

Peter Voß

**Synthese von kompatiblen Soluten mit ectoinanaloger
Struktur und Charakterisierung des protektiven Effektes auf
biochemische Modellsysteme und *Escherichia coli***

Münster 2002

Biochemie

**Synthese von kompatiblen Soluten mit ectoinanaloger
Struktur und Charakterisierung des protektiven Effektes auf
biochemische Modellsysteme und *Escherichia coli***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Peter Voß

aus Greven

Münster 2002

Dekan: Prof. Dr. V. Leute

Erster Gutachter: Prof. Dr. E. A. Galinski

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Galla

Tag der mündlichen Prüfung: 03., 05. und 09.07.2002

Tag der Promotion: 09.07.2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Extremophile - Von der ökologischen Nische ins Supermarktregal	1
1.2. Anpassung an extreme Lebensräume	2
1.3. Kompatible Solute: Vom Naturstoff zur chemischen Synthese	4
1.4. Anwendungsgebiete kompatibler Solute	7
1.4.1. Kompatible Solute zur Stabilisierung ganzer Zellen	7
1.4.2. Kompatible Solute zur Stabilisierung von Proteinen	8
1.4.3. Einfluss kompatibler Solute auf die Stabilität von Ribonucleinsäuren	9
1.4.4. Industrielle Anwendungen kompatibler Solute	10
1.5. Theorien zum Wirkmechanismus kompatibler Solute	11
1.5.1. Die „Preferential Interaction Theorie“ (ARAKAWA & TIMASHEFF, 1983)	11
1.5.2. Die „Water Replacement Hypothesis“ (Clegg et al., 1982)	17
1.5.3. Unterschiedliche Dichtefractionen in wässrigen Lösungen (WIGGINS, 1990)	18
1.5.4. Der „osmophile Effekt“ (BOLEN & BASKAKOV, 2001)	19
1.6. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1. allgemeine biochemische und analytische Methoden	23
2.1.1. Chemikalien	23
2.1.2. Mikroorganismen	24
2.1.3. Nährmedien	24
2.1.3.1. Komplexmedium AB	24
2.1.3.2. Minimalmedium MM63 (LARSEN et al., 1987)	25
2.1.3.3. Vitaminlösung VA (IMHOFF & TRÜPER, 1977)	25
2.1.4. Kulturverfahren	26
2.1.4.1. Stammhaltung	26
2.1.4.2. Flüssigkulturen	26
2.1.4.3. Verfolgung des Zellwachstums	27
2.1.4.4. Zellernte	28

2.1.5. allgemeine Analytik	28
2.1.5.1. Extraktion kompatibler Solute	28
2.1.5.2. isokratische Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC)	29
2.1.5.3. Gradienten-Hochleistungsflüssigchromatografie (FMOC-HPLC)	30
2.1.5.4. NMR-Spektroskopie	32
2.1.5.5. CHN-Analyse	32
2.2. Synthese von Soluten mit ectoinanaloger Struktur	33
2.2.1. Synthese von zyklischen Soluten mit zwitterionischer Struktur	33
2.2.2. Synthese von N-Acetyl-diaminobuttersäure (NAc-DABA)	35
2.2.2.1. Synthese von α - und γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (α - und γ NAc-DABA) durch Acetylierung von L-2,4-Diaminobuttersäure (L-2,4-DABA)	35
2.2.2.2. Synthese von α - und γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (α - und γ NAc-DABA) durch alkalisch Hydrolyse von Ectoin	36
2.2.3. Synthese von 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin Hydrochlorid (Decarboxy-Ectoin, DCE)	37
2.3. Messung des protektiven Effektes der ectoinanalogen kompatiblen Soluten auf biochemische Modellsysteme und <i>Escherichia coli</i>	38
2.3.1. Aufnahme von Soluten durch <i>E. coli</i> DH5 α unter osmotischem Stress	38
2.3.1.1. Wachstum von <i>E. coli</i> DH5 α unter osmotischem Stress	39
2.3.1.2. Produktion von grün fluoreszierendem Protein (GFP) in <i>E. coli</i> DH5 α unter osmotischem Stress	39
2.3.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Stabilität von RNase A	40
2.3.3. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Transferenergie ΔG_{tr} von Proteinen	41
2.3.3.1. Maximale Löslichkeit von Diketopiperazin (DKP) in Abhängigkeit von der Solutkonzentration	42
2.3.3.2. Maximale Löslichkeit der 20 biogenen Aminosäuren in Wasser und 2 M Solutlösung	43
2.3.4. Schutzwirkung von kompatiblen Soluten gegen Radikalschädigungen	43
2.3.5. Einfluss von kompatiblen Soluten und Salzen auf die PCR-Reaktion	45
2.3.5.1. Amplifikation der DNA	45
2.3.5.2. Einfluss von kompatiblen Soluten und Salzen auf die Stabilität von DNA	47

3. Ergebnisse	48
3.1. Synthese von Soluten mit ectoinanaloger Struktur	48
3.1.1. Synthese von zyklischen Soluten mit zwitterionischer Struktur	49
3.1.1.1. Synthese von 4,5-Dihydro-2-methyl-imidazol-4-carbonsäure (DHMICA)	51
3.1.1.2. Synthese von 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure (Ectoin)	52
3.1.1.3. Synthese von 4,5,6,8-Tetrahydro-2-methyl-1H-[1,3]-diazepin- 4-carbonsäure (Homoectoin)	53
3.1.1.4. Synthese von 3,4,5,6,7,8-Hexahydro-2-methyl-1,3-diazocin- 4-carbonsäure (HHMDCA)	55
3.1.2. Charakterisierung von S,S-β-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl- pyrimidin-4-carbonsäure (Hydroxyectoin)	56
3.1.3. Synthese von α- und γN-Acetyl-diaminobuttersäure (α- und γNac-DABA)	57
3.1.3.1. Acetylierung von L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA)	57
3.1.3.2. Alkalische Hydrolyse von Ectoin zu γNac-DABA	58
3.1.3.3. Charakterisierung von αNac-DABA	59
3.1.4. Synthese von 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin Hydrochlorid (Decarboxy-Ectoin, DCE)	60
3.2. Charakterisierung des protektiven Effektes der ectoinanalogen kompatiblen Soluten auf biochemische Modellsysteme und <i>Escherichia coli</i>	61
3.2.1. Verhalten von <i>E. coli</i> DH5α unter Salzstress	61
3.2.1.1. Wachstum von <i>E. coli</i> DH5α unter Salzstress	62
3.2.1.2. Solutaufnahme von <i>E. coli</i> DH5α unter Salzstress	65
3.2.1.3. Produktion des grün fluoreszierenden Reporterproteins GFP durch <i>E. coli</i> DH5α pBRGFP _{UV} -ectUp unter Salzstress	68
3.2.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf den Schmelzpunkt T _m von RNase A	70
3.2.3. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Transferenergie ΔG _{tr} von Proteinen	73
3.2.3.1. Einfluss von kompatiblen Soluten auf ΔG _{tr} des Proteinrückgrates	74
3.2.3.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf ΔG _{tr} der Aminosäureseitenketten	76
3.2.4. Kompatible Solute als Schutzstoffe gegen Hydroxylradikale (HO•)	80
3.2.4.1. Kompatible Solute als Schutzstoffe gegen eine radikalische Hydroxylierung von Salicylat	80
3.2.4.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf den H ₂ O ₂ -Zerfall	82

3.2.5. Einfluss von kompatiblen Soluten und Salzen auf die DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	86
3.2.5.1. Einfluss von kompatiblen Soluten auf den Schmelzpunkt T_m von dsDNA	87
3.2.5.2. Einfluss von Salzen auf den Schmelzpunkt T_m von dsDNA	88
3.2.5.3. Einfluss von Kombinationen aus Salzen und kompatiblen Soluten auf den Schmelzpunkt T_m von dsDNA	90
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	92
4. Diskussion und Ausblick	95
4.1. Herstellung von kompatiblen Soluten	95
4.2. Weitere interessante Strukturen	97
4.3. Wechselwirkungen von kompatiblen Soluten mit Biomolekülen	98
4.3.1. Wechselwirkungen von kompatiblen Soluten mit Proteinen	100
4.3.1.1. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Proteinstabilität gemessen am Schmelzpunkt T_m des Modellenzym RNase A	100
4.3.1.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Transferenergie ΔG_{tr} von Proteinen	104
4.3.2. Kompatible Solute als Schutzstoffe gegen Hydroxylradikale	109
4.3.3. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Stabilität von DNA	112
4.4. Kompatible Solute zur Stabilisierung ganzer Zellen	115
4.5. Anwendungsgebiete kompatibler Solute	117
5. Zusammenfassung	119
6. Literaturverzeichnis	121

Abkürzungsverzeichnis

Hier eine Auflistung der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen und Symbole. Bei physikalischen Messgrößen ist in Klammern die verwendete Einheit angegeben.

% (v/v)	prozentualer Volumenanteil
% (w/v)	prozentualer Massenanteil pro Volumeneinheit
AB-Medium	Antibiotic Medium No. 3, Fa. Oxoid, Wesel
ADAM	1-Aminoadamantan Hydrochlorid
AFM	Einzelmolekül-Kraftspektroskopie (engl.: Atomic-Force-Microscopy)
aqua dest.	destilliertes Wasser
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
aqua demin.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BIA	Biomolekulare Interaktions-Analyse
c	Konzentration [mol/l] oder [mmol/l]
CD	Cirkulardichroismus
L-2,4-DABA / DABA	L-2,4-Diaminobuttersäure Hydrochlorid
DAP	1,3-Diaminopropan
DCE	1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin Hydrochlorid (Decarboxy-Ectoin)
ΔG	freie Enthalpie; nach IUPAC und zu Ehren von J.W. Gibbs auch Gibbs-Energie genannt Da der Begriff „energie“ im englischen sowohl die Energie, als auch die Enthalpie bezeichnet, wird ΔG im folgenden als Energie bezeichnet.
ΔG_d	freie Denaturierungsenergie [$J \times mol^{-1} \times K^{-1}$]
ΔG_{bd}	freie Bindungsenergie [$J \times mol^{-1} \times K^{-1}$]
ΔG_h	freie Hydratationsenergie [$J \times mol^{-1} \times K^{-1}$]
ΔG_{tr}	freie Transferenergie [$J \times mol^{-1} \times K^{-1}$]
DHBA	Dihydroxybenzoesäure (engl.: Dihydroxybenzoec Acid)
DHMICA	4,5-Dihydro-2-methyl-imidazol-4-carbonsäure (engl.: 4,5-Dihydro-2-methyl-imidazole-4-carboxylic Acid)
DKP	Diketopiperazin

DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic Acid)
cDNA	komplementäre DNA
dsDNA	doppelsträngige DNA (engl.: double strang DNA)
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: single strang DNA)
DSC	Differentialkalorimetrie (engl. Differential-Scanning-Calorimetrie)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
<i>ectUp</i>	Genfragment vor den Ectoingenen aus <i>Marinococcus halophilus</i>
eq.	Vielfache (engl.: equivalent)
FE/mM	Flächeneinheiten des Detektorpeaks pro mmol/l Solut
FMOC	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
g	bei Massenangaben: Gramm bei Zentrifugen: Vielfaches der Erdbeschleunigung
<i>gfp</i>	Genfragment, welches das grün fluoreszierende Protein kodiert
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HHMCCA	3,4,5,6,7,8-Hexahydro-2-methyl-1,3-diazocin-4-carbonsäure (engl.: 3,4,5,6,7,8-Hexahydro-2-methyl-1,3-diazocine-4-carboxylic Acid)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (engl.: High Perfomance Liquid Chromatography)
IUPAC	Internationale Union für Reine und Angewandte Chemie (engl.: International Union of Pure and Applied Chemistry)
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Mhz	Megahertz, Einheit der Frequenz
μ	im thermodynamischen Zusammenhang: chemisches Potential, im Zusammenhang mit Bakterienwachstum: Wachstumsrate [h ⁻¹]
M	molar, Kurzform für mol/l
mM	millimolar, Kurzform für mmol/l
μM	mikromolar, Kurzform für μmol/l
MM63	Minimal-Medium Nr. 63 (nach LARSEN et al., 1987)
mW	Milliwatt, Einheit des Wärmeflusses

NAc-DABA	N-Acetyl-diaminobuttersäure (α NAc-DABA und/oder γ NAc-DABA)	
α NAc-DABA	α N-Acetyl-diaminobuttersäure (engl.: α N-acetyl-Diaminobutyric Acid)	
γ NAc-DABA	γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (engl.: γ N-acetyl-Diaminobutyric Acid)	
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduzierte Form	
n. d.	nicht bestimmt (engl.: not determined)	
NMR	Kernresonanzspektroskopie Nuclear Magnetic Resonance)	(engl.:
OD	optische Dichte	
p. A.	Reinheitsgrad von Chemikalien (engl.: pro analysis)	
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)	
PFK	Phosphofruktokinase	
ppm	Einheit der chemischen Verschiebung (engl.: parts per million)	
R	allgemeine Gaskonstante; $8,314 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$	
RI	Brechungsindex (engl.: Refractive Index)	
RNA	Ribonucleinsäure (engl.: Ribonucleic Acid)	
RNase A	Ribonuclease A, bovine pancreatic	
rpm	Umdrehungen pro Minute (eng.: rounds per minit)	
RT	Retentionszeit (engl.: Retention Time)	
SPR	Oberflächen Plasmaresonanz (engl.: Surface Plasmon Resonance)	
TBM	Trockenbiomasse [g oder mg]	
T	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] oder [K]	
t_D	Verdopplungszeit [h]	
T_m	Schmelzpunkt [$^{\circ}\text{C}$] von Proteinen oder DNA	
TMAO	Trimethylamin-N-oxid	
TMS	Tetramethylsilan	
TMSP	3-(Trimethylsilyl)-propionsäure- d_4 -Natriumsalz	
UV	ultraviolett	

1. Einleitung

1.1. Extremophile - Von der ökologischen Nische ins Supermarktregal

Extremophile Organismen besiedeln Lebensräume mit einem oder mehreren für die Mehrheit der existierenden Lebewesen extremen Umweltfaktoren. Sie sind also Nischenbewohner, die aufgrund ihrer speziellen Anpassung dort überleben können, wo „normale“ Lebewesen nicht existieren können. Zu diesen Nischen gehören extrem heisse sowie enorm kalte Lebensräume, wie z. B. Geysiere (Thermophile) oder das ewige Eis des Nord- oder Südpoles (Psychrophile), extreme pH-Werte z. B. in Industrieabwässern (Acido-, bzw. Alkaliphile) sowie extrem hohe Salzkonzentrationen z. B. in Salzseen sowie auf gepökelten, also zur Konservierung in Salz eingelegten, Lebensmitteln wie Schinken, Wurst oder Fisch (Halophile).

Man unterscheidet dabei jeweils danach, ob die Organismen die extremen Umweltbedingungen nur tolerieren können oder diese zwingend benötigen wie z.B. der extrem thermophile *Pyrococcus furiosus*, der bei einer Temperatur von 100°C seine grösste Wachstumsgeschwindigkeit zeigt, während er unter 45°C gar nicht mehr wächst. Natürlich gibt es auch Mischformen zwischen den einzelnen Gruppen z. B. der halo-alkaliphile *Halomonas*-Stamm 25B1 (DUCKWORTH et al., 2000) der gleichzeitig sowohl hohe Salzkonzentrationen als auch einem hohen pH-Wert benötigt um optimal zu wachsen.

Die Extremophilen haben im Laufe der Evolution Schutzmechanismen entwickelt, die sie befähigen die sonst unwirtlichen Räume zu besiedeln. Gerade diese Schutzmechanismen sind für die Forschung und Industrie von grösstem Interesse, so dass in den letzten Jahren viel Aufwand getrieben wurde, um die Probleme beim Umgang mit Extremophilen zu lösen. So wurden z. B. Fermentationsanlagen auf Kunststoff-Basis entwickelt, da der hohe Salzgehalt bei der Anzucht von Halophilen in herkömmlichen Fermentern aus Edelstahl zu starker Korrosion geführt hatte. Andererseits können bei der Anzucht der Extremophilen die Sterilisationsmassnahmen minimiert werden, da diese für andere Lebewesen widrigen Parameter, nur selten zu Kontaminationen führen.

Die Extremophilen und die daraus gewonnenen Strukturen sind ihren Nischen entwachsen und beschränken sich auch nicht mehr auf ihren Einsatz in Forschungslaboren. Sie sind in den letzten Jahren verstärkt in das Interesse der Industrie gerückt und gelangen so immer weiter in

unsere Konsumwelt. Ectoin, ein Schutzstoff viele halophiler Bakterien, kommt z. B. in kommerziell erhältlichen Hautcremes (Hydro-CellLife, Fa. Marbert, Düsseldorf; Seba Med Micro 100, Fa. Sebapharm GmbH & Co. KG, Bad Salzig) zum Einsatz. In naher Zukunft werden, aufgrund ihrer höheren Resistenz gegen die in der Waschmaschine herrschenden Bedingungen, vermutlich Enzyme aus thermophilen und/oder alkaliphilen Organismen in Waschmitteln zu finden sein.

1.2. Anpassung an extreme Lebensräume

Die Anpassungsstrategien der Extremophilen sind ebenso verschieden, wie ihre Lebensräume. Sie betreffen alle Zellbestandteile wie: Membranen, Proteine, Cytosol und Nucleinsäuren. Die Membranen der Thermophilen sind durch ihre Zusammensetzung so modifiziert, dass sie wesentlich starrer sind, während die Psychrophilen sehr flexible Membranen besitzen, die auch bei tiefen Temperaturen noch flüssigkristallin sind (VREELAND et al., 1984; ADAMS et al., 1989; ADAMS & RUSSELL, 1992). Thermophile Organismen schützen ihre DNA und zelluläre Proteine zusätzlich durch die Synthese spezieller Proteine, sogenannte Chaperone, die sich an die DNA und Proteine anlagern und diese vor der thermischen Denaturierung schützen. Auch die Aminosäurezusammensetzung der extremophilen Proteine ist sehr unterschiedlich. Während thermophile Organismen wenig Glycin in die Proteine einbauen, um dadurch die Proteine starrer und unanfälliger für eine temperaturbedingte Auffaltung zu machen, lagern halophile Organismen besonders viele negativ geladene Aminosäuren an der Oberfläche ihrer Enzyme ein, um so eine erhöhte Na^+ und/oder K^+ -Konzentration im Cytosol kompensieren zu können. Die Unterschiede in den Strukturen von thermophilen, halophilen und mesophilen (normalen) Enzymen fassen die folgenden Autoren sehr umfassend zusammen: HOUGH & DANSON, 1999; MADIGAN & OREN, 1999; JAENICKE, 2000; MADERN et al., 2000.

Die halophilen Mikroorganismen gehören hauptsächlich den Reichen der *Archaea* und *Bacteria* an (TRÜPPER & GALINSKI, 1986; SEVERIN, 1993; GALINSKI & TRÜPPER, 1994) aber auch im Reich der *Eukarya* gibt es salzliebende Wesen, wie die Grünalge *Dunaliella salina* (BEN-AMOTZ & AVRON, 1973; AVRON, 1986), sowie xerophile Hefen und Fadenpilze.

Die Anpassung an die geringe Bioverfügbarkeit von Wasser in den salinen Biotopen (Osmoadaptation, REED, 1984) kann dabei nach zwei unterschiedlichen Strategien erfolgen. Extrem halophile Organismen, zu denen hauptsächlich die *Archaea* wie zum Beispiel *Halobacterium salinarum* (GOCHNAUER et al., 1975) und die anaeroben halophilen *Bacteria* wie *Haloanaerobium praevalens* (OREN, 1986) zählen, akkumulieren grössere Mengen an Salzen wie KCl im Cytosol. Sie gleichen den osmotischen Gradienten über die Zellmembran nach dem sogenannten „Salt-in“-Verfahren aus und verhindern somit ein Austrocknen der Zellen durch Wasseraustritt entlang des osmotischen Gradienten (OREN, 1986; GALINSKI, 1995). Diese Organismen sind in der Lage selbst in gesättigten Salzlösungen noch zu wachsen. Die erhöhte Ionenstärke im Zellinneren bedingt aber eine weitreichende Anpassung des Enzymapparates, die dazu führt, dass diese Organismen auf eine hohe Salinität (> 10 % (w/v) NaCl) im Medium angewiesen sind und bei einem plötzlichen Abfall der Salinität im Medium lysieren.

Organismen, welche die „Organic-Osmolyte-Strategie“ zur Anpassung an die hohe Salzkonzentration nutzen, akkumulieren kleine organische Moleküle im Cytosol, die ähnlich wie das KCl der „Salt-in-Strategie“ den osmotischen Druck auf die Zellmembran mindert (GALINSKI, 1995; LENGLER et al., 1999). Im Gegensatz zu KCl beeinträchtigen die organischen Solute nicht die Stoffwechselaktivitäten der Zellen und werden deshalb auch „kompatible Solute“ (BRAUN, 1976) genannt. Kommt es nun zu einer Senkung der Ionenstärke im Medium, so können diese Organismen flexibel reagieren und die akkumulierten Solute über spezielle Schleusen, die sogenannten „mechanosensitiven Kanäle“, schnell ausschleusen. Dadurch wird ein Platzen der Zellen durch verstärkten Wassereinstrom verhindert (SUKHAREV et al., 1997; BLOUNT & MOE, 1999; BIGGIN & SANSOM, 2001). Die Stoffwechselaktivität bleibt dabei voll erhalten, da die Enzyme nicht an den Osmostress angepasst wurden, und so bleiben die Zellen bei niedrigen Salinitäten überlebensfähig. Der Review von OREN (2002) gibt einen guten Überblick über die energetischen Aspekte und Grenzen der unterschiedlichen Anpassungsmechanismen halophiler Organismen.

Der in Minimalmedium nicht salztolerante Organismus *E. coli* akkumuliert unter Salzstress (1 - 4 % (w/v) NaCl) hauptsächlich Trehalose als Osmolyt. Die Biosynthese von kompatiblen Soluten wie Glycinebetain (Betain) oder 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure (Ectoin) ist aber energetisch gesehen wesentlich effektiver als die Synthese von Disacchariden wie Trehalose oder Saccharose

(OREN, 1999; MASKOW & BABEL, 2001a,b), so dass Betain und Ectoin, sowie das in hydroxylierte Derivat des Ectoins sich im Laufe der Evolution als Hauptsolute in halophilen Bakterien durchgesetzt haben. *E. coli* ist in der Lage Betain, Ectoin und Hydroxyectoin aus dem Medium aufzunehmen und so eine bedingte Salztoleranz zu erwerben.

Neben den natürlich halophilen und halotoleranten Organismen wird zur Zeit stark daran geforscht, mesophile Organismen gentechnisch so zu verändern, dass sie eine Salztoleranz erwerben. Pflanzen werden z. B. gentechnisch so manipuliert, dass sie organische Solute synthetisieren und somit bei geringer Wasseraktivität, d. h. auf trockenen oder salzhaltigen Böden, wachsen können (NAKAYAMA et al., 2000; RONTEIN et al., 2002).

1.3. Kompatible Solute: Vom Naturstoff zur chemischen Synthese

Die Struktur der Solute für die Osmoadaptation ist völlig unterschiedlich, aber eine kleine Anzahl von Molekülen taucht sowohl im Reich der *Archaea*, der *Bacteria* und der *Eucarya* immer wieder auf. Zu diesen Schutzmolekülen gehören: Polyole, Zucker, Methylamine, Aminosäuren, einige Aminosäurederivate und in manchen Fällen sogar Harnstoff in Kombination mit Methylaminen (RANDALL et al., 1998). Alle haben gemeinsam, dass sie klein, gut wasserlöslich und bei physiologischem pH neutral sind, keine grossen polaren Bereiche besitzen, und in molaren Mengen im Zellinneren angehäuft werden können, ohne den Zellstoffwechsel negativ zu beeinträchtigen. Einen sehr umfassenden Überblick über die verschiedenen Solute und ihre jeweiligen Vorzüge geben die beiden Reviews von GALINSKI (1995) und da COSTA et al. (1998). Die kompatiblen Solute können von den Organismen entweder aus dem Medium aufgenommen oder neu synthetisiert werden, wobei die Aufnahme energetisch betrachtet günstiger ist (OREN, 1999).

Kompatible Solute wie Ectoin und Hydroxyectoin lassen sich unter Hochsalzbedingungen sehr gut in Bakterien wie *Halomonas elongata* oder *Maricoccus halophilus* anreichern und anschließend aus der Trockenbiomasse isolieren. Ein sehr komfortables Verfahren stellt dabei das „Bacterial Milking“ zur Produktion von Ectoin dar, bei dem die Salinität des Mediums gesenkt wird, nachdem die Zellen bei hoher Salinität grosse Mengen an kompatiblen Soluten produziert haben. Dieses führt dazu, dass die Bakterien die Solute ins Medium ausschleusen, aus welchem man sie dann chromatografisch aufreinigen kann. Die Zellen selber bleiben dabei intakt und können mehrfach „abgemolken“ werden (SAUER & GALINSKI, 1998). Der

Vorteil dieser Methode gegenüber einer rein chemischen Synthese ist, dass die Biosynthese stereoselektiv abläuft. Ein Nachteil der Methode ist, dass sie auf Substanzen beschränkt ist, die in den Bakterien selber als Endprodukte akkumuliert werden. Synthesestufen können nur über einen gentechnisch manipulierten Organismus gewonnen werden.

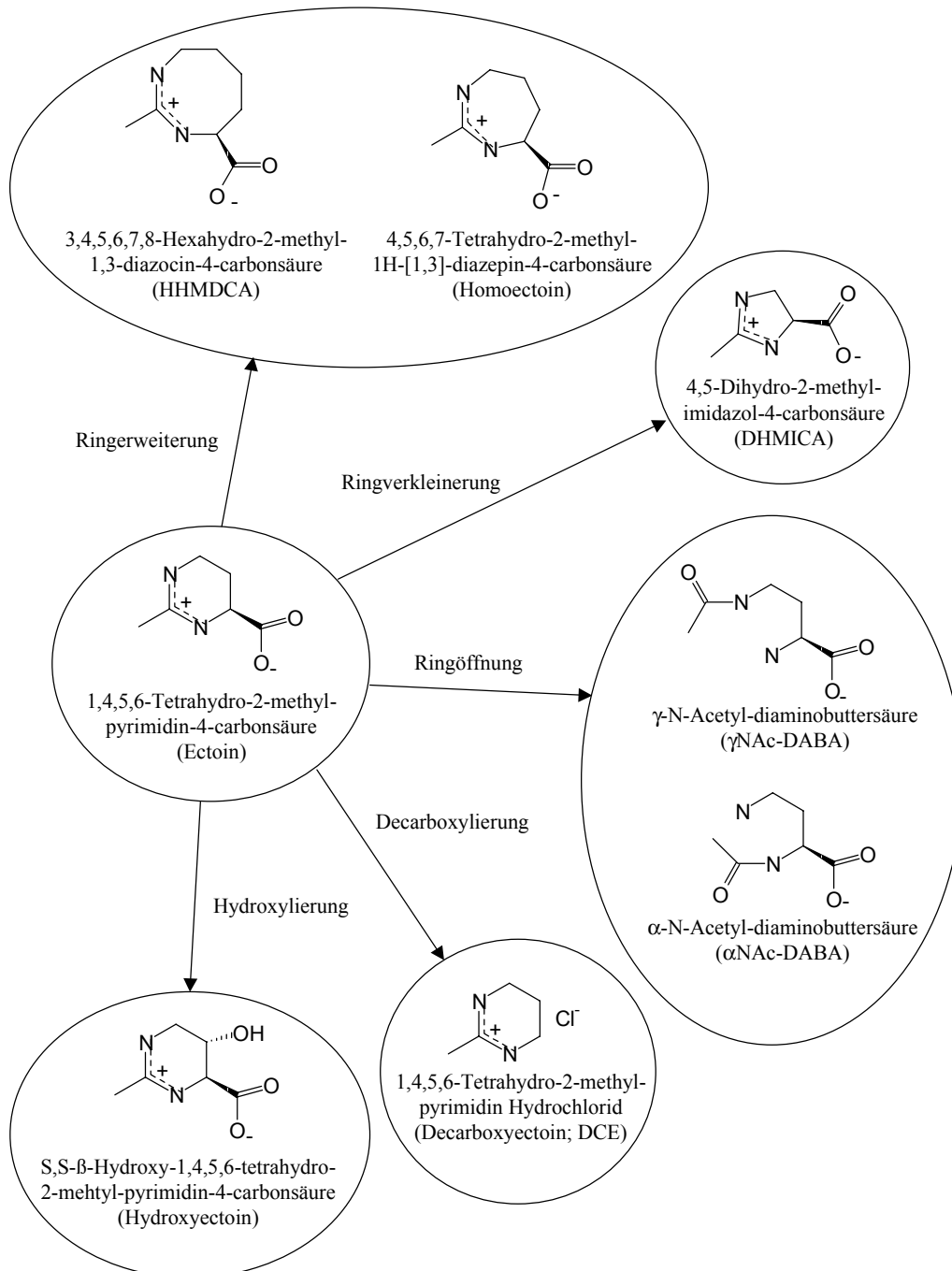


Abb. 1.3.: Übersicht über die vom Ectoin ausgehenden Strukturen. In Klammern sind die Trivialnamen und Abkürzungen angegeben, die im Folgenden für die Solute verwendet werden. Bis auf das optisch inaktive DCE sind die L-Diastereomere skizziert, da die natürlich vorkommenden Solute Ectoin und Hydroxyectoin nur in der L-Form vorkommen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten chemisch verwandte Strukturen, ausgehend von dem in *Ectothiorodospira halochloris* entdeckten Ectoin (GALINSKI, 1986) synthetisiert werden. Diese sollten anschließend auf ihre Eignung als kompatible Solute getestet werden, um neue Anwendungsgebiete für die natürlichen und chemisch synthetisierten Solute zu entdecken. Die Messung von Wechselwirkungen zwischen Wasser, Soluten und Biomolekülen sollte einen Einblick in die Wirkungsweise von kompatiblen Soluten geben. Da die Untersuchungen z.T. molare Mengen erforderten sollten die Solute im Gramm-Massstab hergestellt werden. Abbildung 1.3. zeigt eine Übersicht über die Strukturen, IUPAC-Namen und Trivialnamen der Solute die in dieser Arbeit synthetisiert und charakterisiert werden sollen.

Die neu synthetisierten Solute leiten sich durch Variation der Ringgröße, Hydroxylierung, Ringöffnung oder Decarboxylierung vom zentralen Molekül Ectoin ab. Für einige von den in Abbildung 1.3. gezeigten Soluten gibt es schon seit längerem bekannte Synthesevorschriften, die aber nicht unbedingt speziell für diese Solute erstellt wurden, sondern bei denen die Solute nur ein Produkt einer Reihe von Strukturvariationen ist. Gerade auf dem Gebiet der Tetrahydropyrimidine sind schon viele Synthesestrategien ausprobiert und publiziert worden. In den meisten Fällen waren die Ausbeuten aber sehr gering (oft unter 10 % (w/v)). Teilweise lag der Forschungsschwerpunkt dieser Veröffentlichungen auch nur auf dem Nachweis einer Reaktion und die Produkte wurden gar nicht in Reinform isoliert, sondern lediglich spektroskopisch oder chromatografisch nachgewiesen. Für folgende Strukturen gab es schon ältere Synthesevorschriften: offenkettige, acetylierte Diaminocarbonsäuren wie z. B. γ Nac-DABA (OKAWA & HASE, 1963; LECLERC & BENOITON, 1968; HIMDI-KABBAB et al., 1995), 2-Methyl-Tetrahydropyrimidin-Derivate wie z. B. Ectoin (KOICHI et al. 1991; HIMDI-KABBAB, 1995) oder kationische Strukturen der Tetrahydropyrimidin-Derivate wie z. B. DCE (WEIS, 1984; TAKESHI & MASATOSHI, 1990; GÖLLER, 1995).

1.4. Anwendungsgebiete kompatibler Solute

Alle bisher untersuchten Substanzen, die *in vivo* als Osmolyte fungieren, haben *in vitro* eine stabilisierende Wirkung auf eine Vielzahl unterschiedlicher Biomoleküle gezeigt. Die Fa. Bitop (Witten) hat daher auf der Basis der kompatiblen Solute eine Reihe von Zusätzen (BioStab_{SERIES}) zur Stabilisierung von verschiedenen Biomoleküle, wie Proteine, DNA, RNA und Antikörpern entwickelt. Die Hauptbestandteile sind darin Ectoin und Hydroxyectoin (Fa. BITOP, 2000).

Da die Wirkungsweise der kompatiblen Solute auf molekularer Ebene noch nicht vollständig aufgeklärt ist, werden verschiedene Mechanismen für die stabilisierende Wirkung der Osmolyte diskutiert. Vier der umfassendsten Theorien werden im Kapitel 1.5. noch einmal ausführlich dargestellt (CLEGG et al., 1982; ARAKAWA & TIMASHEFF, 1983; WIGGINS, 1990, BOLEN & BASKAKOV, 2001).

1.4.1. Kompatible Solute zur Stabilisierung ganzer Zellen

Die Überlebensrate von getrockneten Zellen lässt sich durch den Zusatz von kompatiblen Soluten wie Saccharose, Trehalose, Ectoin oder Hydroxyectoin deutlich verbessern. Getrocknete Kulturen lassen sich so besser lagern, bei Bedarf wieder rehydrieren und für analytische Zwecke oder als Starterkulturen verwenden (LOUIS et al., 1994; SCHMITZ, 1994; KARLA, 1997; VOß, 1998). Die Zellen werden dabei hauptsächlich durch den Schutz der Membranen vor Schädigungen beim Übergang vom flüssigkristallinen in den festen Zustand stabilisiert (CROWE et al., 1984; CROWE et al., 1992; HOEKSTRA et al., 1997). Ferner können die Solute aber auch die native Form der Proteine erhalten, oxidative Schädigungen unterbinden oder die DNA vor einem enzymatischen Abbau durch Restriktionsendonucleasen schützen und so zum Überleben der intakten Zellen beitragen (MALIN et al., 1999).

1.4.2. Kompatible Solute zur Stabilisierung von Proteinen

Enzyme sind im Laboralltag verschiedensten Stressfaktoren ausgesetzt. Kompatible Solute können bestimmte Enzyme gegen unterschiedliche stressbedingte Schäden schützen. Das häufige Auftauen und Einfrieren führt bei Enzymen häufig zu einer Schädigung und somit zu einer stark verminderten Enzymaktivität. Anhand des Modellenzymes Lactat Dehydrogenase (LDH) konnten LIPPERT & GALINSKI (1992), GÖLLER (1995) und GÖLLER & GALINSKI (1999) zeigen, dass Betain und die Ectoine Enzyme vor einer Schädigung bewahren können. LIPPERT & GALINSKI (1992) und KNAPP et al. (1999) zeigen anhand verschiedener Modellenzyme wie Ribonuclease A (RNase A), Phosphofruktokinase (PFK) und LDH, dass die Enzyme in Gegenwart von kompatiblen Soluten erst bei höherer Temperatur denaturieren. KAUFMANN et al. (1999) fanden für Ectoin eine thermostabilisierende Wirkung auf Antikörper und Antikörperkonjugate.

JAENICKE (2000) und VOLKIN et al. (1995) geben einen Überblick über mögliche Reaktionen an den Aminosäureseitenketten, die zu einer Proteindenaturierung führen. Eine Oxidation findet dabei hauptsächlich an den schwefelhaltigen Seitenketten der Cysteine und Methionine statt. Anhand der metallkatalysierten oxidativen Schädigung von LDH durch CuSO_4 oder/und H_2O_2 in Gegenwart von Soluten haben ANDERSSON et al. (2000) festgestellt, dass die Solute der Oxidation vorbeugen. SMIRNOFF & CUMBES (1989) und KARLA (1997) fanden heraus, dass einige die kompatiblen Solute Radikalfängereigenschaften besitzen und somit biologische Biomaterialien gegen die radikalische Oxydierung durch Hydroxylradikale (HO^*) schützen können. Proteine können durch die kompatiblen Solute ferner vor einem proteolytischem Abbau geschützt werden (Fa. BITOP, 2000).

Die Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* führt in vielen Fällen zu einer Fehlfaltung und zur Bildung sogenannter „Inclusionbodies“. Diese reduzieren die Ausbeute an nativem Protein erheblich, beziehungsweise machen eine aufwendige Renaturierung der fehlgefalteten Proteine nötig, die wiederum zu Verlusten führt. BARTH et al. (2000) konnten zeigen, dass die Produktion eines Immuntoxines unter Osmostress und in Gegenwart kompatibler Solute zu einer wesentlich höheren Ausbeute an nativ gefaltetem Enzym führt.

Die Eigenschaften, ein Protein gegen die Vielzahl von Stresseinwirkungen zu schützen, machen die kompatiblen Solute zu einer idealen Gruppe von Schutzstoffen für die Lagerung und Handhabung von Enzymen im Laboralltag. Dabei reagieren aber nicht alle Proteine und

alle Solute gleich, sondern die Auswahl des richtigen Sutes gegen den speziellen Stress ist die grosse Kunst der Enzymstabilisierung.

1.4.3. Einfluss kompatible Solute auf die Stabilität von Ribonucleinsäuren

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden dar. Mit ihr können DNA-Fragmente selektiv verfielfältigt werden, um sie anschließend gentechnisch zu manipulieren oder per Sequenzanalyse zu entschlüsseln. Die PCR wird unter anderem zur Einordnung neuer Organismen in den phylogenetischen Stammbaum, zur Vaterschaftsanalyse und in der Gerichtsmedizin zur Überführung von Tätern genutzt. Für die PCR-Reaktion muss die doppelsträngige DNA (dsDNA) zunächst in die komplementären Einzelstränge aufgespalten werden. Der erste Schritt, die Denaturierung, erfolgt meistens durch Temperaturerhöhung. Anschließend lagern sich im zweiten Schritt die Primer an die Einzelstränge an (Primer Annealing), die als Transkriptionsstartpunkte für die Polymerase dienen. Im dritten Schritt vervollständigt die Polymerase den Doppelstrang (Elongation). Diese drei Schritte, die jeweils ein anderes Temperaturoptimum haben werden zyklisch wiederholt bis die gewünschte Menge an Produkt-DNA vorliegt.

Gerade in der Gerichtsmedizin, wo man häufig nur eine sehr kleine DNA-Menge als Vorlage für die PCR hat, ist es wichtig, dass die beiden Stränge im ersten Schritt vollständig getrennt werden, da es sonst zu einer Transkription von Bruchstücken der DNA kommt und man kein einheitliches Produkt erhält, sondern ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten. Die Temperaturoptima für die drei Schritte sind abhängig von der Zusammensetzung der DNA, der Polymerase und dem verwendeten Puffer. GC-reiche DNA-Fragmente sind, aufgrund ihrer grösseren Anzahl an Wasserstoffbrücken, wesentlich stabiler als AT-reiche Sequenzen und bei der PCR sind deshalb höhere Temperaturen zur Denaturierung der dsDNA nötig.

Salze wie NaCl, MgCl₂ oder MgSO₄ erhöhen den Schmelzpunkt (T_m) der DNA und erschweren so ein Aufspalten der Doppelstränge in Einzelstränge. Andererseits sind sie aber als Cofaktoren für die Polymerase nötig. Kompatible Solute dagegen sind in der Lage die Abhängigkeit des Schmelzpunktes T_m vom GC-Gehalt aufzuheben und den T_m der DNA auf den Level einer reinen AT-DNA zu senken (REES et al., 1993; BASKARAN et al., 1996; HENKE et al. 1997; LAPIDOT et al., 1999). Ferner wird die Anbindung von chemischen

Polymerase-Inhibitoren wie Actinomycin D unterbunden (ALONI et al., 1993), so dass die Isolierung und Aufreinigung der DNA vereinfacht und die Lagerstabilität erhöht wird. Zusätzlich stabilisieren die kompatiblen Solute die Polymerase, so dass die Ausbeute der DNA-Amplifikation durch den Zusatz kompatibler Solute deutlich gesteigert werden kann. Durch den Zusatz von kompatiblen Soluten können somit sonst problematische DNA-Fragmente amplifiziert und analysiert werden (LAPIDOT et al., 1999).

Eine weitere Stabilisierung der sonst sehr labilen Substanzen DNA und RNA ist der Schutz vor enzymatischem Abbau. Durch den Zusatz von kompatiblen Soluten wird die Struktur der Nucleinsäuren so verändert, dass viele Restriktionsenzyme wie *EcoRI*, *AvaI* oder *DraI* nicht oder nur sehr schwer in der Lage sind die Nucleinsäuren abzubauen (ALONI et al., 1993; MALIN et al., 1999).

1.4.4. Industrielle Anwendung kompatibler Solute

Durch ihre vielfältigen protektiven Eigenschaften auf die unterschiedlichsten Biomoleküle (Kap. 1.4.1. - 1.4.3.) sind die kompatiblen Solute immer weiter in das Interesse der Konsumindustrie gerückt. Die Firma Merck (Darmstadt) vertreibt seit 2000 Ectoin unter dem Markennamen RonaCare™ Ectoin als Wirkstoff für die Kosmetikindustrie. Die Firma Marbert (Düsseldorf) und die Firma Sebapharm GmbH & Co. KG (Bad Salzig) haben seitdem Cremes mit dem Namen „Hydro-Cellive-Cream“ bzw. „Seba Med MIKRO 100“ am Markt (Die Zeit, 2001).

In Testreihen konnte gezeigt werden, dass u. a. der epidermale Wasserverlust beim Menschen und der negative Einfluss von Detergenzien auf die Cytoplasmamembran von Erythrocyten sowie die schädliche Wirkung von UV-Strahlen auf Langerhans Zellen durch den Einsatz von Ectoin drastisch reduziert werden konnte (BÜNGER, 1998; BÜNGER, 1999; BEYER et al., 2000). Ectoin schützt dabei nicht vor den Schäden der Sonneneinstrahlung wie Hautrötung oder Hautkrebs und ersetzt auch nicht den UV-Sonnenschutz, sondern es unterstützt die zelleigenen Schutz- und Reparaturmechanismen (BÜNGER, 2000; VIEBIG, 2000).

Eine Kooperation von Bitop (Witten) und Aventis Pasteur (Leimen) befasst sich mit dem Zusatz von Ectoin und Hydroxyectoin zu Impfstoffen. Ferner wird an der Vorbereitung einer klinischen Studie zur Reduktion toxischer Nebenwirkungen bei der Immuntoxintherapie von Lymphdrüsenkrebs durch Hydroxyectoin gearbeitet (Die ZEIT, 2000; Fa. BITOP, 2001).

Durch die Summe all der vorgenannten stabilisierenden Effekte konnte Ectoin als Schutzstoff von extremophilen Organismen gegen Osmostress aus der ökologischen Nische in die Supermarktregale unserer Konsumwelt gelangen. Verschiedene weitere kompatible Solute werden in den nächsten Jahren sicherlich noch folgen.

1.5. Theorien zum Wirkmechanismus kompatibler Solute

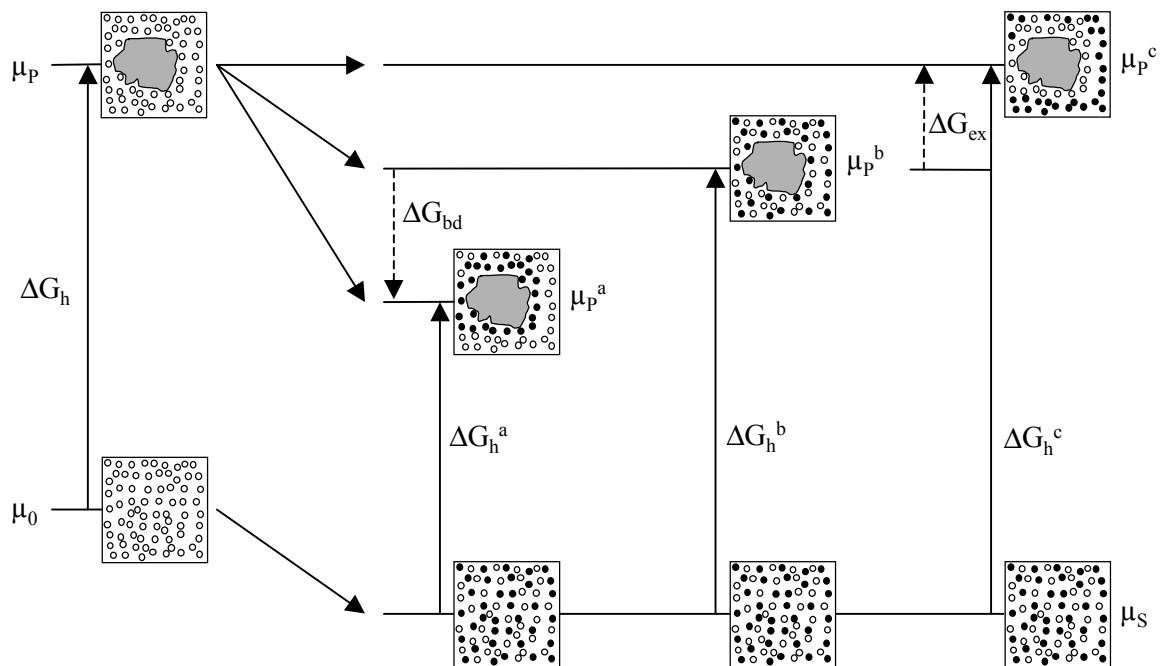
Über die Art und Weise, wie die verschiedenen Solute zu der Stabilität eines Biomoleküls beitragen und wie sie Zellen helfen können, sich an extreme Umweltbedingungen anzupassen, ist in der Vergangenheit viel geforscht und spekuliert worden. Hier werden zunächst vier Theorien vorgestellt, wie Solute und Salze mit Wasser und Biomolekülen wechselwirken.

1.5.1. Die „Preferential Interaction Theorie“ (ARAKAWA & TIMASHEFF, 1983)

Aufbauend auf die Entdeckung von GECKO & TIMASHEFF (1981), dass Glycerin nicht nur die Oberflächenspannung von Wasser senkt, sondern bevorzugt von Proteinoberflächen ausgeschlossen wird und somit zu einer bevorzugten Hydratisierung der Proteine führt, formulierten ARAKAWA & TIMASHEFF 1983 die „Preferential Interaction Theorie“, nachdem sie diesen Ausschluss von der Proteinoberfläche auch für Betain beobachtet hatten. Die Theorie liefert eine weitreichendere Erklärung für die auftretenden Phänomene beim Zusammentreffen von Salzen, Soluten, Wasser und Biomolekülen und wird in dem Review von TIMASHEFF (1998) noch einmal sehr ausführlich dargestellt. Empirisch beobachtete Phänomene wie die Proteinstabilität, die Proteinlöslichkeit (Ein- und Aussalzen), die Selbstorganisation von Untereinheiten zu einem funktionellen System sowie der Einfluss von Substanzen auf die biochemischen Reaktionen der Enzyme lassen sich mit dieser Theorie erklären.

Die „Preferential Interaction Theorie“ geht davon aus, dass alle Oberflächeneinheiten des Proteins sich statistisch gleich verhalten. Einzelne Wechselwirkungen der Oberfläche mit dem Wasser oder den Soluten werden hier nicht erfasst, sondern es wird immer die gesamte Oberfläche betrachtet.

Das Lösungsmittel ist im Falle von Proteinen Wasser bzw. Puffer und das Cosolvens sind die darin gelösten kompatiblen Solute. Wenn ein Protein in Wasser gelöst wird, bildet es eine Hydrathülle, wodurch das chemische Potential der Proteinlösung von μ_0 auf μ_P ansteigt. Dabei entsteht die freie Hydratationsenergie ΔG_h . In Abbildung 1.5.1a. ist das Energieschema zu sehen, welches sich durch das Lösen eines Proteines in Wasser ergibt. Ferner ist der unterschiedliche Einfluss von Soluten zu sehen, der im folgenden näher erläutert wird.



Wasser

Das Solut reagiert in einer wässrigen Lösung an der Proteinoberfläche:
 a) bevorzugt gebunden, b) inert, c) bevorzugt ausgeschlossen.

Abb. 1.5.1a.: Thermodynamisches Energieschema einer Proteinoberfläche in Wasser und einer Solutlösung. Offene Kreise stellen Wassermoleküle, geschlossene Kreise Solutmoleküle dar, μ_0 das chemische Potential von reinem Wasser, μ_S von Solutlösung, μ_P von Proteinlösung, ΔG_h die freie Hydratationsenergie, ΔG_{bd} die freie Bindungsenergie und ΔG_{ex} die freie Energie durch Ausschluss (engl. Exclusion) der Solute von der Proteinoberfläche. ^{a, b} und ^c stellen die Indices der drei unterschiedlichen Fälle dar.

Löst man ein Solut und ein Protein in Wasser, so wird das chemische Potential aufgrund der geringeren Wasseraktivität in der Lösung von μ_0 auf μ_S gesenkt. Dieser rein osmotische Effekt ist für alle Solute und Salze gleich, wobei bei den Salzen die Anzahl der Ionen zu berücksichtigen ist, da osmotische Effekte von der Teilchenzahl abhängig sind. Wasser und Solut konkurrieren um die Oberfläche des Proteins. Hierbei kann es dazu kommen, dass sich das Protein bevorzugt mit einer Molekülsorte umgibt woraus sich auch der Name der Theorie:

„Preferential Interaction Theorie“ ergibt. Die folgende Gleichung zeigt das Gleichgewicht, dessen Konstante K dafür verantwortlich ist, ob ein Solut sich inert verhält, oder bevorzugt angelagert bzw. ausgeschlossen wird.



Dabei kann es zu drei verschiedenen Fällen kommen:

Fall A: „preferential binding“

Binden die Solutmoleküle bevorzugt an der Proteinoberfläche („Preferential Binding“), so steigt μ_S auf μ_P^a . Dadurch wird die freie Hydratationsenergie ΔG_h eines inertierten Solutes um die freie Bindungsenergie ΔG_{bd} gesenkt, da diese negativ ist. Die daraus resultierende ΔG_h^a spiegelt sich in einem geringeren Hydratisierungsgrad des Proteins wieder, da ja mehr Solutmoleküle und weniger Wassermoleküle an die Oberfläche binden. Dieser Sonderfall stellt die Verbindung zur „Water Replacement Hypothesis“ von CLEGG et al. (1982) (Kapitel 1.5.2.) dar. Gerade bei hohen Solutkonzentrationen kann der Zustand des totalen Ausschlusses der Solute von der Proteinoberfläche sicherlich nicht erreicht werden, so dass es zu direkten Wechselwirkungen der Solute mit der Proteinoberfläche kommen muß. Solutmoleküle ersetzen in diesem Fall zumindest zum Teil die Wassermoleküle in der Hydrathülle des Proteins.

Fall B: inertes Solut

Löst man ein Protein und ein inneres Solut in Wasser, so kommt es zu einer Gleichverteilung des Solutes in der Lösung. Die Konzentrationen des Solutes an der Proteinoberfläche und in der freien Lösung sind identisch. Daher steigt das chemische Potential von μ_S auf μ_P^b . Die freie Hydratationsenergie ΔG_h^b ist dabei gleich ΔG_h .

FALL C: „preferential exclusion“

Solute, die bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden führen zu einer „Preferential Hydration“ des Proteines, bzw. einer „Preferential Exclusion“ der Solute. μ_S steigt auf μ_P^c , welches im Grenzfall, dass das Protein nur von Wassermolekülen umgeben ist, gleich μ_P ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Grenzfall in der Natur erreicht wird ist aber sehr gering. Wie man vielleicht vermuten kann, befindet sich das Protein, da es ja nur

Wassermoleküle um sich herum hat, im gleichen Zustand, wie in reinem Wasser. Thermodynamisch gesehen unterscheiden sich die beiden Zustände aber, da sich die Umgebung geändert hat und ein Konzentrationsgefälle des Solute von der freien Lösung zum Protein hin aufgebaut wurde. Die freie Hydratationsenergie ΔG_h^c ist dabei die Summe aus ΔG_h und ΔG_{ex} , der für den Ausschluss der Solutmoleküle notwendigen Energie. Fast alle bekannten kompatiblen Solute werden bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen.

Betrachtet man nun eine Reaktion eines Proteins in einer Solutlösung so bestimmt die Differenz,

$$\Delta\Delta G = \Delta G_h^{a, b \text{ oder } c} - \Delta G_h$$

wie die Reaktion durch das Solut beeinflusst wird. Inerte Solute nehmen bis auf den allgemeinen osmotischen Effekt keinen Einfluss auf die Reaktion, während bindende Solute die Reaktion fördern, dadurch dass die Differenz negativ wird und somit Energie frei wird. Von der Oberfläche ausgeschlossene Solute dagegen inhibieren die Reaktion, da zusätzliche Energie in das System eingebracht werden muss. Somit wird z. B. die Auffaltung eines Proteines durch Solute, die bevorzugt ausgeschlossen werden, erschwert, so dass diese Substanzen als Proteinstabilisatoren dienen. Da die molaren Wechselwirkungen von Wasser und Soluten mit Proteinen oft in der gleichen Größenordnung liegen, müssen die kompatiblen Solute zur Stabilisierung von Proteinen in hohen Konzentrationen (1 - 5 M) angewendet werden.

Bei der Proteinstabilisierung kommt es aber nicht nur darauf an, dass der native Zustand der Proteine stabilisiert wird, sondern ein Protein kann auch stabilisiert werden, wenn man den denaturierten Zustand in der Solutlösung stärker destabilisiert als den nativen (Abb.: 1.5.1b.).

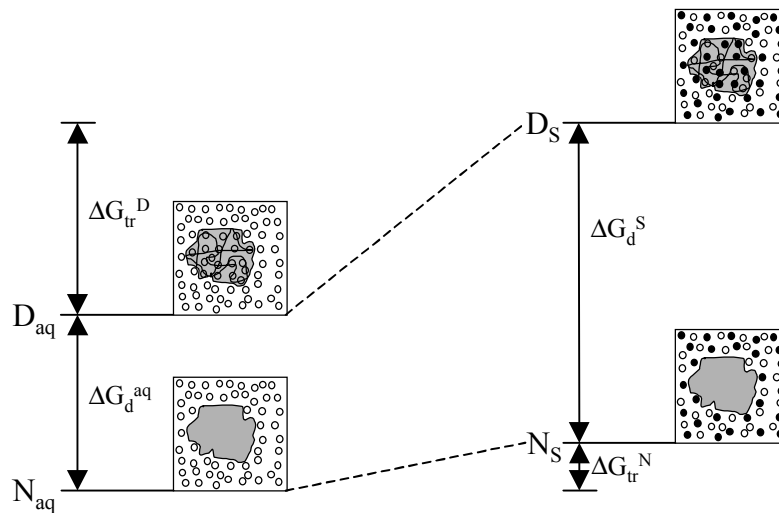


Abb. 1.5.1b.: Energieschema bei der Denaturierung eines Enzymes in wässriger und soluthaltiger Lösung (aq oder S). N und D bezeichnen den nativen bzw. den denaturierten Zustand, ΔG_d ist die zur Denaturierung nötige Energie, ΔG_{tr} die Energie die beim Transfer des Proteins vom wässrigen in ein soluthaltiges Milieu benötigt wird.

Die Gründe warum fast alle bekannten kompatiblen Solute von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden sind vielfältig. Einige davon sind unabhängig von der Oberfläche selber. Eine sterische Behinderungen, welche insbesondere bei grösseren Solutmolekülen (z. B. grösseren Polymeren) eine Rolle spielt (ARAKAWA & TIMASHEFF, 1985), sowie die Arbeit, die verrichtet werden muß um entgegen der zwischen der Oberfläche des Proteins und dem Solvens befindlichen Oberflächenspannung ein Loch für ein Molekül Solut oder Wasser zu machen (GIBBS, 1878; BRÖNSTED, 1931), kann zum Ausschuss eines Solutes führen.

Zucker, Salze und Aminosäuren steigern die Oberflächenspannung der Lösung (LANDT, 1931; LEE & TIMASHEFF, 1981; KITA et al., 1994) und führen so zum bevorzugten Ausschluss von der Proteinoberfläche, da das Protein versucht die Oberflächenspannung zu minimieren, indem es sich zusammenzieht und somit seine Oberfläche verkleinert.

TMAO senkt die Oberflächenspannung (KITA et al., 1994) und sollte somit zu einer bevorzugten Bindung führen (Fall A), wird aber wegen zusätzlichen abstossenden Wechselwirkungen trotzdem nicht bevorzugt an die Oberfläche gebunden (FALL C).

Es gibt aber auch abstossende oder anziehende Effekte, die von der Beschaffenheit der Oberfläche abhängen. Glycerin z. B. verstärkt die Wasserstoffbrücken im Wasser und erhöht so die Hydrophobizität (McDUFFIE et al., 1962). Glycerin bindet also bevorzugt an hydrophobe Bereiche von Proteinoberflächen, während es von hydrophilen Bereichen

ausgeschlossen wird. Die anziehenden und abstossenden Effekte sind additiv, so dass die Zusammensetzung der Proteinoberfläche darüber entscheidet, ob Glycerin stabilisierend oder destabilisierend wirkt.

Besteht eine Lösung aus mehreren verschiedenen Soluten, so verhalten sich die Effekte der Einzelsubstanzen additiv. Dieses ist besonders bei Salzen wichtig, da Salze in Lösung in die entsprechenden Anionen und Kationen dissoziieren und diese wiederum jedes für sich wechselwirken können. So kann der destabilisierende, weil bindende Effekt eines Kations, durch den Ausschluss des Anions aus der Hydrathülle z. B. SO_4^{2-} überkompensiert werden, so dass die Verbindung insgesamt stabilisiert auf das Protein wirkt. Ein weiteres Beispiel für die Additivität der Effekte von mehreren Soluten ist die Kompensation des proteindenaturierenden Einflusses von Harnstoff durch TMAO. Im Laufe der Evolution hat sich diese Kombination zum Beispiel in Haien und Rochen durchgesetzt (WANG & BOLEN, 1997; TIMASHEFF, 1998).

Die „Preferential Exclusion Theorie“ versagt bei Reaktionen, die auf einen kleinen Oberflächenteil des Proteins beschränkt sind, wie z. B. die Bindung eines Liganden. Hier kann es vorkommen, dass die spezifischen Wechselwirkungen an einem kleinen Oberflächenanteil die Bindung des Substrates determinieren (z. B. über eine Konformationsänderung), obwohl der Ligand vom Rest der Proteinoberfläche eher ausgeschlossen würde.

Dadurch dass sich alle Wechselwirkungen aller im System enthaltenen Solute mit den verschiedenen Proteinoberflächenstrukturen (hydrophil, hydrophob, neutral, geladen, aromatisch) additiv verhalten, ist es nahezu unmöglich theoretisch vorherzusagen, ob ein Solut in einem System aus Wasser, Protein und einem oder mehreren Soluten stabilisierend oder denaturierend wirkt. Es können natürlich zusätzlich noch Wechselwirkungen des Solutes mit sich selber oder bei einer Mischungen zwischen den verschiedenen Soluten kommen, die hier aber nicht weiter betrachtet werden können. So können zwar aus thermodynamischen Messungen eines Solutes Analogieschlüsse für ein zweites, ähnliches Solut getroffen werden, durch die Vielzahl der Einflüsse kann es aber immer zu signifikanten Abweichungen kommen.

1.5.2. Die „Water Replacement Hypothesis“ (CLEGG et al., 1982)

Die Beobachtung, dass viele Organismen in der Lage sind einen Grossteil ihres zellulären Wassers abzugeben und nach einer Rehydrierung wieder vollständig aktiv sind, führte CLEGG et al. (1982) zu ihrer „Water Replacement Hypothesis“. Durch die systematische Analyse von trockenungstoleranten Organismen fanden sie heraus, dass zelluläre Strukturen beim Trocknen dadurch geschützt werden können, dass kompatible Solute in den Zellen angesammelt oder an die Zellen angelagert werden können, dort mit den Oberflächen wechselwirken und somit die entzogenen Wassermoleküle in den Hydrathüllen der Zellbestandteile ersetzen. Gerade Polyole wie Glycerin und Inositol sowie Zucker wie Trehalose und Saccharose sind über ihre vielen Hydroxylgruppen in der Lage mit den Biomolekülen Wechselwirkungen einzugehen, die den Interaktionen des Hydratwassers ähneln und so eine intakte Hydrathülle imitieren.

Diese Theorie scheint somit genau im Gegensatz zur „Preferential Interaction Theorie“ von ARAKAWA und TIMASHEFF (1983) zu stehen, die davon ausgeht, dass die kompatiblen Solute hauptsächlich von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden. Man muß aber beachten, daß CLEGG et al. (1982) ihre Untersuchungen immer an getrockneten Zellmaterialien gemacht haben. Bei der Trocknung steigt natürlich die Konzentration aller Zellbestandteile und somit auch der Solute an, so dass davon auszugehen ist, dass alle Beobachtungen bei hohen Solutkonzentrationen (im molaren Bereich) gemacht wurden. Die „Water Replacement Hypothesis“ gilt also nur für den Extremfall der sehr geringen Wasseraktivität. Die „Preferential Interaction Theorie“ hingegen gilt für den gesamten Konzentrationsbereich, wobei im molaren Konzentrationsbereich die direkten Wechselwirkungen sicherlich nicht ausgeschlossen werden können (Fall A in Abb. 1.5.1a.).

1.5.3. Unterschiedliche Dichtefraktionen in wässrigen Lösungen (WIGGINS, 1990)

WIGGINS (1990) untersuchte die Struktur von Wasser und die Effekte von Makromolekülen und Soluten auf das dreidimensionale Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen, welches sich durch das gesamte Volumen einer Lösung bildet. Substanzen haben in Lösung das Bestreben sich möglichst gleichmässig zu verteilen. Wenn diese Gleichverteilung nicht erreicht werden kann, weil zum Beispiel die Anionen sich in der näheren Umgebung eines Polykations anordnen, ändert das Lösungsmittel bei konstanter Temperatur und konstantem Druck sein partielles Molvolumen und es entstehen innerhalb der Lösung Bereiche mit unterschiedlich dichtem Wasser. Wenn das Wasser eine geringe Dichte hat, sind die Wasserstoffbrückenbindungen sehr stark und weitreichend und die Ordnung der Moleküle ist sehr gross, während bei einer hohen Wasserdichte die Bindungen kurz und schwächer sind und die dreidimensionale Ordnung geringer ist.

Für Ionen ist es einfacher von dichten Wasser, in welchem die Wasserstoffbrücken schwächer sind hydriert zu werden, als von weniger dichtem Wasser, in welchem die Wasserstoffbrücken länger und somit stärker sind. Wenn eine Kraft, wie zum Beispiel die elektrostatische Anziehung von Gegenionen eine Gleichverteilung in der Lösung verhindert, kann das Lösungsmittel bei konstanter Temperatur und konstantem Druck dieses thermodynamische Ungleichgewicht nur durch Änderung seines partiellen Molvolumens und somit seiner Dichte ändern.

Je mehr Wasser ein Molekül zur vollständigen Hydrierung braucht, desto mehr wird es dichtes Wasser bevorzugen. Das heisst, wenn ein Solut viel Wasser in seiner Hydrathülle bindet, ist das übrige Wasser weniger dicht. Die hydrophoben Bereiche im Inneren eines Proteines können von dichtem Wasser aber besser hydriert werden, da die Wasserstoffbrücken in diesem Fall schwächer sind. Weniger dichtes Wasser bedeutet also, dass der hydrophobe Effekt der dafür sorgt, dass die unpolaren Aminosäuren sich im Proteininnern zusammenlagern, verstärkt und das Protein somit indirekt stabilisiert wird.

Der Effekt ist einmalig für Wasser, da Wasser das einzige Lösungsmittel ist, welches ein dreidimensionales Netzwerk durch das gesamte Volumen bildet. Er blieb lange unentdeckt, da es sehr schwer ist die unterschiedlichen Fraktionen von Wasser (dicht und weniger dicht) zu detektieren. Nur durch die Definition der beiden Wasserfraktionen ist es möglich die in einem wässrigen Gel auftretenden Phänomene zu erklären. Einerseits bestehen Agarosegele zum Beispiel zu über 99,9 % (w/v) aus Wasser. Dieses ist im flüssigen Zustand und die

Mehrheit der Wassermoleküle ist weit entfernt von der Gelmatrix. Andererseits läuft das Wasser aber nicht aus dem Gel heraus, sondern ist dort alleine durch das Bestreben sich mit der Gelmatrix möglichst gut zu mischen gebunden. Es ist aber auch nicht fest gebunden, da die Mobilität sehr hoch ist und das Wasser durch Hitze, Unter- oder Überdruck auch leicht wieder entfernt werden kann.

Mit normalen physikalischen Messmethoden erhält man immer nur den Mittelwert über den gesamten Wassergehalt da die beiden Wasserfraktionen zum Beispiel auch direkt nebeneinander an einer Polymer- oder Proteinoberfläche auftreten können, wenn dort hydrophile (weniger dichtes Wasser) und hydrophobe (dichtes Wasser) Bereiche existieren und ein Austausch der Wassermoleküle zwischen den verschiedenen Wasserpopulationen möglich ist.

1.5.4. Der „osmophobe Effekt“ (BOLEN & BASKAKOV, 2001)

KAUZMANN beschrieb schon 1959 die thermodynamischen Kräfte die für die Faltung eines Proteines und dessen Stabilität verantwortlich sind. Diese sind Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische, van der Waals und hydrophobe Wechselwirkungen. Neben diese bekannten Kräften entdeckten BOLEN und BASKAKOV (2001) eine zusätzliche Kraft, die hauptsächlich in hochkonzentrierten Lösungen bzw. in Lebewesen, die aufgrund ihres Lebensraumes auf eine hohe intrazelluläre Solutkonzentration angewiesen sind, zum Tragen kommt. Der sogenannte „solvophobe Effekt“ oder in dem Fall, dass es sich bei dem Lösungsmittel um die Lösung eines kompatiblen Solute handelt „osmophobe Effekt“, wirkt ähnlich wie der hydrophobe Effekt der Aminosäureseitenketten. Der hydrophobe Effekt bewirkt, dass sich in einem wässrigen Milieu die hydrophoben Seitenketten im Inneren der Proteine zusammenlagern, um so die Oberfläche zwischen sich und dem hydrophilen Medium Wasser zu minimieren. Der osmophobe Effekt wirkt entgegen dem hydrophoben Effekt nicht auf die Seitenketten, sondern auf das Proteinerückgrat. Das Rückgrat wird beim Lösen eines Proteines in einer Solutlösung bevorzugt von der Solutlösung abgestossen und die native Proteinkonformation wird so stabilisiert.

Diese Theorie geht völlig konform mit der „Preferential Interaction Theorie“ von ARAKAWA & TIMASHEFF, (1983) (s. Kap. 1.5.1.) worin die kompatiblen Solute zu Fall C gehören und somit von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden. ARAKAWA &

TIMASHEFF können bei ihren Untersuchungen aber nicht die einzelnen thermodynamischen Kräfte bestimmen und quantifizieren, sondern nur die Summe der Stabilisierung oder Destabilisierung.

Bolen und seine Mitarbeiter machten ihre Beobachtungen über die Berechnung der freien Gibbs-Energie beim Transfer einer Substanz von reinem Wasser in eine Solutlösung (freie Transferenergie, ΔG_{tr}). Ausgehend von der von ARAKAWA und TIMASHEFF (1983) entdeckten Tatsache, dass die Effekte der Solute auf die Proteinstabilität additiv sind, untersuchten sie die unterschiedliche Löslichkeit der Aminosäuren und die von Diketopiperazin (DKP) in Wasser und Lösungen von: Saccharose und Sarcosin (LIU & BOLEN, 1995), Trimehtylamin-N-oxid (TMAO) (WANG & BOLEN, 1997) sowie Prolin (QU et al., 1998). Das zyklische Dimer von Glycin DKP wurde dabei als Modellsubstanz für für jeweils zwei Rückgrateinheiten gewählt. Abbildung 1.5.4. zeigt die Struktur von DKP.

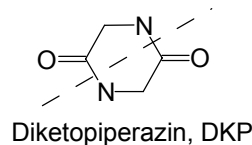


Abb. 1.5.4.: Struktur von Diketopiperazin als Modellsubstanz für zwei Einheiten des Proteinrückgrates. Die gestrichelte Linie zeigt an, wo die beiden Glycine kondensiert sind.

Aus der Löslichkeit der Aminosäuren und DKP in reinem Wasser und in Solutlösung lässt sich die molare freie Transferenergie beim Transfer von Wasser zu Solutlösung, ΔG_{tr} nach folgender Gleichung berechnen:

$$\Delta G_{tr} = R \times T \times \ln(c_w/c_{os}) \quad \text{mit:} \quad \begin{array}{l} R = \text{allgemeine Gaskonstante: } 8,314 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1} \\ T = 298 \text{ K} \\ c_w = \text{Konzentration in Wasser} \\ c_{os} = \text{Konzentration in Solutlösung} \end{array}$$

Die ΔG_{tr} der Aminosäureseitenketten erhält man, wenn man von ΔG_{tr} der kompletten Aminosäure den Wert von Glycin abzieht, da Glycin als Grundgerüst in allen anderen Aminosäuren enthalten ist. Um zu ermitteln ob ein Protein stabiler in wässriger Lösung oder in Solutlösung ist, muss man über alle Bestandteile des Proteins (Seitenketten und Rückgrateinheiten) summieren, wobei besonders diejenigen Aminosäuren betrachtet werden müssen, die im Inneren des Proteins liegen und bei der Denaturierung neu mit dem

Lösungsmittel in Kontakt treten. Diese sind aufgrund des hydrophoben Effektes zum grössten Teil die hydrophoben und aromatischen Aminosäuren.

Bolen und seine Mitarbeiter kommen für die Solute Sarcosin, Saccharose, Prolin und TMAO zu dem Ergebniss, dass DKP in der Solutlösung schlechter gelöst wurde als in reinem Wasser, während die Aminosäuren positive oder negative ΔG_{tr} -Werte hatten. Dabei fiel auf, dass die Aminosäuren wesentlich kleinere Beträge aufwiesen als DKP. Die Aufsummierung für RNase A als Modellenzym ergab somit einen grossen positiven Betrag für die Transferenergie von DKP, während die Summe für die Seitenketten einen deutlich kleineren negativen Betrag ergab. Harnstoff, der bekanntlich Proteine denaturiert, bewirkte als Cosolvens eine grössere Löslichkeit für DKP und destabilisiert somit das Proteinrückgrat. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die proteinstabilisierenden Solute hauptsächlich dadurch wirken, dass sie das Proteinrückgrat wesentlich schlechter lösen, als reines Wasser. TMAO hatte dabei eine besonders grosse stabilisierende Wirkung, so dass 1 M TMAO ausreicht um den destabilisierenden Effekt von 2 M Harnstoff zu kompensieren. Deshalb akkumulieren Haie und Rochen die beiden Solute in dem angegebenen Verhältnis gegen den Salzstress des Meerwassers.

Die Auswahl des am besten für den entsprechenden Lebensraum wirksame Solut scheint in der Natur anhand des osmophobischen Effektes zu erfolgen, wobei die Feinregulation der Proteinstabilisierung durch den oft gegenläufigen, aber vom Betrag her wesentlich geringeren Beitrag der Seitenketten gesichert ist. Prolin z. B. wird von von vielen Bakterien als Schutzstoff gegen Osmostress genutzt, hat *in vitro* aber nicht so ein grosses Potential Proteine vor der Denaturierung zu bewahren. TMAO und Methylamine kommen *in vivo* hauptsächlich gegen den denaturierenden Effekt von Harnstoff zum Einsatz, da sie diesen aufgrund ihrer Transferenergien besonders gut kompensieren können. In thermophilen Organismen schützen die Polyole wie Saccharose scheinbar besonders gut gegen eine Proteinauffaltung (YANCEY et al., 1982).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die chemische Synthese von kompatiblen Soluten im Gramm-Massstab und die deren Charakterisierung. Einfache chemische Synthesen, die zu möglichst billigen Produkten führen, sollten gefunden werden. Dabei sollten die synthetischen Solute Strukturelemente von Ectoin enthalten, um die funktionellen Gruppen des natürlich vorkommenden Schutzstoffes einzeln untersuchen zu können und so die molekularen Gründe für die stabilisierende Wirkung von kompatiblen Soluten in der Natur zu finden.

Die für die Stabilisierung von Biomolekülen verantwortlichen Strukturelemente sollten durch die Messung verschiedener Wechselwirkungen der Solute mit Wasser, einzelnen Biomolekülen und ganzen Zellen identifiziert werden um dann gegebenenfalls chemisch Derivate mit verbesserten Eigenschaften einsetzen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein möglichst einfaches chemisches Verfahren gefunden werden, um kostengünstig ein „Supersolut“ herzustellen, welches ein möglichst breites Wirkspektrum bezüglich der Stabilisierung von Zellstrukturen, wie Proteinen und Nucleinsäuren aber auch ganzen Zellen gegen verschiedene Stressfaktoren und Schädigung aufweist.

Diese Arbeit sollte ferner dazu beitragen, die Nischenbewohner und ihre Produkte besser zu verstehen, neue Anwendungsmöglichkeiten aufzudecken und so das Spektrum der Extremophilen, ihrer Produkte und chemisch verwandter Substanzen in unserem Alltag zu vergrößern.

2. Material und Methoden

Zunächst sind hier die allgemeinen biochemischen und analytischen Labormethoden aufgeführt, gefolgt von den chemischen Synthesen der kompatiblen Solute. Am Ende dieses Kapitels befinden sich die Tests zu den Wechselwirkungen der Solute mit Wasser, Biomaterialien und *Escherichia coli*.

2.1. allgemeine biochemische und analytische Methoden

2.1.1. Chemikalien

Alle Grundchemikalien stammten von der Firma Sigma, Deisenhofen. Sie besaßen den Reinheitsgrad *p. A.* oder *reinst*. Spezialchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acetamidin Hydrochlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Acetonitril (HPLC-grade)	Fa. Merck, Darmstadt
1-Aminoadamantan Hydrochlorid (ADAM)	Fa. Grom, Herrenberg-Kayh
Aminosäuren	Fa. Merck, Darmstadt
Antibiotic medium No. 3	Fa. Oxoid, Wesel
L-2,4-Diaminobuttersäure Dihydrochlorid (DABA)	Fa. ICN, Eschwege
9-Fluorenyloxycarbonylchlorid (FMOC)	Fa. Grom, Herrenberg-Kayh
H ₂ O ₂ (30 % (w/v), Perhydrol)	Fa. Merck, Darmstadt
S,S-β-Hydroxy-1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure (Hydroxyectoin)	Fa. Bitop, Witten
Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator	Fa. Merck, Darmstadt
Peroxid-Test Merckoquant®	Fa. Merck, Darmstadt
Ribonuclease A, bovine pancreatic (50 U/mg) (RNase A)	Fa. Boehringer Mannheim

Aqua demin. für die Nährmedien und die HPLC-Analytik wurde mit einer Serlapur-Pro-90-Anlage der Fa. Seral, Ransbach-Baumbach aufgereinigt. Reinstwasser wurde mit einer Milli-Q-plus-185-Anlage der Fa. Millipore (Eschborn) aufbereitet.

Sterilfilter (Porengröße 0,25 µm) wurden von der Firma Millipore (Eschborn) bezogen.

2.1.2. Mikroorganismen

Um festzustellen, welche der Solute von Microorganismen aufgenommen werden können, und welche Solute im Zellinneren zu einer Salztoleranz führen, wurde *E. coli* DH5 α (HANAHAN, 1983) als Modellstamm ausgewählt.

Für die Fluoreszenzexperimente wurde ein *E. coli* DH5 α Stamm verwendet, der zusätzlich das Plasmid pBRGFP_{UV-ectUp} (BESTVATER, 2001; BESTVATER & GALINSKI, 2002) besass.

2.1.3. Nährmedien

2.1.3.1. Komplexmedium AB

Für die Stammhaltung von *E. coli* DH5 α wurde Komplexmedium AB (Antibiotic medium No. 3, Fa. Oxoid, Wesel) verwendet.

Antibiotic medium No. 3	17,5 g
Natriumchlorid	10 g
Agar	20 g
aqua dest.	ad 1000 ml

Das Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 37°C, unter der Sterilwerkbank in 30 Petrischalen verteilt. Nach dem Auskühlen wurden diese bei 4°C für bis zu einen Monat gelagert.

2.1.3.2. Minimalmedium MM63 (LARSEN et al., 1987)

Das für die Anzucht von *E. coli* DH5 α verwendete Minimalmedium MM63 setzte sich zusammen aus:

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 - 30 g	(Salinität: 1 - 3 % (w/v))
pH	7,15	
aqua dest.	ad 950 ml	
D-Glucose-Monohydrat	4,65 g	
aqua dest.	ad 50 ml	

Da Glucose in Gegenwart von Phosphat beim Autoklavieren sehr leicht caramellisiert, wurden die beiden Lösungen getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen unter der Sterilbank zusammengegeben. Ferner wurde das Medium mit 300 μ l steriler Vitaminstammlösung (Kapitel 2.1.3.3.) versetzt.

Für die Supplementierungsexperimente wurden dem Medium sterilfiltrierte Solutlösungen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

2.1.3.3. Vitaminlösung VA (IMHOFF & TRÜPER, 1977)

Nicotinsäureamid	0,35 g
Thiamin Hydrochlorid	0,30 g
Biotin	0,10 g
p-Aminobenzoessäure	0,20 g
Pyridoxin Hydrochlorid	0,10 g
Ca-D,L-Pantothenat	0,10 g
Vitamin B ₁₂	0,05 g
aqua dest.	ad 1000 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

2.1.4. Kulturverfahren

2.1.4.1. Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurde *E. coli* DH5 α auf AB-Agar (Kapitel 2.1.3.1.) ausplattiert, 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C für maximal einen Monat gelagert.

Zur Langzeitlagerung wurden mittels der MikrobankTM der Fa. Mast Diagnostica (Reinfeld) zusätzliche Kulturen bei -78°C gelagert.

2.1.4.2. Flüssigkulturen

Zur Anzucht von Flüssigkulturen von *E. coli* DH5a wurde zunächst eine Vorkultur bei einer Salinität von 1 % (w/v) NaCl angezogen. Dazu wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben 20 ml MM63 mit einer auf AB-Agar gewachsenen Kultur angeimpft und über Nacht im Rotationsschüttler (Scientific innova 4230 der Fa. New Brunswick, Edison USA) bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Der Kolben war zum besseren Sauerstoffeintrag mit vier Schikanen versehen und mit einer Alukappe steril verschlossen. Für die Anzuchten unter Salzstress wurde eine weitere Vorkultur bei 3 % (w/v) NaCl unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben angezogen. Diese wurde mit 5 ml der Vorkultur bei 1 % (w/v) NaCl angeimpft.

Für die Hauptkultur wurden modifizierte 300 ml Weithals-Erlenmeyerkolben verwendet. An den Kolben war seitlich ein Meßfortsatz zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) angebracht. Ferner befand sich auf der gegenüberliegenden Seite ein mit einer Schraubkappe verschlossener Stutzen, über den die Kulturen supplementiert werden konnten, oder Proben entnommen werden konnte. Eine Schaumkappe (Fa. Merck, Darmstadt) ermöglichte einen Gasaustausch, hielt aber Kontaminationen zurück. Jeweils 100 ml MM63 pro Kolben wurde mit 5 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 150 rpm im Rotationsschüttler angezogen.

2.1.4.3. Verfolgung des Zellwachstums

Das Zellwachstum wurde photometrisch (Novaspec II der Fa. Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) über die Messung der Absorption bei 600 nm verfolgt. Die Absorption bei 600 nm wird auch optische Dichte (OD_{600}) genannt. Hierbei handelt es sich aber nicht um eine Absorption durch die Bakterien, sondern um eine vorgetäuschte Absorption (auch scheinbare Absorption genannt) durch das Streulichtphänomen welches durch die während des Bakterienwachstums steigende Partikelzahl verursacht wird. Zur Messung der OD wurde der Meßfortsatz des Anzuchtkolbens direkt in das Photometer gesetzt. Bei Zelldichten von über 0,5 Absorptionseinheiten steigt der Einfluß der Mehrfach- und Rückstreuung, so dass die OD unterbestimmt wird. Deshalb mußten die Werte über 0,5 OD-Einheiten korrigiert werden. Die Korrektur erfolgte mittels einer „Dalgaard-Anpassung“ (DALGAARD et al., 1994). Dazu wurde mit einer ausgewachsenen Kultur eine Verdünnungsreihe erstellt und die OD der mit frischem Medium verdünnten Proben gemessen. Durch Multiplikation des Meßwertes der größten Verdünnung mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor erhält man die jeweilige reale OD. Nun trägt man die reale OD gegen die direkt im Kolben gemessene OD auf und passt die folgende Gleichung rechnergesteuert an die Messpunkte an und bestimmt so die Variablen A und B:

$$\text{Dalgaard-Gleichung: } OD_{\text{real}} = OD_{\text{gem.}} + A \times (OD_{\text{gem.}})^B$$

Analog hätte man auch die Proben vor der Messung auch soweit verdünnen können, bis die Werte unter 0,5 OD-Einheiten gelegen hätten. Die Methode der Dalgaard-Anpassung hat den Vorteil, daß man nicht jede Probe mit einer $OD \geq 0,5$ verdünnen muß, sondern nur einmal eine Verdünnungsreihe angesetzt. Ferner wurde die Kontaminationsgefahr verringert, da die OD direkt im Messfortsatz der Kolben gemessen wurde, und die Kolben für die Probenentnahme somit nicht geöffnet werden mußten.

In der logarithmischen Auftragung der Wachstumskurven wurde die Steigung ermittelt, die der Wachstumsrate μ [h^{-1}] entspricht. Aus ihr berechnet sich die Verdopplungszeit t_D [h] der Bakterien nach:

$$t_D = (\ln 2) / \mu$$

Auf eine Nass- bzw. Trockengewichtsbestimmung während des Wachstums wurde ebenso verzichtet, wie auf eine Zellzahlbestimmung, da diese Parameter mit der realen OD linear korrelieren (KOCH, 1981).

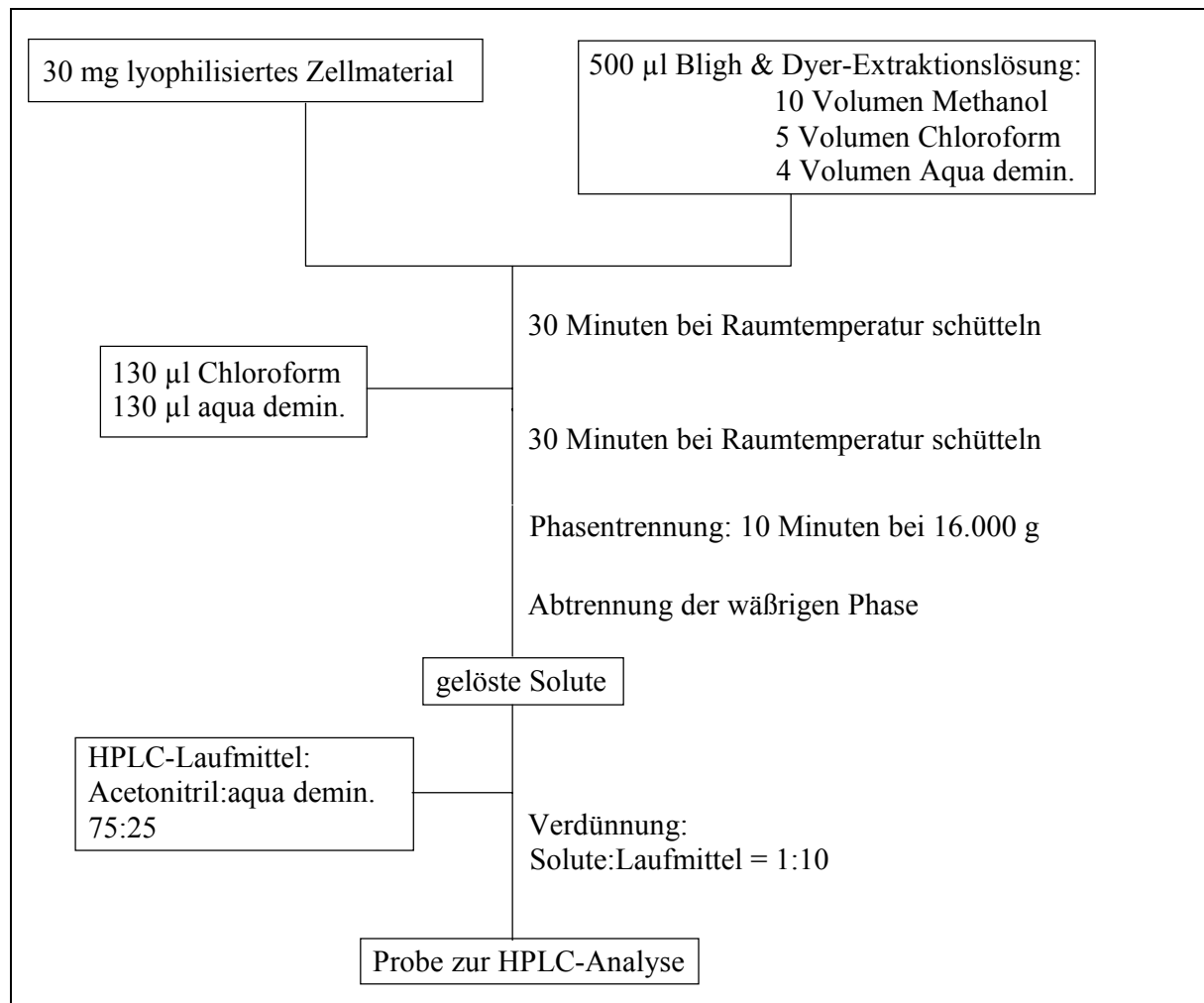
2.1.4.4. Zellernte

Zur Gewinnung der Biomasse und zur Bestimmung der Solutgehalte in den Zellen wurden die Kulturen für 15 Minuten bei $2.800 \times g$ und 4°C abzentrifugiert (Universal-Zentrifuge 16R der Fa. Hettich, Tuttlingen). Die Zellpellets wurden in ausgewogene 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und das Nassgewichte bestimmt. Über Nacht wurden die Pellets lyophilisiert (Alpha I-6, Fa. Christ, Osterode) und anschließend das Trockengewicht ermittelt. Aus dem so erhaltenen Zellmaterial wurden die kompatiblen Solute isoliert (Kapitel 2.1.5.1.) und anschließend mittels HPLC quantifiziert (Kapitel 2.1.5.2.).

2.1.5. allgemeine Analytik

2.1.5.1. Extraktion kompatibler Solute

Die in den gefriergetrockneten Zellen enthaltenen Solute wurden durch eine modifizierte Bligh & Dyer-Extraktion (BLIGH & DYER, 1959; GALINSKI, 1986; GALINSKI & HERZOG, 1990) in eine wässrige Phase überführt. Dazu wurden 30 mg des getrockneten Zellmaterials zerkleinert, mit 500 μl Bligh & Dyer-Lösung (10 Vol. Methanol + 5 Vol. Chloroform + 4 Vol. aqua demin.) versetzt und für 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert (IKA-Vibrax VXR, Janke & Kunkel, Staufen). Anschließend wurden 130 μl Chloroform und 130 μl aqua demin. zugesetzt und die Suspension erneut für 30 Minuten geschüttelt. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 10 Minuten bei $16.060 \times g$ zentrifugiert (Biofuge *Pico*, Heraeus Instruments, Hanau). Die obere, wäßrige Phase, welche die Solute enthält, wurde abpipettiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Zur HPLC-Analyse mußten die Proben 1:10 mit HPLC-Laufmittel (75 % (v/v) Acetonitril) verdünnt werden.



Schema 2.1.5.1.: Extraktion kompatibler Solute nach Bligh & Dyer und Vorbereitung der Proben für die anschließende HPLC-Analyse.

2.1.5.2. isokratische Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

Die Auftrennung und Quantifizierung der kompatiblen Solute erfolgt mittels einer HPLC-Anlage der Fa. Thermo Separation Products (Riviera Beach, USA). Diese bestand aus folgenden Teilen:

- isokratische Pumpe P 100 Spectra Series
- Vakuumentgasungsmodul SCM 1000
- Rheodyne Probenaufgabeeventil mit 20 µl Probenschleife
- Vorsäule Nucleosil Amino, 10 × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, der Fa. Merck, Darmstadt
- Trennsäule Grom-Sil 100 Amino 1-PR, 125 × 4 mm, Partikelgröße 3 µm, der Fa. Grom, Herrenberg-Kayh
- UV-Detektor UV1.000 Spectra Series ($\lambda = 220$ nm)
- Brechungsindexdetektor RI-71, der Fa. Shodex, Tokyo, Japan

Die Anlage wurde von der Software "Chrom Quest™ Chromatography Data System" für Windows NT® gesteuert. Die Datenaufnahme und Auswertung der Chromatogramme erfolgte ebenfalls mit diesem Programm.

Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus 75 % (v/v) Acetonitril (HPLC-grade) und 25 % (v/v) aqua demin. verwendet. Die Flussrate betrug bei allen Messungen 1 ml/min. Das Laufmittel wurde vor der Verwendung zunächst durch 15minütiges Durchströmen mit Helium entgast.

Die Solutkonzentration der Proben wurde jeweils durch Vergleich mit einem entsprechendem Standard ermittelt.

2.1.5.3. Gradienten-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (FMOC-HPLC)

Die Gradienten-HPLC eignet sich zur Quantifizierung von freien Aminosäuren sowie primären und sekundären Aminen, wenn diese vorher mit einem Fluoreszenzmarker (9-Fluorenyloxycarbonylchlorid, FMOC) gekoppelt werden. Bei den Synthesen der Solute (Kapitel 2.2.) entstanden hauptsächlich die ein- und zweifach acetylierten offenkettigen Verbindungen als Nebenprodukte. Da die Gradienten-HPLC empfindlich genug ist, um Amine in einer Konzentration von 50 μM zu detektieren und die Reinheit der synthetisierten Solute bei einer Konzentration von 10 mM überprüft wurde, wären kleinste Verunreinigungen an Nebenprodukt detektiert worden. Ferner wurde diese Methode zur Quantifizierung der maximalen Löslichkeit der biogenen Aminosäuren in 2 M Solutlösung (Kapitel 2.3.3.2.) verwendet.

Die Anlage der Fa. Thermo Separation Products (Riviera Beach, USA) bestand aus den folgenden Teilen:

- Gradientenpumpe P2000 Spectra Series mit Mischkammer für zwei Laufmittel
- Vakuumentgasungsmodul SCM 1000
- Autosampler AS3000 Spectra Series mit Probenaufgabeventil, 10 μl Probenschleife, Probenkühlung (4°C) und Säulenofen (45°C)
- Vorsäule Licrospher 100RP8, 10x4 mm, Partikelgrösse 5 μm , der Fa. Merck, Darmstadt
- Trennsäule Superspher 60 RP8, 125 \times 4 mm, Partikelgrösse 4 μm , der Fa. Grom, Herrenberg-Kayh
- Fluoreszenzdetektor FL3000 Spectra Series, Anregungswellenlänge: $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$, Detektionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$

Die Messgeräte wurden von der Software „Chrom Quest™ Chromatography Data System“ für Windows NT® gesteuert. Die Datenaufnahme und Auswertung der Chromatogramme erfolgte ebenfalls mit diesem Programm.

Die Flussrate betrug 1,25 ml/min. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus den beiden Laufmitteln A und B verwendet wie er in Tabelle 2.1.5.2. beschrieben ist. Die Laufmittel wurde vor der Verwendung zunächst durch 15minütiges Durchströmen mit Helium entgast.

Laufmittel A:	Natriumacetat-Puffer, 50 mM, pH 4,2	79,5 % (v/v)
	Acetonitril	20,0 % (v/v)
	Tetrahydrofuran (THF)	0,5 % (v/v)
Laufmittel B:	Natriumacetat-Puffer, 50 mM, pH 4,2	20,0 % (v/v)
	Acetonitril	80,0 % (v/v)

Tab. 2.1.5.2.: Zusammensetzung des Laufmittelgradienten für die Gradienten-HPLC.

Zeit [min]	Laufmittel A [% (v/v)]	Laufmittel B [% (v/v)]
0	100	0
15	91	9
30	70	30
40	40	60
42	0	100
47	0	100
49	100	0
51	100	0

Zur Detektion der freien Aminofunktionen wurden diese mit 9-Fluorenyloxycarbonylchlorid (FMOC) derivatisiert und anschließend nach Auftrennung auf der HPLC-Säule fluoreszenzspektrometrisch detektiert und quantifiziert (KUNTE et al., 1993). Die Probenderivatisierung wurde wie folgt durchgeführt:

- 40 µl Probelösung wurden mit 40 µl Natriumboratpuffer (0,5 M) mit je 50 µM Taurin und Pipicolinsäure als interne Standards und 80 µl 9-Fluorenyloxycarbonylchlorid-Lösung (FMOC) gemischt und für 45 s kräftig geschüttelt (IKA-Vibrax VXR, Janke & Kunkel, Staufen).
- 100 µl 1-Aminoadamantan-Lösung (ADAM, 40 mM) wurden zugegeben und weitere 45 s kräftig geschüttelt (IKA-Vibrax VXR, Janke & Kunkel, Staufen).
- 140 µl Laufmittel A wurden zugegeben, die Probe gemischt und in den Autosampler der HPLC-Anlage geben.

Die detektierten Aminoverbindungen wurden mittels Standards (jeweils 50 μM) identifiziert und mit Hilfe der internen Standards quantifiziert.

2.1.5.4. NMR-Spektroskopie

Zur Identifizierung der Produkte der Synthesen wurden in der Analytischen Abteilung des organisch-chemischen Instituts der Universität Münster ^{13}C -NMR Spektren angefertigt. Um eine Peakaufspaltung durch Wechselwirkungen zwischen Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen auszuschalten, wurden die ^{13}C -Spektren als breitbandentkoppelte Spektren (CPD: Composite Pulse Decoupling) aufgenommen.

Die Proben wurden über Nacht in einem Lyophilisator (Alpha I-6, Fa. Christ, Osterode) gefriergetrocknet und anschließend in 1 ml D_2O aufgenommen. Da die Löslichkeit von Tetramethylsilan (TMS) in D_2O zu gering ist, wurden jeder Probe 10 mg 3-(Trimethylsilyl)-propionsäure- d_4 -Natriumsalz (TMSP) als internem Standard zugesetzt. Die chemischen Verschiebungen wurden bezogen auf das Methyl-Signal des internen Standards ($\delta [\text{Si}-(\text{CH}_3)_4] = 0,00$ ppm) angegeben. Die Auflistung der Signale beginnt bei hohem Feld.

Die Messungen erfolgten mit einem Spektrometer der Fa. Bruker, (Modell ARX 300 oder AMX 400) bei einer Messfrequenz von 75,5 MHz.

Die Spektren wurden mit dem Programm "Nuts Pro - NMR Utility Transform Software Professional - for Windows 95/NT" der Fa. Acorn NMR Inc. (Livermore, Kanada) bearbeitet und ausgewertet.

2.1.5.5. CHN-Analyse

Sämtliche Elementaranalysen wurden in der analytischen Abteilung des organisch-chemischen Instituts der Universität Münster mit einem CHN-O-Rapid (Fa. Foss-Heraeus, Hanau) und einem Vario EL III (Fa. Elementar Analysensysteme, Hanau) durchgeführt. Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Messungen.

2.2. Synthese von Soluten mit ectoinanaloger Struktur

Ein Ziel dieser Arbeit war die Synthese von strukturanalogen Substanzen zu Ectoin. Abbildung 1.3. zeigt einen Überblick über die Strukturen, IUPAC- und Trivialnamen. Im folgenden Abschnitt werden die chemischen Synthesen der kompatiblen Solute dargestellt. In den dazugehörigen Strukturformeln sind die Solute immer in der ionischen Form dargestellt, so wie sie in wässriger Lösung bei neutralem pH vorliegen. Ferner ist immer das L-Diastereomer gezeichnet, da diese die natürlich vorkommende Form von γ NAc-DABA, Ectoin und Hydroxyectoin ist. Über und unter den Reaktionspfeilen sind die wichtigsten Syntheseparameter wie: Lösungsmittel, Temperatur, pH und Reaktionsdauer aufgeführt.

2.2.1. Synthese von zyklischen Soluten mit zwitterionischer Struktur

Die bei KOICHI et al. (1991) beschriebene Synthese für Ectoin wurde dazu verwendet, 1,4,5,6 Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure (L-Ectoin) und strukturverwandte kompatible Solute mit variabler Ringgröße herzustellen. Die so hergestellten Solute haben alle eine zyklische, zwitterionische Struktur.

Zur Synthese von Ectoin wurde L-2,4-Diaminobuttersäure mittels Orthoessigsäuretrimethylester acetyliert. Der Ringschluss durch die anschließende Dehydratisierung erfolgte bei 50°C spontan. Durch Variation der Diaminokomponente in der Synthese konnte die Ringgröße variiert werden.

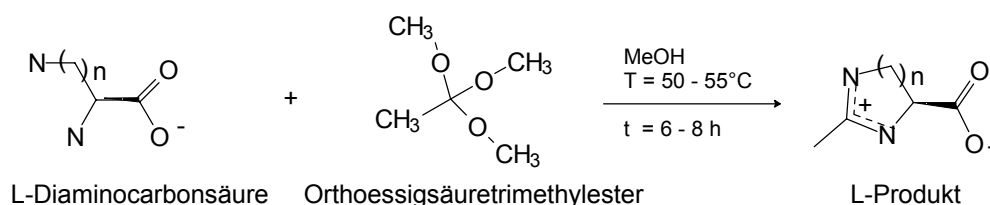


Abb. 2.2.1.: Reaktionsgleichung zur Synthese von zyklischen, ectoinanalogen Soluten mit variabler Ringgröße. $n = 1 - 4$; $n=2$ entspricht dem natürlich vorkommenden Solut L-Ectoin

In einem Dreihalskolben wurden 400 ml getrocknetes Methanol mit 2,5 eq. Orthoessigsäuretrimethylester gemischt und auf 50°C erhitzt. 1 eq. der Diaminocarbonsäure wurden zugegeben und die Suspension bei 50 - 55°C gerührt, bis sich der Niederschlag gelöst hatte (ca. 6 - 8 h). In Tabelle 2.2.1. sind die Edukte sowie die daraus resultierenden Produkte aufgelistet. Bei den grösseren Ringen kam es zu einer gelborange-Färbung der Lösung, verbunden mit einer Erhöhung der Viskosität. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer (Fa. Büchi, Konstanz) abgezogen, der Rückstand in 100 ml aqua bidest. aufgenommen und der pH-Wert mit NaOH-Lösung (2 M) auf pH 7 eingestellt. Dadurch wurde der überschüssige Orthoessigsäuretrimethylester zu Essigsäure und Methanol hydrolysiert. Das bei der Neutralisation entstandene NaCl wurde säulenchromatografisch über eine AG11A8-Ionenverzögerer-Säule (Fa. Biorad, Californien, USA) abgetrennt. Als mobile Phase wurde dabei aqua bidest. eingesetzt. Die Rohprodukte wurden, nach Entfernung des Lösungsmittels, aus getrocknetem Methanol umkristallisiert und über Kieselgel im Vakuum getrocknet. Die Identifizierung der Produkte erfolgte mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie und CHN-Analyse. Die Reinheit der Produkte wurde mittels isokratischer-, Gradienten-HPLC, sowie über die CHN-Analyse festgestellt.

Tab. 2.2.1.: Edukte, Ringgrösse und Produkte der Synthese von zyklischen kompatiblen Soluten mit ectoinanaloger Struktur und variabler Ringgrösse. In Klammern sind die Abkürzungen und Trivialnamen der Solute angegeben, wie sie im Folgenden verwendet werden.

Ringgrösse	n	Diaminokomponente	Produkt
5	1	D,L-1,2-Diaminopropionsäure Hydrochlorid	4,5-Dihydro-2-methyl-imidazol- 4-carbonsäure (DHMICA)
6	2	L-2,4-Diaminobuttersäure Dihydrochlorid	1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin- 4-carbonsäure (L-Ectoin)
7	3	L-Ornithin Hydrochlorid	4,5,6,7-Tetrahydro-2-methyl- 1H-[1,3]-diazepin-4-carbonsäure (Homoectoin)
8	4	L-Lysin Hydrochlorid	3,4,5,6,7,8-Hexahydro-2-methyl- 1,3-diazocin-4-carbonsäure (HHMDCA)

2.2.2. Synthese von N-Acetyl-diaminobuttersäure (NAc-DABA)

Bei der Biosynthese von Ectoin in Bakterien stellt γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (γ NAc-DABA) die letzte Vorstufe dar (PETERS et al., 1990). Die Ectoinsynthese zyklisiert die γ NAc-DABA unter Wasserabspaltung zum kompatiblen Solut Ectoin. Um zu untersuchen ob und wie auch die Vorstufe des Ectoins mit Wasser und Zellstrukturen wechselwirkt, wurde versucht γ NAc-DABA chemisch zu synthetisieren. Da Auf- und Abbau von Substanzen im Zellstoffwechsel häufig über zwei getrennte Wege laufen und α NAc-DABA eventuell ein Abbaubestandteil des Ectoins sein könnte, wurde versucht auch dieses Isomer herzustellen. Dazu wurden zwei Synthesestrategien verfolgt. Zum Einen die Acetylierung von L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA) und zum Anderen die Hydrolyse von L-Ectoin (Rückreaktion des letzten Biosyntheseschrittes).

2.2.2.1. Synthese von α - und γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (α - und γ NAc-DABA) durch Acetylierung von L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA)

Die Acetylierung von L-2,4-Diaminobuttersäure sollte zu einem Gemisch von α NAc-DABA und γ NAc-DABA führen. Da die α -Aminogruppe durch die benachbarte Carboxylgruppe sterisch abgeschirmt wird und somit für eine Acetylierungsreaktion nicht so gut zugänglich ist, sollte mehr γ NAc-DABA als α NAc-DABA entstehen. Ferner wirkt die vorhandene Carboxylgruppe elektronenziehend auf das benachbarte C-Atom. Dadurch wird die α -Aminogruppe positiviert und der nucleophile Angriff dieses Stickstoffs auf den Essigsäureanhydrid wird somit erschwert.

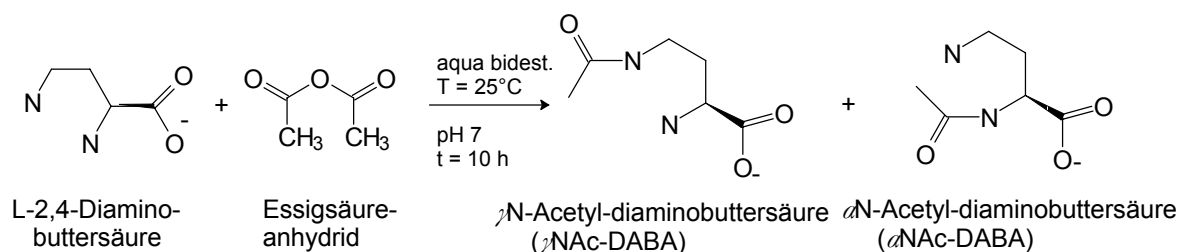


Abb. 2.2.2.1.: Synthese von α - und γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (α - und γ NAc-DABA) durch Acetylierung von L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA) mittels Essigsäureanhydrid.

Unter Rühren bei Raumtemperatur wurde in einem 100 ml Rundkolben 1 g L-2,4-Diaminobuttersäure Dihydrochlorid in 45 ml aqua bidest. gelöst und mit 0,42 g NaOH (2 eq.) neutralisiert. Um die Bildung des zweifach acetylierten Produktes zu minimieren, wurde die Konzentration an Acylierungsreagenz im Ansatz möglichst gering gehalten. Es wurden deshalb 0,75 ml Essigsäureanhydrid (1,5 eq.) gelöst in 5 ml aqua bidest. über 5 h verteilt zutropft. Anschließend wurde die Reaktion für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer (Fa. Büchi, Konstanz) bei möglichst niedrigen Temperaturen eingengt, der Rückstand in 2,5 ml aqua bidest. aufgenommen, das Rohprodukt mit Methanol gefällt und nach Abkühlung auf 4°C in einem Glasfiltertiegel (Porengröße D4) abgesaugt und im Vakuum über Kieselgel getrocknet.

Eine säulenchromatografische Auftrennung der beiden Produkte wurde mit verschiedensten Säulenmaterialien, u. a. Ionentauscher, und mobilen Phasen (Bidest, Methanol, Perchlorsäuregradient) probiert. Es konnte aber keine Trennung der beiden Produkte erreicht werden.

2.2.2.2. Synthese von α - und γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (α - und γ NAc-DABA) durch alkalische Hydrolyse von Ectoin

Die alkalische Hydrolyse von Ectoin stellt die Rückreaktion des durch die Ectoin-Synthase katalysierten Reaktionsschrittes dar. Während der Reaktion entstanden die beiden Produkte α - und γ NAc-DABA, in Reinform isoliert werden konnte aber letztendlich nur γ NAc-DABA.

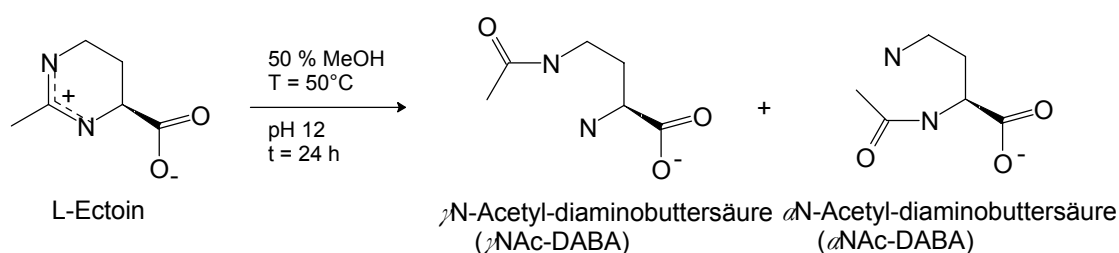


Abb. 2.2.2.2.: Synthese von α - und γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (α - und γ NAc-DABA) durch alkalische Hydrolyse von Ectoin.

1,42 g L-Ectoin wurden in 50 % (v/v) Methanol gelöst (0,1 M) und mit 0,561 g KOH (0,1 M) versetzt. Die Lösung wurde bei 50°C gerührt, wobei der pH-Wert durch Zutropfen von

KOH-Lösung (1 M) konstant bei pH 12 gehalten wurde. Bei der Reaktion fiel das Produkt γ Nac-DABA aus. Nach 24 h wurde die Suspension auf Raumtemperatur abgekühlt und das ausgefallene Produkt in einem Glasfiltertiegel (Porengrösse D4) abgesaugt. Die abfiltrierte Mutterlauge wurde in einem Lyophilisator (Alpha I-6, Fa. Christ, Osterode) eingengt und weiteres Produkt wurde abgesaugt. Die beiden Fraktionen wurden vereint und umkristallisiert. Dazu wurde der Feststoff in möglichst wenig Methanol bei Raumtemperatur gelöst, zur Auskristallisation über Nacht bei 4°C gelagert, abgesaugt und lyophilisiert. Da die γ Nac-DABA bei erhöhter Temperatur sehr leicht wieder zu Ectoin kondensiert wurde es lyophilisiert und nicht am Rotationsverdampfer getrocknet.

Das Produkt wurde mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie und CHN-Analyse als γ Nac-DABA identifiziert und mittels isokratischer und Gradienten-HPLC auf Verunreinigungen untersucht.

2.2.3. Synthese von 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin Hydrochlorid (Decarboxy-Ectoin, DCE)

Das DCE-Kation ließ sich nicht auf die gleiche Weise herstellen wie Ectoin und die homologen Solute (Kapitel 2.2.1.). Da 1,3-Diaminopropan (DAP) sehr alkalisch reagiert und pH-neutrales 1,3-Diaminopropan-Dihydrochlorid ($\text{DAP} \times 2 \text{ HCl}$) oder 1,3-Diaminopropan-Dihydrogensulfat ($\text{DAP} \times \text{H}_2\text{SO}_4$) in getrocknetem Methanol nahezu unlöslich sind wurde zur Herstellung von DCE eine andere Synthese ausgewählt. Acetamidin reagiert auch im alkalischen mit 1,3-Diaminopropan zu dem gewünschten Kation. Bei der Reaktion entsteht NH_3 , weshalb die Reaktion im Abzug durchgeführt wurde.

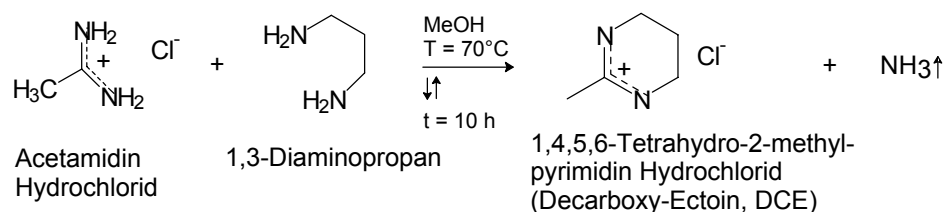


Abb. 2.2.3.: Synthese von 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin Hydrochlorid (DCE). DCE ist eine kationische, decarboxylierte Ectoinstruktur mit Chlorid als Gegenion.

50 g Acetamidin Hydrochlorid (0,5 mol, 1 eq.) wurden in 250 ml Methanol gelöst, mit 45,4 ml Diaminopropan (0,55 mol, 1,1 eq.) versetzt und für 10 h bei 70°C unter Rückfluß gekocht. Das bei der Reaktion entstehende NH₃ wurde durch eine mit 250 ml Salzsäure (4 M) gefüllte Gaswaschflasche geleitet und anschließend entsorgt. Das Methanol wurde am Rotationsverdampfer (Fa. Büchi, Konstanz) abgezogen, das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert, das Produkt in einem Glasfiltertiegel (Porengröße D3) abgesaugt und über Kieselgel im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie und CHN-Analyse identifiziert und mittels gradienten-HPLC auf Verunreinigungen untersucht. Da das Produkt hygroskopisch reagierte, wurde es unter Luftabschluss gelagert.

2.3. Messung des protektiven Effektes der ectoinanalogen kompatiblen Soluten auf biochemische Modellsysteme und *Escherichia coli*

Neben der Synthese der ectoinähnlichen Strukturen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Wechselwirkungen der natürlichen sowie der chemisch synthetisierten Solute mit Wasser und verschiedenen Zellkomponenten bzw. ganzen Zellen zu untersuchen. Diese Versuche sollten dazu dienen die Art der Wechselwirkungen zu identifizieren, um so in einem weiteren Schritt Solute entwickeln zu können, die an spezielle Problemstellungen angepasst sind. Eine mögliche Problemstellung ist z. B. die Erhöhung der Stabilität von biologischem Material bei der Lagerung. Dabei kann es sich sowohl um isolierte Proteine, Ribonucleinsäuren wie DNA und RNA, als auch um ganze Bakterienkulturen handeln.

2.3.1. Aufnahme von Soluten durch *E. coli* DH5α unter osmotischem Stress

Da *E. coli* in der Lage ist Betain, Ectoin und Hydroxyectoin aus dem Medium aufzunehmen und so eine bedingte Salztoleranz zu erwerben, eignet er sich als Testorganismus, ob die neu synthetisierten Solute unter Salzstress ebenfalls aufgenommen werden können und ob diese Solute dem Organismus helfen den Salzstress zu überwinden.

2.3.1.1. Wachstum von *E. coli* DH5 α unter osmotischem Stress

E. coli DH5 α wurde in Minimalmedium MM63 bei einer Salinität von 3 % (w/v) NaCl angezogen. Zusätzlich wurde das Medium mit verschiedenen Soluten supplementiert und die optische Dichte wurde über den Wachstumszeitraum in Abständen von 0,5 - 1 h gemessen. Aus der Wachstumskurve der realen OD wurde die Wachstumsrate μ [h⁻¹] und daraus die Verdopplungszeit t_D [h] ermittelt. Am Ende des exponentiellen Wachstums wurden die Zellen geerntet, lyophilisiert, die Solute extrahiert und mittels isokratischer HPLC quantifiziert. Dabei wurde für jedes Solut eine Doppelbestimmung durchgeführt. Folgende natürliche und chemische Solute wurden jeweils 2 mM zur Supplementierung des MM63 genutzt:

- Betain
- TMAO
- γ NAc-DABA
- Ectoin
- Hydroxyectoin
- DHMICA
- Homoectoin
- DCE

Um zu untersuchen, ob die Solute über das gleiche Aufnahmesystem in die Bakterienzellen gelangen wie Ectoin, wurden mit Ectoin supplementierte Kulturen zusätzlich mit 0 - 10 mM DCE versetzt. Anschließend wurden wieder die Wachstumsraten, die Verdopplungszeiten, sowie die Solutkonzentrationen in den Zellen bestimmt.

2.3.1.2. Produktion von grün fluoreszierendem Protein (GFP) in *E. coli* DH5 α unter osmotischem Stress

Der Stamm *E. coli* DH5 α pBRGFP_{UVectUp} enthält das Genfragment *gfp_{uv}* aus *Aequorea victoria*, sowie das Genfragment *ectUp* aus *Marinococcus halophilus*, welches in diesem direkt vor den Ectoingenen liegt und für das Bestvater Promotoreigenschaften bezüglich einer Salzinduktion nachweisen konnte. *ectUp* schaltet unter Salzstress die Produktion der dahinterliegenden Gene an (BESTVATER, 2001; BESTVATER & GALINSKI, 2002). Der Index UV bedeutet dabei, dass die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge im UV-Bereich angeregt

wird. Das Startkodon des gfp_{UV} stimmte mit dem urpünglichen Startkodon des ersten Ectoingenes überein, so dass durch den Salzstress nicht die Produktion des Schutzstoffes Ectoin, sondern das GFP_{UV} gestartet wird. Das GFP_{UV} benötigt zur Fluoreszenz keine Coenzyme und Cofaktoren wie zum Beispiel ATP und NADH.

Um zu untersuchen, ob die aufgenommenen Solute DHMICA und Homoectoin bei *E. coli* DH5 α nach einem Salzstress dazu führen, dass die Bakterien salztolerant werden und den Osmostress nicht mehr spüren, wurde die Expression des grün fluoreszierenden Reporterproteins GFP_{UV} in Abhängigkeit von der Stärke des Osmoschocks verfolgt.

Die Versuche wurden analog zu den Experimenten von BESTVATER (2001) mit den beiden Soluten Betain und Ectoin durchgeführt. Die Bakterien wurden in MM63 bei 1 % (w/v) NaCl angezogen. Bei einer OD_{600} von ca. 0,2 wurde die Salinität des Mediums durch die Zugabe festen Salzes auf 2 % (w/v), 3 % (w/v) und 4 % (w/v) erhöht. Das Experiment wurde ohne Solut sowie mit jeweils 2 mM DHMICA oder Homoectoin im MM63 durchgeführt. Vor dem Salzsschock und danach alle 2 h wurden Proben genommen, in SUPRASIL[®]-Quarzküvetten (Fa. Hellma, Müllheim) mit frischem Medium auf eine OD_{600} von 0,05 verdünnt und die Fluoreszenz ($\lambda_{ex} = 395$ nm, $\lambda_{em} = 509$ nm) wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer LS50 (Fa. Perkin Elmer, Beakonsfield, UK) gemessen.

Die Fluoreszenzmessungen konnten direkt im Kulturmedium erfolgen, da die einzelnen Bestandteile des MM63 keinen Einfluß auf die Fluoreszenz von GFP_{UV} haben (BESTVATER, 2001). Die Fluoreszenzdaten wurden auf die OD_{600} bezogen und auf die Fluoreszenz bei 1 % (w/v) NaCl normiert.

2.3.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Stabilität von RNase A

Die Stabilität von Ribonuclease A (RNase A, bovine pancreatic) wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der verschiedenen Solute untersucht. Dazu wurde ein Differential Scanning Calorimeter (Micro-DSC III, Fa. Setaram, Caluire, Frankreich) verwendet. Das Kalorimeter heizt die Probe und die Referenz mit konstanter Heizrate auf und misst dabei den Wärmefluss (in mW) der beiden Kammern. Findet in der Probenkammer eine Reaktion z.B. die Denaturierung eines Enzymes statt, die Energie verbraucht (endotherm) oder freisetzt (exotherm), misst das Kalorimeter eine Differenz im Wärmefluss der Probenkammer und dem Wärmefluss der Referenzkammer. Diese Differenz äussert sich in einem Peak, dessen Spitze

der Schmelzpunkt T_m ist. Der Schmelzpunkt T_m ist diejenige Temperatur, bei der 50 % des Enzymes denaturiert vorliegen.

RNase A ist ein Enzym, welches eine sehr grosse Reversibilität bei der thermischen Denaturierung besitzt. Das bedeutet, dass es thermisch denaturiert und anschließend durch abkühlen auf Raumtemperatur wieder in die native Form überführt werden kann ohne dabei wesentlich an enzymatischer Aktivität zu verlieren. Der Puffer (pH 6,15) für die Experimente bestand aus 0,1 M Glycin und 0,1 M NaCl (POKLAR et al. 1999). Die RNase A-Konzentration betrug 4 mg/ml und das Probenvolumen 0,8 ml. Die Referenz hatte bei allen Messungen die gleiche Zusammensetzung wie die Probe, enthielt aber kein Protein. Die Solutkonzentration wurde für die Solute Ectoin, Hydroxyectoin, DHMICA, Homoectoin, DCE, und TMAO zwischen 0 und 3 M, für Acetamidin Hydrochlorid bis 4 M und für Betain bis 5 M variiert.

Die Proben wurden mit einer Heizrate von 0,5°C/min von 10°C bis 85°C erhitzt und anschließend mit - 1°C/min abgekühlt. Es wurden jeweils drei solcher Zyklen durchlaufen, wobei die Proben zwischen den Zyklen für 15 min bei 10°C temperiert wurden.

Die Aufzeichnung sowie Auswertung der Meßwerte erfolgte mit der „Thermal Analysis Software“ (Version 1.20) der Fa. Setaram (Caluire, Frankreich).

Um zu überprüfen, ob die Einflüsse der einzelnen Solute auf den T_m der RNase A additiv sind, wurde eine Messreihe mit 1 M NaCl und variabler Ectoinkonzentration (0 - 3 M) durchgeführt.

Alle weiteren Einflussgrößen, wie Proteinkonzentration, Pufferzusammensetzung, Temperaturprofil und Volumina wurden dabei nicht variiert.

2.3.3. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Transferenergie ΔG_{tr} von Proteinen

Um den Einfluss von Soluten auf die Transferenergie ΔG_{tr} und damit auf die Stabilität von Proteinen zu untersuchen, wurde die Idee von LIU und BOLEN (1995) verfolgt. Die Transferenergie ΔG_{tr} gibt Auskunft darüber, ob eine Substanz sich besser in Wasser ($\Delta G_{tr} > 0$) oder in der Solutlösung ($\Delta G_{tr} < 0$) löst und zeigt somit an, ob das gewählte Lösungsmittel ein gutes oder ein schlechtes Lösungsmittel für die Testsubstanz ist.

LIU und BOLEN (1995) gehen davon aus, dass die Löslichkeit eines Proteines die Summe der Löslichkeit aller seiner Bestandteile ist. Alle Proteine setzen sich aus den 20 biogenen Aminosäuren zusammen, welche ein einheitliches Grundgerüst und eine spezifische Seitenkette besitzen. Das Grundgerüst, aus welchem sich die weiteren biogenen Aminosäuren ableiten besteht aus einem Glycin. Um die durch die Peptidbindung veränderten energetischen Verhältnisse mit zu berücksichtigen, wurde Diketopiperazin (DKP), ein zyklisches Dimer von Glycin, als Modellsubstanz für zwei Einheiten des Proteinrückgrates gewählt. Die ΔG_{tr} der Aminosäureseitenketten wurde bestimmt, indem von ΔG_{tr} der entsprechenden Aminosäure die ΔG_{tr} von Glycin subtrahiert wurde.

Aus dem Unterschied der maximalen Löslichkeiten von DKP und den Aminosäuren in reinem Wasser und in Solutlösung kann man die Transferenergie ΔG_{tr} nach folgender Formel berechnen:

$$\Delta G_{tr} = R \times T \times \ln(c_w/c_{os}) \quad \text{mit: } \begin{array}{l} R = \text{allgemeine Gaskonstante: } 8,314 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1} \\ T = 298 \text{ K} \\ c_w = \text{Konzentration in Wasser} \\ c_{os} = \text{Konzentration in Solutlösung} \end{array}$$

2.3.3.1. Maximale Löslichkeit von Diketopiperazin (DKP) in Abhängigkeit von der Solutkonzentration

Zur Herstellung gesättigter Lösungen von DKP in Wasser, bzw. den Solutelösungen wurden jeweils 150 μl Lösung (0 bis 2 M) und eine Spatelspitze DKP in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Köln) gegeben. Die Proben wurden für 48 h im Temperaturschrank (BK600, Fa. Heraeus Instruments, Hanau) bei 25°C inkubiert und dabei kräftig geschüttelt (IKA-Vibrax VXR, Janke & Kunkel, Staufen). Es wurden jeweils drei unabhängige Ansätze gemacht wobei darauf geachtet wurde, dass die Lösungen immer gesättigt waren, dass heisst immer ein kleiner Bodensatz vorhanden war. Gegebenenfalls wurde DKP nachgegeben. Die Suspensionen wurde für 10 min bei $16.060 \times g$ zentrifugiert (Biofuge *Pico*, Heraeus Instruments, Hanau) und die gesättigten Lösungen wurde vom Niederschlag getrennt. Die gelöste Menge an DKP in der Solutelösung wurde mittels isokratischer HPLC quantifiziert, nachdem der Überstand mit HPLC-Laufmittel (75 % (v/v) Acetonitril) 1:150 verdünnt wurde.

2.3.3.2. Maximale Löslichkeit der 20 biogenen Aminosäuren in Wasser und 2 M Solutlösung

Die Herstellung der gesättigten Aminosäurelösungen erfolgte analog zu den DKP-Lösungen. Es wurde kristalline Aminosäure zu den Lösungen der kompatiblen Solute (jeweils 2 M) gegeben, bis sich ein bleibender Niederschlag bildete. Die Suspensionen wurden für 48 h im Temperaturschrank (BK600, Fa. Heraeus Instruments, Hanau) bei 25°C geschüttelt (IKA-Vibrax VXR, Janke & Kunkel, Staufen), anschließend für 10 min bei $16.060 \times g$ zentrifugiert (Biofuge *Pico*, Heraeus Instruments, Hanau) und die gesättigten Lösungen vom Niederschlag getrennt.

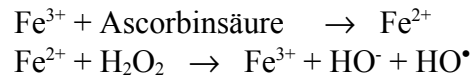
Die Quantifizierung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin erfolgte photometrisch (UV-Spektrometer: Ultrospec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 274$ nm mittels einer Kalibrationsgeraden. Die hydrophoben, ungeladenen sowie die aromatischen Aminosäuren (Alanin, Asparagin, Glutamin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin und Valin) wurden mittels isokratischer HPLC (1:10 bis 1:100 mit Laufmittel verdünnt) quantifiziert. Die Konzentrationsbestimmung der sauren Aminosäuren Aspartat (1:100.000) und Glutamat (1:70.000) sowie der Basischen Arginin (1:100.000), Histidin (1:2.000) und Lysin (1:13.000) erfolgte nach FMOC-Derivatisierung mittels Gradienten-HPLC. Der jeweilige Verdünnungsfaktor ist in Klammern hinter den Aminosäuren angegeben. Ferner wurden all diejenigen Aminosäuren, deren Peaks in der isokratischen HPLC aufgrund des extrem großen Solut-Peaks verdeckt und somit nicht zu quantifizieren waren, nach entsprechender weiteren Verdünnung (1:10.000, für Prolin 1:230.000) mittels Gradienten-HPLC bestimmt.

2.3.4. Schutzwirkung kompatibler Solute gegen Radikalschädigungen

Da Radikale bei der Lagerung von biologischen Materialien häufig zu starken Schädigungen führen, wurden die Radikalfängereigenschaften der Solute näher untersucht. Dazu wurde der von HALLIWELL & GUTTERIDGE (1984) entwickelte und von KARLA (1997) modifizierte Radikalfängertest verwendet. Die Generation von Hydroxylradikalen (HO^\bullet) erfolgt dabei mittels Wasserstoffperoxid, Fe^{3+} und Ascorbinsäure. Die Ascorbinsäure reduziert das Fe^{3+} zu Fe^{2+} und verhindert die Entstehung von Superoxid-Radikalen (HO_2^\bullet), die

ebenfalls aus H_2O_2 entstehen können und in der Lage sind das Eisen zu reduzieren (ROWLEY & HALLIWELL, 1982).

Die folgenden Gleichungen beschreiben die Entstehung von HO^\bullet :



Die Hydroxylradikale hydroxylieren farbloses Salicylat zu Hydroxysalicylat (Dihydroxybenzoesäure, DHBA), welches mit Fe^{3+} zu einem farbigen Komplex reagiert. Die Produktbildung wurde UV-spektroskopisch (Ultraspec 2000, Fa. Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) bei 505 nm verfolgt. Gibt man nun ein Solut zu dem Test, so konkuriert das Solut mit dem Salicylat um die freien Hydroxylradikale. Ein guter Radikalfänger reagiert selber schnell mit den Radikalen und verhindert somit die Bildung des Detektormoleküles Hydroxysalicylat.

Der Test setzte sich aus folgenden Lösungen zusammen, die täglich frisch angesetzt und für 15 min im Vakuum entgast wurden:

Kaliumphosphatpuffer (0,5 M) pH 7,4	100 μl
Ascorbinsäure (5,2 mM)	100 μl
Eisen-III-EDTA (3 mM)	100 μl
Na-Salicylat (50 mM)	100 μl
Solutlösung (2 M)	0 - 500 μl
aqua bidest.	598 - 98 μl

Die Lösungen wurden direkt in Einwegküvetten (Fa. Brand, Wertheim) gemischt. Die Endkonzentration an Solut war: 0 M; 0,05 M; 0,1 M; 0,25 M; 0,5 M sowie 1 M. Die Extinktion bei 505 nm der Referenzprobe ohne Solut wurde vor Beginn der Messung auf 0 gesetzt. Anschließend wurde die Radikalproduktion durch Zugabe von 2 μl H_2O_2 -Lösung (3 % (w/v)) gestartet und die Absorption bei 505 nm über einen Zeitraum von 7 h aufgezeichnet. Die Aufzeichnung der Daten sowie die Auswertung erfolgte mit dem Programm SWIFT Reaction Kinetic (Version 1.05; 1997) der Fa. Pharmacia Biotech (Cambridge, UK).

Während der Messung wurde bis 2 h alle 15 min, bis 7 h alle 30 min der Gehalt an H_2O_2 mittels Merckoquant[®] Peroxid-Test (Fa. Merck, Darmstadt) ermittelt. Bei den Proben, die nach 7 h immer noch Wasserstoffperoxid enthielten wurde die Messung fortgesetzt, bis kein H_2O_2 mehr nachweisbar war. Dabei wurden die Messintervalle entsprechend verlängert.

2.3.5. Einfluss von kompatiblen Soluten und Salzen auf die PCR-Reaktion

Die PCR stellt eine weit verbreitete Methode zur schnellen Amplifikation von DNA-Fragmenten dar. Der hohe Grad an Automatisierung lässt sich bei der PCR aber nur voll ausnutzen, wenn möglichst viele Bedingungen vorhergesagt werden, bzw. konstant gehalten werden. Die Salzkonzentration im Ansatz und hier besonders die Mg^{2+} -Konzentration hat eine große Auswirkung auf das Temperaturprofil, welches für die Ausbeute und Selektivität der PCR-Reaktionen entscheidend ist. Zweiwertige Kationen wie Magnesium steigern den T_m von DNA und machen somit höhere Temperaturen zur Aufspaltung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) nötig. Diese höheren Temperaturen können die Aktivität der Polymerase verringern (LAPIDOT et al., 1999). Andererseits ist Mg^{2+} als Cofaktor für die Taq-Polymerase nötig. In herkömmlichen PCR-Ansätzen ist die Mg^{2+} -Konzentration daher oft nur suboptimal. Kompatible Solute wie z. B. Betain (REES et al., 1993), Prolin (RAJENDRAKUMAR et al., 1997) und Ectoin (LAPIDOT et al., 1999), senken den T_m von dsDNA und destabilisieren die doppelsträngige DNA somit. Gegenüber Proteinen hingegen haben kompatible Solute ihre Eigenschaften als Stabilisatoren vielfach unter Beweis gestellt (LIPPERT & GALINSKI, 1992; GÖLLER & GALINSKI, 1999; KNAPP et al., 1999). Somit können sie bei der PCR von doppeltem Nutzen sein. Sie können zum Einen die zum Schmelzen der dsDNA erforderliche Temperatur senken, und zum Anderen das Enzym gegen den verbleibenden Hitzestress schützen. Es stellt sich nun die Frage, wie eine Kombination von Solut und Salz sich auf die PCR auswirkt und ob die kompatiblen Solute in der Lage sind die T_m -Erhöhung durch eine erhöhte Mg^{2+} -Konzentration zu kompensieren.

2.3.5.1. Amplifikation der DNA

Die Amplifizierung der DNA erfolgte mittels *TaqMan*-PCR (BLECK, 2001) in einem GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt).

Die dsDNA-Menge wurde dabei fluoreszenzspektrometrisch quantifiziert. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green eingesetzt, der sich nur in die grosse Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Die Versuche wurden in 96-well Mikrotiterplatten mit einer Vielzahl an verschiedenen DNA-Primer-Kombinationen durchgeführt. Die PCR-Produkte für

diese Versuche wurden freundlicherweise vom Arbeitskreis Spener (Institut für Biochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) sowie von der Arbeitsgruppe Engel (Institut für Arterioskleroseforschung, Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster) zur Verfügung gestellt. Ein Einfluss der DNA oder des Primers auf die Schmelzpunktverschiebung konnte nicht festgestellt werden, weshalb diese Komponenten nicht extra in dieser Arbeit aufgelistet werden. Der GC-Gehalt der Proben lag zwischen 50 und 60 %. Unter den Proben befanden sich sowohl tierische als auch humane DNA. Hier die allgemeine Zusammensetzung der PCR-Proben, sowie das Temperaturprogramm:

Zusammensetzung:	cDNA	1,25 µl
	Forward-Primer (15 µM)	1,00 µl
	Reverse-Primer (15 µM)	1,00 µl
	SYBR® Green PCR Master Mix	..	7,88 µl
	steriles aqua demin.	13,87 µl

Temperaturprogramm:	Vorlauf	60 °C	2 min
	1. Denaturierung	95 °C	10 min
	Primer-Anealing + Elongation (40 Zyklen)	60 °C	1 min
	Denaturierung	95 °C	15 s

Nach Abschluß der Amplifizierung wurde der Schmelzpunkt T_m^1 der doppelsträngigen DNA bestimmt. Dazu wurden die Proben von 60°C auf 95°C aufgeheizt, während die Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR® Green gemessen wurde. Da der Farbstoff nur fluoresziert, wenn er in der grossen Furche doppelsträngiger DNA eingelagert ist, nimmt das Fluoreszenzsignal beim Aufschmelzen der dsDNA ab. Der Wendepunkt in der Schmelzkurve (oder Peak in der ersten Ableitung der Schmelzkurve) ist der Schmelzpunkt T_m^1 .

2.3.5.2. Einfluss von kompatiblen Soluten und Salzen auf die Stabilität von DNA

Die fertig amplifizierte DNA (25 µl) wurde mit 25 µl Solut- bzw. Salzlösung (jeweils 2-fach Stammlösungen) versetzt. Die Solute Ectoin, Hydroxyectoin, DHMICA, Homoectoin, DCE, Betain und TMAO wurden in einer Endkonzentration zwischen 0 und 1 M verwendet, die Salze MgCl₂, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂, KCl und NaCl im Konzentrationsbereich von 0 - 0,5 M.

Bei der Kombination von Soluten und Salzen wurden zu den 25 µl PCR-Produkt jeweils 12,5 µl Solut- sowie Salzlösung gegeben, so dass die Solute in einer Endkonzentration von 0,5 M vorlag, während die Salzkonzentration zwischen 0 und 0,25 M variierte.

Es wurden Doppelansätze gemacht, wobei die beiden Proben der Doppelbestimmung nicht zwei gleichen PCR-Proben entsprachen. Nach der Zugabe der Zusätze wurden fünf weitere Amplifizierungszyklen (Temperaturprofil siehe oben) durchlaufen, bevor der Schmelzpunkt T_m^2 der dsDNA erneut bestimmt wurde. Daraus wurde die Schmelzpunktverschiebung;

$$\Delta T_m = T_m^2 - T_m^1$$

berrechnet, die durch den Zusatz der Solute, bzw. Salze oder deren Kombination bewirkt wurde.

3. Ergebnisse

Zunächst sind hier die Ergebnisse der Synthesen der kompatiblen Solute und deren spektroskopische und chromatografische Charakteristika aufgeführt und im Anschluss daran werden die Wechselwirkungen der Solute mit Bakterien, Proteinen und Ribonucleinsäuren aufgeführt. Am Ende des Kapitels sind die Ergebnisse noch einmal tabellarisch zusammengefasst. Die Charakteristika der Solute befinden sich in Tabelle 3.3a. während die Wechselwirkungen in Tabelle 3.3b. aufgelistet sind.

3.1. Synthese von Soluten mit ectoinanaloger Struktur

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die chemische Synthese von Soluten, die in ihrer Struktur dem natürlichen kompatiblen Solut Ectoin ähneln. Die Solute sind in den Strukturformeln in der ionischen Form dargestellt, so wie sie in Lösung bei neutralem pH vorliegen. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome in den Abbildungen bezieht sich auf die Bezeichnung der C-Atome bei den ^{13}C -NMR-Spektren, nicht auf die Nummerierung bei der Namensgebung.

Die Ausbeute bezieht sich auf die in der Synthese eingesetzte Stoffmenge an Diaminokomponente. Die Peakflächen der isokratischen HPLC (Flächeneinheiten/mM; FE/mM) sind abhängig von den Detektoren und der verwendeten Software und können daher nur untereinander verglichen werden. Sie wurden für den IR-Detektor auf 1.000 Fe/mM, für den UV-Detektor auf 100.000 Fe/mM gerundet.

Neben den Synthesedaten und Eigenschaften der neu synthetisierten Solute sind auch die Eigenschaften des käuflich erworbenen Solutes Hydroxyectoin aufgeführt. Die Charakteristika der natürlichen und synthetisierten Solute sind in Tabelle 3.3a. noch einmal zusammengefasst.

3.1.1. Synthese von zyklischen Soluten mit zwitterionischer Struktur

Zyklische Solute mit zwitterionischer Struktur konnten analog zur Synthese von KOICHI et al. (1991) hergestellt werden. Die Acetylierung von 2,3-Diaminopropionsäure, 2,4-Diaminobuttersäure, L-Ornithin und L-Lysin mit Orthoessigsäuretrimethylester mit anschließender Zyklisierung der N-acetylierten Zwischenverbindungen führte zu den gewünschten Produkten.

Aus dem Essigsäureester entstanden als Nebenprodukte Methanol und Essigsäure. Bei der kondensierenden Zyklisierung entstand zudem Wasser, welches zusammen mit dem Methanol und der Essigsäure am Rotationsverdampfer entfernt wurde. Als Nebenprodukte konnten im ^{13}C -NMR jeweils die offenkettige, sowie die zweifach N,N'-acetylierte Diaminokomponente identifiziert werden.

Bei den Reaktionen mit L-Ornithin und L-Lysin trat zudem eine gelborange-Färbung sowie eine Erhöhung der Viskosität der Lösung auf, welches auf eine verstärkte Polymerisation der acetylierten Zwischenstufe als Nebenreaktion der Ringkondensation hindeutet.

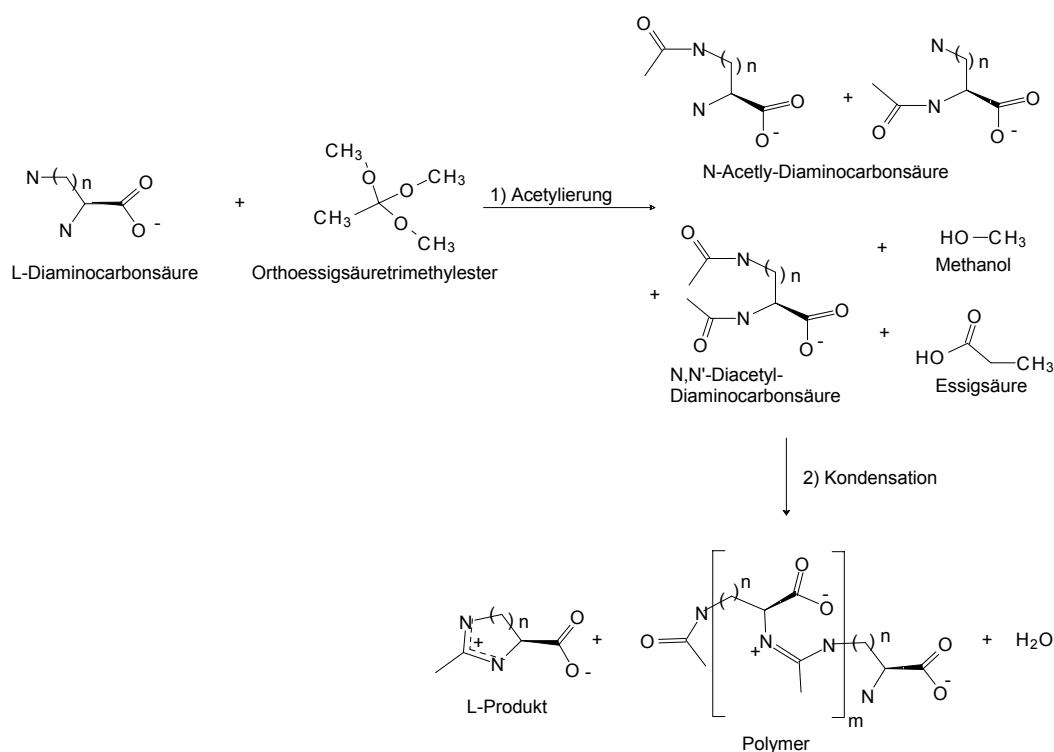
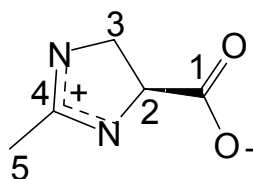


Abb. 3.1.1.: Reaktionsschema der zweistufigen Synthese der zyklischen Solute mit zwitterionischer Struktur. n variiert zwischen 1 - 4, $n = 2$ entspricht dem natürlichen Solut Ectoin. m ist der Polymerisationsgrad.

Das bei der Neutralisation der Hydrochloride entstehende NaCl, Eduktreste sowie die acetylierten Nebenprodukte konnten säulenchromatografisch über einen Ionenverzögerer (AG11A8, Fa. Biorad, Californien, USA) entfernt werden. Dieser wurde mit aqua demin. Wasser regeneriert. Nach der anschließenden Umkristallisation der Rohprodukte aus getrocknetem Methanol lagen die neu synthetisierten Solute in Reinstform vor.

3.1.1.1. Synthese von 4,5-Dihydro-2-methylimidazol-4-carbonsäure (DHMICA)



Da es ein Ziel dieser Arbeit war ein möglichst kostengünstiges, einfach herzustellendes Solut zu synthetisieren und das reine L-Isomer der 2,3-Diaminopropionsäure sehr viel teuer im Verhältnis zu der D,L-Form war, wurde DHMICA nur als racemisches Isomerenmisch aus D- und L-DHMICA hergestellt. Das Produkt reagierte leicht hygroskopisch und wurde deshalb entweder im Vakuum über Kieselgel oder in fest verschlossenen Kunststoffgefäßen gelagert.

Summenformel: $C_5H_8N_2O_2$

Molmasse: 128,131 g/mol

Ausbeute: 58,6 %

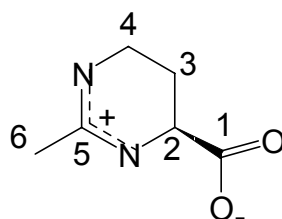
Reinheit nach FMOC-Analyse: > 99 %

isokratische HPLC: RT: 5,4 - 6,8 min
UV_{220nm}: 4.900.000 FE/mM
RI: 65.000 FE/mM

CHN-Analyse: berechnet: C: 46,87 H: 6,29 N: 21,86
gefunden: C: 46,56 H: 6,29 N: 21,60

¹³C-NMR (75,5 MHz, D₂O): δ = 14,70 (C-5), 51,42 (C-3), 62,42 (C-2), 170,80 (C-4), 178,65 (C-1) ppm.

3.1.1.2. Synthese von 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin-4-carbonsäure (L-Ectoin)



Die chemische Synthese des natürlich vorkommenden L-Ectoines nach KOICHI et al. (1991) gelang ohne Probleme im Eintopfverfahren. Der Orthoessigsäuretrimethylester acetyliert die L-2,4-Diaminobuttersäure zu α N-Acetyl-diaminobuttersäure (α NAc-DABA) und γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (γ NAc-DABA), welche unter Abspaltung von Wasser zum gewünschten Produkt zyklisieren. Dabei fördert eine erhöhte Temperatur ($T = 50^{\circ}\text{C}$) den kondensierenden Ringschluss. Da das Stereozentrum der 2,4-Diaminobuttersäure nicht an der Reaktion teilnimmt, entsteht nur L-Ectoin als Produkt. Über die gleiche Reaktion ist es auch möglich das racemisches D,L-Ectoin, bzw. reines D-Ectoin herzustellen, wenn man das Stereozentrum der DABA entsprechend wählt. L-Ectoin kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$

Molmasse: 142,158 g/mol

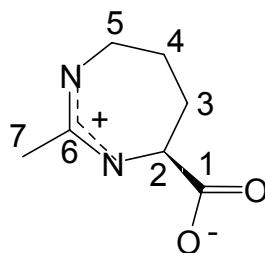
Ausbeute: 65 %

Reinheit nach FMOC-Analyse: > 99 %

isokratische HPLC: RT: 5,8 - 6,8 min
UV_{220nm}: 8.000.000 FE/mM
RI: 81.000 FE/mM

^{13}C -NMR (75,5 MHz, D_2O): $\delta = 21,00$ (C-6), 24,16 (C-3), 40,06 (C-4), 55,95 (C-2), 163,27 (C-5), 179,29 (C-1) ppm.

3.1.1.3. Synthese von 4,5,6,7-Tetrahydro-2-methyl-1H-[1,3]-diazepin-4-carbonsäure (Homoectoin)



Homoectoin konnte nach der gleichen Synthese wie DHMICA und Ectoin hergestellt werden, wobei L-Ornithin als Diaminokomponente gewählt wurde. Auch hier ist die Herstellung verschiedener Enantiomere durch die Wahl des Eduktes möglich. Die Ausbeute lag mit durchschnittlich 25 % deutlich unter der Ausbeute der Ectoin- und DHMICA-Synthese (65 % bzw. 58,6 %). Dieses lässt sich ganz einfach durch die grössere Ringspannung im Homoectoin erklären. Da die beiden Stickstoffatome sp^2 -hybridisiert sind bilden sie mit den beiden flankierenden und dem dazwischenliegenden C-Atom eine planare Ebene. Das Einfügen einer weiteren CH_2 -Gruppe in den Ring führt zu einer stärkeren Ringspannung, die die Atome C-3 und C-4 weiter aus der Ebene der Stickstoffatome herausdrückt. Da ein solcher Ringschluss des acetylierten Ornithins energetisch wesentlich ungünstiger ist, kommt es neben den analog zur Ectoinsynthese üblichen Nebenprodukten α N-Acetyl-ornithin, δ N-Acetyl-ornithin und N,N'-Diacetyl-ornithin auch verstärkt zu einer polymeren Kondensation zweier acetylierter Zwischenstufen, so dass sich als Nebenprodukt ein Polymer bildet, welches das Reaktionsgemisch gelblich färbt und das Rohprodukt nach dem Entfernen des Lösungsmittels zu einem zähen Brei verklebt. Durch Absaugen des auskristallisierten Homoectoins wurde das gewünschte Produkt von dem Polymer getrennt. Das Polymer wurde aufgrund der relativ geringen Kosten für die Edukte verworfen.

Summenformel: $C_7H_{12}N_2O_2$

Molmasse: 156,184 g/mol

Ausbeute: 25 %

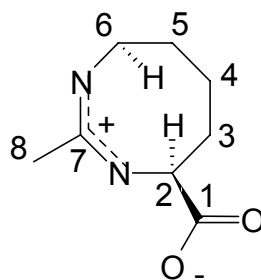
Reinheit nach FMOC-Analyse: > 99 %

isokratische HPLC: RT: 4,2 - 5,1 min
UV_{220nm}: 7.500.000 FE/mM
RI: 85.000 FE/mM

CHN-Analyse: berechnet: C: 53,83 H: 7,74 N: 17,94
gefunden: C: 53,88 H: 7,88 N: 18,30

¹³C-NMR (75,5 MHz, D₂O): δ = 23,38 (C-7), 27,16 (C-4), 32,45 (C-3), 46,22 (C-5),
61,58 (C-2), 168,09 (C-6), 179,23 (C-1) ppm.

3.1.1.4 Synthese von 3,4,5,6,7,8-Hexahydro-2-methyl-1,3-diazocin-4-carbonsäure (HHMDCA)



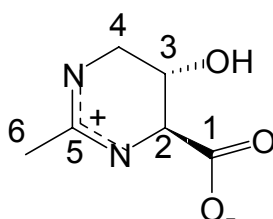
Erweitert man den Ring des Homoocitons noch um eine weitere CH_2 -Gruppe, so wirkt das Molekül der steigenden Ringspannung dadurch entgegen, dass die Atome C-3, C-4 und C-5 einen fast senkrecht auf der Ebene der Stickstoffe stehenden Loop bildet. Die Carboxylgruppe steht dabei in fast ideal equatorialer Stellung. Je ein Wasserstoffatom am C-2 und C-6 (s. obige Abbildung) kommen sich in dieser Konstellation im Ringinneren so nahe, dass es zu einer sterischen Behinderung kommt, die den Ringschluss der acetylierten Zwischenverbindung unterdrückt. Als unerwünschte Nebenreaktion tritt daher die Kondensation von zwei oder mehreren N-Acetyl-lysin-Molekülen zu einem Polymer in den Vordergrund. Die Wahrscheinlichkeit das sich die Enden zweier verschiedener Moleküle treffen wird grösser, als die Möglichkeit des Ringschlusses. Damit verbunden ist eine Erhöhung der Viskosität des orangen klebrigen Rohproduktes. Charakteristisch für das zyklische Produkt ist der Peak des C-7-Atoms im ^{13}C -NMR bei 166,45 ppm, der weder bei dem Polymer, noch bei der zweifach acetylierten Diaminiokomponente auftritt. Da der 8er-Ring nur mit einem Anteil von unter 1 % gebildet wurde, konnte er zwar NMR-spektroskopisch im Rohprodukt nachgewiesen, aber nicht isoliert werden.

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

Molmasse: 170,211 g/mol

^{13}C -NMR (75,5 MHz, D_2O): $\delta = 19,23$ (C-8), 28,46 (C-4), 28,75 (C-5), 28,94 (C-3), 44,09 (C-6), 56,64 (C-2), 166,45 (C-7), 181,53 (C-1) ppm.

3.1.2. Charakterisierung von S,S-β-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydro-2-methylpyrimidin-4-carbonsäure (Hydroxyectoin)



Hydroxyectoin liess sich nicht nach der Synthese wie sie für Ectoin angewendet wurde herstellen, da die dazu benötigte S,S-3-Hydroxy-2,4-diaminobuttersäure nicht käuflich zu erwerben war. Eine chemische Synthese dieser Verbindung ist aufgrund des zusätzlichen Stereozentrums am C-3 sehr aufwendig, so dass es kostengünstiger in Bakterien zu produzieren ist. Das von der Fa. Bitop (Witten) erworbene Hydroxyectoin wurde mit den gleichen Methoden analysiert und charakterisiert wie die selbst synthetisierten Solute.

Summenformel: $C_6H_{10}N_2O_3$

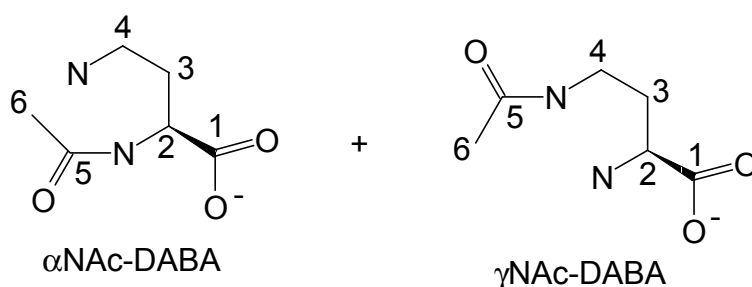
Molmasse: 158,157 g/mol

Reinheit nach FMOC-Analyse: > 99 %

isokratische HPLC: RT: 6,4 - 7,6 min
UV_{220nm}: 7.000.000 FE/mM
RI: 85.000 FE/mM

¹³C-NMR (75,5 MHz, D₂O): δ = 20,79 (C-6), 45,46 (C-4), 62,26 (C-2), 62,67 (C-3), 163,33 (C-5), 177,00 (C-1) ppm.

3.1.3. Synthese von α - und γ N-Acetyl-diaminobuttersäure (α - und γ NAc-DABA)



Zur Synthese von NAc-DABA wurden zwei Strategien verfolgt. Die Erste war die Acetylierung der Diaminobuttersäure zu den beiden Produkten α - und γ NAc-DABA während die zweite Strategie von Ectoin ausging, welches alkalisch hydrolysiert wurde um zu den gewünschten Produkten zu gelangen.

3.1.3.1. Acetylierung von L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA)

Die Acetylierung von DABA mittels Essigsäureanhydrid, führte mit einer Ausbeute von ca. 60% zu einem 1:1 Gemisch der beiden Produkte, welche mittels isokratischer HPLC sowie NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden konnten. Nebenprodukte der Reaktion waren Essigsäure und die durch doppelte Acetylierung entstehende L-N,N'-Diacetyl-2,4-diaminobuttersäure. Die einfach acetylierten Produkte konnten aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und den daher ähnlichen physikalischen Eigenschaften aber nicht voneinander getrennt werden. Durch Erhitzen der beiden Produkte in Lösung auf ca. 50°C wandelten sie sich irreversibel in Ectoin um.

3.1.3.2. Alkalische Hydrolyse von Ectoin zu γ NAc-DABA

Bei der alkalischen Hydrolyse von Ectoin zu α NAc-DABA und γ NAc-DABA in 50 %igem Methanol entstand nach der abschließenden Umkristallisation reines γ NAc-DABA. HPLC-Untersuchungen im Verlauf der Hydrolyse haben ergeben, dass zunächst verstärkt α NAc-DABA entstand. Nach 5 h wurde eine maximale Konzentration von 50 % bezogen auf die eingesetzte Substratmenge erreicht. Die Konzentration von γ NAc-DABA lag zu dieser Zeit bei 40 % und 10 % Ectoin waren noch nachzuweisen. Anschließend sank die Menge an α NAc-DABA auf 20 % ab, während der Anteil an γ NAc-DABA kontinuierlich auf 80 % anstieg. Nach 7 h änderte sich die Ectoinrestkonzentration von 2,5 % nicht mehr. Eine Isolierung von reinem α NAc-DABA gelang nicht. Auch durch einen Abbruch der Hydrolyse bei der maximalen α NAc-DABA-Konzentration nach 5 h, konnte α NAc-DABA nicht in Reinform gewonnen werden, da das Produkt sich entweder zu γ NAc-DABA oder zu Ectoin umlagerte.

Summenformel: $C_6H_{12}N_2O_3$

Molmasse: 160,173 g/mol

Ausbeute: 44 %

Reinheit nach FMOC-Analyse: > 99 %

isokratische HPLC: RT: 7,3 - 12,5 min
UV_{220nm}: 900.000 FE/mM
RI: 68.000 FE/mM

CHN-Analyse: berechnet: C: 44,99 H: 7,55 N: 17,49
gefunden: C: 44,62 H: 7,55 N: 17,06

¹³C-NMR (75,5 MHz, D₂O): δ = 24,63 (C-3), 33,08 (C-6), 38,32 (C-4), 55,35 (C-2), 176,93 (C-5), 177,39 (C-1) ppm.

3.1.3.3. Charakterisierung von α NAc-DABA

Das α NAc-DABA, welches als Zwischenprodukt bei der alkalischen Hydrolyse von Ectoin zeitweise enthalten war, wurde mittels ^{13}C -NMR und isokratischer HPLC identifiziert. Da es nicht in Reinform vorlag, sondern immer mit γ NAc-DABA und Ectoin verunreinigt war, lassen sich die Flächenfaktoren aus der isokratischen HPLC nur grössenordnungsmässig angeben. Bei der Berechnung wurden die Verunreinigungen quantifiziert und von der eingesetzten Masse abgezogen. Die Fläche des α NAc-DABA-Peak lässt sich nun auf die so reduzierte Substanzmenge beziehen.

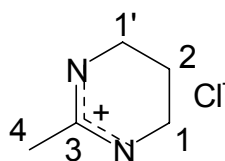
Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$

Molmasse: 160,173 g/mol

isokratische HPLC: **RT:** 11,0 - 13,5 min
UV_{220nm}: ca. 2.000.000 FE/mM
RI: ca. 72.000 FE/mM

^{13}C -NMR (75,5 MHz, D_2O): $\delta = 26,20$ (C-3), 40,41 (C-6), 40,59 (C-4), 56,90 (C-2), 178,50 (C-5), 185,97 (C-1) ppm.

3.1.4. Synthese von 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin Hydrochlorid (Decarboxy-Ectoin, DCE)



Die Synthese von DCE gelang in sehr guten Ausbeuten und zufriedenstellender Reinheit durch die Kondensation von Acetamidin und 1,3-Diaminopropan. Da bei der Reaktion in Methanol NH_3 entweicht, muss die Synthese im Abzug durchgeführt werden und das NH_3 nach Möglichkeit mit HCl neutralisiert werden. Als einzige Verunreinigung konnte NH_4Cl nachgewiesen werden. Der NH_3 -Peak in der Fmoc-HPLC zeigte eine Verunreinigung von ca. 1 %, die durch Umkristallisation aus aqua bidest./Methanol nicht entfernt werden konnte. Spuren der Edukte wurden ebensowenig gefunden, wie offenkettiges oder polymerisiertes Produkt.

Da DCE stark hygroskopisch reagierte, wurde es im Vakuum über getrocknetem Kieselgel gelagert.

Summenformel: $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2 \times \text{HCl}$

Molmasse: 134,609 g/mol

Ausbeute: 91 %

Reinheit nach Fmoc-Analyse: > 98 %

CHN-Analyse:	berechnet:	C: 44,61	H: 8,24	N: 20,81
	gefunden:	C: 43,82	H: 8,32	N: 20,54

^{13}C -NMR (75,5 MHz, D_2O): $\delta = 20,21$ (C-4), $20,94$ (C-2), $41,25$ (C-1, C-1'), $164,62$ (C-3) ppm.

3.2. Charakterisierung des protektiven Effektes der ectoinanalogen kompatiblen Solute auf biochemische Modellsysteme und *Escherichia coli*

Extremophile Organismen haben im Laufe der Evolution kompatible Solute entwickelt um ihre Zellen gegen die extremen Umweltbedingungen in ihren Lebensräumen zu schützen. Die aus den Organismen isolierten natürlichen Solute haben ihre protektiven Eigenschaften sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vielfach bewiesen, wie das breite Anwendungsspektrum zeigt (Kapitel 1.4.). Sie können sowohl bei der Lagerung getrockneter Zellen, zur Stabilisierung von Proteinen oder als Zusatz beim Arbeiten mit Ribonucleinsäuren eingesetzt werden. Wie die Solute die unterschiedlichen Biomoleküle auf molekularer Ebene stabilisieren ist zur Zeit jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Um zu untersuchen, ob die neu synthetisierten Solute (Kapitel 2.2. und 3.1.) ähnliche, stabilisierende Eigenschaften aufweisen, wie die natürlichen Solute wurden die Wechselwirkungen mit Hydroxylradikalen, DNA, Aminosäuren, RNase A und *E. coli*-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sollten ferner einen weiteren Einblick in den molekularen Wirkmechanismus der Solute geben.

3.2.1. Verhalten von *E. coli* DH5 α unter Salzstress

Ein sehr häufig im Labor und der Industrie verwendeter Mikroorganismus ist *E. coli*, welcher aufgrund seines normalen Lebensraumes als Darmbewohner keine natürliche Salztoleranz besitzt. Bei einer erhöhten Salinität strömt Wasser entlang des osmotischen Gradienten aus dem Cytosol ins Medium. Die Membranen stellen dabei für das Wasser kein Hindernis dar. Die intrazelluläre Wasseraktivität wird stark gesenkt, wodurch der Stoffwechsel der Zellen behindert wird, Enzyme, Nucleinsäuren und Membranen geschädigt werden können und die Zelle gegebenenfalls abstirbt. Um dem Wasserausstrom entgegenzuwirken, akkumuliert *E. coli* bei einer erhöhten Salinität im Medium Trehalose als Hauptsolut, wenn keine kompatiblen Solute aus dem Medium aufgenommen werden können. Betain und Ectoin können von *E. coli* aufgenommen werden und bewirken eine Salztoleranz bis ca. 4 % (w/v) NaCl im Medium.

Um das Verhalten von *E. coli* unter Salzstress zu untersuchen, wurden der Stamm *E. coli* DH5 α in Minimalmedium MM63 bei einer Salinität von 3 % (w/v) NaCl angezogen und das

Medium mit verschiedenen Soluten supplementiert. Die Kombination von Ectoin und steigenden Mengen an DCE sollte Aufschluss geben, ob sich die Solutaufnahmen gegenseitig beeinflussen und die Aufnahme von Ectoin gegebenenfalls kompetitiv durch die Aufnahme von DCE gehemmt werden kann.

3.2.1.1. Wachstum von *E. coli* DH5 α unter Salzstress

Das Wachstum von *E. coli* DH5 α wurde anhand der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Da es aufgrund der Messanordnung bei Zelldichten über 0,5 OD-Einheiten zu einer Abweichung des Messwertes vom realen Wert kommt, mussten die gemessenen Werte nach Dalgaard korrigiert werden. Die rechnergesteuerte Anpassung der Dalgaard-Gleichung an die aus der Verdünnungsreihe berechneten realen OD-Werte ergab für die beiden Variablen A und B Werte von:

$$A = 0,41 \qquad B = 4,0$$

Alle gemessenen OD-Werte der Wachstumsexperimente wurden also mittels folgender Dalgaard-Gleichung in die realen OD-Werte umgerechnet:

$$OD_{\text{real}} = OD_{\text{gemessen}} + 0,41 \times OD_{\text{gemessen}}^{4,0}$$

Da 3 % (w/v) NaCl nicht dem natürlichen Milieu entspricht, in dem *E. coli* normalerweise wächst, bedeutete die erhöhte Osmolarität für den Organismus einen gravierenden Stress. Dieser Stress bewirkte in Minimalmedium eine sehr kleine Wachstumsrate μ und somit eine grosse Verdopplungszeit t_D von ca. 5,5 h. Komplementiert man das Minimalmedium mit Soluten (jeweils 2 mM) so lassen sich die hier untersuchten Solute in drei Gruppen aufteilen

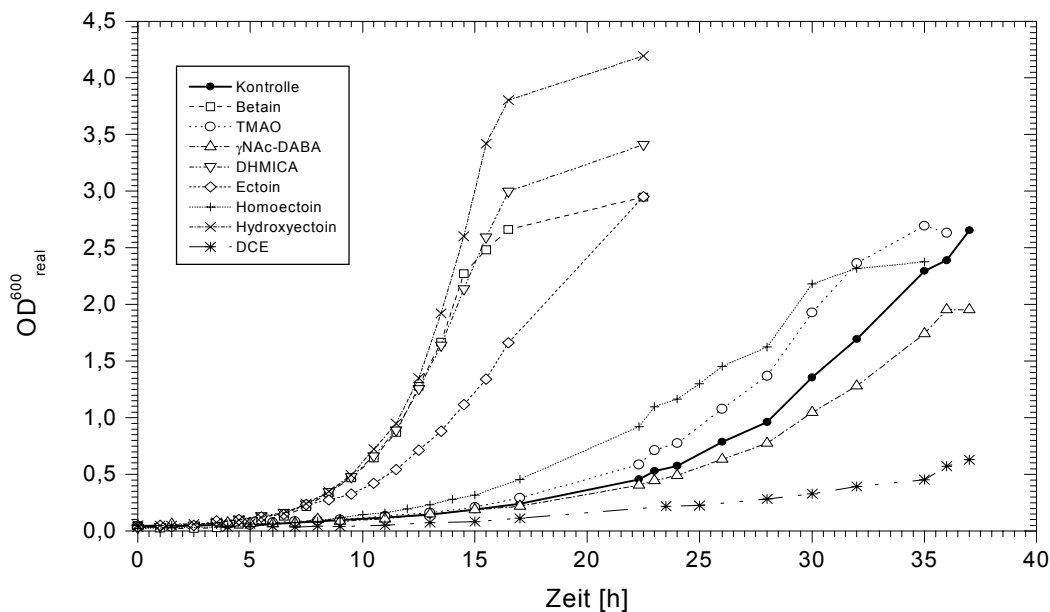


Abb. 3.2.1.1a.: Wachstumskurven von *E. coli* DH5 α in MM63 bei 3 % (w/v) NaCl und Supplementierung mit unterschiedlichen Soluten (jeweils 2 mM). Die Kurven stellen die Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar, wobei die Einzelwerte eine maximale Abweichung von 10 % hatten.

1. Solute, die das Zellwachstum beschleunigen:

Betain, DHMICA und Hydroxyectoin halfen *E. coli* den Salzstress zu überwinden und führten im Vergleich zu der Kontrolle ohne Solutzusatz zu einem beschleunigten Wachstum der Zellen. Ectoin beschleunigte das Zellwachstum nicht so stark wie Betain, DHMICA oder Hydroxyectoin. Die Verdopplungszeit mit Ectoin war aber nur halb so gross wie die der Kontrolle. Die mit Hydroxyectoin supplementierten Kulturen erreichten mit einer maximalen OD von 4,2 die höchste Zelldichte, vor den Kulturen welche mit DHMICA ($OD^{\max} = 3,41$), Betain und Ectoin ($OD^{\max} = 2,95$) ergänzt wurden.

2. Solute, die fast keinen Einfluss auf das Zellwachstum haben:

Homoectoin, TMAO und γ Nac-DABA hatten im Rahmen der Messungengenauigkeit fast keinen Einfluss auf das Zellwachstum. Homoectoin und TMAO steigerten die Wachstumsgeschwindigkeit nur geringfügig, während γ Nac-DABA leicht inhibierend wirkte. Diese Kulturen erreichten durchschnittlich eine maximale OD von 2,5 OD-Einheiten.

3. Solute, die stark wachstumshemmend wirken:

DCE führte zu einer starken Wachstumshemmung. Die mit DCE supplementierten Kulturen erreichten mit einer OD von 0,46 eine wesentlich geringere maximale OD, als alle anderen Kulturen.

Die Werte der Wachstumsraten, Verdopplungszeiten und der maximaler OD sind in Tabelle 3.2.1.2. (Seite 67) zusammengefasst. Da DCE eine deutliche Wachstumshemmung bewirkte, wurde ferner untersucht, ob die Ectoinaufnahme durch die Zugabe von DCE zum Minimalmedium gehemmt werden kann. Dazu wurden Kulturen mit 2 mM Ectoin und steigenden Mengen (0 - 10 mM) DCE supplementiert und deren Wachstum über die optische Dichte verfolgt.

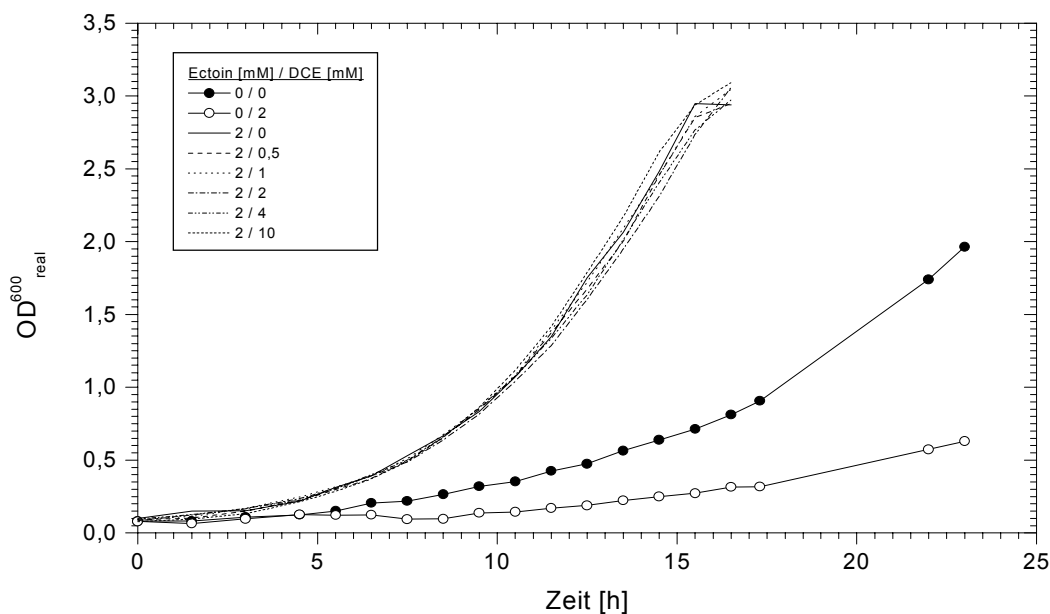


Abb. 3.2.1.1b.: Wachstumskurven von *E. coli* DH5 α in MM63 bei 3 % (w/v) NaCl und Supplementierung mit 2 mM Ectoin und steigender DCE-Konzentration zwischen (0 und 10 mM). Die Kurven stellen die Mittelwerte einer Doppelbestimmung dar. Bei den Einzelwerten trat eine maximale Abweichung von 10 % auf.

Abbildung 3.2.1.1b. zeigt deutlich, dass die Zugabe von DCE keinen Einfluss auf die mit Ectoin supplementierten Zellen hatte. Alle Kulturen, die Ectoin zum Ausgleich des

Salzstresses zur Verfügung hatten, wuchsen gleich schnell. Auch bei einem fünffachen Überschuss an DCE konnte die Wachstumshemmung, die bei der Supplementierung nur mit 2 mM DCE auftrat, nicht beobachtet werden. DCE hemmte die Aufnahme von Ectoin durch *E. coli* DH5 α also nicht. Ob die beiden Solute über dasselbe Transportsystem in die Zellen gelangen, kann nicht entschieden werden, da die K_m -Werte für die beiden Substanzen sich um mehrere 10er-Potenzen unterscheiden können. Somit würde ein 10-facher Überschuss an DCE die Aufnahme von Ectoin noch nicht messbar beeinflussen.

3.2.1.2. Solutaufnahme von *E. coli* DH5 α unter Salzstress

Da *E. coli* nicht in der Lage ist, einer erhöhten Osmolarität im Medium mit einer erhöhten Salzkonzentration im Zellinneren zu begegnen, wenn sich im Minimalmedium keine Komponenten befinden, die zum Ausgleich des osmotischen Gradienten akkumuliert werden könnten, produziert *E. coli* unter diesen Bedingungen Trehalose als Hauptsolut. Aus dem getrockneten Zellmaterial wurden die Solute mittels Mikroextraktion nach einer modifizierten Bligh & Dyer-Methode isoliert und mittels isokratischer HPLC quantifiziert. Die Kulturen, die kein Solut, γ Nac-DABA oder TMAO zur Verfügung hatten, häuften im Zellinneren ca. 0,35 - 0,40 mmol Trehalose/g TBM an. Dieses weist darauf hin, dass *E. coli* nicht in der Lage ist γ Nac-DABA und TMAO aufzunehmen und deshalb verstärkt Trehalose produziert um den Osmostress zu kompensieren. Die Wachstumsgeschwindigkeiten zeigten dieses ebenfalls. Die anderen Solute wurden von den Bakterien in die Zellen aufgenommen. Mit der Aufnahme der Solute ins Cytosol der Zellen sank die Trehalosekonzentration auf 0,05 - 0,15 mmol/g TBM ab. DCE konnte in der isokratischen HPLC mit den vorliegenden Säule nicht quantifiziert werden, da der Peak nicht vom Laufmittelpeak getrennt wurde. Ausserdem ist das verwendete Säulenmaterial ein schwacher Kationenaustauscher und es ergibt sich somit kein linearer Zusammenhang zwischen der DCE-Konzentration und Peakfläche. Aus der grossen UV-Absorption des Laufmittelpeaks, die nur bei DCE-haltigen Proben entstand und der kleinen Trehalose-Konzentration im Zellinneren lässt sich aber schließen, dass DCE von *E. coli* aufgenommen wird.

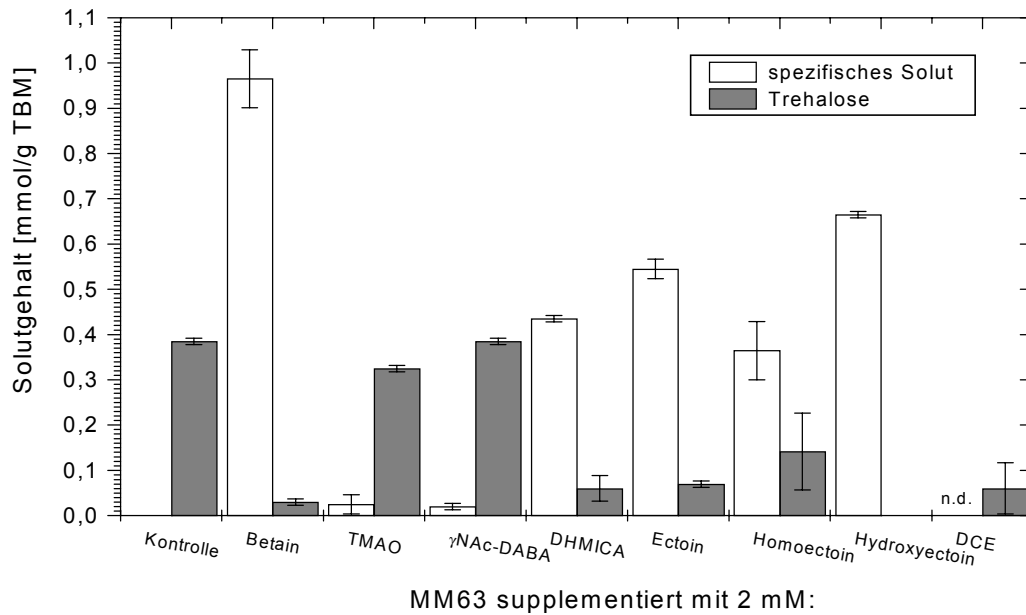


Abb. 3.2.1.2a.: Anteil von Trehalose und spezifischem Solut an der Trockenbiomasse von *E. coli* DH5 α nach Wachstum in MM63 bei 3 % (w/v) NaCl und unterschiedlicher Supplementierung mit kompatiblen Soluten (jeweils 2 mM).

Der Zusatz von Homoectoin zum Medium bewirkte im Gegensatz zu Betain, Ectoin, Hydroxyectoin und DHMICA keine vollständige Kompensation des Salzstress, was sich in einer Verdopplung der intrazellulären Trehalosekonzentration widerspiegelte. Obwohl der intrazelluläre Homoectoingehalt fast genauso hoch war, wie der DHMICA-Gehalt, half das Solut nicht gegen den Salzstress. Um den Osmostress trotzdem zu minimieren häuften diese Zellen verstärkt Trehalose an. Die folgende Tabelle zeigt noch einmal eine Zusammenfassung der Wachstumsparameter und Solutkonzentrationen in den Zellen.

Tab. 3.2.1.2.: Wachstumsparameter von *E. coli* DH5 α sowie Anteil der Solute und Trehalose an der Trockenbiomasse nach Wachstum in MM63 bei 3 % (w/v) NaCl und Supplementierung mit je 2 mM Solut.

	Wachstums- rate	Verdopplungs- zeit	maximale OD	Solutgehalt	
	μ	t_D	max. OD ⁶⁰⁰ _{real}	Trehalose	spez. Solut
	[h ⁻¹]	[h]		mmol/g TBM	mmol/g TBM
Kontrolle	0,13	5,46	2,65	0,39	0
Betain	0,38	1,87	2,95	0,03	0,97
TMAO	0,14	4,81	2,63	0,33	0,03
γNAc-DABA	0,12	5,98	1,95	0,39	0,02
DHMICA	0,34	2,06	3,41	0,06	0,44
Ectoin	0,26	2,63	2,95	0,07	0,55
Homoectoin	0,17	4,01	2,38	0,16	0,39
Hydroxyectoin	0,36	1,64	4,20	0	0,66
DCE	0,10	7,22	0,56	0,06	n.d.

Die Gegenwart von DCE beeinflusste die Aufnahmerate von Ectoin in *E. coli* DH5 α nicht. Wie sich schon aus den Wachstumskurven schließen lässt, beeinträchtigte die Anwesenheit eines fünffachen Überschusses an DCE die Aufnahmeleistung von Ectoin nicht.

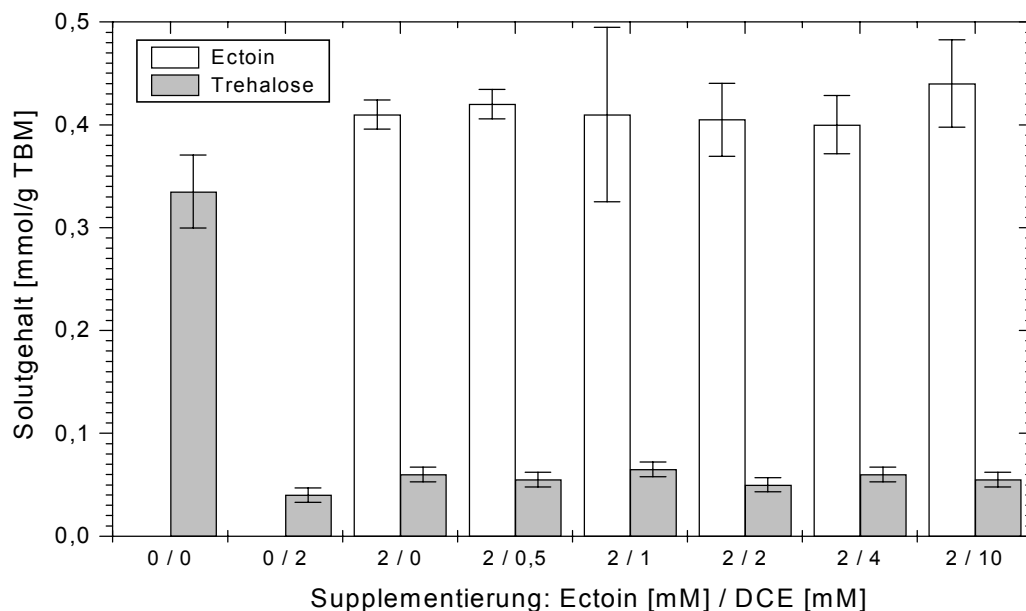


Abb. 3.2.1.2b.: Anteil von Trehalose und Ectoin an der Trockenbiomasse von *E. coli* DH5 α nach Wachstum in MM63 bei 3% (w/v) NaCl und Supplementierung mit 2 mM Ectoin und variabler DCE-Konzentration (0 - 10 mM).

Abbildung 3.2.1.2b. zeigt deutlich, dass die Trehalosekonzentration in den mit Ectoin supplementierten Kulturen von ca. 0,35 auf 0,05 mmol/gTBM abgenommen hat, während der Ectoinlevel im Rahmen der Fehlergrenzen in allen Ansätzen konstant bei 0,42 mmol/gTBM war.

Da auch die nur mit DCE supplementierten Kolben einen gesenkten Trehaloselevel zeigten, kann man vermuten, dass auch DCE in die Zellen aufgenommen wurde und so für einen Ausgleich des osmotischen Gradienten sorgte. Dieses Ergebniss wird ferner durch die grosse UV-Absorption des Laufmittelpicks gestützt. Die grosse UV-Absorption zeigte sich aber nur bei den Bakterien die DCE als einziges Solut zur Verfügung hatten. Die mit DCE und Ectoin supplementierten Kulturen zeigten die verstärkte UV-Absorption nicht. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen Ectoin wesentlich effektiver aufnehmen können als DCE. Obwohl DCE, wenn es als einziges Solut zugegeben wurde in die Zellen aufgenommen wurde und so den osmotischen Gradienten kompensierte, hemmte es gleichzeitig das Wachstum von *E. coli* DH5 α . Eine zu hohe DCE-Konzentration im Cytosol wirkte sich negativ auf den Zellstoffwechsel aus, und inhibierte das Wachstum. Deswegen wuchsen diese Kulturen auch wesentlich langsamer, als die Kontrollen ohne Solutzusatz.

3.2.1.3. Produktion des grün fluoreszierenden Reporterproteins GFP durch *E. coli* DH5 α pBRGFP_{UV-ectUp} unter Salzstress

E. coli DH5 α pBRGFP_{UV-ectUp} ist ein *E. coli*-Stamm, der das Plasmid pBRGFP_{UV-ectUp} besitzt, welches ihn befähigt in Abhängigkeit von der Stärke eines Salzschockes und des damit verbundenen Osmostresses das grün fluoreszierende Protein GFP zu produzieren. Aufbauend auf die Expressionsstudien von BESTVATER (2001; BESTVATER & GALINSKI, 2002) mit Betain und Ectoin als Solute, wurden DHMICA und Homoectoin als weitere Solute untersucht, ob sie den Osmostress für *E. coli* DH5 α pBRGFP_{UV-ectUp} senken oder gänzlich verhindern können. Dieses sollte sich durch eine gesenkte GFP-Produktion zeigen.

Wegen der besseren Übersicht sind in der folgenden Grafik die Werte von Betain und Ectoin von BESTVATER (2001) mit aufgeführt. Die absoluten Fluoreszenzen wurden auf die OD der entsprechenden Kultur bezogen und auf den Wert bei 1 % (w/v) NaCl normiert. Der Grundlevel der Fluoreszenz ohne Salzschock wurde also auf 1 (= 100 %) gesetzt. Die Solute selber sowie das Medium hatten keinen Einfluss auf die Fluoreszenz.

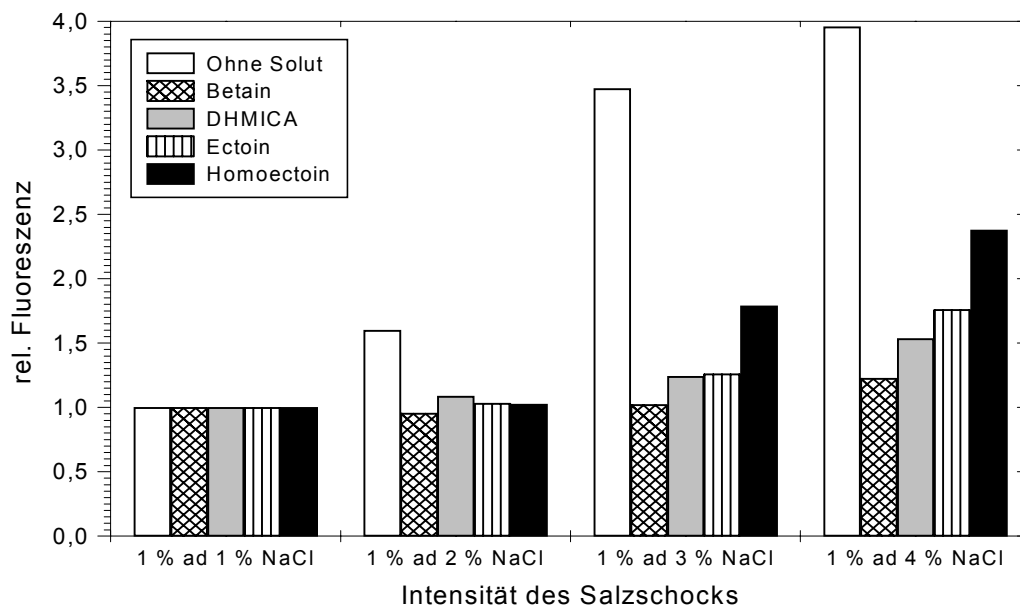


Abb. 3.2.1.3.: Relative Fluoreszenz von *E. coli* DH5 α pBRGFP_{UV-ectUp} 8 h nach dem Salzschock in MM63 bei unterschiedlicher Supplementierung (alle Solute 2 mM). Die Werte von Betain und Ectoin stammen von BESTVATER (2001).

Ein Vergleich der Solute untereinander zeigte, daß Betain, DHMICA, Ectoin und Homoectoin in die Zellen aufgenommen wurden und so den durch den Salzschock ausgelösten Osmogradienten aufhoben. Bei einem Salzschock von 1 % (w/v) auf 2 % (w/v) waren alle hier untersuchten Solute in der Lage den Salzstress zu kompensieren. Mit steigender Höhe des Osmostresses gelang dieses immer weniger, so dass die Fluoreszenz anstieg. Bei 3 % (w/v) und 4 % (w/v) NaCl zeigte sich deutlich, dass Homoectoin am schlechtesten den Stress kompensierte. Da der Homoectoinlevel in den Zellen ähnlich hoch war wie der DHMICA-Level, ist eine mögliche Interpretation, dass die Aufnahme von Homoectoin entweder wachstumslimitierend war oder Homoectoin nicht so gut gegen den Osmostress schützte. Dieses Ergebnis deutet weiter darauf hin, dass Homoectoin eventuell von *E. coli* DH5 α nur begrenzt aufgenommen werden kann. Wie die Wachstumsexperimente schon gezeigt haben, reichte die in den Zellen erreichte Konzentration an Homoectoin nicht zur vollständigen Kompensation des Osmostresses, der von einer Salzkonzentration von 3 % (w/v) ausging, aus.

Die Kulturen ohne Solutzusatz dagegen waren gar nicht in der Lage den Salzstress zu kompensieren und deshalb stieg auch die relative Fluoreszenz schon bei einem Salzschock von 1 % (w/v) auf 2 % (w/v) auf das 1,5fache an. Erhöhte man den Schock für die Bakterien noch weiter, so stieg die Fluoreszenz bis hin zum Vierfachen der Kontrolle an.

3.2.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf den Schmelzpunkt T_m von RNase A

Kompatible Solute stabilisieren Proteine gegen eine Vielzahl von Stresseinwirkungen (Kapitel 1.4.). Die Proteindenaturierung durch das thermische Aufschmelzen der Sekundär- und Tertiärstruktur von RNase A lässt sich im Kalorimeter sehr gut beobachten. Da dieser Prozess für RNase A in hohem Maße reversibel ist, ist sie ein ideales Modellenzym für die Bestimmung des Einflusses der kompatiblen Solute auf den Schmelzpunkt eines Proteins. Am Schmelzpunkt T_m wird im Differential Scanning Calorimeter (DSC) ein deutlicher Peak sichtbar, da für diesen Prozess Energie gebraucht wird. Der Prozess ist zu fast 100 % reversibel, wenn man das Enzym nicht längere Zeit bei hoher Temperatur inkubiert. In reinem Puffer lag der T_m bei 59,5°C.

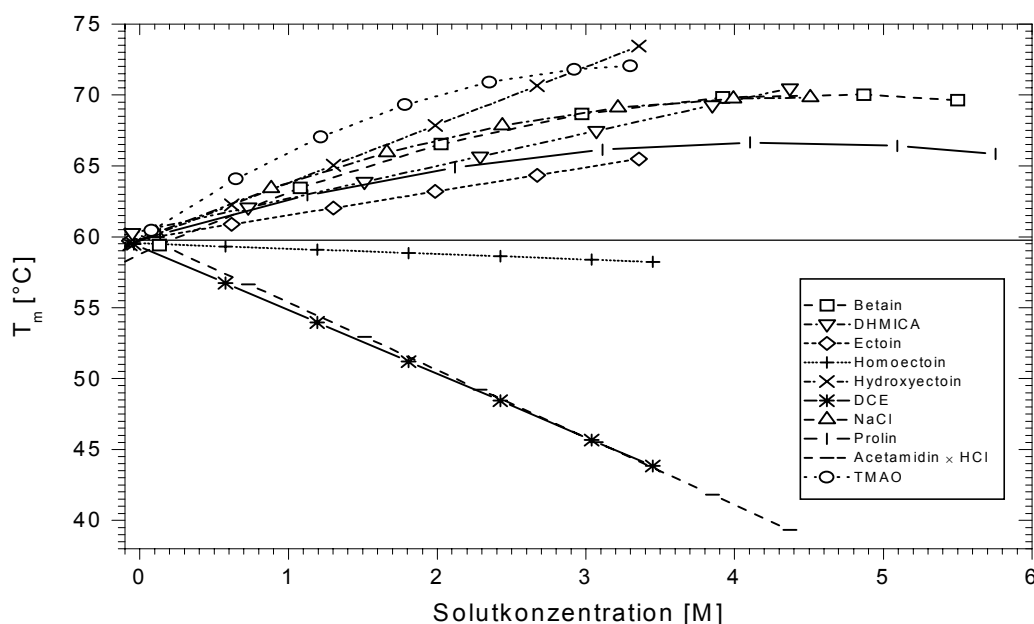


Abb. 3.2.2a.: Einfluss von kompatiblen Soluten auf den Schmelzpunkt T_m von RNase A gemessen im Differential Scanning Calorimeter (DSC).

Wie Abbildung 3.2.2a. deutlich zeigt, verschob sich der T_m der RNase A bei den meisten Soluten mit steigender Konzentration zu höheren Temperaturen. Das heißt, die RNase A blieb bei höheren Temperaturen noch in ihrer aktiven, nativen Form. Bei einigen Soluten, wie z. B. Betain, Prolin und TMAO ergab sich kein linearer Zusammenhang zwischen der T_m -Verschiebung und der Konzentration. Es entstand eine Art Sättigungskurve, die bei sehr hohen Konzentrationen (über 4 M) sogar wieder leicht abfiel.

Absolut gesehen erreichte Hydroxyectoin bei einer Konzentration von 3,5 M die höchste Stabilisierung der RNase A mit einer T_m -Verschiebung von + 13,7°C. Aber auch Betain, DHMICA, NaCl und TMAO erreichten T_m -Steigerungen von über + 10°C. Obwohl bei Betain, Prolin und TMAO kein linearer Zusammenhang zwischen der Solutkonzentration und der Schmelzpunktverschiebung bestand, konnte die Stabilität der RNase A verbessert werden. Ectoin und Prolin stabilisierten das Enzym im Vergleich zu den anderen Soluten nur um + 5,7°C bzw. + 6,9°C und lagen damit deutlich unter den vorgenannten Soluten

NaCl hatte dabei den gleichen stabilisierenden Effekt wie Betain. Sowohl die kompatiblen Solute als auch das Salz scheinen die RNase A kompakter zu machen, so dass sie thermisch nicht so leicht zu denaturieren ist. Homoectoin zeigte erstaunlicherweise fast keinen Effekt auf den T_m .

DCE senkte im Gegensatz zu den anderen Soluten den T_m deutlich, ebenso wie Acetamidin Hydrochlorid, welches auch eine kationische Struktur hat. Da NaCl den T_m deutlich steigert, kann die Destabilisierung der RNase A durch DCE und Acetamidin Hydrochlorid nicht durch die Chlorid-Ionen begründet sein. Vielmehr ist die T_m -Senkung der kationischen Acetamidin-Struktur zuzurechnen, die ja auch im DCE noch erhalten ist. Das gleiche Strukturelement ist zwar auch im DHMICA, Ectoin, Homoectoin und Hydroxyectoin enthalten die kationische Ladung wird aber durch die Carbonsäurefunktion in 4-Position neutralisiert. Das neutrale bis leicht schädliche Verhalten des Homoectoines kann eventuell durch spezifische Wechselwirkungen des Solutes mit Aminosäuren aus dem Proteininneren erklärt werden.

Bei TMAO war die Reversibilität der Auffaltung nur bis 2 M vollständig. Oberhalb von 2 M denaturiert ein Teil des Enzymes bei jedem Aufheizen irreversibel. Dieses kann dadurch kommen, dass TMAO das aufgefaltete Protein stabilisiert und eine Rückfaltung in den nativen Zustand unmöglich macht. Ab einer Konzentration von 3 M kam es zu Proteinausfällungen. Daher kann TMAO nur bis 2 M zur Stabilisierung von RNase A eingesetzt werden. Bezogen auf die Konzentration erreichte TMAO die beste Stabilisierung der RNase A. Mit + 5,8°C/M

liegt der molare Wert deutlich über dem von Betain (+ 4,4°C/M), NaCl (+ 4,2°C/M) und Hydroxyectoin (+ 4,1°C/M). In Tabelle 3.2.2. sind die Werte für die maximale sowie die molare T_m -Verschiebung der RNase A zusammengestellt.

Tab. 3.2.2.: Maximale T_m -Steigerung (absolut und molar) von RNase A durch kompatible Solute. Bei den Absolutwerten ist die Solutkonzentration, bei der dieser Wert erreicht wurde ist mit angegeben. Bei hyperbolischem Kurvenverlauf gelten die molaren Werte nur bis 1,5 mol/l.

Solut	max. ΔT_m		max. molare ΔT_m	
	[°C]	bei c [M]	[°C/M]	Kurvenverlauf
Betain	+ 10,2	4,0	+ 4,4	hyperbolisch
DHMICA	+ 10,7	4,4	+ 2,3	linear
Ectoin	+ 5,7	3,4	+ 1,7	linear
Homoectoin	- 1,5	3,5	- 0,4	linear
Hydroxyectoin	+ 13,7	3,4	+ 4,1	linear
DCE	- 16,1	3,5	- 4,5	linear
NaCl	+ 10,2	4,5	+ 4,2	hyperbolisch
Prolin	+ 6,9	4,1	+ 2,9	hyperbolisch
TMAO	+ 12,3	3,3	+ 5,8	hyperbolisch
Acetamidin × HCl	- 20,4	4,4	- 4,8	linear

Um zu untersuchen, ob der Effekt der Schmelzpunktstabilisierung der RNase A sich bei verschiedenen Soluten additiv verhält, wurde der T_m von RNase A bei 1 M NaCl und steigender Ectoinkonzentration gemessen.

Die rechnerische Summe der Einzeleffekte von Ectoin und NaCl sowie die kombinierte Messung liegen genau übereinander. Dies bedeutet, dass die beiden Solute den T_m der RNase A unabhängig voneinander anheben. Der Effekt von NaCl und Ectoin als kompatibles Solut auf den T_m von RNase A ist additiv.

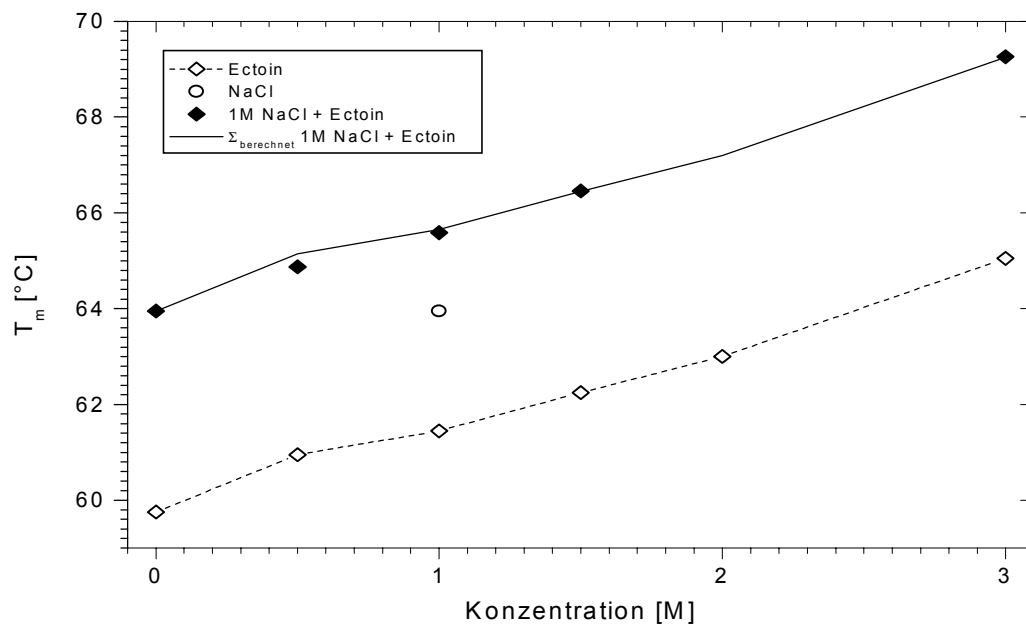


Abb. 3.2.2b.: T_m von RNase A in Abhängigkeit von der Ectoinkonzentration ohne (offene Diamanten mit gestrichelter Linie) und mit 1 M NaCl (ausgefüllte Diamanten) sowie die rechnerische Summe des Einflusses von 1 M NaCl und der variablen Ectoinkonzentration (durchgezogene Linie).

3.2.3. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Transferenergie ΔG_{tr} von Proteinen

Um die Wechselwirkungen der Solute mit Proteinen näher zu untersuchen, wurde der Ansatz von LIU & BOLEN (1995) verfolgt. Dazu wurde die Transferenergie ΔG_{tr} für Diketopiperazin (DKP) als Modellsubstanz für zwei Rückgrateinheiten eines Proteins, sowie für die 20 biogenen Aminosäureseitenketten bestimmt. ΔG_{tr} wurde aus der unterschiedlichen Löslichkeit von DKP und den Aminosäuren in Wasser bzw. Solutlösung berechnet. Um den Beitrag der Seitenketten alleine zu erhalten, wurde von ΔG_{tr} der kompletten Aminosäure der Betrag von Glycin in dem entsprechenden Lösungsmittel abgezogen. Wenn ΔG_{tr} von Wasser in Solutlösung > 0 ist, löst sich die Substanz besser in Wasser, der Transfer geschieht thermodynamisch gesehen nicht freiwillig. Reaktionen mit $\Delta G_{tr} < 0$ laufen dagegen ohne Energiezufuhr ab.

3.2.3.1. Einfluss von kompatiblen Soluten auf ΔG_{tr} des Proteinrückgrates

Das zyklische Dimer von Glycin DKP wurde als Modell für zwei Einheiten eines Proteinrückgrates gewählt. Die Transferenergie ΔG_{tr} für DKP/2 repräsentiert also den Anteil, den das Grundgerüst einer Aminosäure ausmacht. ΔG_{tr} stieg mit Ausnahme von NaCl linear mit der Konzentration der Solutlösung an. Ein besonders grosser Anstieg konnte bei TMAO beobachtet werden.

Da die Bestimmung von ΔG_{tr} über die Konzentrationsbestimmung von gesättigten Lösungen erfolgte, wurde bei Betain überprüft, ob die Lösungen wirklich gesättigt waren. Dazu wurde ein Probensatz direkt für 48 h bei 25°C inkubiert, während der zweite Probensatz vorher für 5 h bei 60°C geschüttelt wurde, wodurch sich mehr Substanz löste, als am Sättigungspunkt bei 25°C. Zwischen den beiden Ansätzen ergaben sich aber keine Unterschiede, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Proben nach 48 h bei 25°C gesättigt waren.

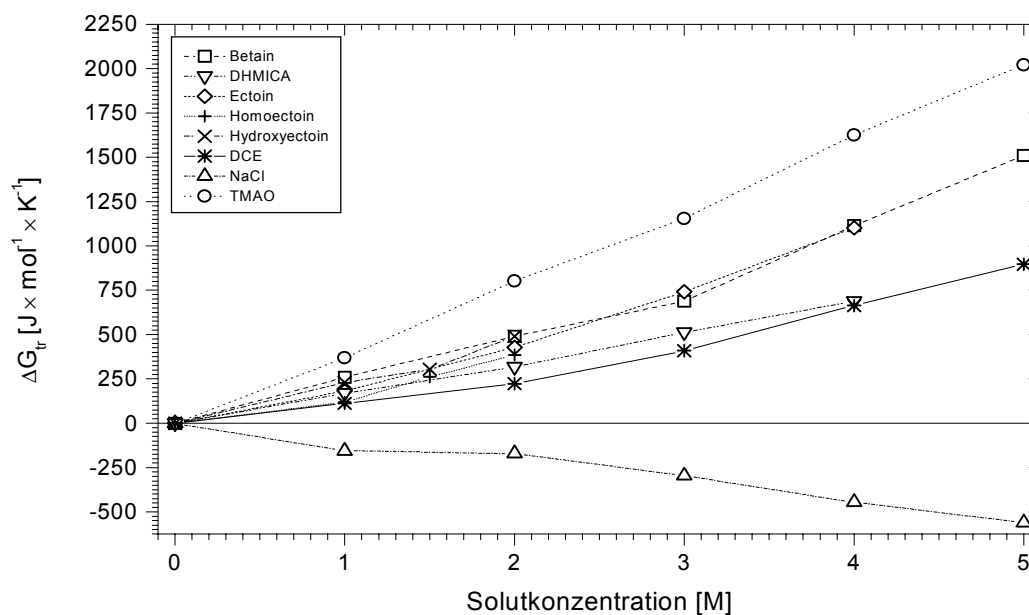


Abb. 3.2.3.1.: Konzentrationsabhängiger Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Transferenergie ΔG_{tr} von DKP/2. Die Werte sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Messungen. Da die Messungenauigkeit (Tabelle 3.2.3.1.) sehr gering war, wurden die Fehlerbalken nicht mit eingezeichnet.

Nur die Harnstoff- und NaCl-Lösung zeigten eine grössere Löslichkeit von DKP, als reines Wasser. Diese beiden Substanzen bilden also im wässrigen System ein „besseres“ Lösungsmittel für die Rückgrat-Einheiten eines Proteins. Da bei der Proteindenaturierung eine Vielzahl von Aminosäuren, die im nativen Zustand im Enzyminneren liegen, neu mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen, fördern Harnstoff und NaCl, bezogen auf das Proteinrückgrat, die Auffaltung des Proteins und damit die Zerstörung seiner Funktion. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu dem T_m -steigernden Effekt von NaCl auf RNase A. Neben dem Proteinrückgrat kommen, während der Proteindenaturierung, aber auch noch viele Aminosäureseitenketten neu mit dem Lösungsmittel in Kontakt. Deshalb wurde im folgenden Kapitel (3.2.3.2.) auch der Einfluss der Solute auf die Löslichkeit der Aminosäureseitenketten untersucht.

Tabelle 3.2.3.1. zeigt, wieviel Energie pro Mol Solut aufgewendet werden muss bzw. frei wird, wenn man ein Mol DKP/2 von einer rein wässrigen Lösung in eine Solutlösung transferiert. Die Werte entsprechen bis auf bei Harnstoff und Prolin den Steigungen der Regressionsgeraden der Werte aus Abbildung 3.2.3.1.. Für Harnstoff und Prolin wurden nur Messungen bei 2 M durchgeführt. Die Daten von TMAO, Prolin und Harnstoff stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit gut mit den Daten von WANG & BOLEN (1997) und QU et al. (1998) überein.

Tab. 3.2.3.1.: Molare Änderung der Transferenergie ΔG_{tr} von DKP/2 beim Übergang von reinem Wasser in Solutlösung. Die Literaturwerte stammen aus: ^{a)} WANG & BOLEN, 1997 und ^{b)} QU et al., 1998

Solut	Änderung von ΔG_{tr} [J \times mol⁻¹ \times K⁻¹] pro mol Solut	Literaturwerte: [J \times mol⁻¹ \times K⁻¹] pro mol Solut
Betain	+ 278 \pm 12	
DHMICA	+ 170 \pm 2	
Ectoin	+ 256 \pm 13	
Homoectoin	+ 177 \pm 14	
Hydroxyectoin	+ 230 \pm 11	
DCE	+ 172 \pm 8	
NaCl	- 109 \pm 5	
TMAO	+ 401 \pm 4	370 ^{a)}
Prolin	+ 139 \pm 10	150 ^{b)}
Harnstoff	- 156 \pm 12	144 ^{a)}

Alle anderen untersuchten Solute waren in Verbindung mit Wasser „schlechtere“ Lösungsmittel für die Modellsubstanz DKP, so dass in Lösungen dieser Solute mehr Energie aufgewendet werden muss um das Proteinrückgrat zu denaturieren, als in wässriger Lösung. Ein besonders hoher Grad der Rückgradstabilisierung wird von TMAO erreicht. TMAO kann z. B. den schädlichen Einfluss der doppelten Menge an Harnstoff kompensieren. Deshalb reichern viele Fische (z.B. Hai und Rochen) im Cytosol TMAO und Harnstoff im Verhältniss 1 : 2 an und kompensieren so den Salzstress durch das Meerwasser (WANG & BOLEN, 1997; TIMASHEFF, 1998). Die natürlich vorkommenden Solute Betain, Ectoin, und Hydroxyectoin zeigten pro mol Solut eine Transferenergie von 230 - 280 $\text{J}\times\text{mol}^{-1}\times\text{K}^{-1}$. Diese lag damit bei nur 2/3 des Wertes von TMAO. Die synthetischen Solute DHMICA, Homoectoin, DCE erreichten nur eine ΔG_{tr} von durchschnittlich 170 $\text{J}\times\text{mol}^{-1}\times\text{K}^{-1}$, Prolin sogar nur 130 $\text{J}\times\text{mol}^{-1}\times\text{K}^{-1}$. Damit wird deutlich, dass die natürlichen Solute Betain, Ectoin und Hydroxyectoin um ca. 50 % besser bei der Stabilisierung des Proteinrückgrates sind, als die synthetischen Solute DHMICA, Homoectoin und DCE.

3.2.3.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf ΔG_{tr} der Aminosäureseitenketten

Da sich die Proteine aber aus Aminosäuren und nicht nur aus Glycinresten zusammensetzen, muß man bei der Stabilisierung von Proteinen zusätzlich zu dem Rückgrat auch noch die Seitenketten berücksichtigen. Die Seitenketten der 20 biogenen Aminosäuren haben völlig verschiedene Funktionalitäten. Geladene Aminosäuren wie Aspartat, Glutamat, Arginin und Lysin können ionische Wechselwirkungen mit dem umgebenen Medium oder weiteren Aminosäuren des Proteins ausbilden, während die hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin, Leucin und Valin sowie die aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan bevorzugt hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Somit tragen die Seitenketten erheblich zur Stabilität von Proteinen bei. Ferner können Cysteinreste durch die Ausbildung von Disulfidbrücken ein Protein in seiner nativen Form stabilisieren.

Um nun die Wirkung der Solute auf ganze Proteine zu untersuchen wurden deshalb neben der Transferenergie von DKP die Transferenergien der einzelnen Aminosäuren beim Übergang von Wasser in 2 M Solutlösung bestimmt. Dazu wurde von der Transferenergie der gesamten Aminosäuren jeweils die Transferenergie von Glycin abgezogen wurde, so dass nur der Beitrag der Seitenketten zu ΔG_{tr} übrigblieb.

Die Cysteinkonzentrationen konnten nicht bestimmt werden. Der während der Inkubation auftretende H_2S -Geruch deutet auf eine Zersetzung der Aminosäure während der 48-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur hin.

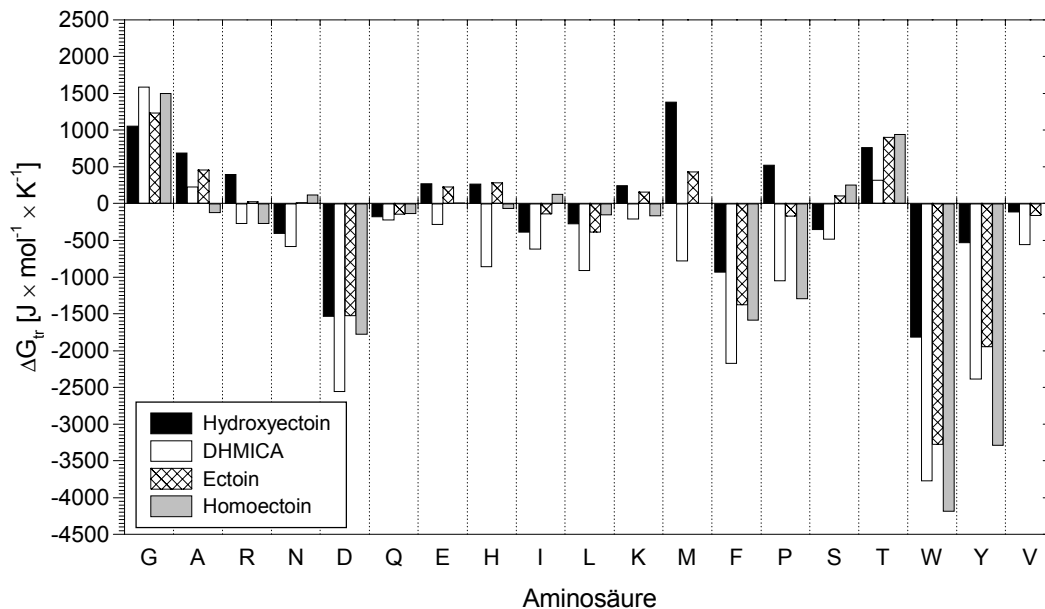


Abb. 3.2.3.2a.: ΔG_{tr} von Glycin, sowie den Aminosäureseitenketten beim Transfer von reinem Wasser in eine 2 M Lösung eines zyklischen, zwitterionischen Solute. Um ΔG_{tr} der Seitenketten zu erhalten wurde der Wert von Glycin von dem jeweiligen Wert für die gesamte Aminosäure abgezogen. Die Aminosäuren sind dabei mit dem Einbuchstabensymbol abgekürzt.

Abbildung 3.2.3.2a. zeigt die Transferenergien der Aminosäureseitenketten beim Transfer von reinem Wasser in eine 2 M Solutlösung. Die Transferenergie von Glycin in 2 M Hydroxyectoin DHMICA-, Ectoin-, Homoectoinlösung war stark positiv. Durch die Subtraktion dieses Wertes von der Transferenergie der höheren Aminosäuren wurden die Energiebeträge der Seitenketten zum Großteil negativ.

Bei den Soluten Hydroxyectoin, Ectoin und Homoectoin spiegelt sich in Bezug auf die aromatischen Aminosäuren der Verlauf der Hydrophobizität der Solutmoleküle wieder. Die aromatischen Seitenketten werden von in der Reihe Hydroxyectoin, Ectoin und Homoectoin immer besser gelöst. Obwohl DHMICA hydrophiler ist als Ectoin, löst es aber die aromatischen Seitenketten nicht schlechter als Ectoin. Bei den unpolaren, nicht aromatischen Seitenketten von Leucin, Isoleucin und Valin lässt sich keine Abhängigkeit der Löslichkeit von der Hydrophobizität erkennen. Daraus kann man folgern, dass nicht nur die

Hydrophobizität des Solute für die Löslichkeit der Aminosäureseitenketten verantwortlich ist, sondern andere Faktoren, wie zum Beispiel die Aromatizität auch eine bedeutende Rolle spielen.

Während die Transferenergie für die Threonin-Seitenkette in allen Fällen deutlich positiv war ($700 - 1100 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$) wurden die aromatischen Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, sowie die negativ geladene Asparaginsäure besonders destabilisiert und somit in der Solutlösung besser gelöst als in Wasser. Die kompatiblen Solute vom Ectoin-Typ scheinen, mit ihren delokalisierten Elektronen, mit den aromatischen Seitenketten besonders gut zu wechselwirken. Die zyklischen Solute besitzen aufgrund der delokalisierten Ladung im Ring ein teilaromatisches System und können so mit den aromatischen Seitenketten Wechselwirkungen eingehen, die dem Stapelkontakt der DNA-Basen in einer Doppelhelix ähneln.

Da die aromatischen Aminosäuren meist im Proteininneren liegen, sollten die Solute also die Proteine destabilisieren. Da die aromatischen Aminosäuren aber nur in einem kleinen Teil eines Proteins ausmachen (ca. 10 - 15 %), kann der stabilisierende Effekt der Solute auf das Rückgrat die Destabilisierung der Seitenketten überkompensieren.

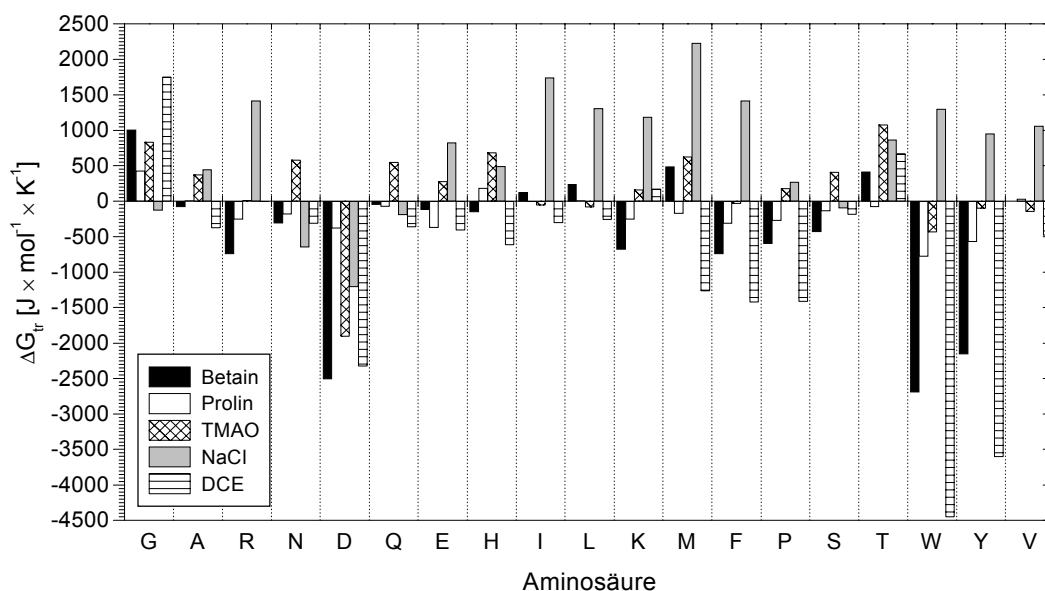


Abb. 3.2.3.2b.: ΔG_{tr} von Glycin, sowie den Aminosäureseitenketten beim Transfer von reinem Wasser in eine 2 M Lösung von Betain, Prolin, TMAO, NaCl oder DCE. Um ΔG_{tr} der Seitenketten zu erhalten wurde der Wert von Glycin von dem jeweiligen Wert für die gesamte Aminosäure abgezogen. Die Aminosäuren sind dabei mit dem Einbuchstabensymbol abgekürzt.

Während Betain sich recht ähnlich verhielt, wie die zylischen Soluten aus Abbildung 3.2.3.2a., hatte Prolin bei allen Aminosäuren einen wesentlich kleineren Effekt auf die Löslichkeit der Seitenketten. Die Transferenergien der Seitenketten haben beim Übergang von Wasser in 2 M Prolinlösung das gleiche Vorzeichen, wie beim Übergang in die Lösung eines ectoinanalogen Sutes. Der Betrag den die einzelnen Aminosäureseitenketten zur Stabilisierung, bzw. Destabilisierung eines Proteines beitragen können ist aber wesentlich geringer.

NaCl zeigte im Vergleich zu den vorgenannten Soluten ein konträres Verhalten. Während ΔG_r für Glycin leicht negativ war, wurden fast alle Aminosäuren schlechter gelöst als in reinem Wasser. Besonders die hydrophoben und aromatischen Aminosäuren wurden von der Salzlösung abgestossen. Bei den Soluten macht also ΔG_r des Rückgrat den stabilisierenden Effekt aus und in einer Salzlösung werden viele Aminosäureseitenketten schlechter gelöst und verhindern so eine Auffaltung des Proteins. Eine Salzlösung kann also sehr wohl ein Protein stabilisieren, wie es ja auch bei RNase A im Kalorimeter zu beobachten war. NaCl destabilisiert zwar das Rückgrat des Proteins, es erhöht die Stabilität des gesamten Proteins aber durch eine schlechtere Löslichkeit für viele Aminosäureseitenketten. Somit lässt sich auch der Schmelzpunktsteigernde Effekt von NaCl auf RNase A, wie er in Kapitel 3.2.2. gefunden wurde erklären.

DCE zeichnete sich dadurch aus, dass die Transferenergien für alle Aminosäureseitenkettan ausser Lysin und Threonin negativ waren. Bei Lysin könnte die Abstossung der positiven Ladungen der Grund für die Stabilisierung sein.

Der Hauptunterschied von TMAO zu den weiteren Soluten ist, dass die aromatischen Aminosäuren, die von den Ectoinen besonders gut gelöst wurden, von TMAO-Lösung nur geringfügig besser gelöst wurden als von reinem Wasser.

Generell zeigten die Aminosäuren bei vielen Soluten nur einen kleinen Effekt ($50 - 100 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$), der sich innerhalb eines Proteines natürlich noch gegenseitig kompensieren kann. Der Effekt der Solute auf das Proteinrückgrat summiert sich dagegen immer auf, entweder ins Positive oder ins Negative, so dass sich innerhalb eines Proteines eine große Summe für die Rückgratstabilisierung oder -destabilisierung ergibt, während der Effekt auf die Seitenketten sich summieren aber auch kompensieren kann.

3.2.4. Kompatible Solute als Schutzstoffe gegen Hydroxylradikale (HO•)

Radikale verursachen bei der Lagerung und dem Umgang mit Biomaterialien oftmals Schädigungen, indem sie diese oxidieren. Um diese Schäden zu minimieren, können Schutzstoffe zugesetzt werden, die die Radikalbildung unterbinden oder die Radikale abfangen. Besonders den Zuckern wie Saccharose und Trehalose sowie einigen Polyolen werden solche Radikalfängereigenschaften zugeschrieben. Um das Potential der kompatiblen Solute zu untersuchen, die durch Hydroxylradikale verursachten Schäden zu minimieren, bzw. zu unterbinden, wurde der von HALLIWELL & GUTTERIDGE (1984) entwickelte und von SMIRNOFF & CUMBES (1989) und KARLA (1997) modifizierte Test zur Herstellung und Detektion von Hydroxylradikalen verwendet. Dabei werden die Radikale mittels Fe^{2+} und Ascorbinsäure erzeugt, wodurch gleichzeitig ein Entstehen von Superoxidradikalen unterbunden wird. Diese hydroxylieren Salicylat zu Hydroxysalicylat (Dihydroxybenzoesäure, DHBA), welches mit Fe^{3+} einen farbigen Komplex bildet, dessen Konzentrationsverlauf im Photometer verfolgt werden kann. Gute Radikalschutzstoffe reagieren mit den Hydroxylradikalen schneller, als das Detektormolekül Salicylat und verhindern somit eine Farbstoffbildung. Gleichzeitig wurde die Abnahme an H_2O_2 verfolgt um den Endpunkt der Radikalproduktion feststellen zu können.

3.2.4.1. Kompatible Solute als Schutzstoffe gegen die radikalische Hydroxylierung von Salicylat

Die radikalische Hydroxylierung von Salicylat zu Hydroxysalicylat und die damit verbundene Farbstoffbildung lässt sich in Abbildung 3.2.4.1.A deutlich erkennen. Nach ca. 1,5 h wurde eine maximale Farbstoffkonzentration erreicht, die dann bis 7 h nur noch leicht anstieg. Dieser leichte Anstieg über die relativ lange Messzeit kann durch Eintrag von Sauerstoff aus der Luft und den damit verbundenen Radikalen in die Proben erklärt werden.

Um zu überprüfen, ob die von der Halogenlampe des Photometers ausgehende Strahlung einen Einfluss auf die Radikalbildung hatte, wurden äquivalente Proben einmal direkt für 7 h gemessen und einmal zunächst 7 h im dunkeln inkubiert und anschließend gemessen. Die Extinctionen der beiden Probensätze stimmte überein. Somit hatte die von dem Photometer ausgehende Strahlung keinen messbaren Einfluss auf die Radikalbildung.

Gibt man nun unterschiedliche Konzentrationen an Saccharose zu dem Testsystem zu, so wird die Farbstoffbildung immer stärker unterbunden. Scheinbar reagieren die Hydroxylradikale mit der als Radikalfänger bekannten Saccharose schneller als mit dem Salicylat und schützen dieses somit vor der Hydroxylierung. Bei Zugabe von 0,25 M Saccharose zum Testansatz tritt kaum, bei 1 M gar keine Farbstoffbildung mehr auf.

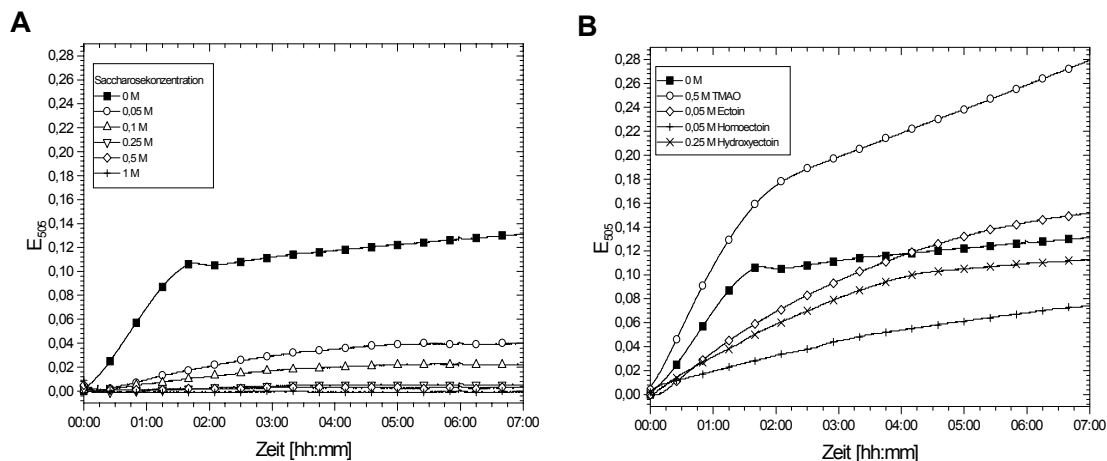


Abb. 3.2.4.1.: Einfluss der kompatiblen Solute auf die Hydroxylierung von Salicylat durch Hydroxylradikale. A) Schutz durch Saccharose. B) Unterschiedlicher Einfluss der weiteren Solute durch Änderung der Reaktionskinetik der Farbstoffbildung. Die Solute wurden in den in der Legende angegebenen Konzentrationen verwendet. Dieses sind die Konzentrationen, bei denen die auffälligsten Abweichung von der Kontrolle auftraten.

Bei genauerer Betrachtung der Abbildung 3.2.4.1.A kann man erkennen, dass schon bei einer Saccharosekonzentration von 0,05 M sich die Kinetik der Farbstoffbildung verändert. Jetzt wird das Plateau erst nach ca. 4,5 h erreicht. Für die weiteren untersuchten Solute ergaben sich teilweise noch drastischere Kinetikänderungen, wie sie exemplarisch an einigen Beispielen in Abbildung 3.2.4.1.B gezeigt sind. Die Solute sind in Abbildung 3.2.4.1.B in den Konzentrationen gezeigt, in denen die auffälligsten Kinetikänderungen auftraten. Gerade bei Ectoin, Homoectoin und DCE war eine starke Verlangsamung der Umsetzung sichtbar, die im Fall von 0,05 M Ectoin nach 4,25 h zu einem Anstieg der Konzentration an hydroxyliertem Produkt über die Kontrolle hinaus führte. Da die Farbstoffkonzentration nach 7 h immer noch anstieg, war die Reaktion noch nicht abgeschlossen. TMAO bewirkte ab 0,25 M einen deutlichen Anstieg der Farbstoffmenge, bei noch höherer Konzentration war dieser Anstieg aber nicht mehr so stark. Hier liegen scheinbar konzentrationsabhängige

Wechselwirkungen mit dem Testsystem vor und diese Daten können deshalb nicht weiter ausgewertet werden.

Da bei dem Radikalfängertest so wie er bisher immer so beschrieben wurde (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; KARLA, 1997) nur die Extinktion zu einem festen Zeitpunkt gemessen wurde, kann es sein, dass nach diesem Zeitpunkt noch weitere Farbstoffbildung erfolgt. Somit ist das Ergebnis nur dann repräsentativ, wenn die untersuchten Reaktionen eine gleiche Kinetik besitzen, da ein Solut sonst je nach Zeitpunkt der Messung einmal als Radikalfänger, oder als „Radikalproduzent“ erscheinen kann. Zumindest muss die Reaktion zum Zeitpunkt der Messung abgeschlossen sein. Dieses lässt sich am einfachsten überprüfen, wenn man die H_2O_2 -Konzentration im Ansatz verfolgt. Ist alles H_2O_2 verbraucht, können auch keine Hydroxylradikale mehr gebildet werden.

Ascorbat konnte als bekannter Schutzstoff vor radikalischer Schädigung in diesem Test nicht verwendet werden, da er in geringen Konzentrationen in dem Ansatz zur Erzeugung der Radikale enthalten ist und ein Zusatz in molaren Mengen einen grossen Einfluss auf die Radikalbildungsreaktion hat.

3.2.4.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf den H_2O_2 -Zerfall

Da die in dieser Arbeit charakterisierten Solute die Kinetik des verwendeten Radikalfängertestes beeinflussten, wurde die H_2O_2 -Konzentration über den Zeitraum des Versuches (7 h) verfolgt. Eine Möglichkeit zur Veränderung der Kinetik der Farbstoffbildung ist eine Wechselwirkung der Solute mit den für die Radikalproduktion verantwortlichen Reaktionen. Die Ausgangskonzentration an H_2O_2 im Radikalfängertest war 60 mg/l. Diese fiel in den Kontrollansätzen durch die Umsetzung mit Fe^{2+} zu Hydroxylradikalen, Wasser und Sauerstoff exponentiell ab. Nach 1,5 h war die Konzentration auf ca. 2 mg/l abgesunken. Dieses ist der Punkt, an welchem im Radikalfängertest die Sättigungsphase beginnt. Nach 2,5 h schließlich konnte in den Kontrollproben kein H_2O_2 mehr nachgewiesen werden.

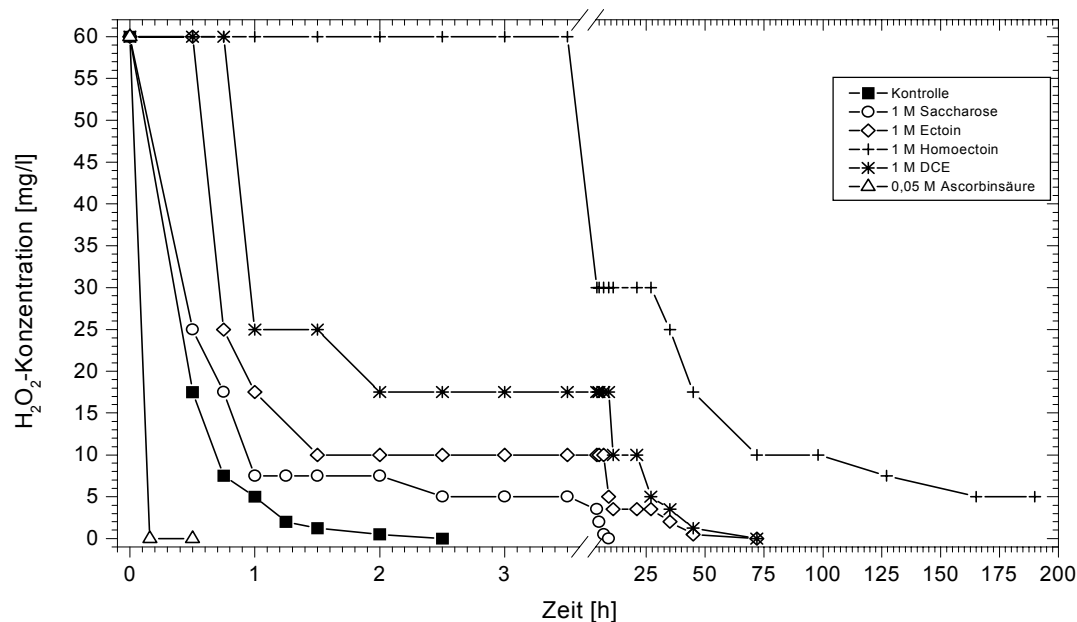


Abb. 3.2.4.2a.: Verlauf der H_2O_2 -Konzentration während des Radikalfängertestes. Die kompatiblen Solute zeigen eine deutliche Verzögerung des H_2O_2 -Zerfalls. Umgekehrt beschleunigt Ascorbinsäure den H_2O_2 -Zerfall.

Die verschiedenen Solute beeinflussten den H_2O_2 -Zerfall unterschiedlich. Durch die Zugabe von 50 mM Ascorbinsäure konnte schon nach 10 Minuten kein H_2O_2 mehr nachgewiesen werden. Da Ascorbinsäure aber schon 0,5 mM im Ansatz enthalten war, um die Radikale zu produzieren, verwundert diese Feststellung nicht.

Saccharose ist in der Lage in kleinen Konzentrationen Radikale zu fangen, wenn die Saccharosekonzentration aber erhöht wird, kommt es auch zu einer Verzögerung des H_2O_2 -Zerfalls und somit zu einer Veränderung der Radikalbildungskinetik. Obwohl das H_2O_2 über einen längeren Zeitraum in der Lösung nachweisbar ist und somit über einen längeren Zeitraum Hydroxylradikale gebildet werden könnten, steigt die Konzentration des farbigen Detektormoleküles Hydroxysalicylat aber nicht weiter an (Abb. 3.2.4.1.A). Saccharose scheint die geringeren Konzentrationen an Radikalen ohne Probleme abzufangen und so gegen ihre schädliche Wirkung zu schützen. DHMICA und Hydroxyectoin verhielten sich ähnlich und verzögerten den H_2O_2 -Zerfall nur wenig. Da nach 7 h kein H_2O_2 mehr in der Lösung enthalten war, können die Radikalfängereigenschaften für diese Solute mit dem hier verwendeten Test untersucht werden. Betain verzögerte die Radikalbildung ebenfalls nur

sehr wenig (3 - 5 h), hatte aber keinen Einfluss auf die Salicylathydroxylierung und ist somit kein Radikalschutzstoff.

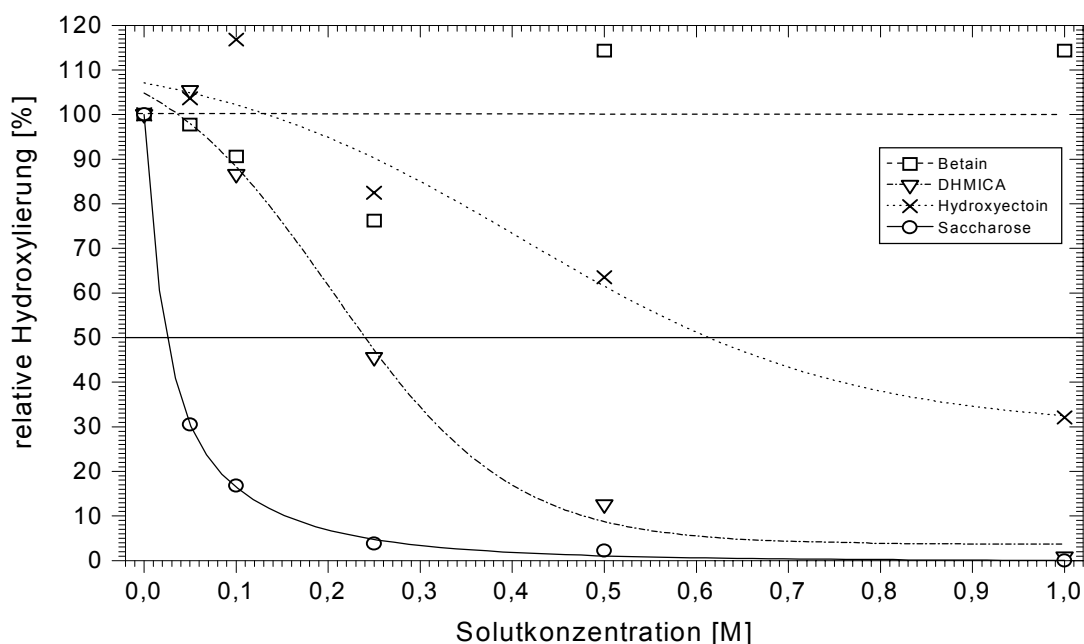


Abb. 3.2.4.2b.: Konzentrationsabhängiger Radikalschutz von Betain, DHMICA, Hydroxyectoin und Saccarose, bezogen auf die Hydroxylierung von Salicylat. Die Hydroxysalicylatkonzentration wurde dazu auf die Farbstoffmenge in den Kontrollproben bezogen.

Ectoin, Homoectoin und DCE verzögerten den H_2O_2 -Zerfall um z.T. über 200 h. Dabei kommt es auch schon bei Konzentrationen von 50 mM zu einer Verlangsamung des Substraterfalls. Da dieses Phänomen nicht für alle Solute gleichmässig auftritt, ist hier kein rein physikalischer Effekt durch die erhöhte Teilchenzahl oder Viskosität der Lösungen festzustellen. Es ist vielmehr ein solutspezifischer und konzentrationsabhängiger Effekt. Die Solute wirkten in höheren Konzentrationen zwar auch Inhibierend auf die Bildung des farbigen Hydroxysalicylates, da aber noch erhebliche Mengen H_2O_2 im Testansatz enthalten waren, kann es noch zu einer weiteren Hydroxylierungsreaktion über den Messzeitraum hinaus kommen.

Die Einflüsse der Solute auf die Bildung von Hydroxysalicylat sowie der Einfluss auf den H_2O_2 -Zerfall sind in Tabelle 3.2.4.2. noch einmal zusammengefasst. Die Konzentration, bei der die Hydroxylierung von Salicylat um 50 % gesenkt wurde (C_{HS}^{50}) wurde dabei nur für diejenigen Solute bestimmt, bei denen nach 7 h kein H_2O_2 mehr im Ansatz enthalten war.

Tab. 3.2.4.2.: Einfluss der kompatiblen Solute auf den Radikalfängertest mit Salicylat als Detektormolekül. Die Zeitangaben beziehen sich darauf wie lange noch H₂O₂ im Ansatz nachgewiesen werden konnte.

Solut	Effekt auf die Hydroxylierung	Effekt auf H ₂ O ₂ -Zerfall
DHMICA	$C_{HS}^{50} = 0,241 \text{ mol/l}$	Verlangsamung erst ab 1M
Ectoin	veränderte Kinetik schon bei kleinen Konzentrationen (50 mM)	starke Verlangsamung (bis 72 h)
Homoectoin	siehe Ectoin	siehe Ectoin
Hydroxyectoin	$C_{HS}^{50} = 0,611 \text{ mol/l}$	Verlangsamung erst ab 1M
DCE	konzentrationsabhängige Inhibierung	sehr starke Verlangsamung (> 200 h)
Betain	Kein Effekt	geringe Verzögerung (2 - 3h) des H ₂ O ₂ -Zerfalls
TMAO	bis 0,1 M kein Effekt, ab 0,25 M verstärkte Hydroxysalicylatbildung	Kein Effekt
Saccharose	$C_{HS}^{50} = 0,024 \text{ mol/l}$	Stabilisierung geringer H ₂ O ₂ -Restkonzentrationen (< 5 mg/l, bis 7 h)
Ascorbinsäure	Interagiert mit den Reaktionen zur Radikalerzeugung und führt zu einer verstärkten Hydroxylierung.	sofortiger Zerfall nach 10 min

Somit lassen sich die untersuchten Solute in zwei Gruppen einteilen. Die Radikalschutzstoffe Saccharose, DHMICA und Hydroxyectoin verzögern den H₂O₂-Zerfall nur gering (bei Konzentrationen oberhalb 1 M) verhindern aber die Hydroxylierung von Salicylat. Hydroxyectoin inhibierte bei einer Konzentration von 0,611 M die Radikalreaktion zu 50 %. DHMICA ist mehr als doppelt so effektiv, da es schon ab 0,241 M den gleichen Effekt zeigt. Die als Schutzstoff gegen Radikale bekannte Substanz Saccharose war nochmal um den Faktor 10 wirkungsvoller. Eine Saccharosekonzentration von nur 24 mM reicht aus um die Menge an gebildetem Hydroxysalicylat zu halbieren.

Ectoin, Homoectoin und DCE wirkten besonders in höheren Konzentrationen inhibierend, auf die Hydroxysalicylatbildung, wechselwirkten aber stark mit den Reaktionen, die zum H₂O₂-Zerfall und somit zur Radikalbildung führen und verzögerten diese stark. Inwieweit dieses als Radikalschutz angesehen werden kann bleibt zu diskutieren, da es einerseits durch die längere Anwesenheit von H₂O₂ zu einer zeitverzögerten Radikalschädigung kommen kann, andererseits haben in Mikroorganismen die zelleigenen Reparaturmechanismen mehr Zeit sich aufzubauen und zu wirken. Eine Verzögerung der Radikalbildung kann für Zellen also auch Teil eines Radikalschutzmechanismus sein.

Betain besitzt keine Radikalschutzeigenschaften während für TMAO und Ascorbinsäure mit diesem Test keine eindeutige Aussage getroffen werden kann, da sie zu stark mit dem Testsystem wechselwirken.

3.2.5. Einfluss von kompatiblen Soluten und Salzen auf die DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eine der bedeutendsten Methoden in der Molekularbiologie dar. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, Nucleinsäurefragmente zu vervielfältigen, um diese anschließend gentechnisch zu modifizieren oder mittels Restriktions- oder Sequenzanalyse zu analysieren. Um die doppelsträngige DNA (dsDNA) zu vervielfältigen muss sie zunächst in die komplementären Einzelstränge (ssDNA) aufgespalten werden. Dieses geschieht meist durch Temperaturerhöhung. Der Schmelzpunkt T_m ist dabei als diejenige Temperatur definiert, bei der die Hälfte der eingesetzten doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten wird. Anschließend wird die Temperatur gesenkt und die Primer binden an. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf das Optimum der verwendeten Polymerase eingestellt, die ausgehend vom Primer den Doppelstrang wieder vervollständigt. Diese drei Schritte werden zyklisch wiederholt, wodurch sich ein exponentieller Anstieg der DNA-Menge ergibt.

Das Temperaturprofil ist sehr entscheidend für die Selektivität und Ausbeute der PCR. Gerade bei geringen Mengen an DNA-Vorlage ist eine vollständige Aufspaltung in die beiden Einzelstränge nötig, da es sonst in den weiteren Zyklen zu einer verstärkten Amplifizierung der Bruchstücke und somit zu einer Vielzahl von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten kommt. Salze und Solute haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die optimalen Temperaturen für die einzelnen Schritte. Während Salze und hier besonders die Kationen die Schmelztemperatur der DNA steigern, da sie sich an das negativ geladene Phosphatrückgrad anlagern und so die Doppelstränge festigen, steigern Zwitterionen wie Betain die Dielektrizität der Lösung und schwächen somit die ionischen Wechselwirkungen (FLOCK et al., 1995; FLOCK et al., 1996a,b). Dadurch wird der Schmelzpunkt der DNA gesenkt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der kompatiblen Solute, verschiedener Salze sowie Kombinationen von Soluten und Salzen auf den Schmelzpunkt von doppelsträngiger DNA untersucht. Dazu wurde am Ende der PCR (nach 40 Zyklen) der Schmelzpunkt der DNA ermittelt. Anschließend wurden die Proben mit Solut- und/oder Salzlösung versetzt. Es

wurden erneut fünf Amplifikationszyklen durchgeführt, bevor der Schmelzpunkt der DNA nochmal bestimmt wurde. Aus diesen beiden Schmelzpunkten lässt sich die Schmelzpunktverschiebung, die durch den Zusatz der Solute und Salze zur PCR bewirkt wurde berechnen.

3.2.5.1. Einfluss von kompatiblen Soluten auf den Schmelzpunkt T_m von dsDNA

Die untersuchten Solute senkten, wie schon bei REES et al. (1993), HENKE et al. (1997) und LAPIDOT et al. (1999) für Betain, Ectoin und Hydroxyectoin beschrieben, konzentrationsabhängig den T_m der doppelsträngigen DNA. Salz hatte dabei einen entgegengesetzten Effekt, der aber nicht wie bei den kompatiblen Soluten linear mit der Konzentration anstieg, sondern eine Sättigungskurve beschrieb. Bei höheren Konzentrationen kam es häufig zu einer Peakverbreiterung in der Ableitung der Schmelzkurve, welche auf einen grösseren Schmelzbereich hindeutet. Oberhalb von 0,5 M ist bei NaCl und DCE kein Aufschmelzen der dsDNA mehr zu sehen.

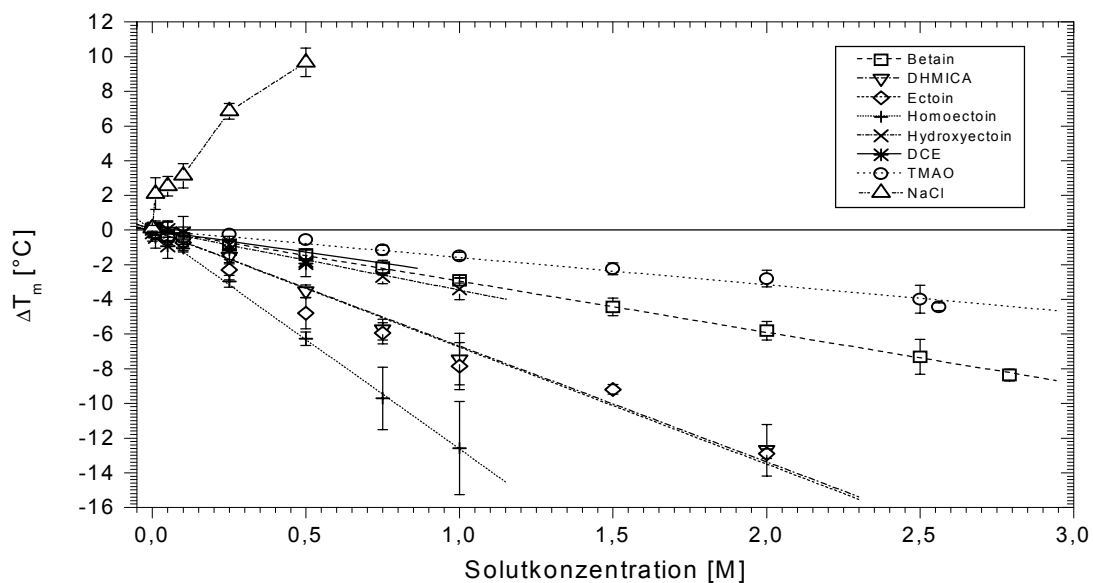


Abb. 3.2.5.1.: Schmelzpunkt T_m von doppelsträngiger DNA (dsDNA) bei der PCR in Abhängigkeit von der Konzentration kompatibler Solute im Puffer. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 - 10 voneinander unabhängigen Messungen. Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung.

In Abb. 3.2.5.1. ist die lineare Abhängigkeit des Schmelzpunktes von der Solutkonzentration deutlich zu erkennen. In Tabelle 3.2.5.1. sind die Steigungen der Regressionsgeraden aufgeführt. Diese Stellen ein Maß für die Fähigkeit der Solute dar, die dsDNA zu destabilisieren und somit eine Aufspaltung in die komplementären Einzelstränge zu erleichtern.

Hierbei zeigte das synthetische Solut Homoectoin mit $-12,6^{\circ}\text{C}$ pro Mol Solut einen fast doppelt so grossen Effekt wie DHMICA und Ectoin. DHMICA und Ectoin zeigten eine molare Destabilisierung der DNA um $-6,7^{\circ}\text{C}/\text{M}$ bzw. $-6,8^{\circ}\text{C}/\text{M}$. Die drei Solute Hydroxyectoin, das kationische DCE und Betain erreichten Werte zwischen $-2,5^{\circ}\text{C}/\text{M}$ und $-3,5^{\circ}\text{C}/\text{M}$, während TMAO mit $-1,6^{\circ}\text{C}/\text{M}$ nur einen relativ kleinen Effekt auf die DNA hatte.

Tab. 3.2.5.1.: Molarer Einfluss der kompatiblen Solute auf den Schmelzpunkt T_m von doppelsträngiger DNA.

Solut	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}/\text{M}$]
DHMICA	- 6,7
Ectoin	- 6,8
Homoectoin	- 12,6
Hydroxyectoin	- 3,5
DCE	- 2,5
Betain	- 3,0
TMAO	- 1,6
NaCl	positiv, nicht linear

NaCl steigerte den T_m schon bei einer Konzentration von nur 50 mM um ca. 2°C , der Effekt stieg mit zunehmender Konzentration nicht weiter linear an, sondern flachte bei höherer Konzentration ab. Bei einer Salzkonzentration von 0,5 M wurde der T_m der dsDNA um ca. 10°C angehoben. Bei noch grösseren Konzentrationen wurden die beiden DNA-Stränge während der Messung nicht mehr vollständig getrennt, so dass oberhalb von 0,5 M NaCl kein T_m mehr gemessen werden konnte.

3.2.5.2. Einfluss von Salzen auf den Schmelzpunkt T_m von dsDNA

Der T_m -steigernde Effekt von NaCl wurde in Kapitel 3.2.5.1. schon beschrieben. Da NaCl zusammen mit den kompatiblen Soluten gemessen wurde, lagen nur Messwerte ab 0,01 M

vor. Zwischen 0,01 und 0,05 M stimmen die Werte für NaCl mit den Werten der Mg-Salze überein. Als weitere Salze wurden KCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit einwertigen Kationen sowie die zweiwertigen CaCl_2 , MgCl_2 und MgSO_4 ausgewählt. Abbildung 3.2.5.2. zeigt deutlich den Unterschied zwischen den beiden untersuchten Magnesiumsalzen sowie NaCl und den weiteren Kationen mit den beiden Anionen Chlorid und Sulfat.

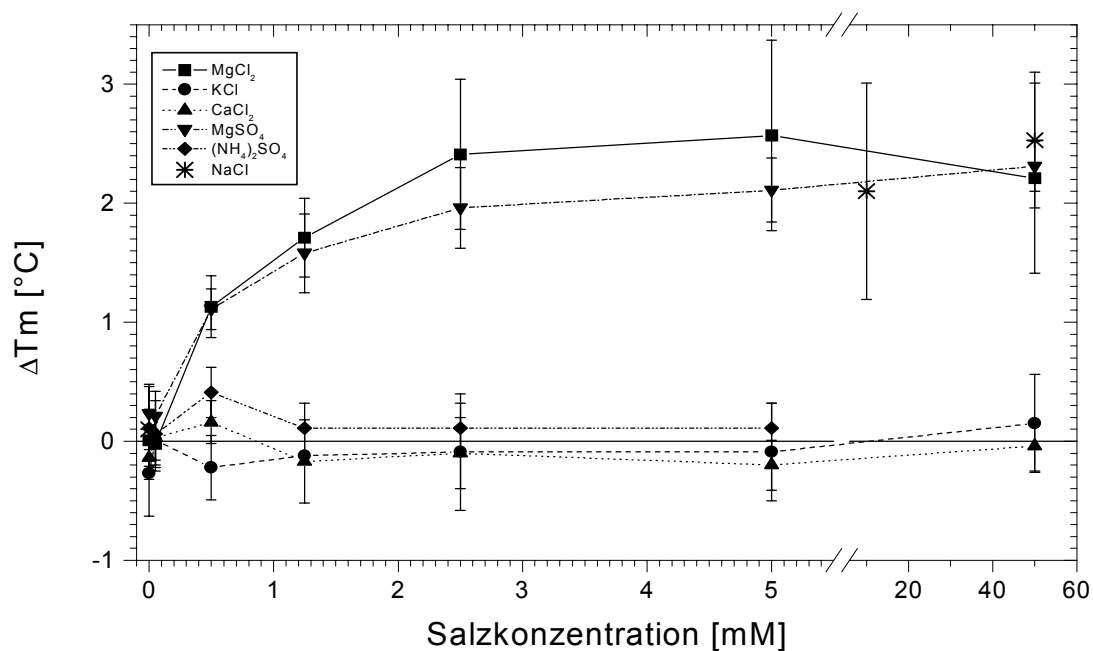


Abb. 3.2.5.2.: Schmelzpunktdifferenz ΔT_m von doppelsträngiger DNA (dsDNA) nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Salze. Die auf der X-Achse angegebene Salzkonzentration ist die Endkonzentration im Puffer. Da der Einfluss von NaCl zusammen mit den kompatiblen Soluten, bei höheren Konzentrationen gemessen wurde, lagen für NaCl keine Werte zwischen 0 - 0,01 M vor.

Während KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und CaCl_2 im Rahmen des Messfehlers keinen Einfluss auf das Schmelzverhalten der dsDNA hatte, zeigten die beiden Magnesiumsalze MgCl_2 und MgSO_4 einen ähnlichen Einfluss auf den T_m der dsDNA, wie NaCl. Schon bei einer Konzentration von 2,5 mM steigerten sie den T_m um über 2°C. Zwischen 5 mM und 50 mM änderte sich der T_m der dsDNA nicht mehr und oberhalb von 50 mM beeinflussten die Salze die PCR-Reaktion derart, dass kein Schmelzen der beiden DNA-Stränge mehr beobachtet werden konnte. Dieses kann z. B. durch eine Zerstörung der einzelsträngigen DNA oder der Polymerase kommen. In beiden Fällen findet kein Aufbau eines Doppestranges mehr statt, so dass auch kein Schmelzpunkt mehr beobachtet werden kann. Da die beiden Magnesiumsalze

MgCl₂, MgSO₄ und NaCl sich im Rahmen des Messfehlers identisch verhalten und ausserdem die gleichen Anionen mit den weiteren ein- und zweiwertigen Kationen keinen Einfluss auf den Schmelzpunkt der dsDNA hatten, ist davon auszugehen, dass das Mg²⁺- und das Na⁺-Ion direkt mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der dsDNA wechselwirkte und so die Bindung der beiden Stränge festigt. Dieses könnte ein Grund sein, warum halophile Mikroorganismen, die sich nach der „Salt-in-Methode“ an ihren Lebensraum angepasst haben, KCl und nicht NaCl im Cytosol akkumulieren.

3.2.5.3. Einfluss von Kombinationen aus Salzen und kompatiblen Soluten auf den Schmelzpunkt T_m von dsDNA

Um zu überprüfen, ob sich die Effekte von Soluten und Salzen auf den T_m von dsDNA additiv verhalten, wurden PCR-Proben mit NaCl, MgCl₂ oder MgSO₄ zusätzlich mit Solut versetzt. Dabei verhielten sich die Effekte der Salze und Solute additiv. Die beiden Magnesiumsalzen zeigten untereinander keinen Unterschied, während die unterschiedliche Fähigkeit der Solute den Schmelzpunkt der dsDNA zu senken sehr deutlich wird.

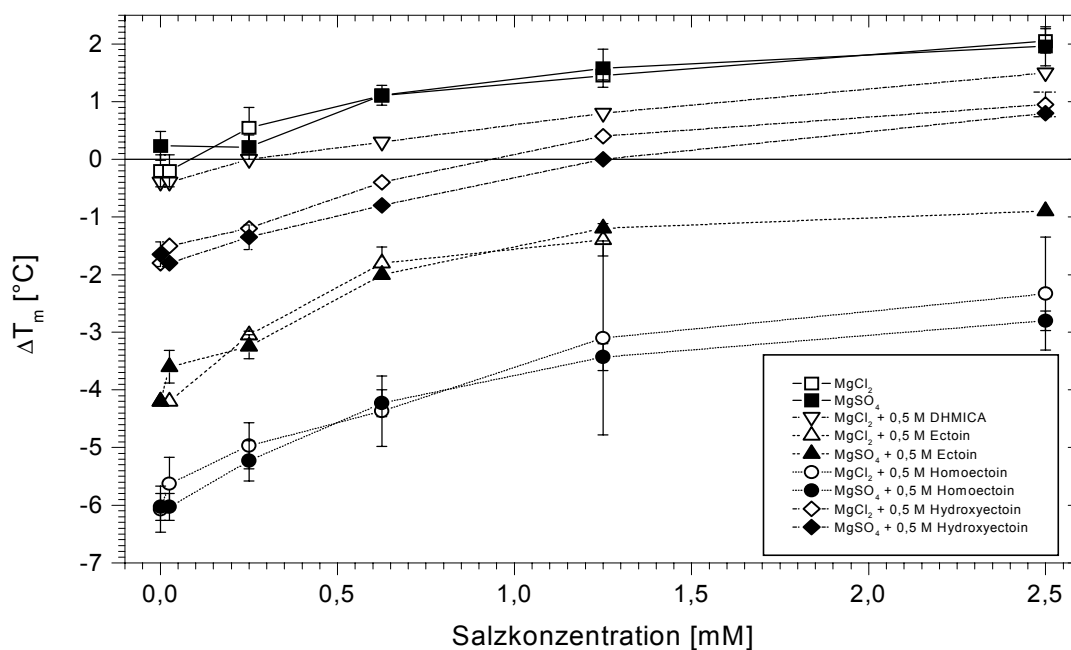


Abb. 3.2.5.3a.: Additiver Effekt von Kombinationen aus Salzen und kompatiblen Soluten auf den T_m von dsDNA. Alle Solute wurden 0,5 M eingesetzt. Der Effekt der beiden Mg-Salze war im Rahmen der Fehlergrenzen gleich.

Es ist also möglich, den T_m -steigernden Einfluss von $MgSO_4$ durch Zugabe eines kompatiblen Solute zu kompensieren, oder sogar überzukompensieren. Der Zusatz von 0,5 M Hydroxyectoin kann die Zugabe von 1 mM Mg-Salz nivelieren. 0,5 M Ectoin oder Homoectoin senkten den T_m sogar soweit, dass selbst eine Mg-Konzentration von 2,5 mM nicht ausreichte um den T_m wieder auf den Normalwert zu steigern. Bei diesen beiden Soluten würden also eine Konzentrationen unterhalb von 0,5 M schon ausreichen, um den Effekt von 1 mM zusätzliches Mg^{2+} zu kompensieren. Somit ist es aufgrund dieser Messungen möglich abzuschätzen, wieviel Solut man zugeben muss, wenn man z. B. die Mg-Konzentration im PCR-Puffer um X mM anheben möchte.

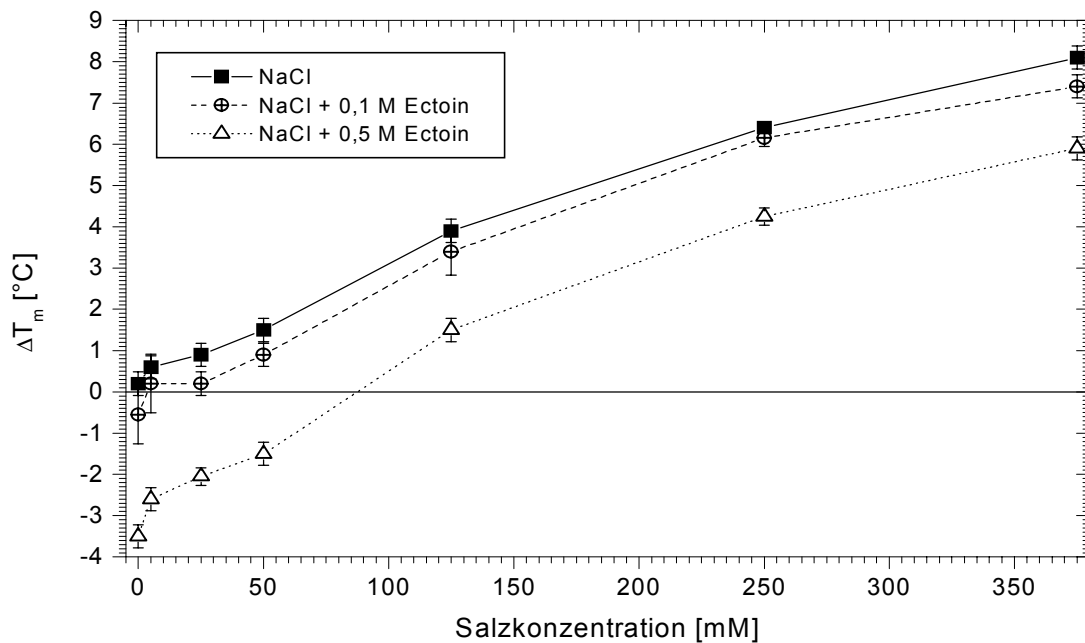


Abb. 3.2.5.3b.: Einfluss der Kombination von NaCl und Ectoin auf den T_m von dsDNA. Die beiden Effekte verhalten sich additiv.

Wenn man eine Kombination aus NaCl und Ectoin zu der PCR gibt, erhält man die gleichen Ergebnisse wie bei den Magnesiumsalzen zusammen mit den verschiedenen kompatiblen Soluten. Der Effekt von NaCl und Ectoin auf den Schmelzpunkt doppelsträngiger DNA verhalten sich additiv. Da NaCl auch in höheren Konzentrationen die PCR nicht so stark beeinflusste wie die Mg-Salze, konnte die Additivität auch bei Konzentrationen über 50 mM gezeigt werden. Abbildung 3.2.5.3b. zeigt, dass eine Ectoinkonzentration von 0,5 M den T_m

steigernden Effekt von 85 mM NaCl kompensiert. Die kompatiblen Solute können also in der Molekularbiologie dazu verwendet werden, den T_m -steigernden Effekt der Salze im PCR-Puffer zu unterbinden.

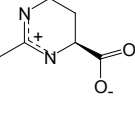
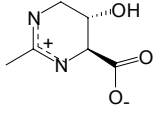
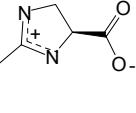
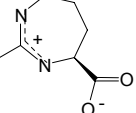
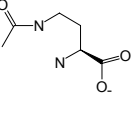
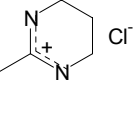
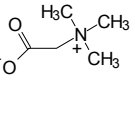
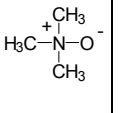
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

In den beiden folgenden Tabelle sind noch einmal alle Daten zu den in dieser Arbeit verwendeten Solute zusammengefasst. Tabelle 3.3a. zeigt eine Übersicht über die Synthesedaten sowie die spektroskopischen und chromatografischen Charakteristika der Solute, während in Tabelle 3.3b. noch einmal alle Daten zu den verschiedenen Stabilisierungsversuchen zusammengestellt sind.

Tabelle 3.3a.: Übersicht über die Daten zu den Synthesen der ectoinanalogen Solute.

IUPAC-Name	1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidin-carbonsäure	SS-β-Hydroxy-1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidin-carbonsäure	4,5-Dihydro-2-methyl-imidazol-4-carbonsäure	4,5,6,7-Tetrahydro-2-methyl-1H-[1,3]-diazepin-4-carbonsäure	3,4,5,6,7,8-Hexahydro-2-methyl-1,3-diazocin-4-carbonsäure	αN-Acetyl-diaminobutter-säure	γN-Acetyl-diaminobutter-säure	1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-pyrimidin Hydrochlorid
Struktur								
Trivialname	Ectoin	Hydroxyectoin	DHMICA	Homoectoin	HHMDCA	αNac-DABA	γNac-DABA	DCE
Summenformel	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₃	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₂	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	C ₅ H ₁₀ N ₂ *HCl
Molmasse [g/mol]	142,158	158,157	128,131	156,184	170,211	160,173	160,173	134,609
Ausbeute	65 %	gekauft	58,6 %	25 %	In Spuren bei der	In Spuren bei der	44 %	91 %
Reinheit nach FMOC-HPLC	> 99 %	> 99 %	> 99 %	> 99 %	Reaktion nachgewiesen.	Reaktion nachgewiesen.	> 99 %	> 98 %
isokrat. HPLC Retentionszeit 75 % AcN [min]	5,8 - 6,8	6,4 - 7,6	5,4 - 6,8	4,2 - 5,1	n. d.	11,0 - 13,5	7,3 - 12,5	n. d.
UV ₂₂₀ [FE/mM]	8.000.000	7.000.000	4.900.000	7.500.000		ca. 2.000.000	900.000	
RI [FE/mM]	81.000	85.000	65.000	85.000		ca. 72.000	68.000	
¹³ C-NMR-Signale 75,5 Mhz, D ₂ O [ppm]	21,00 24,16 40,06 55,95 163,27 179,29	20,79 45,46 62,26 62,77 136,33 177,00	14,70 51,42 62,42 170,80 178,65	23,38 27,16 32,45 46,22 61,58 168,09 179,23	19,23 28,46 28,75 28,94 44,09 56,69 166,45 181,53	26,20 40,41 40,59 56,90 178,50 185,97	24,63 33,08 38,32 55,35 176,93 177,39	20,21 20,94 2 × 41,25 164,62
Bemerkungen			DL-Racemat					

Tab. 3.3b.: Zusammenfassung der Daten der in dieser Arbeit verwendeten Solute zur Stabilisierung von Biomolekülen

IUPAC-Name	1,4,5,6-Tetrahydro-2-mehtyl-4-pyrimidin-carbonsäure	SS-β-Hydroxy-1,4,5,6-tetrahydro-2-mehtyl-4-pyrimidin-carbonsäure	4,5-Dihydro-2-methylimidazol-4-carbonsäure	4,5,6,7-Tetrahydro-2-methyl-1H-[1,3]-diazepin-4-carbonsäure	γN-Acetyl-diamino-buttersäure	1,4,5,6-Tetrahydro-2-mehtyl-pyrimidin Hydrochlorid	Glycin-betain	Trimethyl-amin-N-oxid	weitere Testsubstanzen		
Struktur											
Trivialname	Ectoin	Hydroxyectoin	DHMICA	Homoectoin	γNac-DABA	DCE	Betain	TMAO			
Wachstum von <i>E. coli</i> DH5α in MM63 bei 3 % (w/v) NaCl mit 2 mM Solut-Supplementierung (Tab. 3.2.1.2.)									Kontrolle		
μ [h ⁻¹]	0,26	0,36	0,34	0,17	0,12	0,10	0,38	0,14	0,13		
t _D [h]	2,63	1,64	2,06	4,01	5,98	7,22	1,87	4,81	5,46		
OD ⁶⁰⁰ _{max}	2,95	4,2	3,41	2,38	1,95	0,56	2,95	2,63	2,65		
Solutgehalt [mmol/g TBM]	0,55	0,66	0,44	0,39	0,02	n. d.	0,97	0,03	0		
Trehalosegehalt [mmol/g TBM]	0,07	0,00	0,06	0,16	0,39	0,06	0,03	0,33	0,39		
absoluter und molarer Einfluss von kompatiblen Soluten auf den T _m von RNase A gemessen im DSC (Tab. 3.2.2.)									NaCl	Prolin	Acetamidin Hydrochlorid
abs. ΔT _m [°C]	+ 5,7	+ 13,7	+ 10,7	- 1,5	n.d.	- 16,1	+ 10,2	+ 12,3	+ 10,2	+ 6,9	+ 20,4
mol.ΔT _m [°C/M]	+ 1,7	+ 4,1	+ 2,3	- 0,4	n. d.	- 4,5	+ 4,4	+ 5,8	+ 2,9	- 4,8	+ 4,2
molarer Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Transferenergie ΔG _{tr} von DKP für den Transfer von reinem Wasser zu Solutlösung (Tab. 3.2.3.1.)											Harnstoff
ΔΔG _{tr} [J×mol ⁻¹ ×K ⁻¹]	+ 256 ± 13	+ 230 ± 11	+ 170 ± 2	+ 177 ± 14	n. d.	+ 172 ± 8	+ 278 ± 12	+ 401 ± 4	- 109 ± 5	+ 139 ± 10	- 156 ± 12
Radikalfängereigenschaften der kompatiblen Solute (Tab. 3.2.4.2.)									Saccharose		
Art der Wechselwirkungen	Verzögerung des H ₂ O ₂ -Zerfalls	C _{HS} ⁵⁰ = 0,611 M	C _{HS} ⁵⁰ = 0,241 M	Verzögerung des H ₂ O ₂ -Zerfalls	n. d.	Verzögerung des H ₂ O ₂ -Zerfalls	kein Radikal-schutz	n. d.	C _{HS} ⁵⁰ = 0,024 M		
Einfluss der kompatiblen Solute auf den Schmelzpunkt T _m von doppelsträngiger DNA in der PCR (Tab. 3.2.5.1)											
ΔT _m [°C/M]	- 6,8	- 3,5	- 6,7	- 12,6	n. d.	- 2,5	- 3,0	- 1,6	n. linear		

4. Diskussion und Ausblick

In den folgenden Kapiteln sollen die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit noch einmal diskutiert und mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen verglichen werden. Ferner werden weitere Forschungsgebiete aufgezeigt, die in Zukunft zu einem noch umfassenderen Verständnis der Wirkung von kompatiblen Soluten auf Biomaterialien führen können.

4.1. Herstellung von kompatiblen Soluten

Kompatible Solute lassen sich prinzipiell auf zwei Arten gewinnen. Entweder kann man die Solute aus natürlichen Organismen isolieren (KUNTE et al., 1993), oder rein chemisch synthetisieren (KOICHI et al., 1991). Die beiden Verfahren können gegebenenfalls auch kombiniert werden, indem man eine Vorstufe chemisch herstellt und diese anschließend durch Mikroorganismen in das Endprodukt umwandeln lässt (Biokonversion, Biotransformation) oder eine in Bakterien produzierte bzw. akkumulierte Substanz *in vitro* chemisch weiter umsetzt. Verschiedene Aminosäuren und Steroid-Hormone werden zum Beispiel so hergestellt (RÖMP, 1995). Die zwei Methoden haben unterschiedliche Vor- und Nachteile.

Die Produktion von kompatiblen Soluten in extremophilen Bakterien erfolgt aufgrund der chiralen Enzymoberflächen stereoselektiv und eignet sich daher besonders für komplexe Strukturen, die auf chemischem Wege nur über eine aufwendige, mehrstufige Synthese herzustellen sind. Die meisten chemischen Reaktionen sind nicht stereoselektiv, so dass durch die biotechnologische Solutproduktion eine kostspielige und verlustreiche Aufreinigung, wie zum Beispiel eine Racematspaltung mittels einer chiralen HPLC-Säule, vermieden werden kann. Die Aufreinigung der chemischen Rohprodukte reduziert die Produktausbeute und macht sie häufig unrentabel. S,S- β -Hydroxyectoin ist zum Beispiel aufgrund seiner zwei benachbarten Stereozentren und der weiteren funktionellen Gruppen chemisch nicht einfach zu synthetisieren und kann leichter und billiger aus halophilen Organismen wie *Marinococcus halophilus* isoliert und aufgereinigt werden.

Bei einigen Soluten benötigen die zur Synthese verwendeten Organismen sehr extreme Anzuchtbedingungen, oder sie akkumulieren nur geringe Mengen der gewünschten Produkte. Daher ist in der Vergangenheit viel daran geforscht worden die Synthesewege der Solute gentechnisch in einen einfacher kultivierbaren Laborstamm wie zum Beispiel *E. coli* zu

übertragen. MARTINS et al. (1999) haben die Mannolylglycerat-Synthase aus *Rhodothermus marinus* in *E. coli* überexpressiert und konnten so die bei der Anzucht von *Rhodothermus marinus* erforderlichen hohen Temperaturen umgehen. Daraus ergibt sich aber das Problem, dass die Akzeptanz gentechnisch hergestellter Produkte in der Öffentlichkeit recht gering ist, und sich die so hergestellten Solute unter Umständen schwerer vermarkten lassen. Teilweise arbeiten die rekombinanten Proteine in *E. coli* auch nur suboptimal und erzeugen somit weniger Produkt, als ihre natürlichen Equivalente.

Die Produktion von kompatiblen Soluten in extremophilen Organismen ist auf die Herstellung natürlich vorkommender Strukturen beschränkt. In der rein chemischen Synthese können hingegen auch strukturverwandte Solute hergestellt werden. So kann das Spektrum der kompatiblen Solute erweitert werden, wie die in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen von DHMICA, Homoectoin und DCE zeigen. Ferner ist es chemisch auch möglich die Diastereomere herzustellen, die in der Natur nicht als kompatible Solute genutzt werden (z.B. D-Ectoin).

Die für diese Arbeit durchgeführten Synthesen haben in guten Ausbeuten und Reinheiten zu den gewünschten Produkten geführt. Sie lassen sich aber sicherlich, durch Variation der Syntheseparameter wie pH, Temperatur, Lösungsmittel, Eduktkonzentrationen und Reaktionsdauer, noch weiter optimieren. Die von KOICHI et al. (1991) vorgestellte Synthese von L-Ectoin konnte so modifiziert werden, dass die Ringgröße der Solute variiert wurde. DHMICA wurde aus Kostengründen nur als racemisches Gemisch der D- und L-Form hergestellt, die Synthese des L-Diastereomers sollte aber keine Problem darstellen, wenn man statt D,L-2,3-Diaminopropionsäure das reine L-Isomer wählt. Eine Ringvergrößerung über den Siebenerring des Homoectoins erscheint nicht sinnvoll, da die Synthese von HHMDCA gezeigt hat, dass die Ausbeute aufgrund sterischer Behinderungen nur sehr gering ist. Ferner erhöht sich die Hydrophobizität des Produktes, wodurch die Wasserlöslichkeit gesenkt wird und mögliche Anwendungen auf einen kleineren Konzentrationsbereich beschränkt wären.

4.2. Weitere interessante Strukturen

Eine weitere Variation der Ectoinstruktur ist sicherlich möglich und sinnvoll, um die stabilisierenden Eigenschaften der Solute weiter zu untersuchen.

Über einen einfachen Anionenaustauscher kann das Cl⁻ als Gegenion im DCE ausgetauscht werden. Zunächst sollte hier sicherlich SO₄²⁻ als Gegenion getestet werden, da SO₄²⁻ ein stark strukturbildendes (kosmotropisches) Ion darstellt (COLLINS & WASHABAUGH, 1985). Bei der Proteinstabilisierung wird SO₄²⁻ häufig in der Ammonium-Form verwendet (GÖLLER & GALINSKI, 1999). Ein weiteres denkbare Gegenion zum DCE wäre eine anionische, ectoinanaloge Struktur. Da die anionische Struktur von dem Phosphatrückgrat der DNA abgestossen würde, sollten gerade die Ribonucleinsäuren sich mit einer Anionischen Struktur stabilisieren lassen. Die anionische Struktur hätte somit einen T_m-steigernden Effekt auf DNA und würde die Flexibilität der DNA also erhöhen und nicht wie bei den bisher bekannten Soluten senken. Ausgehend vom Ectoin lässt sich eine anionische Struktur durch die Einführung einer zusätzlichen Carboxylgruppe herstellen. Dazu könnte man (2S,4S)-2,4-Diaminoglutarsäure als Diaminokomponente in der Ectoinsynthese nach KOICHI et al. (1991) ausprobieren. Das Substrat könnte nach den Synthesenvorschriften von HELLMANN et al. (1960), TOI et al. (1960) oder BELOKON et al. (1987) hergestellt werden.

So wie Hydroxyectoin und Ectoin als natürliche kompatible Solute vorkommen, könnte man die hydroxylierten Varianten von DHMICA und Homoectoin herstellen, indem man die hydroxylierten Edukte einsetzt.

Neben den bekannten Soluten, die alle kleine, gut lösliche Moleküle darstellen (GALINSKI, 1995; da COSTA et al., 1998), sind auch makromolekulare Solute vorstellbar, an die *in vitro* Biomoleküle angekoppelt werden können. Wenn man zum Beispiel Proteine oder ganze Zellen an die Polymermatrix aus kompatibelem Solut anbindet werden die Biomoleküle immobilisiert, gleichzeitig stabilisiert und bilden so eine bioaktive Festphase, die in Abhängigkeit von dem Biomolekül für die unterschiedlichsten Anwendungen genutzt werden könnte. Die Polymerisation der kompatiblen Solute könnte durch Veresterung der OH-Gruppe von Hydroxyectoin mit der Carboxylgruppe erfolgen. Alternativ könnten die bei der Synthese von Homoectoin oder HHMCDA als Nebenprodukte entstehenden Polymere verwendet werden.

4.3. Wechselwirkungen von kompatiblen Soluten mit Biomolekülen

In der Natur haben sich gegen die unterschiedlichen Stressfaktoren wie Hitze, Kälte, hohe Osmolarität, und Trockenheit verschiedene Schutzstoffe gebildet. Während die Polyole wie Glycerin, Disaccharide und deren Derivate hauptsächlich in thermophilen Organismen als kompatible Solute gefunden werden, wirken die Methylamine wie Betain, Sarcosin und TMAO hauptsächlich gegen Salzstress, letzteres in der Regel in Kombination mit Harnstoff bei Meeresbewohnern. Gegen Osmostress haben sich ferner kleine Aminosäuren wie Prolin und die Tetrahydropyrimidine (Ectoine) als kompatible Solute durchgesetzt (BOLEN & BASKAKOV 2001). Trehalose und somit ein Zucker wird aber auch von nicht halophilen Bakterien wie *E. coli* als Osmolyt gegen Osmostress akkumuliert und ist *in vivo* und *in vitro* ein guter Schutzstoff gegen Trocknungsschäden an Membranen (CROWE et al., 1986; CROWE et al., 1992; LESLIE et al., 1995).

Aufgrund der Vielfalt an unterschiedlichen Biomolekülen und Soluten ist es sehr schwer, eine Vorhersage zu treffen, wie der Zusatz eines Solutes zum Lösungsmittel sich auf die Stabilität eines Biomoleküles auswirkt. Deshalb gibt es zur Wirkungsweise der kompatiblen Solute verschiedene Theorien, die an unterschiedlichen Testsystemen entwickelt wurden. Die vier in der Einleitung erläuterten Theorien schließen sich aber nicht gegenseitig aus, sondern ergänzen sich teilweise. Da CLEGG et al. (1982) die „Water Replacement Hypothesis“ anhand getrockneter Zellen aufstellten, gilt diese nur für eine sehr geringe Wasseraktivitäten und somit hohe Solutkonzentrationen. So stellt die „Water Replacement Hypothesis“ einen Sonderfall der „Preferential Interaction Theorie“ von ARAKAWA & TIMASHEFF (1983) dar. Nach dieser werden die Biomoleküle durch den Ausschluss der kompatiblen Solute von der Oberfläche stabilisiert, aber gerade bei hohen Solutkonzentrationen können direkte Wechselwirkungen zwischen den Soluten und den Biomolekülen nicht mehr ausgeschlossen werden. BOLEN & BASKAKOV (2001) hingegen untersuchten die Löslichkeitsunterschiede von Aminosäuren und Diketopiperazin (DKP) in Wasser und Solutlösungen, während WIGGINS (1990) ihre Beobachtungen an wässrigen Gelen machte.

Betrachtet man die Wirkung von kompatiblen Soluten auf ganze Bakterienzellen, so wird das System durch das Zusammenspiel unterschiedlichster Moleküle wie Proteine, Nucleinsäuren und Lipiden weitaus komplexer als in den Modellen der vier Theorien. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass die verschiedenen Forschergruppen nicht zu einer allumfassenden sondern zu den unterschiedlichen Theorien gelangten.

Ein weiteres Problem bei der Messung des Einflusses von Soluten auf Biomoleküle ist, dass die Wechselwirkungen zwischen Soluten und Biomolekülen sowie Wasser und Biomolekülen oft in der gleichen Grössenordnung liegen, so dass die durch die Solute bewirkte Differenz oft nur sehr klein ist. Deshalb wurde der „solvophobe“ oder genauer der „osmophobe Effekt“ der Solute auch lange Zeit nicht entdeckt (BOLEN & BASKAKOV, 2001).

In einem Punkt sind sich aber alle Forschergruppen einig: Beim gleichzeitigen Einsatz mehrerer Solute verhalten diese sich als Individuen, so dass die Effekte der Solute additiv sind. Diese Hypothese wird auch durch die Daten dieser Arbeit gestützt. Sowohl der Effekt von NaCl in Kombination mit Ectoin auf den Schmelzpunkt T_m von RNase A (Kapitel 3.2.2.), als auch der Effekt einer Mischung aus einem kompatiblen Solut mit einem Magnesium- oder Natriumsalz auf den T_m von doppelsträngiger DNA (Kapitel 3.2.5.3.) waren vollständig additiv. Für Solute, die untereinander wechselwirken bleibt diese Additivität zu überprüfen.

Da sich unzählige viele Kombinationen von kompatiblen Soluten und Biomolekülen bilden lassen, gibt es auch eine Vielzahl von möglichen Messmethoden um die Wechselwirkungen zu detektieren. Hier sind exemplarisch ein paar, zumeist spektroskopische, Methoden aufgeführt, die einen weiteren Einblick in die Natur der Wechselwirkungen zwischen Wasser, Soluten und Biomolekülen geben könnten:

- Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) mittels SPR-Biosensor (JÄGER et al., 1997; HERBERG & ZIMMERMANN, 1999),
- Dielektrische Relaxationspektroskopie (KAATZE, 1990),
- Einzelmolekül-Kraftspektroskopie (JANSHOFF et al., 2000; OBERDÖRFER et al., 2000; SCHROT, 2001),
- Fluoreszenzspektroskopie (DIEHL et al., 2001),
- Infrarotspektroskopie im nahen UV-Bereich (LEVER, et al., 2001; REINSTÄDLER et al., 1996),
- Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (FULLERTON et al., 1982),
- Oberflächenspannung (BRESLOW & GUO, 1990; FREITAS et al., 1997).

Auf UV-spektroskopische Methoden wie zum Beispiel Cirkulardichroismus (CD-Spektroskopie) zur Strukturermittlung von Proteinen und Nucleinsäuren kann beim Einsatz kompatibler Solute mit ectoinähnlicher Strukturen nicht zurückgegriffen werden, da die Solute selber eine sehr grosse UV-Absorption besitzen.

4.3.1. Wechselwirkungen von kompatiblen Soluten mit Proteinen

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Wechselwirkungen der kompatiblen Soluten mit den in dieser Arbeit untersuchten Biomolekülen diskutiert. Bei der Betrachtung der Effekte der Osmolyte auf ganze Zellen lassen sich einige der Effekte wiederfinden, die auch schon bei der Untersuchung von Soluten und einzelnen Biomolekülen auftraten.

Die Wechselwirkungen von kompatiblen Soluten mit Proteinen wurden zum Einen anhand des Schmelzpunktes T_m des Modellenzymes RNase A und zum Anderen über die Transferenergie ΔG_{tr} der 20 biogenen Aminosäuren sowie Diketopiperazin (DKP) als Modell für das Peptidrückgrat untersucht.

4.3.1.1. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Proteinestabilität gemessen am Schmelzpunkt T_m des Modellenzym RNase A

Der Schmelzpunkt T_m von RNase A wurde in Gegenwart steigender Solutkonzentrationen gemessen (Kapitel 2.3.2.). Die von den meisten Soluten erreichte Proteinestabilisierung lässt sich mit dem bevorzugten Ausschluss der Solute von der Proteinoberfläche erklären (TIMASHEFF, 1998). So werden die hydrophoben Wechselwirkungen im Proteininneren durch die Solute in der Lösung gestärkt, so dass die Proteine starrer werden und erst bei höherer Temperatur aufschmelzen (Kapitel 3.2.2.). SCHROT (2001) findet bei seinen kraftspektroskopischen Untersuchungen mit dem extrazellulärem Matrixprotein Fibronectin eine Erhöhung der Biegesteifigkeit des Proteins und somit eine Stabilitätssteigerung, durch die Solute Ectoin und Sarcosin.

Die kalorimetrischen Untersuchungen der Stabilität von RNase A in Gegenwart von kompatiblen Soluten haben ergeben, dass eine zwitterionische hydrophile Struktur wie sie im Hydroxyectoin enthalten ist die besten Resultate erzielt. Im Rahmen der Fehlergrenzen stimmen die in dieser Arbeit ermittelten Werte mit denen von KNAPP et al. (1999) überein.

Bei den Soluten TMAO, NaCl, Prolin und Betain kam es bei Konzentrationen über 2 M zu einer Verringerung der molaren T_m -Steigerung und bei Betain oberhalb einer Konzentrationen von 4,5 M sogar zu einem Absinken des T_m -wertes. Eventuell werden die direkten Wechselwirkungen der Solute mit der Proteinoberfläche ab dieser Konzentration stärker, als die indirekte, stabilisierende Wirkung durch den Ausschluss der Solute von der Proteinoberfläche. Bei dieser Konzentration ist dann der Übergang von Fall C (bevorzugter

Ausschluss) zu Fall A (bevorzugte Bindung) in der „Preferential Interaction Theorie“ von ARAKAWA & TIMASHEFF (1983).

Bei einer TMAO-Konzentration über 2 M denaturierte bei jedem Aufheizzyklus ein Teil der RNase A und oberhalb von 3 M kam es bei Raumtemperatur sogar zu Proteinausfällungen. Deshalb sollten die Solute, bei denen der Schmelzpunkt der RNase A nicht linear mit der Konzentration ansteigt, nur bis 2 M zur Proteinstabilisierung verwendet werden. Die Destabilisierung bei höheren Solutkonzentrationen kann auch ein Grund sein, warum nicht alle Solute gleich gut gegen Einfrier-Auftau-Stress schützen. Beim Einfrieren der Proben friert das freie Wasser zunächst aus und die Solutkonzentration steigt an, bis die Probe komplett gefroren ist.

Die ectoinähnlichen Solute sowie die Methylamine Betain und TMAO zeigten durchweg einen positiven Effekt auf die Stabilität der RNase A. Lediglich der Zusatz von Homoectoin bewirkte eine leichte und die Zugabe von DCE sowie Acetamidin Hydrochlorid eine starke Destabilisierung. Die höhere Hydrophobizität von Homoectoin im Vergleich zu den anderen Soluten erleichtert scheinbar die Auffaltung des Proteines. Die RNase A denaturiert im Kalorimeter reversibel, da das Aufschmelzen nach dem Abkühlen der Probe erneut beobachtet werden konnte. Die kationische Struktur von DCE und Acetamidin Hydrochlorid wechselwirkt aber scheinbar so stark mit dem Protein, dass dieses schon bei niedrigerer Temperatur zum Teil irreversibel denaturiert. Die zwitterionische Struktur, wie sie die natürlichen Solute Betain, Ectoin und Hydroxyectoin besitzen scheint also vorteilhaft für die Stabilisierung von RNase A zu sein. Ob eine anionische Struktur einen ähnlich stabilisierenden Effekt auf das Protein hat, wie die bisher bekannten Ectoine bleibt zu überprüfen. Die Additivität des T_m -steigernden Effektes der Solute konnte anhand des Beispiels von NaCl und Ectoin gezeigt werden.

Da die Proteinauffaltung ein kooperativer Effekt ist, ist der initiale Schritt sehr entscheidend für die Denaturierung eines Proteins. Wenn man den „Weak-Point“, also die Schwachstelle eines Proteins kennt, kann man diese gezielt schützen und das Protein so in seiner nativen Form stabilisieren. Durch molekularbiologische Methoden ist es heutzutage möglich einzelne Aminosäuren in einem Protein auszutauschen. ARNOLD und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Aminosäuren Lysin 31 bis Phenylalanin 46 für die native Form der RNase A wichtig sind (ARNOLD et al., 1996; 1999). CHATANI et al. (2001; 2002) konnten mit den beiden Phenylalaninen in Position 46 und 120 zwei für die Struktur der RNase A wichtige Aminosäuren detektieren.

Bei einer längeren Lagerung eines Proteins kann es durch die Sauerstoffeinwirkung der Umgebungsluft zu oxidativen Schäden kommen (ANDERSON et al., 2000). Hiervon sind häufig gerade die Disulfidbrücken und somit die Cysteinseitenketten betroffen die in einem funktionellen Enzym die einzelnen Untereinheiten zusammenhalten (LAITHY, et al., 1997; SHIMOTAKAHARA et al., 1997). Daher sollte ein idealer Proteinstabilisator auch oxidativen Stress, der die Disulfidbrücken zerstören kann, abwenden können. ANDERSON et al. (2000) konnten zeigen, dass Lactatdehydrogenase (LDH) durch Hydroxyectoin besser gegen oxidativem Stress geschützt wird als durch Saccharose und Sorbitol. Auch auf diesem Gebiet können kompatible Solute also eingesetzt werden.

Die Stabilisierung eines Proteins gegen Hitze wurde hier exemplarisch am Modell der RNase A gezeigt. Die RNase A unterscheidet sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung wesentlich von dem Aufbau der meisten Proteine in *E. coli*. Abbildung 4.3.1.1. zeigt die Unterschiede deutlich.

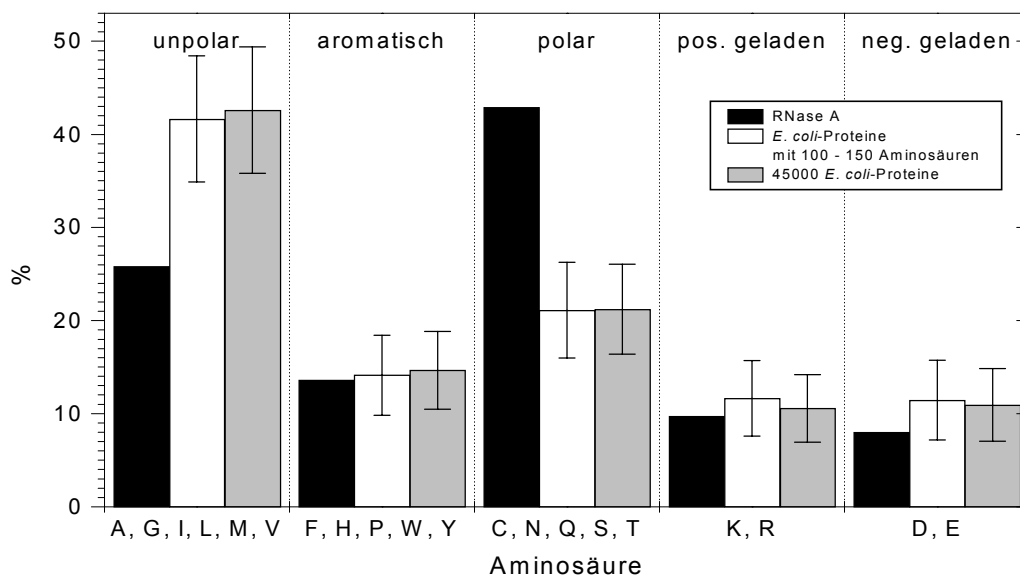


Abb. 4.3.1.1.: Aminosäurezusammensetzung von RNase A (schwarz), ca. 45000 Proteinen aus *E. coli* (hellgrau) sowie 5700 Proteinen aus *E. coli* mit einer Länge von 100 - 150 Aminosäuren (weiß). Die *E. coli*-Proteine wurden willkürlich ausgewählt und entsprechen in etwa 75 % bzw. 10 % des Gesamtproteins aus *E. coli* (EGLER, pers. Mitteilung). Die Aminosäuren sind mit dem Einbuchstaben-Code abgekürzt.

Der Durchschnitt der 5700 Proteine mit einer Länge von 100 bis 150 Aminosäuren unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung kaum von dem Durchschnitt der 45000 willkürlich ausgewählten Proteine aus *E. coli*. Im statistischen Mittel setzt sich ein *E. coli*-Protein aus 50 % aromatischen und unpolaren, 25 % polaren und jeweils 12,5 % negativ und positiv geladenen Aminosäuren zusammen. Der wesentliche Unterschied von RNase A liegt darin, dass sie besonders viele polare und entsprechend weniger unpolare Aminosäuren enthält. Die Anteile der geladenen und aromatischen Aminosäuren ist im Rahmen der Fehlergrenzen genauso hoch wie bei den *E. coli*-Proteinen. Daher stellt RNase A zwar ein leicht zu handhabendes, nicht aber ein sehr repräsentatives Modellenzym dar und die stabilisierenden Eigenschaften der Solute sollten auf alle Fälle an weiteren Proteinen getestet werden.

Im Differentialkalorimeter könnte man besonders gut Enzyme untersuchen, die in der Natur nur eine sehr niedrige thermodynamische Stabilitätskurve besitzen. α -Amylase aus dem antarktischen Bakterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* besitzt thermodynamisch gesehen die geringste Stabilität aller bekannten Enzyme und daher ist bei diesem Enzym das Potential zur Temperaturstabilisierung am grössten (GERDAY et al., 1997; GERDAY & FELLER, 1999; FELLER et al., 1999).

Um einen umfassenden Überblick über die Effekte von Soluten auf die Proteinstabilität zu erhalten, genügt es nicht, sich nur einen Stressfaktor wie die Hitzedenaturierung anzuschauen, sondern es ist notwendig, verschiedene Proteine und verschiedene Stressfaktoren zu untersuchen. Ein weiteres häufig verwendetes Testenzym ist Lactatdehydrogenase (LDH), welche durch kompatible Solute gegen den Stress geschützt wird, der bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen des Proteins entsteht (LIPPERT & GALINSKI, 1992; GÖLLER & GALINSKI, 1999). Homoectoin konnte in einer Konzentration von 1 M nach achtmaligem Einfrieren und Auftauen über 80 % der eingesetzten Enzymaktivität erhalten, während Betain nur ca. 20 %, Ectoin und Hydroxyectoin jeweils 60 % der Aktivität konservierten (GÖLLER, pers. Mitteilung). Das synthetische Solut Homoectoin ist somit wesentlich potenter LDH gegen den Stress beim Einfrieren und Auftauen zu schützen, als die natürlichen Solute Betain, Ectoin und Hydroxyectoin. Andererseits zeigte Homoectoin im Kalorimeter einen leichten, destabilisierenden Effekt auf die RNase A (Kapitel 3.2.2.). Wenn ein Solut ein Enzym gegen einen Stressfaktor schützt, heisst dieses nicht automatisch, dass es ein anderes Enzym gegen einen anderen Stress ebenfalls schützt. Die protektiven Eigenschaften der Solute müssen also einzeln für jede Kombination aus Solut, Protein und Stressfaktor untersucht werden.

4.3.1.2. Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Transferenergie ΔG_{tr} von Proteinen

Um den Effekt der kompatiblen Solute auf die Transferenergie ΔG_{tr} einzelner Aminosäuren beim Übergang von reinem Wasser zu einer Solutlösung zu untersuchen, wurde die Idee von LIU & BOLEN (1995) verfolgt. Während LIU & BOLEN die maximale Löslichkeit mittels Extrapolation einer Dichtemessreihe verschieden konzentrierter Lösungen gemacht haben, wurden in dieser Arbeit direkt gesättigte Lösungen der einzelnen Aminosäuren und von DKP angesetzt und die maximalen Konzentration der Modellsubstanzen gemessen. Aus der maximale Löslichkeit von DKP und den 20 biogenen Aminosäuren in Wasser und Solutlösung wurde die Transferenergie ΔG_{tr} berechnet. Wenn ΔG_{tr} positiv ist, löst die Solutlösung die Aminosäuren oder DKP schlechter als Wasser und somit würden Proteine, die diese Strukturen im Inneren enthalten stabilisiert, da in der Solutlösung mehr Energie aufgewendet werden muss um die Strukturen neu zu hydratisieren. Da die Stabilisierung nach der „Preferential Interaction Theorie“ durch Ausschluss der Solute von der Oberfläche der Biomoleküle stattfindet, sollte in Zukunft der Einfluss von kompatiblen Soluten auf die Eigenschaften von Wasser im Vordergrund stehen.

Wie in Abbildung 3.2.3.1. zu sehen ist, steigt die Transferenergie von DKP/2, mit Ausnahme von NaCl, für alle untersuchten Solute linear an. Das heisst, in der Solutlösung wird mehr Energie gebraucht um die Polypeptidkette aufzufalten und somit das Rückgrat vieler Aminosäuren neu mit der Solutlösung in Kontakt zu bringen. Die kompatiblen Solute stabilisieren also das Proteinrückgrat und können deshalb auch als „Backbone-Chaperone“ bezeichnet werden.

Harnstofflösung, die dafür bekannt ist, einen denaturierenden Effekt auf Proteine auszuüben, löste DKP ebenso wie die NaCl-haltige Lösung besser als Wasser und destabilisiert so das Proteinrückgrat. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte für Prolin, TMAO und Harnstoff weichen von den Daten von QU et al. (1998) und WANG & BOLEN (1997) maximal um 10 % ab und decken sich somit im Rahmen der Fehlergrenzen gut.

Einen besonders grossen stabilisierenden Effekt hatte bei diesen Messungen TMAO. Die Transferenergie von DKP beim Übergang von Wasser in TMAO-Lösung ist fast doppelt so hoch, wie ΔG_{tr} der anderen Solute. Der ΔG_{tr} -Wert für Glycin lag in 2 M TMAO in der gleichen Grössenordnung wie der Wert für DKP, aber die ectoinanalogen Solute hatten für Glycin selber zum Teil eine doppelt so grosse Transferenergie. Für die Berechnung der ΔG_{tr} -Werte der Seitenketten wurde der Glycinwert von ΔG_{tr} der ganzen Aminosäure subtrahiert, so dass sich für die Seitenketten häufig ein stark negativer Wert ergab. Die

Aminosäureseitenketten lösten sich oft also besser in der Solutelösung als in reinem Wasser. Dieser Effekt wirkt dem stabilisierenden Effekt der Solute auf das Proteinrückgrat teilweise entgegen.

Aufgrund ihrer Ringgröße besitzen die Solute DHMICA, Ectoin und Homoectoin eine unterschiedliche Hydrophobizität. Es wurde erwartet, dass ein hydrophiles Solut verstärkt hydrophile Seitenketten löst, während mit zunehmender Hydrophobizität die unpolaren und aromatischen Seitenketten besser gelöst werden sollten. Diese Hypothese lässt sich anhand der Transferenergien der Aminosäureseitenketten nur teilweise bestätigen. Salz als ionisches und somit sehr hydrophiles Solut löst zum Beispiel die unpolaren und aromatischen Aminosäuren sehr viel schlechter als die ectoinähnlichen Solute. Innerhalb der Reihe Hydroxyectoin, Ectoin und Homoectoin spiegelte sich die steigende Hydrophobizität derart wieder, dass die hydrophoben Aminosäuren immer besser gelöst wurden. Wenn man aber DHMICA hinzunimmt, welches hydrophiler als Ectoin ist, so stimmen die Daten mit der Theorie nicht überein.

Generell lässt sich aber feststellen, dass die ectoinanalogen Solute die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin sowie Prolin und Aspartat besonders gut lösen und daher Proteine die reich an aromatischen Aminosäuren sind, schlechter stabilisieren sollten als Proteine, die reich an Alanin oder Threonin sind. Die ectoinanalogen Solute können offensichtlich durch ihre teilaromatische Struktur besonders gut mit den aromatischen Seitenketten wechselwirken. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Entdeckung von TÓTH et al. (2001), dass es zwischen Prolin, Amid-Protonen und aromatischen Seitenketten Wechselwirkungen gibt, die den Stapelwechselwirkungen der Basenpaare in der DNA-Doppelhelix ähneln. TMAO löste die vorgenannten Aminosäuren nur wenig besser als reines Wasser und bewirkt somit in einem Protein nur eine relativ kleine Destabilisierung der aromatischen Seitenketten.

Neben den aromatischen Seitenketten ist die Transferenergie für die negativ geladene Asparaginsäure bei allen Soluten besonders destabilisierend. Eventuell bildet die positive Acetamidin-Struktur der Solute Wechselwirkungen mit der negativen Ladung der Seitenkette aus, so dass Asparaginsäure in Solutlösung besonders gut gelöst wird. Eine weitere Möglichkeit, warum die Solute Asparaginsäure besonders gut lösen, kann sein dass die freie Asparaginsäure in Lösung über eine Kondensation mit der Aminofunktion oder eine Veresterung der beiden Carboxylfunktionen intermolekulare Ringe bildet.

Da die Solute selber auch zyklisch sind und die aromatischen Seitenketten besonders gut stabilisieren liegt es nahe, dass der zyklische Asparaginingring von der Solutlösung besser gelöst wird, als von Wasser und ΔG_{tr} somit negativ ist. Der Unterschied zwischen Asparagin- und Glutaminsäure erklärt sich durch die zusätzliche CH_2 -Gruppe bei Glutaminsäure, die dazu führt, dass die Dimer-Ringe grösser und somit instabiler werden. Die freie Aminosäure Asparagin ist also eventuell ein schlechtes Modell für eine im Protein gebundene Aminosäure.

Die Transferenergie von Cystein konnte leider nicht gemessen werden, da sich Cystein während der 48-stündigen Inkubation zersetzte, wodurch der charakteristische H_2S -Geruch entstand. Dabei wirken gerade Cysteinreste durch die Ausbildung von Disulfidbrücken stabilisierend auf die native Struktur von Proteinen und alleine die Reduktion dieser Disulfidbrücken kann schon ausreichen, um die native Struktur des Proteines zu zerstören (Laithy, et al., 1997; SHIMOTAKAHARA et al., 1997), ohne dass auch nur eine weitere Aminosäure stabilisiert oder destabilisiert wird.

Eine Abschätzung wie stark ein Protein in einer Solutlösung im Vergleich zu reinem Wasser stabilisiert wird ist daher mit den reinen Transferenergien kaum möglich. Dazu sind noch weitere Faktoren nötig. Zum Beispiel ist nicht nur die Anzahl einzelnen Aminosäuren, sondern auch ihre Verteilung innerhalb des Proteines entscheidend (BOLEN & BASKAKOV, 2001). Die Aminosäuren aus dem Inneren des Proteins, die bei einer Proteindenaturierung neu mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen, liefern einen grösseren Beitrag zur Proteinstabilität, als Aminosäuren, die immer vom Lösungsmittel umgeben sind. Für den denaturierten Zustand eines Proteins gibt es ausserdem zwei sehr unterschiedliche Modelle. Im „Upper Limit Model“ ist das denaturierte Protein ein lockeres Zufallsknäuel, bei dem viel Kontakt zur Solutlösung besteht, während das „Lower Limit Model“ von einem kompakten Klumpen mit wenig Kontakt zum Lösungsmittel ausgeht (CREAMER et al., 1997).

Deshalb und weil die Bestimmung von ΔG_{tr} mit einem nicht zu vernachlässigen Fehler behaftet ist, der weiter unten noch diskutiert wird, wurde auf eine Aufsummierung der Einzelbeträge zu der Transferenergie eines kompletten Enzymes verzichtet. Wenn man sich aber die Beträge der Transferenergien von DKP und den einzelnen Aminosäuren betrachtet, kommt man zu dem Schluss von LIU & BOLEN (1995), dass die schlechtere Löslichkeit des Proteinrückgrates verantwortlich ist für die Proteinstabilisierung der ectoinähnlichen Solute. Während der stabilisierende Effekt auf DKP sich für alle Aminosäuren eines Enzymes addiert, kompensieren sich die positiven und negativen Transferenergien der einzelnen

Aminosäureseitenketten zum Teil gegenseitig. Die Theorie, dass im Laufe der Evolution die verschiedenen Solute, als Schutzstoffe gegen die unterschiedlichen Stressfaktoren, nach ihrer Fähigkeit das Proteinrückgrad zu stabilisieren ausgewählt wurden, ist durchaus denkbar (BOLEN & BASKAKOV, 2001). Die Feinregulation ist dabei durch den teilweise gegenläufigen Effekt der Solute auf die Aminosäureseitenketten gegeben.

Die Messung der Transferenergie über die maximale Löslichkeit ist mit einigen Fehlerquellen versehen, die im folgenden diskutiert werden. Die Konzentrationsbestimmung der Aminosäuren und DKP konnte nicht direkt in den gesättigten Lösungen erfolgen, sondern die Proben mussten für die isokratische HPLC und die Gradienten-HPLC zunächst verdünnt werden. Während DKP in der isokratischen HPLC bei einer Verdünnung von 1:150 gemessen werden konnte, waren für die Gradienten-HPLC Verdünnungen bis hin zu 1:1.000.000 nötig. Zusätzlich mussten diese Proben mit dem Fluoreszenzmarker FMOC derivatisiert werden, wodurch noch weitere Pipettierschritte erforderlich waren. Das exakte Pipettieren wurde durch die hohen Aminosäurekonzentrationen in den gesättigten Lösungen und die damit verbundene Viskosität der Lösungen erschwert.

Der einzelne Pipettierfehler wie er bei der Konzentrationsbestimmung von DKP auftritt, ist sicherlich zu vernachlässigen, wie man ja auch anhand der kleinen Fehler in Tabelle 3.2.3.1. sehen kann. Bei den Aminosäuren summiert sich der Fehler aber durch die grosse Anzahl der Verdünnungsschritte auf, so dass bei jedem einzelnen dieser Messwerten sicherlich ein Fehler von $\pm 5\%$ entsteht. Um den Beitrag der einzelnen Aminosäureseitenketten zu erhalten, wurde die Transferenergie von Glycin von der Transferenergie der kompletten Aminosäure subtrahiert. Zur Berechnung von ΔG_{tr} wurden die Konzentrationen der Aminosäuren in Wasser und Solutlösung benötigt, so dass bei der Berechnung von ΔG_{tr} der Seitenketten insgesamt vier Messwerte ins Ergebniss eingehen. Dadurch liegt der relative Fehler dieser Werte bei ca. $\pm 20\%$. Durch die Entwicklung einer Methode, bei der die Aminosäuren direkt oder in geringer Verdünnung bestimmt werden könnten, würde diese Fehlerquelle minimiert. UV-Spektroskopische Methoden können in Verbindung mit ectoinähnlichen Soluten aber nicht verwendet werden, da die Solute selber eine sehr grosse UV-Absorption bei ca. 220 nm besitzen.

Die Löslichkeit der Aminosäuren in Wasser oder Solutlösung unterscheiden sich teilweise nicht sehr stark, so dass das Verhältnis der beiden Konzentrationen einen Wert nahe 1 ergibt. Da das Konzentrationsverhältnis in logarithmischer Form, also als $\ln(c_w/c_{os})$, in die

Berechnung der Transferenergie ΔG_{tr} eingeht und $\ln(1) = 0$ ist, steigt die Messgenauigkeit an diesem Punkt gegen unendlich.

Leichter zu messende Modellschubstanzen für die in Proteinen gebundenen Aminosäuren sind daher eventuell zyklische Aminosäureanhydride wie zum Beispiel 3,6-Dimethylpiperazin-2,5-dion, das zyklische Dimer von Alanin. Diese Strukturen lassen sich zum Teil käuflich erwerben, sie könnten aber auch analog zur Peptidsynthese hergestellt werden, indem man zwei Aminosäuren dimerisiert nachdem man zuvor jeweils eine funktionelle Gruppe durch eine entsprechende Schutzgruppen blockiert hat. Anschließend werden die Schutzgruppen entfernt und die Dipeptide zyklisiert. Auf diese Weise könnte man auch gemischte Anhydride herstellen, bei denen zum Beispiel die negative Ladung der Aspargin- bzw. Glutaminsäure durch die positive Ladung einer Arginin- oder Lysinseitenkette kompensiert wird. Diese Dimere entsprächen dann den Verhältnissen im Protein wesentlich besser, als die in dieser Arbeit verwendeten Hydrochloride. Die zyklischen Dimere haben den weiteren Vorteil, dass der für die Transferenergie erhaltene Wert direkt mit der Transferenergie von DKP verglichen werden könnte, so dass bei den ΔG_{tr} -Werten der Seitenketten nicht jedesmal der Glycinwert subtrahiert werden müsste. Die zyklischen Substanzen besitzen ferner eine eigene UV-Absorption, die sich in Gegenwart von ectoinähnlichen Soluten aber nicht direkt spektroskopisch messen lässt, da die Solute auch im UV-Bereich absorbieren. Mittels isokratischer HPLC könnten die Substanzen von den Soluten getrennt und die Konzentration der Aminosäuredimere anschließend mit einem UV-Detektor bestimmt werden. Da die Fluoreszenzdetektion der Gradienten-HPLC sehr viel empfindlicher ist, als die Detektoren der isokratischen HPLC, müssten die Proben weniger stark verdünnt werden. So könnten einerseits die Derivatisierung der Aminosäuren mit dem Fluoreszenzmarker gespart werden und die Proben müssten andererseits nicht so stark verdünnt werden. Beides führt zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl an Pipettierschritten und somit zu einer Minimierung des Messfehlers.

Ein weiteres mögliches Testsystem zur Bestimmung von ΔG_{tr} der Aminosäureseitenketten ist die direkte Bestimmung der maximalen Löslichkeit von Substanzen, die den Seitenketten entsprechen. Ein Beispiel dafür ist 3-Methyl-Phenol welches der Seitenkette von Phenylalanin entspricht. Diese Methode könnte besonders vorteilhaft für die aromatischen Aminosäuren sein, da die Löslichkeit über die Fluoreszenz der Aromaten ermittelt werden könnte, Probleme ergeben sich allerdings für die kleineren Aminosäuren wie Alanin und Leucin, da hier die reinen Seitenketten bei Raumtemperatur gasförmig sind.

Detektion: $\text{Salicylat} + \text{HO}^\bullet + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}[\text{HO-Salicylat}]$ (farbig)

Radikalschutz: $\text{Salicylat} + \text{Solut} + \text{HO}^\bullet + \text{Fe}^{3+} \rightarrow [\text{HO-Solut}] + \text{Fe}^{3+} + \text{Salicylat}$ (farblos)

Die Regeneration des Fe^{2+} als Katalysator für die Radikalbildung ist auch ohne Ascorbinsäure möglich. Dazu sind die sehr stabilen Superoxidradikale O_2^\bullet nötig, die das Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren können und so ein Fortlaufen der Radikalkettenreaktion sicherstellen können.

Superoxid-Radikale: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^\bullet + \text{H}^+$
 $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^\bullet \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$

Die Untersuchungen von ROWLEY & HALLIWELL (1982) haben ergeben, dass die Entstehung von Superoxid-Radikalen durch den Zusatz von Ascorbinsäure unterbunden werden kann. Somit sind diese Radikale in dem verwendeten Testsystem nicht von Bedeutung.

Eine Absorption von 0,12 wie sie bei den Versuchen zu dieser Arbeit durchschnittlich erreicht wurde, entspricht einer Hydroxysalicylatkonzentration von ca. 0,06 mM (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). Wenn man berücksichtigt, dass nur ca. 70 % der gebildeten Hydroxylradikale detektiert werden (RICHMOND et al., 1981), entspricht die Menge an gebildetem Hydroxysalicylat ungefähr 5 % des eingesetzten H_2O_2 . Da Salicylat im Überschuss vorlag, und in den Kontrollansätzen nach 2,5 h kein H_2O_2 mehr gemessen wurde, müssen 95 % des H_2O_2 zu H_2O und O_2 zerfallen sein, ohne von dem System detektiert zu werden. Die folgende, sicherlich nicht vollständige, Auflistung zeigt eine kleine Auswahl an Reaktionen, die zum Zerfall des H_2O_2 beigetragen haben können:

H_2O_2 -Zerfall: $\text{Fe}^{2+} + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\cdot$
 $2 \text{O}_2^\bullet + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^\bullet + \text{H}^+$
 $\text{O}_2^\bullet + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{HO}^\bullet$

Die Zeit bis zur maximalen Farbstoffkonzentration und somit die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung, wurde durch die kompatiblen Solute beeinflusst. Dieses bedeutet das die Kinetik der Radikalbildung und Detektion verändert wurde. Deshalb wurde zusätzlich der H_2O_2 -Zerfall über den Versuchszeitraum gemessen. Die untersuchten kompatiblen Solute zeigten sehr unterschiedliche Radikalfängereigenschaften. TMAO und Ascorbinsäure wechselwirkten direkt mit dem Testsystem, so dass die Daten nicht weiter ausgewertet werden konnten.

Betain, DHMICA, Hydroxyectoin und Saccharose beeinflussten den H_2O_2 -Zerfall nur sehr wenig, während Ectoin, Homoectoin und DCE ihn stark verlangsamten. Betain hatte keinen

Einfluss auf die Hydroxylierung von Salicylat, während DHMICA, Hydroxyectoin und Saccharose diese zum Teil sehr effektiv unterbinden konnten. Saccharose war dabei um eine Zehnerpotenz besser als DHMICA und Hydroxyectoin. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Beobachtungen von SMIRNOFF & CUMBES (1989) überein, die für Betain und Glycin keine sowie für Saccharose und weitere Polyole sehr gute protektive Eigenschaften bezüglich einer radikalen Schädigung fanden. ANDERSSON et al. (2000) fanden für Hydroxyectoin eine besonders gute protektive Eigenschaften in Bezug auf eine oxidative Schädigung von LDH durch H_2O_2 .

Ectoin, Homoectoin und DCE konnten zumindest in Konzentrationen oberhalb von 0,5 M die Salicylathydroxylierung unterbinden, wechselwirkten aber mit den Reaktionen, die zum H_2O_2 -Zerfall und somit zur Radikalbildung führten. Bei einer Ectoinkonzentration von 50 mM kam es daher dazu, dass nach ca. 4,25 h mehr Radikale detektiert wurden als im Kontrollansatz. Aus den hier vorliegenden Ergebnissen konnte nicht ermittelt werden, welche der oben genannten Reaktionen durch die Solute beeinflusst wurde. Solange nicht jede einzelne Reaktionskinetik bestimmt werden kann, können somit keine Aussagen über die protektiven Eigenschaften von Ectoin, Homoectoin und DCE gemacht werden (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000). Die Stabilisierung des H_2O_2 in der Lösung und der somit verzögerte H_2O_2 -Zerfall kann einerseits zu einer Verzögerung der Radikalschädigung führen, andererseits haben *in vivo* die Schutz- und Reparaturmechanismen eines Organismus mehr Zeit um radikalische Schäden zu beheben.

Radikalschädigungen werden in Organismen aber nicht zwangsläufig von Hydroxylradikalen verursacht (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1995). Auch andere, teilweise sehr stabile, Radikale wie zum Beispiel Superoxide (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000) oder Stickoxide (KIRSCH & de GROOT, 2000) können zu schweren Schäden führen. Daher ist für einen Organismus wahrscheinlich gar nicht die Konzentration einer einzelnen oxidativen Komponente wichtig, sondern der allgemeine Redoxzustand der Zellen entscheidet darüber, ob und in welchem Ausmaß Schäden durch Radikale hervorgerufen werden. Möglicherweise ist deshalb ein Grossteil des Eisens in vielen Organismen komplexiert, da freies Eisen zu oxidativen Zellschäden führen würde. Die Bildung von Hydroxylradikalen aus H_2O_2 ist dabei nur eine Variante (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

Aufgrund der hohen Komplexität der Radikalreaktionen, mit einer Vielzahl an Nebenreaktionen, ist es daher nur sehr schwer möglich Aussagen über die protektiven Eigenschaften kompatibler Solute bezüglich ihrer Radikalfängereigenschaften zu machen.

Solange nicht alle Reaktionen mit den dabei auftretenden Zwischenstufen charakterisiert werden können bleibt es reine Spekulation ob, und wenn ja nach welchem Mechanismus kompatible Solute eine Zelle vor radikalischen Schäden schützen können (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

Ein alternatives Testsystem zur Erzeugung und Detektion von Hydroxylradikalen ist das Xanthine-Oxidase / Malat-Dehydrogenase-System (SMINROFF & CUMBES, 1989). Dieses ist, im Gegensatz zu der rein chemischen Hydroxylierung von Salicylat ein biochemisches Testsystem. Die Hydroxylradikale werden durch Xanthine-Oxidase erzeugt und schädigen Malat-Dehydrogenase wodurch deren Aktivität abnimmt. Ein Problem bei diesem System kann sein, dass das Detektormolekül die Malat-Dehydrogenase ein Protein ist und somit durch die kompatiblen Solute unterschiedlich stark stabilisiert werden kann. Da die Wechselwirkungen solutabhängig sind, sind die Daten der einzelnen Solute untereinander dann nicht vergleichbar.

4.3.3. Einfluss kompatibler Solute auf die Stabilität von DNA

Für einen intakten Zellstoffwechsel sind in einem Organismus nicht nur die Proteine entscheidend, sondern auch die Stabilität der Membranen und Ribonucleinsäuren tragen zur Überlebensfähigkeit des Organismus bei. Daher sollen in diesem Kapitel die Wirkungen der kompatiblen Solute auf die Träger der Erbinformation, die Ribonucleinsäuren diskutiert werden. Dazu wurde der Einfluss der Solute auf den Schmelzpunkt doppelsträngiger DNA (dsDNA) bei der PCR-Reaktion untersucht.

Durchweg alle untersuchten Solute senkten den T_m der dsDNA und destabilisierten diese somit. Dabei kann allerdings nicht unterschieden werden, ob es sich um eine Destabilisierung des Doppelstranges oder um eine Stabilisierung des Einzelstranges handelt. Es kann sein, dass die kompatiblen Solute mit den freien Basen der Einzelstränge positive Wechselwirkungen eingehen und somit diese Konformation gegenüber dem Doppelstrang begünstigen. Im Folgenden wird der Effekt so betrachtet, dass das Aufschmelzen erleichtert und somit der Doppelstrang destabilisiert wird.

Dieser Effekt lässt sich *in vitro* zur Erhöhung der Ausbeute und Spezifität der PCR nutzen, da bei niedrigeren Temperaturen gearbeitet werden kann. Ferner lassen sich so PCR-Reaktionen durchführen, bei denen nur eine geringe Menge an Template vorliegt oder bei dem die

Template-DNA einen so hohen Schmelzpunkt hat, dass eine PCR nur sehr schwer durchzuführen ist (LAPIDOT et al., 1999).

Da in unseren Versuchen immer nur Laborproben mit gemischten GC-Verhältnissen zwischen 50 % und 60 % verwendet wurden, kann über die Abhängigkeit der Schmelzpunktsenkung vom GC-Verhältnis keine Aussage getroffen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die kompatiblen Solute gerade auf GC-reiche Proben einen besonders grossen Effekt haben und den T_m der GC-reichen DNA auf den Level einer AT-reichen DNA senken. Daher sollte sich bei gleicher Solutkonzentration das Ergebnis einer PCR mit GC-reichem Template stärker verbessern als bei einer AT-reichen Probe (REES et al., 1993; BASKARAN et al., 1996; LAPIDOT et al., 1999).

Homoectoin besitzt eine besonders grosse Fähigkeit die dsDNA zu destabilisieren. Mit $-12,6^\circ\text{C}$ pro Mol erreichte Homoectoin, bei gleicher Konzentration, eine fast doppelt so starke T_m -Senkung wie DHMICA und Ectoin. Hydroxyectoin, Betain und DCE erreichten sogar nur ca. ein Viertel dieses Wertes. TMAO hat mit $-1,6^\circ\text{C}$ einen sehr geringen molaren Einfluss auf die DNA. Daher sollte das in dieser Arbeit neu synthetisierte Solut Homoectoin in die Palette der PCR-Zusätze aufgenommen werden, da mit Homoectoin die Zusatzkonzentrationen bei gleicher Effektivität gegenüber Ectoin und Betain halbiert, bzw. geviertel werden könnten. Andererseits könnte die Ausbeute und Spezifität gegenüber den bekannten PCR-Zusätzen deutlich gesteigert werden. DCE lässt sich ab einer Konzentration von 0,5 M nicht mehr in der PCR einsetzen, da dann keine Amplifikation mehr stattfindet. Wahrscheinlich überwiegt hier der destabilisierende Effekt von DCE auf die Polymerase, so dass das Enzym irreversibel denaturiert wird.

Da in unseren Versuchen immer unterschiedliche DNA-Fragmente und Primer verwendet wurden, müssen bis zu einer Anwendung der neuen Solute als PCR-Zusatz noch weitere Optimierungen erfolgen. Z. B. müsste der Einfluss der Primerlänge, des GC-Gehaltes der Proben, der Polymerase selber sowie das gesamte Temperaturprogramm optimiert werden.

Betrachtet man die Umstände unter denen kompatible Solute von halophilen Organismen akkumuliert werden, so wird schnell klar, dass die T_m -Senkung, die ja eigentlich eine Destabilisierung darstellt, dem Organismus bei Salzstress hilft den T_m -steigernden Effekt der Salze aufzufangen. Insbesondere Na^+ und Mg^{2+} haben in unseren Versuchen schon in einer kleinen Konzentrationen von 2,5 mM eine deutliche T_m -Steigerung von $+2^\circ\text{C}$ bewirkt. Dieses hätte *in vivo* zur Folge, dass die DNA nicht mehr amplifiziert werden könnte, da die Umgebungstemperatur von den Zellen ja nicht so ohne weiteres gesteigert werden kann. KCl

hingegen bewirkte bis 50 mM keine Steigerung des T_m . Es liegt nahe zu vermuten, dass einige halophile Organismen deshalb K^+ und nicht Na^+ , wie es im Medium enthalten ist, als Osmolyt nutzen. Daher bleibt zu untersuchen, ob bei einem Salzschock nach oder zeitgleich mit dem Wasserausstrom zunächst Na^+ in die Zellen eindringt oder ob nur der K^+ -Level ansteigt, bevor die kompatiblen Solute als letzte Stressantwort akkumuliert werden. Die Additivität des T_m -senkenden Effektes der Solute und des T_m -steigernden Effektes der Salze, wie sie in Kapitel 3.2.5.3 gezeigt werden konnte, bewirkt wahrscheinlich, dass der resultierende T_m im physiologischen Bereich gehalten wird.

Da die Mg^{2+} -Ionen als Kofaktor für die gängigen DNA-Polymerasen nötig sind, Mg-Salze aber andererseits die Flexibilität von DNA reduzieren und somit das zur Vervielfältigung nötige Aufschmelzen der Doppelhelix erschweren, ist die Mg-Konzentration im PCR-Puffer oftmals nur empirisch bestimmt. Sie ist suboptimal bezüglich der maximalen Leistung des Enzymes und daher lässt sich durch eine geschickte Kombination von Mg-Salzen und kompatiblen Soluten die Leistung der Polymerase *in vitro* sicherlich noch steigern. Eine zusätzliche Schutzfunktion der kompatiblen Solute auf die Polymerase selber wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, konnte aber in der Vergangenheit schon nachgewiesen werden (LAPIDOT et al., 1999).

Da die Reinheit der Template-DNA eine wichtige Voraussetzung für eine ausreichende Produktmenge und -Reinheit ist, könnte der Einfluss von kompatiblen Soluten auf eine PCR mit Verunreinigungen der Template-DNA durch RNA oder Proteinen untersucht werden.

Somit lassen sich die kompatiblen Solute in der Molekularbiologie sehr nützlich einsetzen, da sie einerseits den T_m der DNA-Proben senken und das Arbeiten bei niedrigeren Temperaturprofilen ermöglichen. Andererseits stabilisieren sie die Polymerase. Durch diese beiden Effekte ist es möglich, sonst problematische Proben zu verarbeiten und die Ausbeute und Spezifität von Standard-PCR-Reaktionen deutlich zu erhöhen.

Weitere Methoden mit denen der Einfluss von kompatiblen Soluten auf DNA-Fragmente untersucht werden kann, wurden von DIEHL et al. (2001) und SCHROT (2001) vorgestellt. Die Aussagekraft von Mikroarrays kann durch den Zusatz von Betain deutlich gesteigert werden, da Betain zum Einen die Homogenität der Fluoreszenzspots fördert und zum Andern das unspezifische Rauschen unterdrückt (DIEHL et al., 2001). SCHROT (2001) entdeckte einen destabilisierenden Einfluss von Ectoin auf DNA-Fragmente mittels Einzelmolekül-Kraftspektroskopie. Weitere Messungen mit den ectoinanalogen Strukturen sind nötig, um herauszufinden, ob die Art und Grösse der Wechselwirkungen solutspezifisch sind oder nicht.

4.4. Kompatible Solute zur Stabilisierung ganzer Zellen

Kompatible Solute werden von extremophilen Organismen dazu eingesetzt, die Zellen gegen die extreme Umweltbedingungen zu schützen. Die Synthese oder Aufnahme von Soluten stellt aber nur einen von vielen Anpassungsmechanismen extremophiler Lebewesen dar. Unter Stress werden neben dem normalen Zellstoffwechsel verschiedene Schutz- und Reparaturproteine synthetisiert. So dienen zum Beispiel die Chaperone und „Heat-Shock-Proteins“ dazu, den Zellmetabolismus bei einem plötzlich auftretenden Hitzeschock aufrecht zu erhalten (LINDQUIST, S., 1986; LINDQUIST, S., 1988; FLYNN et al., 1989). Bei längerfristiger Stresseinwirkung, beziehungsweise einem dauerhaften Leben unter dem Stress bei den Extremophilen, wird zusätzlich die Struktur der Zellbestandteile wie die Zusammensetzung der Membranen oder Proteine verändert (VREELAND et al., 1984; ADAMS et al., 1989; ADAMS & RUSSELL, 1992).

Der Einfluss von kompatiblen Soluten auf das Wachstum von Bakterien lässt sich untersuchen, indem man Zellen unter suboptimalen Bedingungen in Minimalmedium anzieht und das Medium gezielt supplementiert. Um den osmotischen Stress von 3 % (w/v) NaCl in Minimalmedium zu kompensieren, akkumuliert *E. coli* Trehalose als Hauptsolut. Befinden sich im Medium kompatible Solute, werden diese von *E. coli* aufgenommen und unterdrücken die Trehaloseakkumulation (BESTVATER, 1999; 2001). Dieses führt zu einem Anstieg der maximalen optischen Dichte und der Wachstumsrate wodurch die Verdopplungszeit gesenkt wird. Die Wachstumsrate, Verdopplungszeit, maximale optische Dichte sowie das Verhältnis von Trehalosemenge und Solutmenge geben also einen Hinweis darauf, welche Solute den Stress für die Zellen kompensieren können.

Die Versuche zum Wachstum von *E. coli* DH5 α unter Salzstress ergaben, dass die Solute Betain, DHMICA, Ectoin, Homoectoin und Hydroxyectoin in die Zellen aufgenommen werden und bis auf Homoectoin zu einem beschleunigten Zellwachstum führen. Die Solute TMAO und γ Nac-DABA eignen sich nicht zur Stabilisierung von ganzen *E. coli*-Zellen, da sie nicht ins Zellinnere gelangen. Sie beeinflussen das Zellwachstum daher nur im Rahmen der Messfehler. Obwohl die aufgenommene Homoectoinmenge den Menge an DHMICA in etwa entspricht führt der Zusatz von Homoectoin zum Minimalmedium nicht zu einem deutlich schnelleren Zellwachstum. Dieses kann an dem destabilisierenden Einfluss auf den T_m von doppelsträngiger DNA liegen, der bei Homoectoin mit $-12,6^\circ\text{C}/\text{M}$ doppelt so gross ist wie bei DHMICA oder Ectoin. Die Werte der GFP-Produktion bestätigten, dass Homoectoin den Osmostress für *E. coli* nicht kompensieren kann.

DCE wird von den Zellen vermutlich aufgenommen, führt aber zu einer Wachstumshemmung. Die schädliche Wirkung von DCE zeigte sich auch schon anhand der Schmelzpunktsenkung von RNase A sowie den durchweg stärker negativen Transferenergien der Aminosäuren. Ferner war eine Bestimmung des Schmelzpunktes der doppelsträngigen DNA oberhalb einer Konzentration von 0,5 M DCE nicht mehr möglich, weil entweder das Protein oder die DNA zerstört wurde.

Homoectoin und DCE werden von *E. coli* unter Salzstress aufgenommen, helfen aber nur begrenzt (Homoectoin) bzw. gar nicht (DCE) gegen den Osmostress. DCE hemmt sogar das Wachstum. Daher sind Homoectoin und DCE gute Kandidaten als „Anti-Solute“. Ein „Anti-Solut“ ist ein Solut, welches dem Organismus vorgaukelt gegen den Umweltstress zu helfen, dieses aber nicht tut.

Der von BESTVATER (2001) entwickelte Stamm *E. coli* DH5 α pBRGFP_{UV-ectUp} zur Detektion von Osmostress in Bakterien bestätigt die Ergebnisse der Wachstumsversuche. *E. coli* DH5 α pBRGFP_{UV-ectUp} produziert in Abhängigkeit vom Osmostress in den Zellen das grün fluoreszierende Reporterprotein GFP. Während Betain, DHMICA und Ectoin die Produktion von GFP bei einem Salzschock von 1 % (w/v) auf 3 % (w/v) effektiv unterbinden, steigt die Fluoreszenz bei der Aufnahme von Homoectoin auf das 1,7 fache der Referenz an. Homoectoin kann zwar von *E. coli* DH5 α aufgenommen werden, aber entweder ist die Aufnahme limitiert, so dass zusätzlich noch Trehalose als Solut synthetisiert wird, oder Homoectoin kann den Osmostress nicht kompensieren. Die Vermutung, dass Hydroxyectoin und DCE in die Zellen aufgenommen werden und Hydroxyectoin den Salzschock kompensiert, während DCE die Zellen schädigt, bleibt zu überprüfen.

Gerade bei einer Kombination verschiedener Stressfaktoren, wie sie zum Beispiel die Trocknung von Zellen darstellt, sind vielseitige protektive Wirkungen eines Solute notwendig. Die Zelltrocknung stellt eine Summe aus geringer Wasseraktivität im Cytosol, steigendem osmotischen Stress durch die Aufkonzentrierung der Medienbestandteile, häufig Hitze sowie schlechter Nährstoffversorgung dar. Bei einer offenen Lagerung an der Luft kann auch noch oxidativer Stress durch Sauerstoff und in der Luft vorkommende Radikale hinzukommen (COX & HECKLY, 1973). Daher sollte ein Solut zum Schutz von Zellen bei einer Lagerung im getrockneten Zustand alle diese Stressfaktoren eliminieren. Da noch kein Solut gefunden wurde, welches alle auftretenden Faktoren gleichzeitig kompensieren kann, der Effekt der einzelnen kompatiblen Solute sich aber meist additiv verhält, ist es auch heute schon möglich Zellen durch eine logische Kombination verschiedener Solute über längere

Zeit zu konservieren. Eine denkbare Kombination ist zum Beispiel Saccharose gegen oxidativen Stress von Hydroxylradikalen und Ectoin oder eine ectoinanaloge Struktur gegen osmotische Schäden. Bei der Herstellung von Stammkulturen zur Lagerung bei -70°C wird häufig eine Mischung aus Saccharose und Glycerin verwendet (VOß, 1998).

4.5. Anwendungsgebiete kompatibler Solute

Obwohl es noch kein Gesamtkonzept gibt, wie die verschiedenen Solute das breit gefächerte Spektrum an Biomolekülen gegen die unterschiedlichen Stressfaktoren stabilisieren, ist es auch heute schon möglich, einzelne Biomoleküle durch eine geschickte Wahl des Zusatzes gezielt gegen Umweltstress zu schützen. Kompatible Solute eignen sich sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*, zur Stabilisierung einer Vielzahl unterschiedlicher Biomoleküle. Wenn man sich also die Wirkungsweise eines speziellen Solutes in der Natur anschaut, kann man daraus empirisch durch Optimierung *in vitro* industrielle Anwendungen entwickeln.

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Wechselwirkungen der natürlichen und der neu synthetisierten Solute mit Proteinen, DNA und ganzen Zellen noch einmal diskutiert. Für gerade diese Probleme hat die Fa. Bitop (Witten) ihre BioStab_{series}TM auf der Basis von Ectoin und Hydroxyectoin entwickelt (Fa. BITOP, 2000). Die Ergebnisse der Wechselwirkungsstudien mit den in dieser Arbeit neu synthetisierten Soluten haben gezeigt, dass DHMICA und Homoectoin teilweise einen noch grösseren Effekt auf die zu stabilisierenden Biomoleküle hatten als die natürlichen Solute Ectoin und Hydroxyectoin. Somit sind DHMICA und Homoectoin gute Kandidaten für neue Stabilisierungs-Kits.

DHMICA lässt sich darüber hinaus als Detektormolekül für Transportprozesse nutzen, da es von *E. coli* aufgenommen, aber nicht synthetisiert werden kann. Die Trennung von DHMICA und Ectoin als natürlichen Soluten ist mittels isokratischer HPLC ohne Probleme möglich. So kann zum Beispiel die Menge an aus dem Medium aufgenommenem Solut von der *de novo* synthetisierten Solutmenge bei einem Salzschock der Bakterien untersucht werden.

DCE wirkte destabilisierend auf den Schmelzpunkt von RNase A und hemmte das Wachstum von *E. coli*. Die Anwendung von DCE zur Stabilisierung von Biomolekülen scheint somit weitestgehend ausgeschlossen. Eventuell reicht ja schon der Austausch des Gegenions aus, um die stabilisierenden Eigenschaften dieses Solutes zu verbessern.

Homoectoin und vermutlich auch DCE werden von Mikroorganismen unter Salzstress aufgenommen, helfen aber nicht gegen den Osmostress. Daher sind sie gute Kandidaten für

die Entwicklung eines „Anti-Solutes“. Ein mögliches Einsatzgebiet solcher „Anti-Solute“ ist die Lebensmittelindustrie. Durch pökeln oder einfrieren konservierte Lebensmittel verderben häufig dadurch, dass sie von Mikroorganismen befallen werden, die durch die Akkumulation eines kompatiblen Solute wie zum Beispiel Betain gegen Osmo- oder Kältestress resistent geworden sind. Bietet man diesen Schädlingen Homoectoin oder DCE als Schutzstoff an, so wird es von den Organismen eventuell statt des schützenden Solute aufgenommen, hilft ihnen aber nicht den Stress zu überwinden und hemmt somit das Wachstum der Schädlinge. Bevor die Solute für die Lebensmittelindustrie zugelassen werden sind aber noch viele Studien gerade zur Aufnahme der „Anti-Solute“ in Gegenwart von kompatiblen Solute sowie zur Ungefährlichkeit für den Menschen nötig.

Neben diesen mehr auf den Laboralltag abgestimmten Anwendungen, können kompatible Solute auch im kosmetischen und medizinisch-pharmazeutischen Bereich verwendet werden. In der Kosmetikindustrie wird Ectoin seit 2000 als Feuchtespender und Aktivator der zelleigenen Reparaturmechanismen in Cremes eingesetzt (BÜNGER, 2000; VIEBIG, 2000). Im medizinischen Bereich konnte anhand von Modellversuchen mit Ratten gezeigt werden, dass Ectoin in der Lage ist körpereigene Zellen vor den Nebenwirkungen eines Krebsmedikamentes zu schützen. Somit konnten höhere Medikamentendosen gegeben werden, die ohne Ectoinzusatz für die Versuchstiere letal gewesen wären (Die ZEIT, 2000; Fa. BITOP, 2001). Die Produktreinheit und hier insbesondere auch die Enantiomerenreinheit ist in diesem Bereich sehr wichtig, da es sonst zu schädlichen Nebenwirkungen eines Diastereomeres kommen kann. Wie weitreichend die Folgen dabei sein können, hat der Fall des Schmerzmittels Contergan® (Fa. Grünenthal GmbH, Stolberg) Ende der 50er Jahren eindrucksvoll bewiesen. Um solche Schäden zu vermeiden sind mit den bisher bekannten Solute und den neuen Solute DHMICA, Homoectoin und DCE noch umfangreiche Studien nötig, um den Nutzen oder Schaden der Solute für den menschlichen Körper wissenschaftlich zu belegen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Solute mit ectoinanaloger Struktur synthetisiert. Die protektiven Eigenschaften auf verschiedene biochemische Modellsysteme sowie ihr Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* unter Salzstress wurde untersucht. Vielleicht helfen die Daten dieser Arbeit als kleiner Stein zusammen mit weiteren Daten-Steinen das vollständige Mosaik der Stabilisierung von Biomolekülen durch kompatible Solute darzustellen

- Das „Super-Solut“, welches ein Biomolekül gegen mehrere Stressfaktoren gleichzeitig schützt, konnte nicht gefunden werden. Dieses ist nicht verwunderlich ist, wenn man bedenkt, wie lange die Natur schon die kompatiblen Solute optimiert.
Besonders interessante neue Solute sind DHMICA und Homoectoin, die sich durch eine Variation der Ringgröße vom Ectoin ableiten sowie das kationische DCE.
- Aufgrund der Untersuchungen zu den protektiven Eigenschaften der Solute auf Biomoleküle ergeben sich die folgenden Anwendungsmöglichkeiten für die neuen Solute:
DHMICA wird von *E. coli* unter Osmostress aufgenommen und kompensiert diesen genauso effektiv wie die natürlichen kompatiblen Solute Betain und Ectoin. Es kann somit zur Aufklärung von Transportprozessen dienen, da die Zellen DHMICA zwar aufnehmen, nicht aber synthetisieren können.
DHMICA und Homoectoin stabilisieren Proteine. Das Beispiel von Homoectoin in Kombination mit RNase A und LDH zeigt aber, dass diese Wechselwirkungen solut-, protein- und stressspezifisch und somit für jeden Einzelfall zu überprüfen sind.
Gute Kandidaten für die Entwicklung eines „Anti-Solutes“ sind Homoectoin und DCE, da sie von *E. coli* aufgenommen werden, den Osmostress aber nicht kompensieren, bzw. beim DCE das Wachstum sogar hemmen.
Der schmelzpunktsenkende Effekt aller untersuchter Solute auf doppelsträngige DNA kann im Labor in der PCR genutzt werden um die Ausbeute und Spezifität der DNA-Amplifizierung zu erhöhen. Homoectoin hatte hierbei einen besonders grosses Potential.

- Die „Preferential Interaction Theorie“ von ARAKAWA & TIMASHEFF (1983) und der „osmophobe Effekt“ von BOLEN & BASKAKOV (2001) werden durch die Daten dieser Arbeit gestützt. Die Untersuchungen zur Transferenergie ΔG_{tr} zeigen, dass der stabilisierende Effekte der Solute hauptsächlich auf das Proteinrückgrat wirkt. Da die Solute die Löslichkeit für DKP als Rückgratmodell senken und so die Proteinstabilität erhöhen, können sie auch „Backbone Chaperone“ genannt werden.

Eine vollständige Aufklärung der Stabilisierungs-Mechanismen war aufgrund der hohen Komplexität der Wechselwirkungen zwischen Soluten, Biomolekülen und Stressfaktoren nicht möglich. Trotzdem ist es möglich einzelne Biomoleküle, durch die geschickte Wahl eines kompatiblen Solutes als Zusatz, gezielt gegen einen Umweltstress zu schützen. Wenn man sich die Wirkungsweise der Solutes in der Natur anschaut, kann man daraus empirisch durch Optimierung *in vitro* eine industrielle Anwendungen entwickeln. Dabei ist es wichtig den „Weak-Point“ des Biomoleküles zu stabilisieren.

- Der verwendete Radikalfängertest, bei dem der Einfluss der Solute auf die Hydroxylierung von Salicylat gemessen wurde, ist nur begrenzt einsetzbar. DHMICA und Hydroxyectoin konnten die Salicylathydroxylierung durch Abfangen der Radikale unterbinden, während Homoectoin und DCE mit den Radikalbildungsreaktionen wechselwirken und deren Kinetik verändern. Sie verzögerten den H_2O_2 -Zerfall und somit auch die Radikalbildung.
- *E. coli* DH5 α pBRGFP_{UV-ectUp} ist ein guter Testorganismus um die Stärke eines Osmostresses auf Bakterien sowie die Fähigkeit der kompatiblen Solute diesen Stress zu kompensieren, zu untersuchen. Die Fluoreszenzdaten durch die stressabhängige Produktion von GFP wurden durch die Wachstumsergebnisse sehr gut gestützt
- Ectoin hat seinen Weg aus der ökologischen Nische über die verschiedenen Forschungslabore in die Regale unserer Konsumwelt schon gefunden. Bis eines der neu synthetisierten Solute ihm aber folgen wird, sind noch zahlreiche Messreihen zur Funktionsweise der Solute sowie ihrem Einfluss auf den menschlichen Organismus zu absolvieren.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, R.L., KOGUT, M., RUSSELL, N.J. (1989)
The effect of salinity on growth and lipid composition of a moderate halophilic Gram-negative bacterium HX.
Biochem. Cell Biol. **68**: 249 - 254
- ADAMS, R.L., RUSSELL, N.J. (1992)
Interactive effects of salt concentration and temperature on growth and lipid composition in the moderate halophilic bacterium *Vibrio costicola*.
Can. J. Microbiol. **38**: 823 - 827
- ALONI, Y., INBAR, L., LAPIDOT, A., BEN-ASHER, E. (1993)
Purified tetrahydropyrimidine derivatives and pharmaceutical compositions comprising them.
Eu. Appl. EP 0553884A1
- ANDERSSON, M.M., BRECCIA, J.D., HATTI-KAUL, R. (2000)
Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase.
Biotechnol. Appl. Biochem. **32**: 145 - 153
- ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S.N. (1983)
Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions.
Arch. Biochem. Biophys. **224**: 169 - 177
- ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S.N. (1985)
Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins.
Biochemistry **24** (24): 6756 - 6762
- ARNOLD, U., RÜCKNAGEL, K.P., SCHIERHORN, A., ULBRICH-HOFMANN, R. (1996)
Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A.
Eur. J. Biochem. **237**: 862 - 869
- ARNOLD, U., SCHIERHORN, A., ULBRICH-HOFMANN, R. (1999)
Modification of the unfolding region in bovine pancreatic ribonuclease and its influence on the thermal stability and proteolytic fragmentation.
Eur. J. Biochem. **259**: 470 - 475
- AVRON, M. (1986)
The osmotic components of halotolerant algae.
Trends Biochem. Sci. **11**: 5 - 6

- BARTH, S., HUHN, M., MATTHEY, B., KLIMKA, A., GALINSKI, E.A., ENGERT, A. (2000)
Compatible-solute-supported periplasmatic expression of functional recombinant proteins under stress conditions.
Appl. Environ. Microbiol. **66**: 1572 - 1579
- BASKARAN, N., KANDPAL, R.P., BHARGAVA, A.K., GLYNN, M.W., BALE, A., WEISSMANN, S.M. (1996)
Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content.
Gen. Res. **6**: 633 - 638
- BELOKON, Y.N., CHERNOGLAZOVA, N.I., BATSANOV, A.S., GARBALINSKAYA, N.S., BAKHMUTOV, V.T., STRUCHKOV, Y.T., BELIKOV, V.M. (1987)
Asymmetric synthesis of (2S,4S)-2,4-Diaminoglutaric acid and (2S,3S)-1,3-Diamino-2,3-dimethylsuccinic acid using chiral Ni(II) complexes.
Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci. **36**: 779 - 783
- BEN-AMOTZ, A., AVRON, M (1973)
The role of Glycerol in the osmotic regulation of the halophilic algae *Dunaliella parva*.
Plant Physiol. **51**: 875 - 878
- BESTVATER, T. (1999)
Untersuchungen zur Koexpression der Ectoin-Gene aus *Marinococcus halophilus* und des Aspartokinasegens aus *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B in *Escherichia coli* DH5 α .
Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- BESTVATER, T. (2001)
Regulation der Ectoin-Biosynthese-Gene in *Marinococcus halophilus* und bei rekombinanter Expression in *Escherichia coli*.
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- BESTVATER, T., GALINSKI, E.A. (2002)
Investigation into a stress-inducible promoter region from *Marinococcus halophilus* using green fluorescent protein.
Extremophiles **6**: 15 - 20
- BEYER, N., DRILLER, H., BÜNGER, J. (2000)
Ectoin - a innovative-multi-functional active substance for the cosmetic industry.
SÖFW Journal **126**: 27 - 29
- BIGGIN, P.C., SANSOM, M.S.P. (2001)
Channel gating: twist to open.
Curr. Biol. **11**: 364 - 366

- Fa. BITOP (2000)
Compatible solutes from extremophiles. Product and application guide.
Bitop - Gesellschaft für biotechnologische Optimierung mbH
Stockumer Strasse 28
58453 Witten
- Fa. BITOP (2001)
Unternehmensporträt BITOP GmbH
BITOP - Gesellschaft für biotechnologische Optimierung mbH
Stockumer Strasse 28
58453 Witten
- BLECK, B. (2001)
Funktionelle Bindung von Fettsäurebindungsproteinen in Zellkulturmodellen.
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- BLIGH, E.G., DYER, W.J. (1959)
A rapid method of lipid extraction and purification.
Can. J. Biochem. Physiol. **37**: 911 - 917
- BLOUNT, P., MOE, P.C. (1999)
Bacterial mechanosensitive channels: Integrating physiology, structure and function.
Trends Microbiol. **7**: 420 - 424
- BOLEN, D.W., BASKAKOV, I.V. (2001)
The Osmophobic Effect: Natural selection of a thermodynamic force in protein folding.
J. Mol. Biol. **310**: 955 - 963
- BRESLOW, R., GUO, T. (1990)
Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 167 - 169
- BROWN, A.D., SIMPSON, J.R. (1972)
Water relations of sugar tolerant yeasts: The role of intercellular polyols.
J. Gen. Microbiol. **72**: 589 - 591
- BROWN, A.D. (1976)
Microbial water stress.
Bact. Rev. **40**: 803 - 846
- BRØNSTED (1931)
Molecular magnitude and phase distribution. I.
Z. Phys. Chem., Bodenstein Festband, 257 - 266
- BÜNGER, J. (1998)
Neue Wirkstoffklasse schützt und pflegt die Haut.
Parfüm. Kosm. **79**: 32 - 35

- BÜNGER, J. (1999)
Ectoïne added protection and care for the skin.
Eurocosm. **7**: 22 - 24
- BÜNGER, J. (2000)
Neue Rohstoffe - Mehr Schutz für die Haut mit einem neuen Wirkstoff für die Kosmetikindustrie.
SÖFW-Journal **126**: 90
- CARPENTER, J.F., CROWE, J.H. (1988)
The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes.
Cryobiology **25** (3): 244 - 255
- CHATANI, E., TANIMIZU, N., UENO, H., HAYASHI, R. (2001)
Structural and functional changes in bovine pancreatic ribonuclease A by the replacement of Phe120 with other hydrophobic residues.
J. Biochem. **129**: 917 - 922
- CHATANI, E., NONOMURA, K., HAYASHI, R., BALNY, C., LANGE, R. (2002)
Comparison of heat- and pressure-induced unfolding of ribonuclease A: The critical role of Phe46 which appears to belong to a new hydrophobic chain-folding initiation site.
Biochemistry **41** (14): 4567 - 4574
- CLARK, M.E. (1985)
The osmotic role of amino acids: Discovery and function.
In „Transport Processes, Iono- and Osmoregulation: Current Comparative Approaches“
R. Gilles und M. Gilles-Baillien, eds.
S.: 412 - 423
Springer Verlag, Berlin
- CLEGG, J.S., SEITZ, P., SEITZ, W., HAZLEWOOD, C.F., (1982)
Cellular response to extreme water loss: The water replacement hypothesis.
Cryobiol. **19**: 306 - 316
- COLLINS, K.D., WASHABAUGH, M.W. (1985)
The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces.
Quart. Rev. Biophys. **18** (4): 323 - 422
- COSTA da, M.S., SANTOS, H., GALINSKI, E.A. (1998)
An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*.
Adv. Biochem. Engineer. Biotech. **61**: 117 - 153
- COX, C.S., HECKLY, R.J. (1973)
Effects of oxygen upon freeze-dried and freeze-thawed bacteria: Viability and free radical studies.
Can. J. Microbiol. **19**: 219 - 231

- CREAMER, T.P., SRINIVASAN, R., ROSE, G.D. (1997)
Modeling unfolded states of proteins and peptides. II. Backbone solvent accessibility.
Biochemistry **36**: 2832 - 2835
- CROWE, L.M., WOMERSLEY, C., CROWE, J.H., REID, D., APPEL, L., RUDOLPH, A. (1986)
Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates.
Biochem. Biophys. Acta. **861**: 131 - 140
- CROWE, J.H., HOEKSTRA, F.A., CROWE, L.M., ANCHORDOGUY, T.J., DROBNIS, E. (1989)
Lipid phase transition measured in intact cells with fourier transform infrared spectroscopy.
Cryobiol. **26**: 76 - 84
- CROWE, J.H., HOEKSTRA, F.A., CROWE, L.M. (1992)
Anhydrobiosis.
Annu. Rev. Physiol. **54**: 579 - 599
- DALGAARD, P., ROSS, T., KAMPERMANN, L., NEUMEYER, K. McMEEKIN, T.A., (1994)
Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data.
Int. J. Food Microbiol. **23**: 391 - 404
- DIEHL, F., GRAHLMANN, S., BEIER, M., HOHEISEL, J.D. (2001)
Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal.
Nucl. Acids Res. **29** (7): e38
- DUCKWORTH, A.W., GRANT, W.D., JONES, B.E., MEXER, D., MARQUEZ, M.C., VENTOSA, A. (2000)
Halomonas magadii sp. nov., a new member of the genus *Halomonas* form a soda lake of the east african rift valley.
Extremophiles **4**: 53 - 60
- FELLER, G., d'AMICO, D., GERDAY, C. (1999)
Thermodynamic stability of a cold-active α -amylase form the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*.
Third meeting on extremophiles as cell vactories
Graz, Österreich
- FLOCK, S., LABARBE, R., HOUSIER, C. (1995)
Osmotic effectors and DNA structure: Effect of glycine on precipitation of DNA by multivalent cations.
J Biomol. Str. Dyn. **13**(1): 87 - 102
- FLOCK, S., LABARBE, R., HOUSIER, C. (1996a)
Dielectric constant and ionic strength effects on DNA precipitation.
Biophys. J. **70**: 1456 - 1465

- FLOCK, S., LABARBE, R., HOUSIER, C. (1996b)
²³Na NMR Study of the effect of organic osmolytes on DNA counterion atmosphere.
Biophys. J. **71**: 1519 - 1529
- FLYNN, G.C., CHAPPELL, T.G., ROTHMAN, J.E. (1989)
Peptide Binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly.
Science **245**: 385 - 390
- FREITAS, A.A., QUINA, F.H., CARROLLI, F.A. (1997)
Estimation of water-organic interfacial tension. A linear free energy relationship
analysis of interfacial adhesion.
J. Phys. Chem. B **101**: 7488 - 7493
- FULLERTON, G.D., POTTER, J.L., DORNBLUTH, N.C. (1982)
NMR relaxation of protons in tissues and other macromolecular water solutions.
Magn. Reson. Imag. **1 (4)**: 209 - 226
- GALINSKI, E.A. (1986)
Salzadaption durch kompatible Solute bei halophilen phototrophen Bakterien.
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- GALINSKI, E.A., HERZOG, R.M. (1990)
The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes
(*Ectothiothodospira halochloris*).
Arch. Microbiol. **153**: 607 - 613
- GALINSKI, E.A., TRÜPER, H.G. (1994)
Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems.
FEMS Microbiol. Rev. **15**: 95 - 108
- GALINSKI, E.A. (1995)
Osmoadaptation in bacteria.
Adv. Microb. Phys. **37**: 273 - 328
- GEKKO, K., TIMASHEFF, S.N. (1981)
Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water
mixtures.
Biochemistry **20 (16)**: 4667 - 4676
- GEKKO, K., TIMASHEFF, S.N. (1981)
Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol.
Biochemistry **20 (16)**: 4677 - 4686
- GERDAY, C., ATTALEB, M., ARPIGNY, J.L., BAISE, E., CHESSA, J.-P., GARSOUX, G.,
PETRESCU, I., FELLER, G. (1997)
Psychrophilic enzymes: A thermodynamic challenge.
Biochem. Biophys. Acta **1347**: 119 - 131

- GERDAY, C., FELLER, G. (1999)
About the properties and structure peculiarities of psychrophilic enzymes.
Third meeting on extremophiles as cell factories
Graz, Österreich
- GIBBS, J.W. (1878)
On the equilibrium of heterogenous substances.
Trans. Conn. Acad. **3**: 323 - 524
- GOCHNAUER, M.B., LEPPARD, G.G., KOMARATAT, P., KATES, M., NOVITSKY, T.,
KUSHNER, D.J. (1975)
Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an
extremely halophilic actinomycete.
Can. J. Microbiol. **21**: 1500 - 1511
- GÖLLER, K. (1995)
Enzymologische und fluoreszenzspektroskopische Studien zur Stabilisierung der
Lactatdehydrogenase durch kompatible Solute und Hofmeister-Salze.
Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- GÖLLER, K., GALINSKI, E.A. (1999)
Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and
freeze-thaw treatment by compatible solute addition.
J. Mol. Catal. B: Enzymatic **7**: 37 - 45
- GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B. (2000)
Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future.
Ann. NY Acad. Sci. **899**: 136 - 147
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1984)
Role of iron in oxygen radical reactions.
in: Methods in Enzymology **105**: 47 - 56
Packer, L. ed.
Academic Press, New York
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1984)
The definition and measurement of antioxidants in biological systems.
Free Rad. Biol. Med. **18 (1)**: 125 - 126
- HANAHAH, D. (1983)
Studies of transformation of *Escherichia coli* with Plasmids.
J. Mol. Biol. **166**: 557 - 580
- HELLMANN, H., OLSON jr, W.H., PIECHOTA, H. (1960)
Unsymmetrische Dreikohlenstoff-Kondensation mit Acetaminomalonsäure-
Monoestern. Synthese von α,α' -Diamino-glutarsäure.
Liebigs Ann. Chem. **631**: 76 - 81

- HENKE, W., HERDEL, K., JUNG, K., SCHNORR, D., LOENING, S.A. (1997)
Betain improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences.
Nucleic Acids Research **25 (19)**: 3957 - 3958
- HERBERG, F.W., ZIMMERMANN, B. (1999)
Analysis of protein kinase interaction using biomolecular interaction analysis.
in: „Protein phosphorylation, a practical approach.”
D.G. Hardie ed.
S. 335 - 371
Oxford University Press
- HIMDI-KABBAB, S., LAVRADOR, K., BAZUREAU, J.P., HAMELIN, J. (1995)
Synthesis of 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidin-carboxylic acid: Osmoprotector amino acid.
Syn. commun. **25 (15)**: 2223 - 2227
- HOEKSTRA, F.A., WOLKERS, W.F., BUITINK, J., GOLOVINA, E.A., CROWE, J.H., CROWE, L.M. (1997)
Membrane stabilisation in the dry state.
Comp. Biochem. Physiol. **116A (4)**: 335 - 341
- HOUGH, D.W., DANSON, M.J. (1999)
Extremozymes.
Curr. Opin. Chem. Biol. **3**: 39 - 46
- IMHOFF, J.F., TRÜPER, H.G. (1977)
Ectothiorhodospira halochloris sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b.
Arch. Microbiol. **114**: 115 - 121
- JÄGER, W., HAASE, B., LUTZ, V., HERBERG, F.W., ZIMMERMANN, B. (1997)
Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) mit SPR-Biosensortechnologie.
Biospektrum **3**: 82 - 84
- JAENICKE, R. (2000)
Stability and stabilization of globular proteins in solution.
J. Biotech. **79**: 193 - 203
- JANSHOFF, A., NEITZERT, M., OBERDÖRFER, Y., FUCHS, H. (2000)
Force spectroscopy of molecular systems - single molecular spectroscopy of polymers and biomolecules.
Angew. Chem. Int. Ed. **39**: 3212 - 3237
- KAAZTE, U. (1990)
On the existence of bound water in biological systems as probed by dielectric spectroscopy.
Phys. Med. Biol. **35 (12)**: 1663 - 1681

- KARLA, K. (1997)
Untersuchungen zur Trockenstabilität von *Vibrio fischeri* kompatible Solute.
Diplomarbeit
Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn
- KAUFMANN, M., GALINSKI, E.A., VANGALA, M.D., SCHWARZ, T. (1999)
Stabilization of native antibody conformation by ectoines.
Third meeting on extremophiles as cell factories
Graz, Österreich
- KAUZMANN, W. (1959)
Some factors in the interpretation of protein denaturation.
Adv. Prot. Chem. **14**: 1 - 63
- KIRSCH, M., de GROOT, H. (2000)
Ascorbate is a potent antioxidant against peroxynitrite-induced oxidation reactions.
J. Biol. Chem. **275** (22): 16702 - 16708
- KITA, Y., ARAKAWA, T., LIN, T.-Y., TIMASHEFF, S.N. (1994)
Contribution of the surface free energy perturbations to protein-solvent.
Biochemistry **33** (50): 15178 - 15189
- KNAPP, S., LADENSTEIN, R., GALINSKI, E.A. (1999)
Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes β -hydroxyectoine and betaine.
Extremophiles **3**: 191 - 198
- KOCH, A.L. (1981)
Growth measurement.
In: Gerhard, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N. (eds.)
Manual of methods for general bacteriology.
S.: 179 - 207
American Society for Microbiology, Washington, DC
- KOICHI, M., MITSUHIKO, M., TATSUO, N., YOSHIO, S. (1991)
Production of tetrahydropyrimidine derivatives.
Jp. Appl. 01-163483
- KUNTE, H.J., GALINSKI, E.A., TRÜPER, H.G. (1993)
A modified FMOC-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines).
J. Microbiol. Meth. **17**: 129 - 136
- LAITY, J.H., LESTER, C.C., SHIMOTAKAHARA, S., ZIMMERMANN, D.E., MONTELLIONE, G.T., SCHERAGA, H.A. (1997)
Structural characterization of an analog of the major rate-determining folding intermediate of bovine pancreatic ribonuclease A.
Biochemistry **36** (46): 12683 - 12699

- LANDT, E. (1931)
The surface tension of solutions of various sugars.
Z. Ver. Dtsch. Zucker-Ind. **81**: 119 - 124
- LAPIDOT, A., IAKOBASHVILI, R., MALIN, G. (1999)
Methods for DNA amplification and sequencing.
Int. Appl. WO 9941410A1
- LARSEN, P.I., SYDNES, L.K., LANDFALD, B., STRØM, A.R. (1987)
Osmoregulation in *Escherichia Coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid and trehalose.
Arch. Microbiol. **147**: 1 - 7
- LECLERC, J., BENOITON, L. (1968)
On the selectivity of acylation of unprotected diamino acids.
Can. J. Chem. **46**: 1047 - 1051
- LEE, J.C., TIMASHEFF, S.N. (1981)
The stabilization of proteins by sucrose.
J. Biol. Chem. **256 (14)**: 7193 - 7201
- LENGLER, J.W., DREWS, G., SCHLEGEL, H.G. (1999)
Biology of prokaryotes.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- LEVER, M., RANDALL, K., GALINSKI, E.A. (2001)
Near infrared spectra of urea with glycine betaine or trimethylamine-N-oxide are additive.
Biochem. Biophys. Acta **1528**: 135 - 140
- LESLIE, S.B., ISRAELI, E., LIGHTHART, B., CROWE, J.H., CROWE, L.M. (1995)
Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.
Microbiol. **61 (10)**: 3592 - 3597
- LINDQUIST, S. (1986)
The heat shock response.
Ann. Rev. Biochem. **55**: 1151 - 1191
- LINDQUIST, S. (1988)
The heat shock proteins.
Ann. Rev. Genet. **22**: 631 - 677
- LIPPERT, K., GALINSKI, E.A., (1992)
Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: Protection against heating, freezing and drying.
Appl. Microbiol. Biotech. **37**: 61 - 65

- LIU, Y., BOLEN, D.W. (1995)
The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes.
Biochemistry **34**: 12884 - 12891
- LOUIS, P., TRÜPER, H.G., GALINSKI, E.A. (1994)
Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**: 684 - 688
- MADERN, D., EBEL, C., ZACCAI, G. (2000)
Halophilic adaptation of enzymes.
Extremophiles **4**: 91 - 98
- MADIGAN, M.T., OREN, A. (1999)
Thermophilic and halophilic extremophiles.
Curr. opin. Microbiol. **2**: 265 - 269
- MAKHATADZE, G.I., PRIVALOV, P.L. (1992)
Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study.
J. Mol. Biol. **226 (2)**: 491 - 505
- MALIN, G., IAKOBASHVILI, R., LAPIDOT, A. (1999)
Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acid interactions.
J. Biol. Chem. **274 (11)**: 6920 - 6929
- MARTINS, L.O., EMPADINHAS, N., MARUGG, J.D., MIGUEL, C., FERREIRA, C., da COSTA, M.S., SANTOS, H. (1999)
Biosynthesis of mannosylglycerate in the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*.
J. Biol. Chem. **274 (50)**: 35407 - 35414
- McDUFFIE, G.E., Jr., QUINN, R.G., LITOVITZ, T.A. (1962)
Dielectric properties of glycerol-water mixtures.
J. Chem. Phys. **37**: 239 - 242
- MASKOW, T., BABEL, W. (2001a)
Calorimetrically obtained informations about the efficiency of ectoine synthesis from glucose in *Halomonas elongata*.
Biochem. Biophys. Acta **1527**: 4 - 10
- MASKOW, T., BABEL, W. (2001b)
Erratum to „Calorimetrically obtained informations about the efficiency of ectoine synthesis from glucose in *Halomonas elongata*.“
Biochem. Biophys. Acta **1528**: 60

- NAKAYAMA, H., YOSHIDA, K., ONO, H., MUROOKA, Y., SHINMYO, A. (2000)
Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells.
Plant Physiol. **122**: 1239 - 1247
- NOZAKI, Y., TANFORD, C. (1970)
The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions.
J. Biol. Chem. **245** (7): 1648 - 1652
- OBERDÖRFER, Y., FUCHS, H., JANSHOFF, A. (2000)
Conformational analysis of native fibronectin by means of force spectroscopy.
Langmuir **16**: 9955 - 9958
- OKAWA, K., HASE, S. (1963)
The Synthesis of N ω -formyl basic amino acid.
Bull. Chem. Soc. Jpn. **36** (6): 754
- OREN, A. (1986)
Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*.
Can. J. Microbiol. **32**: 4 - 9
- OREN, A. (1999)
Bioenergetic aspects of halophilism.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 334 - 348
- OREN, A. (2002)
Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications.
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **28**: 56 - 63
- POKLAR, N., PETROVICIC, OBLAK, M., VESNAVER, G. (1999)
Thermodynamic stability of ribonuclease A in alkylurea solutions and preferential solvation changes accompanying its thermal denaturation: A calorimetric and spectroscopic study.
Prot. Sci. **8**: 832 - 840
- QU, Y., BOLEN, C.L., BOLEN, D.W. (1998)
Osmolyte-driven contraction of a random coil protein.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **95**: 9268 - 9273
- RAJENDRAKUMAR, S.V., SURGUNARAYANA, T., REDDY, A.R. (1997)
DNA helix stabilisation by proline and betaine: Possible role in the salinity tolerance process.
FEBS Letters **410**: 201 - 205
- RANDALL, K., LEVER, M., BLUNT, J.W., CHAMBERS, S.T. (1998)
Counteraction of urea denaturation by glycine betaine and other kosmotropes.
J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys. **2**: 51 - 58

- REED, R.H. (1984)
Use an abuse of osmo-terminology.
Plant Cell Env. **7**: 165 - 170
- REES, W.A., YAGER, T.D., KORTE, J., von HIPPEL, P.H. (1993)
Betain can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting.
Biochem. **32**: 137 - 144
- REINSTÄDLER, D., FABIAN, H., BACKMANN, J., NAUMANN, D. (1996)
Refolding of thermally and urea-denatured Ribonuclease A monitored by time-resolved FTIR spektroskopie.
Biochemistry **35**: 15822 - 15830
- RICHMOND, R., HALLIWELL, B., CHAUHAN, J., DARBE, A. (1981)
Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds.
Anal. Biochem. **118**: 328 - 335
- RÖMP Chemie Lexikon (1995)
Falbe, J. & Regitz, M.
9. Auflage auf CD-Rom, Version 1.0
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- RONTEIN, D., BASSET, G., HANSON, A.D. (2002)
Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in Plants.
Metab. Eng. **4 (1)**: 49 - 56
- ROWLEY, D.A., HALLIWELL, B. (1982)
Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanisms: Relevance to the pathology of rheumatoid diseases.
Clin. Sci. **64**: 649 - 653
- SANTORO, M.M., LIU, Y., KHAN, S.M.A., HOU, L.-X., BOLEN, D.W. (1992)
Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes.
Biochemistry **31**: 5278 - 5283
- SAUER, T., GALINSKI, E.A. (1998)
Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes.
Biotech. Bioeng. **57**: 306 - 313
- SCHMITZ, R. (1994)
Untersuchungen zur Stabilisierung und Immobilisierung lumineszenter Bakterien in Mikrotiterplatten zum Einsatz in einem *in-vivo*-Biolumineszenz-Hemmtest.
Diplomarbeit
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

- SCHROT, S. (2001)
Einfluss von kompatiblen Soluten auf die strukturelle Integrität von Proteinen und Nucleinsäuren auf dem Niveau der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie.
Diplomarbeit
Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- SEVERIN, J. (1993)
Kompatible Solute und Wachstumskinetik bei halophilen aeroben heterotrophen Eubakterien.
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn
- SHIMOTAKAHARA, S., RIOS, C.B., LAITHY, J.H., ZIMMERMANN, D.E., SCHERAGA, H.A., MONTELIONE, G.T. (1997)
NMR structural analysis of an analog of an intermediate formed in the rate-determining step of one pathway in the oxydative folding of bovine pancreatic RNase A: Automated analysis of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignments for wild-type and [C65S, C72S] mutant forms.
Biochemistry **36** (23): 6915 - 6929
- SMIRNOFF, N., CUMBES, Q.J. (1989)
Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes.
Biochemistry **28** (4): 1057 - 1060
- SUKHAREV, S.I., BLOUNT, P., MARTINAC, B., KUNG, C. (1997)
Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: The MscL gene protein and activities.
Annu. Rev. Physiol. **59**: 633 - 657
- TAKESHI, Y., MASATOSHI, U. (1990)
Production of tetrahydropyrimidine compound.
Jp. Appl. 63-259827
- TIMASHEFF, S.N. (1998)
Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: The simplicity of the complicated.
Adv. Prot. Chem. **51**: 355 - 432
- TOI, K.T., MORI, K., IZUMI, Y. (1960)
Synthesis of α,α' -Diaminocarboxylic acids.
Bull. Chem. Soc. Jpn. **33**: 1529 - 1531
- TÓTH, G., MURPHY, F., LOVAS, S. (2001)
Stabilization of local structures by p-CH and aromatic-backbone amide interactions involving propyl and aromatic residues.
Prot. Eng. **14** (8): 543 - 547
- TRÜPER, H.G., GALINSKI, E.A. (1986)
Concentrated brines as habitats for microorganisms.
Experientia **42**: 1182 - 1187

- VIEBIG, A. (2000)
More protection for the skin: Merck KGaA presents a revolutionary active ingredient for the cosmetic industry.
Press release, 12.09.2000, Merck KGaA, Darmstadt
- VOLKIN, D.B., MACH, H., MIDDAUGH, C.R. (1995)
Degradative covalent reactions important to protein stability.
In: Protein stability and folding.
Meth. Mol. Biol. **40**: 35 - 63
- VOß, P. (1998)
Nutzung kompatibler Solute zur Verbesserung der Trockenstabilisierung von *Vibrio fischeri*.
Diplomarbeit
Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- VREELAND, R.H., ANDERSON, R., MURRAY, R.G.E. (1984)
Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*.
J. Bacteriol. **160**: 879 - 883
- WANG, A., BOLEN, D.W. (1997)
A naturally occurring protective system in urea-rich cells: Mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation.
Biochemistry **36 (30)**: 9101 - 9108
- WEIS, A.L. (1984)
A versatile two-step Synthesis of Dihydropyrimidines.
Syn. Commun. **15**: 528 - 530
- WIGGINS, P.M. (1990)
Role of water in biological processes.
Microbiol. Rev. **54**: 432 - 449
- YANCEY, P.H., CLARK, M.E., HAND, S.C., BOWLUS, R.D., SOMERO, G.N. (1982)
Living with water stress: Evolution of osmolyte systems.
Science **217**: 1214 - 1222
- Die ZEIT (2000)
Wunderstoff aus Extremisten.
Ausgabe 36/2000, Erforscht und Erfunden
- Die ZEIT (2001)
Forever young - Bakterien aus einem Wüstensee sollen die menschliche Haut vor Sonne und Wassermangel schützen.
Ausgabe 41/2001, Wirtschaft

Danksagung

- Bei Herrn Prof. Dr. E. A. Galinski möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir das Thema dieser Arbeit überlassen und den Fortgang der Arbeit stets interessiert verfolgt hat. Sein grosses Interesse an den Ergebnissen, die stete Diskussionsbereitschaft sowie sein schier unerschöpflicher Vorrat an möglichen Messmethoden trieben die Versuche, die schliesslich zu dieser Arbeit führten, voran.
- Herrn Prof. Dr. H.-J. Galla danke ich für die Übernahme des Koreferats.
- Für die kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit und die Korrekturvorschläge bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Karsten Karla.
- Ein besonders grosses „DANKE SCHÖN“ gilt allen, die mich bei den verschiedenen Messungen unterstützt haben. Stellvertretend für die Vielzahl an Helfern, die mir auf dem Weg zu dieser Arbeit zur Seite standen, sei hier Sandra Grunewald, die „gute Seele“ des Arbeitskreises, genannt. Sie half mir unter anderem bei den unzähligen HPLC-Messungen sowie den Experimenten zur Bestimmung der Transferenergien.
- Die Mitglieder des Arbeitskreises Galinski trugen durch viele Ideen, Diskussionen und unzählige praktische Hilfestellungen im Laboralltag zum Gelingen dieser Arbeit massgeblich bei, wofür ich ihnen recht herzlich danke.
- Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Institut für Biochemie sowie den „Ehemaligen“ für die freundliche Aufnahme und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken. Das kollegiale Klima im und ausserhalb des Labors erleichterte den Arbeitsalltag enorm. Die vielen kleinen und grossen Leckereien im Kaffeeraum motivierten darüber hinaus häufig zu einem längeren Verweilen im Institut und so mancher experimentelle Rückschlag wurde durch eine gesellige Runde wesentlich erträglicher gemacht.
- Meiner Familie und all meinen Freunden danke ich für die beständige Unterstützung und Motivation.

Lebenslauf



Name: Peter Voß
Geburtsdatum: 28.06.1972
Geburtsort: Greven
Familienstand: ledig

Name der Eltern: Klemens und Maria Voß, geb. Laznik

Schulbildung: St. Josef Grundschule Greven, 1978 - 1982
Anne Frank Realschule Greven, 1982 - 1988
Gymnasium Augustinianum Greven, 1988 - 1991
Abitur: 11.06.1991

Grundwehrdienst: Sanitäter bei der Luftwaffe Würzburg, Oldenburg und Münster, 1991 - 1992

Hochschulstudium: Chemie (Diplom), Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1992 - 1998

Diplomarbeit: Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster mit dem Thema: „Nutzung kompatibler Solute zur Verbesserung der Trockenstabilität von *Vibrio fischeri*“

Abschluss: Diplom-Chemiker 25.09.1998

Promotionstudiengang: Chemie, an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, seit 10.1998

Dissertation: Dissertation am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, unter Anleitung von Prof. Dr. E. A. Galinski, seit 10.1998

Berufsbezogene Tätigkeiten: Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 11.1998 - 12.1998

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 01.1999 - 12.2001

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 01.2002 - 04.2002

