

**Untersuchungen zur  
heterologen Biosynthese des  
seltenen kompatiblen Soluts  
 $N_\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Lisa M. Stiller, geb. Dörfler**

aus Düsseldorf

Bonn, 2020

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: 05.08.2020

Erscheinungsjahr: 2020

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>                             | <b>I</b>  |
| <b>Abkürzungen und Trivialnamen.....</b>                                     | <b>IV</b> |
| <b>1 Einleitung .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Das Aminosäurederivat N <sub>ε</sub> -Acetyl-β-Lysin .....               | 1         |
| 1.1.1 N <sub>ε</sub> -Acetyl-β-Lysin und der Vorläufer β-Lysin.....          | 1         |
| 1.1.2 NAβL als Antwort auf osmotischen Stress .....                          | 3         |
| 1.1.3 Verbreitung der Synthesegene und enzymatische Strukturmerkmale .....   | 5         |
| 1.1.4 Biosynthese von NAβL .....   | 6         |
| 1.2 Heterologe Expression und Proteinproduktion .....                        | 9         |
| 1.2.1 <i>Escherichia coli</i> als Expressionssystem.....                     | 10        |
| 1.2.2 <i>Halomonas elongata</i> als Expressionssystem .....                  | 10        |
| 1.2.3 Heterologe Produktion von NAβL.....                                    | 11        |
| 1.3 Ziel der Arbeit .....  | 12        |
| <b>2 Material und Methoden.....</b>  | <b>14</b> |
| 2.1 Chemikalien, Kits, Enzyme und Marker .....                               | 14        |
| 2.2 Puffer und Lösungen.....   | 17        |
| 2.3 Software.....  | 18        |
| 2.4 Mikrobiologische Methoden.....   | 19        |
| 2.4.1 Mikroorganismen und Vektoren .....                                     | 19        |
| 2.4.2 Nährmedien .....   | 21        |
| 2.4.3 Medienzusätze.....   | 23        |
| 2.4.4 Stammerhaltung.....  | 24        |
| 2.4.5 Vorkulturen .....  | 24        |
| 2.4.6 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern.....                   | 24        |
| 2.4.7 Standardbedingungen.....   | 24        |
| 2.4.8 Semi-anaerobe Anzucht von Flüssigkulturen .....                        | 25        |
| 2.4.9 Anzucht im Fermenter.....  | 25        |
| 2.5 Molekularbiologische Methoden .....                                      | 26        |
| 2.5.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA .....                              | 26        |
| 2.5.1.1 Isolierung von DNA.....  | 26        |
| 2.5.1.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und Restriktionsverdauen ..... | 28        |
| 2.5.1.3 DNA-Quantifizierung .....  | 28        |
| 2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....                                   | 28        |
| 2.5.2.1 Primer und synthetische Ribosomenbindestellen.....                   | 29        |
| 2.5.2.2 PCR mit Supplementen .....   | 30        |
| 2.5.2.3 Gradienten-PCR.....  | 31        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.5.2.4  | SOE-PCR .....  | 31        |
| 2.5.3    | Agarosegelelektrophorese .....   | 32        |
| 2.5.4    | Restriktionsverdau .....   | 32        |
| 2.5.5    | Ligation.....  | 33        |
| 2.5.6    | Herstellung kompetenter Zellen.....  | 33        |
| 2.5.7    | Transformation von <i>E. coli</i> .....  | 34        |
| 2.5.8    | Konjugation von <i>H. elongata</i> .....   | 34        |
| 2.5.9    | DNA-Sequenzierung.....   | 35        |
| 2.6      | Proteinbiochemische Methoden .....   | 35        |
| 2.6.1    | Aufreinigung von Zellprotein .....   | 35        |
| 2.6.2    | Bestimmung des Gesamtzellproteins.....   | 36        |
| 2.6.3    | Proteinquantifizierung .....   | 36        |
| 2.6.4    | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....  | 37        |
| 2.7      | Analytische Methoden .....   | 38        |
| 2.7.1    | Extraktion nach Bligh & Dyer (1959).....   | 38        |
| 2.7.2    | Gefriertrocknung.....  | 38        |
| 2.7.3    | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....   | 39        |
| 2.7.4    | Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR).....  | 42        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>44</b> |
| 3.1      | Der Einfluss von NA $\beta$ L auf molekularbiologische Methoden .....                            | 44        |
| 3.1.1    | NA $\beta$ L als Supplement im Restriktionsverdau.....   | 45        |
| 3.1.2    | NA $\beta$ L als PCR-Zusatz .....  | 48        |
| 3.2      | Clusterexpression der NA $\beta$ L-Synthesegene aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> ..... | 52        |
| 3.2.1    | Vektorkonstruktion von pPE_yodPkamA und pASK_yodPkamA.....                                       | 53        |
| 3.2.2    | Expressionsversuche bei Standardbedingungen.....   | 55        |
| 3.2.3    | Expressionsversuche bei niedriger Temperatur .....   | 58        |
| 3.2.4    | Sequenzuntersuchung der Expressionsvektoren .....  | 59        |
| 3.3      | NA $\beta$ L-Synthese in <i>H. elongata</i> .....  | 62        |
| 3.3.1    | $\beta$ -Lysin-Produktion in <i>H. elongata</i> .....  | 62        |
| 3.3.1.1  | Vektorkonstruktion von pPE_kamA_specRBS .....  | 63        |
| 3.3.1.2  | Produktion von KamA <sub>Bs</sub> und Nachweis von $\beta$ -Lysin .....                          | 64        |
| 3.3.2    | NA $\beta$ L-Produktion in <i>H. elongata</i> .....  | 66        |
| 3.3.2.1  | Vektorkonstruktion von pPE_kamA_specRBS_yodP .....   | 67        |
| 3.3.2.2  | Proteinnachweis und Produktion von NA $\beta$ L .....  | 68        |
| 3.4      | NA $\beta$ L-Synthese in <i>E. coli</i> .....  | 71        |
| 3.4.1    | $\beta$ -Lysin-Produktion in <i>E. coli</i> .....  | 72        |
| 3.4.1.1  | Nutzen des Synthesegens aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> .....                         | 72        |
| 3.4.1.2  | Vektorkonstruktion von pASK_kamA_specRBS .....   | 72        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.4.1.3  | Produktion von KamA <sub>BS</sub> und der Nachweis von $\beta$ -Lysin .....                 | 74         |
| 3.4.1.4  | Nutzen des Synthesegens aus <i>C. pasteurianum</i> DSM 525 <sup>T</sup> .....               | 76         |
| 3.4.1.5  | Vektorkonstruktion von pASK_kamA_CpRBS.....   | 77         |
| 3.4.1.6  | Produktion von KamA <sub>Cp</sub> und der Nachweis von $\beta$ -Lysin.....                  | 78         |
| 3.4.1.7  | Nutzen des Synthesegens aus <i>Ms. mazei</i> Gö1 .....                                      | 80         |
| 3.4.2    | NA $\beta$ L-Produktion in <i>E. coli</i> .....   | 82         |
| 3.4.2.1  | Expressionsvektoren für die NA $\beta$ L-Synthese in <i>E. coli</i> .....                   | 82         |
| 3.4.2.2  | Nachweis der Proteinproduktion.....   | 84         |
| 3.4.2.3  | Produktion von NA $\beta$ L unter semi-anaeroben Bedingungen .....                          | 85         |
| 3.4.2.4  | Nachweis von NA $\beta$ L mittels NMR.....  | 87         |
| 3.4.2.5  | Semi-anaerobe Batch-Fermentation.....   | 90         |
| 3.5      | Vergleich der NA $\beta$ L-Produktion in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen .....        | 93         |
| 3.5.1    | Protein-Nachweis und NA $\beta$ L-Produktion in Fed-Batch-Medium.....                       | 93         |
| 3.5.2    | NA $\beta$ L-Produktion in GGF-Medium.....  | 96         |
| 3.6      | Das bifunktionelle NA $\beta$ L-Synthesegen aus <i>Dehalococcoides mccartyi</i> CBDB1.....  | 98         |
| 3.6.1    | Vektorkonstruktion von pASK_Dmc_RBS_ablAB.....  | 100        |
| 3.6.2    | Proteinproduktion und Produktnachweis .....   | 101        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>  | <b>105</b> |
| 4.1      | Evaluierung der Effekte von NA $\beta$ L auf molekularbiologische Methoden .....            | 105        |
| 4.1.1    | NA $\beta$ L im Restriktionsverdau .....  | 105        |
| 4.1.2    | Der Einfluss von NA $\beta$ L auf die PCR-Reaktion.....                                     | 107        |
| 4.2      | Heterologe NA $\beta$ L-Produktion .....  | 109        |
| 4.2.1    | Nutzen des Genclusters aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> .....                     | 110        |
| 4.2.2    | <i>H. elongata</i> als Produktionsstamm.....  | 111        |
| 4.2.3    | <i>E. coli</i> als Produktionsstamm .....   | 115        |
| 4.2.3.1  | $\beta$ -Lysin wird nur anaerob produziert.....   | 116        |
| 4.2.3.2  | Produktion von NA $\beta$ L.....  | 119        |
| 4.2.3.3  | Vergleich der Produktion in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen.....                      | 127        |
| 4.2.4    | Vergleich mit der Literatur.....  | 130        |
| 4.3      | <i>D. mccartyi</i> CBDB1 besitzt ein bifunktionelles Syntheseprotein für NA $\beta$ L ..... | 133        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>137</b> |
| <b>6</b> | <b>Anhang.....</b>  | <b>139</b> |
| <b>7</b> | <b>Quellenverzeichnis .....</b>   | <b>146</b> |
|          | <b>Publikationsliste .....</b>  | <b>166</b> |

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Abb. 1.1   | Die Antibiotika Streptothricin F und Albothricin .....  | 2  |
| Abb. 1.2   | Beispiele für kompatible Solute .....   | 4  |
| Abb. 1.3   | Schematischer Vergleich der NA $\beta$ L-Synthesegene und deren Homologe in den Genomen<br>verschiedener Organismen .....   | 5  |
| Abb. 1.4   | Schematische Biosynthese von NA $\beta$ L .....   | 7  |
| Abb. 1.5   | Reaktionsmechanismus der L-Lysin 2,3-Aminomutase aus <i>C. subterminale SB4</i> .....   | 8  |
| Abb. 3.1   | Restriktionsverdau von pK18mobsacB mit <i>EcoRI</i> und verschiedenen Zusätzen .....  | 47 |
| Abb. 3.2   | PCR von <i>ectB</i> aus <i>A. cryptum</i> DSM 2389 <sup>T</sup> mit verschiedenen Zusätzen .....  | 49 |
| Abb. 3.3   | PCR von <i>adh2</i> aus <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 mit NA $\beta$ L als Zusatz in verschiedenen<br>Konzentrationen .....  | 51 |
| Abb. 3.4   | Vektorkonstruktion von pASK_yodPkamA und pPE_yodPkamA .....   | 54 |
| Abb. 3.5   | Exemplarischer Wachstumsverlauf unter Standardbedingungen mit dem<br>Gencluster <i>yodP-kamA</i> .....  | 55 |
| Abb. 3.6   | SDS-PAGE von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_yodPkamA .....  | 57 |
| Abb. 3.7   | SDS-PAGE von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_yodPkamA und <i>H. elongata</i> pPE_yodPkamA .....  | 59 |
| Abb. 3.8   | Vergleich der in situ-Sequenz des Vektors pASK_yodPkamA und der dazugehörigen<br>Sequenzierung .....  | 60 |
| Abb. 3.9   | Konstruktion des Expressionsvektors pPE_kamA_specRBS.....   | 63 |
| Abb. 3.10  | SDS-PAGE zum Nachweis von KamA <sub>BS</sub> in <i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup> und <i>H. elongata</i><br>WUB02 mit dem Expressionsvektor pPE_kamA_specRBS ..... | 65 |
| Abb. 3.11  | Konstruktion des Expressionsvektors pPE_kamA_specRBS_yodP.....  | 67 |
| Abb. 3.12  | SDS-PAGE von <i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup> und <i>H. elongata</i> WUB02 mit dem Expressionsvektor<br>pPE_kamA_specRBS_yodP .....                               | 69 |
| Abb. 3.13  | Konstruktion des Expressionsvektors pASK_kamA_specRBS .....   | 73 |
| Abb. 3.14  | SDS-PAGE von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_kamA_specRBS .....  | 74 |
| Abb. 3.15  | Konstruktion des Expressionsvektors pASK_kamA_CpRBS .....   | 77 |
| Abb. 3.16  | SDS-PAGE von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ und <i>E. coli</i> Rosetta <sup>TM</sup> (DE3) mit dem Expressionsvektor<br>pASK_kamA_CpRBS .....                                | 79 |
| Abb. 3.17  | Vektorkarte für pASK_Mm_ablA und Proteinnachweis .....  | 81 |
| Abb. 3.18  | Konstruktion des Expressionsvektors pASK_kamA-yodP-fwd & pASK_kamA-yodP-rev .....   | 83 |
| Abb. 3.19  | Expressionsvektor pASK_yodP-ablA .....  | 84 |
| Abb. 3.20  | SDS-PAGE von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ mit verschiedenen Expressionsvektoren .....  | 85 |
| Abb. 3.21a | <sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie des Zellextrakts von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_yodP-ablA .....   | 88 |
| Abb. 3.21b | <sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie des Zellextrakts von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_kamA-yodP-fwd .....   | 89 |

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

---

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Abb. 3.22 | Verlauf der semi-anaeroben Batch-Fermentation .....  | 91  |
| Abb. 3.23 | NA $\beta$ L-Produktion mittels Batch-Fermentation von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_yodP-ablA .....  | 92  |
| Abb. 3.24 | SDS-PAGE von verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen mit dem Expressionsvektor<br>pASK_yodP-ablA nach Anzucht in Fed-Batch-Medium .....                        | 94  |
| Abb. 3.25 | NA $\beta$ L-Produktion in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen mit dem Expressionsvektor<br>pASK_yodP-ablA bei Anzucht in Fed-Batch-Medium .....           | 95  |
| Abb. 3.26 | NA $\beta$ L-Produktion in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen mit dem Expressionsvektor<br>pASK_yodP-ablA bei Anzucht in GGF-Medium .....                 | 96  |
| Abb. 3.27 | Proteinsequenzvergleich durch das Pfam-Tool zur Untersuchung von funktionellen<br>Regionen .....   | 100 |
| Abb. 3.28 | Konstruktion des Expressionsvektors pASK_Dmc_RBS_ablAB .....   | 101 |
| Abb. 3.29 | SDS-PAGE von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_Dmc_RBS_ablAB .....  | 102 |
| Abb. 3.30 | UV-Chromatogramm des Zellextrakts von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_Dmc_RBS_ablAB und<br>eines Kontrollstamms <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK-IBA3 ..... | 103 |
| Abb. 3.31 | <sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie des Zellextrakts von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_Dmc_RBS_ablAB .....  | 104 |
| Abb. 4.1  | Sequenzausschnitt des Vektors pASK_yodPkamA ( <i>in situ</i> ) .....   | 111 |
| Abb. 4.2  | Vereinfachte schematische Darstellung der Ectoin-Synthese (1), der Inaktivierung von<br>Chloramphenicol (2) und der NA $\beta$ L-Synthese (3) .....          | 114 |
| Abb. 4.3  | Schematischer Vergleich der NA $\beta$ L-Expressionsvektoren .....   | 121 |
| Abb. 4.4  | Vereinfachte schematische Darstellung der anaeroben Verstoffwechslung von Fumarat<br>und Glycerin .....  | 124 |
| Abb. 4.5  | Proteinsequenzvergleich aus <i>D. mccartyi</i> CBDB1 und <i>D. restrictus</i> DSM 9455 durch<br>das Pfam-Tool .....  | 136 |
| Abb. 6.1  | PCR von <i>adh2</i> aus <i>Halobacterium sp.</i> NRC-1 mit verschiedenen Zusätzen .....  | 139 |
| Abb. 6.2  | Teilsequenzierung des Vektors pASK_yodPkamA .....  | 141 |
| Abb. 6.3  | Teilsequenzierung des Vektors pPE_kamA_specRBS .....   | 142 |
| Abb. 6.4  | Verlauf der semi-anaeroben Fed-Batch-Fermentation .....  | 144 |
| Abb. 6.5  | NA $\beta$ L-Produktion mittels Fed-Batch-Fermentation von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_yodP-ablA ...  | 145 |

## Tabellen

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tab. 2.1 | Verwendete Chemikalien, Kits, Enzyme und Marker .....                   | 14 |
| Tab. 2.2 | Verwendete Puffer und Lösungen .....                                    | 17 |
| Tab. 2.3 | Mikroorganismen und Vektoren .....                                      | 19 |
| Tab. 2.4 | MM63-Medium nach Miller (Larsen <i>et al.</i> 1987) .....               | 21 |
| Tab. 2.5 | Zusammensetzung AB-Medium und LB-Medium (mod. nach Bertani, 1951) ..... | 21 |
| Tab. 2.6 | Zusammensetzung Terrific Broth-Medium (Tartof & Hobbs, 1987) .....      | 22 |
| Tab. 2.7 | Glucose-Glycerin-Fumarat-Medium (GGF) nach Spencer & Guest (1973) ..... | 22 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Tab. 2.8  | Fed-Batch-Medium (GGF-Medium mod. nach Kuchenreuther <i>et al.</i> , 2010) .....  | 22  |
| Tab. 2.9  | Zusammensetzung der VA-Lösung (Imhoff & Trüper, 1977) .....   | 23  |
| Tab. 2.10 | Verwendete Primer .....   | 29  |
| Tab. 2.11 | Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit Solutzugabe .....  | 30  |
| Tab. 2.12 | PCR-Programme zur Amplifikation mit Supplementen .....  | 30  |
| Tab. 2.13 | Zusammensetzung eines Restriktionsverdau mit Supplementen .....   | 33  |
| Tab. 2.14 | Zusammensetzung eines Standard-Ligationsansatzes .....  | 33  |
| Tab. 2.15 | Zusammensetzung der Acrylamid-Gele für die SDS-PAGE .....   | 37  |
| Tab. 2.16 | Laufmittelgradient für die FMOc-ADAM-HPLC .....   | 40  |
| Tab. 3.1  | Ergebnisse ausgewählter Blastp-Analysen der Proteinsequenzen KamA <sub>Bs</sub> und YodP<br>aus <i>B. subtilis</i> DSM10 <sup>T</sup> gegen die Proteinsequenzen AblA und AblB aus <i>Ms. mazei</i> Gö1 ...             | 53  |
| Tab. 3.2  | Durchschnittliche Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von <i>H. elongata</i><br>pPE_yodPkamA und <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pASK_yodPkamA .....  | 56  |
| Tab. 3.3  | Intrazellulärer Solut-Gehalt in Expressionskulturen von <i>H. elongata</i> ,<br>jeweils mit dem Plasmid pPE_kamA_specRBS .....  | 65  |
| Tab. 3.4  | Intrazellulärer Solut-Gehalt in Expressionskulturen von <i>H. elongata</i> ,<br>jeweils mit dem Plasmid pPE_kamA_specRBS_yodP .....   | 69  |
| Tab. 3.5  | Intrazellulärer $\beta$ -Lysin-Gehalt in Expressionskulturen von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$<br>pASK_kamA_specRBS .....   | 75  |
| Tab. 3.6  | Intrazellulärer $\beta$ -Lysin-Gehalt in semi-anaeroben Kulturen von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ und <i>E. coli</i><br>Rosetta <sup>TM</sup> (DE3) mit dem Expressionsvektor pASK_kamA_CpRBS .....                      | 80  |
| Tab. 3.7  | NA $\beta$ L-Gehalt in <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ mit den Expressionsvektoren pASK_kamA-yodP-fwd<br>und pASK_yodP-ablA bei Anzucht in MM63-Medium bei 3 % NaCl ( <i>w/v</i> ).....                                     | 86  |
| Tab. 3.8  | NA $\beta$ L-Gehalt in <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ mit den Expressionsvektoren pASK_kamA-yodP-fwd<br>und pASK_yodP-ablA bei Anzucht in GGF-Medium bei 3 % NaCl ( <i>w/v</i> ).....                                      | 87  |
| Tab. 3.9  | NA $\beta$ L-Gehalt der semi-anaeroben Kulturen von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ mit den Expressionsvektoren<br>pASK_kamA-yodP-fwd und pASK_yodP-ablA zur NMR-Analyse .....  | 89  |
| Tab. 3.10 | Ergebnisse ausgewählter Blastp-Analysen der Proteinsequenzen AblA und AblB aus<br><i>Ms. mazei</i> Gö1 im Vergleich mit allen nicht-redundanten Proteinsequenzen aus<br>verschiedenen <i>D. mccartyi</i> -Stämmen ..... | 99  |
| Tab. 4.1  | In dieser Arbeit genutzten Gene und deren Ursprungs-, sowie Expressionsorganismen ...   | 109 |
| Tab. 4.2  | Vergleich der NA $\beta$ L-Produktion in verschiedenen Organismen .....   | 132 |
| Tab. 6.1  | Potenzielle Acetyltransferasen in <i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup> .....  | 143 |
| Tab. 6.2  | Wachstumsraten und Verdopplungszeiten verschiedener <i>E. coli</i> -Stämme mit dem<br>Plasmid pASK_yodP-ablA .....  | 145 |



## Abkürzungen und Trivialnamen

|                          |   |
|--------------------------|---|
| % (w/v)                  | prozentualer Massenanteil pro Volumenanteil   |
| % (v/v)                  | prozentualer Volumenanteil  |
| Δ                        | Deletion, bzw. Mutation des nachfolgenden Gens  |
| α-ADABA                  | N <sub>α</sub> -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure   |
| α-Lysin                  | α-L-Lysin   |
| Abb.                     | Abbildung   |
| <i>ablA</i>              | Gen der L-Lysin 2,3-Aminomutase aus <i>Ms. mazei</i> Gö1                                  |
| <i>ablB</i>              | Gen der β-Lysin N <sub>6</sub> -Acetyltransferase aus <i>Ms. mazei</i> Gö1                |
| <i>ablAB</i>             | Bifunktionelles NAβL-Synthesegen aus <i>D. mccartyi</i> CBDB1                             |
| ADABA                    | N-Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure   |
| ADAM                     | 1-Aminoadamantan  |
| <i>adh2</i>              | Gen der Alkoholdehydrogenase aus <i>Halobacterium sp.</i> NRC-1                           |
| AHT                      | Anhydrotetracyclin  |
| Amp <sup>R</sup>         | Ampicillinresistenz   |
| APS                      | Ammoniumpersulfat   |
| ASA                      | Aspartat-β-Semialdehyd  |
| ATP                      | Adenosintriphosphat   |
| BCA                      | Bicinchoninsäure  |
| Betain                   | Glycinbetain  |
| β-Lysin                  | β-L-Lysin   |
| bp                       | Basenpaar(e)  |
| BSA                      | Bovines Serumalbumin  |
| BSH                      | Bacillithiol  |
| BTC                      | 1,2,4,5-Benzoltetracarboxylat Natriumsalz   |
| B&D                      | Bligh & Dyer  |
| CAT                      | Chloramphenicol-Acetyltransferase   |
| CoA                      | Coenzym A   |
| C-Quelle                 | Kohlenstoffquelle   |
| DABA                     | L-2,4-Diaminobuttersäure  |
| DHAP                     | Dihydroxyacetonphosphat   |
| DMSO                     | Dimethylsulfoxid  |
| DNA                      | Desoxyribonukleinsäure  |
| DNase                    | Desoxyribonuklease  |
| dNTP(s)                  | Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)   |
| DSM                      | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen   |
| DTT                      | Dithiothreitol  |
| é                        | Elektron(en)  |
| EC                       | <i>enzyme commission number</i>   |
| <i>ectB<sub>Ac</sub></i> | Gen der L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase aus <i>A. cryptum</i> DSM 2389 <sup>T</sup> |
| Ectoin                   | (S)-2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure                                    |
| EDTA                     | Ethylendiamintetraessigsäure  |

## Abkürzungen und Trivialnamen

---

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <i>et al.</i>                      | <i>et alii</i> (und andere)   |
| EtOH                               | Ethanol   |
| Fmoc                               | 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid   |
| <i>g</i>                           | Erdbeschleunigung   |
| gDNA                               | genomische DNA  |
| GGF                                | Glycerin-Glucose-Fumarat (-Medium)  |
| Gly3P                              | Glycerin-3-Phosphat   |
| GZP                                | Gesamtzellprotein   |
| h                                  | Stunde(n)   |
| H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>  | demineralisiertes Wasser  |
| H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> | Reinstwasser  |
| Homoectoin                         | 4,5,6,7-Tetrahydro-2-methyl-1H-[1,3]-diazepin-4-carbonsäure                     |
| Hydroxyectoin                      | (S,S)-2-Methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure              |
| IPTG                               | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid  |
| <i>iscR</i>                        | Gen des HTH-Typ-Transkriptionsregulators  |
| <i>kamA<sub>Bs</sub></i>           | Gen der L-Lysin 2,3-Aminomutase aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup>      |
| <i>kamA<sub>Cp</sub></i>           | Gen der L-Lysin 2,3-Aminomutase aus <i>C. pasteurianum</i> DSM 525 <sup>T</sup> |
| <i>kamA<sub>CsSB4</sub></i>        | Gen der L-Lysin 2,3-Aminomutase aus <i>C. subterminale</i> SB4                  |
| kb                                 | Kilobasen   |
| kDa                                | Kilodalton  |
| LB                                 | <i>lysogeny broth</i>   |
| InOD <sub>600</sub>                | natürlicher Logarithmus der optischen Dichte bei 600 nm                         |
| Min                                | Minute(n)   |
| MM63                               | Minimalmedium 63  |
| mRNA                               | <i>messenger RNA</i>  |
| NAαL                               | N <sub>ε</sub> -Acetyl-α-Lysin  |
| NAβA                               | N-Acetyl-β-Alanin   |
| NAβL                               | N <sub>ε</sub> -Acetyl-β-Lysin  |
| NAG                                | N-Acetyl-Glutamin   |
| NAGGN                              | N-Acetyl-Glutaminylglutamin-1-amid  |
| NCBI                               | <i>National Center for Biotechnology Information</i>                            |
| NMR                                | <i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)                            |
| N-Quelle                           | Stickstoffquelle  |
| OD <sub>600</sub>                  | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm                                 |
| PAGE                               | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| PCR                                | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)                    |
| PEG                                | Polyethylenglycol   |
| PEP                                | Phosphoenolpyruvat  |
| pH                                 | <i>potentia hydrogenii</i>  |
| pI                                 | Isoelektrischer Punkt   |
| PLP                                | Pyridoxal 5'-Phosphat   |
| pO <sub>2</sub>                    | Sauerstoffpartialdruck  |
| pPE                                | pPromEct-Vector   |
| ppm                                | <i>parts per million</i>  |
| RBS                                | Ribosomenbindestelle  |
| RI                                 | <i>refractive index</i> (Brechungsindex)  |

## Abkürzungen und Trivialnamen

---

|                      |   |
|----------------------|---|
| RNA                  | Ribonukleinsäure  |
| RNase                | Ribonuklease  |
| rpm                  | <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)  |
| RSB                  | <i>reducing sample buffer</i>   |
| RT                   | Raumtemperatur  |
| SAM                  | S-Adenosyl-Methionin  |
| SDS                  | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)  |
| SD-Sequenz           | Shine-Dalgarno-Sequenz  |
| SOE                  | <i>splicing by overlap extension</i>  |
| synth.               | synthetische  |
| Tab.                 | Tabelle   |
| $t_d$                | Verdopplungszeit  |
| TEMED                | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin  |
| <i>tet</i> -Promotor | Promotor des Tetracyclin-Resistenzgens <i>tetA</i>  |
| TetR                 | Tetracyclin-Repressor   |
| TG                   | Trockengewicht  |
| THF                  | Tetrahydrofuran   |
| Ti-Rate              | Translationsinitiations-Rate  |
| $T_m$                | Schmelztemperatur   |
| TMSP                 | Natrium-Trimethylsilylpropionat   |
| Tris                 | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| tRNA                 | Transfer-RNA  |
| TSS                  | <i>transformation and storage solution</i>  |
| U                    | Unit  |
| UDP                  | Uridindiphosphat  |
| UV                   | Ultraviolett  |
| <i>yodP</i>          | Gen der $\beta$ -Lysine $N_6$ -Acetyltransferase aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup>       |
| YodP <sub>mut</sub>  | Mutierte bacilliale $\beta$ -Lysine $N_6$ -Acetyltransferase in Vektor pASK_yodPkamA/pPE_yodPkamA |

# 1 Einleitung

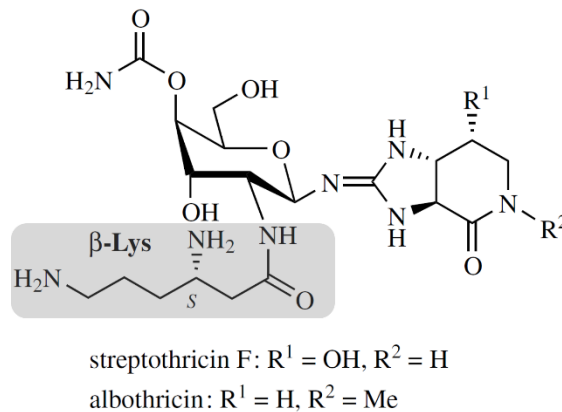
## 1.1 Das Aminosäurederivat N<sub>ε</sub>-Acetyl-β-Lysin

Bei Aminosäuren (AS) handelt es sich um organische Verbindungen mit sowohl einer Carboxyl- als auch (mindestens) einer Aminogruppe. Sie sind allgemein bekannt dafür, die Bausteine von Proteinen darzustellen; die Abfolge solcher Polypeptidketten hat dabei erheblichen Einfluss auf die Art, die Funktion und den weiteren Aufbau eines Proteins. Es gibt zahlreiche Aminosäurederivate, wovon ca. 900 durch natürliche Biosynthesewege produziert werden und ungefähr 80 durch abiotische Synthesen entstehen (Cronin & Pizzarello, 1983; Fowden, 2001; Uy & Wold, 1977). Von allen bekannten Aminosäuren sind jedoch lediglich 20, bzw. bei Bakterien 22, für die Proteinbiosynthese relevant; die sogenannten proteinogenen Aminosäuren. Diese Gruppe beinhaltet ausschließlich L-Aminosäuren, die die Aminogruppe am α-C-Atom tragen (Madigan & Martinko, 1997). Nicht-proteinogene Aminosäuren kommen häufig als Metabolite in Zellen vor, können aber auch spezifische Funktionen, bspw. als Toxine, ausüben (Cox *et al.*, 2005). Nicht-proteinogen sind auch die β-Aminosäuren, welche die Aminogruppe statt am α-C-Atom am nachfolgenden β-C-Atom tragen.

### 1.1.1 N<sub>ε</sub>-Acetyl-β-Lysin und der Vorläufer β-Lysin

β-Aminosäuren kommen im Vergleich zu proteinogenen α-Aminosäuren relativ selten in der Natur vor, sind aber in einigen natürlich produzierten Substanzen zu finden (Griffith, 1986; Kudo *et al.*, 2014). Es wird angenommen, dass sie oft den Zweck von chemischen Schutzmechanismen erfüllen, denn neben Antibiotika sind β-Aminosäuren häufig in anderen biologisch aktiven Molekülen, wie z.B. in Zytostatika oder in Zytotoxinen, anzutreffen (Botes *et al.*, 1984; Engel *et al.*, 2002; Umezawa *et al.*, 1966; Wani *et al.*, 1971; Yang *et al.*, 1994). Die prominentesten Beispiele für Moleküle mit β-Aminosäuren als Reste, bzw. Seitenketten sind die Penicilline, Cephalosporine und Bleomycine, deren Wirksamkeit teilweise von diesen Verbindungen abhängt (Crumpler *et al.*, 1951; Spiteller & Von Nussbaum, 2005). Als erste in natürlichen Stoffen entdeckte β-Aminosäure gilt β-L-Alanin (β-Alanin), welche gleichzeitig auch weitverbreitet in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien vorkommt und im für alle lebenden Organismen essentiellen Cofaktor Coenzym A (CoA) eingebaut ist (Engeland, 1909; Miller & Ojima, 2001; Spiteller & Von Nussbaum, 2005). β-Alanin hat seinen Ursprung in der korrespondierenden proteinogenen α-Aminosäure, ebenso wie β-L-Lysin (β-Lysin).

$\beta$ -Lysin wurde erstmals als Bestandteil von antibiotisch wirksamen Substanzen aus *Streptomyces*-Arten wahrgenommen und ist in vielen strukturell unterschiedlichen Antibiotika dieser Gattung zu finden, unter anderem in Viomycin, Streptothricin und dessen Derivat Albothricin (vgl. Abb. 1.1; Carter *et al.*, 1952; French *et al.*, 1973; Haskell *et al.*, 1952; Inamori *et al.*, 1990; Miyaki *et al.*, 1981; Nomoto *et al.*, 1977; Sawada & Taniyama, 1977; Waksman & Woodruff, 1942).



**Abb. 1.1: Die Antibiotika Streptothricin F und Albothricin (mod. nach Spiteller & Von Nussbaum, 2005).** Der  $\beta$ -Lysin-Rest ist grau hinterlegt.

In diversen *Clostridium*-Spezies liegt  $\beta$ -Lysin regulär als freie Aminosäure vor und stellt dort das erste Intermediat des Lysin-Katabolismus dar. Viele Clostridien können  $\alpha$ -Lysin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle mit den Endprodukten Acetat und Butyrat nutzen. Für eine letztendlich effektive Umwandlung zu Acetyl-CoA bedarf es jedoch einer Verschiebung der  $\alpha$ -Aminogruppen durch die Transformation von  $\alpha$ -Lysin zu  $\beta$ -Lysin (Costilow *et al.*, 1966; Spiteller & Von Nussbaum, 2005; Stadtman, 2006). Das dafür zuständige Enzym, die L-Lysin 2,3-Aminomutase, ist bereits extensiv untersucht worden (vgl. 1.1.3; Aberhart *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1996; Chirpich *et al.*, 1970; Ruzicka *et al.*, 2000; Zappia & Barker, 1970).

$N_\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin (NA $\beta$ L) stellt ein acetyliertes Derivat von  $\beta$ -Lysin dar und liegt bei physiologischem pH-Wert zwitterionisch vor. Es wurde erstmalig von Sowers und Kollegen Anfang der 90er Jahre in methanogenen Archaeen nachgewiesen (Sowers *et al.*, 1990) und galt lange Zeit als eine exklusiv in Archaeen synthetisierte Substanz. In mesophilen und thermophilen Vertretern der Ordnungen *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* wird es vor allem als Antwort auf osmotischen Stress produziert (vgl. 1.1.2; Empadinhas & Da Costa, 2008; Lai *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1999; Pflüger *et al.*, 2003; Roberts, 2005; Robertson, Lai, *et al.*, 1992; Robertson, Noll, *et al.*, 1992; Sowers & Gunsalus, 1995; Sowers *et al.*, 1990). In den letzten Jahren wurde das Aminosäurederivat jedoch auch in Vertretern der Domäne *Bacteria* gefunden; z.B. im grampositiven *Bacillus cereus* CECT 148<sup>T</sup>

(DSM 31<sup>T</sup>) sowie in mehreren grünen Schwefelbakterien der Gattungen *Prosthecochloris*, *Chlorobaculum* und *Chlorobium* (Müller *et al.*, 2011; Triadó-Margarit *et al.*, 2011).

### 1.1.2 NAßL als Antwort auf osmotischen Stress

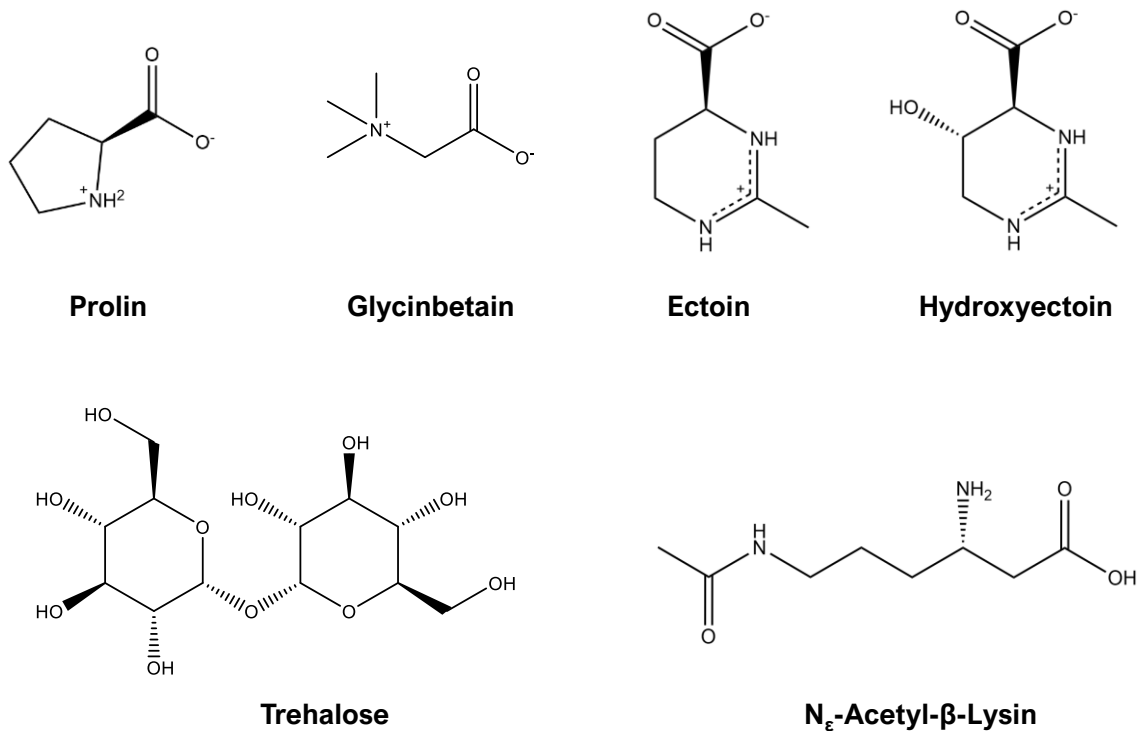
In den Untersuchungen von Sowers *et al.* (1990) stand die Anpassung methanogener Archaeen an hohen osmotischen Druck, also an eine erhöhte Salinität des äußeren Mediums im Fokus (Sowers *et al.*, 1990). Eine erhöhte Osmolarität ist in vielen Lebensräumen auf der Erde zu finden, nämlich überall dort, wo permanent viele gelöste, osmotisch wirksame Substanzen, wie z.B. Salze, vorliegen oder deren Konzentration aufgrund von (periodischer) Austrocknung ansteigt. Dementsprechend sind vor allem Habitate wie Meere oder Salzseen prominente Beispiele für Lebensräume, die eine Besiedlung erschweren. Auch menschengemachte Biotope wie Salinen stellen solche extremen Lebensbedingungen dar. Das Hauptproblem, welchem sich Mikroorganismen dabei stellen müssen, ist eine geringe Wasseraktivität, gepaart mit einer hohen Ionenstärke. Sie laufen Gefahr, das Wasser im Zellinneren über ihre semipermeable Zellmembran aufgrund des osmotischen Drucks zu verlieren und den Metabolismus sowie den Zellturgor nicht mehr aufrecht erhalten zu können (Brown, 1976; Roeßler & Müller, 2001).

Sogenannte halotolerante oder halophile Mikroorganismen haben sich entweder an diese Standorte angepasst oder benötigen teilweise die dort herrschenden Bedingungen, um optimal zu wachsen. Dafür nutzen sie zwei unterschiedliche Strategien zum Überleben: die *salt-in-cytoplasm*-Strategie und die *compatible-solute*-Strategie.

Erstere wird vor allem von halophilen Vertretern der *Bacteria* und *Archaea* genutzt, deren Stoffwechsel auf NaCl angewiesen ist und die bei 3 % NaCl oder höheren Konzentrationen ihr Wachstumsoptimum haben (Galinski & Trüper, 1994; Kushner, 1978). Zum Ausgleich des osmotischen Drucks werden anorganische Ionen im Cytoplasma akkumuliert, die das Zellinnere isoosmotisch bzw. leicht hyperosmotisch zum umgebenden Medium halten. In der Regel werden dafür K<sup>+</sup>-Ionen als Kationen und Cl<sup>-</sup>-Ionen als Gegenionen genutzt, wobei teilweise molare Konzentrationen im Cytoplasma erreicht werden. Eine permanente Adaption des Stoffwechsels und der Zellmaschinerie an hohe Ionenstärken ist somit unerlässlich und äußert sich z.B. in modifizierten Proteinen mit vielen sauren Aminosäuren (Dennis & Shimmin, 1997; Lanyi, 1974; Oren & Mana, 2002).

Die *compatible-solute*-Strategie hingegen erlaubt eine höhere Flexibilität auch bei wechselnden Osmolaritäten, z.B. durch Austrocknung des Lebensraumes. Bei dieser zweiten Strategie werden keine Ionen, sondern niedermolekulare, organische und gut wasserlösliche

Moleküle im Cytoplasma akkumuliert, wobei diese entweder aus der Umgebung aufgenommen oder *de novo* synthetisiert werden (Kempf & Bremer, 1998). Die Akkumulation dieser Substanzen hat im Gegensatz zu Ionen nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zellmaschinerie, weshalb man von „kompatiblen Soluten“ (CS) spricht (Brown, 1976).



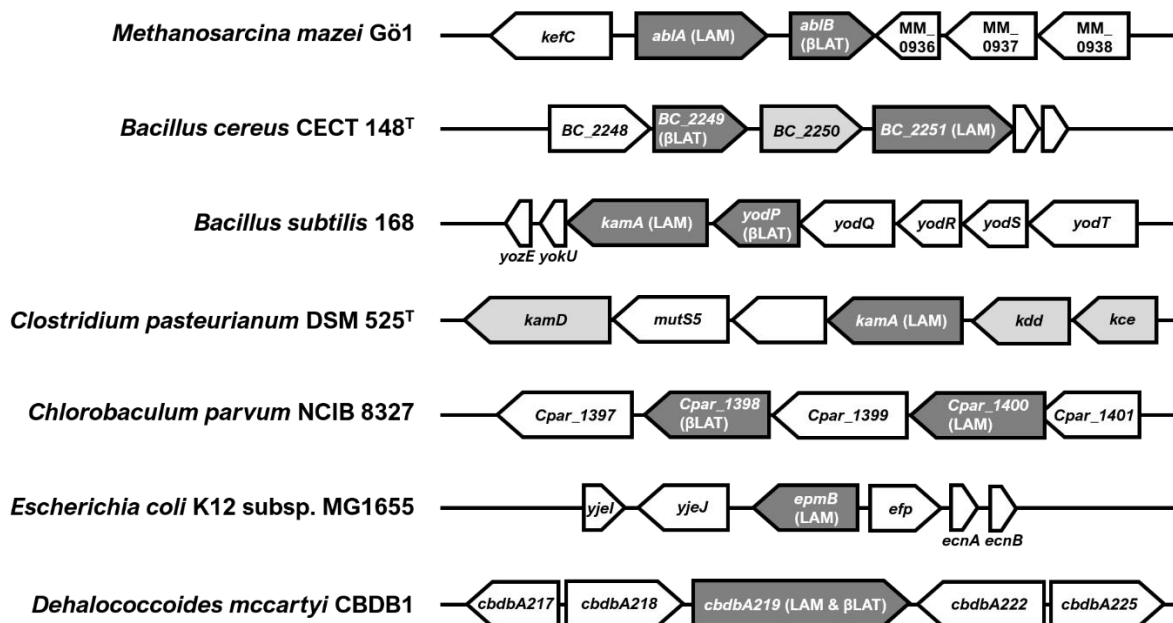
**Abb. 1.2: Beispiele für kompatible Solute.**

NA $\beta$ L wurde als kompatibles Solut in den methanogenen Archaeen *Methanosarcina thermophila* und *Methanogenium cariaci* nachgewiesen, wo es neben Glutamat als Schutzstoff ab einer Salinität von 0,4 M NaCl *de novo* synthetisiert wird (Sowers *et al.*, 1990).

Wie NA $\beta$ L auch liegen die meisten kompatiblen Solute bei physiologischem pH-Wert zwitterionisch oder ungeladen vor und gehören hauptsächlich den Stoffklassen der Polyole, Zucker, Aminosäuren oder deren Derivaten an (vgl. Abb. 1.2; Galinski, 1995). Neben osmotischem Druck können CS auch Schutz vor anderen extremen Standortbedingungen bieten, z.B. vor (extrem) niedrigen oder hohen Temperaturen (Lentzen & Schwarz, 2006). Weitere Vorteile sind stabilisierende Einflüsse auf Proteine und Antikörper (Bersch *et al.*, 2000; Knapp *et al.*, 1999; Lippert & Galinski, 1992; Pollard & Wyn Jones, 1979), das Senken der Schmelztemperatur von Nukleinsäuren (Iakobashvili & Lapidot, 1999; Kurz, 2008) und die Erhöhung der Fluidität von Lipidmembranen (Harishchandra *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Verbreitung der Synthesegene und enzymatische Strukturmerkmale

Während der Nachweis von NAßL bislang vor allem in methanogenen Archaeen und nur einigen wenigen Vertretern der *Bacteria* erbracht wurde, konnten die Synthesegene, bzw. Hinweise auf ebendiese in weiteren Organismen gefunden werden (vgl. Abb. 1.3; Behshad *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2011; Pflüger *et al.*, 2003; Triadó-Margarit *et al.*, 2011). In der Regel gibt es zwei Synthesegene, die für eine L-Lysin 2,3-Aminomutase (LAM, EC 5.4.3.2) und für eine  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase ( $\beta$ LAT, EC 2.3.1.264) kodieren (vgl. 1.1.4). Welchen Zweck die Gene in den jeweiligen Organismen erfüllen und welche Wachstums- oder Umweltbedingungen deren Transkription und Translation induzieren, ist teilweise unbekannt. Müller *et al.* konnten 2011 zeigen, dass *Bacillus subtilis* 168 die Gene *kamA* (LAM) und *yodP* ( $\beta$ LAT) aufweist und diese auch für die homologe Produktion von NAßL genutzt werden können (Müller *et al.*, 2011). Bisher ist jedoch nicht geklärt, welche Rolle die Gene und NAßL selbst in *B. subtilis* *in vivo* spielen. Eine Funktion bei der Degradation von  $\alpha$ -Lysin, der Sporulation oder beim Schutz vor Kälte, Hitze oder bei hohen Salzkonzentrationen konnte bisher ausgeschlossen werden (Müller *et al.*, 2011).



**Abb. 1.3: Schematischer Vergleich der NAßL-Synthesegene und deren Homologe in den Genomen verschiedener Organismen.** Relevante Biosynthesegene für  $\beta$ -Lysin, bzw. NAßL sind in dunkelgrau unterlegt. Hellgrau hinterlegt in *B. cereus* CECT 148<sup>T</sup> ist das Gen *BC\_2250*, welches einen hypothetischen L-Lysin-Aminomutase-Regulator darstellt. In *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> befindet sich die LAM in einem Gencluster, welches mit dem Lysin-Metabolismus in Verbindung steht; hellgrau sind hier *kamD*: D-Lysine 5,6-Aminomutase  $\alpha$ -Untereinheit, *kdd*: L-Erythro-3,5-Diaminohexansäure Dehydrogenase, *kce*: 3-Keto-5-Aminohexansäure Spaltungsenzym. *Dehalococcoides mccartyi* CBDB1 verfügt voraussichtlich über ein bifunktionelles Fusionsenzym AblAB (vgl. 3.6).



*Escherichia coli* K12 subsp. MG1655 verfügt auch über eine L-Lysin 2,3-Aminomutase zur Synthese von  $\beta$ -Lysin, hier ist das Produkt jedoch (*R*)- $\beta$ -Lysin und nicht (*L*)- $\beta$ -Lysin, wie es z.B. in *Clostridium*- oder *Bacillus*-Spezies der Fall ist. Die Bedeutung sowohl des Enzyms als auch des Produkts in *E. coli* ist noch nicht geklärt (Behshad *et al.*, 2006). Weitere Organismen, die mindestens das Gen für eine L-Lysin 2,3-Aminomutase besitzen bzw. Hinweise auf homologe Proteine zeigen, sind in ganz unterschiedlichen Phyla der Bakterien zu finden, z.B. in *Porphyromonas gingivalis* (Bacteroidetes), *Fusobacterium nucleatum* (Fusobacteria) und *Haemophilus influenzae* (Proteobacteria) (Barker *et al.*, 1982; Behshad *et al.*, 2006 und vorhergesagt durch bioinformatische Analysen).

Die charakteristischste Sequenz in all diesen LAM stellt ein Eisen-Schwefel-Bindemotiv **CXXXCXXC** dar, welches drei konservierte Cysteinreste aufweist (Chen *et al.*, 2000; Hung & Lai, 2013; Pflüger *et al.*, 2003). Außerdem kann im Großteil dieser Enzyme das Motiv DAPGGGGK gefunden werden, welches in die Bindung des Cofaktors S-Adenosylmethionin (SAM) involviert ist (Hung & Lai, 2013; Pflüger *et al.*, 2003; vgl. auch 1.1.4). Einige LAM, wie z.B. die aus *Ms. mazei* Gö1, *Chlorobaculum parvum* NBIC 8327, *Clostridium subterminale* SB4 oder auch ein potenzielles Fusionsprotein aus *D. mccartyi* CBDB1, weisen außerdem eine zweite cysteinreiche Sequenz **CXXXCXXC** nahe des C-Terminus auf, die eine Zink-Bindestelle darstellt (Hung & Lai, 2013; Pflüger *et al.*, 2003; vgl. auch 3.6). Chen und Kollegen sprechen außerdem noch von einem PLP-Bindemotiv **LXKXRX**, welches bspw. in *C. subterminale* SB4, *P. gingivalis*, *Deinococcus radiodurans* oder *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> zu finden ist; dabei aber bei weitem nicht den gleichen Konservierungsgrad wie die bereits genannten Motive aufweist (Chen *et al.*, 2000).

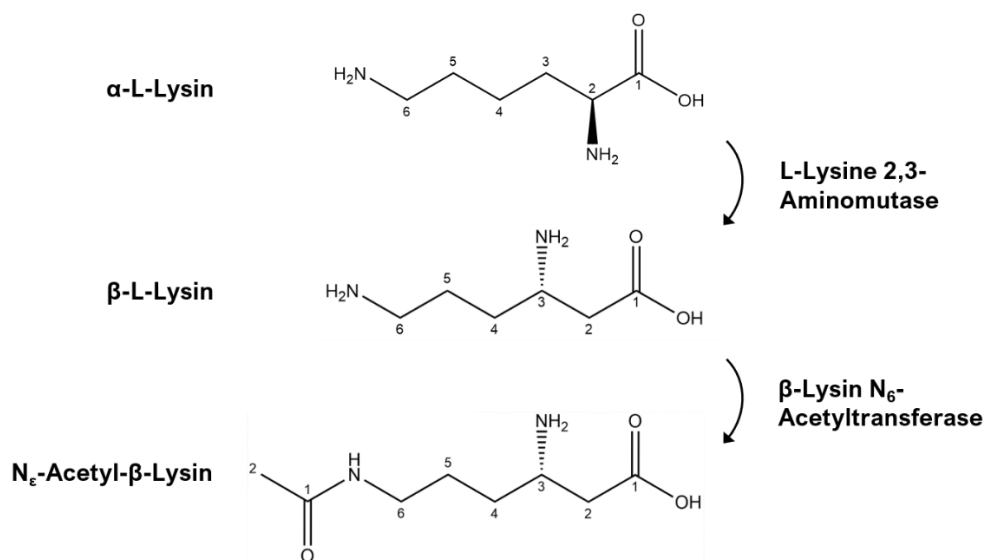
Im Gegensatz zu L-Lysin 2,3-Aminomutasen haben die GCN5-bezogenen N-Acetyltransferasen (GNAT) der gleichnamigen GNAT *Superfamily*, zu denen die  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase gehört, eine geringe primäre Sequenzidentität zueinander (Dyda *et al.*, 2000; Favrot *et al.*, 2016; Seltsmann, 1989). Hier ist jedoch die Sekundärstruktur des Proteins, die aus sechs bis sieben  $\beta$ -Faltblättern und vier  $\alpha$ -Helices besteht, als charakteristische Struktur zu nennen, welche als Homologie-Merkmal genutzt werden kann (Favrot *et al.*, 2016).

#### 1.1.4 Biosynthese von NA $\beta$ L

Die Biosynthese von NA $\beta$ L umfasst zwei Schritte (vgl. Abb. 1.4): Zunächst wird das Vorläufermolekül  $\alpha$ -Lysin von einer L-Lysin 2,3-Aminomutase zu  $\beta$ -Lysin umgewandelt. Dabei kann  $\alpha$ -Lysin u.a. aus dem Diaminopimelinsäure-Weg ausgehend von L-Aspartat stammen

oder als externes Substrat zugeführt werden. Nachfolgend wird  $\beta$ -Lysin an der  $\epsilon$ -Aminogruppe mittels einer  $\beta$ -Lysin  $N_6$ -Acetyltransferase acetyliert.

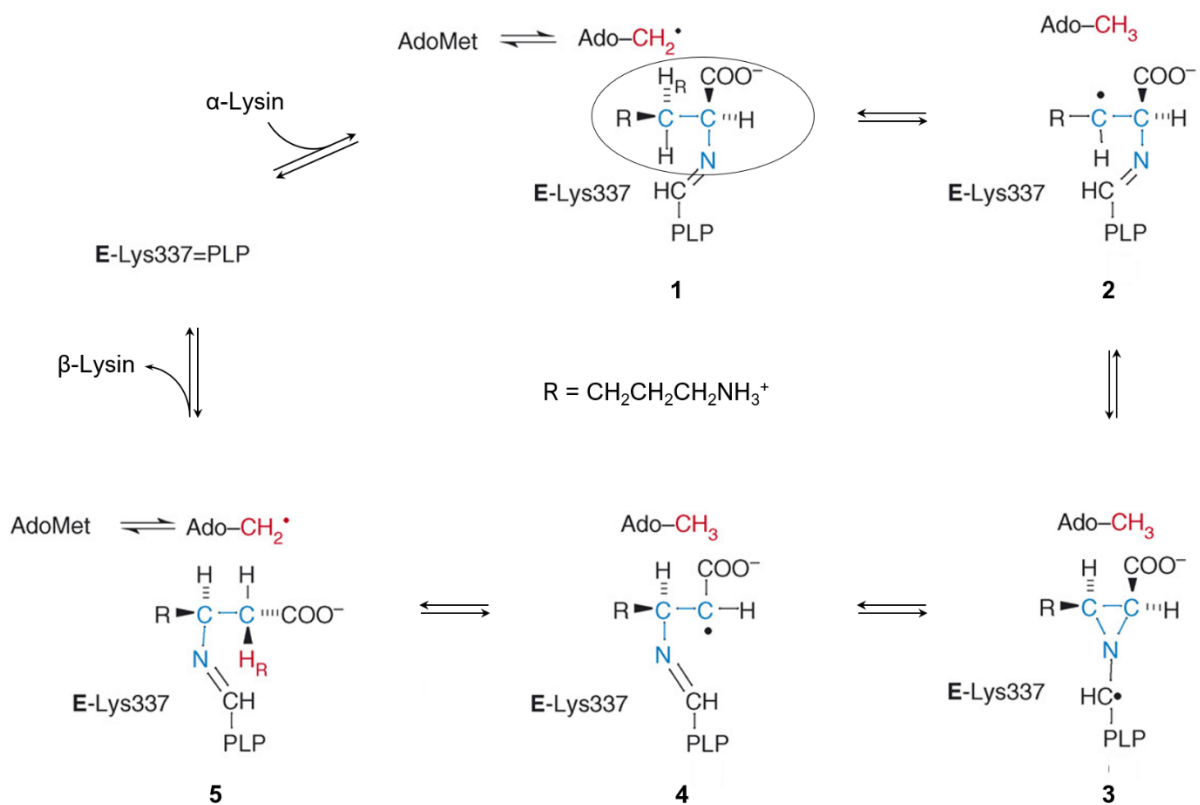
Während der zweite Schritt die einfache Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Substratmoleküls durch eine GCN5-bezogene N-Acetyltransferase darstellt, ist der erste Schritt um ein Vielfaches komplexer. Hier wird von der Aminomutase der Tausch eines H-Atoms am  $C_3$ -Atom mit der Aminogruppe am  $C_2$ -Atom katalysiert, welcher die temporäre Einführung eines Radikals mit sich bringt. Für diese radikalische Isomerisierung benötigt das Enzym bestimmte Cofaktoren, darunter Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP), welches mit dem Enzym eine interne und mit dem Substrat  $\alpha$ -Lysin eine externe Aldimin-Verbindung eingeht (Chen & Frey, 2001; Lepore *et al.*, 2005).



**Abb. 1.4: Schematische Biosynthese von  $N_\epsilon$ ÄBL.**

Die LAM besitzt außerdem [4Fe-4S]-Cluster, wobei für die LAM aus *C. subterminale* SB4 und *B. subtilis* (*subsp. amyloliquefaciens*) ein [4Fe-4S]-Cluster pro enzymatischer Untereinheit postuliert wurde (Chen *et al.*, 2000; Chirpich *et al.*, 1970; Petrovich *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu anderen Aminomutasen, wie z.B. der Lysin 5,6-Aminomutase von *Clostridium sticklandii* (Tang *et al.*, 2003), nutzt die L-Lysin 2,3-Aminomutase nicht Adenosylcobalamin als Cofaktor, sondern gehört zu der von Sofia *et al.* aufgestellten *Radical SAM superfamily*-Proteinfamilie. Dabei dient S-Adenosylmethionin (SAM) als Transfermittel für ein H-Atom und spielt eine direkte Rolle in der radikalischen Reaktion (Frey, 1998; Sofia, 2001). Der Reaktionsmechanismus der LAM ist in den letzten Jahren ausgiebig durch verschiedenste Experimente untersucht worden (Frey & Magnusson, 2003; Lees *et al.*, 2006; Lepore *et al.*, 2005), wobei das in Abb. 1.5 gezeigte Schema den mutmaßlichen katalytischen Zyklus am Beispiel der LAM von *C. subterminale* SB4 darstellt. Zunächst wird der Cofaktor SAM

homolytisch an der C<sub>5</sub>-S-Bindung gespalten; dabei wird das notwendige Elektron von einem im Enzym befindlichen [4Fe-4S]-Cluster bereitgestellt (Chen *et al.*, 2003; Cosper *et al.*, 2003). Infolgedessen entsteht (reversibel) ein 5'-Deoxyadenosyl-Radikal (Ado-CH<sub>2</sub>•), welches im Anschluss ein H-Atom (H<sub>R</sub>) am C<sub>3</sub>-Atom von L-Lysin abstrahiert. L-Lysin ist dabei über eine Aldimin-Bindung an PLP gebunden, welches wiederum über eine weitere Aldimin-Bindung an Lys<sub>337</sub> mit dem Enzym interagiert (vgl. Abb. 1.5, 1). Die Abstraktion führt zur Ausbildung eines Substrat-Radikals (vgl. Abb. 1.5, 2). Durch zweimalige Verlagerung entsteht über die temporäre Ausbildung einer Aziridin-Gruppe (vgl. Abb. 1.5, 3) ein Produkt-gebundenes Radikal (vgl. Abb. 1.5, 4). Im letzten Schritt erfolgt die Abstraktion eines H-Atoms von 5'-Deoxyadenosin (Ado-CH<sub>3</sub>), welches zur Regenerierung des 5'-Deoxyadenosyl-Radikals und somit auch von SAM am Ende des Zyklus führt (vgl. Abb. 1.5, 5). Das Produkt β-Lysin kann daraufhin durch eine Transaldiminierung aus dem Enzymkomplex entlassen werden und der Zyklus kann erneut beginnen.



**Abb. 1.5: Reaktionsmechanismus der L-Lysin 2,3-Aminomutase aus *C. subterminale* SB4 (mod. nach Wang & Frey, 2007).** Das mobilisierte H-Atom ist rot dargestellt; die in die direkte Umlagerung involvierte Gruppen in blau. E-Lys337: Enzym mit PLP-interagierendem Lys<sub>337</sub>. Das Substrat L-Lysin ist zur Orientierung einmalig umrahmt (1). AdoMet: SAM

Die Umwandlung von α-Lysin zu β-Lysin ist aufgrund der in der LAM befindlichen [4Fe-4S]-Cluster sauerstoffempfindlich (Flint *et al.*, 1993). Eine Aufreinigung des Enzyms in aktiver Form

kann demnach nur unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden, andernfalls ist eine Reaktivierung durch anaerobe Inkubation mit PLP, Fe(II), einem reduzierenden Agens, wie z.B. Dihydroliponsäure, sowie SAM notwendig (Ruzicka *et al.*, 2000).

## 1.2 Heterologe Expression und Proteinproduktion

Als heterologe Expression versteht man die Expression eines Gens in einem Wirtsorganismus, der dieses Gen natürlicherweise nicht besitzt. Häufig wird dafür auch die Bezeichnung „heterologe Proteinexpression“ verwendet, die die Expression eines fremden Gens und die nachfolgende Translation in das dazugehörige Protein umfasst (Angov *et al.*, 2008; Briand *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2018; Parrilli *et al.*, 2008). Seit in den 70er Jahren zum ersten Mal Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich zum Ausgleich einer Auxotrophie in *E. coli* genutzt werden konnte, wurden viele rekombinante Proteine in fremden Wirtsorganismen produziert; darunter befinden sich auch einige medizinisch relevante Proteine, wie z.B. das Humane Interleukin 2 oder igG-Antikörper (Struhl & Magasanik, 1976; Takimura *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 2004). Auch wichtige pharmazeutische Verbindungen, wie Insulin oder Erythropoetin, werden heterolog in großem Maßstab produziert (Baeshen *et al.*, 2014; Lee-Huang, 1984; Lee *et al.*, 2012). Abgesehen von der direkten Produktion wissenschaftlich oder medizinisch relevanter Substanzen ist die heterologe Proteinexpression ein häufig genutztes Werkzeug, um Proteine und Enzyme, die näher untersucht und charakterisiert werden sollen, in großen Mengen zu produzieren. Die Wirtszellen dafür, die auch als Expressionssysteme bezeichnet werden, können diversen Quellen entspringen und stammen u.a. aus Säugetieren, Insekten und Pflanzen oder sind Hefen sowie Bakterien (Schmidt, 2004; Voedisch *et al.*, 2005). Die Wahl des Expressionssystems richtet sich dabei häufig nach dem zu produzierenden Protein oder Molekül selbst, da jede Zellart Vor- und Nachteile besitzt. In Säugetierzellen werden häufig therapeutisch relevante Proteine produziert, um mit den einhergehenden posttranslationalen Modifikationen für den Menschen gut verträglich zu sein (Voedisch *et al.*, 2005). Bakterienzellen bieten diesen Vorteil nicht, gehören aber aufgrund ihrer in vielen Fällen einfachen Handhabung und kurzen Generationszeit zu einer beliebten Gruppe an Expressionssystemen. Häufig verwendete Organismen sind u.a. *B. subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* und *E. coli*, die teilweise auch in der Lage sind, das synthetisierte Produkt direkt in das umgebende Medium auszuschleusen (Moritz, 2018; Schmidt, 2004; Terpe, 2006).

### 1.2.1 *Escherichia coli* als Expressionssystem

Das fakultativ anaerobe, gramnegative Enterobakterium *E. coli* ist einer der bekanntesten Organismen für die Produktion rekombinanter Proteine. Viele Stämme sind mittlerweile sequenziert und ermöglichen so eine genetische Zugänglichkeit. Das schnelle Wachstum sowie geringe Wachstumsansprüche und Haltungskosten sind weitere positive Faktoren (Shiloach & Fass, 2005). Unter geeigneten Bedingungen kann der Ertrag an heterolog produzierten Proteinen sogar bis zu 20 % des gesamten Zellproteins ausmachen (Schmidt, 2004). Außerdem können unvorteilhafte Effekte, wie z.B. die Bildung von Einschlusskörperchen bei fehlerhafter Faltung bzw. bei der Produktion von unlöslichen, rekombinanten Proteinen mittlerweile durch geeignete genetische Modifikationen verringert werden (Baneyx & Mujacic, 2004; Choi & Lee, 2004). Inzwischen gibt es eine große Anzahl an mutierten Wirtsstämmen, Klonierungsvektoren und Promotoren, sodass die Bandbreite an Genen aus fremden Organismen, die mittels *E. coli* exprimiert werden können, enorm ist (Baneyx, 1999; Briand *et al.*, 2016; Casali, 2003; Selleck & Tan, 2008). *E. coli* wird nicht nur für die Produktion von Arzneimitteln wie Insulin oder Calcitonin genutzt, sondern stellt ein reguläres Expressionssystem dar, wenn es um Studien zur Proteincharakterisierung geht (Schmidt, 2004). Auch wenn ein signifikanter Teil aller rekombinanten Proteine in *E. coli* unter aeroben Bedingungen (über-)produziert wird, wurde in den letzten Jahren auch von der Produktion heterologer Enzyme unter anaeroben Bedingungen berichtet, z.B. die Hydrogenasen HydA1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* und HydA aus *C. pasteurianum* (Kuchenreuther *et al.*, 2010).

Während *E. coli* selbst zum Schutz vor osmotischem Stress K<sup>+</sup>-Ionen und Glutamat akkumuliert und Trehalose synthetisiert, wurde der Organismus in der Vergangenheit mehrfach zur Synthese von kompatiblen Soluten genutzt (Dinnbier *et al.*, 1988; Giaever *et al.*, 1988). So wurden bereits erfolgreich N-Acetyl-glutaminyglutamin-1-amid (NAGGN), sowie in diversen Arbeiten die beiden Aspartat-Derivate Ectoin und Hydroxyectoin produziert (Bethlehem, 2019; Czech *et al.*, 2018; He *et al.*, 2015; Korsten, 2011; Louis & Galinski, 1997; Moritz, 2018; Ning *et al.*, 2016; Schubert *et al.*, 2007).

### 1.2.2 *Halomonas elongata* als Expressionssystem

So versatil *E. coli* als Expressionsorganismus auch ist - bei der heterologen Produktion mancher Proteine stößt dieses System an seine Grenzen. Ein hoher GC-Gehalt der zu exprimierenden Gene, komplexe Disulfidbrücken innerhalb eines Proteins oder auch

Oligomere, genauso wie Proteine aus bspw. halophilen Organismen stellen einen erhöhten Schwierigkeitsgrad dar (Choi & Lee, 2004; Makrides, 1996; Schmidt, 2004). Ein alternatives Expressionssystem ist das gramnegative  $\gamma$ -Proteobakterium *Halomonas elongata*. Der Organismus aus der Familie der *Halomonadaceae* zählt zu den moderat Halophilen und kann bei NaCl-Konzentrationen zwischen 1 % und 25 % NaCl im umgebenden Medium wachsen, wobei *H. elongata* ein Optimum bei ca. 3 % NaCl zeigt (Ventosa *et al.*, 1998; Vreeland *et al.*, 1980). *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> ist vollständig sequenziert, hat geringe Nährstoffansprüche und kann auch unter 37 °C in Minimalmedium eine hohe Zelldichte erreichen. Sein GC-Gehalt beläuft sich auf 63,6 %, weshalb ein hoher GC-Gehalt in fremden Genen in der Regel keine Hürde darstellt (NCBI Genome, Assembly No. GCA\_000196875.2, *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>). Abseits der Merkmale, die auch andere Expressionssysteme aufweisen, ist ein zusätzlicher Vorteil die Fähigkeit zur Produktion kompatibler Solute. Zum Schutz vor osmotischem Druck synthetisiert *H. elongata* als langfristige Stressantwort Ectoin und Hydroxyectoin (Wohlfarth *et al.*, 1990). Diese Tetrahydropyrimidine sind schon häufig untersucht worden und aufgrund ihrer protektiven Eigenschaften gegenüber Makromolekülen und ganzen Zellen von großem Nutzen für die heterologe Proteinexpression, z.B. als Faltungshelfer bzw. Chaperone (Diamant *et al.*, 2001; Lippert & Galinski, 1992; Pastor *et al.*, 2010; Street *et al.*, 2006, 2010).

Bis jetzt wurde eine Reihe heterologer Verbindungen erfolgreich in *H. elongata* produziert; darunter Enzyme, Speicherstoffe und Reporterproteine (Brünig, 2005; Dörfler, 2014; Douka *et al.*, 2001; Frillingos *et al.*, 2000; Mothes *et al.*, 2008; Prabhu *et al.*, 2004; Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2007; Schrötter, 2016). Außerdem wurde das Expressionssystem mehrfach optimiert; z.B. für eine (kontrollierte) salzinduzierte Genexpression oder den Transport heterologer Proteine in das Periplasma (Grün, 2011; Stiller *et al.*, 2018; Witt *et al.*, 2011). Bisherige Arbeiten zur Produktion von kompatiblen Soluten umfassen neben den natürlichen Substanzen Ectoin und Hydroxyectoin auch NAGGN, sowie das aus dem thermophilen *Rhodothermus marinus* stammende Mannosylglycerat (Beyert, 2018; Burdziak, 2006; Butte, 2018; Korsten, 2011; Lange, 2009; Meffert, 2011).

### 1.2.3 Heterologe Produktion von NA $\beta$ L

NA $\beta$ L wurde bisher vor allem in methanogenen Archaeen und nur einigen Bakterien nachgewiesen; eine (Über-)Produktion unter kontrollierten Bedingungen wurde lediglich in homologer Form durchgeführt (Müller *et al.*, 2011; Pflüger *et al.*, 2003; Sowers *et al.*, 1990; Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Gleichwohl wurde jedoch in der Vergangenheit das erste Enzym des Biosynthesewegs, die LAM, mehrfach mithilfe von *E. coli* heterolog produziert. Hierbei

handelte es sich hauptsächlich um Experimente zur Charakterisierung der Enzyme aus *C. subterminale* SB4, *B. subtilis* ATCC 27505 und methanogenen Archaeen (Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Hung & Lai, 2013; Lepore *et al.*, 2005; Ruzicka *et al.*, 2000; Ruzicka & Frey, 2010). Vergangene Untersuchungen mit dem Ziel der heterologen NAßL-Produktion konnten bestenfalls die Produktion der Synthese-Enzyme AbIA und AbIB aus *Ms. mazei* Gö1 verzeichnen; eine nachweisbare Produktion der Substanz gelang jedoch nicht (Hövels, 2015a, 2015b; Lohberger, 2009; Möller, 2011 ; vgl. 1.3).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Bis heute konnten etliche positive Eigenschaften von unterschiedlichsten kompatiblen Soluten nachgewiesen werden, darunter Effekte auf Lipidmembranen oder der Schutz von ganzen Zellen gegen Trocken-, Kälte-, Hitze- und osmotischen Stress (Harishchandra *et al.*, 2010; Lentzen & Schwarz, 2006; Louis *et al.*, 1994; Manzanera *et al.*, 2004). Auch der Einfluss auf Nukleinsäuren sowie auf Proteine und Enzyme sind nützliche Eigenschaften, die in diversen Anwendungen zum Einsatz kommen (Andersson *et al.*, 2000; Bersch *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2017; Iakobashvili & Lapidot, 1999; Knapp *et al.*, 1999; Kurz, 2008; Lippert & Galinski, 1992; Pollard & Wyn Jones, 1979; Schroter *et al.*, 2017). Glycinbetain (Betain) wird z.B. regelmäßig in PCR-Reaktionen als *PCR-Enhancer* eingesetzt und Trehalose dient als Molekül-Stabilisator in der Kryokonservierung und Gefriertrocknung (Henke *et al.*, 1997; Jain & Roy, 2009; Kaushik & Bhat, 2003; Rees *et al.*, 1993). Daneben lassen sich kompatible Solute in kosmetischen Produkten wie Augentropfen und Sonnenschutz wiederfinden (Bünger *et al.*, 2003; Graf *et al.*, 2008; Bitop AG). Vor allem Ectoine werden mittlerweile auch im medizinischen Bereich eingesetzt und sind ein häufiger Bestandteil in bspw. Inhalationslösungen zur unterstützenden Therapie bei Atemwegserkrankungen, wie Asthma, oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (Sydlik *et al.*, 2013; K. Unfried *et al.*, 2010; Unfried *et al.*, 2016). Im Fokus weiterer Einsatzgebiete stehen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn, und sogar ein potenzieller Einsatz gegen Lungenkarzinome (Schwarz *et al.*, 2006a, 2006b; Sheikhpour *et al.*, 2014).

NAßL wird als kompatibles Solut gegen osmotischen Stress synthetisiert (Pflüger *et al.*, 2003; Sowers *et al.*, 1990; Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Abgesehen davon sind weitere (protektive) Eigenschaften weitgehend unerforscht. Dies hängt vor allem mit der geringen Verfügbarkeit der Substanz zusammen: NAßL kann nicht käuflich erworben werden und eine ausreichende Versorgung durch natürliche Produzenten umfasst die langwierige und spezielle Anzucht der

entsprechenden Organismen, sowie eine komplexe Aufreinigung (Müller *et al.*, 2011; Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Auch die Vorstufe  $\beta$ -Lysin wird nicht kommerziell vertrieben und die Bedingungen einer natürlichen Produktion sind mit denen von NA $\beta$ L gleichzusetzen. Eine vereinfachte Produktion in bekannten Expressionssystemen würde daher einer weiterführenden Charakterisierung, sowie die Aufklärung eines möglichen Nutzens von NA $\beta$ L außerhalb dem eines Osmolyts erlauben.

In vergangenen Arbeiten stand vor allem die Produktion von NA $\beta$ L mithilfe der Enzyme aus *Ms. mazei* Gö1 im Fokus. Dafür sollten die korrelierenden Gene *abIA* und *abIB* im Gencluster oder unter der Kontrolle eines jeweils eigenen Promotors entweder in *E. coli* oder in *H. elongata* exprimiert werden (Hövels, 2015a, 2015b; Lohberger, 2009; Möller, 2011). Mehr als eine lösliche Produktion der beiden Syntheseproteine konnte jedoch in diesen Arbeiten nicht gezeigt werden; weder die Vorstufe  $\beta$ -Lysin noch das Solut NA $\beta$ L wurde hier heterolog produziert.

In der vorliegenden Arbeit stand somit erneut der Nachweis und die Produktion beider Substanzen durch eine Ganzzellbiokatalyse in *H. elongata* und *E. coli* im Mittelpunkt. Dafür wurden nicht ausschließlich die Synthesegene aus *Ms. mazei* Gö1 verwendet, sondern weitere Ursprungsorganismen für eine erfolgreiche Durchführung genutzt. Studien zur heterologen Proteinexpression wurden hierfür in verschiedenen Maßstäben ausgehend von Kleinst-Anaerobenflaschen bis hin zu Anzucht im 1 L-Fermenter durchgeführt.

Des Weiteren sollte sich diese Arbeit mit möglichen Eigenschaften von NA $\beta$ L durch Einsatz in molekularbiologischen Methoden beschäftigen. Dafür wurden die Auswirkungen von NA $\beta$ L mit denen bereits untersuchter kompatibler Solute verglichen, um mögliche Einsatzgebiete der Substanz vorhersehen zu können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Kits, Enzyme und Marker

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien, Kits, Enzyme und Marker. n.a.: nicht angegeben

| Chemikalien  | Hersteller   |
|--|--|
| Acetonitril, AcN ( $\geq 99,9\%$ )   | Merck, Darmstadt                                       |
| N-Acetyl- $\beta$ -Alanin, NA $\beta$ A (97 %)                             | Alfa Aeser [Thermo Fisher (Kandel) GmbH, Karlsruhe]    |
| N-Acetyl-Glutamin, NAG ( $\geq 99\%$ )                                     | Fluka, Buchs (Schweiz)                                 |
| N-Acetyl-Glutaminylglutamin-1-Amid, NAGGN                                  | Eigenproduktion (Amendt, 2014)                         |
| N $\epsilon$ -Acetyl- $\alpha$ -Lysin, NAA $\alpha$ L (Reinheitsgrad n.a.) | Sigma-Aldrich, Steinheim                               |
| N $\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin, NA $\beta$ L                         | Eigenproduktion (Triadó-Margarit <i>et al.</i> , 2011) |
| Acrylamid (30 %)   | Carl Roth, Karlsruhe                                   |
| Adenosintriphosphat Dinatriumsalz, ATP ( $\geq 99\%$ )                     | Sigma-Aldrich  |
| Agar-Agar, Kobe I  | Carl Roth  |
| Agarose  | Carl Roth  |
| 1-Aminoadamantan Hydrochlorid, ADAM ( $\geq 99\%$ )                        | Sigma-Aldrich  |
| Ammoniumchlorid, NH $_4$ Cl ( $\geq 99\%$ )                                | Carl Roth  |
| Ammoniumeisen(III)-Citrat (~18 % Fe)                                       | Carl Roth  |
| Ammoniumpersulfat, APS (~ 98 %)  | Bio-Rad, Hercules (USA)                                |
| Ammoniumsulfat, (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ ( $\geq 99,5\%$ )                  | Carl Roth  |
| Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (AHT)                                      | IBA, Göttingen   |
| Antibiotic Broth Medium No. 3  | Oxoid Ltd., Hampshire (England)                        |
| 1,2,4,5-Benzoltetracarboxylat Natriumsalz, BTC                             | Synthese von Hort, 2014                                |
| Borsäure, H $_3$ BO $_3$ ( $\geq 99\%$ )                                   | Fluka  |
| <i>Bovine serum albumin</i> , BSA  | Sigma-Aldrich  |
| Bromphenolblau   | Merck  |
| Calciumchlorid Dihydrat, CaCl $_2$ x 2 H $_2$ O ( $\geq 99,5\%$ )          | Merck  |
| Carbenicillin Dinatriumsalz ( $\geq 88\%$ )                                | Carl Roth  |
| Caseinpepton (NZamin)  | Carl Roth  |
| Chloroform ( $\geq 99,8\%$ )   | Merck  |
| L-Cystein ( $\geq 99\%$ )  | Carl Roth  |
| Desoxyribonukleosidtriphosphat Mix, dNTPs (10 mM)                          | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)                |
| Deuteriumoxid ( $\geq 99,9\%$ )  | Merck  |
| Dikaliumhydrogenphosphat, K $_2$ HPO $_4$ ( $\geq 99\%$ )                  | Carl Roth  |
| Dimethylsulfoxid, DMSO ( $\geq 99,5\%$ )                                   | Carl Roth / Thermo Fisher Scientific                   |
| Dithiothreitol, DTT ( $\geq 99\%$ )  | Carl Roth  |
| Ectoin (Reinheitsgrad n.a.)  | behawe Naturprodukte, Rietberg                         |
| Eisen(II)-sulfat Heptahydrat, FeSO $_4$ x 7 H $_2$ O ( $\geq 99\%$ )       | Sigma-Aldrich  |

|  |                            |
|--|----------------------------|
| Essigsäure, Eisessig (100 %)   | Merck                      |
| Ethanol (≥ 99,8 %)   | Carl Roth                  |
| Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz, EDTA (≥ 99 %)                                | Carl Roth                  |
| 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid, Fmoc (97 %)   | Sigma-Aldrich              |
| Fumarsäure Dinatriumsalz, Fumarat (≥ 99 %)   | Merck                      |
| GelRed   | Biotium, Fremont (USA)     |
| D-Glucose Monohydrat (≥ 99 %)  | VWR, Darmstadt             |
| Glycerin (≥ 99,5 %)  | Carl Roth                  |
| Glycinbetain   | Fluka                      |
| Hefeextrakt  | Carl Roth                  |
| Hydroxyectoin (≥ 95 %)   | Fluka                      |
| Isopropanol (≥ 99,8 %)   | Carl Roth                  |
| Kaliumchlorid, KCl (≥ 99,5 %)  | Carl Roth                  |
| Kaliumdihydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (≥ 99 %)                       | Carl Roth                  |
| Kaliumhydroxid, KOH (≥ 85 %)   | Carl Roth                  |
| Kupfersulfat Pentahydrat, CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O (≥ 99 %)                | Carl Roth                  |
| Laemmli Puffer für SDS-PAGE (10x)  | Serva                      |
| α-L-Lysin Monohydrochlorid (≥ 98 %)  | Sigma-Aldrich              |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat, MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (≥99 %)              | Carl Roth                  |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat, MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (≥99,5 %)            | Merck                      |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat, MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O (≥ 99 %)          | Merck                      |
| Mangan(II)-sulfat Monohydrat, MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (p. a.)               | Merck                      |
| Methanol (≥ 99,9%)   | Carl Roth                  |
| N,N'-Methylenbisacrylamid, Bisacrylamid (2 %)  | Merck                      |
| Natriumacetat Trihydrat (≥ 99,5 %)   | Sigma-Aldrich              |
| Natriumchlorid, NaCl (≥ 99,5 %)  | Carl Roth                  |
| Natriumdodecylsulfat, SDS (≥ 99 %)   | Serva                      |
| Natriumhydroxid, NaOH (≥ 99 %)   | Merck                      |
| Natriummolybdat Dihydrat, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (≥ 98 %) | Merck                      |
| Natrium-Trimethylsilylpropionat, TMSP (≥ 98 %)   | Merck                      |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)   | Carl Roth                  |
| Polyethylenglycol 8000, PEG 8000   | Sigma-Aldrich              |
| Pyridoxal 5'-Phosphat, PLP (Reinheitsgrad n.a.)  | Sigma-Aldrich              |
| Quick Coomassie Stain  | Generon, Slough, (England) |
| Salzsäure, HCl (37 %)  | Carl Roth                  |
| Schwefelsäure, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95-97 %)                                  | Merck                      |
| Taurin (≥ 99 %)  | Fluka                      |
| Tetrahydrofuran, THF (≥ 99,9 %)  | Merck                      |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED (≥ 99 %)                                       | Carl Roth                  |
| D-Trehalose Dihydrat (≥ 99 %)  | Carl Roth                  |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris (≥ 99,9 %)   | Carl Roth                  |

## Material und Methoden

|  |   |
|--|---|
| Triton X-100   | Fluka   |
| Zinksulfat Heptahydrat, ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | Fluka   |
| <b>Kits</b>  | <b>Hersteller</b>   |
| BCA Assay: Protein Quantification Kit                          | Uptima, Montluçon (Frankreich)                                |
| peqGOLD Gel Extraction Kit                                     | Peqlab, Erlangen  |
| Zyppy Plasmid Miniprep Kit                                     | Zymo Research, Irvine (USA)                                   |
| <b>Enzyme</b>  | <b>Hersteller</b>   |
| Desoxyribonuklease I, DNase I                                  | Sigma-Aldrich   |
| Lysozym  | Carl Roth   |
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/μL)                          | Thermo Fisher Scientific                                      |
| <i>Phusion</i> High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/μL)           | Thermo Fisher Scientific                                      |
| Proteinase K   | Boehringer Mannheim [Roche, Basel Schweiz]                    |
| Restriktionsendonukleasen, diverse                             | Thermo Fisher Scientific / New England BioLabs, Ipswich (USA) |
| Ribonuklease A, RNase A  | Carl Roth   |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μL)                            | biotechrabbit GmbH, Hennigsdorf                               |
| Thermosensitive Alkaline Phosphatase, FastAP (1 U/μL)          | Thermo Fisher Scientific                                      |
| T4-DNA-Ligase (5 Weiss U/μL)                                   | Thermo Fisher Scientific                                      |
| <b>Marker</b>  | <b>Hersteller</b>   |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder                                      | Thermo Fisher Scientific                                      |
| GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder                               | Thermo Fisher Scientific                                      |
| ExcelBand 3-color Broad Range Protein Marker PM2700            | SMOBIO, Hsinchu City (Taiwan, R.O.C.)                         |
| PageRuler Prestained Protein Ladder                            | Thermo Fisher Scientific                                      |
| PageRuler Unstained Protein Ladder                             | Thermo Fisher Scientific                                      |
| Prestained Precision Protein Standards, Broad Range            | Bio-Rad, Hercules, USA  |

**N<sub>ε</sub>-Acetyl-β-Lysin.** Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte N<sub>ε</sub>-Acetyl-β-Lysin (vgl. 2.5.2.2, 2.5.4.1 und 2.7.3.1) stammt aus homologen Expressionsstämmen von *C. parvum* UdG6501Lms, die von Triadó-Margarit *et al.* (2011) in Pfennig Mineralmedium (Overmann, 2001; Trüper & Pfennig, 1992) bei 3 % NaCl (*w/v*) kultiviert wurden. Für die Aufreinigung wurde Zellmaterial des Expressionsstammes mittels Blich & Dyer extrahiert (vgl. 2.7.1) und die soluthaltige wässrige Phase im Niedrigvakuum aufkonzentriert. Es folgte eine Entsalzung über eine geeignete Säule (AG11A8, 2 x 72 cm, Bio-Rad). Die Trennung von anderen möglichen Substanzen, z.B. β-Glutamat, erfolgte durch eine Kationen-Austauscher-Säule (Dowex 50 W x 8/100-200) mit Na<sup>+</sup> und der Elution durch einen pH-Gradienten (Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Verbleibendes Carbonat wurde durch Chromatographie mit einer Ionenverzögerungssäule (AG11A8, Bio-Rad) entfernt (Triadó-Margarit *et al.*, 2011).

## 2.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, so nicht anders angegeben, mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

**Tab. 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen**

| <b>Isolierung genomischer DNA</b>                             |  |
|---|--|
| Lysepuffer  | 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1,2 % Triton X-100, pH 8  |
| Lysozym-Stammlösung   | 10 % (w/v) Lysozym in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> ; -20 °C  |
| TES-Puffer  | 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8  |
| Natriumacetat-Puffer  | 3 M Na-Acetat, pH 4,8-5,2  |
| SDS-Lösung  | 10 % SDS (w/v)   |
| <b>Plasmidisolierung ohne Aufreinigungssäule (Non-Column)</b> |  |
| Puffer 1  | 50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 10 % (w/v) RNase A, 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   |
| <b>Agarosegelelektrophorese</b>                               |  |
| 1x TAE-Puffer   | 40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,6 % (v/v) Eisessig, pH 8,0   |
| 6x Ladepuffer   | 10 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 60 % (v/v) Glycerin, pH 7,6; 4 °C   |
| <b>Ligation</b>   |  |
| ATP-Lösung  | 10 mM ATP in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> ; -20 °C   |
| <b>Herstellung von kompetenten Zellen</b>                     |  |
| TSS-Puffer  | 10 % PEG 8000 (w/v), 5 % DMSO (v/v), 50 mM MgCl <sub>2</sub> in LB-Medium, pH 6,5; sterilfiltriert; 4 °C   |
| <b>Proteinextraktion aus ganzen Zellen</b>                    |  |
| Resuspensionspuffer   | 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8  |
| Lysozym-Stammlösung   | 10 % (w/v) Lysozym in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> ; -20 °C  |
| SDS-Lösung  | 10 % SDS (w/v) bzw. 1 % SDS (w/v)  |
| DNase I-Stammlösung   | 1 % DNase I (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> ; -20 °C   |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung                                     | 50 mM MgCl <sub>2</sub>  |
| <b>Proteinextraktion aus B&amp;D-Ansätzen</b>                 |  |
| Natronlauge   | 0,1 M NaOH   |
| <b>SDS-PAGE</b>   |  |
| Acrylamid-Mix   | 32,7 mL Acrylamid (30 %), 10 mL Bisacrylamid (2 %), H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub> ad 50 mL; 4 °C   |
| APS-Lösung  | 10 % APS (w/v), 4 °C   |
| Sammelgelpuffer   | 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8   |
| Trenngelpuffer  | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8   |
| 1x Laufpuffer   | 10x Laemmli-Puffer (Serva), 1:10 in H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>  |
| Ladepuffer (4x RSB)   | 4,5 mL Sammelgelpuffer, 5 mL Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 3,86 % (w/v) DTT, Spatelspitze Bromphenolblau, H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> ad 10 mL; -20 °C |

| <b>Solutextraktion</b>                           |  |
|--|--|
| Bligh & Dyer-Lösung                              | Methanol/Chloroform/H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> (10:5:4; v/v)       |
| <b>FMOC-ADAM-HPLC</b>                            |  |
| Boratpuffer                                      | 0,5 M Borsäure in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> , pH 7,7 (NaOH)       |
| FMOC-Reagenz                                     | 1 mM FMOC in Aceton  |
| ADAM-Reagenz                                     | 40 mM ADAM in Boratpuffer, 1:1 verdünnt mit Aceton                         |
| Natriumacetat-Lösung                             | 50 mM Natriumacetat in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>                  |
| Essigsäure-Lösung                                | 0,3 % Essigsäure (v/v) in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>               |
| Acetat-Puffer                                    | Essigsäure-Lösung titriert auf pH 4,2 mit Natriumacetat-Lösung             |
| Laufmittel A                                     | 80 % Acetat-Puffer (v/v), 20 % Acetonitril (v/v), 0,5 % THF (v/v)          |
| Laufmittel B                                     | 20 % Acetat-Puffer (v/v), 80 % Acetonitril (v/v)                           |
| <b>Isokratische HPLC</b>                         |  |
| Laufmittel (NH <sub>2</sub> )                    | 80 % Acetonitril (v/v) in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>               |
| Laufmittel (Aminex)                              | 10 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> |
| <b><sup>1</sup>H-NMR bzw. <sup>13</sup>C-NMR</b> |  |
| Lösungsmittel für <sup>1</sup> H-NMR             | 10 mM BTC in Deuteriumoxid; 4 °C   |
| Lösungsmittel für <sup>13</sup> C-NMR            | Deuteriumoxid mit 5 mg/mL Na-TMSP; 4 °C                                    |

## 2.3 Software

- **BPROM** (*prediction of bacterial promoters*), Softberry (Solovyev & Salamov, 2011), <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfin> db, Stand: 27.03.2020
- **ChemDraw**, Professional 18.0.0.231, PerkinElmer, Waltham (USA)
- **ChromQuest**, Version 5.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
- **Codon Usage Database** (Nakamura, 2000), <http://www.kazusa.or.jp/codon/>, Stand: 27.03.2020
- **graphical codon usage analyser**, (Fuhrmann *et al.*, 2004), <http://gcu.schoedl.de/index.html>, Stand: 27.03.2020
- **Interpro** (Mitchell *et al.*, 2019), EMBL-EBI, <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, Stand: 27.03.2020,
- **IPC, isoelectric point calculator** (Kozlowski, 2016), <http://isoelectric.org>, Stand: 28.01.2020
- **KEGG** (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), <http://www.genome.jp/kegg/>, Stand: 12.01.2020
- **Mendeley Desktop**, Version 1.19.3, Mendeley Ltd., Amsterdam (Niederlande)
- **MestReNova**, Version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostela (Spanien)

- **MultAlin** (Corpet, 1988), <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, Stand: 27.03.2020
- **NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Stand: 27.03.2020
- **NCBI BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*), <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Stand: 27.03.2020
- **Pfam**, Version 32.0, EMBL-EBI, Hinxton, UK, <http://pfam.xfam.org/>, Stand 27.03.2020
- **Promega Restriction Enzyme Tool**, Promega, <https://www.promega.de/resources/tools/retool/>, Stand: 27.03.2020
- **Prosite** (de Castro *et al.*, 2006), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Genf (Schweiz), <https://prosite.expasy.org/prosite.html>, Stand: 27.03.2020
- **ProtParam tool** (Gasteiger *et al.*, 2005), ExPASy, <https://web.expasy.org/protparam/>, Stand: 27.03.2020
- **RBS Calculator**, Version 2.0 (Espah Borujeni *et al.*, 2014; Salis *et al.*, 2009), <https://salislab.net/software/>, Stand: 12.01.2020
- **SnapGene Viewer**, Version 4.2.11, GSL Biotech, Chicago (USA)
- **SnapGene**, Version 4.1.9, GSL Biotech, Chicago (USA)  
Stand: 18.09.17
- **Translate tool**, ExPASy, <https://web.expasy.org/translate/>, Stand: 27.03.2020
- **Uniprot**, <https://www.uniprot.org/>, Stand: 27.03.2020

## 2.4 Mikrobiologische Methoden

### 2.4.1 Mikroorganismen und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Vektoren sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

**Tab. 2.3: Mikroorganismen und Vektoren**

| Organismus                           | Genotyp   | Referenz                     |
|--------------------------------------|---|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ | F <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, <i>thi-1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, , <i>deoR</i> | (Hanahan, 1983)              |
| <i>E. coli</i> S17.1                 | RP4-2 (Tc::Mu)(Km::Tn7), <i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR</i> , Sm <sup>R</sup>  | (Simon <i>et al.</i> , 1983) |
| <i>E. coli</i> Rosetta™ (DE3)        | F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda$ (DE3), pRARE, Cm <sup>R</sup>  | Novagen, Madison (USA)       |
| <i>E. coli</i> MG1655 (DSM 18039)    | K12, F <sup>-</sup> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>ilvG</i> <sup>-</sup> , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>  | (Guyer <i>et al.</i> , 1981) |

## Material und Methoden

| <i>E. coli</i> BL21                                  | F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i>   | (Studier & Moffatt, 1986)                    |
|--|---|--|
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) $\Delta$ <i>iscR</i>       | F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> , <i>met</i> (DE3), $\Delta$ <i>iscR</i>   | (Akhtar & Jones, 2008)                       |
| <i>E. coli</i> BKA-13                                | $\Delta$ ( <i>putPA</i> )101, $\Delta$ ( <i>proP</i> )2, $\Delta$ ( <i>proU</i> )608, <i>betTIBA</i> , <i>Spc<sup>R</sup></i> , $\Delta$ <i>otsB</i>  | (Burdziak, 2006)                             |
| <i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup>      | Wildtyp   | (Vreeland <i>et al.</i> , 1980)              |
| <i>H. elongata</i> WUB02                             | Derivat von <i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup> ; $\Delta$ <i>ectA</i> , $\Delta$ <i>ectC</i>  | (Witt, 2011)                                 |
| <i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup>         | Wildtyp   | (Nakamura <i>et al.</i> , 1999)              |
| <i>Clostridium pasteurianum</i> DSM 525 <sup>T</sup> | Wildtyp   | Winogradsky, 1895                            |
| Vektor   | Eigenschaften   | Referenz                                     |
| pBBR1-MCS  | <i>mob</i> , <i>rep</i> , Cm <sup>R</sup>   | (Kovach <i>et al.</i> , 1994)                |
| pPromEct (pPE)                                       | pBBR1-MCS Derivat mit der Promotorregion des Ectoin-Genclusters ( <i>promA</i> ) aus <i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup>   | (Brünig, 2005; Stiller <i>et al.</i> , 2018) |
| pPE_yodPkamA   | Derivat von pPE, welches die Sequenzen der Gene <i>yodP</i> und <i>kamA</i> aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> trägt; diesen voran ist jeweils eine synth. RBS gestellt   | Diese Arbeit                                 |
| pPE_kamA_specRBS                                     | Derivat von pPE, welches die Sequenz des Gens <i>kamA</i> aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> mit einem veränderten Startcodon (ATG) trägt; diesem voran ist eine synth. RBS gestellt  | Diese Arbeit                                 |
| pPE_kamA_specRBS_yodP                                | Derivat von pPE, welches die Sequenzen der Gene <i>kamA</i> (mit verändertem Startcodon ATG) und <i>yodP</i> aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> trägt; diesen voran ist jeweils eine synth. RBS gestellt  | Diese Arbeit                                 |
| pASK-IBA3  | <i>tet</i> -Promoter, Tet-Repressor, Strep-Tag, Amp <sup>R</sup>  | IBA (Göttingen)                              |
| pASK_yodPkamA  | Derivat von pASK-IBA3, welches die Sequenzen der Gene <i>yodP</i> und <i>kamA</i> aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> trägt; diesen voran ist jeweils eine synth. RBS gestellt   | Diese Arbeit                                 |
| pASK_kamA_specRBS                                    | Derivat von pASK-IBA3, welches die Sequenz des Gens <i>kamA</i> aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> mit einem geänderten Startcodon trägt; diesem voran ist eine synth. RBS gestellt   | Diese Arbeit                                 |
| pASK_kamA_CpRBS                                      | Derivat von pASK-IBA3, welches die Sequenz des Gens <i>kamA</i> aus <i>C. pasteurianum</i> DSM 525 <sup>T</sup> trägt; diesem voran ist eine synth. RBS gestellt  | Diese Arbeit                                 |
| pASK_kamA-yodP-fwd, bzw. pASK_kamA-yodP-rev          | Derivat von pASK-IBA3, welches die Sequenzen der Gene <i>kamA</i> aus <i>C. pasteurianum</i> DSM 525 <sup>T</sup> und <i>yodP</i> aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> trägt; diesen voran ist jeweils eine synth. RBS, sowie jeweils ein <i>tet</i> -Promoter gestellt | Diese Arbeit                                 |

|                    |  |                   |
|--------------------|--|-------------------|
| pASK_yodP-ablA     | Derivat von pASK-IBA3, welches die Sequenzen der Gene <i>yodP</i> aus <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> und <i>ablA</i> aus <i>Ms. mazei</i> Gö1 trägt; diesen voran ist jeweils eine synth. RBS, sowie jeweils ein <i>tet</i> -Promoter gestellt | (Georgiev, 2017a) |
| pASK_Dmc_RBS_ablAB | Derivat von pASK-IBA3, welches die Sequenz des Gens <i>ablAB</i> aus <i>D. mccartyi</i> CBDB1 trägt; diesem voran ist eine synth. RBS gestellt   | Diese Arbeit      |

## 2.4.2 Nährmedien

Alle Medien wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Im Folgenden sind die für diese Arbeit genutzten Anzuchtmedien aufgelistet. Die Salzkonzentration ist hier und in weiteren Kapiteln nach der Medienbezeichnung als Zahl angehängt (z.B. steht MM63-0,5 für MM63-Medium mit 0,5 % NaCl w/v). Für MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, sowie CaCl<sub>2</sub> wurden Stammlösungen hergestellt (250 mg/mL, bzw. 1,1 mg/mL und 0,5 mg/mL) und entsprechend eingesetzt. Zur Verwendung jeglicher Medien als festes Nährmedium (Agarplatten) wurden bei der Herstellung 2 % (w/v) Agar hinzugegeben und mitautoklaviert.

<sup>1)</sup> Diese Zusätze wurden jeweils separat autoklaviert und im Anschluss steril zum Medium hinzugegeben.

**Tab. 2.4: MM63-Medium nach Miller (Larsen *et al.*, 1987)**

| Komponente                                      | L <sup>-1</sup> |
|---|-----------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 13,61 g         |
| KOH   | 4,21 g          |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1,98 g          |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O          | 0,25 g          |
| FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O          | 0,0011 g        |
| NaCl  | variabel        |
| <sup>1)</sup> Glucose x H <sub>2</sub> O        | 5 g             |
| pH 7,1  |                 |

**Tab. 2.5: Zusammensetzung AB-Medium (Antibiotic Broth Medium No. 3) und LB-Medium (*lysogeny broth*, mod. nach Bertani, 1951).** AB-Medium enthält in seiner ursprünglichen Zusammensetzung bereits 3,5 g/L NaCl, was bei der Herstellung mit spezifischen NaCl-Konzentrationen berücksichtigt wurde.

| AB-Medium | L <sup>-1</sup> | LB-Medium   | L <sup>-1</sup> |
|-----------|-----------------|-------------|-----------------|
| AB-Medium | 17,5 g          | NZamin      | 10 g            |
| NaCl      | variabel        | Hefeextrakt | 5 g             |
|           |                 | NaCl        | 5 g             |
| pH 7,2    |                 | pH 7,2      |                 |



**Tab. 2.6: Zusammensetzung Terrific Broth-Medium (Tartof & Hobbs, 1987)**

| <b>Komponente</b>               | <b>L<sup>-1</sup></b> |
|---------------------------------|-----------------------|
| Trypton                         | 12 g                  |
| Hefeextrakt                     | 24 g                  |
| Glycerin                        | 4 mL                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2,31 g                |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 12,45 g               |
| pH 7,2 - 7,4                    |                       |

**Tab. 2.7: Glucose-Glycerin-Fumarat-Medium (GGF) nach Spencer & Guest, 1973)**

| <b>Komponente</b>                               | <b>L<sup>-1</sup></b> |
|---|-----------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 5,44 g                |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 10,49 g               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2 g                   |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O          | 0,05 g                |
| FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O           | 0,125 mg              |
| MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O          | 0,0038 g              |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0,5 mg                |
| NaCl  | 5 g                   |
| <sup>1)</sup> Glucose x H <sub>2</sub> O        | 10 mM                 |
| <sup>1)</sup> Glycerin                          | 40 mM                 |
| <sup>1)</sup> Fumarat                           | 50 mM                 |
| pH 7,1 (KOH)                                    |                       |

**Tab. 2.8: Fed-Batch-Medium (GGF-Medium mod. nach Kuchenreuther *et al.*, 2010)**

| <b>Komponente</b>                               | <b>L<sup>-1</sup></b> |
|---|-----------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 5,44 g                |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 10,49 g               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2 g                   |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O          | 0,05 g                |
| MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O          | 0,0038 g              |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0,5 mg                |
| NaCl  | 5 g                   |
| NZamin  | 0,5 g                 |
| <sup>1)</sup> Ammoniumeisen(III)-Citrat         | 2 mM                  |
| <sup>1)</sup> Glycerin                          | 40 mM                 |
| pH 7,1 (KOH)                                    |                       |

### 2.4.3 Medienzusätze

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Medienzusätze sterilfiltriert. Die Lagerung von Antibiotika und des Induktors Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (AHT) erfolgte bei -20 °C, alle weiteren Zusätze wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

**Antibiotika.** Alle für den Plasmid-Erhalt (= Selektionsdruck) und den Schutz vor Kontamination genutzten Antibiotika wurden in einer 1000x konzentrierten Stammlösung angesetzt. Bei der Kultivierung von *E. coli*-Expressionskulturen mit pASK-Vektoren wurde das Antibiotikum Carbenicillin (Endkonz. 100 µg/mL in H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub>) genutzt. Bei der Kultivierung von *H. elongata*-Expressionskulturen mit pPE-Vektoren wurde das Antibiotikum Chloramphenicol (Endkonz. 50 µg/mL in 100 % Ethanol) verwendet. Die Zugabe erfolgte jeweils entweder vor der Inokulation der Flüssigkultur oder unmittelbar vor dem Gießen von Agarplatten.

**Substrat.** Für die Produktion des Zwischenprodukts β-L-Lysin und des Endprodukts NAßL wurde als Ausgangsstoff α-L-Lysin (vgl. Tab. 2.1) aus einer 1 M Stammlösung für eine Endkonzentration von 4 mM zu den Expressionskultur hinzugegeben.

**Induktoren.** In *E. coli*-Expressionsstämmen mit pASK-Vektoren erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe einer AHT-Stammlösung (2 mg/mL in 100 % Ethanol) mit einer Endkonzentration von 0,2 µg/mL. Dabei wurde diese Konzentration auf das Doppelte erhöht, wenn auf den jeweiligen Vektoren 2 (*tet*-)Promotoren kodiert waren (vgl. Tab. 2.3).

In *H. elongata*-Expressionsstämmen mit pPE-Vektoren wurde zur Induktion NaCl als Feststoff bis zu einer bestimmten Konzentration (*w/v*) in die Kultur gegeben (im Folgenden auch als „Salzchock“ bezeichnet).

**Vitaminlösung.** Für die Kultivierung von Thiamin-auxotrophen *E. coli* DH5α-Stämmen wurde dem Anzuchtmedium stets 1 mL Vitaminlösung (VA-Lösung, vgl. Tab. 2.9) pro L Medium hinzugegeben.

**Tab. 2.9: Zusammensetzung der VA-Lösung (Imhoff & Trüper, 1977).**

| VA-Lösung              | L <sup>-1</sup> |
|------------------------|-----------------|
| Biotin                 | 100 mg          |
| Nicotinamid            | 350 mg          |
| Thiamin Hydrochlorid   | 300 mg          |
| p-Aminobenzoessäure    | 200 mg          |
| Pyridoxal Hydrochlorid | 100 mg          |
| Calcium-Panthenat      | 100 mg          |
| Cyanocobalamin         | 50 mg           |

#### 2.4.4 Stammerhaltung

Für die kurzfristige Lagerung wurden alle verwendeten Stämme auf jeweils entsprechenden Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt. Für die langfristige Lagerung wurden für jeden Stamm Kryokulturen bei -70 °C angelegt.

#### 2.4.5 Vorkulturen

Zur Inokulation von Expressionskulturen wurden am Vortag Übernachtskulturen angelegt. Für diese wurden 20 - 40 mL des gleichen Mediums verwendet, das später in den entsprechenden Expressionskulturen zum Einsatz kam. Die Übernachtskulturen wurden bei Bedarf außerdem mit Antibiotikum, sowie im Falle von *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stämmen mit VA-Lösung versetzt. Die Inokulation der Kulturen erfolgte mit Zellmaterial von der jeweiligen Agarplatte.

#### 2.4.6 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern

Die Verfolgung des Wachstums von Haupt-, bzw. Expressionskulturen erfolgte durch die photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm (OD<sub>600</sub>). Hierfür wurde in regelmäßigen Zeitabständen die OD<sub>600</sub> durch die Nutzung von OD-Kolben (vgl. 2.4.7), bzw. von 1 mL-Kunststoffküvetten mit einem Photometer bestimmt (Novaspec II, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Als Leerwert wurde das jeweilige Medium genutzt. Eine lineare Beziehung zwischen der OD<sub>600</sub> und der Zelldichte war im Falle von OD-Kolben bis zu einem Wert von ca. 0,5 gegeben. Bei der Nutzung von Küvetten wurde die Kultur ab einer OD<sub>600</sub> von 0,4 mit dem entsprechenden sterilen Medium verdünnt. Die Wachstumsrate  $\mu$  entspricht der Steigung der logarithmisch aufgetragenen OD<sub>600</sub>-Werte in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Verdopplungszeit  $t_d$  ergibt sich aus  $\ln(2) / \mu$ .

#### 2.4.7 Standardbedingungen

Die Anzucht unter Standardbedingungen erfolgte in sogenannten OD-Kolben. Dabei handelt es sich um Weithals-Schikane-Erlenmeyerkolben mit einem seitlich angebrachten Glasrohr, welches die Bestimmung der OD<sub>600</sub> der Kultur ohne eine Probenentnahme ermöglicht. Gegenüber des Glasrohres befindet sich zudem eine Schraubdeckel-Öffnung, die für die Zugabe von Medienzusätzen oder eine Probenentnahme genutzt werden kann. Die OD-Kolben wurden mit Silikon-Schaumstoffkappen verschlossen (Merck, Darmstadt), die für eine ausreichende O<sub>2</sub>-Versorgung sorgen.

Für Expressionsversuche wurden Hauptkulturen in 250 mL-OD-Kolben mit einem Kulturvolumen von 50 - 100 mL angelegt. Diese wurden mit der entsprechenden Vorkultur (vgl.

2.4.5) im Falle von *E. coli* auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 und im Falle von *H. elongata* auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 inokuliert. Das Wachstum erfolgte aerob bei 37 °C und 180 rpm (*E. coli*-Stämme), bzw. bei 30 °C und 150 rpm (*H. elongata*-Stämme) bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4. Im Anschluss erfolgte die Induktion der Genexpression (vgl. 2.4.3) und die Anzucht wurde fortgesetzt.

Die Ernte dieser Expressionskulturen erfolgte in sterilen 50 mL-Falcon-Röhrchen bei 8500 rpm für 15 Min bei RT (Avanti J-20 XP, Rotor JA-10, Beckman Coulter).

#### **2.4.8 Semi-anaerobe Anzucht von Flüssigkulturen**

Für die Produktion von sauerstoffsensitiven Proteinen in *E. coli* erfolgte die Anzucht in Anlehnung an Kuchenreuther *et al.* (2010). Dafür wurden die jeweiligen Expressionsstämme bis zur Induktion analog zu Kapitel 2.4.7 aerob kultiviert. Nach der Induktion und der Zugabe des Substrats  $\alpha$ -L-Lysin wurde die Kultur unter sterilen Bedingungen in eine dem Volumen angepasste Anaerobenflasche überführt. In diese vorgelegt war bereits die benötigte Menge NaCl für eine Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 3 % (w/v). Das Anzuchtgefäß wurde luftdicht verschlossen, sodass der Restsauerstoff von *E. coli* selbst verbraucht wurde und ein anaerobes Milieu entstand. Nach kurzem Durchmischen aller Komponenten durch mehrfaches Invertieren erfolgte die weitere Kultivierung stehend bei 30 °C. In einigen Experimenten wurde nicht die *gesamte* Kultur, sondern lediglich die Hälfte in Anaerobenflaschen überführt. Dafür wurden ein Kulturvolumen von 100 mL genutzt, wobei der in den OD-Kolben verbleibende Teil weiter unter Standardbedingungen angezogen und das Wachstum verfolgt wurde.

Im Falle der semi-anaeroben Anzucht von Flüssigkulturen mit Fed-Batch-Medium (vgl. Tab. 2.8) wurde ähnlich wie oben beschrieben vorgegangen. Im Zuge der Induktion wurde neben dem Substrat  $\alpha$ -L-Lysin jedoch außerdem L-Cystein (2 mM Endkonz.) in die Kultur gegeben. In den genutzten Anaerobenflaschen war zusätzlich zu NaCl außerdem Fumarat als Feststoff (50 mM Endkonz.) vorgelegt. Die Ernte aller semi-anaeroben Kulturen erfolgte analog zu den Standardbedingungen.

#### **2.4.9 Anzucht im Fermenter**

Für die Anzucht von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA zur Produktion von NA $\beta$ L in größerem Maßstab und unter kontrollierten Bedingungen wurden 1 L-Fermenter mit Temperatursteuerung und Rührvorrichtung genutzt (DASGIP, Jülich). Diese wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> befüllt nach Herstellerangaben autoklaviert. Die pH- und pO<sub>2</sub>-Sonden (Mettler Toledo, Gießen) wurden für 30 Min in 100 % Ethanol inkubiert und im Fermenter angebracht. Für die Fermentation wurden 800 mL Medium in den Fermenter überführt und mit der entsprechenden Menge Antibiotikum und VA-Lösung versetzt. Der so vorbereitete Fermenter wurde mit einer

Heizmanschette auf 37 °C temperiert und der Inhalt durch einen Magnetrührer bei 250 rpm durchmischt. Über einen Kompressor (DK50 Plus, Ekom, Ahrensburg) wurde die sterile Zuluft eingebracht. Nachdem das Fermentermedium die Zieltemperatur von 37 °C erreicht hatte, wurde dieses durch eine entsprechende Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert. Dafür wurde die benötigte Menge an Vorkultur berechnet und die Zellen steril abzentrifugiert, die Zellmasse in 2,5 mL sterilem Fermentermedium resuspendiert und eingesetzt. Der pH-Wert wurde im Laufe der Fermentation mittels pH-Sonde kontrolliert und automatisch mit 4 M, bzw. 5 M NaOH über Regelkreis-regulierte Peristaltikpumpen auf 6,6 - 7,2 eingestellt (vgl. 3.4.2.5). Das Wachstum wurde durch Messen der OD<sub>600</sub> beobachtet, wobei 1 mL-Proben durch das im Fermenter integrierte Probenrohr entnommen wurden. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 durch die Zugabe von AHT (0,4 µg/mL Endkonz.). Zeitgleich mit der Induktion erfolgte außerdem die Zugabe von weiteren Substanzen:

Batch-Fermentation:                    α-L-Lysin (4 mM), NaCl (auf 3 % w/v)

Fed-Batch-Fermentation:            α-L-Lysin (4 mM), NaCl (auf 3 % w/v), L-Cystein (2 mM),  
Fumarat (50 mM)

Im Anschluss wurde die Temperatur auf 30 °C gesenkt und die Rührgeschwindigkeit auf 100 rpm verringert. Im Falle der Fed-Batch-Fermentation wurden im Verlauf der Anzucht jeweils 25 mM Glycerin und Fumarat in die Fermenterkultur gegeben. Für die spätere Analyse der Zellen und des Kulturüberstandes mittels HPLC wurden 10 mL-Proben entnommen, die Zellen steril abzentrifugiert (2800 x g, 20 Min, RT; Heraeus Megafuge 1.0, Rotor BS4402, Thermo Scientific) und diese, sowie ein Teil des Überstandes bei -20 °C gelagert.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA

#### 2.5.1.1 Isolierung von DNA

**Genomische DNA.** Für die spätere Nutzung als Matrize in der Polymerase-Kettenreaktion wurde die genomische DNA (gDNA) aus den grampositiven Bakterien *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> und *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> isoliert. Dafür wurden aus einer Übernacht-Kultur des jeweiligen Organismus 2 mL pro Ansatz geerntet (5500 x g, 2 Min, RT) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 160 µL Lysepuffer + 40 µL Lysozymstammlsg. resuspendiert und bei 37 °C

für 30 Min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe einer Spatelspitze RNaseA und eine weitere Inkubation bei 65 °C für 5 Min. Anschließend wurden 40 µL 10 % SDS, eine Spatelspitze Proteinase K und 550 µL TES-Puffer hinzugegeben. Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei 60 °C für ca. 1 ½ h inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden dem Ansatz 300 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben, dieser auf dem Vortexer gemischt und zentrifugiert (13.600 x g, 10 Min, RT). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese beiden Schritte wurden solange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war (3 - 5x). Die "letzte" wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieser dann 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetat-Puffer, sowie 1 Volumen an eiskaltem Isopropanol zugesetzt. Nach Durchmischen wurde der Ansatz bei -20 °C für mindestens 30 Min inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (13.600 x g, 5 Min, RT); der Überstand wurde verworfen. Das erhaltene Pellet wurde mit 500 µL eiskaltem 70 % Ethanol (EtOH) gewaschen (13.600 x g, 5 Min, RT) und der Überstand quantitativ entfernt. Das gDNA-Pellet wurde in einem Trockenschrank (Heraeus Instruments T6060) bei 60 °C für 20 - 30 Min getrocknet und anschließend in ca. 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> aufgenommen.

**Plasmid-DNA.** Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden zwei verschiedene Herangehensweisen genutzt. Vektoren aus *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>, sowie solche, die in niedriger Kopienanzahl in Zellen vorkommen (*low copy plasmids*, z.B. Vektoren auf Basis von pBBR1-MCS), wurde i.d.R. mithilfe des Zippy Plasmid Miniprep Kits gemäß Herstellerangaben isoliert.

Vektoren aus *E. coli*-Stämmen, bzw. solche, die in hoher Kopienanzahl in der Zelle vorliegen (*high copy*, z.B. Vektoren auf Basis von pASK-IBA3), wurden i.d.R. mittels *Non-Column*-Plasmidpräparation (vgl. Tab. 2.2) isoliert. Für die Plasmidpräparation basierend auf alkalischer Lyse wurden 1,5 – 5 mL einer Übernacht-Kultur abzentrifugiert (13.600 x g, 1 Min, RT) und der Überstand verworfen. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µL Puffer 1 und das Pellet wurde durch Vortexen resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µL Puffer 2 wurde der Ansatz durch Invertieren vorsichtig gemischt und zügig 200 µL Puffer 3 dazugegeben, gefolgt von erneutem invertieren. Die Probe wurden zentrifugiert (13.600 x g, 3 Min, RT), der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß mit bereits vorgelegten 500 µL Chloroform gegeben und der Ansatz kräftig geschüttelt. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, die obere wässrige Phase des Überstands vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß mit bereits vorgelegten 500 µL Isopropanol überführt. Die Probe wurde erneut kräftig vermischt und wiederholt zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die gefällte DNA mit 500 µL eiskaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen. Nach kurzem Abzentrifugieren der DNA wurde diese

bei 60 °C im Trockenschrank für 20 - 30 Min getrocknet und dann in 30 - 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 2.5.1.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und Restriktionsverdauen

Zur Aufreinigung von z.B. PCR-Produkten aus Agarosegelen oder von enzymatisch modifizierter DNA zur späteren Ligation wurde das peqGOLD Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben genutzt.

### 2.5.1.3 DNA-Quantifizierung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration nach bspw. einer PCR oder einem Restriktionsverdau wurde die DNA aufgereinigt und anschließend mittels Nanodrop-BioSpectrometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Der Reinheitsgrad wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm, bzw. 280 nm parallel vom Gerät bestimmt. Mithilfe der DNA-Konzentration in ng/µL konnte für nachfolgende Ligationen die molare Konzentration in mol/µL nach Formel 1 berechnet werden:

Formel 1: Berechnung der molaren DNA-Konzentration

$$\frac{DNA \text{ ng}/\mu L \times 10^{-9}}{660 \text{ g/mol} \times DNA \text{ Fragmentgröße [bp]}} = DNA \text{ mol}/\mu L$$

## **2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist ein von Mullis *et al.* (1986) entwickeltes Verfahren zur *in vitro*-Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Die Methode ist seit vielen Jahren eine Standardtechnik und die Funktionsweise und Durchführung wurden in der Vergangenheit ausgiebig erörtert (Caetano-Anollés, 2013; Joshi & Deshpande, 2011; Stephenson, 2010).

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) wurden anhand der DNA-Sequenz manuell erstellt und über Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen; eine Lagerung erfolgte in H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> resuspendiert bei -20 °C. Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen, die in späteren Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurde entweder die *Phusion* High-Fidelity DNA-Polymerase oder die *Pfu* DNA-Polymerase von Thermo Scientific genutzt. Für Kontroll-Reaktionen, sowie zur Untersuchung von möglichen Einflüssen durch Solute oder andere Supplemente wurde die *Taq* DNA-Polymerase der biotechrabbit GmbH verwendet. Die

Reaktionen wurden gemäß Herstellerangaben in 200 µL-Reaktionsgefäßen angesetzt und in einem Thermocycler (MyCycler, Bio-Rad) eingesetzt.

Die PCR-Programme dieser Arbeit richteten sich nach den Herstellerangaben, wobei wenn nötig ein Vorzyklus vor dem eigentlich Hauptzyklus der Reaktion gesetzt wurde. Dieser umfasste die drei regulären Schritte (Denaturierung, Primer-Hybridisierung, Elongation), wurde allerdings nur 2 - 3 mal wiederholt. Dieser Vorzyklus war dann genutzt, wenn Primer im zur DNA-Sequenz komplementären Teil eine andere Hybridisierungstemperatur als in der gesamten Länge vorwies (wie z.B. solche mit inkludierter synthetischer Ribosomenbindestelle, vgl. 2.10, sowie Tab. 2.12).

### 2.5.2.1 Primer und synthetische Ribosomenbindestellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.10 zusammengefasst. In den entworfenen Expressionsvektoren sind die darauf vorliegenden Gene mit einer stromaufwärts liegenden synthetischen (synth.) Ribosomenbindestelle (RBS) ausgestattet. Diese RBS wurden *in silico* mithilfe des „RBS Calculators“ (Espah Borujeni *et al.*, 2014; Salis *et al.*, 2009) entworfen und sorgen für eine erhöhte Effizienz der Translationsinitiation (= Ti-Rate) unter Berücksichtigung der stromabwärts liegenden Gensequenz und des Wirtsorganismus. Die erfolgreichen Auswirkungen dieser synth. RBS wurden in der Vergangenheit bereits beschrieben (Dörfler, 2014; Stiller *et al.*, 2018).

**Tab. 2.10: Verwendete Primer.** Schnittstellen von Restriktionsenzymen sind fett dargestellt, synthetische RBS für den Einsatz in einem Expressionsvektor sind unterstrichen. RE: Restriktionsenzym.  
<sup>1)</sup>Die unterstrichene Sequenz stellt nur einen Teil der synth. RBS dar, die bereits in der DNA-Matrize zu finden ist.

| Name              | Sequenz (5' – 3')  | RE      |
|-------------------|--|---------|
| for_yodP_Bs       | ATTGGATCC <u>CTCGCCCCAGGAGGAATATAAGGAGGTTTAAA</u><br>ATGCTCAAGTCAATAAAGAGT                   | BamHI   |
| rev_yodP_Bs_SOE   | ATACCATTTGTTTTCAAGACTGACCTCCTTATATTTCGATGAGCGAATGT<br>CGCGCATATTTTGATTACAGTTGCTTGACCA        | -       |
| for_kamA_Bs_SOE   | TGGTGCAAGCAACTGTAATCAAAATATGCGCG<br><u>ACATTGCTCATCGAATATAAGGAGGTCAGTCTTGAAAAACAAATGGTAT</u> | -       |
| rev_kamA_Bs       | AAGCGT <b>CGACT</b> CATGAAGAATCCCCTCCGC  | Sall    |
| RBS_ablAB_BamHI   | ATTGGATCC <u>CCACAACATTACATAATTCGAGGAGAATAATC</u><br>ATGGTTTTAGCCGATACAA                     | BamHI   |
| ablAB_rev_HindIII | ATTA <b>AGCTT</b> CCGCTCTGCTATATGATACT   | HindIII |
| for_kamA_specRBS  | ATTGGATCC <u>GAACCCCCGGATAAGATAAGGAGGTAAGTTATGAAAAACA</u><br>AATGG                           | BamHI   |
| for_yodPRBS       | ATT <b>GTCGAC</b> <u>CTCGCCCCAGGAGGAATATA</u> <sup>1)</sup>                                  | Sall    |
| rev_yodPRBS       | TTAG <b>GGCC</b> CTTACAGTTGCTTGACCAAAA   | Apal    |
| for_kamA_CpRBS    | ATTGGATCC <u>TAAGTACGAATATAACGAGATAAGGAGGGAGCAAATGGTG</u><br>AAGAGTAGAAGATA                  | BamHI   |
| rev_kamA_Cp       | CTA <b>GTCGACTT</b> TATACATTTTTAGACTTAT  | Sall    |



Die Sequenzen der synth. RBS wurden in die 5'-Primer zur Amplifikation von Gensequenzen einbezogen und mittels PCR in das entsprechende Amplifikat eingebracht.

### 2.5.2.2 PCR mit Supplementen

Um zu untersuchen, ob NAßL Auswirkungen auf die Methode der PCR hat, wurde das kompatible Solut, sowie andere Testsubstanzen zu den jeweiligen Reaktionsansatz dazugegeben.

**Tab. 2.11: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit Solutzugabe.** <sup>1)</sup>Bei den Kontrollreaktionen ohne Supplement, ohne Supplement/Plasmid und ohne Supplement/Polymerase wurden die jeweiligen Bestandteile durch die Volumendifferenz an H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> ersetzt.

| Komponenten                        | Volumen [µL] |
|------------------------------------|--------------|
| 10x Reaktionspuffer                | 2            |
| MgCl <sub>2</sub>                  | 0,6          |
| dNTP-Mix (2 mM)                    | 2            |
| forward-Primer (10 pmol/µL)        | 1            |
| reverse-Primer (10 pmol/µL)        | 1            |
| DNA-Matrize <sup>1)</sup>          | 1            |
| Supplement <sup>1)</sup>           | 500 µM       |
| H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> | ad 20 µL     |
| Taq DNA-Polymerase <sup>1)</sup>   | 0,25         |

Der Reaktionsansatz wurde ausgehend von den Herstellerangaben an die benötigten Zwecke angepasst (vgl. Tab. 2.11).

**Tab. 2.12: PCR-Programme zur Amplifikation mit Supplementen.**

| PCR-Schritt              | Temperatur [°C] |             | Zeit [Sek]  |             |
|--------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
|                          | <i>ectB</i>     | <i>adh2</i> | <i>ectB</i> | <i>adh2</i> |
| 1. Initialdenaturierung  | 95              |             | 2           |             |
| 2a) Vorzyklus (2x)       |                 |             |             |             |
| Denaturierung            | -               | 95          | -           | 30          |
| Primer-Hybridisierung    | -               | 49,3        | -           | 30          |
| Elongation               | -               | 72          | -           | 63          |
| 2b) Hauptzyklus (30x)    |                 |             |             |             |
| Denaturierung            | 95              | 95          | 30          |             |
| Primer-Hybridisierung    | 67,3            | 61,6        | 30          |             |
| Elongation               |                 | 72          | 80          | 63          |
| 3. Erweiterte Elongation | 72              |             | 10 Min      |             |
| 4. Kühlen                | 12              |             | ∞           |             |

Die Programme zur Amplifikation von *ectB*, bzw. *adh2* wurden nach Herstellerangaben durchgeführt (Amplifikationstemperatur =  $T_m - 5$  °C; Elongation: 1 Min/kb) und sind in Tab. 2.12 zusammengefasst.

### 2.5.2.3 Gradienten-PCR

In den in dieser Arbeit durchgeführten Gradienten-PCR wurden mehrere gleiche PCR-Reaktionen angesetzt und parallel durchgeführt. Jedem Reaktionsansatz wurde jedoch im Schritt der Primer-Hybridisierung eine andere Temperatur innerhalb eines bestimmten Temperaturbereichs zugewiesen. Diese Vorgehensweise ist dann nützlich, wenn die optimale Hybridisierungstemperatur aufgrund von z.B. unterschiedlichen Schmelztemperaturen innerhalb eines langen Oligonukleotids nicht spezifiziert werden kann. Die Gradienten-PCR wurde im Zuge der Vektorkonstruktion von pASK\_yodPkamA, pPE\_yodPkamA, pASK\_kamA\_specRBS und pASK\_kamA\_CpRBS für die Amplifikation der Gene *yodP* und/oder *kamA<sub>Bs</sub>* und/oder *kamA<sub>Cp</sub>* durchgeführt, wobei ein Temperaturbereich von 65 - 80 °C, bzw. 55 - 70 °C gewählt wurde.

### 2.5.2.4 SOE-PCR

Die SOE-PCR (*splicing by overlapping extension* PCR) beschreibt eine PCR-Technik, mit der zwei oder mehr DNA-Sequenzen miteinander fusioniert werden können; dabei dienen Teile der genutzten DNA-Abschnitte als Primer, um die gegenseitige Amplifikation anzutreiben. Mithilfe dieser Methode ist es z.B. möglich, spezifische Mutationen (*site-directed mutagenesis*) hervorzurufen, bestimmte Nukleotide zu ersetzen, Abschnitte zu deletieren oder zusätzliche Nukleotide in die Sequenz einzufügen (Heckman & Pease, 2007; Higuchi *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1989).

In dieser Arbeit wurde die SOE-PCR genutzt, um die Gene *yodP* und *kamA* aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> für die Vektorkonstruktion von pASK\_yodPkamA, bzw. pPE\_yodPkamA zu fusionieren. Dafür wurden die Primer rev\_yodP\_Bs\_SOE und for\_kamA\_Bs\_SOE jeweils komplementär zueinander gestaltet, um so eine gezielte Überlappung darzustellen (vgl. Tab. 2.10). Nach der einzelnen Amplifikation der beiden Gene mit den vorhergesehenen Primern wurde eine SOE-PCR mit der *Phusion* High-Fidelity DNA-Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die DNA-Matrize jeweils zur Hälfte aus den bereits amplifizierten Einzelgenen (mit nun zueinander komplementären Abschnitten) bestand (vgl. 3.2.1). Als reguläre Primer wurden for\_yodP\_Bs, sowie rev\_kamA\_Bs genutzt (vgl. Tab. 2.10).

### 2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Für die spätere Isolation von PCR-Produkten, zur Kontrolle einer Testrestriktion oder zur Analyse der Auswirkungen von NAßL auf molekulare Methoden wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde standardmäßig ein 1 %iges Agarosegel durch Lösen von 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer in dafür vorgesehenen Gelkammern angefertigt (Biometra Horizon 58, Analytik Jena). Vor dem Lauf wurde das Gel komplett mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die zu analysierenden DNA-Proben mit 6x Ladepuffer versetzt. Zur Größenbestimmung wurde ein DNA-Größenstandard mit aufgetragen (vgl. Tab. 2.1). Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 80 - 100 V angelegt (Power Supply 122, Consort, Turnhout, Belgien). Die Färbung der DNA erfolgte durch Inkubation mit dem fluoreszierenden Farbstoff GelRed (Biotium) nach Herstellerangaben. Eine Analyse und Dokumentation konnte mittels Betrachtung unter UV-Licht erreicht werden (Gel Imager, Intas, Göttingen).

### 2.5.4 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau beschreibt die spezifische enzymatische Spaltung von Phosphodiester-Bindungen der DNA. Alle enzymatischen Hydrolysen wurden nach Herstellerangaben in einem Volumen zwischen 20 – 40 µL durchgeführt, wobei das Puffersystem an das/die genutzte/n Enzym/e und das entsprechende Volumen angepasst wurde. DNA-Fragmente (und Vektoren) für die Vektorkonstruktion wurden 3 h inkubiert, wobei nach 2,5 h der Vektor-DNA 1 U alkalische Phosphatase (FastAP) zugesetzt wurde. Diese dephosphoryliert das 5'-Ende der DNA und verhindert so eine Re-Ligation des geschnittenen Vektors. Kontroll-Restriktionen wurden 1,5 – 2 h nach Herstellerangaben inkubiert. Die Inaktivierung der Restriktionsverdau wurde entweder durch die Aufreinigung der DNA aus dem Reaktionsansatz (vgl. 2.5.1.2) oder durch Hitzeeinwirkung nach Herstellerangaben erreicht.

**Restriktionsverdau mit Supplementen.** Um zu analysieren, ob NAßL Einfluss auf die Methode des Restriktionsverdaus hat, wurde NAßL, sowie andere Testsubstanzen zu den jeweiligen Reaktionsansatz dazugegeben (Tab. 2.13). Für die Untersuchungen wurden pro zu untersuchende Substanz sechs Reaktionsansätze („0“, „2“, „5“, „10“, „30“ oder „60“) angelegt und die Reaktionen durch Zugabe des Restriktionsenzym *EcoRI* gestartet. Der Abbruch der Reaktion erfolgte nach 0, 2, 5, 10, 30 oder 60 Minuten, indem 5 µL aus dem Ansatz entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß mit bereits vorgelegten 2 µL 140 mM EDTA pipettiert

wurden (Endkonz. EDTA 40 mM). Zu diesem Gemisch wurden anschließend 1,4 µL 6x Ladepuffer gegeben und die Proben auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen.

**Tab. 2.13: Zusammensetzung eines Restriktionsverdau mit Supplementen.** <sup>1)</sup>Bei den Kontrollreaktionen ohne Supplement wurde die Differenz an H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> dazugegeben.

| Komponenten                        | Volumen [µL]            |
|------------------------------------|-------------------------|
| EcoRI-Puffer                       | 4                       |
| Plasmid                            | 10                      |
| Supplement <sup>1)</sup>           | Endkonzentration 500 µM |
| H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> | ad 40 µL                |
| EcoRI                              | 1                       |

### 2.5.5 Ligation

Zur Ligation von enzymatisch verdauter Vektor- und Insert-DNA wurde die T4-DNA-Ligase (vgl. Tab. 2.1) genutzt. Für ein optimale Zusammensetzung von Vektor-Rückgrat und Insert wurden diese abhängig von ihrer Größe in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. In Tab. 2.14 ist die hier standardmäßig genutzte Komposition von Substanzen gezeigt. Die Ligationsansätze wurden entweder bei Raumtemperatur für 1 - 2 h, oder in einem Thermocycler (MyCycler, Bio-Rad) bei 16 °C für 16 h inkubiert. Eine Deaktivierung der Reaktion erfolgte entweder durch Hitze einwirkung (65 °C, 10 Min) oder durch Aufreinigung des Ligationsansatzes durch das peqGOLD Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben. Wenn nötig erfolgte die Lagerung der Ansätze bei -20 °C.

**Tab. 2.14: Zusammensetzung eines Standard-Ligationsansatzes**

| Komponenten                        | Volumen [µL]      |
|------------------------------------|-------------------|
| T4-DNA-Ligase (5 U/µL)             | 1                 |
| 10x T4-DNA-Ligase Puffer           | 2                 |
| ATP (10 mM)                        | 1                 |
| Vektor-DNA                         | 10 - 120 ng       |
| Insert-DNA                         | 3:1 zu Vektor-DNA |
| H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> | ad 20 µL          |

### 2.5.6 Herstellung kompetenter Zellen

Zur späteren Transformation von *E. coli*-Zellen mit Expressionsplasmiden wurden diese vorher chemisch kompetent gemacht (nach Chung *et al.*, 1989). Dafür wurden 50 - 100 mL AB- oder LB-Medium 1 %ig mit einer Übernachtskultur des jeweilig benötigten *E. coli*-Stamms inokuliert

und dieser bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,3 bis 0,45 angezogen. Die Kultur wurde steril geerntet (2000 x g, 15 - 20 Min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in TSS-Puffer (vgl. Tab. 2.2) in einem Verhältnis von 50 µL Puffer/mL ehemals Kultur resuspendiert. Der Ansatz wurde in passenden Reaktionsgefäßen in 150 µL-Schritten aliquotiert und bis zur weiteren Nutzung bei -70 °C gelagert.

### **2.5.7 Transformation von *E. coli***

Die Aufnahme der Expressionsvektoren durch *E. coli* wurde mittels Transformation erreicht. Dafür wurde die benötigte Menge an kompetenten *E. coli*-Zellen (vgl. 2.5.6) auf Eis aufgetaut und entweder ein Ligationsansatz (vgl. 2.5.5) oder 5 - 10 µL reine Plasmid-DNA pro Aliquot dazugegeben. Der Transformationsansatz wurde für 20 Min auf Eis inkubiert und danach einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sek unterzogen. Anschließend wurden die Zellen für 1 - 2 Min auf Eis gekühlt, mit 500 µL SOB-Medium versetzt und zur Regeneration bei 37 °C und 180 rpm für 1 - 2 h inkubiert. Dann wurde der Reaktionsansatz auf AB-Agarplatten mit dem jeweilig benötigten Antibiotikum ausplattiert, wobei 150 µL der Zellsuspension direkt genutzt wurden; die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert (10.000 x g, 1 Min, RT), der Überstand verworfen, das Zellpellet im Rückfluss resuspendiert und ebenfalls auf Selektivnährboden aufgebracht. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert, aus den entstandenen Transformanden die Vektor-DNA isoliert und diese durch Restriktionsanalysen oder mittels PCR überprüft (vgl. 2.5.1.1, sowie 2.5.2 und 2.5.4).

### **2.5.8 Konjugation von *H. elongata***

Die in dieser Arbeit für *H. elongata* verwendeten Expressionsvektoren wurden per Konjugation nach einer modifizierten Methode von Kunte & Galinski (1995) in diesen Organismus eingebracht. Bei diesen Vektoren handelt es sich um mobilisierbare Plasmide auf Basis des pPromEct-Vektors; sie besitzen zwar einen Teil der genetischen Informationen, die für die DNA-Übertragung notwendig sind (*mob*-site und *oriT*), die Transfer-Gene *tra* fehlen jedoch. In *E. coli* S17.1 liegen diese Gene genomisch integriert vor, weshalb dieser Stamm als Donor-Stamm verwendet wurde.

Für den konjugativen Transfer von Expressionsvektoren wurde der jeweilige Akzeptor-Stamm von *H. elongata* in AB-2-, bzw. AB-3-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 - 0,9 angezogen. Der Donorstamm *E. coli* S17.1 (transformiert mit dem jeweiligen Vektor) wurde auf einer AB-0,5-Agarplatte mit Chloramphenicol (50 µg/mL) über Nacht angezogen. Für den Konjugationsvorgang wurde Zellmaterial des Donorstamms in AB-0,5-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 resuspendiert und 400 µL dieser Suspension mit 600 µL der *Halomonas*-Kultur

vermischt. Das Zellgemisch wurde abzentrifugiert (2500 x *g*, 2 Min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet im Rückfluss resuspendiert. Ein steriler Nitrocellulosefilter (0,45 µM) wurde auf AB-2-, bzw. AB-3-Agarplatten ohne Antibiotikum platziert und das Zellgemisch auf den Filter pipettiert; die Platten wurden anschließend über Nacht bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der bebrütete Filter in ein passendes Reaktionsgefäß überführt und die Zellen in 1 mL MM63-2-, bzw. MM63-3-Medium durch Vortexen vom Filter gelöst. Danach wurde eine Verdünnungsreihe der Schritte 10<sup>-1</sup>-10<sup>-5</sup> mit dem entsprechenden Medium angelegt und jeweils 100 µL der Zellsuspension und der Verdünnungen auf MM63-2-, bzw. MM63-3-Agarplatten mit Chloramphenicol (50 µg/mL) ausplattiert. Die Platten wurden im Anschluss bei 30 °C für ca. 3 Tage inkubiert.

### 2.5.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Vektor-DNA wurde durch die Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg) durchgeführt.

## 2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1 Aufreinigung von Zellprotein

**Lösliches Zellprotein.** Für die Aufreinigung des löslichen Zellproteins wurde eine Methode nach Brüinig (2005) angewandt. Dafür wurden das Zellmaterial auf Eis aufgetaut und in 200 µL Resuspensionspuffer resuspendiert. Die Probe wurde mit 2 µL Lysozym-Stammlösung versetzt, mithilfe des Vortexers gemischt und für 30 Min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10 µL SDS-Lösung (10 % *w/v*) und eine weitere 30-minütige Inkubationsphase auf Eis. Im Anschluss wurden 1 µL MgCl<sub>2</sub>, sowie 2 µL DNase I-Stammlösung zugesetzt und der Ansatz auf Eis für 1,5 h inkubiert. Danach folgte ein Gefrierschritt bei -20 °C für mindestens 30 Min (optional über Nacht). Die Aufreinigung wurde mit einer Ultraschallbehandlung von 3 x 15 Min in einem geeisten Wasserbad (Sonorex TK52, Bandelin, Berlin) fortgesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (16.000 x *g*, 30 Min, 4 °C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das entstandene Pellet für die spätere Aufreinigung des unlöslichen Zellproteins bei -20 °C aufbewahrt.

**Unlösliches Zellprotein.** Die Methode zur Aufreinigung der unlöslichen Proteinfraction richtet sich nach Tetsch (2001). Dafür wurden die aus der unter 2.6.1 beschriebenen Aufarbeitung gewonnenen Pellets auf Eis aufgetaut und zweimal mit 750 µL Resuspensionspuffer

gewaschen (16.000 x g, 5 Min, RT). Die Proben wurden anschließend mit SDS-Lösung (1 % w/v) resuspendiert. In der Regel wurde ein Volumen von 300 µL genutzt, was je nach Pelletgröße um +/- 100 µL nach oben oder unten korrigiert wurde. Danach erfolgte eine Inkubation bei 950 rpm und 80 °C für ca. 1,5 h (Thermomixer® compact, Eppendorf AG, Hamburg).

### **2.6.2 Bestimmung des Gesamtzellproteins**

Für die Gesamtzellprotein (GZP)-Bestimmung wurde die bei der Bligh & Dyer-Extraktion (vgl. 2.7.1) entstandene Interphase verwendet. Dafür wurde nach Abnahme der wässrigen Phase die verbleibende Makromolekülfraktion durch Platzieren der Reaktionsgefäße im Abzug oder durch Behandlung mit einem Vakuumkonzentrator (SpeedVac Savant ISS110, Thermo Scientific) komplett getrocknet. Nach Verdampfen der Chloroform-Phase wurde die Interphase mit 0,1 M NaOH versetzt, wobei sich die Menge an der Größe des Materials orientierte: i.d.R. wurde ein Volumen von 500 µL genutzt, was um +/- 200 µL nach oben oder unten korrigiert wurde. Danach wurden die Proben bei 800 rpm und 75 °C für 1,5 - 2 h inkubiert (Thermomixer® compact, Eppendorf AG, Hamburg). Falls erforderlich wurden unlösliche Bestandteile, wie z.B. ausgefallene Sulfid-Verbindungen, abzentrifugiert (16.000 x g, 2 Min, RT) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser konnte im Anschluss direkt zur Proteinquantifizierung verwendet werden (vgl. 2.6.3)

### **2.6.3 Proteinquantifizierung**

Um die Proteinkonzentration der löslichen oder unlöslichen Proteinfraction, sowie des Gesamtproteins zu bestimmen, wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Dieser kolorimetrische Test basiert auf der Biuretreaktion, bei der  $\text{Cu}^{2+}$  durch Reaktion mit Peptidbindungen in Protein zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert werden und mit der hier genutzten, namensgebenden Bicinchoninsäure (BCA) einen Chelatkomplex eingehen, der eine violette Färbung aufweist. Diese Färbung kann dann z.B. mithilfe eines Photometers gemessen werden, wobei die Komplexbildung proportional zum Proteingehalt ist und mittels eines Proteinstandards (hier bovines Serumalbumin, BSA) mit bekannter Konzentration ermittelt werden kann.

Für den BCA-Assay wurde das Protein Quantification Kit (Uptima) genutzt und der Test in einer Mikrotiterplatte nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proteinproben wurden je nach Ursprung (löslich, unlöslich, Gesamtzellprotein) zwischen 1:10 und 1:50 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  verdünnt; der Proteinstandard BSA wurde in Konzentrationen von 50 - 500 µg/mL eingesetzt. Nach der vorhergesehenen Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte in einem Plattenlesegerät (Infinite M200, Tecan Deutschland, Crailsheim) bei 550 nm gemessen und mithilfe der Werte des

Proteinstandards eine Kalibrierkurve erstellt, die dann zur Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben genutzt wurde.

#### 2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Beim Verfahren der SDS-PAGE werden Proteine in einer Gelmatrix anhand ihrer Größe durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Diese Methode wurde in modifizierter Form in Anlehnung an Laemmli (1970) nach Herstellerangaben (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt.

Die Herstellung der Gele erfolgte nach den Angaben in Tab. 2.15, wobei das Trenngel zuerst gegossen wurde und vor der Polymerisierung mit Ethanol überschichtet wurde, um einen glatten Übergang für das Sammelgel zu schaffen. Anschließend erfolgte die Entfernung von Ethanol und die Überschichtung mit dem Sammelgel, wobei in dieses ein Probenkamm eingesetzt wurde. Die Gelkammer (Mini-Protean® 3, Bio-Rad) wurde dann mit 1x Laufpuffer gefüllt.

**2.15: Zusammensetzung der Acrylamid-Gele für die SDS-PAGE.** T: Totale Konzentration Acrylamid und Bisacrylamid, C: Konzentration des Quervernetzers Bisacrylamid)

| 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 % SDS (w/v)                     | 100 µL                | 10 % SDS (w/v)                   | 50 µL   |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>   | ad 10 mL              | H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 5 mL |
| <b>Zur Polymerisierung jeweils</b> |                       |                                  |         |
|                                    | APS-Lösung (10 % w/v) | 50 µL                            |         |
|                                    | TEMED                 | 10 µL                            |         |

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden nach der Quantifizierung (vgl. 2.6.3) mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> so verdünnt, dass 20 µg Protein pro Laufspur aufgetragen werden konnten. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben außerdem mit 4x RSB versetzt, für 5 - 10 Min bei 70 °C inkubiert und kurz abzentrifugiert. Als Größenstandard wurde in jedem Gel ein geeigneter Proteinmarker mitaufgetragen (vgl. Tab. 2.1). Die Elektrophorese wurde durch Anlegen einer Spannung von 60 V für das Sammelgel und 100 V für das Trenngel durchgeführt (Power Supply EPS 500/400, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteinbanden durch eine Coomassie-Färbung (Quick Coomassie Stain, Serva), wofür das Gel ca. 60 Min in der Färbelösung auf einem Rotationsschüttler (IKA-Vibrax-VXR, Typ VX2E, Janke&Kunkel, Staufen) inkubiert wurde. Die Hintergrundfärbung wurde durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> entfernt. Das fertig gefärbte Gel wurde fotografiert und zur Konservierung



auf Whatman-Papier durch einen Vakuumtrockner (Gel Dryer MGD-4534, VWR) für 1 - 3 h bei 80 °C getrocknet.

## 2.7 Analytische Methoden

### 2.7.1 Extraktion nach Bligh & Dyer (1959)

Um Zellmaterial mittels HPLC unter anderem auf den Gehalt intrazellulärer Solute untersuchen zu können, wurde das Verfahren von Bligh & Dyer (1959, modifiziert nach Galinski, 1986, im Folgenden B&D) angewendet. Dafür wurde entweder gefriergetrocknetes Zellmaterial (vgl. 2.7.2) genutzt, oder das Zellpellet nach Zentrifugation eines geeigneten Expressionskultur-Volumens verwendet. Die B&D-Methode basiert auf der Trennung von hydrophilen und hydrophoben Zellbestandteilen durch Phasentrennung unter Einsatz von Chloroform und einem Wasser-Methanol-Gemisch. Dabei sammeln sich hydrophobe Bestandteile, wie Lipide, in der unteren Chloroform-Phase. In der Interphase werden Proteine und andere Makromoleküle gefällt; die obere wässrige Phase enthält z.B. kompatible Solute, Aminosäuren und andere wasserlösliche Komponenten.

Für die Extraktion wurde auf 30 mg gemörsertes gefriergetrocknetes Zellmaterial 500 µL B&D-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde im Anschluss für 10 Min auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 130 µL H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub>, sowie 130 µL Chloroform und ein analoger Inkubationsschritt. Die Phasentrennung wurde durch einen Zentrifugationsschritt verstärkt (12.000 x g, 5 Min, RT) und die obere Phase (im Folgenden B&D-Extrakt) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung bis zur Analyse mittels HPLC erfolgte bei -20 °C. Je nach eingesetztem Zellmaterial wurden alle Volumina ausgehend vom Verhältnis 30 mg Zellmaterial / 500 µL B&D-Lösung hinauf-, oder herabgesetzt. Bei frischem, nicht gefriergetrocknetem Zellmaterial wurde i.d.R. Zellpellet aus 10 mL aerober, stationärer Kultur mit 750 µL B&D-Lösung nach der oben beschriebenen Vorgehensweise behandelt.

### 2.7.2 Gefriertrocknung

Für die spätere Extraktion nach Bligh & Dyer und zur Bestimmung des Trockengewichts (TG) der Biomasse wurde das Zellmaterial gefriergetrocknet. Dabei wird gefrorenem Material durch Sublimation das Wasser entzogen. Die Gefriertrocknung erfolgte über Nacht (ca. 20 h) bei einem Hochvakuum von 0,05 Millibar und 20 - 30 °C (Gefriertrocknungsanlage Alpha I-6, Christ, Osterode).

### 2.7.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der analytischen Trennmethode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography, HPLC*) können Substanzen in einer Probe getrennt, identifiziert und quantifiziert werden. Die HPLC ist seit den 1960er Jahren eine etablierte Methode der Chemie, deren Durchführung und Möglichkeiten in der Vergangenheit ausgiebig aufgearbeitet wurden (Malviya *et al.*, 2010; Sabir *et al.*, 2016; Snyder, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden der HPLC genutzt, die im Folgenden erläutert werden.

#### 2.7.3.1 Fmoc-ADAM-HPLC

Die Fmoc-ADAM-HPLC dient dem Nachweis von N-reaktiven Verbindungen und ist daher für den Nachweis von Aminosäuren geeignet (Bütikofer *et al.*, 1991; Einarsson *et al.*, 1983). Für die Detektion werden die zu untersuchenden Stoffe durch die Reaktion mit 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc) derivatisiert; überschüssiges Fmoc wird durch die Zugabe von 1-Aminoadamantan (ADAM) „abgefangen“ und verhindert so eine Signalüberlagerung mit den derivatisierten Verbindungen (Jámbor & Molnár-Perl, 2009). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem zur Detektion von  $\beta$ -L-Lysin, NA $\beta$ L und geeigneten Aminosäure-Standards genutzt.

Für die Analyse mittels Fmoc-ADAM-HPLC wurde ein Laufmittelgradient aus Laufmittel A und Laufmittel B genutzt (vgl. Tab. 2.1 und Tab. 2.2). Als stationäre Phase wurden zwei verschiedene HPLC-Säulen eingesetzt: (1) eine *Reversed-Phase*-Kieselgelmatrix (Superspher<sup>®</sup> 60 RP-8, 4  $\mu$ m, LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Merck) und (2) eine *Reversed-Phase*-Polystyrolharz-Kieselgelmatrix (Nucleogel<sup>™</sup> RP 100-8, 8  $\mu$ m, 150-4, Macherey-Nagel). Letztere wurde für eine distinktere Trennung des L-Alanin-Signals und des NA $\beta$ L-Signals verwendet, wobei mit dieser Säule *nicht* das Signal für  $\beta$ -L-Lysin identifiziert und quantifiziert werden konnte. HPLC-Analysen zum Nachweis von potenziellem  $\beta$ -L-Lysin wurden demnach mit der Säule Superspher<sup>®</sup> 60 RP-8 (Merck) durchgeführt; Analysen zum Nachweis von NA $\beta$ L mit der Säule Nucleogel<sup>™</sup> RP 100-8 (Machery-Nagel).

#### **Aufbau der Anlage und Messungen**

- Entgaser (SpectraSystem SCM1000, Thermo Scientific)
- Pumpe (SpectraSystem P2000, Thermo Separation Products)
- Probenaufgabe (Autosampler SpectraSystems AS3000, Probenschleife 100  $\mu$ L, Probenhalter 4 °C, Säulenofen 45 °C, Thermo Separation Products)<sup>1</sup>

- Vorsäule (LiChrospher 100 RP-8, 5 µm, LiChroCART 4-4, Merck; bzw. Nucleogel RP, 5-3, Macherey-Nagel)
- Trennsäule (Superspher® 60 RP-8, 4 µm, LiChroCART® 125-4, Merck, bzw. Nucleogel™ RP 100-8, 8 µm, 150-4, Macherey-Nagel)
- Fluoreszenzdetektor (SpectraSystem FL3000, 254 nm (ex.), 316 nm (em.), Thermo Separation Products)

<sup>1</sup>Alternativ zur Nutzung eines Autosamplers wurde auch die Kombination aus einem autonomen Probenaufgabe-Ventil (Rheodyne Injector Nr. 7125, Probenschleife 20 µL, Rheodyne LLC) zusammen mit einem gesonderten Säulenofen (HPLC Column Heater, Bio-Rad, Hercules, USA) genutzt.

Die Messungen erfolgten bei einer Flussrate von 1,25 mL/Min, 45 °C Säulentemperatur und einem Laufmittelgradienten (vgl. Tab. 2.16). Zur Identifizierung und Quantifizierung wurden geeignete Standardsubstanzen mit einer Konzentration von 25 µM gemessen.

**Tab. 2.16: Laufmittelgradient für die FMOc-ADAM-HPLC**

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

**Probenderivatisierung.** Zellextrakte nach der Behandlung durch Bligh & Dyer wurden 1:25 und Kulturüberstände 1:10 - 1:40 je nach NaCl-Gehalt mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> verdünnt. Die so verdünnten Proben wurden zur Abtrennung von Partikeln abzentrifugiert (10.000 x g, 3 Min, RT) und dann derivatisiert. Dafür wurden 40 µL der verdünnten Probe (oder einer Standardsubstanz) mit 40 µL Boratpuffer inkl. 25 µM Taurin als interner Standard versetzt. Es folgte die Zugabe von 80 µL FMOc-Reagenz und eine Inkubationsphase auf dem Rotationsschüttler für 45 Sek. Anschließend wurden 100 µL ADAM-Reagenz zum Reaktionsansatz gegeben und dieser erneut für 45 Sek auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 140 µL Laufmittel A hinzugegeben und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert. Die so derivatisierten Proben wurden bis zur Messung entweder im Autosampler oder im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

**Nachweis des Zwischenprodukts β-L-Lysin.** In Ermangelung eines geeigneten Standards der Beta-Aminosäure β-L-Lysin erfolgte die Identifizierung mittels FMOc-ADAM-HPLC durch

Abgleich mit einer Kontrollmessung. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Trennsäule Superspher® 60 RP-8 mit dem oben angegebenen Gradienten (vgl. Tab. 2.16): Für  $\beta$ -L-Lysin wurde ein Signal zu einer ähnlichen Retentionszeit erwartet, wie das der zugehörige Alpha-Aminosäure  $\alpha$ -L-Lysin - etwa um 41,3 Minuten. Der Vergleich einer Kontrollmessung (Kontrollstamm mit Leervektor) mit Messungen der Expressionskulturen ergab ein zusätzliches Signal, das als potenzielles  $\beta$ -L-Lysin gehandelt wurde. Der spätere Nachweis von NA $\beta$ L in den korrelierenden Expressionsstämmen bestätigte dieses Signal bei ca. 42,4 Min als die Vorstufe  $\beta$ -L-Lysin.

**Nachweis des kompatiblen Soluts NA $\beta$ L.** Für die Identifizierung von NA $\beta$ L durch die FMOC-ADAM-HPLC wurde das durch *C. parvum* UdG6501Lms heterolog produzierte N $\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin genutzt (vgl. 2.1.1; Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Die Quantifizierung erfolgte durch Nutzung eines N $\epsilon$ -Acetyl- $\alpha$ -Lysin-Standards (hohe Strukturähnlichkeit und identisches Molekulargewicht).

#### 2.7.3.2 Isokratische HPLC (ungeladene und zwitterionische Solute)

Für den Nachweis und die Quantifizierung von wasserlöslichen und bei physiologischem pH-Wert ungeladenen Substanzen, wurde in dieser Arbeit die Methode der isokratischen HPLC mit Brechungsindex- (RI) und UV-Detektion angewendet (Galinski, 1986). Dabei wurden hauptsächlich Ectoin und Trehalose quantifiziert.

Die mobile Phase bestand aus 80 %igem Acetonitril (*w/v*) bei physiologischem pH-Wert. Die stationäre Phase bildete eine *Reversed-Phase*-Kieselgelmatrix, wobei die Hydroxylgruppen über hydrophobe Propylketten mit polaren endständigen Aminogruppen verbunden waren.

#### **Aufbau der Anlage und Messungen**

- Entgaser (SpectraSystem SCM1000, Thermo Scientific)
- Pumpe (SpectraSystem P1000, Thermo Separation Products)
- Probenaufgabeventil (Rheodyne Injector Nr. 7125, Probenschleife 20  $\mu$ L, Rheodyne LLC)
- Vorsäule (LiChrospher 100 NH<sub>2</sub>, 5  $\mu$ m, LiChroCART 4-4, Merck)
- Trennsäule (LiChrospher® 100 NH<sub>2</sub>, 5  $\mu$ m, LiChroCART® 125-4, Merck)
- UV-Detektor (SpectraSystem UV1000, 210 nm, Thermo Separation Products)
- RI-Detektor (Shodex RI-71, Showa Denko K.K.)

Die Messungen erfolgten bei einer Flussrate von 1 mL/Min bei RT. Zur Identifizierung und Quantifizierung wurden geeignete Standardsubstanzen mit einer Konzentration von 1 - 2,5 mM gemessen.

**Probenvorbereitung.** Proben aus der B&D-Extraktion wurden 1:4, Kulturüberstände 1:5 - 1:10 mit 80 %igem Acetonitril verdünnt. Die so verdünnten Proben wurden unmittelbar vor der Messung 3 Min bei ca. 10.000 x g abzentrifugiert (Tischzentrifuge).

### 2.7.3.3 Isokratische HPLC (organische Säuren, Polyole und Zucker)

Für den Nachweis von Glycerin, Glucose und Ethanol, sowie den organischen Säuren Fumarat, Succinat und Acetat wurde ebenfalls das Verfahren der isokratischen HPLC verwendet. Dafür kam die Trennsäule Aminex HPX-87-H (Bio-Rad) zum Einsatz. Diese ist für die Analyse von Kohlehydraten und organischen Säuren geeignet, wobei das Säulenmaterial aus einer Matrix aus Polystyrol-Divinylbenzol besteht, an die Protonen gebunden sind. Als mobile Phase diente hier H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM).

### Aufbau der Anlage und Messungen

- Entgaser (Knauer Smartline Manager 5000)
- Pumpe (Knauer Smartline Pump 1000)
- Probenaufgabeventil (Knauer Smartline Autosampler 3800, Probenschleife 20 µL)
- Säulenofen (Knauer Column-Thermostat Jetstream 2 Plus)
- Trennsäule (Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, 9 µm, Bio-Rad)
- UV-Detektor (Knauer Smartline UV Detector 2600)
- RI-Detektor (Knauer Azura RID 2.1L)

Die Messungen erfolgten bei einer Flussrate von 0,3 mL/Min bei 50 °C Säulentemperatur. Zur Identifizierung und Quantifizierung wurden geeignete Standardsubstanzen mit einer Konzentration von 1 - 2,5 mM gemessen.

**Probenvorbereitung.** Proben aus der B&D-Extraktion wurden 1:5, Kulturüberstände 1:2 mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM) verdünnt. Die so verdünnten Proben wurden 3 Min bei ca. 10.000 x g abzentrifugiert (Tischzentrifuge) und bis zur Messung im Autosampler gelagert.

### **2.7.4 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR)**

Die Kernspinresonanz-Spektroskopie ist eine Analysetechnik mit atomarer Auflösung, die zum Nachweis bestimmter Inhaltsstoffe einer Probe und für die Strukturbestimmung dieser genutzt werden kann. Dabei beruht die Methode auf der Tatsache, dass Atomkerne mit ungerader

Anzahl an Protonen oder Neutronen, wie z.B.  $^1\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ , einen Drehimpuls (Kernspin) besitzen. Dieser Spin führt zu der Entstehung eines eigenen magnetischen Feldes - durch das Anlegen eines äußeren Magnetfeldes kann dementsprechend die Orientierung des Kerns beeinflusst werden: eine Orientierung parallel zum äußeren Magnetfeld weist dabei ein niedrigeres Energieniveau auf, als eine anti-parallele Orientierung. Werden nun elektromagnetische Wellen einer Frequenz eingestrahlt, deren Energie der Differenz beider Orientierungen entspricht, können Übergänge vom niedrigeren zum höheren energetischen Zustand hervorgerufen werden. Beim anschließenden erneuten Einstellen des Energiegleichgewichts geben die Atomkerne eine sogenannte Resonanzfrequenz ab, die gemessen werden kann. Diese Resonanzfrequenz ist für jeden Kern in einer bestimmten chemischen Umgebung charakteristisch, wodurch auf die Struktur der untersuchten Moleküle geschlossen werden kann.

Zur Validierung der NA $\beta$ L-Produktion durch *E. coli*, bzw. *H. elongata* wurde Zellextrakt von geeigneten Expressionskulturen durch eine  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse untersucht.

**Probenvorbereitung.** Das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde in mehreren Ansätzen einer Bligh & Dyer-Extraktion unterzogen. Die gewonnenen Extrakte wurden vereinigt und mehrere Tage unter dem Abzug getrocknet. Ein so getrockneter Ansatz wurde anschließend in 500  $\mu\text{L}$  Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ ) resuspendiert und mit 2,5 mg Natrium-Trimethylsilylpropionat (TMSP) als interner Standard versetzt. Auf die Zugabe von Acetonitril, bzw. Methanol wurde verzichtet.

**NMR-Messung.** Die NMR-Messungen wurden vom Institut für Pharmazeutische Mikrobiologie (Universität Bonn) durchgeführt. Dabei kam das NMR-Spektrometer Avance 300DPX (Bruker, Billerica, USA) zum Einsatz. Die Messfrequenz für den  $^{13}\text{C}$ -Kanal betrug 75,46 MHz. Die Kalibrierung der Messwerte wurde durch den internen Standard TMSP vorgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm MestReNova 8.0.1; zur Identifizierung der Signale erfolgte ein Abgleich mit NMR-Spektren geeigneter Standardsubstanzen.

### 3 Ergebnisse

In der Vergangenheit widmeten sich viele Studien den für die NA $\beta$ L-Produktion benötigten Enzymen, wobei insbesondere die LAM im Fokus der Forschung stand (Behshad *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2000; Dyda *et al.*, 2000; Hung & Lai, 2013; Ruzicka *et al.*, 2000; Song & Frey, 1991; Wu *et al.*, 2011). Seitdem NA $\beta$ L im Jahr 1990 in methanogenen Archaeen entdeckt wurde (Sowers *et al.*, 1990), ist es jedoch nur in geringem Umfang untersucht worden. Eine Überproduktion gelang bislang lediglich in homologer Form (Müller *et al.*, 2011; Pflüger *et al.*, 2003; Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Potenzielle Einsatzmöglichkeiten als kompatibles Solut neben dem natürlichen Gebrauch als Osmolyt sind dementsprechend unbekannt.

In Anlehnung an vergangene Arbeiten (Hövels, 2015b, 2015a; Lohberger, 2009; Möller, 2011), sowie als Konsequenz des mäßigen Kenntnisstands bzgl. der Eignung von NA $\beta$ L als Supplement, wurde in der vorliegenden Abhandlung die heterologe Produktion von  $\beta$ -Lysin und NA $\beta$ L behandelt. Dies erfolgte mithilfe verschiedener Enzyme aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>, *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>, *Ms. mazei* Gö1 und *D. mccartyi* CBDB1. Als Wirtsorganismen dienten die Proteobakterien *H. elongata* und *E. coli*. Außerdem wurde NA $\beta$ L in molekularbiologischen Verfahren eingesetzt und die Ergebnisse hinsichtlich möglicher Auswirkungen des Osmolyts untersucht.

#### 3.1 Der Einfluss von NA $\beta$ L auf molekularbiologische Methoden

NA $\beta$ L wird von u.a. von methanogenen Archaeen als kompatibles Solut zum Schutz vor osmotischem Stress synthetisiert (vgl. 1.1, Empadinhas & Da Costa, 2008; Lai *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1999; Pflüger *et al.*, 2003; Roberts, 2005; Robertson, Lai, *et al.*, 1992; Robertson, Noll, *et al.*, 1992; Sowers *et al.*, 1990; Sowers & Gunsalus, 1995). In den letzten Jahrzehnten gab es zahlreiche Untersuchungen zum Einfluss kompatibler Solute auf molekularer Ebene. Dabei stellte sich heraus, dass viele dieser Substanzen einen Effekt auf Nukleinsäuren, bzw. Nukleinsäure-Protein-Komplexe haben und stabilisierende Eigenschaften aufweisen (Allison & Anchordoquy, 2000) oder die Komplexbildung unterstützen (Semrad & Green, 2002), aber auch inhibierende Wirkung auf die enzymatische Funktion zeigen können (Malin *et al.*, 1999). Um NA $\beta$ L näher zu charakterisieren und mit den Auswirkungen anderer kompatibler Solute zu vergleichen, wurde es in zwei Standardmethoden der Molekularbiologie als Supplement eingesetzt. Der Restriktionsverdau, also die gezielte Modifikation von Nukleinsäuren mithilfe von Exonukleasen, sowie die Polymerase-Kettenreaktion bieten sich als schnelle und einfache

Techniken zur Untersuchung von Effekten auf Protein-Nukleinsäure-Interaktion an. Neben NA $\beta$ L wurden auch andere Substanzen im direkten Vergleich eingesetzt:  $\alpha$ -Lysin, welches die Ausgangsaminosäure darstellt und N $_e$ -Acetyl- $\alpha$ -Lysin (NA $\alpha$ L), welches starke strukturelle Ähnlichkeit zu NA $\beta$ L aufweist. N-Acetyl- $\beta$ -Alanin (NA $\beta$ A) wurde als weitere  $\beta$ -Aminosäure miteinbezogen; N-Acetyl-Glutamin (NAG) und NAGGN als weitere N-acetylierte Substanzen, wobei letztere in der Vergangenheit durch ihren stabilisierenden Effekt auf Proteine aufgefallen ist (Beyert, 2018; Korsten, 2011). Weitere Supplemente waren die Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin (OH-Ectoin), der Zucker Trehalose, sowie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Betain. Die letzten fünf Substanzen wurden in den letzten Jahren ebenfalls mehrfach untersucht und boten sich daher als Vergleichsmoleküle an (Malin *et al.*, 1999; Schnoor *et al.*, 2004; Shen & Hohn, 1992).

Es gibt bis heute wenig Untersuchungen zu NA $\beta$ L und auch die Produktion dieses Soluts erwies sich bis jetzt als schwierig. Für die durchgeführten Versuche wurden Bestände der Substanz verwendet, die mithilfe des grünen Schwefelbakteriums *C. parvum* UdG6501Lms von Triadó-Margarit *et al.* (2011) produziert wurden (vgl. 2.1).

### 3.1.1 NA $\beta$ L als Supplement im Restriktionsverdau

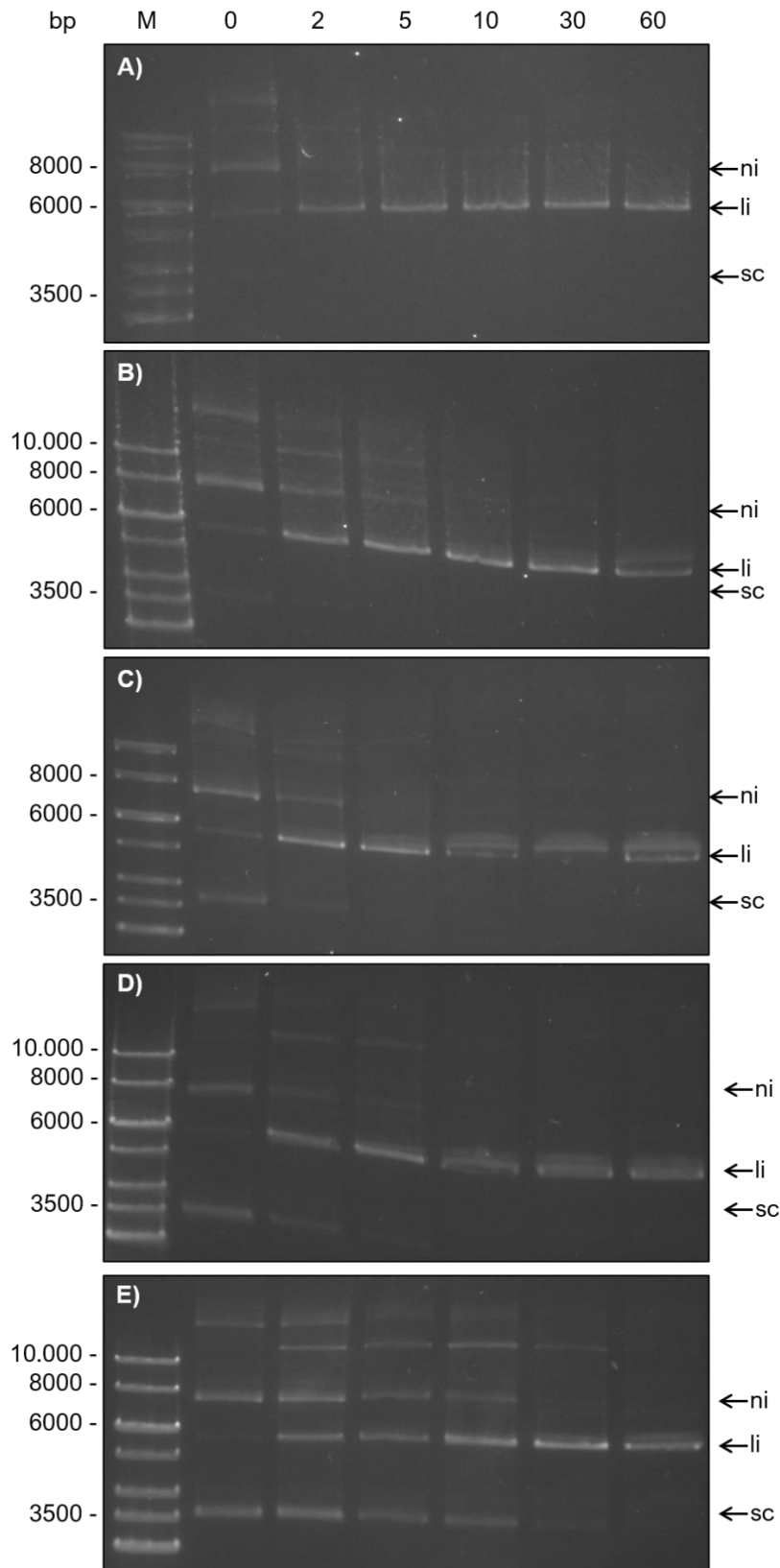
Erste Untersuchungen behandelten den Einfluss von NA $\beta$ L beim enzymatischen Verdau von DNA. Dafür wurde in Anlehnung an Malin *et al.* (1999) das Plasmid pK18mobsacB (welches ein Derivat des Vektors pBR322 darstellt) mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut, die Reaktionen nach verschiedenen Zeitpunkten mit EDTA gestoppt und auf ein Agarosegel aufgetragen (vgl. 2.5.4.1). Die Methode beruht dabei auf einer Mengenverschiebung von unterschiedlichen topologischen Zuständen von Plasmid-DNA. Durch die Auftragung der über die Zeit genommenen Proben entsteht ein charakteristisches Muster, wobei vor allem drei typischen Formen von Plasmid-DNA in den Vordergrund rücken: supercoiled, also ein unbeschädigtes, überspiralisiertes Doppelstrang-Plasmid; und nicked, also ein Doppelstrang-Plasmid mit einem Einzelstrangbruch, was zur Relaxierung der superhelikalen Spannung führt. Bei der linearisierten Form handelt es sich um ein einmalig geschnittenes Plasmid. Diese und auch weitere Formen (z.B. einzelsträngiges Plasmid) liegen natürlicherweise in Bakterienzellen vor. So ist es bspw. unabdingbar, dass zelluläre Topoisomerasen Einzelstrangbrüche in Plasmide einführen (= *nicked*), um die Replikation durch die DNA-Polymerase zu ermöglichen (Wang, 1996). Da bei der Aufreinigung durch reguläre Labormethoden, wie z.B. durch eine *Non-Column*-Plasmidpräparation, oder auch durch Aufreinigungs-Kits, technisch nicht zwischen all diesen Formen unterschieden werden kann, findet man sie in der Regel auch in



den Reaktionsansätzen beim Restriktionsverdau wieder. Im Laufe der Reaktion eines Restriktionsenzym ergibt sich eine topologische Mengenverschiebung zur linearisierten Form aus den Molekülen, die noch eine Erkennungssequenz für das jeweilige Enzym besitzen (z.B. *supercoiled*, *nicked*, usw.), da immer mehr Plasmid-DNA geschnitten vorliegt. pK18mobsacB besitzt nur eine einzige Erkennungssequenz für *EcoRI*; eine korrekte Spaltung der DNA erzeugt also ein linearisiertes Plasmid von 5719 bp. Neben NA $\beta$ L wurden als Zusatz noch NA $\alpha$ L,  $\alpha$ -Lysin, sowie als Negativkontrolle OH-Ectoin gewählt.

In Abbildung 3.1 sind die Restriktionsverdaue ohne und mit verschiedenen Zusätzen dargestellt. In Teilbild 3.1 A ist eine zusatzlose Restriktion des Plasmids pK18mobsacB mit *EcoRI* aufgetragen. Hier ist die Bande der *supercoiled*-Form sehr schwach bis nicht zu erkennen, dafür liegt bereits eine sehr geringe Menge lineares Plasmid bei 0 Min Reaktionszeit vor. Ob diese Menge wirklich durch einige Sekunden Inkubation entstanden ist, oder bereits so vorlag, lässt sich hier nicht sagen. Die Bandenstärke der linearen Form nimmt schnell über die Zeit zu und bereits ab 5 Min ist keine eindeutige Bande mehr der *nicked*-Plasmidform zuzuordnen, sodass ab diesem Zeitpunkt nur noch lineares Plasmid vorliegt (vgl. Abb. 3.1 A). Im Kontrast dazu scheint OH-Ectoin als Zusatz diesen Prozess etwas zu verlangsamen (vgl. Abb. 3.1 B). Auch hier ist zwar wenig *supercoiled*-Form zum Start der Reaktion sichtbar, dafür liegt ein größerer Teil des Plasmids relaxiert vor. Die Reaktion läuft analog zum zusatzlosen Ansatz ab; jedoch ist der Zeitpunkt, an dem nur noch geschnittenes Plasmid vorliegt, verschoben (vgl. Abb. 3.1 B, Laufspur „10“).  $\alpha$ -Lysin hat keinen signifikanten Einfluss auf den Restriktionsverdau (vgl. Abb. 3.1 C). Hier ist die *supercoiled*-Form beim Reaktionsstart gut zu erkennen, eine Verschiebung von dieser und der *nicked*-Form hin zum linearisierten Plasmid läuft, verglichen mit der Kontrollreaktion, gleich schnell ab (vgl. vgl. 3.1 A und C, Laufspur „5“). Der Einfluss von NA $\alpha$ L als ebenfalls acetyliertes Lysin ist vergleichbar mit dem von OH-Ectoin (vgl. Abb. 3.1 D). Hier sind bis Minute 5 die hyperspiralisierte und relaxierte Form als Bande zu erkennen. Vollständig linearisiertes Plasmid liegt wie in Teilbild B erst ab Minute 10 vor (vgl. Abb. 3.1 B und D, Laufspur „10“). Im Gegensatz zu allen anderen Zusätzen verzögert die Zugabe von NA $\beta$ L die Reaktion signifikant (vgl. Abb. 3.1 E). Bis 10 Minuten nach Reaktionsstart zeigen sich die *supercoiled*- und *nicked*-Form des Plasmides deutlich, danach vermindert sich die Intensität. Von komplett geschnitten-vorliegendem Plasmid kann erst ab 1 Stunde nach Inkubationsstart gesprochen werden.

In fast allen Reaktionsansätzen ist außerdem eine Bande mit einer Größe von ca. 10.000 bp zu erkennen. Hierbei handelt es sich möglicherweise um ein zufällig gebildetes Konstrukt aus zwei zusammengelagerten Plasmiden, die an ihren jeweiligen Schnittstellen re-ligiert sind.



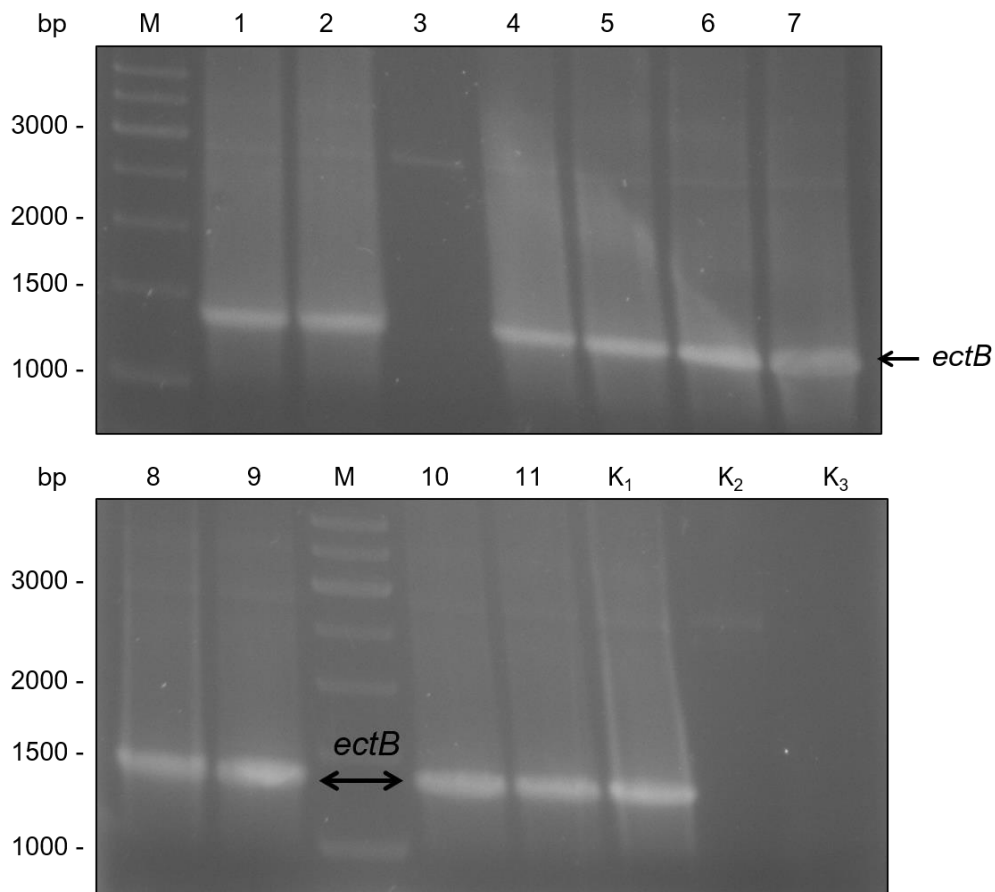
**Abb. 3.1: Restriktionsverdau von pK18mobsacB mit *EcoRI* und verschiedenen Zusätzen.** Der jeweilige Versuchsansatz wurde in mehreren Ausführungen angesetzt und die Reaktionen jeweils nach bestimmten Zeitpunkten mit 40 mM EDTA abgestoppt. Die Laufpurbeschriftung weist auf die Zeit in Minuten hin, nach der die Reaktion beendet wurde. Die Supplemente wurden in einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt. A) Kontrolle (Restriktion ohne Zusatz), B) OH-Ectoin, C)  $\alpha$ -Lysin, D) NAcL, E) NAßL, ni: *nicked* Form, li: linearisierte Form (5719 bp), sc: *supercoiled* Form, M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Ein solches „Doppelplasmid“ hätte eine Größe von 11.438 bp und korreliert so mit der Höhe der erwähnten Bande. Für diese Annahme würde z.B. die zunehmende Bandenstärke in Abb. 3.1 D und E von Minute 0 – 2 sprechen.

### 3.1.2 NAßL als PCR-Zusatz

Eine häufig eingesetzte Standardmethode der Molekularbiologie ist die PCR. Die Bestandteile der Reaktionsansätze bestimmen dabei den Verlauf der Reaktion und haben Einfluss auf das Endergebnis. So konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass auch die Konzentration an Cofaktoren wie z.B. Magnesium und die Wahl des zugehörigen Kations, oder die Menge an Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) entscheidende Einflüsse auf das Enzym und so die Produktmenge haben können (Leung *et al.*, 1989). Auch die DNA-Matrize hat mit ihrer spezifischen Zusammensetzung aus Purinen und Pyrimidinen erhebliche Auswirkung auf den Ablauf der PCR-Reaktion, da jeder der drei Hauptschritte, also die DNA-Denaturierung, die Primer-Hybridisierung und die Elongation auf diese abgestimmt werden müssen. Nur so kann das bestmögliche Ergebnis, nämlich der Erhalt von viel Produkt und wenig Nebenprodukt(en), erzielt werden. In den letzten Jahren konnte immer wieder gezeigt werden, dass bestimmte Substanzen, darunter auch kompatible Solute, PCR-Reaktionen beeinflussen können - Betain und Trehalose bspw. gelten als gebräuchliche Zusätze, weil sie u.a. die Schmelztemperatur der DNA senken und so die Elongation erleichtern (Henke *et al.*, 1997; Spiess *et al.*, 2004). Dies ist vor allem bei Guanin- (G) und Cytosin- (C) reichen DNA-Matrizen hilfreich, da diese durch eine erhöhte Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen über hohe Schmelztemperaturen verfügen, die wiederum negativ auf andere Schritte im PCR-Zyklus wirken oder sogar zum Abbruch der Reaktion führen können (McDowell *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob und welchen Einfluss NAßL auf eine PCR hat, wurde das Gen *ectB* aus dem  $\alpha$ -Proteobakterium *A. cryptum* DSM 2389<sup>T</sup> in Anwesenheit von NAßL amplifiziert (vgl. 2.5.2.2). *ectB<sub>Ac</sub>* kodiert eine L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase und weist einen GC-Gehalt von 70 % auf. Neben NAßL wurden auch noch andere Stoffe zum Vergleich auf ihren Einfluss getestet, darunter kompatible Solute, wie z.B. Ectoin oder OH-Ectoin, aber auch etablierte PCR-*Enhancer* wie Betain, Trehalose oder DMSO. Als Enzym wurde die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Diese DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ist ausgesprochen hitzestabil und hat eine hohe spezifische Aktivität, eine 3'→5'-Exonukleasefunktion findet sich hier allerdings nicht (Lawyer *et al.*, 1993). Als Reaktionskontrollen wurde jeweils ein PCR-Ansatz ohne Supplement, ohne Supplement/Polymerase und ohne Supplement/Matrize angesetzt.

In Abb. 3.2 sind die PCR-Produkte nach Auftrennung in 1 %-Agarosegelen dargestellt. Auffällig ist, dass im Reaktionsansatz ohne Zusatz ( $K_1$ ) bereits eine große Menge an Amplifikat gebildet werden konnte. Dies ist durch den erhöhten GC-Gehalt des Gens überraschend. Trehalose, Betain und DMSO haben ebenfalls keinen großen Einfluss auf die Amplifikat-Ausbeute; lediglich im Ansatz mit DMSO-Zugabe kann eine leicht erhöhte Produktmenge beobachtet werden (vgl. Abb. 3.2, Laufspur Nr. 9).



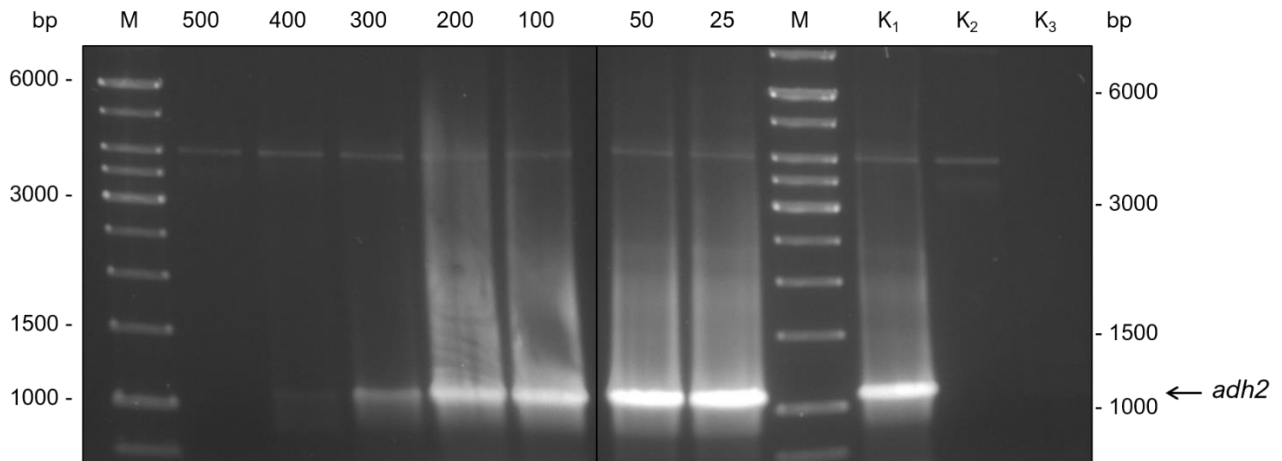
**Abb. 3.2: PCR von *ectB* aus *A. cryptum* DSM 2389<sup>T</sup> mit verschiedenen Zusätzen.** Als Matrixe für *ectB*<sub>Ac</sub> wurde das Plasmid pWUB\_ectB\_acry genutzt; das Amplifikat hat eine Größe von 1339 bp. Die Zusätze wurden jeweils in einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt. 1: Trehalose, 2: NA $\alpha$ L, 3: NA $\beta$ L, 4:  $\alpha$ -Lysin, 5: NAG, 6: NAGGN, 7: NA $\beta$ A, 8: Betain, 9: DMSO, 10: Ectoin, 11: OH-Ectoin, K<sub>1</sub>: Kontrolle ohne Supplement, K<sub>2</sub>: Kontrolle ohne Supplement/Polymerase, K<sub>3</sub>: Kontrolle ohne Supplement/Plasmid, M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Die beiden kompatiblen Solute Ectoin und OH-Ectoin haben keinen signifikanten Einfluss auf die hier detektierten Mengen an Amplifikat (vgl. Abb. 3.2, Laufspur 10, 11). Das war vor allem für OH-Ectoin nicht zu erwarten, da dieser Substanz inhibierende Wirkungen nachgesagt wird (Schnoor *et al.*, 2004). Das seltene Solut NAGGN und dessen Vorläufer NAG beeinflussen die PCR-Reaktion ebenfalls nicht, die Produktmenge ist mit der in der Kontrolle ( $K_1$ ) vergleichbar. Interessant ist der Vergleich zwischen der NA $\beta$ L-Vorstufe  $\alpha$ -Lysin, acetyliertem  $\alpha$ -L-Lysin, acetyliertem  $\beta$ -L-Alanin (NA $\beta$ A) und dem im Mittelpunkt der Untersuchung stehenden NA $\beta$ L.

Während NA $\alpha$ L und  $\alpha$ -Lysin keine Auswirkungen auf die PCR haben, ist die Produktausbeute mit NA $\beta$ A leicht erhöht – im starken Kontrast dazu bleibt im Ansatz mit NA $\beta$ L eine Produktbande komplett aus (vgl. Abb. 3.2, Laufspur 2, 3, 4, 7). Die Hypothese, dass die Acetylgruppe der hier getesteten Aminosäurederivate eindeutige Auswirkungen auf die PCR-Reaktion haben könnte, kann in Anbetracht der wenig in Einklang stehenden Ergebnisse in Laufspur 2, 3, 5, 6 und 7 (vgl. Abb. 3.2) nicht bestätigt werden. In allen Ansätzen befindet sich zusätzlich eine schwache Bande auf einer Höhe von ca. 2800 - 2900 bp; mit Ausnahme der Kontrolle ohne Plasmid (vgl. Abb. 3.2, Laufspur K<sub>3</sub>). Dieser Sachverhalt weist daraufhin, dass es sich hierbei nicht um ein Nebenprodukt handelt, sondern um das Plasmid, welches in der *supercoiled*- oder *nicked*-Form vorliegt.

Aufgrund des erhöhten GC-Gehalts von 70 % bietet sich das Gen *ectB* zwar in der Theorie als geeignete Matrize für die oben gezeigte Methode an; es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine Amplifikation ohne Zugabe jeglicher Supplemente große Produktausbeuten ermöglicht. Dementsprechend wurde eine weitere PCR mit den gleichen Supplementen, aber einer anderen DNA-Matrize angesetzt. Als Vorlage wurde das Gen *adh2* aus dem Archaeon *Halobacterium sp. NRC-1* gewählt, welches ebenfalls über einen GC-Gehalt von 70 % verfügt. Das Agarosegel der Produkte aus dieser PCR zeigt ein vergleichbares Bild zur supplementierten Amplifikation von *ectB<sub>Ac</sub>* (vgl. Abb. 6.1 im Anhang). Hier zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen den Bandenstärken der Kontrolle (K<sub>1</sub>) und den PCR-Reaktionen mit Zusätzen. Erneut bleibt ein Produkt im Ansatz mit NA $\beta$ L als Zusatz aus, was auf eine Inhibierung der Reaktion hindeutet.

Um diese mögliche Inhibierung näher zu untersuchen, wurde abermals eine PCR mit *adh2* durchgeführt, wobei diesmal lediglich NA $\beta$ L supplementiert wurde. Dabei wurde die Konzentration ausgehend von 500  $\mu$ M gesenkt, um einen Punkt zu erreichen, an dem die Inhibierung aufgehoben und die Produktbildung wieder ermöglicht wird (vgl. Abb. 3.3). Das hier präsentierte Bild bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse (vgl. Abb. 3.2) und ermöglicht außerdem eine weiterführende Beurteilung. Die Ergebnisse der PCR zeigen deutlich, dass bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M die Reaktion komplett inhibiert wird, ab 400  $\mu$ M aber eine schwache Produktbande auf einer Höhe von ca. 1000 bp sichtbar ist. Die Menge des Amplifikats steigt mit jeder weiteren Erniedrigung der NA $\beta$ L-Konzentration an. Die Bandenstärke des Produkts bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M NA $\beta$ L übertrifft sogar leicht die der Kontrolle ohne Solutzugabe (vgl. Abb. 3.3, Laufspur K<sub>1</sub>). Eine schwach sichtbare Bande auf Höhe von ca. 4000 bp in jeder Reaktion (außer K<sub>3</sub>) weist auf die *supercoiled*- oder *nicked*-Form der DNA-Matrize hin.



**Abb. 3.3: PCR von *adh2* aus *Halobacterium* sp. NRC-1 mit NAβL als Zusatz in verschiedenen Konzentrationen.** Als Matrize für *adh2* wurde das Plasmid pWUB\_His\_*adh2* genutzt; das Amplifikat hat eine Größe von 1059 bp. Die Laufspurbeschriftung weist auf die genutzte Konzentration an NAβL hin (500 - 25 μM). K<sub>1</sub>: Kontrolle ohne NAβL, K<sub>2</sub>: Kontrolle ohne NAβL/Polymerase, K<sub>3</sub>: Kontrolle ohne NAβL/Plasmid, M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Die in den hier gezeigten Versuchen genutzten Substanzen wurden in einer Konzentration von 500 μM eingesetzt; eine signifikante Auswirkung der bereits bekannten Zusätze wie Betain, Trehalose, DMSO, Ectoin oder OH-Ectoin war aufgrund dieser niedrigen Konzentration nicht zu erwarten (Henke *et al.*, 1997; Schnoor *et al.*, 2004; Shen & Hohn, 1992; Spiess *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu verringert NAβL als Supplement in der PCR nicht nur die Produktmenge, sondern inhibiert die Reaktion sogar vollständig. Andere acetylierte Verbindungen oder β-Aminosäuren (bzw. -Derivate) haben im Vergleich keinen Effekt auf die Produktmenge (vgl. Abb. 3.2 und Abb. 6.1, Laufspuren 2, 5, 6, 7). Ähnliche Ergebnisse können beim Restriktionsverdau des Plasmids pK18mobsacB durch *Eco*RI beobachtet werden (vgl. Abb. 3.1). Hier sorgt die Zugabe von NAβL ebenfalls für eine signifikante Verzögerung der gesamten Reaktion.

Weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung von NAβL könnten z.B. DNA-Schmelzkurven unter dem Einfluss verschiedener kompatibler Solute, oder protektive Auswirkungen auf Proteine gegen Hitze oder Gefrierzyklen umfassen (Göller & A. Galinski, 1999; Rees *et al.*, 1993).

### 3.2 Clusterexpression der NA $\beta$ L-Synthesegene aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>

Bisherige Arbeiten zur heterologen Synthese von NA $\beta$ L umfassten die Expression der Gene *abIA* und *abIB* aus *Ms. mazei* Gö1 (Hövels, 2015b, 2015a; Lohberger, 2009; Möller, 2011). Dabei war es möglich, beide Proteine mittels Western Blot-Analysen in löslicher Form zumindest in *H. elongata*-Stämmen nachzuweisen (Möller, 2011; Hövels, 2015a); dies gelang für Expressionsstämme von *E. coli* bislang nicht. Ein Indiz für die Aktivität beider Proteine - also der Beleg eines Zwischen- oder Endproduktes konnte nicht erbracht werden. Die bisherige Anzucht von Expressionskulturen wurde bisher außerdem ausschließlich bei Anwesenheit von Sauerstoff durchgeführt. Diese Vorgehensweise steht in starkem Kontrast zu Angaben aus der Literatur, aus denen hervorgeht, dass die heterologe Produktion von sauerstoffempfindlichen L-Lysin 2,3-Aminomutasen aus anaeroben, methanogenen Archaeen eine Anzucht unter Ausschluss von Sauerstoff bedingt (Behshad *et al.*, 2006; Hung & Lai, 2013; Sowers *et al.*, 1990). Aufgrund dieser wenig überzeugenden Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen wurden für die vorliegende Arbeit zwei Thesen in Bezug auf die Produktion von NA $\beta$ L aufgestellt, die die weitere Vorgehensweise bestimmt haben:

- 1) *Ms. mazei* Gö1 ist als einzelner Donorstamm für beide Biosynthesegene von NA $\beta$ L ungeeignet
- 2) Für den weiteren Einsatz der beschriebenen archaealen Gene, bzw. Proteine ist der Ausschluss von Sauerstoff unerlässlich

Dementsprechend wurde zunächst der Fokus daraufgelegt, einen alternativen Ursprungsorganismus für die Gene der L-Lysin 2,3-Aminomutase und der  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase zu finden. Eine anaerobe Anzucht der hier genutzten Expressionsorganismen ist grundsätzlich möglich, jedoch wirkt sich eine obligat anaerobe Kultivierung negativ auf die Energiegewinnung und somit u.a. auf Wachstumsrate und Effektivität der Proteinproduktion aus (Fuchs *et al.*, 2007). In Folge dessen wurde das fakultativ anaerobe Bakterium *Bacillus subtilis* als Donorstamm ausgewählt. Die auf dem Genom vorliegende Transkriptionseinheit *yodT-yodS-yodR-yodQ-yodP-kamA* beinhaltet mit *yodP* und *kamA* zwei *abIA*- und *abIB*-homologe Gene (vgl. Tab. 3.1).

KamA<sub>BS</sub> verfügt über die konservierte Aminosäuresequenz **CSMYCRYCTRRRF** (C<sub>134</sub>-F<sub>146</sub>) des Eisen-Schwefel-Bindemotivs, das SAM-Bindemotiv DAPGGGK und über die putativen PLP-Bindemotive **LVKIRV** (L<sub>288</sub>-V<sub>293</sub>), die u.a. auch in der umfangreich untersuchten L-Lysin 2,3-Aminomutase von *C. subterminale* SB4 zu finden sind (Chen *et al.*, 2000; Ruzicka *et al.*, 2000).

**Tab. 3.1: Ergebnisse ausgewählter Blastp-Analysen der Proteinsequenzen KamA<sub>Bs</sub> und YodP aus *B. subtilis* DSM10<sup>T</sup> gegen die Proteinsequenzen AbIA und AbIB aus *Ms. mazei* Gö1. E-Wert: Zufälligkeitsparameter. NCBI-Zugangsnummern: KamA<sub>Bs</sub> (NP\_389850.1), YodP (NP\_389851.1), AbIA (AAM30630.1; MM\_0934), AbIB (AAM30631.1; MM\_0935)**

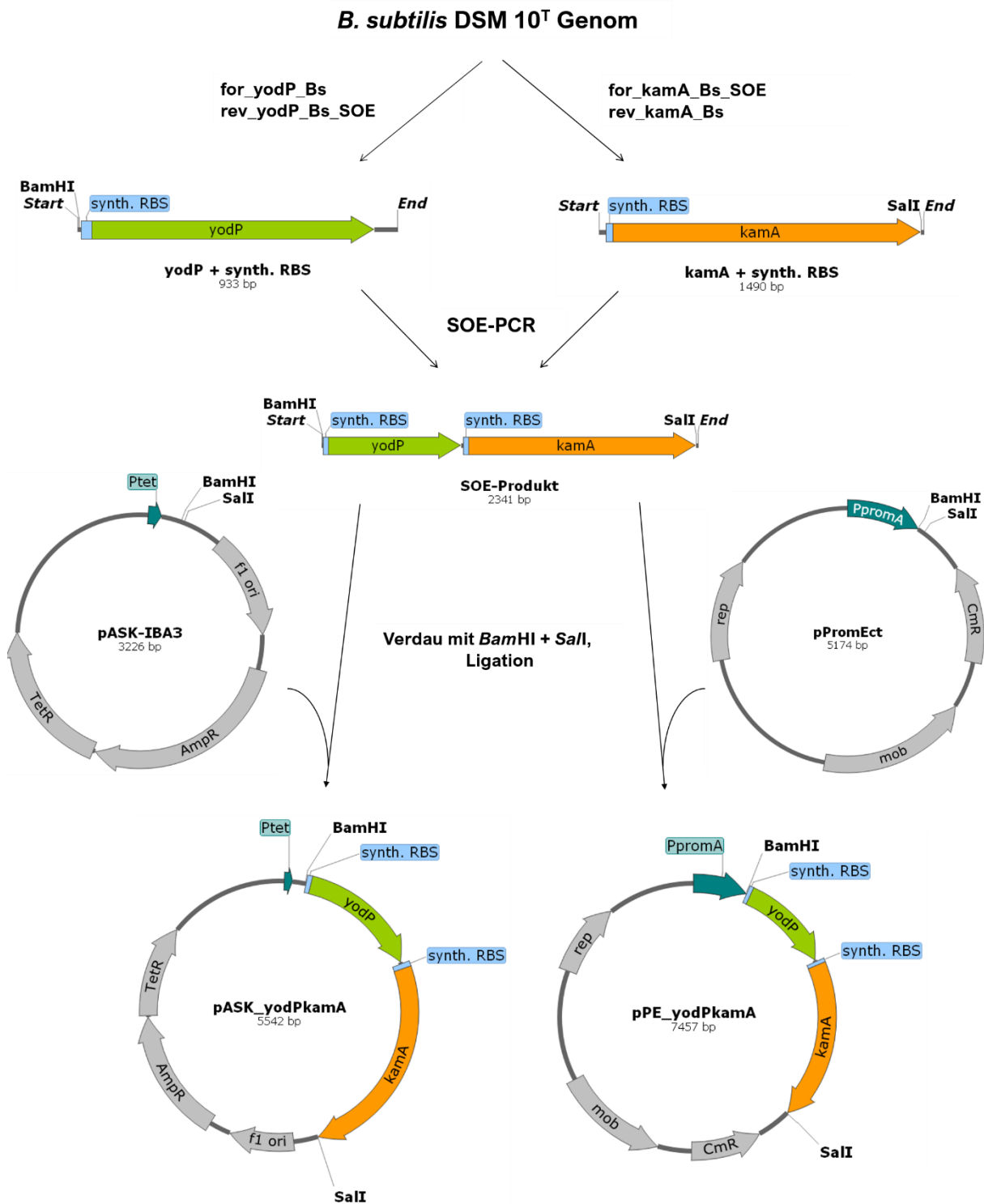
| Protein                   | Länge (Aminosäuren) | Sequenzabdeckung | E-Wert            | Sequenzidentität |
|---------------------------|---------------------|------------------|-------------------|------------------|
| KamA <sub>Bs</sub> / AbIA | 471 / 419           | 86 %             | e <sup>-149</sup> | 50,6 %           |
| YodP / AbIB               | 275 / 271           | 89 %             | 2e <sup>-42</sup> | 33,5 %           |

Die Expression der gesamten Transkriptionseinheit durch den Transkriptionsfaktor SigE ist zwar während der Sporulation von *B. subtilis* hochreguliert, ein Nachweis von NAßL während des vegetativen Wachstums oder unter Salzstress konnte bisher allerdings nicht erbracht werden (Müller *et al.*, 2011). Die homologe, Induktor-gesteuerte Überexpression der beiden Gene *yodP* und *kamA* führte zu einer NAßL-Menge von 0,28 µmol/mg Protein (Müller *et al.*, 2011). Von einer heterologen Expression der Synthesegene wurde bis zu diesem Zeitpunkt nicht berichtet; aufgrund der postulierten Sauerstofftoleranz der resultierenden Proteine wurde dieser Ansatz in der vorliegenden Arbeit jedoch weiterverfolgt.

### 3.2.1 Vektorkonstruktion von pPE\_yodPkamA und pASK\_yodPkamA

Für die heterologe Expression des Teil-Genclusters *yodP-kamA<sub>Bs</sub>* in *H. elongata* wurde ein neuer Vektor auf Basis von pPromEct konstruiert. Dieser verfügt über die Promotorregion *promA* aus *H. elongata* selbst, welche eine NaCl-abhängige Expression der stromabwärts liegenden Gene ermöglicht (Brünig, 2005, Stiller *et al.*, 2018). Für die Expression in *E. coli* wurde als Basis das Plasmid pASK-IBA3 genutzt. Beide Vektoren erhielten die gleiche kombinierte Sequenz der beiden Gene *yodP* und *kamA<sub>Bs</sub>* und einer jeweils vorangestellten synthetischen Ribosomenbindestelle. Als DNA-Matrize für beide Gene diente die genomische Sequenz von *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>. Für die Amplifikation von *yodP* wurden die Primer for\_yodP\_Bs und rev\_yodP\_Bs\_SOE genutzt (vgl. Tab. 2.10). Das Gen *kamA<sub>Bs</sub>* wurde mithilfe der Primer for\_kamA\_Bs\_SOE und rev\_kamA\_Bs (vgl. Tab. 2.10) amplifiziert. Der 5'-Primer für *yodP*, sowie der 3'-Primer für *kamA<sub>Bs</sub>* zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass beide zueinander komplementär sind. So konnte eine anschließende SOE-PCR mit den beiden PCR-Produkten durchgeführt werden (vgl. 2.5.2.4). Das SOE-PCR-Produkt wurde anschließend mittels der Schnittstellen *Bam*HI und *Sall* entweder in den Vektor pPromEct stromabwärts des *promA*-Promotors, oder in den Vektor pASK-IBA3 stromabwärts des *tet*-Promotors integriert (vgl. Abb. 3.4). Nach der Ligation des SOE-Produkts mit dem jeweiligen Vektorrückgrat wurden beide Vektoren durch Transformation in *E. coli* DH5a eingebracht.



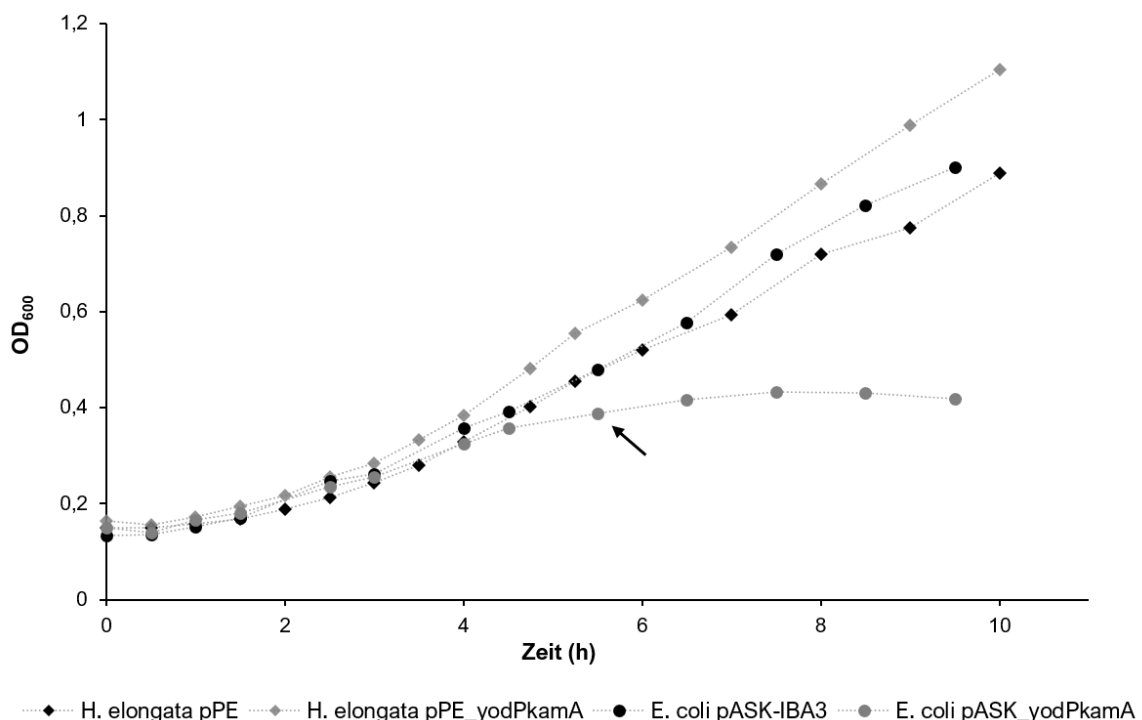


**Abb. 3.4: Vektorkonstruktion von pASK\_yodPkamA und pPE\_yodPkamA.** Die beiden Gene *yodP* und *kamA<sub>Bs</sub>* wurden mittels Gradienten-PCR aus dem Genom von *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> amplifiziert und durch eine SOE-PCR zu einem Molekül verbunden. Dieses wurde anschließend über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in pASK-IBA3, bzw. pPromEct eingebracht. AmpR: Ampicillinresistenz, CmR: Chloramphenicolresistenz, TetR: Tet-Repressor, Ptet: *tet*-Promotor, PpromA: *promA*-Promotor, ori: Replikationsursprung, rep: Replikationsgene, mob: Mobilisationsgene

Nach der Kontrolle auf die erfolgreiche Klonierung wurde außerdem pPE\_yodPkamA über eine weitere Transformation in *E. coli* S17.1 eingebracht und durch anschließende Konjugation in den Zielorganismus *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> transferiert (vgl. 2.5.5, 2.5.7 und 2.5.8)

### 3.2.2 Expressionsversuche bei Standardbedingungen

Erste Versuche zur heterologen Expression der *Bacillus*-Synthesegene und der damit verbundenen Produktion von NA $\beta$ L wurden in MM63-Medium und 0,5 % NaCl bei der Anzucht von *E. coli* DH5a, sowie bei 3 % NaCl bei der Anzucht von *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> durchgeführt (vgl. 2.4.7). Die Induktion der Genexpression von *yodP* und *kamA<sub>Bs</sub>* erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 mit Anhydrotetracyclin (AHT) in *E. coli*, bzw. durch einen Salzschock auf 7 % NaCl im Fall von *H. elongata*. Abb. 3.5 stellt beispielhaft den Wachstumsverlauf der Expressionsstämme dar. Das Wachstumsverhalten der *Halomonas*-Stämme zeigt dabei, gemeinsam mit dem Kontrollstamm *E. coli* pASK-IBA3, keine Auffälligkeiten. Sehr deutlich ist jedoch ein starker Einbruch des Wachstums von *E. coli* pASK\_yodPkamA ab ca. 5,5 h zu beobachten (Abb. 3.5, Pfeil).



**Abb. 3.5: Exemplarischer Wachstumsverlauf unter Standardbedingungen mit dem Gencluster *yodP-kamA*.** *E. coli* pASK\_yodPkamA und *H. elongata* pPE\_yodPkamA, sowie die dazugehörigen Kontrollstämme mit Leervektor wurden in MM63-Medium mit 0,5 %, bzw. 3 % NaCl im Nasenkolben angezogen und bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 mit AHT, bzw. durch Salzschock auf 7 % NaCl induziert. Das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung ist jeweils dargestellt.

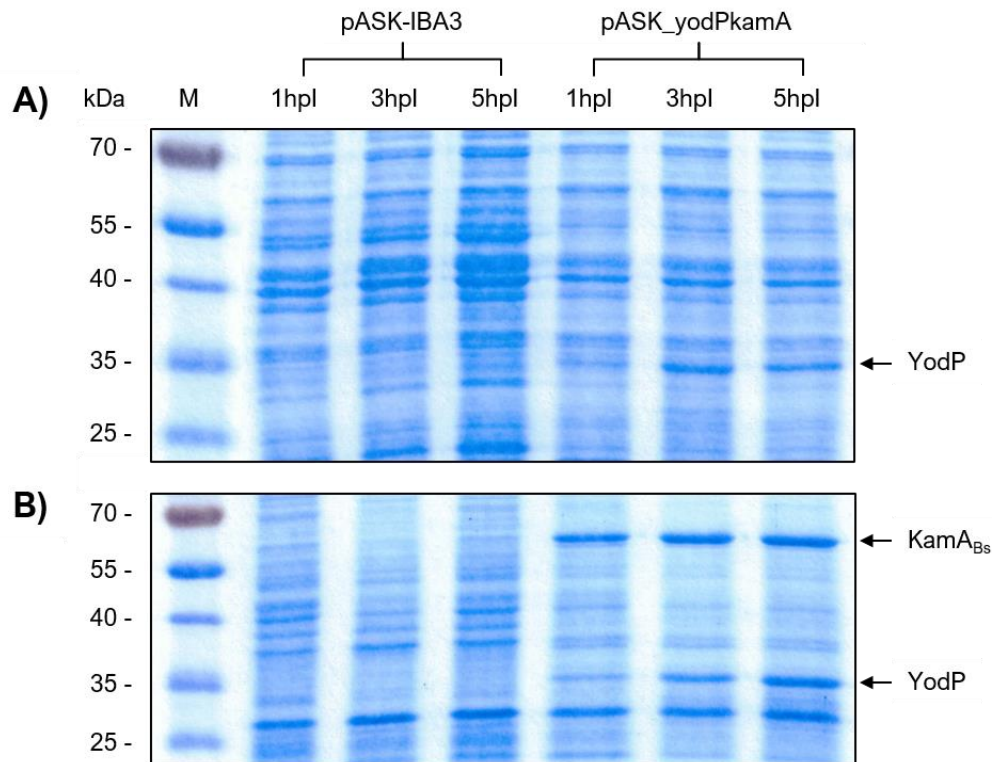
Dieser Einbruch korreliert mit der Induktion der Kultur durch AHT und weist daraufhin, dass die Expression der auf dem Vektor befindlichen Gene signifikante Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit hat. Die Wachstumsraten aller Stämme bis zur Induktion sind mit Werten zwischen 0,22 – 0,28 h<sup>-1</sup> und einer dazugehörigen Verdopplungsgeschwindigkeit von ca. 2,5 - 3 h für Wachstum in Minimalmedium unauffällig (vgl. Tab. 3.2). Zur Untersuchung der Proteinproduktion wurden 1, 3 und 5 h nach der Induktion jeweils 5 mL-Proben aller Kulturen genommen und aus dem darin enthaltenen Gesamtzellprotein jeweils die lösliche und die unlösliche Proteinfraction mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. 2.6.4).

**Tab. 3.2: Durchschnittliche Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von *H. elongata* pPE\_yodPkamA und *E. coli* DH5α pASK\_yodPkamA.**  $\mu$ : Wachstumsrate  $t_d$ : Verdopplungszeit.

| Stamm                             | $\mu$ [h <sup>-1</sup> ] | $t_d$ [h] |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------|
| <i>H. elongata</i> pPE            | 0,26                     | 2,68      |
| <i>H. elongata</i> pPE_yodPkamA   | 0,27                     | 2,60      |
| <i>E. coli</i> DH5α pASK-IBA3     | 0,28                     | 2,52      |
| <i>E. coli</i> DH5α pASK_yodPkamA | 0,22                     | 3,15      |

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Analysen für jeweils eine Kultur von *E. coli* DH5α pASK\_yodPkamA, sowie dem dazugehörigen Kontrollstamm *E. coli* DH5α pASK-IBA3 gezeigt (vgl. Abb. 3.6). Die SDS-PAGE der verschiedenen Proteinfractionen aus Kulturen von *H. elongata* pPE\_yodPkamA zeigt weder die Produktion von YodP noch von KamA<sub>Bs</sub>, weshalb diese Daten nicht aufgeführt sind.

Eine lösliche Produktion von YodP in *E. coli* DH5α ist bereits eine Stunde nach Induktion schwach zu erkennen; 3 - 5 h Stunden post-Induktion ist diese Bande deutlich verstärkt (vgl. Abb. 3.6 A). KamA<sub>Bs</sub> kann in der löslichen Fraktion nicht nachgewiesen werden. Ein anderes Bild ergibt sich bei der Analyse der unlöslichen Proteinfraction. Hier ist ein Nachweis beider Proteine im Expressionsstamm möglich. Es finden sich bereits eine Stunde nach Induktion deutliche Mengen von KamA<sub>Bs</sub> auf Höhe von ca. 60 kDa, auch wenn das Protein eine errechnete Größe von 54,1 kDa besitzt (vgl. Abb. 3.6 B). In der unlöslichen Proteinfraction ist außerdem ein schrittweise erfolgreicher Anstieg der Menge an YodP in der Expressionskultur sichtbar (Abb. 3.6 B), der positiv mit der Kultivierungszeit korreliert.



**Abb. 3.6: SDS-PAGE von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodPkamA.** Die Stämme wurden in MM63-0,5 kultiviert. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden Proben 1, 3 und 5 h nach der Induktion der Genexpression mit AHT entnommen und die lösliche (**A**), sowie die unlösliche Proteinfraction (**B**) aufgereinigt und aufgetragen (20  $\mu$ g Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für YodP (31,2 kDa) und KamA<sub>Bs</sub> (54,1 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. pASK-IBA3: Kontrollkultur mit Leervektor; M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Zeitgleich zur Probennahme für die Proteinanalyse wurden außerdem Proben zur Untersuchung mittels HPLC aus den Kulturen entnommen. Diese wurden pelletiert, gefriergetrocknet und einer Bligh & Dyer-Extraktion (B&D-Extraktion) unterzogen. Anschließend erfolgte die Derivatisierung der Extrakte für die Analyse durch die FMOC-ADAM-HPLC (vgl. 2.7.1 - 2.7.3). Ein Nachweis des Zwischenprodukts  $\beta$ -Lysin, bzw. von NA $\beta$ L konnte jedoch weder für die Expressionskulturen von *E. coli* DH5a noch für die von *H. elongata* erbracht werden.

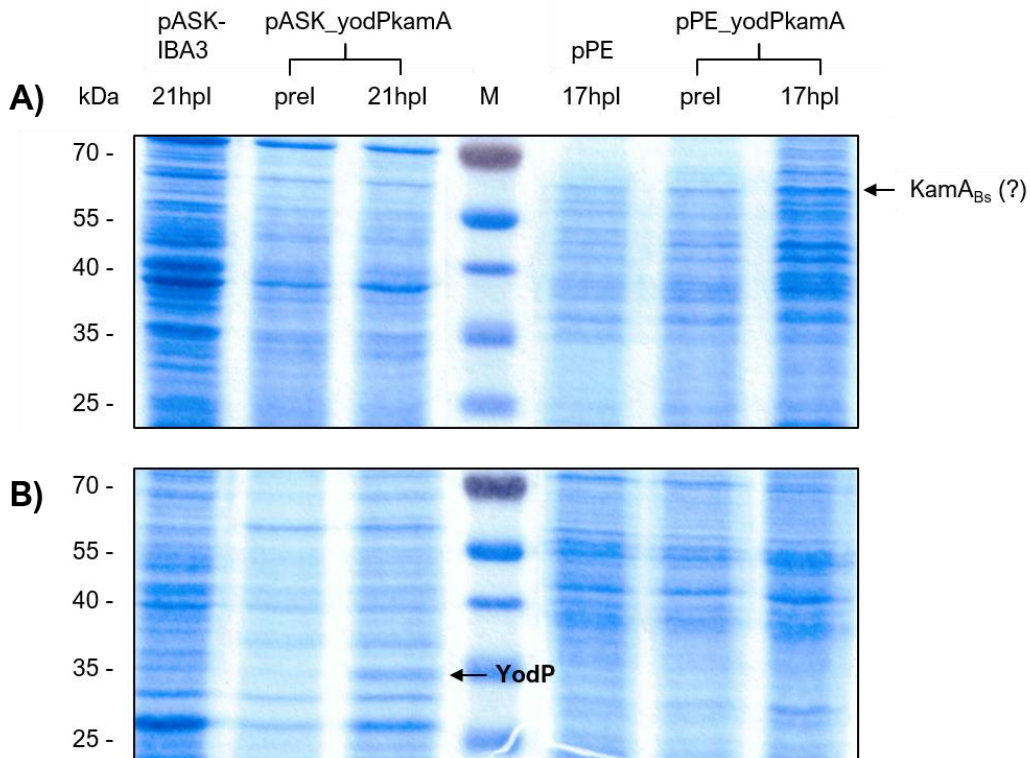
Diese ersten Versuche mit den neu konstruierten Vektoren konnten zeigen, dass *E. coli* DH5 $\alpha$  in der Lage ist die für die Synthese von NA $\beta$ L benötigten Enzyme aus *B. subtilis* zu produzieren. Diese liegen jedoch größtenteils in der unlöslichen Proteinfraction vor. Das Zwischen-, bzw. Endprodukt konnte mittels HPLC-Messungen nicht nachgewiesen werden, was auf dysfunktionale Proteine oder eine nicht ausreichende Menge löslicher Proteine hinweisen kann. In *H. elongata* konnten weder die benötigten Proteine noch das Produkt nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Expressionsversuche bei niedriger Temperatur

Die unter 3.2.2 dargestellten Ergebnisse zeigen die grundsätzliche Funktionalität der konstruierten Vektoren in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Um die Konzentration an löslichem Protein zu erhöhen wurde im darauffolgenden Versuch die Wachstumstemperatur gesenkt; so sollte eine Verlangsamung des Stoffwechsels und eine langsamere Proteinbiosynthese forciert werden. Die Kultivierung erfolgte analog zu 3.2.2 (vgl. auch 2.4.7), wobei alle Kulturen bis zur Induktion der Genexpression bei 30 °C inkubiert wurden. Nach der Induktion mit AHT (Kulturen von *E. coli*), bzw. durch einen Salzschock auf 10 % NaCl (Kulturen von *H. elongata*) wurde die Temperatur weiter auf 20 °C abgesenkt.

Der Wachstumsverlauf der angelegten Kulturen war mit dem in Abb. 3.5 gezeigten Verlauf vergleichbar. Bis auf die Kontrollkulturen von *H. elongata* pPE, welche mit einer Wachstumsrate von 0,15 h<sup>-1</sup> und einer Verdopplungszeit von ~4,7 h ein deutlich langsames Wachstum zeigten, entsprachen die Wachstumskurven aller anderen Kulturen den vorherigen Versuchen (vgl. auch Tab. 3.2). Für den Vergleich mit der Proteinproduktion bei Standardbedingungen wurden ebenfalls Kulturproben für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE bzw. FMOC-ADAM-HPLC genommen.

Im Folgenden sind die SDS-PAGE-Analysen für jeweils eine Kultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodPkamA und *H. elongata* pPE\_yodPkamA, sowie den dazugehörigen Kontrollstämmen gezeigt (vgl. Abb. 3.7). Hierbei kann keine deutliche lösliche Produktion von KamA<sub>Bs</sub> in *H. elongata* pPE\_yodPkamA nachgewiesen werden. In den stationären Proben des Expressionsstammes befindet sich eine Bande, die möglicherweise zur L-Lysin 2,3-Aminomutase passt; eine deutliche Abgrenzung von *Halomonas*-eigenen Proteinen ist jedoch nicht möglich (vgl. Abb. 3.7 A). Im *E. coli*-Expressionsstamm ist keine lösliche Produktion von KamA<sub>Bs</sub> sichtbar. Eine deutliche Bande für die  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase YodP ist lediglich in der unlöslichen Proteinfraction der stationären Proben des *E. coli*-Expressionsstammes wiederzufinden (vgl. Abb. 3.7 B). Die Proben von *H. elongata* pPE\_yodPkamA weisen kein YodP auf, weder löslich noch unlöslich. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Absenkung der Temperatur während der Produktionsphase der heterologen Syntheseproteine keine erhöhte lösliche Proteinproduktion zur Folge hatte. Während ein Nachweis der Proteine in den Expressionskulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$  sich sogar diffiziler gestaltet als in vorherigen Versuchen (vgl. 3.2.2), gibt es hier zumindest Hinweise auf lösliches KamA in *H. elongata*-Expressionskulturen (Abb. 3.7 A).



**Abb. 3.7: SDS-PAGE von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodPkamA und *H. elongata* pPE\_yodPkamA.** Die Stämme wurden in MM63 mit 0,5 %, bzw. 3 % NaCl bei 30 °C kultiviert, nach der Induktion der Genexpression mit AHT, bzw. durch Salzschock, wurde die Temperatur auf 20 °C abgesenkt. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden Proben vor Induktion (prel) und in der stationären Phase nach Induktion (17/21hpl) entnommen und die lösliche (A), sowie die unlösliche Proteinfraction (B) aufgereinigt und aufgetragen (20  $\mu$ g Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für YodP (31,2 kDa) und KamA (54,1 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse kann allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass die Proben nach Induktion vergleichsweise spät genommen wurden (17 h nach Induktion vs. max. 5 h nach Induktion in 3.2.2). Es ist demnach möglich, dass ein Teil der produzierten Proteine bereits wieder abgebaut wurde. Der Nachweis des Zwischenprodukts  $\beta$ -Lysin oder des Endproduktes NA $\beta$ L durch die Analyse von Zellextrakt mittels FMOC-ADAM-HPLC konnte auch in diesem Versuch nicht erbracht werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.4 Sequenzuntersuchung der Expressionsvektoren

Eine Untersuchung des klonierten Genbereichs *yodP-kamA<sub>Bs</sub>* durch eine Teilsequenzierung des Vektors pASK\_yodPkamA (vgl. 6.2 im Anhang) ergab eine Mutation im Gen *yodP*. Diese Mutation äußert sich durch Einbau eines weiteren Thymins nach Base 650 der  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase (Base 865 im Vektor) und sorgt für eine Leserasterverschiebung, die die Entstehung eines Stopcodons und somit eines ca. 18 Aminosäuren (AS) kürzeren Proteins zur

Folge hat (vgl. Abb. 3.8). Diese Verkürzung hat (1) Auswirkungen auf die N-Acetyltransferase-Domäne, die für den Abschnitt der Aminosäuren 125 - 271 annotiert ist (Interpro-/Prosite-Analyse, Kennungsnr. O34895) und sorgt (2) für eine signifikante Verschiebung des isoelektrischen Punkts (pI) des Enzyms von 5,76 auf 7,56.

Weitere Mutationen konnten mittels Sequenzierung nicht festgestellt werden. In Folge der genaueren Untersuchung der hier genutzten Gensequenzen fiel auf, dass das Startcodon von *kamA<sub>Bs</sub>* durch Leucin mit dem Triplet T TG (bzw. UUG) kodiert wird. 13 % der proteinkodierenden Sequenzen sind im Ursprungsorganismus *B. subtilis* mit einem Leucin als Startcodon ausgestattet, hauptsächlich ist jedoch Methionin (ATG, bzw. AUG) mit 87 % als Initialtriplett vorzufinden (Rocha *et al.*, 1999). Dies ist mit ~82,6 % auch in *E. coli* K12 der Fall, als zweithäufigstes Startcodon ist jedoch GTG mit ~14,3 % zu finden; die Basenfolge T TG bildet mit ~3 % den geringsten Anteil (Blattner *et al.*, 1997).

|                                  |  |      |
|----------------------------------|--|------|
| pASK_yodPkamA ( <i>in situ</i> ) | TTTTTAATCGAGGCGTTAGAAAAAGAAATGGCTGGAGAGGATATCGTTCATGTG<br>Phe Leu Ile Glu Ala Leu Glu Lys Glu Met Ala Gly Glu Asp Ile Val His Val  | 902  |
| Teilsequenzierung                | TTTTTAATCGAGGCGTTTAGAAAAAGAAATGGCTGGAGAGGATATCGTTCATGT<br>Phe Leu Ile Glu Ala Phe Arg Lys Arg Asn Gly Trp Arg Gly Tyr Arg Ser Cys  |      |
| pASK_yodPkamA ( <i>in situ</i> ) | TTTTCTCTCGCCCGTGCTTCGTCTTTTGGGATGAATGCTGTGTTGTACCATTCA<br>Phe Ser Leu Ala Arg Ala Ser Ser Phe Gly Met Asn Ala Val Leu Tyr His Ser  | 956  |
| Teilsequenzierung                | GTTTTCTCTCGCCCGTGCTTCGTCTTTTGGGATGAATGCTGTGTTGTACCATTCC<br>Val Phe Ser Arg Pro Cys Phe Val Phe Trp Asp Glu Cys Cys Val Val Pro Phe |      |
| pASK_yodPkamA ( <i>in situ</i> ) | GGTTATCAGTATGGCGGAAGGCTGATCAATAATTGCTTTATAGCCGAAGGCCTT<br>Gly Tyr Gln Tyr Gly Gly Arg Leu Ile Asn Asn Cys Phe Ile Ala Glu Gly Leu  | 1010 |
| Teilsequenzierung                | AGGTTATCAGTATGGCGGAAGGCTGATCAATAATTGCTTTATAGCCGAAGGCCT<br>Arg Leu Ser Val Trp Arg Lys Ala Asp Gln STOP                             |      |
| pASK_yodPkamA ( <i>in situ</i> ) | GAAAACATGAATATTTGGTGCAAGCAACTGTAA<br>Glu Asn Met Asn Ile Trp Cys Lys Gln Leu STOP  | 1043 |
| Teilsequenzierung                | TGAAAACATGAATATTTGGTGCAAGCAACTGTA  |      |

**Abb. 3.8: Vergleich der *in situ*-Sequenz des Vektors pASK\_yodPkamA und der dazugehörigen Sequenzierung.** Die vergleichenden Abschnitte stellen die letzten ca. 195 Basen von *yodP* dar. Die obere Zeile bildet die Basensequenz ab, die der Vektor laut *in situ*-Konstruktion vorweist. Darunter ist vergleichend die Basenfolge gezeigt, die laut Sequenzierung des Plasmids tatsächlich besteht. Das Triplet mit Mutation, deren Folge eine Leserasterverschiebung des Gens *yodP* ist, ist umrahmt (Einbau eines zusätzlichen Thymins nach Base 865 des Vektors). STOP: Stopcodon TAA.

*E. coli* DH5 $\alpha$  ist ebenfalls auf einen K-Stamm zurückzuführen (Hanahan, 1983), weshalb im Folgenden davon ausgegangen wurde, dass die dortige statistische Verteilung der Startcodons in proteinkodierenden Sequenzen vergleichbar ist und Leucin nur verhältnismäßig selten genutzt wird. Die hier konstruierten Vektoren weisen (1) eine Mutation in der für die  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase kodierende Gensequenz *yodP* auf. Dies hat zur Folge, dass ein verkürztes Protein mit einem signifikant verschobenen *pI* produziert wird. (2) Zusätzlich besitzt das im Vektor enthaltene Gen *kamA<sub>Bs</sub>* mit Leucin ein eher ungewöhnliches Startcodon, welches trotz deutlichem Nachweis von KamA in der unlöslichen Proteinfraction (vgl. Abb. 3.6 B) nicht effektiv von *E. coli* genutzt werden kann. Die oben gezeigten Daten müssen aufgrund der oben genannten Ursachen bereits hier als Misserfolg gedeutet werden. Ob der Tatsache, dass sie jedoch die Grundlage für weiterführende Untersuchungen bildeten (vgl. 3.3 und 3.4), wurden sie hier dementsprechend aufgeführt. In weiteren Versuche lag der Fokus auf der Expression einer L-Lysin 2,3-Aminomutase, um die Synthese von NA $\beta$ L schrittweise zu etablieren und einen möglichen Nachweis des Zwischenprodukts  $\beta$ -Lysin erbringen zu können. Ausreichende Informationen zu *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> bzgl. der statistischen Verteilung von Startcodons stehen bis zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung, auch wenn der allgemeine Codon-Gebrauch (*codon usage*) des Bakteriums bekannt ist. Da *E. coli* und *H. elongata* die systematische Einteilung in die Klasse der Gammaproteobakterien teilen und dementsprechend einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen, wurde der gleiche Ansatz für weitere Expressionsvektoren gewählt (Euzéby, 1997; Parte, 2014). Für die weitere Nutzung des Gens *kamA<sub>Bs</sub>* aus *B. subtilis* in Expressionsvektoren für *E. coli* und *H. elongata* wurde das Startcodon Leucin (TTG) durch ein Methionin (ATG) ausgetauscht (vgl. 3.3 und 3.4.1.1, bzw. 3.4.1.2).



### 3.3 NA $\beta$ L-Synthese in *H. elongata*

Frühere Arbeiten zur NA $\beta$ L-Synthese in *H. elongata* beschäftigten sich mit der Produktion der archaealen Proteine AblA und AblB aus *Ms. mazei* Gö1. Beide Proteine konnten durch Western Blots in löslicher Form nachgewiesen werden, ein Nachweis für die Synthese des Solut NA $\beta$ L gelang jedoch nicht (Hövels, 2015a; Möller, 2011). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsvektoren konstruiert, die die NA $\beta$ L-Synthesegene aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> tragen (vgl. 3.2). Eine effektive Nutzung dieser Vektoren in *H. elongata* muss jedoch aufgrund einer Mutation im Gen *yodP*, sowie einem für *H. elongata* ungewöhnlichen Startcodon im Gen *kamA<sub>Bs</sub>* als erfolglos gesehen werden. Als Konsequenz dessen wurde der Fokus auf die funktionelle Expression von *kamA<sub>Bs</sub>* (L-Lysin 2,3-Aminomutase) gelegt. In späteren Untersuchungen wurde dann die  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase in Expressionsvektoren und -versuchen miteinbezogen (vgl. 3.3.2). Das Zwischenprodukt  $\beta$ -Lysin sollte dort nachfolgend als Substrat für die Produktion von NA $\beta$ L dienen.

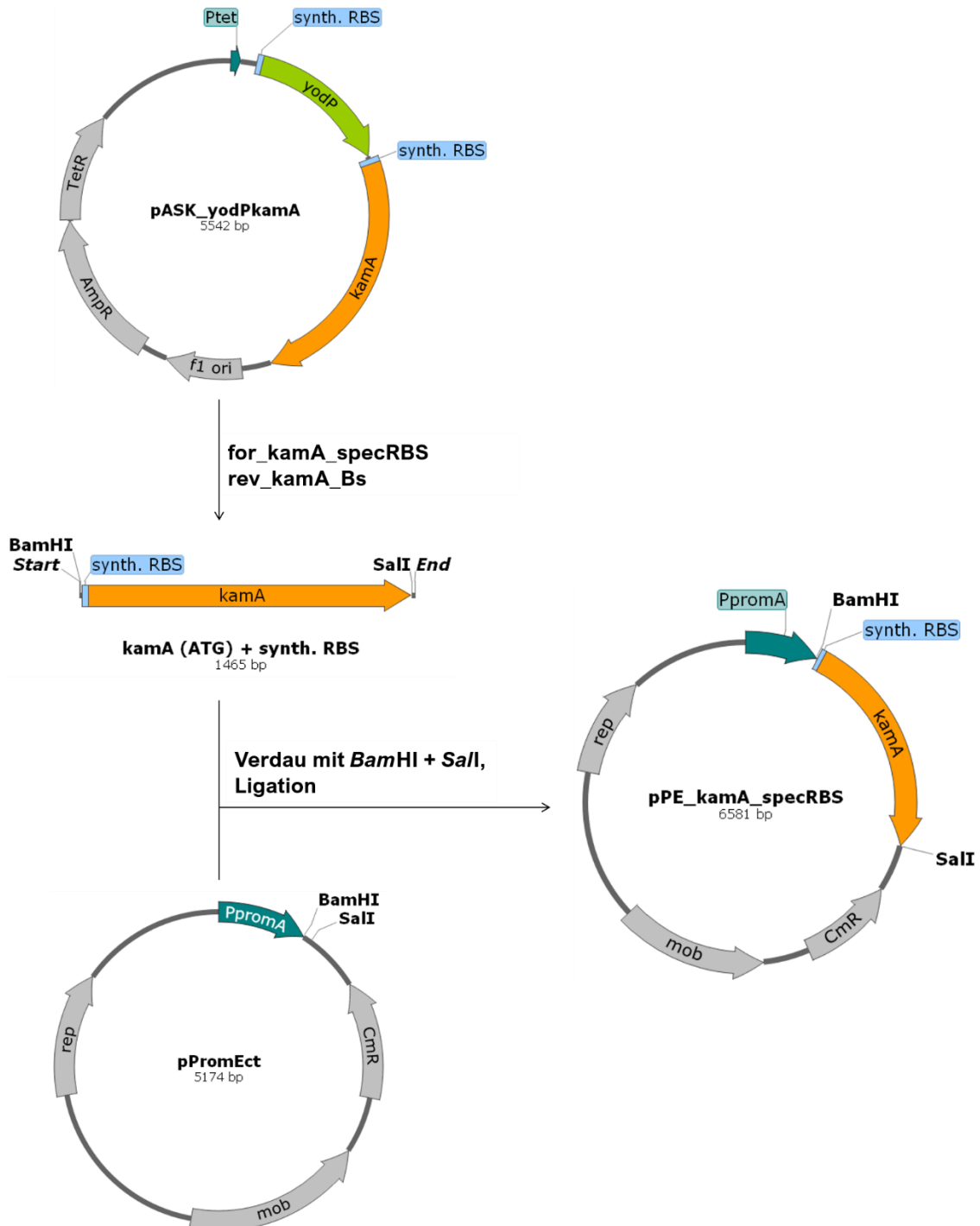
Als Expressionsorganismus wurde neben dem Typstamm *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> auch *H. elongata* WUB02 (Witt, 2011) genutzt. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine Deletion der Gene *ectA* (EC 2.3.1.178) und *ectC* (EC 4.2.1.108) aus und ist somit nicht mehr in der Lage, Ectoin als kompatibles Solut zum Schutz gegen osmotischen Stress zu synthetisieren. Es wurde nachgewiesen, dass die Expressionsstärke des NaCl-induzierbaren Promotors *promA* durch Ectoin selbst vermindert werden kann (Brünig, 2005; Kunte, 2006). Ein Vergleich der beiden *Halomonas*-Stämme hinsichtlich der heterologen Protein-, sowie Zwischen- und Endprodukt-Synthese bot sich dementsprechend an, da *kamA<sub>Bs</sub>* im Expressionsvektor ebenfalls unter der Kontrolle des *promA*-Promotors steht (vgl. 3.3.1.1).

#### 3.3.1 $\beta$ -Lysin-Produktion in *H. elongata*

Wie bereits in 3.2.4 geschildert, wird das Startcodon in *kamA<sub>Bs</sub>* durch ein Leucin (TTG) kodiert. Informationen hinsichtlich der bevorzugten Nutzung bestimmter Startcodons in *H. elongata* stehen, im Gegensatz zu *E. coli*, zum jetzigen Zeitpunkt nicht zur Verfügung. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass *H. elongata* aufgrund seiner Klassen-Zugehörigkeit diesbezüglich Ähnlichkeiten zu *E. coli* aufweist. Des Weiteren weisen die Synthesegene *ectABC* und *ectD* für die mikrobiell und wirtschaftlich relevanten kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin ein Methionin als Initialtriplekt auf (Schwibbert *et al.*, 2011). Die Anpassung von *kamA<sub>Bs</sub>* wurde nachfolgend daraus abgeleitet.

## 3.3.1.1 Vektorkonstruktion von pPE\_kamA\_specRBS

Für die Produktion von  $\beta$ -Lysin in *H. elongata* wurde ein neuer Vektor auf Basis von pPromEct konstruiert. Als DNA-Matrize diente hierbei der bereits konstruierte Vektor pASK\_yodPkamA (vgl. 3.2.1).



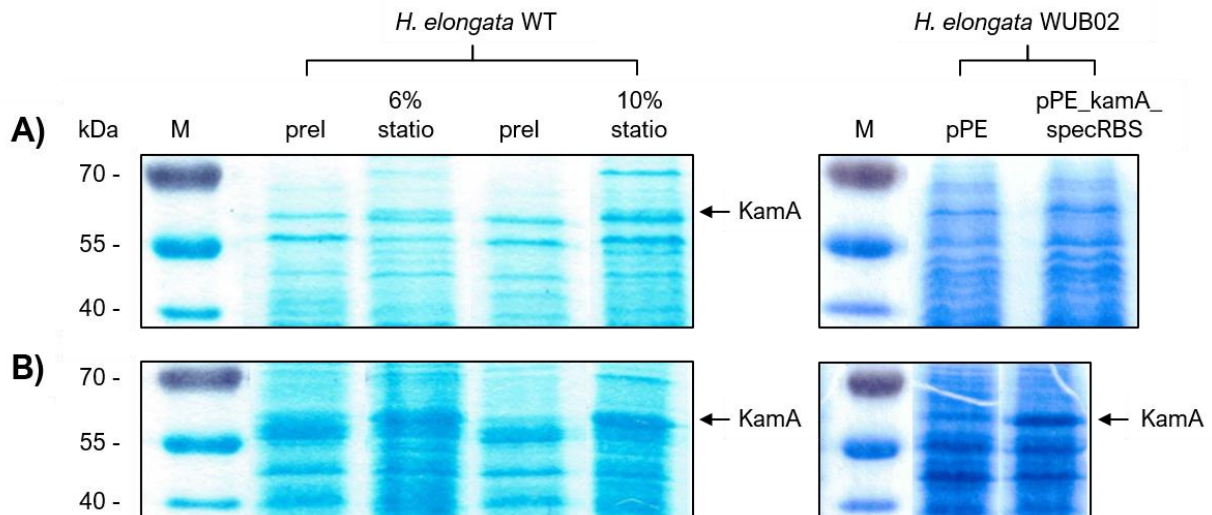
**Abb. 3.9: Konstruktion des Expressionsvektors pPE\_kamA\_specRBS.** Das Gen *kamA<sub>BS</sub>* wurde mittels PCR aus dem Vektor pASK\_yodPkamA (vgl. 3.2.1) amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in pPE eingebracht. AmpR: Ampicillinresistenz, CmR: Chloramphenicolresistenz, TetR: Tet-Repressor, P<sub>promA</sub>: *promA*-Promotor, ori: Replikationsursprung, rep: Replikationsgene, mob: Mobilisationsgene

Das Gen *kamA<sub>Bs</sub>* wurde mithilfe der Primer *for\_kamA\_specRBS* und *rev\_kamA\_Bs* amplifiziert, wobei der 5'-Primer eine Sequenz für eine synthetische RBS enthielt und außerdem so konzipiert war, dass bei der Amplifikation von *kamA<sub>Bs</sub>* das ursprüngliche Startcodon TTG zu einem ATG verändert wurde (vgl. Tab. 2.10). Das Amplifikat wurde anschließend durch die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den Vektor pPE stromabwärts des *promA*-Promotors integriert (vgl. Abb. 3.9). Nach der Ligation von Rückgrat und Amplifikat wurde *E. coli* DH5α mit dem neuen Vektor transformiert. Über eine weitere Transformation von *E. coli* S17.1 wurde der Vektor mittels Konjugation in die Zielorganismen *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> und *H. elongata* WUB02 transferiert (vgl. 2.5.5, 2.5.7 und 2.5.8). Eine Sequenzierung des Vektors pPE\_kamA\_specRBS ergab keine Auffälligkeiten (vgl. 6.3 im Anhang).

### 3.3.1.2 Produktion von KamA<sub>Bs</sub> und Nachweis von β-Lysin

Nachfolgend sollte die Produktion des modifizierten KamA<sub>Bs</sub> mittels SDS-PAGE überprüft werden. Dafür wurden Expressionskulturen in MM63-Medium nach Standardbedingungen angelegt (vgl. 2.4.7), wobei die NaCl-Konzentrationen dem Wildtyp (3 % w/v), bzw. der Deletionsmutante (2 % w/v) angepasst wurde. Die Kulturen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 durch einen Salzschock induziert, indem die NaCl-Konzentration von Kulturen des Wildtyps auf entweder 6 % oder 10 % angehoben wurden. In Kulturen von *H. elongata* WUB02 wurde die Konzentration lediglich auf 4 % angehoben, da die Deletion der zwei Ectoin-Synthesegene eine erniedrigte Salztoleranz zur Folge hat. Die Kulturen wurden in der stationären Phase geerntet und ein Teil der Zellen zur Aufreinigung der löslichen und unlöslichen Proteinfraction genutzt; der Rest der Zellen wurde für HPLC-Analysen verwendet. Abb. 3.10 zeigt repräsentativ die SDS-PAGE-Analyse jeweils einer Expressionskultur.

Dabei sind einige Unterschiede zu den Analysen bisheriger Expressionskulturen von *H. elongata* auszumachen (vgl. auch 3.2.3, Abb. 3.7): während die löslichen Proteinfractionen des Wildtyp-Expressionsstammes nur schwache Banden der L-Lysin 2,3-Aminomutase aufweisen, sieht man in der unlöslichen Proteinfraction eine klare Überproduktion des Proteins (Abb. 3.10 A, B). Dabei ist festzustellen, dass sich die Bande für KamA<sub>Bs</sub> erneut in einer höheren Position finden lässt (ca. 60 kDa), als die theoretische Masse vorgibt (54,1 kDa, vgl. auch 3.2.2, Abb. 3.6). Zwischen der Bandenstärke bei der Induktion auf 6 %, bzw. 10 % NaCl (w/v) gibt es keinen nennenswerten Unterschied. In *H. elongata* WUB02 pPE\_kamA\_specRBS konnte KamA<sub>Bs</sub> in der löslichen Proteinfraction nicht eindeutig von zelleigenen Proteinen differenziert werden (Abb. 3.10 A). Das Protein ist auch hier nur in der unlöslichen Fraktion zu finden, wobei zumindest ein Teil der Bande auch aus unspezifischen *Halomonas*-eigenen Proteinen besteht, wie durch den Vergleich mit einem Kontrollstamm deutlich wird (Abb. 3.10 B).



**Abb. 3.10: SDS-PAGE zum Nachweis von KamA<sub>Bs</sub> in *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> und *H. elongata* WUB02 mit dem Expressionsvektor pPE\_kamA\_specRBS.** Die Kulturen wurden in MM63-Medium mit 2 %, bzw. 3 % NaCl kultiviert und die Genexpression per Salzschock induziert. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden entweder Proben vor Induktion (prel) und in der stationären Phase nach Induktion (statio) bearbeitet - oder im Fall von *H. elongata* WUB02 stationäre Proben parallel zu denen eines Kontrollstammes (pPE). Aus diesen wurde jeweils die lösliche (**A**), sowie die unlösliche Proteinfraction (**B**) aufgereinigt und aufgetragen (20 µg Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für KamA<sub>Bs</sub> (54,1 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Der verbleibende Teil der Kulturernte wurde jeweils für die Untersuchung des Zellextraktes mittels FMOC-ADAM-HPLC, bzw. Aminophasen-HPLC genutzt (vgl. 2.7.3 und 2.7.4). Es ist hervorzuheben, dass nun zum ersten Mal der Nachweis einer β-Lysin-Produktion in *H. elongata* erbracht werden konnte. Tabelle 3.3 zeigt den intrazellulären Gehalt an β-Lysin, das zelleigene Osmolyt Ectoin, sowie Glutamat als weiteren Bestandteil.

**Tab. 3.3: Intrazellulärer Solut-Gehalt in Expressionskulturen von *H. elongata*, jeweils mit dem Plasmid pPE\_kamA\_specRBS.** Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG) und in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV) als arithmetisches Mittel einer Doppelbestimmung.

| Verbindung | <i>H. elongata</i> WT 6 % |            | <i>H. elongata</i> WT 10 % |            | <i>H. elongata</i> WUB02 4 % |            |
|------------|---------------------------|------------|----------------------------|------------|------------------------------|------------|
|            | mg/g TG                   | mmol/L IZV | mg/g TG                    | mmol/L IZV | mg/g TG                      | mmol/L IZV |
| β-Lysin    | 0,4                       | 2,3        | 0,5                        | 2,8        | 0,6                          | 3,2        |
| Ectoin     | 73,4                      | 445        | 94,9                       | 575,3      | -                            | -          |
| Glutamat   | 9,9                       | 50,7       | 12,5                       | 63,9       | 35,8                         | 173,4      |

Die Messwerte sind auf das Trockengewicht der Zellen und auf das intrazelluläre Volumen (IZV) der Zellen bezogen worden, welches in *H. elongata* bereits 1983 von Vreeland *et al.*, sowie 1994 von Miguelez & Gilmour untersucht wurde. Dabei konnte in letzterer Arbeit gezeigt werden, dass das intrazelluläre Volumen bei 3 % NaCl ungefähr 1,16 mL/g TG und bei 2 % NaCl ca. 1,22 mL/g TG ausmacht und dieses auch nach Zugabe von erhöhten Mengen NaCl

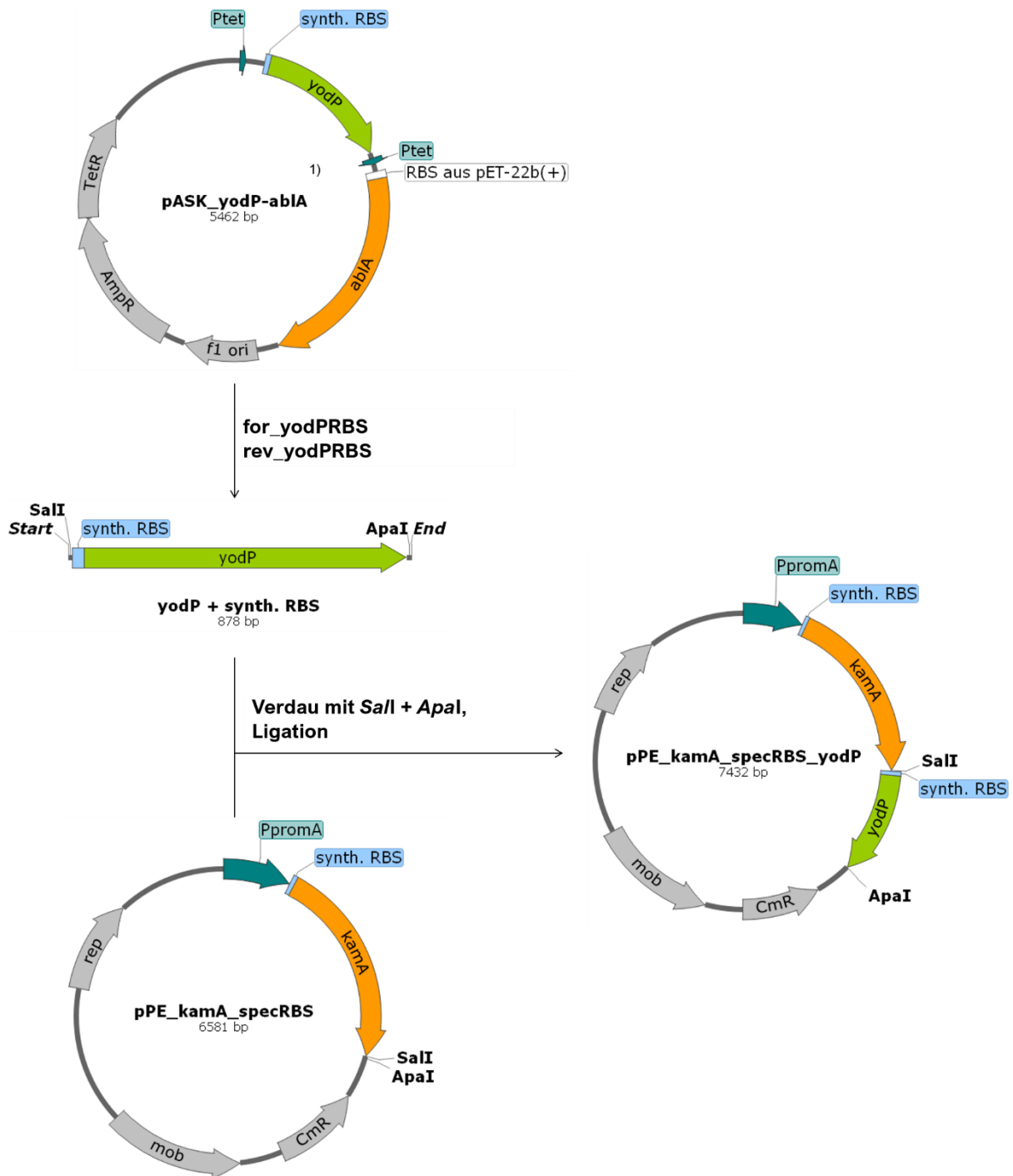
(wie beim hier durchgeführten Salzschock) bereits ca. 6 h später wieder hergestellt ist (Migueluez & Gilmour, 1994). Die durchgeführten Berechnungen beziehen sich auf diese Werte. Der Gehalt an heterolog produziertem  $\beta$ -Lysin steigt abhängig von der Induktionsstärke leicht an; hier ist eine Zunahme von ca. 20 % bei einem Schock auf 10 % NaCl zu verzeichnen. Die Deletionsmutante weist im Vergleich den höchsten Gehalt an  $\beta$ -Lysin auf. Die Kultur enthält jedoch die geringste Salzkonzentration, sodass dieses Ergebnis nicht den Erwartungen entspricht (vgl. Tab. 3.3.). Der Mangel an Ectoin, welches durch die Deletionen  $\Delta ectA$  und  $\Delta ectC$  nicht mehr synthetisiert werden kann, scheint demnach positive Auswirkungen auf die Produktion von  $\beta$ -Lysin zu haben. Die produzierten Mengen an potenziellem  $\beta$ -Lysin sind in etwa mit den Literaturwerten von frei vorliegenden AS wie z.B. Glutamin oder Isoleucin in *H. elongata* vergleichbar (Vreeland *et al.*, 1983) und bieten einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die weitere Produktion des Endproduktes NA $\beta$ L. Beide Wildtyp-Expressionsstämme zeigen außerdem eine Zunahme von Ectoin und Glutamat korrelierend zur Salzkonzentration, wobei letzteres von *H. elongata* (zusammen mit  $K^+$ -Ionen) als erste Reaktion auf einen Salzschock akkumuliert wird (Empadinhas & Da Costa, 2008). Für beide Substanzen wird eine Zunahme von ca. 25 - 30 % im Vergleich von einem Salzschock auf 6 % mit einem Salzschock auf 10 % NaCl (*w/v*) festgehalten (vgl. Tab. 3.3). Die Deletionsmutante weist einen stark erhöhten Gehalt an Glutamat im Vergleich zu den Wildtypkulturen auf, was auf die Abwesenheit von Ectoin als nutzbares Osmolyt zurückzuführen ist. Eine HPLC-Untersuchung der Medienüberstände ergab keine Hinweise auf  $\beta$ -Lysin (Daten nicht gezeigt). Die oben gezeigten Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass eine prinzipielle Nutzung der *B. subtilis*-Gene in *H. elongata* zielführend sein kann. Die Veränderung des Startcodons von *kamA<sub>Bs</sub>* in das alternative Initialtripllett TTG führte zu nachweisbaren Proteinbanden für *KamA<sub>Bs</sub>*, sowie dem Zwischenprodukt  $\beta$ -Lysin, welches zum ersten Mal in *H. elongata* belegt werden konnte. In Folge wurde ein Vektor konstruiert, der zusätzlich für das Gen *yodP* kodiert.

### 3.3.2 NA $\beta$ L-Produktion in *H. elongata*

Die unter 3.2 konstruierten Vektoren wiesen eine Mutation im Gen *yodP* und damit einhergehend einen Funktionsverlust der  $\beta$ -Lysine N<sub>6</sub>-Acetyltransferase auf (vgl. 3.2.4 und Abb. 6.2). Eine erfolgreiche Produktion von NA $\beta$ L konnte nicht nachgewiesen werden, auch wenn YodP in beiden Proteinfractionen von *E. coli* DH5 $\alpha$  in der SDS-PAGE vorlag (vgl. Abb. 3.6). Hierbei handelt es sich voraussichtlich um ein ca. 257 AS großes mutiertes YodP<sub>mut</sub>, was aufgrund des geringen Unterschieds von ca. 18 AS zum annotierten Protein in der SDS-PAGE nicht davon unterschieden werden kann. Die nachfolgenden Versuche stellten somit eine

erstmalige Betrachtung einer heterologen Produktion der  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase aus *B. subtilis* in *H. elongata* dar.

### 3.3.2.1 Vektorkonstruktion von pPE\_kamA\_specRBS\_yodP

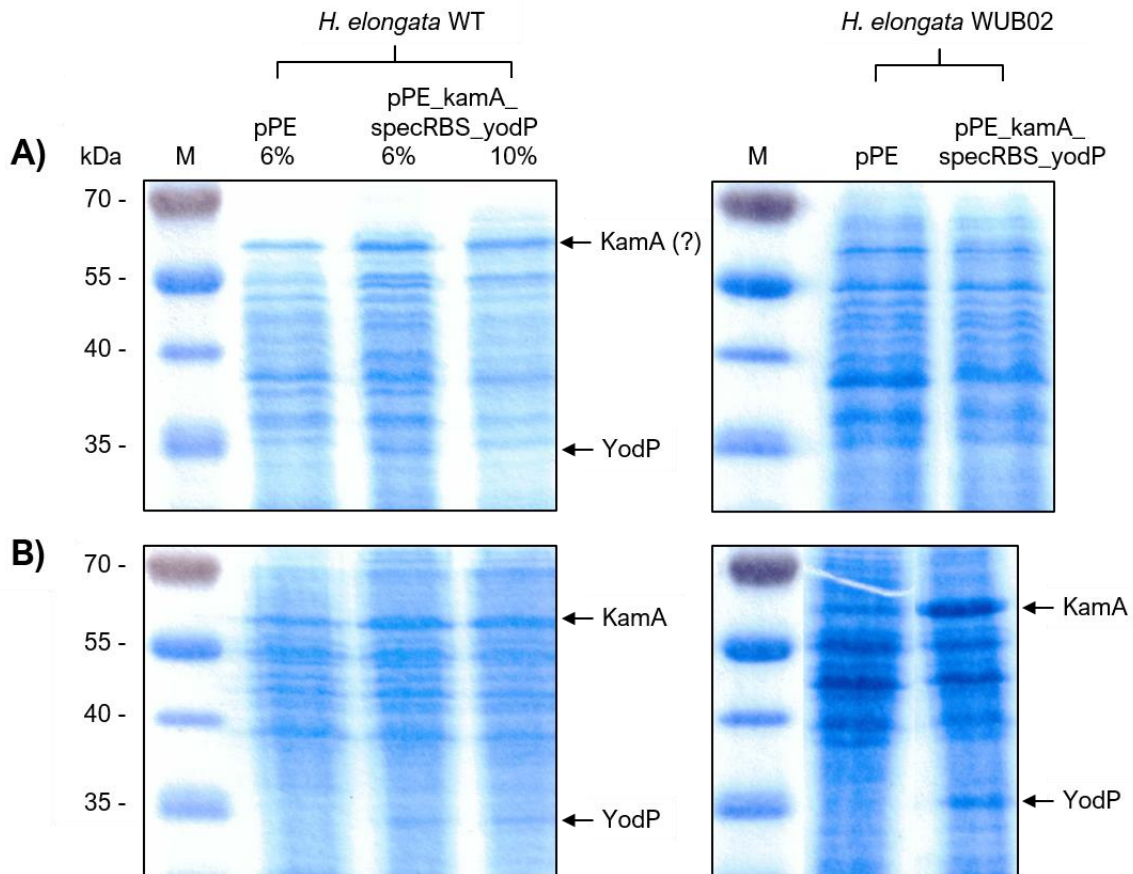


**Abb. 3.11: Konstruktion des Expressionsvektors pPE\_kamA\_specRBS\_yodP.** Das Gen *yodP* wurde mittels PCR aus dem Vektor pASK\_yodP-ablA<sup>1)</sup> amplifiziert und über die Schnittstellen *SalI* und *ApaI* in pPE\_kamA\_specRBS eingebracht. AmpR: Ampicillinresistenz, CmR: Chloramphenicolresistenz, TetR: Tet-Repressor, Ptet: *tet*-Promotor, PpromA: *promA*-Promotor, ori: Replikationsursprung, rep: Replikationsgene, mob: Mobilisationsgene. <sup>1)</sup>unter 3.4.2.1 und Abb. 3.19 beschrieben.

Für die Konstruktion des Expressionsplasmids mit beiden Synthesegenen bildete der vorher konstruierte Vektor pPE\_kamA\_specRBS (vgl. Abb. 3.9) die Basis. Das ergänzende Gen *yodP* wurde mithilfe der Primer *for\_yodPRBS* und *rev\_yodPRBS* amplifiziert; als DNA-Matrize wurde der Vektor pASK\_yodP-*abIA* (Georgiev, 2017; vgl. 3.4.2.1, Abb. 3.19) eingesetzt. Das Amplifikat wurde im Anschluss mittels der Schnittstellen *Sall* und *Apal* in den Vektor pPE\_kamA\_specRBS stromabwärts des dort bereits befindlichen Gens *kamA<sub>BS</sub>* integriert und mit dem Vektorrückgrat ligiert (vgl. Abb. 3.11). Es erfolgte die Überführung mittels Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$ , sowie von *E. coli* S17.1. Im Anschluss daran wurde der Vektor durch Konjugation in die Zielorganismen *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> und *H. elongata* WUB02 transferiert (vgl. 2.5.5, 2.5.7 und 2.5.8).

### 3.3.2.2 Proteinnachweis und Produktion von NA $\beta$ L

Die Anzucht der Expressionsstämme erfolgte in MM63-Medium mit jeweils an die Stämme angepassten NaCl-Konzentrationen (vgl. 3.3.1.2 und 2.4.7). Abb. 3.12 zeigt die SDS-PAGE der jeweils aufgereinigten löslichen und unlöslichen Proteinfraction von repräsentativ einer Expressionskultur mit dazugehörigem Kontrollstamm. Der Nachweis von KamA<sub>BS</sub> in beiden Expressionsstämmen ist analog zu vorherigen Versuchen. Eine lösliche Produktion kann nicht eindeutig belegt werden, da sich zu viele unspezifische Proteine im Wildtyp-Expressionsstamm auf gleicher Höhe wie die L-Lysin 2,3-Aminomutase befinden (ausgehend von dem bisher gezeigten höheren Laufverhalten; vgl. Abb. 3.12 A). In der Deletionsmutante ist kein lösliches KamA<sub>BS</sub> nachweisbar. In den unlöslichen Proteinfractionen sind neben *Halomonas*-eigenen Proteinen in *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> pPE\_kamA\_specRBS\_yodP auch Banden für KamA<sub>BS</sub> sichtbar (vgl. Abb. 3.12 A und B), ungeachtet der Induktionsstärke auf 6 % oder 10 % NaCl (*w/v*). Auffällig ist der Nachweis von KamA<sub>BS</sub> in der unlöslichen Proteinfraction der Deletionsmutante, die deutlich stärker als im Wildtyp ist (vgl. Abb. 3.12 B). Im Gegensatz zu bisherigen Versuchen sind erstmalig in *H. elongata* Banden für YodP auszumachen. Diese sind schwach im Wildtyp-Expressionsstamm, jedoch deutlich vom Kontrollstamm zu unterscheiden (vgl. Abb. 3.12 A und B). Ebenso wie KamA<sub>BS</sub> ist die Bande der  $\beta$ -Lysine N<sub>6</sub>-Acetyltransferase in *H. elongata* WUB02 pPE\_kamA\_specRBS\_yodP nur in der unlöslichen Proteinfraction aufzufinden, dort allerdings deutlich stärker als im Wildtyp (vgl. Abb. 3.12 B). Abermals scheint die Induktionsstärke keinen Einfluss auf die Produktion der heterologen Proteine zu haben, auch wenn der genutzte Promoter *promA* auf dem Expressionsvektor zu einer NaCl-abhängigen Expression befähigt (Brünig, 2005; Stiller *et al.*, 2018).



**Abb. 3.12: SDS-PAGE von *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> und *H. elongata* WUB02 mit dem Expressionsvektor pPE\_kamA\_specRBS\_yodP.** Die Kulturen wurden in MM63-Medium mit 2 %, bzw. 3 % NaCl kultiviert und die Induktion der Genexpression per Salzschock durchgeführt. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden die Kulturen in der stationären Phase geerntet und aus einem Teil der Zellen jeweils die lösliche (A), sowie die unlösliche Proteinfraction (B) aufgereinigt und aufgetragen (20 µg Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für KamA<sub>BS</sub> (54,1 kDa) und YodP (31,2 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. pPE: Kontrollstamm mit Leervektor pPE, M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Der Rest der geernteten Zellen wurde wie zuvor beschrieben für Analysen des Zellextraktes mittels FMOc-ADAM-HPLC, bzw. Aminophasen-HPLC genutzt (2.7.3 und 2.7.4).

Hier kann hervorgehoben werden, dass es durch den Einsatz heterologer Proteine nun zum ersten Mal gelungen ist, das kompatible Solut NAßL in *H. elongata* zu produzieren und nachzuweisen (vgl. Tab. 3.4).

**Tab. 3.4: Intrazellulärer Solut-Gehalt in Expressionskulturen von *H. elongata*, jeweils mit dem Plasmid pPE\_kamA\_specRBS\_yodP.** Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG) und in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV) als arithmetisches Mittel einer Doppelbestimmung.

|            | <i>H. elongata</i> WT 6 % |            | <i>H. elongata</i> WT 10 % |            | <i>H. elongata</i> WUB02 4 % |            |
|------------|---------------------------|------------|----------------------------|------------|------------------------------|------------|
| Verbindung | mg/g TG                   | mmol/L IZV | mg/g TG                    | mmol/L IZV | mg/g TG                      | mmol/L IZV |
| NAßL       | 1,4                       | 6,5        | 0,8                        | 3,6        | 1,6                          | 6,9        |
| Ectoin     | 60,7                      | 368        | 68,5                       | 415,3      | -                            | -          |
| Glutamat   | 13,2                      | 67,3       | 7,9                        | 40,2       | 37,5                         | 181,9      |



Wie bereits unter 3.3.1.2 beschrieben, wurden die Messwerte auf das intrazelluläre Volumen nach Miguelez & Gilmour (1994) bezogen. Tab. 3.4 stellt vergleichend die errechneten Konzentrationen für NA $\beta$ L, Ectoin und Glutamat dar. Die Messungen der Kulturüberstände der Expressionskulturen wiesen kein NA $\beta$ L auf (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist die fehlende Korrelation zwischen der Induktionsstärke durch NaCl-Zugabe und der Menge des kompatiblen Soluts NA $\beta$ L. So ist in Wildtyp-Expressionskulturen bei 10 % NaCl nur etwa die Hälfte der Konzentration an NA $\beta$ L vorhanden, wie es in Ansätzen bei 6 % NaCl der Fall ist (vgl. Tab. 3.4). Erneut konnte in der Deletionsmutante die höchste Menge der heterolog produzierten Substanz gemessen werden, vermutlich basierend auf dem Mangel an Ectoin. Insgesamt liegen die absoluten Werte für NA $\beta$ L über denen für  $\beta$ -Lysin (vgl. Tab. 3.3 und 3.4). Der Anstieg von Ectoin in Abhängigkeit zur Induktionsstärke fällt mit nur ca. 5 % Zunahme geringer aus als in vorangegangenen Experimenten zur  $\beta$ -Lysin-Produktion (vgl. Tab. 3.3). Auch die absoluten Werte für Ectoin sind in den hier durchgeführten Experimenten grundsätzlich kleiner - dabei ist eine Gesamtabnahme von ca. 19 % (Kulturen mit 6 % NaCl), bzw. ca. 30 - 40 % (Kulturen mit 10 % NaCl) im Vergleich zu vorherigen Werten zu verzeichnen (vgl. Tab. 3.3 und 3.4). Die Ergebnisse für Glutamat entsprachen in dieser Form nicht den Erwartungen. In Wildtyp-Expressionsstämmen ist bei 10 % NaCl weniger Glutamat zu verzeichnen als in jenen mit 6 % NaCl. Die Glutamat-Werte der Deletionsmutanten sind mit den Werten früherer Versuche vergleichbar (vgl. Tab. 3.4 und 3.4). Weitere analoge Versuche zur NA $\beta$ L-Produktion mit einer erhöhten Menge an  $\alpha$ -Lysin als Substrat (10 mM statt 4 mM) ergaben keinen höheren Gehalt an NA $\beta$ L, sondern nur etwa 20 % (*H. elongata* WUB02 pPE\_kamA\_specRBS\_yodP), bzw. 60-70 % (*H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> pPE\_kamA\_specRBS\_yodP) der Ausbeuten, die bei einer Zugabe von 4 mM erreicht werden konnten (vgl. Tab. 3.4; Daten nicht gezeigt). Auffällig waren in den dazugehörigen Messungen mittels FMOC-ADAM-HPLC lediglich Signale, die mglw. für NA $\alpha$ L stehen könnten. Eine genaue Identifikation der Substanz gelang jedoch nicht. Des Weiteren wurden Zellextrakte der Expressionskulturen mittels <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie untersucht, hier konnte jedoch aufgrund zu geringer Konzentrationen keine abschließende Aussage getroffen werden (Daten nicht gezeigt). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen erstmals die erfolgreiche Produktion von  $\beta$ -Lysin, sowie die erfolgreiche Produktion des kompatiblen Soluts NA $\beta$ L in *H. elongata* mithilfe der Gene *kamA<sub>Bs</sub>* und *yodP* aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>. Obwohl ein Großteil der heterolog produzierten Proteine in den unlöslichen Proteinfractionen der Expressionsstämme wiederzufinden ist, konnte die Funktionalität durch Identifikation des Zwischen- und Endprodukts mittels HPLC bestätigt werden.

### 3.4 NA $\beta$ L-Synthese in *E. coli*

Der Fokus der nachfolgend dargestellten Untersuchungen lag auf der heterologen Expression von NA $\beta$ L in *E. coli*. Dieser Modellorganismus zählt zu den am besten untersuchten Mikroorganismen und eignet sich bestens für heterologe Expressionsstudien, was in der Vergangenheit wiederholt dargelegt wurde (Baneyx, 1999; Demain & Vaishnav, 2009; Rosano & Ceccarelli, 2014; Sørensen & Mortensen, 2005) und in Verbindung mit der Produktion verschiedenster L-Lysin 2,3-Aminomutasen hinreichend gezeigt werden konnte (Chen *et al.*, 2000; Hung & Lai, 2013; Ruzicka *et al.*, 2000). Eine heterologe Produktion von NA $\beta$ L, unter anderem durch die Gene *ablA* und *ablB* aus *Ms. mazei* Gö1, war bisher jedoch erfolglos (Lohberger, 2009; Möller, 2011). Erste Versuche zur Produktion von NA $\beta$ L mit Hilfe der Synthesegene aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> scheiterten an einer Mutation im Gen der  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase und an einem für *E. coli* ungewöhnlichen Startcodon (TTG für Leucin) im Gen *kamA<sub>Bs</sub>* (vgl. 3.2.4). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Konstruktion neuer Expressionsvektoren und der damit einhergehenden Anpassung des Startcodons von *kamA<sub>Bs</sub>* (L-Lysin 2,3-Aminomutase) zum ersten Mal das Zwischenprodukt  $\beta$ -Lysin, sowie das Endprodukt NA $\beta$ L im ebenfalls genutzten Expressionssystem *H. elongata* nachgewiesen werden (vgl. 3.3, Tab. 3.3 und 3.4). Diese erfolgreichen Ergebnisse dienten als Basis für eine analoge Vorgehensweise in *E. coli*.

Neben der Optimierung von *kamA<sub>Bs</sub>* aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> wurde für die heterologe Expression in *E. coli* ein weiterer Ursprungsorganismus für ein alternatives Gen gesucht. *Clostridium pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> verfügt ebenfalls über eine L-Lysin 2,3-Aminomutase KamA, die beim Abbau von Lysin eine Rolle spielt (Chirpich *et al.*, 1970; Costilow *et al.*, 1966; Stadtman, 2006). Aufgrund mehrerer vorangegangener Untersuchungen zum gleichnamigen Enzym des nahe verwandten *C. subterminale* SB4 (Aberhart *et al.*, 1983; Behshad *et al.*, 2006; Chirpich *et al.*, 1970; Ruzicka *et al.*, 2000; Song & Frey, 1991) stellt das Gen *kamA<sub>Cp</sub>* eine vielversprechende Alternative dar.

Zusätzlich zu der bisher beschriebenen aeroben Anzucht wurden Expressionskulturen von *E. coli* nun auch semi-anaerob inkubiert (vgl. 2.4.8), um eine mögliche Produktion von  $\beta$ -Lysin und NA $\beta$ L unter dem Ausschluss von Sauerstoff zu untersuchen. Analog zu der unter Kapitel 3.3 beschriebenen Vorgehensweise stand zuerst die funktionelle Expression einer L-Lysin 2,3-Aminomutase im Fokus der Untersuchungen. Weiterführende Experimente umfassten anschließend auch die zusätzliche Nutzung einer  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Aminotransferase zur Produktion von NA $\beta$ L (vgl. 3.4.2).

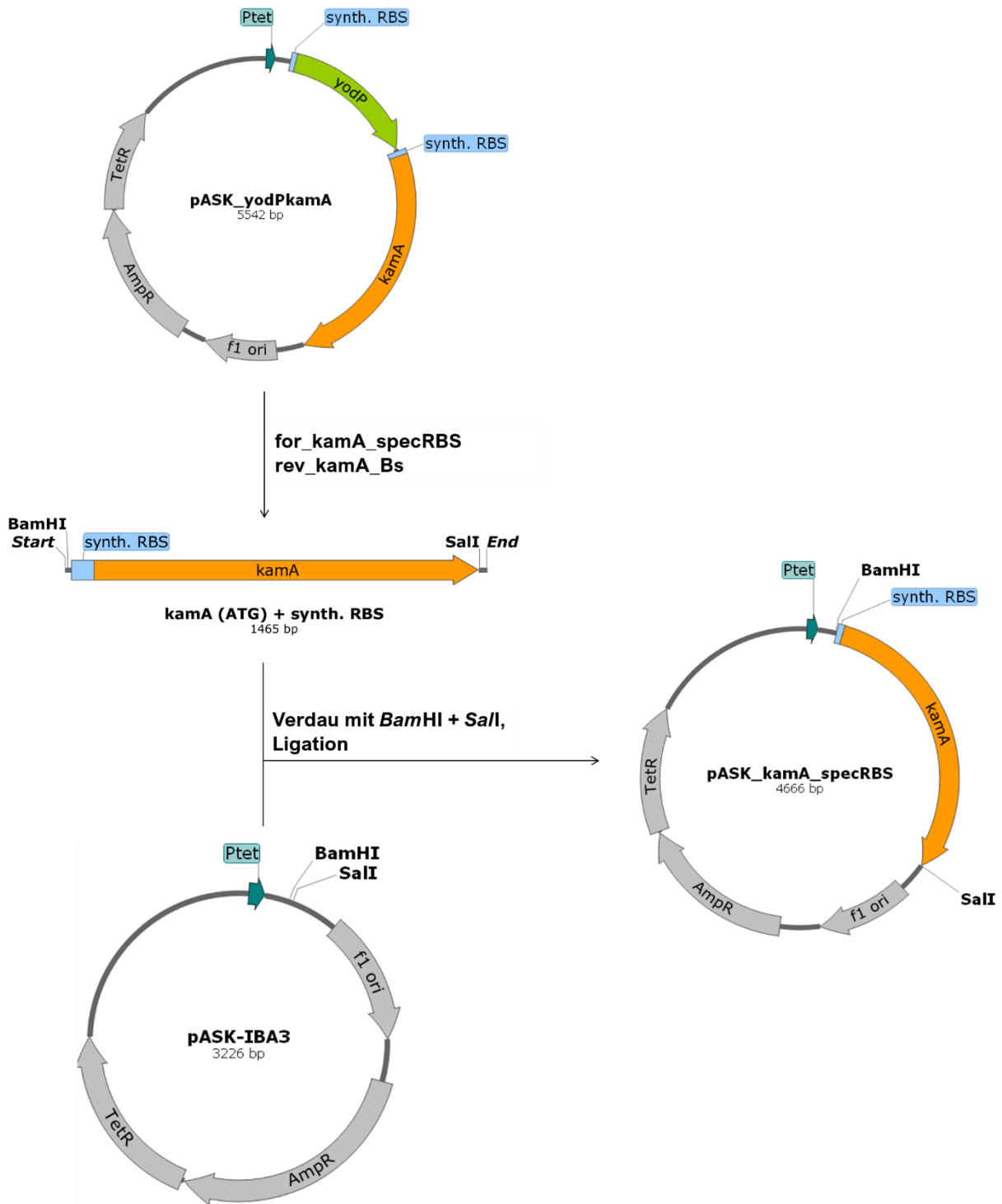
### 3.4.1 $\beta$ -Lysin-Produktion in *E. coli*

#### 3.4.1.1 Nutzen des Synthesegens aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>

Wie unter 3.2.4 und 3.3 ausführlich dargelegt, ist *kamA<sub>Bs</sub>* mit dem Starttriolett TTG (bzw. UUG) ausgestattet, welches in *E. coli* K12 bei lediglich ~3 % der proteinkodierenden Sequenzen in dieser Art zum Einsatz kommt (Blattner *et al.*, 1997). Die Ergebnisse, die mit einer Änderung dieses Startcodons von TTG zu ATG bereits im Organismus *H. elongata* erzielt werden konnten, begründeten die Durchführung identischer Modifikationen für die Expression in *E. coli* (vgl. 3.3).

#### 3.4.1.2 Vektorkonstruktion von pASK *kamA* specRBS

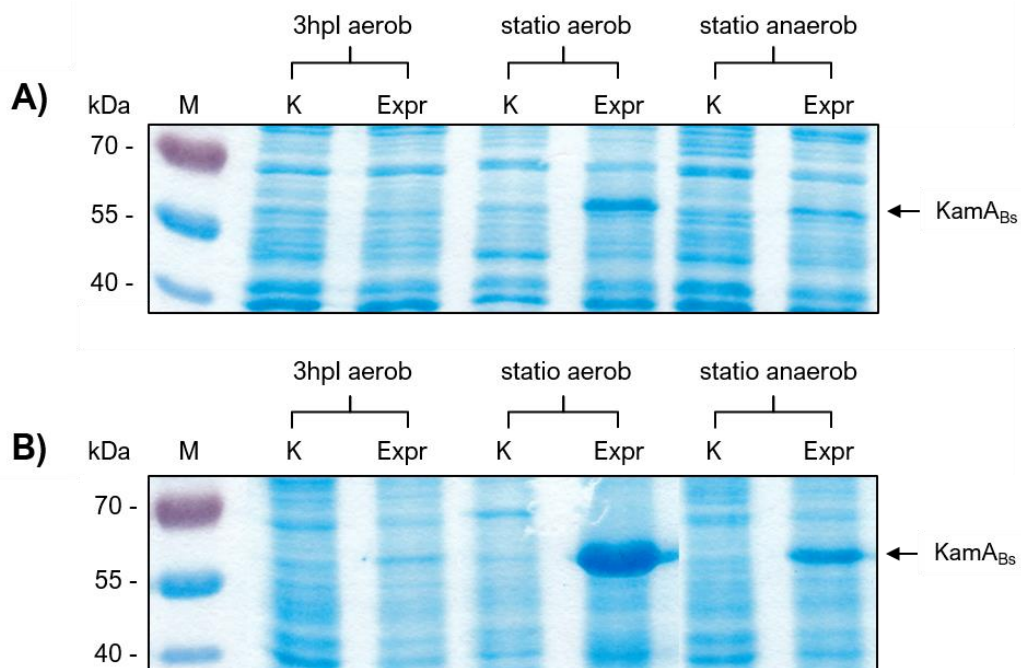
Für die Produktion von  $\beta$ -Lysin in *E. coli* mithilfe der Synthesegene aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> wurde ein neuer Vektor auf Basis des pASK-IBA3-Plasmids konstruiert. Als DNA-Matrize diente dabei der bereits konstruierte Vektor pASK\_yodPkamA (vgl. 3.2.1). Das Gen *kamA<sub>Bs</sub>* wurde mithilfe der Primer for\_*kamA*\_specRBS und rev\_*kamA*\_Bs amplifiziert, wobei der 5'-Primer die Sequenz einer synthetischen RBS enthielt und außerdem so konstruiert war, dass bei der Amplifikation von *kamA<sub>Bs</sub>* das Startcodon TTG zu ATG verändert wurde (vgl. Tab 2.10). Das Amplifikat wurde im Anschluss durch die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den Vektor pASK-IBA3 stromabwärts des *tet*-Promotors integriert (vgl. Abb. 3.13). Es folgte die Ligation von Rückgrat und Amplifikat und die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit dem neuen Vektor (vgl. 2.5.5 und 2.5.7).



**Abb. 3.13: Konstruktion des Expressionsvektors pASK\_kamA\_specRBS.** Das Gen *kamA<sub>BS</sub>* wurde mittels Gradienten-PCR aus dem Vektor pASK\_yodPkamA (vgl. 3.2.1) amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in pASK-IBA3 eingebracht. AmpR: Ampicillinresistenz, TetR: Tet-Repressor, Ptet: *tet*-Promotor, ori: Replikationsursprung

### 3.4.1.3 Produktion von KamA<sub>Bs</sub> und der Nachweis von $\beta$ -Lysin

Zur Überprüfung der KamA<sub>Bs</sub>-Produktion mittels SDS-PAGE wurden Expressions- und Kontrollkulturen in MM63-Medium bei 1 % NaCl angezogen. Im Gegensatz zu bisherigen Anzuchtbedingungen (vgl. 2.4.7) wurde die reguläre Glucose-Konzentration von 25 mM auf 50 mM angehoben und außerdem 50 mM Fumarat hinzugegeben, um eine spätere anaerobe Anzucht mit Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor zu ermöglichen. Die Produktion wurde bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 mittels AHT induziert und das Substrat L-Lysin zugegeben. Die Hälfte der so behandelten Kulturen wurde anschließend jeweils in eine Anaerobenflasche überführt und bei 30 °C inkubiert, die restlichen Kulturen verblieben im Schüttelkolben und wurden bei 37 °C inkubiert (vgl. 2.4.8). Für die Analyse per SDS-PAGE wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und diese zur Aufreinigung der löslichen und unlöslichen Proteinfraction, sowie für HPLC-Analysen genutzt. Abb. 3.14 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der Proteinproben von jeweils einer Expressionskultur.



**Abb. 3.14: SDS-PAGE von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA\_specRBS.** Die Kulturen wurden in MM63-Medium mit 1 % NaCl kultiviert und die Genexpression durch AHT induziert. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden Proben 3 h nach Induktion (3hpl) und in der stationären Phase (statio) unter aeroben (aerob) oder anaeroben (anaerob) Bedingungen genommen. Aus diesen wurde jeweils die lösliche (**A**), sowie die unlösliche Proteinfraction (**B**) aufgereinigt und aufgetragen (20  $\mu$ g Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für KamA<sub>Bs</sub> (54,1 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. K: Kontrollkultur *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK-IBA3, Expr: Expressionskultur, M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Hier ist eine klare Produktion der bacillalen L-Lysin 2,3-Aminomutase in löslicher Form in *E. coli* nachzuweisen; eine deutliche Bande ist dabei in Proben der Expressionskultur in der

stationären Phase unter aeroben Bedingungen sichtbar (vgl. Abb. 3.14 A). Wie in vorherigen Analysen ist diese auch hier erneut in höherer Position zu finden als das theoretisch vorgegebene Gewicht von KamA<sub>Bs</sub> (54,1 kDa, vgl. 3.3.1.2, Abb. 3.10 und 3.2.2, Abb. 3.6). Unter anaeroben Bedingungen kann KamA<sub>Bs</sub> ebenfalls distinktiv von den Banden der Kontrollkultur unterschieden werden. In den unlöslichen Proteinfractionen ist bereits drei Stunden nach Induktion eine schwache Bande für KamA<sub>Bs</sub> in der Expressionskultur auszumachen (vgl. Abb. 3.14 B, Laufspur „3hpl“). In den Proben der stationären Phasen von *E. coli* DH5α pASK\_kamA\_specRBS ist aerob eine starke Überexpression nachzuweisen, unter Ausschluss von Sauerstoff ist die dementsprechende Bande ebenfalls deutlich ausgeprägt (vgl. Abb. 3.14 B).

Zum Nachweis des Zwischenprodukts β-Lysin mittels FMOC-ADAM-HPLC wurden die Kulturproben aus der stationären Phase unter aeroben und anaeroben Bedingungen genutzt. Diese wurden nach der Gefriertrocknung einer B&D-Extraktion unterzogen; im Anschluss erfolgten die Derivatisierung und Messung der Proben (vgl. 2.7). Wie in *H. elongata* war es nun auch in *E. coli* nach Anpassung der kamA<sub>Bs</sub>-Gensequenz zum ersten Mal möglich, heterolog produziertes β-Lysin nachzuweisen (vgl. Tab. 3.5).

**Tab. 3.5: Intrazellulärer β-Lysin-Gehalt in Expressionskulturen von *E. coli* DH5α pASK\_kamA\_specRBS.** Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG) und in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV) als arithmetisches Mittel einer Doppelbestimmung. n.n.: nicht nachweisbar.

| aerobe Kulturen |            | anaerobe Kulturen |            |
|-----------------|------------|-------------------|------------|
| mg/g TG         | mmol/L IZV | mg/g TG           | mmol/L IZV |
| n.n.            | n.n.       | 1                 | 3,5        |

Die Messwerte wurden auf das Trockengewicht der Zellen, sowie auf das intrazelluläre Volumen bezogen. Dieses wurde für *E. coli* in der Vergangenheit mehrfach untersucht (Bennett *et al.*, 2008; Brown & Dunn, 1989; Loferer-Krößbacher *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2013). Die Werte der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die Ergebnisse von Wang *et al.*, die durch eine NAD<sup>+</sup>-Konzentrations-abhängige Methode in *E. coli* BL21 (DE3) ein intrazelluläres Volumen (IZV) von 1,9 mL/g TG bei ca. 1 % NaCl postuliert haben (Wang *et al.*, 2013). Da in den hier durchgeführten Experimenten *E. coli* DH5α genutzt wurde, sind die in Tab. 3.5 gegebenen IZV-Werte als Näherungsangaben zu verstehen.

Die ermittelten Werte für die anaeroben Expressionskulturen von *E. coli* DH5α pASK\_kamA\_specRBS sind mit 3,5 mmol β-Lysin L<sup>-1</sup> IZV vergleichbar mit denen der Expressionskulturen von *H. elongata* WUB02 (vgl. Tab. 3.3). Entgegen der Erwartungen konnte in den aeroben Kulturen der Expressionsstämme kein Nachweis für das Zwischenprodukt

erbracht werden, obwohl das genutzte Gen *kamA<sub>BS</sub>* im vergleichbaren Expressionsvektor pPE\_kamA\_specRBS für *H. elongata* diesen zu einer aeroben Produktion befähigt hat (vgl. 3.3.1.2).

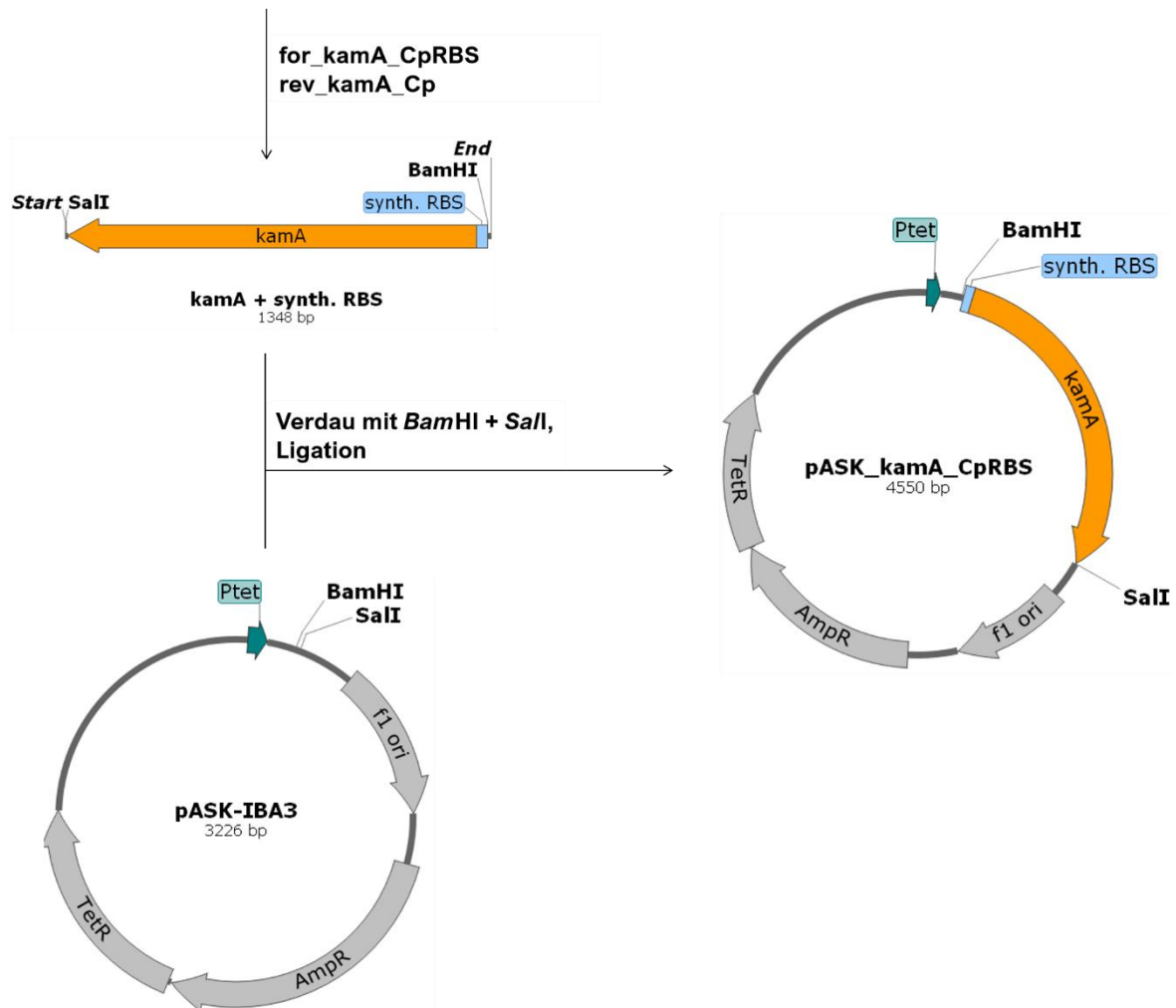
#### 3.4.1.4 Nutzen des Synthesegens aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>

Ursprüngliche Überlegungen, die L-Lysin 2,3-Aminomutase aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> zu nutzen, beruhen vor allem auf der Möglichkeit zur aeroben Produktion von  $\beta$ -Lysin, wie bereits homolog gezeigt konnte (Müller *et al.*, 2011). Wie unter 3.3 und 3.4.1.3 gezeigt, war es jedoch notwendig, das Startcodon von *kamA<sub>BS</sub>* für eine funktionelle Expression in *H. elongata* und *E. coli* anzupassen. Das Produkt  $\beta$ -Lysin konnte bisher in aeroben Kulturen von *H. elongata*, nicht jedoch in aeroben Kulturen von *E. coli* nachgewiesen werden (vgl. 3.3.1.2 und 3.4.1.3). Demnach wurde postuliert, dass die Notwendigkeit einer anaeroben Produktion von  $\beta$ -Lysin in *E. coli* besteht. Diese sollte mithilfe einer L-Lysin 2,3-Aminomutase aus einem weiteren alternativen Ursprungsorganismus gesteigert werden. Das gleichnamige Enzym KamA aus dem anaeroben Stäbchenbakterium *C. subterminale* SB4 wurde in der Vergangenheit ausführlich untersucht (Aberhart *et al.*, 1983; Behshad *et al.*, 2006; Chirpich *et al.*, 1970; Ruzicka *et al.*, 2000; Song & Frey, 1991) und verfügt über eine ca. 60-fach erhöhte spezifische Aktivität verglichen mit dem homologen Enzym aus *B. subtilis* (Chen *et al.*, 2000; Lieder *et al.*, 1998). Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass KamA in Clostridien eine wichtige Rolle beim Abbau von L-Lysin spielt, was von diesen als Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle genutzt werden kann (Chirpich *et al.*, 1970; Costilow *et al.*, 1966; Stadtman, 2006). *C. subterminale* SB4 ist als Organismus der Risikogruppe 2 eingestuft und schon mehrfach mit Humaninfektionen in Verbindung gebracht worden (Carrasquillo *et al.*, 2018; Tappe *et al.*, 2009; Thind & Preis, 2014), weshalb für die vorliegende Arbeit der eng verwandte, nicht-pathogene Organismus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> genutzt wurde. KamA aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> (im Folgenden KamA<sub>Cp</sub>, bzw. *kamA<sub>Cp</sub>*) weist nach NCBI BLASTp-Analysen gegen KamA aus *C. subterminale* SB4 eine Sequenzabdeckung von 98 %, einen Zufälligkeitsparameter (*E-value*) von 0,0 und eine Sequenzidentität von 75 % auf und wird automatisch als L-Lysin 2,3-Aminomutase annotiert (NCBI-Zugangsnr. WP\_003445619.1). Diese Annotierung wird durch die ebenfalls vorhandenen konservierten Aminosäuresequenzen **CSMYCRHC** (C<sub>126</sub>-C<sub>133</sub>) der Eisen-Bindemotive, durch DAPGGGGK (D<sub>331</sub>-K<sub>338</sub>) des SAM-Bindemotivs und **LVKIRV** (L<sub>280</sub>-V<sub>285</sub>) der putativen PLP-Bindemotive gestützt, die auch in KamA<sub>CsSB4</sub> und KamA<sub>BS</sub> vorzufinden sind (Chen *et al.*, 2000; Hung & Lai, 2013; Ruzicka *et al.*, 2000, vgl. auch 3.2).

### 3.4.1.5 Vektorkonstruktion von pASK\_kamA\_CpRBS

Für die Konstruktion des Expressionsvektors wurde erneut pASK-IBA3 als Rückgrat genutzt. Als DNA-Matrize für die Amplifizierung von *kamA<sub>Cp</sub>* diente die genomische DNA von *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>.

#### *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> Genom



**Abb. 3.15: Konstruktion des Expressionsvektors pASK\_kamA\_CpRBS.** Das Gen *kamA<sub>Cp</sub>* wurde mittels Gradienten-PCR aus der genomischen DNA von *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in pASK-IBA3 eingebracht. AmpR: Ampicillinresistenz, TetR: Tet-Repressor, Ptet: *tet*-Promotor, ori: Replikationsursprung

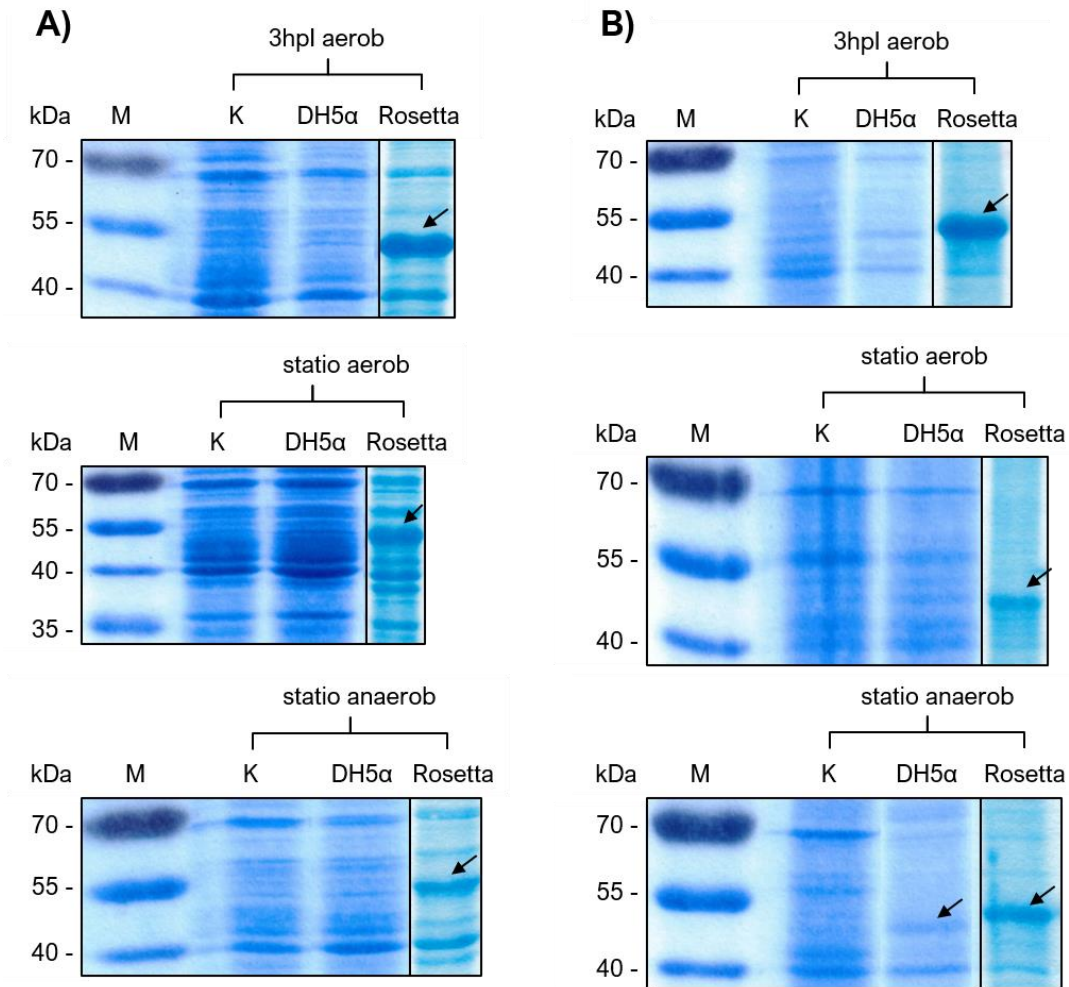
Das Gen wurde mithilfe der Primer *for\_kamA\_CpRBS* und *rev\_kamA\_Cp* amplifiziert; der 5'-Primer enthielt eine Sequenz für eine synthetische RBS (vgl. Tab. 2.10). Das Amplifikat wurde im Anschluss mittels der Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den Vektor pASK-IBA3 stromabwärts des *tet*-Promotors integriert (vgl. Abb. 3.15). Nach der Ligation von Rückgrat und Amplifikation folgte die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$ , sowie *E. coli* Rosetta<sup>™</sup> (DE3) mit dem neuen Expressionsvektor (vgl. 2.5.5 und 2.5.7).



### 3.4.1.6 Produktion von KamA<sub>Cp</sub> und der Nachweis von $\beta$ -Lysin

Zum Nachweis der Proteinproduktion wurden zunächst Expressionskulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$ , sowie *E. coli* Rosetta™ (DE3) angezogen. Letzterer Stamm ist ein *E. coli* BL21-Derivat und trägt ein Plasmid, worauf für *E. coli* seltene Transfer-RNAs (tRNA) kodiert sind (pRARE, Novagen). Die Aminosäuren Arginin, Isoleucin und Glycin werden in *kamA<sub>Cp</sub>* mit einer erhöhten Frequenz durch die Triplets AGA (Arginin), ATA (Isoleucin) und GGA (Glycin) kodiert (Analyse durch *graphical codon usage analyser*, vgl. 2.3). Um eventuelle Versorgungsengpässe durch in *E. coli* seltene tRNAs bei der Translation von *kamA<sub>Cp</sub>*-mRNA zu untersuchen, wurde *E. coli* Rosetta™ (DE3) ebenfalls mit dem Expressionsplasmid transformiert und der rekombinante Stamm vergleichend zu *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA\_CpRBS angezogen.

Die Anzucht der Expressionskulturen zum Nachweis von KamA<sub>Cp</sub> erfolgte in Terrific Broth-Medium (TB-Medium). Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 wurden die Kulturen mittels AHT induziert und das Substrat L-Lysin hinzugegeben. Anschließend wurde die Hälfte der so behandelten Kulturen jeweils in eine Anaerobenflasche überführt, in der 50 mM Fumarat (Endkonzentration) als Elektronenakzeptor für die anaerobe Anzucht vorgelegt waren. Die restlichen Kulturen verblieben im Schüttelkolben. Für die Analyse mittels SDS-PAGE wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und diese zur Aufreinigung der löslichen und unlöslichen Proteinfraction genutzt. Abb. 3.16 zeigt die SDS-PAGE-Analyse von repräsentativen Proteinproben jeweils einer Expressionskultur. Dabei ist deutlich zu sehen, dass die Produktion von KamA<sub>Cp</sub> um ein Vielfaches stärker in *E. coli* Rosetta™ (DE3) ist als in *E. coli* DH5 $\alpha$ : bereits 3 h nach Induktion ist eine große Menge KamA<sub>Cp</sub> in den Kulturproben nachzuweisen. Eine vergleichbar starke Bande ist auch in den aeroben Proben der stationären Phase sichtbar (vgl. Abb. 3.16 A). In den anaeroben Proben ist KamA<sub>Cp</sub> ebenfalls deutlich zu detektieren. Die löslichen Proteinfractionen von *E. coli* DH5 $\alpha$  zeigen keinerlei KamA<sub>Cp</sub> (Abb. 3.16 A, jeweils „DH5 $\alpha$ “). In den unlöslichen Proteinfractionen von *E. coli* Rosetta™ (DE3) pASK\_kamA\_CpRBS ist das clostridiale Protein ebenfalls ausgeprägt; die größte Menge ist dabei in den Proben 3 h nach Induktion zu finden, während die Bandenstärken in den stationären Kulturen (aerob wie anaerob) vergleichbar sind (Abb. 3.16 B). In *E. coli* DH5 $\alpha$  findet sich lediglich in den Proben der anaeroben, stationären Phase eine Bande für KamA<sub>Cp</sub> (Abb. 3.16 B). Im Vergleich mit dem Kontrollstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK-IBA3 wird deutlich, dass auf der Höhe von KamA<sub>Cp</sub> (49,8 kDa) ebenfalls *E. coli*-eigene Proteine liegen. Diesbezüglich muss bei der Auswertung der Proben von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA\_CpRBS in Betracht gezogen werden, dass KamA<sub>Cp</sub> evtl. in geringen Mengen produziert wurde, der Nachweis jedoch durch eine zu geringe Konzentration nicht erbracht werden kann (Abb. 3.16 A und B, jeweils K und DH5 $\alpha$ ).



**Abb. 3.16: SDS-PAGE von *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* Rosetta™ (DE3) mit dem Expressionsvektor pASK\_kamA\_CpRBS.** Die Kulturen wurden in TB-Medium kultiviert und die Genexpression durch AHT induziert. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden Proben drei Stunden nach Induktion (3hpl) und in der stationären Phase (statio) unter aeroben (aerob) oder anaeroben (anaerob) Bedingungen genommen. Aus diesen wurde jeweils die lösliche (A), sowie die unlösliche Proteinfraction (B) aufgereinigt und aufgetragen (20  $\mu$ g Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für KamA<sub>cp</sub> (49,8 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. K: Kontrollkultur *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK-IBA3, DH5 $\alpha$ : *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA\_CpRBS, Rosetta: *E. coli* Rosetta™ (DE3) pASK\_kamA\_CpRBS, M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Zum Nachweis des Zwischenprodukts  $\beta$ -Lysin mittels FMOc-ADAM-HPLC wurden Expressionskulturen beider *E. coli*-Stämme in MM63-Medium bei 0,5 % NaCl angelegt. Dabei wurde die Glucose-Konzentration auf 50 mM angehoben und außerdem 50 mM Fumarat hinzugegeben. Die Anzucht erfolgte bis zur Induktion analog zur bisherigen Kultivierung (vgl. 3.4.1.3). Nach der Zugabe von AHT als Induktor und dem Substrat L-Lysin wurden die Kulturen jeweils auf zwei Anaerobenflaschen aufgeteilt, wovon in je eine 2,5 % NaCl (*w/v*) vorgelegt waren, um einen Salzschock auf 3 % NaCl herbeizuführen. Die weitere Anzucht erfolgte anaerob bei 30 °C. Für die Analyse mittels FMOc-ADAM-HPLC wurden die Kulturen in der

stationären Phase geerntet und nach der Gefriertrocknung einer B&D-Extraktion unterzogen. Im Anschluss wurden die Proben derivatisiert und vermessen (vgl. 2.7).

Es war hier erneut möglich, das Zwischenprodukt  $\beta$ -Lysin in *E. coli* DH5 $\alpha$ , sowie *E. coli* Rosetta™ (DE3) nachzuweisen (vgl. Tab. 3.6).

**Tab. 3.6: Intrazellulärer  $\beta$ -Lysin-Gehalt in semi-anaeroben Kulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* Rosetta™ (DE3) mit dem Expressionsvektor pASK\_kamA\_CpRBS.** Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG) und in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV) als arithmetisches Mittel einer Doppelbestimmung.

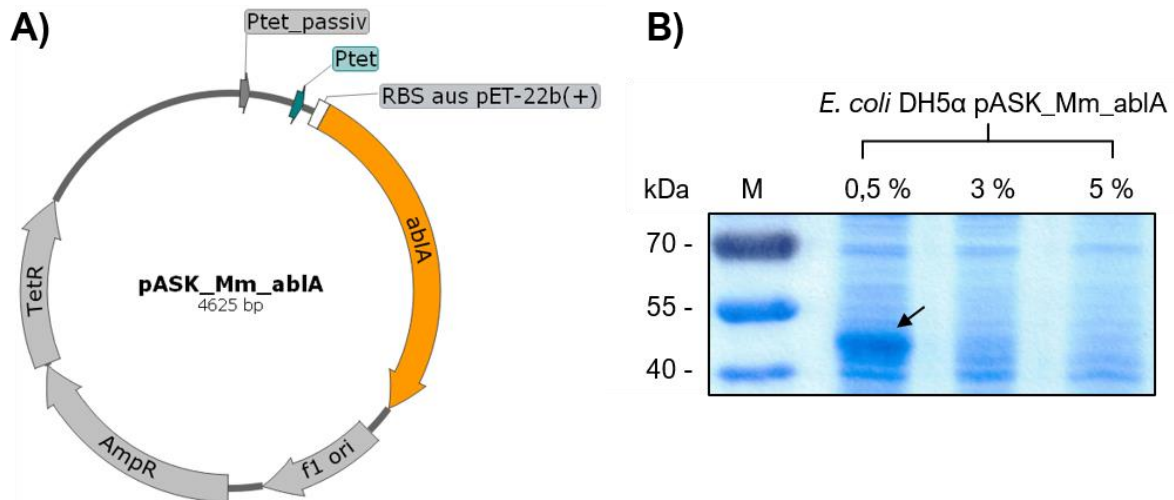
|                  | <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ |            | <i>E. coli</i> Rosetta™ (DE3) |            |
|------------------|-----------------------------|------------|-------------------------------|------------|
|                  | mg/g TG                     | mmol/L IZV | mg/g TG                       | mmol/L IZV |
| 0,5 % NaCl (w/v) | 2,3                         | 8,4        | 1,9                           | 6,9        |
| 3 % NaCl (w/v)   | 8,3                         | 29,9       | 1,5                           | 5,2        |

Die hier angegebenen IZV-Werte beziehen sich auf Berechnungen von Wang *et al.*, die für *E. coli* BL21 (DE3) ein IZV von 1,9 mL/g TG bei ca. 1 % NaCl postuliert haben. Die Angaben sind daher lediglich als Näherungswerte zu verstehen (Wang *et al.*, 2013). Die Produktion von  $\beta$ -Lysin ist in beiden Expressionsstämmen bei einer NaCl-Konzentration von 0,5 % (w/v) vergleichbar; der Gehalt in *E. coli* DH5 $\alpha$  ist nur wenig höher (vgl. Tab. 3.6). Damit wird ungefähr die doppelte Menge an  $\beta$ -Lysin im Vergleich zu den Expressionsstämmen mit bacilialem Protein synthetisiert (vgl. 3.4.1.3, Tab. 3.5). Bei einer NaCl-Konzentration von 3 % (w/v) produziert *E. coli* Rosetta™ (DE3) in etwa die gleichen Mengen wie bei 0,5 % NaCl (w/v). Der intrazelluläre  $\beta$ -Lysin-Gehalt in *E. coli* DH5 $\alpha$  ist jedoch um das drei- bis vierfache erhöht (~30 mM, vgl. Tab. 3.6). Die hier dargestellten  $\beta$ -Lysin-Werte stehen im deutlichen Kontrast zum Nachweis des Proteins KamA<sub>Cp</sub> durch die SDS-PAGE (vgl. Abb. 3.16 A, B). Dieses konnte in *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA\_CpRBS nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Produktion von  $\beta$ -Lysin ist jedoch signifikant effizienter als in *E. coli* Rosetta™ (DE3). Die oben gezeigten Ergebnisse deuten weiterhin an, dass das Anheben der NaCl-Konzentration auf 3 % (w/v) positive Auswirkungen auf die Zwischenprodukt-Synthese in diesem Expressionsstamm hat.

#### 3.4.1.7 Nutzen des Synthesegens aus *Ms. mazei* Gö1

Im Zuge dieser Arbeit wurden Versuche mit der L-Lysin 2,3-Aminomutase AblA aus *Ms. mazei* Gö1 durchgeführt (Georgiev, 2017a). Im Gegensatz zu bisher erfolglosen Arbeiten (Hövels, 2015a, 2015b; Lohberger, 2009; Möller, 2011,) konnte hier das Zwischenprodukt  $\beta$ -Lysin erstmals anaerob mit diesem Protein in *E. coli* produziert werden. Dafür wurde der Expressionsvektor pASK\_Mm\_ablA genutzt (Witt, unveröffentlicht), dessen Basis der pASK-IBA3-Vektor bildete (vgl. Abb. 3.17). Dem Gen *ablA* vorangestellt wurde hier ein Abschnitt aus

dem pET-22b(+)-Vektor, der eine putative RBS aus dem dort befindlichen T7-Promoter darstellt. Das Gen selbst steht unter der Kontrolle des *tet*-Promoters, welcher bei der Konstruktion zusammen mit dem Gen aus dem Ursprungsvektor pASK\_Mm\_NAβL (Witt, unveröffentlicht) in das neue Vektorrückgrat eingebracht wurde.



**Abb. 3.17: Vektorkarte für pASK\_Mm\_abIA und Proteinnachweis. (A)** Expressionsvektor pASK\_Mm\_abIA (Witt, unveröffentlicht). AmpR: Ampicillinresistenz, TetR: Tet-Repressor, ori: Replikationsursprung, Ptet: *tet*-Promotor, Ptet\_passiv: *tet*-Promotor des Vektorrückgrats, RBS aus pET-22b(+): Sequenzabschnitt des T7-Promoters. **(B)** SDS-PAGE-Analyse der unlöslichen Proteinfractionen von *E. coli* DH5α pASK\_Mm\_abIA (mod. nach Georgiev, 2017a). Die Kulturen wurden in MM63-Medium mit variierender NaCl-Konzentration kultiviert und die Genexpression durch AHT induziert. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden 3 h nach Induktion Proben genommen und aus diesen die unlösliche Proteinfraction aufgereinigt und aufgetragen (20 µg Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für AblA (47,8 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Georgiev konnte die Proteinproduktion von AblA mittels SDS-PAGE-Analysen nachweisen, wobei eine deutliche Bande in der unlöslichen Proteinfraction von Expressionskulturen bei 0,5 % NaCl sichtbar war (vgl. Abb. 3.17 B, mod. nach Georgiev, 2017a). Der Nachweis von β-Lysin wurde in den stationären Proben vergleichbarer Expressionskulturen von *E. coli* DH5α pASK\_Mm\_abIA erbracht. Diese wurden in MM63-0,5-Medium kultiviert und nach der Induktion mit AHT und der Zugabe des Substrats L-Lysin in Anaerobenflaschen überführt, in denen 2,5 %, bzw. 4,5 % NaCl (w/v) vorgelegt waren, um einen Salzschock auf 3 %, bzw. 5 % NaCl (w/v) durchzuführen (Georgiev, 2017a). Mittels FMOc-ADAM-HPLC-Analysen konnte in diesen Versuchen eine erfolgreiche Produktion β-Lysins mithilfe des Synthesegens *abIA* aus *Ms. mazei* Gö1 gezeigt werden: Bezogen auf das Gesamtzellprotein (GZP, vgl. 2.6.2) wurden dabei intrazelluläre β-Lysin-Werte von 6,3 mg/g GZP (0,5 % NaCl w/v), 13,2 mg/g GZP (3 % NaCl w/v) und 5,9 mg/g GZP (5 % NaCl w/v) erreicht (Georgiev, 2017a). Die Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 3 % (w/v) hatte in den hier betrachteten Produktionsstämmen von

*E. coli* DH5 $\alpha$  erneut positive Auswirkungen auf die Menge an Zwischenprodukt. Die erreichten Werte sind in etwa vergleichbar mit den Produktionsmengen des in dieser Arbeit entwickelten Expressionsstammes *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA\_CpRBS bei 3 % NaCl (vgl. Tab. 3.6). Die bisher gezeigten Ergebnisse, sowie die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen von Georgiev (2017a) bestätigen, dass *E. coli* neben *H. elongata* als geeigneter Expressionsorganismus für heterologe L-Lysin 2,3-Aminomutasen dient. Obwohl es nicht gelungen ist, einen eindeutigen Nachweis aller Enzyme mittels SDS-PAGE-Analysen zu erbringen, konnte das Zwischenprodukt  $\beta$ -Lysin jedoch in allen Expressionsstämmen mit den verschiedenen Aminomutasen aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>, *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>, sowie *Ms. mazei* Gö1 nachgewiesen werden (vgl. Tab. 3.5, 3.6, sowie Georgiev, 2017a). In Folge dieser Resultate wurde in weiteren Versuchen zusätzlich eine  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase in geeignete Expressionsvektoren für *E. coli* eingebracht.

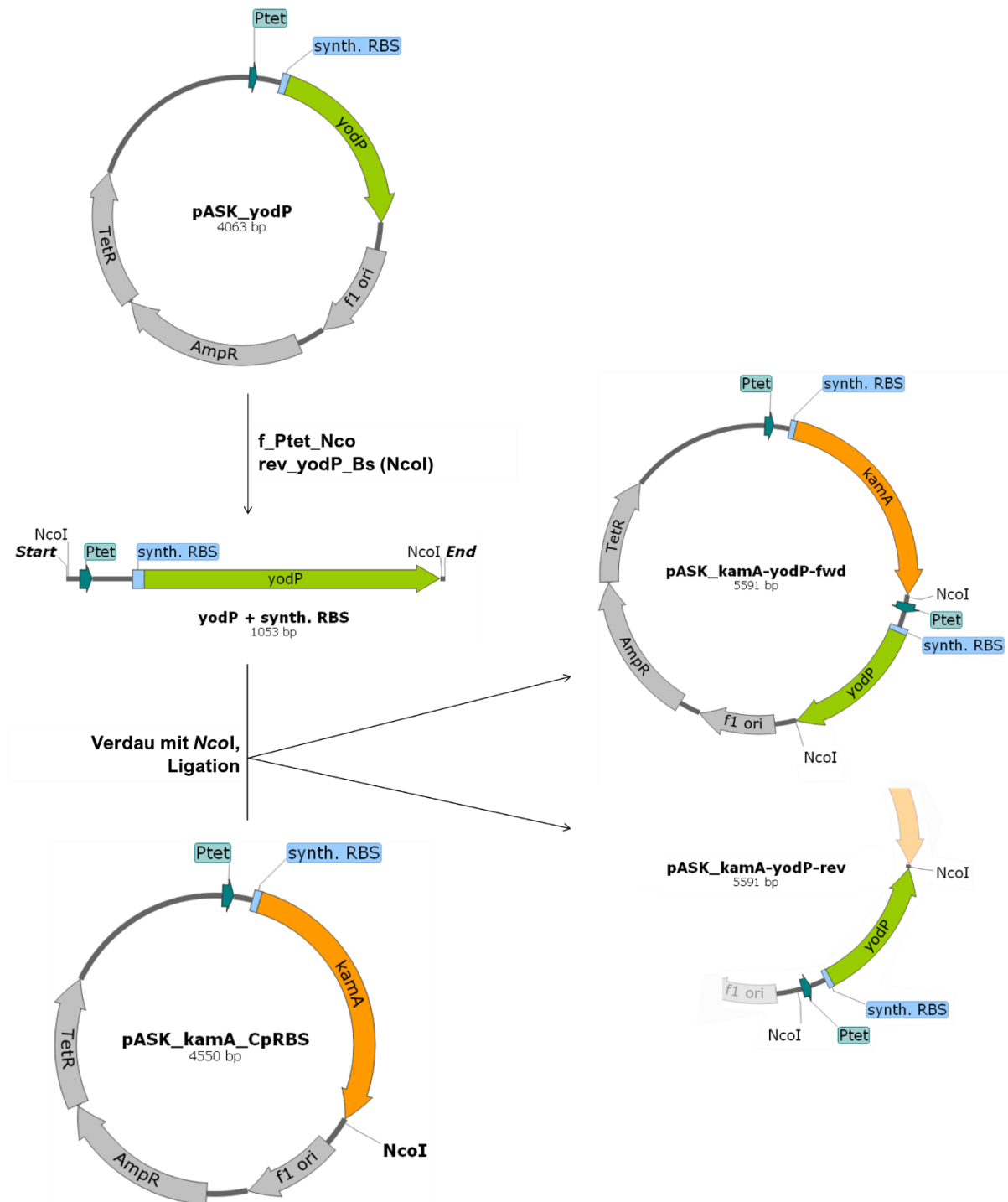
### 3.4.2 NA $\beta$ L-Produktion in *E. coli*

Für die NA $\beta$ L-Produktion in *E. coli* wurden die Erkenntnisse aus vorangegangenen Versuchen in die nachfolgenden Schritte miteinbezogen. Es stand vor allem die semi-anaerobe Anzucht von *E. coli*-Expressionskulturen im Fokus (vgl. 2.4.8), da auch mit KamA<sub>Bs</sub> kein Nachweis von  $\beta$ -Lysin bei aerober Anzucht erbracht werden konnte. Weitere Arbeiten mit der L-Lysin 2,3-Aminomutase aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> wurden dementsprechend eingestellt; auch weil im direkten Vergleich mit Enzymen aus alternativen Organismen die Produktionsmengen von  $\beta$ -Lysin gering waren (vgl. Tab. 3.5, 3.6 und 3.4.1.7). Es konnte zwar eine signifikant erhöhte Proteinproduktion im Stamm *E. coli* Rosetta™ (DE3) im Vergleich zu *E. coli* DH5 $\alpha$  gezeigt werden (vgl. Abb. 3.16); die Zwischenprodukt-Synthese zeigte jedoch geringe Werte auf. Demzufolge wurde der Fokus zunächst auf eine NA $\beta$ L-Produktion im Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  gelegt, in dem ca. sechsmal mehr  $\beta$ -Lysin nachgewiesen werden konnte (vgl. Tab. 3.6).

#### 3.4.2.1 Expressionsvektoren für die NA $\beta$ L-Synthese in *E. coli*

In Kapitel 3.4.1 konnte gezeigt werden, dass mithilfe aller getesteten L-Lysine 2,3-Aminomutasen in *E. coli*  $\beta$ -Lysin produziert werden konnte; die höchsten Mengen wurden mit dem Enzym KamA<sub>Cp</sub> aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>, sowie mit AbIA aus *Ms. mazei* Gö1 erzielt (vgl. Tab. 3.6 und 3.4.1.7). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden beide Proteine in Kombination mit einer passenden  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase zur NA $\beta$ L-Produktion genutzt. Das Enzym YodP aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> erschien aufgrund der vielversprechenden Resultate im Organismus *H. elongata* (vgl. 3.3.2) als geeignet. Die Nutzung von AbIB aus *Ms. mazei* Gö1

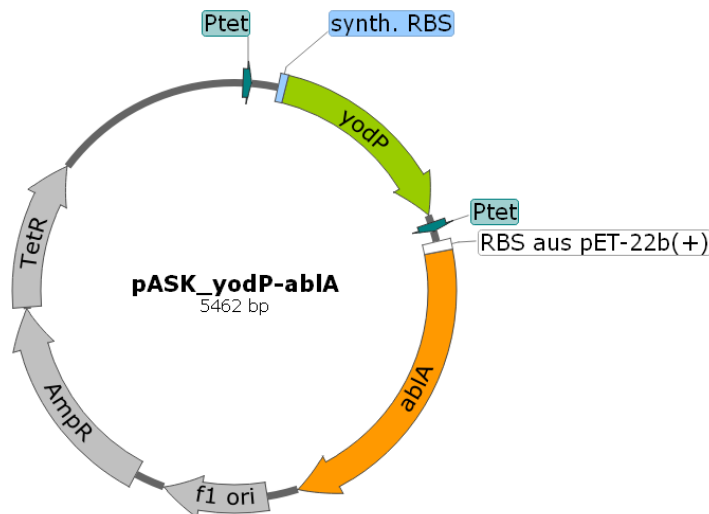
wurde aufgrund der negativen Resultate (Georgiev, 2017b; Hövels, 2015b, 2015a; Lohberger, 2009; Möller, 2011) ausgeschlossen. Für die Kombination aus  $KamA_{Cp}$  und YodP wurde ein neuer Expressionsvektor auf Basis des bereits entwickelten Vektors  $pASK\_kamA\_CpRBS$  konstruiert.



**Abb. 3.18: Konstruktion des Expressionsvektors  $pASK\_kamA\_yodP\_fwd$  und  $pASK\_kamA\_yodP\_rev$ .** Ein Abschnitt bestehend aus dem  $tet$ -Promoter, dem Gen  $yodP$  sowie dessen vorangestellter, synth. RBS wurde mittels PCR inkl. Vorzyklus (vgl. 2.5.2) aus dem Vektor  $pASK\_yodP$  (Georgiev, 2017b) amplifiziert und über die Schnittstelle  $NcoI$  in  $pASK\_kamA\_CpRBS$  eingebracht.  $AmpR$ : Ampicillinresistenz,  $TetR$ : Tet-Repressor,  $Ptet$ :  $tet$ -Promotor,  $ori$ : Replikationsursprung.

Als DNA-Matrize für *yodP* diente dabei das Plasmid pASK\_yodP (Georgiev, 2017). Das Gen *yodP* wurde inklusive einer vorangestellten synthetischen RBS und dem außerdem in der Matrize stromaufwärts liegenden *tet*-Promoter mithilfe der Primer f\_Ptet\_Nco (Moritz, 2018) und rev\_yodP\_Bs(NcoI) amplifiziert (vgl. Tab. 2.10). Es erfolgte die Integration des Amplifikats mittels der Schnittstelle *NcoI* in den Vektor pASK\_kamA\_CpRBS stromabwärts des dort befindlichen Gens *kamA<sub>Cp</sub>*. Da sich an beiden Enden des Amplifikats eine *NcoI*-Schnittstelle befand, konnte die Orientierung des Amplifikats hierbei variieren, also entweder in 5'-3'- (*forward*, fwd), oder 3'-5'-Richtung (*reverse*, rev) des Vektors liegen (vgl. Abb. 3.18). Nach der Ligation von Rückgrat und Amplifikat erfolgte die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit beiden möglichen Vektoren (vgl. 2.5.5 und 2.5.7).

Für den Expressionsvektor mit der Kombination aus *abIA* und *yodP* wurde der von Georgiev im Zuge der vorliegenden Arbeit bereits entwickelte Vektor pASK\_yodP-abIA genutzt (Georgiev, 2017). Dieser basiert ebenfalls auf dem pASK-IBA3-Plasmid und enthält beide entsprechenden Gene je unter der Kontrolle eines eigenen *tet*-Promoters (vgl. Abb. 3.19).



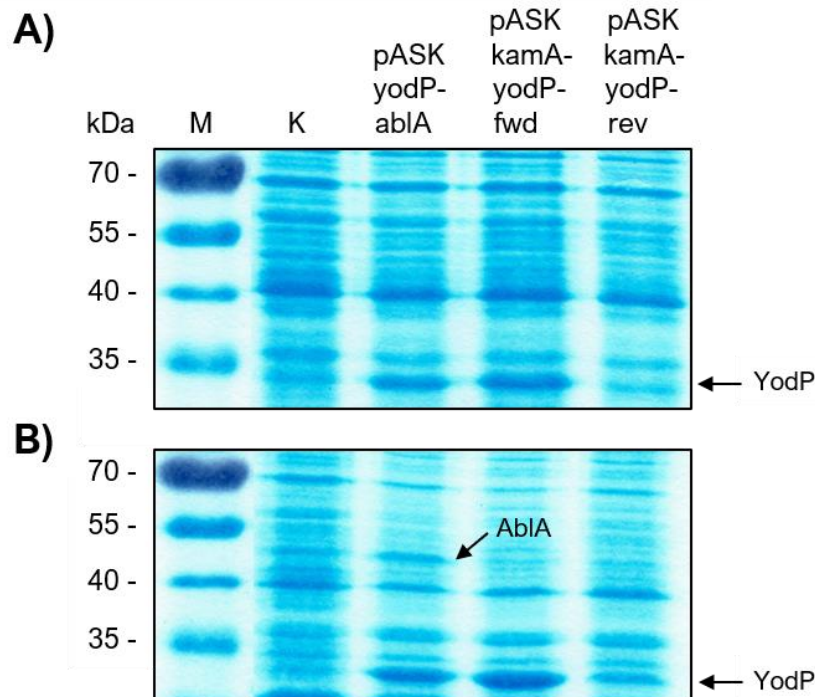
**Abb. 3.19: Expressionsvektor pASK\_yodP-abIA (mod. nach Georgiev, 2017b).** Der Expressionsvektor trägt das Gen der  $\beta$ -Lysin  $N_6$ -Acetyltransferase *yodP* aus *B. subtilis* DSM10<sup>T</sup> mit vorangestellter synth. RBS, sowie das Gen der L-Lysin 2,3-Aminomutase *abIA* aus *Ms. mazei* Gö1 mit der putativen RBS des pET-22b(+)-Vektors. Beide Gene stehen unter der Kontrolle eines *tet*-Promoters. AmpR: Ampicillinresistenz, TetR: Tet-Repressor, ori: Replikationsursprung, Ptet: *tet*-Promotor, RBS aus pET-22b(+): Sequenzabschnitt des T7-Promoters.

#### 3.4.2.2 Nachweis der Proteinproduktion

Zum Nachweis der Proteinproduktion wurden aerobe Expressionskulturen in LBG-Medium mit 0,5 % NaCl angelegt und die Genexpression bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 durch Zugabe von AHT induziert. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden 4 h nach Induktion Proben der Kulturen genommen und zur Aufreinigung der löslichen, sowie unlöslichen Proteinfractionen genutzt. In

Abb. 3.20 ist die SDS-PAGE-Analyse repräsentativer Proteinproben von jeweils einer Expressionskultur dargestellt.

Ein Nachweis der L-Lysin 2,3-Aminomutase AblA oder KamA in löslicher Form ist dabei in keinem der Expressionsstämme möglich. Für die  $\beta$ -Lysin  $N_6$ -Acetyltransferase YodP sind deutliche Banden in der löslichen Proteinfraction der Expressionsstämme *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA und *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA-yodP-fwd zu erkennen (vgl. Abb. 3.20); in *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA-yodP-rev ist nur eine geringe Menge Protein erkennbar. Die unlösliche Proteinfraction von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA zeigt eine Bande für AblA, diese ist jedoch schwächer ausgeprägt als in vorherigen Versuchen (vgl. Abb. 3.20 B und 3.17 B). Die clostridiale L-Lysin 2,3-Aminomutase KamA<sub>Cp</sub> kann weder in Proben der Expressionskulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA-yodP-fwd noch *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA-yodP-rev nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.20 B).



**Abb. 3.20: SDS-PAGE von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit verschiedenen Expressionsvektoren.** Die Stämme wurden in LBG-0,5 % kultiviert und die Genexpression durch AHT induziert. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden Proben 4 h nach Induktion genommen und aus diesen jeweils die lösliche (**A**), sowie die unlösliche Proteinfraction (**B**) aufgereinigt und aufgetragen (20  $\mu$ g Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für YodP (31,2 kDa), sowie eine für AblA (47,8 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. K: Kontrollkultur *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK-IBA3, M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

### 3.4.2.3 Produktion von NA $\beta$ L unter semi-anaeroben Bedingungen

Für den Nachweis von NA $\beta$ L wurden semi-anaerobe Expressionskulturen der Stämme *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA-yodP-fwd und *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA in MM63-Medium mit



0,5 % NaCl (*w/v*) und 50 mM Fumarat nach beschriebener Methode kultiviert (vgl. 2.4.8). Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse wurde die NaCl-Konzentration nach der Induktion auf 3 % NaCl (*w/v*) angehoben (vgl. 3.4.1.6 und 3.4.1.7). Für die Analyse mittels HPLC wurden die Kulturen in der stationären Phase geerntet. Nach der Gefriertrocknung folgten eine B&D-Extraktion und die Messung per HPLC (vgl. 2.7).

Bei der Analyse der Kulturen konnte jetzt die Bildung von NA $\beta$ L beobachtet werden. Es ist hervorzuheben, dass hier zum ersten Mal der Nachweis einer NA $\beta$ L-Produktion in *E. coli* mithilfe heterologer Enzyme erbracht werden konnte (vgl. Tab. 3.7). Die hier angegebenen IZV-Werte beziehen sich auf Berechnungen von Wang *et al.*, die für *E. coli* BL21 (DE3) ein IZV von 1,9 mL/g TG bei ca. 1 % NaCl postuliert haben. Die Angaben sind daher lediglich als Näherungswerte zu verstehen (Wang *et al.*, 2013).

**Tab. 3.7: NA $\beta$ L-Gehalt in *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den Expressionsvektoren pASK\_kamA-yodP-fwd und pASK\_yodP-abIA bei Anzucht in MM63-Medium bei 3 % NaCl (*w/v*).** Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG) und in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV).

| pASK_kamA-yodP-fwd |            | pASK_yodP-abIA |            |
|--------------------|------------|----------------|------------|
| mg/g TG            | mmol/L IZV | mg/g TG        | mmol/L IZV |
| 1,9                | 5,2        | 14,2           | 39,8       |

Diese Ergebnisse bestätigen die Funktionalität beider Expressionsvektoren in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Es ist auffällig, dass die produzierten Mengen stark voneinander abweichen; so ist in *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-abIA ca. achtmal mehr NA $\beta$ L nachweisbar. Dies ist unerwartet, da mit beiden L-Lysin 2,3-Aminomutasen KamA<sub>Cp</sub> und AbIA ursprünglich etwa gleiche Mengen der Ausgangssubstanz  $\beta$ -Lysin produziert werden konnten (vgl. Tab. 3.6 und 3.4.1.7) und die nun zusätzlich genutzte  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase in beiden Vektoren YodP ist. In den Kulturüberständen konnte kein NA $\beta$ L nachgewiesen werden.

Weitere Produktionsversuche bezogen sich auf die Untersuchungsergebnisse, die im Zuge der Arbeit von Georgiev (2017b) durchgeführt wurden. Dort konnte gezeigt werden, dass die Anzucht der Expressionsstämme in Glucose-Glycerin-Fumarat-Medium (GGF, mod. nach Spencer & Guest, 1973) zu einer erhöhten Produktion von NA $\beta$ L und zusätzlich zur Abgabe des Solut in den Kulturüberstand führen kann (Georgiev, 2017b und unveröffentlicht).

Im Vergleich zum standardmäßig genutzten MM63-Medium unterscheidet sich GGF-Medium vor allem durch den Zusatz von Mangan (2,3  $\mu$ M), CaCl<sub>2</sub> (4,5  $\mu$ M), Glycerin (40 mM) und Fumarat (50 mM), sowie einer verringerten Menge an Glucose (10 mM, vgl. 2.4.2).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Kultivierung der hier genutzten Expressionsstämme in GGF-Medium eine erhöhte Endproduktmenge, sowie die Sekretion von NA $\beta$ L in den

Kulturüberstand hervorruft. Semi-anaerobe Expressionskulturen in GGF-0,5-Medium wurden wie unter 2.4.8 beschrieben angezogen und die Zellen, sowie der Kulturüberstand mittels FMOc-ADAM-HPLC analysiert (vgl. 2.7). Dabei konnte nicht nur eine erhöhte Menge an NAßL nachgewiesen werden, sondern im Falle von *E. coli* DH5α pASK\_yodP-abIA auch die Abgabe des Solut in das Kulturmedium (vgl. Tab. 3.8).

**Tab. 3.8: NAßL-Gehalt in *E. coli* DH5α mit den Expressionsvektoren pASK\_kamA-yodP-fwd und pASK\_yodP-abIA bei Anzucht in GGF-Medium bei 3 % NaCl (w/v).** Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG), in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV) und in mg/L Kulturüberstand als arithmetisches Mittel einer Doppelbestimmung. MÜ: Medienüberstand, n.n.: nicht nachweisbar.

| pASK_kamA-yodP-fwd |            |         | pASK_yodP-abIA |            |         |
|--------------------|------------|---------|----------------|------------|---------|
| mg/g TG            | mmol/L IZV | mg/L MÜ | mg/g TG        | mmol/L IZV | mg/L MÜ |
| 2,4                | 6,8        | n.n.    | 23,8           | 66,7       | 31,2    |

Die hier angegebenen IZV-Werte beziehen sich auf Berechnungen von Wang *et al.*, die für *E. coli* BL21 (DE3) ein IZV von 1,9 mL/g TG bei ca. 1 % NaCl postuliert haben. Die Angaben sind daher lediglich als Näherungswerte zu verstehen (Wang *et al.*, 2013). Die intrazelluläre NAßL-Menge in *E. coli* DH5α pASK\_kamA-yodP-fwd ist im Vergleich zu vorherigen Versuchen mit MM63-Medium um ca. 30 % erhöht (vgl. Tab. 3.7 und 3.8), ein Nachweis des Solut im Kulturüberstand konnte nicht erbracht werden. In *E. coli* DH5α pASK\_yodP-abIA konnten ca. 70 % erhöhte Werte im Vergleich zu vorherigen Experimenten gemessen werden (vgl. Tab. 3.7 und 3.8). Außerdem wird ein Teil des produzierten NAßL in das umgebende Medium abgegeben. Die Kulturen erreichten eine Trockenbiomasse von ca. 0,33 g/L (Daten nicht gezeigt), was zu einem Gesamttiter von 39,1 mg NAßL je Liter Kulturvolumen führt.

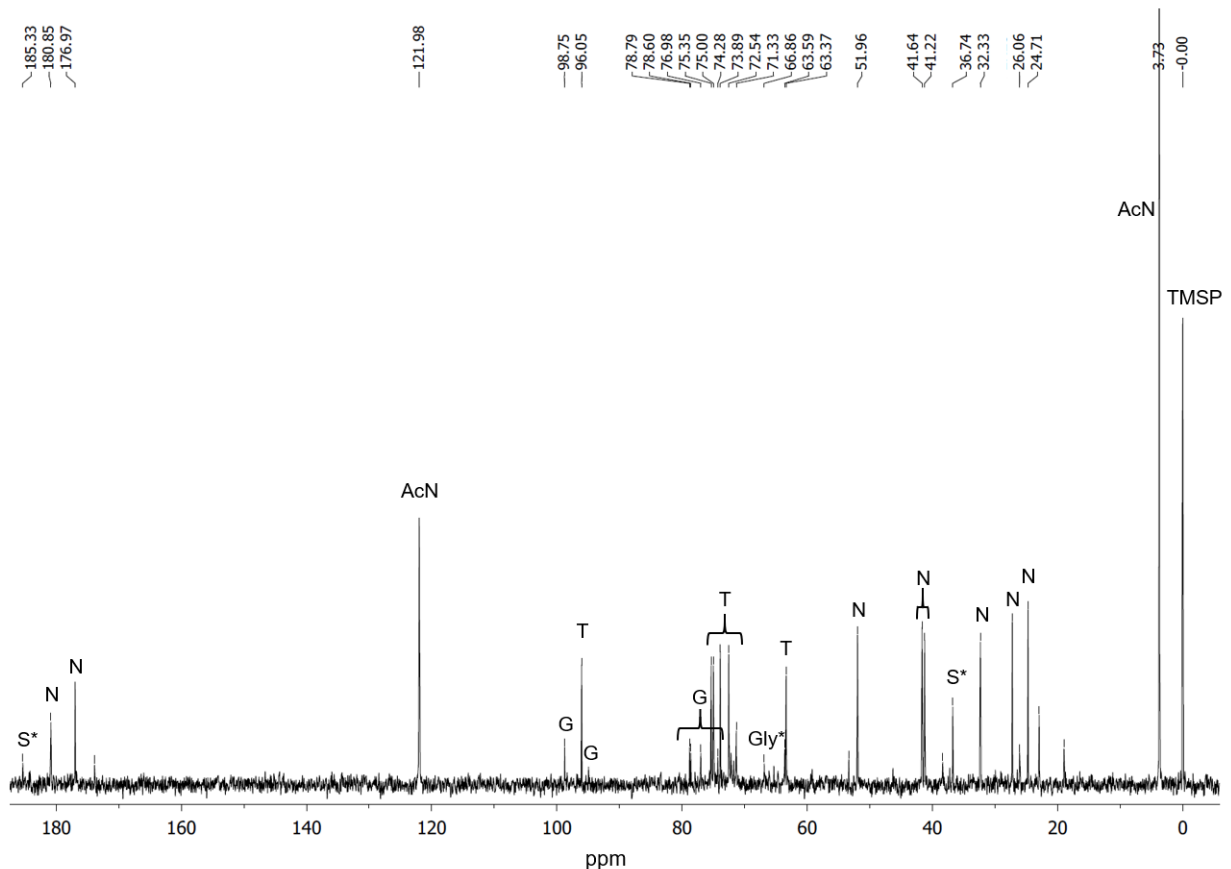
Der Expressionsstamm *E. coli* DH5a pASK\_kamA-yodP-rev zeigte in allen bisher durchgeführten Versuchen vergleichbare Ergebnisse der Produktmenge zum Stamm mit dem Expressionsvektor pASK\_kamA-yodP-fwd (Daten nicht gezeigt).

#### 3.4.2.4 Nachweis von NAßL mittels NMR

Neben dem Nachweis mittels HPLC sollte die Produktion von NAßL in *E. coli* auch durch eine <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Dafür wurden semi-anaerobe Expressionskulturen von *E. coli* DH5α pASK\_kamA-yodP-fwd und *E. coli* DH5α pASK\_yodP-abIA in GGF-0,5-Medium angelegt und die Salzkonzentration zeitgleich mit der Induktion und der Zugabe des Substrats L-Lysin auf 3 % NaCl (w/v) angehoben (vgl. 2.4.8 und 3.4.2.2). Die Zellen wurden über Nacht inkubiert, am nächsten Tag geerntet und die Zellmasse gefriergetrocknet. Dem

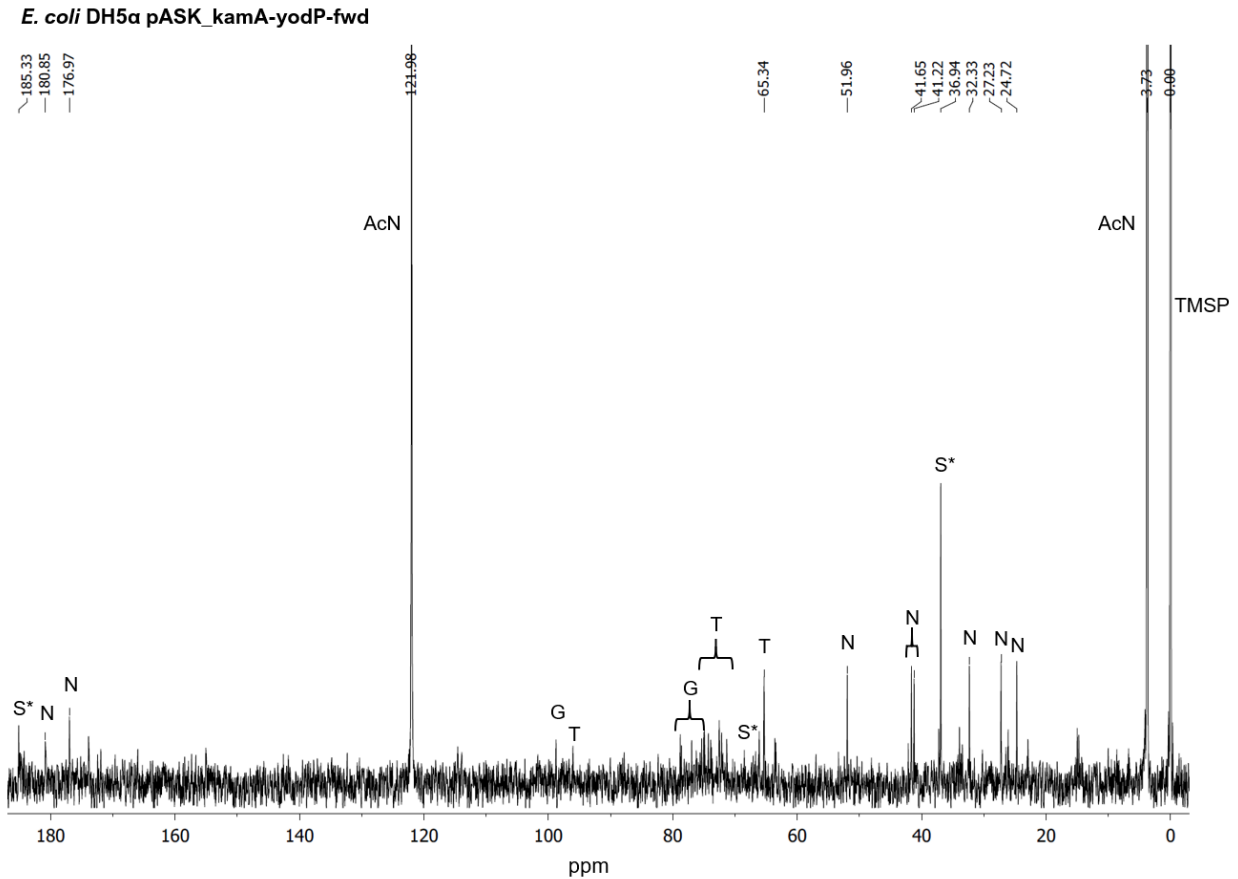
schlossen sich eine Extraktion nach Bligh & Dyer und die Aufbereitung des Extraktes für die NMR-Analyse an (vgl. 2.7.4).

***E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-abIA**



**Abb. 3.21a:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie des Zellextrakts von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-abIA. Die Zellen der semi-anaeroben Kulturen wurden in der stationären Phase geerntet, auf Filterpapier ausgestrichen, gefriergetrocknet und anschließend einer B&D-Extraktion unterzogen. Der Extrakt wurde mit dem internen Standard TMSP versetzt. Neben dem Standardsignal konnten die Signale für NA $\beta$ L (N) eindeutig identifiziert werden (Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Einige Signale konnten anderen Substanzen wie Trehalose (T), Glucose (G), Acetonitril (AcN) und möglicherweise Glycerin (Gly\*), sowie evtl. Succinat (S\*) zugeordnet werden, wobei ein fehlendes Signal von Glycerin bei ca. 75 ppm und ein fehlendes Signal von Succinat bei ca. 77 ppm überlagert, oder aufgrund einer zu geringen Konzentration nicht eindeutig sichtbar ist.

Die Analyse des Extraktes mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie bestätigte eindeutig die Produktion des kompatiblen Soluts N $_{\epsilon}$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin für beide der oben beschriebenen Kombinationen aus L-Lysin 2,3-Aminomutase und  $\beta$ -Lysin N $_6$ -Acetyltransferase im Expressionsorganismus *E. coli* DH5 $\alpha$  (vgl. Abb. 3.21a und b).



**Abb. 3.21b:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie des Zellextrakts von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA-yodP-fwd. Die Zellen der semi-anaeroben Kulturen wurden in der stationären Phase geerntet, auf Filterpapier ausgestrichen, gefriergetrocknet und anschließend einer B&D-Extraktion unterzogen. Der Extrakt wurde mit dem internen Standard TMSM versetzt. Neben dem Standardsignal konnten die Signale für NA $\beta$ L (N) eindeutig identifiziert werden (Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Einige Signale konnten anderen Substanzen wie Trehalose (T), Glucose (G), Acetonitril (AcN), sowie evtl. Succinat (S\*) zugeordnet werden, wobei ein fehlendes Signal von Succinat bei ca. 77 ppm überlagert, oder aufgrund einer zu geringen Konzentration nicht eindeutig sichtbar ist.

Zusätzliche Untersuchungen der Extrakte mittels isokratischer HPLC ergaben deutlich erhöhte intrazelluläre Mengen an NA $\beta$ L in beiden Stämmen (vgl. Tab. 3.9). Ein Nachweis des Soluts im Kulturüberstand konnte jedoch für keine der Expressionskulturen erbracht werden.

**Tab. 3.9:** NA $\beta$ L-Gehalt der semi-anaeroben Kulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den Expressionsvektoren pASK\_kamA-yodP-fwd und pASK\_yodP-abIA zur NMR-Analyse. Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG) und in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV).

| pASK_kamA-yodP-fwd |            | pASK_yodP-abIA |            |
|--------------------|------------|----------------|------------|
| mg/g TG            | mmol/L IZV | mg/g TG        | mmol/L IZV |
| 7,1                | 19,9       | 50,8           | 142,1      |

Die hier angegebenen IZV-Werte beziehen sich auf Berechnungen von Wang *et al.*, die für *E. coli* BL21 (DE3) ein IZV von 1,9 mL/g TG bei ca. 1 % NaCl postuliert haben. Die Angaben sind

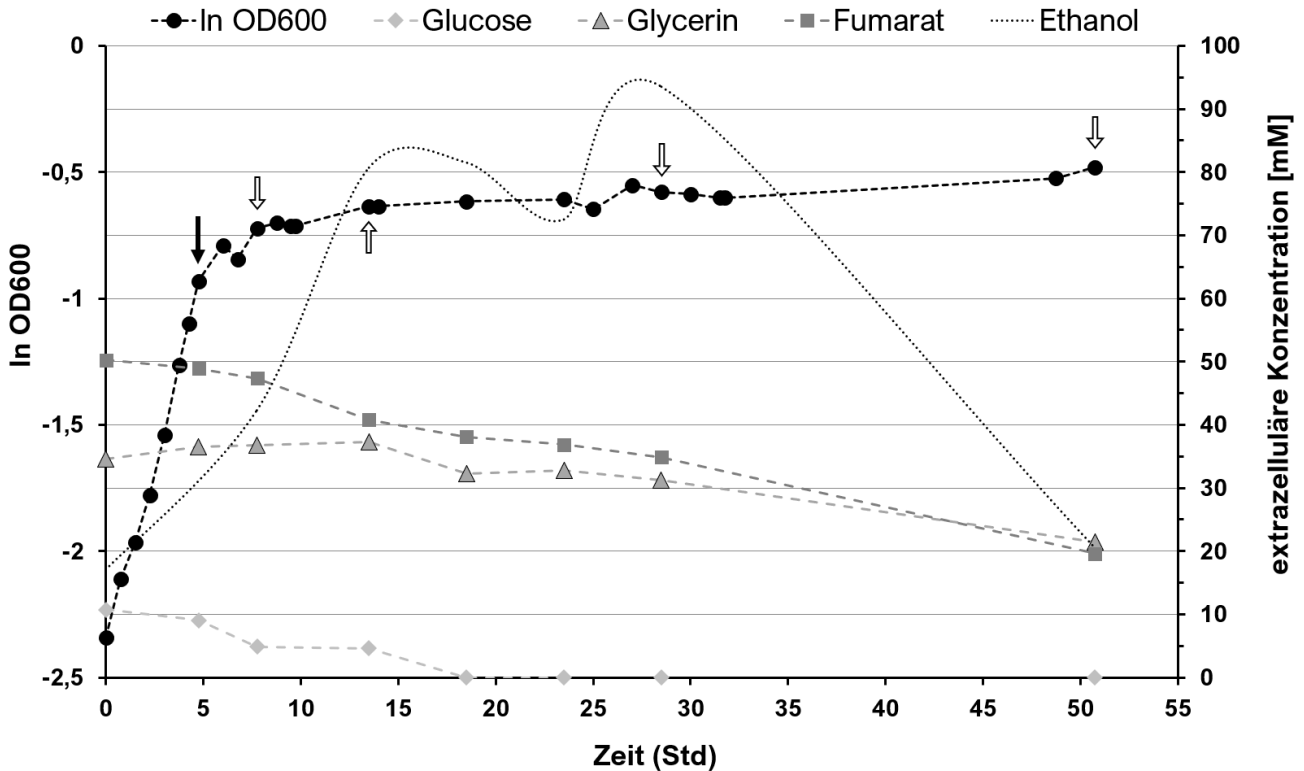
daher lediglich als Näherungswerte zu verstehen (Wang *et al.*, 2013). Die hier präsentierten Analysen mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie beziehen sich auf das gleiche HPLC-Signal von NA $\beta$ L, wie es auch in Expressionsstämmen von *H. elongata* zu finden ist (vgl. 3.3.2.2). In *H. elongata* konnte aufgrund zu geringer NA $\beta$ L-Konzentrationen kein Nachweis mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse durchgeführt werden. Die hier präsentierten Ergebnisse identifizieren das ebenfalls dort detektierte HPLC-Signal als NA $\beta$ L und bestätigen somit auch eine Produktion in *H. elongata*. Der Nachweis des Endprodukts belegt außerdem die zwangsläufige Produktion des Zwischenprodukts  $\beta$ -Lysin in *H. elongata* und *E. coli*.

#### 3.4.2.5 Semi-anaerobe Batch-Fermentation

Nachdem die Produktion von NA $\beta$ L in *E. coli* im Schüttelkolben bzw. in Anaerobenflaschen erfolgreich nachgewiesen werden konnte, sollte nun die heterologe Produktion unter kontrollierten Wachstumsbedingungen analysiert werden. Da der Expressionsstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA bis zu diesem Zeitpunkt in allen durchgeführten Experimenten die höchsten Erträge an NA $\beta$ L gezeigt hatte (vgl. Tab. 3.7 und 3.9), wurde dieser für eine Batch-Fermentation im 1 L-Fermenter genutzt. Dabei erfolgte die stringente Kontrolle des pH-Werts, der Temperatur und der Sauerstoffzufuhr. Als Fermentationsmedium wurde modifiziertes GGF-Medium mit 0,5 % NaCl genutzt (vgl. 2.4.2).

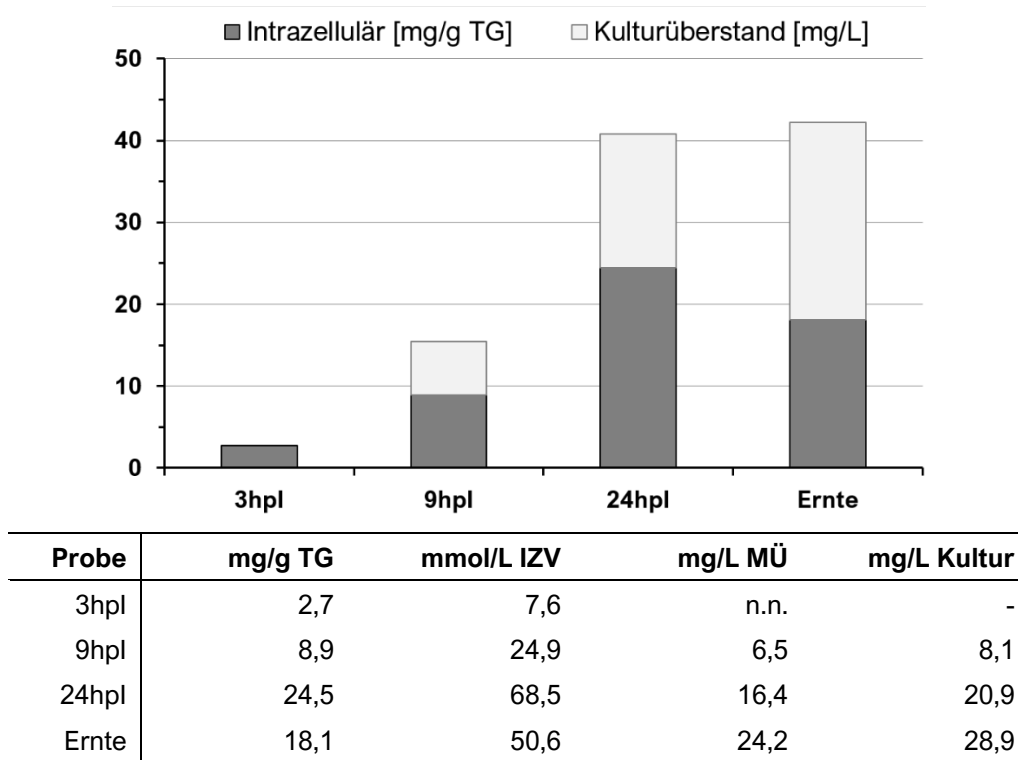
Zu Beginn der Fermentation waren im Medium 50 mM Fumarat, 40 mM Glycerin und 10 mM Glucose enthalten. Die Zugabe von Glucose sollte eine schnelle Zunahme der Zelldichte ermöglichen; diese stieg kurz nach der Inokulation ohne eine lag-Phase mit einer Wachstumsrate von  $0,32\text{ h}^{-1}$  (vgl. Abb. 3.22). Zum Zeitpunkt der Induktion waren lediglich ca. 1 mM Glucose und Fumarat verbraucht. Bereits 3 h nach Induktion konnte ein intrazellulärer Gehalt von 2,7 mg/g TG NA $\beta$ L nachgewiesen werden; die Glucose-Konzentration war auf 4,9 mM und die Fumarat-Konzentration auf 47,3 mM gesunken. Außerdem stieg der Ethanolgehalt im Medium an. Neun Stunden nach Induktion hatte sich die Menge an intrazellulärem NA $\beta$ L auf ca. 9 mg/g TG erhöht; außerdem konnte NA $\beta$ L im Kulturüberstand nachgewiesen werden (ca. 6,5 mg/L, vgl. Abb. 3.23). Während die Konzentration von Glucose im Medium ungefähr gleich blieb, nahm die Fumarat-Konzentration stärker ab und fiel auf 40,8 mM. Ab diesem Zeitpunkt nahm die Zelldichte im Verlauf der Fermentation nur noch wenig zu und blieb ab ca. 15 h etwa unverändert, was mit dem vollständigen Verbrauch von Glucose korrelierte. Die intrazelluläre NA $\beta$ L-Konzentration erreichte mit ca. 25 mg/g TG den höchsten Wert nach 24 h (post-Induktion), womit die Ergebnisse zur semi-anaeroben Anzucht in GGF-Medium im Schüttelkolben, bzw. Anaerobenflaschen reproduziert werden konnten; die extrazelluläre Konzentration betrug jedoch nur ca. die Hälfte vorheriger Versuche (vgl. Abb. 3.23, sowie Tab.

3.8). 24 h nach Induktion wurde erstmalig eine deutliche Abnahme von Glycerin auf ca. 30 mM, sowie von Fumarat auf 35 mM verzeichnet. Zum Zeitpunkt der Ernte hatte die Kultur eine End-OD<sub>600</sub> von 0,64 erreicht.



**Abb. 3.22: Verlauf der semi-anaeroben Batch-Fermentation.** *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA wurde in mod. GGF-Medium mit 0,5 % NaCl im 1 L-Fermenter kultiviert (vgl. 2.4.9). Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 erfolgte die Zugabe des Induktors AHT, des Substrats L-Lysin und NaCl (Salzschock auf 3 % w/v Endkonz.). Im direkten Anschluss wurde die Sauerstoffzufuhr gestoppt, die Rührzahl von 250 rpm auf 100 rpm verringert und die Temperatur auf 30 °C gesenkt. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH automatisch eingestellt (pH 6,6 - 7,1). Der Wachstumsverlauf ist durch den natürlichen Logarithmus der OD<sub>600</sub> gezeigt. Die Medienüberstände wurden mittels HPLC analysiert und quantifiziert. Die Ethanol-Kurve setzt sich aus Werten eines internen automatischen Abgleichs der Chromatogramme und einem Standard zusammen und ist als Trend zu verstehen. Schwarzer Pfeil: Zeitpunkt der Induktion, Weiße Pfeile: Probennahme für die Bestimmung von NA $\beta$ L.

Der finale NA $\beta$ L-Gehalt in den Zellen betrug ca. 18 mg/g TG, die Konzentration im Kulturüberstand war auf ca. 24,2 mg/L gestiegen (vgl. Abb. 3.23). Der Ethanol-Gehalt befand sich auf einem vergleichbarem Niveau wie zum Start der Fermentation; der Gehalt an Fumarat und Glycerin lag bei ca. 20 mM (vgl. Abb. 3.22). Im Zuge der Fermentation wurden ebenfalls die intrazellulären Konzentrationen der Stoffwechselprodukte Succinat und Acetat gemessen. Diese betrugen zu keinem Zeitpunkt mehr als 4,3 mM (Succinat), bzw. 2,6 mM (Acetat). Die in Abb. 3.23 angegebenen IZV-Werte für NA $\beta$ L beziehen sich auf Berechnungen von Wang *et al.*, die für *E. coli* BL21 (DE3) ein IZV von 1,9 mL/g TG bei ca. 1 % NaCl postuliert haben. Die Angaben sind daher lediglich als Näherungswerte zu verstehen (Wang *et al.*, 2013).



**Abb. 3.23: NAβL-Produktion mittels Batch-Fermentation von *E. coli* DH5α pASK\_yodP-ablA.** Oben: Gehalt von NAβL in den Zellen und im Kulturüberstand. Unten: Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG), in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV), in mg/L Kulturüberstand und der Gesamttiter (mg/L Kultur). MÜ: Medienüberstand, n.n.: nicht nachweisbar. Ernte: ca. 51 h nach Inokulation.

Um das Kulturwachstum zu fördern und den Übergang, sowie die Bedingungen für die anaerobe Fumarat-Atmung zu begünstigen, wurde eine weitere Anzucht dieses Stammes unter kontrollierten Bedingungen im 1 L-Fermenter durchgeführt. Dabei erfolgte im Fermentationsverlauf eine weitere Zugabe von C-Quelle und Fumarat (Fed-Batch-Ansatz); außerdem wurden in Anlehnung an Kuchenreuther *et al.* (2010) weitere Veränderungen an der Zusammensetzung des Fermentationsmediums vorgenommen (vgl. „Semi-anaerobe Fed-Batch-Fermentation“ im Anhang). Eine Auswertung jener Fed-Batch-Fermentation zeigte jedoch, dass diese Variante der Anzucht unter kontrollierten Bedingungen weder zu einer Steigerung der Zelldichte, noch zu einer Steigerung des intra- oder/und extrazellulären Gehalts an NAβL geführt hat (vgl. Abb. 6.5 im Anhang).

### 3.5 Vergleich der NA $\beta$ L-Produktion in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

In bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass mit dem Expressionsvektor pASK\_yodP-ablA die höchsten Erträge an NA $\beta$ L erzielt werden konnten, wobei der Gehalt bis zu ca. 50 mg/g TG und 140 mmol/L IZV erreichte (vgl. 3.4.2.4, Tab. 3.9). Der dafür bisher verwendete Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  verfügt u.a. über drei Mutationen *recA1*, *endA1* und *lacZ* $\Delta$ M15, die ihn vor allem als klassischen Klonierungsstamm ausweisen. So ist die Plasmid-/Vektorstabilität erhöht (*endA1*), die homologe Rekombination verhindert (*recA1*) und ein Blau-Weiß-Screening möglich (*lacZ* $\Delta$ M15) (Hanahan, 1983).

Um die Produktionsmengen von NA $\beta$ L mithilfe von pASK\_yodP-ablA in geeigneteren *E. coli*-Stämmen zu vergleichen, wurden vier weitere Stämme mit dem Expressionsvektor transformiert: *E. coli* MG1655, *E. coli* BL21, *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ *iscR* und *E. coli* BKA-13. Dabei stellt der Stamm *E. coli* MG1655 den „Ur-K12 Stamm“ dar, der auch für die Genomsequenzierung genutzt wurde (Blattner *et al.*, 1997). In *E. coli* BL21 fehlen u.a. die Proteasen Lon und OmpT, was den Abbau heterologer Proteine stark reduziert und diesen Stamm als klassischen (Protein-)Produktionsstamm charakterisiert (Rosano & Ceccarelli, 2014). *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ *iscR* ist ein BL21-Derivat, welches zusätzlich das  $\lambda$ DE3-Lysogen für die T7-RNA-Polymerase trägt und in dem eine Deletion im *iscR*-Gen auftritt, welches für den Repressor des *isc*-Operons kodiert. Dieses Operon ist für die Ausbildung von Eisen-Schwefel-Clustern unabdingbar; ein Ausfall des zugehörigen Repressors IscR führt dementsprechend zu einer erhöhten Produktion von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen (Akhtar & Jones, 2008; Kuchenreuther *et al.*, 2010). Der Stamm *E. coli* BKA-13 weist neben Deletionen in verschiedenen Transportergenen (Haardt *et al.*, 1995) eine Deletion des *otsB*-Gens auf, welches für die Trehalose-6-Phosphatase kodiert. Eine *de novo*-Synthese von Trehalose, z.B. als Schutzmechanismus gegenüber osmotischem Stress, ist in diesem Stamm dementsprechend nicht möglich (Burdziak, 2006).

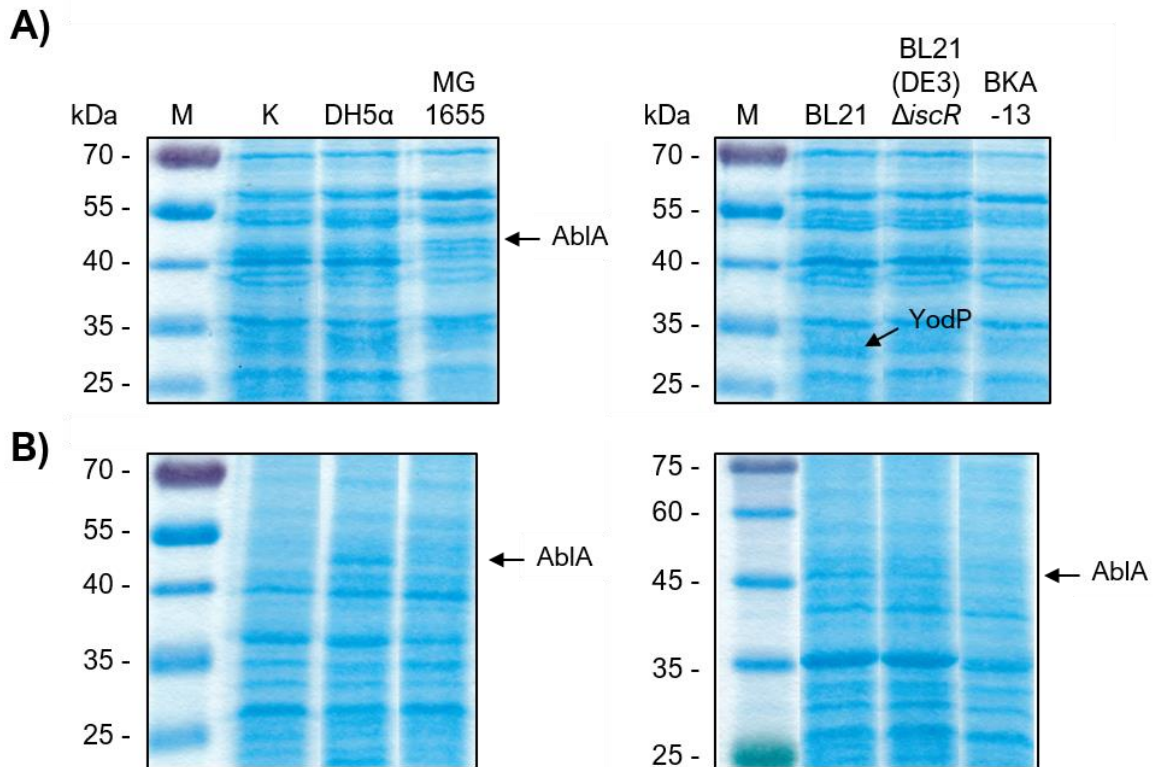
Im Folgenden wurde die Protein- und NA $\beta$ L-Produktion mithilfe von pASK\_yodP-ablA in den oben erwähnten Stämmen mit der in *E. coli* DH5 $\alpha$  verglichen.

#### 3.5.1 Protein-Nachweis und NA $\beta$ L-Produktion in Fed-Batch-Medium

Zunächst wurde die Protein- und NA $\beta$ L-Produktion in allen Stämmen bei Anzucht in Fed-Batch-Medium verglichen. Die Verwendung dieses Mediums sollte, durch Ammoniumeisen(III)-Citrat und die spätere Zugabe von L-Cystein, die Produktion Eisen-Schwefel-Cluster-haltiger



Proteine verbessern. Dafür wurden semi-anaerobe Expressionskulturen in Fed-Batch-Medium mit 0,5 % NaCl aerob bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 angezogen (vgl. 2.4.8 und Tab. 2.8). Nach der Induktion durch AHT und der Zugabe aller Zusätze (vgl. 2.4.3) wurden die Kulturen komplett in Anaerobenflaschen überführt und bei 30 °C bis zur stationären Phase inkubiert. Ein Teil des Zellmaterials wurde zur Aufreinigung der löslichen, sowie der unlöslichen Proteinfraction genutzt. Abb. 3.24 zeigt die SDS-PAGE von repräsentativen Proteinproben jeweils einer Expressionskultur.

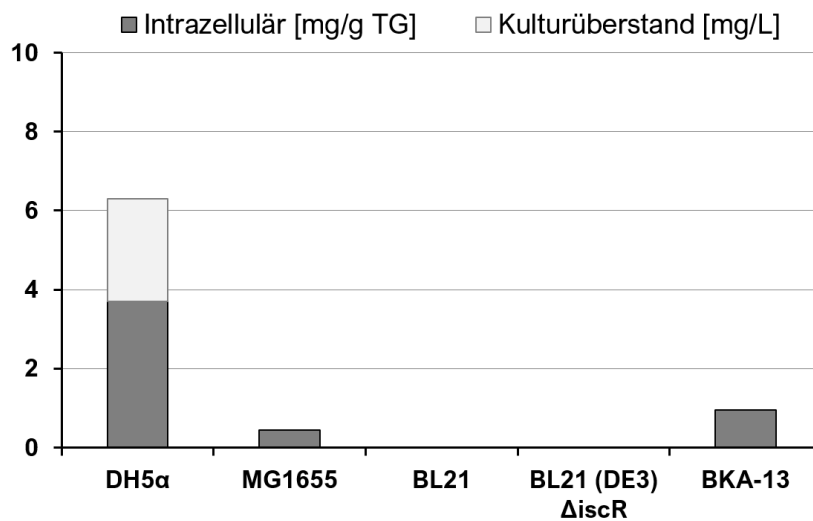


**Abb. 3.24: SDS-PAGE von verschiedenen *E. coli*-Stämmen mit dem Expressionsvektor pASK\_yodP-ablA nach Anzucht in Fed-Batch-Medium.** Die Stämme wurden in Fed-Batch-Medium mit 0,5 % NaCl kultiviert und die Genexpression durch AHT induziert. Für die Analyse mittels SDS-PAGE wurde die anaeroben Kulturen in der stationären Phase geerntet und aus einem Teil des Zellmaterials jeweils die lösliche (**A**), sowie die unlösliche Proteinfraction (**B**) aufgereinigt und aufgetragen (20 µg Protein/Laufspur). Die potenziellen Banden für YodP (31,2 kDa), sowie eine für AblA (47,8 kDa) sind mit einem Pfeil markiert. K: Kontrollstamm *E. coli* DH5α pASK-IBA3, M: PageRuler Prestained Protein Ladder, bzw. ExcelBand™ 3-Color Broad Range Protein Marker.

AblA konnte deutlich in zwei Stämmen detektiert werden: *E. coli* DH5α weist eine deutliche Bande für das Protein in der unlöslichen Proteinfraction auf (vgl. Abb. 3.24 B), während die Aminomutase im Stamm *E. coli* MG1655 nur in der löslichen Proteinfraction sichtbar ist (vgl. Abb. 3.24 A). Des Weiteren zeigen beide *E. coli* BL21-Stämme in der unlöslichen Proteinfraction jeweils eine Bande, die AblA entsprechen könnte; eine eindeutige Zuordnung kann jedoch aufgrund des abweichenden Proteinmarkers nicht erfolgen (vgl. Abb. 3.24 B). In

allen anderen Expressionsstämmen konnte kein Nachweis erbracht werden. Ein Beleg für die Produktion der Acetyltransferase YodP lässt sich in der löslichen Proteinfraction des Stammes *E. coli* BL21 finden (vgl. Abb. 3.24 A).

Der Nachweis der NA $\beta$ L-Produktion mittels FMOC-ADAM-HPLC erfolgte analog zur bisherigen Vorgehensweise. Das geerntete Zellmaterial wurde gefriergetrocknet und einer B&D-Extraktion unterzogen; darauf folgte die Derivatisierung und Messung der Proben (vgl. 2.7). Abb. 3.25 zeigt den NA $\beta$ L-Gehalt der Expressionskulturen, wobei in drei der untersuchten Stämmen NA $\beta$ L nachgewiesen werden konnte.



|            | DH5 $\alpha$ | MG1655 | BL21 | BL21 (DE3) $\Delta$ iscR | BKA-13 |
|------------|--------------|--------|------|--------------------------|--------|
| mg/g TG    | 3,7          | 0,5    | n.n. | n.n.                     | 1      |
| mmol/L IZV | 10,4         | 1,3    | n.n. | n.n.                     | 2,6    |
| mg/L       | 2,6          | n.n.   | n.n. | n.n.                     | n.n.   |

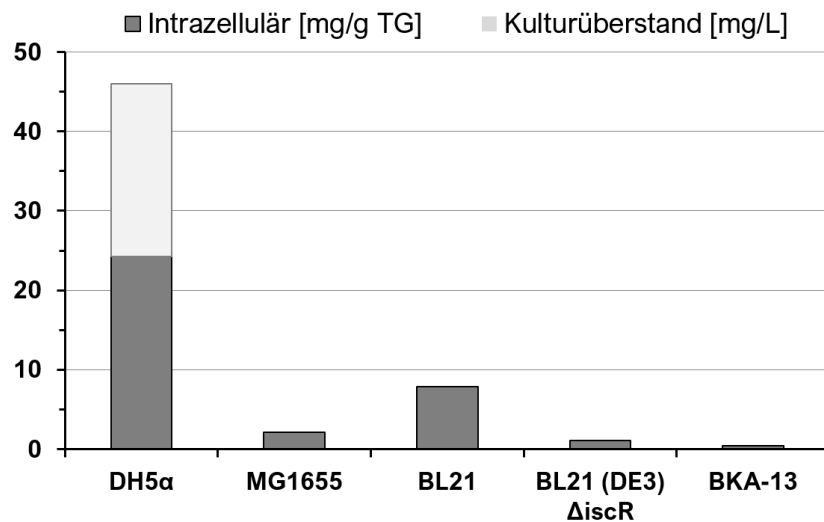
**Abb. 3.25: NA $\beta$ L-Produktion in verschiedenen *E. coli*-Stämmen mit dem Expressionsvektor pASK\_yodP-ablA bei Anzucht in Fed-Batch-Medium.** Oben: Gehalt von NA $\beta$ L in den Zellen und im Kulturüberstand. Unten: Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG), in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV) und in mg/L Kulturüberstand als arithmetisches Mittel einer Doppelbestimmung. MÜ: Medienüberstand, n.n.: nicht nachweisbar.

Die hier angegebenen IZV-Werte beziehen sich auf Berechnungen von Wang *et al.*, die für *E. coli* BL21 (DE3) ein IZV von 1,9 mL/g TG bei ca. 1 % NaCl postuliert haben. Die Angaben sind daher lediglich als Näherungswerte zu verstehen (Wang *et al.*, 2013). In *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA wird ein Gehalt von fast 4 mg NA $\beta$ L/g TG erreicht, was mit den Werten der Fed-Batch-Fermentation verglichen werden kann, aber deutlich unter den experimentell bereits ermittelten Höchstmengen liegt (vgl. Abb. 3.25, sowie 3.4.2.4, und 6.5 im Anhang). Zudem wurde eine sehr geringe Menge des kompatiblen Solut im Medium gefunden (Gesamtiter 4,7 mg/L Kultur). *E. coli* DH5 $\alpha$  zeigt im direkten Vergleich mit den anderen hier

genutzten Expressionsstämmen die höchste Produktion. In den *E. coli*-Expressionsstämmen BKA-13 und MG1655 konnte ebenfalls ein Nachweis für NAβL erbracht werden, jedoch sind die Werte mit ca. 1 mg/g TG und ca. 0,5 mg/g TG niedrig und gehören zu den geringsten bisher ermittelten Werten (vgl. Abb. 3.25). In den Zellen der Expressionsstämme *E. coli* BL21 und dem Derivat *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR konnte kein NAβL detektiert werden.

### 3.5.2 NAβL-Produktion in GGF-Medium

Zusätzlich wurde die Produktion von NAβL in GGF-Medium untersucht. Dafür wurden semi-anaerobe Expressionskulturen in GGF-0,5-Medium angelegt (vgl. 2.4.8) und Zellmaterial aus der anaeroben Kultur in der stationären Phase für die Analyse mittels FMOC-ADAM-HPLC genutzt (vgl. 2.7). Der NAβL-Gehalt der Expressionskulturen ist in Abb. 3.26 gezeigt. Im Gegensatz zur Anzucht in Fed-Batch-Medium konnte in allen Stämmen der Nachweis des kompatiblen Solut erbracht werden.



|            | DH5α | MG1655 | BL21 | BL21 (DE3) $\Delta$ iscR | BKA-13 |
|------------|------|--------|------|--------------------------|--------|
| mg/g TG    | 24,2 | 2,2    | 7,9  | 1,1                      | 0,5    |
| mmol/L IZV | 67,7 | 6      | 22   | 3,1                      | 1,3    |
| mg/L       | 21,8 | n.n.   | n.n. | n.n.                     | n.n.   |

**Abb. 3.26: NAβL-Produktion in verschiedenen *E. coli*-Stämmen mit dem Expressionsvektor pASK\_yodP-abIA bei Anzucht in GGF-Medium.** Oben: Gehalt von NAβL in den Zellen und im Kulturüberstand. Unten: Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG), in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV) und in mg/L Kulturüberstand als arithmetisches Mittel einer Doppelbestimmung. MÜ: Medienüberstand, n.n.: nicht nachweisbar.

Die hier angegebenen IZV-Werte beziehen sich auf Berechnungen von Wang *et al.*, die für *E. coli* BL21 (DE3) ein IZV von 1,9 mL/g TG bei ca. 1 % NaCl postuliert haben. Die Angaben sind

daher lediglich als Näherungswerte zu verstehen (Wang *et al.*, 2013). Der NAßL-Gehalt ist im direkten Vergleich am höchsten im bisher genutzten Expressionsstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA (Gesamtiter 29,1 mg/L Kultur). Mit 2,2 mg/g TG ist die NAßL-Menge in *E. coli* MG1655 niedrig, sie stellt jedoch eine ca. fünffache Steigerung des bisherigen Gehalts in Fed-Batch-Medium dar (vgl. Abb. 3.25 und Abb. 3.26). Die Anzucht der Expressionsstämme in GGF-Medium hat außerdem positive Auswirkung auf die Stämme *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR, in denen erstmalig NAßL gemessen werden konnte. Dabei übertrifft *E. coli* BL21 mit einem NAßL-Gehalt von 7,9 mg/g TG auch den Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA-yodP-fwd (vgl. Abb. 3.26, sowie 3.4.2.3 Tab. 3.7, Tab. 3.8 und 3.4.2.4 Tab. 3.9). Der NAßL-Gehalt in *E. coli* BKA-13 bleibt trotz des Medienwechsels etwa auf dem gleichen Niveau wie in vorherigen Versuchen (vgl. Abb. 3.26 und 3.25).

### 3.6 Das bifunktionelle NA $\beta$ L-Synthesegen aus *Dehalococcoides mccartyi* CBDB1

Die bisher gezeigten Ergebnisse (vgl. 3.2 - 3.5) umfassen die Synthese von NA $\beta$ L mithilfe von zwei Enzymen: einer L-Lysin 2,3-Aminomutase, die  $\alpha$ -Lysin zu  $\beta$ -Lysin umwandelt, und einer N<sub>6</sub>-Acetyltransferase, die  $\beta$ -Lysin acetyliert und so NA $\beta$ L formt. Die erfolgreiche Synthese des Zwischenprodukts, sowie des Endprodukts durch diesen 2-Schritt-Weg mithilfe beider Proteine, teilweise aus unterschiedlichen Ursprungsorganismen, ist in *E. coli* und *H. elongata* in der vorliegenden Arbeit gezeigt worden (vgl. 3.3 und 3.4).

Die Produktion (heterologer) Proteine erfordert den Einsatz von Energie und Ressourcen, die der Wirtszelle nicht mehr für den regulären Metabolismus zur Verfügung stehen (Glick, 1995), was somit Auswirkungen auf die Wachstumsrate haben kann (vgl. Abb. 3.5). Bei der Synthese eines Produktes durch heterologe Enzyme erhöht sich die metabolische Belastung weiter, da neben den benötigten Proteinen zusätzliche Substanzen gebildet werden. Eine mögliche Entlastung der Zelle könnte in so einem Fall durch die Verkürzung des Synthesewegs erreicht werden, so z.B. durch die direkte Zugabe des Vorläufermoleküls, bzw. des Substrats, oder die Nutzung eines Enzyms, was einen 2-Schritt-Weg in sich vereint.

*Dehalococcoides mccartyi* aus der Klasse der *Chloroflexi* gehört der Gattung *Dehalococcoides* an, welche sich vor allem durch den Stoffwechsel der reduktiven Dehalogenierung von chlorierten Aromaten und Aliphaten auszeichnet (Kube *et al.*, 2005). Im Jahr 2004 entdeckten Empadinhas *et al.* (2004) eine neue Mannosylglycerat-Synthase in *D. mccartyi* 195<sup>T</sup> (ehemals *D. ethenogenes*, Löffler *et al.*, 2013) und erweiterten so die Bandbreite an Organismen, die im Besitz von Genen zur putativen Synthese von kompatiblen Soluten sind. Im Hinblick darauf, dass das Solut Mannosylglycerat vor allem in thermophilen Organismen zu finden ist, war die Entdeckung des Gens *mgsD* in der als mesophil eingestuften Gattung *Dehalococcoides* unerwartet. *mgsD* kodiert für ein Protein, welches homologe Domänen der Mannosyl-3-Phosphoglycerat-Synthase (MPGS, EC 2.4.1.217) und der Mannosyl-3-Phosphoglycerat-Phosphatase (MPGP, EC 3.1.3.70) besitzt, und somit den 2-Schritt-Weg aus bspw. *Rhodothermus marinus* in einem bifunktionellen Enzym vereint (Empadinhas *et al.*, 2004).

Bioinformatische Recherchen ergaben, dass neben *MgsD* aus *D. mccartyi* 195<sup>T</sup> weitere potenziell bifunktionelle Enzyme in der Gattung *Dehalococcoides* zu finden sind. Diese Enzyme sind höchstwahrscheinlich für die Synthese des kompatiblen Solut NA $\beta$ L zuständig. Mittels NCBI BLASTp-Analysen durch Vergleich mit der Aminomutase AbIA und der Acetyltransferase AbIB aus *Ms. mazei* Gö1 konnten mögliche bifunktionelle Enzyme für die

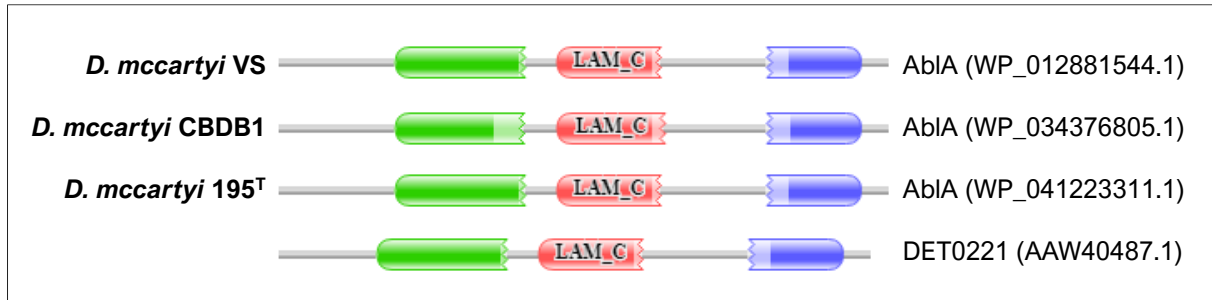
Synthese von NAßL u.a. in *D. mccartyi* VS, *D. mccartyi* CBDB1 und *D. mccartyi* 195<sup>T</sup> identifiziert werden (vgl. Tab. 3.10).

**Tab. 3.10: Ergebnisse ausgewählter Blastp-Analysen der Proteinsequenzen AbIA und AbIB aus *Ms. mazei* Gö1 im Vergleich mit allen nicht-redundanten Proteinsequenzen aus verschiedenen *D. mccartyi*-Stämmen.** Die NCBI-Zugangsnummer ist unter dem Gen-Eintrag vermerkt. Sequenzabd.: Sequenzabdeckung, E-Wert: Zufälligkeitsparameter, Ident.: Sequenzidentität.

| Homologe Gene<br>in <i>D. mccartyi</i> -Stämmen | Länge (AS) | Gene aus <i>M. mazei</i> Gö1                                  |   |
|---|------------|---|---|
|   |            | AbIA  | AbIB  |
| <b><i>D. mccartyi</i> VS</b>                    |            |   |   |
| <i>abIA</i><br>(WP_012881544.1)                 | 730        | Sequenzabd.: 97%<br>E-Wert: 2e <sup>-157</sup><br>Ident.: 55% | Sequenzabd: 95%<br>E-Wert: 4e <sup>-34</sup><br>Ident.: 31% |
| <b><i>D. mccartyi</i> CBDB1</b>                 |            |   |   |
| <i>abIA</i><br>(WP_034376805.1)                 | 730        | Sequenzabd: 96%<br>E-Wert: 4e <sup>-155</sup><br>Ident.: 54%  | Sequenzabd: 95%<br>E-Wert: 7e <sup>-32</sup><br>Ident.: 30% |
| <b><i>D. mccartyi</i> 195<sup>T</sup></b>       |            |   |   |
| <i>abIA</i><br>(WP_041223311.1)                 | 730        | Sequenzabd: 55%<br>E-Wert: 4e <sup>-157</sup><br>Ident.: 33%  | Sequenzabd: 95%<br>E-Wert: 3e <sup>-32</sup><br>Ident.: 30% |
| <i>det0221</i><br>(AAW40487.1)                  | 708        | Sequenzabd: 55%<br>E-Wert: 2e <sup>-157</sup><br>Ident.: 33%  | Sequenzabd: 95%<br>E-Wert: 2e <sup>-32</sup><br>Ident.: 30% |

Eine weitere Untersuchung der Sequenzen mit dem Pfam-Tool (vgl. 2.3) ergab, dass alle über die gleichen drei funktionalen Regionen verfügen, die auf eine Doppelfunktion der daraus resultierenden Proteine hinweisen (vgl. Abb. 3.27.). Jede Sequenz umfasst dabei eine funktionelle Region für die Domäne der *Radical SAM superfamily*, welche Enzyme wie z.B. AbIA einschließt; also solche, die [4Fe-4S]<sup>+</sup>-Cluster besitzen und durch reduktive Spaltung eines S-Adenosyl-L-Methionins ein Radikal als Intermediat einer Reaktion bilden. Damit einhergehend wird die direkte Funktion einer Lysin-2,3-Aminomutase vorhergesagt (vgl. Abb. 3.27., rot), was durch die Aminosäuresequenzen **CAMYCRHC** (C<sub>147</sub>-C<sub>154</sub>, vermutlich Eisen-Bindemotiv) und **LVKIIR** (L<sub>237</sub>-R<sub>242</sub>, vermutlich PLP-Bindemotiv) unterstützt wird (Chen *et al.*, 2000; Ruzicka *et al.*, 2000, vgl. auch 3.2 und 3.4.1.4). Die für eine Doppelfunktion ausschlaggebende zusätzliche Zuweisung funktioneller Regionen ist die der *Acetyltransferase (GNAT) family*, also die Fähigkeit des Proteins zur Übertragung einer Acetylgruppe (Abb. 3.27, blau). Im Folgenden wurde nun überprüft, ob es möglich ist, eines der bioinformatisch untersuchten, zu AbIA/AbIB-homologen Proteine heterolog in *E. coli* DH5α zu produzieren und die vorhergesagte Bifunktionalität durch den Nachweis von NAßL zu bestätigen. Im Zentrum dieser Untersuchungen stand das Enzym AbIA aus *D. mccartyi* CBDB1 (NCBI

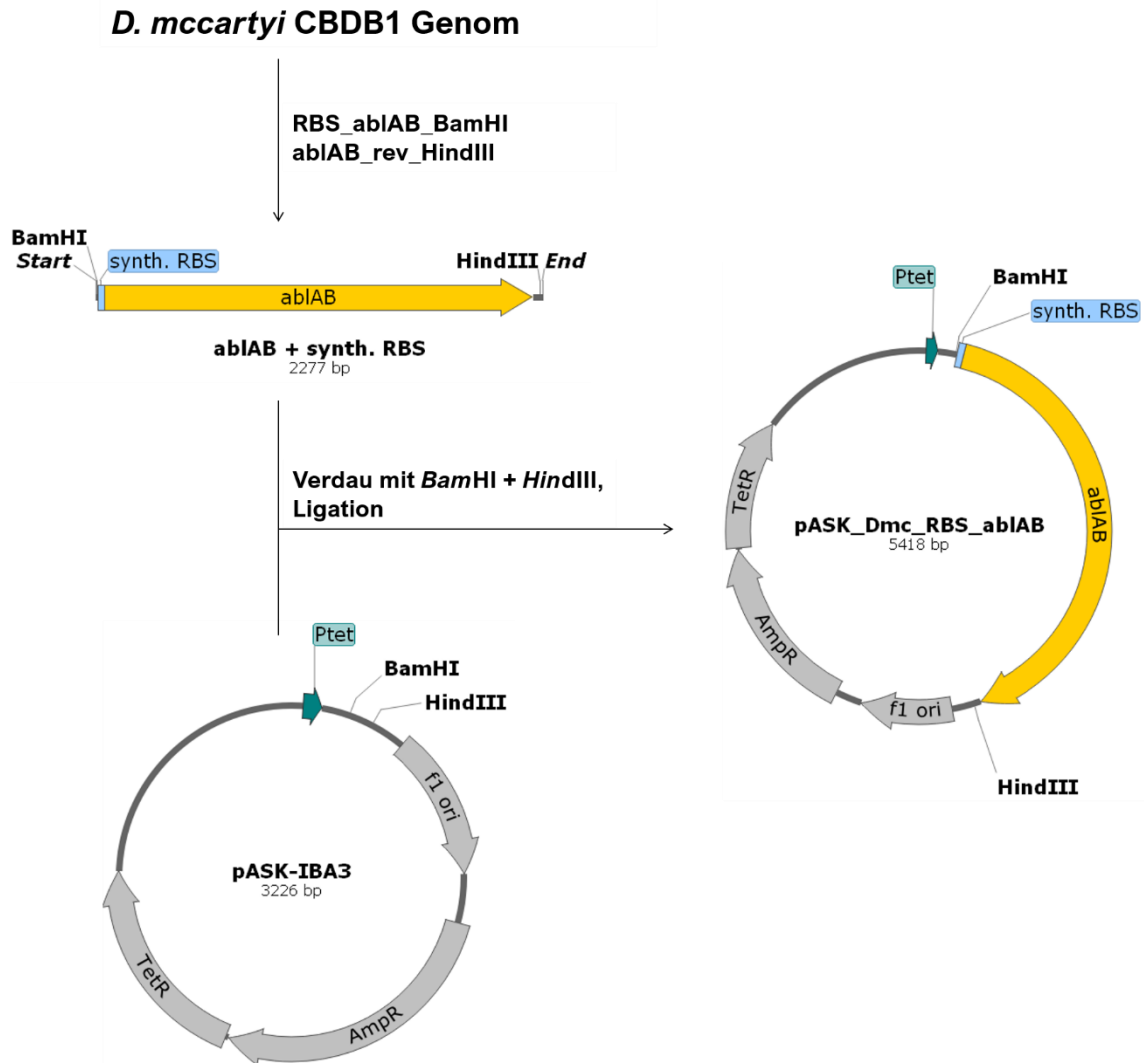
Zugangsnr. WP\_034376805.1), welches im weiteren Verlauf als AblAB (bzw. *ablAB*) bezeichnet wird.



**Abb. 3.27: Proteinsequenzvergleich durch das Pfam-Tool zur Untersuchung von funktionellen Regionen.** Grün: Domäne der *Radical SAM superfamily*, rot: *Lysine-2,3-aminomutase*, blau: *Acetyltransferase (GNAT) family*.

### 3.6.1 Vektorkonstruktion von pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB

Für die heterologe Expression von *ablAB* in *E. coli* DH5a wurde ein neuer Vektor auf Basis von pASK-IBA3 konstruiert. Als DNA-Matrize für *ablAB* wurde die genomische DNA von *D. mccartyi* CBDB1 genutzt. Für die Amplifikation des Gens wurden die Primer RBS\_ablAB\_BamHI und ablAB\_rev\_HindIII verwendet, wobei der 5'-Primer neben der Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI außerdem noch die Sequenz für eine synthetische RBS zur effektiveren Translation der entstehenden mRNA enthielt (vgl. Tab. 2.10). Das amplifizierte Gen inkl. vorangestellter synthetischer RBS wurde mittels der Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in den Vektor pASK-IBA3 stromabwärts des *tet*-Promotors integriert (vgl. Abb. 3.28). Nach der Ligation von Amplifikat und Vektorrückgrat wurde der neue Vektor mittels Transformation in den Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht (vgl. 2.5.5 und 2.5.7).

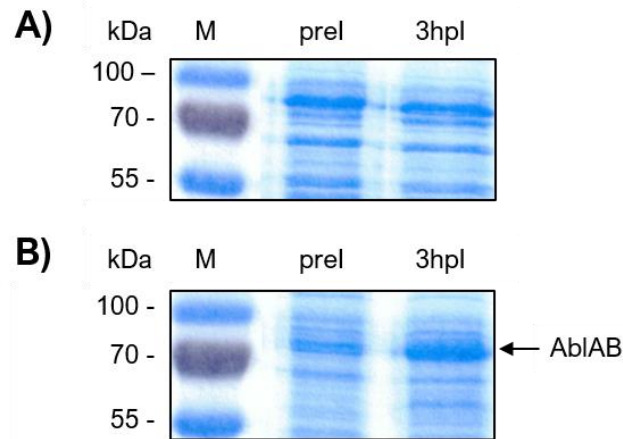


**Abb. 3.28: Konstruktion des Expressionsvektors pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB.** Das putative Gen *ablAB* wurde mittels PCR aus der genomischen DNA von *D. mccartyi* CBDB1 amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in pASK-IBA3 eingebracht. AmpR: Ampicillinresistenz, TetR: Tet-Repressor, Ptet: *tet*-Promotor, ori: Replikationsursprung

### 3.6.2 Proteinproduktion und Produktnachweis

Um die Produktion von AblAB mithilfe des Expressionsvektors pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB nachzuweisen, wurde eine semi-anaerobe Expressionskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB in GGF-0,5-Medium angelegt (vgl. 2.4.8). Aus dem Gesamtzellprotein der aeroben Kultur vor und nach der Induktion wurde dann die lösliche sowie die unlösliche Proteinfraktion aufgereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. 2.6 und Abb. 3.29). Die Analyse per SDS-PAGE zeigt, dass die grundlegende Produktion des bifunktionellen Proteins in *E. coli* DH5 $\alpha$  möglich ist; eine deutliche Bande konnte diesem aber nur in der unlöslichen Proteinfraktion zugeordnet werden (vgl. Abb. 3.29 B).

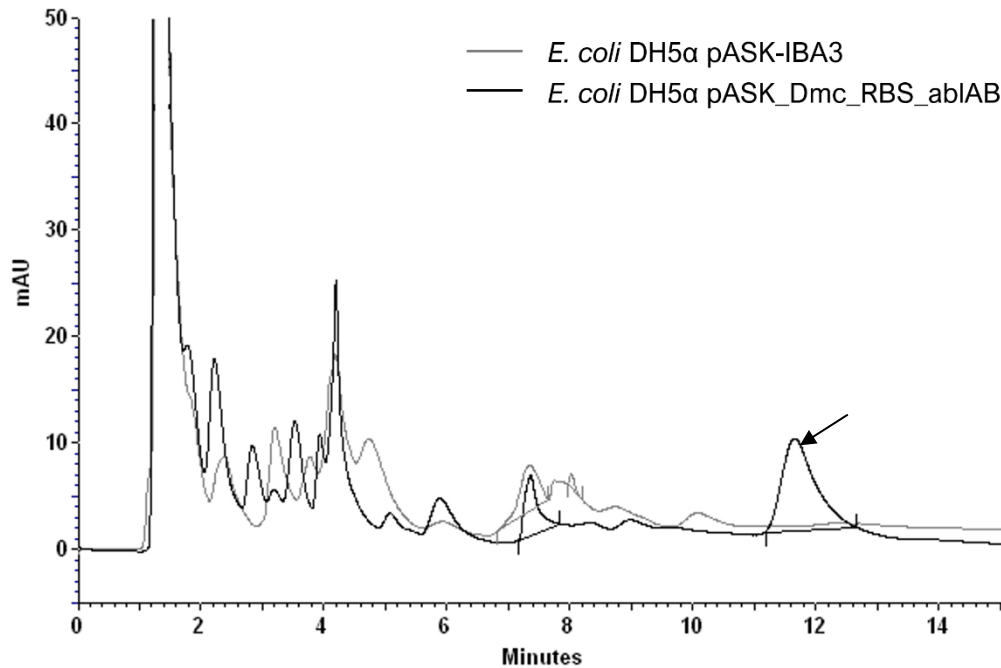




**Abb. 3.29: SDS-PAGE von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB.** Der Produktionsstamm wurde in GGF-0,5 kultiviert. Für die Analyse per SDS-PAGE wurden Proben vor der Induktion der Genexpression mit AHT (prel), sowie 3 Stunden nach Induktion (3hpl) entnommen und die lösliche (**A**), sowie die unlösliche Proteinfraction (**B**) aufgereinigt und aufgetragen (20  $\mu$ g Protein/Laufspur). Die potenzielle Bande von AblAB (82,3 kDa) ist mit einem Pfeil markiert. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

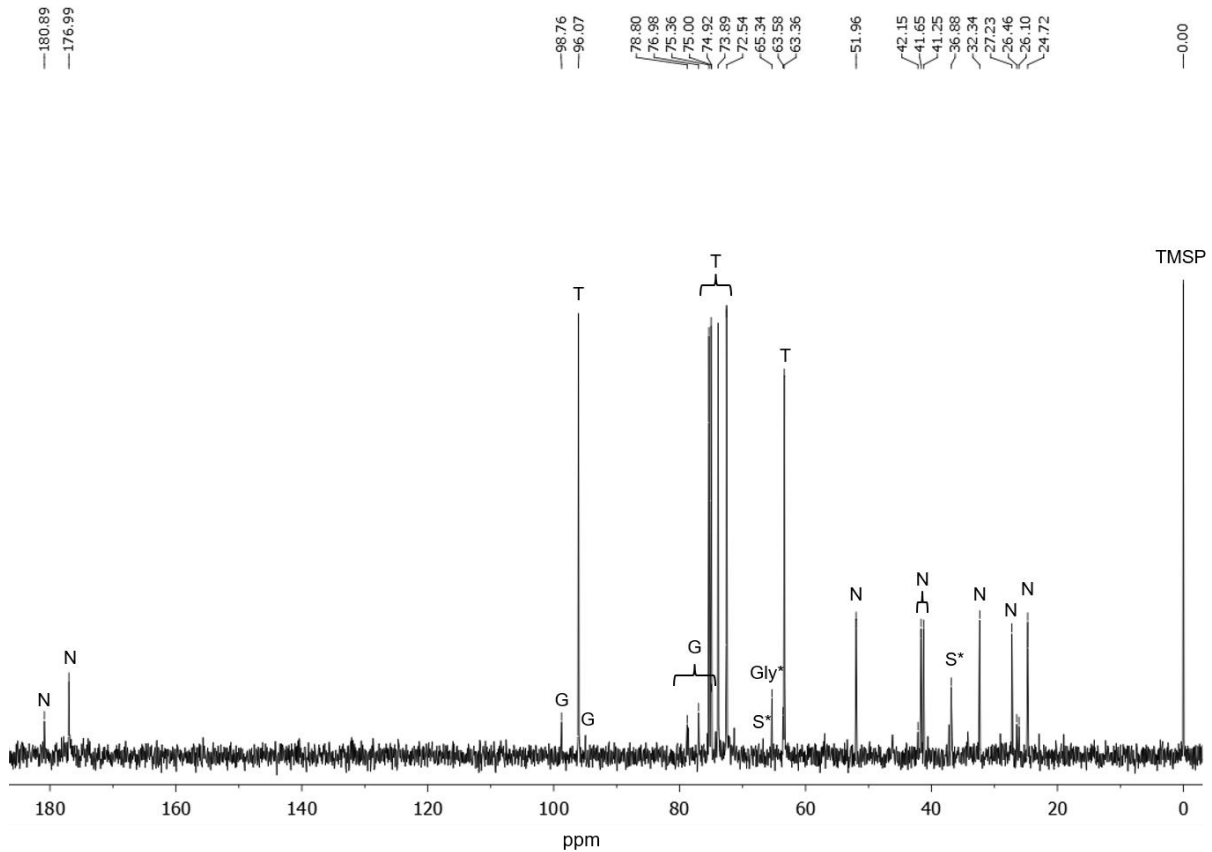
Der Vergleich mit der Probe vor Induktion zeigt deutlich, dass diverse *E. coli*-spezifische Proteine einen Hintergrund bilden, AblAB sich jedoch deutlich davon abhebt. Ein möglicher Anteil von AblAB in der löslichen Proteinfraction ist zu gering, als dass dieser mit der hier gezeigten Methode nachgewiesen werden kann.

Zum Nachweis des Produkts NA $\beta$ L wurde der anaerobe Teil der Kultur in der stationären Phase geerntet und das Zellmaterial für eine isokratische HPLC aufbereitet (vgl. 2.7). Im Vergleich mit dem Chromatogramm eines Kontrollstamms *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK-IBA3 (vgl. Abb. 3.30) ist im Expressionsstamm ein isoliertes Signal für NA $\beta$ L zu erkennen. Die Berechnung der Konzentration unter Einbeziehen des alternativen Standards NA $\alpha$ L ergab eine Menge von ca. 4,1 mg NA $\beta$ L/g TG (11,5 mM IZV nach Wang *et al.*, 2013). Eine Bestimmung der Konzentration über den RI-Detektor war hier nicht möglich, da die Erhöhung auf 3 % NaCl im Medium zur Synthese von Trehalose geführt hat, deren Signal die gleiche Retentionszeit wie die von NA $\beta$ L aufwies. Analoge Produktionsversuche mit dem Expressionsstamm und der Supplementierung von PLP als Cofaktor für AblAB zeigten ein identisches Bild im Chromatogramm des Zellextraktes, wobei die Zugabe von PLP zur Hauptkultur keinen Einfluss auf die intrazelluläre NA $\beta$ L-Menge hatte (~4,2 mg/g TG; 11,7 mM IZV nach Wang *et al.*, 2013).



**Abb. 3.30: UV-Chromatogramm des Zellextrakts von *E. coli* DH5α pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB und eines Kontrollstamms *E. coli* DH5α pASK-IBA3.** Die Zellen der anaeroben Kulturen in GGF-0,5 wurden in der stationären Phase geerntet, über Nacht gefriergetrocknet und anschließend einer B&D-Extraktion unterzogen. Der Extrakt wurde 1:4 mit 80 % AcN verdünnt und mittels isokratischer HPLC gemessen. Das Signal für NAβL ist mit einem Pfeil markiert. mAU: milli absorption units (a.u.)

Zur Überprüfung einer möglichen Abgabe des Solut ins Anzuchtmedium wurden die Medienproben für eine Analyse mittels FMOC-ADAM-HPLC derivatisiert und gemessen (vgl. 2.7). Hierbei konnte ein geringer Anteil an NAβL nachgewiesen werden (~2,1 mg/L). Zur Bestätigung der bisher erlangten Ergebnisse sollten Proben eines Zellextrakts auch mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie auf das Vorhandensein von NAβL überprüft werden. Dafür wurde eine semi-anaerobe Expressionskultur von *E. coli* DH5α pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB in GGF-Medium über Nacht kultiviert (vgl. 2.4.8), die Zellen geerntet, auf Filterpapier ausgestrichen und die Zellmasse gefriergetrocknet. Dem schlossen sich eine Extraktion nach Bligh & Dyer und die Aufbereitung des Extraktes für die NMR-Analyse an (vgl. 2.7). Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie bestätigte die intrazelluläre Produktion von NAβL (Abb. 3.31). Zum Abgleich mit den bisherigen Ergebnissen wurde ein Teil des B&D-Extraktes außerdem für eine Untersuchung mittels FMOC-ADAM-HPLC genutzt (vgl. 2.7.3), die eine im Vergleich zu bisherigen Ergebnissen leicht erhöhte Menge von intrazellulärem NAβL ergab (ca. 10,7 mg/g TG; 29,9 mM IZV nach Wang *et al.*, 2013).



**Abb. 3.31:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie des Zellextrakts von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB. Die Zellen der anaeroben Kultur wurden in der stationären Phase geerntet, auf Filterpapier ausgestrichen, über Nacht gefriergetrocknet und anschließend einer B&D-Extraktion unterzogen. Der Extrakt wurde mit dem internen Standard TMSP versetzt. Neben dem Standardsignal konnten die Signale für NA $\beta$ L (N) eindeutig identifiziert werden (Triadó-Margarit *et al.*, 2011). Einige Signale konnten anderen Substanzen wie Trehalose (T), Glucose (G) und möglicherweise Glycerin (Gly\*), sowie evtl. Succhinat (S\*) zugeordnet werden, wobei ein fehlendes Signal von Glycerin bei ca. 75 ppm und ein fehlendes Signal von Succhinat bei ca. 185 ppm überlagert, oder aufgrund einer zu geringen Konzentration nicht eindeutig sichtbar ist.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass (1) der Expressionsvektor pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB funktionell ist und (2) *E. coli* DH5 $\alpha$  mit ebendiesem in der Lage ist, das Protein aus *D. mccartyi* CBDB1 zu produzieren. Es kann (3) festgestellt werden, dass die Sequenz von *ablA* nicht nur wie bisher annotiert für eine L-Lysin 2-3-Aminomutase, sondern für ein bifunktionelles Enzym mit zusätzlicher N $_6$ -Acetyltransferase-Region kodiert und *E. coli* DH5 $\alpha$  zur heterologen Produktion von NA $\beta$ L unter semi-anaeroben Bedingungen befähigt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Evaluierung der Effekte von NA $\beta$ L auf molekularbiologische Methoden

Ein Ziel dieser Arbeit war, neben dem Schutz vor osmotischem Stress andere mögliche Eigenschaften von NA $\beta$ L zu untersuchen. Einigen kompatiblen Solute, wie z.B. Ectoin oder Trehalose, wurden in der Vergangenheit auch weitere protektive Wirkungen auf Zell- oder molekularer Ebene nachgewiesen. Betain und Trehalose wurde ein verstärkender Effekt auf die PCR-Reaktion nachgewiesen; sie gehören als *PCR Enhancer* zu Stoffen, die sich u.a. positiv auf die Produktausbeute auswirken können (Rees *et al.*, 1993; Schnoor *et al.*, 2004; Spiess *et al.*, 2004). In Anlehnung daran wurde der mögliche Einfluss von NA $\beta$ L auf molekulare Prozesse untersucht. Dafür erfolgte die Supplementierung der Substanz in PCR-Reaktionen und bei der enzymatischen Spaltung von DNA (Restriktionsverdau), wobei das Ergebnis mit dem anderer Substanzen verglichen wurde (vgl. 3.1).

#### 4.1.1 NA $\beta$ L im Restriktionsverdau

Die Methode des Restriktionsverdaus hat ihren Ursprung im gleichnamigen prokaryotischen Verteidigungsmechanismus, bei dem die Übernahme der Zelle durch fremde, z.B. virale DNA mittels Spaltung durch Endonukleasen verhindert wird. Der Prozess wird als ideales Modellsystem einer sequenzspezifischen Protein-DNA-Interaktion verstanden, da jegliche Beeinflussung Auswirkung auf die DNA-Spaltung hat. Während in der natürlichen Reaktionsumgebung, also dem Cytoplasma, zahlreiche weitere (nicht benötigte) Substanzen vorliegen, beinhaltet ein Restriktionsansatz *in vitro* nur die relevanten Komponenten: das zu modifizierende DNA-Molekül, ein (oder mehrere) Restriktionsendonukleasen, sowie ein geeignetes Puffersystem. Diese Bestandteile stellen in den durchgeführten Untersuchungen somit die möglichen Ansatzpunkte für die genutzten Supplemente dar.

Erste Experimente zu möglichen Effekten von NA $\beta$ L auf die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA zeigen, dass dessen Zugabe signifikante Auswirkung auf die Reaktion hat (vgl. Abb. 3.1 E). So verschiebt sich der Zeitpunkt, zu dem die gesamte Plasmid-DNA in linearisierter Form vorliegt, von fünf (ohne Supplement) auf sechzig Minuten (mit NA $\beta$ L). Eine Abnahme der offen-zirkulären Form (*nicked*) ist erst nach zehn Minuten Reaktionszeit zu beobachten.

Ähnliche, jedoch nicht im gleichen Ausmaß auftretende Effekte zeigt der Zusatz von jeweils OH-Ectoin oder NA $\alpha$ L (vgl. Abb. 3.1 B, D). OH-Ectoin ist schon von Malin *et al.* (1999) untersucht worden und wies in analogen Versuchen bereits ab 0,1 mM eine Verzögerung der Reaktion auf, wobei keine Bildung des Zwischenprodukts (*nicked-Form*) nachgewiesen wurde. Im Zuge der Analysen von Malin *et al.* konnten mehrere mögliche Inhibierungs-Mechanismen von OH-Ectoin ausgeschlossen werden, wie z.B. die Bindung der für die Funktion von *EcoRI* benötigten Mg<sup>2+</sup>-Ionen oder eine Modifikation des Enzyms, sowie die Länge des DNA-Moleküls selbst (Malin *et al.* 1999). Als vermutliche Ursache wird hier der zwitterionische Charakter von OH-Ectoin genannt, den sowohl NA $\alpha$ L als auch NA $\beta$ L ebenfalls besitzen. Es konnte nachgewiesen werden, dass zwitterionische Moleküle die di-elektrische Konstante eines Mediums erhöhen, was wiederum Auswirkungen auf die Coulomb-Kraft hat und diese abschwächt (Flock *et al.*, 1996). Die Coulomb-Kraft beschreibt die Wechselwirkung von gleichen, bzw. gegensätzlichen Ladungen und spielt u.a. bei der Interaktion von positiv geladene Seitenketten eines Proteins mit den negativ geladenen Phosphatgruppen von DNA bei der Bildung eines Protein-DNA-Komplexes eine Rolle (Jen-Jacobson, 1997). Neben weiteren Faktoren hat sie somit einen relevanten Einfluss auf die freie Bindungsenergie eines solchen Komplexes, was signifikante Auswirkungen auf alle nachfolgenden Schritte hat und - im Falle von *EcoRI* und Plasmid-DNA - zur Verzögerung der Reaktion führt. Diese These wird von den Beobachtungen von Cohn *et al.*, (1943) gestützt, die u.a. gezeigt haben, dass  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure (welches teilweise starke strukturelle Ähnlichkeit zu L-Lysin, NA $\alpha$ L und NA $\beta$ L aufweist) die di-elektrische Konstante einer Lösung erhöht. Arbeiten von Flock *et al.* (1996) bestätigen diese Beobachtung ebenfalls; in Experimenten zur Präzipitation von DNA erhöhte die Zugabe von bspw. Glycin oder 6-Aminocaprinsäure die di-elektrische Konstante der Reaktionslösung und sorgte für einen deutlich gesteigerten Ausfall an Nukleinsäure.

Geht man davon aus, dass die von Malin *et al.* postulierten Wirkmechanismen von OH-Ectoin auch auf NA $\alpha$ L und NA $\beta$ L zutreffen, kann es sich bei der Inhibierung der Spaltungsreaktion um eine kompetitive Hemmung handeln. Dabei wechselwirken die Supplemente jedoch nicht direkt mit dem Enzym oder der DNA, sondern greifen in die Interaktion der Ladungen bei der Protein-DNA-Bindung ein; bspw. durch sterische Hemmung bei der Verkürzung des Ladungsabstands (Malin *et al.* 1999).

Damit kann jedoch nicht erklärt werden, warum die Zugabe von NA $\beta$ L die Spaltungsreaktion so viel stärker inhibiert als NA $\alpha$ L. Eine Verschiebung des pH-Wertes durch die Zugabe beider Substanzen konnte als Auslöser widerlegt werden (gemessener pH-Wert Stammlösung NA $\alpha$ L: 5,3 / Stammlösung NA $\beta$ L: 6). Das in den hier durchgeführten Experimenten genutzte NA $\alpha$ L lag als reine Chemikalie vor (vgl. Tab. 2.1). Im Gegensatz dazu stammte NA $\beta$ L aus Beständen, die

von Triadó-Margarit *et al.* (2011) aus dem grünen Schwefelbakterium *C. parvum* UdG6501Lms aufgereinigt wurden. Es ist durchaus möglich, dass die dabei durchgeführte Entsalzung des Soluts nicht ausreichend war und weiterhin eine erhöhte NaCl-Konzentration in der genutzten Stammlösung vorlag. Restriktionsendonukleasen wie *EcoRI* binden die zu spaltende DNA zunächst unspezifisch, um nachfolgend durch lineare Diffusion an der Ziel-Schnittstelle zu binden (Pingoud & Jeltsch, 1997; Terry *et al.*, 1985). Diese lineare Diffusion hängt, ähnlich zur Bildung des Protein-DNA-Komplexes, von elektrostatischen Interaktionen zwischen dem Protein und den Phosphatgruppen der DNA ab (Pingoud & Jeltsch 1997). Auf diesen Prozess haben Ionen wie Na<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup> einen großen Einfluss. Eine Beeinträchtigung dieses unspezifischen Prozesses durch z.B. das Zwitterion OH-Ectoin konnten Malin *et al.* bis zu einer Konzentration von 1,5 mM, was der dreifachen hier eingesetzten Konzentration entspricht, widerlegen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zu möglichen Effekten von NAßL auf die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA liefern erste Ergebnisse zur Beantwortung dieser Fragestellung. In nachfolgenden Ansätzen ist besonders zu beachten, dass genutzte Stammlösungen von NAßL frei von NaCl und in größeren Konzentrationen vorliegen, um Auswirkungen auch ab 1 mM NAßL und höher zu untersuchen.

#### **4.1.2 Der Einfluss von NAßL auf die PCR-Reaktion**

Die Methode der PCR geht ursprünglich auf den Prozess der Replikation zurück, also die intrazelluläre Vervielfältigung von DNA, die für die Entstehung neuer Zellen (z.B. durch Zellteilung) notwendig ist. Durch den Einsatz bestimmter Oligonukleotide werden *in vitro* nur spezifische Abschnitte der Erbinformation amplifiziert. Die PCR stellt eine zentrale Technik der Molekularbiologie dar und stand bereits vielfach im Fokus verschiedenster Untersuchungen, so auch hinsichtlich der Auswirkungen von Supplementen auf die Optimierung und die Effizienz (Chakrabarti, 2001; Chakrabarti & Schutt, 2001, 2002; Henke *et al.*, 1997; Louwrier & Van Der Valk, 2001; Rees *et al.*, 1993; Sabzghabae *et al.*, 2014; Schnoor *et al.*, 2004; Shen & Hohn, 1992; Spiess *et al.*, 2004; Spiess & Ivell, 2002). Im Gegensatz zum Restriktionsverdau beinhaltet ein PCR-Reaktionsansatz neben dem Enzym, der DNA und dem Puffersystem noch zwei weitere Komponenten. Zum Start der Replikation durch die DNA-Polymerase werden Primer benötigt, sowie dNTPs als Bausteine für neue DNA-Stränge. Allerdings wird der Einfluss kompatibler Solute, bzw. von PCR-*Enhancern* auf die Schmelztemperatur von DNA ( $T_m$ ) dabei als wichtigster Faktor angesehen. Die Trennung der beiden DNA-Stränge ermöglicht alle

folgenden Schritte, wie der Primer-Anlagerung und Elongation und ist somit essenziell für die gesamte Reaktion (Kurz, 2008, Schnoor *et al.*, 2014).

Erste Versuche zu einem möglichen Effekt von NA $\beta$ L auf eine PCR-Reaktion resultierten in einer komplette Inhibition der Reaktion (vgl. Abb. 3.2). So ist bei der Zugabe von 0,5 mM NA $\beta$ L kein Nachweis des Produkts möglich (vgl. Abb. 3.2 Laufspur 3). Im Gegensatz dazu hat die Supplementation geeigneter vergleichender Komponenten keine signifikanten Auswirkungen auf die Produktmenge, gemessen an der Kontrolle. Im nachfolgenden Versuch, in dem NA $\beta$ L in absteigender Konzentration von 500 - 25  $\mu$ M in eine PCR des Gens *adh2* supplementiert wurde, zeigt sich bereits ab 400  $\mu$ M eine Produktbande (vgl. Abb. 3.3). Hier wird die Ausbeute mit Abnahme der NA $\beta$ L-Konzentration schrittweise größer; die Bandenstärke ist bei der kleinsten verwendeten Konzentration (25  $\mu$ M) etwas deutlicher als bei der Kontrollreaktion.

Neben Molekülen wie Ectoin, DMSO oder Trehalose wurden in den durchgeführten Versuchen auch Stoffe eingesetzt, die strukturell starke Ähnlichkeiten zu NA $\beta$ L aufweisen, unter anderem NA $\alpha$ L, NA $\beta$ A oder NAG. Bei der Supplementierung dieser Stoffe konnte, wie bei den übrigen anderen Stoffen auch, keinerlei Effekt auf die PCR nachgewiesen werden. Eine eindeutige Aussage bezüglich eines möglichen molekularen Einflusses von NA $\beta$ L kann somit nicht getätigt werden. Weder lässt sich die hier gezeigte teilweise komplette Inhibition durch eine Acetylierung am C<sub>6</sub>-Atom erklären (keine Inhibition durch NA $\alpha$ L), noch durch den Charakter eines  $\beta$ -Aminosäurederivats (keine Inhibition durch NA $\beta$ A). Zum jetzigen Zeitpunkt muss in Betracht gezogen werden, dass die genutzte NA $\beta$ L-Lösung nicht ausreichend aufgereinigt vorlag und zu hohe Mengen an NaCl enthält. (Anorganische) Ionen können die Schmelztemperatur von Nukleinsäuren erhöhen (Kurz, 2006). Besonders Kationen wie Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> oder auch Mg<sup>2+</sup> können als Gegenionen mit dem Phosphatrückgrat von Nukleinsäure interagieren und so die Abstoßungskraft der beiden Stränge reduzieren, was zu einer erhöhten Stabilität führt und für eine begünstigte Faltung sorgen kann (Draper, 2004; Hackl & Blagoi, 2005; Tan & Chen, 2006; Völker *et al.*, 2001). Darüber hinaus kann die Ionenkonzentration einer Lösung signifikant in die Protein-DNA-Interaktion eingreifen. Wie Bergqvist *et al.* (2003) beschrieben haben, werden bei der Bildung einer Protein-DNA-Einheit Ionen und Wassermoleküle in die direkte Umgebung des Komplexes entlassen, sodass eine direkte Interaktion zwischen Proteinresten und DNA stattfinden kann. Eine veränderte Ionenkonzentration kann die Thermodynamik dieses Prozesses modifizieren und somit die Bindung beeinträchtigen (Bergqvist *et al.*, 2003; Record, Lohman, *et al.*, 1976; Record, Woodbury, *et al.*, 1976). Ähnliche Beobachtungen konnten in Experimenten zur Wechselwirkung zwischen dem Lac-Repressor und der dazugehörigen Operatorsequenz des *lac*-Operons gezeigt werden. Hierbei sank die Bindungskonstante und somit die Affinität

zwischen Protein und DNA signifikant, wenn die KCl-Konzentration im Medium von 0,01 M auf 0,2 M angehoben wurde (Riggs *et al.*, 1970a; Riggs *et al.*, 1970b). Übertragen auf eine PCR-Reaktion bedeutet dies eine Einschränkung der Enzym-DNA-Interaktion und demnach der Synthese neuer DNA-Stränge.

Die hier getesteten Effekte von NAßL auf die Amplifikation GC-reicher Gene (*in vitro*) stellen erste Versuche dieser Art dar. Schmelzkurven-Analysen unter Einfluss vergleichender Supplemente könnten in nachfolgenden Ansätzen Aufschluss darüber geben, ob NAßL mit der DNA direkt interagiert.

## 4.2 Heterologe NAßL-Produktion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der heterologen Expression von NAßL-Synthesegenen und der damit verbundenen Produktion dieses kompatiblen Solut. NAßL kommt natürlicherweise in methanogenen Archaeen und Bakterien, wie grünen Schwefelbakterien oder einigen *Bacillus*-Spezies vor. In bisherigen Untersuchungen lag der Fokus vor allem auf der (Über-)Produktion der L-Lysin 2,3-Aminomutase zu Charakterisierungszwecken (Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Hung & Lai, 2013; Lepore *et al.*, 2005; Ruzicka *et al.*, 2000; Ruzicka & Frey, 2010). Die Synthese von  $\beta$ -Lysin gelang bisher alleinig *in vitro*, oder im Fall von NAßL ausschließlich durch homologe Proteinexpression (Chen *et al.*, 2000; Hung & Lai, 2013; Müller *et al.*, 2011; Pflüger *et al.*, 2007; Sowers *et al.*, 1990; Triadó-Margarit *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Stämme der Organismen *E. coli* und *H. elongata* genutzt, wobei diverse Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Genkombinationen zum Einsatz kamen (vgl. Tab. 4.1).

**Tab. 4.1: In dieser Arbeit genutzten Gene und deren Ursprungs-, sowie Expressionsorganismen.**  
 $\beta$ LAT:  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase, LAM: L-Lysin 2,3-Aminomutase

| Gen         | NCBI-Zugangsnr. | Funktion         | Ursprung                                       | Expressionsorganismus   |
|-------------|-----------------|------------------|--|---|
| <i>yodP</i> | NP_389851.1     | $\beta$ LAT      | <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup>         | <i>H. elongata</i> WT, WUB02  |
| <i>kamA</i> | NP_389850.1     | LAM              | <i>B. subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup>         | <i>H. elongata</i> WT, WUB02;<br><i>E. coli</i> DH5 $\alpha$  |
| <i>kamA</i> | WP_003445619.1  | LAM              | <i>C. pasteurianum</i><br>DSM 525 <sup>T</sup> | <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$   |
| <i>abIA</i> | AAM30630.1      | LAM              | <i>Ms. mazei</i> Gö1                           | <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , Rosetta <sup>™</sup> (DE3),<br>BL21, MG1655, BKA-13<br>BL21 (DE3) $\Delta$ iscR,<br><i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ |
| <i>abIA</i> | WP_034376805.1  | LAM/ $\beta$ LAT | <i>D. mccartyi</i> CBDB1                       | <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$   |



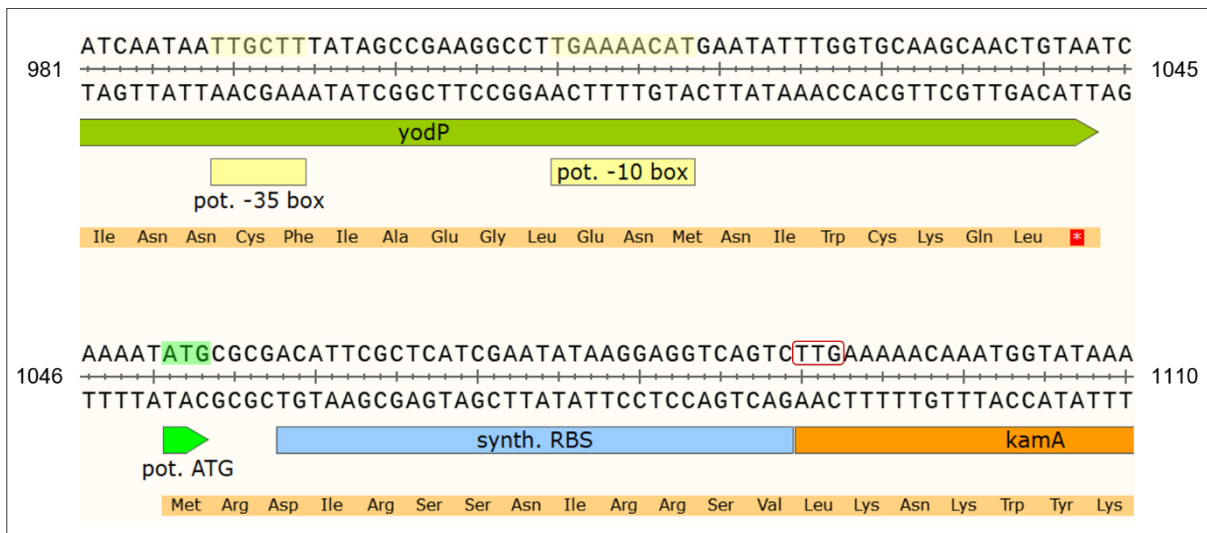
#### 4.2.1 Nutzen des Genclusters aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>

Im Fokus der ersten Experimente zur heterologen Synthese von NA $\beta$ L stand das Gencluster *yodP-kamA<sub>Bs</sub>* aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>, welches gemeinsam mit vier weiteren *yod*-Genen eine Transkriptionseinheit bildet (vgl. 3.2 und Müller *et al.*, 2011). Das Gencluster wurde in geeignete Expressionsvektoren für *H. elongata*, bzw. *E. coli* übertragen. Beide Gene wurden dazu einzeln aus dem Genom amplifiziert und mit einer synthetischen RBS versehen. Anschließend wurden die Konstrukte mittels SOE-PCR wieder zu einem Cluster verbunden und hinter einen Promotor integriert; dabei handelte es sich im Falle von *H. elongata* um den *promA*-Promotor und im Falle von *E. coli* um den *tet*-Promotor. Für die Expression beider Gene war somit lediglich ein Promotor verantwortlich.

Zwar war es unter Standardbedingungen (vgl. 3.2.2) möglich, kleine Mengen von YodP<sub>Bs</sub> in *E. coli* DH5 $\alpha$  löslich zu produzieren, der Großteil des Proteins lag jedoch, wie auch die Gesamtmasse an KamA, in der unlöslichen Proteinfraction vor (vgl. Abb. 3.6). Eine Produktion der Proteine bei 20 °C (vgl. 3.2.3) verbesserte die Ausbeute für beide Proteine nicht; so konnte in *E. coli* DH5 $\alpha$  ausschließlich YodP in der unlöslichen Proteinfraction nachgewiesen werden. Eine Produktion der beiden Enzyme in *H. elongata* konnte in keinem Experiment festgestellt werden. Auch blieb der Nachweis des Produkts NA $\beta$ L aus.

Die Teilsequenzierung des Vektors pASK\_yodPkamA (vgl. Abb. 6.2 im Anhang) offenbarte eine *Frameshift*-Mutation (Verschiebung des Leserasters) im Gen der  $\beta$ LAT, wobei der Einbau eines zusätzlichen Thymins ein 18 AS kürzeres Protein, sowie eine Erhöhung des pI um knapp 2 Einheiten zur Folge hatte (vgl. 3.2.4). Zwar konnte dieses YodP<sub>mut</sub> in geringen Mengen löslich in *E. coli* DH5 $\alpha$  produziert werden, die Funktion als Acetyltransferase geht dadurch jedoch verloren, wodurch der fehlende Nachweis von NA $\beta$ L erklärt werden kann. Es konnten keine weitere Mutationen bei der Sequenzierung nachgewiesen werden, weshalb die Produktion des Zwischenprodukts  $\beta$ -Lysin mit dem theoretischen Sequenzmuster möglich sein muss. Der Nachweis blieb jedoch aus; außerdem konnte KamA<sub>Bs</sub> ausschließlich in *E. coli* in der unlöslichen Proteinfraction detektiert werden. Dies kann durch eine alternative Proteinsequenz erklärt werden: eine Analyse der Gensequenz *yodP* mit dem BPROM-Tool (vgl. 2.3) deutet auf einen sig<sup>70</sup>-Promotor nahe des 3'-Endes des Gens hin (vgl. Abb. 4.1). Stromabwärts des Gens befindet sich zusätzlich ein Triplett ATG, welches sich im gleichen Leseraster (*in frame*) wie das nachfolgende *kamA<sub>Bs</sub>* befindet. Das Codon TTG, wie es auch in *kamA<sub>Bs</sub>* zu finden ist, tritt in allen annotierten offenen Leserastern von *E. coli* K12 in lediglich 3 % aller Fälle als Startcodon auf (Panicker *et al.*, 2015); außerdem konnte gezeigt werden, dass die Nutzung eines alternativen Startcodons zu ATG die Translationseffizienz in *E. coli* um das Achtfache reduzieren kann (Sussman *et al.*, 1996). Für die Proteinsynthese in *E. coli* pASK\_yodPkamA

wird mit hoher Wahrscheinlichkeit das stromaufwärts der synth. RBS liegende ATG für die Translation von *kamA<sub>Bs</sub>* genutzt werden. Dies würde zu einem 13 AS längeren Protein mit nur einem geringfügig höherem pI (von 6,07 auf 6,39) führen, aber die korrekte Faltung und somit die Löslichkeit und Funktion des Proteins beeinträchtigen. Eine weitere mögliche Erklärung zur fehlenden Funktion von *KamA<sub>Bs</sub>* durch das Phänomen der *natural polarity*, also die reduzierte Expression von Genen, die weiter vom Promotor entfernt liegen, kann aus zwei Gründen ausgeschlossen werden (Kennell & Riezman, 1977; Zabin & Fowler, 1970). Zum einen liegt das Gencluster *yodP-kamA<sub>Bs</sub>* laut Literatur mit weiteren Genen in einer Transkriptionseinheit im Ursprungsorganismus (Müller *et al.*, 2011), es ist jedoch nicht bekannt, ob ein Operon-Charakter besteht, für den dieses Phänomen vor allem beobachtet werden konnte. Des Weiteren liegt *KamA<sub>Bs</sub>* zwar unlöslich, dafür aber in einer Menge vor, die gegen eine reduzierte Translation spricht (vgl. Abb. 3.6).



**Abb. 4.1: Sequenzausschnitt des Vektors pASK\_yodPkamA (*in situ*).** Gezeigt ist das 3'-Ende des Gens *yodP<sub>Bs</sub>* mit beiden potenziellen sig70-Promotorboxen. Daran schließt sich ein funktionell, *in frame* liegendes ATG an, sowie die synth. RBS von *kamA<sub>Bs</sub>* und der Anfang (5'-Ende) des Gens selbst. Rot umrahmt: natürliches Startcodon TTG von *kamA<sub>Bs</sub>*.

#### 4.2.2 *H. elongata* als Produktionsstamm

Mit dem *yodP-kamA*-Gencluster aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> (vgl. 3.2 und 4.2.1) konnte in *H. elongata* kein  $\beta$ -Lysin, bzw. NA $\beta$ L produziert werden. Untersuchungen der Vektorsequenz offenbarten ein seltenes Startcodon für *kamA<sub>Bs</sub>*, sowie eine Mutation in *yodP*. Als Konsequenz dessen wurden zwei neue Vektoren konstruiert, wobei der erste lediglich das Gen der bacillialen LAM enthielt, welches durch die Wahl neuer Primer nun das Startcodon ATG statt des ursprünglichen TTG aufwies (vgl. 3.3.1.1, pPE\_kamA\_specRBS). Der zweite Vektor baute

auf dem ersten auf und enthielt zusätzlich das Gen der bacillalen  $\beta$ LAT stromabwärts von *kamA<sub>Bs</sub>* (vgl. 3.3.2.1, pPE\_kamA\_specRBS\_yodP). Beide Vektoren wurden jeweils in den Wildtyp *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>, sowie in die Ectoin-Deletionsmutante *H. elongata* WUB02 überführt.

**$\beta$ -Lysin.** Nach der Anzucht bei Standardbedingungen war es möglich, die Produktion der LAM nachzuweisen (vgl. Abb. 3.10). In Wildtyp-Kulturen konnte ungeachtet der NaCl-Konzentration die zur Induktion verwendet wurde (auf 6 % oder 10 % w/v) etwa die gleichen Mengen KamA<sub>Bs</sub> in der löslichen, sowie unlöslich Proteinfraction detektiert werden. Die Ectoin-Deletionsmutante wies vergleichbar viel KamA<sub>Bs</sub> in der unlöslichen Form wie die Wildtyp-Kultur auf; ein konkreter Nachweis des Proteins in der löslichen Fraction konnte nicht erbracht werden (vgl. Abb. 3.10). In der SDS-PAGE-Analyse kann eine potenzielle KamA<sub>Bs</sub>-Bande von *Halomonas*-eigenem Protein nicht eindeutig unterschieden werden; die nachfolgend erzielten Ergebnisse setzen jedoch eine funktionelle Produktion des Enzyms voraus. Zusätzlich zum Nachweis der Proteine gelang es erstmals, heterolog produziertes  $\beta$ -Lysin mittels FMOC-ADAM-HPLC nachzuweisen (bis zu 0,5 mg/g TG in *H. elongata* pPE\_kamA\_specRBS und 0,6 mg/g TG in *H. elongata* WUB02 pPE\_kamA\_specRBS; vgl. Tab. 3.3).

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der Tausch des KamA<sub>Bs</sub>-Startcodons TTG zu ATG im Expressionsvektor signifikante Auswirkungen hat. Dies bestärkt die Vermutung, dass das Triplett ATG nicht nur in *E. coli*, sondern auch in *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> präferiert zur Proteinbiosynthese genutzt wird.

Die  $\beta$ -Lysin-Werte aller untersuchten Kulturen unterscheiden sich im direkten Vergleich nicht signifikant, dennoch muss bei der Betrachtung der Ergebnisse die Höhe der NaCl-Menge zur Induktion beachtet werden. Die Salzkonzentration in den Wildtyp-Kulturen wurde entweder auf 6 % oder auf 10 % (w/v) angehoben. In vergangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass damit eine starke Protein-(Über)Produktion erreicht wird (Witt, 2011, Dörfler, 2014, Stiller *et al.*, 2018). Die Konzentration in der Ectoin-Deletionsmutante wurde lediglich von 2 % auf 4 % NaCl (w/v) erhöht, sodass eine vergleichsweise geringe Ausbeute an Protein oder Produkt erwartet wurde. Der detektierte  $\beta$ -Lysin-Wert übertrifft jedoch die Werte der wildtypischen Expressionskulturen. Dies unterstreicht den großen Einfluss von Ectoin auf den *promA*-Promotor, welcher sich in einer Erniedrigung der Expressionsstärke äußert (Kunte, 2006). Dieser Regulationsmechanismus entfällt in *H. elongata* WUB02. Gleichzeitig ist das Wachstum des Stammes aufgrund dieser Deletion eingeschränkt und ab NaCl-Konzentrationen von 5 - 6 % (w/v) stark inhibiert (Witt, 2011 und unveröffentlicht). *H. elongata* WUB02 pPE\_kamA\_specRBS ist somit trotz des Unvermögens, Ectoin zu produzieren, nur mäßig für die Synthese von  $\beta$ -Lysin geeignet.

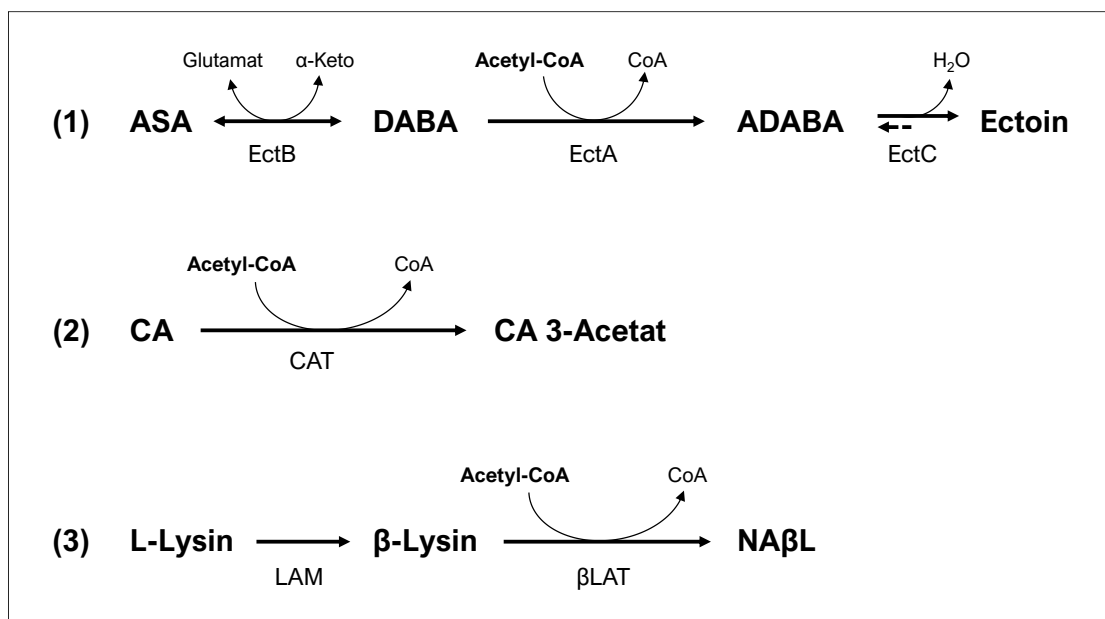
Die hier erreichten Mengen an  $\beta$ -Lysin sind, verglichen mit dem zelleigenen Osmolyt Ectoin, sehr gering. Das Substrat L-Lysin wurde mit 4 mM Endkonzentration zu den Kulturen gegeben (zusätzlich zur zelleigenen *de-novo*-Synthese von L-Lysin) und lag somit im Überschuss vor, was eine Substratlimitierung ausschließt. Eine Verwertung des bereits produzierten  $\beta$ -Lysin für den Aufbau von Biomasse wie in Clostridien scheint unwahrscheinlich, da es in *H. elongata* keine Hinweise auf homologe Abbau-Enzyme, wie z.B. KamD oder KamE (beide EC 5.4.3.3) gibt. Eine Verwertung durch Einbau in Peptidketten mittels Translation kann aufgrund der aktuellen Forschungslage nur sehr kritisch betrachtet werden, da dies zwar grundsätzlich möglich ist, aber eine zellfreie Umgebung und ein (stark) modifiziertes ribosomales System voraussetzt (Fujino *et al.*, 2016). Darüber hinaus wurde in früheren Studien gezeigt, dass die Gleichgewichtskonstante der L-Lysin 2,3-Aminomutase auf Seiten des  $\beta$ -Isomers liegt (Chen *et al.*, 2007). Eine Erklärung für die relativ geringen Mengen an  $\beta$ -Lysin in *H. elongata* mit dem Vektor pPE\_kamA\_specRBS müssen zu diesem Zeitpunkt also dem Ectoin-Regulationsmechanismus (herabgesenkte Expressionsstärke des *promA*-Promotors), oder der geringen Salztoleranz der Deletionsmutante (eingeschränktes Wachstum bei hoher NaCl-Konzentration) zugesprochen werden.

**NA $\beta$ L.** Mithilfe des Expressionsvektors pPE\_kamA\_specRBS\_yodP konnte in *H. elongata* nun neben KamA<sub>Bs</sub> zusätzlich auch das Protein YodP produziert werden (vgl. Abb. 3.12). In den Wildtyp-Kulturen konnten vergleichbare Mengen an Protein (KamA<sub>Bs</sub> und YodP) in der löslichen, sowie unlöslichen Proteinfraction unabhängig der Induktionsstärke (6 % oder 10 % NaCl *w/v*) detektiert werden. In der Deletionsmutante lagen beide Proteine eindeutig in der unlöslichen Fraktion vor (vgl. Abb. 3.12). Die Analyse des Zellmaterials mittels HPLC bestätigte die erstmalige erfolgreiche heterologe Produktion des kompatiblen Soluts NA $\beta$ L in *H. elongata* mithilfe der Synthesegene aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> (vgl. Tab. 3.4).

Auffällig ist, dass es bei diesen Versuchen keine Korrelation zwischen Induktionsstärke und der Menge an (kompatiblen) Soluten gibt; hier findet sich mehr NA $\beta$ L in Wildtyp-Kulturen bei 6 % NaCl (*w/v*), als bei Kulturen mit 10 % NaCl (*w/v*). Der Ectoin-Gehalt ist vergleichbar, aber insgesamt niedriger als in analogen Versuchen zur  $\beta$ -Lysin-Produktion (vgl. 3.3.1.2 und Tab. 3.3). Der höchste NA $\beta$ L-Gehalt findet sich in Kulturen von *H. elongata* WUB02, welcher mit einer NaCl-Erhöhung auf 4 % (*w/v*) minimal mehr NA $\beta$ L als die Wildtyp-Kulturen bei 6 % (*w/v*) produziert. Das kann erneut durch den *promA*-Regulationsmechanismus durch Ectoin selbst erklärt werden, der in diesem Stamm entfällt.

Für die LAM aus dem nahe verwandten *B. subtilis* ATCC 27505 wurde im Vergleich zur LAM aus *C. subterminale* SB4 eine sehr geringe Aktivität postuliert (Chen *et al.*, 2000; Lieder *et al.*, 1998); dies gilt möglicherweise auch für die LAM aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>. Dennoch war es

Müller *et al.* (2011) möglich, durch homologe Überexpression von *yodP* einen NAßL-Gehalt von umgerechnet ca. 20 mg/g TG zu erhalten, wovon die hier produzierten Mengen weit entfernt liegen. Eine mögliche Erklärung für wildtypische Expressionskulturen von *H. elongata* bezieht nicht nur die Ectoin-Produktion, sondern auch den hier angelegten Selektionsdruck mit ein. Zunächst gilt es neben dem Regulationsmechanismus durch Ectoin auch dessen Synthese zu beachten. Ectoin wird mithilfe von den drei Enzymen EctA (EC 2.3.1.178), EctB (EC 2.6.1.76) und EctC (EC 4.2.1.108) ausgehend von Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd synthetisiert (Peters *et al.*, 1990). Dabei wird im zweiten Schritt ein Acetyl-CoA durch EctA verbraucht, um das Zwischenprodukt N $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure (ADABA) zu synthetisieren (vgl. Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Vereinfachte schematische Darstellung der Ectoin-Synthese (1), der Inaktivierung von Chloramphenicol (2) und der NAßL-Synthese (3).** ASA: Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd,  $\alpha$ -Keto:  $\alpha$ -Ketoglutarat, DABA: L-2,4-Diaminobuttersäure, ADABA: N $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure, CA: Chloramphenicol

Des Weiteren wurde zu den hier genutzten Expressionskulturen das Antibiotikum Chloramphenicol (Cm) als Selektionsdruck zugegeben. Auf dem Vektor pPE\_kamA\_specRBS\_yodP befindet sich das Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), welches für das dazugehörige Protein (EC 2.3.1.28) kodiert und die benötigte Resistenz vermittelt (vgl. Abb. 3.11). Cm wird dabei unter Verbrauch von Acetyl-CoA durch die CAT acetyliert und somit inaktiviert (Shaw, 1983; vgl. Abb. 4.2).

Zusammen mit der Synthese von NAßL werden in den Expressionskulturen von *H. elongata* pPE\_kamA\_specRBS\_yodP also drei verschiedene Reaktionen vermittelt, die neben anderen zahlreichen Stoffwechselreaktionen, z.B. dem Citratzyklus, zusätzlich Acetyl-CoA konkurrierend verbrauchen. Acetyl-CoA entsteht in großen Mengen durch die Glykolyse, die

bei Wachstum in MM63-Medium durch Glucose gespeist wird. Bei der Kultivierung von Organismen ohne Expressionsvektoren ist nicht von einer Unterversorgung mit Acetyl-CoA auszugehen. Der hohe Bedarf an Acetyl-CoA durch die oben beschriebenen drei Reaktionen, wobei zwei durch hohe NaCl-Mengen stark induziert werden, könnte jedoch einen Mangel des Moleküls hervorrufen. Das erklärt ebenfalls den geringen Gehalt an Ectoin (vgl. Tab. 3.4), der in den wildtypischen Expressionsstämmen bei 6 %, bzw. 10 % NaCl (*w/v*) ca. 50 - 60 % niedriger ist als der zu erwartende Ectoingehalt in Wildtypkulturen ohne Expressionsplasmid (Persönliche Kommunikation E.A. Galinski, 2020).

Vor diesem Hintergrund erscheint es wenig überraschend, dass die Zugabe von 10 mM L-Lysin keine steigernde Wirkung auf den NAßL-Gehalt hatte; dieser hatte sich im ggS. zu vorherigen Experimenten verringert (vgl. 3.3.2.2, Daten nicht gezeigt). Zusätzliche Signale in den HPLC-Messungen weisen auf N-acetyliertes  $\alpha$ -Lysin hin, das bei der stark erhöhten Zugabe von L-Lysin akkumuliert werden kann. Bioinformatische Analysen des Genoms von *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> ergaben 16 mögliche Genloci, die nach computergestützter Analyse eine potenzielle Acetyltransferase-Funktion besitzen (vgl. Tab. 6.1 im Anhang). Eine Acetylierung von L-Lysin zu N $\epsilon$ -Acetyl- $\alpha$ -Lysin oder N $\alpha$ -Acetyl- $\alpha$ -Lysin ist hier denkbar. Bisher nicht untersucht ist die Spezifität von YodP; eine Substrat-Promiskuität stellt eine zusätzliche Funktions-Möglichkeit dar.

Wie durch die gezeigten Ergebnisse deutlich wurde, ermöglicht die Nutzung von *H. elongata* als Expressionsorganismus im Gegensatz zu *E. coli* die aerobe Produktion von NAßL. Um dieses Expressionssystem zu optimieren und den NAßL-Gehalt zu erhöhen, sollte u.a. das System zum Erhalt des Selektionsdrucks geändert und so der Bedarf an Acetyl-CoA gesenkt werden. Dafür würde sich ein Aminoglykosid-Antibiotikum (wie z.B. Kanamycin) mit einer ATP-abhängigen Aminoglykosid-Phosphotransferase als Resistenzmechanismus anbieten.

#### 4.2.3 *E. coli* als Produktionsstamm

Nachdem die ersten Expressionsversuche mithilfe des *yodP-kamA*-Genclusters aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> wenig erfolgreich waren, wurde für die NAßL-Produktion durch *E. coli* die gleiche Strategie angewendet, wie für die Synthese durch *H. elongata*. Hier lag der Fokus zunächst auf einer funktionellen Produktion der LAM und dem Zwischenprodukt  $\beta$ -Lysin. Dafür wurden zwei Vektoren konstruiert, wobei der erste die bacilliale LAM mit alternativem Startcodon ATG statt TTG enthielt (vgl. 3.4.1.2, pASK\_kamA\_specRBS). Für den zweiten Vektor wurde die LAM aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> genutzt (vgl. 3.4.1.5, pASK\_kamA\_CpRBS).

Die heterologe Produktion von NA $\beta$ L in *E. coli* konnte schließlich mit zwei weiteren Vektoren erreicht werden, die beide eine Kombination aus verschiedenen Genen aufwiesen. Der Vektor pASK\_kamA\_yodP-fwd enthielt dabei die Gensequenz der LAM aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> und die  $\beta$ LAT aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> (vgl. 3.4.2.1). Das Expressionsplasmid pASK\_yodP-abIA wies eine Kombination aus der LAM von *Ms. mazei* Gö1 und bacillialer  $\beta$ LAT auf (Georgiev, 2017b, vgl. auch Abb. 3.19).

#### 4.2.3.1 $\beta$ -Lysin wird nur anaerob produziert

**KamA aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>.** Ebenso wie in *H. elongata* hatte der Tausch des KamA<sub>BS</sub>-Startcodons von ATG zu TTG auch in *E. coli* signifikante Auswirkungen auf die Produktion des Enzyms. Nach der Anzucht in MM63-1 war es mithilfe des Expressionsvektors pASK\_kamA\_specRBS möglich, KamA<sub>BS</sub> in der löslichen und unlöslichen Proteinfraction nachzuweisen (vgl. Abb. 3.14). Die Proteinmengen waren dabei in den Proben der aeroben Kulturen deutlich höher als in Kulturen, die unter anaeroben Bedingungen angezogen wurden. Die Untersuchung mittels HPLC ergab erstmals den Nachweis von heterolog synthetisiertem  $\beta$ -Lysin in *E. coli* (vgl. Tab. 3.5). Trotz Nutzung der Sauerstoff-unempfindlichen LAM aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> wurde das Zwischenprodukt lediglich in anaeroben Kulturen des Expressionsstamms gefunden, nicht jedoch in aeroben. Die in den anaeroben *E. coli*-Expressionskulturen nachgewiesenen Mengen an  $\beta$ -Lysin sind mit ca. 3,5 mmol/L IZV vergleichbar mit den Werten aus *H. elongata* WUB02 pASK\_kamA\_specRBS (vgl. Tab. 3.3). Zunächst bestärken die erzielten Ergebnisse, dass auch *E. coli* DH5 $\alpha$  eine Präferenz für das Initialtriplekt ATG besitzt. Zwar zeigen die SDS-PAGE-Analysen der Expressionstämme mit *yodP-kamA*-Cluster ebenfalls eine Proteinbande für KamA<sub>BS</sub> in der unlöslichen Proteinfraction (vgl. Abb. 3.6), diese stellt jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit ein 13 AS längeres Protein dar, welches nicht funktionell ist (vgl. 3.2 und 4.2.1). Die Funktionalität des hier produzierten Enzyms wird durch den Nachweis des Zwischenprodukts bestätigt.

Die Produktion von  $\beta$ -Lysin konnte ausschließlich unter Ausschuss von Sauerstoff beobachtet werden, obwohl dies mit dem gleichen Enzym in *H. elongata* auch bei aeroben Anzuchtbedingungen möglich war (vgl. 3.3.1.2, Tab. 3.3). Auch die homologe Produktion von NA $\beta$ L in *B. subtilis* wurde unter aeroben Bedingungen durchgeführt, was eine hohe Sauerstoffempfindlichkeit (*in vivo*) von KamA<sub>BS</sub> ausschließt (Müller *et al.*, 2011). In vergangene Untersuchungen zur heterologen Produktion von YodO (LAM) aus *B. subtilis* ATCC 27505 in *E. coli* musste das Enzym für *in vitro*-Aktivitätstests unter anaeroben und reduzierenden Bedingungen (Zugabe von Natrium-Dithionit) vor-inkubiert werden (Chen *et al.*, 2000). Zusammen mit den gezeigten Ergebnissen lässt dies darauf schließen, dass in *E. coli* unter

aeroben Bedingungen keine optimalen Produktionsverhältnisse für die LAM hergestellt werden können. Ein Beispiel dafür könnte der unterschiedliche Turgordruck sein, der in *E. coli* stark von dem in *B. subtilis* abweicht (ca. 0,3 bar vs. ca. 20 bar; Deng *et al.*, 2011; Mika *et al.*, 2014) und unter Umständen Auswirkungen auf die Aktivität der LAM hat. Der niedrige Turgor kann in *H. elongata* bei erhöhten Salinitäten durch die Aufnahme von K<sup>+</sup> (und Glutamat) ausgeglichen werden (Kraegeloh & Kunte, 2002).

Zusätzliche Erklärungen beziehen das reduktive Milieu im Cytoplasma der Expressionskulturen ein. Es konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Bacillithiol-Gehalt in *B. subtilis* während des exponentiellen Wachstums stark ansteigt (Sharma *et al.*, 2011). Bacillithiol (BSH) ersetzt in vielen grampositiven Bakterien Glutathion, welches wiederum in den meisten gramnegativen Bakterien vorkommt und eine wichtige Rolle beim Schutz vor oxidativem Stress und der Aufrechterhaltung des reduktiven Milieus spielt (Deponte, 2013; Hand & Honek, 2005; Meister, 1988). Ein signifikanter Anstieg von Glutathion in *E. coli* wurde in der Vergangenheit unter anderem häufig als Antwort auf osmotischen Stress beobachtet (McLaggan *et al.*, 1990; Oktyabrskii & Smirnova, 2012; Smirnova *et al.*, 2001), der jedoch in den hier durchgeführten Expressionsversuchen nicht bestand (1 % NaCl w/v). Es ist nicht eindeutig, in welchem Maße der Glutathion-Gehalt in *H. elongata* bei osmotischem Stress ansteigt. Es ist jedoch denkbar, dass in *H. elongata* unter osmotischem Stress (vgl. 3.3) ähnliche reduzierende Bedingungen durch Glutathion vorliegen, wie in *B. subtilis* unter isoosmotischen Bedingungen durch Bacillithiol. Dies kann positive Auswirkungen auf die Aktivität der LAM unter aeroben Bedingungen haben. Einen möglichen Ansatzpunkt für weiterführende Experimente könnte die aerobe Anzucht von *E. coli* pASK\_kamA\_specRBS mit erhöhter NaCl-Konzentration (3 - 5 % w/v) darstellen, um einen Anstieg des Glutathion-Gehalts zu forcieren.

**KamA aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>.** Der Vektor pASK\_kamA\_CpRBS wurde in den Expressionsstämmen *E. coli* DH5α und *E. coli* Rosetta™ (DE3) genutzt. Die Produktion der LAM konnte dabei sehr deutlich im Rosetta-Stamm in der löslichen und der unlöslichen Proteinfraction bei Anwesenheit und unter Ausschluss von Sauerstoff nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.16). In Kulturen von *E. coli* DH5α war dies nur in der unlöslichen Proteinfraction unter anaeroben Bedingungen der Fall.

Die deutliche Überproduktion des Enzyms in *E. coli* Rosetta™ (DE3) war zu erwarten; so werden z.B. von den 28 Arginin-Resten in KamA<sub>Cp</sub> ca. 90 % durch das Triplett AGA kodiert, für das die dazugehörige tRNA nur in geringer Konzentration in *E. coli* vorliegt (Kane, 1995). Eine Unterstützung der Translation in *E. coli* Rosetta™ (DE3) durch das pRARE-Plasmid hat dementsprechende positive Auswirkungen auf eine hohe Produktion. Umso auffälliger war der Nachweis von β-Lysin in anaeroben Kulturen beider Expressionsstämme; die Produktmenge



in *E. coli* DH5 $\alpha$  übertraf die in *E. coli* Rosetta™ (DE3) beinahe um das sechsfache in Minimalmedium bei 3 % NaCl (w/v) (vgl. Tab. 3.6). Verglichen mit den vorherigen Beobachtungen ist davon auszugehen, dass von einer hohen Proteinproduktion nicht auf eine hohe Produktmenge geschlossen werden kann. Diese Beobachtungen wurden bereits von Schrötter (2016) in Bezug auf die Produktion und der damit einhergehenden Fluoreszenz von GFP<sub>uv</sub> getätigt.

Das BL21-Derivat *E. coli* Rosetta™ (DE3) wird wie viele andere nahverwandte Derivate vor allem zur Überproduktion von Proteinen genutzt (Novy *et al.*, 2001; Tegel *et al.*, 2010); aufgrund der vergleichsweise geringen Produktion des Zwischenprodukts  $\beta$ -Lysin wurde der Stamm in den weiterführenden Experimenten ausgeschlossen. Die erfolgreiche und im Vergleich zu Rosetta™ (DE3) hohe Produktion von  $\beta$ -Lysin in *E. coli* DH5 $\alpha$  bestätigte die Unabhängigkeit von zusätzlichen tRNAs für seltene Aminosäuretripletts in der clostridialen LAM bzgl. ihrer Aktivität. Eine Einschränkung im Wachstum konnte im Vergleich zu *E. coli* Rosetta™ (DE3) ebenfalls nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Der  $\beta$ -Lysin-Gehalt in *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK<sub>kamA</sub>CpRBS war in Medium mit 3 % NaCl (w/v) am höchsten. KamA<sub>Cp</sub> weist eine Acidität von 0 % auf (gleiche Anzahl saurer und basischer AS-Reste) und kann daher nicht als salzliebendes Protein betrachtet werden. Die Kultivierung von *E. coli*-Expressionskulturen in vergangenen Untersuchungen wurden bei geringen NaCl-Konzentrationen durchgeführt, wobei eine Charakterisierung des Proteins und nicht die Produktion von  $\beta$ -Lysin im Vordergrund stand (Chen *et al.*, 2006; Lepore *et al.*, 2005; Ruzicka *et al.*, 2000; Ruzicka & Frey, 2010). Die erhöhte NaCl-Konzentration von 3 % (w/v) wirkt sich im Fall von KamA<sub>Cp</sub> also vor allem positiv auf die Enzymfunktion, und nicht auf die Enzymproduktion aus. Möglicherweise liegen hier reduzierende Bedingungen im Cytoplasma durch eine erhöhte Glutathion-Menge vor (vgl. „KamA aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>“).

**AbIA aus *Ms. mazei* Gö1.** Bisherige Arbeiten mit AbIA (und AbIB) wurden stets unter aeroben Bedingungen durchgeführt, wobei zu keinem Zeitpunkt  $\beta$ -Lysin nachgewiesen werden konnte (Hövels, 2015a, 2015b; Lohberger, 2009; Möller, 2011;). Wie bereits unter 3.2 beschrieben, wurde für alle weiteren Untersuchungen dieser Arbeit mit archaealen Genen, bzw. Proteinen, der Ausschluss von Sauerstoff vorausgesetzt. Die Anzucht von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit dem Expressionsvektor pASK<sub>Mm</sub>abIA (vgl. Abb. 3.17 A; Witt, unveröffentlicht) für die Synthese von  $\beta$ -Lysin erfolgte analog zu Versuchen mit KamA<sub>Cp</sub> unter semi-anaeroben Bedingungen (Georgiev, 2017a).

Ein eindeutiger Nachweis der Produktion von AbIA konnte nach Anzucht in MM63-0,5-Medium erbracht werden, auch wenn das Enzym dort nur in der unlöslichen Proteinfraction vorlag (vgl.

Abb. 3.17 B). Bei höheren Salzkonzentrationen wie 3 %, bzw. 5 % NaCl (*w/v*) war dies nicht der Fall.

Erstmalig konnte zusätzlich zu AblA auch das Produkt  $\beta$ -Lysin detektiert werden, wobei dies in allen Expressionskulturen (ungeachtet der NaCl-Konzentration) der Fall war (vgl. 3.4.1.7; Georgiev, 2017a). Der höchste Wert wurde nach der Anzucht mit 3 % NaCl (*w/v*) gemessen und ist mit ca. 6,6 mg/g TG in etwa vergleichbar mit dem Gehalt in *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA\_CpRBS bei gleicher Salinität (unter der Annahme, dass ca. 50 % Protein im TG vorliegen; (Stouthamer, 1973).

Die erhöhte Salzkonzentration hat auf die LAM aus *Ms. mazei* Gö1 positive Auswirkungen. AblA weist zwar lediglich eine Acidität von ca. 2,4 % auf, die Transkription des Gens steigt jedoch um ca. das 126-fache, wenn die Salinität von 38,5 mM NaCl (ca. 0,2 % *w/v*) auf 800 mM NaCl (ca. 4,7 % *w/v*) angehoben wird (Pflüger *et al.*, 2007). Auch die Produktion des kompatiblen Soluta NA $\beta$ L ist stark erhöht, wenn die Kulturen bei erhöhtem osmotischen Stress kultiviert werden (Pflüger *et al.*, 2003; Saum *et al.*, 2009).

Für die heterologe Produktion von AblA und Synthese von  $\beta$ -Lysin in *E. coli* liegt das Optimum bei 3 % NaCl (*w/v*). Wie von Georgiev (2017a) gezeigt nimmt der  $\beta$ -Lysin-Gehalt in Expressionskulturen bei 5 % NaCl (*w/v*) ab und ist vergleichbar mit Werten bei 0,5 % NaCl (*w/v*). Dies kann auf den osmotischen Stress zurückzuführen sein, der für *E. coli* bei dieser Salinität bereits hoch ist und nicht nur Auswirkung auf die heterologe Proteinexpression, sondern auch auf die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit des Organismus hat (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich hierbei demnach um eine Inhibition des gesamten Expressionssystems.

#### 4.2.3.2 Produktion von NA $\beta$ L

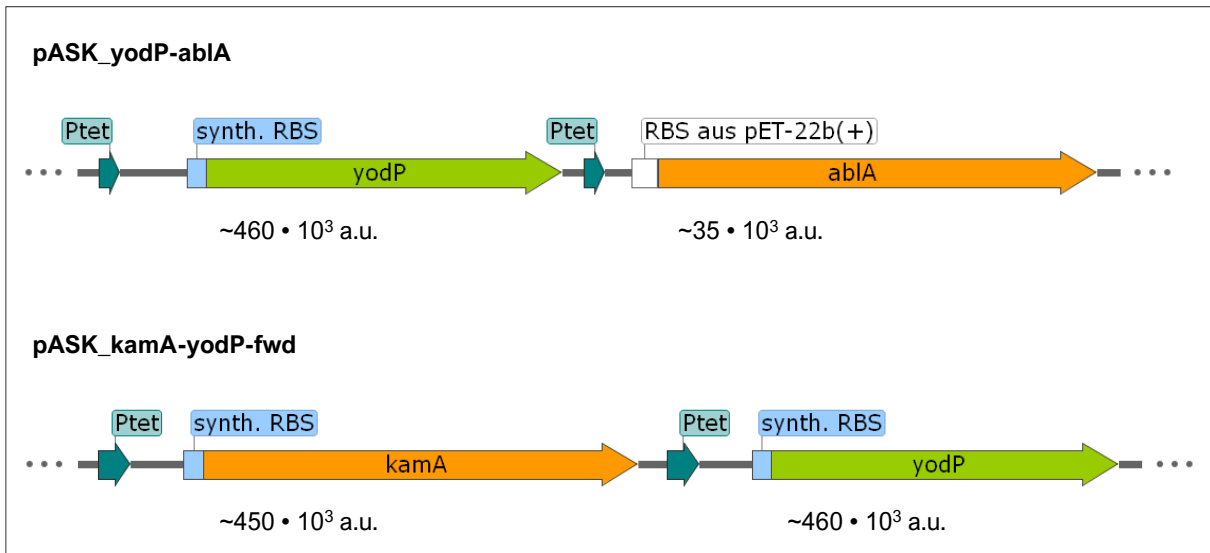
**Proteinnachweis.** Für die erstmalige erfolgreiche Synthese von NA $\beta$ L in *E. coli* wurde der Stamm DH5 $\alpha$ , sowie die beiden Expressionsvektoren pASK\_kamA\_yodP-fwd, sowie pASK\_yodP-ablA genutzt (vgl. 3.4.2.1, Abb. 3.18, Abb. 3.19 und Georgiev, 2017b). Diese stellen eine Kombination aus der  $\beta$ LAT YodP aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> und der LAM KamA<sub>Cp</sub> aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>, bzw. AblA aus *Ms. mazei* Gö1 dar. Der Nachweis der Proteinproduktion konnte in diesen Expressionskulturen für YodP erbracht werden, mögliche Signale der LAM in der unlöslichen Proteinfraction von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA können jedoch nicht eindeutig als solche identifiziert werden (vgl. Abb. 3.20). Ähnliche Ergebnisse konnten auch von Georgiev beobachtet werden (Abb. 3.17; Georgiev, 2017b).

AblA besitzt einige für *E. coli* selten genutzte Tripletts, wie z.B. AGG oder AGA (76 % aller Arginin-Reste), AUA (36 % aller Isoleucin-Reste) oder GGA (42 % aller Glycin-Reste). Die

Produktion des Enzyms in *E. coli* ist dementsprechend beeinträchtigt. Bei der Kultivierung unter aeroben Bedingungen wird aufgrund einer ausreichend vorliegenden C-Quelle in MM63-Medium (50 mM Glucose) und verfügbarem Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor schnell Biomasse aufgebaut. Die Verfügbarkeit der für seltenen Triplets bereitgestellten tRNAs ist folglich herabgesetzt, da der Biomasseaufbau von der Zelle der Synthese von heterologen Proteinen vorgezogen wird. Diese These wird durch SDS-PAGE-Analysen von *E. coli* Rosetta™ (DE3) pASK\_kamA\_CpRBS untermauert, in denen die Produktion von KamA<sub>Cp</sub> mithilfe des pRARE-Plasmids deutlich nachzuweisen war (vgl. Abb. 3.16). Eine daraus folgende Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Synthese des Zwischenprodukts  $\beta$ -Lysin konnte im Stamm DH5 $\alpha$  jedoch nicht beobachtet werden (vgl. 3.4.1.6 und 4.2.3.1, KamA aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>).

Für die Synthese von NA $\beta$ L wurden die Expressionskulturen ausschließlich semi-anaerob angezogen. Dabei erfolgte die Kultivierung anfangs in MM63-0,5 und später in GGF-0,5, wobei jeweils 50 mM Fumarat zugesetzt waren. Auffällig war dabei der große Unterschied in der NA $\beta$ L-Produktion innerhalb der Expressionsstämmen aufgrund verschiedener Vektoren, und bei der Nutzung unterschiedlicher Medien (vgl. Tab. 3.7 und Tab. 3.8).

**Vergleich der NA $\beta$ L-Expressionsvektoren.** Die zur Synthese von NA $\beta$ L genutzten Vektoren unterscheiden sich durch die inverse Reihenfolge der Gene und der RBS der LAM (vgl. Abb. 3.18, 3.19 und 4.3). In pASK\_yodP-*abIA* stammt die RBS ursprünglich aus dem pET-22b(+)-Vektor, in pASK\_kamA-yodP-fwd befindet sich vor der LAM hingegen eine synthetisch konstruierte RBS (vgl. 2.5.2.1). Die insgesamt vier heterologen Gene wurden mittels *RBS-Calculator* (vgl. 2.3 und 2.5.2.1) inklusive der vorangestellten RBS analysiert, woraus sich jeweils die Translations-Initiationsraten (Ti-Rate) ergaben. Dabei fiel auf, dass jeweils *yodP* und *kamA<sub>Cp</sub>* eine Ti-Rate von ca. 450k besitzen, während sich die von *abIA* auf ca. 35k beläuft und somit zwölfmal niedriger ist (vgl. Abb. 4.3). Diese vier Werte gelten als sehr hoch; im Vergleich ergaben Analysen der *E. coli*-Haushaltsgene *cysG* und *hcaT* signifikant geringere Ti-Raten von ca. 2,2k, bzw. ca. 640 (Analyse durch RBS-Calculator mittels durch BPROM-Tool vorhergesagte Promotoren, vgl. 2.3). Bisherige Studien ergaben, dass die Ti-Rate bei einer ausreichenden Nährstoffversorgung der limitierende Schritt bei der Translation von mRNA in *E. coli* ist (Jacques & Dreyfus, 1990). Die Anzucht der Expressionsstämmen erfolgte in Minimalmedium (inkl. Zugabe von VA-Lösung); wobei für MM63-Medium gezeigt wurde, dass vor allem bei einer hohen Produktion von stark N-haltigen Substanzen das Medium N-limitiert wird (Moritz, 2018; Bethlehem 2019).



**Abb. 4.3: Schematischer Vergleich der NAβL-Expressionsvektoren.** Die Länge der Gene ist zwecks darstellerischer Gründe nicht repräsentativ. Unter den Gensequenzen ist jeweils die mit dem RBS-Calculator-Tool (vgl. 2.3) berechnete Translations-Initiationsrate (*t.i.*-Rate) angegeben. Ptet: *tet*-Promotor, a.u.: *arbitrary units*

Zusätzlich besteht ein starker Bedarf an seltener tRNA durch die heterologe Expression der auf den Vektoren befindlichen Gene. Diese Nachfrage hat ihren Ursprung zum größten Teil in den Genen der jeweiligen LAM (vgl. 4.2.3.1) und nur vereinzelt in *yodP* (ca. 22 % aller Arg/Ile/Gly-Reste durch seltene Codons). Diese massive Forderung nach seltener tRNA durch sehr hohe Ti-Raten kann also durchaus mit einem Aminosäure-Mangel verglichen werden. Subramaniam *et al.* (2014) konnten diesbezüglich zeigen, dass solche Wachstumsbedingungen starke Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese (PBS) haben. Während des Voranschreitens des Ribosomenkomplexes auf der mRNA, bzw. der Elongation der Aminosäurekette kommt es unter solchen Umständen immer wieder zu kleinen Pausen durch die ausbleibende Versorgung mit der nächsten tRNA. Nachfolgend sammeln sich mehrere Komplexe hinter dem führenden Ribosom, es kommt zu einer Art „Ribosomenstau“ (Subramaniam *et al.*, 2014). Es konnte nachgewiesen werden, dass solche Strukturen mit erhöhter Frequenz aktiv aufgelöst werden (z.B. durch *tmRNA*, Keiler *et al.*, 1996), was im Abbruch der Translation resultiert (Subramaniam *et al.*, 2014).

Durch die stark erhöhten Ti-Raten von *yodP* und *kamA<sub>cp</sub>*, bzw. *ablA* tritt dieses beschriebene Phänomen möglicherweise ein. Das Gen *ablA* besitzt zwar immer noch eine sehr hohe Ti-Rate von ca. 35k, diese stellt aber einen signifikant geringeren Wert als den von *kamA<sub>cp</sub>* dar. Dieser Unterschied mag jedoch ausreichend sein, um AblA mit weniger Abbrüchen zu translatieren und mehr funktionelles Protein zu erhalten. Gemeinsam mit den Ergebnissen der SDS-PAGE-Analysen (vgl. 4.2.3.2, „Proteinnachweis“) führen die Resultate zu der Schlussfolgerung, dass ein Maximum nicht immer ein Optimum ist. Die Transkription und Translation von heterologen

Genen, bzw. Proteinen ist ein hochkomplexes System, welches aufeinander abgestimmt sein muss und im besten Falle balanciert und nicht ausmaximiert ist.

**Semi-anaerobes Wachstum besteht aus zwei Phasen.** Bei der Anzucht der Expressionsstämme ist nicht nur deutlich geworden, dass die Nutzung des Vektor pASK\_yodP-ablA eine erhöhte Produktion von NA $\beta$ L zur Folge hat, sondern auch die Anzucht in GGF-Medium (gegenüber der Anzucht in MM63-Medium, vgl. Tab. 3.7 und Tab. 3.8). Die zwei Kulturmedien MM63 und GGF (vgl. 2.4.2, Tab. 2.4 und Tab. 2.7) stellen beide ein Minimalmedium dar. Der größte Unterschied besteht in der Zusammensetzung der C-Quelle, die in MM63 komplett aus Glucose besteht (25 mM) und in GGF-Medium aus Glucose (10 mM) und Glycerin (40 mM) zusammengesetzt ist. Neben dieser Variation ist GGF-Medium außerdem noch Mangan (2,3  $\mu$ M MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O), sowie Calcium (4,5  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>) zugesetzt.

Bei der semi-anaeroben Anzucht der Expressionsstämme unterscheiden sich zwei Phasen: Wachstum unter aeroben Bedingungen bis zum Zeitpunkt der Induktion ( $W_1$ ) und Wachstum nach Induktion unter anaeroben Bedingungen ( $W_2$ ). Phase  $W_1$  beschreibt den Aufbau von Zellmasse bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4. In dieser Phase wird in beiden Medien zunächst aerob Glucose verstoffwechselt. Die Anwesenheit dieses Zuckers hemmt die Aufnahme vieler anderer Substrate (Postma *et al.*, 1984). Außerdem wird die Aufnahme von Glycerin bei Anwesenheit anderer Substrate durch eine Feedback-Inhibition, vermittelt durch Fructose-1,6-Bisphosphat, supprimiert (Zwaig & Lin, 1966). Die Daten der semi-anaeroben Batch-Fermentation bestätigen diese Gegebenheiten (vgl. Abb. 3.22). Beim Vergleich von Phase  $W_1$  in verschiedenen Expressionsversuchen konnte im Mittel eine erhöhte Wachstumsrate detektiert werden, wenn GGF- statt MM63-Medium zur Kultivierung genutzt wurde (durchschn. 0,32 h<sup>-1</sup> vs. 0,24 h<sup>-1</sup>; Standardabweichung 0,05, bzw. 0,04; Daten nicht gezeigt). Dieser Unterschied ist durch den Zusatz von Mangan und/oder Calcium in GGF-Medium erklärbar. Die Menge des zugesetzten Mangans entspricht ungefähr der in Spurenelementlösungen, welche häufig zur Förderung des Wachstums in Minimalmedium zugegeben werden (*trace element solution*, Claus *et al.*, 1983).

Eine Inhibition des Wachstums aufgrund eines Überflussmetabolismus durch „zu viel“ Glucose in MM63-Medium scheint hier unwahrscheinlich. Bei einem Überflussmetabolismus tritt ein Ungleichgewicht zwischen Aufnahmerate der C-Quelle und limitierter Kapazität des oxidativen Stoffwechsels in Folge einer hohen Wachstumsrate ein. In MM63-Medium ist die Menge an Glucose mit 25 mM jedoch lediglich 2,5-mal höher als in GGF-Medium; außerdem befinden sich die Expressionskulturen zum Zeitpunkt der Induktion (spätester Punkt der Wachstumsraten-Berechnung) bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 - was bei *E. coli* ungefähr einem TG von 0,13 g/L entspricht (Ren *et al.*, 2013; Sauer *et al.*, 1999; Soini *et al.*, 2008). Ein Mangel an

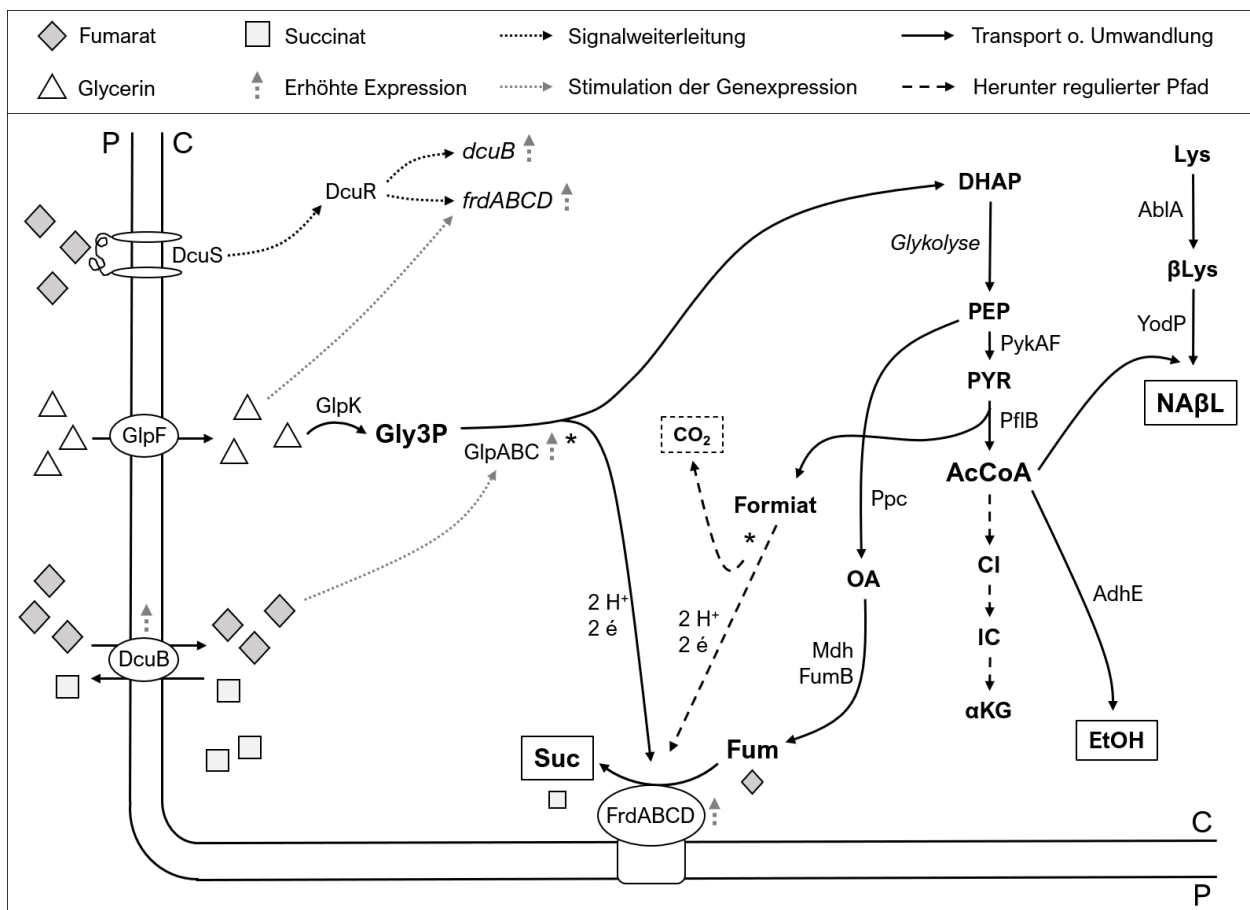
Sauerstoff und die damit verbundene Bildung von Acetat, welches i.d.R. inhibitorisch auf bakterielles Wachstum wirkt, kann somit ausgeschlossen werden (El-Mansi & Holms, 1989; Pinhal *et al.*, 2019; Varma *et al.*, 1993).

**GGF-Medium wirkt sich positiv auf das Expressionssystem aus.** Der Hauptunterschied zwischen MM63 und GGF kommt erst in Phase  $W_2$  zum Tragen. Diese zeichnet sich durch den Restverbrauch an Sauerstoff und den Wechsel zum anaeroben Stoffwechsel aus. Außerdem findet im Laufe dieser Phase in GGF-Medium ein Wechsel der C-Quelle von Glucose zu Glycerin statt. Es gibt Hinweise darauf, dass ein anaerobes Wachstum mit Fumarat und Glycerin als Elektronen ( $e^-$ )-Donor und C-Quelle metabolisch besser aufeinander abgestimmt ist als das Zellwachstum mit Fumarat und Glucose. Dies wird im Folgenden genauer analysiert. Ein Umschalten von aerober auf anaerobe Atmung mittels Fumarat wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. In *E. coli* ist dafür unter anderem ein globaler anaerober Regulator Fnr zuständig, sowie das Zwei-Komponenten-System DcuSR (Zientz *et al.*, 1998). Dabei wird Fumarat im Medium von der membranständigen, sensorischen Histidinkinase DcuS erkannt und ein Signal über den Regulator DcuR weitergeleitet, welches für die (erhöhte) Expression der Gene eines anaeroben Fumarat-Succinat Antiporters DcuB und der Fumaratreduktase FrdABCD sorgt (Zientz *et al.*, 1998). Fumarat wird vermehrt ins Cytoplasma geschleust und kann dort von der membranständigen Fumaratreduktase als terminaler Elektronenakzeptor zu Succinat reduziert werden. Die dafür notwendigen  $2 e^-$  können aus unterschiedlichen Quellen stammen; eine Möglichkeit ist Formiat, welches unter anaeroben Bedingungen aus Pyruvat entsteht und so zu  $CO_2$  oxidiert wird. Mit der Reduktion von Fumarat zu Succinat einher geht ein Transport von  $e^-$  über einen weiteren Dehydrogenase-Komplex, z.B. eine NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase. Bei diesen Abläufen wird ein Protonengradient aufgebaut, der final für die Generierung von ATP durch eine protonengetriebene ATP-Synthase sorgt (Fuchs *et al.*, 2007). Glucose wird unter anaeroben Bedingungen in *E. coli* durch die gemischte Säuregärung verstoffwechselt. Dabei wird sie weiterhin durch die Glykolyse zu Phosphoenolpyruvat (PEP), über Pyruvat zu Acetyl-CoA umgewandelt. Es entstehen eine Reihe von Endprodukten, so z.B. Succinat, Formiat, Ethanol und Acetat, wobei Succinat hier analog zur Fumarat-Atmung durch die Fumarat-Reduktase gebildet wird (Fuchs *et al.*, 2007).

Bei Glycerin wurde lange Zeit vorausgesetzt, dass ein externer Elektronenakzeptor anwesend sein muss, um den Zuckeralkohol anaerob zu nutzen. Dies konnte jedoch mehrfach widerlegt werden (Dharmadi *et al.*, 2006; Murarka *et al.*, 2008; Yazdani & Gonzalez, 2007). Die Aufnahme von Glycerin ins Zellinnere erfolgt genau wie bei der aeroben Verstoffwechslung durch den Transporter GlpF. Dort wird es durch die Typ II Glycerin-Dehydrogenase GldA und die PEP-abhängige Dihydroxyacetonkinase DhaKLM zu Pyruvat umgewandelt (Murarka *et al.*, 2008).

Daraus entstehen wiederum verschiedenen Endprodukte; vor allem Ethanol, Succinat und CO<sub>2</sub> (Dharmadi *et al.*, 2006).

Bei der gemeinsamen Betrachtung dieser verschiedenen Stoffwechselwege wird deutlich, dass anaerobes Wachstum mit der Kombination aus Fumarat und Glycerin als é- und C-Quelle gegenüber Glucose zu bevorzugen ist und teilweise synergistische Effekte auslöst (vgl. Abb. 4.4): Die Sensorkinase DcuS detektiert Fumarat im Medium, woraufhin ein Signal ausgelöst wird, dass die Überexpression von *dcuB* (Antiporter) und *frdABCD* (Fumaratreduktase, FR) induziert (vgl. Abb. 4.4 und Zientz *et al.*, 1998). Fumarat wird vermehrt in die Zelle eingeschleust. Gleichzeitig wird auch Glycerin durch das Porin GlpF aufgenommen (Heller *et al.*, 1980), was sich leicht verstärkend auf die Expression von *dcuB* und *frdABCD* auswirkt (Zientz *et al.*, 1998).



**Abb. 4.4: Vereinfachte schematische Darstellung der anaeroben Verstoffwechslung von Fumarat und Glycerin.** P: Periplasma, C: Cytoplasma, Suc: Succinat, Fum: Fumarat, PYR: Pyruvat, AcCoa: Acetyl-CoA, Ci: Citrat, IC: Isocitrat, αKG: α-Ketoglutarat, EtOH: Ethanol, Lys: Lysin, βLys: β-Lysin, Ppc: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Mdh: Malatdehydrogenase, FumB: Fumarat-Hydratase, PykAF: Pyruvatkinase, PflB: Formiatacetyltransferase, AdhE: Aldehydalkohol-Dehydrogenase. Umrahmt sind wichtige Substanzen, die bei diesem Stoffwechsel entstehen. Asterisk: Reaktion läuft über membranständiges Enzym ab.

Es erfolgt die Umwandlung in Gly3P, welches durch die Glycerinkinase GlpK vermittelt wird (vgl. Abb. 4.4). Gly3P kann direkt als Elektronendonator für die Reduktion von Fumarat (Fum) zu Succinat (Suc) durch die FR verwendet werden. Dafür wird Gly3P zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgesetzt, was durch die Dehydrogenase GlpABC katalysiert wird. Die Expression dieses Enzymkomplexes wird durch die Anwesenheit von Fumarat außerdem erhöht (Zhu *et al.*, 2002). Succinat verlässt die Zelle wieder durch den Antiporter DcuB. Das aus Gly3P entstandene DHAP kann nun weiter durch Prozesse der Glykolyse in PEP und über Oxalacetat (OA) und Malat zu Fumarat umgewandelt werden. PEP wird außerdem über Pyruvat (PYR) zu Formiat und Acetyl-CoA umgewandelt. Es ist unklar, in welchem Ausmaß hierbei Formiat als  $e^-$ -Donor für die Fumaratreduktion genutzt wird. Da die Expression von GlpABC hochreguliert ist und Formiat im Vergleich zu Gly3P als „schwacher“  $e^-$ -Donor bezeichnet wird (Unden & Kleefeld, 2004), kann von einer bevorzugten Nutzung von Gly3P ausgegangen werden. Murarka *et al.* (2008) konnten zeigen, dass bei der anaeroben Verstoffwechslung von Glycerin vor allem Ethanol entsteht, welches ausgehend von Acetyl-CoA gebildet wird. Acetyl-CoA wird von der heterologen  $\beta$ LAT YodP genutzt, welches das aus dem Substrat Lysin gebildete  $\beta$ -Lysin zu NA $\beta$ L umwandelt. Die mögliche Umsetzung von Acetyl-CoA mittels der Enzyme des Citratzyklus ist gering, da im anaeroben die Expression dieser Enzyme herunterreguliert ist (Iuchi & Lin, 1995). Die Energiegewinnung ist bei der Nutzung von Fumarat und Glycerin wahrscheinlich etwas geringer als die bei dem Gebrauch von Fumarat und Glucose. Die Kombination Fumarat und Glycerin liefert dabei etwas weniger als 1,5 Netto-ATP ( $< 0,5$  ATP Fumarat-Reduktion und 1 Netto-ATP aus Glycerin  $\rightarrow$  EtOH; Unden & Kleefeld, 2004; Murarka *et al.*, 2008), während die Kombination aus Fumarat und Glucose netto etwas weniger als 2,5 ATP liefert (Unden & Kleefeld, 2004). Dennoch scheint der parallele Einsatz der Substrate Glycerin und Fumarat das Gesamtsystem positiv zu beeinflussen, da die Anwesenheit dieser beiden Substanzen jeweils die Expression der gegenseitigen Stoffwechsellzyme fördert (vgl. Abb. 4.4). Glycerin wird außerdem langsamer als Glucose verbraucht (Holms, 1996; Martínez-Gómez *et al.*, 2012), was sich positiv auf die Zellprozesse und auch die Produktion der heterologen Enzyme AbIA und YodP auswirken kann. Die anaerobe Verstoffwechslung von Glycerin geht darüber hinaus, im Gegensatz zur Vergärung von Glucose, nicht mit der Bildung von Acetat einher (Murarka *et al.*, 2008), sodass zumindest diesbezüglich mehr Acetyl-CoA für die Reaktion der  $\beta$ LAT YodP zur Bildung von NA $\beta$ L zur Verfügung steht. Insgesamt lässt sich sagen, dass GGF-Medium für die Produktion von NA $\beta$ L und auch die semi-anaerobe Anzucht ausgewogener ist.

**Semi-anaerobe Fermentation.** Die in GGF-Medium durchgeführte Fermentation unterstützt die oben dargelegte Theorie der Verstoffwechslung von Fumarat und Glycerin im Zuge der



NA $\beta$ L-Produktion von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-abIA (vgl. Abb. 3.22). Zunächst wird in Phase W<sub>1</sub> unter aeroben Bedingungen Glucose verbraucht. Damit wird die benötigte Zellmasse bis zur Induktion aufgebaut. Fumarat und Glycerin liegen bis dahin in den zugegebenen Mengen im Medium vor, wobei kleine Mengen Fumarat aufgenommen werden konnten (Hermsen *et al.*, 2015). Es ist wichtig anzumerken, dass die hier gezeigten Werte Einzelmessungen darstellen, also vor allem richtungsweisenden Charakter besitzen. Nach dem Start der anaeroben Kultivierungsbedingungen beschleunigte sich der Glucose-Verbrauch, gepaart mit einem Anstieg der EtOH-Konzentration. Nach kurzer Zeit stellen sich anaerobe Verhältnisse ein und Glucose wurde entweder allein oder in Kombination mit Fumarat verbraucht (Abb. 3.22, 3hpl). Der Fumarat-Gehalt sinkt ab diesem Zeitpunkt schneller, ab ca. 15 h kann man von einem Wechsel der C-Quelle von Glucose auf Glycerin ausgehen. Nachdem der Ethanol-Gehalt kurzzeitig sinkt, kann der erneute Anstieg auf die metabolische Umstellung auf Fumarat und Glycerin zurückzuführen sein. Diese zweite Zunahme ist sehr viel geringer als der erste Anstieg durch Glucose (von ca. 70 mM auf ca. 90 mM).

Die hier maximal produzierten NA $\beta$ L-Mengen sind vergleichbar mit den erreichten Werten aus Schüttelkulturen (ca. 24 mg/g TG, vgl. Abb. 3.23 und Tab. 3.8). Dabei ist vor allem eine steigende Menge NA $\beta$ L im Kulturüberstand zu beobachten. Ein Teil dieses extrazellulären Gehalts kann möglicherweise durch lysierte Zellen erklärt werden. Grundsätzlich ist jedoch der Efflux von NA $\beta$ L durch ein Exporterprotein denkbar, wofür sich in *E. coli* der Lysin-Exporter LysO anbieten würde. In der Regel ist die Aktivität von membranständigen Exportern in Bakterien an die intrazelluläre Konzentration der zu transportierenden Substanzen gekoppelt (Pathania & Sardesai, 2015). So ist bspw. eine Lysin-Exkretion durch den LysO-homologen Exporter LysE in *C. glutamicum* erst oberhalb von ca. 20 mM intrazellulärem Lysin zu verzeichnen (Erdmann *et al.*, 1993). Derartige intrazelluläre NA $\beta$ L-Konzentrationen wurden in den hier durchgeführten Experimenten zwar mehrfach erreicht, eine stringente Sekretion des kompatiblen Soluts kann allerdings nicht beobachtet werden (vgl. Tab. 3.7, 3.8, 3.9 und Abb. 3.22). Neben einer hohen intrazellulären NA $\beta$ L-Konzentration muss also von einem weiteren, zu diesem Zeitpunkt unbekanntem Mechanismus ausgegangen werden.

Die Anzucht des Expressionsstamms *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-abIA in GGF-Medium erwies sich als die effizienteste Methode, heterolog NA $\beta$ L zu produzieren. Dabei kann Glucose zunächst zum Biomasseaufbau genutzt werden, woran sich ein anaerobes Wachstum auf Glycerin und Fumarat und die Expression der heterologen Gene zur NA $\beta$ L-Produktion anschließt. Eine Verbesserung könnte die Verminderung des Glucose-Gehalts von anfänglich 10 mM auf 5 mM sein. Diese Menge reicht aus, um die zur Induktion gewünschte Zelldichte schnell aufzubauen und gleichzeitig zu einem zügigeren Wechsel der C-Quelle führen, die wie

bereits erläutert positive Auswirkungen auf das gesamte Expressionssystem hat. Eine Überexpression des Lysin-Exporters LysO könnte möglicherweise Aufschluss darüber geben, ob eine NA $\beta$ L-Sekretion an dieses Protein gekoppelt ist.

#### 4.2.3.3 Vergleich der Produktion in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Die höchsten NA $\beta$ L-Erträge konnten in *E. coli* mit dem Expressionsvektor pASK\_yodP-ablA erzielt werden (bis zu 50 mg/g TG, vgl. Tab. 3.8, Tab. 3.9, Abb. 3.23). Um zu untersuchen, ob ein Wechsel des Expressionssystems diese Erträge noch weiter erhöht, wurden vier weitere *E. coli*-Stämme mit dem Vektor transformiert. Zum Vergleich der Proteinproduktion wurden die insgesamt fünf Stämme in Fed-Batch-Medium kultiviert; dabei handelt es sich um GGF-Medium, welches außerdem Ammoniumeisen(III)-Citrat (AmFeCi) enthält und dem zum Zeitpunkt der Induktion außerdem L-Cystein zugesetzt wird (vgl. Tab. 2.8). Das in AmFeCi enthaltene Eisen, sowie der zusätzliche Schwefel durch L-Cystein wirken sich positiv auf die Produktion von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Clustern, wie der LAM, aus (Kuchenreuther *et al.*, 2010). Davon sollte vor allem *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR profitieren, da in diesem Stamm der Repressor IscR des dazugehörigen *iscR*-Operons deletiert ist, welches für die Produktion von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen verantwortlich ist (Akhtar & Jones, 2008).

Die am häufigsten genutzten *E. coli*-Stämme entspringen der K12- oder B-Linie (Daegelen *et al.*, 2009). Der in dieser Arbeit hauptsächlich genutzte Stamm DH5 $\alpha$  ist ursprünglich ein K-Stamm und wird i.d.R. als Klonierungsstamm verwendet, da seine Mutationen (*recA1*, *endA1*, *lacZ* $\Delta$ M15) vor allem zu einer erhöhten Plasmid- und Genomstabilität beitragen (Hanahan, 1983). Außerdem ist der Metabolismus, bzw. das Zellwachstum durch weitere Mutationen, wie z.B. eine Thiamin-Auxotrophie oder eine Mutation in der Adenylosuccinat-Lyase PurB eingeschränkt (Casali, 2003; Jung *et al.*, 2010). Viele Derivate der B-Linie hingegen werden vor allem als (Protein-)Produktionsstämme genutzt, da sie in Minimalmedium schneller als K-Stämme wachsen und ihnen häufig Proteasen (Lon, OmpT) fehlen, die heterologe Proteine abbauen (Phue *et al.*, 2005; Rosano & Ceccarelli, 2014).

***E. coli* BL21 / BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR.** Diese beiden Stämme entstammen der B-Linie und sind häufig genutzte Derivate für die Überproduktion von heterologen Proteinen (Baneyx, 1999). *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR besitzt das Gen für die T7-Polymerase ( $\lambda$ DE3 Lysogen); dieses wurde jedoch aufgrund der Nutzung eines pASK-Expressionsvektors nicht weiter berücksichtigt. Beide B-Stämme konnten in den durchgeführten Experimenten bzgl. der Protein- oder NA $\beta$ L-Produktion nicht überzeugen: trotz der Nutzung des vor allem für BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR ausgelegten Fed-Batch-Mediums blieb eine hohe Proteinproduktion aus. Lediglich in GGF-

Medium wurden in *E. coli* BL21 pASK\_yodP-ablA leicht erhöhte NA $\beta$ L-Erträge nachgewiesen, die jene von *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_kamA-yodP-fwd übertreffen (vgl. Abb. 3.24, 3.26 und Tab. 3.9). Die Stämme wiesen jedoch bei Anzucht in Fed-Batch-Medium im direkten Vergleich die höchsten Wachstumsraten auf ( $0,55 \mu \text{ h}^{-1}$ , vgl. Tab. 6.2 im Anhang). Bei diesem schnellen Kulturwachstum reicht eine Unterstützung der Eisen-Schwefelcluster-Bildung durch Substratzugabe (AmFeCi, L-Cystein) nicht aus und muss zusätzlich durch einen erhöhten Vorrat an seltenen tRNAs ergänzt werden, um eine hohe Produktion der methanogenen LAM zu erreichen. Dass dies positive Auswirkungen auf die Proteinmenge hat, konnte bereits mit dem B-Derivat *E. coli* Rosetta™ (DE3) gezeigt werden (vgl. Abb. 3.16). Für B-Stämme konnte außerdem eine erhöhte Aktivität des Glyoxylat-Zyklus unter aeroben Bedingungen gezeigt werden (Phue *et al.*, 2005). Dieser Zyklus kann auch unter Ausschuss von Sauerstoff ablaufen (Burow *et al.*, 2008); inwiefern die Aktivität in B-Stämmen dann erhöht ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Ein gesteigerter Umsatz von Acetyl-CoA durch diesen Pfad wirkt sich negativ auf die Acetylierung von  $\beta$ -Lysin und somit auf die NA $\beta$ L-Produktion aus, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abb. 3.25 und 3.26).

***E. coli* BKA-13.** Dieser Stamm geht ursprünglich auf *E. coli* K12 zurück und wurde bereits von Haardt *et al.* (1995) so modifiziert, dass die Transportsysteme ProP und ProU deletiert sind (Stamm MKH13,  $\Delta(\text{proP})2 \Delta(\text{proU})608$  [Spc<sup>r</sup>]). Somit ist diese Linie nicht mehr in der Lage, Prolin-/Glycin-Betain aus der Umgebung aufzunehmen. Weitere Modifikationen wurden von Burdziak (2006) vorgenommen, sodass auch die *de novo*-Synthese von Trehalose nicht mehr funktionell ist ( $\Delta\text{otsB}$ ). Bei der Kultivierung in Fed-Batch-Medium wies *E. coli* BKA-13 vor der Induktion eine minimal erhöhte Wachstumsrate gegenüber *E. coli* DH5 $\alpha$  auf (vgl. Tab. 6.2 im Anhang), in den Kulturen konnten jedoch zum Zeitpunkt der Ernte die geringsten Biomassen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). *E. coli* BKA-13 zeigt ein signifikant verringertes Zellwachstum unter osmotischem Stress und weist aufgrund der oben genannten Deletionen eine erniedrigte Salztoleranz auf (Wachstum nur bis ca. 3,8 % NaCl w/v, Burdziak 2006). Eine deutlich positive Auswirkung der genetischen Modifikationen auf die Protein- oder NA $\beta$ L-Produktion konnte nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 3.24, 3.25 und 3.26). Daraus lässt sich schließen, dass die Trehalose-Produktion keinen bedeutenden Einfluss auf die NA $\beta$ L-Synthese hat. Die Bildung von Trehalose erfolgt durch die Kondensation von UDP-Glucose und Glucose-6-Phosphat zu Trehalose-6-Phosphat. Dem schließt sich eine Dephosphorylierung zu Trehalose an (Kaasen *et al.*, 1992). Eine direkte Überschneidung der Synthesewege zu NA $\beta$ L, wie bspw. eine Konkurrenz um Acetyl-CoA, besteht demnach nicht. Die Einbußen bei Wachstum unter Salzstress, die sich für *E. coli* BKA-13 ergeben, übertreffen die möglichen Vorteile bei der NA $\beta$ L-Synthese durch den Ausfall der Trehalose-Produktion.

*E. coli*-Stämme die der B-Linie entstammen, werden vor allem häufig für die Protein-Überproduktion eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit stand jedoch die Produktion des kompatiblen Soluts NA $\beta$ L im Fokus. Wie bereits dargelegt werden konnte (vgl. 4.2.3.2), ist für eine effiziente NA $\beta$ L-Produktion ein balanciertes Expressionssystem und das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie z.B. Zellwachstum und Substratverwertung ausschlaggebend. Dies wird durch die Kultivierung von *E. coli* Rosetta™ (DE3) pASK\_kamA\_CpRBS verdeutlicht, nach der hohe Mengen an heterologen Proteinen, jedoch nur wenig  $\beta$ -Lysin detektiert werden konnten (vgl. Abb. 3.16 und Tab. 3.6). Sieben *et al.* (2016) konnten zeigen, dass die Stabilität eines Plasmid-basierten Expressionssystems vor allem durch den genutzten Selektionsdruck vermittelt wird. Ein möglicher Verlust von Expressionsvektoren hängt dabei von der Effektivität und der Stabilität des Selektionsdrucks (wie hier z.B. durch Zugabe eines Antibiotikums) und der Stoffwechselbelastung durch heterologe Gene ab (Sieben *et al.*, 2016). In den letzten Jahren wurden Untersuchungen durchgeführt, die verdeutlichen, dass die Synthese eines heterologen Produkts maßgeblich von der Vektorstabilität abhängt.

In den hier durchgeführten Versuchen mit *E. coli*-Stämmen wird der Selektionsdruck durch die Zugabe von Carbenicillin vermittelt. Die genutzten Vektoren vermitteln eine Resistenz gegenüber diesem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum durch eine  $\beta$ -Lactamase (BLA). Die produzierte BLA wird dabei ins Medium sekretiert, wo sie Carbenicillin-Moleküle durch Spaltung inaktiviert. Dabei wird nicht nur Plasmid-tragenden Zellen ein Wachstum ermöglicht, sondern der allgemeine Selektionsdruck gesenkt. So können auch Zellen wachsen, die nicht (mehr) über das Plasmid verfügen (Yurtsev *et al.*, 2013). Darüber hinaus sinkt für die Zellen der Bedarf am Erhalt des Plasmids, welches durch heterologe Gene eine Belastung des Stoffwechsels darstellt. Die Wahrscheinlichkeit für einen Plasmid-Verlust ist demnach erhöht. In Folge dessen ist es möglich, dass zwei Populationen in einer Kultur entstehen (Plasmid-tragende und Plasmid-freie Zellen), wobei Plasmid-freie Zellen schneller wachsen als Plasmid-tragende Zellen (Bentley & Kompala, 1990). Dieses Risiko ist bei vielen B-Stämmen erhöht, da diese zum einen über das Porenprotein OmpF verfügen und große Mengen von BLA sekretieren können und zum anderen schnell wachsen. Die korrekte Aufteilung von Plasmiden auf entstehende Tochterzellen ist bei hohen Wachstumsraten beeinträchtigt (Mairhofer *et al.*, 2013; Sieben *et al.*, 2016). Ein kompletter Verlust heterologer Plasmide konnte bereits in BL21-Stämmen, nicht jedoch in K-Stämmen beobachtet werden (Marisch *et al.*, 2013; Sieben *et al.*, 2016). Der hier beschriebene Sachverhalt wurde von Bethlehem (2019) im Zuge der heterologen Produktion von Ectoin in *E. coli* erneut beobachtet. Eine Zugabe von Clavulansäure als BLA-Hemmer konnte diesen Effekten entgegenwirken und die Ectoin-

Produktion signifikant um etwa 350 % erhöhen, sowie die Menge an Plasmid-freien Zellen verringern (Bethlehem, 2019).

Die oben dargelegten Punkte erklären, warum *E. coli* DH5 $\alpha$  der im Vergleich mit den anderen genutzten Stämmen effizienteste Produktionsstamm für NA $\beta$ L ist. In diesem Stamm ist durch genetische Modifikation die Plasmidstabilität erhöht, was in *E. coli* MG1655 (ebenfalls K-Stamm) nicht der Fall ist. Außerdem verhindern die niedrigen Wachstumsraten durch Mutationen in der Adenylosuccinat-Lyase PurB ein Ungleichgewicht der Population in Bezug auf die Plasmidverteilung in den Zellen. Auch bei der Synthese von Ectoin durch heterologe Proteine in *E. coli* erwies sich der Stamm DH5 $\alpha$ , bzw. ein K-Stamm als optimales Expressionssystem (Bethlehem, 2019; Moritz, 2018). Eine weitere Optimierung der NA $\beta$ L-Produktion mit *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-abIA kann durch die Zugabe eines BLA-Hemmers wie Clavulansäure getestet werden. Ein alternatives Selektionsdruck-System würde sich außerdem anbieten.

#### 4.2.4 Vergleich mit der Literatur

Im Folgenden wurden die in der vorliegenden Arbeit genutzten Expressionsstämme anhand ihrer Produktionsdaten für NA $\beta$ L mit ausgewählten Werten aus der Literatur verglichen (vgl. Tab. 4.2). Dabei ist anzumerken, dass die hier entwickelten Stämme bis zum jetzigen Zeitpunkt die ersten heterologen Produktionsstämme von NA $\beta$ L darstellen - ein Vergleich ist dementsprechend nur mit Daten aus homologer Produktion möglich. Aufgrund des sehr niedrigen NA $\beta$ L-Gehalts wurden *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR und *E. coli* BKA-13 in der nachfolgenden Tabelle ausgelassen (vgl. Abb. 3.25 und 3.26).

*H. elongata* repräsentiert zum jetzigen Zeitpunkt den ersten Organismus, mit dem eine heterologe Synthese von NA $\beta$ L bei aerober Anzucht möglich ist. Dafür wurden für beide benötigten Enzyme die Gene aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> genutzt (pPE\_kamA\_specRBS\_yodP, vgl. Abb. 3.11). Die in dieser Arbeit mit der Ectoin-Deletionsmutante *H. elongata* WUB02 erzielten Werte machen jedoch nur ca. 7 % des Gehaltes aus, der bei homologer Überproduktion in *B. subtilis* möglich ist (vgl. Tab. 4.2, Müller *et al.*, 2011). Es ist nicht abschließend zu klären, ob die geringe Produktion stoffwechselbedingt ist (vgl. 4.2.2), oder die Aktivität der Enzyme herabgesetzt ist. KamA<sub>BS</sub> und YodP besitzen eine sehr geringe Acidität (ca. 1,5 % bzw. ca. 2,2 %) und sind somit nicht als halophile Proteine einzustufen. Sie stammen jedoch aus einem grampositiven Bakterium, welches einen erhöhten Turgordruck (~ 20 bar) aufweist (Whatmore & Reed, 1990) und an welchen sich die Proteine angepasst haben. In *H. elongata* könnte dieser fehlende hohe Turgordruck durch einen erhöhten osmotischen Druck bei 6 - 10 % NaCl (w/v)

ausgeglichen werden und sich positiv auf die Proteinaktivität auswirken. *H. elongata* bietet sich demnach grundsätzlich als Expressionsorganismus an; zur effektiveren NA $\beta$ L-Produktion sollte jedoch das Plasmid-basierte Expressionssystem optimiert werden, wie z.B. durch die Nutzung eines alternativer Selektionsdrucks zur Minimierung des Acetyl-CoA-Verbrauchs (vgl. 4.2.2). In *E. coli* konnte die heterologe Produktion von NA $\beta$ L unter semi-anaeroben Anzuchtbedingungen nachgewiesen werden. Der effizienteste Produzent *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_yodP-ablA greift für die Synthese auf das Gen der LAM aus *Ms. mazei* Gö1 (*ablA*) in Kombination mit *yodP* ( $\beta$ LAT) aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> zurück (vgl. Abb. 3.19). Die mit diesem System produzierten NA $\beta$ L-Mengen können mit denen der natürlichen Produzenten *B. subtilis* 168 BGSC 1A1 (Müller *et al.* 2011), *Prosthecochloris vibrioformis* UdG7007LpA und *B. cereus* CECT 148<sup>T</sup> (Triadó-Margarit *et al.* 2011) verglichen werden (vgl. Tab. 4.2). Zusätzlich konnte bei diesem Stamm auch NA $\beta$ L im Medium detektiert werden, wobei Mengen zwischen 21,8 - 31,2 mg/L erreicht wurden (vgl. Tab. 3.8 und Abb. 3.23, 3.25, 3.26). Der höchste erreichte Gesamttiter (kombinierter intrazellulärer und extrazellulärer Gehalt) an NA $\beta$ L betrug 39,1 mg/L Kultur (vgl. 3.4.2.3).

**Tab. 4.2: Vergleich der NAßL-Produktion in verschiedenen Organismen.** MM: Minimalmedium, VM: Vollmedium (z.B. LB oder TB), n.a.: nicht angegeben.

| Expressionsorganismus                        | Vektor/Ursprung       | Produktion  | NaCl [%] | NAßL<br>[mmol/g Protein] | NAßL<br>[mg/g TG] | Referenz                           |
|--|-----------------------|-------------|----------|--------------------------|-------------------|------------------------------------|
| <i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup>     | pPE_kamA_specRBS_yodP | Aerob, MM   | 6        | ~ 0,02 <sup>1</sup>      | 1,4               | Diese Arbeit                       |
|  |                       |             | 10       | ~ 0,01 <sup>1</sup>      | 0,8               | s.o.                               |
| <i>H. elongata</i> WUB02                     | pPE_kamA_specRBS_yodP | Aerob, MM   | 4        | ~ 0,02 <sup>1</sup>      | 1,6               | s.o.                               |
| <i>E. coli</i> DH5α                          | pASK_kamA_yodP-fwd    | Anaerob, MM | 3        | ~ 0,08 <sup>1</sup>      | 7,1               | s.o.                               |
| <i>E. coli</i> DH5α                          | pASK_yodP-abIA        | Anaerob, MM | 3        | ~ 0,53 <sup>1,2</sup>    | 50,8 <sup>2</sup> | s.o.                               |
| <i>E. coli</i> MG1655                        | pASK_yodP-abIA        | Anaerob, MM | 3        | ~ 0,02 <sup>1</sup>      | 2,2               | s.o.                               |
| <i>E. coli</i> BL21                          | pASK_yodP-abIA        | Anaerob, MM | 3        | ~0,08 <sup>1</sup>       | 7,9               | s.o.                               |
| <i>E. coli</i> DH5α                          | pASK_Dmc_RBS_abIAB    | Anaerob, MM | 3        | ~0,1 <sup>1</sup>        | 10,7              | s.o.                               |
| <sup>3</sup> <i>B. subtilis</i> 168 BGSC 1A1 | <i>homolog</i>        | Aerob, VM   | 0        | 0,28                     | n.a.              | Müller <i>et al.</i> 2011          |
| <i>P. vibrioformis</i> UdG7007LpA            | <i>homolog</i>        | Anaerob, MM | 3        | 0,55 - 0,61              | n.a.              | Triadó-Margarit <i>et al.</i> 2011 |
|  |                       |             | 5        | 1,95 - 2,11              | n.a.              |                                    |
| <i>C. parvum</i> UdG6501Lms                  | <i>homolog</i>        | Anaerob, MM | 3        | 0,07 - 0,1               | n.a.              | Triadó-Margarit <i>et al.</i> 2011 |
|  |                       |             | 5        | 0,33 - 0,48              | n.a.              |                                    |
| <i>B. cereus</i> CECT 148 <sup>T</sup>       | <i>homolog</i>        | Aerob, VM   | 1        | 0,3                      | n.a.              | Triadó-Margarit <i>et al.</i> 2011 |
|  |                       |             | 5        | 1,67                     | n.a.              |                                    |
| <i>Methanococcus maripaludis</i> JJ          | <i>homolog</i>        | Anaerob, MM | 2,2      | 0,14                     | n.a.              | Pflüger <i>et al.</i> 2003         |
|  |                       |             | 4,7      | 0,7                      | n.a.              |                                    |
| <i>Ms. mazei</i> Gö1                         | <i>homolog</i>        | Anaerob, MM | 2,3      | 0,14                     | n.a.              | Pflüger <i>et al.</i> 2003         |
|  |                       |             | 4,7      | 0,8                      | n.a.              |                                    |
| <i>Methanogenium cariaci</i> DSM 1497        | <i>homolog</i>        | Anaerob, MM | 2,9      | 0,86                     | n.a.              | Sowers <i>et al.</i> 1990          |
| <i>Ms. thermophila</i> DSM 1825              | <i>homolog</i>        | Anaerob, MM | 2,9      | 0,094                    | n.a.              |                                    |

<sup>1</sup> Anhand des Trockengewichts (TG) ermittelt und in mmol/g Protein unter der Annahme umgerechnet, dass ca. 50 % Protein im TG vorliegen (Stouthamer, 1973)

<sup>2</sup> Höchster erreichter Wert; durchschnittlicher Wert ca. 0,25 mmol/g Protein, bzw. ca. 24 mg/g TG

<sup>3</sup> Hierbei handelt es sich genetisch um *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>

### 4.3 *D. mccartyi* CBDB1 besitzt ein bifunktionelles Syntheseprotein für NAßL

NAßL wurde bisher nur in methanogenen Archaeen und wenigen Bakterien nachgewiesen, während Hinweise auf mögliche Synthesegene für dieses Solut in weitaus mehr Organismen zu finden sind (vgl. 1.3, (Behshad *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2011; Pflüger *et al.*, 2003; Triadó-Margarit *et al.*, 2011)). Dabei handelt es in nahezu allen Fällen um die zwei für die Produktion von NAßL benötigten Gene einer L-Lysin 2,3-Aminomutase und einer  $\beta$ -Lysin N<sub>6</sub>-Acetyltransferase (vgl. 1.3). Eine Ausnahme dazu bildet das Gen *abIA* (NCBI Zugangsnr. WP\_034376805.1) aus dem anaeroben Bakterium *D. mccartyi* CBDB1, welches sowohl Motive einer Aminomutase als auch einer Acetyltransferase aufweist (vgl. 3.6). Aufgrund dieses Sachverhalts wurde das Gen in Anlehnung an die einzelnen Synthesegene aus *Ms. mazei* Gö1 in der vorliegenden Arbeit als *ablAB* bezeichnet.

Um die bioinformatischen Untersuchungen experimentell zu belegen und die mögliche Bifunktionalität zu bestätigen, wurde *ablAB* in einen Expressionsvektor eingebracht und so im Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  heterolog exprimiert. Nach der Kultivierung von Expressionskulturen in Minimalmedium konnte durch Analysen des Gesamtzellproteins das Protein AblAB in der unlöslichen Proteinfraction mit einer deutlichen Bande in der SDS-PAGE nachgewiesen werden (vgl. 3.6.2 und Abb. 3.29). Des Weiteren wurde Zellmaterial, sowie Medienüberstand aus Expressionskulturen des Stammes *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_Dmc\_RBS\_ablAB mithilfe einer isokratischen HPLC, bzw. einer FMOC-ADAM-HPLC untersucht. Dabei konnte die Produktion des kompatiblen Soluts NAßL belegt werden, welches in einer Konzentration von ca. 4 - 11 mg/g TG intrazellulär vorlag und extrazellulär (im Anzuchtmedium) Mengen von ca. 2 mg/L erreichte (vgl. 3.6.2). Zur weiteren Bestätigung wurden Proben des Zellmaterials außerdem einer NMR-Analyse unterzogen, die das heterologe Expressionsprodukt NAßL eindeutig identifizierten (vgl. Abb. 3.32). Somit konnte in dieser Arbeit die Bifunktionalität des Enzyms AblAB durch heterologe Expressionsversuche in *E. coli* DH5 $\alpha$  eindeutig bestätigt werden (vgl. 3.6).

Das Bakterium *D. mccartyi* CBDB1 wurde erstmals aus anoxischen Sediment der Saale isoliert und betreibt wie andere Vertreter seiner Art Energiekonservierung durch die reduktive Dehalogenierung von chlorierten aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, wobei H<sub>2</sub> als Elektronendonator genutzt wird (Adrian *et al.*, 2000; Bunge *et al.*, 2003; Hartwig *et al.*, 2017; Kube *et al.*, 2005; Löffler *et al.*, 2013). Es besitzt verschiedene Homologe einer dafür notwendigen reduktiven Dehalogenase, deren Transkription teilweise durch die Anwesenheit bestimmter Substrate, wie z.B. 2,3-Dichlordibenzo-*p*-Dioxin, induziert wird (Wagner *et al.*,



2013). In letzter Vergangenheit wurde *D. mccartyi* CBDB1 in der Industrieregion Bitterfeld-Wolfen nachgewiesen (Nijenhuis *et al.*, 2018). Die dortige Landschaft leidet aufgrund der seit vielen Jahrzehnten ansässigen chemischen Industrie an einer massiven Boden- und Grundwasserkontamination mit Chlorkohlenwasserstoffen, die teilweise unkontrolliert freigesetzt wurden (Gossel *et al.*, 2009; Nijenhuis *et al.*, 2018). Neben Gattungen wie *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium* und weiteren nicht näher definierten Spezies wurde *D. mccartyi* CBDB1 als dort ansässiger Organismus identifiziert, der eine große Rolle bei der natürlichen Bioremediation der Umgebung spielt (Nijenhuis *et al.*, 2018).

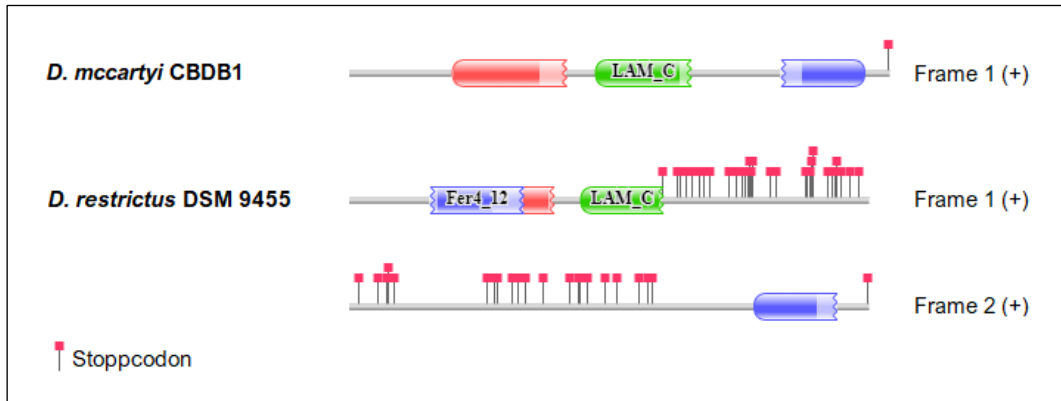
Bisher gibt es keine Hinweise darauf, warum *D. mccartyi* CBDB1 (und nahe Verwandte, vgl. 3.6, auch Abb. 3.27) über ein Synthesegen für NAßL verfügt. Empadinhas *et al.* (2004) schlagen bzgl. des bifunktionellen Mannosylglycerat-Synthesegens in *D. mccartyi* 195<sup>T</sup> den horizontalen Gentransfer (ausgehend von thermophilen Organismen) als Ursache vor. Sie begründen außerdem den Zusammenschluss der Einzelproteine zu einem bifunktionellen Protein mit einer erhöhten Stabilität des Enzyms (Beaucamp *et al.*, 2008; Empadinhas *et al.*, 2004).

Es ist nicht bekannt, wofür *D. mccartyi* das Solut nutzt. Proteomanalysen der Arbeitsgruppe Lechner aus Halle (Saale) konnten zeigen, dass AblAB in *D. mccartyi* CBDB1 unter regulären Anzuchtbedingungen mit 1,2,3-Trichlorbenzol (1,2,3-TCB) als Elektronenakzeptor sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase produziert wird (durchschn. 2,7-fach höhere Abundanz als Medianabundanz, im Vergleich dazu GroEL: ca. 7,7-fach höhere Abundanz als Medianabundanz). Bei der Untersuchung sogenannter „Hungerkulturen“ ohne Elektronenakzeptor konnte kein AblAB nachgewiesen werden (Persönliche Kommunikation F. Greiner-Haas, 2018). In weiterführenden Transkriptomanalysen von *D. mccartyi* CBDB1 stellte sich heraus, dass *ablAB* bei der Kultivierung mit 1,2,4-TCB als Elektronenakzeptor ca. 3,6 mal öfter transkribiert wird, als bei der Kultivierung mit 1,2,3-TCB (Persönliche Kommunikation F. Greiner-Haas, 2018). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Produktion von AblAB durch den Stoffwechsel der reduktiven Dehalogenierung induziert wird. Inwiefern das Produkt NAßL dabei eine Rolle spielen könnte, ist bisher unklar. Sollte die Produktion des Solut tatsächlich in direktem Zusammenhang mit der Reduktion von Chlorkohlenwasserstoffen stehen, könnte es möglicherweise in dazugehörigen Redoxreaktionen genutzt werden.

Eine wahrscheinlichere Erklärung steht im Zusammenhang mit dem Schutz gegenüber den extremen und schädlichen Umwelteinflüssen im natürlichen Habitat von *D. mccartyi* CBDB1. Bei den Untersuchungen von Nijenhuis *et al.* (2018) wurde *D. mccartyi* CBDB1 auch an Standorten nahe Bitterfeld-Wolfen gefunden, die hohe Konzentrationen an Benzolen und

allgemein BTEX (Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol) aufweisen (Cichocka *et al.*, 2010; Heidrich *et al.*, 2004; Nijenhuis *et al.*, 2007). Diese hydrophoben, nicht-halogenierten Kohlenwasserstoffe sind höchst toxisch. Deren Verstoffwechslung, wie z.B. von Benzol, kann zur Bildung von Folgeprodukten wie Phenol führen, die die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) erhöhen (Whysner *et al.*, 2004). Zu ROS gehören u.a. Oxidantien wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder OCl<sup>-</sup>, aber auch freie Radikale, wie z.B. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> oder HO<sup>•</sup>, wobei letztere oftmals zu oxidativem Stress führen. Neben Schutzenzymen, wie z.B. der Superoxid-Dismutase oder der Katalase, existieren mehrere nicht-enzymatische antioxidative Schutzmoleküle als Radikalfänger, darunter das weit verbreitete Glutathion oder die Aminosäure Prolin (Gill & Tuteja, 2010; Halliwell, 2015; Ianas *et al.*, 1991; Orthen *et al.*, 1994; Reiter *et al.*, 2000; Yu, 1994). Vor kurzem wurde außerdem das kompatible Solut Ectoin als geeignetes Antioxidans in Verbindung mit dem Hydroxylradikal bestätigt (Brands *et al.*, 2019). Es ist davon auszugehen, dass das kompatible Solut und Aminosäurederivat NAßL ebenfalls als Radikalfänger genutzt wird. Bioinformatische Analysen des Genoms von *D. mccartyi* CBDB1 ergaben keinerlei Hinweise auf Enzyme wie eine Glutamat-Cystein-Ligase (EC 6.3.2.2) oder eine Glutathion-Synthetase (EC 6.3.2.2), was durch umfassende phylogenetische Untersuchungen bereits validiert wurde (Copley & Dhillon, 2002). Zusätzlich konnten keine Synthesegene der Glutathion-Analoga Mycothiol oder Bacillithiol detektiert werden, die vor allem in Actinobakterien oder Bacilli vorkommen (Fahey, 2013; Newton *et al.*, 2008; Newton *et al.*, 2009; Vanduinen *et al.*, 2015). Als Schutzenzyme besitzt *D. mccartyi* CBDB1 eine Superoxid-Dismutase (CbdbA912, Zugangsnr. CAI83047.1). Die Annahme, dass NAßL einen Schutz gegenüber dieser Art toxischen Umwelteinflüssen vermittelt, wird durch weitere bioinformatische Untersuchungen des anaeroben Bakteriums *Dehalobacter restrictus* gestützt. *D. restrictus* und diesem zugehörige Spezies betreiben reduktive Dehalogenierung von Tetra- und Trichlorethenen und wurden wie *D. mccartyi* CBDB1 von Nijenhuis *et al.* rund um Bitterfeld-Wolfen gefunden (Holliger *et al.*, 1998; Nijenhuis *et al.*, 2018). Neben der Tatsache, dass *D. restrictus* ebenfalls keine Glutathion-Synthesegene besitzt und auch die Produktion von Analoga nicht belegt ist, konnte durch NCBI BLASTp-Analysen jedoch eine putative L-Lysine 2,3-Aminomutase (Dehre\_00265, Zugangsnr. WP\_025204890.1) und eine putative β-Lysine N<sub>6</sub>-Acetyltransferase (Dehre\_00260, Zugangsnr. WP\_025204889.1) gefunden werden. Obwohl sich die dazugehörigen Gene im Genom von *D. restrictus* um 20 Basenpaare überlappen, muss hier im Gegensatz zu AblAB aus *D. mccartyi* CBDB1 von zwei einzelnen Proteinen statt einem bifunktionellen Enzym ausgegangen werden. Analysen der Gesamtsequenz beider überlappender Proteine durch das Pfam-Tool (vgl. 2.3) haben

diesbezüglich zwei verschiedene Leseraster für die Motive der Aminomutase-Funktion, bzw. der Acetyltransferase-Funktion vorausgesagt (vgl. Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Proteinsequenzvergleich aus *D. mccartyi* CBDB1 und *D. restrictus* DSM 9455 durch das Pfam-Tool.** Rot: Domäne der Radical SAM superfamily, grün: Lysine-2,3-aminomutase, blau: Acetyltransferase (GNAT) family, blau (Fer4\_12): 4Fe-4S single cluster domain.

Die Funktion von NAßL als Radikalfänger könnte durch Einsatz des Solutis in Standard-Analysen, wie z.B. im 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)-Assay oder durch Experimente in Anlehnung an Brands *et al.* (2019) weitere Informationen liefern.

## 5 Zusammenfassung

N<sub>ε</sub>-Acetyl-β-Lysin (NAβL) stellt ein Derivat der Aminosäure L-Lysin dar. Es wurde zum ersten Mal in methanogenen Archaeen entdeckt und wird von diesen Organismen, sowie grünen Schwefelbakterien oder auch *Bacillus*-Spezies zum Schutz vor osmotischem Stress synthetisiert. Bisher wurden vor allem die zur Produktion notwendigen Enzyme untersucht - über die Substanz ist außer der osmotischen Wirksamkeit wenig bekannt.

Ein Ziel dieser Arbeit war zunächst, weitere mögliche Eigenschaften von NAβL zu untersuchen. Für viele andere kompatible Solute, wie z.B. Ectoin, Betain oder Trehalose konnte in der Vergangenheit eine protektive Wirkung auf Zell- oder molekularer Ebene nachgewiesen werden. In Anlehnung daran wurde der mögliche Einfluss von NAβL auf molekulare Prozesse untersucht. Dafür erfolgte die Supplementierung der Substanz in PCR-Reaktionen und bei der enzymatischen Spaltung von DNA (Restriktionsverdau). Die Zugabe von NAβL inhibierte die PCR-Reaktion ab einer Konzentration von 500 μM, allerdings kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage zu einem möglichen Mechanismus getroffen werden. Bei der Addition der Substanz zum Restriktionsverdau konnte eine signifikante Verzögerung der Spaltungsreaktion beobachtet werden. Der Zeitpunkt, zu dem die gesamte Plasmid-DNA in linearisierter Form vorlag, verschob sich dabei von fünf (Kontrollreaktion ohne Supplement) auf sechzig Minuten (mit NAβL). Das Solut beeinflusst hier möglicherweise die freie Bindungsenergie des Komplexes aus DNA und Restriktionsenzym durch seinen zwitterionischen Charakter, was zur Verzögerung des Spaltungsprozesses führt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand aus der Entwicklung eines Vektor-basierten heterologen Expressionssystems für die Synthese von NAβL, wofür die Bakterien *Halomonas elongata* und *Escherichia coli* ausgewählt wurden. Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal erfolgreich die heterologe Produktion von sowohl der NAβL-Vorstufe β-Lysin, als auch dem Endprodukt NAβL nachgewiesen werden. Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Kultivierungsmethoden und unterschiedliche Kombinationen aus Ursprungsgenen genutzt:

Die Produktion von β-Lysin in *H. elongata* gelang durch den Gebrauch des Synthesegens *kamA* (L-Lysin 2,3-Aminomutase, LAM) aus *Bacillus subtilis* DSM 10<sup>T</sup>. Nach aerober Kultivierung in Minimalmedium konnte ein β-Lysin-Gehalt von bis zu 0,5 mg/g Trockengewicht (TG; entspricht 2,8 mM intrazelluläres Volumen, IZV) bei 10 % NaCl (*w/v*) in wildtypischen Expressionskulturen nachgewiesen werden. In der Ectoin-defizienten Mutante *H. elongata* WUB02 wurden diese Werte bei 4 % NaCl (*w/v*) leicht übertroffen (0,6 mg/g TG; 3,2 mM IZV).

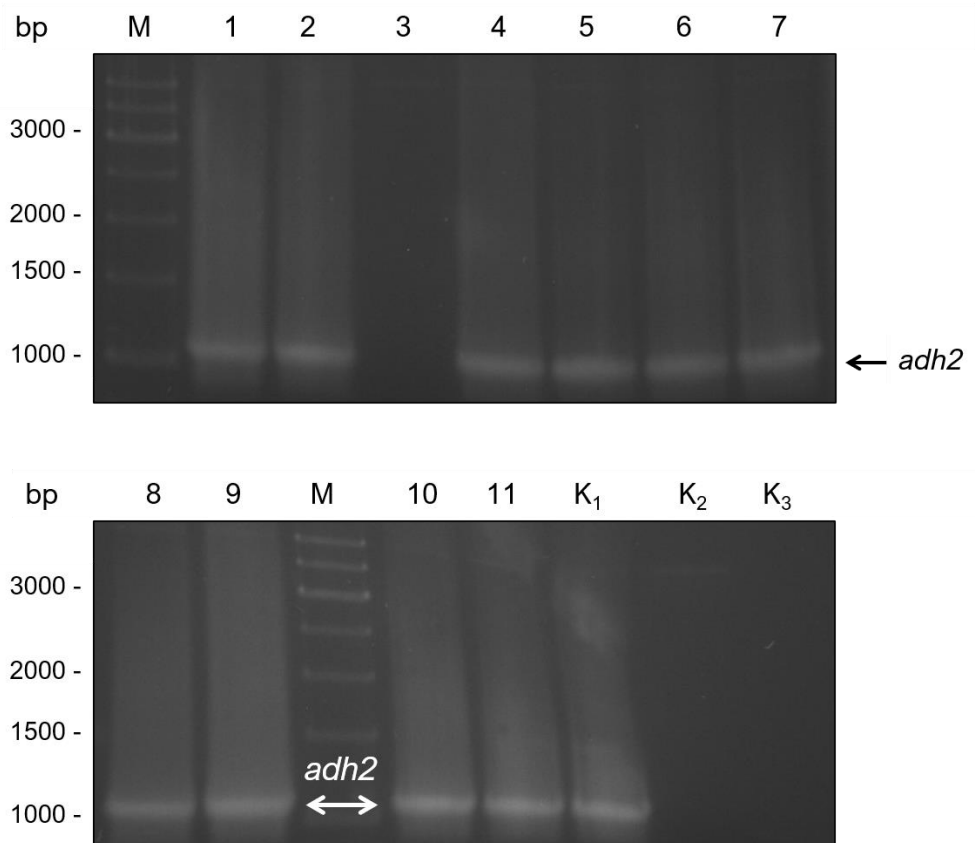
Der zusätzliche Einsatz des Gens *yodP* ( $\beta$ -Lysin  $N_6$ -Acetyltransferase,  $\beta$ LAT) aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> befähigte *H. elongata* zur Produktion von NA $\beta$ L. Bei der aeroben Kultivierung der Expressionskulturen in Minimalmedium konnten bis zu 1,4 mg/g TG (6,5 mM IZV) NA $\beta$ L in Expressionskulturen des Wildtyps bei 6 % NaCl (*w/v*) produziert werden. Expressionsstämme der Ectoin-defizienten Mutante *H. elongata* WUB02 erreichten bei 4 % NaCl (*w/v*) erneut leicht erhöhte Mengen (1,6 mg/g TG; 6,9 mM IZV).

Die Synthese von  $\beta$ -Lysin bzw. NA $\beta$ L in *E. coli* wurde durch eine semi-anaerobe Kultivierung in Minimalmedium realisiert. Dafür erfolgte zunächst die Anzucht geeigneter Expressionsstämme unter aeroben Bedingungen; nach Induktion der Genexpression wurden diese unter Ausschluss von Sauerstoff weiterkultiviert. Dabei dienten Glycerin als C-Quelle und Fumarat als Elektronenakzeptor. Die Produktion von  $\beta$ -Lysin gelang durch den Einsatz verschiedener heterologer LAM, darunter KamA aus sowohl *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup>, als auch aus *Clostridium pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup>. Der  $\beta$ -Lysin-Gehalt im effizientesten Produktionsstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  variierte dabei zwischen 1 mg/g TG (3,5 mM IZV) mit KamA<sub>Bs</sub> und 8,3 mg/g TG (29,9 mM IZV) mit KamA<sub>Cp</sub>.

Die Produktion von NA $\beta$ L konnte durch die Kombination verschiedener heterologer Enzyme erreicht werden; *E. coli* DH5 $\alpha$  stellte sich dabei als effizientester Produktionsstamm heraus. Die Zusammenstellung der LAM KamA aus *C. pasteurianum* DSM 525<sup>T</sup> und der  $\beta$ LAT YodP aus *B. subtilis* DSM 10<sup>T</sup> ermöglichte die Produktion von bis zu 7,1 mg/g TG (19,9 mM IZV) NA $\beta$ L bei semi-anaerober Kultivierung in Minimalmedium. Die Kombination der LAM AblA aus *Methanosarcina mazei* Gö1 und der  $\beta$ LAT YodP konnte diesen Ertrag noch steigern (bis zu ca. 50 mg/g TG, bzw. 142,1 mM IZV und bis zu einem Gesamttiter von 39,1 mg/L Kultur).

Des Weiteren konnte erfolgreich die Bifunktionalität eines NA $\beta$ L-Syntheseproteins aus dem grünen Nichtschwefelbakterium *Dehalococcoides mccartyi* CBDB1 experimentell bestätigt werden. AblAB vereint die Funktionen der LAM und der  $\beta$ LAT und befähigte *E. coli* DH5 $\alpha$  zur Synthese von bis zu 10,7 mg/g TG (29,9 mM IZV) NA $\beta$ L bei semi-anaerober Kultivierung in Minimalmedium mit den Substraten Glycerin und Fumarat.

## 6 Anhang



**Abb. 6.1: PCR von *adh2* aus *Halobacterium sp.* NRC-1 mit verschiedenen Zusätzen.** Als Matrize für *adh2* wurde das Plasmid pWUB\_His\_*adh2* genutzt; das Amplifikat hat eine Größe von 1059 bp. Die Zusätze wurden jeweils in einer Endkonzentration von 0,5 mM dazugegeben. 1: Trehalose, 2: NAαL, 3: NAβL, 4: L-Lysin, 5: NAG, 6: NAGGN, 7: NAβA, 8: Betain, 9: DMSO, 10: Ectoin, 11: OH-Ectoin, K<sub>1</sub>: Kontrolle ohne Supplement, K<sub>2</sub>: Kontrolle ohne Polymerase, K<sub>3</sub>: Kontrolle ohne Plasmid, M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder

## Anhang

|  |   |               |      |
|--|---|---------------|------|
|  |   | <b>synth.</b> |      |
|  | TTGCGGGCCCGTTGCATGATAGTTCGACAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAATGGGAGACCGCGGTCCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCTCGCCCCAGGAGGA      |               | 113  |
|  | <b>RBS</b> <span style="margin-left: 100px;"><b>yodP</b></span>   |               |      |
|  | ATATAAGGAGGTTTAAAATGCTCAAGTCAATAAAGAGTAGCGGTGTCACAGCAGTTTTGGACCATGACGGCTTTAATAAACGAATCAGAGTGGTTCGTTATGACGGAGCCATT     |               | 226  |
|  | M L K S I K S S G V T A V L D H D G F N K R I R V V R Y D G A I   |               |      |
|  | GAGAAGGCCCTGCCGGATATCGTGGCAGCGGCAAAAAGAAGAGAATGCAGAAAAAATCATTGTCTATGCGAAGCAGCATGATGAGCCGATCCCTTGCCAAACAATTATTTGCGCC   |               | 339  |
|  | E K A L P D I V A A A K E E N A E K I I V Y A K Q H D E P I L A K Q L F A P   |               |      |
|  | GGAGGGCTATCTAAAAGGCTATTATCTCGGCCATTTCGGCTTGTGTGCATGGTACGTTACCTTTTCAGAAAAGCCGGAGACAAACAGATTCTTATACAGAGGAACAGGAGATCATCG |               | 452  |
|  | E G Y L K G Y Y L G H S A C V M V R Y L S E S R R Q T D S Y T E E Q E I I   |               |      |
|  | AAGCCATATATCGCACAGCGCCCCGTCTTCGCAACGACAGTACACCCGTTTTTACGATGAGAAAAGCAGAAACAAACGACATGTACCAGCTATCGATGCTGTATAAAAAAGTA     |               | 565  |
|  | E A I Y R T A P R L R N D S T P V F T M R K A E T N D M Y Q L S M L Y K K V   |               |      |
|  | TTCCGCACGTACCCAACCCCGGTATTTGACCCCGCTTATATTGAAAAGACGATGAATGCAAATACGGTGTATTATATCATGCTTGATCATGACCGCCTGATCAGCGCAGCAAG     |               | 678  |
|  | F R T Y P T P V F D P A Y I E K T M N A N T V Y Y I M L D H D R L I S A A S   |               |      |
|  | CGCAGAAATCAATCCAGAGCTTGGGCATGCAGAAATAACCGATTGCGCTGTGCTGCCGGAATATCGCGGCCATTTCGTTAACAAGCTTTTTAATCGAGGCGTTTAGAAAAAGAA    |               | 791  |
|  | A E I N P E L G H A E I T D C A V L P E Y R G H S L T S F L I E A F R K R   |               |      |
|  | ATGGCTGGAGAGGATATCGTTCATGTGTTTTCTCTCGCCGTGCTTCGTCTTTTGGGATGAATGCTGTGTTGTACCATTTCAGGTTATCAGTATGGCGGAAGGCTGATCAATAA     |               | 904  |
|  | N G W R G Y R S C V F S R P C F V F W D E C C V V P F R L S V W R K A D Q *   |               |      |
|  | <b>synth. RBS</b> <span style="margin-left: 100px;"><b>kamA</b></span>  |               |      |
|  | TTGCTTTATAGCCGAAGCCTTGAAAACATGAATATTTGGTGCAAGCAACTGTAATCAAAAATATGCGCGACATTCGCTCATCGAATATAAGGAGGTCAGTCTTGAAAAACAAA     |               | 1017 |
|  | L K N K   |               |      |
|  | TGGTATAAACCGAAACGGCATTGGAAGGAGATCGAGTTATGGAAGGACGTTCCGGAAGAGAAAATGGAACGATTGGCTTTGGCAGCTGACACACACTGTAAGAACGTTAGATGA    |               | 1130 |
|  | E Y K P K R H W K E I E L W K D V P E E K W N D W L W Q L T H T V R T L D D   |               |      |
|  | TTTAAAGAAAGTCATTAATCTGACCGAGGATGAAGAGGAAGGCGTCAGAATTTCTACCAAAACGATCCCCTTAAATATTACACCTTACTATGCTTCTTTAATGGACCCCGACA     |               | 1243 |
|  | L K K V I N L T E D E E E G V R I S T K T I P L N I T P Y Y A S L M D P D   |               |      |
|  | ATCCGAGATGCCCGGTACGCATGCAGTCTGTGCCGCTTTCTGAAGAAATGCACAAAACAAAATACGATCTGGAAGACCCGCTTCATGAGGATGAAGATTACCCGGTACCCGGT     |               | 1356 |
|  | N P R C P V R M Q S V P L S E E M H K T K Y D L E D P L H E D E D S P V P G   |               |      |
|  | CTGACACACCGCTATCCCGACCGTGTGCTGTTTCTTGTCACGAATCAATGTTCCATGTACTGCCGCTACTGCACAAGAAGGCGCTTTTCCGGACAAATCGGAATGGGCGTCCC     |               | 1469 |
|  | L T H R Y P D R V L F L V T N Q C S M Y C R Y C T R R R F S G Q I G M G V P   |               |      |
|  | CAAAAAACAGCTTGATGCTGCAATTGCTTATATCCGGGAAACACCCGAAATCCGCGATTGTTTAATTTTCAGGCGGTGATGGGCTGCTCATCAACGACCAAATTTTAGAATATA    |               | 1582 |
|  | K K Q L D A A I A Y I R E T P E I R D C L I S G G D G L L I N D Q I L E Y   |               |      |

## Anhang

```
TTTTAAAAGAGCTGCGCAGCATTCCGCATCTGGAAGTCATCAGAATCGGAACAAGAGCTCCCGTCGTCTTTCCGCAGCGCATTACCGATCATCTGTGCGAGATATTGAAAAAA 1695
I L K E L R S I P H L E V I R I G T R A P V V F P Q R I T D H L C E I L K K
TATCATCCGGTCTGGCTGAACACCCATTTTAAACACAAGCATCGAAATGACAGAAGAATCCGTTGAGGCATGTGAAAAGCTGGTGAACGCGGGAGTGCCGGTTCGAAATCAGGC 1808
Y H P V W L N T H F N T S I E M T E E S V E A C E K L V N A G V P V G N Q A
TGTCGTATTAGCAGGTATTAATGATTCCGGTTCCTCAATTATGAAAAAGCTCATGCATGACTTGGTAAAAATCAGAGTCCGTCCTTATTATATTTACCAATGTGATCTGTCAGAAG 1921
V V L A G I N D S V P I M K K L M H D L V K I R V R P Y Y I Y Q C D L S E
GAATAGGGCATTTCAGAGCTCCTGTTTCCAAAGGTTTGGAGATCATTGAAGGGCTGAGAGGTCATACCTCAGGCTATGCGGTTCTACCTTTGTGCTTGACGCACCAGGCGGA 2034
G I G H F R A P V S K G L E I I E G L R G H T S G Y A V P T F V V D A P G G
GGAGGTAAAATCGCCCTGCAGCCAAACTATGTCCTGTCACAAAGTCCCTGACAAAGTATCTTAAGAAATTTTGAAGGTGTGATTACGTCATATCCGGAACCAGAGAATTATAT 2147
G G K I A L Q P N Y V L S Q S P D K V I L R N F E G V I T S Y P E P E N Y I
CCCCAATCAGGCAGACGCCTATTTTGGAGTCCGTTTCCCTGAAACCGCTGACAAAAAGGAGCCGATCGGGCTGAGTGCCATTTTGTGACAAAGAAGTTTCGTTTACACCTG 2260
P N Q A D A Y F E S V F P E T A D K K E P I G L S A I F A D K E V S F T P
AAAATGTAGACAGAATCAAAAAGGAGAGAGGCATACATCGCAAATCCGGAGCATGAAACATTTAAAGATCGGCGTGAGAAAAGAGATCAGCTCAAAGAAAAGAAATTTTGGCG 2373
E N V D R I K R R E A Y I A N P E H E T L K D R R E K R D Q L K E K K F L A
CAGCAGAAAAAACAGAAAGAGACTGAATGCGGAGGGGATTCTTCATGAGTCGAC 2427
Q Q K K Q K E T E C G G D S S *
```

**Abb. 6.2: Teilsequenzierung des Vektors pASK\_yodPkamA.** Dargestellt ist die nach der Sequenzierung (vgl. 2.5.9) erhaltene Nukleotidsequenz, sowie die abgeleitete Aminosäuresequenzen der auf dem Vektor befindlichen Gene. Die jeweiligen Startcodons sind unterstrichen, die davorliegende synth. RBS in blauer Schrift. Innerhalb der synth. RBS ist die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) unterstrichelt. In Gelb hervorgehoben ist die Punktmutation (Insertion eines Thymins), die zur Verschiebung des Leserasters (Grau hervorgehoben) und somit zu einem verfrühten Abbruch der Aminosäuresequenz von YodP führt. In Pink hervorgehoben ist das ursprüngliche Stopcodon von YodP.



## Anhang

| -> <i>promA</i>   | synth. RBS | <i>kamA</i>   |      |
|---|------------|---|------|
| CGAACATGTACGGATCCGAACCCCGGATAAGATAAGGAGGTAAGTT  | <u>ATG</u> | GAAAAACAAATGGTATAAACCGAAACGGCATTGGAAGGAGATCGAGTTATGGAAGGACGTTCCG            | 113  |
|   |            | <u>M</u> K N K W Y K P K R H W K E I E L W K D V P                          |      |
| GAAGAGAAAATGGAACGATTGGCTTTGGCAGCTGACACACACTGTAAGAACGTTAGATGATTTAAAGAAAAGTCATTAATCTGACCGAGGATGAAGAGGAAGGCGTCAGAATTTTC  |            | E E K W N D W L W Q L T H T V R T L D D L K K V I N L T E D E E E G V R I S | 226  |
| TACCAAAAACGATCCCCTTAAATATTACACCTTACTATGCTTCTTTAATGGACCCCGACAATCCGAGATGCCCGGTACGCATGCAGTCTGTGCCGCTTTCTGAAGAAATGCACA    |            | T K T I P L N I T P Y Y A S L M D P D N P R C P V R M Q S V P L S E E M H   | 339  |
| AAACAAAATACGATCTGGAAGACCCGCTTCATGAGGATGAAGATTCACCCGGTACCCGGTCTGACACACCGCTATCCCAGCCGTGTGCTGTTTCTTGTCACGAATCAATGTTCC    |            | K T K Y D L E D P L H E D E D S P V P G L T H R Y P D R V L F L V T N Q C S | 452  |
| ATGTACTGCCGCTACTGCACAAGAAGGCGCTTTTCCGGACAAATCGGAATGGGCGTCCCCAAAAAACAGCTTGATGCTGCAATTGCTTATATCCGGGAAACACCCGAAATCCG     |            | M Y C R Y C T R R R F S G Q I G M G V P K K Q L D A A I A Y I R E T P E I R | 565  |
| CGATTGTTTAAATTTTCAAGCGGTGATGGGCTGCTCATCAACGACCAAAATTTTAGAATATATTTTAAAAGAGCTGCGCAGCATTCCGCATCTGGAAGTCATCAGAATCGGAACAA  |            | D C L I S G G D G L L I N D Q I L E Y I L K E L R S I P H L E V I R I G T   | 678  |
| GAGCTCCCGTCGTCTTTCCGCAGCGCATTACCGATCATCTGTGCGAGATATTGAAAAAATATCATCCGGTCTGGCTGAACACCCATTTTAAACACAAGCATCGAAATGACAGAA    |            | R A P V V F P Q R I T D H L C E I L K K Y H P V W L N T H F N T S I E M T E | 791  |
| GAATCCGTTGAGGCATGTGAAAAGCTGGTGAACCGGGAGTGCCGGTTCGGAAATCAGGCTGTGCTATTAGCAGGTATTAATGATTTCGGTTCCAATTATGAAAAGCTCATGCA     |            | E S V E A C E K L V N A G V P V G N Q A V V L A G I N D S V P I M K K L M H | 904  |
| TGACTIONGTTAAAAATCAGAGTCCGTCCTTATTATATTTACCAATGTGATCTGTGTCAGAAGGAATAGGGCATTTCAGAGCTCCTGTTTCCAAAGGTTTGGAGATCATTGAAGGGC |            | D L V K I R V R P Y Y I Y Q C D L S E G I G H F R A P V S K G L E I I E G   | 1017 |
| TGAGAGGTCATACCTCAGGCTATGCGGTTCTTACCTTTGTCGTTGACGCACCAGGCGGAGGAGGTAATAATCGCCCTGCAGCCAAACTATGTCCTGTACAAAAGTCCTGACAAA    |            | L R G H T S G Y A V P T F V V D A P G G G G K I A L Q P N Y V L S Q S P D K | 1130 |
| GTGATCTTAAAGAAATTTTGAAGGTGTGATTACGTCATATCCGGAACCAGAGAATTATATCCCCAATCAGGCAGACGCCTATTTTGGAGTCCGTTTTTCCCTGAAACCGCTGACAA  |            | V I L R N F E G V I T S Y P E P E N Y I P N Q A D A Y F E S V F P E T A D K | 1243 |
| AAAGGAGCCGATCGGGCTGAGTGCCATTTTGTGTCACAAAAGAAAGTTTCGTTTACACCTGAAAATGTAGACAGAATCAAAAAGGAGAGAGGCATACATCGCAAATCCGGAGCATG  |            | K E P I G L S A I F A D K E V S F T P E N V D R I K R R E A Y I A N P E H   | 1356 |
| AAACATTAAAAGATCGGCGTGAGAAAAGAGATCAGCTCAAAGAAAAGAAATTTTGGCGCAGCAGAAAAAACAGAAAAGAGACTGAATGCGGAGGGGATTCTTCATGAGTCGAC     |            | E T L K D R R E K R D Q L K E K K F L A Q Q K K Q K E T E C G G D S S *     | 1469 |

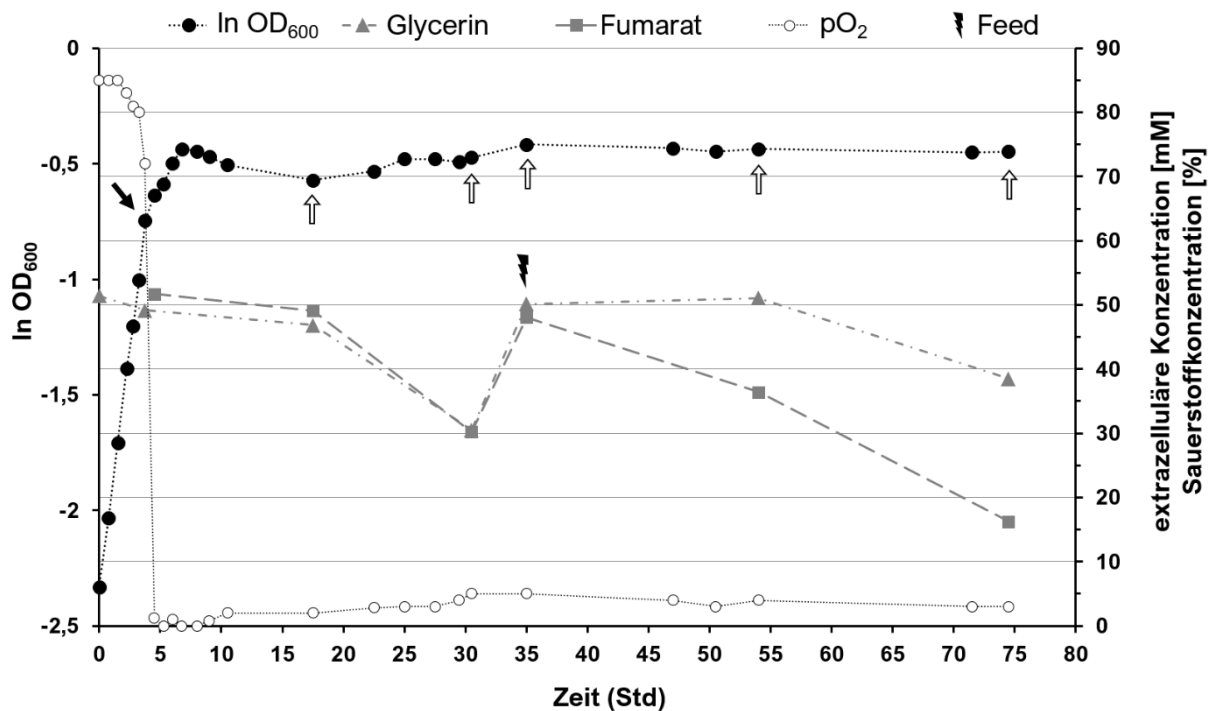
**Abb. 6.3: Teilsequenzierung des Vektors pPE\_ kamA\_specRBS.** Dargestellt ist die nach der Sequenzierung (vgl. 2.5.9) erhaltene Nukleotidsequenz, sowie die abgeleitete Aminosäuresequenzen des auf dem Vektor befindlichen Gens. Das jeweilige Startcodon ist unterstrichen, die davorliegende synth. RBS in blauer Schrift. Innerhalb der synth. RBS ist die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) unterstrichelt.

**Tab. 6.1: Potenzielle Acetyltransferasen in *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>.** Die Aminosäuresequenzen der folgenden Genloci wurden mithilfe des InterProScan-Tools (vgl. 2.3) untersucht. Dabei wurde für jede Sequenz die Funktion einer Acetyltransferase aufgrund homologer Abschnitte in den Aminosäuresequenzen durch computergestützte Analysen vorhergesagt; diese ist jedoch nicht experimentell bestätigt. Für Helo\_3069 wurde außerdem die Funktion einer Glucosamin 6-Phosphate N-Acetyltransferase vorhergesagt. AS: Aminosäure(n), n.a.: nicht angegeben.

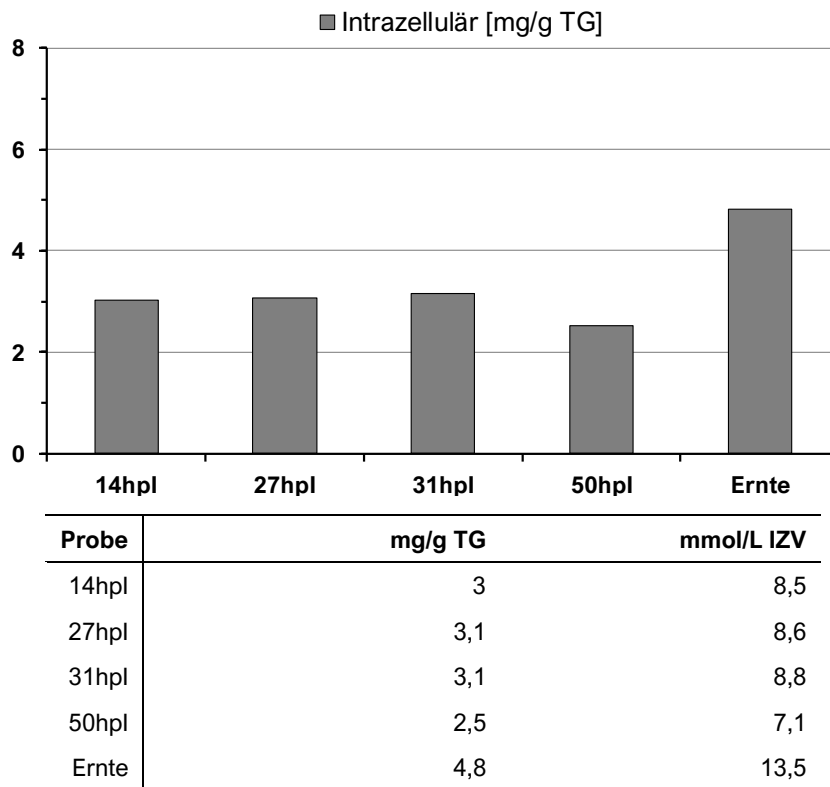
| Genlocus            | EC-Nr.  | AS-Länge | Bindetasche für CoA |
|---------------------|---------|----------|---------------------|
| Helo_1179 (RS00910) | 2.3.1.- | 149      | Ja                  |
| Helo_1435 (RS02285) | n.a.    | 180      | Nein                |
| Helo_RS04115        | n.a.    | 149      | Ja                  |
| Helo_2150 (RS18925) | n.a.    | 127      | Ja                  |
| Helo_2309 (RS07070) | n.a.    | 198      | Ja                  |
| Helo_2498 (RS08095) | n.a.    | 892      | Ja                  |
| Helo_2944 (RS10575) | 2.3.1.- | 141      | Ja                  |
| Helo_2949 (RS10615) | n.a.    | 160      | Ja                  |
| Helo_3069 (RS11245) | n.a.    | 144      | Ja                  |
| Helo_3137 (RS11595) | n.a.    | 122      | Ja                  |
| Helo_3166 (RS11740) | 2.3.1.- | 143      | Ja                  |
| Helo_3177 (RS11795) | n.a.    | 251      | Nein                |
| Helo_3178 (RS11800) | n.a.    | 148      | Ja                  |
| Helo_3215 (RS12000) | n.a.    | 137      | Ja                  |
| Helo_3439 (RS13185) | n.a.    | 155      | Ja                  |
| Helo_3575 (RS13925) | 2.3.1.- | 185      | Ja                  |

### Semi-anaerobe Fed-Batch-Fermentation

*E. coli* DH5a pASK\_yodP-ablA wurde erneut unter semi-anaerobe Anzuchtbedingungen im 1 L-Fermenter angezogen, wobei im Laufe der Fermentation eine erneute Zugabe der C-Quelle und von Fumarat erfolgte. In Anlehnung an Kuchenreuther *et al.* (2010) wurden weitere Veränderungen am Fermentationsmedium vorgenommen (mod. GGF-0,5; vgl. 2.4.2). Glycerin wurde als einzige C-Quelle mit einer Konzentration von 40 mM eingesetzt. Außerdem erfolgte die Zugabe von 2 mM Ammonium-Eisen(III)-Citrat ins Medium, um der L-Lysin 2,3-Aminomutase, sowie der Fumaratreduktase zusätzlich Eisen zur Verfügung zu stellen. Fumarat wurde gemeinsam mit 2 mM L-Cystein erst zum Zeitpunkt der Induktion in die Kultur gegeben. Während der Fermentation erfolgte die Kontrolle des pH-Werts, der Temperatur und der Sauerstoffkonzentration.



**Abb. 6.4: Verlauf der semi-anaeroben Fed-Batch-Fermentation.** *E. coli* DH5a pASK\_yodP-ablA wurde in GGF-Medium (mod. nach Kuchenreuther *et al.* 2010) mit 0,5 % NaCl im 1 L-Fermenter kultiviert (vgl. 2.4.9). Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4 erfolgte die Zugabe des Induktors AHT, des Substrats L-Lysin, Fumarat, L-Cystein und 2,5 % NaCl (w/v). Im direkten Anschluss wurde die Sauerstoffzufuhr gestoppt, die Rührzahl von 250 rpm auf 100 rpm verringert und die Temperatur auf 30 °C gesenkt. Der pH-Wert wurde mit 4 M NaOH automatisch eingestellt (pH 7 - 7,2). Der Wachstumsverlauf ist durch den natürlichen Logarithmus der OD<sub>600</sub> gezeigt. Die Medienüberstände wurden mittels HPLC analysiert und quantifiziert. Schwarzer Pfeil: Zeitpunkt der Induktion, Weiße Pfeile: Probenahme für die Bestimmung von NAßL.



**Abb. 6.5: NAβL-Produktion mittels Fed-Batch-Fermentation von *E. coli* DH5α pASK\_yodP-abIA.** Oben: Intrazellulärer NAβL-Gehalt in mg/g TG. Unten: Gezeigt sind vergleichend die Werte in mg/g Trockengewicht (TG) und in mmol/L intrazelluläres Volumen (IZV). Ernte: ca. 71 h nach Inokulation.

**Tab. 6.2: Wachstumsraten und Verdopplungszeiten verschiedener *E. coli*-Stämme mit dem Plasmid pASK\_yodP-abIA.** Die Kultivierung erfolgte in Fed-Batch-Medium mit 0,5 % NaCl. Die Werte repräsentieren das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung.

| <i>E. coli</i>           | $\mu$ [h <sup>-1</sup> ] | $t_d$ [h] |
|--------------------------|--------------------------|-----------|
| DH5α                     | 0,32                     | 2,15      |
| MG1655                   | 0,32                     | 2,16      |
| BL21                     | 0,54                     | 1,28      |
| BL21 (DE3) $\Delta$ iscR | 0,55                     | 1,25      |
| BKA-13                   | 0,35                     | 1,97      |

## 7 Quellenverzeichnis

- Aberhart, D., Lin, H., Weiller, B. H., Gould, S. J., & Thiruvengadam, T. K. (1983).** Stereochemistry of Lysine 2,3-Aminomutase Isolated from *Clostridium subterminale* Strain SB4. *Journal of the American Chemical Society*, 105(16), 5461–5470.
- Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, J., & Görisch, H. (2000).** Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature*, 408(6812), 580–583.
- Akhtar, M. K., & Jones, P. R. (2008).** Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe-Fe hydrogenase activity and H<sub>2</sub>-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Allison, S. D., & Anchordoquy, T. J. (2000).** Mechanisms of protection of cationic lipid-DNA complexes during lyophilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- 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(3), 145.
- Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L., & Lyon, J. A. (2008).** Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS ONE*, 3(5).
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014).** Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(1).
- Baneyx, F. (1999).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. In *Current Opinion in Biotechnology*.
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004).** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1407.
- Barker, H. A., Kahn, J. M., & Hedrick, L. (1982).** Pathway of lysine degradation in *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Bacteriology*, 152(1), 201–207.
- Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B., & Jaenicke, R. (2008).** Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. *Protein Science*, 6(10), 2159–2165.
- Behshad, E., Ruzicka, F. J., Mansoorabadi, S. O., Chen, D., Reed, G. H., & Frey, P. A. (2006).** Enantiomeric free radicals and enzymatic control of stereochemistry in a radical mechanism: the case of lysine 2,3-aminomutases. *Biochemistry*, 45(42), 12639–12646.
- Bennett, B. D., Yuan, J., Kimball, E. H., & Rabinowitz, J. D. (2008).** Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nature Protocols*, 3(8), 1299–1311.
- Bentley, W. E., & Kompala, D. S. (1990).** Stability in continuous cultures of recombinant bacteria: A metabolic approach. *Biotechnology Letters*, 12(5), 329–334.
- Bergqvist, S., Williams, M. A., O'Brien, R., & Ladbury, J. E. (2003).** Halophilic adaptation of protein-DNA interactions. *Biochemical Society Transactions*, 31(3), 677–680.
- Bersch, S., Vangala, M., Schwarz, T., & Kaufmann, M. (2000).** Protection of antibodies against proteolytic degradation by compatible solutes. *Biomolecule Stabilisation. From Molecular Interpretations to Bio-Industrial Applications*.
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 62(3), 293–300.

- Bethlehem, L. (2019).** Design & generation of an efficient *E. coli* cell-factory for the overproduction of the compatible solutes ectoine & hydroxyectoine. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn.
- Beyert, J. K. (2018).** N-acetylglutaminyglutamine-1-amide Optimizing heterologous production in *Halomonas elongata*. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453–1462.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), 911–917.
- Botes, D. P., Tuinman, A. A., Wessels, P. L., Viljoen, C. C., Kruger, H., Williams, D. H., Santikarn, S., Smith, R. J., & Hammond, S. J. (1984).** The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0, 2311–2318.
- Brands, S., Schein, P., Castro-Ochoa, K. F., & Galinski, E. A. (2019).** Hydroxyl radical scavenging of the compatible solute ectoine generates two N-acetimides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 674.
- Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J. M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneuric, R., & Neiers, F. (2016).** A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 6.
- Brown, A. D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40(4), 803–846.
- Brown, A. F., & Dunn, G. A. (1989).** Microinterferometry of the movement of dry matter in fibroblasts. *J Cell Sci*.
- Brünig, A. (2005).** Molekulargenetische und physiologische Studien zur Entwicklung eines Expressionssystems in *Halomonas elongata* DSMZ 2581<sup>T</sup>. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Bunge, M., Adrian, L., Kraus, A., Opel, M., Lorenz, W. G., Andreesen, J. R., Görisch, H., & Lechner, U. (2003).** Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature*, 421(6921), 357–360.
- Bünger, J., Driller, H.-J., & Martin, R. (2003).** Use of ectoine or ectoine derivatives in cosmetic formulations. In *United States Patent and Trademark Office granted Patent*.
- Burdziak, A. (2006).** Entwicklung eines bakteriellen Stammes zur Produktion des kompatiblen Solute Mannosylglycerat. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Burow, L. C., Mabbett, A. N., & Blackall, L. L. (2008).** Anaerobic glyoxylate cycle activity during simultaneous utilization of glycogen and acetate in uncultured *Accumulibacter* enriched in enhanced biological phosphorus removal communities. *ISME Journal*, 2(10), 1040–1051.
- Bütikofer, U., Fuchs, D., Bosset, J. O., & Gmür, W. (1991).** Automated HPLC-amino acid determination of protein hydrolysates by precolumn derivatization with OPA and FMOc and comparison with classical ion exchange chromatography. *Chromatographia*, 31(9–10), 441–447.
- Butte, N. (2018).** *Halomonas elongata* als alternatives Expressionssystem für heterologe Produktion kompatibler Solute und rekombinanter Proteine. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Caetano-Anollés, D. (2013).** Polymerase Chain Reaction. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (pp. 392–395).

- Carrasquillo, M., Dever, L. L., & Sonyey, A. (2018).** Botulism-like symptoms in an immunocompetent patient with *Clostridium subterminale* bacteremia. *IDCases*, 11, 80–82.
- Carter, H. E., Hearn, W. R., Lansford, E. M., Page, A. C., Salzman, N. P., Shapiro, D., & Taylor, W. R. (1952).** Structure of the diamino-hexanoic acid from streptothricin. *Journal of the American Chemical Society*, 74(14), 3704.
- Casali, N. (2003).** *Escherichia coli* host strains. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 235, 27–48.
- Chakrabarti, R. (2001).** The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Research*, 29(11), 2377–2381.
- Chakrabarti, R., & Schutt, C. E. (2001).** The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene*, 274(1–2), 293–298.
- Chakrabarti, R., & Schutt, C. E. (2002).** Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification. *BioTechniques*, 32(4), 866–874.
- Chang, C. H., Ballinger, M. D., Reed, G. H., & Frey, P. A. (1996).** Lysine 2,3-aminomutase: Rapid mix-freeze-quench electron paramagnetic resonance studies establishing the kinetic competence of a substrate-based radical intermediate. *Biochemistry*, 35(34), 11081–11084.
- Chen, D., & Frey, P. A. (2001).** Identification of lysine 346 as a functionally important residue for pyridoxal 5'-phosphate binding and catalysis in lysine 2,3-aminomutase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 40(2), 596–602.
- Chen, D., Walsby, C., Hoffman, B. M., & Frey, P. A. (2003).** Coordination and mechanism of reversible cleavage of S-adenosylmethionine by the [4Fe-4S] center in lysine 2,3-aminomutase. *Journal of the American Chemical Society*, 125(39), 11788–11789.
- Chen, D., Ruzicka, F. J., & Frey, P. A. (2000).** A novel lysine 2,3-aminomutase encoded by the yodO gene of *Bacillus subtilis*: Characterization and the observation of organic radical intermediates. *Biochemical Journal*, 348(3), 539–549.
- Chen, D., Tanem, J., & Frey, P. A. (2007).** Basis for the equilibrium constant in the interconversion of l-lysine and l-β-lysine by lysine 2,3-Aminomutase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1774(2), 297–302.
- Chen, Dawei, Frey, P. A., Lepore, B. W., Ringe, D., & Ruzicka, F. J. (2006).** Identification of structural and catalytic classes of highly conserved amino acid residues in lysine 2,3-aminomutase. *Biochemistry*, 45(42), 12647–12653.
- Chirpich, T. P., Zappia, V., Costilow, R. N., & Barker, H. A. (1970).** Lysine 2,3-aminomutase. Purification and properties of a pyridoxal phosphate and S-adenosylmethionine-activated enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 245(7), 1778–1789.
- Choi, J. H., & Lee, S. Y. (2004).** Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 625–635.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7), 2172–2175.
- Cichocka, D., Nikolausz, M., Haest, P. J., & Nijenhuis, I. (2010).** Tetrachloroethene conversion to ethene by a *Dehalococcoides*-containing enrichment culture from Bitterfeld. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(2), 297–310.
- Claus, D., Fahmy, F., Rolf, H. J., & Tosunoglu, N. (1983).** *Sporosarcina halophila* sp. nov., an Obligate, Slightly Halophilic Bacterium from Salt Marsh Soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(4), 496–506.

- Cohn, E., Edsall, J., Kirkwood, J., Mueller, H., Oncley, J., & Scatchard, G. (1943).** Proteins, amino acids and peptides as Ions and Dipolar Ions. *The American Journal of the Medical Sciences*, 205(6), 884.
- Copley, S. D., & Dhillon, J. K. (2002).** Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biology*, 3(5).
- Corpet, F. (1988).** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16(22), 10881–10890.
- Cosper, M. M., Cosper, N. J., Hong, W., Shokes, J. E., Broderick, W. E., Broderick, J. B., Johnson, M. K., & Scott, R. A. (2003).** Structural studies of the interaction of S-adenosylmethionine with the [4Fe-4S] clusters in biotin synthase and pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Protein Science*, 12(7), 1573–1577.
- Costilow, R. N., Rochovansky, O. M., & Barker, H. A. (1966).** Isolation and identification of beta-lysine as an intermediate in lysine fermentation. *Journal of Biological Chemistry*, 241(7), 1573–1580.
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., & Bergman, B. (2005).** Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 5074–5078.
- Cronin, J. R., & Pizzarello, S. (1983).** Amino acids in meteorites. *Advances in Space Research*, 3(9), 5–18.
- Crumpler, H. R., Dent, C. E., Harris, H., & Westall, R. G. (1951).**  $\beta$ -aminoisobutyric acid ( $\alpha$ -methyl- $\beta$ -alanine): A new amino-acid obtained from human urine. *Nature*, 167(4243), 307–308.
- 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(2).
- Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009).** Tracing Ancestors and Relatives of *Escherichia coli* B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 634–643.
- de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., & Hulo, N. (2006).** ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.).
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009).** Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*, 27(3), 297–306.
- Deng, Y., Sun, M., & Shaevitz, J. W. (2011).** Direct measurement of cell wall stress stiffening and turgor pressure in live bacterial cells. *Physical Review Letters*, 107(15).
- Dennis, P. P., & Shimmin, L. C. (1997).** Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 61(1), 90–104.
- Deponte, M. (2013).** Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 5, pp. 3217–3266).
- Dharmadi, Y., Murarka, A., & Gonzalez, R. (2006).** Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(5), 821–829.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., & Goloubinoff, P. (2001).** Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39586–39591.



- 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(4), 348–357.
- Dörfler, L. (2014).** Synthetic approach to a heterologous production system in *Halomonas elongata*. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Douka, E., Christogianni, A., Koukkou, A. I., Afendra, A. S., & Drainas, C. (2001).** Use of a green fluorescent protein gene as a reporter in *Zymomonas mobilis* and *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 221–227.
- Draper, D. E. (2004).** A guide to ions and RNA structure. *RNA*, 10(3), 335–343.
- Dyda, F., Klein, D. C., & Hickman, A. B. (2000).** GCN5-related N-acetyltransferases: A structural overview. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29, 81–103.
- 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(C), 609–618.
- El-Mansi, E. M. T., & Holms, W. H. (1989).** Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *Journal of General Microbiology*, 135(11), 2875–2883.
- Empadinhas, N., Albuquerque, L., Costa, J., Zinder, S. H., Santos, M. A. S., Santos, H., & Da Costa, M. S. (2004).** A gene from the mesophilic bacterium *Dehalococcoides ethenogenes* encodes a novel mannosylglycerate synthase. *Journal of Bacteriology*, 186(13), 4075–4084.
- Empadinhas, N., & Da Costa, M. S. (2008).** Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: Distribution of compatible solutes. *International Microbiology*, 11(3), 151–161.
- Engel, S., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2002).** Chemical ecology of marine microbial defense. In *Journal of Chemical Ecology* (Vol. 28, Issue 10, pp. 1971–1985).
- Engeland, R. (1909).** Zur Kenntnis der Bestandteile des Fleischextraktes. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 42(2), 2457–2462.
- Erdmann, A., Weil, B., & Kramer, R. (1993).** Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. *Journal of General Microbiology*, 139(12), 3115–3122.
- 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 Res*, 42(4), 2646–2659.
- Euzéby, J. P. (1997).** *List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the internet*. *International Journal of Systematic Bacteriology*.
- Fahey, R. C. (2013).** Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3182–3198.
- Favrot, L., Blanchard, J. S., & Vergnolle, O. (2016).** Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation. *Biochemistry*, 55(7), 989–1002.
- Flint, D. H., Tuminello, J. F., & Emptage, M. H. (1993).** The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, 268(30), 22369–22376.
- Flock, S., Labarbe, R., & Houssier, C. (1996).** Dielectric constant and ionic strength effects on DNA precipitation. *Biophysical Journal*, 70(3), 1456–1465.
- Fowden, L. (2001).** Plant amino acid research in retrospect: From Chibnall to Singh. *Amino Acids*, 20(3), 217–224.

- French, J. C., Bartz, Q. R., & Dion, H. W. (1973).** Myomycin, a new antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, 26(5), 272–283.
- Frey, P. A. (1998).** S-Adenosylmethionine: A “poor man’s coenzyme B<sub>2</sub>” in the reaction of lysine 2,3-aminomutase. *Biochemical Society Transactions*, 26(3), 304–310.
- Frey, P. A., & Magnusson, O. T. (2003).** S-adenosylmethionine: A wolf in sheep’s clothing, or a rich man’s adenosylcobalamin? *Chemical Reviews*, 103(6), 2129–2148.
- Frillingos, S., Linden, A., Niehaus, F., Vargas, C., Nieto, J. J., Ventosa, A., Antranikian, G., & Drinas, C. (2000).** Cloning and expression of  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 495–503.
- Fuchs, G., Eitinger, T., Heider, J., Kemper, B., Kothe, E., Schlegel, H. G., Schink, B., Schneider, E., & Uden, G. (2007).** *Allgemeine Mikrobiologie* (8th ed.).
- 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(6), 869–881.
- Fujino, T., Goto, Y., Suga, H., & Murakami, H. (2016).** Ribosomal Synthesis of Peptides with Multiple  $\beta$ -Amino Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 138(6), 1962–1969.
- Galinski, E. (1986).** Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen, phototrophen Bakterien. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Galinski, E. A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol*, 37, 272–328.
- Galinski, Erwin A., & Trüper, H. G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(2–3), 95–108.
- 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* (pp. 571–607).
- Georgiev, N. (2017a).** Biotechnologische Produktion mikrobiell relevanter Lysin-Derivate. Bachelorarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Georgiev, N. (2017b).** Produktion von  $\beta$ -Lysin und N $\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin in *Escherichia coli*. Projektarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Giaever, 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(6), 2841–2849.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
- Glick, B. R. (1995).** Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances*, 13(2), 247–261.
- Göller, K., & Galinski, E. (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(1–4), 37–45.
- Gossel, W., Stollberg, R., & Wycisk, P. (2009).** Regionales Langzeitmodell zur Simulation von Grundwasserströmung und Stofftransport im Gebiet der Unteren Mulde/Fuhne. *Grundwasser*, 14(1), 47–60.
- 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(4), 326–333.

- Griffith, O. W. (1986).**  $\beta$ -Amino acids: mammalian metabolism and utility as  $\alpha$ -amino acid analogs. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 855–878.
- Grün, A. (2011).** Studien zur Expression zum tat-Transportsystem von heterologen Proteinen in *Halomonas elongata*. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Guyer, M. S., Reed, R. R., Steitz, J. A., & Low, K. B. (1981).** Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 45 Pt 1, 135–140.
- 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. *MGG Molecular & General Genetics*, 246(6), 783–796.
- Hackl, E. V., & Blagoi, Y. P. (2005).** The effect of temperature on DNA structural transitions under the action of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ions in aqueous solutions. *Biopolymers*, 77(6), 315–324.
- Hahn, M. B., Meyer, S., Schroter, M. A., Kunte, H. J., Solomun, T., & Sturm, H. (2017).** DNA protection by ectoine from ionizing radiation: molecular mechanisms. *Phys Chem Chem Phys*, 19(37), 25717–25722.
- Halliwell, B. (2015).** Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In *eLS* (pp. 1–9). John Wiley & Sons, Ltd.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580.
- Hand, C. E., & Honek, J. F. (2005).** Biological chemistry of naturally occurring thiols of microbial and marine origin. *Journal of Natural Products*, 68(2), 293–308.
- 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(1–3), 37–46.
- Hartwig, S., Dragomirova, N., Kublik, A., Türkowsky, D., von Bergen, M., Lechner, U., Adrian, L., & Sawers, R. G. (2017).** A H<sub>2</sub>-oxidizing, 1,2,3-trichlorobenzene-reducing multienzyme complex isolated from the obligately organohalide-respiring bacterium *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB1. *Environmental Microbiology Reports*, 9(5), 618–625.
- Haskell, T. H., Fusari, S. A., Frohardt, R. P., & Bartz, Q. R. (1952).** The Chemistry of Viomycin. *Journal of the American Chemical Society*, 74(3), 599–602.
- 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(1).
- Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007).** Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, 2(4), 924–932.
- Heidrich, S., Weiß, H., & Kaschl, A. (2004).** Attenuation reactions in a multiple contaminated aquifer in Bitterfeld (Germany). *Environmental Pollution*, 129(2), 277–288.
- Heller, K. B., Lin, E. C. C., & Hastings Wilson, T. (1980).** Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 144(1), 274–278.
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., & Loening, S. A. (1997).** Betaine Improves the PCR Amplification of GC-Rich DNA Sequences. *Nucleic Acids Research*, 25(19), 3957–3958.
- Hermesen, R., Okano, H., You, C., Werner, N., & Hwa, T. (2015).** A growth-rate composition formula for the growth of *E. coli* on co-utilized carbon substrates. *Molecular Systems Biology*, 11(4), 801.

- Higuchi, R., Krummel, B., & Saiki, R. K. (1988).** A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 16(15), 7351–7367.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51–59.
- Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schumacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., & Zehnder, A. J. B. (1998).** *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Archives of Microbiology*, 169(4), 313–321.
- Holms, H. (1996).** Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(2), 85–116.
- Hövels, M. (2015a).** Heterologe Expression des kompatiblen Solut N $\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin. Projektarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Hövels, M. (2015b).** Heterologe Produktion der seltenen kompatiblen Solute N-Acetylglutaminylglutamin-1-amid (NAGGN) und N $\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysin (NABL). Bachelorarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Hung, C. C., & Lai, M. C. (2013).** The phylogenetic analysis and putative function of lysine 2,3-aminomutase from methanoarchaea infers the potential biocatalysts for the synthesis of  $\beta$ -lysine. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(1), 1–10.
- Iakobashvili, R., & Lapidot, A. (1999).** Low temperature cycled PCR protocol for Klenow fragment of DNA polymerase I in the presence of proline. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 27, Issue 6, pp. 1566–1568).
- Ianas, O., Olinescu, R., & Badescu, I. (1991).** Melatonin involvement in oxidative processes. *Revue Roumaine de Medecine - Serie Endocrinologie*, 29(3–4), 147–153.
- Imhoff, J. F., & Trüper, H. G. (1977).** *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. *Archives of Microbiology*, 114(2), 115–121.
- Inamori, Y., Amino, H., Tsuboi, M., Yamaguchi, S., & Tsujibo, H. (1990).** Biological Activities of Racemomycin-B,  $\beta$ -Lysine Rich Streptothricin Antibiotic, the Main Component of *Streptomyces lavendulae* OP-2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38(8), 2296–2298.
- Iuchi, S., & Lin, E. C. C. (1995).** Signal Transduction in the Arc System for Control of Operons Encoding Aerobic Respiratory Enzymes. In *Two-Component Signal Transduction* (pp. 223–231). ASM Press.
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., ... Kyrpides, N. (2003).** Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423(6935), 87–91.
- Jacques, N., & Dreyfus, M. (1990).** Translation initiation in *Escherichia coli*: old and new questions. *Molecular Microbiology*, 4(7), 1063–1067.
- Jain, N. K., & Roy, I. (2009).** Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 18(1), 24–36.
- Jámbor, A., & Molnár-Perl, I. (2009).** Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. Literature overview and further study. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 3064–3077.
- Jen-Jacobson, L. (1997).** Protein-DNA recognition complexes: Conservation of structure and binding energy in the transition state. *Biopolymers*, 44(2), 153–180.

- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011).** Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1).
- Jung, S. C., Smith, C. L., Lee, K. S., Hong, M. E., Kweon, D. H., Stephanopoulos, G., & Jin, Y. S. (2010).** Restoration of growth phenotypes of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  in minimal media through reversal of a point mutation in purB. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6307–6309.
- Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O. B., & Strom, A. R. (1992).** Molecular cloning and physical mapping of the otsBA genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: Evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *Journal of Bacteriology*, 174(3), 889–898.
- Kane, J. F. (1995).** Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 6 (5), 494-500
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018).** Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822.
- Kaushik, J. K., & Bhat, R. (2003).** Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26458–26465.
- Keiler, K. C., Waller, P. R. H., & Sauer, R. T. (1996).** Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*, 271(5251), 990–993.
- Kempf, B., & Bremer, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*, 170(5), 319–330.
- Kennell, D., & Riezman, H. (1977).** Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli* lac operon. *Journal of Molecular Biology*, 114(1), 1–21.
- Knapp, S., Ladenstein, R., & Erwin, A. G. (1999).** Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes  $\beta$ -hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles*, 3(3), 191–198.
- Korsten, A. (2011).** Das seltene kompatible Solut N-Acetyl-glutaminylglutamin-1-amid (NAGGN): Heterologe Expression des Genclusters aus *Pseudomonas putida* und Untersuchungen zur Funktion der putativen Biosyntheseenzyme. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop 2nd, R. M., & Peterson, K. M. (1994).** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques*, 16(5), 800–802.
- Kozlowski, L. P. (2016).** IPC - Isoelectric Point Calculator. *Biology Direct*, 11(1).
- Kraegeloh, A., & Kunte, H. J. (2002).** Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles*, 6(6), 453–462.
- Kube, M., Beck, A., Zinder, S. H., Kuhl, H., Reinhardt, R., & Adrian, L. (2005).** Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nature Biotechnology*, 23(10), 1269–1273.
- Kuchenreuther, J. M., Grady-Smith, C. S., Bingham, A. S., George, S. J., Cramer, S. P., & Swartz, J. R. (2010).** High-yield expression of heterologous [FeFe] hydrogenases in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 5(11), e15491.
- Kudo, F., Miyanaga, A., & Eguchi, T. (2014).** Biosynthesis of natural products containing  $\beta$ -amino acids. *Natural Product Reports*, 31(8), 1056–1073.
- Kunte, H. J. (2006).** Osmoregulation in bacteria: Compatible solute accumulation and osmosensing. *Environmental Chemistry*, 3(2), 94–99.

- 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 Microbiol Lett*, 128(3), 293–299.
- Kurz, M. (2008).** Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. *Saline Systems*, 4(1), 6.
- Kushner, D. J. (1978).** Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In D. J. Kushner (Ed.), *Microbial Life in Extreme Environments* (pp. 317–368). Academic Press.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lai, M. C., Sowers, K. R., Robertson, D. E., Roberts, M. F., & Gunsalus, R. P. (1991).** Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology*, 173(17), 5352–5358.
- Lange, C. (2009).** Optimierung der Produktion des kompatiblen Soluts Mannosylglycerat in einem heterologen Expressionsstamm. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Lanyi, J. K. (1974).** Salt dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 38(3), 272–290.
- Larsen, P. I., Sydnnes, L. K., Landfald, B., & Strom, A. R. (1987).** Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch Microbiol*, 147(1), 1–7.
- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S. Y., Landre, P. A., Abramson, R. D., & Gelfand, D. H. (1993).** High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Research*, 2(4), 275–287.
- Lee-Huang, S. (1984).** Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(9 I), 2708–2712.
- Lee, J. S., Ha, T. K., Lee, S. J., & Lee, G. M. (2012).** Current state and perspectives on erythropoietin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6), 1405–1416.
- Lees, N. S., Chen, D., Walsby, C. J., Behshad, E., Frey, P. A., & Hoffman, B. M. (2006).** How an enzyme tames reactive intermediates: Positioning of the active-site components of lysine 2,3-aminomutase during enzymatic turnover as determined by ENDOR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 128(31), 10145–10154.
- Lentzen, G., & Schwarz, T. (2006).** Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(4), 623–634.
- Lepore, B. W., Ruzicka, F. J., Frey, P. A., & Ringe, D. (2005).** The x-ray crystal structure of lysine-2,3-aminomutase from *Clostridium subterminale*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13819–13824.
- Leung, D. W., Chen, E., & Goeddel, D. V. (1989).** A Method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, 1, 11–15.
- Lieder, K. W., Booker, S., Ruzicka, F. J., Beinert, H., Reed, G. H., & Frey, P. A. (1998).** S-adenosylmethionine-dependent reduction of lysine 2,3-aminomutase and observation of the catalytically functional iron-sulfur centers by electron paramagnetic resonance. *Biochemistry*, 37(8), 2578–2585.
- Lippert, K., & Galinski, E. A. (1992).** Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(1), 61–65.

- Loferer-Krößbacher, M., Klima, J., & Psenner, R. (1998).** Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 688–694.
- Löffler, F. E., Yan, J., Ritalahti, K. M., Adrian, L., Edwards, E. A., Konstantinidis, K. T., Müller, J. A., Fullerton, H., Zinder, S. H., & Spormann, A. M. (2013).** *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and famil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 625–635.
- Lohberger, A. (2009).** Konstruktion eines Produktionsstammes für das kompatible Solut Nε-Acetyl-β-Lysin. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Louis, P., & Galinski, E. A. (1997).** Identification of plasmids in the genus *Marinococcus* and complete nucleotide sequence of plasmid pPL1 from *Marinococcus halophilus*. *Plasmid*, 38(2), 107–114.
- 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(6), 684–688.
- Louwrier, A., & Van Der Valk, A. (2001).** Can sucrose affect polymerase chain reaction product formation? *Biotechnology Letters*, 23(3), 175–178.
- Madigan, M. T., & Martinko, J. (1997).** Brock Biology of Micro-Organisms Brock Biology of Microorganisms. In *Ugeskrift for Laeger* (Vol. 159, Issue January). Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings.
- Mairhofer, J., Scharl, T., Marisch, K., Cserjan-Puschmann, M., & Striedner, G. (2013).** Comparative transcription profiling and in-depth characterization of plasmid-based and plasmid-free *Escherichia coli* expression systems under production conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3802–3812.
- Makrides, S. C. (1996).** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 60(3), 512–538.
- Malin, G., Iakobashvili, R., & Lapidot, A. (1999).** Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. *J Biol Chem*, 274(11), 6920–6929.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., & Sharma, P. K. (2010).** High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), 22–26.
- Manzanera, M., Vilchez, S., & Tunnacliffe, A. (2004).** High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiology Letters*, 233(2), 347–352.
- 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(1).
- Martin, D. D., Ciulla, R. A., & Roberts, M. F. (1999).** Osmoadaptation in archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1815–1825.
- 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.
- McDowell, D. G., Burns, N. A., & Parkes, H. C. (1998).** Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research*, 26(14), 3340–3347.

- McLaggan, D., Logan, T. M., Lynn, D. G., & Epstein, W. (1990).** Involvement of  $\gamma$ -glutamyl peptides in osmoadaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3631–3636.
- Meffert, A. (2011).** Die Hydroxylierung von Ectoin und Derivaten durch die Hydroxylase EctD aus *Halomonas elongata*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Meister, A. (1988).** Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17205–17208.
- Migueluez, E., & Gilmour, D. J. (1994).** Regulation of cell volume in the salt tolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Letters in Applied Microbiology*, 19(5), 363–365.
- Mika, J. T., Schavemaker, P. E., Krasnikov, V., & Poolman, B. (2014).** Impact of osmotic stress on protein diffusion in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 94(4), 857–870.
- Miller, M. L., & Ojima, I. (2001).** Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chemical Records*, 1(3), 195–211.
- Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S. D., Chang, H. Y., El-Gebali, S., Fraser, M. I., Gough, J., Haft, D. R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., ... Finn, R. D. (2019).** InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D351–D360.
- Miyaki, T., Tenmyo, O., Numata, K. I., Matsumoto, K., Yamamoto, H., Nishiyama, Y., Ohbayashi, M., Imanishi, H., Konishi, M., & Kawaguchi, H. (1981).** Tallysomycin, A new antitumor antibiotic complex related to bleomycin. *Journal of Antibiotics*, 34(6), 658–664.
- Möller, C. M. (2011).** Heterologe Expression von Biosynthesegenen für kompatible Solute. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Moritz, K. D. (2018).** *Escherichia coli* und *Synechocystis sp.* als heterologe Produktionssysteme für Ectoin und Hydroxyectoin. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Mothes, G., Schubert, T., Harms, H., & Maskow, T. (2008).** Biotechnological coproduction of compatible solutes and polyhydroxyalkanoates using the Genus *Halomonas*. *Engineering in Life Sciences*, 8(6), 658–662.
- Müller, S., Hoffmann, T., Santos, H., Saum, S. H., Bremer, E., & Müller, V. (2011).** Bacterial *abl*-like genes: Production of the archaeal osmolyte N $\epsilon$ -acetyl- $\beta$ -lysine by homologous overexpression of the *yodP-kamA* genes in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 689–697.
- 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 Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263–273.
- Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2008).** Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1124–1135.
- Nakamura, L. K., Roberts, M. S., & Cohan, F. M. (1999).** Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis subsp subtilis subsp nov* and *Bacillus subtilis subsp spizizenii subsp nov*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1211–1215.
- Nakamura, Y. (2000).** Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 292–292.
- Newton, G., Buchmeier, N., & Fahey, R. C. (2008).** Biosynthesis and Functions of Mycothiol, the Unique Protective Thiol of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 471–494.



- Newton, G. L., Rawat, M., La Clair, J., Jothivasan, V. K., Budiarto, T., Hamilton, C. J., Claiborne, A., Helmann, J. D., & Fahey, R. (2009).** Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nature Chemical Biology*, 5(9), 625–627.
- Nijenhuis, I., Nikolausz, M., Köth, A., Felföldi, T., Weiss, H., Drangmeister, J., Großmann, J., Kästner, M., & Richnow, H. H. (2007).** Assessment of the natural attenuation of chlorinated ethenes in an anaerobic contaminated aquifer in the Bitterfeld/Wolfen area using stable isotope techniques, microcosm studies and molecular biomarkers. *Chemosphere*, 67(2), 300–311.
- Nijenhuis, I., Stollberg, R., & Lechner, U. (2018).** Anaerobic microbial dehalogenation and its key players in the contaminated Bitterfeld-Wolfen megasite. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(4).
- 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.
- Nomoto, S., Teshima, T., Wakamiya, T., & Shiba, T. (1977).** The revised structure of capreomycin. *The Journal of Antibiotics*, 30(11), 955–959.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., & Mierendorf, R. (2001).** Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *InNovations*, 12, 1–3.
- Oktyabrskii, O. N., & Smirnova, G. V. (2012).** Redox potential changes in bacterial cultures under stress conditions. *Microbiology*, 81(2), 131–142.
- 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(3), 217–223.
- Orthen, B., Popp, M., & Smirnoff, N. (1994).** Hydroxyl radical scavenging properties of cyclitols. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences*, 102, 269–272.
- Overmann, J. (2001).** Green sulfur bacteria. In G. Garrity & J. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1* (pp. 601–623). Williams and Wilkins.
- Panicker, I. S., Browning, G. F., & Markham, P. F. (2015).** The effect of an alternate start codon on heterologous expression of a PhoA fusion protein in mycoplasma gallisepticum. *PLoS ONE*, 10(5).
- Parrilli, E., Duilio, A., & Tutino, M. L. (2008).** Heterologous protein expression in psychrophilic hosts. In *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* (pp. 365–379).
- Parte, A. C. (2014).** LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 42(D1).
- 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(6), 782–801.
- Pathania, A., & Sardesai, A. A. (2015).** Distinct paths for basic amino acid export in *Escherichia coli*: YbjE (LysO) mediates export of L-lysine. *Journal of Bacteriology*, 197(12), 2036–2047.
- Peters, P., Galinski, E. A., & Truper, H. G. (1990).** The Biosynthesis of Ectoine. *FEMS Microbiol Lett*, 71(1–2), 157–162.
- Petrovich, R. M., Ruzicka, F. J., Reed, G. H., & Frey, P. A. (1991).** Metal cofactors of lysine-2,3-aminomutase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(12), 7656–7660.
- Pflüger, K., Baumann, S., Gottschalk, G., Lin, W., Santos, H., & Müller, V. (2003).** Lysine-2,3-Aminomutase and  $\beta$ -Lysine Acetyltransferase Genes of Methanogenic Archaea Are Salt Induced and Are Essential for the Biosynthesis of N $\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -Lysine and Growth at High Salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6047–6055.

- Pflüger, K., Ehrenreich, A., Salmon, K., Gunsalus, R. P., Deppenmeier, U., Gottschalk, G., & Müller, V. (2007).** Identification of genes involved in salt adaptation in the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 using genome-wide gene expression profiling. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 79–89.
- Phue, J. N., Noronha, S. B., Hattacharyya, R., Wolfe, A. J., & Shiloach, J. (2005).** Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: Differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(7), 805–820.
- Pingoud, A., & Jeltsch, A. (1997).** Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *European Journal of Biochemistry*, 246(1), 1–22.
- Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J., & De Jong, H. (2019).** Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate. *Journal of Bacteriology*, 201(13).
- Pollard, A., & Wyn Jones, R. G. (1979).** Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta*, 144(3), 291–298.
- Postma, P. W., Epstein, W., Schuitema, A. R. J., & Nelson, S. O. (1984).** Interaction between III(Glc) of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and glycerol kinase of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 158(1), 351–353.
- Prabhu, J., Schauwecker, F., Grammel, N., Keller, U., & Bernhard, M. (2004).** Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3130–3132.
- Record, M. T., Lohman, T. M., & Hase, P. de. (1976).** Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *Journal of Molecular Biology*, 107(2), 145–158.
- Record, M. T., Woodbury, C. P., & Lohman, T. M. (1976).** Na<sup>+</sup> effects on transitions of DNA and polynucleotides of variable linear charge density. *Biopolymers*, 15(5), 893–915.
- Rees, W. A., Korte, J., Von Hippel, P. H., & Yager, T. D. (1993).** Betaine Can Eliminate the Base Pair Composition Dependence of DNA Melting. *Biochemistry*, 32(1), 137–144.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., & Gatto, E. (2000).** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. *Journal of Biomedical Science*, 7(6), 444–458.
- Ren, Q., Henes, B., Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L. (2013).** High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 13.
- Riggs, A D, Suzuki, H., & Bourgeois, S. (1970).** Lac repressor-operator interaction. I. Equilibrium studies. *Journal of Molecular Biology*, 48(1), 67–83.
- Riggs, Arthur D., Bourgeois, S., & Cohn, M. (1970).** The lac repressor-operator interaction. III. Kinetic studies. *Journal of Molecular Biology*, 53(3), 401–417.
- Roberts, M. F. (2005).** Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1, 5.
- Robertson, D. E., Lai, M. C., Gunsalus, R. P., & Roberts, M. F. (1992).** Composition, variation, and dynamics of major osmotic solutes in *Methanohalophilus* strain FDF1. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2438–2443.
- Robertson, D. E., Noll, D., & Roberts, M. F. (1992).** Free amino acid dynamics in marine methanogens.  $\beta$ -amino acids as compatible solutes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14893–14901.
- Rocha, E. P. C., Danchin, A., & Viari, A. (1999).** Translation in *Bacillus subtilis*: Roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Research*, 27(17), 3567–3576.

- Rodríguez-Sáiz, M., Sánchez-Porro, C., De La Fuente, J. L., Mellado, E., & Barredo, J. L. (2007).** Engineering the halophilic bacterium *Halomonas elongata* to produce  $\beta$ -carotene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 637–643.
- Roeßler, M., & Müller, V. (2001).** Osmoadaptation in bacteria and archaea: Common principles and differences. *Environmental Microbiology*, 3(12), 743–754.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR).
- Ruzicka, F. J., & Frey, P. A. (2010).** Kinetic and spectroscopic evidence of negative cooperativity in the action of lysine 2,3-aminomutase. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(49), 16118–16124.
- Ruzicka, F. J., Lieder, K. W., & Frey, P. A. (2000).** Lysine 2,3-aminomutase from *Clostridium subterminale* SB4: Mass spectral characterization of cyanogen bromide-treated peptides and cloning, sequencing, and expression of the gene kamA in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(2), 469–476.
- Sabir, A. M., Moloy, M., & Bhasin, P. S. (2016).** HPLC Method Development and Validation: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 39–46.
- Sabzghabae, A., Moazen, F., Mousavian, Z., & Sadeghi, H. M. (2014).** Polymerase chain reaction amplification of a GC rich region by adding 1,2 propanediol. *Advanced Biomedical Research*, 3(1), 65.
- Salis, H. M., Mirsky, E. A., & Voigt, C. A. (2009).** Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotechnol*, 27(10), 946–950.
- Sauer, U., Lasko, D. R., Fiaux, J., Hochuli, M., Glaser, R., Szyperski, T., Wüthrich, K., & Bailey, J. E. (1999).** Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *Journal of Bacteriology*, 181(21), 6679–6688.
- Saum, R., Mingote, A., Santos, H., & Müller, V. (2009).** A novel limb in the osmoregulatory network of *Methanosarcina mazei* Gö1: N $\epsilon$ -acetyl- $\beta$ -lysine can be substituted by glutamate and alanine. *Environmental Microbiology*, 11(5), 1056–1065.
- Sawada, Y., & Taniyama, H. (1977).** Studies on the  $\beta$ -Lysine Peptide. IV. Preparation of Semi-synthetic Racemomycins and Their Antimicrobial Activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 25(6), 1302–1305.
- Schmidt, F. R. (2004).** Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 363–372.
- Schnoor, M., Voß, P., Cullen, P., Böking, T., Galla, H. J., Galinski, E. A., & Lorkowski, S. (2004).** Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(3), 867–872.
- Schroter, M. A., Meyer, S., Hahn, M. B., Solomun, T., Sturm, H., & Kunte, H. J. (2017).** Ectoine protects DNA from damage by ionizing radiation. *Sci Rep*, 7(1), 15272.
- Schrötter, A. S. (2016).** Untersuchung konstitutiver Promotoren in *Halomonas elongata*. Bachelorarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- 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(10), 3343–3347.
- Schwarz, T., Lentzen, G., & Krutmann, J. (2006a).** Ectoin und/oder Hydroxyectoin zur Prophylaxe und Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Patent No. EP 1 858 519 B1).
- Schwarz, T., Lentzen, G., & Krutmann, J. (2006b).** Kompatible Solute enthaltende Mittel zur oralen Verwendung (Patent No. EP1858519A2).

- Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., Rampp, M., Schuster, S. C., Klenk, H. P., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D., & Kunte, H. J. (2011).** A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581<sup>T</sup>. *Environ Microbiol*, 13(8), 1973–1994.
- Selleck, W., & Tan, S. (2008).** Recombinant protein complex expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, SUPPL. 52.
- Seltmann, G. (1989).** Biochemical aspects of the resistance to nourseothricin (streptothricin) of *Escherichia coli* strains. *Journal of Basic Microbiology*, 29(8), 547–559.
- Semrad, K., & Green, R. (2002).** Osmolytes stimulate the reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of *Escherichia coli* 23S rRNA. *RNA*, 8(4), 401–411.
- Sharma, S. V., Jothivasan, V. K., Newton, G. L., Upton, H., Wakabayashi, J. I., Kane, M. G., Roberts, A. A., Rawat, M., La Clair, J. J., & Hamilton, C. J. (2011).** Chemical and chemoenzymatic syntheses of bacillithiol: A unique low-molecular-weight thiol amongst low G + C gram-positive bacteria. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(31), 7101–7104.
- Shaw, W. V. (1983).** Chloramphenicol acetyltransferase: Enzymology and molecular biology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 14(1), 1–46.
- Sheikhpour, M., Ahangari, G., Sadeghizadeh, M., & Arabi, I. (2014).** Antiproliferative effects of Ectoine and Hydroxyectoine on human lung cancer cells. *J Cancer Sci Ther*, 6(10).
- Shen, W.-H., & Hohn, B. (1992).** DMSO improves PCR amplification of DNA with complex secondary structure. *Trends in Genetics*, 8(7), 228.
- Shiloach, J., & Fass, R. (2005).** Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23(5), 345–357.
- Sieben, M., Steinhorn, G., Müller, C., Fuchs, S., Ann Chin, L., Regestein, L., & Büchs, J. (2016).** Testing plasmid stability of *Escherichia coli* using the Continuously Operated Shaken BIOreactor System. *Biotechnology Progress*, 32(6), 1418–1425.
- Simon, R., Priefer, U., & Puhler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotech*, 1(9), 784–791.
- Smirnova, G. V., Krasnykh, T. A., & Oktyabrsky, O. N. (2001).** Role of glutathione in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress. *Biochemistry (Moscow)*, 66(9), 973–978.
- Snyder, L. R. (2000).** HPLC: Past and Present. *Analytical Chemistry*, 72(11), 412A-420A.
- Sofia, H. J. (2001).** Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Research*, 29(5), 1097–1106.
- Soini, J., Ukkonen, K., & Neubauer, P. (2008).** High cell density media for *Escherichia coli* are generally designed for aerobic cultivations - Consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. *Microbial Cell Factories*, 7.
- Solovyev, V., & Salamov, A. (2011).** Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (Li, R.W., pp. 61–78). Nova Science Publishers.
- Song, K. B., & Frey, P. A. (1991).** Molecular properties of lysine-2,3-aminomutase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(12), 7651–7655.
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005).** Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128.

- Sowers, K. R., & Gunsalus, R. P. (1995).** Halotolerance in *Methanosarcina* spp.: Role of N( $\epsilon$ )-acetyl- $\beta$ -lysine,  $\alpha$ - glutamate, glycine betaine, and K<sup>+</sup> as compatible solutes for osmotic adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4382–4388.
- Sowers, Kevin R., Robertson, D. E., Noll, D., Gunsalus, R. P., & Roberts, M. F. (1990).** N $\epsilon$ -Acetyl- $\beta$ -lysine: An osmolyte synthesized by methanogenic archaeobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(23), 9083–9087.
- Spencer, M. E., & Guest, J. R. (1973).** Isolation and properties of fumarate reductase mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 114(2), 563–570.
- Spiess, A. N., & Ivell, R. (2002).** A highly efficient method for long-chain cDNA synthesis using trehalose and betaine. *Analytical Biochemistry*, 301(2), 168–174.
- Spiess, A. N., Mueller, N., & Ivell, R. (2004).** Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of taq polymerase by the disaccharide trehalose. *Clinical Chemistry*, 50(7), 1256–1259.
- Spiteller, P., & Von Nussbaum, F. (2005).**  $\beta$ -Amino Acids in Natural Products. In *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids: Second Edition* (pp. 19–91).
- Stadtman, T. C. (2006).** Lysine Metabolism by Clostridia. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Vol. 38, pp. 413–448).
- Stephenson, F. . (2010).** Calculations for Molecular Biology and Biotechnology. In *Molecular Biology and Biotechnology* (pp. 165–209).
- Stiller, L. M., Galinski, E. A., & Witt, E. M. H. J. (2018).** Engineering the Salt-Inducible Ectoine Promoter Region of *Halomonas elongata* for Protein Expression in a Unique Stabilizing Environment. *Genes*, 9(4), 184.
- Stouthamer, A. H. (1973).** A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie van Leeuwenhoek*, 39(1), 545–565.
- Street, T. O., Bolen, D. W., & Rose, G. D. (2006).** A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(38), 13997–14002.
- Street, T. O., Krukenberg, K. A., Rosgen, J., Bolen, D. W., & Agard, D. A. (2010).** Osmolyte-induced conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. *Protein Science*, 19(1), 57–65.
- Struhl, K., & Magasanik, B. (1976).** Ammonia-sensitive mutant of *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol*, 126(2), 739–742.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130.
- Subramaniam, A. R., Zid, B. M., & O’Shea, E. K. (2014).** An integrated approach reveals regulatory controls on bacterial translation elongation. *Cell*, 159(5), 1200–1211.
- Sussman, J. K., Simons, E. L., & Simons, R. W. (1996).** *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. *Molecular Microbiology*, 21(2), 347–360.
- Sydlik, U., Peuschel, H., Paunel-Gorgulu, A., Keymel, S., Kramer, U., Weissenberg, A., Kroker, M., Seghrouchni, S., Heiss, C., Windolf, J., Bilstein, A., Kelm, M., Krutmann, J., & Unfried, K. (2013).** Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: A new strategy against lung inflammation. *European Respiratory Journal*, 41(2), 433–442.
- Takimura, Y., Kato, M., Ohta, T., Yamagata, H., & Udaka, S. (1997).** Secretion of human interleukin-2 in biologically active form by *Bacillus brevis* directly into culture medium. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61(11), 1858–1861.

- Tan, Z. J., & Chen, S. J. (2006).** Nucleic acid helix stability: Effects of salt concentration, cation valence and size, and chain length. *Biophysical Journal*, 90(4), 1175–1190.
- Tang, K. H., Casarez, A. D., Wu, W., & Frey, P. A. (2003).** Kinetic and biochemical analysis of the mechanism of action of lysine 5,6-aminomutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 418(1), 49–54.
- Tappe, D., Valenza, G., Duwe, T., Koebe, H. G., Frosch, M., & Abele-Horn, M. (2009).** *Clostridium subterminale* infection secondary to an open fracture. *Infections in Medicine*, 26(1), 28–30.
- Tartof, K., & Hobbs, C. (1987).** Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Laboratories Focus*, 9(12).
- Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., & Persson, A. (2010).** Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). *Protein Expression and Purification*, 69(2), 159–167.
- Terpe, K. (2006).** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(2), 211–222.
- Terry, B. J., Jack, W. E., & Modrich, P. (1985).** Facilitated diffusion during catalysis by *EcoRI* endonuclease. Nonspecific interactions in *EcoRI* catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 260(24), 13130–13137.
- Tetsch, L. (2001).** Aufreinigung und Charakterisierung von TeaA, dem Substratbindeprotein des osmoregulierten Ectoitransporters TeaABC. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Thind, S. K., & Preis, J. I. (2014).** *Clostridium subterminale* septicemia in a patient with esophageal cancer. *IDCases*, 1(3), 47–49.
- Triadó-Margarit, X., Vila, X., & Galinski, E. A. (2011).** Osmoadaptative accumulation of Nε-acetyl-β-lysine in green sulfur bacteria and *Bacillus cereus* CECT 148T. *FEMS Microbiol Lett*, 318(2), 159–167.
- Trüper, H. G., & Pfennig, N. (1992).** The Family *Chlorobiaceae*. In A. Balows, H. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, & K. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria* (pp. 3583–3592). Springer-Verlag.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., & Okami, Y. (1966).** New antibiotics, bleomycin A and B. *Journal of Antibiotics*, 19(5), 200–209.
- Uden, G., & Kleefeld, A. (2004).** C4-Dicarboxylate Degradation in Aerobic and Anaerobic Growth. *EcoSal Plus*, 1(1).
- Unfried, K., Sydlik, U., Peuschel, H., Albrecht, C., Bilstein, A., & Krutmann, J. (2010).** The compatible solute ectoine prevents neutrophilic lung inflammation induced by environmental model nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters*, 196, S67.
- Unfried, Klaus, Krämer, U., Sydlik, U., Autengruber, A., Bilstein, A., Stolz, S., Marini, A., Schikowski, T., Keymel, S., & Krutmann, J. (2016).** Reduction of neutrophilic lung inflammation by inhalation of the compatible solute ectoine: A randomized trial with elderly individuals. *International Journal of COPD*, 11(1), 2573–2583.
- Uy, R., & Wold, F. (1977).** Posttranslational covalent modification of proteins. *Science*, 198(4320), 890–896.
- Vanduinen, A. J., Winchell, K. R., Keithly, M. E., & Cook, P. D. (2015).** X-ray crystallographic structure of BshC, a unique enzyme involved in bacillithiol biosynthesis. *Biochemistry*, 54(2), 100–103.

- Varma, A., Boesch, B. W., & Palsson, B. O. (1993).** Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2465–2473.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2), 504–544.
- Voedisch, B., Menzel, C., Jordan, E., El-Ghezal, A., Schirrmann, T., Hust, M., & Jostock, T. (2005).** Heterologe Expression von rekombinanten Proteinpharmazeutika. *Laborwelt*, 6.
- Völker, J., Klump, H. H., Manning, G. S., & Breslauer, K. J. (2001).** Counterion association with native and denatured nucleic acids: An experimental approach. *Journal of Molecular Biology*, 310(5), 1011–1025.
- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L., & Elliot, E. (1980).** *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30(2), 485–495.
- Vreeland, R. H., Mierau, B. D., Litchfield, C. D., & Martin, E. L. (1983).** Relationship of the internal solute composition to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(4), 407–414.
- Wagner, A., Segler, L., Kleinsteuber, S., Sawers, G., Smidt, H., & Lechner, U. (2013).** Regulation of reductive dehalogenase gene transcription in *Dehalococcoides mccartyi*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1616).
- Waksman, S. A., & Woodruff, H. B. (1942).** Streptothricin, a New Selective Bacteriostatic and Bactericidal Agent, Particularly Active Against Gram-Negative Bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 49(2), 207–210.
- Wang, J. (1996).** DNA Topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 65(1), 635–692.
- Wang, L., Zhou, Y. J., Ji, D., & Zhao, Z. K. (2013).** An accurate method for estimation of the intracellular aqueous volume of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods*, 93(2), 73–76.
- Wang, S. C., & Frey, P. A. (2007).** S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(3), 101–110.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & Mcphail, A. T. (1971).** Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327.
- Ward, M., Lin, C., Victoria, D. C., Fox, B. P., Fox, J. A., Wong, D. L., Meerman, H. J., Pucci, J. P., Fong, R. B., Heng, M. H., Tsurushita, N., Gieswein, C., Park, M., & Wang, H. (2004).** Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*, 70(5), 2567–2576.
- Whatmore, A. M., & Reed, R. H. (1990).** Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: A possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *Journal of General Microbiology*, 136(12), 2521–2526.
- Whysner, J., Reddy, M. V., Ross, P. M., Mohan, M., & Lax, E. A. (2004).** Genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 566(2), 99–130.
- Witt, E. (2011).** Nebenreaktionen der Ectoin-Synthese aus *Halomonas elongata* DSM 2581<sup>T</sup> und Entwicklung eines salzinduzierten Expressionssystems. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Witt, E. M. H. J., Grün, A., Kurz, M., & Galinski, E. A. (2011).** Engineered salt-induced ectoine promoter for use in *H. elongata* as halophilic expression system. (Conference Poster).

- 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(4), 705–712.
- Wu, B., Szymanski, W., Heberling, M. M., Feringa, B. L., & Janssen, D. B. (2011).** Aminomutases: mechanistic diversity, biotechnological applications and future perspectives. *Trends Biotechnol.*, 29(7), 352–362.
- Yang, X., Strobel, G., Stierle, A., Hess, W. M., Lee, J., & Clardy, J. (1994).** A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. *Plant Science*, 102(1), 1–9.
- Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2007).** Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 213–219.
- Yu, B. P. (1994).** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139–162.
- Yurtsev, E. A., Chao, H., Datta, M., Artemova, T., & Gore, J. (2013).** Bacterial cheating drives the population dynamics of cooperative antibiotic resistance plasmids. *Molecular Systems Biology*, 9.
- Zabin, I., & Fowler, A. V. (1970).**  $\beta$ -galactosidase and thiogalactoside transacetylase. In J. R. Beckwith & D. Zipser (Eds.), *The Lactose Operon* (pp. 27–47). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zappia, V., & Barker, H. A. (1970).** Studies on lysine-2,3-aminomutase. Subunit structure and sulfhydryl groups. *Biochimica et Biophysica Acta*, 207(3), 505–513.
- Zhu, M. M., Lawman, P. D., & Cameron, D. C. (2002).** Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. *Biotechnology Progress*, 18(4), 694–699.
- Zientz, E., Bongaerts, J., & Udden, G. (1998).** Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 180(20), 5421–5425.
- Zwaig, N., & Lin, E. C. C. (1966).** Feedback inhibition of glycerol kinase, a catabolic enzyme in *Escherichia coli*. *Science*, 153(3737), 755–757.



## Publikationsliste

### Veröffentlichungen

**Stiller, LM; Witt, EMHJ; Galinski, EA (2018)** Engineering the salt-Inducible ectoine promoter region of *Halomonas elongata* for protein expression in a unique stabilizing environment. *Genes* 2018, 9 (4), S. 184

### Poster

**Stiller, LM; Galinski, EA; Witt, EMHJ (2016)** Systematic molecular optimization of heterologous protein production in the halophilic *Halomonas elongata*. VAAM-Jahrestagung 2016, Jena, Deutschland

**Stiller, LM; Galinski, EA; Witt, EMHJ (2014)** *Halomonas elongata* as a novel host for the heterologous production of proteins in a unique stabilizing environment. VAAM-Jahrestagung 2014, Dresden, Deutschland