

Biochemie

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

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Christian Egler

aus Herten

- 2004 -

Dekan:

Prof. Dr. Jens Leker

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Erwin A.Galinski

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Hans-Joachim Galla

Tag der mündlichen Prüfungen : 16.11.2004, 29.11.2004 und 01.12.2004

Tag der Promotion : 01.12.2004

Meinem Sternchen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Grundlagen der Osmoadaptation	2
1.1.1. Akkumulation von anorganischen Elektrolyten („salt-in-cytoplasm“- Typ)	4
1.1.2. Akkumulation von organischen Soluten („organic-osmolyte“-Typ)	4
1.1.2.1. Weitergehende Anpassungen	6
1.2. Osmotischer Schock	7
1.3. Biosynthese von Ectoin	9
1.4. Heterologe Expressionssysteme	10
1.5. Ziele der Arbeit	12
2. Materialien und Methoden	14
2.1. Organismen	14
2.2. Plasmide	15
2.3. Nährmedien	15
2.3.1. Minimalmedium MM63 nach Miller (Larsen <i>et al.</i> , 1987)	16
2.3.2. Komplexmedium LB (Luria Bertani Medium) (Miller, 1992)	16
2.3.3. Fischpepton Medium (Frings, 1995)	17
2.3.4. Agarplatten	17
2.4. Puffer und Lösungen	18
2.4.1. Vitaminlösung VA (Imhoff und Trüper, 1977)	18
2.4.2. Puffer für die Agarosegelelektrophorese	18
2.4.2.1. TAE-Puffer	18
2.4.2.2. Ladepuffer	18
2.4.3. Puffer für die Herstellung kompetenter Zellen (Hanahan, 1983)	18
2.4.3.1. TFB1-Lösung	18

2.4.3.2.	TFB2-Lösung	19
2.4.4.	TELT-Lösung für die Plasmidisolierung	19
2.4.5.	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	19
2.4.5.1.	Acrylamid/Bis-Acrylamid-Mix	19
2.4.5.2.	SDS-Sammelgelpuffer	19
2.4.5.3.	SDS-Trenngelpuffer	19
2.4.5.4.	APS-Lösung (40% (w/v))	20
2.4.5.5.	4x SDS-Auftragspuffer	20
2.4.5.6.	SDS-Laufpuffer	20
2.4.5.7.	Coomassie-Färbelösung	20
2.4.5.8.	Coomassie-Entfärbelösung	20
2.4.6.	Puffer für die Proteinaufreinigung	21
2.4.6.1.	Aufreinigung-Lysispuffer	21
2.4.6.2.	Aufreinigung-Waschpuffer	21
2.4.6.3.	Aufreinigung-Elutionspuffer	21
2.4.7.	Lösungen für den BCA-Test	22
2.4.7.1.	BCA-Lösung	22
2.4.7.2.	Albumin-Stammlösungen	22
2.4.8.	Puffer und Lösungen für die Bestimmung organischer Solute	22
2.4.8.1.	Extraktionslösung (Bligh & Dyer-Lösung)	22
2.4.9.	Lösungen für die isokratische HPLC	22
2.4.9.1.	Laufmittel	22
2.4.10.	Puffer und Lösungen für die Fmoc-HPLC	22
2.4.10.1.	Na-Boratpuffer	22
2.4.10.2.	interner Standard Taurin	23
2.4.10.3.	Fmoc-Lösung	23
2.4.10.4.	ADAM-Lösung	23
2.4.10.5.	Laufmittel A	23
2.4.10.6.	Laufmittel B	23

2.5. Anzucht und Kultivierung der Mikroorganismen	23
2.5.1. Stammhaltung	23
2.5.1.1. <i>Escherichia coli</i>	23
2.5.1.2. <i>Marinococcus halophilus</i>	23
2.5.2. Anzucht von <i>E. coli</i>	24
2.5.2.1. Vorkulturen	24
2.5.2.2. Hauptkulturen für Plasmidisolierung und Proteingewinnung	24
2.5.3. Anzucht von <i>Marinococcus halophilus</i>	24
2.5.3.1. Vorkulturen	24
2.5.3.2. Hauptkulturen für Salzschockversuche und die Untersuchung adaptierter Kulturen	24
2.5.4. Zellernte	24
2.6. Molekularbiologische Methoden	25
2.6.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	25
2.6.2. Plasmid-DNA-Isolierung	25
2.6.2.1. TELT-Methode	25
2.6.2.2. Plasmid-Präparations-Kits	26
2.6.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	26
2.6.4. Enzymatische Modifikation von DNA	26
2.6.5. PCR	26
2.6.5.1. Prinzip	26
2.6.5.2. Primer	27
2.6.5.3. Temperaturprogramm	27
2.6.6. Agarosegelelektrophorese	28
2.6.7. DNA-Isolierung durch Gelelution	28
2.6.8. Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	29
2.6.9. Restriktionsanalyse	29
2.6.10. Sequenzierung	29
2.7. Proteinchemische Methoden	29
2.7.1. Expression	29

2.7.2. Zellaufschluss und Gewinnung des löslichen Gesamtzellproteins	30
2.7.3. Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose.....	30
2.7.4. Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Superflow (FPLC)	30
2.7.4.1. FPLC-Steuerungseinheit.....	30
2.7.4.2. Ni-NTA-Superflow-Säule und Durchführung der Chromatographie.....	31
2.7.5. Enzymatische Entfernung des Histidinüberhangs	31
2.7.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)	32
2.7.6.1. Herstellung des Gels	32
2.7.6.2. Durchführung der Elektrophorese	32
2.7.6.3. Coomassie Färbung	33
2.7.7. BCA-Test.....	33
2.7.8. Aufkonzentrierung	34
2.7.9. Pufferaustausch	34
2.7.10. Massenspektrometrie.....	34
2.8. Aktivitätsassays	34
2.8.1. Zusammensetzung der Reaktionsansätze	35
2.8.1.1. 2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase	35
2.8.1.2. Ectoin-Synthase	35
2.8.2. Nachweis von Thiol.....	35
2.8.3. Photometrische Untersuchungen.....	36
2.9. Bestimmung organischer Solute.....	36
2.9.1. Extraktion des Zellmaterials (Bligh und Dyer, 1959).....	37
2.9.2. Isokratische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Galinski und Herzog, 1990)	37
2.9.3. Fmoc-Aminosäureanalyse (Kunte <i>et al.</i> , 1992).....	38
2.10. Proteinkristallisation.....	39
2.11. Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes mit dem Farbstoff Snarf-1 im Fluoreszenzphotometer	40
2.11.1. Beladen der Zellen mit dem Farbstoff.....	41
2.11.2. Ausfluss des Farbstoffes aus den Bakterien	41

2.11.3. Kalibration des Systems	41
2.11.4. Messung des cytoplasmatischen pH-Wertes.....	43
2.12. Fluoreszenzmikroskopie	43
2.13. Chemikalien und Enzyme	44
2.14. Computerprogramme	46
2.14.1. Igor Pro	46
2.14.2. Clone Manager.....	46
3. Ergebnisse	47
3.1. Konstruktion der Expressionssysteme.....	47
3.1.1. pET-15b ectA	48
3.1.2. pET-15b ectB	49
3.1.3. pET-24d ectB	51
3.1.4. pET-24d ectC	52
3.2. Proteinaufreinigung	53
3.2.1. Nachweis der erfolgreichen Expression	54
3.2.2. Ermittlung der optimalen Aufreinigungsbedingungen.....	55
3.2.3. SDS-PAGE.....	55
3.2.4. Massenspektrometrie.....	57
3.2.5. Aktivitätsnachweis HPLC	58
3.2.6. Optimierung der Expressionsbedingungen.....	61
3.3. Charakterisierung der aufgereinigten Enzyme	63
3.3.1. Acetyltransferase	64
3.3.1.1. schneller Aktivitätstest.....	64
3.3.1.2. Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit	65
3.3.1.3. Einfluss des pH-Wertes.....	66
3.3.1.4. Einfluss der Salzkonzentration	67
3.3.1.5. Bestimmung kinetischer Daten.....	68
3.3.1.6. Bestimmung der cytoplasmatischen DABA-Konzentration.....	70
3.3.2. Ectoinsynthese.....	70

3.3.2.1.	schneller Aktivitätstest.....	71
3.3.2.2.	Einfluss des pH-Wertes.....	72
3.3.2.3.	Einfluss der Salzkonzentration.....	73
3.4.	FPLC-Aufreinigung.....	73
3.4.1.	<i>in-situ</i> Abspaltung des Histidüberhanges.....	75
3.5.	Kristallisationsexperimente.....	77
3.6.	Physiologische Arbeiten an <i>Marinococcus halophilus</i>	80
3.6.1.	Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von <i>M. halophilus</i>	81
3.7.	Fluoreszenzmethoden.....	82
3.7.1.	Entwicklung eines Anfärbeprotokolls.....	83
3.7.2.	Fluoreszenzmikroskopie.....	83
3.7.3.	Fluoreszenzspektroskopie.....	85
3.8.	pH-Homöostasis von <i>Marinococcus halophilus</i>	87
3.9.	Einfluss der externen Osmolaritätsänderung auf den cytoplasmatischen pH-Wert.....	89
4.	Diskussion.....	91
4.1.	Proteingewinnung durch heterologe Expression.....	91
4.2.	Regulation der Ectoin-Biosynthese.....	97
4.2.1.	Entwicklung der Enzymassays.....	98
4.2.2.	Cytoplasmatischer Salzgehalt als Regulator.....	100
4.2.3.	Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität.....	102
4.3.	Methoden zur Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes.....	105
4.4.	Wird die Ectoinbiosynthese durch den cytoplasmatischen pH-Wert reguliert?.....	108
4.5.	Ausblick.....	110
5.	Zusammenfassung.....	113
6.	Literaturverzeichnis.....	116
7.	Anhang.....	131
7.1.	Darstellung des Igor Moduls als kommentierter Programmcode.....	131

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Prozentualer Volumenanteil
% (w/v)	Prozentualer Massenanteil je Volumenanteil
A ₂₆₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines SerumAlbumin
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
dsDNA	Doppelsträngige DNA
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung; in Verbindung mit Massenangaben: Gramm
h	Stunde(n)
HIC	Hydrophobe InteraktionsChromatographie
L	Liter
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelsträngige DNA
T _m	Schmelztemperatur eines DNA-Doppelstranges
T _m [*]	Anlagerungstemperatur eines Primers
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

Viele Lebensformen auf der Erde sind so klein, dass sie als Mikroorganismen bezeichnet werden. Sie sind an jeder Stelle der Erdkruste anzutreffen, einschließlich der Tiefsee und der Atmosphäre. Dabei besiedeln Mikroorganismen auch ökologische Nischen, die sich durch einen oder mehrere ungünstige Umweltparameter auszeichnen. Diese Umweltbedingungen stellen für alle Lebensformen, die sich darin angesiedelt haben, Stressfaktoren dar, durch die ihr Wachstum begrenzt wird (Hecker *et al.*, 1996). Neben Schwankungen des Nährstoffangebotes, des pH-Wertes und der Temperatur ist auch die Osmolarität des Mediums ein Stressfaktor der besondere Anpassungen von Lebewesen erfordert, die sich in Habitaten mit erhöhtem Salzgehalt angesiedelt haben.

Zu den Lebensräumen mit erhöhter Salinität gehören Salzseen (Imhoff *et al.*, 1979; Post, 1977), saline Verdunstungsbecken (Vreeland *et al.*, 1980; Ventosa *et al.*, 1998) oder künstlich erzeugte Habitats wie eingepökelttes Fleisch (Vilhelmson *et al.*, 1996). Der Salzgehalt dieser Lebensräume variiert über einen weiten Bereich und kann von dem des Meerwassers (3 % Salz) bis zu dem einer gesättigten Natriumchloridlösung (30 %) reichen. Die Salzzusammensetzung dieser Standorte kann sich je nach deren Ursprung erheblich unterscheiden. Ist die Salinität thalassohaliner Standorte weitgehend durch Natriumchlorid bestimmt, so sind viele athalassohaline Salzseen reich an Calcium, Magnesium oder Carbonat (Ventosa *et al.*, 1998; Galinski, 1995). Zusätzlich kann die Salinität kontinuierlichen oder schlagartigen Änderungen unterliegen, wie sie beim Austrocknen eines Sees, bei der Vermischung von Wassermassen in Ästuarien oder bei heftigen Regenfällen auftreten. Eine Vielzahl an Mikroorganismen hat sich auf die besonderen Herausforderungen eingestellt, die einen salzhaltigen Lebensraum auszeichnen.

Zur Unterscheidung der Anpassung werden die Begriffe halotolerant und halophil verwendet. Halotolerante Organismen sind bei Salzgehalten $> 3\%$ Natriumchlorid noch zu Wachstum in der Lage, ihr Wachstumsoptimum liegt jedoch bei kleineren Salzkonzentrationen. Ein Beispiel für einen halotoleranten Mikroorganismus ist das marine, Gram-negative Bakterium *Halomonas elongata*, dessen Wachstumsoptimum bei etwa 3 % Salzgehalt ist. Liegt das Wachstumsoptimum bei Salzgehalten, die 3 % überschreiten, spricht man von einem halophilen Organismus. *Marinococcus halophilus* ist daher als halophiler Mikroorganismus zu bezeichnen, denn sein Wachstumsoptimum liegt zwischen 7,5 und 10 % Salzgehalt. *Escherichia coli* hat sein Wachstumsoptimum weit unter 3 % Salz und ist oberhalb dieses

Salzgehalts kaum zu Wachstum in der Lage. Deshalb ist dieses Bakterium weder halophil noch halotolerant.

1.1. Grundlagen der Osmoadaptation

Bakterienzellen sind von einer elastischen Zellwand umgeben, die für die meisten Ionen und niedermolekularen Substanzen permeabel ist. Eine Barriere für den Einstrom zahlreicher, im Wasser gelöster Substanzen wie Makromoleküle, Ionen und organische Verbindungen ist die semipermeable Cytoplasmamembran (Bovell *et al.*, 1963). Die Cytoplasmamembran ist jedoch für viele amphipatische Verbindungen wie Wasser, Glycerin und Ethanol durchlässig. Die Semipermeabilität der Cytoplasmamembran ist durch ihren Aufbau als Lipiddoppelschicht bedingt. Für die kontrollierte Aufnahme bestimmter Ionen und Moleküle wird sie von speziellen Proteinen durchspannt. Vereinfacht gesehen besteht die niedermolekulare Matrix des Cytoplasmas von Bakterienzellen aus einer wässrigen Lösung osmotisch aktiver Substanzen. Die Gesamtkonzentration der Osmolyte im Cytoplasma ist in der Regel höher als in der Umgebung der Zelle. Dies führt zu einem Wassereinstrom aus der Umgebung entlang des osmotischen Gradienten in die Zelle, so dass sich ein nach außen gegen die Zellwand gerichteter Druck, der Turgor, aufbaut (Wood, 1999). Die Aufrechterhaltung eines positiven Turgors ist unerlässlich für das Überleben der Zelle sowie die geregelte Zellteilung und stellt möglicherweise die mechanische Kraft für die Ausdehnung der Zellwand während des Zellwachstums dar (Koch, 1983; Höltje, 1998). Der Turgor Gram-positiver Bakterien beträgt ungefähr $20 \cdot 10^5$ Pa (Whatmore und Reed, 1990) und ist somit wesentlich höher als der Gram-negativer Mikroorganismen, welcher bei 3 bis $10 \cdot 10^5$ Pa liegt (Koch, 1984; Csonka, 1989). Die hohe Innendrucktoleranz Gram-positiver Bakterien ist vermutlich durch die Stabilität des elastischen Mureinsacculus bedingt, der aus über 25 Peptidoglykanschichten besteht (Whatmore und Reed, 1990). Änderungen der externen Osmolalität beeinflussen den Wasserstrom entlang des osmotischen Gradienten der Cytoplasmamembran. Dabei bewirken hyperosmolare Bedingungen einen Wasserausstrom aus der Zelle, wobei das Cytoplasma dehydriert. Unter besonders starkem osmotischem Stress bricht der Zellturgor zusammen und die Cytoplasmamembran löst sich von der Zellwand ab. Dieser als Plasmolyse bezeichnete Vorgang bewirkt eine Konzentrationserhöhung der cytoplasmatischen Inhaltsstoffe, wodurch in der entstehenden hochviskosen Umgebung zahlreiche physiologische Prozesse inhibiert werden (Meury, 1988; Csonka, 1989). Unter hypoosmolaren Bedingungen findet ein Wassereinstrom in das Cytoplasma statt, und der Turgor steigt. Die elastische aber dennoch stabile Zellwand der Bakterien ist in der Lage dem erhöhten Innendruck über einen gewissen Bereich

standzuhalten (Carpita, 1985). Darüber hinaus sind Bakterien bemüht, über mechanosensitive Kanäle osmotisch aktive Zellinhaltsstoffe aus dem Cytoplasma auszuschleusen, um das Bersten der Zelle unter extrem hypoosmotischen Bedingungen zu verhindern (Poolman und Glaasker, 1998; Booth und Louis, 1999).

Mikroorganismen besitzen keine Systeme für eine aktive Wasseraufnahme. Daher erfolgt der Wasserstrom über die Cytoplasmamembran allein durch Diffusion und wird durch die osmotischen Drücke des Cytoplasmas und der Umgebung der Bakterienzelle bestimmt (Booth und Louis, 1999). Die einfache Diffusion des Wassers reicht aus, um osmotische Schwankungen auszugleichen.

Osmoadaptation bezeichnet die physiologische und genetische Anpassung eines Organismus an Standorte geringer Wasseraktivität (Galinski, 1995). Saline Standorte weisen eine hohe Ionenstärke und eine niedrige Wasseraktivität auf ($a_w=0,75$ für eine gesättigte Kochsalzlösung), und da die Cytoplasmamembran für Wasser frei permeabel ist, dehydrieren nicht angepasste Zellen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (Csonka, 1989). Dabei bewegt sich das Wasser stets von der Seite des höheren zu der des niedrigeren osmotischen Potentials. Ein Organismus, dessen Lebensraum einen erhöhten Salzgehalt aufweist, ist aufgrund der Semipermeabilität der Membran zu Anpassungsmechanismen gezwungen, um der Dehydrierung des Cytoplasmas entgegen zu wirken. Ein adaptierter Organismus muss in der Lage sein, die interne Wasseraktivität der externen anzupassen, damit sich ein osmotisches Gleichgewicht über die Membran einstellen kann (Galinski und Trüper, 1994). So wird ein Austritt von Wasser aus der Zelle verhindert.

Mikroorganismen sind durch mehrstufige Anpassungsprozesse in der Lage, aktiv auf eine erhöhte Osmolalität ihrer Umgebung zu reagieren (Galinski und Trüper, 1994; Csonka und Epstein, 1996). Ziel dieser Stressreaktion ist die Aufrechterhaltung eines positiven Turgors, um Stabilität und Teilungsfähigkeit der Zelle zu erhalten. Grundsätzlich lassen sich zwei Strategien unterscheiden, um den durch hochosmolare Umweltbedingungen hervorgerufenen Störungen des zellulären Wasserhaushaltes entgegen zu wirken. Sie werden als „salt-in“- und „organic-osmolyte“-Strategie bezeichnet.

1.1.1. Akkumulation von anorganischen Elektrolyten („salt-in-cytoplasm“-Typ)

Bei dieser Anpassungsstrategie akkumulieren die Organismen Salze im Cytoplasma. Die Ionenzusammensetzung des Cytoplasmas unterscheidet sich dabei jedoch deutlich von der der Umgebung, deren Salinität hauptsächlich durch hohe Natriumionenkonzentrationen zustande kommt. Extrem halophile Archaea (*Halobacteriaceae*) akkumulieren Kalium in molaren Konzentrationen im Zellinneren, so dass sich ein Kaliumionengradient der Größenordnung 100:1 über die Cytoplasmamembran ausbildet (Lanyi, 1974; Oren, 1986). Natriumchlorid bleibt dabei weitgehend aus dem Cytoplasma ausgeschlossen (Larsen *et al.*, 1987; Eisenberg *et al.*, 1992). Anaerobe halophile Bacteria der Ordnung *Halanaerobium* und einige strikt anaerobe Eubakterien der Ordnung *Halanaerobiales* (Oren *et al.*, 1997; Rengpipat *et al.*, 1988) sowie das kürzlich entdeckte aerobe Eubakterium *Salinibacter ruber* (Oren *et al.*, 2002) weisen ebenfalls eine hohe Elektrolytkonzentration im Cytoplasma auf. Auch sie können Kalium im Cytoplasma anreichern. Es wurden aber auch hohe cytoplasmatische Natriumionenkonzentrationen bestimmt, die häufig den Gehalt an Kalium übertrafen (Oren *et al.*, 1997; Oren, 1986). Da halophile, anaerobe *Bacteria* scheinbar so wenig Energie wie möglich in den Aufbau eines Ionengradienten investieren, weisen sie bereits in der exponentiellen Wachstumsphase hohe Natriumionenkonzentrationen auf. In der stationären Phase wird schließlich sogar, vermutlich aus Energiemangel, der Kaliumionengradient zugunsten hoher Natriumionenkonzentrationen abgebaut (Oren *et al.*, 1997). Die hohe intrazelluläre Ionenkonzentration verlangt eine Anpassungen des gesamten Zellapparates: die intrazellulären Biomoleküle wie Enzyme, Co-Faktoren und Ribosomen tragen zusätzliche negative Ladungen an den Oberflächen (Mevarech *et al.*, 2000) und besitzen eine sehr kompakte Struktur. Werden die Kationen entzogen, die diese Ladungen voneinander abschirmen, ist die Konformation und Aktivität der Proteine und Enzyme nicht länger gewährleistet (Mevarech *et al.*, 2000). Dadurch ist die Adaptionfähigkeit solcher extrem halophilen Organismen auf hochsaline Standorte beschränkt.

1.1.2. Akkumulation von organischen Soluten („organic-osmolyte“-Typ)

Eukaryotische Mikroorganismen wie die Grünalgen der Gattungen *Dunaliella salina* (Avron, 1986), Vertreter der methanogenen Archaea wie *Methanohalophilus* sp. (Lai *et al.*, 1991), sowie phototrophe und aerobe chemoheterotrophe *Bacteria* (Severin, 1993; Galinski, 1995; Ventosa *et al.*, 1998) akkumulieren zur Anpassung an saline Standorte organische

Verbindungen, die als kompatible Solute bezeichnet werden (Brown, 1976). Anorganische Ionen werden bei adaptierten Zellen dieses Typs weitgehend aus dem Cytoplasma ausgeschlossen.

Kompatible Solute besitzen ein geringes Molekulargewicht, sind bei physiologischem pH-Wert elektrisch neutral, aber polar und weisen sich durch eine hohe Löslichkeit in Wasser aus (Galinski, 1995), von den extrem thermophilen Bakterien sind darüber hinaus auch anionische kompatible Solute bekannt (da Costa *et al.*, 1998). Die Akkumulation erfolgt durch *de novo*-Synthese und durch Aufnahme aus dem Medium. Die Aufnahme der Solute wird, wenn beide Möglichkeiten offen stehen, bevorzugt, da sie energetisch günstiger ist. Stehen Transportsysteme für kompatible Solute zur Verfügung, reduziert sich die Energie deutlich, die für die Osmoadaptation aufgewandt werden muss, sobald brauchbare Verbindungen in der Umgebung vorhanden sind (Oren, 1999). Beide Mechanismen, *de novo*-Synthese und Aufnahme aus dem Medium, werden sowohl von halotoleranten als auch von halophilen Organismen verwirklicht (Galinski, 1995). So konnte in Glycinbetain produzierenden Cyanobakterien effiziente Glycinbetain-Transporter nachgewiesen werden (Moore *et al.*, 1987). Vergleichbare Glycinbetain-Transportsysteme konnten in *Halorhodospira halochloris* (Peters *et al.*, 1992) und in salz-toleranten und salzabhängigen methanogenen *Archaea* (Mikkat *et al.*, 1997; Hagemann *et al.*, 1997) gefunden werden. Im Fall von *Halomonas elongata* erfolgt der Transport von Ectoin über einen spezifischen Ectoin-Transporter (Grammann *et al.*, 2002). Kürzlich gelang die Entdeckung zweier Transportsysteme für kompatible Solute bei *M. halophilus*. Neben einem Transporter für Betain konnte auch ein Transportsystem für Ectoin identifiziert werden (Vermeulen und Kunte, 2004).

Die Bezeichnung kompatible Solute (Brown, 1976) beschreibt die Eigenschaft der Osmolyte, auch bei hohen cytoplasmatische Konzentrationen nicht mit dem Zellstoffwechsel zu interferieren. Kompatible Solute gehören verschiedenen Stoffklassen an, welche charakteristisch für die unterschiedliche Salztoleranz der jeweiligen Organismen sind:

Zucker (Trehalose und Saccharose) und Schwefelverbindungen (z.B. Dimethylsulfoniopropionat) sind typisch für nicht halophile und gemäßigt halotolerante Mikroorganismen. Solute dieser Gruppe werden durch Synthese in cytoplasmatischen Konzentrationen bis zu etwa 500 mM akkumuliert. Insbesondere Trehalose wird als allgemeiner Stressmetabolit angesehen (Van Laere, 1989; Wiemken, 1990) und wird auch von *E. coli* akkumuliert.

Polyole (Glycerol, Arabitol, Inositol) treten bei halophilen Pilzen sowie bei salz-toleranten Algen und Pflanzen auf (Wegmann, 1971; Ben-Amotz und Avron, 1973; Storey und Wyn Jones, 1977; Hocking und Norton, 1983).

Aminosäuren und Aminosäurederivate sind für Organismen mit erhöhter Salztoleranz charakteristisch und können in Konzentrationen über 500 mM akkumuliert werden. Dazu gehören Prolin, die Tetrahydropyrimidinderivate Ectoin (Galinski *et al.*, 1985) und Hydroxyectoin, Glycinbetain (Severin *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1990), acetylierte Diaminosäuren und Glutaminderivate (Galinski, 1995). Glycinbetain und Prolin wurden bisher sowohl in Bakterien als auch in Algen und Pflanzen nachgewiesen.

Werden die kompatiblen Solute nicht halophilen Bakterien, wie *Escherichia coli*, im Medium angeboten, so können diese Substanzen durch osmoregulierte Transporter ins Cytoplasma aufgenommen werden. Durch die Aktivität von Transportsystemen für kompatible Solute erlangen sogar nicht halotolerante Mikroorganismen wie *E. coli* eine gewisse Salztoleranz (Kempf und Bremer, 1998). Sie ersetzen dann Verbindungen wie Trehalose als kompatibles Solut. Die Salztoleranz von *E. coli* erhöht sich dadurch beispielsweise von 3,8 % auf über 5 % Natriumchlorid (Csonka und Epstein, 1996). Die Mehrzahl dieser Aufnahmesysteme zeichnet sich durch eine hohe Substrataffinität aus und wird auf Ebene der Transportaktivität und/oder auf Expressionsebene reguliert (Lucht und Bremer, 1994; Kempf und Bremer, 1998).

1.1.2.1. Weitergehende Anpassungen

Neben der Fähigkeit, kompatible Solute zu akkumulieren, zeichnen sich halophile Organismen durch Anpassungen der unmittelbar mit dem Außenmedium in Kontakt stehenden Strukturen wie Exoenzymen, periplasmatischen Proteinen und der Cytoplasmamembran an die Salinität aus. Dabei wirkt sich die Salinität besonders auf die Phospholipidzusammensetzung der Membran aus (Vreeland *et al.*, 1984; Imhoff und Thiemann, 1991). Mit steigender Salzkonzentration nimmt die Menge ungeladener Lipide, wie Phosphatidylethanolamin, ab, während der Anteil an negativ geladenen Lipiden etwa Phosphatidylglycerol zunimmt (Galinski, 1995). Die Veränderungen der Membranzusammensetzung dienen dem Erhalt der Membranfluidität und -stabilität. Diese Eigenschaften hängen von der Temperatur, dem pH-Wert und der Salinität ab. Ihre Regulation wirkt sich dabei vermutlich verlangsamernd auf physiologische Vorgänge und damit auch auf das Zellwachstum aus (Severin, 1993).

Organismen, die sich der „organic-osmolyte“-Strategie zur Osmoadaptation bedienen, besitzen daher intrazelluläre Makromoleküle deren Aktivität nicht auf hohe Ionenstärken beschränkt ist. Dadurch können sich diese Organismen an einen weiten Salinitätsbereich anpassen. Bedenkt man die hohen Energieaufwendungen im Vergleich zu einer „salt-in“-Strategie (Oren, 1999), dann ist es wahrscheinlich diese Flexibilität bei der Reaktion auf wechselnde Umweltbedingungen, die Organismen mit einer der „organic-osmolyte“-Strategie den nötigen Evolutionsvorteil verschafft und so zu der weiten Verbreitung dieser Art der Osmoadaptation geführt hat.

1.2. Osmotischer Schock

Eine plötzliche Änderung der externen Osmolarität wird als osmotischer Schock bezeichnet. Unter einem hyperosmotischen Schock wird dabei die schlagartige Erhöhung, unter einem hypoosmotischen Schock die Erniedrigung der externen Osmolarität verstanden. Ein hyperosmotischer Schock hat einen cytoplasmatischen Wasserverlust der Zelle zur Folge, wodurch sich das cytoplasmatische Volumen verringert. Im Extremfall setzt eine Plasmolyse ein, wobei sich die Membran von der Zellwand ablöst (Schwarz und Koch, 1995), der Organismus stirbt ab.

Nicht halophile Bakterien sind nur begrenzt in der Lage, auf osmotischen Stress zu reagieren. Die sogenannte Primärantwort auf einem hyperosmotischen Schock ist an *Escherichia coli* gut untersucht worden (Epstein und Schultz, 1965; Epstein, 1986; Csonka und Epstein, 1996). Bei steigender Osmolarität des Mediums akkumuliert *E. coli* im Cytoplasma zunächst K^+ -Ionen, um den Gradienten des osmotischen Potentials über die Membran auszugleichen (Cayley *et al.*, 1991). Als Gegenionen werden Glutamat, sowie in geringen Mengen γ -Glutamylglutamin und Glutathion synthetisiert oder aus dem Medium aufgenommen (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1990). Drei für die Aufnahme von Kaliumionen verantwortliche Transportsysteme sind bekannt, die konstitutiven Systeme TrkA und TrkD, sowie das osmoregulierte System Kdp (Dosch *et al.*, 1991; Altendorf und Epstein, 1994). Kdp, das Genprodukt des *kdpABC*-Operons unter Kontrolle der Gene *kdpD* und *kdpE*, ist eine ATPase mit hoher Affinität zu K^+ (Hesse *et al.*, 1984; Polarek *et al.*, 1992; Walderhaug *et al.*, 1992). Eine Genexpression erfolgt jedoch nur, wenn der Turgor der Zelle aufgrund eines unzureichenden Kaliumionentransports von TrkA und TrkD nicht aufrechterhalten werden kann (Sugiura *et al.*, 1994).

Die Akkumulation von Kaliumionen und organischen Gegenionen ist lediglich als eine erste Reaktion auf akuten osmotischen Stress anzusehen. Die Obergrenze dieser ersten

Stressantwort beschränkt sich auf niedrige Salinitäten bis 3 % Salz, was dem Salzgehalt des Meerwassers entspricht. Eine weitergehende Adaptation an osmotischen Stress erreicht *E. coli* nur durch die Akkumulation kompatibler Solute. Trehalose wird von *E. coli* in einer konzertierten Reaktion aus UDP-Glucose und Glucose-6-Monophosphat synthetisiert. Bei der Akkumulation kommt es jedoch nur unter Stickstoffmangel dazu, dass das vorhandene Glutamat ersetzt wird (Larsen *et al.*, 1987; Dinnbier *et al.*, 1988; Welsh *et al.*, 1991). Trehalose wird als ein allgemeiner Stressmetabolit angesehen (Van Laere, 1989; Wiemken, 1990). Die Genexpression der Enzyme des Biosyntheseweges von Trehalose, *otsA* und *otsB*, steht unter Kontrolle von *rpo^S*, welches den Sigmafaktor σ^S kodiert. Das Regulatorgen *rpo^S* wird in verschiedenen Stresssituationen, wie beispielsweise auch dem Nährstoffmangel in der stationären Phase, induziert (Lange und Hengge-Aronis, 1991; Hengge-Aronis *et al.*, 1991). Abgesehen von seiner Funktion als allgemeiner Stressmetabolit wird die Rolle der Trehalose bei der Osmoadaptation als eher untergeordnet angesehen (Galinski, 1995).

E. coli besitzt leistungsstarke Aufnahmesysteme für kompatible Solute wie Betain, Ectoin und verschiedene Aminosäuren. Die Akkumulation der kompatiblen Solute aus dem Medium ermöglicht es *Escherichia coli*, sich an Konzentrationen bis zu 6 % NaCl anzupassen. ProP und ProU sind zwei Transportsysteme, die es *E. coli* ermöglichen eine Vielzahl von Substraten aus dem Medium aufzunehmen (Lucht und Bremer, 1994).

Auch bei *Halomonas elongata*, einem halotoleranten, chemoorganotrophen Eubakterium (γ -Proteobakterien), dessen Hauptsolut Ectoin ist (Wohlfarth *et al.*, 1990), werden Kalium und Glutamat im Bereich niedriger Mediensalinität als Osmolyt eingesetzt. (Kraegeloh und Kunte, 2002). Mit zunehmender Salzkonzentration übernimmt jedoch Ectoin diese Rolle, und die Bedeutung von Kalium und Glutamat als Osmolyt tritt mehr und mehr in den Hintergrund. Als Primärantwort auf einen Salzschock spielen Kalium und Glutamat bei *Halomonas elongata* eine ähnliche Rolle wie in *E. coli*, statt Trehalose wird dann jedoch Ectoin synthetisiert (Kraegeloh und Kunte, 2002). Im Fall von *H. elongata* findet der Rücktransport von aus der Zelle diffundiertem Ectoin über einen spezifischen Ectoin-Transporter statt (Grammann *et al.*, 2002).

Bei *M. halophilus* gibt es wie bereits erwähnt neben einem Transporter für Betain auch ein Transportsystem für Ectoin (Vermeulen und Kunte, 2004). Nicht immer bietet sich für Bakterien bei hyperosmotischem Stress die Möglichkeit durch Aufnahme kompatibler Solute aus dem Medium das osmotische Gleichgewicht wiederherzustellen. Häufig sind diese nicht in der Umgebung des Bakteriums vorhanden oder durch Konkurrenten bereits aufgenommen. Dann bleibt nur der Ausweg der *de novo*-Synthese.

1.3. Biosynthese von Ectoin

Der Syntheseweg von Ectoin wurde erstmals auf Enzymebene an Gram-negativen halophilen Eubakterien aufgeklärt (Peters *et al.*, 1990).

L-Aspartat- β -semialdehyd, ein Intermediat des Aminosäurestoffwechsel von Lysin, Methionin und Isoleucin, wird durch drei enzymatische Reaktionen in Ectoin umgewandelt. Im ersten Schritt findet eine Transaminierung zu L-2,4-Diaminobuttersäure statt. Es folgt eine Acetylierung der γ -Aminogruppe zu N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure. In der abschließenden Kondensationsreaktion erfolgt schließlich der Ringschluss zu L-Ectoin. Eine grafische Darstellung der Ectoin-Biosynthese findet sich in Abbildung 1.

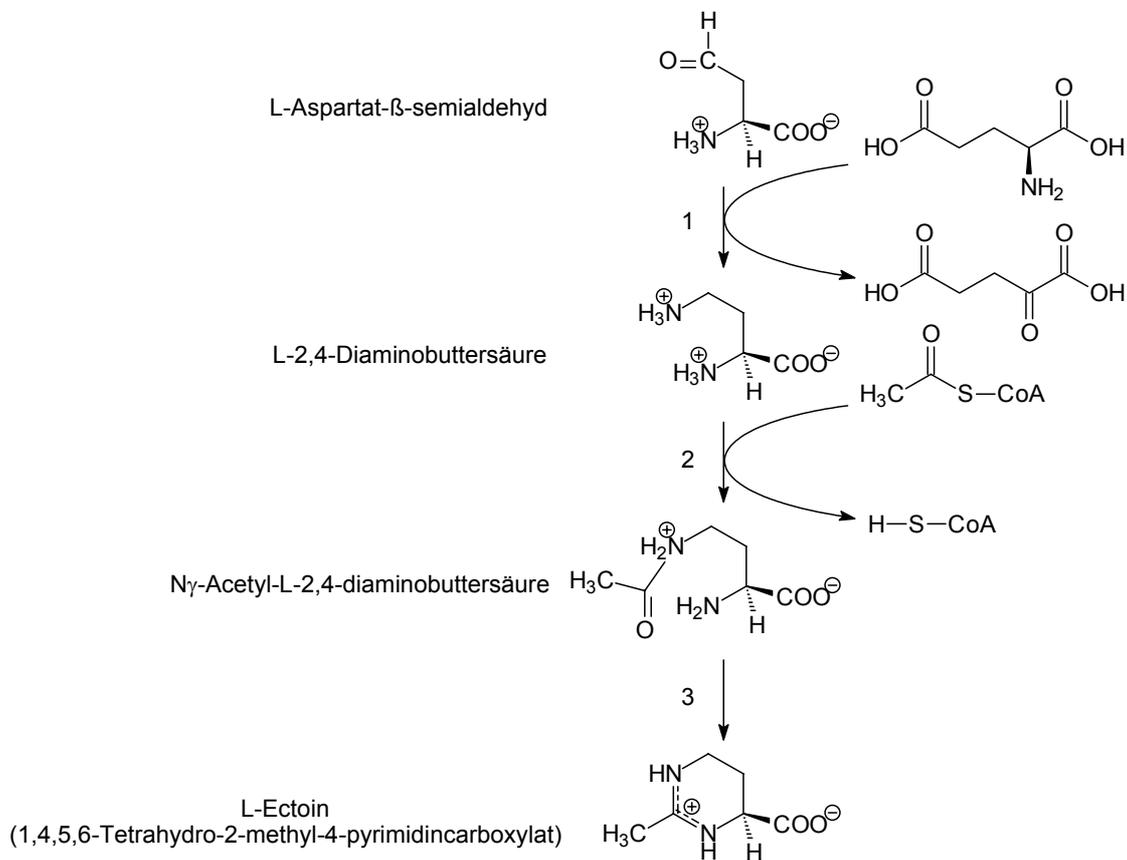


Abbildung 1: Ectoin-Biosynthese (Peters *et al.*, 1990). Die nummerierten Reaktionen werden durch die Enzyme 1) L-2,4-Diaminobutyrat-Transaminase, 2) L-2,4-Diaminobutyrat-Acetyltransferase und 3) L-Ectoin-Synthase katalysiert.

Das Gen für die L-Ectoin-Synthase aus einer *Halomonas*-Art konnte mittels PCR amplifiziert und sequenziert werden (Min-Yu *et al.*, 1993). In *Halomonas elongata* wurden die drei Ectoinogene von Göller *et al.*, (1998) identifiziert und charakterisiert. Der komplette

Ectoinbiosynthese-Gencluster (*ectABC*) wurde erstmals aus dem Gram-positiven, moderat halophilen *Marinococcus halophilus* in *E. coli* kloniert und sequenziert (Louis und Galinski, 1997).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die durch einen osmotischen Schock ausgelöste vermehrte Ectoinproduktion nicht ausschließlich durch die Transkription der Ectoingene reguliert wird, sondern dass die Regulation der Ectoinkonzentration bei *H. elongata* auch durch Aktivitätskontrolle erfolgt (Kraegeloh und Kunte, 2002). Arbeiten an *M. halophilus* konnten zwar nachweisen, dass sich vor den Genen *ectABC* eine Promotorregion befindet, die vor allem in Stresssituationen aktiv ist (Bestvater und Galinski, 2002), ein vermehrtes Auftreten von Transkripten der Gene *ectABC* als Reaktion auf hyperosmotischen Stress konnte jedoch erst nach etwa 20 Minuten beobachtet werden (Bestvater, 2001). Dieser Zeitrahmen ist für eine Reaktion auf einen Wechsel in der Osmolarität des umgebenden Mediums zu lang, als dass es sich um den einzigen Mechanismus zur Regulation der Ectoinbiosynthese handeln könnte. Daher wird an dieser Stelle postuliert, dass in Abwesenheit verfügbarer Solute aus dem Medium die *de novo*-Synthese von kompatiblen Soluten sofort einsetzt.

1.4. Heterologe Expressionssysteme

Die Gesamtheit aller Komponenten, die benötigt werden, um eine Nukleinsäuresequenz in eine Aminosäuresequenz entsprechend des genetischen Codes zu translatieren und gegebenenfalls posttranslationale Modifikationen durchführen, ist im Begriff Expressionssystem zusammengefasst. Meist sind dies mit entsprechenden Vektorsystemen ausgestattete *Escherichia coli*, Hefen oder Insektenzellen. Es sind jedoch auch reine *in vitro*-Systeme oder Säugerzellen als Expressionssysteme verfügbar (Qiagen.com). Von einem heterologen Expressionssystem spricht man, wenn genetische Information eines als Spender bezeichneten Organismus in einem artfremden Wirtsorganismus translatiert wird.

Die Funktionsweise des in dieser Arbeit verwendete Systems soll an dieser Stelle kurz umrissen werden.

Die Grundzüge dieses Systems wurden bereits Ende der Achtziger Jahre unter Federführung von Studier (Studier und Moffatt, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990) entwickelt. Die genetische Information, auch als Zielgen bezeichnet, befindet sich auf einem pET-Vektor unter Kontrolle eines T7-Promotors. Entscheidend für die Funktionsweise der hier gewählte Strategie ist die Gegenwart des DE3-Lysogens im Wirtsorganismus *E. coli*

BL21. Das Lysogen enthält das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter *lacUV5*-Kontrolle. Der *lacUV5*-Promotor ist mit IPTG induzierbar. IPTG steht für Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid, einem Analogon der Galaktose und ist von *E. coli* nicht metabolisierbar. Wird also IPTG in die Bakterienkultur gegeben, wird es durch das Bakterium aufgenommen und induziert den *lac*-Promotor. Da es nicht metabolisierbar ist, bleibt der Promotor ständig aktiv.

Besonders erwähnenswert sind das Gen *lacI*, welches für den *lac*-Repressor codiert und das Gen für T7-Lysozym. Beide Gene sind Teil des Expressionssystems, trotzdem scheinen sie einer Expressionsinduktion entgegen zu wirken. Sie dienen jedoch dazu, die basale Expression (d.h. vor der Induktion) des Zielgens (also des Gens, das hinter den T7-Promotor kloniert wurde) zu senken (Studier, 1991). Der durch das *lacI*-Gen codierte *lac*-Repressor vermindert das Ablesen des Gens für die T7-RNA-Polymerase, das sich hinter einem *lac*-Promotor befindet. Das T7-Lysozym bindet an die T7-RNA-Polymerase und setzt so deren Aktivität herab, wodurch eventuell schon expremierte T7-RNA-Polymerase weniger mRNA des Zielgens erzeugt. Durch Zugabe von IPTG wird der *lac*-Repressor inaktiviert. Das *lacI*-Gen liefert nicht genügend *lac*-Repressor, um eine Inaktivierung des *lacUV5*-Promotors aufrecht zu erhalten und das T7-Lysozym wird daraufhin mit T7-RNA-Polymerasen "überschüttet".

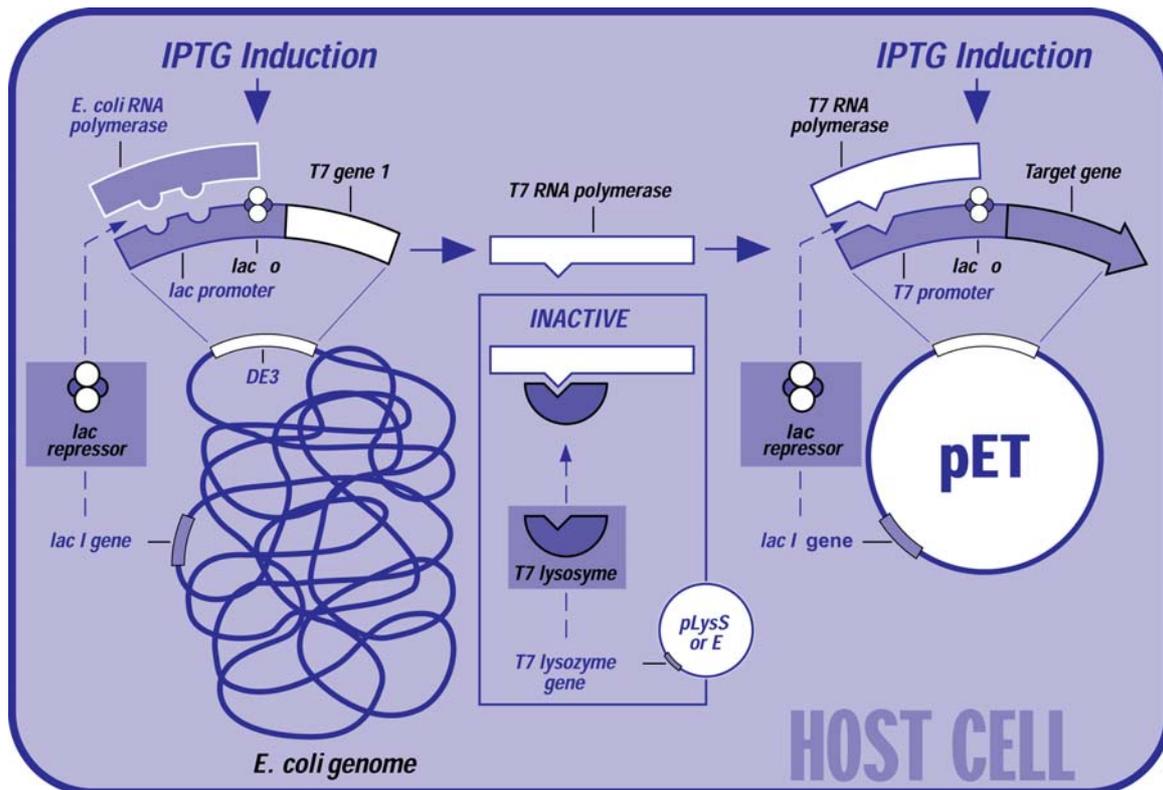


Abbildung 2: Das T7-Expressionssystem der Firma Novagen. Das Schaubild zeigt schematisch die Funktionsweise des verwendeten Expressionssystems. Schlüsselkomponenten sind dabei das DE3-Lysogen, welches das Gen für die T7-RNA-Polymerase enthält, der pET-Vektor, der die Sequenz des Zielgens unter T7-Promotor-Kontrolle enthält und der pLysS-Vektor, der das Gen für T7-Lysozym enthält, das ein Antagonist der T7-RNA-Polymerase ist. Die Abbildung ist der Dokumentation des pET-Systems der Firma Novagen entnommen.

Dies hat zur Folge, dass das Zielgen, welches hinter dem T7-Promotor situiert ist, wie gewünscht abgelesen wird. Zum besseren Verständnis ist der Mechanismus der Expression in Abbildung 2 in graphischer Form dargestellt. Als Produkt der Expression entsteht ein Fusionsprotein, das dem Zielprotein einen Überhang von sechs Histidinen hinzufügt, und das Protein dadurch einer Affinitätschromatographie zugänglich zu machen. Zusätzlich besteht bei einigen Expressionssystemen die Möglichkeit den Histidinüberhang durch Einsatz einer Protease abzuspalten.

1.5. Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zum Verständnis der Regulation der Ectoinbiosynthese auf enzymatischer Ebene beizutragen. Es wurde der Ansatz verfolgt, zunächst die drei beteiligten Enzyme aufzureinigen, um sie anschließend *in vitro* zu charakterisieren. Die Gewinnung der Enzyme sollte durch Verwendung des bereits vorgestellten heterologen Expressionssystems mit anschließender affinitätschromatographischer Aufreinigung

möglichst einfach und effizient gestaltet werden. Im Zuge der Enzymcharakterisierung sollten Parameter identifiziert werden, die für eine Kontrolle der Enzymaktivität in Frage kommen. Parallel wurde versucht, auf Grundlage der Aminosäurezusammensetzung Rückschlüsse auf denkbare Mechanismen bei der Regulation der Ectoinbiosynthese zu ziehen. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Studien sollten Parameter, die als potentielle regulierende Elemente identifiziert wurden, physiologisch untersucht werden. Mit dem Zwischenergebnis der Charakterisierung wurde der cytoplasmatische pH-Wert als vielversprechendes Element zur Kontrolle der Ectoinbiosynthese auf der Ebene der Enzymaktivität näher untersucht. Dazu musste zunächst eine Methode zur dynamischen Messung des cytoplasmatischen pH-Wertes etabliert werden. Das dabei erarbeitete System auf Grundlage von pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen wurde eingesetzt, um die Auswirkungen von hyperosmotischen Stress auf den cytoplasmatischen pH-Wert von *M. halophilus* zu untersuchen. Stichpunktartig lassen sich die Ziele dieser Arbeit wie folgt zusammenfassen:

- Entwicklung von heterologen Expressionssystemen für die drei Enzyme der Ectoinbiosynthese
- Erarbeitung einer Aufreinigungsstrategie zur Gewinnung größerer Mengen aktiver Enzyme
- Proteinchemische Charakterisierung der Enzyme der Ectoinbiosynthese zur Identifikation möglicher Regulationsmechanismen
- Physiologische Untersuchung cytoplasmatischer Parameter, die auf Grundlage der Enzymcharakterisierung als regulierenden Elemente bei der Ectoinbiosynthese in Frage kommen

Neben den genannten Hauptzielen dieser Arbeit sollte durch Züchtung von Proteinkristallen versucht werden, die Grundlagen zu einer Aufklärung der räumlichen Struktur der Enzyme der Ectoinbiosynthese mittels Röntgenstrukturanalyse zu schaffen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Organismen

Tabelle 1: Liste der verwendeten Mikroorganismen

Stamm	Genotypische Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> Top10F'	[F' [<i>lacI^q</i> , Tn10(Tet ^R)], <i>mcrA</i> , D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), f80 <i>lacZ</i> DM15, D <i>lacX</i> 74, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD</i> 139 D(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Frank, 1997
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal</i> (DE3) [pLysS Cam ^r]	Studier und Moffatt, 1986; Studier, 1991
<i>Marinococcus halophilus</i> DSM 20408 ^T	Wildtyp	Novitsky und Kushner, 1976; Hao <i>et al.</i> , 1984

2.2. Plasmide

Tabelle 2: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Selektionsmarker	Referenz
pET-15b	Expressionsvektor für Fusionsproteine mit N-terminalem His-Tag	Ampicilin	NOVAGEN, Madison, WI, USA
pET-24d	Expressionsvektor für Fusionsproteine mit C-terminalem His-Tag	Kanamycin	NOVAGEN, Madison, WI, USA
pET-15b <i>ectA</i>	<i>ectA</i> -Gen aus <i>M. halophilus</i> in pET-15b	Ampicilin	diese Arbeit
pET-15b <i>ectB</i>	<i>ectB</i> -Gen aus <i>M. halophilus</i> in pET-15b	Ampicilin	diese Arbeit
pET-15b <i>ectC</i>	<i>ectC</i> -Gen aus <i>M. halophilus</i> in pET-15b	Ampicilin	Bestvater, 2001
pET-24d <i>ectB</i>	<i>ectB</i> -Gen aus <i>M. halophilus</i> in pET-24d	Kanamycin	diese Arbeit
pET-24d <i>ectC</i>	<i>ectC</i> -Gen aus <i>M. halophilus</i> in pET-24d	Kanamycin	Kiss, 2000
pOSM12	Ectoin-Gencluster aus <i>M. halophilus</i> in pHSG575	Ampicilin	Louis und Galinski, 1997
pUC18	<i>lacZ'</i>	Ampicilin	Norlander <i>et al.</i> , 1983 Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

2.3. Nährmedien

Zur Herstellung der Nährmedien und Puffer wurde, sofern nicht anders beschrieben, mit einer Serlapur-Pro-90-Anlage der Firma SERAL hergestelltes, demineralisiertes Wasser

verwendet. Zur Sterilfiltration wurden Sterilfilter der Firma MILLIPORE (Eschborn) mit einer Porengröße von 0,25 µm benutzt.

2.3.1. Minimalmedium MM63 nach Miller (Larsen *et al.*, 1987)

Stammlösung (750 mL)

Kaliumdihydrogenphosphat	13,61 g
Kaliumhydroxid	4,21 g
Ammoniumsulfat	1,98 g
Magnesiumsulfat Heptahydrat	0,25 g
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	0,0011 g
Natriumchlorid	10,00 g

Chemikalien in dieser Reihenfolge in 650 mL Wasser lösen. Nach Zugabe des Ammoniumsulfat den pH-Wert auf 7,2 einstellen. Nach dem Lösen der restlichen Chemikalien pH auf 7,2 einstellen und auf 750 mL auffüllen.

Glucose-Stammlösung (40 mL)

D-Glucosemonohydrat	8,72 g
---------------------------	--------

ad 40 mL mit dH₂O.

Beide Lösungen getrennt autoklavieren.

Zur Herstellung von 100 mL MM63-Medium werden in 75 mL MM63-Stammlösung die benötigte Menge NaCl (je nach gewünschter Salinität des Mediums) aufgelöst, dann 2 mL Glucose-Stammlösung zugegeben und mit dH₂O auf 100 mL aufgefüllt.

2.3.2. Komplexmedium LB (Luria Bertani Medium) (Miller, 1992)

Casaminoacids	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
Natriumchlorid	40,00 g

pH 7,5 ad 1L mit dH₂O

Zur Selektion plasmidtragender Stämme wurden den Medien nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicilin	100 mg/mL in demin. Wasser	50 µg/mL
Chloramphenicol	50 mg/mL in 98 % Ethanol	25 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL	25 µg/mL

2.3.3. Fischpepton Medium (Frings, 1995)

Salzlösung (800 mL)

Ammoniumchlorid	2,0 g
Natriumchlorid	90 g
Meersalz	10 g
Fischpepton S490	14,7 g

Glucose-Lösung (100 mL)

D-Glucose	10,0 g
-----------------	--------

Phosphat-Lösung (100 mL)

Dikaliumhydrogenphosphat	0,5 g
--------------------------------	-------

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert. Anschließend wurden sie zusammengegeben und 0,5 mL autoklavierter Mangansulfat-Lösung (1 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) wurden hinzugefügt.

2.3.4. Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten für die Stammhaltung wurde das gewünschte Medium, mit 2 % (w/v) Agar versetzt, in Petrischalen gegossen und bei 4° C gelagert.

2.4. Puffer und Lösungen

2.4.1. Vitaminlösung VA (Imhoff und Trüper, 1977)

Nicotinsäureamid	0,35 g
Thiamin·HCl	0,30 g
Biotin	0,10 g
p-Aminobenzoessäure	0,20 g
Pyridoxin·HCl	0,10 g
Ca-DL-Pantothenat	0,10 g
Vitamin B12	0,05 g

ad 1 L mit dH₂O.

2.4.2. Puffer für die Agarosegelelektrophorese

2.4.2.1. TAE-Puffer

40 mM Tris/HCl; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA; pH 8,0. Der Puffer wird als 50-fach Stammlösung angesetzt und vor Gebrauch entsprechend verdünnt.

2.4.2.2. Ladepuffer

60 mM EDTA; 60 % Glycerin; 0,2 % Bromphenolblau; 0,2 % Xylencyanol FF. Der Puffer ist als 6-fach Stammlösung (Loading Dye Solution) kommerziell erhältlich bei MBI FERMENTAS, Vilnius, Litauen.

2.4.3. Puffer für die Herstellung kompetenter Zellen (Hanahan, 1983)

2.4.3.1. TFB1-Lösung

Rubidiumchlorid	3,023 g
Mangan(II)chloridtetrahydrat	2,473 g
Kaliumacetat	0,736 g
Calciumchloriddihydrat	0,368 g
Glycerol (15 % (v/v))	27,5 mL

pH 5,8 ad 250 mL mit dH₂O, steril filtrieren

2.4.3.2. TFB2-Lösung

Rubidiumchlorid	0,302 g
Calciumchloriddihydrat	2,757 g
3-Morpholinopropansulfonsäure.....	0,523 g
Glycerol (15 %(v/v))	37,5 mL

pH 8,0 (Wichtig: mit KOH einstellen !) ad 250 mL mit dH₂O, steril filtrieren

2.4.4. TELT-Lösung für die Plasmidisolierung

Tris	0,61 g
EDTA	2,38 g
LiCl	10,6 g
TritonX-100	0,4 g

pH 7,5 ad 100 mL mit dH₂O

2.4.5. Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

2.4.5.1. Acrylamid/Bis-Acrylamid-Mix

Acrylamid 40 %(v/v)	9,8 mL
N,N'-Methylen-Bisacrylamid 2 %(v/v)	4,0 mL
aqua demin.	6,2 mL

2.4.5.2. SDS-Sammelgelpuffer

Tris	12,11 g
Natriumdodecylsulfat	0,8 g

pH 6,8 ad 250 mL mit dH₂O

2.4.5.3. SDS-Trenngelpuffer

Tris	36,33 g
Natriumdodecylsulfat	0,8 g

pH 8,8 ad 250 mL mit dH₂O

2.4.5.4. APS-Lösung (40 % (w/v))

Ammoniumperoxodisulfat 0,4 g

ad 1 mL mit dH₂O

2.4.5.5. 4x SDS-Auftragspuffer

0,225 M Tris/HCl; 50 % Glycerin; 5 % SDS; 0,25M DTT; 0,05 % Bromphenolblau. Der Puffer ist als gebrauchsfertige Lösung bei NOVAGEN, Madison, WI, USA kommerziell erhältlich.

2.4.5.6. SDS-Laufpuffer

Tris 36,33 g

Glycin 22,53 g

Natriumdodecylsulfat 3 g

Natriumazid 3 g

ad 3L mit dH₂O

2.4.5.7. Coomassie-Färbelösung

Methanol 40 mL

Essigsäure (100 % (v/v)) 10 mL

Coomassie 0,05 g

ad 100 mL mit dH₂O, vor erstem Gebrauch einmal filtern

2.4.5.8. Coomassie-Entfärbelösung

Methanol 40 mL

Essigsäure(100 % (v/v)) 10 mL

ad 100 mL mit dH₂O

2.4.6. Puffer für die Proteinaufreinigung

2.4.6.1. Aufreinigung-Lysispuffer

PBS mit Imidazol

Natriumdihydrogenphosphat	6,90 g
Natriumchlorid	29,93 g
Imidazol	0,68 g

pH 8,5 ad 1L mit dH₂O

2.4.6.2. Aufreinigung-Waschpuffer

PBS mit Imidazol

Natriumdihydrogenphosphat	6,90 g
Natriumchlorid	29,93 g
Imidazol	1,36 g

pH 8,5 ad 1L mit dH₂O

Im Laufe der Prozessoptimierung wurde die Konzentration an Imidazol den jeweiligen experimentellen Bedürfnissen angepasst.

2.4.6.3. Aufreinigung-Elutionspuffer

PBS mit Imidazol

Natriumdihydrogenphosphat	6,90 g
Natriumchlorid	29,93 g
Imidazol	17,00 g

pH 8,5 ad 1L mit dH₂O

2.4.7. Lösungen für den BCA-Test (PIERCE, Rockford, IL, USA)

2.4.7.1. BCA-Lösung

Lösung A: 1 % Bicinchoninsäure; 2 % Natriumcarbonat; 0,16 % Natriumtartrat; 0,3 % Natriumhydroxid (1M); 0,95 % Natriumhydrogencarbonat

Lösung B: 4 % Kupfersulfat

Beide Lösungen sind als fertige Stammlösungen erhältlich. Direkt vor der Durchführung wird die Gebrauchslösung aus 50 Volumina Lösung A mit einem Volumen B hergestellt.

2.4.7.2. Albumin-Stammlösungen

Stammlösung 1: 500 µg/mL Albumin

Stammlösung 2: 100 µg/mL Albumin

2.4.8. Puffer und Lösungen für die Bestimmung organischer Solute

2.4.8.1. Extraktionslösung (Bligh & Dyer-Lösung)

Methanol: Chloroform: Reinstwasser im Volumenverhältnis 10: 5: 4

2.4.9. Lösungen für die isokratische HPLC

2.4.9.1. Laufmittel

Acetonitril: Wasser im Volumenverhältnis 80: 20

2.4.10. Puffer und Lösungen für die FMOC-HPLC

2.4.10.1. Na-Boratpuffer

Borsäure 30.92 g

pH 7,7 (mit NaOH) ad 1L mit dH₂O

2.4.10.2. interner Standard Taurin

Taurin (in Na-Boratpuffer) 25 µM

2.4.10.3. FMOC-Lösung

9-Fluorenylmethyl-succinimidyl-carbonate 3.4 mg

in 10 mL Aceton auflösen (Endkonzentration ist dann 1 mM)

2.4.10.4. ADAM-Lösung

ADAM-Reagenz wird 40 mM in Aceton: Na-Boratpuffer im Volumenverhältnis 1: 1 aufgelöst.

2.4.10.5. Laufmittel A

Acetonitril 200 mL

Tetrahydrofuran 5 mL

Na-Acetat-Puffer (50mM) 795 mL

pH 4,2

2.4.10.6. Laufmittel B

Acetonitril 800 mL

Na-Acetat-Puffer (50mM) 200 mL

pH 4,2

2.5. Anzucht und Kultivierung der Mikroorganismen

2.5.1. Stammhaltung

2.5.1.1. *Escherichia coli*

Stammkulturen von *Escherichia coli* wurden auf LB-Agarplatten mit 1 % NaCl bei 37° C angezogen. Diese Stammkulturen wurden bis zu 4 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt.

2.5.1.2. *Marinococcus halophilus*

Stammkulturen von *Marinococcus halophilus* wurden auf MM63-Agarplatten mit 10 % NaCl oder Fischpepton-Medium-Agarplatten bei 30° C angezogen. Diese Stammkulturen wurden bis zu 4 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt.

2.5.2. Anzucht von *E. coli*

2.5.2.1. Vorkulturen

LB-Medium mit der später in der Hauptkultur erwünschten NaCl-Konzentration wurde mit einer Stammkultur von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37° C im Inkubationsschüttler (innova 4230, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) bei 180 rpm in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane zum besseren Sauerstoffeintrag inkubiert.

2.5.2.2. Hauptkulturen für Plasmidisolierung und Proteingewinnung

Die LB-Hauptkultur (mit entsprechender Salzkonzentration) wurde 1-2 %ig (v/v) aus der Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37° C und 180 rpm in 250 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikane und seitlich angesetztem Glasrohr zur Verfolgung der optischen Dichte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8. Sollte die optische Dichte über 0,8 hinaus verfolgt werden, wurde eine Probe entnommen und in einer Küvette vermessen, nachdem mit passendem Medium auf eine ausreichend niedrige OD verdünnt wurde.

2.5.3. Anzucht von *Marinococcus halophilus*

2.5.3.1. Vorkulturen

MM63-Medium oder Fischpepton-Medium mit der später in der Hauptkultur erwünschten NaCl-Konzentration wurde mit einer Stammkultur angeimpft und über Nacht bei 30° C im Inkubationsschüttler (innova 4230, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC) bei 180 rpm in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane zum besseren Sauerstoffeintrag inkubiert.

2.5.3.2. Hauptkulturen für Salzschockversuche und die Untersuchung adaptierter Kulturen

Die MM63- oder Fischpepton-Medium-Hauptkultur (mit entsprechender Salzkonzentration) wurde 1-2 %ig (v/v) aus der Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30° C und 180 rpm in 250 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikane und seitlich angesetztem Glasrohr zur Verfolgung der optischen Dichte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8.

2.5.4. Zellernte

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Bakterien durch Zentrifugation nach folgendem Schema geerntet. Je nach Volumen wurden Eppendorfgefäße, 50 mL Kunststoffreaktionsgefäße mit Schraubdeckel („Falcon-Tubes“) oder 500 mL

Zentrifugenbecher verwendet. Für Eppendorfgefäße wurden eine gekühlte EPPENDORF-Tischzentrifuge (10000xg, 4° C, 10 min), für die größeren Gefäße eine BECKMANN Zentrifuge Modell J2-21 bzw. Avanti J30I (10000xg, 4° C, 25 min) mit passendem Rotor eingesetzt. Die Biomasse wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren, das Pellet in ein passendes Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70° C gelagert.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Herstellung kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* wurden 10 mL LB-Medium mit einigen Kolonien einer Stammplatte angeimpft und über Nacht bei 37° C inkubiert. Als Hauptkultur wurden 100 mL vorgewärmtes LB-Medium mit 1 mL der Übernachtskultur angeimpft und auf dem Rotationsschüttler (180 rpm, 37° C) inkubiert bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,4-0,5 erreicht war. Die Kulturlösung wurde für 5 min auf Eis abgekühlt, bevor die Bakterien durch Zentrifugieren (5 min, 4000xg, 4° C) abgeerntet wurden. Das Pellet ist vorsichtig in 30 mL gekühlter (4° C) TFB1-Lösung resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert worden. Durch erneutes Zentrifugieren (5 min, 4000xg, 4° C) wurden die Bakterien pelletiert und in 4 mL gekühlter (4° C) TFB2-Lösung resuspendiert. Aliquots dieser Suspension von je 100 µL wurden in sterilen Eppendorfgefäßen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70° C gelagert.

2.6.2. Plasmid-DNA-Isolierung

Zunächst wurden 5-20 mL LB-Medium mit Bakterienmaterial angeimpft, wobei nur für Restriktionsanalysen Einzelkolonien verwendet wurden. Dieser Ansatz wurde bei 37° C im Schüttelschrank inkubiert, bis eine optische Dichte von ca. 0,8-1 erreicht war. Die optische Dichte wurde dabei durch das seitlich am Kolben angebrachte Glasrohr bestimmt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren pelletiert.

Für die weitere Aufarbeitung wurde eines der beiden folgenden Protokolle angewandt.

2.6.2.1. TELT-Methode

Gewinnung kleinerer DNA-Mengen für die Restriktionsanalyse: Das Bakterienpellet wurde in 100 µL TELT-Puffer resuspendiert und diese Suspension für 15 min aufgekocht. Der Ansatz wurde zur Abkühlung für 5 min auf Eis inkubiert; dann zentrifugiert (10000xg, 10 min). Das entstehende Pellet wurde mit einem sterilisierten Zahnstocher entfernt. Die klare Lösung

wurde mit 300 µL EtOH (abs.) versetzt, zentrifugiert (10000xg, 5 min) und das entstandene Pellet nach Abgießen des Überstandes mit 50 µL Wasser aufgenommen.

2.6.2.2. Plasmid-Präparations-Kits

Gewinnung von DNA für Klonierungen und Sequenzierungen: Kleinere Mengen Plasmid DNA (aus bis zu 3 mL Kultur) wurden mit dem GFX™ Micro Plasmid Prep Kit der Firma PHARMACIA BIOTECH (Freiburg) isoliert. Die Isolierung größerer Mengen (aus bis zu 20 ml Kultur) erfolgte mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II der Firma PEQLAB (Erlangen), jeweils nach Herstellerangaben.

2.6.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Der Präparation folgte eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle, bei der ein Teil der Plasmidlösung im Photospektrometer (Ultrospec 2000 UV-Vis Spectrophotometer, PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) bei 260 nm und 280 nm vermessen wurde. War die Absorption größer als 1 wurde so verdünnt, dass die Absorption zwischen 0,2 und 1 lag. Bei einer Absorption von 1 hat eine dsDNA-Lösung (z.B. Plasmide) die Konzentration 50 µg/mL, eine ssDNA-Lösung (z.B. Primer) eine Konzentration von 33 µg/mL. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm Abs_{260}/Abs_{280} hat bei reiner DNA einen Wert zwischen 1,7-1,9. Proteinverunreinigungen führen zu einem höheren, RNA-Beimengungen zu einem niedrigerem Wert. Es wurden nur reine Lösungen weiter verwendet.

2.6.4. Enzymatische Modifikation von DNA

Enzymatische Hydrolyse und Ligation von DNA erfolgten mit käuflichen Enzymen nach Herstellerangaben.

2.6.5. PCR

2.6.5.1. Prinzip

Das von Mullis und Faloona, (1987) entwickelte Prinzip der PCR ist die zyklische Amplifizierung von DNA-Fragmenten, wobei die Zahl der Fragmente durch sukzessive Verdopplung exponentiell steigt. Für die Durchführung einer PCR müssen die flankierenden Sequenzbereiche des zu amplifizierenden Fragments bekannt sein, da die Sequenz der Oligonukleotidprimer aus ihnen abgeleitet wird.

2.6.5.2. Primer

Tabelle 4: Verwendete Primer

Name	Sequenz	Schmelztemperatur T_m^*
ectA f NHIS	GGTGGTAAGCATATGGAAAC	67° C
ectA r NHIS	CATGTCGGATCCGCTACTTA	67° C
ectB f NHIS	CTCATATGATGCAGAATGAT	62° C
ectB r NHIS	GCTTCTTTGGATCCAATTAG	62° C
ectB f CHIS	ACGTACGTCCATGG- ATGATGCAGAATGATCTCAG	64° C
ectB r CHIS	ACGTACGTCTCGAG- CGTTGGAGCATCGGTTT	64° C

2.6.5.3. Temperaturprogramm

- | | | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-------|-------|
| 1. Initiale Denaturierung | 94° C | 2 min | |
| 2. Denaturierung | 94° C | 30 s | } 10x |
| Hybridisierung | $(T_m) - (0,5° \text{ C pro Zyklus})$ | 30 s | |
| Elongation | 72° C | 1 min | |
| 3. Denaturierung | 94° C | 30 s | } 20x |
| Hybridisierung | $(T_m - 5° \text{ C})$ | 30 s | |
| Elongation | 72° C | 1 min | |
| 4. Finale Elongation | 72° C | 5 min | |

Ein Standard-Reaktionsansatz enthielt die nachstehenden Komponenten :

Template-DNA	~200 ng
Oligonukleotidprimerpaar	25 pmol je Primer
10x Polymerasepuffer	5 µL
dNTP-Mix	0,2 mM
Taq-Polymerase	5 U

Die Komponenten wurden auf Eis zusammengegeben und mit deionisiertem Wasser auf 50 µL aufgefüllt. Zum Start der Reaktion wurde das Reaktionsgefäß mit der Mischung in den auf bereits mindestens 80° C vortemperierten Thermoblock gestellt, um eine unerwünschte Aktivität der Polymerase vor der initiellen Denaturierung zu unterbinden, und das oben dargestellte Temperaturprogramm durchlaufen. Die sukzessive Temperaturerniedrigung von 0,5°C in jedem der ersten zehn Zyklen bis zum Erreichen der üblicherweise verwendeten Anlagerungstemperatur für Primer (5° unter der Schmelztemperatur) hat eine besonders stringente Vermehrung in den entscheidenden ersten Zyklen zur Folge.

2.6.6. Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in Horizon® 58 und Horizon® 11-14 Gelelektrophoresekammern der Firma LIFE TECHNOLOGIES (Karlsruhe). Die Elektrophoresen wurden in TAE-Puffern bei 5 V/cm durchgeführt. Die mit TAE-Puffern hergestellten Gele hatten je nach aufzutrennender Fragmentgröße eine Agarosekonzentration von 0,8 bis 2,0 % (w/v). Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel 5 bis 10 Minuten mit Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Dokumentation erfolgte auf einem UV-Tisch mit Hilfe des Videosystems Duo-Store der Firma INTAS (Göttingen).

2.6.7. DNA-Isolierung durch Gelelution

Für die DNA-Aufreinigung wurde die gewünschte Gel-Bande mit dem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma QIAGEN aus dem Gel eluiert. Die Verarbeitung erfolgte gemäss dem von QIAGEN vorgeschlagenen Protokoll. Alle für diesen Arbeitsschritt verwendeten Spezialchemikalien entstammten dem Kit. Dabei wird die Agarose bei 50° C gelöst, die Affinität der DNA zur verwendeten Säule durch chaotrope Salze erhöht und dadurch an diese gebunden. Nach dem Waschen und Trocknen der Säule wird die DNA eluiert.

2.6.8. Transformation kompetenter *E. coli*

Ein Aliquot der zu transformierenden oder zu testenden Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Zum Test der kompetenten Zellen wurden 0,1 ng des Plasmids pUC18 zugefügt. Alternativ wurde eine geeignete Menge des zu transformierenden Vektors hinzugegeben. Nach vorsichtigem Umrühren wurde erst 30 Minuten auf Eis, dann für 45 Sekunden bei 42° C im Wasserbad inkubiert. 900 µL LB-Medium wurden zugegeben und es wurde unter Schütteln eine Stunde bei 37° C inkubiert. Aliquots zu 100 µL wurden auf festem LB1-Nährmedium, das mit entsprechenden Antibiotika versetzt war, ausgestrichen.

2.6.9. Restriktionsanalyse

Um eine Vorauswahl unter den Produkten der Konstruktionsversuche der Expressionsvektoren vorzunehmen, wurde die Plasmid-DNA von Einzelkolonien mit verschiedenen Restriktionsenzymkombinationen hydrolysiert und das erhaltene Bandenmuster nach einer Gelelektrophorese mit dem theoretischen Muster des entsprechenden Vektors verglichen. Bei Übereinstimmung der Muster wurde der entsprechende Klon für weitere Untersuchungen ausgewählt.

2.6.10. Sequenzierung

Alle Sequenzierungsreaktionen sowie deren Auswertung wurden als Auftragsarbeit von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

2.7. Proteinchemische Methoden

2.7.1. Expression

Für die Isolierung und Reinigung der Proteine wurde *E. coli* BL21 pLysS mit dem entsprechenden Expressionsvektor in 50 mL LB-Flüssigmedium mit Chloramphenicol und Ampicilin bzw. Kanamycin (siehe Vektortabelle) angezogen. Für die Expression wurde die Hauptkultur mit dieser Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft. Das Volumen der Hauptkultur wurde je nach Bedarf auf 100 mL bis 500 mL eingestellt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20° C gelagert.

2.7.2. Zellaufschluss und Gewinnung des löslichen Gesamtzellproteins

Das aufzuarbeitende Zellpellet wurde für 15 min auf Eis langsam aufgetaut. Um eine Denaturierung oder enzymatischen Abbau von Proteinen zu minimieren, wurde im Folgenden immer eisgekühlt (4° C) und mit vorgekühltem Puffer gearbeitet. Das Pellet wurde in 1/50 des ursprünglichen Kulturvolumens Lysispuffer, dem 1 mg/mL Lysozym zugesetzt war, resuspendiert. Dem folgte eine Ultraschallbehandlung (6mal 10 s mit 10 s Pause) oder alternativ eine Homogenisierung und Aufschluss durch eine Kanüle. Die durch eine dieser Behandlungen erzeugte Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 µg RNaseA und 5 µg DNaseI je mL Lysispuffer zugegeben und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen wurde für 20-30 min bei 10.000xg und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde vor einer weiteren Aufarbeitung durch eine 0,2 µm Membran gefiltert und ohne voriges Einfrieren direkt in einer Affinitätschromatographie eingesetzt. Je nach Volumen des aufzuarbeitenden Lysats wurde eine manuelle Aufarbeitung mit Ni-NTA-Agarose für kleine Volumina oder eine Aufarbeitung an der FPLC mit Ni-NTA-Sephadex für größere Volumina durchgeführt.

2.7.3. Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose

Das Lysat (ca. 1-3 mL) wurde mit 50-200 µL einer 50 %igen Ni-NTA-Agarose-Aufschwämmung versetzt. Dieses Gemenge wurde für 60 min bei 4° C im Rotationschüttler bei 200 rpm inkubiert und anschließend zur Abtrennung der mit Protein gesättigten Ni-NTA-Agarose über eine Polypropylen-Durchflusssäule mit Fritte (QIAGEN) gegeben. Zur Abtrennung unerwünschter Proteine ist zweimal mit 5 mL Lysispuffer, dann zweimal mit 5 mL Waschpuffer gespült worden, bevor das Enzym mit 200 µL Elutionspuffer aufgenommen wurde.

2.7.4. Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Superflow (FPLC)

2.7.4.1. FPLC-Steuerungseinheit

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde eine FPLC-Anlage der Firma PHARMACIA (Uppsala, Schweden) verwendet. Die verwendete FPLC-Anlage war aus folgenden Komponenten aufgebaut:

- Hochpräzisionspumpe P-500

- Probenauftragsventil V-7
- Gradienten-Programmiereinheit GP-250
- Probenauftragsschleife Superloop 50 mL
- UV-Detektor UV-1
- Fraktionssammler Frac-100
- Elutionsprofilschreiber

2.7.4.2. Ni-NTA-Superflow-Säule und Durchführung der Chromatographie

Das verwendete Säulenmaterial ist unter dem Markennamen Ni-NTA-Superflow bei QIAGEN erhältlich. Es handelt sich dabei um hochvernetztes Agarose, die in der Lage ist, die höheren Drücke, die bei der FPLC auftreten, unbeschadet zu überstehen. Das aus 6 % Agarose bestehende Trägermaterial hat ein Nitriloessigsäurederivat als funktionelle Gruppe, durch die es in der Lage ist Ni-Ionen zu binden. Die Säule wurde unter 20 % Ethanol bei 4° C gelagert. Die Äquilibration erfolgte durch Spülen der Säule mit zehn Säulenvolumina Lysispuffer. Nach der Äquilibration wurde das komplette Probenvolumen aufgetragen. Nicht oder schwach gebundene Proteine wurden in den darauf folgenden Waschschrritten mit jeweils zehn Säulenvolumina Lysispuffer und Waschpuffer entfernt. Die Flußrate wurde zum Auftragen und Eluieren des Proteins auf 0,5 mL/min eingestellt. Waschschrritte wurden mit 1 mL/min durchgeführt.

2.7.5. Enzymatische Entfernung des Histidinüberhanges

Die auf dem Expressionsvektor pET-15b basierenden Expressionsvektoren fügen zwischen dem Histidinüberhang und dem Zielprotein eine Thrombinschnittstelle ein. Um eine proteolytische Spaltung von Fusionsproteinen an dieser Proteaseschnittstelle (Erkennungssequenz Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) durchzuführen, wurde zu einer Proteinlösung 5 U Thrombin je mg des zu spaltenden Fusionsprotein gegeben. Konnte mit dieser Thrombinmenge eine Spaltung nicht in ausreichendem Masse erzielt werden, wurde die Thrombinmenge erhöht. Es ist keine Umpufferung des Fusionsproteins hin zu optimaleren Bedingungen für die Protease durchgeführt worden, da eine Verringerung des Salzgehaltes und ein Erniedrigung des pH-Wertes zwar zu besserer Spaltung aber auch zu stark herabgesetzter Aktivitätsausbeute führten. Dem Reaktionsansatz wurde lediglich Calciumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 2,5 mM zugesetzt.

2.7.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

2.7.6.1. Herstellung des Gels

Die verwendeten Polyacrylamid-Gele wurden über eine radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid erstellt, wobei Letzteres als Quervernetzer fungierte. Der Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS) wurde als Polymerisationsstarter eingesetzt. Als Radikalvermittler der Polymerisationsreaktion wurde der Reaktion N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugesetzt. Im Nachbau einer handelsüblichen vertikalen Gelkammer wurde ein Trenngel gegossen, das anschließend mit einem Sammelgel überschichtet wurde. Die Gele hatten die folgende Zusammensetzung :

Trenngel

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Mix	3,00 mL
SDS-Trenngelpuffer	1,50 mL
Glycerin/dH ₂ O (2:1)	1,50 mL
TEMED	12 µL

zum Start der radikalischen Polymerisation

APS-Lösung (40 % (w/v))	6 µL
-------------------------------	------

Sammelgel

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Mix	0,50 mL
SDS-Sammelgelpuffer	0,75 mL
dH ₂ O	1,75 mL
TEMED	12 µL

zum Start der radikalischen Polymerisation

APS-Lösung (40 % (w/v))	6 µL
-------------------------------	------

2.7.6.2. Durchführung der Elektrophorese

Der Probenauftrag erfolgte nach Befüllen der Elektrophorese-Kammer mit Laufpuffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 4x SDS-Auftragspuffer versetzt und für 20 min bei 80° C inkubiert. Die angelegte Spannung wurde bis zum Einlauf der Proben in das Trenngel auf maximal 60 V und/oder die Stromstärke auf maximal 15 mA eingestellt. Nach Eintritt in

das Trenngel wurde die Spannung auf 100 V und die Stromstärke auf 20-25 mA erhöht. Die SDS-PAGE wurde mit Coomassie gefärbt.

2.7.6.3. Coomassie Färbung

Um die auf den SDS-PAGE Gelen aufgetrennten Proteine nachzuweisen, wurden die Gele über Nacht in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Im sauren Milieu bindet Coomassie-Brilliant-Blue irreversibel an Proteine und macht sie so nach Entfärbung des Gels sichtbar. Die Nachweisgrenze für Coomassie-gefärbte SDS-PAGE Gele liegt bei >1,5 µg Protein. Die Entfärbung der Gele erfolgte über 3-6 h, wobei die Entfärbelösung in der ersten Entfärbestunde zweimal gewechselt wurde. Es wurde solange in Entfärbelösung inkubiert bis der gewünschte Grad der Entfärbung erreicht war. Die entfärbten Gele wurden auf einem handelsüblichen Scanner digital aufgenommen und dokumentiert.

2.7.7. **BCA-Test**

Der Proteingehalt von Proben wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits der Firma PIERCE nach der Methode von Smith *et al.*, (1985) bestimmt. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , welches mit BCA spezifisch einen Farbkomplex bildet. Verantwortlich für die Reduktion des Kupfers im alkalischen Milieu sind vorwiegend die Peptidbindungen (Wiechelmann *et al.*, 1988). Das Prinzip des BCA-Testes beruht auf der Bildung eines purpurfarbenen Komplexes der Bicinchoninsäure in Gegenwart von Cu^+ .

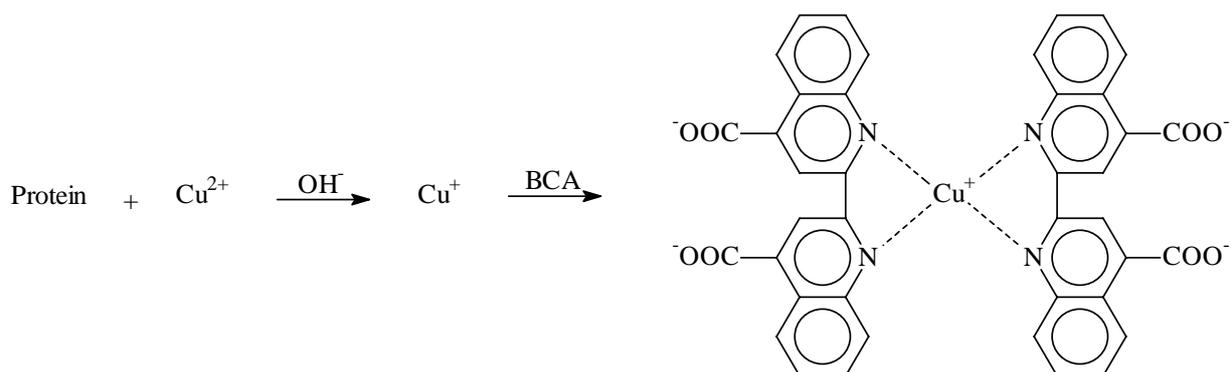


Abbildung 3: Prinzip des BCA-Test

Die Durchführung des Testes erfolgte gemäß Herstellerangaben im Mikrotiterplattenmaßstab. Die Intensität der Färbung wurde mit einem MPP 4008 Mikroplatte Photometer der Firma MIKROTEK LABORSYSTEME GMBH (Overath) bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich mit den Absorptionen einer BSA-Stammreihe auf derselben Mikrotiterplatte.

2.7.8. Aufkonzentrierung

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurden Microcon YM-10 Zentrifugen-Membranfiltereinheiten der Firma MILLIPORE eingesetzt. Diese Membranfiltersysteme haben eine Ausschlussgröße von 10 kDa. Pufferbestandteile und Wasser können die Membran passieren, Proteine größer 10 kDa werden zurückgehalten.

2.7.9. Pufferaustausch

Um eine mögliche Belastung der aufgereinigten Proteine durch Imidazol zu minimieren, wurde der Puffer mittels einer Econo-Pac 10DG, gepackt mit Bio-Gel P-6DG, der Firma Bio-Rad gemäß Herstellerangaben ausgetauscht. Das Protein wurde dabei gewöhnlich vom Elutionspuffer in einen PBS-Puffer (500 mM NaCl, 50 mM Phosphat, pH 8,0) für die Lagerung oder Weiterverwendung überführt.

Alternativ wurden bei geringen Volumina (<500 µL) Microcon YM-10 Zentrifugen-Membranfiltereinheiten der Firma MILLIPORE gemäss Herstellerangaben verwendet.

2.7.10. Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden durch Dr. H. Luftmann in der Abteilung für Massenspektrometrie des Organisch-chemischen Institutes der Universität Münster durchgeführt.

Die Proben wurden an einem Gerät der Bauart Quattro LC der Firma MICROMASS vermessen. Als Einlass diente ein Nanospray Elektropray-Einlass. Die Ionisation erfolgte durch ESI (Elektrosprayionisation), welches das derzeit schonendste Verfahren zur Produktion von Ionen ist. Die Lösung der Substanz wird hierbei in ein elektrisches Feld versprüht. Die Trennung zu Einzelmolekülen (oder Molekülverbänden) erfolgt bereits durch den Lösungsvorgang. Entstehen in Lösung spontan Ionen, so können diese direkt nachgewiesen werden, sonst entstehen sie erst während des Sprühvorgangs. Die Proteine waren jeweils in einem Ammoniumformiat-Puffer gelöst.

2.8. Aktivitätsassays

Die aufgereinigten Enzyme wurden durch die im folgenden dargestellten Enzymtests charakterisiert. Um die relativ zeitaufwendige Vermessung der Reaktionsansätze durch

HPLC zu umgehen, wurde für jedes der beiden Enzyme jeweils ein alternativer Aktivitätsnachweis entwickelt.

2.8.1. Zusammensetzung der Reaktionsansätze

2.8.1.1. 2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase

Die Reaktion von 2,4-Diaminobuttersäure zu N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure durch die 2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (im Folgenden mit **DABAacT** abgekürzt) wurde in einem 60 mM Tris-Puffer und einer Acetyl-CoA-Konzentration von 10 mM durchgeführt. Die Konzentration von 2,4-Diaminobuttersäure, der Salzgehalt und der pH-Wert im Reaktionsgemisch wurde entsprechend der experimentellen Erfordernisse variiert. Soweit nicht anders vermerkt, war in den Aktivitätstests die Konzentration von 2,4-Diaminobuttersäure auf 30 mM, der Salzgehalt auf 0,5 M und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt.

2.8.1.2. Ectoin-Synthase

Der Ringschluss von N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure zu Ectoin katalysiert durch die Ectoin-Synthase (im Folgenden mit **EctSyn** abgekürzt) wurde in einem 60 mM Tris-Puffer durchgeführt. Der Salzgehalt und der pH-Wert im Reaktionsgemisch wurde entsprechend der experimentellen Erfordernisse variiert. Soweit nicht anders vermerkt war in den Aktivitätstests die Konzentration von N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure auf 10 mM, der Salzgehalt auf 0,5M und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt.

2.8.2. Nachweis von Thiol

Da bei der Umwandlung von 2,4-Diaminobuttersäure zu N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure freies Thiol in Form von CoA-SH entsteht, lässt sich der Verlauf dieser Reaktion indirekt durch Nachweis der Thiolkonzentration verfolgen. Hierzu eignet sich die, auch als Ellmans Reagenz bezeichnete, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure).

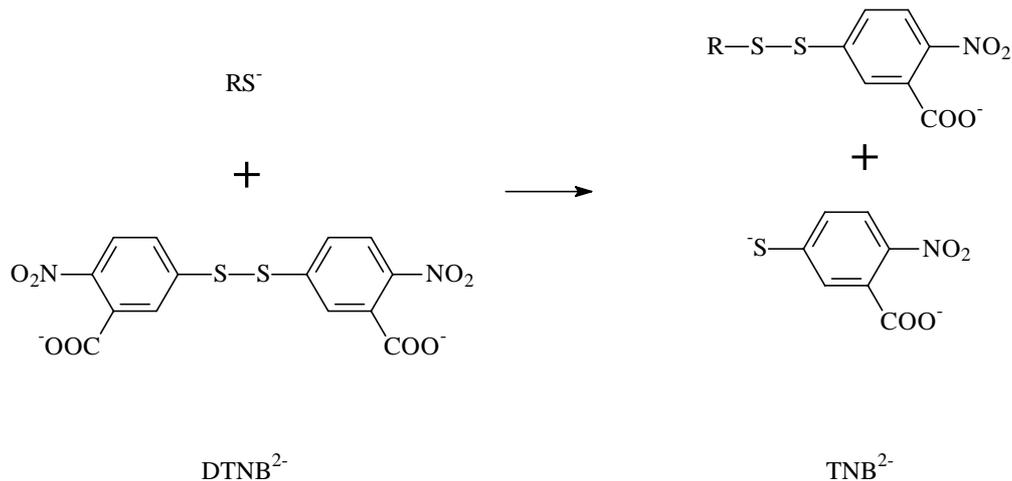


Abbildung 4: Reaktion von Ellmans Reagenz mit einem Thiolat

Das entstehende 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB^{2-}) ist ein Farbstoff mit einem hohen molaren Extinktionskoeffizienten im violetten Bereich des Spektrums. Eine direkte Verfolgung der Reaktion in einer Küvette mit Hilfe eines Photospektrometers war aufgrund von Wechselwirkungen des Profarbstoffes mit dem Enzym nicht möglich. Daher wurde der Enzymassay im Mikrotitermaßstab durchgeführt. Zu festgelegten Zeitpunkten wurde der laufenden Reaktion eine Probe entnommen. Die Reaktion in der Probe wurde mit SDS abgestoppt, anschließend wurde eine Lösung von Ellmans Reagenz (2 mM) zugesetzt und die Absorption mit einem MPP 4008 Mikroplatte Photometer der Firma MIKROTEK LABORSYSTEME GMBH (Overath) bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

2.8.3. Photometrische Untersuchungen

Aufgrund des großen Unterschiedes der molaren Extinktionskoeffizienten von Ectoin und N_γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure bei 210 nm lässt sich der Fortlauf der Ringschlussreaktion am Spektralphotometer verfolgen.

2.9. Bestimmung organischer Solute

Zur Bestimmung organischer Solute in Zellen von *M. halophilus* wurden die Zellen zunächst geerntet und aufgeschlossen, die Extrakte dann mittels HPLC vermessen. Die Bestimmung von Reaktionsprodukten aus Enzymassays wurde direkt aus der Reaktionslösung durchgeführt.

2.9.1. Extraktion des Zellmaterials (Bligh und Dyer, 1959)

Bei der Extraktion an dem Zellmaterial mit einem Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch wird eine Phasentrennung erreicht, an deren Grenzfläche zelluläre Proteine gespreitet werden. Die Inhaltsstoffe der Zellen gelangen je nach Löslichkeit in die hydrophobe Chloroform-phase oder in die hydrophile Methanol-Wasser-Phase. Die Methode macht die wasser-löslichen Solute einer nachfolgenden quantitativen Bestimmung durch HPLC zugänglich. Die Extraktion wurde an gefriergetrocknetem Zellmaterial durchgeführt.

Kulturen exponentiell wachsender Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor, 15 min, 8000 x g, RT). Das Zellmaterial wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingebracht und gefriergetrocknet (16 – 20 h, Alpha I-6, CHRIST). Jeweils 15 oder 30 mg des gefriergetrockneten Zellmaterials wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Extraktionslösung (Bligh & Dyer-Lösung) wurde das Gemisch 30 min auf einem Schüttler (IKA VIBRAX) inkubiert. Es folgte die Zugabe von je 130 µl Reinstwasser und Chloroform. Das Reaktionsgefäß wurde gevortext und mindestens 10 Minuten weiter geschüttelt. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde die Probe mit 8000 x g in einer Tischzentrifuge (Biofuge A, HERAEUS) 5 min lang zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4° C oder längerfristig bei -20° C aufbewahrt.

2.9.2. Isokratische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Galinski und Herzog, 1990)

Die Bestimmung von Reaktionsprodukten in einem Enzymassay erfolgte mittels isokratischer HPLC an einer Aminophase. Mit dieser chromatographischen Methode lassen sich ungeladene, wasserlösliche Substanzen verschiedener Stoffklassen, wie beispielsweise Polyole, Zucker, Betaine, Aminosäuren und Ectoine, analysieren. Das verwendete System war aus folgenden Komponenten aufgebaut:

- Spectra SYSTEM™ Pumpe P100
- Vakuumentgasungsmodul SCM 1000
- Rheodyne-Probenaufgabeventil mit 20 µL Probenschleife
- Vorsäule: Nucleosil Amino, 10x4 mm, Partikelgröße 5 µm (GROM, Herrenberg)

- Trennsäule: GromSil Amino-1 Pr, 125x4 mm, Partikelgröße 3 µm (GROM, Herrenberg)
- Spectra SYSTEM™ UV-Detektor UV 1000

Als Laufmittel diente in allen Messungen 80 %iges, entgastes Acetonitril.

2.9.3. Fmoc-Aminosäureanalyse (Kunte *et al.*, 1992)

Mit der Fmoc-Methode können primäre und sekundäre Aminosäuren der Analyse durch die HPLC zugänglich gemacht werden. Fmoc ist ein fluoreszierendes Molekül und bildet mit Aminosäuren unter leicht alkalischen Bedingungen Fmoc-Aminosäuren, die damit fluorometrisch nachweisbar werden. Die Methode ist hochempfindlich, sie kann zum Nachweis von Aminosäuren im µM-Bereich eingesetzt werden.

Aufbau der HPLC-Apparatur:

- Zwei Kurzhubdoppelkolbenpumpen (consta Metric 3000, Milton Roy)
- Mischkammer und Entgaser
- Autosampler mit Kühlung (4°-6°C) und Säulenofen (45°C) (Marathon, Spark)
- Injektionsschleife 20 µl
- Shimadzu Fluoreszenz-Detektor (RF-535)
- PC mit Chromatographie-Software (Axxiom chromatography, Calabasas) zur Steuerung des Gradienten, Kontrolle der Flussrate (1,25 ml min⁻¹) und Bestimmung der Peakflächen durch Integration

Die Probenaufgabe erfolgte automatisch über den Autosampler. Die Auftrennung erfolgte an einer reversed-phase-Säule (125 x 4, Grom Superspher 60 RP8, 4µm), dabei wurde ein Fließmittelgradient gefahren (Tabelle 5).

Durchführung:

Die Zellextrakte wurden zuerst in Reinstwasser verdünnt (Verdünnung 1:20 - 1:40). Die verdünnten Extrakte wurden vor der Auftrennung mit Fmoc derivatisiert. Dazu wurden 40 µl der Probe oder des Aminosäurestandard in einem Probengläschen zu 40 µl Na-Boratpuffer mit internen Standard Taurin gegeben, nach Zugabe von 80 µl Fmoc-Lösung wurde für 45 s geschüttelt (IKA-Vibrax). Dann wurden 100 µl ADAM-Lösung zugefügt und das Gemisch für 45 s geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz mit 140 µl Laufmittel A aufgefüllt.

Tabelle 5: Zeitverlauf des Laufmittelgradienten zur Auftrennung von FMOC-Aminosäuren.

Zeitpunkt [min]	Laufmittel B [%]
0	0
2	0
8	20
16	27
29	54
31	100

FMOC-Aminosäuren wurden mit einem Fluoreszenzdetektor durch Anregung bei 254 nm und Emission bei 315 nm detektiert. Die Zusammensetzung der Proben wurde durch Vergleich mit externen Standardsubstanzen ermittelt.

2.10. Proteinkristallisation

Bei Versuchen zur Proteinkristallisation wurde das Dampfdiffusions-Prinzip angewendet. Hierbei wurden 2 μL einer Proteinlösung (10-20 mg/mL) mit 2-4 μL einer Mutterlösung (Komponente des verwendeten „Crystal Screen“-Kit der Firma HAMPTONRESEARCH (hamptonresearch.com)), bestehend aus einem Fällungsmittel und diversen anderen Zusätzen, gemischt und in einem versiegelten Raum einem sehr viel größeren Reservoir (500 μL) derselben Mutterlösung gegenübergestellt. Aufgrund der geringeren Fällungsmittelkonzentration im Proteintröpfchen tritt eine Diffusion von Wassermolekülen in Richtung Reservoir ein. Die Fällungsmittelkonzentration im Tropfen nimmt zu und die Keimbildungsbarriere wird möglicherweise überschritten, so dass es zur Bildung von Kristallisationskeimen kommt.

Versuche zur Kristallisation von aufgereinigtem Enzym wurden nach der „hanging drop“-Methode durchgeführt. Dabei hängt der Tropfen über dem Reservoir.

2.11. *Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes mit dem Farbstoff Snarf-1 im Fluoreszenzphotometer*

Der Fluoreszenzfarbstoff Snarf-1 der Firma MOLECULAR PROBES (Portland, Oregon) ist ein Fluoresceinderivat, das in Abhängigkeit vom pH-Wert sein Fluoreszenzspektrum ändert. Er liegt in Form eines Acetomethoxyester als Prefluorophor vor, der darüber hinaus eine Succinimidylesterfunktion aufweist.

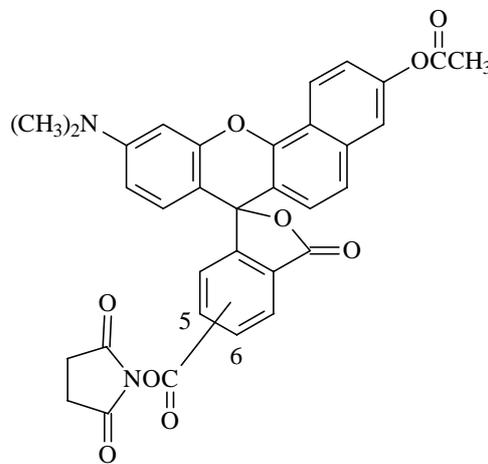


Abbildung 5: Der Fluoreszenzfarbstoff Snarf-1 (als Acetomethoxyester Succinimidylester)

Die Acetomethoxyesterfunktion macht den Farbstoff membrangängig. Im Zellinneren wird diese Funktion durch Esterasen gespalten und dadurch vom Prefluorophor zum Fluorophor umgewandelt. Dieser ist nicht mehr membrangängig und kann daher das Zellinnere nicht mehr durch Diffusion verlassen. Um ein Ausschleusen des Farbstoffs durch die verschiedenen Membrankanäle und Transportsystem einzudämmen wurde die Succinimidylesterfunktion eingeführt. Dadurch erhält der Farbstoff die Möglichkeit an zellinterne aliphatische Aminofunktionen zu binden und sich fest im Zellinnern zu integrieren. Das Phänomen des „Ausbluten“, das den Einsatz vieler Farbstoffsysteme sehr erschwert, wird unterbunden. Durch geeignete Waschprotokolle ließ sich das Problem der Hintergrundfluoreszenz durch ins Medium abgegebene Farbstoffmoleküle fast vollständig umgehen.

2.11.1. Beladen der Zellen mit dem Farbstoff

Zum Beladen der Zellen mit Farbstoff wurde zunächst eine Bakterienkultur pelletiert und in einem Phosphatpuffer (50 mM Phosphat, Salzgehalt entsprechend dem Medium der Bakterienkultur, pH 7,2) resuspendiert und mittels einer Farbstoffstammlösung (50 µg in 42 µL DMSO) auf 10 µM Farbstoffkonzentration gebracht. Es wurde für 30 min bei 30° C im Schüttelschrank inkubiert. Zum Auswaschen von ungebundenem Farbstoff wurden die Bakterien zunächst pelletiert und dann in frischem Phosphatpuffer, der zusätzlich mit einer dem Medium entsprechenden Glucosemenge versetzt war, resuspendiert und für 15-20 min bei 30° C im Schüttelschrank inkubiert. Die Zugabe von Glucose liefert den Zellen die Energie um ungebundenen Farbstoff durch Transportsysteme aus dem Cytoplasma zu entfernen. Diesem Waschschrift folgt eine Pelletierung und Resuspendierung in Medium oder Puffer, der gegebenenfalls mit Glucose versetzt war. Vor einer weiteren Verwendung wurde die Zellen für mindestens 15 Minuten im Schüttelschrank inkubiert, um sich nach der strapaziösen Färbe- und Entfärbeprozedur zu regenerieren. Dies ist möglich, da eine Abgabe von Farbstoff an das Medium minimal ist.

2.11.2. Ausfluss des Farbstoffes aus den Bakterien

Um den Prozess der Farbstoffabgabe der Bakterien an das Medium zu untersuchen, wurde einer Suspension von angefärbten Bakterien in Glucose-haltigem Puffer bei 30° C im Schüttelschrank inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde der Suspension eine Probe entnommen und deren Fluoreszenz (Fluoreszenzphotometer LS50B der Firma PERKIN-ELMER) vermessen. Dann wurde die Suspension zentrifugiert und die Fluoreszenz des Überstandes bestimmt.

2.11.3. Kalibration des Systems

Ebenso wie die Absorption ist die Fluoreszenz ein Phänomen, das in Abhängigkeit von Parametern wie Lösungsmittel, Temperatur und pH-Wert mehr oder weniger stark ausgeprägt ist. Vor allem die Fluoreszenz kann bei Anwesenheit von ebenfalls in Lösung befindlichen Substanzen großen Schwankungen unterworfen sein. Daher muss ein System, das sich der Fluoreszenz als analytisches Medium bedient unter möglichst exakt nachgebildeten experimentellen Bedingungen zunächst kalibriert werden. Die genaueste Nachbildung des Zellinneren einer Bakterie ist das Zellinnere der Bakterie selbst. Um eine Kalibration des verwendeten Fluoreszenz-pH-Indikators zu erreichen, ist eine Korrelation zwischen dem cytoplasmatischen pH-Wert und dem gemessenen Fluoreszenzspektrum von

nöten. Der innere pH-Wert eines Bakteriums lässt sich gewöhnlich nur schwer genau einstellen, da das Bakterium diesen normalerweise kontrolliert. Durch Einsatz von Ionophoren kann man jedoch einen Ausgleich zwischen dem cytoplasmatischen und dem pH-Wert des Mediums erzwingen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu der Ionophor Nigericin verwendet (Abbildung 6).

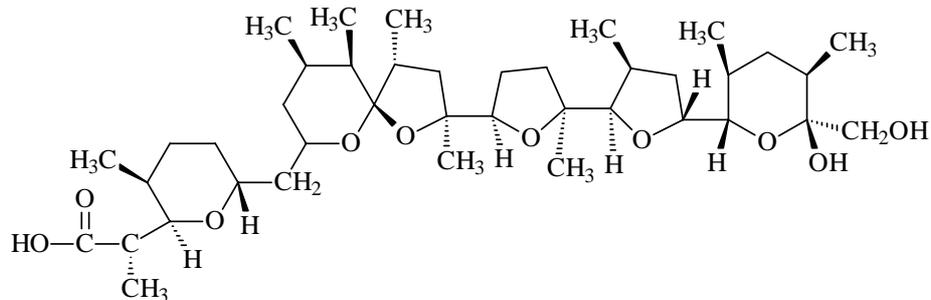


Abbildung 6: Struktur des Ionophors Nigericin

Die Berechnung des pH-Wertes auf Basis des Fluoreszenzspektrum erfolgte unter Zuhilfenahme der sogenannten „ratio-imaging“-Methode. Dabei wird der Fluoreszenzemissionswert einer Wellenlänge durch den Wert der Emission an einer anderen Stelle des Fluoreszenzspektrum geteilt. Da es sich bei dem Farbstoff vereinfacht gesehen um eine schwache Säure handelt, die im protonierten Zustand (HA) eine andere Fluoreszenzemissionswellenlänge hat als im deprotonierter Form (A^-), lässt sich aus der Henderson-Hasselbach-Gleichung ein linearer Zusammenhang zwischen pH-Wert und dem Logarithmus des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten folgern. Die Herleitung dieses Zusammenhang ist in Gleichung 1 dargelegt.

$$k_a = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA]}$$

$$[H_3O^+] = k_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$-\log[H_3O^+] = -\log k_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Henderson – Hasselbach – Gleichung

mit $I_{A^-} \propto [A^-]$ und $I_{HA} \propto [HA]$

$$pH = pK_a - \log \frac{I_{HA}}{I_{A^-}}$$

Gleichung 1: Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und den Fluoreszenzintensitäten I_{A^-} und I_{HA}

Die Wahl der verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlänge für weitere Arbeiten wurde auf Grundlage eines Differenzspektrum bei unterschiedlichen pH-Werten getroffen (siehe Ergebnisteil). Angeregt wurde im folgenden bei einer Wellenlänge von 515 nm. Es wurde jeweils ein komplettes Emissionsspektrum (Fluoreszenzphotometer LS50B der Firma PERKIN-ELMER) aufgenommen. Als Berechnungsgrundlage für den pH-Wert wurden die Intensitäten der Emission bei 580 nm und 640 nm verwendet.

2.11.4. Messung des cytoplasmatischen pH-Wertes

Mit Snarf-1 angefärbte Zellen wurden, nachdem sie sich für einige Zeit unter ihren vorigen Wachstumsbedingungen regenerieren konnten, den zu untersuchenden Bedingungen ausgesetzt. Dazu wurde ein Teil der Bakterien in Puffer oder Medium verdünnt und die Fluoreszenz in einem Fluoreszenzphotometer (Fluoreszenzphotometer LS50B der Firma PERKIN-ELMER) vermessen. Aus den Spektren der Bakterien wurden durch Vergleich mit den Spektren der Kalibration die cytoplasmatischen pH-Werte berechnet.

2.12. Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop Leica DM LB der Firma LEICA. Als Detektor diente die CCD Kamera DC 300F von LEICA. Die Belichtungszeit wurde entsprechend des Präparates jeweils passend gewählt, um ein gutes Signal zu Rausch-Verhältnis zu erreichen.

2.13. Chemikalien und Enzyme

Acetonitril, HPLC grade	Roth
Agar	Sigma
Ammoniumchlorid p.a., NH_4Cl	Merck
Ammoniumsulfat p.a., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat p.a., K_2HPO_4	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO), p.a.	Roth
Glucose · H_2O (Monohydrat)	Merck
Glycerin (wasserfrei)	Merck
Kaliumhydroxid p.a., KOH	Merck
Eisensulfat p.a., $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Merck
Ethylendiamintetraacetat, Dinatrium-(EDTA)	Fluka
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Roth
Hefeextrakt (Yeast Extract)	Fluka
Kalziumchlorid p.a., $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck
Künstliches Meersalz (Tropic Marine)	Tagis-Aquarium, Dreieich
Magnesiumsulfat p.a., $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Magnesiumchlorid, MgCl_2	Merck
Mangansulfat, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
Marine Peptone S 090	Primex
(3-[N-Morpholin]propansulfonsäure), MOPS	Sigma
Natriumcarbonat p.a., Na_2CO_3	Merck
Natriumhydrogencarbonat p.a., NaHCO_3	Merck
Natriumchlorid NaCl	Merck
Natrium-Laurylsulfat, SDS	Sigma
Pepton (aus Casein pankreatisch)	Merck

verdaut)	
Pipes	Roth
Rubidiumchlorid, RbCl	Sigma
Tris	Roth
TritonX-100	Sigma

2.14. Computerprogramme

2.14.1. Igor Pro

Bei Igor Pro (Version 4.08) handelt es sich um ein wissenschaftliches Datenanalyseprogramm der Firma WAVEMETRICS (Lake Oswego, Oregon, USA). Die Möglichkeit das Programm durch eigene Routinen zu erweitern, hat die Analyse der Fluoreszenzspektren wesentlich erleichtert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das Programm einige Routinen erarbeitet, die der Verarbeitung und grafischen Darstellung von Fluoreszenzspektren dienen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist der Programmcode, der entwickelt wurde, in den Anhang ausgelagert.

2.14.2. Clone Manager

Zur Darstellung und Planung der Arbeiten an den Vektorsystemen wurde das Softwarepaket Clone Manager 7 (Version 7.03) der Firma SCIENTIFIC AND EDUCATIONAL SOFTWARE einschließlich der ebenfalls dort erhältlichen Software Primer Designer in der Version 3.0 verwendet.

3. Ergebnisse

Die Osmoadaptation ist ein Prozess, der wie die meisten physiologischen Mechanismen auf vielen Organisationsebenen stattfindet. Ändern sich die osmotischen Bedingungen, so werden Transportsysteme aktiv oder Membranporen sowie mechano-sensitive Kanäle öffnen sich, die Expression von Gengruppen wird vermehrt oder vermindert, und die Aktivität von Enzymen muss den neuen Bedingungen entsprechend angepasst werden. In Bezug auf die molekularen Anpassungsstrategien, mit denen *M. halophilus* bei einem hyperosmotischen Ereignis sein Überleben zu sichern versucht, sind in naher Vergangenheit auf den Gebieten der Genregulation (Bestvater und Galinski, 2002) und der Transportsysteme für kompatible Solute (Vermeulen, 2003) viele Ergebnisse erzielt worden, die zum Verständnis des Prozesses der Osmoadaptation beitragen. Dem steht das völlige Fehlen von Informationen über die Charakteristika der beteiligten Enzyme und möglicher molekularer Mechanismen zur Kontrolle der katalytischen Aktivität dieser gegenüber. Wie bereits in vorigen Arbeiten (zu einer Zusammenfassung siehe Galinski, 1995) gezeigt wurde, synthetisiert *M. halophilus* die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin, um sich einer hyperosmotischen Veränderung seiner Umgebung anpassen zu können. Die genetische Grundlage für die Synthese von Ectoin konnte bereits durch Louis und Galinski, 1997 aufgeklärt werden. Seitdem ist keine weitere Veröffentlichung über die Enzyme, durch die *M. halophilus* sich einem steigenden Salzgehalt seiner Umgebung anpasst, und die molekularen Mechanismen, die diese Enzyme möglicherweise kontrollieren, erfolgt.

3.1. Konstruktion der Expressionssysteme

Ausgehend von einem ersten Versuch eines der Proteine des Ectoinbiosyntheseweges von *M. halophilus* aufzureinigen (Bestvater, 2001), wurde in dieser Arbeit eine Reihe von Expressionsvektoren aus der Familie der kommerziellen pET-Vektoren konstruiert. Als Grundlage dienten die beiden Vektoren pET-15b und pET-24d, in die jeweils eines der Ectoin-Gene kloniert wurde. Die Vektoren unterscheiden sich in zwei Punkten voneinander. Zum Einen fügen Derivate des Vektors pET-15b am N-terminalen Ende des Proteins einen Histidinüberhang an, die Derivate des Vektors pET-24d am C-terminalen Ende. Zum anderen kodiert pET-15b zwischen Histidinüberhang und Zielgen für eine Thrombinschnittstelle. Dies ist in pET-24d nicht realisiert. Im folgenden werden die hergestellten Konstrukte vorgestellt. Dabei wird jeweils der unter der Kontrolle des T7-Promotors liegende Teil des Vektors dargestellt. Tabellarisch werden wichtigsten Charakteristika des jeweiligen Zielproteins, wie sie sich aus der Proteinsequenz ableiten

lassen, angegeben. Um unerwünschte Mutationen, die möglicherweise im Laufe der Vektorkonstruktion aufgetreten sind, auszuschließen zu können, ist in allen Fällen eine Sequenzierung (extern als Auftragsarbeit bei GATC (Konstanz) durchgeführt) vorgenommen worden.

3.1.1. pET-15b *ectA*

Um die durch das Gen *ectA* kodierte 2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (DABAAC_T) aufzureinigen, wurde durch PCR ein DNA-Fragment erzeugt, das in die Gen-flankierenden Bereiche die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* einführt. Hierzu wurde die PCR mit dem Primerpaar *ectA* f_{NHIS} und *ectA* r_{NHIS} und pOSM12 als Matrize durchgeführt. Die Sequenz der Primerpaare wich geringfügig von der Sequenz der Vorlage ab, wodurch die gewünschten Schnittstellen erzeugt wurden. Nach hydrolytischer Spaltung dieses DNA-Fragmentes sowie des Plasmids pET-15b mit den entsprechenden Restriktionsenzymen konnte das Gen *ectA* in den Vektor kloniert werden. Die Sequenz des weiterverwendeten Klones ist in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt. Es wurde darauf verzichtet das ganze Gen darzustellen.

```

995C taatacagact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag
    >>.T7 Promoter..>>

915C atataccatg ggcagcagcc atcatcatca tcatacagc agcggcctgg tgccgcgagg cagccatag gaaacgaaaa
                                NdeI
    >>.....His-Tag.....>>
    >>.....ectA.....>>
    >>.....ectA His.....>>
  
```

Abbildung 7: Der Teil des Vektors pET-15b *ectA*, der das 5'-Ende des Konstruktes enthält. Der Einbau des Gens *ectA* erfolgte an der *NdeI*-Schnittstelle. Der rot unterstrichene Bereich zwischen dem His-Tag und dem Gen codiert für eine Thrombin-Schnittstelle.

```

                                BamHI
360C gacatttoga ataggacct ttacaaaata agtagcggat cgggctgcta acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg
    >.....ectA.....>>
    >.....ectA His.....>>

280C ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttg
    >>.....T7 Terminator.....>>
  
```

Abbildung 8: Der Teil des Vektors pET-15b *ectA*, der das 3'-Ende des Konstruktes enthält. Der Einbau des Gens *ectA* erfolgte an der *BamHI*-Schnittstelle.

Induziert man die Expression der T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von IPTG zu einer Kulturlösung von BL21 (DE3) pET-15b *ectA* pLysS, resultiert dies in einer Expression des Gens *ectA*. Das bei einer erfolgreichen Expression entstehende Produkt hat eine Länge von 192 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 21548,9 Da.

Tabelle 6: Charakteristika des Produktes der Expression von BL21 pET-15b *ectA*

Länge	192 AS
Molgewicht	21548,9 Da
theoretischer pI	4,65

Das aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS und dem hier konstruierten Vektor pET-15b *ectA* bestehenden Expressionssystem war wie erwartet in der Lage, das Zielprotein zu produzieren. Für das aufgereinigte Protein wurde darüber hinaus gezeigt, dass es die Reaktion von 2,4-Diaminobuttersäure zu N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure katalysiert. Daher wurde von weiteren Vektorkonstruktion mit pET-24d als Grundlage abgesehen.

3.1.2. pET-15b *ectB*

Zur Konstruktion des Vektors pET-15b *ectB* wurde vorgegangen wie schon bei der Konstruktion des *ectA*-Pendants. Wiederum wurden die Schnittstellen durch PCR mit mutierten Primern (*ectB* f NHIS, *ectB* r NHIS) eingeführt. Die Sequenz des weiterverwendeten Klons ist in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt.

```

1773C taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataatTT tgtttaactt taagaaggag
    >>.T7 Promoter...>>
                                     XbaI
1693C atataccatg ggcagcagcc atcatcatca tcatcacagc agcggcctgg tgccgcgcgg cagccatatg atgcagaatg
                                     NdeI
    >>.....His-Tag.....>>
    >>.....ectB.....>
    >>.....ectB His.....>
  
```

Abbildung 9: Der Teil des Vektors pET-15b *ectB*, der das 5'-Ende des Konstruktes enthält. Der Einbau des Gens *ectB* erfolgte an der *NdeI*-Schnittstelle. Der rot unterstrichene Bereich zwischen dem His-Tag und dem Gen kodiert für eine Thrombin-Schnittstelle.

```

                                     BamHI
371C ccgctgaaag caacctcgta gccaaataat ccactgcatg actaattgga tccggctgct aacaaagccc gaaaggaagc
>.....ectB.....>>
>.....ectB His.....>>

291C tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata actagcataa cccctggggg cctctaaacg ggtcttgagg gggtttttg
>>.....T7 Terminator.....>>

```

Abbildung 10: Der Teil des Vektors pET-15b ectB, der das 3'-Ende des Konstruktes enthält. Der Einbau des Gens *ectB* erfolgte an der *Bam*HI-Schnittstelle.

Das 447 Aminosäuren lange Genprodukt einer erfolgreichen Expression der Transaminase hätte ein Molekulargewicht von 49355,8 Da.

Tabelle 7: Charakteristika des Produktes der Expression von BL21 pET-15b ectB

Länge	447 AS
Molgewicht	49355,8 Da
theoretischer pI	5.50

Das Ziel, mit dem aus *E.coli* BL21 und pET-15b ectB bestehenden Expressionssystem die Transaminase aufzureinigen zu können, wurde nicht erreicht. Zwar konnte der konstruierte Vektor erfolgreich in den Wirtstamm BL21 eingebracht werden (Nachweis erfolgte durch PCR), jedoch konnte nach der Induktion und auch nach Variation der Expressionsbedingung (IPTG-Konzentration, Salzgehalt des Mediums, Temperatur nach der Induktion) kein Zielprotein in der gewonnenen Biomasse nachgewiesen werden.

3.1.3. pET-24d ectB

Da mit einem pET-15b-Derivat keine Transaminase aufgereinigt werden konnte, wurde der Vektor pET-24d ectB konstruiert, wobei analog obigen Ausführungen vorgegangen wurde. Die Schnittstellen wurden durch PCR mit mutierten Primern (ectB f CHIS, ectB r CHIS) eingeführt. Die Sequenz des weiterverwendeten Klons ist in Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellt.

```

1380C aattaatacag actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaaataa ttttgtttaa cttaagaag
    >>.T7 Promotor...>>

          NcoI
          |
1300C gagatatacc atggatgatg cagaatgatc tcagcgtttt taatgaatac gaatcggaag tacgcagtta tgtgagagga
    >>.....ectB.....>>
    >>.....ectB His.....>>
  
```

Abbildung 11: Der Teil des Vektors pET-24d ectB, der das 5'-Ende des Konstruktes enthält. Der Einbau des Gens *ectB* erfolgte an der *NcoI*-Schnittstelle.

```

          XhoI
          |
    20C aacctcgtag ccaaactcga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt
    >.....ectB.....>>
    >.....ectB His.....>>
          >>....His Tag....>>

6458C ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttg
          >>.....T7 Terminator.....>>
  
```

Abbildung 12: Der Teil des Vektors pET-24d ectB, der das 3'-Ende des Konstruktes enthält. Der Einbau des Gens *ectB* erfolgte an der *XhoI*-Schnittstelle.

Das 435 Aminosäuren lange Genprodukt einer erfolgreichen Expression der Transaminase hätte ein Molekulargewicht von 49257,7 Da.

Tabelle 8: Charakteristika des Produktes der Expression von BL21 pET-24d ectB

Länge	435 AS
Molgewicht	49257,7 Da
theoretischer pI	5,26

Ebenso wie im Expressionssystem, das auf einem pET-15b-Derivat basiert, konnte auch in der Biomasse von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pET-24d ectB nach der Induktion keine Transaminase nachgewiesen werden. Der Versuch durch eine Variation der Kultur- und Expressionsbedingungen doch noch das erwünschte Protein zu erhalten, führte nicht zum Ziel. Daher konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Charakterisierung der Transaminase durchgeführt werden.

3.1.4. pET-24d ectC

Ein auf pET-15b basierender Expressionsvektor lieferte kein aktives Enzym, daher erfolgte die Konstruktion des Vektors pET-24d ectC. Dabei wurde analog zu vorigen Vektorkonstruktionen vorgegangen. Die Schnittstellen wurden durch PCR mit mutierten Primern eingeführt. Die entscheidenden Sequenzbereiche sind in Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellt. Um eine möglicherweise unerwünscht aufgetretene Mutation während der Amplifikation von *ectC* ausschließen zu können, wurde der für die Weiterverwendung vorgesehenen Klon sequenziert. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Christine Kiss im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Kiss, 2000) durchgeführt.

```

5145  ttaatacgac tcactatagg ggaattgtga gcgataaca atccccctct agaaataatt ttgtttaact ttaagaagga
      >>.T7-Promotor...>>
      xbaI
5225  gatataccat ggctagccgg aatacacaat gaaagtaatt aaactcgaag atttgctcgg cactgaacgt gaagtagatg
      >>.....EctC.....>
      >>.....ectC His.....>

```

Abbildung 13: Der Teil des Vektors pET-24d ectC, der das 5'-Ende des Konstruktes enthält. Der Einbau des Gens *ectC* erfolgte an der *NheI*-Schnittstelle.

```

                    XhoI
5618  tgtatatccc gctgatcttg atctcgagca ccaccaccac caccactgag atccggctgc taacaaagcc cgaaaggaag
                    >>....His-Tag.....>>
>.....EctC.....>>
>.....ectC His.....>>

58  ctgagttggc tgctgccacc gctgagcaat aactagcata acccctggg gcctctaaac gggctcttgag ggggtttttg
                    >>.....T7-Terminator.....>>

```

Abbildung 14: Der Teil des Vektors pET-24d ectC, der das 3'-Ende des Konstruktes enthält. Der Einbau des Gens *ectC* erfolgte an der *XhoI*-Schnittstelle.

Das 137 Aminosäuren lange Genprodukt einer erfolgreichen Expression der Ectoinsynthese hat ein Molekulargewicht von 15861,5 Da.

Tabelle 9: Charakteristika des Produktes der Expression von BL21 pET-24d *ectC*

Länge	137 AS
Molgewicht	15861,5 Da
theoretischer pI	4.76

Anders als bei den Versuchen die Transaminase aufzureinigen, führte der Wechsel des Expressionsvektors mit der damit verbundenen Verschiebung des Histidinüberhanges vom N-terminalen zum C-terminalen Ende der Aminosäurekette im Fall der Ectoin-Synthase zu einem funktionstüchtigen Expressionssystem. Im Gegensatz zu dem auf dem pET-15b *ectC* basierenden Expressionssystem war das Enzym nach der Aufreinigung aktiv und katalysierte die Kondensation von N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure zu Ectoin.

3.2. Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der Enzyme erfolgte durch Anwendung von affinitätschromatographischen Verfahren. Wie bereits erwähnt, werden von den konstruierten Expressionssystemen Fusionsproteine erzeugt. Das jeweilige Zielprotein ist dabei mit einem sechsfachen Histidinüberhang versehen, der die Aufreinigung durch Anwendung einer Ni-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die DABAaCT und Ectoin-Synthase ein Aufreinigungsverfahren etabliert, das es erlaubt in nur einen

Aufreinigungsschritt das Enzym von unerwünschten Proteinen aus einem Lysat aufzureinigen und in einer ausreichend großen Menge zu gewinnen. Die Entwicklung des Aufreinigungsverfahrens durchlief dabei verschiedene Stadien, die im folgenden dargestellt sind.

3.2.1. Nachweis der erfolgreichen Expression

Zunächst musste sichergestellt werden, dass das hergestellte Expressionssystem das erwünschte Protein synthetisiert. Dazu wurde eine 100 mL-Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen und mit 1 mM IPTG induziert. Im Abstand von je einer Stunde wurden der Kultur Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis einer solchen SDS-PAGE ist exemplarisch für die DABAaCT in Abbildung 15 dargestellt. Wie man deutlich erkennt, ist ein starker Zuwachs einer Proteinbande bei der für das Fusionsprotein erwarteten Größe zu verzeichnen. Es kann daher von einer erfolgreichen Expression des Proteins ausgegangen werden, wobei anzumerken ist, dass an dieser Stelle noch keine Aussage über die Aktivität des exprimierten Proteins gemacht werden kann.

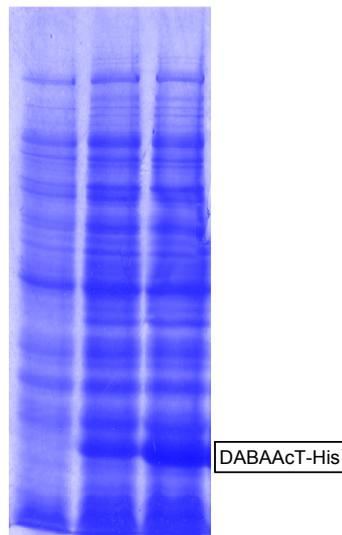


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Expression von DABAaCT-His. In den drei Spuren ist das Gesamtprotein von Proben einer Expression aufgetragen. Die Proben wurden direkt vor der Induktion (linke Spur), eine Stunde (mittlere Spur) und zwei Stunden (rechte Spur) danach genommen.

Um die Wahrscheinlichkeit aktives Protein aufzureinigen zu erhöhen, wurde im folgenden ausschließlich mit der Fraktion der löslichen Proteine weitergearbeitet. Auf eine

Renaturierung von ausgefallenen oder in Form von Einschlusskörperchen vorliegendem Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

3.2.2. Ermittlung der optimalen Aufreinigungsbedingungen

Nachdem nachgewiesen war, dass die Expressionssysteme in der Lage waren, das gewünschte Protein zu erzeugen, wurde ein Aufreinigungsprotokoll entwickelt, das eine effektive Isolierung des Zielproteins aus der Vielzahl der in einem Lysat vorliegenden Proteine ermöglicht. Das Kernstück eines solchen Protokolls ist die Ermittlung optimaler Wasch- und Elutionsbedingungen.

Eine Vielzahl von Proteinen wurde bereits durch das im Lysispuffer in geringer Konzentration (10 mM) vorhandene Imidazol an einer Anbindung an die Ni-NTA-Matrix gehindert. Es gibt jedoch eine große Zahl von Proteinen die ebenso wie das exprimierte Fusionsprotein eine hohe Affinität zu Ni-Ionen haben. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass sie eine ähnlich hohe Affinität wie das mit sechs Histidinen versehene Zielprotein aufweisen. Durch schrittweises Erhöhen der Imidazolkonzentration der verwendeten Waschlösung konnten bei einer Konzentration von 50 mM störende Fremdproteine weitestgehend von der Säule abgelöst werden, ohne dass es dabei zu einem hohen Verlust an Zielprotein kam. Um das Risiko eines möglicherweise schädigenden Einflusses einer hohen Konzentration an Imidazol zu umgehen, wurde das Protein bei einer möglichst geringen Imidazolkonzentration (110 mM bei DABAAcT; 120 mM bei der Ectoin-Synthase) eluiert. Im Anschluss wurde das Imidazol durch eine Größenausschlusschromatographie vom Protein getrennt.

3.2.3. SDS-PAGE

Einer Isolation schließt sich stets eine Analyse der Reinheit an. Verunreinigungen durch fremde Proteine sind im vorliegenden Fall sehr gut durch eine SDS-PAGE nachzuweisen, da nach Durchführung einer Affinitätschromatographie eventuell vorhandene Fremdproteine nur selten die gleiche Größe wie das Zielprotein haben. Um geringe Mengen an unerwünschten Proteinen im Eluat nachweisen zu können, wurde das Gel mit sehr viel Protein (5 µg) beladen. In der Folge war die Bande, die durch das Zielprotein erzeugt wurde, sehr stark ausgeprägt und die Ausdehnung in der Laufrichtung des Gels sehr breit. Normalerweise ist dies ein unerwünschter Effekt, da er einer verlässlichen Größenbestimmung entgegenwirkt, doch um die in kleineren Mengen vorliegenden unerwünschten Proteine nachzuweisen, war die Überladung des Gels eine verlässliche Methode, wie Abbildung 16 demonstriert.

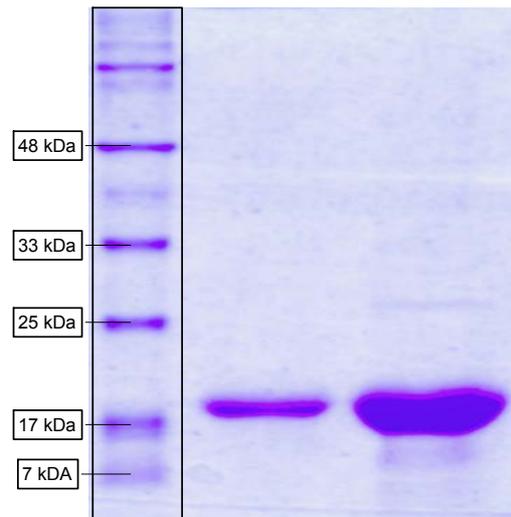


Abbildung 16: SDS-PAGE Analyse einer DABAAct-Lösung. Es wurden unterschiedliche Mengen einer Proteinlösung aufgetragen. Eine Spur enthält 1 µg Protein, die andere 5 µg. Zwar ist die Bande mit weniger Protein deutlich schärfer, doch Verunreinigungen die bei der Auftragung einer größeren Menge sichtbar sind, lassen sich dann nicht mehr nachweisen.

Wie aus den Abbildung 16 und Abbildung 17 hervorgeht, konnten sowohl die Acetyltransferase als auch die Ectoin-Synthase in hoher Reinheit isoliert werden. Lediglich kleine Beimengungen an Fremdproteinen waren in den Elutionen der beiden Proteine nachzuweisen.

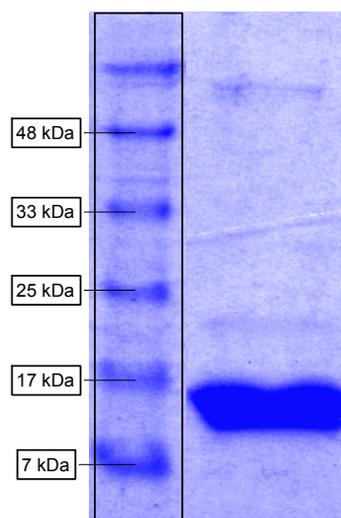


Abbildung 17: SDS-PAGE Analyse einer Ectoin-Synthase Elution. Um etwaige Verunreinigungen nachweisen zu können, wurden mit 5 µg sehr viel Protein aufgetragen.

Nachdem klargestellt war, dass die Proteine in Reinform gewonnen werden konnten und die Molekülmassen im Rahmen der Messgenauigkeit einer SDS-PAGE den erwarteten Werten entsprach, erfolgte eine genaue Massenbestimmung zur zweifelsfreien Identifizierung der aufgereinigten Enzyme.

3.2.4. Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Molekülmasse ist die Massenspektrometrie die Methode der Wahl. Lange Zeit war es jedoch technisch kaum möglich Proteine zu analysieren, da es sich bei diesen um instabile Gebilde mit großer Molekülmasse handelt. Doch durch die Fortschritte der letzten Jahre hat sich die Massenspektrometrie mit Enzymen zu einer Standardmethode in der Biochemie entwickelt, so dass eine Größenbestimmung über die Methodik der SDS-PAGE durch Gele mit sehr langer Laufstrecke der Vergangenheit angehört. In Abbildung 18 und Abbildung 19 sind die Massenspektren der Acetyltransferase und der Ectoin Synthase dargestellt, wie sie von Dr. Luftmann (Abteilung für Massenspektrometrie, Organisch-chemisches Institut der WWU Münster) mit Proben der jeweiligen Proteine aufgenommen wurden. Man kann deutlich erkennen, dass in beiden Spektren eine Vielzahl von Peaks auftraten, was zunächst verwirrend erscheint. Hinzu kommt, dass bei der Acetyltransferase kein Signal an der Stelle der für dieses Protein erwarteten Masse bestimmt wurde.

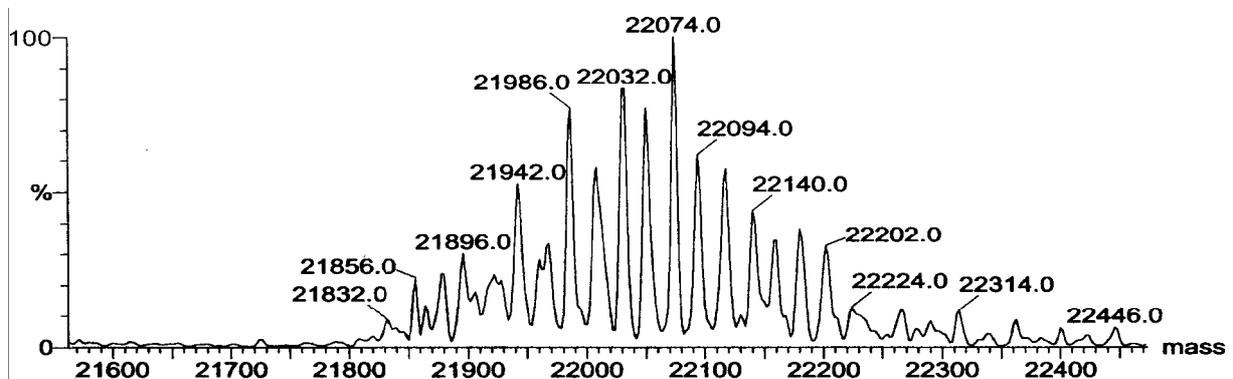


Abbildung 18: Massenspektrum der Acetyltransferase. Das theoretische Gewicht des Proteins ist 21549 Da. Es ist ein Bandenmuster zu erkennen, bei dem der Abstand der Peaks ca. 22 Da beträgt.

Bei einer näheren Betrachtung der Spektren fällt auf, dass der Abstand zweier Peaks jeweils etwa 22 Da beträgt. Dieser Massenunterschied entsteht durch den Austausch eines Wasserstoffions durch ein Natriumion (Dr. Luftmann, pers. comm.). Berücksichtigt man die Tatsache, dass beide Enzyme (wie in der Einleitung bereits erwähnt) eine ausgesprochen hohe Anzahl an sauren Aminosäuren aufweisen, die jeweils statt eines Wasserstoffions auch ein Natriumion binden können, ergibt sich zwanglos, dass die jeweiligen Peaks durch

Proteinmoleküle mit unterschiedlicher Anzahl an Natriumionen erzeugt wurden. Bei Addition einer unterschiedlichen Anzahl von Natriummassen zum theoretischen Gewicht eines Enzyms ergibt sich dann das jeweils tatsächlich erhaltene Massenspektrum.

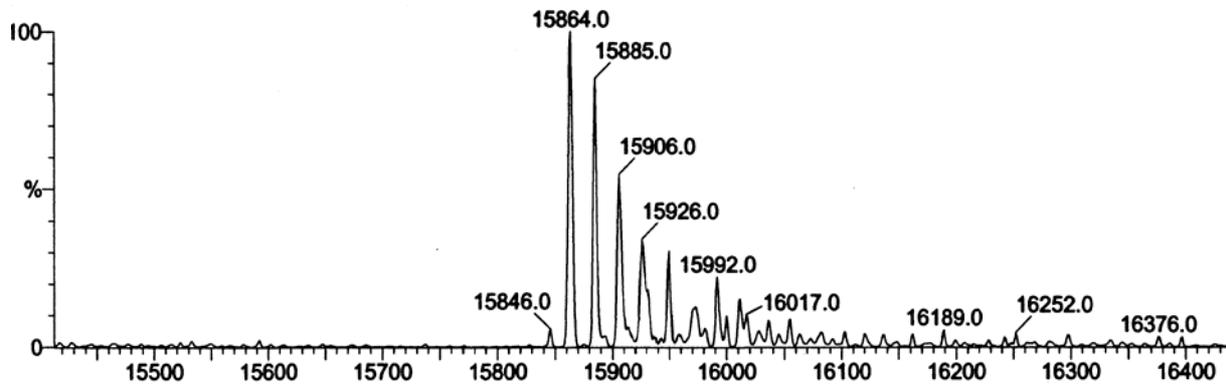


Abbildung 19: Massenspektrum der Ectoin Synthase. Die theoretische Molekülmasse beträgt 15861 Da. Sehr gut erkennbar ist der Massenunterschied von ca. 22 Da zweier benachbarter Peaks.

Es ist weiterhin auffällig, dass die Acetyltransferase eine weitaus größere Anzahl an Natriumionen gebunden hat als die Ectoin-Synthase. Dies erklärt sich jedoch durch die Zusammensetzung des jeweils verwendeten Puffergemisches. Prinzipiell ist es vorteilhaft bei der Massenspektrometrie Puffer zu verwenden, die Ammonium als Kation verwenden, da sich dieses in Form von Ammoniak in die Gasphase überführen lässt. Dadurch verbleiben keine Rückstände in Form von Salzkrusten, was die Lebensdauer der verwendeten Geräte erhöht. Bei der Vermessung der Ectoin-Synthase konnte eine Umpufferung des Proteins in einen niedrig konzentrierten Ammoniumformiat-Puffer durchgeführt werden, der durch wenig Natriumchlorid (50 mM) supplementiert war. Der Versuch diese Umpufferung auch mit der Acetyltransferase vorzunehmen war nicht erfolgreich, da das Enzym dabei ausfiel und der Massenspektrometrie nicht mehr zugänglich war. Daher wurde ausnahmsweise eine Probe mit hoher Natriumchloridkonzentration (0,3 M) verwendet. Die größere Verfügbarkeit an Natriumionen erklärt somit die sehr viel ausgeprägte Verschiebung des Spektrums in den Bereich größerer Massen.

3.2.5. Aktivitätsnachweis HPLC

Der gelungenen Isolation der beiden Enzyme schloss sich der Nachweis der katalytischen Aktivität an. Für beide Proteine wurde eine möglichst einfach zusammengesetzte Reaktionslösung hergestellt, die sich jeweils aus einem Phosphatpuffer, Natriumchlorid und den enzymespezifischen Substraten zusammensetzte. Als Substrate wurden im Fall der DABAAct 2,4-Diaminobuttersäure und Acetyl-CoA (in Form des Trilithium-Salzes)

eingesetzt. Das Substrat für die Ectoin-Synthase war $N\gamma$ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure. Der jeweiligen Reaktionslösung wurde direkt nach der Enzymzugabe eine Probe entnommen und eine weitere nach Verstreichen einer angemessenen langen Reaktionszeit (2 h). Die Proben wurde durch Zusatz von Trichloressigsäure inaktiviert. Das Ergebnis der Aktivitätstests auf der HPLC ist in Abbildung 20 für die Acetyltransferase und in Abbildung 21 für die Ectoin-Synthase dargestellt. In Abbildung 20 ist der durch $N\gamma$ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure hervorgerufene Peak klar zu sehen. Die Identifizierung der Substanz erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit mit geeigneten Standards (ohne Abbildung). Die Methode des Vergleichs mit Standardproben ermöglicht ebenso eine Konzentrationsbestimmung der Probe über den Vergleich der Peakfläche. Die Auswertung des Produktpeaks mit den jeweiligen Standards ließ auf einen vollständigen Umsatz der als limitierende Substratkomponente eingesetzte Diaminobuttersäure schließen.

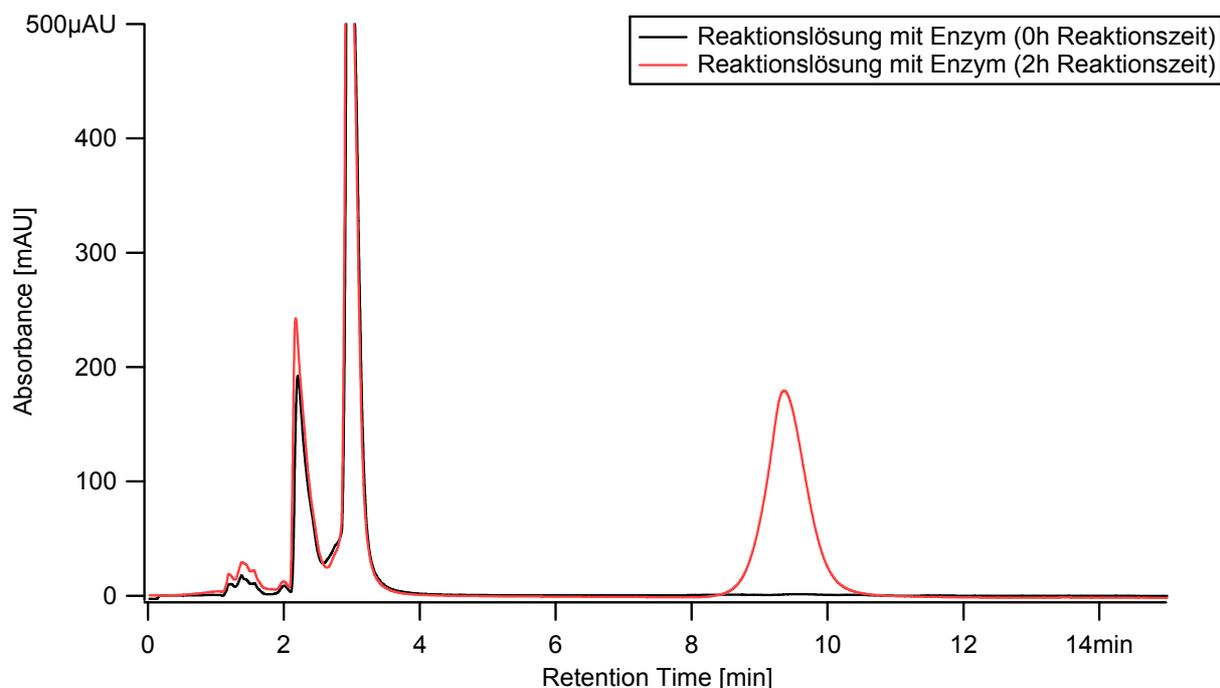


Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm zum Nachweis der katalytischen Aktivität der Acetyltransferase. Es sind die Chromatogramme von zwei Proben abgebildet. Eine Probe wurde vor der Zugabe von Enzym zum Reaktionsansatz, eine weitere nach zwei Stunden Reaktionszeit genommen. Durch Vergleich mit einem Probenstandard für $N\gamma$ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure konnte diese Bande bei ca 9,5 min Retentionszeit eindeutig dem Produkt der Acetylierung von 2,4-Diaminobuttersäure zugeordnet werden.

Analog zur Vorgehensweise bei der Untersuchung der Aktivität der Acetyltransferase wurde eine Reaktionslösung mit $N\gamma$ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure und Ectoin-Synthase bearbeitet. Das in Abbildung 21 gezeigte Chromatogramm demonstriert deutlich den Umsatz von $N\gamma$ -

Acetyl-2,4-diaminobuttersäure zu Ectoin. Der Umsatz von Substrat zu Produkt äußert sich durch das Verschwinden des Peaks bei 9,5 min Retentionszeit und das Auftreten eines Peaks bei 6,9 min Retentionszeit. Die vergrößerte Peakfläche des Ectoinpeaks ist eine Folge der stark erhöhten Absorption von Ectoin bei 210 nm. Durch Vergleich mit geeigneten Standards wurde nachgewiesen, dass N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure vollständig zu Ectoin umgesetzt wurde.

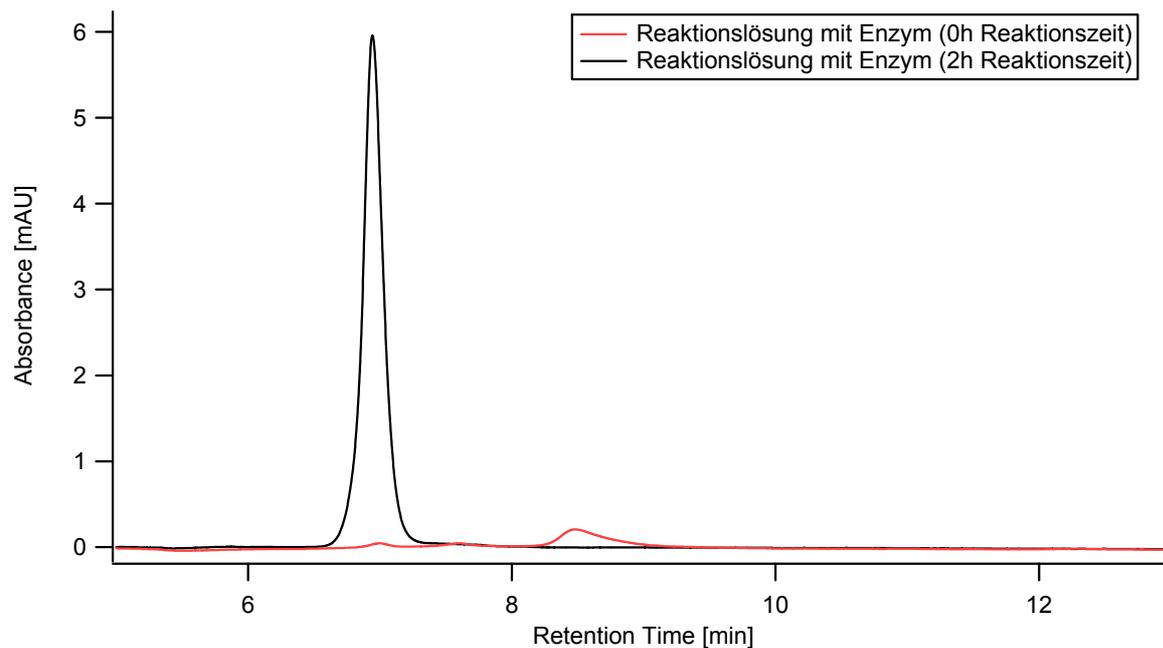


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm zum Nachweis der katalytischen Aktivität der Ectoin-Synthase. Analog zur Vorgehensweise beim Nachweis der Enzymaktivität der Acetyltransferase wurden Proben entnommen und vermessen. Eine Probe wurde vor der Zugabe von Enzym zum Reaktionsansatz, eine direkt im Anschluss an die Zugabe, eine weitere nach zwei Stunden Reaktionszeit genommen. Durch Vergleich mit einem Probenstandard für N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure (8,5 min) und Ectoin (6,9 min) konnte diese Banden eindeutig dem Substrat bzw. dem Produkt der Kondensationsreaktion zugeordnet werden.

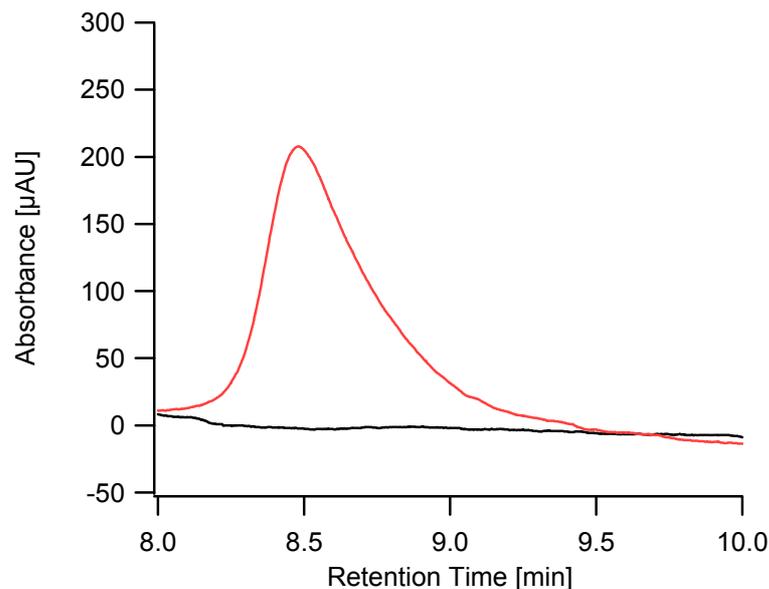


Abbildung 22: Zum besseren Vergleich mit Abbildung 20 wurde der $N\gamma$ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure-Peak aus Abbildung 21 bei 8,5 min hier noch einmal vergrößert dargestellt

Die Unterschiede in der Retentionszeit von $N\gamma$ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure im Chromatogramm der Acetyltransferase- und in dem des Ectoin-Synthase-Aktivitätstests wurde durch eine möglicherweise leicht abweichende Laufmittelzusammensetzung, vor allem aber durch die Säule hervorgerufen, deren Trennleistung sich im Laufe vieler Messungen ändert. Um eine zweifelsfreie Identifizierung und Konzentrationsbestimmung zu ermöglichen wurde vor und nach jedem Messzyklus eine Kalibration des HPLC-Systems mit definierten Standards durchgeführt.

3.2.6. Optimierung der Expressionsbedingungen

Das Ziel jeder Strategie zur Proteinaufreinigung, unabhängig davon ob die Isolation aus dem Ursprungsorganismus oder einem heterologen Expressionssystem erfolgt, ist es in möglichst wenigen und einfachen Schritten ein Maximum an aktivem Enzym zu gewinnen. Ein Aspekt dieser Isolation, die Aufreinigungsstrategie, wurde bereits behandelt (Kapitel 3.2.2) und deren Optimierung dargelegt. Dort wurde erklärt wie aus einem Lysat induzierter Bakterien ein Maximum an reinem Protein gewonnen werden kann. Der große Vorteil eines heterologen Expressionssystems ist die Möglichkeit das gewünschte Protein überexprimieren zu können. Es wird in diesem System deutlich mehr Zielprotein erzeugt als es im Ursprungsorganismus der Fall wäre. Allerdings kann es bei dieser Überexpression auch zu unerwünschten Nebeneffekten kommen. Möglicherweise fällt das Enzym unter den gewählten Wachstumsbedingung bereits in der Zelle aus oder es kommt zur Bildung von

unerwünschten Einschlusskörperchen. Um derartigen Prozessen entgegenzuwirken und um aus einer begrenzten Menge an Kulturlösung ein Lysat mit möglichst viel aktivem Enzym in nativem Zustand gewinnen zu können, ist es ratsam einige Wachstums- und Expressionsbedingungen zu variieren. Häufig beschränkt sich diese Variation auf eine Erniedrigung der Temperatur nach der Induktion um Stoffwechselforgänge zu verlangsamen und so möglicherweise eine korrekte Enzymfaltung zu begünstigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch auch der Salzgehalt des Kulturmediums variiert, da berücksichtigt wurde, dass der Spenderorganismus der Gene ein halophiles Bakterium ist. Zwar kann *E. coli* nicht die gleichen Solutekonzentrationen wie *M. halophilus* tolerieren, aber bis zu einer Salzkonzentration von 3 % war der verwendete *E. coli*-Stamm in LB-Medium noch zu einem guten Wachstum in der Lage (siehe Abbildung 23). Daher wurde der Salzgehalt von 1 % bis 3 % und die Temperaturen zwischen 30° C und 37° C nach der Induktion variiert, um eine optimale Ausbeute an Zielprotein zu erreichen.

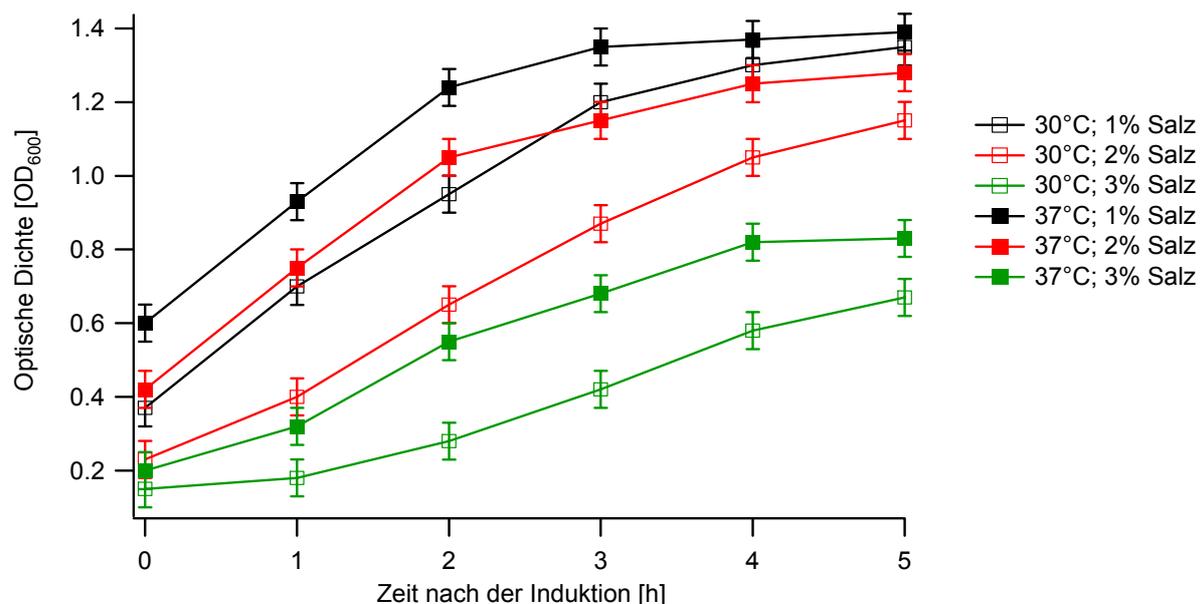


Abbildung 23: Wachstumsverlauf verschiedener Bakterienkulturen nach der Induktion. Es sind die Wachstumskurven von sechs Kulturen abgebildet. Alle Kulturen wurden zum Zeitpunkt $t=0\text{h}$ mit 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen unterschieden sich jeweils im Salzgehalt und wurden nach der Induktion bei 30° C bzw. 37° C inkubiert. Die Zellernte erfolgte üblicherweise 4 h nach der Induktion.

Wie man leicht sieht, war die Ausbeute an Biomasse bei Kulturen, die in einem Medium geringerer Salinität angezogen wurden, deutlich größer als bei solchen, die sich höherer Salinität anpassen mussten. Betrachtet man jedoch die Ausbeute an Zielprotein, die aus der Biomasse einer Kultur isoliert werden konnte, verkehren sich diese Verhältnisse ins Gegenteil (Abbildung 24). Nach 4 h Expressionszeit konnte mehr als doppelt soviel Enzym

aus einer Kultur höherer Salinität aufgereinigt werden, und das obwohl nach dieser Zeit weniger Biomasse entstanden war als in den Kulturen niedriger Salinität. Die Proteinausbeute bezogen auf Biomasse ist bei Kulturen, die bei 3 % Salz inkubiert wurden etwa viermal höher als bei solchen, die bei 1 % Salz angezogen wurden.

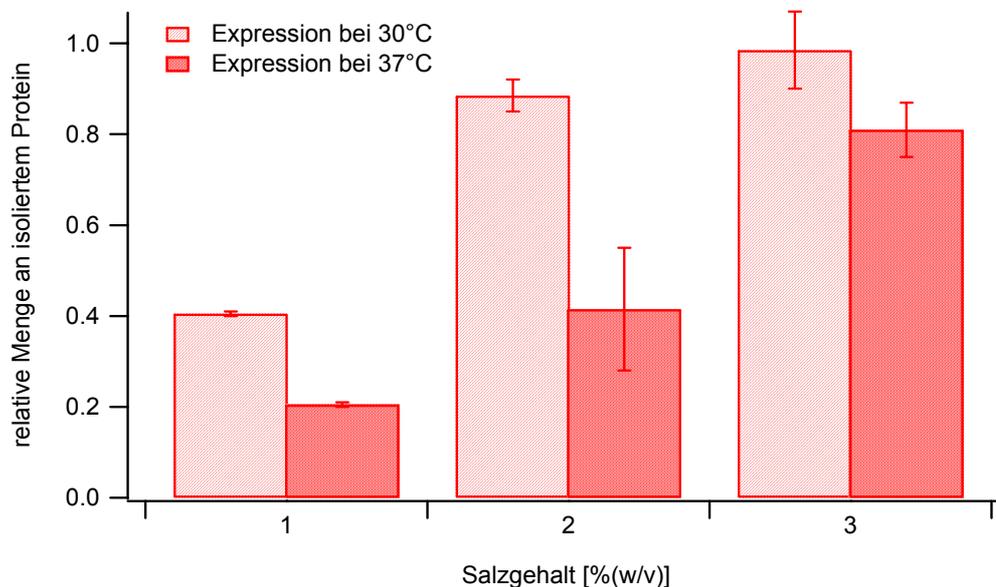


Abbildung 24: Vergleich der Proteinausbeute bei verschiedenen Expressionsbedingungen. Es wurden jeweils Kulturen gleichen Volumens induziert und nach vier Stunden abgeerntet. Die Bakterien wurden lysiert, dann das Zielprotein aus dem Lysat aufgereinigt und quantifiziert.

Dieser Zusammenhang zwischen Enzymsausbeute und Mediensalinität wurde sowohl bei der Acetyltransferase als auch bei der Ectoin-Synthase gefunden. Daher erfolgte die Expression ausschließlich in Medien mit 3 % Salz. Ebenso ausgeprägt wie der Salzgehalt wirkte sich ein Absenken der Temperatur nach der Induktion auf die Ausbeute an Protein aus. Da die Ausbeute an Zielprotein bei 30° C höher war als bei 37° C, wurde die Temperatur der Kulturen nach der Induktion durch IPTG auf 30° C abgesenkt. Bis zu diesem Zeitpunkt waren sie bei 37° C angezogen worden, um die schnellere Erzeugung von Biomasse bei dieser Inkubationstemperatur auszunutzen.

3.3. *Charakterisierung der aufgereinigten Enzyme*

Nachdem mit der Isolierung der beiden Proteine ein Ziel dieser Arbeit bereits erreicht war, eröffnete sich die Möglichkeit, die Enzyme in Hinblick auf verschiedene Parameter zu charakterisieren. Neben der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität lag das besondere

Interesse auf den Einflüssen, die sowohl der Salzgehalt als auch der pH-Wert auf die Katalysegeschwindigkeit haben.

3.3.1. Acetyltransferase

Die Acetyltransferase katalysiert wie bereits erwähnt die Acetylierung von 2,4-Diaminobuttersäure zu N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure, wobei Acetyl-Coenzym A als Acetyldonor fungiert.

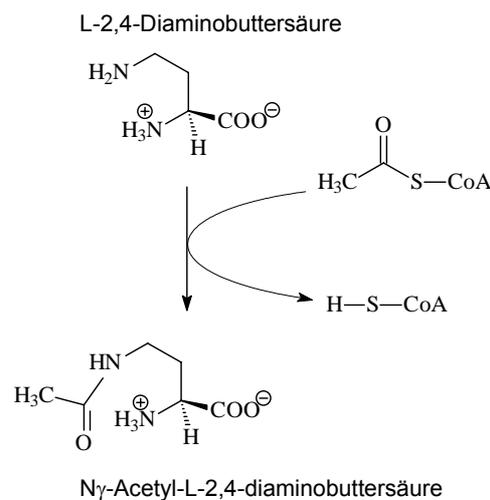


Abbildung 25: Acetylierung der Diaminobuttersäure. In der von der Acetyltransferase katalysierten Reaktion entsteht N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure mit Acetyl-CoA als Cofaktor.

Um einen Einfluss des Histidinüberhanges auf die Aktivität von vornherein ausschließen zu können, wurde ein Teil des aufgereinigten Enzyms einer Proteolyse mit Thrombin unterworfen. Eine SDS-PAGE (ohne Abbildung) diente als Nachweis für eine erfolgreiche Abspaltung des Histidinüberhanges. Auch wenn die Abspaltung innerhalb einer Stunde nicht vollständig war, lag ein großer Teil des Enzyms in gespaltener Form vor. Die Aktivität des gespaltenen Enzyms wurde mit der des Fusionsproteins verglichen. Dabei konnte kein Aktivitätsunterschied festgestellt werden. Daher wurde davon ausgegangen, dass ein N-terminaler Histidinüberhang bei der Acetyltransferase keinen Einfluss auf die Aktivität hat und aufgrund dessen im folgenden auf eine Spaltung des Enzyms verzichtet.

3.3.1.1. schneller Aktivitätstest

Um die Charakterisierung der Acetyltransferase schnell voran treiben zu können, wurde nach einer Alternative zu der langwierigen Vermessung von Proben an der HPLC gesucht. Als Ansatzpunkt bot sich hier die Bildung einer freien SH-Funktion als Ergebnis des

Acetylverlustes des Acetyl-CoAs an. Die als Ellman's Reagenz bekannte 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) stellte sich hierfür als das Reagenz der Wahl heraus.

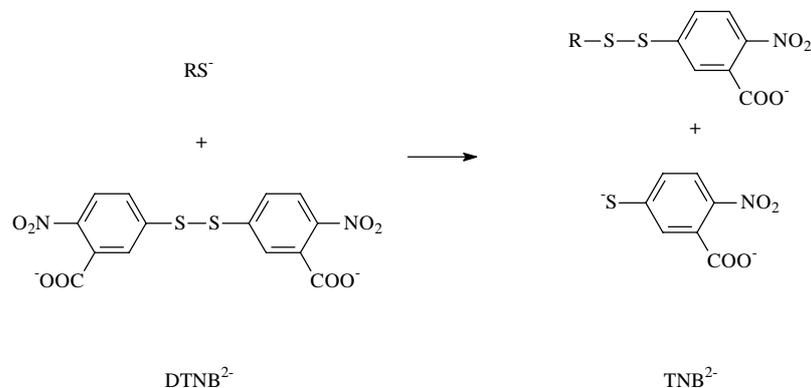


Abbildung 26: Reaktion von Ellmans Reagenz. Das Prechromophor liegt als Dimer vor. Dieses Dimer reagiert mit frei Thiolaten zu einem gemischten Disulfid und dem Chromophor 2-Nitro-5-thiobenzoat welcher als zweiwertiges Anionen vorliegt.

Da Trichloressigsäure zu einer Entfärbung des Reagenzes führte, wurde zur Inaktivierung der Acetyltransferase SDS eingesetzt. Um einen möglichen Einfluss auf die Farbreaktion durch SDS (Wang und Volini, 1968) in der eingesetzten Konzentration (1 % (w/v)) ausschließen zu können, wurden Cysteinlösungen bekannter Konzentration bei Zusatz unterschiedlicher SDS-Mengen nach Zugabe von DTNB vermessen. Es konnte kein Einfluss des SDS auf die Absorption festgestellt werden. Nach Kalibration mit Cysteinlösungen bekannter Konzentration stand daher ein einfach durchzuführender und schnell auszuwertender Enzymassay zur Verfügung.

3.3.1.2. Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Alle chemischen Reaktionen laufen mit Erhöhung der Temperatur schneller ab, das gilt auch für Enzym-katalysierte Reaktionen. Es ist jedoch zu beachten, dass Enzyme nicht beliebig temperaturstabil sind. Daher nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bei Temperaturerhöhung über einen bestimmten Punkt hinaus wieder ab. Zur Aufnahme des Temperaturprofils wurde der Reaktionsmix, kurz bevor die Reaktion durch Zugabe von Enzymlösung gestartet wurde, auf die gewünschte Temperatur vorgewärmt.

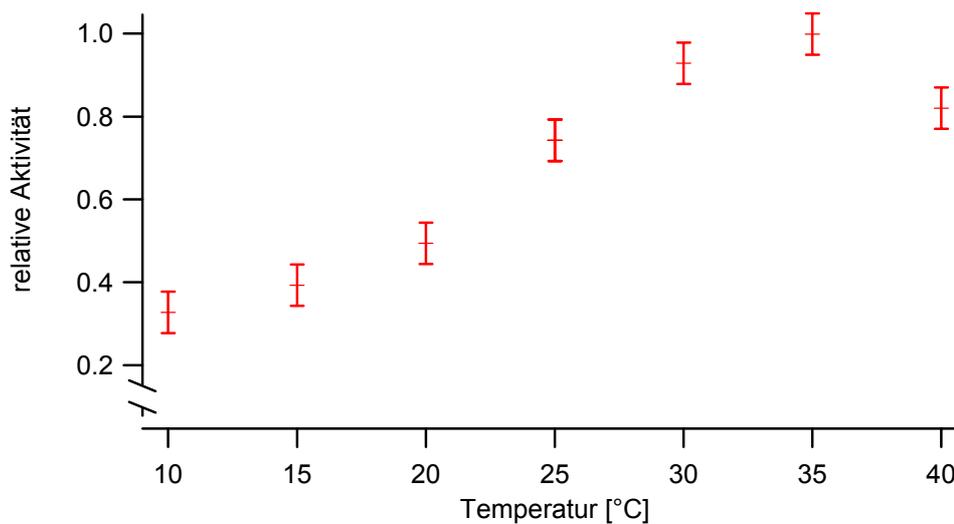


Abbildung 27: Temperaturprofil der enzymkatalysierten Acetylierung. Bei unterschiedlichen Temperaturen wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Acetylierung von 2,4-Diaminobuttersäure zu N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure bestimmt.

Nach der Auswertung der Daten ergab sich das in Abbildung 27 durchgestellte Temperaturprofil. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei 35° C erreicht. Es wurde darauf verzichtet Temperaturen über 40° C zu untersuchen, da oberhalb dieser Schwelle ein Überleben des Ursprungsorganismus unwahrscheinlich wird und daher für Untersuchungen, die thematisch der Osmoregulation zugeordnet sind, nicht relevant erscheinen. Außerdem konnte bei dem vergleichsweise kleinen Reaktionsvolumen von ca. 100 μ L eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Verdunstungseffekte mit der damit verbundenen Aufkonzentration der Substrate und Produkte nicht mehr ausgeschlossen werden.

3.3.1.3. Einfluss des pH-Wertes

Zieht man in Betracht, dass die Acetyltransferase über einen hohen Anteil an sauren und basischen Aminosäuren verfügt, kann man eine starke Abhängigkeit der tertiären Struktur und damit auch der katalytischen Eigenschaften vom pH-Wert schon vermuten. Um einen solchen ausgeprägten Einfluss des pH-Wertes nachzuweisen, wurden Reaktionslösungen mit verschiedenen pH-Werten mit Enzymlösung versetzt und die Geschwindigkeit der Acetylierung bestimmt (Abbildung 28).

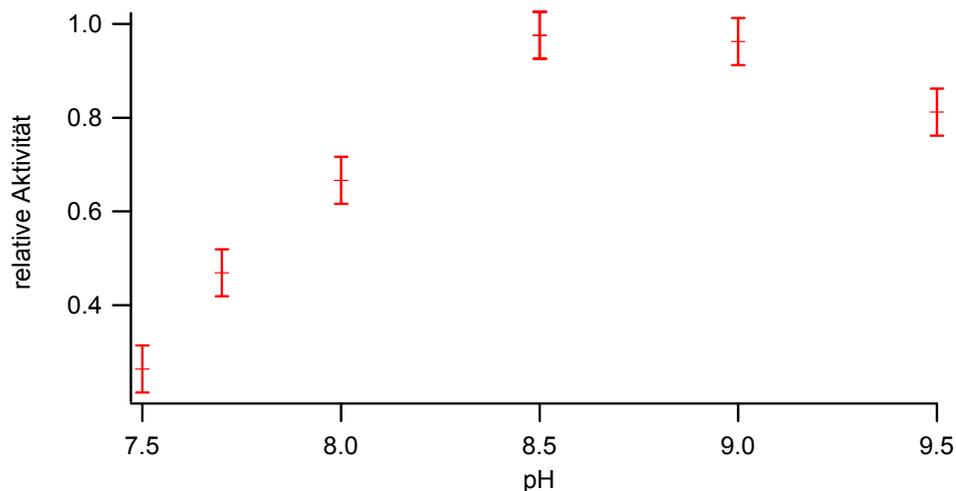


Abbildung 28: Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Acetylierung von 2,4-Diaminobuttersäure zu N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure.

Die Aktivität des Enzyms zeigte eine ausgesprochen starke Abhängigkeit vom pH-Wert mit einem Maximum bei etwa 8,5. Dass die maximale Aktivität in einem so alkalischen Bereich liegt war insofern überraschend, da pH-Werte des Cytoplasmas meist im Bereich zwischen 7,5 und 8,0 liegen. Dieses interessante Ergebnis machte eine Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wert von *M. halophilus* wünschenswert, da für diesen Organismus noch keine Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt wurden und sich bei der Ectoin-Synthese ein ganz ähnlicher pH-Verlauf der Aktivität zeigte. Bei vielen Organismen kommt es bei der Erhöhung der externen Osmolarität zu einem Influx von Alkaliionen, was meist zu einer Anhebung des cytoplasmatischen pH-Wertes führt. Die Reaktion auf eine hyperosmotische Veränderung der Umgebung könnte eine Erklärung für das ungewöhnliche pH-Spektrum der Aktivität liefern und wird im Kapitel Diskussion noch näher erörtert.

3.3.1.4. Einfluss der Salzkonzentration

Wie man bei einem Enzym im Biosyntheseweg eines kompatiblen Solutes und damit eines Osmoschutzstoffes vermuten sollte, zeigte die Aktivität der Acetyltransferase eine Abhängigkeit von der Salzkonzentration des umgebenden Mediums.

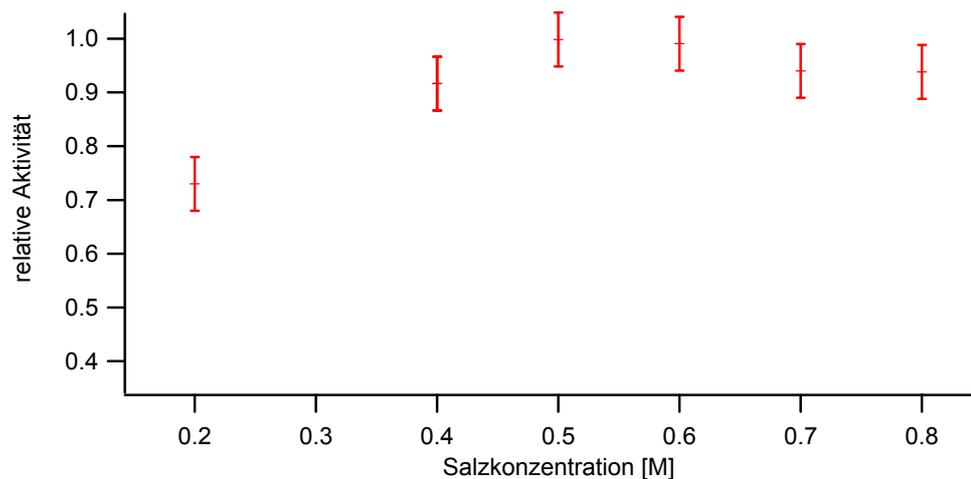


Abbildung 29: Auswirkung von Variation in der Kationenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Acetylierung der 2,4-Diaminobuttersäure. Bei höheren Salzkonzentrationen (1,6 M) sinkt der Wert auf 0,4 ab.

Bei einer niedrigen Salzkonzentration ist die Aktivität deutlich herabgesetzt. Eine maximale Aktivität zeigte das Enzym zwischen 0,5 M und 0,7 M, was einer Kochsalzkonzentration von 3-5 % entspräche. Auch bei höheren Salinitäten bis 0,8 M wies die Acetyltransferase noch eine ausgeprägte Aktivität auf, die dann jedoch bei einer sehr hohen Salinität von >1,5 M abfällt.

Auffällig war, dass die Aktivität unabhängig davon, ob die Osmolarität durch Natrium- oder Kaliumionen verändert wurde, ausschließlich von der Gesamtkonzentration dieser beiden Kationen beeinflusst wurde. Sie zeigte keine Präferenz gegenüber einem der beiden Ionen, obwohl es in Folge eines Salzschocks, wie bereits erwähnt, häufig zu einem Influx von Kaliumionen kommt, was einen verstärkten Einfluss dieser gegenüber Natriumionen hätte vermuten lassen. Die maximalen Umsatzraten der L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase wurde zu 35 $\mu\text{mol}/\text{min}$ je mg Protein bestimmt.

3.3.1.5. Bestimmung kinetischer Daten

Neben den maximalen Umsatzraten bei unterschiedlichen Bedingungen wurde auch die Beeinflussung der Michaelis-Menten-Konstanten durch pH-Wert und Salzkonzentration bestimmt. In Abbildung 30 und in Abbildung 31 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen grafisch dargestellt. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante wurden die Reaktionsgeschwindigkeit in Ansätzen mit unterschiedlichen DABA-Konzentrationen bestimmt. Von einer Ermittlung des K_m -Wertes von Acetyl-CoA wurde abgesehen, da wie in der Diskussion noch erörtert wird, die Nachweisgrenze der eingesetzten Aktivitätsassays dazu nicht ausreichend war.

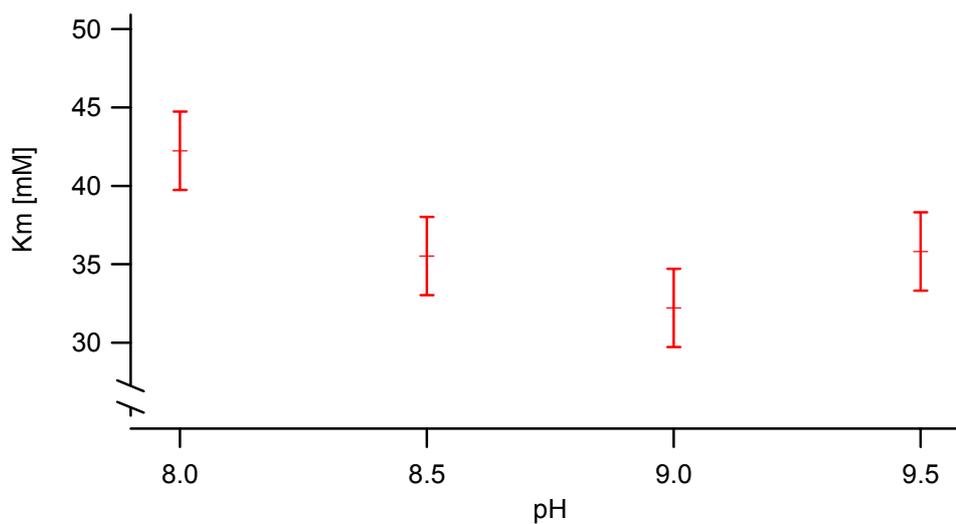


Abbildung 30: Einfluss des pH-Wertes auf den Km-Wert der Acetyltransferase. Im Bereich zwischen pH 8,5 und 9,0 ist der Km-Wert der Acetyltransferase minimal. Die Reaktionsgeschwindigkeit war in diesem Bereich besonders groß (siehe Abbildung 28).

Es zeigt sich, dass der Km-Wert für DABA sowohl vom pH-Wert als auch von der Salzkonzentration beeinflusst wird. Im Vergleich den Auswirkungen, die eine Variation dieser Parameter auf die maximalen Umsatzraten dieses Enzyms hatte, ist der Unterschied der Km-Werte jedoch eher gering.

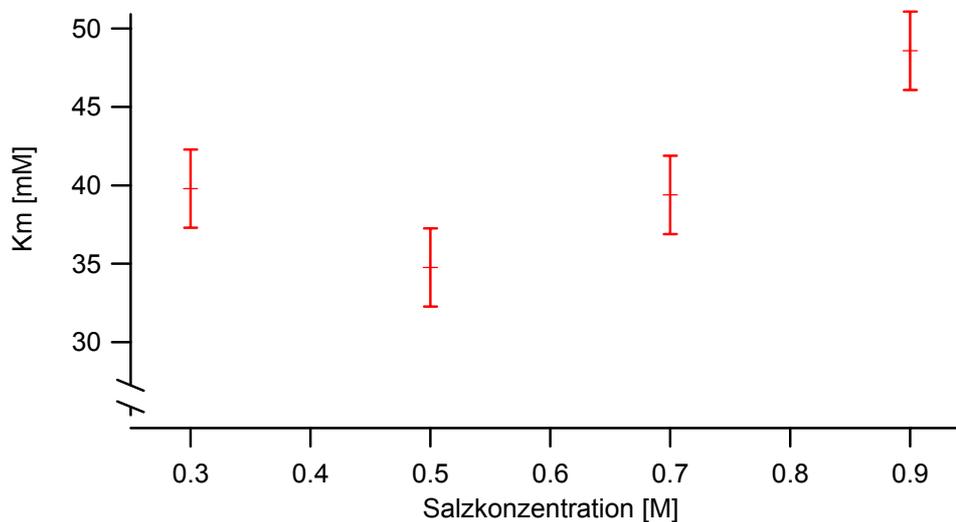


Abbildung 31: Einfluss der Salzkonzentration auf den Km-Wert der Acetyltransferase. Im Bereich niedriger Km-Werte war die Reaktionsgeschwindigkeit besonders groß (Abbildung 29).

Wie man sieht ist der Km-Wert für das Substrat DABA im Bereich guter Umsatzraten bei 30-40 mM.

3.3.1.6. Bestimmung der cytoplasmatischen DABA-Konzentration

Um die für die Acetyltransferase ermittelten K_m -Werte zu bestätigen, wurde die cytoplasmatische DABA-Konzentration in *M. halophilus* bestimmt. Gewöhnlich liegen *in vivo*-Substratkonzentrationen im Bereich von 10 % bis 100 % des K_m -wertes (Fersht, 1985), im Fall der DABA wurde also eine cytoplasmatische Konzentration von 3-30 mM erwartet. Es wurden in Mineralsalzmedium wachsende Bakterien untersucht. Nach der Gefriertrocknung und einer Bligh&Dyer-Extraktion wurde die Konzentration von DABA mittels FMOC-HPLC bestimmt. Dabei wurde ein DABA-Gehalt von 3,5 $\mu\text{mol/g}$ Trockenbiomasse bestimmt. Geht man von einem cytoplasmatischen Volumen von 2,5 mL je g Trockenbiomasse aus, entspricht dieser DABA-Gehalt einer Konzentration von ca. 1,4 mM und liegt somit in der erwarteten Größenordnung.

3.3.2. Ectoinsynthese

Die Ectoinsynthese katalysiert den letzten Schritt in der Synthese des kompatiblen Solutes Ectoin, den Ringschluss von N_γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure durch eine Kondensationsreaktion.

N_γ -Acetyl-L-2,4-diaminobuttersäure

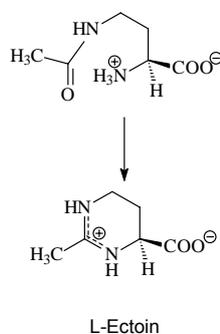


Abbildung 32: Ringschluss zu Ectoin. Diese Reaktion der N_γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure wird durch die Ectoin-Synthase katalysiert.

Ein Einfluss des Histidinüberhanges auf die Aktivität konnte anders als bei der Acetyltransferase nicht untersucht werden. Das verwendete Expressionssystem sieht keine Möglichkeit zu einer proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins vor. Im Rahmen dieser Arbeit stand kein Expressionssystem, das eine Abspaltung eines C-terminalen Histidinüberhanges erlaubt hätte, zur Verfügung. Alternative Möglichkeiten die Ectoinsynthese ohne einen möglicherweise störenden Überhang zu gewinnen werden an anderer Stelle noch diskutiert.

Die maximale Umsatzrate von 8,8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ je mg des Enzyms liegt niedriger als bei Ectoinsynthese von *H. elongata*, deren Umsatzraten etwa 50 $\mu\text{mol}/\text{min}$ je mg beträgt (Ono *et al.*, 1999).

3.3.2.1. schneller Aktivitätstest

Um die Charakterisierung der Ectoinsynthese zu erleichtern, wurde ähnlich wie für die Acetyltransferase eine Alternative zu Untersuchungen mit Hilfe der HPLC gefunden. Chromatogramme, die zum Nachweis der Aktivität der Ectoinsynthese aufgenommen wurden, zeigten, dass die Peaks von Ectoin bei gleicher Konzentration eine wesentlich größere Fläche haben als solche von N_γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure. Dies konnte nur die Folge einer stark unterschiedlichen Absorption bei der Wellenlänge, die der Detektor verwendet (210 nm) sein. Zur Entwicklung eines Enzymassays basierend auf einer unterschiedlichen Absorption der beiden Substanzen wurde das UV-Vis-Spektrum von Ectoin und N_γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure aufgenommen (Abbildung 33).

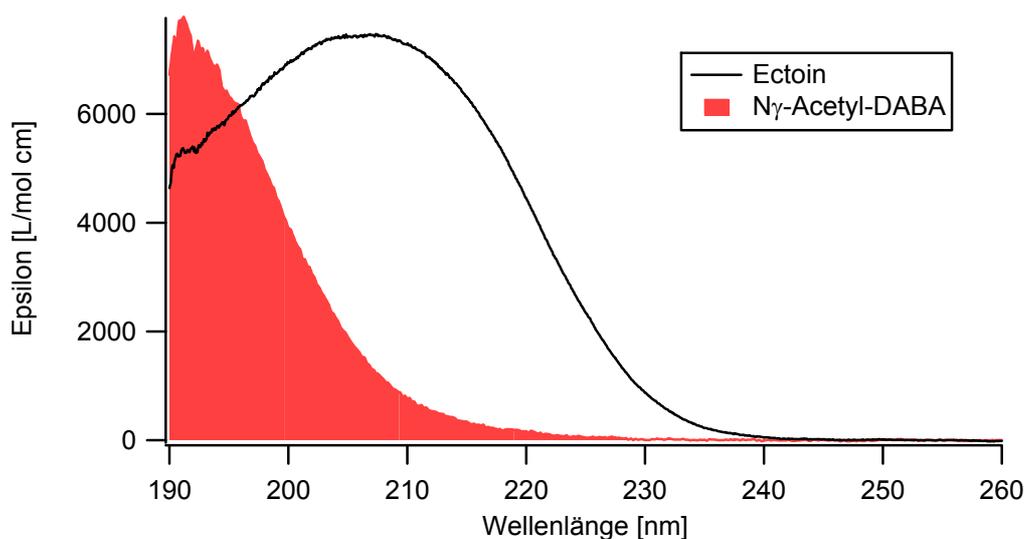


Abbildung 33: Vergleich der Absorptionsspektren von N_γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure und Ectoin. Der große Unterschied der molaren Extinktionskoeffizienten bei 210 nm war die Grundlage für einen Enzymassay, der als Alternative zu HPLC-Messungen entwickelt wurde.

Wie man leicht sieht, ist eine Wellenlänge von 210 nm, die auch der Detektor der HPLC verwendet, bereits sehr gut als Ansatzpunkt einer Aktivitätsmessung geeignet. Aufgrund der sehr hohen Absorption von Ectoin bei dieser Wellenlänge wurden Messungen der Aktivität in einer Küvette mit 0,1cm Schichtdicke durchgeführt. Der Umsatz von N_γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure zu Ectoin konnte nach Zugabe von Enzym zu einer gepufferten N_γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure-Lösung am Spektralphotometer gut verfolgt werden. Eine

Änderung des pH-Wertes im Bereich zwischen 7,0 und 9,0 und der Salinität zeigte keine messbare Änderung in den Absorptionsspektren der beiden Substanzen zwischen 190 nm und 260 nm.

3.3.2.2. Einfluss des pH-Wertes

Analog zu den Untersuchungen an der DABAaCT wurde das pH-Spektrum der Aktivität der Ectoin-Synthase aufgenommen. Dazu wurde die Veränderung der Absorption einer gepufferten N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure-Lösung verschiedenen pH-Wertes nach der Zugabe von Ectoin-Synthase vermessen. Aus den bekannten Extinktionskoeffizienten von N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure und Ectoin konnten die Änderungen der Konzentrationen und damit die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet werden. Wie bereits angedeutet, wurde die Aktivität der Ectoin-Synthase in einer ähnlichen Weise durch den pH-Wert beeinflusst wie die DABAaCT (Abbildung 34). Auch die Ectoin-Synthase erreichte bei einem pH-Wert von 8,5 ihr Aktivitätsmaximum.

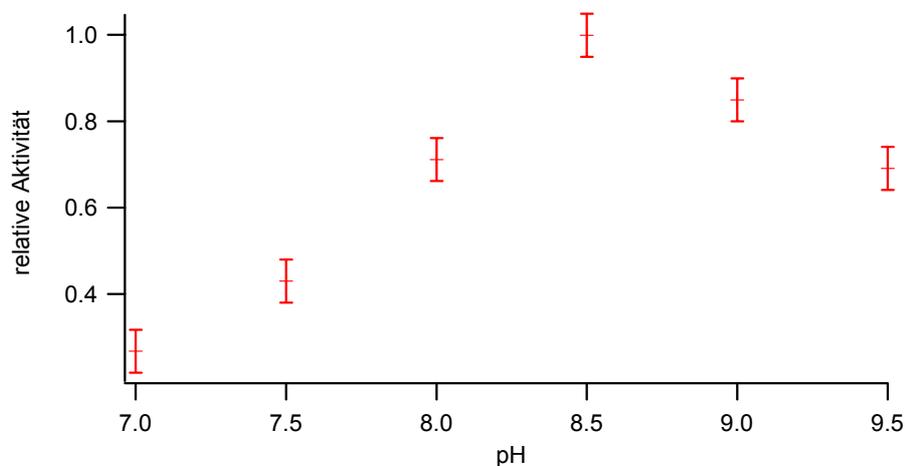


Abbildung 34: Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Kondensation von N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure zu Ectoin.

Ebenso wie bei der Acetyltransferase war nicht die Beeinflussung der Aktivität durch den pH-Wert, sondern die Lage des Maximum ungewöhnlich. Dass der pH-Wert sich stark auf die Aktivität auswirken würde, ließ sich durch den hohen Anteil an geladenen Aminosäuren an der Enzymzusammensetzung bereits vermuten. Dass die höchste Aktivität jedoch bei einem so alkalischen pH-Wert und noch zudem bei einem ähnlichen Wert wie bei der

Acetyltransferase liegen würde, drängt zu dem Schluss, dass die H^+ -Ionenkonzentration einer der Schlüsselparameter bei der Regulation des Ectoinbiosyntheseweges ist.

3.3.2.3. Einfluss der Salzkonzentration

Mit ihrem hohen Anteil an sauren Aminosäuren war bei der Ectoin-Synthase eine Verknüpfung zwischen Salzgehalt und Enzymaktivität zu erwarten. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden $N\gamma$ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure-Lösungen unterschiedlichen Salzgehaltes mit Ectoin-Synthase versetzt und die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Der Einfluss der Salinität auf die Aktivität ist in Abbildung 35 graphisch dargestellt.

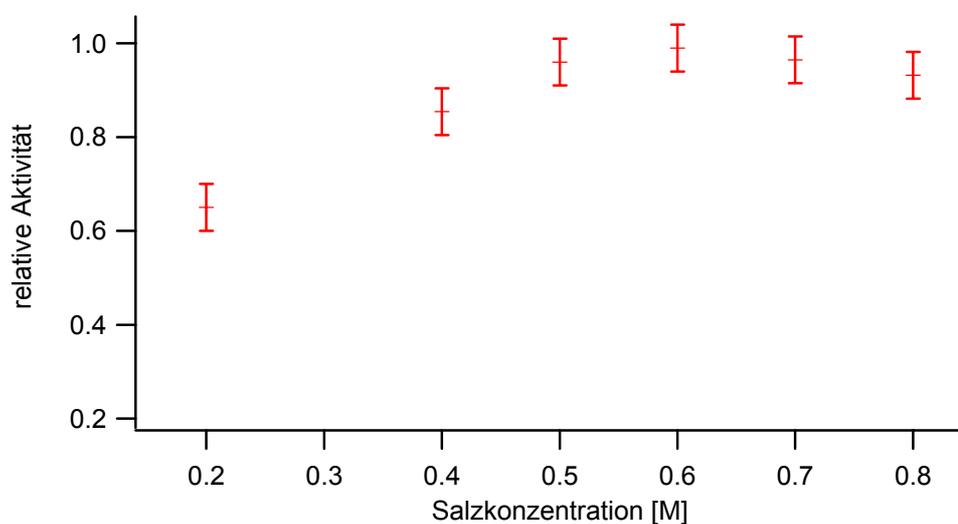


Abbildung 35: Einfluss des Salzgehaltes auf die Aktivität der Ectoin-Synthase. Bei höheren Salzkonzentrationen (1,6 M) sinkt der Wert auf 0,45 ab.

Auch bei der Ectoin-Synthase wurde bei niedrigem Salzgehalt eine verringerte Aktivität bestimmt. Die höchste Aktivität wurde bei einer Kationenkonzentration von 0,5-0,6 M ermittelt, wohingegen bei 1,6 M noch etwa die halbe Aktivität vorlag. Qualitativ stimmt dieser Aktivitätsverlauf mit den für die Acetyltransferase ermittelten Werten überein. Auch bei der Ectoin-Synthase war es unerheblich, in welchem Mischungsverhältnis Natrium- und Kaliumionen vorlagen, die Aktivität wies ausschließlich eine Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration beider Ionen auf.

3.4. FPLC-Aufreinigung

Viele Methoden zu einer weiterreichenden Untersuchung von Enzymen setzen die Verfügbarkeit von Proteinmengen im mg-Bereich voraus. Die Aufreinigung von

Enzymmengen dieser Größenordnung lässt sich durch den Einsatz von batch-Verfahren kaum erreichen, so dass sich hierfür der Einsatz einer FPLC-Aufreinigung anbietet. Darüber hinaus lässt die Verwendung einer automatisierten Aufreinigung mit einer FPLC-Anlage den Einsatz eines standardisierten Protokolls zu, so dass es bei der Aufreinigung kaum noch zu nennenswerten chargen-abhängigen Schwankungen in der erreichten Aktivitätsausbeute kommt. Um den genannten Vorteil des höheren Durchsatzes bei der Aufreinigung der Acetyltransferase und der Ectoin-Synthase nutzen zu können, wurde die Anwendbarkeit einer FPLC-Aufreinigung mit einer Ni-NTA Superflow (QIAGEN, Hilden) am Beispiel der DABAaCT untersucht. Dabei wurde ein Protokoll mit einem linearen Konzentrationsgradient von Imidazol verwendet. Der Verlauf der Aufreinigung lässt sich anhand des aufgenommenen Chromatogramms verfolgen (Abbildung 36).

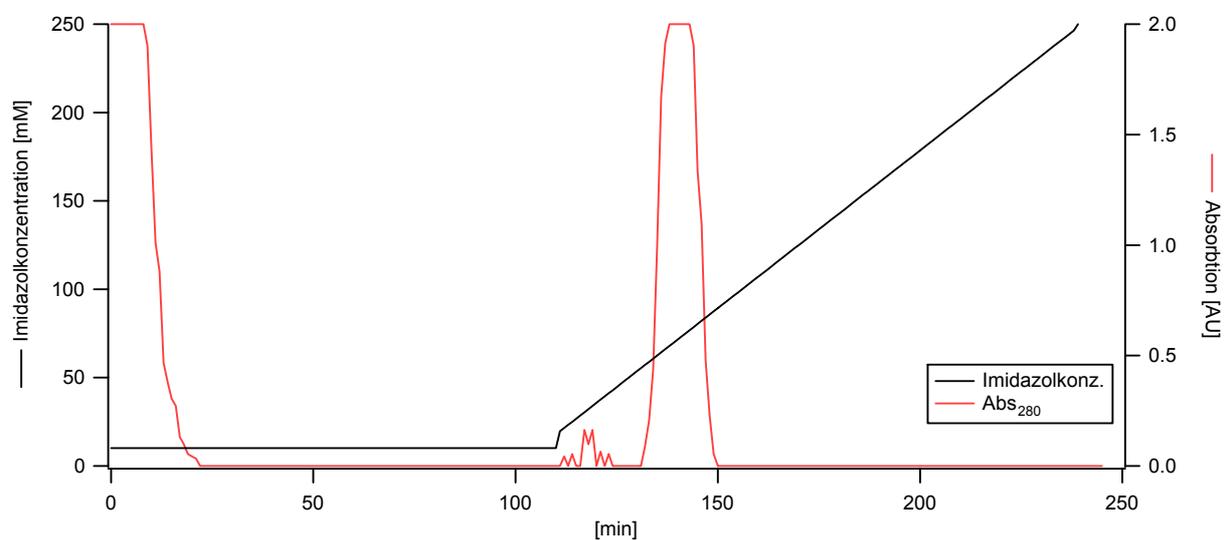


Abbildung 36: Aufreinigung mit der FPLC. Durch steigende Imidazolkonzentration erhöhte Absorptionen wurden korrigiert. Die DABAaCT konnte ab einer Imidazolkonzentration von ca. 130 mM von der Säule eluiert werden.

Der Säulendurchlauf wurde fraktioniert aufgefangen und Chargen mit hoher Proteinkonzentration in einer SDS-PAGE untersucht. Durch Einsatz der FPLC konnten Lysatvolumina von bis zu 20 mL auf die Säule aufgetragen werden, so dass eine Aufreinigung von Protein aus der Biomasse von 1L Kulturvolumen ermöglicht wurde. Im batch-Verfahren stellte ein Viertel dieses Volumens die Grenze des Sinnvollen dar, da der Durchsatz an Pufferlösungen durch die verwendeten Polypropylensäulen bei den zum Waschen benötigten Volumina zum limitierenden Faktor wurde. Der Anteil an Verunreinigungen im Eluat durch unerwünschte Proteine war bei der FPLC-Aufreinigung vergleichbar mit dem der batch-Aufreinigung. Bei Bedarf wäre eine weitergehende Aufreinigung in sich anschließenden Chromatographieschritten (Gelfiltration, HIC oder Ionenaustauscher)

anzuschließen. Dabei auftretende Verluste wären jedoch angesichts der guten Verfügbarkeit der Enzyme durch die vorgestellten Expressionssysteme kaum von Bedeutung.

3.4.1. *in-situ* Abspaltung des Histidinüberhanges

Alternativ zur Elution durch eine steigende Imidazolkonzentration besteht im Falle der Acetyltransferase, die durch ein auf einem pET-15b-Derivat basierendes Expressionssystem gewonnen wird, die Möglichkeit die Immobilisierung des Enzyms durch eine proteolytische Abspaltung des Histidinüberhanges mit Thrombin aufzuheben. Der Histidinüberhang verbleibt dabei am Säulenmaterial, während das eigentliche Enzym die Fähigkeit zur Anbindung an die Säule verliert. Vor allem in Verbindung mit einer FPLC-Anlage ließ sich diese Form der Elution komfortabel dadurch realisieren, dass ein geschlossener Kreislauf, bei dem das Eluat wieder auf die Säule gegeben wurde, erzeugt wurde. Schematisch ist diese Konfiguration in Abbildung 37 dargestellt.

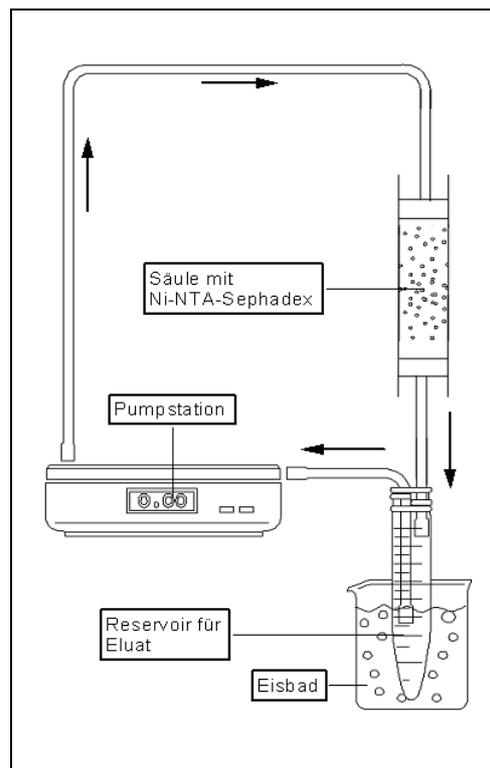


Abbildung 37: Schema der FPLC-Konfiguration zur *in-situ* Abspaltung des Histidinüberhanges. Etwa ein Säulenvolumen wurde im Reservoir vorgelegt, so dass zu keinem Zeitpunkt die Gefahr bestand, dass die Pumpe trocken lief und Luft durch die Säule gedrückt wurde. In das Reservoir wurde Thrombin gegeben, dass daraufhin immer wieder über die Säule gepumpt wurde und bei jedem Durchlauf etwas des dort immobilisierten Fusionsproteins spaltete. Zum Abbruch der Abspaltung wurde der Ansaugschlauch aus dem Reservoir entnommen und das verbleibende Eluat durch Luft aus der Säule gedrückt.

Bevor der dargestellte geschlossene Kreislauf eingerichtet wurde, erfolgte die Durchführung der üblichen Waschschriffe mit Imidazol-haltigen Puffern, um den Anteil an unerwünschten Proteinen von vornherein zu minimieren. Statt die Imidazolkonzentration durch Einsatz des Elutionspuffers stark zu erhöhen, wurden 15 mL des Durchlaufs in einem Reservoir aufgefangen, welches dann an Stelle des Puffervorrats mit der Pumpe verbunden wurde. Zur Abspaltung des Enzyms von der Säule wurde in dieses Reservoir die gewünschte Menge an Thrombin gegeben. Durch die proteolytische Aktivität des Thrombins wurde schließlich ein Grossteil des Proteins von der Säule abgespalten. Der Verlauf dieser Abspaltung lässt sich aus Abbildung 38 ablesen.

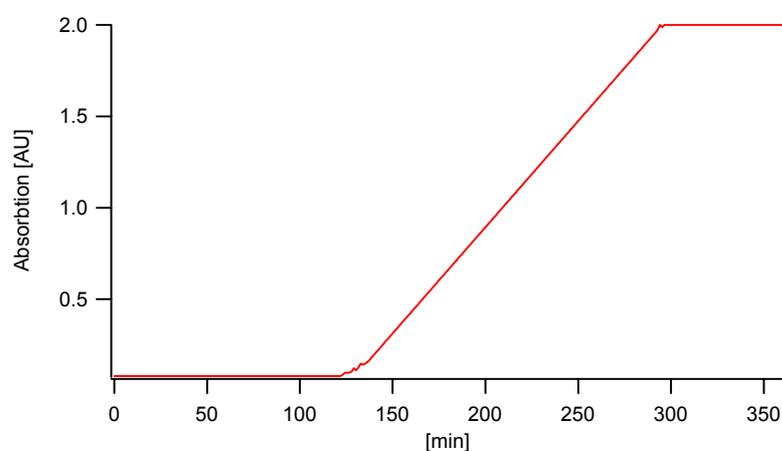


Abbildung 38: Verlauf der *in-situ* Abspaltung. Anhand der Absorptionzunahme durch abgespaltenes Protein, ließ sich das Ansteigen der Enzymkonzentration im Eluat verfolgen.

Man kann erkennen, dass die Konzentration an Protein im Durchfluss immer weiter ansteigt. Durch die zyklische Prozessführung konnte bei einer relativ geringen Menge an Thrombin die Elution des Proteins in einem sehr kleinen Volumen erreicht werden. Die Vorteile dieses Vorgehens lagen zum einen in einer geringen Verunreinigung durch das „Fremdprotein“ Thrombin, zum anderen in der hohen Proteinkonzentration des Eluats, dass einen Zwischenschritt zum Aufkonzentrieren der gewonnenen Proteinlösung unnötig machte. Darüber hinaus lag Imidazol nur in einer sehr geringen Konzentration im Eluat vor. Der völlige Verzicht auf Imidazol ist jedoch nicht zu empfehlen, da sowohl das Zielprotein als auch das Thrombin dabei möglicherweise an die Säule binden. War Imidazol im Eluat unerwünscht, wie bei den Versuchen zur Proteinkristallisation, konnte es jedoch dank der geringen Konzentration relativ einfach, zum Beispiel durch Einsatz von Microcon-Filtereinheiten, komplett entfernt werden. Eventuell störendes Thrombin kann durch Einsatz kommerzieller Aufreinigungskits (diese enthalten Serin-Proteasen bindendes Säulenmaterial) einfach entfernt werden.

3.5. Kristallisationsexperimente

Um die räumliche Struktur eines Enzyms aufzuklären, stehen zur Zeit zwei Verfahren zur Verfügung, die dies ermöglichen. Zum einen die Verwendung korrelierter NMR-Spektren, zum anderen die Auswertung von Röntgenbeugungsmustern von Kristallen des Enzyms. Dabei steckt der Einsatz von NMR-Methoden zur Strukturaufklärung noch in der Entwicklungsphase und erlaubt nur die Untersuchung relativ kleiner Proteine. Darüber hinaus setzt diese Methode den Einsatz sehr leistungsstarker NMR-Spektrometer voraus, die für diese Arbeit nicht zur Verfügung standen. Die zweite Methode, der Einsatz von röntgen-kristallografischen Verfahren, ist demnach auch sehr viel verbreiteter und zur Zeit das Mittel der Wahl um die räumliche Struktur von Enzym zu erforschen. Die Voraussetzung für die Anwendung dieser Methodik ist die Gewinnung von Kristallen des jeweiligen Enzyms. Um Kristalle eines Proteins zu erzeugen, wurden bereits einige Methoden entwickelt, deren Vor- und Nachteile an dieser Stelle jedoch nicht diskutiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen mit der als „hanging drop“ bezeichneten Methode und dem Einsatz kommerzieller Screening-Kits Bedingungen zu finden, bei denen Kristalle der Acetyltransferase entstehen. Im Folgenden werden die Ergebnisse mit den verschiedenen im Screening-Kit vorhandenen Puffern tabellarisch dargestellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der Kristallisationsversuche. Diese Tabelle erstreckt sich über mehrere Seiten. Unter „Ausfällung“ wurden Versuchsergebnisse zusammengefasst, bei denen es zur Ausbildung einer nicht-kristallinen festen Proteinphase kam.

0,02M Calciumchloride Dihydrat 0,1M Natriumacetat Trihydrate pH4,6 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol	Ausfällung	0,1M Tris Hydrochlorid pH 8,5 2,0M Ammoniumsulfat	Ausfällung
0,4M Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat	Ausfällung	0,2M tri-Natriumcitrat Dihydrat 0,1M HEPES-Na pH 7,5 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol	Ausfällung
0,4M mono- Ammoniumdihydrogenphosphat	Ausfällung	0,2M Magnesiumchlorid Hexahydrat 0,1M Tris Hydrochlorid pH 8,5 30% v/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung

0,1M Natriumcacodylat pH 6,5 1,4M Natriumacetat Trihydrat	Ausfällung	0,1M HEPES-Na pH7,5 1,5M Lithiumsulfat Monohydrate	Ausfällung
0,2M tri-Natriumcitrat Dihydrat 0,1M Natriumcacodylat pH 6,5 30% v/v iso-Propanol	Ausfällung	0,2M Lithiumsulfat Monohydrate 0,1M Tris Hydrochlorid pH8,5 30% v/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung
0,2M Ammoniumacetat 0,1M tri-Natriumcitrat Dihydrate pH5,6 30% v/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung	0,2M Magnesiumacetat Tetrahydrate 0,1M Natriumcacodylat pH 6,5 20% v/v Polyethylen Glycol 8000	Ausfällung
0,2M Ammoniumacetat 0,1M Natriumacetat Trihydrat pH4,6 30% v/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung	0,2M Ammoniumacetat 0,1M Tris Hydrochlorid pH8,5 30% v/v iso-Propanol	Ausfällung
0,1M tri-Natriumcitrate pH5,6 1,0M Ammoniumdihydrogenphosphat	Ausfällung	0,2M Ammoniumacetat 0,1M Natriumacetat Trihydrat pH4,6 25 % w/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung
0,2M Magnesiumchlorid Hexahydrate 0,1M HEPES-Na pH7,5 30% v/v iso-Propanol	Ausfällung	0,2M Magnesiumacetat Tetrahydrate 0,1M Natriumcacodylat pH 6,5 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol	Ausfällung
0,2M tri-Natriumcitrat Dihydrat 0,1M Tris Hydrochlorid pH8,5 30% v/v Polyethylen Glycol 400	Ausfällung	0,2M Natriumacetat Trihydrate 0,1M Tris Hydrochlorid pH8,5 30% w/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung
0,2M Calciumchlorid Dihydrate 0,1M HEPES-Na pH7,5 28% v/v Polyethylen Glycol 400	Klare Lösung	0,2M Magnesiumchlorid Hexahydrate 0,1M HEPES-Na pH7,5 30% v/v Polyethylen Glycol 400	Ausfällung
0,2M Ammoniumsulfat 0,1M Natriumcacodylat pH 6,5 30% v/v Polyethylen Glycol 8000	Ausfällung	0,2M Calciumchlorid Dihydrate 0,1M Natriumacetat Trihydrate pH4,6 20% v/v iso-Propanol	Ausfällung

0,1M Imidazol pH6,5 1,0M Natriumacetat Trihydrate	Ausfällung	0,1M Natriumacetat Trihydrat pH 4,6 2,0M Natriumformiat	Ausfällung
0,2M Ammoniumacetat 0,1M tri-Natriumcitrat Dihydrat pH6,5 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol	klare Lösung	0,1M HEPES-Na pH7,5 0,8M Natriumdihydrogenphosphat 0,8M Kaliumdihydrogenphosphat	Ausfällung
0,2M tri-Natriumcitrat Dihydrat 0,1M HEPES-Na pH7,5 20% v/v iso-Propanol	Ausfällung	0,1M Tris Hydrochlorid pH8,5 8% w/v Polyethylen Glycol 8000	Ausfällung
0,2M Natriumacetat Trihydrate 0,1M Natriumcacodylat pH6,5 30% w/v Polyethylen Glycol 8000	Ausfällung	0,1M Natriumacetat Trihydrate pH4,6 8% w/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung
0,1M HEPES-Na pH7,5 0,8M Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrate	Ausfällung	0,1M HEPES-Na pH7,5 1,4M tri-Natriumcitrat Dihydrate	Klare Lösung
0,2M Ammoniumsulfat 30% w/v Polyethylen Glycol 8000	klare Lösung	0,5M Lithiumsulfat Monohydrat 15% w/v Polyethylen Glycol 8000	Ausfällung
0,2M Ammoniusulfat 30% w/v Polyethylen Glycol 4000	Klare Lösung	0,1M tri-Natriumcitrat Dihydrat pH5,6 20% v/v iso-Propanol; 20% w/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung
2,0M Ammoniumsulfat	Ausfällung	0,1M HEPES-Na pH7,5 10% v/v iso-Propanol; 20% w/v Polyethylen Glycol 4000	Ausfällung
4,0M Natriumformiat	Ausfällung	0,05M Kaliumdihydrogenphosphat 20% w/v Polyethylen Glycol 8000	Ausfällung

0,2M Magnesiumformiat	Ausfällung	0,1M Natriumacetat Trihydrat pH4,6 2,0M Ammoniumsulfat	Ausfällung
0,2M Zinkacetat Dihydrate 0,1M Natriumcacodylat pH6,5 18% w/v Polyethylen Glycol 8000	Ausfällung	0,1M Tris Hydrochlorid pH8,5 2,0M Ammoniumdihydrogenphosphat	Ausfällung
0,2M Calciumacetat 0,1M Natriumcacodylat pH6,5 18% w/v Polyethylen Glycol 8000	klare Lösung		

Mit keinem der im Screening-Kit enthaltenen Puffer/Reagenzien-Kombinationen konnte eine Kristallbildung beobachtet werden. Möglicherweise hängt dies mit dem ungewöhnlich sauren Charakter und der relativ hohen Ladungsdichte des Enzyms zusammen. Die Zubereitungen des Screening-Kits wurden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4° C im Kühlraum getestet, wobei die Enzymkonzentration zu Beginn des Experiments jeweils 10 mg/mL betrug und langsam durch Diffusion des Lösungsmittels Wasser aus dem Tropfen in das Pufferreservoir auf 20 mg/mL anstieg. Neben den durch das Screening-Kit bereitgestellten Pufferkompositionen wurde der Versuch unternommen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumsulfat (30 mM bis 400 mM) bei pH 8,5 in einem 400 mM Natriumchlorid enthaltenen Tris/HCl-Puffer (60 mM) eine Kristallisation des Proteins zu bewirken. Auch bei diesen Experimenten konnte keine Kristallbildung beobachtet werden.

3.6. Physiologische Arbeiten an *Marinococcus halophilus*

Die Ergebnisse der Charakterisierung von an der Ectoinbiosynthese beteiligten Enzyme, weckten das Interesse, die Physiologie des Bakteriums *Marinococcus halophilus* genauer zu betrachten. Bisherige Untersuchungen an *M. halophilus* widmeten sich vor allem klassischen mikrobiologischen Themen wie der chemotaxonomischen Einordnung und der phänotypischen Charakterisierung. Die molekularen Grundlagen der Osmoadaptation sind bei diesem Organismus bisher kaum untersucht. Abgesehen von Arbeiten die sich mit der Regulation der Ectoinbiosynthese auf genetischer Grundlage beschäftigen (Bestvater, 2001; Bestvater und Galinski, 2002) ist bezüglich der Osmoregulation im speziellen und der

Steuerung wichtiger cytoplasmatischer Parameter im allgemeinen nur wenig über *M. halophilus* bekannt. Durch die Charakterisierung von zwei Enzymen, die an der Biosynthese des kompatiblen Sutes Ectoin beteiligt sind, wurden Anhaltspunkte für mögliche Mechanismen einer osmotischen Kontrolle dieses Biosyntheseweges geliefert. Der starke Einfluss des pH-Wertes und der Salinität auf die Aktivität dieser Enzyme legt den Schluss nahe, dass ein hyperosmotischer Schock eine Veränderung dieser beiden Parameter in einer Richtung bewirkt, die die Aktivität von Enzymen steigert, die bei der Kontrolle des osmotischen Milieu des Cytoplasmas von Bedeutung sind. Da eine Anpassung der cytoplasmatischen Osmolarität zu höheren Werten bei einer hyperosmotischen Veränderung des Mediums unausweichlich ist, wurde zunächst die Regulation des cytoplasmatischen pH-Wertes untersucht. Die Wahl eines Fluoreszenzfarbstoffes als Methode für diese Arbeiten wird im Kapitel Diskussion noch erörtert. Um festzustellen, ob der cytoplasmatische pH-Wert als regulatorisches Element in Frage kommt, musste zunächst geklärt werden, in wie weit dieser selbst durch den Organismus reguliert wird. Würde der cytoplasmatische pH-Wert ausschließlich vom pH-Wert des Mediums abhängen, so wäre eine kontrollierende Funktion bei osmotischen Änderungen nahezu auszuschließen. Daher ist der Einfluss des externen pH-Wertes auf das Wachstum und den cytoplasmatischen pH-Wert untersucht worden.

3.6.1. Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum von *M. halophilus*

Die Fähigkeit des Organismus bei unterschiedlichen pH-Werten des Mediums zu wachsen, ist bereits in einer taxonomischen Arbeit (Marquez *et al.*, 1992) dokumentiert worden. Dort wurde gezeigt, dass *M. halophilus* bei pH-Werten von 5,0 bis 9,0 zu Wachstum in der Lage ist. In der vorliegenden Arbeit wurde über die qualitative Beobachtung, ob zwischen pH 6,5 und 9,0 ein Wachstum stattfindet hinaus auch die Wachstumsgeschwindigkeiten ermittelt (Abbildung 39).

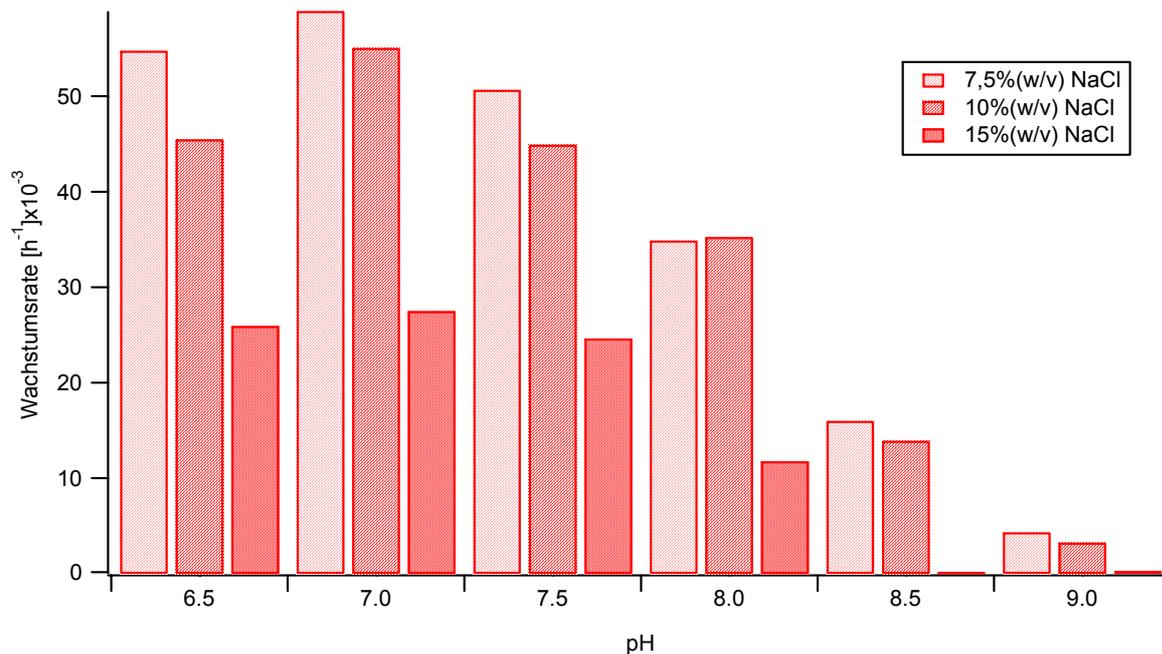


Abbildung 39: Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von pH-Wert und Salinität bei einer Temperatur von 30° C in FP-Medium.

Da grundsätzlich auch der Einfluss des Salzgehaltes im Medium von Interesse für diese Arbeit ist, wurde der Einfluss des pH-Wertes bei drei verschiedenen Salzgehalten untersucht. Wie bereits von Hao *et al.* (1984) gezeigt wurde, ist *Marinococcus halophilus* zwischen 5 % und 15 % Salzgehalt zu Wachstum in der Lage. Bei 15 % war das Wachstum bereits deutlich herabgesetzt. Neben dem Salzgehalt übte auch der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit aus. Besonders pH-Werte zwischen 6,5 und 7,5 des Mediums befähigten *M. halophilus* schnell zu wachsen. Da das Hauptaugenmerk die Anpassung an osmotischen Stress war, wurde außer bei den Untersuchungen zur pH-Homöostase bei einem pH von 7,2 gearbeitet, der für den Organismus keine zusätzliche Belastung wegen suboptimaler pH-Bedingungen darstellen sollten.

3.7. Fluoreszenzmethoden

Die Fluoreszenzmikroskopie und –spektroskopie vereinen in sich eine Reihe von Vorteilen, die eine Nutzung dieser Methode gegenüber anderen Möglichkeiten besonders interessant machen. Als besondere Vorzüge sind neben der relativ einfachen Handhabung zu nennen: a) die hohe Sensibilität; b) der Verzicht auf invasive Eingriffe in die Zelle (wie beispielweise bei Mikroelektroden); und vor allem c) die Möglichkeit dynamische Vorgänge beobachten, also zeitabhängige Messreihen aufnehmen zu können. Dabei ergänzen sich Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzspektroskopie in der Weise, dass die Mikroskopie

eine Betrachtung von Einzelzellen ermöglicht und die Spektroskopie das Studium einer ganzen Population erlaubt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Protokoll für das Einbringen von Farbstoffmolekülen in *M. halophilus* erarbeitet werden, das darüber hinaus einen Verlust des Farbstoffes an das Medium im Laufe eines Experimentes auf ein Minimum reduziert. Das erhöhte die Genauigkeit der Methode durch eine Verringerung der durch das Medium auftretenden Hintergrundfluoreszenz.

3.7.1. Entwicklung eines Anfärbeprotokolls

Grundlage weiterer Untersuchungen war es, möglichst viel des gewählten Farbstoffes in das Cytoplasma von *M. halophilus* einzubringen und den Anteil an Farbstoff, der das Cytoplasma im Laufe des folgenden Experiments wieder verlässt, auf ein Minimum zu reduzieren. Dazu wurde eine in Minimalmedium kultivierte Bakteriensuspension durch Zentrifugation abgeerntet und in einem isotonischen Phosphatpuffer resuspendiert. Der hohe Anteil an fluoreszierenden Substanzen in Komplexmedien machte eine Anzucht in Minimalmedium trotz des deutlich reduzierten Zellwachstums unter diesen Bedingungen unausweichlich. Dem Anfärben folgte eine Inkubation in Glucose-haltigem Phosphatpuffer. In diesem Schritt wurde die Zellen energetisiert und durch aktive Transportsysteme Farbstoff, der nicht im Cytoplasma gebunden ist, an das Medium abgeben. Durch Variation der Farbstoffkonzentration im Anfärbungsschritt und unterschiedlich lange Inkubationszeiten während der Färbung und Entfärbung konnte ein Protokoll entwickelt werden, das stark gefärbte Bakterien lieferte, die im Laufe eines einstündigen Experimentes so gut wie keinen Farbstoff mehr ins Medium abgaben. Die besten Ergebnisse wurden mit einer 30 minütigen Anfärbung bei einer Farbstoffkonzentration von 10 μM und einer 15 minütigen Entfärbung bei einer Glucosekonzentration wie sie auch im Minimalmedium MM63 eingestellt ist, erreicht.

3.7.2. Fluoreszenzmikroskopie

Durch den Einsatz fluoreszenzmikroskopischer Methoden wurde ein experimenteller Ansatz zur Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes an einzelnen Bakterien entwickelt.

Um einen möglicherweise schädigenden Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffs zu untersuchen, wurden angefärbte Bakterien mit Hilfe der Fluoreszenz- und der Durchlichtmikroskopie beobachtet. Es zeigte sich, dass angefärbte Bakterien sich von unbehandelten Bakterien in Habitus und Beweglichkeit nicht unterschieden. Daraus wurde geschlossen, dass das zum Anfärben angewendete Protokoll sich nicht nachteilig auf die Zellen auswirkt. Durch Einsatz passend gewählter Fluoreszenzfilter wurde versucht, den cytoplasmatischen pH-Wert durch

ratio-imaging zweier direkt hintereinander aufgenommener Bilder zu bestimmen, was eine Kalibrierung des Systems voraussetzt. Im Zuge dieser Arbeiten stellte sich das Ausbleichen des Farbstoffes in den Bakterien durch das Anregungslicht als großes Problem dar. Da das verwendete Fluoreszenzmikroskop nicht die Möglichkeit einer automatisierten Belichtungskontrolle vorsieht, wurde der Versuch mit einer manuellen Bedienung des Shutters durchgeführt. Schnell zeigte sich, dass eine quantifizierbare Reproduktion des Effektes des Photofading mit dem verwendeten System nicht durchführbar war. Eine weitere Hürde stellte die Notwendigkeit eines Filterwechsel bei der Anwendung der ratio-imaging-Methode dar. Die Problematik des Photofading in Verbindung mit der Notwendigkeit den Emissionsfilter wechseln zu müssen, machte es daher unmöglich quantitative Untersuchungen mit dem vorliegenden Fluoreszenzmikroskop durchzuführen.

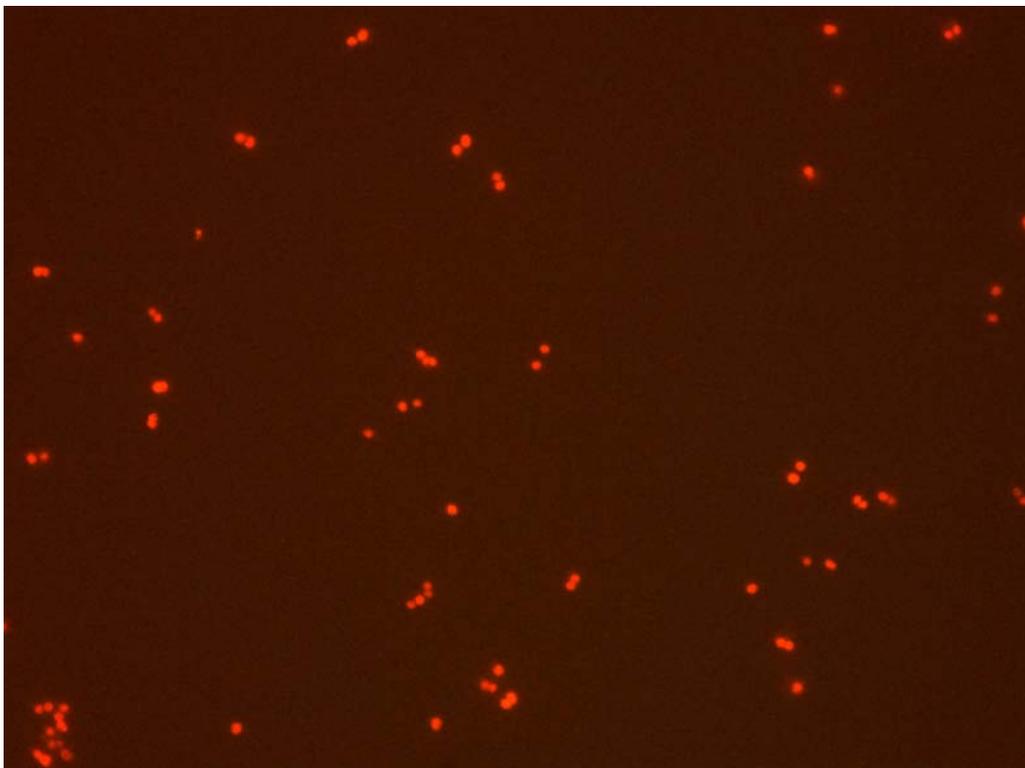


Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *M. halophilus*. Die Bakterien wurden zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Snarf-1 angefärbt. Die Anregung erfolgte durch einen BP-Filter 515-560 nm, Als Emissionsfilter diente ein LP 580, der Wellenlängen ab 580 nm passieren lässt.

Trotzdem konnte der Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie wertvolle Ergebnisse liefern, zeigte sich doch, dass *M. halophilus* sich ausgesprochen intensiv anfärben ließ und weiterhin sehr beweglich war, was als Zeichen guter Vitalität gewertet wurde. Das Ziel, quantitative Untersuchungen des cytoplasmatischen pH-Wertes an einzelnen Bakterien durchführen zu können, konnte jedoch nicht erreicht werden.

3.7.3. Fluoreszenzspektroskopie

Ebenso wie die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht auch die Fluoreszenzspektroskopie die Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes. Bei der Präparation der Bakterien wurde ebenso vorgegangen wie bei der Fluoreszenzmikroskopie. Der Unterschied der erhaltenen Daten liegt vor allem darin, dass bei der mikroskopischen Anwendung Einzelzellen beobachtet werden, bei spektroskopischen Methode eine Population von Bakterien. Dies hat den Vorteil, dass wesentlich weniger Licht benötigt wird, um Emissionen in einer Intensität zu erzeugen, die eine quantitative Auswertung des gewonnenen Spektrum ermöglichen. Darüber hinaus wird nur ein Teil der Population angestrahlt, so dass ein Ausbleichen der Probe auch bei länger andauernden Experimenten nicht beobachtet werden konnte. In einem ersten Experiment konnte gezeigt werden, dass sich die Spektren von *M. halophilus* mit unterschiedlichem cytoplasmatischen pH-Wert stark genug unterscheiden, um weitergehende Untersuchungen durchführen zu können (Abbildung 41).

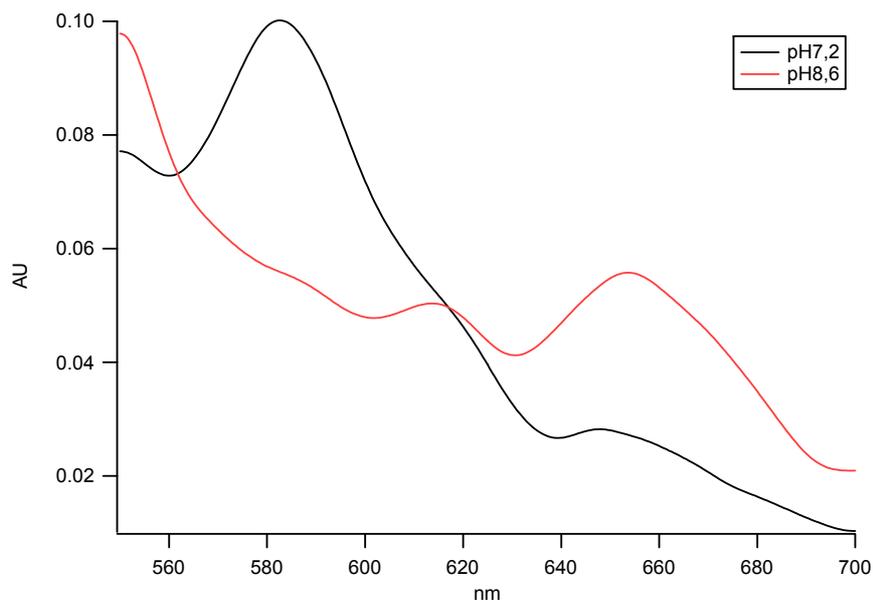


Abbildung 41: Spektren mit Snarf gefärbter Bakteriensuspensionen bei 515 nm Anregungswellenlänge. Vor Aufnahme des Spektrums wurde durch Zugabe von Nigericin der cytoplasmatische pH-Wert dem des Mediums angeglichen. Es wurden Bakterien vermessen, die in Medium mit dem pH-Wert 7,2 bzw. 8,6 vorlagen.

Der cytoplasmatische pH-Wert wurde durch Nigericin dem äußeren pH-Wert angepasst. Der Farbstoff wurde wie vom Hersteller empfohlen bei einer Wellenlänge von 515 nm angeregt. Man sieht deutlich, dass sich die Spektren vor allem bezüglich der Emission bei 590 nm stark unterscheiden. Um die optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen für quantitative Messungen festzulegen, wurde bei verschiedenen eingestellten cytoplasmatischen

pH-Werten Anregungs/Emissions-Spektren aufgenommen und durch Bildung von Differenzspektren ausgewertet (Abbildung 42).

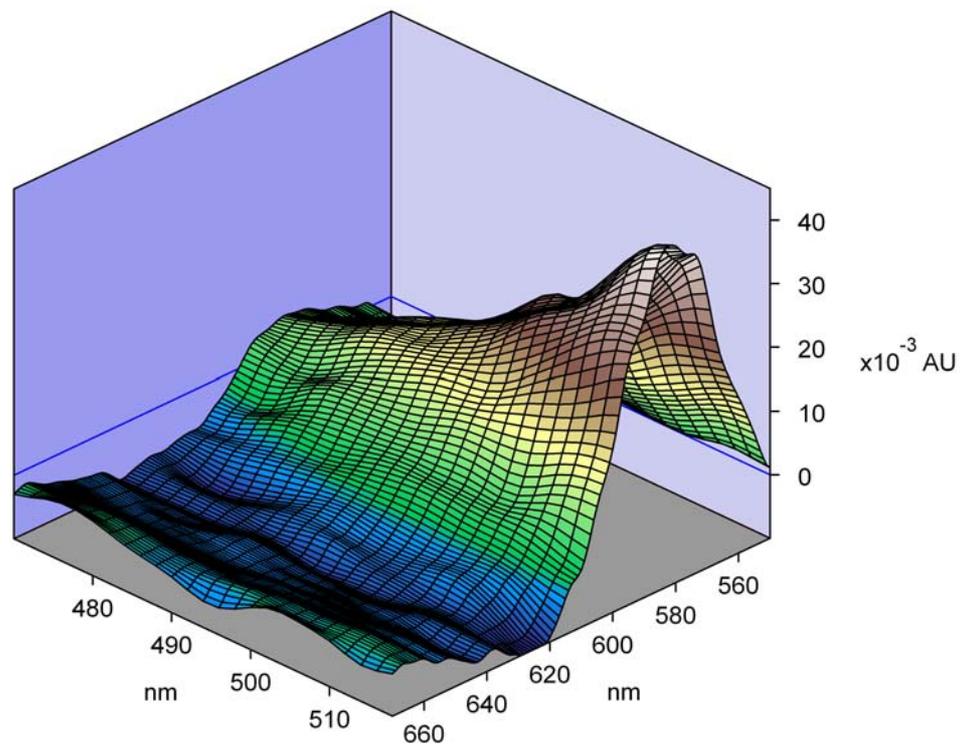


Abbildung 42: Differenzspektrum von *M. halophilus* (nach Färbung mit Snarf-1) von Spektren bei pH 7,2 und pH 8,8. Auf der linken unteren Achse ist die Anregungswellenlänge auf der rechten unteren Achsen die Emissionswellenlänge. Die Differenz der Fluoreszenzintensitäten ist auf der senkrechten Achse aufgetragen.

Bei den vom Hersteller des Farbstoffes empfohlenen Wellenlängen von 515 nm für die Anregung und 580 nm sowie 640 nm für die beiden Emissionen war die Differenz der beiden Fluoreszenzbanden bei unterschiedlichen pH-Werten besonders groß. Daher sind diese Wellenlängen für die im folgenden beschriebenen Methoden gut geeignet. Da es sich bei dem verwendeten Farbstoff um ein Säure/Base-System handelt bei dem die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Bande mit der Konzentration der protonierten bzw. deprotonierten Form korrespondiert, wurde gemäß der Henderson-Hasselbach-Gleichung ein linearer Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und dem logarithmierten Quotienten der Fluoreszenzintensitäten vermutet. Um dies zu bestätigen, wurden Fluoreszenzspektren

angefärbter Bakterien in Nigericin-haltigen Puffern unterschiedlichen pH-Wertes aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 43).

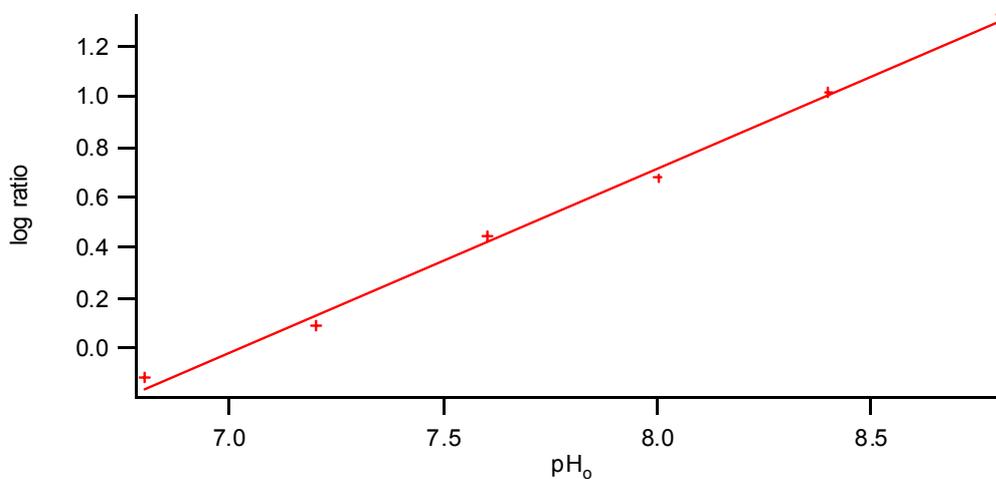


Abbildung 43: Beispiel für eine Kalibrationsgerade. Auf der Ordinate sind logarithmierten Quotienten der Fluoreszenzintensitäten der Wellenlängen 580 nm und 640 nm gegen die pH-Werte auf der Abszisse aufgetragen.

Der vermutete Zusammenhang konnte eindeutig nachgewiesen werden. Der Nachweis dieses linearen Zusammenhanges ist gleichzeitig die Kalibration des Systems, da einem bestimmten logarithmischen Wert jeweils eindeutig ein pH-Wert des Cytoplasma zugeordnet werden kann. Um eine mögliche Änderung der Fluoreszenzcharakteristika des Systems durch Schwankungen der cytoplasmatischen Zusammensetzungen in Folge leicht variierender Wachstumsbedingungen als Fehlerquelle ausschließen zu können, wurde mit jeder Charge angefärbter Bakterien jeweils eine Kalibration nach obigen Muster durchgeführt.

3.8. pH-Homöostasis von *Marinococcus halophilus*

Das Fehlen von Informationen über den Einfluss, den verschiedene Umgebungsparameter wie Salzgehalt oder pH-Wert auf die cytoplasmatische Zusammensetzung von *M. halophilus* haben, machte es äußerst schwierig, Daten, die im Rahmen der Charakterisierung der Enzyme Acetyltransferase und Ectoinsynthase *in vitro* gewonnen wurden, zu interpretieren. Mit der dargestellten Methode zur Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes war es erstmals möglich diese wichtige Eigenschaft des Zellinnern zu untersuchen. Es wurde zunächst ermittelt, inwieweit der interne pH-Wert durch den pH-Wert des Mediums beeinflusst wird, mit anderen Worten, ob es bei *M. halophilus* eine pH-Homöostase gibt oder ob sich der cytoplasmatische pH-Wert dem des Mediums anpasst. Dazu wurde bei zwei

verschiedenen Salzgehalten, 7,5 % (w/v) und 10 % (w/v) Natriumchlorid, Bakterien unterschiedlichen pH-Werten ausgesetzt und dann deren cytoplasmatischer pH-Wert bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 44 grafisch dargestellt.

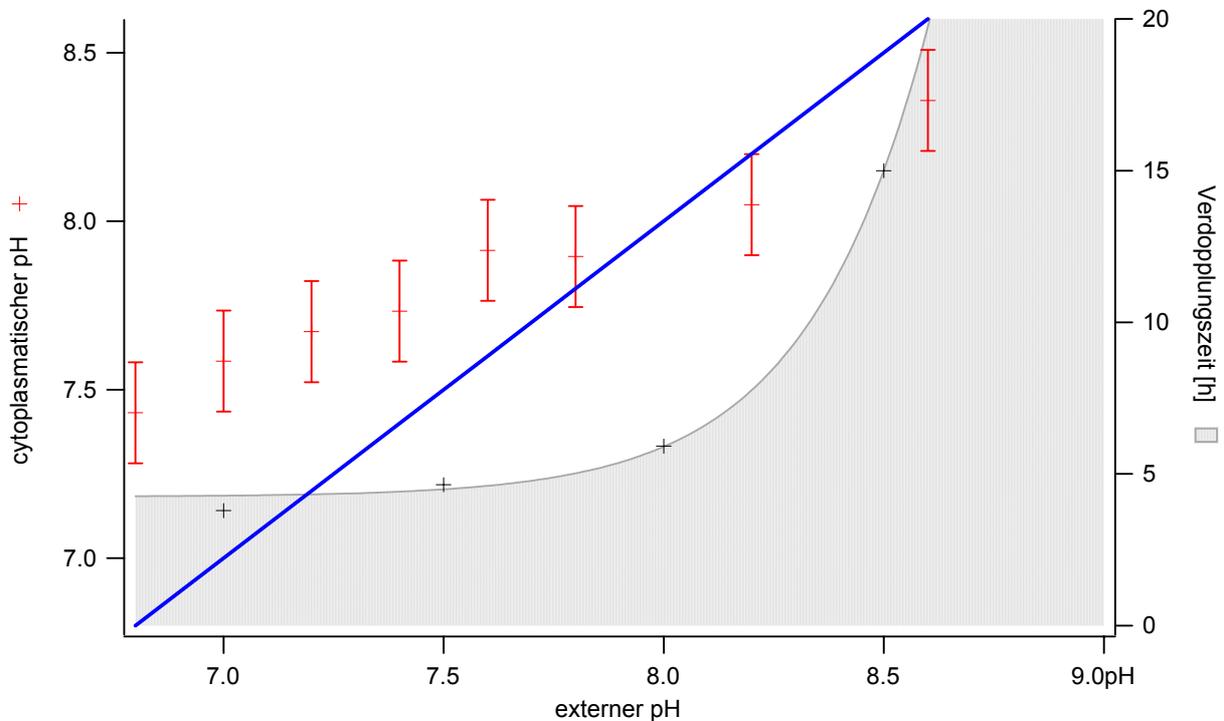


Abbildung 44: Auswirkungen des externen pH-Wertes. In Rot ist der durch Fluoreszenzmessungen bestimmte cytoplasmatische pH-Wert gegen den externen pH-Wert aufgetragen. Die blaue Gerade ist keine Ausgleichsgerade, sondern dient nur zur Orientierung und stellt den Zusammenhang pH_i gleich pH_o dar. In Grau ist der Zusammenhang von Verdopplungszeit und dem pH-Wert des Mediums dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass sich der interne pH-Wert nicht im gleichen Maße wie der externe pH-Wert änderte. Der Organismus scheint bestrebt, den cytoplasmatischen pH-Wert innerhalb gewisser Grenzen zu halten. Bis zu einem pH-Wert von ca. 8 lag der cytoplasmatische pH-Wert über dem des Mediums und sank bei Überschreiten dieses Wertes darunter ab. In diesen Bereich nahm auch die Verdopplungszeit stark zu, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Unterschreiten des externen pH-Wertes durch das Cytoplasma für den Organismus sehr problematisch ist. Prozesse, die auf einem Protonengradienten zwischen Cytoplasma und Medium angewiesen sind, können nicht mehr so ablaufen, wie es innerhalb „normaler“ Umgebungsparameter der Fall wäre. Dies erklärt die stark erhöhten Verdopplungszeiten bis zu einem völligen Erliegen des Wachstums bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes.

Die Salinität des Mediums hatte keinen Einfluss auf den cytoplasmatischen pH-Wert, das pH-Profil bei 7,5 % und 10 % Salzgehalt im Medium unterschied sich nur geringfügig. Die Schwankungen dabei lagen im Bereich der Messungenauigkeit.

3.9. *Einfluss der externen Osmolaritätsänderung auf den cytoplasmatischen pH-Wert*

In den bereits dargestellten Ergebnissen wurde gezeigt, dass der cytoplasmatische pH-Wert bei guten Wachstumsbedingungen im Bereich zwischen pH 7,4 und pH 7,8 liegt. Von besonderem Interesse waren die Auswirkungen eines hyperosmotischen Schocks auf den cytoplasmatischen pH-Wert. Zu diesem Zweck wurde eine Suspension angefärbter Bakterien durch Zusatz einer vorgewärmten 5 M Natriumchlorid-Lösung einem Salzschock ausgesetzt. Der Salzgehalt des Mediums wurde in Gegenwart von Glucose als Energiequelle von 7,5 % auf 10 % erhöht. Durch kontinuierliche Aufnahme von Fluoreszenzspektren konnten Veränderungen des cytoplasmatischen pH-Wertes verfolgt werden (Abbildung 45).

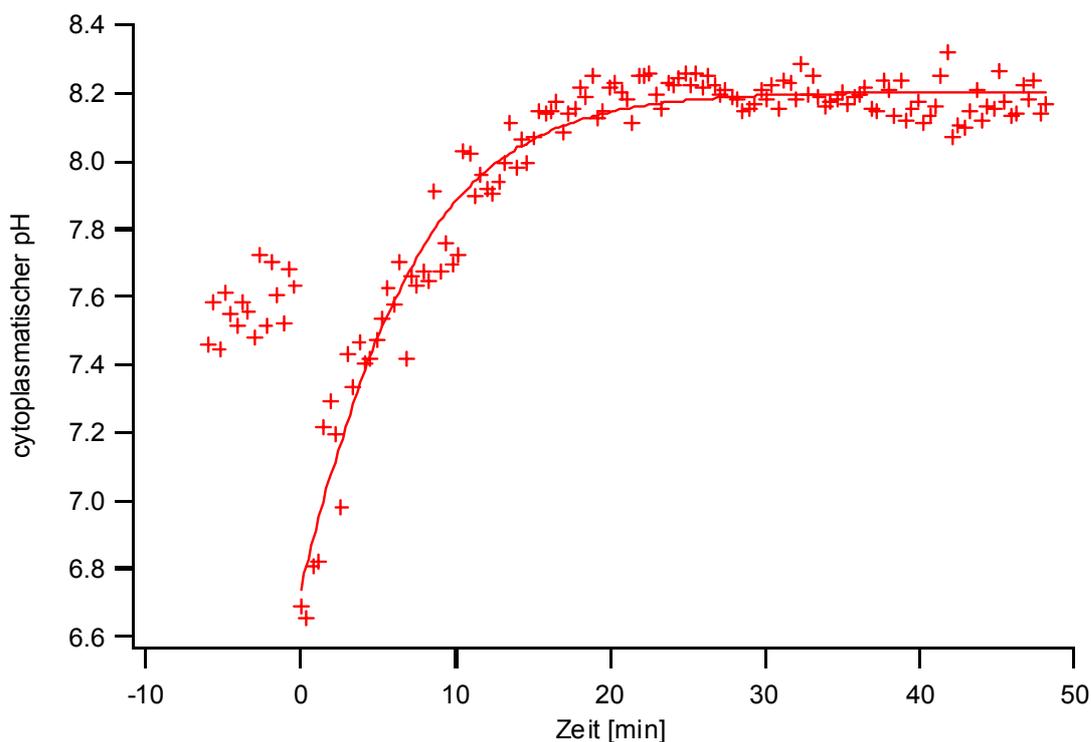


Abbildung 45: Auswirkungen eines moderaten Salzschocks auf den cytoplasmatischen pH-Wert. Es ist die zeitliche Änderung des cytoplasmatischen pH-Wertes in Folge eines Salzschocks zum Zeitpunkt $t=0$ min dargestellt.

Wie erwartet war der pH-Wert des Cytoplasmas vor dem hyperosmotischen Ereignis bei ca. pH 7,6. Kurz nach Zugabe der Salzlösung zur Erhöhung der Mediensalinität wurde ein pH-Wert von ca. 6,8 gemessen. Innerhalb der ersten 15 min nach dem Salzschock stieg der pH-Wert dann relativ schnell um 1,4 Einheiten auf einen Wert von 8,2 bei dem er für mindestens 30 Minuten verblieb. Ein Absinken des internen pH-Wert auf das Niveau wie es vor dem Salzschock vorlag, konnte nicht beobachtet werden. Als Folge eines Salzschocks erfolgt demnach eine Verschiebung des cytoplasmatischen pH-Wertes zum Alkalischen und damit in einen Bereich in dem die Enzyme des Biosyntheseweges des kompatiblen Solutes Ectoin eine besonders hohe Aktivität aufweisen.

4. Diskussion

In den folgenden Kapiteln werden die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und im Licht der Ergebnisse anderer Forschergruppen bewertet. Ferner werden weitere Forschungsgebiete aufgezeigt, die in Zukunft zu einem umfassenderen Verständnis der Osmoregulation führen könnten.

Die Osmoregulation ist ein sehr komplexer physiologischer Vorgang, der nur ansatzweise als verstanden betrachtet werden kann. Der Grossteil der Studien, die sich thematisch mit der Osmoregulation auseinandersetzen, beschränkt sich darauf, bei einer Vielzahl von Organismen kompatible Solute unterschiedlicher Natur nachzuweisen oder genregulatorische Auswirkungen wechselnder osmotischer Bedingungen zu untersuchen. Wenngleich die erstgenannten Studien sicher den nötigen ersten Schritt zum Verständnis der Osmoregulation darstellen und die Entwicklung molekularbiologischer Methoden in den letzten Jahren nun erstmals eine Untersuchung von gesamten mRNA Populationen gestattet (Steil *et al.*, 2003), ist ein wichtiger Aspekt im komplexen Gefüge der Osmoregulation sehr vernachlässigt worden, und zwar die Enzyme zur Synthese kompatibler Solute. Nur die Regulation der Enzymaktivität gestattet es einem Organismus in kurzer Zeit auf eine Änderung von osmotischen Verhältnissen zu reagieren. Eine Anpassung ausschließlich über die Regulation der Genexpression wäre dazu zu langsam. Im Fall des kompatiblen Solutes Ectoin, das bereits bei einer Vielzahl von Mikroorganismen nachgewiesen werden konnte (Galinski, 1995), steht einer großen Anzahl an genetischen Studien (Canovas *et al.*, 1997; Louis und Galinski, 1997; Canovas *et al.*, 1998; Göller *et al.*, 1998) nur eine Veröffentlichung gegenüber, die sich mit der Charakterisierung der biosynthetischen Enzyme befasst (Ono *et al.*, 1999). Die vorliegende Arbeit wurde mit der Zielsetzung begonnen, einen ersten Schritt zu machen, um diese Lücke zu schließen.

4.1. ***Proteingewinnung durch heterologe Expression***

Prinzipiell gibt es bei der Aufreinigung eines Proteins zwei mögliche Vorgehensweisen. Zum einen kann ein Protein aus der Biomasse des Ursprungsorganismus gewonnen werden, zum anderen kann ein heterologes Expressionssystem eingesetzt werden.

Zunächst sind die Vor- und Nachteile der jeweiligen Vorgehensweisen gegeneinander abzuwägen. Der Hauptvorteil bei der Aufreinigung aus dem Ursprungsorganismus ist, dass das Protein in jedem Fall in nativer Form in der Biomasse vorliegt. Damit ist sogleich der

gravierendste Nachteil bei der Verwendung von heterologen Expressionssystemen aufgezeigt, bei denen keineswegs sicher ist, ob das erwünschte Protein im gewählten System überhaupt erfolgreich produzierbar ist. Es ist allerdings zu beachten, dass das gewünschte Protein im Ursprungsorganismus häufig nur in einer sehr geringen Konzentration vorliegt. Darüber hinaus kann die Aufreinigung aus der Biomasse sehr aufwendig und mit sehr großen Verlusten behaftet sein. Hier bietet die heterologe Expression einen Ausweg an, da eine Überexpression des gewünschten Proteins möglich ist. Zusätzlich können durch Anhängen zusätzlicher Aminosäuren Fusionsproteine erzeugt werden, die den Einsatz von affinitätschromatographischen Verfahren ermöglichen und eine Aufreinigung dadurch sehr vereinfachen.

Im Falle der Aufreinigung der Enzyme der Ectoinbiosynthese konnte auf die Erkenntnisse vorhergehender Arbeiten auf diesem Gebiet zurückgegriffen werden. Bereits in einer Arbeit von Petra Louis (Louis und Galinski, 1997) konnte gezeigt werden, dass durch Einbringen von genetischen Material aus *M. halophilus* in *E. coli*, die Coli-Bakterien zu einer Synthese von Ectoin befähigt werden. Thorsten Bestvater konnte im Rahmen seiner Arbeit sogar einen Produktionsstamm von *E. coli* zur Gewinnung von Ectoin erzeugen (Bestvater, 2001). Daher war zu Beginn dieser Arbeit bereits klar, dass *E. coli* zu einer Produktion von funktionsfähigen Enzymen des Ectoinbiosyntheseweges mit genetischem Material aus *M. halophilus* in der Lage ist. Daher wurde die Verwendung eines heterologen Expressionssystems basierend auf einem *E. coli*-Stamm zur Gewinnung dieser Enzyme gegenüber anderen Methoden favorisiert.

Neben der Möglichkeit der Überexpression durch Verwendung starker Promotoren kann die Aufreinigung der gewonnenen Proteine durch Einsatz von affinitätschromatographischen Verfahren vereinfacht werden. Es musste aus der Vielzahl der kommerziell erhältlichen Expressionssysteme eine Kombination gefunden werden, die sowohl einen starken Promotor aufweist als auch den Einsatz einer selektiven Chromatographie ermöglicht. Dabei fiel die Wahl auf ein T7-Expressionssystem der Firma Novagen, das sich aus einer Kombination von Expressionsvektoren der pET-Serie in Verbindung mit *E. coli* der BL21-Linie zusammensetzt.

Nachteilig an dem verwendeten Expressionssystemen ist die relativ schlechte Regulierbarkeit der Expression. Durch Variation der zugegebenen IPTG-Menge ist lediglich eine grobe Steuerung der Expressionsrate möglich. Häufig kommt es zu einer Bildung von sogenannten Einschlusskörperchen durch denaturierendes, aggregierendes Protein in Folge einer zu starken Produktion des Zielproteins, wodurch die Ausbeute an nativem Zielprotein stark herab gesetzt sein kann. Auch wenn bei den in dieser Arbeit verwendeten

Expressionssystemen diese Problematik nicht explizit untersucht wurde, ist anzumerken, dass eine Absenkung der Temperatur zu einer Erhöhung der Ausbeute an aktivem Zielprotein führte, was darauf hindeutet, dass eine zu starke Transkription des Zielgens sich eher nachteilig auswirkte. Da diese relativ einfache Maßnahme bereits zu einer mehr als zufrieden stellenden Proteinausbeute führte, wurde auf einen Wechsel zu Systemen, die eine bessere Induktionskontrolle erlaubt hätten, verzichtet.

Durch Anwendung einer weiteren einfachen Maßnahme konnte die Enzymausbeute abermals erhöht werden. Die Anzucht und Induktion erfolgte in Medien mit einer erhöhten Salzkonzentration. Durch die Erhöhung des Salzgehaltes von 1 % auf 3 % wurde eine zwei- bis dreimal höhere Menge an Enzym aus einer Kultur vergleichbaren Volumens gewonnen. Diese Expression unter osmotischen Stress erfolgte vor allem in Hinblick auf die halophile Natur des Spenderorganismus. Mehrere Arbeiten, die sich mit halophilen Proteinen beschäftigen, heben die stabilisierende Wirkung von erhöhter Salzkonzentration auf halophile Enzyme hervor (Madern *et al.*, 2000; Mevarech *et al.*, 2000). Dabei wird argumentiert, dass durch niedrig affine Bindung der Salzionen an spezifische Stellen auf der Oberfläche des gefalteten Polypeptids, die aktive Konformation der Enzyme stabilisiert wird. Durch die Erhöhung der Mediensalinität kommt es auch im Cytoplasma zu einer Erhöhung des Salzgehaltes sowie zu einem Anstieg der Konzentration aus dem Medium verfügbarer kompatibler Solute. Es ist allgemein bekannt, dass *E. coli* ebenso wie andere Mikroorganismen auf erhöhte Salzgehalte der Umgebung mit einer Akkumulation vorhandener kompatibler Solute aus dem Medium reagiert (Galinski, 1995). Ebenfalls gut dokumentiert ist der stabilisierende Effekt kompatibler Solute auf Enzyme (Knapp *et al.*, 1999; Göller und Galinski, 1999). Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der beobachteten Zunahme an nativem Protein bei der Aufreinigung aus salzgestressten Expressionskulturen um eine Kombination der beiden beschriebenen stabilisierenden Effekte handelt, die im vorliegenden Fall sehr erfolgreich ausgenutzt werden konnten.

Neben der klassischen Expression im Cytoplasma wurde eine Sekretion des Proteins in das Periplasma erwogen. Die Vorteile eines derartigen Vorgehens lägen vor allem in einer vereinfachten Aufreinigung, da sich im Periplasma deutlich weniger Proteine befinden als im Cytoplasma. Im Gegensatz zum Cytoplasma enthält das Periplasma nur etwas 4 % des Gesamtzellproteins (Nossal und Heppel, 1966) oder etwa 100 Proteine (Pugsley und Schwartz, 1985) daher sind Verunreinigungen durch unerwünschte Proteine leichter zu umgehen. Darüber hinaus ist die proteolytische Aktivität im Periplasma häufig stark herabgesetzt, so dass das Risiko teilweise gespaltenes Enzym aufzureinigen deutlich gesenkt werden kann. Diesen Vorteilen stehen jedoch auch Nachteile gegenüber, wie ein

mögliches Überladen des Sekretionssystem durch überexpressiertes Protein sowie eine unkorrekte Faltung der Enzyme bei Export in das Periplasma. Da es sich bei den Enzymen von Interesse um cytoplasmatische Proteine handelt und die chemische Umgebung im Cytoplasma von *E. coli* dem ursprünglichen Expressionsort eher entspricht als das Periplasma, wurde von einer Expression mit anschließendem Export abgesehen. Darüber hinaus konnten Probleme mit Proteasen durch Verwendung des Protease-defizienten Stammes *E. coli* B21 (DE3) umgangen werden. Das Problem der Bildung von Einschlusskörperchen bei cytoplasmatischer Expression wurde durch ausschließliche Aufarbeitung der löslichen Fraktion des Lysats umgangen. Eine Renaturierung von Enzym das in Form dieser Einschlusskörperchen vorliegt wurde nicht versucht, da eine ausreichende Menge des Zielproteins in nativer, löslicher Form vorlag. Dem zweiten Vorteil der geringeren Verunreinigung durch unerwünschte Proteine beim einem Export in das Periplasma steht im verwendeten Expressionssystem die Möglichkeit einer affinitätschromatographischen Aufreinigung gegenüber. Wie gezeigt werden konnte, ist die Verunreinigung durch Fremdprotein bereits nach einem einzigen Aufreinigungsschritt minimal. Die erzielte Reinheit bewegte sich in der Größenordnung von 99 % und war für die in dieser Arbeit beabsichtigte Charakterisierung mehr als ausreichend. Die Auswahl eines Histidinüberhanges der die Aufreinigung mittels Nickelionen-Affinitätschromatographie gestattet, hat sich daher als eine gut geeignete Methode zur Aufreinigung der DABAaCT und der Ectoinsynthase herausgestellt. Als Alternative zu einem Poly-(His)-Fusionsprotein wäre die Bildung eines Fusionsproteins mit der Gluthation-S-transferase oder Protein A gewesen. Beide Methoden haben den Vorteil sich ebenso wie die Affinitätschromatographie mit Poly-(His)-Überhängen als Standardmethoden etabliert zu haben. In der vorliegenden Arbeit war vor allem die geringe Größe des sechsfachen Histidinüberhanges für die Entscheidung ausschlaggebend, das es sich bei zwei der Enzyme um Moleküle einer relativ geringen Größe mit Massen unter 20 kDa handelt.

Das erste Enzym im Ectoinbiosyntheseweg, die Aminotransferase konnte mit einem pET-basierten Expressionssystem nicht erfolgreich produziert werden. Möglicherweise hängt das Scheitern von Aufreinigungsversuchen bei der Transaminase mit der Wahl dieses Überhanges zusammen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass dieses erste Enzym in der Biosynthesekette von Ectoin scheinbar nicht zwingend erforderlich ist. So konnte Karin Göller für das Ectoin-produzierende Bakterium *Halomonas elongata* zeigen, dass eine Mutante, die nicht zu einer Produktion dieses Enzyms fähig war, wenig Beeinträchtigung bei der Produktion des kompatiblen Solute zeigte. Sogar unter Salzstress konnten nur geringe Unterschiede im Wachstum und der cytoplasmatischen Solutezusammensetzung mit dem

Wildtyp festgestellt werden (Göller, 1999). Erst bei relativ hohen Salzkonzentration von 12 % waren deutliche Unterschiede in der cytoplasmatischen Ectoinkonzentration nachzuweisen. Es ist nicht auszuschließen, dass auch *E. coli* in der Arbeit von Louis und Galinski, nicht auf die Transaminase des Ectoinengcluster zur Biosynthese von Ectoin angewiesen ist. Daher ist die Annahme, dieses Protein würde in *E. coli* erfolgreich produziert, weil das kompatible Solut nachgewiesen wurde, vielleicht falsch. Einem erneuten Versuch die Transaminase aufzureinigen muss daher der Nachweis einer Expression in *E. coli* ohne Affinitätstags vorangehen. Ist nachgewiesen, dass sich die Transaminase in *E. coli* exprimieren lässt, kann die Aufreinigung im Anschluss an eine heterologe Expression versucht werden. Ansonsten bleibt nur die Aufreinigung des Enzyms aus dem Ursprungsorganismus mit den bereits erwähnten Problemen, die eine solche Vorgehensweise mit sich bringt. Vor allem die Ausbeute an Protein bezogen auf die Kulturgröße wird gegenüber der in dieser Arbeit durchgeführten Aufreinigung sehr viel geringer ausfallen. Um eine Abschätzung dieses Faktors zu ermöglichen, kann man die Ergebnisse der Arbeit von Ono et al., die eine Aufreinigung der Ectoin-synthetisierenden Enzyme aus einem *Halomonas elongata*-Stamm durch geführt haben (Ono et al., 1999) mit den Ausbeuten, wie sie in dieser Arbeit erreicht wurden, vergleichen. Aus einer 5 L-Kultur von *Halomonas elongata* konnten ca. 50 µg der Acetyltransferase aufgereinigt werden. Die Ausbeute aus 1 L Kulturlösung nach heterologer Expression in *E. coli* mit anschließender affinitätschromatographischer Aufreinigung betrug dagegen etwa 2 mg. Sicherlich wird es Unterschiede in der Expression der Enzyme in zwei unterschiedlichen Organismen geben, auch wenn sie den gleichen Schritt bei der Biosynthese eines Naturstoffes katalysieren, dennoch illustriert ein Faktor von 200 in der Proteinausbeute die klare Überlegenheit des hier verwendeten Aufreinigungsverfahrens, wenn auch bei der Betrachtung eines anderen Enzyms wie der Ectoin-Synthase dieser Faktor auf den Wert 20 absinkt. Zusätzlich zu dieser um ein bis zwei Größenordnungen höheren Ausbeute ist das klassische Verfahren zur Proteinaufreinigung mit 3-4 chromatographischen Arbeitsschritten um ein Vielfaches aufwendiger und auch bei sorgfältiger Durchführung ist jeder dieser Schritte mit einem etwa 50 %igen Aktivitätsverlust des Eluats verbunden (Ono et al., 1999).

Abschließend zur Betrachtung des verwendeten Aufreinigungsverfahrens wird noch ein Kritikpunkt behandelt, der häufig gegen den Einsatz von Fusionsproteinkonstrukten ins Feld geführt wird. Dabei handelt es sich um die prinzipielle Möglichkeit, dass das aufgereinigte Fusionsprotein sich in seinen charakteristischen Eigenschaften vor allem in Bezug auf die Aktivität vom nativen Protein unterscheiden kann. Natürlich kann ohne genauen Vergleich von nativem Protein und Fusionsprotein nicht ausgeschlossen werden, dass sich diese in

ihrer Aktivität unterscheiden. Da das native Protein jedoch nur schwer zugänglich ist, ansonsten hätte man nicht den Umweg über das Fusionsprotein gewählt, ist es nur schwer möglich dieses Argument zu entkräften. Daher ist in vielen Systemen zur Erzeugung von Fusionsproteinen eine Möglichkeit zur Abspaltung des Affinitätstags vorgesehen. So ist auch im hier eingesetzten, auf dem Vektor pET-15b basierenden, Expressionssystem für die Acetyltransferase zwischen dem sechsfachen Histidinanhang und der Acetyltransferase eine Erkennungsstelle für die Protease Thrombin situiert. Diese ermöglicht die Spaltung des Fusionsproteins, wobei nur zwei zusätzliche Aminosäuren am N-terminalen Ende der Polypeptidkette der Acetyltransferase im Vergleich mit der ursprünglichen Form zurückbleiben. Beim Vergleich der Aktivitäten von gespaltenen und ungespaltenen Fusionsproteinen konnte kein Einfluss des Überhanges nachgewiesen werden. Ein Einfluss der zwei verbliebenen Aminosäuren auf die Konformation und damit auf die Aktivität der Acetyltransferase erscheint wenig plausibel. Sollte es einen Einfluss dieser zwei Aminosäuren geben, erscheint es nicht schlüssig warum zusätzliche 12 Aminosäuren die Aktivität nicht noch weiter verringern. Daher wird von keinem Einfluss des angefügten Überhanges auf aktives Protein ausgegangen. Das jedoch die Position des Histidinüberhanges am N-terminalen oder C-terminalen Ende des Proteins durchaus entscheidend für den Erfolg der Aufreinigung sein kann, zeigte sich bei der Gewinnung rekombinanter Ectoin-Synthase. Ein Expressionsvektor zur Aufreinigung dieses Enzyms als Fusionsprotein mit N-terminalen Histidinüberhang durch die hier beschriebene Verfahrensweise wurden von Thorsten Bestvater im Rahmen seiner Dissertation (Bestvater, 2001) konstruiert. Dort konnte der Nachweis einer Expression erbracht werden, und auch die Aufreinigung des Proteins aus dem Lysat der Expressionskultur war erfolgreich. Die Untersuchung der katalytischen Aktivität des so aufgereinigten Enzyms wurde jedoch nicht durchgeführt und Experimente mit diesem Protein wurden erst im Rahmen dieser Arbeit unternommen. In Zusammenarbeit mit Christine Kiss konnte nachgewiesen werden, dass sich im Lysat der Expressionskultur aktive Ectoin-Synthase befindet, d.h. N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure zu Ectoin umgesetzt wurde (Kiss, 2000). Diese Umsetzung konnte nur nach Induktion der Proteinsynthese durch IPTG beobachtet werden, war also eindeutig von der Expression der Ectoinsynthase abhängig. Versuche das aktive Enzym aus dem Lysat durch den Einsatz der Nickelionenaffinitätschromatographie zu isolieren scheiterten jedoch. Zwar ließ sich das Fusionsprotein leicht aus dem Lysat aufreinigen, zeigte jedoch nach der Elution vom Säulenmaterial keinerlei Aktivität mehr. Dieses Ergebnis lässt zwei Interpretationsmöglichkeiten als Erklärung offen. Zum einen könnte die Aufreinigung über die Säule das Enzym inaktivieren, zum anderen wäre es möglich, dass nur inkorrekt gefaltetes und damit inaktives Enzym den Histidinüberhang in einer Weise exponiert, die eine

Anbindung an das Säulenmaterial ermöglicht. Durch einen Wechsel des Histidinüberhanges vom N-terminalen zum C-terminalen Ende des Enzyms konnten diese Probleme überwunden werden und aktives Protein konnte aus dem Lysat von induzierten Expressionskulturen erfolgreich isoliert werden. Dieser Erfolg spricht gegen die Erklärung, dass die Säule das Enzym möglicherweise desaktiviert, da die Position des Histidinüberhanges dafür nicht von Bedeutung sein kann.

4.2. Regulation der Ectoin-Biosynthese

Durch den Einsatz der beschriebenen heterologen Expressionssysteme und affinitätschromatographischen Aufreinigung konnte leicht genügend Protein hergestellt werden, so dass eine umfangreiche Charakterisierung dieser beiden Enzyme durchgeführt werden konnte. Da die Diaminobuttersäure-TA in dieser Arbeit nicht aufgereinigt werden konnte, wurde das Hauptaugenmerk auf die durch die Gene *ectA* und *ectC* kodierten Enzyme gelegt. Für das Ectoin-produzierende Bakterium *Halomonas elongata* konnte gezeigt werden, dass eine Mutante, die nicht zu einer Produktion der Transaminase fähig war, kaum Beeinträchtigung bei der Produktion des kompatiblen Solutes zeigte und unter Salzstress nur geringe Unterschiede im Wachstumsvergleich und in der cytoplasmatischen Solutezusammensetzung mit dem Wildtyp zeigte (Göller, 1999). Da Diaminobuttersäure bei vielen Gram-positiven Bakterien ein Bestandteil der Zellmembran ist (Perkins und Cummins, 1964; Suzuki *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996) ist es möglich, dass *M. halophilus* für DABA auch andere Synthesewege besitzt und die Regulation der Konzentration dieses Zwischenproduktes anderen Mechanismen zugrunde liegt. Ein weiteres Argument für einen von den beiden anderen Enzymen abweichenden Regulationsmechanismus liefert die deutlich unterschiedliche Zusammensetzung der DABA-Transaminase im Vergleich mit der DABAAct und der Ectoin-Synthase (Abbildung 46).

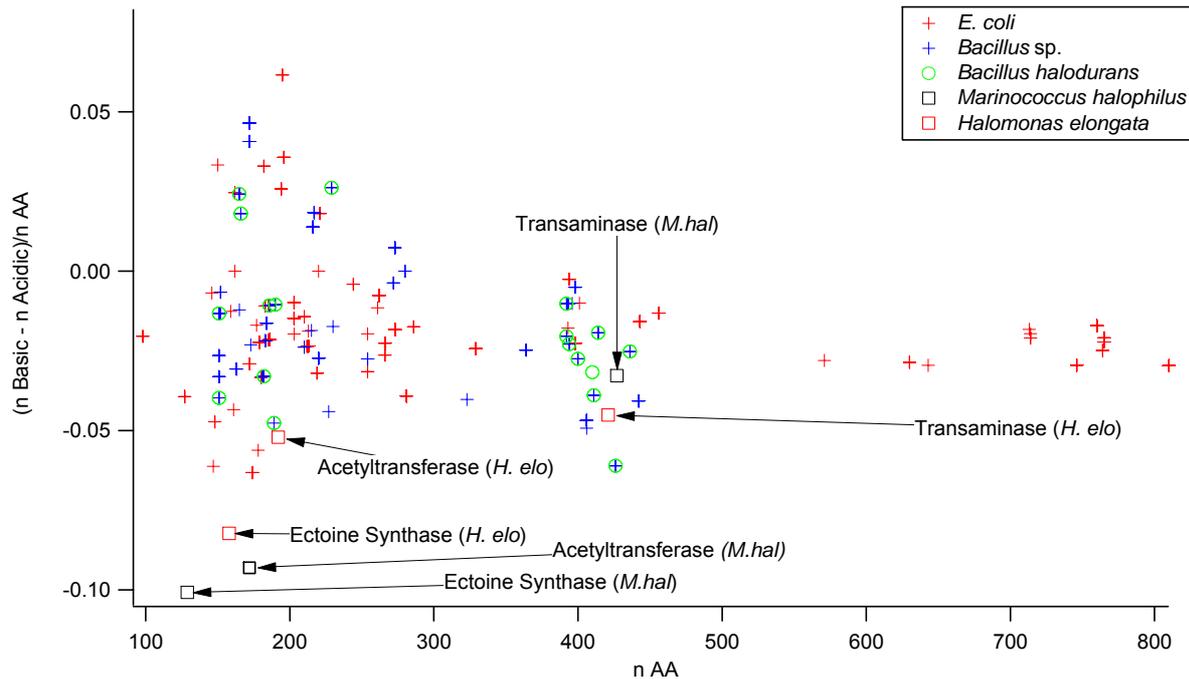


Abbildung 46: Dargestellt ist die Zusammensetzung verschiedener Acetyltransferasen. Um ein Maß für die Azidität oder Basizität eines Enzyms zu finden, wurde die Anzahl der sauren von der der basischen Aminosäuren subtrahiert. Anschließend wurde durch die Länge der Aminosäurekette geteilt. Negative Werte kennzeichnen Enzyme mit einem Überschuss an sauren Aminosäuren, positive Werte solche mit einem Überschuss basischer Aminosäuren. Je größer der Betrag desto ausgeprägter ist der saure bzw. der basische Charakter des Enzyms. Hervorgehoben sind die Enzyme der Ectoinbiosynthese dargestellt. Mit Ausnahme der Ectoin-Synthasen und Transaminasen von *M. halophilus* und *H. elongata* wurden ausschließlich die Zusammensetzungen von Acetyltransferasen verschiedener Organismen aufgetragen. Die Daten der Proteine wurden der Datenbank der NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen.

Wie in der Abbildung 46 deutlich zu erkennen ist, handelt es sich bei der Transaminase um ein Enzym mit nur leicht saurem Charakter. Der mit dem Programm „Clone Manager“ berechnete pI beträgt etwa 5,5 und ist damit um ca. eine Einheit höher als die entsprechenden Werte der Acetyltransferase und der Ectoin-Synthase.

4.2.1. Entwicklung der Enzymassays

Der saure Charakter dieser beiden Enzyme, wie ihn Abbildung 46 anschaulich demonstriert, legt eine Regulierung der Aktivität über pH-Wert und Kationenkonzentration nahe. Bevor der Einfluss dieser beiden Faktoren untersucht werden konnte, erschien es zweckmäßig für jedes der beiden Enzyme einen Aktivitätsassay zu entwickeln, um nicht auf langwierige Messungen an der HPLC angewiesen zu sein. Im Falle der Ectoinsynthase gestaltete sich dies relativ unproblematisch, da aus HPLC-Messungen bereits der große Unterschied der Absorption von Substrat und Produkt im UV-Bereich bekannt war. Daher lag es nahe, den

Umsatz von N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure zu Ectoin im UV-Vis Photometer zu verfolgen und die Reaktion in einer Küvette ablaufen zu lassen. Es musste beachtet werden, dass die Schichtdicke angemessen klein gewählt wurde, da der Extinktionskoeffizient von Ectoin relativ groß ist. HPLC-Messungen wurden stichprobenartig zur Verifikation der Daten durchgeführt. Im Falle der Acetyltransferase konnte ein derartig einfacher Enzymassay nicht durchgeführt werden, da sich die optischen Eigenschaften von 2,4-Diaminobuttersäure und N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure nicht ausreichend unterscheiden. Versuche die unterschiedlichen optischen Eigenschaften von Acetyl-Coenzym A und Coenzym A auszunutzen waren nicht erfolgreich. Daher wurde nach einem chemischen Nachweis für eines der beiden Produkte der Acetyltransfer-Reaktion gesucht. Der Farbstoff DTNB bot sich als Nachweisreagenz für die bei der Deacetylierung von Acetyl-Coenzym A entstehende Thiofunktion an. Daher wurde zunächst versucht analog zum Assay für die Ectoinsynthese in der Küvette zu arbeiten. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Farbstoff die DABAAct inaktiviert.

Diesem Nachteil des Farbstoffes steht jedoch die recht große Empfindlichkeit des Assays gegenüber, wodurch es möglich war, den Test auf einer Mikrotiterplatte durchzuführen, die bekanntlich eine geringe Schichtdicke für photometrische Bestimmungen zur Verfügung stellt. Mit dem entwickelten Assay konnten noch Konzentrationsunterschiede von 10 μ M nachgewiesen werden. Für die Bestimmung von sehr niedrigen Km-Werten war jedoch auch dieser empfindliche Test nicht ausreichend. Da für eine verlässliche Bestimmung mindestens fünf aufeinanderfolgende Messungen notwendig sind, muss während der Reaktion ein Unterschied von mindestens 50 μ M erreicht werden. Hinzu kommt, dass die Substratkonzentration auch bei dem letzten Wert noch ausreichend hoch sein musste. Daher war die minimale Startkonzentration an Substrat 100 μ M. Da für eine verlässliche Bestimmung des Km-Wertes eine Reaktion bei mindestens ein Fünftel Km durchgeführt werden muss (Fersht, 1985), war der niedrigste mit Sicherheit zu bestimmende Km-Wert bei 500 μ M. Für die Ermittlung des Km-Wertes von DABA war diese Grenze problemlos einzuhalten. Eine Bestimmung des Km-Wertes von Acetyl-CoA war jedoch nicht möglich, da der Km-Wert für dieses Substrat wahrscheinlich zu niedrig war. Gewöhnlich liegt der Km-Wert von Acetyltransferasen für das Acetyl-CoA im Bereich von 10-50 μ M und damit um 1-2 Größenordnungen unter dem mit den verwendeten Enzymassays erreichbaren Messbereich.

Der Farbstoff wurde erst im Anschluss an die Reaktion zugesetzt. Die Inaktivierung des Enzyms nach der Probennahme erfolgte anders als im ursprünglichen HPLC-Experiment nicht mit Trichloressigsäure, da diese zu einer Entfärbung von DTNB führte. Daher wurde auf

SDS-Zugabe als Methode für die Inaktivierung ausgewichen. Die Literatur berichtet von einem Einfluss von SDS auf die Färbung von DTNB (Wang und Volini, 1968), der bei den verwendeten Konzentrationen jedoch nicht beobachtet werden konnte.

Für die Inaktivierung des Enzyms durch DTNB lassen sich eine Reihe von Vermutungen anstellen. Am wahrscheinlichsten ist, dass durch Anbindung des Farbstoffes an freie Thiofunktion von Cystein- oder Methionin-Seitenketten die dreidimensionale Struktur des Enzyms gestört und daher die katalytische Aktivität beeinträchtigt wird. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass eine Thiofunktion im aktiven Zentrum an der Transacetylierung beteiligt ist, wie für einige Acetyltransferasen bereits beschrieben (Dyda *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 1992) und eine Anbindung des Farbstoffes an diese entscheidende Stelle das Enzym blockiert. Genauerem Aufschluss darüber könnte nur die Aufklärung der räumlichen Struktur des Enzyms geben. Die unternommenen Versuche Proteinkristalle der Acetyltransferase zu erzeugen, um damit die Grundlagen für eine Röntgen-Strukturanalyse zu schaffen, blieben leider erfolglos. Trotz einer Vielzahl an Bedingungen wurden keine Bedingungen gefunden, bei denen es zu einer Bildung von Proteinkristallen kam. Da der theoretische Hintergrund der Proteinkristallbildung allenfalls ansatzweise als verstanden betrachtet werden kann, wird auf eine detaillierte Diskussion über mögliche Gründe für das Scheitern der Kristallisationsversuche verzichtet.

4.2.2. Cytoplasmatischer Salzgehalt als Regulator

Nachdem durch die Entwicklung einfach und schnell durchzuführender Enzymassays die Grundlage zu einer Charakterisierung der gewonnen Enzyme geschaffen wurde, ist der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Aktivität der DABAacT und der Ectoin-Synthase untersucht worden. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl der Salzgehalt als auch der pH-Wert die katalytischen Eigenschaften der beiden Enzyme stark beeinflussen. Die Charakteristika der beiden untersuchten Enzyme stimmen in ihren Optima gut überein. So zeigten beiden Enzyme eine maximale Aktivität bei einer Kationenkonzentration von 0,5-0,6 mol/L. Diese Salzkonzentration für die maximale Aktivität scheint sehr niedrig, wenn man bedenkt, dass *M. halophilus* bis zu einer Salzkonzentration des Mediums von 2,5 M gutes Wachstum zeigt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass viele Organismen, die die „organic-osmolyte“-Strategie verfolgen, trotz der hohen Verfügbarkeit, Alkaliionen aus dem Cytoplasma ausschließen (Matheson *et al.*, 1976; Sadler *et al.*, 1980; Ventosa *et al.*, 1998). Daher ist es möglich, dass die Konzentration an Alkaliionen bei der Regulation der Ectoinbiosynthese eine integrale Rolle spielt, zeigen doch die beiden untersuchten Enzyme eine recht gute Übereinstimmung im Einfluss der Alkaliionenkonzentration auf die Aktivität.

Würde *M. halophilus* die cytoplasmatische Alkaliionenkonzentration sehr niedrig halten, wobei „niedrig“ in diesem Fall eine Konzentration von ca. 0,2-0,3 M bedeuten würde, und als Reaktion auf einen Salzschock die Salzkonzentration im Zellinnern auf 0,5-0,6 M anheben, wäre dies bereits ein möglicher Mechanismus zur Regulation der Ectoinbiosynthese. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass bei einer Reihe von, sowohl halotoleranten als auch nicht-halotoleranten, Bakterien ein hyperosmotisches Ereignis zu einer vorübergehenden Akkumulation von Kaliumionen führt. Dabei dienen die Kaliumionen scheinbar als ein Osmolyt zur Wiederherstellung von Turgor und Zellvolumen bis es durch kompatible Solute ersetzt werden kann (Reed *et al.*, 1985; Dinnbier *et al.*, 1988; Whatmore *et al.*, 1990; Welsh und Herbert, 1993). Die ins Zellinnere einströmenden Alkaliionen könnten daher bei *M. halophilus* daher eine doppelte Funktion erfüllen, indem sie sowohl als schnell verfügbares Osmolyt als auch zur Regulation der Biosynthese kompatibler Solute dienen. Vergleicht man die ermittelten Daten mit den Ergebnissen der Forschergruppe um Ono, die sich ebenfalls mit den Enzymen der Ectoinbiosynthese beschäftigt hat (Tabelle 11), fällt auf, dass auch bei *Halomonas elongata* das pH-Optimum im Alkalischen liegt und in bezug auf den Einfluss von Alkaliionen ähnliche Charakteristika aufweist (Ono *et al.*, 1999).

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse der Arbeitsgruppe Ono (Ono *et al.*, 1999) für die Enzyme der Ectoinbiosynthese in *H. elongata* mit den in dieser Arbeit untersuchten Enzymen von *M. halophilus*. Die Daten von *M. halophilus* sind jeweils unterstrichen. (N.D. nicht durchgeführt)

	DABA-Aminotransferase	DABA-Acetyltransferase	Ectoinsynthese
Optimaler pH-Wert	8,6 - 8,7 <u>N.D.</u>	8,2 <u>8,5-9,0</u>	8,5 - 9,0 <u>8,5</u>
Optimaler Salzgehalt [M]	0,5 <u>N.D.</u>	0,4 <u>0,5</u>	0,5 <u>0,6</u>
Reaktionsgeschwindigkeit bei optimalen Bedingungen [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	12 <u>N.D.</u>	N.D. <u>35</u>	56 <u>8,8</u>
Km-Wert [mM]	4,5 <u>N.D.</u>	N.D. <u>30 (DABA)</u>	11 <u>N.D.</u>

Für *H. elongata* konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Regulation der Ectoinbiosynthese hauptsächlich auf der Ebene der Enzymaktivität stattfinden muss (Kraegeloh und Kunte, 2002). In Versuchen zur Salzanpassung dieses Organismus wurden einige Kulturen im Vorfeld eines Salzschocks mit dem Antibiotikum Chloramphenicol

versetzt. Durch diese Maßnahme wurde dem Organismus die Fähigkeit zur Proteinbiosynthese genommen. Wie erwartet zeigten die mit Chloramphenicol behandelten Kulturen kein Wachstum. Sie waren jedoch ebenso wie unbehandelte Kulturen in der Lage das kompatible Solute Ectoin in Reaktion auf einen Salzschock sowohl aufzunehmen als auch zu synthetisieren. Dabei zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen Chloramphenicol-behandelten und unbehandelten Bakterienkulturen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Synthese kompatibler Solute bei diesem Organismus hauptsächlich auf der Ebene der Enzymaktivität reguliert wird, sofern die Erhöhung der Salzkonzentration nicht zu drastisch (Verdopplung des Salzgehalts oder mehr) ausfällt (Kraegeloh und Kunte, 2002). In der genannten Arbeit wurden darüber hinaus die integrale Bedeutung von Kaliumionen für die osmotische Anpassung von *H. elongata* untersucht.

Obwohl bisher ungeklärt ist, weshalb Kaliumionen diese wichtige Rolle bei der Osmoadaptation spielen, wurden hierfür bereits einige naheliegende Annahmen formulieren. Sind in der Umgebung eines Bakteriums Kaliumionen nur in sehr begrenztem Maße verfügbar, kommt es aufgrund des stark erhöhten Na^+/K^+ -Verhältnisses zu einem vermehrten Austausch von Kalium- durch Natriumionen an entscheidenden Bindestellen sowohl in als auch außerhalb der Zelle. Dadurch könnten viele Prozesse, wie Transport, Atmung und Biosynthese beeinträchtigt oder inhibiert werden. Für *E. coli* und *Vibrio alginolyticus* konnte gezeigt werden, dass Kalium für den Aufbau eines pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran erforderlich ist (Padan *et al.*, 1976; Tokuda *et al.*, 1981). Durch diese Beobachtungen konnte die wichtige Rolle von Natriumionen, vor allem jedoch von Kaliumionen, für die Regulation von osmo-adaptiven Prozessen eindrucksvoll demonstriert werden. Daher ist es wenig überraschend, dass die Aktivität von Enzymen der Ectoinbiosynthese der Organismen *H. elongata* und *M. halophilus* durch diese Ionen beeinflusst wird. Die Möglichkeit von Kaliumionen als messenger für osmotischen Stress ist in der Literatur bereits diskutiert worden (Booth und Higgins, 1990; Dinnbier *et al.*, 1988)

4.2.3. Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität

Es besteht also die Möglichkeit, dass Kaliumionen aber auch Natriumionen als regulierendes Element die Ectoinbiosynthese beeinflussen. Es ist jedoch anzumerken, dass die Aktivität vor allem im Bereich zwischen 0,2 M und 0,4 M Alkaliionenkonzentration besonders stark ansteigt. Würde *M. halophilus* die cytoplasmatische Alkaliionenkonzentration in einem Bereich von ca. 0,2-0,3 M halten, und als Reaktion auf eine plötzliche Zunahme der Mediensalinität die Salzkonzentration im Zellinnern auf 0,5-0,6 M anheben, wäre dies ein möglicher Mechanismus zur Regulation der Ectoinbiosynthese. Eine derart niedrige

Konzentration der Alkaliionen Kalium und Natrium wäre jedoch für einen halophilen Organismus ungewöhnlich. Viele halophile Organismen haben cytoplasmatische Kaliumionenkonzentration von ca. 0,5 M (Ventosa *et al.*, 1998) und heben diese als Reaktion auf einen Salzschock auf ca. 1 M an. In diesem Konzentrationsbereich ändert sich die Aktivität der untersuchten Enzyme jedoch nur unwesentlich. Vor diesem Hintergrund erscheint die Regulation der Enzymaktivität durch Variation der Alkaliionenkonzentration wenig wahrscheinlich. Neben dem bereits diskutierten Einfluss von Alkaliionenkonzentration auf die Aktivität der Enzyme der Ectoinbiosynthese konnte allerdings auch der Einfluss des pH-Wertes nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die untersuchten Enzyme ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von etwa 8,5 haben. Da die Enzyme im Cytoplasma lokalisiert sind, ist dieser Wert für ein Aktivitätsoptimum relativ hoch, denn die meisten Bakterien halten den pH-Wert des Cytoplasma im Bereich zwischen 7,5 und 8,0 (Booth, 1985). Dass viele Bakterien den internen pH-Wert nach Möglichkeit innerhalb eines bestimmten Bereiches halten, ist bereits seit längerem bekannt (Harold *et al.*, 1970; Harold, 1977; Booth, 1985). Ebenso ist es eine allgemein anerkannte Tatsache, dass sich die Konzentration von Protonen, Natrium- und Kaliumionen durch verschiedene Syn- und Antiporter gegenseitig beeinflussen. Der erste Organismus an dem die Bildung eines pH-Gradienten untersucht wurde, war das, ebenso wie *M. halophilus*, zu den Firmicuten zählende Bakterium *Streptococcus faecalis*. Es wurde festgestellt, dass *S. faecalis* je nach pH-Wert des Mediums einen 0,5 bis 1 pH-Einheiten erhöhten pH-Wert im Cytoplasma aufweist (Harold und Papineau, 1972). Für diesen Organismus konnte ein Zusammenhang zwischen der Alkalisierung des Cytoplasmas und Kaliumtransport eindeutig nachgewiesen werden (Kobayashi *et al.*, 1982). Dass es in der Folge eines hyperosmotischen Schocks zu einem Einströmen von Kaliumionen in das Cytoplasma kommt, ist bereits diskutiert worden. Anders als bei *E. coli* scheint die Erhöhung der cytoplasmatischen Kaliumionenkonzentration nach einem Salzschock für halophile Bakterien kein kurzzeitiges Phänomen zu sein, sondern über einen längeren Zeitraum zu bestehen. Daher kommt die mit dem Einströmen von Kaliumionen auftretende Alkalisierung des Mediums, falls sie ähnlich wie die Erhöhung des Kaliumlevels über einen längeren Zeitraum in den Zellen Bestand haben sollte, als regulatorisches Element in Frage.

Für *E. coli* wurde bereits widerlegt, dass die in Folge eines Salzschocks entstehende Alkalisierung des Zellinneren bei der Regulation von osmoprotektiven Mechanismen der einzige Einflussfaktor ist (Dinnbier *et al.*, 1988). Durch Messung cytoplasmatischer Parameter wie pH-Wert, Kaliumionen-, Glutamat- und Trehalosekonzentration an *E. coli* K12 sowie einiger *E. coli*-Mutanten konnten Dinnbier *et al.*, zeigen, dass in Folge eines

hyperosmotischen Schocks sowohl der intrazelluläre pH-Wert als auch die cytoplasmatische K^+ -Konzentration sowie die des Gegenions Glutamat schnell ansteigen (Abbildung 47).

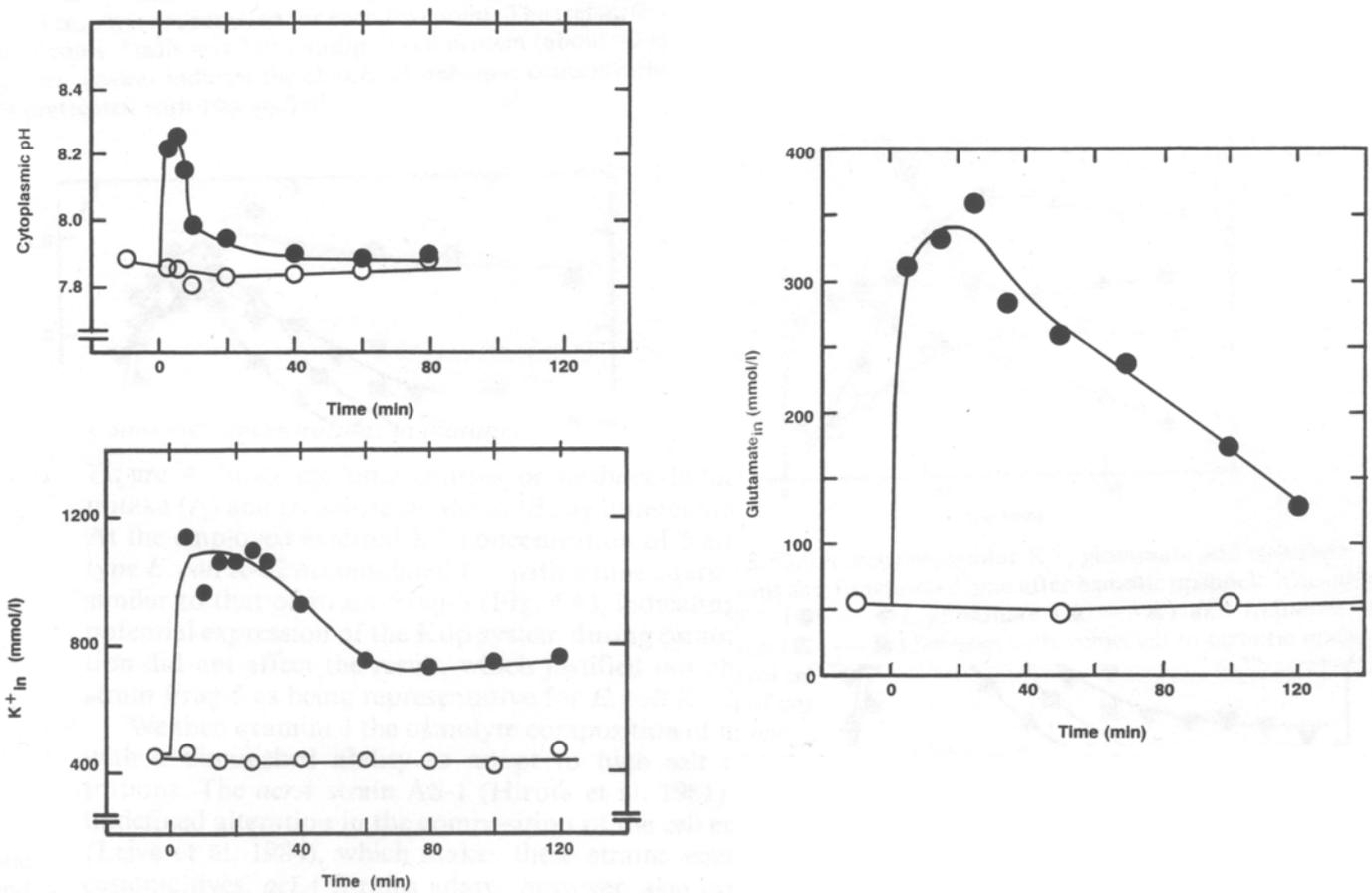


Abbildung 47: Auswirkungen eines hyperosmotischen Schocks auf *E. coli*. Geschockte Zellen sind als geschlossene Kreise dargestellt. Die offenen Kreise zeigen zum Vergleich nicht geschockte Bakterien. Dargestellt sind die Veränderungen des cytoplasmatischen pH-Wertes (links oben) sowie der intrazellulären Kaliumionen- und Glutamatkonzentration (links unten bzw. rechts). Die Abbildungen sind aus der Originalliteratur entnommen (Dinnbier *et al.*, 1988).

Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass der cytoplasmatische pH-Wert als ausschließlicher Regulationsmechanismus nicht in Frage kommt, da er bereits 15-20 Minuten nach einer Erhöhung der Mediensalinität wieder auf einen Wert sinkt, wie er vor dem Salzschock vorlag und die Synthese neuer kompatibler Solute oder deren Aufnahme in dieser kurzen Zeit nicht abgeschlossen werden kann.

Die hohe Aktivität der beiden in dieser Arbeit untersuchten Enzyme bei alkalischen pH-Werten legt jedoch eine regulierende Funktion des internen pH-Werts nahe. Da es noch keine Untersuchungen gab, die sich thematisch mit den Auswirkungen eines hyperosmotischen Schocks auf den cytoplasmatischen pH-Wert bei *M. halophilus* befassen,

wurde in dieser Arbeit eine Methode zur dynamischen Messung des internen pH-Wertes etabliert und die Reaktion von *M. halophilus* auf einen Salzschock untersucht.

4.3. Methoden zur Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Wertes

Um herauszufinden, ob auch der pH-Wert als regulierendes Element die Ectoinbiosynthese beeinflusst, wurden verschiedene Methoden erwogen, um Änderungen des cytoplasmatischen pH-Wertes festzustellen, die als Folge einer hyperosmotischen Veränderung des Mediums auftreten. Zur Messung des intrazellulären pH-Wertes wurden bereits eine Reihe von Methoden entwickelt, darunter der Einsatz von H^+ -empfindlichen Mikroelektroden (Gerson und Burton, 1976), von ^{31}P -NMR (Gillies *et al.*, 1981; Civan *et al.*, 1986; Barton *et al.*, 1980; Navon *et al.*, 1979), von radioaktiv-markierten membrangängigen schwacher Säuren (Gillies und Deamer, 1979; Schuldiner und Rozengurt, 1982; L'Allemain *et al.*, 1985; Anand und Prasad, 1989) und von pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen (Grinstein *et al.*, 1984; Gillies *et al.*, 1990; Haworth und Fliegel, 1993; Pena *et al.*, 1995; Breeuwer *et al.*, 1996; Guldeldt und Arneborg, 1998; Siegumfeldt *et al.*, 1999).

Der Einsatz von Mikroelektroden schied von vornherein aus, da Bakterien dafür zu klein sind. Theoretisch wäre es möglich durch Einsatz von Antibiotika und trickreichen Manipulationen Riesenzellen von *M. halophilus* zu erzeugen. Es wurde jedoch davon abgesehen, diese Methode einzusetzen, da fraglich war, ob sich diese künstlichen Konstrukte unter osmotischen Stress ebenso verhalten wie „normale“ Bakterien. Der Versuch bestehende Protokolle für das halophile Bakterium *H. elongata* zu modifizieren, erwiesen sich als wenig vielversprechend (Kurz, 2003). Gegen den Einsatz von ^{31}P -NMR gab es eine ganze Reihe von Argumenten. Neben der begrenzten Verfügbarkeit von Messzeit am NMR-Gerät und der Notwendigkeit sehr hoher Zelldichten während der Messung, sprach vor allem die mangelnde zeitliche Auflösung gegen den Einsatz dieser Methode. Die Verwendung radioaktiv-markierter membrangängiger schwacher Säuren ermöglicht nur mit sehr großem Aufwand die dynamische Verfolgung von Änderungen des cytoplasmatischen pH-Wertes, und eine Aufkonzentration der Säuren kann sich störend auf den Metabolismus auswirken. Daher wurde der Einsatz eines pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes favorisiert um die Auswirkungen eines Salzschocks auf *M. halophilus* zu studieren.

Ein Hauptkritikpunkt, der in der Vergangenheit gegen die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen sprach, war die Abgabe des Farbstoffes vom Cytoplasma in das

Medium (Booth, 1985). Das dadurch erzeugte Hintergrundsignal machte eine Interpretation der gewonnenen Daten zu einer schwierigen Aufgabe. Um dieses Problem zu umgehen, werden die Fluoreszenzfarbstoffe, auch als Molekularsonden bezeichnet, in Form von nicht fluoreszierenden Acetoxymethyl- oder Diacetylestern eingesetzt.

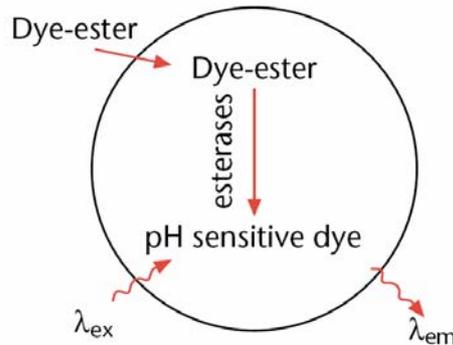


Abbildung 48: Schema zum Prinzip der verwendeten Färbemethode. Die Molekularsonde wird in Form eines nicht fluoreszierenden Ester in die Kulturlösung gegeben. In dieser Form ist sie membrangängig. Erst im Cytoplasma kommt es durch intrazelluläre Esterasen mit der Abspaltung der Esterfunktion zur Bildung eines Fluoreszenzfarbstoffes. Der dabei entstehende Fluorophor ist nicht mehr membrangängig und reichert sich dadurch im Cytoplasma an. (Abbildung: MOLECULAR PROBES)

Sie sind dann membrangängig und werden im Cytoplasma von Esterasen gespalten, wodurch sie ihre Fähigkeit verlieren, die Membran passieren zu können, und sich im Zellinnern akkumulieren (Abbildung 48). Trotz dieser Methode kommt es im Laufe eines Experiments durch Ausströmen des Farbstoffes aus dem Cytoplasma zu einem Farbstoffverlust des Zellinnern. Dies ist ein nicht völlig verstandener Prozess, der jedoch durch das Einführen einer Succinimidylesterfunktion in den Farbstoff stark eingedämmt werden kann (Abbildung 49).

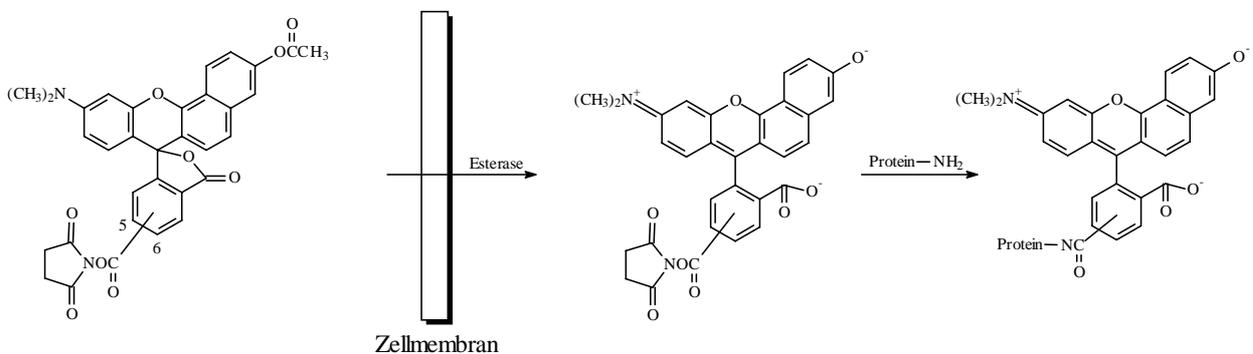


Abbildung 49: Mechanismen die beim Färben der Bakterien von Bedeutung sind. Details der Reaktion des Succinimidylesters mit der Aminfunktion sind in Abbildung 50 dargestellt.

Diese zusätzliche Estergruppe ermöglicht eine kovalente Bindung des Farbstoffes mit zellinternen aliphatischen Aminen (Haugland und Spence, 1996).

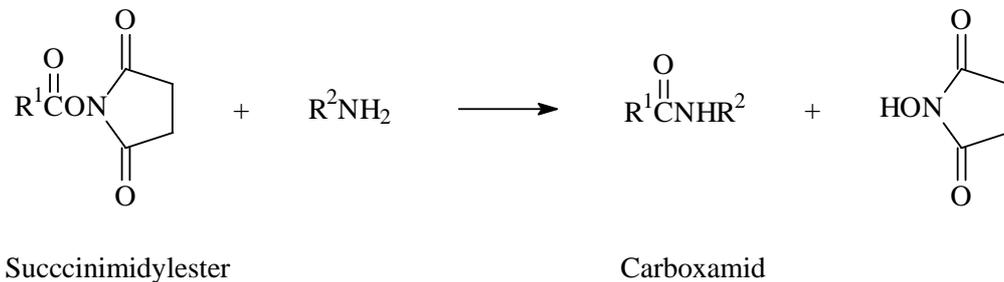


Abbildung 50: Kovalente Bindung zwischen Farbstoff (R^1) und einem cytoplasmatischen aliphatischen Amin (R^2NH_2)

Neben der Verwendung dieser beiden Methoden wurde für jede Charge von angefärbten Bakterien eine Kalibration unter Bedingungen durchgeführt, die den anschließenden experimentellen Bedingungen möglichst nahe kamen. Durch Anwendung dieser Maßnahmen konnten im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert werden, die es gestattet, aussagekräftige Messungen des cytoplasmatischen pH-Wertes bei *M. halophilus* durchzuführen sowie die Dynamik von Änderungen des internen pH-Wertes als Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock zu verfolgen.

Zunächst wurde der Einfluss des externen pH-Wertes pH_o auf den cytoplasmatischen pH-Wert pH_i untersucht. Dabei zeigte *M. halophilus* die Fähigkeit zur pH-Homöostasis. Diese Fähigkeit den pH_i ca. 0,5 bis 1 pH-Einheit über pH_o zu halten, ist bereits bei anderen Mikroorganismen beobachtet worden (Harold und Papineau, 1972, Breeuwer *et al.*, 1996). Demgegenüber ist der Einfluss von Osmolaritätsänderungen des Mediums auf den pH_i eines Organismus ein bisher wenig untersuchtes Phänomen, das im Rahmen dieser Arbeit für *M. halophilus* jedoch eindeutig nachgewiesen werden konnte. Eine Erhöhung des Salzgehaltes von 7,5 % auf 10 % führte bei *M. halophilus* zu einem Ansteigen des pH_i von 7,6 auf 8,2 innerhalb von 15 Minuten.

Was die Ursache für diese Anhebung des cytoplasmatischen pH-Wertes ist, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Eine plausible Erklärung wäre die Möglichkeit, dass es in der Folge eines hyperosmotischen Schocks zu einem Einströmen von Kalium- und vielleicht auch Natriumionen kommt, wie an andere Stelle bereits erörtert. Um die Elektroneutralität des Cytoplasmas aufrecht zu erhalten stehen dem Bakterium zwei mögliche Wege offen: 1) Transport von Protonen oder Kationen aus dem Cytoplasma heraus, 2) Synthese von organischen Säuren oder sauren Aminosäuren (Galinski, 1995).

Sicher werden viele Bakterien eine Kombination dieser beiden Strategien verfolgen. Das Bakterium *E. coli* reagiert auf einen hyperosmotischen Schock mit einer prompten Aufnahme von Kaliumionen bei gleichzeitigem Ausstoß von Protonen. Dies führt zu einer vorübergehenden Alkalisierung des Cytoplasma, die durch eine Anreicherung von Glutamat jedoch schnell überwunden wird. Mit der Überproduktion von Trehalose oder der Aufnahme von kompatiblen Soluten aus dem Medium wird die Konzentration von Kaliumglutamat im Cytoplasma immer weiter abgesenkt (Dinnbier *et al.*, 1988).

Einem hyperosmotischen Schock begegnet auch *B. subtilis* mit der Aufnahme von Kaliumionen aus der Umgebung. Anders als *E. coli* synthetisiert *B. subtilis* jedoch kein Glutamat, sondern nimmt Prolin aus dem Medium auf oder synthetisiert dieses (Whatmore *et al.*, 1990; Whatmore und Reed, 1990). Ob es auch bei *B. subtilis* zu einer vorübergehenden oder dauerhaften Alkalisierung des Mediums kommt, ist bisher nicht untersucht, angesichts der fehlenden Produktion oder Aufnahme eines Gegenions für das akkumulierte Kalium aber sehr wahrscheinlich.

Daher ist es im Fall von *M. halophilus* eine plausible Erklärung, dass die Alkalisierung des Cytoplasma durch einströmende Kaliumionen bei gleichzeitigem Export von Protonen verursacht wird. Bei *M. halophilus* bleibt der pH-Wert über einen längeren Zeitraum auf hohem Niveau wohingegen *E. coli* schon nach 15 bis 20 Minuten den pH_i wieder auf einen Wert abgesenkt hat, wie er vor dem hyperosmotischen Schock vorherrschte. Leider ließ sich die hier vorgestellte Methodik mit Fluoreszenzfarbstoffen als molekulare Sonde zur Bestimmung des pH_i auf *E. coli* nicht übertragen. Obwohl für einen anderen pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff bereits etabliert (Riondet *et al.*, 1997), konnten Coli-Bakterien mit dem in dieser Arbeit verwendeten Farbstoff nicht untersucht werden, da *E. coli* diesen nicht aufnimmt. Sogar sehr drastische Maßnahmen, wie eine Teillysis (Repaske, 1956), um den Farbstoff in das Cytoplasma von *E. coli* einzubringen, blieben erfolglos.

4.4. Wird die Ectoinbiosynthese durch den cytoplasmatischen pH-Wert reguliert ?

Für viele Organismen konnte bereits gezeigt werden, dass der interne pH-Wert die Expression von Genen (Olson, 1993), aber auch Transportprozesse (Poolman *et al.*, 1987) beeinflusst. Dass die beobachtete Alkalisierung des Cytoplasmas ein wichtiges regulatorisches Element bei der Kontrolle der Ectoinbiosynthese ist, scheint bei den dargelegten Ergebnissen und Erörterungen auf der Hand zu liegen. Im folgenden wird

versucht ein Schema der Reaktion auf ein hyperosmotisches Ereignis herzuleiten, wie es für eine Reihe von Organismen bereits postuliert wurde (Kempf und Bremer, 1998; Morbach und Krämer, 2002).

Nach dem Stand der Forschung ist die erste Reaktion von Bakterien bei einem Verlust von cytoplasmatischem Wasser wie er durch einen hyperosmotischen Schock verursacht wird, die Aufnahme von Kaliumionen (Dinnbier *et al.*, 1988; McLaggan *et al.*, 1994; Whatmore *et al.*, 1990; Whatmore und Reed, 1990; Kraegeloh und Kunte, 2002). Diese Reaktion tritt sowohl bei *E. coli*, *B. subtilis*, *C. glutamicum* als auch *H. elongata* auf und ist begleitet von der Synthese von Glutamat (bei *E. coli* und *C. glutamicum*), Prolin (*B. subtilis*) oder Ectoin (*H. elongata*) oder der Aufnahme dieser Substanzen durch spezialisierte Transportsysteme. Dabei sind die Transportsysteme in den meisten Fällen auf der Ebene der Aktivität reguliert, wobei häufig eine zusätzliche Regulation auf der Expressionsebene beobachtet werden kann (Morbach und Krämer, 2002). Auch in den Fällen, in denen die Neusynthese dieser Verbindungen untersucht wurde, findet eine Regulation auf der Ebene der Transkription und Enzymaktivität statt. Die entscheidenden Elemente zur Kontrolle des cytoplasmatischen Solutegehaltes konnten auch beim Bakterium *M. halophilus* identifiziert werden. Es gibt Enzyme zur Biosynthese des kompatiblen Solute Ectoin (Louis und Galinski, 1997), die auf der Ebene der Expression reguliert werden (Bestvater, 2001). Darüber hinaus gibt es Transportsysteme für Betain und Ectoin über die kompatible Solute aus dem Medium aufgenommen werden können (Vermeulen, 2003). Dass eine Regulation der cytoplasmatischen Solutkonzentration ausschließlich auf der Ebene der Expression von entscheidenden Enzymen stattfindet, kann aufgrund der Ergebnisse von Thorsten Bestvater ausgeschlossen werden. Eine signifikante Erhöhung der Menge an mRNA für die Ectoin-produzierenden Enzyme im mRNA-Pool wurde erst 10-15 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock nachgewiesen (Bestvater, 2001). Bis diese Reaktion zu einer vermehrten Anzahl Ectoin-synthetisierender Enzyme führt, sind sicher noch weitere 5-10 Minuten nötig. Der Zeitraum von 15-25 Minuten ist viel zu groß, um im Falle eines hyperosmotischen Schocks das Überleben des Bakteriums sicherstellen zu können.

Angesichts der auffallenden Übereinstimmung in den entscheidenden Systemen der Osmoregulation mit anderen Organismen, ist wahrscheinlich auch die erste Reaktion von *M. halophilus* auf einen hyperosmotischen Schock die Aufnahme von Kaliumionen aus dem Medium. Die experimentelle Bestätigung dieser Vermutung steht allerdings noch aus, konnte jedoch für das Gram-negative Bakterium *H. elongata*, das ebenfalls das kompatible Solute Ectoin mit den entsprechenden Transportsystemen verwendet, erbracht werden (Kraegeloh und Kunte, 2002). Dieser primäre Anpassungsmechanismus tritt demnach auch bei

halophilen Organismen auf. Die beobachtete Alkalisierung bei *M. halophilus* ist daher wahrscheinlich eine Folge der Kaliumionenaufnahme. Da nicht bekannt ist, in welchen Bereichen sich die cytoplasmatische Konzentration der Alkaliionen vor und nach einem Salzschock bewegen, kann über eine regulierende Funktion dieser Ionen keine Aussage gemacht werden. Diese Funktion kann jedoch dem cytoplasmatischen pH-Wert aufgrund der erbrachten Ergebnisse eindeutig zugeschrieben werden. Daher wird an dieser Stelle die Hypothese aufgestellt, dass die Regulation der Ectoinbiosynthese auch auf der Ebene der Enzymaktivität stattfindet und zwar mit dem cytoplasmatischen pH-Wert als ein regulierendes Element. Ob es sich dabei um den einzigen Faktor handelt, der die Ectoinbiosynthese beeinflusst, ist nicht geklärt, erscheint jedoch angesichts des großen Einfluss des pH-Wertes auf viele chemische Reaktionen als eher unwahrscheinlich. Darüber hinaus ist es notwendig die Erkenntnisse dieser Arbeit, die aus einer Kombination von physiologischen Methoden bei der Untersuchung des cytoplasmatischen pH-Wertes und den *in vitro*-Messungen mit den Enzymen des Ectoinbiosynthese gewonnen wurden, durch Untersuchungen des cytoplasmatischen Solute-pools bei verschiedenen pH_i und Salzgehalten zu untermauern. Ebenfalls wünschenswert wäre eine Untersuchung der cytoplasmatischen Kationenzusammensetzung bei verschiedenen Salzgehalten und nach einem hyperosmotischen Schock, entweder mit den Methoden wie sie schon erfolgreich bei *H. elongata* etabliert wurden (Kraegeloh und Kunte, 2002) oder ebenso wie die Bestimmung des pH_i in dieser Arbeit mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. Zu einer Auswahl an möglichen Farbstoffen sei auf das Handbuch eines namenhaften Herstellers in der „Web-Edition“ verwiesen (www.probes.com/handbook.htm). Die Vorteile der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ist bereits diskutiert worden. Zusätzlich sei auf die Möglichkeiten hingewiesen, die sich durch Erweiterung der beschriebenen Methodik durch Fluoreszenzmikroskopie (Guldfeldt und Arneborg, 1998) oder Durchflusszytometrie (Leyval *et al.*, 1997) eröffnen. Durch die Anwendung dieser Techniken ließe sich eine Bestimmung von pH_i und cytoplasmatischen Kationenkonzentrationen an einzelnen Bakterien durchführen.

4.5. Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelten Expressionssysteme eröffnen die Möglichkeit große Mengen der an der Ectoinbiosynthese beteiligten Enzyme in sehr reiner Form zu gewinnen. Die Verfügbarkeit von reinem Enzym in Milligramm-Mengen ist die Grundlage für Methoden zur Strukturaufklärung. Sowohl für die Züchtung von Kristallen für die Röntgenstrukturanalyse, wie sie für die Acetyltransferase bereits in dieser Arbeit versucht

wurde, als auch für die Bereitstellung großer Mengen an Enzym, wie sie für eine Strukturaufklärung mittels NMR-Methoden benötigt werden, ist ein effektives System zur Gewinnung des jeweiligen Proteins die Grundvoraussetzung. Die hohe Ausbeute an reinem Protein aus einer relativ kleinen Kultur ist vor allem für die Gewinnung von Enzymen mit einem speziellem Isotopenverhältnis, wie sie für die mehrdimensionale NMR-Analyse nötig sind (Gardner und Kay, 1998), von besonderem Vorteil. Je kleiner die benötigte Kulturgröße ist, desto kosteneffektiver kann mit teurem Isotopen-angereicherten Medium das jeweilige Enzym gewonnen werden.

Ein weiteres Betätigungsfeld eröffnet sich durch die Möglichkeit Enzym-spezifische Antikörper für die Proteine der Ectoinbiosynthese zu gewinnen. Auch hierfür ist es notwendig sehr reines Protein einzusetzen, wie es durch die in dieser Arbeit dargestellten Expressionssysteme und Aufreinigungsstrategien zur Verfügung steht. Sollte es dafür nötig sein, das Protein ohne einen Histidinüberhang bereitzustellen, bietet die in situ-Abspaltung, wie sie von Hefti beschrieben wurde (Hefti *et al.*, 2001) und für das Enzym der DABAacT in dieser Arbeit bereits demonstriert werden konnte, die Methode der Wahl um große Mengen davon gewinnen zu können. Die Anwendungsfelder von spezifischen Antikörpern sind sehr weitreichend und werden daher nicht weiter erörtert.

Um die Auswirkungen von Osmolaritätsänderungen an *M. halophilus* weitergehend zu erforschen, wäre eine Erweiterung, der in dieser Arbeit demonstrierten Methodik mit cytoplasmatisch lokalisierten Fluoreszenzfarbstoffen auf Kationen und Anionen erwägenswert. Vor allem im Bereich der Zellbiologie sind innerhalb der letzten Jahre beachtenswerte Fortschritte in der Anwendung dieser Fluoreszenzfarbstoffe gemacht worden. Viele der dabei erarbeiteten Methoden können mit vergleichsweise geringem entwicklungs-technischem Aufwand auch in der Untersuchung von Bakterien eingesetzt werden. Es gibt bereits eine Reihe von Fluoreszenzmarkern für die Kationen von Natrium und Kalium sowie für Chloridionen (Minta und Tsien, 1989; Meuwis *et al.*, 1995; Jayaraman *et al.*, 2001; Wolfbeis und Urbano, 1982; Illsley und Verkman, 1987). Diese Ionen sind besonders für das Verständnis osmoadaptiver Prozesse bei Bakterien von essentieller Bedeutung. Darüber hinaus lässt sich die Methodik der cytoplasmatischen Ionenkonzentrationsbestimmung mit dem Fluoreszenzphotometer noch durch Einsatz eines Fluoreszenzmikroskopes aufwerten. Bei entsprechender Ausrüstung des Mikroskops wird damit sogar eine Bestimmung von pH-Werten oder Ionenkonzentrationen einzelner Bakterien in Echtzeit möglich. Auswirkungen verschiedener Umweltparameter könnten dann an individuellen Bakterien direkt bestimmt werden. Eine zusätzliche Erweiterung zur Fluoreszenzphotometrie wäre die Verwendung von Durchflusszytometern (Leyval *et al.*,

1997). Bei geschickter Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe könnte eine Mischung von Bakterien, die mit Markern für verschiedene cytoplasmatische Parameter angefärbt sind, verwendet werden, um zeitgleich den cytoplasmatischen pH-Wert, Kalium- und Natriumionenkonzentration unter den jeweiligen Kulturbedingungen zu untersuchen.

Sollte es gelingen für *M. halophilus* ein Vektorsystem zu entwickeln, wäre als Alternative zu einem Anfärben der Bakterien die Expression von pH-sensitiven GFP-Varianten verfügbar. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auf stress-verursachende Schritte wie Zentrifugation, Pufferwechsel oder Resuspendierung verzichtet werden kann. Im Bereich der Hefezellen konnte diese Arbeitstechnik bereits erfolgreich eingesetzt werden (Karagiannis und Young, 2001). Um die Untersuchungen der cytoplasmatischen Kaliumionenkonzentrationen an *H. elongata* (Kraegeloh und Kunte, 2002) zu ergänzen, wäre die Expression von GFP-Mutanten sicher das Mittel der Wahl, da Färbeversuche am ebenfalls Gram-negativen *E. coli*, wie bereits erörtert, erfolglos waren.

5. Zusammenfassung

- Für die Enzyme L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase und L-Ectoinsynthase des Ectoinbiosynthesewegs von *M. halophilus* wurden heterologe Expressionssysteme entwickelt. Die erstellten Expressionssysteme bestehen aus einem pET-Derivat als Expressionsvektor und dem *E. coli*-Stamm BL21 pLysS als Wirtsorganismus. Grundlage des Systems ist die Expression des Zielgens unter der Kontrolle eines T7-Promotors, der sich durch eine besonders starke Transkriptionsrate auszeichnet. Den Polypeptidketten der Enzyme wird jeweils ein 6-facher Histidinüberhang angefügt und so ein Fusionsprotein erzeugt. Im Fall der L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase ist der Überhang am N-terminalen Ende situiert und über eine Proteaseerkennungstelle abspaltbar. Der Überhang der L-Ectoinsynthase ist am C-Terminus lokalisiert. Versuche eine aktive L-Ectoinsynthase mit N-terminalen, abspaltbaren Histidinüberhang aufzureinigen sind fehlgeschlagen.
- Die Aufreinigung beider Enzyme erfolgte durch Ni-Ionen-Chelat-Affinitätschromatographie. Der funktionale Bestandteil der stationären Phase sind bei dieser Art der Chromatographie immobilisierte Ni-Ionen. Die Anbindung der Ni-Ionen an das Trägermaterial wurde durch eine Nitriooessigsäurefunktion, die kovalent an Sepharose gebunden ist, realisiert. Die mit den jeweiligen Expressionssystemen erzeugten Fusionsproteine sind durch den 6-fachen Histidinüberhang zu einer Anbindung an die Ni-Ionen in der Lage. Durch erhöhte Imidazolkonzentrationen können nur schwach gebundene Fremdproteine in wenigen Waschschritten von der Säule entfernt werden und reines Fusionsprotein bleibt gebunden zurück. Die Elution des Zielproteins erfolgt durch eine nochmals stark erhöhte Imidazolkonzentration, wobei die mit Imidazol in Konkurrenz um Nickelkoordinationsstellen stehenden Histidinreste vollständig verdrängt werden. Im beschriebenen batch-Verfahren konnten Eluate mit einer sehr hohen Proteinkonzentration erzeugt werden. Besonders viel aktives Enzym konnte aus Kulturen isoliert werden, die bei 30° C induziert und bei der relativ hohen Salzkonzentration von 3 % (w/v) NaCl angezogen wurden.

- Das Enzym Diaminobuttersäure-Transaminase, kodiert durch das Gen *ectB*, konnte in dieser Arbeit nicht aufgereinigt werden. Es wurden Expressionsvektoren zur Gewinnung von Fusionsprotein mit entweder C-terminalen oder N-terminalen Poly-(His)-Tag erzeugt. Mit keinem der auf diesen Vektoren basierenden Expressionssystemen gelang die Überexpression der Transaminase.
- Als Alternative für langwierige Aktivitätsassays bei der vorgesehenen Charakterisierung der Enzyme wurde jeweils ein einfach durchzuführender Aktivitätstest für jedes der beiden Enzyme entwickelt. Grundlage für den Assay für die L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase war die als Ellman's Reagenz bezeichnete Substanz 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), die durch die bei der Transacetylierung entstehenden Thiofunktion des Coenzym A zu einem gelben Farbstoff reagiert. Wegen der Enzym-desaktivierenden Wirkung dieser Substanz konnte die Reaktion nur diskontinuierlich durch Probennahme verfolgt werden. Die Umwandlung von N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure zu Ectoin durch die L-Ectoinsynthase konnte bedingt durch den großen Absorptionsunterschied von Produkt und Edukt bei 260 nm im UV-Vis-Spektralphotometer vermessen werden.
- Um die Aufklärung der räumlichen Struktur der Acetyltransferase mittels Röntgenstrukturanalyse zu ermöglichen, wurde versucht mit der „hanging drop“-Methode Kristalle dieses Enzym zu züchten. Bei keiner der untersuchten Kristallisationsbedingungen konnte die Bildung von Proteinkristallen beobachtet werden.
- Die Charakterisierung der beiden Enzyme zeigte eine große Übereinstimmung der Aktivitätsoptima bezüglich pH-Wert und Kationenkonzentration. Eine besonders hohe Aktivität konnte für beide Enzyme bei einem pH-Wert von ca. 8,5 und einer Kationenkonzentration von 0,5-0,6 M nachgewiesen werden. Die maximalen Umsatzraten der L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase wurde zu 35 $\mu\text{mol}/\text{min}$ je mg Protein bestimmt, die der L-Ectoinsynthase zu 8,8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ je mg Protein. Das Temperaturoptimum lag bei etwa 35° C und damit in einem erwarteten Temperaturbereich. Der Km-Wert der Acetyltransferase für das Substrat DABA wurde zu ca. 32 mM bestimmt.

- Die *in vitro*-Ergebnisse der Charakterisierung zeigten den cytoplasmatischen pH-Wert (pH_i) als ein mögliches Element im Regulationsmechanismus der Ectoinbiosynthese auf. Die pH-Optima beider Enzyme waren bei einem pH-Wert von 8,5 bestimmt worden. Da cytoplasmatische pH-Werte gewöhnlich zwischen 7,5 und 8,0 liegen und Literaturwerte für *M. halophilus* nicht verfügbar waren, wurde eine Methode zur Messung des pH_i erarbeitet. Die entwickelte Methode basiert auf dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Snarf-1, der in membrangängiger Form eines Acetomethoxy-Succinimidylester einer Bakteriensuspension zugesetzt wird. Der in dieser Form nicht fluoreszierende Farbstoff wird durch zellinterne Esterasen in den nicht-membrangängigen Fluorophor umgewandelt. Der Fluoreszenzfarbstoff hat bei Anregung bei einer Wellenlänge von 515 nm zwei Emissionsbanden, die bei 580 nm bzw. 640 nm liegen. Je nach pH-Wert ändert sich das Quotientenverhältnis der beiden Emissionsbanden, wodurch eine Bestimmung des internen pH-Wertes ermöglicht wird.
- Die Bestimmung des pH_i zeigte, dass *M. halophilus* einen Mechanismus zur Regulation des cytoplasmatischen pH-Wertes besitzt. Bis zum einem externen pH-Wert (pH_o) von 8,5 wurde ein pH-Gradient zwischen Cytoplasma und Medium aufrecht erhalten ($\text{pH}_i - \text{pH}_o > 0$). Das Zusammenbrechen des pH-Gradienten ab pH 8,5 hängt dabei offensichtlich mit einer eingeschränkten Vitalfunktion bei hohen pH-Werten zusammen, die bei Wachstumsversuchen nachgewiesen werden konnte. Auf hyperosmotischen Stress reagiert *M. halophilus* mit einer Alkalisierung des Cytoplasma. Der pH_i wurde innerhalb von 15 Minuten von 7,6 auf 8,2 erhöht und ist daher wahrscheinlich ein Teil der Regulation der Ectoinbiosynthese.

6. Literaturverzeichnis

- Altendorf, K. und W. Epstein (1994).
"Kdp-ATPase of *Escherichia coli*."
Cellular Physiology and Biochemistry **4** (3-4): 160-168.
- Anand, S. und R. Prasad (1989).
"Rise in Intracellular pH is concurrent with 'start' progression of *Saccharomyces cerevisiae*."
Journal of General Microbiology **135** (Pt 8): 2173-2179.
- Avron, M. (1986).
"The osmotic components of halotolerant algae."
Trends in Biochemical Sciences **11**: 5-6.
- Barton, J. K., J. A. Den Hollander, T. M. Lee, A. Maclaughlin und R. G. Shulman (1980).
"Measurement of the internal pH of yeast spores by ³¹P nuclear magnetic resonance."
Proceedings of the National Academy of Science USA **77** (5): 2470-2473.
- Ben-Amotz, A. und M. Avron (1973).
"The role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the halophilic *Algae Dunaliella parva*."
Plant Physiology **51**: 875-878.
- Bestvater, T. (2001).
"Regulation der Ectoin-Biosynthese-Gene in *Marinococcus halophilus* und bei rekombinanter Expression in *Escherichia coli*." Institut für Biochemie.
Dissertation, Münster, Westfälische Wilhelms-Universität
- Bestvater, T. und E. A. Galinski (2002).
"Investigation into a stress-inducible promoter region from *Marinococcus halophilus* using green fluorescent protein."
Extremophiles **6** (1): 15-20.
- Bligh, E. G. und W. J. Dyer (1959).
"A rapid method of lipid extraction and purification."
Canadian Journal of Biochemistry and Physiology **37**: 911-917.
- Booth, I. R. (1985).
"Regulation of cytoplasmic pH in bacteria."
Microbiological Reviews **49** (4): 359-78.
- Booth, I. R. und C. F. Higgins (1990).
"Enteric bacteria and osmotic stress: intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress?"
FEMS microbiology reviews **6** (2-3): 239-46.
- Booth, I. R. und P. Louis (1999).
"Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*."
Current Opinion in Microbiology **2**: 166-169.

- Bovell, C. R., L. Packer und R. Helgerson (1963).
"Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering."
Biochimica et Biophysica Acta **75**: 257-266.
- Breeuwer, P., J. L. Drocourt, F. M. Rombouts und T. Abee (1996).
"A novel method for continuous determination of the intracellular pH in bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester."
Applied and environmental microbiology **62** (1): 178-183.
- Brown, A. D. (1976).
"Microbial water stress."
Bacteriological Reviews **40** (4): 803-46.
- Canovas, D., C. Vargas, M. I. Calderon, A. Ventosa und J. J. Nieto (1998).
"Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043."
Systematic and Applied Microbiology **21** (4): 487-97.
- Canovas, D., C. Vargas, F. Iglesias-Guerra, L. N. Csonka, D. Rhodes, A. Ventosa und J. J. Nieto (1997).
"Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes."
Journal of Biological Chemistry **272** (41): 25794-801.
- Carpita, N. C. (1985).
"Tensile strength of cell walls of living cells."
Plant Physiology **79**: 485-488.
- Cayley, S., B. A. Lewis, H. J. Guttman und M. T. j. Record (1991).
"Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. Implications for protein-DNA interactions in vivo."
Journal of Molecular Biology **222**: 281-300.
- Civan, M. M., S. R. Williams, D. G. Gadian und E. Rozengurt (1986).
"³¹P NMR Analysis of intracellular pH of Swill Mouse 3T3 cells: Effects of Extracellular Na⁺, and K⁺, and mitogenic stimulation."
Journal of Membrane Biology **94** (1): 55-64.
- Csonka, L. N. (1989).
"Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress."
Microbiological Reviews **53** (1): 121-47.
- Csonka, L. N. und W. Epstein (1996).
"Osmoregulation." in "*Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology." F. C. Neidhardt and R. Curtiss.
Washington, D.C., ASM Press: 2 v. (xx, 2822 p.).
- da Costa, M. S., H. Santos und E. A. Galinski (1998).
"An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea."
Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology **61**: 117-53.

- Dinnbier, U., E. Limpinsel, R. Schmid und E. P. Bakker (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): 348-57.
- Dosch, D. C., G. L. Helmer, S. H. Sutton, F. F. Salvacion und W. Epstein (1991).
"Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: Evidence for 3 constitutive systems mediating uptake of potassium."
Journal of Bacteriology **173**: 687-696.
- Dyda, F., D. C. Klein und A. B. Hickman (2000).
"GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview."
Annual review of biophysics and biomolecular structure **29**: 81-103.
- Eisenberg, H., M. Mevarech und G. Zaccai (1992).
"Biochemical, structural and molecular genetic aspects of halophilism."
Advances in Protein Chemistry **43**: 1-62.
- Epstein, W. (1986).
"Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*."
FEMS Microbiology Reviews **39**: 73-78.
- Epstein, W. und S. G. Schultz (1965).
"Cation transport in *Escherichia coli* K-12 V. Regulation of Cation Content."
Journal of General Physiology **49**: 221-234.
- Fersht, A. R. (1985).
"Enzyme structure and Mechanism." (2nd Edition)
New York, WH Freeman and Co.
- Frank, M. B. (1997).
"Bacterial Hosts and Vectors - Genetics." in "Molecular Biology Protocols." M. B. Frank.
Oklahoma City.
- Frings, E. (1995).
"Kompatible Solute ausgewählter halotoleranter und halophiler *Firmicutes*: Isolierung, Identifizierung und Produktion." Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie.
Dissertation, Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
- Galinski, E. A. (1995).
"Osmoadaptation in bacteria."
Advances in microbial physiology **37**: 272-328.
- Galinski, E. A. und R. M. Herzog (1990).
"The role of trehalose as a substitute for nitrogen containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*)."
Archives of Microbiology **153**: 607-613.
- Galinski, E. A., H. P. Pfeiffer und H. G. Truper (1985).
"1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*."
European Journal of Biochemistry **149** (1): 135-9.

- Galinski, E. A. und H. G. Trüper (1994).
"Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems."
FEMS Microbiology Reviews **15**: 95-108.
- Gardner, K. H. und L. E. Kay (1998).
"The use of ²H, ¹³C, ¹⁵N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins."
Annual review of biophysics and biomolecular structure **27**: 357-406.
- Gerson, D. F. und A. C. Burton (1976).
"The relation of cycling of intracellular pH to mitosis in the acellular slime mould *Physarum polycephalum*."
Journal of Cellular Physiology **91** (2): 297-303.
- Gillies, R. J. und D. W. Deamer (1979).
"Intracellular pH changes during the cell cycle in *Tetrahymena*."
Journal of Cellular Physiology **100** (1): 23-31.
- Gillies, R. J., R. Martinez-Zauguilan, G. M. Martinez, R. Serrano und R. Perona (1990).
"Tumorigenic 3T3 cells maintain an alkaline pH under physiological conditions."
Proceedings of the National Academy of Science USA **87** (19): 7414-7418.
- Gillies, R. J., K. Ugurbil, J. A. Den Hollander und R. J. Shulaman (1981).
"³¹P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*."
Proceedings of the National Academy of Science USA **78** (4): 2125-2129.
- Göller, K. (1999).
"Identifizierung und Charakterisierung des Ectoin-Genclusters in *Halomonas elongata*." Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
Dissertation, Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität: 124
- Göller, K. und E. A. Galinski (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.
- Göller, K., A. Ofer und E. A. Galinski (1998).
"Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis [published erratum appears in FEMS Microbiol Lett 1998 Aug 15; **165**(2):379]."
FEMS Microbiology Letters **161** (2): 293-300.
- Grammann, K., A. Volke und H. J. Kunte (2002).
"New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T."
Journal of Bacteriology **184** (11): 3078-85.
- Grinstein, S., S. Cohen und A. Rothstein (1984).
"Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport."
Journal of General Physiology **83** (3): 341-369.

- Guldfeldt, L. U. und N. Arneborg (1998).
"Measurement of the effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting, individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy."
Applied and environmental microbiology **64** (2): 530-4.
- Hagemann, M., S. Richter und S. Mikkat (1997).
"The *gytA* gene encodes a subunit for the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC6803."
Journal of Bacteriology **179**: 714-720.
- Hanahan, D. (1983).
"Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids."
Journal of Molecular Biology **166** (4): 557-80.
- Hao, M. V., M. Kocur und K. Komagata (1984).
"*Marinococcus* gen. nov., a new genus for motile cocci with meso-diaminopimelic acid in the cell wall; and *Marinococcus albus* sp. nov. and *Marinococcus halophilus* (Novitsky and Kushner) comb. no."
Journal of General and Applied Microbiology **30**: 449-459.
- Harold, F. M. (1977).
"Ion currents and physiological functions in microorganisms."
Annu Rev Microbiol **31**: 181-203.
- Harold, F. M. und D. Papineau (1972).
"Cation transport and electrogenesis by *Streptococcus faecalis*. II. Proton and sodium extrusion."
Journal of Membrane Biology **8** (1): 45-62.
- Harold, F. M., E. Pavlasova und J. R. Baarda (1970).
"A transmembrane pH gradient in *Streptococcus faecalis*: origin, and dissipation by proton conductors and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide."
Biochimica et Biophysica Acta **196** (2): 235-244.
- Haugland, R. P. und M. T. Z. Spence (1996).
"Probes useful at near neutral pH." in "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals." I. D. Johnson.
Eugene, Oregon, USA, Molecular Probes.
- Haworth, R. S. und L. Fliegel (1993).
"Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe* – comparison with *Saccharomyces cerevisiae*."
Molecular and Cellular Biochemistry **124** (2): 131-140.
- Hecker, M., W. Schumann und U. Volker (1996).
"Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*."
Molecular Microbiology **19** (3): 417-38.
- Hefti, M. H., C. J. Van Vugt-Van der Toorn, R. Dixon und J. Vervoort (2001).
"A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site."
Analytical Biochemistry **295** (2): 180-5.

- Hengge-Aronis, R., W. Klein, R. Lange, M. Rimmele und W. Boos (1991).
"Trehalose Synthesis Genes Are Controlled by the Putative Sigma Factor Encoded by *rpoS* and Are Involved in Stationary-Phase Thermotolerance in *Escherichia coli*."
Journal of Bacteriology **173**: 7918-7924.
- Hesse, J. E., L. Wieczorek, K. Altendorf, A. S. Reicin, E. Darus und W. Epstein (1984).
"Sequence homologies between two membrane transport ATPases, The Kdp-ATPase of *Escherichia coli* and the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum."
Proceedings of the National Academy of Science USA **81**: 4746-4750.
- Hocking, A. D. und R. S. Norton (1983).
"Natural-abundance ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Internal Solutes of Xerophilic Fungi."
Journal of Genetic Microbiology **129**: 2915-2925.
- Höltje, J. V. (1998).
"Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*."
Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**: 181-203.
- Illsley, N. P. und A. S. Verkman (1987).
"Membrane chloride transport measured using a chloride-sensitive fluorescent probe."
Biochemistry **26** (5): 1215-9.
- Imhoff, J. und H. G. Trüper (1977).
"*Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b."
Archives of Microbiology **114**: 115-121.
- Imhoff, J. F., H. G. Sahl, G. S. H. Soliman und H. G. Trüper (1979).
"The Wadi Natrun: chemical composition and microbial mass development in alkaline brines of eutrophic desert lakes."
Geomicrobiological Journal **1**: 219-234.
- Imhoff, J. F. und B. Thiemann (1991).
"Influence of salt concentration and temperature on the fatty acid composition of *Ectothiorhodospira* and other halophilic phototrophic purple bacteria."
Archives of Microbiology **156**: 370-375.
- Jayaraman, S., N. S. Joo, B. Reitz, J. J. Wine und A. S. Verkman (2001).
"Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na(+)] and pH but elevated viscosity."
Proceedings of the National Academy of Science USA **98** (14): 8119-23.
- Karagiannis, J. und P. G. Young (2001).
"Intracellular pH homeostasis during cell-cycle progression and growth state transition in *Schizosaccharomyces pombe*."
Journal of Cell Science **114** (Pt 16): 2929-41.
- Kempf, B. und E. Bremer (1998).
"Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments."
Archives of microbiology **170**: 319-330.

- Kiss, C. (2000).
"Rekombinante Expression und Funktionalität der Ectoinsynthese aus *Marinococcus halophilus*." Institut für Biochemie.
Diplomarbeit, Münster, Westfälische Wilhelms-Universität
- Knapp, S., R. Ladenstein und E. A. Galinski (1999).
"Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine."
Extremophiles **3** (3): 191-8.
- Kobayashi, H., N. Murakami und T. Unemoto (1982).
"Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*."
Journal of Biological Chemistry **257** (22): 13246–13252.
- Koch, A. L. (1983).
"The surface stress theory of microbial morphogenesis."
Advances in Microbial Physiology **24**: 301-336.
- Koch, J. (1984).
"Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic stress."
Journal of Bacteriology **159**: 919-924.
- Kraegeloh, A. und H. J. Kunte (2002).
"Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*."
Extremophiles **6** (6): 453-62.
- Kunte, H. J., E. A. Galinski und H. G. Trüper (1992).
"A modified Fmoc-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines)."
Journal of Microbiological Methods **17**: 129-136.
- Kurz, M. (2003).
"Natrium/Protonen-Antiporter und mechanosensitive Kanäle von *Halomonas elongata*: Überlebensstrategien bei osmotischem Stress." Institut für Biochemie.
Dissertation, Münster, Westfälische Wilhelms-Universität
- L'Allemain, G., S. Paris und J. Pouyssegur (1985).
"Role of a Na⁺-dependent internal pH homeostasis in *S. pombe* Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in regulation of intracellular pH in fibroblasts."
Journal of Biological Chemistry **259** (9): 5809-5815.
- Laemmli, U. K. (1970).
"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4."
Nature **227** (259): 680-5.
- Lai, M. C., K. R. Sowers, D. E. Robertson, M. F. Roberts und R. P. Gunsalus (1991).
"Distribution of Compatible Solutes in the Halophilic Methanogenic *Archaeobacteria*."
Journal of Bacteriology **173**: 5352-5358.
- Lange, R. und R. Hengge-Aronis (1991).
"Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*."
FEMS Microbiology Letters **96**: 149-154.

- Lanyi, J. K. (1974).
"Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria."
Bacteriological Reviews **38** (3): 272-90.
- Larsen, P. I., L. K. Sydnes, B. Landfald und A. R. Strom (1987).
"Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose."
Archives of Microbiology **147** (1): 1-7.
- Leyval, D., F. Debay, J. M. Engasser und J. L. Goergen (1997).
"Flow cytometry for the intracellular pH measurement of glutamate producing *Corynebacterium glutamicum*."
Journal of Microbiological Methods **29** (2): 121-127.
- Louis, P. und E. A. Galinski (1997).
"Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*."
Microbiology **143** (Pt 4): 1141-9.
- Lucht, J. M. und E. Bremer (1994).
"Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: Osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU."
FEMS Microbiology Reviews **14**: 3-20.
- Madern, D., C. Ebel und G. Zaccai (2000).
"Halophilic adaptation of enzymes."
Extremophiles **4** (2): 91-8.
- Marquez, M. C., A. Ventosa und F. Ruiz-Berraquero (1992).
"Phenotypic and Chemotaxonomic Characterization of *Marinococcus halophilus*."
Systematic & Applied Microbiology **15**: 63-69.
- Matheson, A. T., G. D. Sprott, I. J. McDonald und T. H. (1976).
"Some properties of an unidentified halophile: growth characteristics, internal salt concentration, and morphology."
Canadian Journal of Microbiology **22** (6): 780-786.
- McLaggan, D., T. M. Logan, D. G. Lynn und W. Epstein (1990).
"Involvement of gamma-glutamyl peptidases in osmoadaptation of *Escherichia coli*."
Journal of Bacteriology **172**: 3631-3636.
- McLaggan, D., J. Naprstek, E. T. Buurmann und W. Epstein (1994).
"Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*."
Journal of Biological Chemistry **269** (3): 1911-1917.
- Meury, J. (1988).
"Glycinebetaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*."
Archives of Microbiology **149**: 232-239.
- Meuwis, K., N. Boens, F. C. De Schryver, J. Gallay und M. Vincent (1995).
"Photophysics of the fluorescent K⁺ indicator PBFI."
Biophysical Journal **68** (6): 2469-73.

- Mevarech, M., F. Frolow und L. M. Gloss (2000).
"Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt."
Biophysical Chemistry **86** (2-3): 155-64.
- Mikkat, S., U. Effmert und M. Hagemann (1997).
"Uptake and use of the osmoprotective compounds trehalose, glucosylglycerol, and sucrose by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803."
Archives of Microbiology **167** (112-118).
- Miller, J. H. (1992).
"A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria."
Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Minta, A. und R. Y. Tsien (1989).
"Fluorescent indicators for cytosolic sodium."
Journal of Biological Chemistry **264** (32): 19449-57.
- Min-Yu, L., H. Ono und M. Takano (1993).
"Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp."
Annual Report of the International Center for Cooperative Research in Biotechnology Japan **16**: 193-200.
- Moore, D. J., R. H. Reed und W. D. P. Stewart (1987).
"A glycine betaine transport system in *Aphanothece halophytica* and other glycine betaine synthesising cyanobacteria."
Archives of Microbiology **147**: 399-405.
- Morbach, S. und R. Krämer (2002).
"Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria."
Chembiochem **3** (5): 384-97.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987).
"Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction."
Methods in Enzymology **155**: 335-50.
- Navon, G., R. G. Shulman, T. Yamane, T. R. Eccleshall, K. Lam, J. J. Baronofsky und J. Marmur (1979).
"Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of wild-type and glycolytic pathway mutants of *Saccharomyces cerevisiae*."
Biochemistry **18** (21): 4487-4499.
- Norrander, J., T. Kempe und J. Messing (1983).
"Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis."
Gene **26** (1): 101-6.
- Nossal, N. G. und L. A. Heppel (1966).
"The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase."
Journal of Biological Chemistry **241** (13): 3055-3062.

- Novitsky, T. J. und D. J. Kushner (1976).
"*Planococcus halophilus* sp.nov., a Facultatively Halophilic Coccus."
International Journal of Systematic Bacteriology **26** (1): 53-57.
- Olson, E. R. (1993).
"Influence of pH on bacterial gene expression."
Molecular Microbiology **8** (1): 5-14.
- Ono, H., K. Sawada, N. Khunajakr, T. Tao, M. Yamamoto, M. Hiramoto, A. Shinmyo, M. Takano und Y. Murooka (1999).
"Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*."
Journal of Bacteriology **181** (1): 91-9.
- Oren, A. (1986).
"Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*."
Canadian Journal of Microbiology **32** (4): 4-9.
- Oren, A. (1999).
"Bioenergetic aspects of halophilism."
Microbiology and Molecular Biology Reviews **63** (2): 334-48.
- Oren, A., M. Heldal und S. Norland (1997).
"X-Ray microanalysis of intracellular ions in the anaerobic halophilic eubacterium *Haloanaerobium praevalens*."
Canadian Journal of Microbiology **43**: 588-592.
- Oren, A., M. Heldal, S. Norland und E. A. Galinski (2002).
"Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*."
Extremophiles **6** (6): 491-8.
- Padan, E., D. Zilberstein und H. Rottenberg (1976).
"The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells."
European Journal of Biochemistry **63** (2): 533-541.
- Pena, A., J. Ramirez, G. Rosas und M. Calahorra (1995).
"Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation."
Journal of Bacteriology **177** (4): 1017-1022.
- Perkins, H. R. und C. S. Cummins (1964).
"Chemical Structure of Bacterial Cell Walls. Ornithine and 2,4-Diaminobutyric Acid as Components of the Cell Walls of Plant Pathogenic *Corynebacteria*."
Nature **201**: 1105-1107.
- Peters, P., E. A. Galinski und H. G. Trüper (1990).
"The biosynthesis of ectoine."
FEMS Microbiology Letters **71**: 157-162.

- Peters, P., E. Tel-Or und H. G. Trüper (1992).
"Transport of glycine betaine in the extremely haloalkaliphilic sulphur bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*."
Journal of Genetic Microbiology **138**: 1993-1998.
- Polarek, J. W., G. Williams und W. Epstein (1992).
"The products of the *kdpDE* operon are required for expression of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*."
Journal of Bacteriology **174**: 2145-2151.
- Poolman, B. und E. Glaesker (1998).
"Regulation of compatible solute accumulation in bacteria."
Molecular Microbiology **29** (2): 397-407.
- Poolman, B., K. J. Hellingwerf und W. N. Konings (1987).
"Regulation of the glutamate-glutamine transport system by intracellular pH in *Streptococcus lactis*."
Journal of Bacteriology **169** (5): 2272-6.
- Post, J. F. (1977).
"The microbial ecology of the Great Salt Lake."
Microbial Ecology **3**: 143-165.
- Pugsley, A. P. und M. Schwartz (1985).
"Export and secretion of proteins by bacteria."
FEMS Microbiology Reviews **32**: 3-38.
- Reed, R. H., S. R. C. Warr, D. L. Richardson, D. J. Moore und W. D. P. Stewart (1985).
"Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium."
FEMS Microbiology Letters **28**: 225-229.
- Rengpipat, S., S. E. Lowe und J. G. Zeikus (1988).
"Effect of Extreme Salt concentrations on Physiology and biochemistry of *Halobacteroides acetoethylicus*."
Journal of Bacteriology **170**: 3065-3071.
- Repaske, R. C. W. (1956).
"Lysis of gram negative bacteria by lysozyme."
Biochimica et Biophysica Acta **22**: 189-191.
- Riondet, C., R. Cachon, Y. Wache, G. Alcaraz und C. Divies (1997).
"Measurement of the intracellular pH in *Escherichia coli* with the internally conjugated fluorescent probe 5- (and 6-)carboxyfluorescein succinimidyl ester."
Biotechnology Techniques **11** (10): 735-738.
- Robertson, D., D. Noll, M. F. Roberts, J. Menaia und R. D. Boone (1990).
"Detection of the osmoregulator betaine in methanogens."
Applied and Environmental Microbiology **56**: 563-565.
- Rosenberg, A. H., B. N. Lade, D. S. Chui, S. W. Lin, J. J. Dunn und F. W. Studier (1987).
"Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase."
Gene **56** (1): 125-135.

- Sadler, M., M. McAninch, R. Alico und L. I. Hochstein (1980).
"The intracellular Na⁺ and K⁺ composition of the moderately halophilic bacterium, *Paracoccus halodenitrificans*."
Canadian Journal of Microbiology **26** (4): 496–502.
- Schuldiner, S. und E. Rozengurt (1982).
"Na⁺/H⁺ antiport in Swiss 3T3 cells: mitogenic stimulation leads to cytoplasmic alkalization."
Proceedings of the National Academy of Science USA **79** (24): 7778-7782.
- Schwarz, H. und A. L. Koch (1995).
"Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the Gram-negative cell wall."
Microbiology **181**: 3161-3170.
- Severin, J. (1993).
"Kompatible Solute und Wachstumskinetik bei halophilen aeroben heterotrophen Eubakterien."
Dissertation, Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität
- Severin, J., A. Wolfahrt und E. A. Galinski (1992).
"The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria."
Journal of Genetic Microbiology **138**: 1629-1638.
- Siegumfeldt, H., K. B. Rechinger und M. Jakobsen (1999).
"Use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacterial cells in mixed cultures."
Microbiology **145** (7): 1703-9.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985).
"Measurement of protein using bicinchoninic acid."
Analytical Biochemistry **150**: 76-85.
- Steil, L., T. Hoffmann, I. Budde, U. Volker und E. Bremer (2003).
"Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity."
Journal of Bacteriology **185** (21): 6358-70.
- Storey, R. und R. G. Wyn Jones (1977).
"Quarternary Ammonium Compounds in Plants in Relation to Salt Resistance."
Phytochemistry **16**: 447-453.
- Studier, F. W. (1991).
"Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system."
Journal of Molecular Biology **219** (1): 37-44.
- Studier, F. W. und B. A. Moffatt (1986).
"Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes."
Journal of Molecular Biology **189** (1): 113-30.

- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn und J. W. Dubendorff (1990).
"Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes."
Methods in Enzymology **185**: 60–89.
- Sugiura, A., K. Hirokawa, K. Nakashima und T. Mizuno (1994).
"Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*."
Molecular Microbiology **3**: 1025-1038.
- Suzuki, K., J. Sasaki, M. Uramoto, T. Nakase und K. Komagata (1996).
"*Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for
"Corynebacterium mediolanum" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating
bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan."
International Journal of Systematic Bacteriology **46** (1): 88–93.
- Takeuchi, M., N. Weiss, P. Schumann und A. Yokota. (1996).
"*Leucobacter komagatae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic gram-positive,
nonsporulating rod with 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall."
International Journal of Systematic Bacteriology **46** (4): 967–971.
- Tokuda, H., T. Nakamura und T. Unemoto (1981).
"Potassium ion is required for the generation of pH-dependent membrane potential
and Δ pH by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*."
Biochemistry **20** (14): 4198–4203.
- Van Laere, A. (1989).
"Trehalose, reserve and/or stress metabolit ?"
FEMS Microbiology Reviews **63**: 201-210.
- Ventosa, A., J. J. Nieto und A. Oren (1998).
"Biology of moderately halophilic aerobic bacteria."
Microbiology and Molecular Biology Reviews **62** (2): 504-44.
- Vermeulen, V. (2003).
"Identifizierung und Charakterisierung von zwei osmoregulierten Solutetransportern
aus *Marinococcus halophilus* DSM 20408^T." IFMB.
Diplomarbeit, Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität: 87
- Vermeulen, V. und H. J. Kunte (2004).
"*Marinococcus halophilus* DSM 20408^T encodes two transporters for compatible
solutes belonging to the betaine-carnitine-choline transporter family: identification and
characterization of ectoine transporter EctM and glycine betaine transporter BetM."
Extremophiles: in Press.
- Vilhelmson, O., H. Hafsteinson und J. K. Kristjansson (1996).
"Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from fully cured
salted cod (bachalao)."
Journal of Applied Bacteriology **81**: 95-103.
- Vreeland, R. H., R. Anderson und R. G. Murray (1984).
"Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of
Halomonas elongata."
Journal of Bacteriology **160** (3): 879-83.

- Vreeland, R. H., C. D. Litchfield, E. L. Martin und E. Elliot (1980).
"Halomonas elongata, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria."
International Journal of Systematic Bacteriology **30** (2): 485-495.
- Walderhaug, M. O., J. W. Polarek, P. Voelkner, J. M. Daniel, J. E. Hesse, K. Altendorf und W. Epstein (1992).
"KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of two-component sensor-effector class of regulators."
Journal of Bacteriology **174**: 2152-2159.
- Wang, S. F. und M. Volini (1968).
"Studies on the active site of rhodanese."
Journal of Biological Chemistry **243** (20): 5465-70.
- Watanabe, M., T. Sofuni und T. Nohmi (1992).
"Involvement of Cys69 residue in the catalytic mechanism of N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase of *Salmonella typhimurium*."
Journal of Biological Chemistry **267** (12): 8429-36.
- Wegmann, K. (1971).
"Osmotic regulation of photosynthetic glycerol production in *Dunaliella*."
Biochimica et Biophysica Acta **234**: 317-323.
- Welsh, D. T. und R. A. Herbert (1993).
"Osmoadaptation of *Thiocapsa roseopersicina* OP-1 in batch and continuous culture: accumulation of K⁺ and sucrose in response to osmotic stress."
FEMS Microbiology Ecology **13**: 151-158.
- Welsh, D. T., R. H. Reed und R. A. Herbert (1991).
"The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCIB 9484: interaction of trehalose, K⁺ and, glutamate during osmoadaptation in continuous culture."
Journal of Genetic Microbiology **137**: 745-750.
- Whatmore, A. M., J. A. Chudek und R. H. Reed (1990).
"The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*."
Journal of General Microbiology **136** (Pt 12): 2527-2535.
- Whatmore, A. M. und R. H. Reed (1990).
"Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role of K⁺ in turgor regulation."
Journal of General Microbiology **136** (Pt 12): 2521-2526.
- Wiechelmann, K. J., R. D. Braun und J. F. Fitzpatrick (1988).
"Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation."
Analytical Biochemistry **175**: 231-237.
- Wiemken, A. (1990).
"Trehalose in yeast, Stress Protectant Rather Than Reserve Carbohydrate."
Antonie van Leeuwenhoek **58**: 209-217.

-
- Wohlfarth, A., J. Severin und E. A. Galinski (1990).
"The spectrum of compatible solutes
in heterotrophic halophilic eubacteria of the family Halomonadaceae."
Journal of General Microbiology **136**: 705-712.
- Wolfbeis, O. S. und E. Urbano (1982).
"Syntheses of fluorescent dyes. 14. Standards for fluorescence measurements in the
near neutral pH-range."
Journal of Heterocyclic Chemistry **19** (4): 841-43.
- Wood, J. M. (1999).
"Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors."
Microbiology and Molecular Biology Reviews **63** (1): 230-62.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing (1985).
"Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the
M13mp18 and pUC19 vectors."
Gene **33** (1): 103-19.

7. Anhang

7.1. Darstellung des Igor Moduls als kommentierter Programmcode

```
#pragma rtGlobals = 1

Menu "LS50-B"
    "Load .SP File", LoadSP()
    "Load .SP Files in Dir", LoadSPDir()
    "Create X-Timewave from Waves in TopWindow", CreateXTimeWave()
    "Auto Matrix",AutoMatrix()
    "Manual Matrix TimeEmission from TopWindow",CreateMatrixTimeEmission()
    "Manual Matrix ExcitationEmission from TopWindow",CreateMatrixExitationEmission()
    "Smooth Matrix",SmoothMatrixXY()

End

// LoadSP()
// Each time you run LoadSP, it prompts you for a text file, loads the data from the text
// file into wave0 and wave1 and then asks if you want to print the resulting graph.

Function LoadSP()
    String ywname, info, infoType="", infoExSlidWdth, infoEmSlidWdth, infoDate, infoTime, infoUser, oldNote;
    Variable start, delta, ende, const;
    make/O data0, infowav0
    make/O /T infotwav0
    LoadWave /Q /J /G /L={0,54,0,0,0} /N=data //reads out the data beginning in line 54
    ywname = "W_" + S_fileName; //assign wavename
    start = data0[0] //set xstart for scaling
    delta = data0[1]-data0[0] //set delta for scaling
    Duplicate /O data1, $ywname;
    LoadWave /Q /K=1 /J /L={0,9,1,0,0} /N=infowav S_path+S_fileName //reads out last x
    ende=infowav0[0]
    LoadWave /Q /K=1 /J /L={0,21,1,0,0} /N=infowav S_path+S_fileName //reads out experiment constant
    const=infowav0[0]
    if (const<start)
        info="Emissionspectrum"
        Note $ywname, info
        LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,21,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out constant as string
        Note $ywname, "Excitation at "+infotwav0[0]+" nm"
        infoType=info+" "+infotwav0[0]
    else
        info="Excitationspectrum"
        Note $ywname, info
        LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,21,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out constant as string
        Note $ywname, "Emission at "+infotwav0[0]+" nm"
        infoType=info+" "+infotwav0[0]
    endif
    LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,22,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out excitation slit width
    info="Excitation Slit Width = "
    Note $ywname, info+infotwav0[0]+" nm"
    infoExSlidWdth=infotwav0[0]
    LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,23,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out emmision slit width
    info = "Emission Slit Width = "
    Note $ywname, info+infotwav0[0]+" nm"
    infoEmSlidWdth=infotwav0[0]
    LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,3,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out Date Info
    info = "Date = "
    Note $ywname, info+infotwav0[0]
    infoDate=infotwav0[0]
    LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,4,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out Time Info
    info = "Time = "
    Note $ywname, info+infotwav0[0]
    infoTime=infotwav0[0]
    LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,8,2,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out User Info
```

```

info="User Info = "
Note $ywname, info+infotwav0[0]
infoUser=infotwav0[0]
// LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,43,1,0,0} /A=ScaleX S_path+S_fileName //reads out unit of xwave
// LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,44,1,0,0} /A=ScaleY S_path+S_fileName //reads out unit of ywave
SetScale/P x start,delta,"nm", $ywname //set scale x
SetScale d 0,0,"AU", $ywname //set scale y
// Display $ywname as ywname //displays graph
// ShowInfo;
oldNote=note($ywname)
Note/k $ywname
Note $ywname,
infoType+";"+infoExSlidWdth+";"+infoEmSlidWdth+";"+infoDate+";"+infoTime+";"+infoUser+";"+oldNote
Note $ywname, "Original Data File : "+S_path+S_fileName
KillWaves data0, data1, infowav0, infotwav0; //ScaleX0, ScaleY0

End

// LoadSPDir()
// Each time you run LoadSPDir, it prompts you for the name of a symbolic path
// from which to load and graph data. In this experiment, we have created a symbolic
// path named 'data' which points to the "AutoGraph Data" folder.
// LoadSPDir loads and graphs the data from each of the files, one at a time.
// It then prints the graph if you have requested printing.
Function LoadSPDir()
String thePath="_New Path_"
Prompt thePath, "Name of path containing text files", popup PathList(";", ";", ";")+"_New Path_"
DoPrompt "Auto Graph 2", thePath
if (V_flag != 0)
return -1 // User cancelled.
endif

if (CmpStr(thePath, "_New Path_") == 0) // User selected new path ?
NewPath/O data // This brings up dialog and creates or overwrites path
if (V_flag != 0)
return -1 // User cancelled
endif
thePath = "data"
endif

String fileName
Variable fileIndex=0, gotFile
do
fileName = IndexedFile($thePath, fileIndex, ".SP") // Get name of next text file in path
gotFile = CmpStr(fileName, "")
if (gotFile)
String ywname, info, infoType="", infoExSlidWdth, infoEmSlidWdth, infoDate, infoTime, infoUser, oldNote;
Variable start, delta, ende, const;
make/O data0, infowav0
make /O/T infotwav0
LoadWave /Q /J /G /L={0,54,0,0,0} /N=data /P=$thePath fileName //reads out the data beginning in line 54
ywname = "W_"+S_fileName; //assign wavename
start = data0[0] //set xstart for scaling
delta = data0[1]-data0[0] //set delta for scaling
Duplicate /O data1, $ywname;
LoadWave /Q /K=1 /J /L={0,9,1,0,0} /N=infowav S_path+S_fileName //reads out last x
ende=infowav0[0]
LoadWave /Q /K=1 /J /L={0,21,1,0,0} /N=infowav S_path+S_fileName //reads out experiment constant
const=infowav0[0]
if (const<start)
info="Emissionspectrum"
Note $ywname, info
LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,21,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out constant as string
Note $ywname, "Excitation at "+infotwav0[0]+" nm"
infoType=infotwav0[0]
else
info="Excitationspectrum"
Note $ywname, info
LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,21,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out constant as string
Note $ywname, "Emission at "+infotwav0[0]+" nm"
infoType=infotwav0[0]
endif
LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,22,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out excitation slit width
info="Excitation Slit Width = "
Note $ywname, info+infotwav0[0]+" nm"

```

```

infoExSlidWdth=infotwav0[0]
LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,23,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out emmission slit width
info ="Emission Slit Width ="
Note $ywname, info+infotwav0[0]+" nm"
infoEmSlidWdth=infotwav0[0]
LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,3,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out Date Info
info ="Date ="
Note $ywname, info+infotwav0[0]
infoDate=infotwav0[0]
LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,4,1,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out Time Info
info ="Time ="
Note $ywname, info+infotwav0[0]
infoTime=infotwav0[0]
LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,8,2,0,0} /N=infotwav S_path+S_fileName //reads out User Info
info ="User Info ="
Note $ywname, info+infotwav0[0]
infoUser=infotwav0[0]
// LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,43,1,0,0} /A=ScaleX S_path+S_fileName //reads out unit of xwave
// LoadWave /Q /K=2 /J /L={0,44,1,0,0} /A=ScaleY S_path+S_fileName //reads out unit of ywave
SetScale/P x start,delta,"nm", $ywname //set scale x
SetScale d 0,0,"AU", $ywname //set scale y
// Display $ywname as ywname //displays graph
// ShowInfo;
oldNote=note($ywname)
Note/k $ywname
Note $ywname,
infoType+";"+infoExSlidWdth+";"+infoEmSlidWdth+";"+infoDate+";"+infoTime+";"+infoUser+";"+oldNote
Note $ywname, "Original Data File : "+S_path+S_fileName
KillWaves data0, data1, infowav0, infotwav0; //ScaleX0, ScaleY0
endif
fileIndex += 1
while (gotFile) // Until IndexedFile runs out of files
End

Function CreateXTimeWave()
String WList, theWave, Info, TimePointStr, DatePointStr
Variable Index=0, Year, Month, Day, DateVar, TimePointhVar, TimePointminVar, TimePointsecVar, TimePointdsecVar
Make/D/O/N=0 TimeX
WList = WaveList(";", "WIN:")
Do
theWave = StringFromList(index, WList)
if (strlen (theWave) == 0)
break
endif
Info=note($theWave)
DatePointStr = StringFromList (3, Info)
TimepointStr = StringFromList (4, Info)
sscanf DatePointStr, "%f/%f/%f", Year, Month, Day
sscanf TimePointStr, "%f.%f.%f.%f", TimePointhVar, TimePointminVar, TimePointsecVar, TimePointdsecVar
DateVar = date2secs(2000+Year, Month, Day) //derive number of seconds for date

insertpoints index,1,TimeX

TimeX[index]=DateVar+TimePointhVar*3600+TimePointminVar*60+TimePointsecVar+TimePointdsecVar/100
//insert new point
index+=1
While (1)
SetScale d 0,0,"dat", TimeX
End

Function AutoMatrix()
String WList, theWave1, theWave2, Info1, Info2, Ex1Str, Ex2Str
Variable Index=0, Ex1, Ex2
WList = WaveList(";", "WIN:")
theWave1 = StringFromList(index, WList)
theWave2 = StringFromList(index+1, WList)
if (strlen (theWave1) == 0)
return -1
endif
if (strlen (theWave2) == 0)
return -1
endif
Info1=note($theWave1)
Info2=note($theWave2)

```

```

Ex1Str = StringFromList (0, Info1)
Ex2Str = StringFromList (0, Info2)
sscanf Ex1Str,"%f",Ex1
sscanf Ex2Str,"%f",Ex2
if (Ex1!=Ex2)
    CreateMatrixExcitationEmission()
else
    CreateMatrixTimeEmission()
endif
End

Function CreateMatrixTimeEmission()
String WList, theWave, Info, Ystartstr, Yendstr, TimePointStr, DatePointStr
Variable Index=0, Ystart, Yend, Year, Month, Day, DateVar, TimePointhVar, TimePointminVar, TimePointsecVar,
TimePointdsecVar
WList = WaveList(";", ";", "WIN:")
Do
    theWave = StringFromList(index, WList)
    if (strlen (theWave) == 0)
        break
    endif
    if (index == 0)
        Duplicate /O $theWave, Matrix
        Info=note($theWave)
        DatePointStr = StringFromList (3, Info)
        TimepointStr = StringFromList (4, Info)
        sscanf DatePointStr, "%f/%f/%f", Year, Month, Day
        sscanf TimePointStr, "%f:%f:%f.%f", TimePointhVar, TimePointminVar, TimePointsecVar,
        TimePointdsecVar
        DateVar = date2secs(2000+Year, Month, Day) //derive number of seconds for date

Ystart=DateVar+TimePointhVar*3600+TimePointminVar*60+TimePointsecVar+TimePointdsecVar/100
//start point
    else
        Duplicate/O $theWave, Insert
        insertpoints/M=1 index+1,1,Matrix
        Matrix[][index] = Insert[p]
        killwaves insert
    endif
    index+=1
    theWave = StringFromList(index-1, WList)
    Info=note($theWave)
    DatePointStr = StringFromList (3, Info)
    TimepointStr = StringFromList (4, Info)
    sscanf DatePointStr, "%f/%f/%f", Year, Month, Day
    sscanf TimePointStr, "%f:%f:%f.%f", TimePointhVar, TimePointminVar, TimePointsecVar,
    TimePointdsecVar
    DateVar = date2secs(2000+Year, Month, Day) //derive number of seconds for date

Yend=DateVar+TimePointhVar*3600+TimePointminVar*60+TimePointsecVar+TimePointdsecVar/100
//start point
        setscale/I y, Ystart, Yend, "dat", Matrix
        SetScale d 0,0,"AU", Matrix

While (1)
Display /W=(3.75,38.75,567.75,406.25)
AppendImage Matrix
ModifyImage Matrix ctab= {*,*,Terrain,0}
ModifyGraph mirror=2
End

Function CreateMatrixExcitationEmission()
String WList, theWave, Info, Ystartstr, Yendstr
Variable Index=0, Ystart, Yend
WList = WaveList(";", ";", "WIN:")
Do
    theWave = StringFromList(index, WList)
    if (strlen (theWave) == 0)
        break
    endif
    if (index == 0)
        Duplicate /O $theWave, Matrix
        Info=note($theWave)
        Ystartstr=stringfromlist(0, info)

```

```

                sscanf Ystartstr,"%f",Ystart
            else
                Duplicate/O $theWave, Insert
                insertpoints/M=1 index+1,1,Matrix
                Matrix[][index] = Insert[p]
                killwaves insert
            endif
            index+=1
                theWave = StringFromList(index-1, WList)
                Info=note($theWave)
                Yendstr=stringfromlist(0, info)
                sscanf Yendstr,"%f",Yend
                setscale/l y,Ystart,Yend, "nm", Matrix
                SetScale d 0,0,"AU", Matrix
        While (1)
            Display /W=(3.75,38.75,567.75,406.25)
            AppendImage Matrix
            ModifyImage Matrix ctab= {*,*,Terrain,0}
            ModifyGraph mirror=2
        End

Function SmoothMatrixXY()
    String WList, theWave, tempName, counterStr
    variable X=0, y=0, index, nRows, nCol, counter=0, smoothtypeX=1, smoothtypeY=1

    WList = WaveList(";", ":", "WIN:")
        theWave = StringFromList(0, WList)
        if (strlen (theWave) == 0)
            return -1
        endif
            nRows=DimSize ($theWave,1) //get number of rows
            nCol=DimSize ($theWave,0) //get number of Col
            duplicate/O $theWave tempMatrix

    Prompt x, "Smooth Horizontally"
    Prompt smoothtypeX, "Smooth Type", popup, "Binominal;Mooving Average"
    Prompt y, "Smooth Vertically"
    Prompt smoothtypeY, "Smooth Type", popup, "Binominal;Mooving Average"
    DoPrompt "Smooth Parameters",x, smoothtypeX, y, smoothtypeY
    if (x>0)
        counter=-1
        // Make Waves from Matrix, Horizontal = Rows
        do
            counter+=1
            make/O/N=(nCol) temp
            temp=tempMatrix[p][counter]
            if (smoothtypeX==1)
                smooth x,temp
            else
                smooth /B=1 x, temp
            endif
            tempMatrix[][counter] = temp[p]
        while (counter<nRows)
        duplicate/O tempMatrix $theWave
    endif

    if (y>0)
        counter=-1
        // Make Waves from Matrix, Vertical = Col
        do
            counter+=1
            make/O/N=(nRows) temp
            temp=tempMatrix[counter][p] //transfer row from Matrix to column in temp
            if (smoothtypeY==1)
                smooth y,temp
            else
                smooth /B=1 y, temp
            endif
            tempMatrix[counter][] = temp[q] //transfer column from temp to row in Matrix (temp[q])
        while (counter<nCol)
        duplicate/O tempMatrix $theWave
    endif
    Killwaves temp, tempMatrix
end

```

Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. A. Galinski danke ich für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Prof. Dr. H.-J. Galla danke ich für Übernahme des Koreferats.

Bei den Mitgliedern meines Arbeitskreises möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Diskussionsbereitschaft bedanken. Mein besonderer Dank gilt Sandra Grunewald und Marlene Stein für die Hilfe bei HPLC-Messungen sowie Dr. Peter Voss für die Bereitstellung der N γ -Acetyl-2,4-diaminobuttersäure.

Dr. Matthias Kurz und Dr. Daniel Burdziak danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Arbeitskreisen des Instituts für Biochemie in Münster sowie des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie in Bonn für die stete Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Annika Wedeking, die mich stets in allen Lebenslagen, besonders aber in den schwierigen, unterstützt hat.