen Produktion von Ectoin wird derzeit das moderat halophile Bakterium *H. elongata* eingesetzt (Kunte *et al.*, 2014). Dafür wurde das als *bacterial milking* bekannte Verfahren entwickelt (Sauer & Galinski, 1998). Hierbei wird Ectoin mittels Fermentation von *H. elongata* bei einer hohen Salinität (10 - 15 % NaCl) intrazellulär akkumuliert und anschließend durch einen hypoosmotischen Schock aus den Zellen gewonnen. Durch diese mehrmals wiederholbare Methode kann ein Ectoin-Gehalt von 155 mg/g TBM pro Zyklus erzielt werden (Sauer & Galinski, 1998). Darüber hinaus wurde eine sogenannte *leaky mutant* von *H. elongata* erzeugt, die aufgrund einer Mutation des Ectoin-Transporters TeaABC Ectoin ins Medium ausscheidet (Grammann *et al.*, 2002; Kunte *et al.*, 2002). Im Gegensatz zum *bacterial milking* ist die Ectoin-Produktion nicht vom intrazellulären Solutgehalt abhängig, wodurch weniger NaCl erforderlich ist. Außerdem wird die extrazelluläre Ectoin-Konzentration nicht länger durch die Zelldichte limitiert und die Produktreinigung ist vereinfacht (vgl. Abb. 1.3). Durch zusätzliche Deletion des Gens *doeA* (*super-leaky mutant*) ist der Abbau von Ectoin in *H. elongata* nicht mehr möglich und die Produktivität kann im Vergleich zur *leaky mutant* um das Dreifache gesteigert werden (Kunte *et al.*, 2014). Jedoch werden in der Literatur keine konkreten Werte für die Produktivität angegeben.

Zhang *et al.* (2009) haben erstmals von einem natürlichen Ectoin-sekretierenden Stamm, *H. salina* DSM 5928^T, berichtet, der bei einer moderaten Salinität (2,9 %) wächst und Ectoin extrazellulär akkumuliert. In einem kombinierten Prozess aus Fermentation und anschließender Produktion mit ruhenden Zellen in der Phosphat-limitierten stationären Phase erreichte der Stamm einen extrazellulären Ectoin-Gehalt von ca. 0,28 g/g TBM (Lang *et al.*, 2011). Dabei diente Glutamat als C- und N-Quelle. Weiterhin ergab sich eine maximale spezifische Produktivität von bis zu 30 mg/(g TBM x h) und ein Ertrag an Ectoin von 0,13 g/g (vgl. Tab. 4.2).

Moderat halophile Vertreter, wie *H. elongata* und *H. salina*, sind für die Ectoin-Produktion jedoch auf NaCl angewiesen, da die Expression von *ectABC* durch osmotischen Stress reguliert wird. Für die industrielle Produktion ist eine hohe NaCl-Konzentration von Nachteil, weil dadurch die Haltbarkeit der Fermentertechnik eingeschränkt wird und der Gewinnungsprozess zeit- und kostenintensiver ist.

Eine attraktive Möglichkeit, um den industriellen Prozess zu verbessern, ist die Ectoin-Produktion vom NaCl-Bedarf loszulösen. Dies kann erreicht werden, indem ein nicht-halophiler Wirt für die Expression der Biosynthesegene unter Kontrolle eines starken NaCl-unabhängigen Promotors verwendet wird. In der Literatur sind bereits einige heterologe Produktionsstämme beschrieben, wobei vorwiegend die Modellorganismen *E. coli* und *C. glutamicum* eingesetzt wurden. Als Donorstamm dienen entweder halophile Vertreter, wie *H. elongata* und *C. salexigens*, oder das halotolerante Bakterium *P. stutzeri*.

Schubert et al. (2007) haben zum ersten Mal mit *E. coli* eine extrazelluläre Akkumulation von Ectoin in Glucose-Mineralsalzmedium ohne Zusatz von NaCl erreicht (6 g/L). Das Produktionssystem basierte genau wie *E. coli* pASK_ectABCD_m auf einem pASK-Vektor mit dem starken AHT-induzierbaren *tet*-Promotor. Jedoch wurde das *ectABC*-Gencluster des moderat halophilen *C. salexigens* DSM 3043^T verwendet. Sowohl die maximale spezifische Produktivität als auch der Ertrag fielen deutlich geringer aus als bei *E. coli* pASK_ectABCD_m (vgl. Tab. 4.2).

Becker et al. (2013) ist erstmals eine salzfreie Produktion und Sekretion von Ectoin mit einem genetisch modifizierten *C. glutamicum*-Stamm gelungen. Dazu wurden die Gene *ectABCD* von *P. stutzeri* A1501 Codon-optimiert und unter Kontrolle eines starken konstitutiven *C. glutamicum*-Promotors ins Genom integriert. Zusätzlich verfügte der Produktionsstamm über eine Feedback-resistente Aspartokinase und der Ausstrom von Lysin, das als Nebenprodukt auftrat, wurde durch Inaktivierung des entsprechenden Efflux-Systems LysE unterbunden. Trotz *metabolic engineering* konnte nur eine maximale Produktivität von ca. 30 mg/(g TBM x h) erreicht werden, die im Bereich der des natürlichen Ectoin-Produzenten *H. salina* liegt (vgl. Tab. 4.2). Zudem ist nicht klar, warum der Stamm kaum Hydroxyectoin produziert hat (6 %).

Kürzlich konnte die Ectoin-Produktion mit *C. glutamicum* gesteigert werden (**Pérez-García et al., 2017**). Im Vergleich zu Becker et al. ergab sich mittels Fed-Batch-Fermentation, ebenfalls ohne NaCl und mit Glucose als C-Quelle, eine fast fünfmal höhere Ectoin-Konzentration (22 g/L) und mit 120 mg/(g TBM x h) eine viermal höhere spezifische Produktivität (vgl. Tab. 4.2). Die heterologe Ectoin-Produktion wurde durch einen Vektor mit *ectABC* aus *C. salexigens* unter Kontrolle des *tac*-Promotors und Induktion mit IPTG ermöglicht. Darüber hinaus verfügte der Produktionsstamm über eine optimierte Pyruvat-Carboxylase und eine deregulierte Aspartokinase, um den Oxalacetat-Pool zu erhöhen und Aspartat- β -semialdehyd in ausreichender Menge bereitzustellen. Jedoch wurden neben Ectoin große Mengen an Lysin extrazellulär angehäuft (21 %). Wenn der Lysin-Transporter inaktiviert wurde, wie bei dem Produktionsstamm von Becker et al., wurde zwar nur noch Ectoin im Medium akkumuliert, aber die Konzentration war um das Fünffache reduziert und somit in der gleichen Größenordnung wie bei Becker et al. (2013). *C. glutamicum*, der für die industrielle Lysin-Produktion genutzt wird, scheint wegen der gemeinsamen Vorstufe Aspartat- β -semialdehyd als Ectoin-Produzent geeignet zu sein. Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, die Produktion von Lysin gering zu halten und den Fluss in Richtung Ectoin-Synthese zu lenken. Schlussendlich waren die höchsten Werte für die Produktivität und den Ertrag immer noch zwei- bis dreimal niedriger verglichen mit *E. coli* pASK_ectABCD_m (vgl. Tab. 4.2).

Der bisher höchste extrazelluläre Ectoin-Gehalt (4,05 g/g TBM) wurde mit dem *ectABC*-Gencluster aus *H. elongata* DSM 2581^T unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors in *E. coli* BW25113 erzielt (**He et al., 2015**). Weiterhin war die maximale spezifische Produktivität mit rund 250 mg/(g TBM x h) sehr hoch und wurde nur von *E. coli* pASK_ectABCD_m übertroffen (vgl. Tab. 4.2). Aber die Ectoin-Produktion erfolgte mittels Ganzzellbiokatalyse aus der Vorstufe Aspartat und Glycerin bei einer hohen Zelldichte (OD₆₀₀ 20). Die vorangegangene Fed-Batch-

Fermentation zur Bildung der Biomasse wurde in den scheinbar sehr guten Produktionsdaten nicht miteinbezogen. Bei den anderen Produktionssystemen hingegen beziehen sich die Angaben auf die Produktion von Ectoin und Biomasse.

Kürzlich wurde von einem Ectoin-sekretierenden *E. coli*-Stamm unter Verwendung des Genclusters aus *P. stutzeri* A1501 berichtet (**Czech et al., 2018**). In Batch-Kultur mit Glucose und Aspartat als C-Quellen sowie 0,4 M NaCl (2,3 %) wurde eine ähnlich hohe Ectoin-Konzentration wie mit *E. coli* pASK_ectABCD_m erreicht, aber der Ectoin-Gehalt bezogen auf TBM fiel geringer aus (vgl. Tab. 4.2). Die höchste Ectoin-Ausbeute wurde mit dem Stamm *E. coli* SK51 erzielt, der keine Trehalose synthetisieren kann und dem die Transporter ProP und ProU zur Aufnahme von Ectoin fehlen. Die Expression erfolgte unter Kontrolle des *P. stutzeri*-eigenen Promotors mit einer Mutation in der -35-Region. Bei Anzucht ohne Salz statt 2,3 % NaCl war die Ausbeute an Ectoin deutlich verringert (< 0,2 g/L). Demnach benötigt der Produktionsstamm NaCl als Induktor. Weiterhin haben Czech et al. einen Ertrag an Ectoin von 0,3 g/g Glucose angegeben. Das Medium enthielt jedoch auch Aspartat, so dass anhand der eingesetzten Mengen beider C-Quellen der Ertrag auf lediglich 0,18 g/g geschätzt werden kann. Die maximale spezifische Produktivität konnte wegen fehlender Wachstumsdaten nicht ermittelt werden. Die mittlere spezifische Produktivität, also die Ectoin-Produktion bezogen auf den gesamten Wachstumszeitraum (24 h), betrug rund 44 mg/(g TBM x h). Demgegenüber ergab sich für *E. coli* pASK_ectABCD_m bei 24-stündiger Anzucht mit 0,25 % NaCl eine mittlere Produktivität von 120 mg/(g TBM x h).

Eine sehr hohe Ectoin-Produktion (25,1 g/L) haben **Ning et al. (2016)** in *E. coli* W3110 mit dem *ectABC*-Gencluster aus *H. elongata* 1A01717 unter Kontrolle des starken IPTG-induzierbaren *trc*-Promotors erreicht. Dabei konnte die Produktivität vor allem durch *metabolic engineering* gesteigert werden. Durch Deletion des Gens *thrA*, das für die bifunktionelle Aspartokinase/Homoserin-Dehydrogenase codiert, und durch Überproduktion einer deregulierten Aspartokinase wurde der Fluss von Aspartat- β -semialdehyd in Richtung Ectoin begünstigt. Außerdem erfolgte die Expression der PEP-Carboxylase unter Kontrolle des *trc*-Promotors, um den Oxalacetat-Pool zu erhöhen. Schlussendlich konnte eine maximale spezifische Produktivität von rund 160 mg/(g TBM x h) in einem Komplexmedium mit Glucose und ohne NaCl erzielt werden. Demnach war die Produktivität etwa halb so hoch wie bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Produktionssystem und abgesehen von der Ganzzellbiokatalyse (He et al., 2015) der höchste Literaturwert (vgl. Tab. 4.2). Der Ertrag lag in der gleichen Größenordnung wie bei *E. coli* pASK_ectABCD_m, wobei die komplexen Bestandteile des Mediums, Hefeextrakt und Trypton, nicht miteinbezogen wurden. Laut Ning et al. könnte die Codon-optimierte Sequenz zu einer Instabilität oder Fehlfaltung der mRNA und folglich zu einer verminderten Expression geführt haben.

Tab. 4.2: Vergleich der Ectoin- und Hydroxyectoin-Produktion bisheriger Produktionssysteme

Aufgelistet sind heterologe Produktionsstämme, mit Ausnahme eines natürlichen Produzenten, die wenig NaCl benötigen und Ectoin bzw. Hydroxyectoin ins Medium sekretieren. Die Angaben wurden den Referenzen direkt entnommen oder anhand der angegebenen Produktionsdaten ermittelt (~). Ac: Acetat, Asp: Aspartat, Ect: Ectoin, Glu: Glucose, Glut: Glutamat, Gly: Glycerin, HE: Hefeextrakt, α -Keto: α -Ketoglutarat, ME: Methanol, Sor: Sorbitol, Try: Trypton, TBM: Trockenbiomasse, n.e.: nicht ermittelbar

	Ursprung der Gene	Verfahren	NaCl [%]	C-Quelle	Titer ¹ [g/L]	Solutgehalt ¹ [g/g TBM]	Produktivität ² [mg/(g TBM x h)]	Y _{P/S} ³ [g/g]	Nebenprodukte ⁴	Referenz
Ectoin										
<i>E. coli</i> pASK_ectABCD _m	<i>A. cryptum</i>	Batch (Kolben)	0	Gly	1,33	2,30	n.e.	0,29	3 % ADABA	diese Arbeit
			0,25	Gly	1,66	2,93	345,1	0,36	keine	diese Arbeit
			0,5	Gly	1,54	2,47	352,9	0,33	1 % ADABA	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SK51 pLC75	<i>P. stutzeri</i>	Batch (Kolben)	2,3	Glu, Asp	1,5	1,05	n.e.	~ 0,18 ⁵	keine	Czech <i>et al.</i> (2018)
<i>E. coli</i> ECT05	<i>H. elongata</i>	Fed-Batch (Kolben)	0	Glu, HE, Try	13,6	1,7	~ 160	~ 0,38 ⁶	keine	Ning <i>et al.</i> (2016)
		Fed-Batch	0	Glu, HE, Try	25,1	0,8	~ 125	~ 0,11 ⁶	< 7 % Ac, 4 % α -Keto	Ning <i>et al.</i> (2016)
<i>E. coli</i> pBAD-ectABC	<i>H. elongata</i>	Ganzzellbiokatalyse	0	Gly, Asp	25,1 ⁷	4,05 ⁷	~ 250 ⁷	n.e.	keine	He <i>et al.</i> (2015)
<i>E. coli</i> pASK-ectABC	<i>C. salexigens</i>	Fed-Batch	0	Glu	6,0	0,27	~ 5	~ 0,02	keine	Schubert <i>et al.</i> (2007)
<i>C. glutamicum</i> Ecto5	<i>C. salexigens</i>	Fed-Batch	0	Glu	22,0	~ 1,8	~ 120	0,16	21 % Lys, 4 % Glut	Pérez-García <i>et al.</i> (2017)
<i>C. glutamicum</i> ECT-2 ⁸	<i>P. stutzeri</i>	Fed-Batch	0	Glu, HE	4,5	~ 0,25	~ 30	n.e.	6 % Hydroxyectoin	Becker <i>et al.</i> (2013)
<i>H. salina</i> DSM 5928 ^T	-	Batch	2,9	Glut	6,84	~ 0,2	~ 30	~ 0,10	keine	Lang <i>et al.</i> (2011)
		Kombination ⁹	2,9	Glut	11,75	~ 0,28	~ 25	~ 0,13	keine	Lang <i>et al.</i> (2011)
Hydroxyectoin										
<i>E. coli</i> pASK_ectABCDask	<i>A. cryptum</i>	Batch (Kolben)	0	Gly	0,93	0,95	n.e.	0,20	7 % Ect, 4 % ADABA	diese Arbeit
			0,5	Gly	1,57	2,18	202,8	0,34	4 % Ect	diese Arbeit
			1,0	Gly	1,39	1,80	n.e.	0,30	keine	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SK51 pASTI14	<i>P. stutzeri</i>	Batch (Kolben)	2,3	Glu, Asp	1,30	1,20	n.e.	~ 0,16 ⁵	32 % Ect	Czech <i>et al.</i> (2018)
					(1,90) ¹⁰	(1,75) ¹⁰	n.e.	(0,23) ¹⁰		
<i>H. polymorpha</i> EctBACD ⁸	<i>H. elongata</i>	Fed-Batch	0,03	Gly, Sor, ME	2,8	0,06	~ 2	n.e.	2 % Ect	Eilert <i>et al.</i> (2013)

¹ Ectoin bzw. Hydroxyectoin im Medium

² Maximale spezifische Produktivität; entspricht der höchsten Zunahme der extrazellulären Solutkonzentration bezogen auf die Zeitdifferenz und mittlere TBM

³ Ertrag an extrazellulärem Ectoin bzw. Hydroxyectoin (P) aus der gesamten verbrauchten C-Quelle (S); 1 g C-Quelle entspricht ca. 0,4 g Kohlenstoff (HE, Try ausgeschlossen)

⁴ Nebenprodukte, die zusätzlich zu Ectoin bzw. Hydroxyectoin im Medium akkumuliert wurden; die Prozentzahl bezieht sich auf den extrazellulären Gesamtsolutgehalt

⁵ geschätzt anhand der eingesetzten Menge an Glucose (5 g/L) und Aspartat (25 mM = 3,3 g/L)

⁶ Der Ertrag bezieht sich nur auf die verbrauchte Glucose; das Medium enthielt zusätzlich 2 g/L Hefeextrakt und 4 g/L Trypton

⁷ Die Bildung der bei der Ganzzellbiokatalyse eingesetzten Biomasse ist in den Daten nicht miteinbezogen

⁸ Die *ect*-Gene wurden Codon-optimiert ins Genom integriert, während die anderen heterologen Systeme auf einem Plasmid basieren

⁹ komminierter Prozess aus Batch-Fermentation und anschließender Produktion mit ruhenden Zellen in der Phosphat-limitierten stationären Phase

¹⁰ Angaben in Klammern beziehen sich auf Hydroxyectoin + Ectoin

E. coli pASK_ectABCD_m hat von allen Produktionsstämmen die höchste spezifische Produktivität und fast immer den höchsten Ertrag erzielt, ohne dass der Stamm durch *metabolic engineering* optimiert wurde. Da sich die Produktionssysteme in einigen Punkten unterscheiden, kann über die Gründe für die stark variierenden Produktivitäten nur spekuliert werden.

Eine unterschiedliche Kopienzahl der Expressionsvektoren könnte Einfluss auf die Ectoin-Produktion gehabt haben. Bei dem von Becker *et al.* konstruierten *C. glutamicum*-Stamm befindet sich nur eine Kopie des Genclusters im Genom, was eine Erklärung für die geringere Produktion gegenüber den Plasmid-basierten Systemen sein könnte. Des Weiteren wurde das gesamte Gencluster in den Wirtsstamm transferiert und nur der Promotor vor *ectA* durch einen starken Wirts-eigenen Promotor ausgetauscht. Im Fall der moderat halophilen Donorstämme *H. elongata* und *C. salexigens* befinden sich jedoch weitere Promotoren innerhalb des Genclusters, die von alternativen σ -Faktoren erkannt werden und die Expression im Produktionsstamm beeinflusst haben könnten (Schwibbert *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2004). In *H. elongata* konnte für die Gene *ectABC* zudem ein Anstieg des mRNA- und Proteinlevels in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration festgestellt werden (Kindzierski *et al.*, 2017). Außerdem könnten sich andere transkriptionale oder translationale Regulationsmechanismen auf die heterologe Ectoin-Produktion im Wirtsstamm bei Anzucht ohne bzw. mit wenig NaCl ausgewirkt haben.

Weiterhin wurden meistens die Gene ohne Codon-Optimierung in den Wirtsstamm eingebracht. Folglich könnte eine vom Donorstamm abweichende *codon usage* die heterologe Ectoin-Produktion beeinträchtigt haben, da diese eine große Rolle bei der Regulation der Translation spielt. Ning *et al.* (2016) haben jedoch für ihren Produktionsstamm nach Codon-Optimierung eine niedrigere Produktion beobachtet.

Schließlich könnte auch eine verminderte Aktivität der Enzyme aus den halophilen Donorstämmen unter den Produktionsbedingungen (kein bzw. wenig NaCl) zu einer geringeren Produktivität geführt haben. Für *H. elongata* konnte *in vitro* gezeigt werden, dass EctA, EctB und EctC für eine optimale Aktivität auf NaCl angewiesen sind (Ono *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den anderen Produktionssystemen verfügt *E. coli* pASK_ectABCD_m über die Enzyme aus einem nicht-halophilen Stamm, *A. cryptum*, für dessen EctC bereits demonstriert wurde, dass kein NaCl für eine hohe Aktivität erforderlich ist (Moritz, 2012).

4.2.3.2 Vergleich der Hydroxyectoin-Produktion

Die industrielle Produktion von Hydroxyectoin erfolgt zur Zeit mit *H. elongata* durch *bacterial milking* (Sauer & Galinski, 1998) oder durch ein optimiertes Verfahren (*permanent milking*), das auf einer kontinuierlichen Fermentation basiert (Lentzen & Schwarz, 2006a). Allerdings wird Hydroxyectoin erst bei Salinitäten über 10 % NaCl und Temperaturen oberhalb von 40 °C intrazellulär akkumuliert (Wohlfarth *et al.*, 1990; Meffert, 2011). Dabei wird ein Hydroxyectoin-Anteil von maximal 50 % erreicht. Andere Vertreter der *Halomonadaceae*, wie *C. salexigens* und

Halomonas boliviensis, akkumulieren Hydroxyectoin ebenfalls nur in Kombination mit Ectoin (García-Esteba *et al.*, 2006; Van-Thuoc *et al.*, 2010). Die Trennung von Hydroxyectoin und Ectoin erfordert eine chromatographische Aufreinigung und macht den Produktionsprozess zeit- und kostenintensiver.

Meffert (2011) konnte durch erhöhte *ectD*-Expression und einen Hitzeschock von 37 auf 50 °C eine fast vollständige Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin in *H. elongata* erreichen. Der gram-positive Stamm *Marinococcus* M52 hingegen akkumuliert bereits bei moderaten Temperaturen in der stationären Phase überwiegend Hydroxyectoin. Aber anders als bei *H. elongata* können die Solute nicht durch *bacterial milking* gewonnen werden, sondern müssen aus den Zellen extrahiert werden (Frings *et al.*, 1995). Durch genetische Manipulation von *C. salexigens* konnten Rodríguez-Moya *et al.* (2013) einen intrazellulären Hydroxyectoin-Anteil von über 90 % bei geringer Salinität und Temperatur (4,35 % NaCl, 37 °C) erzielen. Den höchsten Hydroxyectoin-Gehalt von 140 mg/g TBM hatte ein *C. salexigens*-Stamm, bei dem die Gene *ectABCD* im Genom deletiert waren und stattdessen mit Hilfe eines Vektors überexprimiert wurden.

Seip *et al.* (2011) haben erstmals eine *de novo*-Synthese von Hydroxyectoin in *E. coli* etabliert, wobei das *ectABCDask*-Gencluster aus *P. stutzeri* DSM 5190^T unter Kontrolle der ursprünglichen Promotoren exprimiert wurde. Bei 3 % NaCl konnte in der spät stationären Phase ein intrazellulärer Solutgehalt von rund 80 mg/g TBM mit einem Hydroxyectoin-Anteil von mehr als 95 % erzielt werden. Neben dem in dieser Arbeit vorgestellten Produktionssystem wurden erst zwei andere Produktionsstämme beschrieben, mit denen eine extrazelluläre Akkumulation von Hydroxyectoin bei geringer Salinität möglich ist (vgl. Tab. 4.2).

Eilert *et al.* (2013) haben für die heterologe Hydroxyectoin-Produktion die Hefe *Hansenula polymorpha* als Wirt verwendet. Die Gene *ectABCD* aus *H. elongata* wurden Codon-optimiert und einzeln mit dem starken Methanol-induzierten *FMD*-Promotor ins Genom von *H. polymorpha* integriert. Durch Fermentation mit Methanol, Glycerin und Sorbitol als C-Quellen ergab sich eine extrazelluläre Hydroxyectoin-Konzentration von 2,8 g/L und ein Ectoin-Anteil von nur 2 %. Allerdings fielen der Biomasse-bezogene Solutgehalt und die spezifische Produktivität verglichen mit *E. coli* pASK_ectABCDask sehr gering aus (vgl. Tab. 4.2).

Czech *et al.* (2018) haben neben dem Ectoin-Produzenten auch einen Hydroxyectoin-sekretierenden *E. coli*-Stamm entwickelt, der ebenfalls auf dem Trehalose- sowie Transporterdefizienten Stamm SK51 und einem Expressionsvektor mit dem *P. stutzeri*-Gencluster beruht (vgl. 4.2.3.1). Der Produktionsstamm erreichte eine hohe extrazelluläre Solutkonzentration von 1,9 g/L, aber der Hydroxyectoin-Anteil lag nur bei 68 % (1,3 g/L). Der Solutgehalt bezogen auf TBM und der Ertrag fielen in jedem Fall geringer aus als bei *E. coli* pASK_ectABCDask (vgl. Tab. 4.2). Anstatt der maximalen spezifischen Produktivität konnte nur die mittlere Produktivität für den 24-stündigen Wachstumszeitraum ermittelt werden, die mit 50 mg/(g TBM x h) etwa halb so hoch war wie im Fall von *E. coli* pASK_ectABCDask (90 mg/(g TBM x h)). Neben dem Nachteil des hohen Ectoin-Anteils von 32 % benötigt der Produktionsstamm von Czech *et al.* ca. 2 % NaCl

und Aspartat für eine hohe Hydroxyectoin-Produktion. *E. coli* pASK_ectABCDask hingegen kann eine höherer Ausbeute an Hydroxyectoin mit Glycerin als C-Quelle und weniger NaCl erreichen (vgl. Tab. 4.2). Das macht den Hydroxyectoin-Produzenten zu einem vielversprechenden Kandidaten für die industrielle Produktion.

Insgesamt zeichnet sich das in dieser Arbeit optimierte Produktionssystem für Ectoin bzw. Hydroxyectoin basierend auf *E. coli* mit dem *A. cryptum*-Gencluster durch eine hohe spezifische Produktivität und einen hohen Ertrag aus. Die Ectoine werden überwiegend im Medium akkumuliert (> 99 %) und durch Optimierung der Produktionsbedingungen konnte der Anteil unerwünschter Nebenprodukte auf ein Minimum reduziert werden, was die Produktgewinnung vereinfacht. Darüber hinaus ist kein bzw. nur wenig NaCl ($\leq 0,5\%$) für eine hohe Produktion der Ectoine erforderlich. Daher werden die durch osmotischen Stress induzierten Regulationsmechanismen, wie die Synthese des Wirts-eigenen Soluts Trehalose, eine hohe intrazelluläre Akkumulation und eine Wiederaufnahme der Solute, im Produktionsstamm *E. coli* unterbunden. Zudem können im Hinblick auf die industrielle Produktion durch die geringe NaCl-Konzentration Zeit und Kosten gespart werden. Weitere Vorteile sind, dass das Produktionssystem einfach zu handhaben ist und mit Glycerin eine günstige und in hoher Konzentration lösliche C-Quelle verwendet wird.

4.2.4 Weitere Untersuchungen und Optimierungen des Produktionssystems

***E. coli* pASK_ectABCDask** Der Vergleich mit anderen Produktionsstämmen zeigt, dass das in dieser Arbeit optimierte Produktionssystem Potenzial für die industrielle Produktion der Ectoine hat. Der Hydroxyectoin-sekretierende Stamm *E. coli* pASK_ectABCDask sollte noch ausführlicher charakterisiert werden. Unter anderem sollte die Produktion bei einer NaCl-Konzentration von 0,25 % untersucht werden, die bei *E. coli* pASK_ectABCD_m einen höheren extrazellulären Solutgehalt verglichen mit 0,5 % NaCl ergab. Zudem wäre eine erneute Bestimmung der maximalen spezifischen Produktivität für *E. coli* pASK_ectABCDask sinnvoll. Weiterhin sollte die Hydroxyectoin-Produktion im großen Maßstab Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein. Hierbei ist vor allem auf eine ausreichende O₂-Versorgung zu achten, die ein limitierender Faktor bei der Hydroxyectoin-Produktion sein kann (Meffert, 2011; Witt, 2011).

Aufnahmeraten Für die Produktionsbedingungen (< 1 % NaCl) ist nicht bekannt, ob die Transporter ProP, ProU sowie PutP in *E. coli* aktiv sind und Ectoin bzw. Hydroxyectoin aufgenommen werden. Daher wäre es hilfreich, die Aufnahmeraten für beide Solute in *E. coli* pASK_ectABCD_m und pASK_ectABCDask zu bestimmen. Falls eine Wiederaufnahme der extrazellulär akkumulierten Ectoine unter den Produktionsbedingungen erfolgt, könnte die Produktion in einem Trehalose-defizienten *E. coli*-Stamm untersucht werden, um möglicherweise eine Steigerung der Produktivität zu erreichen (vgl. 4.2.2.4).

ADABA-Akkumulation Weitere Untersuchungen zur extrazellulären Akkumulation von ADABA könnten zeigen, ob EctC ein limitierender Faktor für die Ectoin-Produktion in *E. coli* ist. Für die Bedingungen, bei denen eine hohe ADABA-Akkumulation auftrat (z.B. Anzucht mit Glucose), sollte getestet werden, ob diese durch Zugabe einer höheren AHT-Menge unterbunden werden kann. Außerdem könnte eine Bestimmung der mRNA-Menge mittels RT-qPCR Aufschluss darüber geben, ob *ectC* in geringerem Maße transkribiert wird als *ectA* und *ectB*.

Fermentation Das hier vorgestellte Produktionssystem erzielt einen hohen Solutgehalt bezogen auf TBM und eine hohe spezifische Produktivität verglichen mit anderen Produktionsstämmen, aber die Biomasse-Produktion und volumetrische Produktivität sind gering. Das Ziel zukünftiger Experimente besteht somit darin, die Produktion der Ectoine im großen Maßstab mit einer hohen Zelldichte zu erreichen und dabei die hohe Produktivität möglichst beizubehalten. Eine Hochzelldichte-Fermentation mit Glycerin wurde bereits für *E. coli* entwickelt, wobei Zelldichten oberhalb von 100 g TBM/L erzielt werden konnten (Korz *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1997). Für verschiedene rekombinante *E. coli*-Stämme wurde ebenfalls eine Fermentation mit hoher Zelldichte beschrieben (Restaino *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2004; Hellmuth *et al.*, 1994).

Bei der Fermentation der Produktionsstämmen sollte auf eine ausreichende Stickstoff-Versorgung für die Produktion der Ectoine geachtet werden (vgl. 4.2.2.10). Zur Optimierung der heterologen Produktion könnten u.a. eine Spurenelementlösung zugesetzt werden, eine höhere bzw. mehrmalige AHT-Zugabe erfolgen und der Fermenter vor Licht geschützt werden, um den Licht-induzierten Abbau des Induktors zu unterbinden (vgl. 4.2.2.15). Außerdem sind im Zuge der Fed-Batch-Fermentation Maßnahmen erforderlich, um eine extrazelluläre Akkumulation unerwünschter Nebenprodukte, wie ADABA und Acetat, zu vermeiden. Dies könnte eventuell durch eine langsamere Fütterung mit Glycerin erreicht werden (vgl. 4.2.2.15).

Selektion Das Plasmid-basierte Produktionssystem benötigt, anders als der natürliche Ectoin-Produzent *H. elongata*, Carbenicillin für die Selektion und AHT für die Induktion, was bei einer industriellen Produktion höhere Kosten mit sich bringen würde. Andererseits kann die Produktion durch den induzierbaren Promotor reguliert und der Produktionsstart individuell festgelegt werden. Ein wichtiger Aspekt für die großtechnische Produktion ist die Plasmidstabilität, die näher untersucht werden sollte. In der stationären Phase (18 h nach Induktion) konnten zwar noch Plasmid-tragende Zellen nachgewiesen werden, aber über eine länger andauernde Fermentation könnte die Plasmidstabilität trotzdem die Produktivität maßgeblich beeinflussen. Daher wären die Verwendung eines anderen Selektionsmarkers (vgl. 4.2.2.12) und die genomische Integration der Biosynthesegene zum Vergleich mit dem bisherigen Produktionssystem interessant. Die genomische Integration durch homologe Rekombination ist gegenüber einem Plasmid stabiler, aber dafür befindet sich nur eine Kopie im Genom, so dass die Produktion geringer ausfallen könnte. Andererseits wurden Methoden beschrieben, durch die mehrere Kopien der Gene ins Genom integriert werden können und die eine hohe genetische Stabilität sowie Expression erlauben (Tyo *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2015).

Metabolic engineering Eine weitere Optimierung des Produktionssystems könnte mittels *metabolic engineering* erfolgen, was bereits für andere Ectoin-produzierende Stämme gezeigt wurde (Ning *et al.*, 2016; Pérez-García *et al.*, 2017; Czech *et al.*, 2018). Hierfür ist eine Analyse des metabolischen Stoffflusses während der Produktion der Ectoine hilfreich, um mögliche Engpässe im Stoffwechsel aufzudecken. Für die Ectoin-Produktion in *E. coli* wurde bereits eine Stoffflussanalyse bei Wachstum mit ^{13}C -markiertem Glycerin durchgeführt (Bethlehem *et al.*, 2017). Dabei zeigte sich, dass vermehrt Kohlenstoff von PEP direkt zu Oxalacetat fließt und der Glyoxylatzyklus keine entscheidende Rolle spielt. Oxalacetat bildet mit Pyruvat und PEP einen wichtigen Knotenpunkt im zentralen Stoffwechsel und wird für die Biosynthese der Ectoine und Aminosäuren der Aspartat-Familie aus dem Citratzyklus abgeführt. Da *E. coli* keine Pyruvat-Carboxylase hat, dient die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat mittels der PEP-Carboxylase als anaplerotische Reaktion, was eine Erklärung für den erhöhten Stofffluss ist.

Die Produktion der Ectoine in *E. coli* könnte eventuell durch Überexpression der nativen PEP-Carboxylase optimiert werden, die zu einem erhöhten Oxalacetat-Pool führt (Farmer & Liao, 1997). Weiterhin konnte in *E. coli* ein erhöhter Stofffluss Richtung Oxalacetat durch heterologe Expression einer Pyruvat-Carboxylase erreicht werden (Gokarn *et al.*, 2001; March *et al.*, 2002). Dadurch konnten die Biomasse und die Produktion eines rekombinanten Proteins erhöht und die aerobe Acetat-Bildung deutlich reduziert werden, während die Wachstumsrate nicht beeinträchtigt wurde.

Ein weiterer kritischer Punkt könnte die Bereitstellung von Aspartat- β -semialdehyd sein. Daher wäre es interessant, den Effekt einer zusätzlichen Aspartokinase auf die Ectoin-Produktion in *E. coli* zu untersuchen. Dafür könnte eine deregulierte Aspartokinase oder die Aspartokinase aus dem *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* verwendet werden, deren Regulation jedoch nicht bekannt ist.

Weiterhin ist die Produktion der Ectoine in *E. coli* mit einem erhöhten NADPH-Bedarf verbunden (vgl. 4.2.2.9). Ein möglicher Ansatz, um den NADPH-Pool zu erhöhen und die Produktion der Ectoine eventuell zu steigern, wäre die heterologe Expression einer NAD-abhängigen Glutamat-DH statt dem nativen NADP-abhängigen Enzym. Schließlich könnte untersucht werden, ob sich die Codon-Optimierung der Biosynthesegene und die Verwendung von synthetischen RBS geeigneter Stärke positiv auf die heterologe Produktion auswirken.

4.3 *Synechocystis* als heterologes Produktionssystem für Ectoine

Das halotolerante Cyanobakterium *Synechocystis* synthetisiert das kompatible Solut Glucosylglycerin in Antwort auf osmotischen Stress und dient als Modellorganismus für die Osmoadaptation in Cyanobakterien. Daher ist es interessant, die Wirkung von Ectoinen gegenüber osmotischen Stress und anderen Stressfaktoren in *Synechocystis* zu untersuchen. Darüber hinaus könnte *Synechocystis* für die heterologe Produktion von biotechnologisch interessanten Substanzen, wie den Ectoinen, aus CO₂ und Licht verwendet werden. *Synechocystis* ist für die genetische Manipulation und heterologe Expression geeignet, da u.a. das Genom vollständig sequenziert ist, leicht transformierbare Stämme zur Verfügung stehen und schon Vektorsysteme für die genomische Integration und autonome Replikation entwickelt wurden. In den vergangenen Jahren wurden bereits einige Versuche unternommen, *Synechocystis* als photoautotrophe Zellfabrik für Biokraftstoffe, z.B. Ethanol und Isobutanol, aber auch für Lactat sowie Saccharose zu nutzen (vgl. 1.5.2). In dieser Arbeit wurde erstmals versucht, die heterologe Produktion von Ectoinen in *Synechocystis* zu etablieren.

4.3.1 Hydroxyectoin-Produktion in *Synechocystis*

4.3.1.1 Überblick zum möglichen Biosyntheseweg in *Synechocystis*

Im Zuge dieser Arbeit konnte die Produktion von Hydroxyectoin erstmals unter photoautotrophen Bedingungen in *Synechocystis* erreicht werden. Die heterologe Produktion wurde durch den Expressionsvektor pSynect2 vermittelt, der auf dem Shuttle-Vektor pRL59EH-Ω basiert und das *ectABCD*-Gencluster von *P. stutzeri* unter Kontrolle des *tac*-Promotors enthält (vgl. Abb. 3.39). Der *tac*-Promotor ist ein Hybrid aus dem *trp*- und *lac*-Promotor (de Boer *et al.*, 1983) und sowohl in *E. coli* als auch in *Synechocystis* funktionell (Ferino & Chauvat, 1989). Der mögliche Biosyntheseweg von Hydroxyectoin in *Synechocystis* ist schematisch in Abbildung 4.5 dargestellt.

Kohlenstoff-Assimilation *Synechocystis* besitzt einen ATP-abhängigen und zwei Na⁺-abhängige Transporter zur Aufnahme von Hydrogencarbonat (HCO₃⁻). CO₂ gelangt mittels passiver Diffusion in die Zelle und wird durch Enzymkomplexe an der Thylakoidmembran in HCO₃⁻ umgewandelt, wozu NADPH oder reduziertes Ferredoxin benötigt wird (Price *et al.*, 2008). Die CO₂-Fixierung mittels der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), dem ersten Schritt im Calvin-Zyklus, erfolgt in den Carboxysomen, die von einer Proteinhülle umgeben sind. Alle anderen Enzyme des Calvin-Zyklus sind im Cytoplasma lokalisiert. Folglich müssen das im Cytoplasma akkumulierte HCO₃⁻ sowie Ribulose-1,5-bisphosphat in und 3-Phosphoglycerat aus den Carboxysomen diffundieren, was durch Poren in der Proteinhülle ermöglicht wird (Kerfeld *et al.*, 2005). In den Carboxysomen wird HCO₃⁻ durch eine Carboanhydrase in CO₂ umgewandelt und eine hohe CO₂-Konzentration aufrechterhalten, um die Carboxylierung mittels der wenig CO₂-affinen RubisCO zu begünstigen (Price *et al.*, 2008).

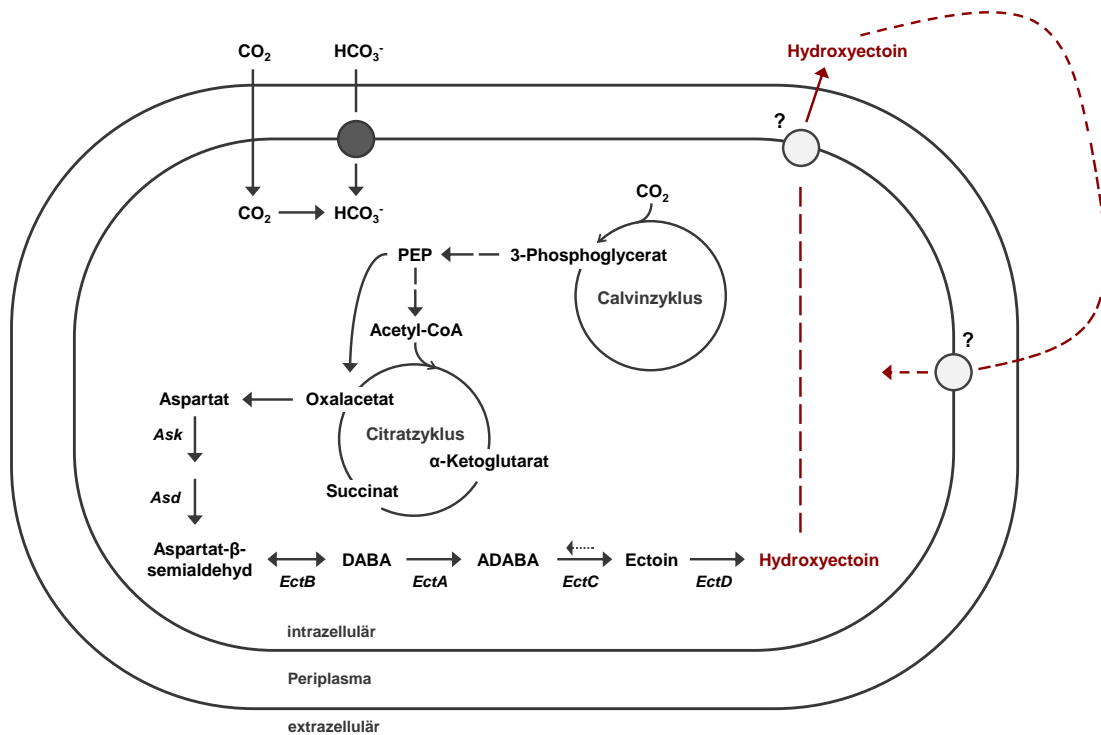


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Hydroxyectoin-Synthese in *Synechocystis pSynect2*
 HCO_3^- und CO_2 werden durch aktiven Transport bzw. passive Diffusion aufgenommen. CO_2 wird an der Thylakoidmembran in HCO_3^- umgewandelt und die CO_2 -Fixierung mittels RubisCO erfolgt in den Carboxysomen (nicht gezeigt). Das im Calvin-Zyklus gebildete 3-Phosphoglycerat wird vermutlich über Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Oxalacetat umgesetzt. Die Hydroxyectoin-Synthese geht von Aspartat aus (vgl. Abb. 1.1). Der konventionelle Citratzyklus ist wegen der fehlenden α -Ketoglutarat-Dehydrogenase unvollständig, kann aber durch alternative Wege geschlossen werden. Hydroxyectoin gelangt ins Medium, wobei nicht bekannt ist, wie der Efflux erfolgt und ob Hydroxyectoin wieder aufgenommen werden kann.

Hydroxyectoin-Synthese Das im Calvin-Zyklus gebildete 3-Phosphoglycerat kann in PEP umgewandelt werden, das vermutlich mittels der PEP-Carboxylase zu Oxalacetat umgesetzt wird. Aspartat wird durch Transaminierung von Oxalacetat bereitgestellt und weiter in Aspartat- β -semialdehyd umgewandelt. Schließlich kann Hydroxyectoin mit Hilfe der rekombinanten Enzyme synthetisiert werden (vgl. Abb. 4.5). Die für die Biosynthese benötigte Energie in Form von ATP und die Reduktionsäquivalente werden primär durch Photosynthese bereitgestellt.

Eine Besonderheit der Cyanobakterien ist, dass die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase zur Umsetzung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA fehlt und somit der konventionelle Citratzyklus unvollständig ist (Smith *et al.*, 1967). Aber es gibt alternative Wege den Citratzyklus zwischen α -Ketoglutarat und Succinat zu schließen. Dazu gehören die kürzlich in Cyanobakterien identifizierten Enzyme α -Ketoglutarat-Decarboxylase und Succinat-semialdehyd-Dehydrogenase, welche die Umsetzung von α -Ketoglutarat über Succinat-semialdehyd zu Succinat ermöglichen (Zhang & Bryant, 2011). Außerdem kann der Citratzyklus in *Synechocystis* durch Konversion von Glutamat zu Succinat über den γ -Aminobuttersäure-Shunt vervollständigt werden (Xiong *et al.*, 2014). Der Glyoxylatzyklus hingegen scheint in *Synechocystis* nicht aktiv zu sein (Knoop *et al.*, 2013). Allerdings dient der Citratzyklus während des phototrophen Wachstums ohnehin primär der Bereitstellung von Vorstufen für die Biosynthese.

Stickstoff-Assimilation Als N-Quelle wurde Nitrat eingesetzt, das von *Synechocystis* über einen ATP-abhängigen Nitrat/Nitrit-Transporter aufgenommen wird (Flores *et al.*, 2005). Im Cytoplasma wird Nitrat durch die Ferredoxin-abhängigen Nitrat- und Nitrit-Reduktasen zu Ammonium reduziert. Anschließend wird Ammonium via GS/GOGAT-System auf α -Ketoglutarat übertragen und Glutamat gebildet, das als Aminogruppendonor im Zuge der Hydroxyectoin-Synthese dient.

Efflux und Influx von Hydroxyectoin Hydroxyectoin wurde sowohl intrazellulär als auch extrazellulär nachgewiesen, während Ectoin und andere Vorstufen nicht detektiert werden konnten. Allerdings ist nicht bekannt, wie der Efflux von Hydroxyectoin erfolgt und ob Hydroxyectoin von *Synechocystis* wieder aufgenommen werden kann (vgl. 4.3.1.2).

4.3.1.2 Extrazelluläre Akkumulation von Hydroxyectoin

Bei Wachstum in BG11 ohne NaCl hat *Synechocystis* pSynect2 Hydroxyectoin ins Medium sekretiert, vorausgesetzt die extrazelluläre Akkumulation ist nicht auf lysierte Zellen zurückzuführen. Mittels HPLC konnte eine Konzentration von bis zu 27,3 mg/L (0,17 mM) im Medium detektiert werden. Für die $\Delta ggtA$ -Mutante von *Synechocystis*, bei der der Transporter Ggt zur Aufnahme von Glucosylglycerin defekt ist, zeigte sich, dass diese Glucosylglycerin kontinuierlich ins Medium verliert (Hagemann *et al.*, 1997a). Nach 48 Stunden Wachstum bei 4% NaCl ergab sich eine extrazelluläre Konzentration von etwa 0,6 mM, was rund 10% des gesamten Glucosylglycerins entsprach. Für den Stamm *Synechocystis* sp. PCC 6714, dem die Gene für den Transporter Ggt im Genom fehlen, konnte auch eine Sekretion von Glucosylglycerin festgestellt werden (Kopf *et al.*, 2014). Die verantwortlichen Efflux-Systeme in *Synechocystis* sind noch unbekannt. Bei dem heterotrophen Bakterium *Stenotrophomonas rhizophila* konnte ebenfalls ein selektiver Ausstrom von Glucosylglycerin in der stationären Phase beobachtet werden (Roder *et al.*, 2005). Dieser Stamm besitzt das Gen für einen MFS-Transporter, das mit dem *ggpPS*-Gen für die Glucosylglycerin-Synthese salzabhängig co-exprimiert wird und ein potenzieller Kandidat für ein Efflux-System ist (Hagemann *et al.*, 2008; Alavi *et al.*, 2013).

Die Aufnahme von Hydroxyectoin wurde noch nicht in *Synechocystis* untersucht, weshalb nicht bekannt ist, ob das Solut aufgenommen werden kann. Bisher wurde nur der salzregulierte Transporter Ggt identifiziert, der neben Glucosylglycerin auch Saccharose und Trehalose transportiert (Mikkat *et al.*, 1996, 1997). Andere Zucker, wie Glucose und Maltose, sowie Glycinbetain werden nicht aufgenommen. Weiterhin ist nicht klar, ob der Transporter in Abwesenheit von NaCl aktiv ist. Bei einer minimalen NaCl-Konzentration von 2 mM konnte zwar eine geringe Glucosylglycerin-Aufnahme nachgewiesen werden, aber die Aufnahmerate wurde erst durch höhere Salinitäten deutlich gesteigert (Mikkat *et al.*, 1996). Die Tatsache, dass *Synechocystis* pSynect2 Hydroxyectoin sekretiert hat und für das Wirts-eigene Solut Glucosylglycerin eine extrazelluläre Akkumulation nur im Fall eines defekten Transportes auftritt, spricht dafür, dass Hydroxyectoin zumindest in BG11 ohne NaCl nicht aufgenommen wird. Bei 0,5% NaCl konnte kein Hydroxyectoin im Medium

detektiert werden. Ein möglicher Grund könnte sein, dass das potenzielle Aufnahmesystem aktiv war und Hydroxyectoin wieder aus dem Medium aufgenommen wurde. Andererseits könnte Glucosylglycerin synthetisiert worden sein und einen Einfluss auf die heterologe Hydroxyectoin-Produktion gehabt haben. Da kein Standard für die HPLC zur Verfügung stand, konnte nicht geklärt werden, ob *Synechocystis* pSynect2 Glucosylglycerin intrazellulär akkumuliert hat.

4.3.1.3 Effekt des Induktors IPTG

Der *tac*-Promotor in pRL59EH- Ω enthält einen *lac*-Operator, so dass die Expression prinzipiell durch den Repressor LacI inhibiert und mittels IPTG induziert werden kann (de Boer *et al.*, 1983). LacI ist auf dem Expressionsvektor codiert und sollte in Abwesenheit von IPTG zu einer Repression führen. Bei *E. coli* XL1-Blue pRL59EH_ectC_Acry_His und pSynect2 war erwartungsgemäß kaum eine Produktion ohne Zugabe des Induktors nachweisbar. In *Synechocystis* hingegen konnte sowohl bei Wachstum mit als auch ohne IPTG eine heterologe Produktion von EctC und Hydroxyectoin beobachtet werden. Varman *et al.* (2013) haben ebenfalls den *tac*-Promotor für die heterologe Expression in *Synechocystis* verwendet und festgestellt, dass mit dem Produktionsstamm eine hohe Produktausbeute in Abwesenheit von IPTG erreicht wird.

Für den *trc*-Promotor, der sich vom *tac*-Promotor nur durch einen *spacer* zwischen -35- und -10-Region von 17 statt 16 bp unterscheidet (Brosius *et al.*, 1985), konnten in *Synechocystis* ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit beobachtet werden (Guerrero *et al.*, 2012). Die heterologe Ethylen-Produktion war nahezu gleich, unabhängig davon, ob IPTG vorhanden war oder nicht. Huang *et al.* (2010) konnten demonstrieren, dass die Aktivität des *trc*-Promotors durch LacI nur um 25 % reduziert wird verglichen mit der Aktivität in Abwesenheit des Repressors. Das lässt auf eine ineffiziente Repression der Promotoren in *Synechocystis* schließen und könnte mit einer geringen Expression von *lacI* zusammenhängen. Andererseits könnte die geringe Repression auf Unterschiede im Aufbau der RNA-Polymerase von Cyanobakterien verglichen mit *E. coli* und deren Interaktion mit *E. coli*-abstammenden Promotoren zurückzuführen sein (Heidorn *et al.*, 2011).

Weiterhin haben Huang *et al.* eine vollständige Induktion des *trc*-Promotors in *Synechocystis* durch Zugabe von 2 mM IPTG erreicht. Demnach könnte auch eine zu niedrige IPTG-Menge (0,5 mM) ein Grund für die annähernd gleiche Produktion mit bzw. ohne Induktor in *Synechocystis* pSynect2 gewesen sein. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob die Produktion von Hydroxyectoin durch eine höhere IPTG-Konzentration gesteigert werden könnte.

4.3.1.4 Genetische Stabilität der Expressionsvektoren

Die maximale Hydroxyectoin-Produktion, 25,2 mg/g TBM intrazellulär und 27,3 mg/L extrazellulär, konnte mit einem frisch konjugierten *Synechocystis*-Stamm erreicht werden. Dabei hatten die Kulturen statt der üblichen dunkelgrünen Färbung eine hellgrüne bis gelbliche Farbe, die auf eine Chlorose hindeutet. Bei Cyanobakterien wird in Folge eines Nährstoffmangels, z.B. Stickstoff, der Metabolismus auf das Überleben der Zelle eingestellt, wobei u.a. die photosynthetischen Pigmente abgebaut werden (Schwarz & Forchhammer, 2005). Dieser Prozess führt zum Bleichen der Cyanobakterien und wird daher als Chlorose bezeichnet (Allen & Smith, 1969). Das BG11-Medium beinhaltet 1,5 g NaNO₃/L (0,25 g N/L). Unter der Annahme, dass 11 % Stickstoff in der TBM von *Synechocystis* vorliegen (Shastri & Morgan, 2005), sind rund 30 mg N/L in die gebildete TBM (ca. 0,25 g/L) und weitere 5 mg/L in das extrazelluläre Hydroxyectoin geflossen. Daher kann ein Stickstoff-Mangel ausgeschlossen werden. Aber ein anderer Nährstoffmangel, sonstige Stressfaktoren oder ein negativer Effekt der heterologen Expression (z.B. *metabolic burden*) könnten Auslöser für die vermutete Chlorose gewesen sein.

Für die Hydroxyectoin-Produktion mit *Synechocystis* pSynect2 konnten starke Schwankungen beobachtet werden und bei manchen Wachstumsversuchen war kein Hydroxyectoin nachweisbar. In diesen Fällen konnte auch, trotz Selektion mit Antibiotika, das *ectABCD*-Gencluster nicht mehr mittels PCR in der Gesamt-DNA detektiert werden. Eine durch spontane Mutation erworbene Resistenz von *Synechocystis* ist unwahrscheinlich, da zwei Antibiotika eingesetzt wurden und vor der Konjugation getestet wurde, ob der Wildtyp noch selektionierbar ist. Zusammen mit der Beobachtung, dass die höchste Produktion kurz nach Konjugation erreicht wurde, deuten die Schwankungen auf eine genetische Instabilität hin. Chen *et al.* (2016) konnten bei dem Versuch ein Proteorhodopsin unter Verwendung des *trc*-Promotors in *Synechocystis* zu produzieren, keine heterologe Expression nachweisen. Dies wurde auf eine genetische Instabilität des Expressionsvektors zurückgeführt, weil im Anschluss an die Kultivierung nur mutierte Plasmide isoliert werden konnten. Bei anderen rekombinanten *Synechocystis*-Stämmen war vermutlich auch eine genetische Instabilität ausschlaggebend für die verminderte bzw. fehlende Produktion (Jones, 2014; Cassier-Chauvat *et al.*, 2016). Dabei wurde die genetische Instabilität durch eine Veränderung der Gensequenz, z.B. eine Punktmutation, eine Deletion größerer Fragmente oder eine Insertion genetischer Elemente, hervorgerufen.

Die genetische Instabilität der heterologen Produktionsstämme könnte u.a. mit dem Effekt des *metabolic burden* zusammenhängen, durch den spontane Mutationen in der artfremden Gensequenz begünstigt sein könnten. Im Fall von *E. coli* werden Stämme mit *recA*-Deletion für eine erhöhte Stabilität der Plasmide eingesetzt. Eine *recA*-Deletionsmutante von *Synechocystis* konnte zwar auch generiert werden (Minda *et al.*, 2005), aber diese zeigte nur eingeschränktes Wachstum bei normaler Beleuchtungsstärke und ist daher nicht für die heterologe Produktion geeignet. Alternativen zur Steigerung der genetischen Stabilität werden in Kapitel 4.3.3 erläutert.

4.3.1.5 Nicht-funktionelle Expressionssysteme

pSynect1 Für *E. coli* XL1-Blue pSynect1 mit *ectABCD* aus *A. cryptum* war nur eine marginale Hydroxyectoin-Produktion detektierbar (vgl. Abb. 3.40). Das Vektorsystem kann nicht ausschlaggebend gewesen sein, da die Expression mit pSynect2 auf Basis von pRL59EH- Ω erfolgreich war. Zudem konnte in dieser und vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass das *A. cryptum*-Gencluster in *E. coli* funktionell ist. Daher hat eventuell eine Mutation im Vektor zum Funktionsverlust eines oder mehrerer Proteine geführt, was mittels Sequenzierung bestätigt werden könnte.

pSynect3 In *Synechocystis* pSynect3 mit *ectABC* aus *A. cryptum* unter Kontrolle des *psbA1*-Promotors war kein Ectoin nachweisbar. Der Ausgangsvektor pVZ322 ist prinzipiell in *Synechocystis* funktionell (Zinchenko *et al.*, 1999), die richtige pSynect3-Sequenz wurde mittels Sequenzierung bestätigt und *ectC* konnte in der Gesamt-DNA des konjugierten Stamms nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.42). Dennoch könnte die genetische Stabilität ein Grund für das Ausbleiben der Produktion gewesen sein (vgl. 4.3.1.4). Denkbar ist auch, dass die Enzyme aus *A. cryptum* in *Synechocystis* nicht funktionell waren, was durch einen EctC-Aktivitätstest mit *Synechocystis* pRL59EH_ectC_Acry_His untersucht werden könnte. Zudem könnte die Aktivität des *psbA1*-Promotors unter den getesteten Bedingungen zu gering gewesen sein, z.B. wegen einer ungenügenden Lichtintensität (Dai *et al.*, 2014). Diese Annahme könnte durch Anzucht bei höheren Beleuchtungsstärken oder Verwendung eines anderen Promotors bestätigt werden.

Δ ggpS-Mutante Die Experimente mit der Δ ggpS-Mutante von *Synechocystis*, die kein Glucosylglycerin synthetisieren kann und bei 2 bis 3% NaCl nicht mehr wächst (Marin *et al.*, 1998), sollten zeigen, ob die Ectoine produziert werden und das Wirts-eigene Solut bei osmotischem Stress ersetzen können. Da die mit pSynect2 bzw. pSynect3 konjugierte Δ ggpS-Mutante nicht gewachsen ist, war durch die Ectoine wahrscheinlich kein ausreichender Schutz gegenüber dem Salzstress gegeben. Ein möglicher Grund ist eine fehlende oder unzureichende Produktion der Ectoine, was mit einer genetischen Instabilität der Vektoren zusammenhängen könnte (vgl. 4.3.1.4). Weiterhin könnte es sein, dass die Ectoine ins Medium sekretiert wurden und nicht wieder aufgenommen werden konnten (vgl. 4.3.1.2). Außerdem ist denkbar, dass die Ectoine zwar produziert wurden, aber Glucosylglycerin nicht als kompatibles Solut in *Synechocystis* ersetzen konnten oder eine toxische Wirkung hatten. Diesen Annahmen könnte durch Anzucht der Δ ggpS-Mutanten ohne NaCl und anschließende HPLC-Analyse nachgegangen werden.

4.3.2 Hydroxyectoin-Produktion im Vergleich zu *E. coli* und zum Donorstamm

Vergleich mit *E. coli* XL1-Blue pSynect2 Für die Hydroxyectoin-Produktion mit *Synechocystis* pSynect2 waren Schwankungen zu beobachten, wobei sich ein intrazellulärer Solutgehalt von 0,2 bis maximal 25,2 mg/g TBM in BG11 ohne NaCl ergab (vgl. Tab. 3.3). *E. coli* XL1-Blue pSynect2 hatte einen intrazellulären Hydroxyectoin-Gehalt von rund 6 mg/g TBM ohne NaCl-Zugabe und ca. 33 mg/g TBM bei Anzucht mit 1% NaCl (vgl. Abb. 3.40). Das mit *Synechocystis* erreichte Maximum

lag somit in der gleichen Größenordnung wie der Hydroxyectoin-Gehalt von *E. coli* XL1-Blue. Bei *Synechocystis* pSynect2 konnte eine extrazelluläre Hydroxyectoin-Konzentration von bis zu 27,3 mg/L detektiert werden. Im Fall von *E. coli* XL1-Blue hingegen war kein Hydroxyectoin im Medium nachweisbar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in *E. coli* XL1-Blue die Aufnahmesysteme für Hydroxyectoin bei 1 % NaCl aktiv waren und die extrazellulär akkumulierten Solute wieder aufgenommen wurden.

Die ähnliche Hydroxyectoin-Produktion in *Synechocystis* und *E. coli* XL1-Blue könnte damit zusammenhängen, dass die Consensus-Sequenzen für die -35- und -10-Region der σ^{70} -abhängigen Promotoren, zu denen der *tac*-Promotor gehört, bei beiden Stämmen fast identisch sind (Wösten, 1998; Imamura & Asayama, 2009). Außerdem unterscheidet sich bei *Synechocystis* das 3'-Ende der 16S rRNA (5'-ACCUCUUU-3') nur in der letzten Base von dem in *E. coli*, weshalb auch die SD-Sequenz innerhalb der RBS ähnlich sein sollte. In Übereinstimmung damit ergeben sich mit dem RBS Calculator sehr ähnliche theoretische Ti-Raten für *ectABCD* von pSynect2 in beiden Stämmen.

Insgesamt war die Hydroxyectoin-Produktion in *Synechocystis* und *E. coli* XL1-Blue mit dem Expressionsvektor pSynect2 wesentlich geringer im Vergleich zu anderen heterologen Produktionssystemen, z.B. *E. coli* DH5 α pASK_ectABCDask. Dies verdeutlicht, dass die Wahl des Expressionsvektors, des Wirtsstamms und des Donorstamms entscheidend für eine erfolgreiche heterologe Expression und hohe Produktausbeute ist. Im direkten Vergleich von pSynect2 und pASK_ectABCDask könnten u.a. die Kopienzahl, die Plasmidstabilität, die Promotoraktivität und die Aktivität der rekombinanten Proteine im Wirtsstamm für die unterschiedliche Produktionsleistung verantwortlich sein.

Vergleich mit dem Donorstamm *P. stutzeri* Der Donorstamm *P. stutzeri* synthetisiert in Abwesenheit von NaCl kein Hydroxyectoin und bei Wachstum mit NaCl wird Hydroxyectoin stets in Kombination mit N-Acetyl-glutaminylglutamin-1-amid (NAGGN) und Trehalose intrazellulär akkumuliert (Seip *et al.*, 2011). Bei Anzucht in MM63-0,5 beträgt der intrazelluläre Hydroxyectoin-Gehalt etwa 8 mg/g TBM und bei 1 % NaCl steigt der Gehalt auf ca. 20 mg/g TBM an. Demzufolge konnte mit *Synechocystis* pSynect2 eine Hydroxyectoin-Produktion in der gleichen Größenordnung wie beim Donorstamm erreicht werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Hydroxyectoin-Synthese im Donorstamm durch osmotischen Stress reguliert wird, hätte in *Synechocystis* unter Verwendung des NaCl-unabhängigen *tac*-Promotors eine höhere Produktion erwartet werden können. Allerdings ist nicht klar, ob regulatorische Elemente innerhalb des *ectABCD*-Genclusters von *P. stutzeri* vorliegen, die einen Einfluss auf die Expression in *Synechocystis* haben. Dazu kommen der Selektionsdruck durch die Antibiotika und eine mögliche genetische Instabilität des Expressionsvektors. Darüber hinaus könnte die Aktivität der Enzyme in *Synechocystis* geringer sein als im Donorstamm und eine Abweichung der *codon usage* könnte ebenfalls zu einer geringeren Expression und Hydroxyectoin-Produktion geführt haben (vgl. 4.3.3).

4.3.3 Optimierung der heterologen Produktion in *Synechocystis*

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Produktion von Hydroxyectoin in *Synechocystis* erreicht werden. Allerdings waren starke Schwankungen zu beobachten und die Hydroxyectoin-Ausbeute fiel relativ gering aus verglichen mit anderen heterologen Produktionssystemen. Zudem waren die Wachstumsrate und TBM von *Synechocystis* unter den gegebenen Produktionsbedingungen geringer als bei *E. coli*. Eine Steigerung der Wachstumsrate, TBM und heterologen Produktion könnte durch veränderte Wachstumsbedingungen, z.B. CO₂-Begasung und Variation der Beleuchtungsstärke, erreicht werden. Darüber hinaus könnte eine Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion und Steigerung der genetischen Stabilität auf verschiedenen Ebenen der Genexpression erfolgen.

Kopienzahl Die genetische Stabilität eines Plasmids ist u.a. von der Anzahl der Kopien pro Zelle abhängig, je weniger Kopien vorliegen, desto geringer ist die Stabilität (Becker & Meyer, 1997). Für den in dieser Arbeit verwendeten Vektor pRL59EH- Ω , ein RSF1010-Derivat, wurde keine Kopienzahl ermittelt. Für andere RSF1010-Derivate ergab sich in *Synechocystis* eine mittlere Kopienzahl von 10 bis 30 (Marraccini *et al.*, 1993; Ng *et al.*, 2000). Die Hydroxyectoin-Produktion könnte eventuell durch Verwendung eines Vektors mit höherer Kopienzahl, z.B. das native Plasmid pCA2.4, verbessert werden (Armshaw *et al.*, 2015). Dabei muss jedoch bedacht werden, dass sich mit zunehmenden Vektorkopien wiederum der Effekt des *metabolic burden* stärker auswirken könnte (Seo & Bailey, 1985).

Genomische Integration Ein anderer Ansatz zur Optimierung der heterologen Produktion ist das *ectABCD*-Gencluster ins Genom von *Synechocystis* zu integrieren. Eine genomische Integration ist zwar aufwendiger, aber dafür stabiler als ein replikatives Plasmid, vor allem über einen längeren Zeitraum. Im Genom von *Synechocystis* befinden sich mehrere neutrale Genloci, z.B. *slr0168*, die für eine genomische Integration geeignet sind, weil deren Modifikation keine erkennbare Auswirkung auf den Phänotyp hat (Kunert *et al.*, 2000). Außerdem liegen im Durchschnitt 12 Kopien des Chromosoms pro Zelle vor (Labarre *et al.*, 1989). Demzufolge könnte das *ectABCD*-Gencluster durch längere Selektion mehrmals ins Wirtsgenom eingebracht werden (Vermaas, 1996).

Promotor Die Consensus-Sequenzen für die -35- und -10-Region der σ^{70} -abhängigen Promotoren sind bei *E. coli* und Cyanobakterien fast identisch (Wösten, 1998; Imamura & Asayama, 2009). Daher ist es nicht überraschend, dass der von *E. coli*-abstammende *tac*-Promotor mit optimaler Consensus-Sequenz in *Synechocystis* funktionell ist (Ferino & Chauvat, 1989). Jedoch zeigen andere häufig in *E. coli* verwendete Promotoren kaum oder keine Aktivität in *Synechocystis*, z.B. der *tet*- und *lac*-Promotor (Huang *et al.*, 2010). Zudem ist die Regulation anders als in *E. coli*, z.B. der *trc*-Promotor wird weniger effizient durch LacI reprimiert, was mit Unterschieden im Aufbau der RNA-Polymerase beider Organismen zusammenhängen könnte (Heidorn *et al.*, 2011). Zur Optimierung der Hydroxyectoin-Produktion in *Synechocystis* könnte die IPTG-Menge variiert und ein anderer heterologer oder nativer Promotor getestet werden. Die nativen *rbc*- und *psbA2*-Promotoren, die in die Expression der RubisCO bzw. des Photosystems II involviert sind, erlauben eine starke konstitutive Expression und wurden schon erfolgreich für die heterologe

Produktion verwendet (Gao *et al.*, 2012; Lindberg *et al.*, 2010). Allerdings könnte ein streng reguliertes Expressionssystem für eine hohe genetische Stabilität von Vorteil sein (Cassier-Chauvat *et al.*, 2016). Bei der Kultivierung über einen langen Zeitraum könnte zunächst Biomasse aufgebaut werden, während die heterologe Expression möglichst vollständig reprimiert ist und erst zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert wird. Eine bessere Kontrolle der LacI-regulierten Promotoren in *Synechocystis* konnte durch Überexpression von LacI und Veränderung der Promotorstruktur für eine höhere Affinität des Repressors erreicht werden (Albers *et al.*, 2015; Guerrero *et al.*, 2012). Eine weitere Möglichkeit für eine streng regulierte Expression bietet der native Nickel-induzierbare Promotor (Englund *et al.*, 2016).

RBS In pSynect2 befinden sich vor *ectA* eine RBS aus *E. coli* und vor den Genen *ectBCD* die potenziellen RBS aus *P. stutzeri*. Bei beiden Stämmen ist das 3'-Ende der 16S rRNA identisch (5'-ACCUCUUA-3') und im Fall von *Synechocystis* unterscheidet sich nur die letzte Base, weshalb auch die SD-Sequenz innerhalb der RBS ähnlich sein sollte. Mit dem RBS Calculator (Salis *et al.*, 2009) ergeben sich jedoch, bis auf für *ectB* (6905), niedrige theoretische Ti-Raten (≤ 100) für die Gene in *Synechocystis* pSynect2, die auf eine geringe Translationsrate hindeuten. Demnach könnte die Hydroxyectoin-Produktion eventuell durch effizientere native oder synthetische RBS gesteigert werden. Interessant ist, dass laut Ma *et al.* (2002) nur 26 % der Gene von *Synechocystis* eine SD-Sequenz aufweisen und somit wahrscheinlich alternative Faktoren anstelle der RBS eine Rolle bei der Initiation der Translation spielen.

Codon usage Die Codons des universellen genetischen Codes werden von verschiedenen Spezies unterschiedlich oft genutzt und die *codon usage* hat einen Einfluss auf die Regulation der Translation. Die Häufigkeit eines bestimmten Codons steht in Korrelation mit der Konzentration der zugehörigen tRNA in der Zelle (Ikemura, 1981). Selten verwendete Codons können zu einer verringerten Translationsrate führen (Sørensen *et al.*, 1989). Die mittlere Differenz der *codon usage* vom Donorstamm *P. stutzeri* und Wirtsstamm *Synechocystis* beträgt entsprechend des Online-Tools GCUA (Fuhrmann *et al.*, 2004) 23,6%. In Übereinstimmung damit besteht eine große Abweichung im GC-Gehalt zwischen Donor- und Wirtsstamm (63,3 vs. 47,7%). Der Unterschied könnte die heterologe Expression beeinträchtigt haben, falls häufig in der mRNA vorkommende Codons nur selten von *Synechocystis* verwendet wurden.

Neben der generellen *codon usage* wurden daher auch Codons in den Genen *ectABCD* von *P. stutzeri* betrachtet, die von *Synechocystis* selten genutzt werden ($< 20\%$). Dabei zeigte sich, dass vor allem Serin (TCG, AGC) und Leucin (CTG, CTC) betroffen sind, wobei die Häufigkeit des Codons TCG in *Synechocystis* sogar nur 7% beträgt (vgl. Abb. 4.6). Außerdem besteht eine große Differenz in der Verwendung von CCG, das in *P. stutzeri* am häufigsten Prolin codiert, sowie von GTC (Valin) und GCG (Alanin). Durch Anpassung der Gensequenz von *ectABCD* an die *codon usage* von *Synechocystis* könnte die heterologe Hydroxyectoin-Produktion vermutlich gesteigert werden. Lindberg *et al.* (2010) konnten die heterologe Expression einer pflanzlichen Isopren-Synthase in *Synechocystis* durch Codon-Optimierung zehnfach erhöhen.

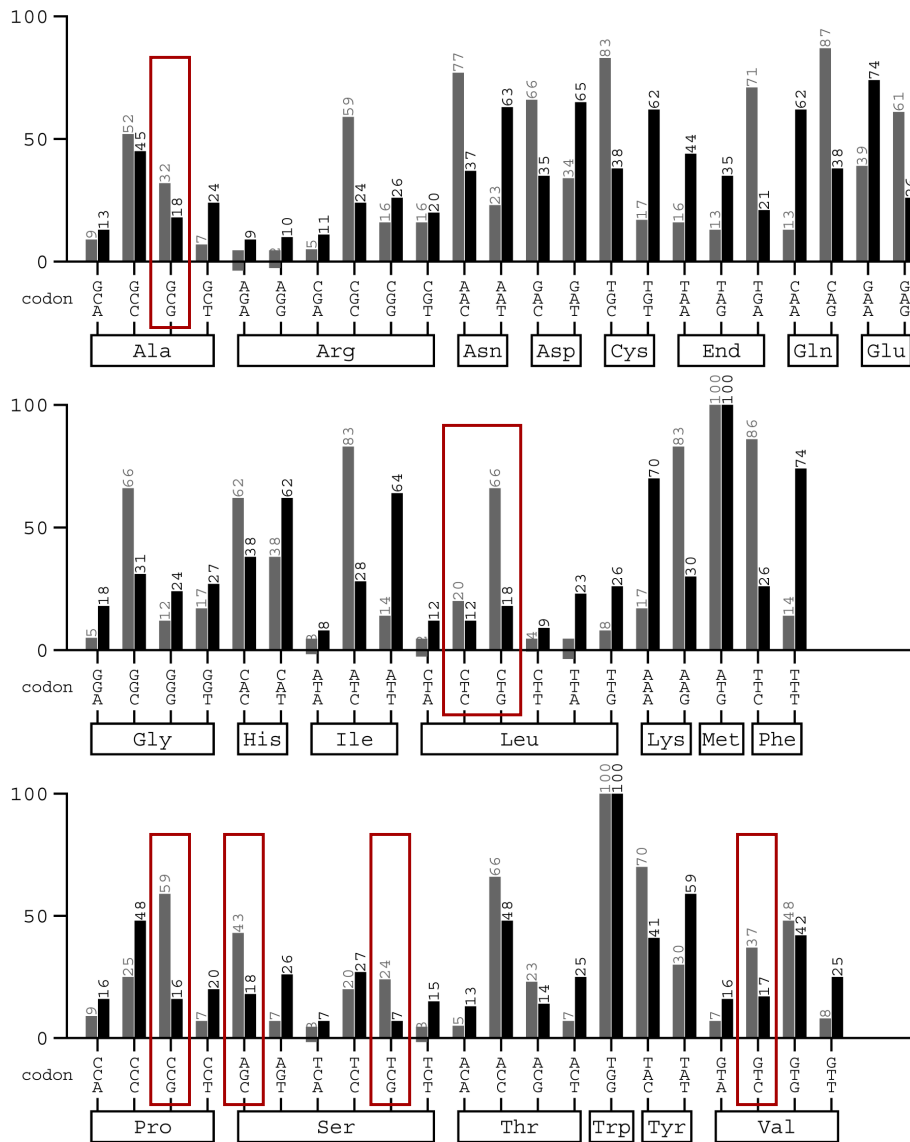


Abb. 4.6: Vergleich der *codon usage* von *Synechocystis* und *P. stutzeri*

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der Nutzung jedes Codons in *P. stutzeri* (grau) und *Synechocystis* (schwarz). Die mittlere Differenz aller Codons beträgt 23,6%. Die größten Abweichungen hinsichtlich *ectABCD* von *P. stutzeri* sind rot markiert. Die *codon usage*-Tabellen (Kazusa-Datenbank, Nakamura *et al.*, 2000) wurden mit dem Online-Tool GCUA (Fuhrmann *et al.*, 2004) analysiert.

Neben der Optimierung der heterologen Produktion sollte *Synechocystis* im großen Maßstab kultiviert und die Hydroxyectoin-Produktion mittels NMR verifiziert werden. Ein genetisch stabiler Produktionsstamm könnte bei höheren Salinitäten ($\geq 2\%$ NaCl) kultiviert werden, um den Einfluss der osmotischen Konzentration und des Wirts-eigenen Soluts Glucosylglycerin auf die intrazelluläre und extrazelluläre Akkumulation von Hydroxyectoin zu untersuchen. Dabei wäre auch ein Vergleich des Wildtyps mit der $\Delta ggpS$ -Mutante (Marin *et al.*, 1998), die kein Glucosylglycerin synthetisieren kann, interessant. Ein weiteres Ziel wäre die Produktion von Ectoin in *Synechocystis* zu etablieren und dessen Wirkung bei osmotischen Stress zu analysieren. Darüber hinaus wären Experimente zur Wirkung der Ectoine unter anderen Stressbedingungen, z.B. Hitze- und Trockenstress sowie hohe Lichtintensitäten in *Synechocystis* interessant.

5 Zusammenfassung

Die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin werden von vielen Mikroorganismen zur Anpassung an osmotischen Stress synthetisiert. Darüber hinaus haben sie eine protektive Wirkung auf Biomoleküle, Zellen und Gewebe gegenüber verschiedenen Stressfaktoren und sind daher für biotechnologische Anwendungen interessant. In dieser Arbeit wurde die Biosynthese der Ectoine sowohl in dem natürlichen Produzenten *A. cryptum* als auch in *E. coli* und *Synechocystis*, die als heterologe Produktionssysteme dienen, untersucht. Schwerpunkt war die Produktion bei geringer Salinität, um den bisherigen Produktionsprozess mit *H. elongata* zu optimieren, der durch einen erhöhten NaCl-Bedarf und eine aufwendige Trennung der Ectoine kostenintensiv ist.

A. cryptum Im Vergleich zu anderen Bakterien hat *A. cryptum* eine geringe NaCl-Toleranz ($\leq 5\%$), aber eine hohe Toleranz gegenüber $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ($> 300\text{ mM}$), was durch Wachstumsversuche in dieser und vorangehenden Arbeiten festgestellt wurde. HPLC- und NMR-Analysen in dieser Arbeit zeigten, dass *A. cryptum* hauptsächlich Hydroxyectoin und Trehalose als Antwort auf osmotischen Stress durch NaCl oder $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ synthetisiert. Bei 2% NaCl (342 mM) und 300 mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ergab sich eine ähnliche osmotische Konzentration und annähernd das gleiche intrazelluläre Verhältnis von Trehalose zu Hydroxyectoin (1,5:1). Ein bioinformatischer Vergleich zeigte, dass sich die Ectoinsynthase (EctC) von *A. cryptum* durch eine geringe Acidität deutlich von EctC halophiler Bakterien unterscheidet. Dies stimmt mit vorherigen Enzymtests überein, die eine Abnahme der Aktivität mit steigender NaCl-Konzentration ergaben. Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass das *ectABCDask*-Gencluster von *A. cryptum* ein geeigneter Kandidat für eine salzfreie Produktion der Ectoine in *E. coli* ist.

E. coli Aufbauend auf den von Bethlehem (2015) konstruierten Produktionsstämmen sollte in dieser Arbeit die Produktion der Ectoine in *E. coli* DH5 α unter Verwendung des *ectABCDask*-Genclusters aus *A. cryptum* näher charakterisiert und optimiert werden. Das Produktionssystem basiert auf dem Vektor pASK-IBA3 mit dem AHT-induzierbaren *tet*-Promotor und erlaubt eine hohe Produktion sowie extrazelluläre Akkumulation der Solute bei geringer Salinität.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *E. coli* DH5 α pASK_ectABCD_m aufgrund einer Mutation in *ectD* und einem damit verbundenen Funktionsverlust der Ectoinhydroxylase Ectoin statt Hydroxyectoin produziert. Weiterhin konnte ein geringer positiver Effekt der Aspartokinase Ask von *A. cryptum* auf die Hydroxyectoin-Produktion in *E. coli* festgestellt werden. Physiologische Untersuchungen ergaben, dass die höchste Ausbeute an Ectoin bzw. Hydroxyectoin und ein minimaler Anteil unerwünschter Nebenprodukte bei Wachstum mit Glycerin und wenig NaCl (0,25-0,5%) erreicht wird. Die Wachstumsrate war zwar geringer als bei Anzucht mit Glucose und anderen C-Quellen, aber dafür wurde Kohlenstoff vermehrt in die Produktion der Ectoine statt der Biomasse gelenkt. Die C-Bilanz für die Produktion der Ectoine separat vom restlichen Metabolismus

zeigte, dass neben den zwei theoretisch benötigten Glycerin-Molekülen ein weiteres Glycerin pro Ectoin bzw. Hydroxyectoin verbraucht wurde. Mögliche Gründe sind u.a. die Biosynthese der rekombinanten Proteine und ein erhöhter NADPH-Verbrauch in *E. coli*. Zudem konnte anhand der N-Bilanz ein hoher Stickstoffbedarf des Produktionssystems festgestellt werden.

Durch einen Aktivitätstest mit Rohextrakten der Produktionsstämme wurde die Annahme bekräftigt, dass EctC ein Reaktionsgleichgewicht zwischen ADABA und Ectoin zu Gunsten der stabileren Form Ectoin einstellt (1:16-20). Weiterhin wurde unter manchen Produktionsbedingungen eine extrazelluläre Akkumulation von ADABA beobachtet. Als mögliche Gründe kommen eine zu geringe EctC-Aktivität, ein erhöhter Stofffluss im Metabolismus und das EctC-vermittelte Reaktionsgleichgewicht in Betracht. Die Produktion im Schüttelkolben konnte grundsätzlich im größeren Maßstab reproduziert werden. Aber bei der Fed-Batch-Fermentation wurden ADABA und Acetat, eventuell bedingt durch einen Überflussmetabolismus, vermehrt im Medium akkumuliert. Die mittels separatem *tet*-Promotor und optimierter RBS gesteigerte Expression von *ectC* führte unter manchen Bedingungen zu einer höheren Ectoin-Ausbeute. Aber unter optimierten Wachstumsbedingungen konnte das Produktionssystem auch bei geringerer Proteinexpression eine hohe Produktion der Ectoine erreichen.

Mit dem optimierten Ectoin- und Hydroxyectoin-Produzenten konnten ein hoher extrazellulärer Solutgehalt von 2,18 bzw. 2,93 g/g TBM und ein hoher Ertrag an Soluten von 0,36 bzw. 0,34 g/g Glycerin erzielt werden. Weiterhin ergab sich eine maximale spezifische Produktivität von bis zu 352,9 mg/(g TBM x h). Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Produktionsstämmen konnte das in dieser Arbeit optimierte Produktionssystem in *E. coli* die höchste spezifische Produktivität und bis auf eine Ausnahme den höchsten Ertrag erzielen.

Insgesamt zeichnet sich das optimierte Produktionssystem dadurch aus, dass entweder Ectoin oder Hydroxyectoin mit einer hohen spezifischen Produktivität in Minimalmedium mit Glycerin und wenig NaCl ($\leq 0,5\%$) produziert werden kann. Außerdem werden die produzierten Ectoine fast ausschließlich im Medium akkumuliert ($\geq 99\%$) und der Anteil unerwünschter Nebenprodukte ist minimal ($\leq 4\%$). Aufgrund dessen könnte das Produktionssystem maßgeblich zur Optimierung des derzeitigen industriellen Produktions- und Gewinnungsprozesses beitragen.

Synechocystis Das Cyanobakterium *Synechocystis* könnte genutzt werden, um biotechnologisch interessante Produkte, wie die Ectoine, aus CO₂ und Licht zu produzieren. In dieser Arbeit wurde die Expression von *ectC* aus *A. cryptum* mittels Western Blot in *Synechocystis* nachgewiesen. Außerdem konnte Hydroxyectoin erstmals unter phototrophen Bedingungen in *Synechocystis* mit dem *ectABCD*-Gencluster von *P. stutzeri* produziert werden. Mittels HPLC ergab sich ein intrazellulärer und extrazellulärer Solutgehalt von bis zu 25,2 bzw. 112,5 mg/g TBM bei Wachstum ohne NaCl. Insgesamt fiel die Produktion verglichen mit anderen Produktionssystemen jedoch gering aus und ging mit starken Schwankungen einher, die auf eine genetische Instabilität des Expressionsvektors hinweisen. Davon abgesehen wurde mit den Ergebnissen dieser Arbeit eine Basis geschaffen, um die heterologe Produktion der Ectoine in *Synechocystis* voranzutreiben.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Aziz, H., Wadie, W., Abdallah, D. M., Lentzen, G. & Khayyal, M. T. (2013). Novel effects of ectoine, a bacteria-derived natural tetrahydropyrimidine, in experimental colitis. *Phytomedicine* **20**, 585–591.
- Alavi, P., Starcher, M. R., Zachow, C., Müller, H. & Berg, G. (2013). Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405^T. *Frontiers in Plant Science* **4**, 141.
- Albers, S. C., Gallegos, V. A. & Peebles, C. A. (2015). Engineering of genetic control tools in *Synechocystis* sp. PCC 6803 using rational design techniques. *Journal of Biotechnology* **216**, 36–46.
- Allen, M. M. (1984). Cyanobacterial cell inclusions. *Annual Review of Microbiology* **38**, 1–25.
- Allen, M. M. & Smith, A. J. (1969). Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Archiv für Mikrobiologie* **69**, 114–120.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.
- Andersson, M. M., Breccia, J. D. & Hatti-Kaul, R. (2000). Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **32**, 145–153.
- Angermayr, S. A., Paszota, M. & Hellingwerf, K. J. (2012). Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 7098–7106.
- Arakawa, T. & Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal* **47**, 411–414.
- Armshaw, P., Carey, D., Sheahan, C. & Pembroke, J. T. (2015). Utilising the native plasmid, pCA2.4, from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 as a cloning site for enhanced product production. *Biotechnology for Biofuels* **8**, 201.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A. & Engert, A. (2000). Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1572–1579.
- Becker, E. C. & Meyer, R. J. (1997). Acquisition of resistance genes by the IncQ plasmid R1162 is limited by its high copy number and lack of a partitioning mechanism. *Journal of Bacteriology* **179**, 5947–5950.
- Becker, J., Schäfer, R., Kohlstedt, M., Harder, B. J., Borchert, N. S., Stöveken, N., Bremer, E. & Wittmann, C. (2013). Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microbial Cell Factories* **12**, 110.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H. & Kompala, D. S. (1990). Plasmid-encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* **35**, 668–681.
- Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A. & Ghazi, A. (1996). Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *Journal of Membrane Biology* **151**, 175–187.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**, 293–300.
- Bestvater, T. & Galinski, E. A. (2002). Investigation into a stress-inducible promoter region from *Marinococcus halophilus* using green fluorescent protein. *Extremophiles* **6**, 15–20.
- Bestvater, T., Louis, P. & Galinski, E. A. (2008). Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: By-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Systems* **4**, 12.
- Bethlehem, L. (2015). Production of ectoines in *Escherichia coli* utilizing the hydroxyectoine gene cluster from the non-halophilic *Acidiphilium cryptum*. Masterarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Bethlehem, L., Moritz, K. D., Sümmermann, M. L. & Galinski, E. A. (2017). Biotransformation of glycerol to ectoine. Poster, Biotransformations-2017 Hannover.
- Betnér, I. & Földi, P. (1988). The FMOC-ADAM-approach to amino acid analysis. *LC-GC* **6**, 832–840.
- Black, T. A. & Wolk, C. P. (1994). Analysis of a Het^- mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing. *Journal of Bacteriology* **176**, 2282–2292.
- Blake, M., Johnston, K., Russell-Jones, G. & Gotschlich, E. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry* **136**, 175–179.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911–917.
- Bolten, C. J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J.-C. & Wittmann, C. (2007). Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Analytical Chemistry* **79**, 3843–3849.
- Borges, N., Ramos, A., Raven, N. D., Sharp, R. J. & Santos, H. (2002). Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles* **6**, 209–216.
- Botta, C., Di Giorgio, C., Sabatier, A.-S. & De Méo, M. (2008). Genotoxicity of visible light (400 – 800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **91**, 24–34.
- Brauner, J. F. (2016). Kinetik der Hydroxylierung von Ectoin und Homoectoin im Zuge einer Ganzzellbiotransformation durch *E. coli* BL21 pETectDHis. Masterarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Brünig, A. N. S. (2005). Molekulargenetische und physiologische Studien zur Entwicklung eines Expressionssystems in *Halomonas elongata* DSMZ 2581^T. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Brosius, J., Erfle, M. & Storella, J. (1985). Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. Effect on its *in vivo* activity. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3539–3541.
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Reviews* **40**, 803–846.
- Buenger, J. & Driller, H. (2004). Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacology and Physiology* **17**, 232–237.
- Burdziak, A. (2006). Entwicklung eines bakteriellen Stammes zur Produktion des kompatiblen Solutes Mannosylglycerat. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Bursy, J., Pierik, A. J., Pica, N. & Bremer, E. (2007). Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 31147–31155.
- Calderón, M. I., Vargas, C., Rojo, F., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Ventosa, A. & Nieto, J. J. (2004). Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. *Microbiology* **150**, 3051–3063.
- Casali, N. (2003). *Escherichia coli* host strains. In *E. coli Plasmid Vectors. Methods in Molecular Biology* (eds N. Casali & A. Preston). Totowa, NJ: Humana Press, 27–48.
- Cassier-Chauvat, C., Veaudor, T. & Chauvat, F. (2016). Comparative genomics of DNA recombination and repair in cyanobacteria: Biotechnological implications. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1809.
- Chen, Q., van der Steen, J. B., Dekker, H. L., Ganapathy, S., de Grip, W. J. & Hellingwerf, K. J. (2016). Expression of *holo*-proteorhodopsin in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabolic Engineering* **35**, 83–94.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156–159.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 2172–2175.

- Cánovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Rhodes, D., Ventosa, A. & Nieto, J. J. (1997). Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 25794–25801.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881–10890.
- Csonka, L. N. (1982). A third L-proline permease in *Salmonella typhimurium* which functions in media of elevated osmotic strength. *Journal of Bacteriology* **151**, 1433–1443.
- Culham, D. E., Lasby, B., Marangoni, A. G., Milner, J. L., Steer, B. A., van Nues, R. W. & Wood, J. M. (1993). Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *Journal of Molecular Biology* **229**, 268–276.
- Cummings, D. E., Fendorf, S., Singh, N., Sani, R. K., Peyton, B. M. & Magnuson, T. S. (2007). Reduction of Cr(VI) under acidic conditions by the facultative Fe(III)-reducing bacterium *Acidiphilium cryptum*. *Environmental Science & Technology* **41**, 146–152.
- Czech, L., Poehl, S., Hub, P., Stöveken, N. & Bremer, E. (2018). Tinkering with osmotically controlled transcription allows enhanced production and excretion of ectoine and hydroxyectoine from a microbial cell factory. *Applied and Environmental Microbiology* **84**, e01772–17.
- Czech, L., Stöveken, N. & Bremer, E. (2016). EctD-mediated biotransformation of the chemical chaperone ectoine into hydroxyectoine and its mechanosensitive channel-independent excretion. *Microbial Cell Factories* **15**, 126.
- Dagert, M. & Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**, 23–28.
- Dai, G.-Z., Qiu, B.-S. & Forchhammer, K. (2014). Ammonium tolerance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and the role of the *psbA* multigene family. *Plant, Cell and Environment* **37**, 840–851.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J. & Vasser, M. (1983). The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**, 21–25.
- Degenkolb, J., Takahashi, M., Ellestad, G. A. & Hillen, W. (1991). Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 1591–1595.
- Diaz Ricci, J. C. & Hernández, M. E. (2000). Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. *Critical Reviews in Biotechnology* **20**, 79–108.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. & Bakker, E. P. (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Archives of Microbiology* **150**, 348–357.
- Dörfler, L. (2014). Synthetic approach to a heterologous production system in *Halomonas elongata*. Masterarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Eichel, A., Wittig, J., Shah-Hosseini, K. & Mösges, R. (2013). A prospective, controlled study of SNS01 (ectoine nasal spray) compared to BNO-101 (phytotherapeutic dragées) in patients with acute rhinosinusitis. *Current Medical Research and Opinion* **29**, 739–746.
- Eilert, E., Kranz, A., Hollenberg, C. P., Piontek, M. & Suckow, M. (2013). Synthesis and release of the bacterial compatible solute 5-hydroxyectoine in *Hansenula polymorpha*. *Journal of Biotechnology* **167**, 85–93.
- Einarsson, S., Josefsson, B. & Lagerkvist, S. (1983). Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **282**, 609–618.
- Englund, E., Liang, F. & Lindberg, P. (2016). Evaluation of promoters and ribosome binding sites for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Scientific Reports* **6**, 36640.

- Espah Borujeni, A., Channarasappa, A. S. & Salis, H. M. (2014).** Translation rate is controlled by coupled trade-offs between site accessibility, selective RNA unfolding and sliding at upstream standby sites. *Nucleic Acids Research* **42**, 2646–2659.
- Farmer, W. R. & Liao, J. C. (1997).** Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3205–3210.
- Ferino, F. & Chauvat, F. (1989).** A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Gene* **84**, 257–266.
- Fischer, J., Quentmeier, A., Gansel, S., Sabados, V. & Friedrich, C. G. (2002).** Inducible aluminum resistance of *Acidiphilium cryptum* and aluminum tolerance of other acidophilic bacteria. *Archives of Microbiology* **178**, 554–558.
- Flores, E., Frías, J. E., Rubio, L. M. & Herrero, A. (2005).** Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* **83**, 117–133.
- Folsom, J. P. & Carlson, R. P. (2015).** Physiological, biomass elemental composition and proteomic analyses of *Escherichia coli* ammonium-limited chemostat growth, and comparison with iron- and glucose-limited chemostat growth. *Microbiology* **161**, 1659–1670.
- Fowden, L. (1972).** Amino acid complement of plants. *Phytochemistry* **11**, 2271–2276.
- Friedrich, C. (2001).** Aluminium-Resistenz von *Acidiphilium cryptum*. DE 19958977.
- Frings, E., Sauer, T. & Galinski, E. A. (1995).** Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *Journal of Biotechnology* **43**, 53–61.
- Fuentes, L. G., Lara, A. R., Martínez, L. M., Ramírez, O. T., Martínez, A., Bolívar, F. & Gosset, G. (2013).** Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microbial Cell Factories* **12**, 42.
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., Heitzer, M. & Hegemann, P. (2004).** Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Molecular Biology* **55**, 869–881.
- Fukuchi, S., Yoshimune, K., Wakayama, M., Moriguchi, M. & Nishikawa, K. (2003).** Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *Journal of Molecular Biology* **327**, 347–357.
- Galinski, E. A. (1986).** Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen, phototrophen Bakterien. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Galinski, E. A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **37**, 272–328.
- Galinski, E. A., Pfeiffer, H.-P. & Trüper, H. G. (1985).** 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *European Journal of Biochemistry* **149**, 135–139.
- Galinski, E. A. & Trüper, H. G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* **15**, 95–108.
- Gao, Z., Zhao, H., Li, Z., Tan, X. & Lu, X. (2012).** Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy & Environmental Science* **5**, 9857–9865.
- García-Esteva, R., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J. J. & Vargas, C. (2006).** The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Journal of Bacteriology* **188**, 3774–3784.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005).** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (ed. J. W. Walker). Totowa, NJ: Humana Press, 571–607.
- Gerdes, K. (1988).** The *parB* (*hok/sok*) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system. *Nature Biotechnology* **6**, 1402–1405.
- Giæver, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I. & Strøm, A. R. (1988).** Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **170**, 2841–2849.

- Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances* **13**, 247–261.
- Göller, K. & Galinski, E. A. (1999). Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **7**, 37–45.
- Gokarn, R. R., Evans, J. D., Walker, J. R., Martin, S. A., Eiteman, M. A. & Altman, E. (2001). The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 188–195.
- Gold, L. (1988). Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry* **57**, 199–233.
- Goltsman, D. S. A., Deneff, V. J., Singer, S. W., VerBerkmoes, N. C., Lefsrud, M., Mueller, R. S., Dick, G. J., Sun, C. L., Wheeler, K. E., Zemla, A., Baker, B. J., Hauser, L., Land, M., Shah, M. B., Thelen, M. P., Hettich, R. L., Banfield, J. F. (2009). Community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic iron-oxidizing "*Leptospirillum rubarum*"(group II) and "*Leptospirillum ferrodiazotrophum*"(group III) bacteria in acid mine drainage biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 4599–4615.
- Graf, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F. & Driller, H. (2008). The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clinics in Dermatology* **26**, 326–333.
- Grammann, K., Volke, A. & Kunte, H. J. (2002). New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the *bacteria* domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Journal of Bacteriology* **184**, 3078–3085.
- Grigorieva, G. & Shestakov, S. (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiology Letters* **13**, 367–370.
- Grothe, S., Krogsrud, R. L., McClellan, D. J., Milner, J. L. & Wood, J. M. (1986). Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **166**, 253–259.
- Gu, P., Yang, F., Su, T., Wang, Q., Liang, Q. & Qi, Q. (2015). A rapid and reliable strategy for chromosomal integration of gene(s) with multiple copies. *Scientific Reports* **5**, 9684.
- Guerrero, F., Carbonell, V., Cossu, M., Correddu, D. & Jones, P. R. (2012). Ethylene synthesis and regulated expression of recombinant protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS ONE* **7**, e50470.
- Guida, L., Saidi, Z., Hughes, M. N. & Poole, R. K. (1991). Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* **156**, 507–512.
- Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. & Bremer, E. (1995). The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Molecular and General Genetics* **246**, 783–786.
- Hagemann, M., Ribbeck-Busch, K., Klähn, S., Hasse, D., Steinbruch, R. & Berg, G. (2008). The plant-associated bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* expresses a new enzyme for the synthesis of the compatible solute glucosylglycerol. *Journal of Bacteriology* **190**, 5898–5906.
- Hagemann, M., Richter, S. & Mikkat, S. (1997a). The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **179**, 714–720.
- Hagemann, M., Schoor, A., Jeanjean, R., Zuther, E. & Joset, F. (1997b). The *stpA* gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes the glucosylglycerol-phosphate phosphatase involved in cyanobacterial osmotic response to salt shock. *Journal of Bacteriology* **179**, 1727–1733.
- Hahn, M. B., Meyer, S., Schröter, M.-A., Kunte, H.-J., Solomun, T. & Sturm, H. (2017). DNA protection by ectoine from ionizing radiation: molecular mechanisms. *Physical Chemistry Chemical Physics* **19**, 25717–25722.
- Halpern, Y. S., Barash, H., Dover, S. & Druck, K. (1973). Sodium and potassium requirements for active transport of glutamate by *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **114**, 53–58.
- Han, K., Lim, H. C. & Hong, J. (1992). Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **39**, 663–671.

- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.
- Harishchandra, R. K., Wulff, S., Lentzen, G., Neuhaus, T. & Galla, H.-J. (2010).** The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. *Biophysical Chemistry* **150**, 37–46.
- Harrison, A. P. (1981).** *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**, 327–332.
- Harrison, A. P., Jarvis, B. W. & Johnson, J. L. (1980).** Heterotrophic bacteria from cultures of autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*: relationships as studied by means of deoxyribonucleic acid homology. *Journal of Bacteriology* **143**, 448–454.
- He, Y.-Z., Gong, J., Yu, H.-Y., Tao, Y., Zhang, S. & Dong, Z.-Y. (2015).** High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* **14**, 55.
- Heidorn, T., Camsund, D., Huang, H.-H., Lindberg, P., Oliveira, P., Stensjö, K. & Lindblad, P. (2011).** Synthetic biology in cyanobacteria: Engineering and analyzing novel functions. *Methods in Enzymology* **497**, 539–579.
- Heinrich, U., Garbe, B. & Tronnier, H. (2007).** In vivo assessment of ectoin: a randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Skin Pharmacology and Physiology* **20**, 211–218.
- Hellmuth, K., Korz, D. J., Sanders, E. A. & Deckwer, W.-D. (1994).** Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *Journal of Biotechnology* **32**, 289–298.
- Holms, H. (1996).** Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* **19**, 85–116.
- Hort, M. (2014).** Die Anwendung des Hitzeschock-Systems von *Halomonas elongata* auf die Trockenstabilisierung des Modellenzym Lactatdehydrogenase. Bachelorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989).** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61–68.
- Höppner, A., Widderich, N., Lenders, M., Bremer, E. & Smits, S. H. J. (2014).** Crystal structure of the ectoine hydroxylase, a snapshot of the active site. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 29570–29583.
- Huang, H.-H., Camsund, D., Lindblad, P. & Heidorn, T. (2010).** Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Research* **38**, 2577–2593.
- Huang, H.-H. & Lindblad, P. (2013).** Wide-dynamic-range promoters engineered for cyanobacteria. *Journal of Biological Engineering* **7**, 10.
- Ikemura, T. (1981).** Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *Journal of Molecular Biology* **151**, 389–409.
- Imamura, S. & Asayama, M. (2009).** Sigma factors for cyanobacterial transcription. *Gene Regulation and Systems Biology* **3**, 65–87.
- Imhoff, J. F. & Trüper, H. G. (1977).** *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. *Archives of Microbiology* **114**, 115–121.
- Inbar, L. & Lapidot, A. (1988).** The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ^{13}C - and ^{15}N -labeled L-glutamate and ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 16014–16022.
- Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T. & Blanco, C. (1992).** Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *Journal of Bacteriology* **174**, 5027–5035.

- Jensen, E. B. & Carlsen, S. (1990).** Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnology and Bioengineering* **36**, 1–11.
- Johnson, D. B. & McGinness, S. (1991).** Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 207–211.
- Jones, P. R. (2014).** Genetic instability in cyanobacteria - an elephant in the room? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2**, 12.
- Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M. & Park, C. B. (2005).** Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Letters* **579**, 4775–4780.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (1996).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* **3**, 109–136.
- Kawai, F., Zhang, D. & Sugimoto, M. (2000).** Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **189**, 143–147.
- Kay, W. W. (1971).** Two aspartate transport systems in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **246**, 7373–7382.
- Kempf, B. & Bremer, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* **170**, 319–330.
- Kennell, D. & Riezman, H. (1977).** Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli lac* operon. *Journal of Molecular Biology* **114**, 1–21.
- Kerfeld, C. A., Sawaya, M. R., Tanaka, S., Nguyen, C. V., Phillips, M., Beeby, M. & Yeates, T. O. (2005).** Protein structures forming the shell of primitive bacterial organelles. *Science* **309**, 936–938.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, Y. K. & Chang, H. N. (2004).** High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **26**, 147–150.
- Kindzierski, V., Raschke, S., Knabe, N., Siedler, F., Scheffer, B., Pflüger-Grau, K., Pfeiffer, F., Oesterheld, D., Marin-Sanguino, A. & Kunte, H.-J. (2017).** Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: A case study for integrative systems biology. *PLoS ONE* **12**, e0168818.
- Kishimoto, N. & Tano, T. (1987).** Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic mine drainage, sewage, and soils. *Journal of General and Applied Microbiology* **33**, 11–25.
- Kleman, G. L. & Strohl, W. R. (1994).** Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3952–3958.
- Klingner, A., Bartsch, A., Dogs, M., Wagner-Döbler, I., Jahn, D., Simon, M., Brinkhoff, T., Becker, J. & Wittmann, C. (2015).** Large-scale ^{13}C flux profiling reveals conservation of the Entner-Doudoroff pathway as a glycolytic strategy among marine bacteria that use glucose. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 2408–2422.
- Knoop, H., Gründel, M., Zilliges, Y., Lehmann, R., Hoffmann, S., Lockau, W. & Steuer, R. (2013).** Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS Computational Biology* **9**, e1003081.
- Kobus, S., Widderich, N., Höppner, A., Bremer, E. & Smits, S. H. J. (2015).** Overproduction, crystallization and X-ray diffraction data analysis of ectoine synthase from the cold-adapted marine bacterium *Sphingopyxis alaskensis*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* **71**, 1027–1032.
- Koichi, M., Mitsuhiro, M., Tatsuo, N. & Yoshio, S. (1991).** Production of tetrahydropyrimidine derivatives. JP 3031265.

- Kopf, M., Klähn, S., Pade, N., Weingärtner, C., Hagemann, M., Voß, B. & Hess, W. R. (2014). Comparative genome analysis of the closely related *Synechocystis* strains PCC 6714 and PCC 6803. *DNA Research* **21**, 255–266.
- Korpimäki, T., Kurittu, J. & Karp, M. (2003). Surprisingly fast disappearance of β -lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches. *Journal of Microbiological Methods* **53**, 37–42.
- Korz, D. J., Rinas, K., U. and Hellmuth, Sanders, E. A. & Deckwer, W.-D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **39**, 59–65.
- Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G. & Stackebrandt, E. (1999). Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: Isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 3633–3640.
- Kuhlmann, A. U. & Bremer, E. (2002). Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 772–783.
- Kuhlmann, A. U., Bursy, J., Gimpel, S., Hoffmann, T. & Bremer, E. (2008). Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenicus* is triggered by high salinity and low growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 4560–4563.
- Kundig, W., Kundig, F. D., Anderson, B. & Roseman, S. (1966). Restoration of active transport of glycosides in *Escherichia coli* by a component of a phosphotransferase system. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 3243–3246.
- Kunert, A., Hagemann, M. & Erdmann, N. (2000). Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. *Journal of Microbiological Methods* **41**, 185–194.
- Kunte, H., Galinski, E., Grammann, K., Volke, A. & Bestvater, T. (2002). Verfahren zur Gewinnung von Wertstoffen aus Organismen. EP 1409707.
- Kunte, H. J. & Galinski, E. A. (1995). Transposon mutagenesis in halophilic eubacteria: conjugal transfer and insertion of transposon Tn5 and Tn1732 in *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 293–299.
- Kunte, H. J., Galinski, E. A. & Trüper, H. G. (1993). A modified FMOC-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines). *Journal of Microbiological Methods* **17**, 129–136.
- Kunte, H. J., Lentzen, G. & Galinski, E. A. (2014). Industrial production of the cell protectant ectoine: Protection mechanisms, processes, and products. *Current Biotechnology* **3**, 10–25.
- Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In *Microbial Life in Extreme Environments* (ed. D. J. Kushner). London: Academic Press, 317–368.
- Labarre, J., Chauvat, F. & Thuriaux, P. (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **171**, 3449–3457.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lang, Y., Bai, L., Ren, Y., Zhang, L. & Nagata, S. (2011). Production of ectoine through a combined process that uses both growing and resting cells of *Halomonas salina* DSM 5928^T. *Extremophiles* **15**, 303–310.
- Lapidot, A., Iakobashvili, R. & Malin, G. (1999). Methods for DNA amplification and sequencing. WO 1999041410A1.
- Larsen, P. I., Sydnes, L. K., Landfald, B. & Strøm, A. R. (1987). Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Archives of Microbiology* **147**, 1–7.
- Le Rudulier, D. & Bouillard, L. (1983). Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 152–159.

- Lee, H. J., Jeon, H. J., Ji, S. C., Yun, S. H. & Lim, H. M. (2008). Establishment of an mRNA gradient depends on the promoter: An investigation of polarity in gene expression. *Journal of Molecular Biology* **378**, 318–327.
- Lentzen, G. & Schwarz, T. (2006a). Kompatible Solute: Mikrobielle Herstellung und Anwendung. In *Angewandte Mikrobiologie* (ed. G. Anthranikian). Berlin, Heidelberg: Springer, 355–371.
- Lentzen, G. & Schwarz, T. (2006b). Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 623–634.
- Levina, N., Töttemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. & Booth, I. R. (1999). Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO Journal* **18**, 1730–1737.
- Lin, E. C. C. (1976). Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **30**, 535–578.
- Lindberg, P., Park, S. & Melis, A. (2010). Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metabolic Engineering* **12**, 70–79.
- Lippert, K. & Galinski, E. A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**, 61–65.
- Liss, I. (1962). N-Acetyldiaminobuttersäure, eine neue Aminosäure aus dem Latex von *Euphorbia pulcherrima* Willd ex Klotzsch. *Phytochemistry* **1**, 87–88.
- Lo, C.-C., Bonner, C. A., Xie, G., D'Souza, M. & Jensen, R. A. (2009). Cohesion group approach for evolutionary analysis of aspartokinase, an enzyme that feeds a branched network of many biochemical pathways. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**, 594–651.
- Lombardi, F. & Kaback, H. R. (1972). Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. VIII. The transport of amino acids by membranes prepared from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 7844–7857.
- Louis, P. & Galinski, E. A. (1997). Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**, 1141–1149.
- Louis, P., Trüper, H. G. & Galinski, E. A. (1994). Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**, 684–688.
- Luli, G. W. & Strohl, W. R. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 1004–1011.
- Lutz, R. & Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I₁-I₂ regulatory elements. *Nucleic Acids Research* **25**, 1203–1210.
- Ma, J., Campbell, A. & Karlin, S. (2002). Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *Journal of Bacteriology* **184**, 5733–5745.
- MacArthur, M. W. & Thornton, J. M. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *Journal of Molecular Biology* **218**, 397–412.
- Macdonald, T. L. & Martin, R. B. (1988). Aluminum ion in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences* **13**, 15–19.
- Malin, G., Iakobashvili, R. & Lapidot, A. (1999). Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction: Type II restriction endonucleases as a model system. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 6920–6929.
- Manzanera, M., García de Castro, A., Tøndervik, A., Rayner-Brandes, M., Strøm, A. R. & Tunnacliffe, A. (2002). Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4328–4333.
- Manzanera, M., Vilchez, S. & Tunnacliffe, A. (2004). High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiology Letters* **233**, 347–352.

- March, J. C., Eiteman, M. A. & Altman, E. (2002). Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5620–5624.
- Marin, K., Zuther, E., Kerstan, T., Kunert, A. & Hagemann, M. (1998). The *gppS* gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encoding glucosyl-glycerol-phosphate synthase is involved in osmolyte synthesis. *Journal of Bacteriology* **180**, 4843–4849.
- Marisch, K., Bayer, K., Cserjan-Puschmann, M., Luchner, M. & Striedner, G. (2013). Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories* **12**, 58.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology* **3**, 208–218.
- Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P. & Chauvat, F. (1993). A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Molecular Biology* **23**, 905–909.
- Martínez-Gómez, K., Flores, N., Castañeda, H. M., Martínez-Batallar, G., Hernández-Chávez, G., Ramírez, O. T., Gosset, G., Encarnación, S. & Bolívar, F. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories* **11**, 46.
- Maskow, T. & Babel, W. (2001). Calorimetrically obtained information about the efficiency of ectoine synthesis from glucose in *Halomonas elongata*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1527**, 4–10.
- May, G., Faatz, E., Lucht, J. M., Haardt, M., Bolliger, M. & Bremer, E. (1989). Characterization of the osmoregulated *Escherichia coli proU* promoter and identification of ProV as a membrane-associated protein. *Molecular Microbiology* **3**, 1521–1531.
- Meffert, A. (2011). Die Hydroxylierung von Ectoin und Derivaten durch die Hydroxylase EctD aus *Halomonas elongata*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Menzel, R. & Roth, J. (1980). Identification and mapping of a second proline permease in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **141**, 1064–1070.
- Mikkat, S., Effmert, U. & Hagemann, M. (1997). Uptake and use of the osmoprotective compounds trehalose, glucosylglycerol, and sucrose by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Archives of Microbiology* **167**, 112–118.
- Mikkat, S., Hagemann, M. & Schoor, A. (1996). Active transport of glucosylglycerol is involved in salt adaptation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* **142**, 1725–1732.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, R. E. & Stadtman, E. R. (1972). Glutamate synthase from *Escherichia coli*: An iron-sulfide flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 7407–7419.
- Minda, R., Ramchandani, J., Joshi, V. P. & Bhattacharjee, S. K. (2005). A homozygous *recA* mutant of *Synechocystis* PCC6803: construction strategy and characteristics eliciting a novel RecA independent UVC resistance in dark. *Molecular Genetics and Genomics* **274**, 616–624.
- Moritz, K. D. (2012). Untersuchungen zum Hydroxyectoin-Biosynthesegencluster aus *Acidiphilium cryptum* JF-5. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Moritz, K. D., Amendt, B., Witt, E. M. H. J. & Galinski, E. A. (2015). The hydroxyectoine gene cluster of the non-halophilic acidophile *Acidiphilium cryptum*. *Extremophiles* **19**, 87–99.
- Mosier, A. C., Justice, N. B., Bowen, B. P., Baran, R., Thomas, B. C., Northen, T. R. & Banfield, J. F. (2013). Metabolites associated with adaptation of microorganisms to an acidophilic, metal-rich environment identified by stable-isotope-enabled metabolomics. *mBio* **4**, e00484–12.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263–273.

- Mustakhimov, I. I., Reshetnikov, A. S., Khmelenina, V. N. & Trotsenko, Y. A. (2009). EctR - a novel transcriptional regulator of ectoine biosynthesis genes in the haloalkaliphilic methylotrophic bacterium *Methylophaga alcalica*. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **429**, 305–308.
- Nakamura, Y., Gojobori, T. & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research* **28**, 292.
- Nakano, K., Rischke, M., Sato, S. & Märkl, H. (1997). Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**, 597–601.
- Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* **48**, 443–453.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. & Smith, D. F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology* **119**, 736–747.
- Neubauer, A., Soini, J., Bollok, M., Zenker, M., Sandqvist, J., Myllyharju, J. & Neubauer, P. (2007). Fermentation process for tetrameric human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*: Improvement by gene optimisation of the PDI/ β subunit and repeated addition of the inducer anhydrotetracycline. *Journal of Biotechnology* **128**, 308–321.
- Ng, W.-O., Zentella, R., Wang, Y., Taylor, J.-S. A. & Pakrasi, H. B. (2000). *phrA*, the major photoreactivating factor in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 codes for a cyclobutane-pyrimidine-dimer-specific DNA photolyase. *Archives of Microbiology* **173**, 412–417.
- Ning, Y., Wu, X., Zhang, C., Xu, Q., Chen, N. & Xie, X. (2016). Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* **36**, 10–18.
- Normark, S., Bergström, S., Edlund, T., Grundström, T., Jaurin, B., Lindberg, F. P. & Olsson, O. (1983). Overlapping genes. *Annual Review of Genetics* **17**, 499–525.
- Novak, J. F., Stirnberg, M., Roenneke, B. & Marin, K. (2011). A novel mechanism of osmosensing, a salt-dependent protein-nucleic acid interaction in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 3235–3241.
- Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M. & Murooka, Y. (1999). Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *Journal of Bacteriology* **181**, 91–99.
- Oppenheim, D. S. & Yanofsky, C. (1980). Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics* **95**, 785–795.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 334–348.
- Oren, A. & Mana, L. (2002). Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. *Extremophiles* **6**, 217–223.
- Ow, D. S.-W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K.-W. & Yap, M. G.-S. (2006). Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 391–398.
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J. & Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances* **28**, 782–801.
- Patte, J. C. (1996). Biosynthesis of threonine and lysine. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (eds F. C. Neidhardt, R. I. Curtis, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H. E. Umbarger). Washington, DC: ASM Press, 528–541.
- Peekhaus, N. & Conway, T. (1998). What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **180**, 3495–3502.

- Pérez-García, F., Ziert, C., Risse, J. M. & Wendisch, V. F. (2017). Improved fermentative production of the compatible solute ectoine by *Corynebacterium glutamicum* from glucose and alternative carbon sources. *Journal of Biotechnology* **258**, 59–68.
- Perroud, B. & Le Rudulier, D. (1985). Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *Journal of Bacteriology* **161**, 393–401.
- Peters, P., Galinski, E. A. & Trüper, H. G. (1990). The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiology Letters* **71**, 157–162.
- Piña, R. G. & Cervantes, C. (1996). Microbial interactions with aluminium. *Biometals* **9**, 311–316.
- Politi, N., Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., Cusella De Angelis, M. G. & Magni, P. (2014). Half-life measurements of chemical inducers for recombinant gene expression. *Journal of Biological Engineering* **8**, 5.
- Prentki, P. & Krisch, H. M. (1984). In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**, 303–313.
- Price, G. D., Badger, M. R., Woodger, F. J. & Long, B. M. (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1441–1461.
- Rangannan, V. & Bansal, M. (2011). PromBase: a web resource for various genomic features and predicted promoters in prokaryotic genomes. *BMC Research Notes* **4**, 257.
- Rasmussen, B., Noller, H. F., Daubresse, G., Oliva, B., Misulovin, Z., Rothstein, D. M., Ellestad, G. A., Gluzman, Y., Tally, F. P. & Chopra, I. (1991). Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 2306–2311.
- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V. & Evilia, C. (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea* **2013**, 373275.
- Reed, R. H., Borowitzka, L. J., Mackay, M. A., Chudek, J. A., Foster, R., Warr, S. R. C., Moore, D. J. & Stewart, W. D. P. (1986). Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 51–56.
- Reed, R. H. & Stewart, W. D. P. (1985). Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Marine Biology* **88**, 1–9.
- Reese, M. G. (2001). Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers and Chemistry* **26**, 51–56.
- Repaske, D. R. & Adler, J. (1981). Change in intracellular pH of *Escherichia coli* mediates the chemotactic response to certain attractants and repellents. *Journal of Bacteriology* **145**, 1196–1208.
- Reshetnikov, A. S., Khmelenina, V. N. & Trotsenko, Y. A. (2006). Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph "*Methylophilum alcaliphilum* 20Z". *Archives of Microbiology* **184**, 286–297.
- Restaino, O. F., Bhaskar, U., Paul, P., Li, L., De Rosa, M., Dordick, J. S. & Linhardt, R. J. (2013). High cell density cultivation of a recombinant *E. coli* strain expressing a key enzyme in bioengineered heparin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**, 3893–3900.
- Reuter, K., Pittelkow, M., Bursy, J., Heine, A., Craan, T. & Bremer, E. (2010). Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD. *PLoS ONE* **5**, e10647.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**, 1–61.
- Roder, A., Hoffmann, E., Hagemann, M. & Berg, G. (2005). Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiology Letters* **243**, 219–226.

- Rodríguez-Moya, J., Argandoña, M., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J. J. & Vargas, C. (2013). Temperature- and salinity-decoupled overproduction of hydroxyectoine by *Chromohalobacter salexigens*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 1018–1023.
- Rozkov, A., Avignone-Rossa, C., Ertl, P., Jones, P., O’Kennedy, R., Smith, J., Dale, J. & Bushell, M. (2004). Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnology and Bioengineering* **88**, 909–915.
- Sakamoto, N., Kotre, A. M. & Savageau, M. A. (1975). Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *Journal of Bacteriology* **124**, 775–783.
- Salis, H. M., Mirsky, E. A. & Voigt, C. A. (2009). Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nature Biotechnology* **27**, 946–950.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, T. & Galinski, E. A. (1998). Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering* **57**, 306–313.
- Sauer, U. & Eikmanns, B. J. (2005). The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 765–794.
- Schellenberg, G. D. & Furlong, C. E. (1977). Resolution of the multiplicity of the glutamate and aspartate transport systems of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 9055–9064.
- Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M. & Scherzinger, E. (1989). Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* **75**, 271–288.
- Schubert, T., Maskow, T., Benndorf, D., Harms, H. & Breuer, U. (2007). Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3343–3347.
- Schwarz, R. & Forchhammer, K. (2005). Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology* **151**, 2503–2514.
- Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., Rampp, M., Schuster, S. C., Klenk, H.-P., Pfeiffer, F., Oesterheld, D., Kunte, H. J. (2011). A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Environmental Microbiology* **13**, 1973–1994.
- Seip, B. (2009). Charakterisierung des Hydroxyectoin-Biosynthesegenclusters aus *Pseudomonas stutzeri* und Vergleich der Ectoinsynthese mit der anderer Organismen. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Seip, B., Galinski, E. A. & Kurz, M. (2011). Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *Pseudomonas stutzeri* *ectABCD-ask* gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 1368–1374.
- Seo, J.-H. & Bailey, J. E. (1985). Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **27**, 1668–1674.
- Severin, J., Wohlfarth, A. & Galinski, E. A. (1992). The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *Journal of General Microbiology* **138**, 1629–1638.
- Shastri, A. A. & Morgan, J. A. (2005). Flux balance analysis of photoautotrophic metabolism. *Biotechnology Progress* **21**, 1617–1626.
- Shiloach, J. & Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density - a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances* **23**, 345–357.
- Shiloach, J., Kaufman, J., Guillard, A. S. & Fass, R. (1996). Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (ΔDE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 421–428.

- Shimizu, N., Fukuzono, S., Fujimori, K., Nishimura, N. & Odawara, Y. (1988). Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance concentration monitoring. *Journal of Fermentation Technology* **66**, 187–191.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**, 1342–1346.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**, 539.
- Simon, R., Prierer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology* **1**, 784–791.
- Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131–135.
- Smith, A. J., London, J. & Stanier, R. Y. (1967). Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *Journal of Bacteriology* **94**, 972–983.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85.
- Solovyev, V. & Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (ed. R. W. Li). Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, 61–78.
- Sørensen, M. A., Kurland, C. & Pedersen, S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **207**, 365–377.
- Spaans, S. K., Weusthuis, R. A., van der Oost, J. & K, S. W. M. (2015). NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology* **6**, 742.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriological Reviews* **35**, 171–205.
- Steitz, J. A. & Jakes, K. (1975). How ribosomes select initiator regions in mRNA: Base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**, 4734–4738.
- Stöveken, N., Pittelkow, M., Sinner, T., Jensen, R. A., Heider, J. & Bremer, E. (2011). A specialized aspartokinase enhances the biosynthesis of the osmoprotectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Journal of Bacteriology* **193**, 4456–4468.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direkt selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**, 113–130.
- Stumpfe, D. (2003). Aufbau und Regulation der Ectoin-Synthesegene *ectABC* aus *Halomonas elongata* DSM 2581^T. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Sydlik, U., Gallitz, I., Albrecht, C., Abel, J., Krutmann, J. & Unfried, K. (2009). The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **180**, 29–35.
- Sykes, R. B. & Matthew, M. (1976). The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2**, 115–157.
- Tanne, C., Golovina, E. A., Hoekstra, F. A., Meffert, A. & Galinski, E. A. (2014). Glass-forming property of hydroxyectoine is the cause of its superior function as a desiccation protectant. *Frontiers in Microbiology* **5**, 150.
- Tetsch, L. (2001). Aufreinigung und Charakterisierung von TeaA, dem Substratbindeprotein des osmoregulierten Ectointransporters TeaABC. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Tillett, D., Burns, B. P. & Neilan, B. A. (2000). Optimized rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping bacterial mRNA transcripts. *BioTechniques* **28**, 448–456.

- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 4350–4354.
- Tyo, K. E. J., Ajikumar, P. K. & Stephanopoulos, G. (2009). Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nature Biotechnology* **27**, 760–765.
- Ungerer, J., Tao, L., Davis, M., Ghirardi, M., Maness, P.-C. & Yu, J. (2012). Sustained photosynthetic conversion of CO₂ to ethylene in recombinant cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Energy & Environmental Science* **5**, 8998–9006.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**, e115.
- Van-Thuoc, D., Guzmán, H., Quillaguamán, J. & Hatti-Kaul, R. (2010). High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture and milking process. *Journal of Biotechnology* **147**, 46–51.
- Varman, A. M., Xiao, Y., Pakrasi, H. B. & Tang, Y. J. (2013). Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 for isobutanol production. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 908914.
- Veit, A., Polen, T. & Wendisch, V. F. (2007). Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 406–421.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 504–544.
- Vermaas, W. (1996). Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Principles and possible biotechnology applications. *Journal of Applied Phycology* **8**, 263–273.
- Vielgraf, S. L. (2008). Stereospezifische Hydroxylierung kompatibler Solute über Ganzzellkatalyse in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Voß, P. (2002). Synthese von kompatiblen Soluten mit ectoinanaloger Struktur und Charakterisierung des protektiven Effektes auf biochemische Modellsysteme und *Escherichia coli*. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Vreeland, R. H. & Martin, E. L. (1980). Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Canadian Journal of Microbiology* **26**, 746–752.
- Wakao, N., Yasuda, T., Jojima, Y., Yamanaka, S. & Hiraishi, A. (2002). Enhanced growth of *Acidocella facilis* and related acidophilic bacteria at high concentrations of aluminum. *Microbes and Environments* **17**, 98–104.
- Wang, X., Ji, S. C., Yun, S. H., Jeon, H. J., Kim, S. W. & Lim, H. M. (2014). Expression of each cistron in the *gal* operon can be regulated by transcription termination and generation of a *galK*-specific mRNA, mK2. *Journal of Bacteriology* **196**, 2598–2606.
- Weissgerber, T. (2010). Untersuchungen zur Regulation einer Aspartokinase aus dem (Hydroxy-)ectoin Biosynthese-Gencluster von *Pseudomonas stutzeri*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Widderich, N., Czech, L., Elling, F. J., Könneke, M., Stöveken, N., Pittelkow, M., Riclea, R., Dickschat, J. S., Heider, J. & Bremer, E. (2016a). Strangers in the archaeal world: osmostress-responsive biosynthesis of ectoine and hydroxyectoine by the marine thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus*. *Environmental Microbiology* **18**, 1227–1248.
- Widderich, N., Höppner, A., M., P., Heider, J., Smits, S. H. J. & Bremer, E. (2014). Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS ONE* **9**, e93809.
- Widderich, N., Kobus, S., Höppner, A., Riclea, R., Seubert, A., Dickschat, J. S., Heider, J., Smits, S. H. J. & Bremer, E. (2016b). Biochemistry and crystal structure of ectoine synthase: A metal-containing member of the cupin superfamily. *PLoS ONE* **11**, e0151285.

- Williams, J. G. K. (1988).** Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods in Enzymology* **167**, 766–778.
- Witt, E. (2011).** Nebenreaktionen der Ectoin-Synthese aus *Halomonas elongata* DSM 2581^T und Entwicklung eines salzinduzierten Expressionssystems. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Witt, E. M. H. J., Davies, N. W. & Galinski, E. A. (2011).** Unexpected property of ectoine synthase and its application for synthesis of the engineered compatible solute ADPC. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**, 113–122.
- Wohlfarth, A., Severin, J. & Galinski, E. A. (1990).** The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *Journal of General Microbiology* **136**, 705–712.
- Wolfe, A. J. (2005).** The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**, 12–50.
- Wösten, M. M. S. M. (1998).** Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 127–150.
- Xiong, W., Brune, D. & Vermaas, W. F. J. (2014).** The γ -aminobutyric acid shunt contributes to closing the tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology* **93**, 786–796.
- Yeh, J. I., Chinte, U. & Du, S. (2008).** Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3280–3285.
- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J. & Zhang, F. (2013).** Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs* **11**, 2894–2916.
- Zabin, I. & Fowler, A. V. (1970).** β -galactosidase and thiogalactoside transacetylase. In *The Lactose Operon* (eds. J. R. Beckwith & D. Zipser). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 27–47.
- Zaccai, G., Bagan, I., Combet, J., Cuello, G. J., Demé, B., Fichou, Y., Gallat, F.-X., Galvan Josa, V. M., von Gronau, S., Haertlein, M., Martel, A., Moulin, M., Neumann, M., Weik, M., Oesterhelt, D. (2016).** Neutrons describe ectoine effects on water H-bonding and hydration around a soluble protein and a cell membrane. *Scientific Reports* **6**, 31434.
- Zhang, L.-H., Lang, Y.-J. & Nagata, S. (2009).** Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extremophiles* **13**, 717–724.
- Zhang, S. & Bryant, D. A. (2011).** The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* **334**, 1551–1553.
- Zinchenko, V. V., Piven, I. V., Melnik, V. A. & Shestakov, S. V. (1999).** Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants. *Russian Journal of Genetics* **35**, 228–232.
- Zwaig, N., Kistler, W. S. & Lin, E. C. C. (1970).** Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **102**, 753–759.

7 Anhang

Tab. 7.1: Vergleich annotierter Ectoinsynthesen in Genclustern von Vertretern der *Bacteria*

Die Stämme sind entsprechend der steigenden Acidität von EctC geordnet. Die Acidität ergibt sich aus den sauren Aminosäuren (AS, D + E) abzüglich der basischen Aminosäuren (K + R) dividiert durch die Gesamtzahl der Aminosäuren von EctC. Die Aminosäuresequenzen stammen von NCBI und die Parameter zu EctC wurden mittels ProtParam (ExPASy) bestimmt. pI: theoretischer isoelektrischer Punkt

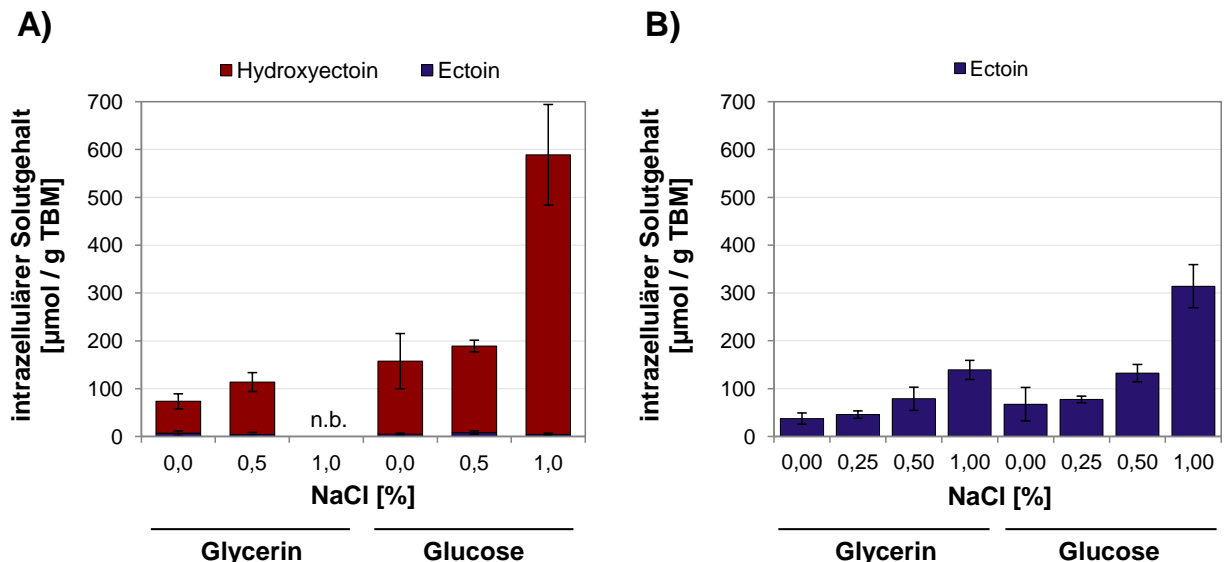
	Acidität [%]	saure AS (D + E)	basische AS (K + R)	Gesamtzahl AS	pI
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	0,00	17	17	138	7,06
<i>Acidiphilium cryptum</i> DSM 2389	3,03	18	14	132	6,03
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	3,03	18	14	132	6,03
<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	3,65	20	15	137	5,86
<i>Sphingobium japonicum</i> BiD32	3,65	18	13	137	5,85
<i>Acidiphilium multivorum</i> AIU301	3,79	18	13	132	5,85
<i>Desulfarculus baarsii</i> DSM 2075	3,85	18	13	130	6,01
<i>Limnobacter</i> sp. MED105	3,88	18	13	129	6,03
<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230	4,38	19	13	137	5,68
<i>Achromobacter arsenitoxydans</i> SY8	4,55	20	14	132	5,57
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	4,58	19	13	131	5,72
<i>Phenylobacterium zucineum</i> HLK1	4,62	20	14	130	5,59
<i>Desulfurispirillum indicum</i> S5	4,62	19	13	130	5,26
<i>Sphingopyxis</i> sp. MC1	4,96	22	15	141	5,42
<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y	5,11	22	15	137	5,55
<i>Hyphomonas neptunium</i> ATCC 15444	5,19	19	12	135	5,51
<i>Spirochaeta</i> sp. L21-RPul-D2	5,22	23	16	134	5,33
<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804	5,26	20	13	133	5,40
<i>Teredinibacter turnerae</i> T7901	5,30	22	15	132	5,32
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> ML-04	5,34	21	14	131	5,45
<i>Aurantimonas manganoxydans</i> SI85-9A1	5,38	21	14	130	5,55
<i>Halobacillus halophilus</i> DSM 2266	5,38	25	18	130	5,35
<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3	5,43	20	13	129	5,41
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	5,84	22	14	137	5,24
<i>Methylophaga lonarensis</i> MPL	5,97	21	13	134	5,26
<i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2	6,02	21	13	133	5,38
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 2	6,06	22	14	132	5,42
<i>Thiomicrospira crunogena</i> XCL-2	6,11	24	16	131	5,31
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	6,15	18	10	130	5,59
<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	6,20	23	15	129	5,43
<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	6,21	22	13	145	5,38
<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	6,25	20	12	128	4,98
<i>Pseudomonas caeni</i> DSM 24390	6,35	20	12	126	5,12
<i>Cycloclasticus</i> sp. P1	6,47	22	13	139	5,13
<i>Vibrio cholerae</i> M66-2	6,52	21	12	138	5,49
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	6,72	24	15	134	5,05

Fortsetzung Tab. 7.1	Acidität [%]	saure AS (D + E)	basische AS (K + R)	Gesamtzahl AS	pI
<i>Methylobacterium alcaliphilum</i> 20Z	6,72	21	12	134	4,98
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	6,77	22	13	133	5,27
<i>Catenovulum agarivorans</i> DS-2	6,82	22	13	132	5,25
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	6,82	22	13	132	5,15
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	6,82	22	13	132	5,01
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	6,87	19	10	131	5,20
<i>Bordetella parapertussis</i> Bpp5	6,87	21	12	131	5,01
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	6,87	21	12	131	5,01
<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC2654	6,87	22	13	131	5,24
<i>Hermineimonas arsenicoxydans</i> ASM2612v1	6,90	21	11	145	5,03
<i>Kushneria aurantia</i> DSM 21353	6,92	23	14	130	5,29
<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	6,92	21	12	130	5,48
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	6,92	19	10	130	5,45
<i>Mycobacterium</i> sp. MCS	6,98	19	10	129	5,34
<i>Spongibacter tropicus</i> DSM 19543	7,09	21	12	127	4,87
<i>Halomonas titanicae</i> BH1	7,41	22	12	135	5,36
<i>Alcanivorax pacificus</i> W11-5	7,46	22	12	134	5,03
<i>Thalassospira lucentensis</i> DSM 14000	7,52	22	12	133	4,81
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	7,58	24	14	132	4,96
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	7,69	24	14	130	5,27
<i>Spirochaeta africana</i> DSM 8902	7,69	24	14	130	4,85
<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK	7,81	22	12	128	5,03
<i>Planctomyces brasiliensis</i> DSM 5305	7,81	21	11	128	4,83
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	8,21	25	14	134	4,99
<i>Roseobacter</i> sp. MED193	8,33	22	11	132	4,93
<i>Vibrio fluvialis</i> PG41	8,46	21	10	130	4,87
<i>Ruania albidiflava</i> DSM 18029	8,46	23	12	130	4,93
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	8,53	26	15	129	4,90
<i>Halomonas boliviensis</i> LC1	8,53	22	11	129	5,24
<i>Salinivibrio costicola</i>	8,53	22	11	129	4,87
<i>Vibrio fischeri</i> ES114	8,59	23	12	128	4,93
<i>Vibrio splendidus</i> LGP32	8,59	22	11	128	4,92
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	8,59	22	11	128	4,92
<i>Enterovibrio norvegicus</i> FF-454	8,59	22	11	128	4,85
<i>Photobacterium angustum</i> S14	8,59	24	13	128	4,95
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1	9,09	27	15	132	4,98
<i>Kytococcus sedentarius</i> DSM 20547	9,42	24	11	138	4,81
<i>Rhodococcus equi</i> 103S	9,42	25	12	138	4,67
<i>Halorhodospira halophila</i> SL1	9,52	24	12	126	4,78
<i>Mycobacterium</i> sp. JDM601	9,63	23	10	135	4,75
<i>Neptuniibacter caesariensis</i> ASM15334v1	10,00	24	11	130	4,76
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	10,22	26	12	137	4,87
<i>Oceanimonas</i> sp. GK1	10,37	25	11	135	4,70
<i>Thermobifida fusca</i> YX	10,45	24	10	134	4,57
<i>Oceanimonas smirnovii</i> ATCC BAA-899	11,85	25	9	135	4,56

Tab. 7.2: Ectoin-Produktion in *E. coli* pASK_ectABCD_m mit Glycerin und 0,25 % NaCl

Die maximale Produktivität ergab sich für den Zeitraum 7-11 h nach Induktion (spät exponentielle Phase, vgl. Abb. 3.16 B). Kohlenstoff (C)- und Stickstoff (N)-Bilanz wurden mit einem C:N-Verhältnis von 48:12 % in der Trockenbiomasse (TBM) von *E. coli* bestimmt. Die separate C-Bilanz für TBM bzw. Ectoin wurde anhand des Ertrags von 2,66 g Glycerin/g TBM des Kontrollstamms *E. coli* pASK-IBA3 in MM63-0,5 berechnet. $Y_{(X+E)/S}$: Ertrag von TBM (X) und Ectoin (E) über C-Quelle (S), $Y_{E/S}$: Ertrag von Ectoin (E) über C-Quelle (S)

Wachstumsrate [h^{-1}]	0,21 ± 0,01
C-Quelle im Medium [g/L]	4,65 (1,82 C)
TBM [g/L]	0,57 ± 0,02
Ectoin (extrazellulär) [g/L]	1,66 ± 0,07
Ertrag $Y_{(X+E)/S}$ [g/g]	0,48
Ertrag $Y_{E/S}$ [g/g]	0,36
Ectoin (extrazellulär) [g/g TBM]	2,93 ± 0,13
spezifische Produktivität [mg/(g TBM x h)]	345,1 ± 9,6
<hr/>	
C-Bilanz (total) [C in g/L]	0,27 in TBM 0,84 in Ectoin total 61 % der C-Quelle (1,82)
C-Bilanz (separat) [C in g/L]	0,59 der C-Quelle für 0,27 in TBM (= 46 %) (verglichen mit Kontrollstamm) 1,22 der C-Quelle für 0,84 in Ectoin (= 69 %)
<hr/>	
N-Bilanz (total) [N in g/L]	0,07 in TBM 0,33 in Ectoin total 95 % der N-Quelle (0,42)

**Abb. 7.1: Intrazellulärer Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt**

E. coli pASK_ectABCDask (A) und pASK_ectABCD_m (B) wurden in MM63 mit 50 mM Glycerin bzw. 25 mM Glucose und 0-1 % NaCl kultiviert. Nach Ernte in der stationären Phase wurden die Zellextrakte via HPLC analysiert und der intrazelluläre Ectoin- sowie Hydroxyectoin-Gehalt ($\mu\text{mol} / \text{g}$ Trockenbiomasse (TBM)) bestimmt. ADABA und Trehalose waren auch teilweise in geringen Mengen nachweisbar, konnten aber wegen Signalüberlagerungen nicht eindeutig quantifiziert werden. Das arithmetische Mittel mit Standardabweichung aus mind. drei Experimenten ist gezeigt. n.b.: nicht bestimmt

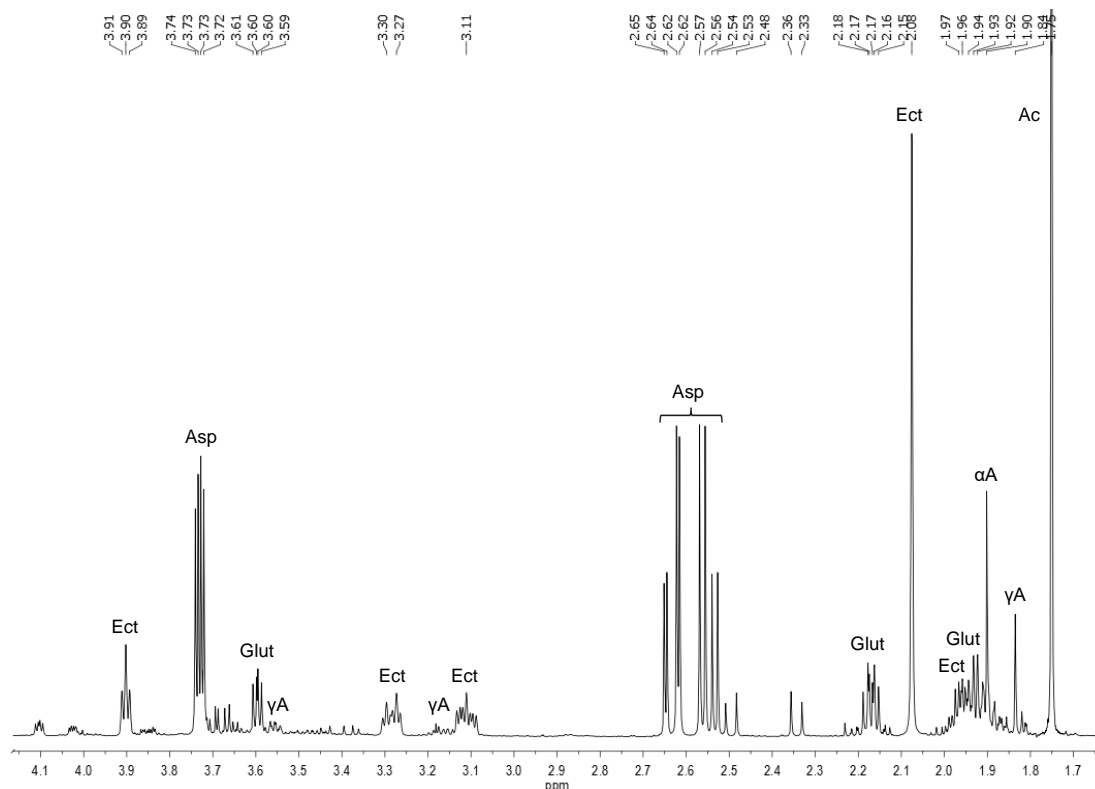


Abb. 7.2: ^1H -NMR-Spektrum zur Ganzzellbiokatalyse mit *E. coli* pASK_ectABCD_m

Die Überstandsproben 25 - 40 h der Ganzzellbiokatalyse mit ähnlicher Zusammensetzung (vgl. Abb. 3.20) wurden vereinigt, gefriergetrocknet und in Deuteriumoxid mit internem Standard BTC (Signal bei 7,4 ppm außerhalb des Ausschnitts) aufgenommen. Neben dem Substrat Aspartat (Asp) wurden Signale für Acetat (Ac), Ectoin (Ect), Glutamat (Glut), γ - und α -ADABA (γA , αA) identifiziert.

Acry_LysC	MARIVMKFGGTSVADLLDIRNVAARVKRVVDEGHEVAVVTSAMAGATNQLVAVWCQELSPLYDAREYDTPV	70
Pstu_LysC	MALIVQKFGGTSVGTVERIEQVAEKVKKFRDGGDIVVVVSAMSGETNRLIDLAKQISEQFVPPRELDVMV	70
Cglu_LysC	MALVVQKYGGSSLESAERIRNVAERIVATKKAGNDVVVCSAMGDTTDELLELAAAVNPVPPAREMDMLL	70
	** : *	
Acry_LysC	ATGEQVTIGLLAVALQTIQVDARSWTGWQIPIRTDQGHGKARIDAIDGAELIRRMQMGQVPIAGFQIG	140
Pstu_LysC	STGEQVTIALLAMALIKRGVPAVSYTGQVRLITDSAHTKARILQIDAQRIQRDIKAGRVVVVAGFQGVN	140
Cglu_LysC	TAGERISNALVAMAIESLGAEAQSFSTGSQAGVLTTERHGNARIVDVTTPGRVREALDEGKICIVAGFQGVN	140
	:: * : *	
Acry_LysC	PD-NRVTTLGRGGSDTSAVAVAAAADRCDIYTDVVDGVTTPRIVPKARKLPAIAYEEMLELASVGAK	209
Pstu_LysC	EK-GNITTLGRGGSDTGVAAAALKADECQIYTDVVDGVTTPRIVVAKAQRDKITFEEMLEMASLGSK	209
Cglu_LysC	KETRDVTTLGRGGSDTAVAAAAALNADVCEIYSDVDGVTTPRIVPNQAQKLEKLSFEEMLELAAVGSK	210
	: * : *	
Acry_LysC	VLQTRSELAMKERVVRVQVLSSTFDAPGTLV-VDE-DEIVEQEIVAGIAYSREAKVTVRRVDPDRPGVAA	277
Pstu_LysC	VLQIRAVEFAGKYSVPLRVLHSFQEGPGLITLDE-EESMEQPIISGIAFNREAKLTIRGVPDTPGVAF	278
Cglu_LysC	ILVLRVVEYARAFNVPLRVRSSYSNDPGLIAGSMEDIPVEEAVLTGVATDKSEAKVTVLGISDKPGEAA	280
	: * : *	
Acry_LysC	SVFGPLAEAGINVDMIVQNVN--ADGTTDMFTFLNKTELPRARLVLDEKRDEIGFAELATDPDVAKISVV	345
Pstu_LysC	KILGPISAANVEVDMIVQNVN--HDNTTDFFTVHRNDYNNALQVLQGIAAEMGAREAIGDTNIAKVSIV	346
Cglu_LysC	KVFRALADAEINIDMVLQNVSSVEDGTTDITFTCPRSRGRRAMEILKKLQVQGNWTVNLVYDDQVQKVSIV	350
	:: : *	
Acry_LysC	GVGMRSHAGVAGTMRFSLAARGINIQVISTSEIKVSVLIDAETELAVRALHTAYGLDVA-----	405
Pstu_LysC	GVGMRSHAGVASRMFEALAKENINIQMISTSEIKVSVVIEEKYLELAVRALHTAFELDAPAGNTAE----	412
Cglu_LysC	GAGMKSHPGVTAEFMEALRDVNVNIELISTSEIRISVLIREDDDLDAARALHEQFQLGGDEAVVYAGTGR	421
	* : *	

Abb. 7.3: Sequenzvergleich der Aspartokinase LysC

Die Aminosäuresequenz der außerhalb des *ectABCDask*-Genclusters annotierten Aspartokinase LysC von *A. cryptum* JF-5 (Acry_LysC) wurde mit LysC von *P. stutzeri* DSM 5190^T (Pstu_LysC) und *C. glutamicum* ATCC 13032 (Cglu_LysC) verglichen (Clustal Omega, Sievers *et al.*, 2011). Konservierte Aminosäuren sind mit Stern und Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften mit Doppelpunkt markiert.

ectA
 GTGCGCTGCGTCGCGCCGACCGCGGCCGATGGTCCGGCGGTGACCGCGCTGATCGCGGACTGCCCGCCGCTCGATGCCAATTCGGCCTATTGCAACCTGCTGCAATGCACCGATTCGCGCGAAACCTGCGTGCCTCGCC 138
 M A L R R P T A A D G P A V T A L I A D C P P L D A N S A Y C N L L Q C T D F A E T C V L A
 GAGCGGAGGGCGCGGTGGTTCGGCTGATTTCGGGCTACCGCCGCGGTGACACCTCTCGGCATCTTCGCTGCGCAGGTGCGCGTCTCGTCCGCGCGCGGGGCATCGGCCTCGCGGGCAGATGCTCGATGCGCTG 276
 E R E G A V V G W I S G Y R P P S D L S R I F V W Q V A V S S A A R G I G L G G Q M L D A L
 CTCGACCGTCCCGCATTGCCGCGGTGCGCGCCTGACCACCACCATCACCGAGGCGAACCCGCGTCTGGCGGCTGTTGAAAAGCCTGCCCGCGCGCGCGGCTCGTTCCGCGGGCGGTGCGCTTCGACCGC 414
 L D R P A I A G V R A L T T T I T E A N T A S W R L F E S L A R R R G G S F A R A V R F D R
 SD **ectB**
 GCGCCCATTCGCGCGCCTGCAGGACCGAGTTCGAGGTGACGATCGGCCTTCCCAGCCCGTGCGCCAACCAGCACGAAAGGACATCTCATGACCGATCTGCCGCGCCCTCCCAGCGCAAGCCGATAACCGCA 552
 A A H F A G L H D T E F E V T I G L P Q P V A E P A R K D I S - M T D L P R P S R R K P D T A
 TCTACGAGCGCATGGAGTCCAGGGTGGGAGCTACTGCACCGCGATCCCAGCGCAGTTACGCGGGCCGAAGGCGCCTGGCTGCATGACAGCAGCGCGCGCTACCTGGATTCCTCGCGGCTGCTCGTGCCTGA 690
 I Y E R M E S R V R S Y C T A I P R Q F T R A E G A W L H D S H G G R Y L D F L A G C S S L
 ATTACGGCCACAATCATCCGGTGTGAAACGGCGCTGATCGACTATATCGCCCGCAGCGCATCGCTCATGGACTCGACTTCCATACCGACGCCAAGGCCGAGTTCCTCGACGCGCTGAAACCGTGCATCCTGAAGC 828
 N Y G H N H P V L K R A L I D Y I A R D G I A H G L D F H T D A K A E F L D A L E T V I L K
 CGCGGGCATGGACTATCGGCCATGTTTCGTCGCGCCGACCGGAACCAATGCCGTGAGGCGCGCTCAAGCTCGCCCGAAGGTGACCGCGCGCAGACCGTGCATCGCCTTCCACCAACGGCTTCCACGGCATGACGC 966
 P R G M D Y R A M F V G P T G T N A V E A A L K L A R K V T G R Q T V I A F T N G F H G M T
 TCGCGCCCTCGCCTGCACCGGCAACGAGGGCAAGCGCGCGCGCCGGCGTCCGCGTCCGCCATGTCAGCCACGAGCCTTATGACGGGTATTACGGCCCGGAGATCGACACCGCCGACCTGCTGGAGCAGCGCCTTG 1104
 L G A L A C T G N E G K R G G A G V P L A H V S H E P Y D G Y Y G P E I D T A D L L E Q R L
 CCGACGGCTCCTCGGCCCTCGACGCGCGCGCGGCTTCTGGTTCGAGACGGTGCAGGGCGAGGGCGGGCTGAACGCGCCCTCCGCGGATGGATGCGCAAGATCGCGCGCTCGCAAGCGCCACGGCGCGTCTCA 1242
 A D G S S G L D A P A A F L V E T V Q G E G G L N A A S A G W M R K I A A L A K R H G A L L
 TCGTGGATGACATCCAGGCCGGTGCAGCGCGCAGGGCGCTTCTTTCAGTTCGAGGAGATGGGCATCCGCCCCGACATCATACCCTCGGAAATCGCTTCCGGCATCGCGCGCCCTTCCGCGTACCCCTGTTCC 1380
 I V D D I Q A G C G R T G R F F S F E E M G I R P D I I T L A K S L S G I G A P F A L T L F
 GCGCGAAGTTCGACAGTGAAGCCCGGCGAGCACAACGGCAGCTTCCGCGCAACACCAGCCTTCGTACCAGCGCGCGCGGATCCGCCATTTCTGGAGCGATGACGCCTTCCGCGCGACATCGCCCGCGCG 1518
 R P E L D Q W K P G E H N G T F R G N N H A F V T A A A A I R H F W S D D A F A A D I A R R
 GCGACCTGCTCGGCCCGCGCTCGATGCGATCGCAGCAGCGCATGGGATGAGCACGCGCGCGCGGCATGATGACGGGCATCGATGCCGCGACCGCGCGATGGCCGAGCGCATCACCGCATCGCCTTCCGCGAGG 1656
 G D L L G R R L D A I A A R H G M S T R G R G M M Q G I D A G T G A M A E R I T G I A F R E
 GGCTGGTATCGAGACCAGCGCGCGAGATGGCGAGATCGTCAAGGTGCTGGCGCGCTCACCATCGATGACGACCTGCTGGCGCGCGGGTTCGACATTCCTCGAAGCGCGCGTGAACGAGGCCACCGCGCCACCTACA 1794
 G L V I E T S G A D G E I V K V L A P L T I D D D L L A A G L D I L E R A V N E A T A P T Y
 SD **ectC**
 GCGTCCGCGCGAGTGCAGGGCCGCGACACGAAGCAAGGAGCAGAAACATCATCCGACTCTGAAGGAGGCGCAGGCTCGGAGCGAAAGTCTGTCACCGATGGTGGGACAGCGTGCATGCTGCTGCGCGAC 1932
 S V A A E - M I I R T L K E A Q A S E R K V V T D G W D S V R M L L R D
 GACGGCATGGGCTTCTGTTCCACATCACACGATGTACGCGGGCAAGGAGTGCAGGATGCACTACAAGCATCATACGAGCCGCTTCTGCTCTGAGCGGAGAGGGCACCATCGAGGATCTCGACGCCGCGAGACG 2070
 D G M G F S F H I T T M Y A G K E L R M H Y K H H Y E A V F V L S G E G T I E D L D A G E T
 CACCAGTGAAGCCGGCGTGTCTATGTGCTCAACAAGGACGACCGCATGTGGTTCGCCCGAAGACCGATATCGTACCAGCTGCGTGTTCACCCGCGGTCACCGGGCAGGAGGTGCATGACGCGTCCGCGGCC 2208
 H Q L K P G V L Y V L N R H D R H V V R P K T D I V T A C V F N P P V T G Q E V H D A S G A
 SD **ectD**
 TATCCGCCCCCGGTCGCGGAGGCGGCTGAGGTCCCGGTCCGCAACGAACGAAACGTGGGAGAAAAGACAATGGACGATCTCTATCCGTGCGCGCGCAACCCACCCCGTCCGCTGCTGCCGCGCCACGATCCGGT 2346
 Y P P A P V G E A A - M D D L Y P S R R E P T P S L L P R H D P
 GGTGCATGGGCGCTGGGCGCCCGCGCGCGCTGAGCGACGAGCAGACGCGGTTCTACGACACCAACGGCTATCTCGTGTGGAGAACGTTCGACCCCGCGGAGATCGCGCTGCTGCAGTCGGGGTGCATGGATCT 2484
 V V H G R W A P G A P L S D E Q T R F Y D T N G Y L V L E N V F D P A E I A L L Q S G S M D

```

GCTGGCCAACCCCGCCGGGCTCGACCCGAGACCATCATCACCGAGCGGGCAGCGACGAGGTGCGCTCGATCTTCGCGATCCACGCGCAGAACAATTGCTCGGCCGTCTCGCCGCGGATTCGCGGATTGCCGGGGT 2622
L L A N P A G L D R E T I I T E R G S D E V R S I F A I H A Q N E L L G R L A A D S R I A G
GGCGCGCTTCTGCTGGATGACGACGTCTACATCCATCAGTCGCGGCTCAACTACAAGCCGGGCTTCGATGGCAAGGAGTCTACTGGCACTCCGATTTTCGAGACCTGGCATGTCGAGGATGGCATGCCGCGGATGCG 2760
V A R F L L D D D V Y I H Q S R L N Y K P G F D G K E F Y W H S D F E T W H V E D G M P R M
CGCGTGTGCGATGTGATCCTGCTGGCGGAGAATACCGCAATAACGGGCCGCTGATGGTCATCCCGGCTCGCACCAGCAATATCTCACCTGCGTGGCGGAGACGCCGAGAACATTACCCTCCTCGTGAAGAA 2898
R A L S M S I L L A E N T A N N G P L M V I P G S H R K Y L T C V G E T P E N H Y R S S L K
GCAGGAATACGGCGTGCACGACCGGAGATGCTGACCGCGCTCGCCAGCGATCACGGCATCGTCGCGCCGACGGGCAAGCCGGCACCGTGGTGTGTTGCGACTGCAACACGATGCACGGCTCGAACGGCAACATCAC 3036
K Q E Y G V P D R E M L T A L A S D H G I V A P T G K A G T V V L F D C N T M H G S N G N I
GCCGTTCCCGCGTTCGAACCGGTTCTTCGTGTTCAACGCAAGGCGAACAGCCTGGTCGAGCCGTTCCGGCCGAAATCGCGCGCGCCGGACTTCATCGCCGACCGCGGTTACGACCGTGCACATCGTGAAGGGCCC 3174
T P F P R S N A F F V F N A K A N S L V E P F G P K S R R P D F I A D R A F T T V D I V K G
SD ask
GCTGGTGCAGCGCGGCGATGAGCATGGCTCCGAGTGTGCGAAGATCGCGCGCACGTGATCGCGCGCAGCGACGCGGTTGTGCGCAACGTGCTGATCGCCGCGCGCGCGCGCGATCTCTACCGGCGG 3312
P L V R R E R A A -
M S M A P S V E K I G G T S I A A T D A V V G N V L I A G R A G R D L Y R R
ATCTTCGTGGTCTCTGCCTATGGCGGGATCACCGACCTGCTGCTGGAGCCGAAAAGAAGACCGACGCCGGAAGCCGCCGGGTTTATGCCAGCTTCGCGCCGATGGCGAGAAGGGCGACTGGCGCGACGCGCTC 3450
I F V V S A Y G G I T D L L L E P K K K T D A A K P P G L Y A S F A A D G E K G D W R D A L
GATGCGGTGCGCCCGCGATGCGCGCCCGCAACGAGGAGGTGTTGCGCACGTGCGCCGAGCGCGCGTGGCGGATGACTTCGTGCGCCCGCGGATCGCGGAGACCCGCGCTGCCTCGACGATCTCGACCGCTGCGC 3588
D A V A A A M R A R N E E V F G T S P E R A V A D D F V A A R I G E T R A C L D D L D R L R
GGCCACGGCCATTTCCGGTTCGACGAACCGCTCGCCACCCCTGCGCGAGCTGCTCGCGGGTTCGGCGAGGCGCACAGCGCGCACAAACCCGCTGCTGCTGCGTGCAGCGCGGCTCAACGCGGCTTCGTGACCTG 3726
G H G H F R L D E P L A T L R E L L A G L G E A H S A H N T A L L L R A R G V N A A F V D L
ACCGCTGGCAGGCGCGCAACCTCGATCTCGACGAGCGGATCCGACCCGGGCTCGACGGGATCGACTCAGCACCCTGCCGATCGTACCCTGCTGAAATGCAGCGACGGCATGGTCCGAAATACGAC 3864
T G W Q D G R N L D L D E R I R T G L D G I D S A T T L P I V T G Y V K C S D G M V R K Y D
CGCGGTACACCGAGATGACCTTCGCCCGGCTCGCCGTGCTCACCGCGCGCGGAGCGATCATCCACAAGGAGTTCATCTCTCCAGCGCGATCCGAAGGTCGTGCGCGTGGCAAGGCGCGCAAGATCGGCCG 4002
R G Y T E M T F A R L A V L T G A R E A I I H K E F H L S S A D P K V V G V G K A R K I G R
ACGAATTACGACGTGACGGACCGCTCGCAATCTCGCGTTCGAGGTCATCCATCCCGGTGCGCGCGCGCTGCGCCAGGCGGGCATTCGCTGCGGGTGCAGCAACCTTCGACCGGCACGACGAGGCACGCTG 4140
T N Y D V - D Q L A N L G V E V I H P G A A R G L R Q A G I P L R V R N T F D R H D E G T L
ATCTGCGCCGACTACGTTTCCGCGCGCGCGCATCGAGATCGTCAACGGCATCCGCGAGCTGCGCGCGCTTCAGTCTTCGAGCAGGACATGGTCGGCAAGAAGGGCTATGACGCGCGGATCCTCGACACGCTGACG 4278
I C A D Y V S A A P R I E I V T G I R E L R A L Q F F E Q D M V G K K G Y D A A I L D T L T
AAGCACCGCGCGCATCGTCAGCAAGTCGTCACGCAACGCCATCACCCATTACCTCGCCCGCGCGGCGGCGGACGGTGCGCCGGGTGATCGCCGATCTGGAGGCGCGATTTCCGAACCGCGAGGCTCTCGCGCGG 4416
K H R A R I V S K S S N A N A I T H Y L A A G G P T V R R V I A D L E A R F P N A E V S A P
CGCCTCGCCATGGTTCGCGTGCAGCGGATCTCAGCGGAGGCTGTGTCGGCCGCGCGCTCGACGCGCTCGCGCGCGGGAATCGGGTGAAGGCGATGCAGCACCAGATGCGCAATGTCGACATCCAGTTC 4554
R L A M V A L I G S D L S A E G C V G R A L D A L G A A G I G V K A M Q H Q M R N V D I Q F
ATTCTCGATACCGCGCTTCGACGACGGATCCGCGCGCTCCACGCCCGCTGGTGAATGCCGGGCGCGCAGGACGGCAAAGCGGGACGCTGCGCACCGCGCGCTGA 4665
I L D T D R F D D A I R A L H A A L V E C R A A Q D G K G G T L R T A A -

```

Abb. 7.4: Sequenz des *ectABCDask*-Genclusters von *A. cryptum* DSM 2389^T

Gezeigt ist die nach Sequenzierung erhaltene Nukleotidsequenz sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz der einzelnen Gene des Typstamms. Zu dem bereits vollständig sequenzierten Isolat *A. cryptum* JF-5 (GenBank CP000697) besteht eine Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz von 99,3%. Abweichungen in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz sind grau markiert. Startcodons sind mit einer durchgezogenen und die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) innerhalb der potenziellen Ribosomenbindestellen mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet.

CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTGT	<u>TTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCAC</u>	CCCTATCAGTGATAG	<u>GAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGAC</u>	GGTGGCGCTGCGT	137
	-35	-10	+1		
CGGCCGACCGCGCCGATGGTCCGGCGGTGACCGCGCTGATCGCGGACTGCCCGCGCTCGATGCCAATTCGGCCTATTGCAACCTGCTGCAATGCACCGATTTCCGCCAAACCTGCGTGCTCGCCGAGCGCGAGGG					274
CGGGTGGTCCGGTGGATTTCCGGCTACCGCCCGCGTACAGCCTCTCGCGCATCTTCGTCTGGCAGGTCGCGGTCTCGTCCGCGCGCGGGGCATCGGCCTCGGGGGCAGATGCTCGATGCGCTGCTCGACCGTC					411
CCGCCATTGCCGGGTGCGCGCCCTGACCACCACCATCACCGAGGCGAACACCGCGTCTGGCGGTGTTGAAAGCCTTGCCCGCCGGCGGGCGGCTCGTTCGCCGGGGCGGTGCGCTTCGACCGCGCCGCCAT					548
		SD		<i>ectB</i>	
TTCGCCGGCTGCACGACACCGAGTTTCAGGTGACGATCGGCCTTCCCAGCCCGTCCCGAACCAGCAGCAAAGGACATCTCATGACCGATCTGCCGGCCCCCTCCGGCGCAAGCCGGATACCGGATCTACGAG					685
CGCATGGAGTCCAGGTGCGGAGCTACTGCACCGCATCCCGCCAGTTCACGCGGGCGAAGGCGCCTGGTGCATGACAGCCACGGCGGCCCTACCTGGATTTCTCGCCGGCTGCTCGTCTGTAATTACGG					822
CCACAATCATCCGGTGTGAAACGGGCGTGTATCGACTATATCGCCCGCAGCGCATCGCTCATGGACTCGACTTCATACCGACGCCAAGGCCGAGTTCCTCGACGCGCTGAAACCGTGATCCTGAAGCCGCGGG					959
GCATGGACTATCGGCCATGTTCTGTCGGCCGACCGAACAATGCCGTCGAGGCCGCGTCAAGCTCGCCGCAAGGTGACCGCCGGCAGACCGTGTATCGCTTCACCAACGGCTTCACGGCATGACGCTCGGC					1096
GCCCTCGCCTGCACCGGCAACGAGGGCAAGCGCGGGCGCCGGCTGCCGCTCGCCATGTCAGCCACGAGCCTTATGACGGGTATTACGGCCCGGAGATCGACACCGCCGACCTGCTGGAGCAGCGCCTTGCCGA					1233
CGGCTCCTCGGGCTCGACGCGCCGGCGGCTTCTGGTGCAGACGGTGCAGGGCAGGGCGGGCTGAACGCCCTCCCGGATGGATGCGCAAGATCGCCGCGCTCGCGAAGCGCCACGGCGCGCTGCTCATCG					1370
TGGATGACATCCAGCCGGCTGCGGCCGACGGGGCGCTTCTTCAGCTTCGAGGAGATGGGCATCCGCCCCGACATCATCACCTCGCGAAATCGCTCTCCGGCATCGGCGGCCCTTCGCGTGAACCTGTTCCGC					1507
CCGGAATCGACAGTGAAGCCCGCGGAGCACAACGGCACGTTCCCGGCAACAACACGCGCTTCGTACCGCCGCCGGCGATCCGCCATTTCTGGAGCGATGACGCTTCGCCGCCGACATCGCCCGGCGCGG					1644
CGACCTGCTCGGCCCGCGCTCGATGCGATCGCAGCACGGCATGGGATGAGCACGCGCGCCGGCGCATGATGCAGGGCATCGATGCCGGCACCGGCGGATGGCCGAGCGCATCACCGCATCGCCTTCCGCGAGG					1781
GGCTGGTGCATCGAGACCAGCGCGCAGATGGCGAGATCGTCAAGGTGCTGGCGCGCTCACCATCGATGACGACCTGCTGGCGCGGGCTCGACATTTCTGAACGCGCGTGAACGAGGCCACCGCGCCACCTAC					1918
AGCGTCGCCCGCGAGTGA	CGGGCCGCGACGAAAGCAAGGAGCAGAAACATGATCATCCGGACTCTGCCATGGTGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTGT	<u>TTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCAC</u>			2055
		-35	-10	+1	
	SD			<i>ectC</i>	
CCCTATCAGTGATAG	GAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAAATCGAAAC	<u>ATGATCATCCGGACTCTGAAGGAGGCGCAGGCCTCGGAGCGAAAGGTCGTACCCGATGGCTGGGACAGCGTGGCATGCTGCTGC</u>			2192
GCGACGACGGCATGGGCTTCTCGTTCACATCACACGATGTACGCGGGCAAGGAGCTGCGGATGCACTACAAGCATCATTACGAAGCCGTCTTCGTCTGAGCGGAGAGGGCACCATCGAGGATCTCGACGCCGGC					2329
GAGACGACACAGCTGAAGCCGGCGTGTCTATGTGCTCAACAGGCACGACCGCCATGTGGTGCGCCGAAAGACCGATATCGTCAACCGCTGCGTGTTCACCCGCGGTACCGGGCAGGAGGTGCATGACGCGTC					2466
CGGCGCTATCCGCCGCCCGGTGCGGAGGGCGCCTGAGGTCCCGTCCGCA					2520

Abb. 7.5: Sequenzausschnitt des Expressionsvektors pASK_ectAB-C

Die Gene *ectAB* und *ectC* von *A. cryptum* befinden sich jeweils stromabwärts eines *tet*-Promotors im Vektor pASK-IBA3. Die -35- und -10-Region, der Transkriptionsstartpunkt (+1) sowie die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) innerhalb der putativen Ribosomenbindestelle (RBS) wurden nach Skerra (1994) eingefügt. Startcodons sowie Promotorelemente sind mit einer durchgezogenen und SD-Sequenzen innerhalb der potenziellen RBS mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet.

-> *ectB*

```

CGGCCGAGATGGCGAGATCGTCAAGGTGCTGGCGCCGCTCACCATCGATGACGACCTGCTGGCGGGGGCTCGACATTCTCGAACGCGCCGTGAACGAGGCCACCGCGCCACCTACAGCGTCGCCGCCGAGTGAC 1937
GGGCCGCGACACGAAGCAAGGAGCAGAAACATGATCATCCGGACTCTGCCATGGTGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTGTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACCTCCCTATCAGTGATAGAGAA 2074
                                     SD          ectC
                                     -35          -10          +1
AAGTGAATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATCATCCGGACTCTGAAGGAGGGCGAGGCCCTCGGAGCGAAAGGTCGTCACCGATGGCTGGGACAGC 2211
GTGCGCATGTGCTGCGCGACGACGGCATGGGCTTCTCGTTCCACATCACCACGATGTACGCGGGCAAGGAGCTGCGGATGCACATAAGCATCATTACGAAGCCGCTTCGTCCTGAGCGGAGAGGGCACCATCGA 2348
GGATCTCGACGCCGGCGAGACGCACCAGCTGAAGCCGGGCGTCTCTATGTGCTCAACAGGCACGACCCCATGTGGTGGCGCCGAAGACCGATATCGTCAACCGCTGCGTGTCAACCCGCCGGTCAACGGGCAGG 2485
AAGTGATGACGCGTCCGGCCCTATCCGCCGCCCGGTCGGCGAGGCGGCTGAAAGCTTGACCTGTGAAGTAAAAATG 2567

```

Abb. 7.6: Sequenzausschnitt des Expressionsvektors pASK_ectAB-RectC

Die Gene *ectAB* und *ectC* von *A. cryptum* sind jeweils stromabwärts eines *tet*-Promotors im Vektor pASK-IBA3 enthalten und vor *ectC* befindet sich zusätzlich die Ribosomenbindestelle (RBS) aus pET-22b(+). Die -35- und -10-Region sowie der Transkriptionsstartpunkt (+1) des *tet*-Promotors wurden nach Skerra (1994) eingefügt. Das Startcodon von *ectC* und die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) innerhalb der RBS sind zusätzlich durch eine Linie gekennzeichnet. Die fehlende Sequenz von *ectA* und *ectB* ist identisch zu pASK_ectAB-C und Abb. 7.5 zu entnehmen.

```

TCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGAATTCCATATGATCATCCGGACTCTGAAGGA 137
                                     tac-Promotor
                                     -35          -10          +1
                                     SD
                                     ectC
GGCGCAGGCCTCGGAGCGAAAGGTCGTCACCGATGGCTGGGACAGCGTGCATGCTGCTGCGCGACGACGGCATGGGCTTCTCGTTCCACATCACCACGATGTACGCGGGCAAGGAGCTGCGGATGCACTACAAGC 274
ATCATTACGAAGCCGCTTTCGTCCTGAGCGGAGAGGGCACCATCGAGGATCTCGACGCCGGCGAGACGCACCAGCTGAAGCCGGGCGTCTCTATGTGCTCAACAGGCACGACCCCATGTGGTGGCGCCGAAGACC 411
GATATCGTCAACCGCTGCGTGTTCACCCGCCGGTCAACGGGCAGGAGGTGCATGACGCGTCCGGCGCCTATCCGCCGCCCGGTCGGCGAGGCGGCCCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGC 548
                                     spacer          His-Tag

```

Abb. 7.7: Sequenzausschnitt des Expressionsvektors pRL59EH_ectC_Acry_His

Das Gen *ectC* von *A. cryptum* mit der Sequenz für einen C-terminalen His-Tag befindet sich im Shuttle-Vektor pRL59EH-Ω stromabwärts des *tac*-Promotors. Die -35- und -10-Region, der Transkriptionsstartpunkt (+1) sowie die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) innerhalb der Ribosomenbindestelle wurden nach de Boer *et al.* (1983) eingefügt. Zusätzlich sind das Startcodon, der His-Tag und die spacer-Region mit Linien gekennzeichnet.

	<i>tac</i> -Promotor	SD	<i>ectA</i>	
TCATAACGGTTC	TTGGCAAATATTCTGAAATGAGCT	<u>GTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGAATTCGAGCTCGGTACCTGTGCGGATATGCC</u>		137
	-35	-10	+1	
TACCCTAAAAAGGAATTC	CAATCAACAACCCAAAGGCATTGTTTTGAGTTTTCCCCACCGTAATGCTCCGTCGTCCAACCGACGGCGACGGTTACAACCTTCATCAGCTGGTGGCGCGCTGCCAGCCCTCGATACCA			274
ATTCGGTCTACTGCAACCTGCTGCAGTGTTCGGATTTTCGCTGATACCGCCATCGCCGCAGAGAACGCTCAAGGCGAGCTGGTCGGTTTTCATCTCGGGTTACCGCCCCCTTCGCGGGCCGACACGCTGTTTCGCTCGG				411
CAGGTCGCGCTGCACAGCTGCATGCGCGGTCAGGGGCTGGCCCTGCGCATGCTGCTGGCACTGACCGCCGGGTCGCTCGCGAGTACGGCGTGCCTTACATGGAACACCACCTTCGCGGACACACGGGGGTCACA				548
GGCGCTGTTCAAGCGGGCTTCGACCGCTCGATGCCAACTGCACGACGCGCACGCTGTTTCGCGCGACACGCATTTTCGCGGTCAGCACGAGGACGAGGTGCTCTACCGCGCCGGCCGTTACCGTTTTCCATC				685
	SD	<i>ectB</i>		
TAGAAGAAGAGCTCA	<u>AAGGAGCAGCATGAAACTTTTTGA</u> ACTGAATGAATCCAGGGTTCGCAGCTACTGCCGTTTCCTTCCCGTGGTCTTCAAGCAGGCCAGGGCGCCGAAGTGGTCA			822
ACATCGACTTCCTCGCTGGTGC	CGGCACGCTCAACTACGGGCACAACCACCGGTGCTCAAGCAGGCGCTGCTCGAGTACATCGAGAGCGACGGCATCACCCACGGCTGGACATGTACACCGAAGCAAGGAGCGT			959
TTCTCGAAACCTTCA	ACCGGCTGATCCTCGAGCCGCGGGCATGGGCGACTACCGCATGCAGTTACCGGCCGACCGGCACCAACCGGTCGAGGCGGCGATGAACTGGCGCGCAAGGTCACCGGACGCAACAA			1096
CATCATCAGCTTACCAATGGCTTCC	ACGGCTGCAGCATTTGGCGCGTGGCCGCCACCGGCAACCAGCATCACCGTGGTGGTTCGGGCATCAGCCTCACCGATGTACGCGCATGCCGTACGCCAATTACTTTGGCG			1233
ACAAGACCAACACCATCGGCATGAT	GGACAAGCTTTGTCCGACCCATCCAGCGGTATCGACAAGCCGGCGGGTGTATCGTCGAGGTGGTGCAGGGCGAAGGCGCCCTGAACACCGCTCGGCCGAATGGATGCGC			1370
AAGCTCGAGAAGCTTCGCCAAGCAG	GAGATGCTGCTGATCGTCGACGACATCCAGGCGGCTGCGGCCGACCGGGACTTTCCTCAGCTTCGAAGAGATGGGCATCCAGCCGATATCGTCACGCTGTCCAAGTC			1507
GCTGTCCGGCTACGGCTGCCGTTCC	GCATGGTGTGCTGCGCCAGGAGCTGGACCAGTGGAAAGCCGGCGAACAACCGCACCTTCCGCGGCAACAACCATTCGATTCGTCACGGCGCCGCGGGTTCGAGCACT			1644
TCTGGCAGAACGACGCTTCGCCAAC	AGCGTGAAGGCCAAGGGCAAGCGCATCGCCGACGGCATGCAGCGCATCATCCGTCGCCACGGCCCGGATTTCGCTGTTCTCAAGGGCCGCGGGATGATGATCGGCATCAGC			1781
TGCCCGATGGCGAGATTGCCGCGC	AGTGTGCCGCCATGCCTTCGAAAACGGCCTGGTGTGAGACCAGCGGCCCCACAGCGAAGTGGTCAAGTGCCTGTGCCCGCTGATCATCAGCGATGAGCAGATCGACAA			1918
	SD	<i>ectC</i>		
GGCACTTTCATCCTCGACAAGGCCTTT	GCCGCGTGTGAGCGAGCAGACCAGAGAACCAAGCTTCTCTGAGGATCCGCAATGATCGTCAAGAACCTTCGCCAGTGCGAAAAGACCGACCGCAAGGTCCACAGCCAG			2055
ACCGGCACCTGGGACAGCAGCGCAT	GCTGCTCAAGGACGACAAGGTGGGATTCTCTTCCACATCACCCATCTACGCCGCGAGCAGACGCACATCCACTACCAGAACCCTTCGAGTCGGTGTACTGCATCAG			2192
CGGCAATGGCGAGATCGAAACATCG	CCGACGGCAAGATCTACAAGATCGAGCCGGCACGCTGTACGTGCTGGACAAGCATGACGAGCACCTGCTGCGCGGTGGCAGCGAAGACATGAAGCTGGCTGCGTCTTCA			2329
	SD			
ACCCGCGCTCAACGGGCGGAAGTGC	ATGACGAAAGCGGCTCTATCCGCTGGAGGCCGAAACCGTCTGATACCGGTTTAACCGGGCGGCCACCGCGCCGCCCCGCCATTACAAGAAAGGAGGTAAGCGTGAACC			2466
	<i>ectD</i>			
CTATGCAAGCCGACCTGTATCCCTCG	CGCCAGGAAGACCAGCCAGCTGGCAGGAACGCCTGGATCCGGTCGTCTACCGCAGCGACCTGGAGAAATGCGCCAATCGCGGCAGAGCTGGTCAACGCTTCGAGCGCGAC			2603
GGCTACCTGGTCATCCCAATCTGTT	CAGCGCCAGCAAGTCGCGCTGTTTCGCGCGAACTCGAGCGCATGCGCCAGGACCCGGCGTTCGCGGTTCCGGCAAGACCATCAAGGAACCCGACAGCGGTGCGATCCG			2740
CTCGGTGTTCCGCATCCACAAGGACA	ACGAGCTGTTCCGCCGCTCGCAGCCGACGAGCGCACCGCCGGCATCGCCGCTTCATCTTGGCGCGACCTGTACGTGCATCAGTCGCGAATGAACTTCAAGCCCGGCT			2877
TCACCGCAAGGAGTCTACTGGCACT	CGGATTTTCGAGACCTGGCAGATCGAGGACGGCATGCCGCGATGCGCTGCCTGCTGCTCGATCTCTTGACCGACAACGAGCCGACAAACGGCCCGCTGATGCTGATG			3014
CCCGCTCGCACAAGCACTACGTGCG	TGTGTCGGAGCCACACCGGAAAATCACTACGAGAAGTCCCTGCGCAAGCAGGAGATCGGCATCCCGACCAGAACAGCCTGAGCGAGCTGGCCAGCCGCTTCGGCATCGA			3151
CTGCGCCACCGCCCCCGCGCAGCGT	GGTGTCTTCCACTGCAACACCATGCATGGCTCCAATGGCAACATCACGCCAGCGCGGAGCAATCTGTTCTACGCTTACAACCAGCTGGATAATGCCGTGCAGGCTC			3288
CGTTCTGCGAGCAGAAACCGCGCC	CGCCCTTTGTCGCCAAGCGGAGAATTTCAAGCCGTGGACATTCGGCCGCAACAGTATCTCTGAGGCGATGGTGCACCTGCAGGCAT	3400		

Abb. 7.8: Sequenzausschnitt des Expressionsvektors pSynect2

Das *ectABCD*-Gencluster von *P. stutzeri* befindet sich im Shuttle-Vektor pRL59EH-Ω stromabwärts des *tac*-Promotors. Die -35- und -10-Region, der Transkriptionsstartpunkt (+1) sowie die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) innerhalb der Ribosomenbindestelle (RBS) wurden nach de Boer *et al.* (1983) eingefügt. Zusätzlich sind Startcodons mit einer durchgezogenen und SD-Sequenzen innerhalb der potenziellen RBS mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Erwin Galinski bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die anregenden Diskussionen.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier.

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Klein von der Universität Oslo und Herrn Prof. Dr. Karl Forchhammer von der Universität Tübingen möchte ich mich bedanken, dass sie mir den Forschungsaufenthalt in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht haben. Dabei habe ich viele hilfreiche Erkenntnisse und Methoden zu Phototrophen und speziell zu *Synechocystis* erlangt.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Martin Hagemann, Dr. Georg Hölzl, Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Nutzung von Geräten und Bereitstellung von Stämmen, Plasmiden und sonstigen Materialien.

Bei der AG Deppenmeier, vor allem bei Lena Kröninger und Thomas Franke, möchte ich mich für die Ratschläge rund um die RNA-Arbeiten bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Arbeitsgruppe, sowohl an die aktuellen als auch an die ehemaligen Mitglieder, mit denen ich die Zeit meiner Diplomarbeit und Doktorarbeit zusammen verbracht haben. Es war eine schöne, aufregende, lustige, prägende und rundum gelungene Zeit. Durch die AG Galinski ist das IfMB zu einem heimischen Ort für mich geworden.

Besonders danken möchte ich Dr. Elisabeth Witt, Lisa Dörfler, Lukas Bethlehem und Jarryd Brauner für jegliche Unterstützung im Laboralltag, hilfreiche Diskussion, unterhaltsame Pausen, inspirierende Gespräche und tolle Erlebnisse außerhalb des IfMB. Ich bin froh euch als Freunde gewonnen zu haben. Ein herzlicher Dank geht auch an Birgit Amendt, Elisabeth Schwab und Marlene Hecker für ihre Unterstützung im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen MitarbeiterInnen des Instituts für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Freunden, besonders Anna-Maria May und Sarah Refai, danke ich für ihr Verständnis, tolle Erlebnisse, die wir schon zusammen erlebt haben und noch vor uns haben.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern und meinen Schwestern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und auf die ich mich immer verlassen kann.

Meinem Mann Stefan danke ich für seine uneingeschränkte Unterstützung, durch die ich jede Herausforderung bisher meistern konnte. Danke für deine hilfreichen Ratschläge, dein Verständnis für meine Macken und viele schöne gemeinsame Momente.