Osmotisch regulierte Biosynthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*: Biochemische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD und Identifizierung ihres Strukturgenes

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jan Bursy
aus Löbau

Marburg/Lahn, 2005

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 2001 bis Oktober 2004 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 26.08.2005

Erstgutachter:	Prof. Dr. Erhard Bremer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2005

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Manuskripte zur Veröffentlichung vorbereitet:

Bursy, J., A. J. Pierik, N. Pica und E. Bremer (2005). Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. Manuskript.

Bursy, J., H. Hartmann, A. U. Kuhlmann, A. J. Pierik und E. Bremer (2005). Ectoine hydroxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization of an enzyme responsible for the biosynthesis of the compatible solute hydroxyectoine. Manuskript.

Kuhlmann, A. U., J. Bursy, S. Gimpel, T. Hoffmann und E. Bremer (2005). Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenticus* is triggered by two environmental stimuli: high salt and low temperature. Manuskript.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis 1

Tabellenverzeichnis 4
Abbildungsverzeichnis 4
Abkürzungen 6

II Zusammenfassung 7

III Einleitung 9

1 Mikrobielle Anpassung an variierende Umweltbedingungen 9
1.1 Die Bedeutung von Wasser, Osmose und Turgor 11
1.2 Anpassung von Mikroorganismen an hyperosmotische Wachstumsbedingungen 12
1.3 Eigenschaften, Struktur und Wirkungsweise kompatibler Solute 14
1.4 Die initiale Stressantwort: Kalium-Aufnahme unter hyperosmolaren Bedingungen 19
1.5 Die zweite Anpassungsphase: Aufnahme und Synthese kompatibler Solute 20
1.6 Ectoin und Hydroxyectoin 29
2 Efflux osmotisch aktiver Substanzen nach einem hypoosmotischen Schock: Schutz vor extremem Turgor 39
3 Perzeption osmotischer Veränderungen und regulatorische Mechanismen 40
4 Verwendung kompatibler Solute als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle 42
5 *Salibacillus salexigens* 43
5.1 Moderat halophile und halotolerante Mikroorganismen 43

IV Ziel der Arbeit 45

V Material und Methoden 46

1 Chemikalien und Reagenzien 46
1.1 Gase 46
1.2 Referenz-Substanzen für die HPLC-Analyse 46
2 Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide 47
3 Kulturmedien, Zusätze und Wachstumsbedingungen 50
3.1 Medien 50
3.2 Sterilisation 52
3.3 Wachstumsbedingungen 52
4 Molekularbiologische und genetische Methoden 53
4.1 Agarose-Gelelektrophorese 53
4.2 Präparation von Nukleinsäuren 53
4.3 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot) 55
4.4 RNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot) 56
4.5 Identifikation von mRNA-Startpunkten mittels Primer Extensions-Analyse 57
5 Konstruktion von Plasmiden, Genbanken und Bakterienstämmen 57
5.1 Restriktion von DNA 57
5.2 Ligationen 58
5.3 Transformation von E. *coli* 58
5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) 58
5.5 Klonierung mit dem TOPO TA® - Cloning-Kit 58
5.6 DNA-Sequenzierung 59
5.7 Herstellung einer *S. salexigens* Genbank und Klonierung von *ectABC* 59
5.8 Klonierung von *ectD* 60
5.9 Konstruktion eines Expressionssystemes für die Ectoin-Hydroxylase EctD 60
6 Biochemische Methoden 61

6.1 Proteine ... 61
6.2 HPLC Analyse ... 69
7 Computergestützte Analyse von DNA- und Proteinsequenzen ... 71
7.1 Zugriffsnummern der Nukleotidsequenzen ... 71

VI Ergebnisse ... 72

1 *De novo* Biosynthese von Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens* ... 72
1.1 Die Ectoin-Biosynthese in Abhängigkeit von der Salinität des Mediums ... 72
1.2 Hydroxyectoin-Biosynthese in Abhängigkeit von der Wachstumsphase ... 73
2 Isolierung und Charakterisierung der Ectoin-Biosynthese-Gene *ectABC* aus *Salibacillus salexigens* ... 74
2.1 Klonierung der Ectoin-Biosynthese-Gene *ectABC* ... 74
2.2 Sequenzanalyse der *ectABC*-Gene und der abgeleiteten EctABC Proteine aus *S. salexigens* ... 76
2.3 Transkriptionelle Analyse der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* ... 79
2.4 Der Transkriptionsstart der *ectABC*-mRNA und Analyse des Promotors ... 80
3 Das Ectoin-Hydroxylase-Gen *ectD* aus *Salibacillus salexigens* ... 81
3.1 Isolierung und Charakterisierung des Ectoin-Hydroxylase-Genes *ectD* aus *S. salexigens* ... 82
4 Biochemische und physiologische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* ... 94
4.1 Entwicklung eines Aktivitäts-Testes zum Nachweis des EctD-Enzymes ... 94
4.2 Reinigung der Ectoin Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* ... 95
4.3 Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz der Ectoin-Hydroxylase ... 97
4.4 Bestimmung der molekularen Masse der Ectoin Hydroxylase EctD ... 97
4.5 Eindimensionale ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur Produktbestätigung ... 98
4.6 Kinetische Parameter der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* ... 99
4.7 Synthese der Ectoin-Hydroxylase EctD in *S. salexigens* ... 110
4.8 Heterologe Produktion der *S. salexigens* Ectoin-Hydroxylase EctD in *Escherichia coli* ... 111
4.9 Bestimmung des Eisengehaltes des aktiven EctD-Enzymes ... 113
4.10 Ist das gereinigte Enzym durch Salz aktivierbar? ... 114
4.11 Kristallisation von EctD ... 114
4.12 Strukturanalyse der EctD-Aminosäuresequenz ... 115
4.13 Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese ... 117

VII Diskussion ... 118

1 Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese ... 119
1.1 Protektive Eigenschaften von Ectoin und Hydroxyectoin ... 119
1.2 Transkriptionelle Induktion der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese unter hyperosmolaren Wachstumsbedingungen ... 121
1.3 Die osmotisch regulierte Hydroxyectoin-Biosynthese ist zusätzlich von der Wachstumsphase abhängig ... 124
1.4 Die Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese ist konserviert in Gram-positiven und Gram-negativen *Bacteria* ... 126
2 Die Ectoin-Hydroxylase EctD ... 129
2.1 Die Enzymfamilie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen ... 132
2.2 Reaktionsmechanismus ... 136
2.3 Modell des aktiven Zentrums, der 2-His-1-Carboxylat-Triade ... 141

VIII Literaturverzeichnis ... 142

IX Anhang 160

1 Vergleich der Aminosäuresequenz der Ectoin-Biosynthese-Enzyme EctABC 160
1.1 EctA 161
1.2 EctB 164
1.3 EctC 169
2 Konservierte aromatische Aminosäurereste in potentiellen Ectoin-Hydroxylasen. 172
3 Überblick über die Familie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen 173

Danksagung 174

Erklärung 175

Lebenslauf 176

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. ^{13}C-NMR Bestimmung der *de novo* synthetisierten organischen Osmolyte im Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera. 34
Tabelle 2. Bakterienstämme und Bakteriophagen..... 47
Tabelle 3. Plasmide 48
Tabelle 4. Oligonukleotide..... 49
Tabelle 5. Vitaminlösung A (10 ml/l) 51
Tabelle 6. Vitaminlösung B (10 ml l^{-1}) 51
Tabelle 7. Mineralsalzmedium für *S. salexigens*..... 51
Tabelle 8. Konzentrationen der Antibiotika für *E. coli*..... 52
Tabelle 9. Verwendete Puffer..... 61
Tabelle 10. Verwendete Säulen..... 62
Tabelle 11. Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele..... 66
Tabelle 12. Gradient für die Auftrennung FMOC-derivatisierter Aminosäuren. 71
Tabelle 13. Sequenzidentitäten der potentiellen Ectoin-Biosyntheseenzyme EctABC aus *S. salexigens* zu den EctABC-Proteinen anderer *Bacteria*..... 78
Tabelle 14. Sequenzidentitäten der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* zu den potentiellen EctD-Proteinen anderer *Bacteria*. 90
Tabelle 15. Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*..... 96
Tabelle 16. Aktivitätstest für die Reinigung und Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*. 106
Tabelle 17. Konsensusmotive der Subklassen innerhalb der Familie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. 136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Allgemeines Schema zur Anpassung von Mikroorganismen an hyper- oder hypotone Umweltbedingungen. 14
Abbildung 2. Ausgewählte Vertreter kompatibler Solute. 15
Abbildung 3. Modell des präferenziellen Ausschlusses zur Proteinstabilisierung durch kompatible Solute..... 19
Abbildung 4. Synthesewege für Prolin in *Bacillus subtilis*..... 26
Abbildung 5. Biosynthese von Glutamat (Madigan *et al.* 2000). 28
Abbildung 6. Efflux, Aufnahme- und Synthese-Systeme für kompatible Solute in *Bacillus subtilis*. 29
Abbildung 7. Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen. 33
Abbildung 8. Schematische Zusammenfassung des theoretischen Biosyntheseweges von Glukose ($C_6H_{12}O_6$) zu Ectoin ($C_6H_{10}O_2N_2$) über Aspartat bzw. Aspartat-β-Semialdehyd als Vorläufermoleküle der Ectoin-Biosynthese..... 36
Abbildung 9. Ectoin-Biosynthese in aeroben chemoheteroptrophen Bakterien. 36
Abbildung 10. Akkumulation von Ectoin und Hydroxyectoin durch osmotisch regulierte Biosynthese in *Salibacillus salexigens*..... 73
Abbildung 11. Akkumulation von Ectoin und Hydroxyectoin durch *de novo* Biosynthese. 74
Abbildung 12. Nukleotidsequenz der *ectABC*-Region aus *S. salexigens*..... 77
Abbildung 13. Das *ectABC*-Operon aus *S. salexigens* ist durch NaCl induzierbar. 80
Abbildung 14. Primer-Extension-Analyse der *ectABC*-Promotorregion. 81
Abbildung 15. Vergleich der Aminosäuresequenz potentieller Hydroxylasen. 84
Abbildung 16. *ectD*-Southern Blot-Analyse chromosomaler DNA aus *S. salexigens*..... 85
Abbildung 17. Struktur des sequenzierten Teils des *ectD*-Inserts aus pBJ9..... 86
Abbildung 18. Nukleotidsequenz der *ectD*-Region aus *S. salexigens*. 87

Abbildung 19. Vergleich der Aminosäuresequenz potentieller Ectoin-Hydroxylasen. 91
Abbildung 20. Stammbaum auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der potentiellen Ectoin-Hydroxylasen und genetische Organisation der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese. 92
Abbildung 21. Northern-Blot-Analyse der *ectD*-Expression bei verschiedenen Salinitäten in *S. salexigens*. 93
Abbildung 22. EctD-vermittelte Biosynthese von Hydroxyectoin in *S. salexigens* 95
Abbildung 23. Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* 97
Abbildung 24. Massenspektrum der gereinigten Ectoinhydroxylase EctD. 98
Abbildung 25. ^{1}H-NMR-Spektren von Hydroxyectoin. 99
Abbildung 26. HPLC-Analyse der *in vitro* Aktivität der Ectoin-Hydroxylase EctD. 100
Abbildung 27. K_m-Bestimmung für das Substrat Ectoin und das Co-Substrat 2-Oxoglutarat. 101
Abbildung 28. Abhängigkeit der EctD-Aktivität von der $FeSO_4$-Konzentration. 103
Abbildung 29. Abhängigkeit der EctD-Aktivität von der Katalase-Konzentration. 103
Abbildung 30. Abhängigkeit der EctD-Aktivität von der Ascorbat-Konzentration. 104
Abbildung 31. Abhängigkeit der EctD-Aktivität von der Inkubationstemperatur. 104
Abbildung 32. Abhängigkeit der EctD-Aktivität vom pH-Wert. 105
Abbildung 33. HPLC-Analyse der *in vitro* Prolin-Hydroxylase-Aktivität von EctD. 108
Abbildung 34. HPLC-Analyse der *in vitro* Aktivität der Ectoin-Hydroxylase EctD mit Homoectoin oder DHMICA als Substrate. 109
Abbildung 35. Analyse der EctD-Synthese in *S. salexigens* 110
Abbildung 36. Heterologe Produktion und Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *Escherichia coli*. 112
Abbildung 37. Hydroxyectoin-Akkumulation durch die EctD-katalysierte Hydroxylierung von Ectoin in *Escherichia coli*. 113
Abbildung 38. Kristalle der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*. 115
Abbildung 39. Computermodell des aktiven Zentrums der Ectoin-Hydroxylase. 116
Abbildung 40. Biosyntheseweg für Ectoin und Hydroxyectoin. 117
Abbildung 41. Potentieller Reaktionsablauf der Biosynthese von 5-Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*. 139
Abbildung 42. Ausgewählte Reaktionen, die von mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen katalysiert werden. 140
Abbildung 43. Modell des aktiven Zentrums einer mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase mit dem konservierten Eisen-Bindemotiv, der „2-His-1-Carboxylat-Triade“. 141
Abbildung 44. Vergleich der Aminosäuresequenzen von EctA-Proteinen. 162
Abbildung 45. Stammbaum auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der potentiellen L-2,4-Diaminobutyrat-N_γ-Acetyltransferasen (EctA). 163
Abbildung 46. Vergleich der Aminosäuresequenzen von EctB-Proteinen. 167
Abbildung 47. Stammbaum auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der potentiellen L-2,4-Diaminobutyrat Transaminasen (EctB). 168
Abbildung 48. Vergleich der Aminosäuresequenzen von EctC-Proteinen. 170
Abbildung 49. Stammbaum auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der potentiellen L-Ectoin-Synthasen (EctC). 171
Abbildung 50. Vergleich der Aminosäuresequenz potentieller Ectoin-Hydroxylasen. 172
Abbildung 51. Auszug aus der BRENDA-Datenbank. 173

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ADAM	1-Aminoadamantan
Amp^r	resistent gegen Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare (base pairs)
CIAP	(Calf Intestine Alkaline Phosphatase)
Cml^r	resistent gegen Chloramphenicol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
δ	chemische Verschiebung
FMOC	9-Flurenyloxycarbonylchlorid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
Kan^r	resistent gegen Kanamycin
kb	Kilobasen (kilobases)
Kap.	Kapitel
MALDI-TOF MS	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Flugzeit Massenspektrometrie (matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry)
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
OD_{578}	optische Dichte bei der Wellenlänge 578 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
ppm	Teile pro Million (parts per million)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
Spc^r	resistent gegen Spectinomycin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet^r	resistent gegen Tetracyclin
vol/vol	Volumen pro Volumen (volume per volume)
wt/vol	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-Indolyl-β-D-Galactosid

II Zusammenfassung

Ein weit verbreitetes Prinzip der Anpassung an wechselnde osmotische Umweltbedingungen ist die Akkumulation durch Transport oder *de novo* Synthese einer bestimmten Klasse niedermolekularer organischer Osmolyte, den so genannten kompatiblen Soluten.

Die Untersuchung der unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen *de novo* synthetisierten und akkumulierten organischen kompatiblen Solute im Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera durch ^{13}C-Kernresonanzspektroskopie ergab, dass Glutamat, Prolin und Ectoin, allein oder in Kombination, die dominanten kompatiblen Solute dieser Spezies sind. Die Mehrheit der untersuchten *Bacilli* synthetisiert das Tetrahydropyrimidin Ectoin als Antwort auf eine erhöhte Osmolarität. Eine Subgruppe dieser Ectoin-Synthetisierer ist auch in der Lage, ein hydroxyliertes Derivat von Ectoin, 5-Hydroxyectoin, zu synthetisieren. Das moderat halophile, Gram-positive Bodenbakterium *Salibacillus salexigens* ist ein Vertreter dieser Gruppe der Ectoin und Hydroxyectoin produzierenden *Bacilli*. In der vorliegenden Arbeit wurde die Biosynthese der Tetrahydropyrimidine analysiert und der Biosyntheseweg von Hydroxyectoin einschließlich seiner Regulation auf genetischer, molekularer und biochemischer Ebene erstmals untersucht und aufgeklärt.

In *S. salexigens* korreliert die Menge des *de novo* synthetisierten Ectoines linear mit der Salinität des Wachstumsmediums. Die Biosynthese dieses kompatiblen Solutes stellt eine schnelle Anpassung an hochosmolare Bedingungen dar, da sie unmittelbar nach dem Umsetzen der Bakterien in hypersalines Medium einsetzt. Sie basiert auf dem auf transkriptioneller Ebene osmotisch fein regulierten *ectABC* Ectoin-Biosyntheseoperon, welches aus diesem Organismus isoliert und charakterisiert werden konnte. Primer Extensions-Analysen mit *S. salexigens* Gesamt-RNA zeigten, dass die Transkription des *ectABC*-Operons unter Salzstress von einem Promotor kontrolliert wird, der Sequenzübereinstimmungen zu dem vegetativen Sigmafaktor σ^A in *Bacillus subtilis* aufweist. Die genetische Organisation sowie die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der isolierten *ectABC*-Gene sind unter Gram-positiven wie unter Gram-negativen Mikroorganismen weit verbreitet und konserviert.

Die Bildung von Hydroxyectoin findet erst in der späten exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase statt. Das Strukturgen, *ectD*, das für die Ectoin-Hydroxylase EctD kodiert, konnte ebenfalls aus *S. salexigens* isoliert und charakterisiert werden. Obwohl die Biosynthese von Hydroxyectoin von der Ectoin-Biosynthese direkt abhängt, sind die Gene nicht in unmittelbarer Nähe im Genom von *S. salexigens* lokalisiert. Es wurde gezeigt, dass die Transkription von *ectD* unter osmotischer Kontrolle und ein *ectD*-Transkript bereits in der frühen exponentiellen Wachstumsphase detektierbar ist. Durch Western-Blot-Analysen mit einem EctD-spezifischen Antikörper konnte auch das Enzym schon in der frühen exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen werden.

Das enzymatisch aktive Protein EctD konnte nativ aus *S. salexigens* über mehrere chromatographische Schritte zu apparenter Homogenität gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Für das gereinigte Enzym konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es Ectoin in Abhängigkeit der Cosubstrate 2-Oxoglutarat und molekularem Sauerstoff in Gegenwart von Eisensulfat direkt zu Hydroxyectoin hydroxyliert. Der K_m für das Substrat Ectoin beträgt 3,5 ± 0,2 mM, für das Co-Substrat 2-Oxoglutarat 5,2 ± 0,2 mM, die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion V_{max} beträgt 0,46 ± 0,1 U/mg Protein. Dieses Enzym ist substratspezifisch, da keine strukturell ähnlichen Substanzen als Substrate akzeptiert wurden.

Für das *de novo* gebildete Reaktionsprodukt des gereinigten EctD-Enzymes wurde mittels ^{13}C- und ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie gezeigt, dass es sich dabei um (4*S*,5*S*)-5-Hydroxyectoin, handelt und es die gleiche stereochemische Konfiguration wie das in der Literatur erstmals biochemisch beschriebene, *in vivo* synthetisierte Hydroxyectoin aus *Streptomyces parvulus*, sowie das kommerziell verfügbare Hydroxyectoin aus *Marinococcus* M52, aufweist. Die heterologe Produktion der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* als *Strep*-tag® II-Fusionsprotein im Gram-negativen Enterobakterium *Escherichia coli* DH5α

führt zu einem funktionellen Enzym, welches aus exogenen Quellen intrazellulär akkumuliertes Ectoin in *E. coli* zu Hydroxyectoin hydroxyliert.

Die Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* begründet eine neue Subfamilie von Ectoin-Hydroxylasen innerhalb der Superfamilie der mononukleären Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.). EctD-verwandte Enzyme können durch Datenbankanalysen in den Genomen verschiedener Gram-positiver und Gram-negativer *Bacteria* identifiziert werden, welche ebenfalls über ein *ectABC*-Gencluster verfügen. In der Aminosäuresequenz der EctD-Proteine gibt es eine vollständig konservierte Folge von neun Aminosäuren (W-H-S-D-F-E-T-W-H) welche charakteristisch für diese Subfamilie ist und als Suchmerkmal in Datenbanken verwendet werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind ein Beleg für die über das Genus *Bacillus* hinaus gut konservierte Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese. Die detaillierte Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase vermittelt einen Einblick in die Biochemie der Hydroxyectoin-Biosynthese und etabliert eine neue Subfamilie in der Superfamilie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.

III Einleitung

1 Mikrobielle Anpassung an variierende Umweltbedingungen

Mikroorganismen sind in ihrer natürlichen Umgebung einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Faktoren ausgesetzt, deren Schwankungen die Zelle einem Stress aussetzen können. Dies sind im Wesentlichen: Nährstofflimitation, schwankende pH-Werte, eingeschränkte Wasserverfügbarkeit, z. B. durch Austrocknung des Bodens oder starken Regen (Abb. 1), und Temperaturstress, durch Temperaturschwankungen oder Wachstum bei nicht optimaler Temperatur. Trotz dieses z. T. permanenten Stresses, sind Mikroorganismen in der Lage, in solchen Lebensräumen zu existieren und sich zu vermehren. Die erfolgreiche Besiedelung eines solchen Habitates erfordert sehr flexible und vor allem schnelle Anpassungsmechanismen, welche es der Zelle ermöglichen, auf Veränderungen der Umwelt gezielt zu reagieren und das Überleben und das Wachstum sicherzustellen.

Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Stress durch hohe oder wechselnde Osmolaritäten des umgebenden Mediums zu. Einige Mikroorganismen sind in ihrem speziellen Habitat – dem Meerwasser, Salzseen oder auch Lebensmitteln – der permanenten Präsenz hoher Konzentrationen osmotisch wirksamer Substanzen wie Salzen oder Kohlenhydraten ausgesetzt (Ventosa *et al.* 1998[a]; Grant 2004). Andere wiederum besiedeln die oberen Bodenschichten und sind damit ständig wechselnden osmotischen Bedingungen, z. B. durch Austrocknung oder Regen verursachte drastische Veränderungen der Wasseraktivität ausgesetzt, was zu negativen Effekten für die gesamte Zelle führt (Abb. 1) (Galinski & Trüper 1994; Miller & Wood 1996; Ventosa *et al.* 1998[a]; Bremer & Krämer 2000). Weitere negative Effekte hoher Salzkonzentrationen sind die dadurch hervorgerufene Eisenlimitation (Hoffmann *et al.* 2002) und eine hohe Ionenstärke. Es gibt aber auch indirekte positive Effekte. So führt die Akkumulation einiger kompatibler Solute unter Salzstress zu einer erhöhten Thermoprotektion nicht nur in *Bacteria* (Tesone *et al.* 1981; Fletcher & Csonka 1998), sondern auch in tierischen Zellen (Sheikh-Hammad *et al.* 1994) oder in Pflanzen (Pareek *et al.* 1995).

Im Freiland sind Bodenmikroorganismen Kombinationen verschiedener Umweltstressfaktoren ausgesetzt. Sie besitzen daher zahlreiche Anpassungsmechanismen unter der Kontrolle regulatorischer Netzwerke, die ihr Überleben unter ständig wechselnden Bedingungen ermöglichen sollen.

Eine besondere Strategie für den „Notfall“ haben die Genera *Bacillus* und *Clostridium* entwickelt, die jedoch mit einem temporären Verlust des Habitats einhergeht. Die Bildung von Überdauerungsformen, den Endosporen (Errington 1993; Madigan *et al.* 2000; Sonenschein 2000) vermittelt Resistenz gegenüber verschiedenen chemischen und physikalischen Einflüssen, so dass auch nach z. T. mehreren Millionen Jahren ein Auskeimen der Sporen möglich ist (Vreeland *et al.* 2000). Sporulation scheint aber nicht die bevorzugte Anpassungsreaktion von *Bacilli* an hochosmolare Bedingungen zu sein, da der mehrstufige Prozess der Sporulation unter Salzstress in Phase II abbricht. Die Aktivierung der frühen Sigmafaktoren σ^E und σ^F wird unter diesen Bedingungen blockiert und die Sporulationskaskade unterbrochen (Ruzal *et al.* 1998).

Eine Alternative bei ständiger Präsenz als vegetative Zelle stellen dazu bakterielle Stressantworten dar, die das Überleben und Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen, wie Hitze-, Ethanol-, Säure-/Alkalistress, Nährstoffmangel, Sauerstofflimitation, oder einer erhöhten Salzkonzentration erlauben (Hecker *et al.* 1996; Bernhardt *et al.* 1997; Völker *et al.* 1999; Hecker & Völker 2001). Generelle Stressantworten vermitteln einen allgemeinen Schutz gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen unabhängig vom auslösenden Stressfaktor. Die transiente Expression der Gene genereller Stressregulone unterliegt dabei der Kontrolle eines oder mehrerer Regulatoren (Hecker & Völker 1998; Völker *et al.* 1999). Das generelle Stressregulon in *Bacillus subtilis* wird durch den alternativen Transkriptionsfaktor SigB (σ^B) gesteuert, und kontrolliert, direkt oder indirekt, wahrscheinlich mehr als 150 Gene in *B. subtilis* (Petersohn *et al.* 2001; Price *et al.* 2001; Brigulla *et al.* 2003). Unabhängig von der generellen Stressantwort wird je nach Stressart eine spezifische Stressantwort induziert (Petersohn *et al.* 2001; Brigulla *et al.* 2003; Holtmann *et al.* 2004[a]). Das Zusammenspiel zwischen genereller und spezifischer Stressantwort gewährleistet die effiziente Adaption der Zellen an verschiedene Arten von Stress (Hengge-Aronis 1999). Die generelle Stressanpassung in Gram-positiven Bakterien ist auf physiologischer Ebene eng verwandt mit der Stressantwort, die vom alternativen Transkriptionsfaktor RpoS in Gram-negativen Bakterien vermittelt wird (Hengge-Aronis 1996; Loewen *et al.* 1998). Proteom-Analysen haben gezeigt, dass die durch einen plötzlichen Anstieg der Osmolarität induzierten Proteine in zwei Gruppen, die salzspezifischen und die generellen Stressproteine, unterteilt werden können (Bernhardt *et al.* 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Überlebensfähigkeit einer *sigB* Mutante nach einem plötzlichen, wachstumslimitierenden Salzschock deutlich eingeschränkt ist (Völker *et al.* 1999). Direkt nach einem hyperosmotischen Schock sorgt σ^B für die transiente Expression der Gene *opuD* und *opuE*, welche für Transporter zur Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen codieren. In hochosmolar adaptierten *B. subtilis* Zellen erfolgt die Transkription beider Gene nicht σ^B-abhängig, sondern spezifisch osmotisch reguliert, solange der Stimulus andauert (von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter & Bremer 1998). Plötzliche, extreme Salzschocks und das Wachstum unter lang anhaltend hochosmolaren Bedingungen stellen offensichtlich unterschiedliche Anforderungen an die Stressreaktion der Zelle, denen sie zum einen mit der Anschaltung der generellen Stressantwort, zum anderen mit für osmotischen Stress spezifischen Anpassungsreaktionen, wie der Akkumulation kompatibler Solute, begegnet. Das SigB-Regulon bietet eine schnelle, aber meist transiente Antwort, während andere Sigma-Faktoren, wie z. B. σ^A, so lange aktiv bleiben wie der Stimulus andauert. Proteom- und Northern-Analysen in *B. subtilis* zeigten aber auch, dass unter Hitzestress und bei suboptimaler Wachstumstemperatur σ^B-kontrollierte Gene kontinuierlich induziert sind (Brigulla *et al.* 2003; Holtmann *et al.* 2004[a]). So haben auch viele Gene für die *de novo* Biosynthese osmotischer Schutzsubstanzen Promotoren, die von σ^A erkannt werden (Brill 2001; Kuhlmann 2002; Kuhlmann & Bremer 2002).

1.1 Die Bedeutung von Wasser, Osmose und Turgor

Wasser wird auch als „Lösungsmittel“ des Lebens bezeichnet, da alle Organismen Wasser benötigen und zu großen Teilen aus diesem bestehen. So ist die Wasserverfügbarkeit (a_w) einer der wichtigsten Umweltfaktoren für Überleben und Wachstum in einem speziellen Habitat. Die Wasserverfügbarkeit hängt nicht nur vom Wassergehalt ab, sondern berücksichtigt auch die Konzentrationen von gelösten Soluten, osmotisch wirksamen Substanzen, wie Salze, Zucker, Aminosäuren und anderen organische Osmolyten (Madigan *et al.* 2000; Grant 2004). Für partikuläre Lebensräume, wie z. B. den Boden wird der Begriff der Wasserverfügbarkeit zusätzlich durch den Term der Kapillarität ψ kompliziert (Grant 2004).

Osmose ist ein elementarer Prozess in der Natur und basiert darauf, dass Wasser aus Bereichen mit niedriger Konzentration an gelösten Stoffen in Bereiche mit einer höheren Konzentration an Soluten diffundiert, insofern dies über eine wasserdurchlässige, semipermeable Barriere, wie z. B. die Zytoplasmamembran einer Zelle, möglich ist. Wasser ist also immer „bestrebt“ einen Konzentrationsausgleich herzustellen. Als Solute werden im Wasser gelöste Substanzen bezeichnet, die einen Einfluss auf die Osmolarität bzw. Wasseraktivität haben.

Die bakterielle, semipermeable Zytoplasmamembran ist für Wasser, Glycerin und kurzkettige Alkohole durchlässig, bildet jedoch eine effektive Barriere für anorganische Salze, Aminosäuren, Makromoleküle und organische Verbindungen im Zytoplasma oder der Umgebung der Zelle (Bovell *et al.* 1963). Die Semipermeabilität dieser Membran ist durch ihren Aufbau als Lipiddoppelschicht bedingt. Für die kontrollierte Aufnahme bestimmter Ionen und Moleküle wird sie von speziellen Transportproteinen durchspannt. Der Fluss von Wasser über die Membran wird in einigen Mikroorganismen durch Wasserkanäle, so genannte Aquaporine, erleichtert (Calamita *et al.* 1995; Calamita *et al.* 1998; Delamarche *et al.* 1999). Eine weitere Möglichkeit für den schnellen Efflux von Wasser, inklusiver gelöster Substanzen, aus der Zelle heraus, stellen die mechanosensitiven Kanäle dar (Moe *et al.* 1998; Blount & Moe 1999; Blount *et al.* 1999; Booth & Louis 1999; Wood *et al.* 2001; Hoffmann *et al.* in Vorbereitung). Die Funktion dieser Membranproteine wird auch als „Notventil“ nach einem hypoosmotischen Schock angesehen (Kap. 2).

Mikroorganismen, die in Habitaten mit niedrigen Wasseraktivitäten existieren, müssen Mechanismen haben, um einen Wasserverlust durch Osmose zu vermeiden. Für die mikrobielle Zelle ist es von entscheidender Bedeutung einen positiven Zellinnendruck, den Turgor, innerhalb bestimmter Grenzen aufrecht zu erhalten, um zu überleben und sich teilen zu können (Koch 1983; Csonka 1989; Höltje 1998; Wood 1999). Da Mikroorganismen Wasser nicht durch aktive Prozesse transportieren können, kann der intrazelluläre Wassergehalt und damit das Zellvolumen ausschließlich indirekt über Wasserströme gesteuert werden, die einem osmotischen Gradienten folgen (Bremer & Krämer 2000; Madigan *et al.* 2000; Bremer 2002). Das Zytoplasma von Zellen besteht aus einer wässrigen Lösung osmotisch aktiver und nicht aktiver Substanzen. Normalerweise ist die intrazelluläre Konzentration osmotisch aktiver Substanzen höher als die des umgebenden Mediums. Das hat die Konsequenz, dass Wasser entsprechend dem osmotischen Gradienten in die Zellen einströmt und sich damit ein positiver hydrostatischer

Druck, der so genannte Turgor, gegen die Zellwand aufbaut (Whatmore *et al.* 1990; Ingraham & Marr 1996; Wood 1999) (Abb. 1). Bei Gram-positiven Bakterien kann der Turgor einen Druck von circa 20 bis 25 x 10^5 Pa erreichen. Bei Gram-negativen liegt der Zellinnendruck zwischen 3 und 10 × 10^5 Pa (Whatmore & Reed 1990; Csonka & Epstein 1996).

Um den Turgor in physiologischen Grenzen zu halten, muss die mikrobielle Zelle auf zwei mögliche Szenarien schnell und effektiv reagieren können. Dies sind zum einen eine hyperosmotische Umwelt – in Salzseen oder in austrocknendem Boden – und zum anderen eine hypoosmotische Umgebung, z. B. nach einem heftigen Regenschauer (Abb. 1). Sinkt die externe Wasseraktivität, kommt es zu einem Ausstrom von Wasser aus der Zelle. Damit besteht die Gefahr des Zusammenbruchs des Turgors bis hin zur Plasmolyse, was zu Wachstumstillstand und Zelltod führen kann. Wird die Zelle dagegen hypoosmolaren Bedingungen ausgesetzt, strömt Wasser in die Zelle ein und im Extremfall besteht die Gefahr des Platzens, da nur eine bestimmte Volumenzunahme durch die begrenzte Dehnungsfähigkeit des Mureinsacculus kompensiert werden kann (Höltje 1998; Wood 1999).

Strategien zur Anpassung an extreme und schwankende externe Osmolarität sind also von fundamentaler Bedeutung für das Überleben und Wachstumsvermögen von Mikroorganismen.

1.2 Anpassung von Mikroorganismen an hyperosmotische Wachstumsbedingungen

Mikroorganismen sind in der Lage, Lebensräume mit einem beträchtlichen Spektrum osmotischer Bedingungen zu besiedeln. Dies reicht von konzentrierten Salzsolen bis hin zu Süßwasserhabitaten (Ventosa *et al.* 1998[a]; Grant 2004).

Der Begriff „osmotischer Stress“ umfasst zwei unterschiedliche Aspekte. Der Stress, der von hohen Ionenkonzentrationen verursacht wird ist nicht zwangsläufig der Selbe, wie der osmotische Stress, den organische Solute verursachen. So tolerieren viele xerophile Mikroorganismen aus Nahrungsmitteln mit hohem Zuckergehalt auch eine niedrige Wasseraktivität (a_w), welche durch Ionen hervorgerufen wird. Andererseits müssen Mikroorganismen aus gesättigten Salzseen (a_w 0,75) nicht zwangsläufig in Medien mit vergleichbarer Wasseraktivität, verursacht durch organische Solute, wachsen können (Grant 2004). Mikroorganismen aus Habitaten mit niedriger a_w durch hohe Salzkonzentrationen sind spezifisch angepasst an höhere Ionenkonzentrationen, überlappend mit der Anpassung an niedrige Wasseraktivität. Solche Organismen werden im Allgemeinen als halophil oder halotolerant bezeichnet, im Gegensatz zu xerophil und xerotolerant. Diese Bezeichnungen werden eher verwendet für Mikroorganismen, welche bei niedriger Wasseraktivität wachsen, die nicht durch anorganische Ionen verursacht wird (Grant 2004).

Eine Anpassung an Lebensräume mit niedriger Wasseraktivität ist die aktive Steuerung des intrazellulären Wassergehaltes, um einen letalen Wasserverlust durch osmotisch bedingten Wasserausstrom über die Zytoplasmamembran zu verhindern. Da mikrobielle Zellen keine Systeme für den aktiven Transport von Wasser zur Verfügung stehen, sind sie darauf angewiesen den Wasserstrom über die semipermeable Zytoplasmamembran durch den Gehalt an

intrazellulären osmotisch aktiven Substanzen zu regulieren. Um auf eine hyperosmolaren Umwelt adäquat reagieren zu könne, gibt es zwei grundsätzliche Strategien:

I) „salt-in“

Die Bezeichnung „salt-in“ bezieht sich auf die Nutzung anorganischer Ionen, für gewöhnlich K^+ und Cl^-, um einen osmotischen Ausgleich zur externen Salzkonzentration zu schaffen. Diese Art der Anpassung ist vorwiegend bei halophilen Prokaryoten zu finden (Galinski & Trüper 1994; Ventosa *et al.* 1998[a]). Dies sind hauptsächlich *Haloarchaea* und anaerobe Bakterien der Ordnung *Haloanaerobiales* ((Grant 2004). Dabei werden diese Salze bis zu molaren Konzentrationen (bis zu 5 M) angehäuft (Grant 2004), was voraussetzt, dass die gesamten metabolischen und regulatorischen Prozesse dieser Organismen an hohe intrazelluläre Ionenkonzentrationen angepasst sind, da normalerweise hohe Salzkonzentrationen, die Topologie der DNA verändern, die Hydrathülle von Proteinen stören, hydrophobe Bindungen verstärken, was zur Denaturierung von Polypeptiden führt. Eine Folge dieser Anpassung ist untere anderem, dass einige biochemische Prozesse strikt von der hohen intrazellulären Kaliumkonzentration abhängig sind. Die Zellmembran vieler halophiler Mikroorganismen ist unterhalb der hohen Ionenstärke strukturell nicht stabil (Brown 1963; Brown 1976; Eisenberg & Wachtel 1987; Zhilina & Zavarzin 1990; Dennis & Shimmin 1997). Diese Anpassungsstrategie ist sehr erfolgreich bei der Adaptation an extreme Salzkonzentrationen, erweist sich aber als relativ unflexibel und beschränkt die Habitate solcher extrem halophilen Mikroorganismen auf Salzseen und Salinen mit relativ gleich bleibenden Salzkonzentrationen.

II) „salt-out“

Die Bezeichnung „salt-out“ bezieht sich auf den aktiven Transport von anorganischen Ionen aus dem Zytoplasma heraus. Um einen erhöhte externe Osmolarität kompensieren und den Turgor aufrecht erhalten zu können, werden osmotische Schutzsubstanzen, organische Moleküle mit geringer molekularer Masse und osmotischem Potential, durch hoch affine Transportsysteme und/oder *de novo* Synthese im Zytoplasma akkumuliert (Galinski & Trüper 1994; Csonka & Epstein 1996; Miller & Wood 1996; Kempf & Bremer 1998[a;] Kempf & Bremer 1998[b;] Bremer 2002).

Die meisten *Bacteria* und *Archaea*, die moderater Osmolarität ausgesetzt bzw. regelmäßigen Fluktuationen der externen Osmolarität unterworfen sind, bedienen sich einer anderen Strategie, die sie in Hinblick auf die Wahl ihrer Habitate deutlich flexibler macht als Mikroorganismen mit der „salt-in“ Strategie.

Dabei wird als initiale Antwort auf hyperosmotischen Stress zwar ebenfalls Kalium angehäuft, das aber aufgrund der erwähnten Inkompatibilität mit dem Zellmetabolismus nach kurzer Zeit, in einem zweiten Schritt der Anpassung, durch niedermolekulare organische Solute ersetzt wird (Csonka & Epstein 1996; Kempf & Bremer 1998[a;] Bremer & Krämer 2000; Bremer 2002). Diese organischen Osmoprotektiva werden entweder *de novo*

synthetisiert und/oder über spezifische, hoch affine Transporter aus der Umgebung aufgenommen (Galinski & Trüper 1994; Csonka & Epstein 1996; Miller & Wood 1996; Kempf & Bremer 1998[a]). Die organischen Solute können je nach externer Osmolarität bis zu molaren Konzentrationen akkumuliert werden, ohne den Zellmetabolismus zu beeinträchtigen. Daher werden sie auch als kompatible Solute bezeichnet (Brown 1976; Grant 2004; Holtmann *et al.* 2004[b]).

Osmoprotektion durch Transport und/oder *de novo* Synthese, sowie die Nutzung eines kleinen Spektrums organischer Verbindungen, ist ein konservierter Anpassungsmechanismus, der in *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya* weit verbreitet ist. So ist diese Reaktion auf wechselnde osmotische Bedingungen nicht nur bei Mikroorganismen, sondern auch bei Pilzen, Pflanzen, tierischen und menschlichen Zellen zu finden (Rhodes & Hanson 1993; Galinski & Trüper 1994; Bohnert *et al.* 1995; Galinski 1995; Gutierrez *et al.* 1995; Csonka & Epstein 1996; Miller & Wood 1996; Burg *et al.* 1997; Hagemann *et al.* 1997; da Costa *et al.* 1998; Peter *et al.* 1998; Poolman & Glaasker 1998; Kempf & Bremer 1998[a]; Ventosa *et al.* 1998[a]; Wood 1999; Bremer & Krämer 2000; Nakayama *et al.* 2000; Roberts 2000; Wood *et al.* 2001; Holtmann 2002; Kuhlmann & Bremer 2002).

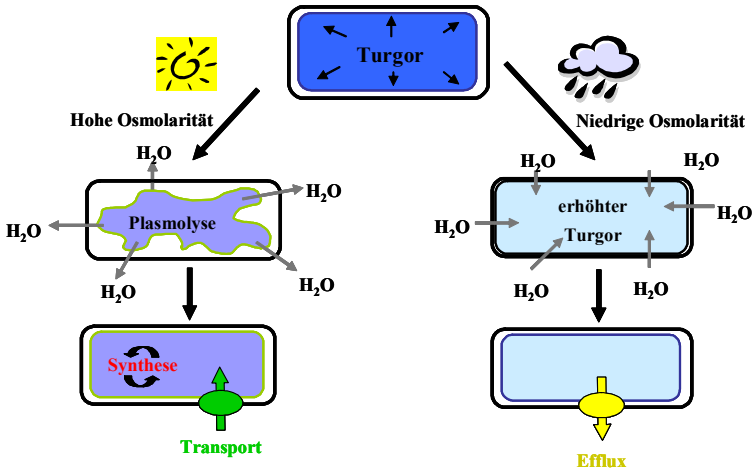


Abbildung 1. Allgemeines Schema zur Anpassung von Mikroorganismen an hyper- oder hypotone Umweltbedingungen.

1.3 Eigenschaften, Struktur und Wirkungsweise kompatibler Solute

Die intrazelluläre Akkumulation niedermolekularer, organischer, osmotisch aktiver Substanzen, den kompatiblen Solute, ermöglicht das Überleben und das Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen (Bayles 1993; Malin & Lapidot 1996; Kempf & Bremer 1998[a]; Caldas *et al.* 1999; Bremer & Krämer 2000; Canovas *et al.* 2001; Wood *et al.* 2001; Holtmann 2002; Holtmann *et al.* 2003; Holtmann *et al.* 2004[b]). Diese organischen Osmolyte können bis zu molaren Konzentrationen in der Zelle angereichert werden, ohne negativen Einfluss auf den zellulären Katabolismus, Anabolismus, Proteinfaltung, Membranintigrität oder die Zellteilung zu

haben (Brown 1976; Le Rudulier *et al.* 1984; Kaasen *et al.* 1994), daher die Bezeichnung als kompatible Solute (Brown 1976).

Obwohl die Fähigkeit zur Akkumulation kompatibler Solute als Antwort auf hyperosmotischen Stress in allen drei Domänen vertreten ist (Bohnert *et al.* 1995; Kempf & Bremer 1998[a]; Roberts 2000), rekrutiert sich das Spektrum der verwendeten kompatiblen Solute aus lediglich vier Stoffklassen, mit z. T. gemeinsamen strukturellen Motiven, besonders unter den Aminosäuren und deren Derivaten (Abb. 2)(Le Rudulier *et al.* 1984; Miller & Wood 1996; da Costa *et al.* 1998; Kempf & Bremer 1998[a]; Bremer & Krämer 2000; Madigan *et al.* 2000; Grant 2004; Holtmann *et al.* 2004[b]):

I. Polyole
   1) Polyole, wie z. B. Glycerol, Arabitol, Mannitol,
   2) Kohlenhydraten, wie Trehalose, Saccharose,
   3) Zuckerderivate, wie Sulphotrehalose und Glycosylglycerol;

II. Aminosäuren und -derivate
   1) Aminosäuren, wie Prolin, Glutamat und Glutamin
   2) *N*-acetylierte Aminosäuren, wie N_{δ}-Acethylornithin;
   3) Glutamin-Amid Derivate, wie N_{α}-Carbamoylglutamin Amid
   4) Tetrahydropyrimidine, Ectoin und Hydroxyectoin
   5) kleine Peptide

III. Tri-Methyl-Ammonium-Verbindungen, wie Glycin-Betain, Cholin oder Carnitin

IV. Thetine (Dimethyl-Sulphonium-Verbindungen), wie Dimethyl-Sulfoniopropionat und Sulfatester, wie Cholin-*O*-Sulfat;

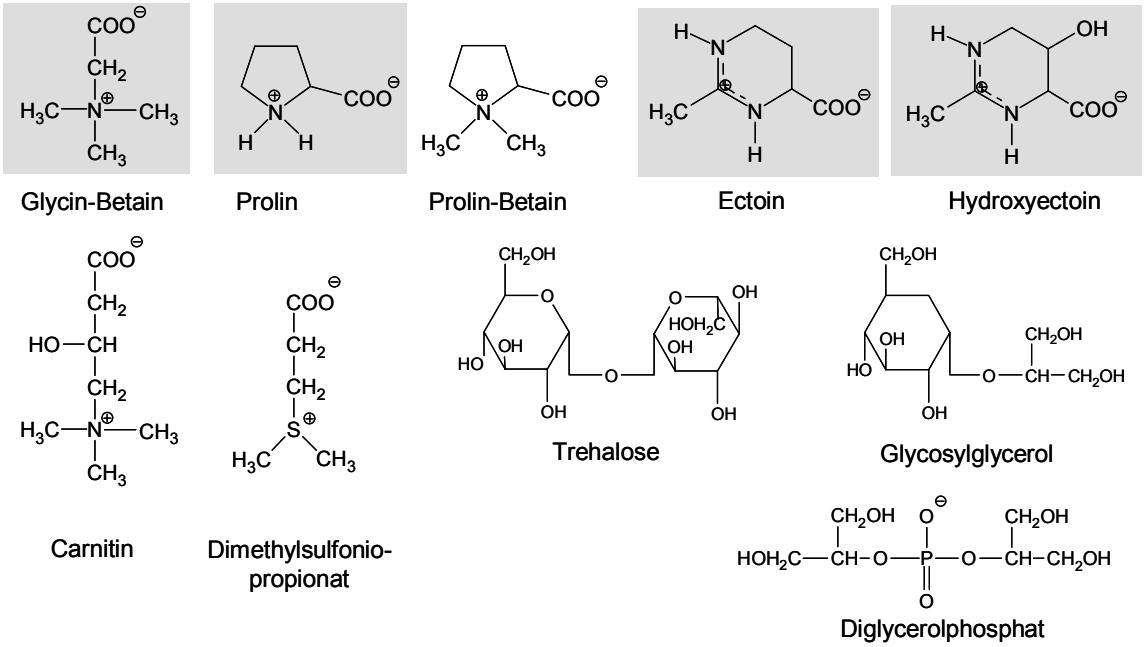


Abbildung 2. Ausgewählte Vertreter kompatibler Solute.

Im Genus *Bacillus* und nah verwandten Genera synthetisierte kompatible Solute sind grau unterlegt (Madigan *et al.* 2000; Santos & da Costa 2002).

Die meisten kompatiblen Solute in *Bacteria* und *Eukarya* sind polar, bei physiologischem pH-Wert ungeladen oder zwitterionisch und bis zu molaren Konzentrationen in wässrigen Lösungen löslich (Csonka 1989). Sie sind chemisch, physikalisch und biologisch stabil. Darüber hinaus interagieren sie nicht direkt mit Proteinen (Csonka 1989; Galinski & Trüper 1994). Bei niedrigen pH-Werten verlieren kompatible Solute ihre proteinstabilisierenden Eigenschaften, da sich der ionische Charakter des Solutes und des Proteins verstärkt, so dass es doch zu Anziehungskräften zwischen Protein und Solut kommt. Das Solut interagiert direkt mit der Proteinoberfläche anstatt von ihr ausgeschlossen zu sein („preferential exclusion model", Kapitel III.1.3.1) (Knapp *et al.* 1999).

Die von *Archaea* bevorzugten kompatiblen Solute gleichen in ihrer Grundstruktur und ihren Eigenschaften den von *Bacteria* und *Eukarya* verwendeten. Der Grossteil von ihnen trägt aber eine negative Ladung (Martins *et al.* 1997; Martin *et al.* 1999; Roberts 2000; Roeßler & Müller 2001[b]). Dieser anionische Charakter beruht in den meisten Fällen auf einer Carboxylat-, Phosphat- oder Sulfatgruppe (Abb. 2). Eine Erklärung für die Verwendung negativ geladener Solute in *Archaea* ist die Verwendung als Gegenion zur hohen intrazellulären Konzentration von positiven Kaliumionen (Martin *et al.* 1999; Roberts 2000).

Neben ihrer osmotischen Aktivität und der daraus resultierenden Aufrechterhaltung des Turgors, sowie der guten Kompatibilität, müssen diese Substanzen die Zelle aber auch wirkungsvoll vor der Inaktivierung, Inhibierung und Denaturierung von Enzymen und makromolekularen Strukturen unter den Bedingungen von niedriger Wasseraktivität und hoher Ionenstärke schützen (Brown 1976; Pollard & Wyn Jones 1981; Lippert & Galinski 1992; Galinski & Trüper 1994; Göller *et al.* 1998; Caldas *et al.* 1999; Canovas *et al.* 1999; Malin *et al.* 1999; Bourot *et al.* 2000; Canovas *et al.* 2001; Diamant *et al.* 2001; Diamant *et al.* 2003; Grant 2004; Schnoor *et al.* 2004). Kompatible Solute haben neben ihrer Eigenschaft der Hydrierung der Zelle bzw. zellulärer Komponenten auch proteinstabilisierende Eigenschaften sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Lippert & Galinski 1992; Canovas *et al.* 1999; Andersson *et al.* 2000; Diamant *et al.* 2003; Arora *et al.* 2004). Die Eigenschaft kompatiblen Solute, Proteine in eine kompakte Konformation zu drängen („preferential exclusion model") trägt möglicherweise auch zu ihrer Funktion als Schutzsubstanzen bei Hitze und Kälte bei (Lamosa *et al.* 1998; Caldas *et al.* 1999; Bourot *et al.* 2000; Canovas *et al.* 2001; Roeßler & Müller 2001[a]; Borges *et al.* 2002; Mendum & Smith 2002; Santos & da Costa 2002; Holtmann *et al.* 2004[a]; Holtmann & Bremer 2004[c]; Pais *et al.* 2005; Hoffmann & Bremer in Vorbereitung). Für eine thermoprotektive Wirkung einzelner kompatiblen Solute, scheint die Konzentration im Gegensatz zur osmoprotektiven Wirkung eine untergeordnete Rolle zu spielen, da offensichtlich wesentlich geringere intrazelluläre Konzentrationen im Vergleich zu osmotischem Stress ausreichend sind (Caldas *et al.* 1999; Holtmann *et al.* 2003), um thermolabile Proteine zu stabilisieren (Lippert & Galinski 1992; Canovas *et al.* 1999; Knapp *et al.* 1999; Diamant *et al.* 2001; Borges *et al.* 2002; Morbach & Krämer 2002; Diamant *et al.* 2003). Diese proteinstabilisierenden Eigenschaften führten auch zu der Bezeichnung als chemische Chaperone (Tatzelt *et al.* 1996). Zusätzlich zu den direkten Einflüssen auf Proteine aktivieren bereits niedrige Konzentrationen kompatibler Solute die molekularen Chaperone wie GroEL, DnaK oder ClpB, indem sie die lokale Faltung der

chaperongebundenen Polypeptide fördern und das native Endprodukt der Reaktion bei Hitze stabilisieren (Diamant *et al.* 2001; Diamant *et al.* 2003). Bei niedrigen Temperaturen ist die Faltung von Proteinen verlangsamt oder inkorrekt (Graumann & Marahiel 1999), was durch die Funktion der kompatiblen Solute als „chemisches Chaperon“ kompensiert werden kann. Die positiven Effekte auf Proteine unter Hitzestress werden auch *in vitro*, z.B. in Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) zur Stabilisierung der Polymerase, genutzt (Schnoor *et al.* 2004). So kommen in Kits zur Optimierung der PCR Ectoin, Hydroxyectoin und/oder Glycin-Betain zum Einsatz (bitop AG, Witten, Deutschland).

Schon seit längerer Zeit ist der positive Einfluss von Zuckern und Polyolen auf die Toleranz von Mikroorganismen gegen Einfrieren und Auftauen bekannt (Mazur 1968; Hino *et al.* 1990). So werden kompatible Solute routinemäßig als Additive für mikrobiologische Proben verwendet, die gefroren oder lyophilisiert werden sollen (Barbour & Priest 1986; Simione & Brown 1991). Die protektiven Fähigkeiten sind dabei von der Konzentration, der gewählten Schutzsubstanz und dem jeweiligen System (ganze Zellen oder Proteine) abhängig. Es kann nicht automatisch vom Potential der Osmoprotektion auf eine Thermo- oder Cryoprotektion geschlossen werden, da diese speziellen Eigenschaften wahrscheinlich von spezifischen Interaktionen zwischen Solut und Protein abhängen. (Holtmann 2002; Holtmann & Bremer 2004[c]). Es sind für jeden Organismus oder jede Probe individuelle Analysen erforderlich um das genaue Spektrum der Osmo-, Thermo- und Cryoprotektiva bestimmen zu können.

Für einige osmotische Schutzsubstanzen, z. B. für Prolin, konnte eine protektive Wirkung gegen Hydroxyl-Radikale gezeigt werden (Smirnoff & Cumbes 1989). Auch Ectoin kann einen gewissen Schutz gegen die negativen Effekte von Wasserstoffperoxyd (Andersson *et al.* 2000) und UV-Strahlung (Buenger & Driller 2004) vermitteln.

Die Effekte beschränken sich aber nicht nur auf Proteine. Für einige kompatible Solute konnte gezeigt werden, dass sie auch die Interaktion von DNA mit Proteinen (Record *et al.* 1998; Courtenay *et al.* 2000), die Topologie und chemischen Eigenschaften von DNA, wie z. B. den Schmelzpunkt von DNA-Strängen oder RNA-Sekundärstrukturen beeinflussen können. Solche RNA-Sekundärstrukturen behindern die Initiation der Translation (Graumann *et al.* 1997; Jiang *et al.* 1997), was ein limitierender Faktor bei niedrigen Temperaturen ist (Broeze *et al.* 1978). Veränderungen in der Temperatur resultieren in einer Änderung der superhelikalen Dicht der DNA, was die Transkription der Gene beeinflusst (May *et al.* 1990; Krispin & Allmansberger 1995). Für Ectoin konnte gezeigt werden, dass es den Schmelzpunkt GC-reicher DNA erniedrigt. Diese Eigenschaft wird unter anderem für die Optimierung von PCR-Ansätzen genutzt (bitop AG, Witten, Deutschland).

Kompatible Solute schützen die Zellen nicht nur nach einem Temperaturschock, sondern tragen wesentlichen zum Wachstum bei kontinuierlich sub- oder supraoptimalen Temperaturen bei. Das pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* wächst bei hoher Osmolarität und niedrigen Temperaturen (Seliger & Jones 1986). Um mit diesen Bedingungen umzugehen, nutzt *L. monocytogenes* die protektiven Eigenschaften kompatibler Solute. Glycin Betain wird bei Wachstum in der Kälte verstärkt transportiert, was zu besserem Wachstum führt (Ko *et al.* 1994).

Carnitin und Prolin Betain haben sowohl eine osmo- als auch eine cryoprotekive Wirkung auf diesen Organismus (Beumer *et al.* 1994; Bayles & Wilkinson 2000).

Die Ectoin-Biosynthese ist nicht nur durch osmotischen Stress induzierbar, sondern reagiert auch auf andere Umweltreize. So konnte in *Streptomyces griseus* ein erhöhter Level an Ectoin gefunden werden, wenn dieser Organismus bei einer Wachstumstemperatur über dem Temperaturoptimum inkubiert wurde (Malin & Lapidot 1996). Ein ähnliches Phänomen konnte in *Streptomyces coelicolor* A3(2) beobachtet werden. Bei Wachstumstemperaturen über dem Optimum von 28°C synthetisiert dieser Actinomycet Ectoin und Hydroxyectoin, auch ohne osmotischen Stress (Kuhlmann 2002). Eine exogene Zugabe von Ectoin, Hydroxyectoin oder einer Kombination von beiden zeigt einen cryoprotektiven Effekt auf das Wachstum bei 15 °C (Bursy *et al.* 2005). Im Genus *Halomonas* ist die Synthese bzw. das Verhältnis von Ectoin zu Hydroxyectoin von der Salzkonzentration und der Wachstumstemperatur abhängig (Galinski & Herzog 1990). In *Virgibacillus pantothenticus* konnte eine kälteinduzierte Transkription der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* und die Akkumulation diese Solutes nachgewiesen werden (Kuhlmann *et al.* 2005). Auch für den Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* wurde gezeigt, das einige kompatible Solute das Wachstum in der Kälte und in der Hitze fördern und dass für den Import auch die gleichen Transportsysteme wie unter osmotischem Stress genutzt werden (Spaller 1999; Brigulla *et al.* 2003; Holtmann & Bremer 2004[c;] Hoffmann & Bremer in Vorbereitung). Die Zugabe geringer Konzentrationen von Glycin-Betain oder verschiedenen anderen kompatiblen Soluten zum Medium resultieren in einer Verkürzung der lag-Phase und in einer erhöhten Wachstumsrate bei kontinuierlichem Wachstum bei 52°C (Holtmann & Bremer 2004[c]). Es kommt aber nicht zu einer Erhöhung der maximalen Wachstumstemperatur. Thermoprotektive Eigenschaften auf das mikrobielle Wachstum sind für Trehalose (Hengge-Aronis *et al.* 1991; Canovas *et al.* 2001), für Glycin-Betain (Caldas *et al.* 1999; Holtmann & Bremer 2004[c]), wie auch für die Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin (Malin & Lapidot 1996; Bursy *et al.* 2005) gezeigt worden.

Thermophile und hyperthermophile *Bacteria* und *Archaea* synthetisieren, wenn sie Hitzestress ausgesetzt sind spezielle kompatible Solute, wie zyklisches 2,3-Bisphosphoglycerat, Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat (DIP) und Mannosylglycerat. Diese kompatiblen Solute konnten nicht in mesophilen Prokaryoten nachgewiesen werden (Nunes *et al.* 1995) ((Scholz *et al.* 1992; Ciulla *et al.* 1994; Martins *et al.* 1997; Lamosa *et al.* 1998; Silva *et al.* 1999; Borges *et al.* 2002). Vermutlich besitzen diese Solute spezielle thermoprotektive Eigenschaften, die bei extremen Wachstumstemperaturen eine stabilisierende Funktion für zelluläre Strukturen haben. Auch hier kommt wahrscheinlich der Effekt des „chemischen Chaperones" zum Tragen, da die Proteine in eine möglichst kompakte Konformation gedrängt werden, was vor thermischer Inaktivierung durch Missfaltung und Aggregation schützt.

1.3.1 Modell der Wirkungsweise kompatibler Solute

Die exakten biochemischen Mechanismen, welche die Wirkung der kompatiblen Solute ausmachen, sind auch heute noch nicht komplett verstanden. Vor allem da es einen Unterschied zwischen den protektiven Effekten bei hoher Osmolarität und anderen Stessfaktoren wie Hitze

und Kälte gibt. Im Allgemeinen wird zur Erklärung der Effekte das Modell des „Präferentiellen Ausschlusses“ von Arakawa und Timasheff herangezogen (Arakawa & Timasheff 1985). Dieses Modell beruht auf den osmophoben Wechselwirkungen. So werden die aus den speziellen Eigenschaften der kompatiblen Solute herrührenden energetisch ungünstigen Interaktionen zwischen diesen und dem Proteinrückgrat bezeichnet (Bolen & Baskakov 2001). Aufgrund dieser werden sie von der direkten Hydrathülle des Proteines ausgeschlossen (Bolen & Baskakov 2001), was zu einer nicht-homogenen Verteilung der Solute im Zytoplasma und zur präferentiellen Hydrierung der Proteinoberfläche führt. Dieses Ungleichgewicht erzeugt eine thermodynamische Kraft, welche das Protein in eine möglichst kompakte Konformation drängt, was die native tertiäre und quarternäre Struktur der Proteine stabilisiert (Abb. 3) (Arakawa & Timasheff 1985; Incharoensakadi *et al.* 1986; Winzor *et al.* 1992; Timasheff 1998; Bolen & Baskakov 2001). Ihre nahezu fehlende Wechselwirkung mit den Proteinen an sich, erklärt ihre Kompatibilität sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Arakawa & Timasheff 1985).

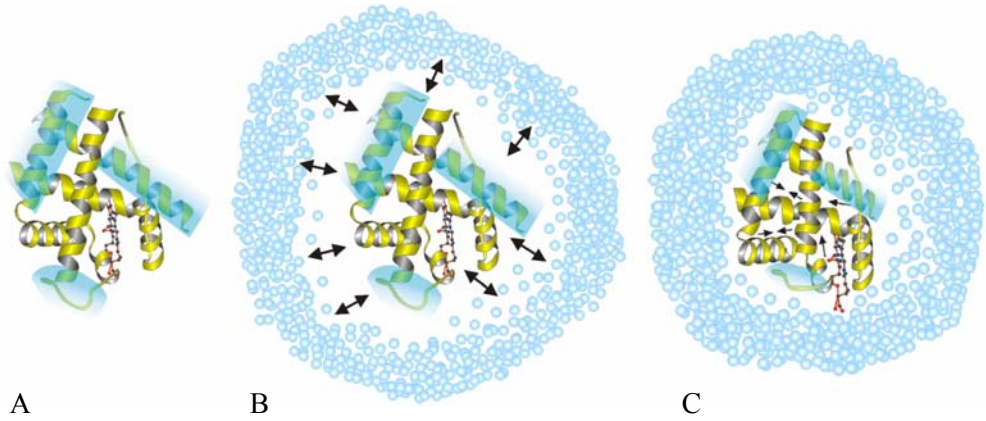


Abbildung 3. Modell des präferenziellen Ausschlusses zur Proteinstabilisierung durch kompatible Solute.
Dargestellt ist die modellhafte Tertiärstruktur eines nativen Proteines mit seiner Hydrathülle im ungestressten Zustand (**A**); (**B**) Unter Stress denaturierendes Protein. Kompatible Solute sind als Kugeln dargestellte und werden aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften von der direkten Hydrathülle des Proteines ausgeschlossen, was zu einer Ungleichverteilung im Raum führt; (**C**) Um diese energetisch ungünstigen Verteilung zu reduzieren, nimmt das Protein eine möglichst kompakte Konformation ein, welche der nativen in (A) ähnelt. (Arakawa & Timasheff 1985; Bolen & Baskakov 2001), Bildquelle: bitop AG, Witten, Deutschland; www.bitop.de)

1.4 Die initiale Stressantwort: Kalium-Aufnahme unter hyperosmolaren Bedingungen

Kalium ist in der Natur weit verbreitet und wird sowohl von *Bacteria* als auch von *Archaea* als eine Reaktion auf eine Erhöhung der externen Osmolarität in der Zelle angereichert. Aber auch in der nicht gestressten Zelle liegt Kalium als häufigstes Kation in Konzentrationen bis zu 150 mM vor. Es ist an der Aufrecherhaltung des Turgors und eines physiologischen pH-Wertes beteiligt und wird für die Aktivität verschiedener Enzyme benötigt oder beeinflusst deren Stabilität (Whatmore & Reed 1990; Csonka & Hanson 1991; Ono *et al.* 1999).

In dem Gram-positiven, halotoleranten Bodenbakterium, *B. subtilis*, wird im Folgenden eine zweistufige Anpassungsreaktion an hyperosmolare Umweltbedingungen erläutert. Direkt

nach einem hyperosmolaren Schock wird als initiale Stressantwort Kalium aus externen Quellen über spezifische Kalium-Transportsysteme (Ktr) in die Zelle transportiert, welches in der zweiten Phase aufgrund der metabolischen Unverträglichkeit durch organische, metabolisch-kompatible Osmolyte ersetzt wird (Whatmore *et al.* 1990). Eine Kaliumbestimmung nach einem moderaten hyperosmotischen Schock von 0,4 M ergab, dass sich innerhalb einer Stunde der Kaliumgehalt fast verdoppelt (Whatmore & Reed 1990). Die Kaliumaufnahme wird in *B. subtilis* von zwei spezifischen Kalium-Transportern KtrAB und KtrCD bewältigt, wobei dem hochaffinen KtrAB-System die größere Bedeutung zukommt (Holtmann *et al.* 2003). Solche K^+-Transporter des Ktr-Typ wurden auch in anderen Mikroorganismen und Pflanzen identifiziert (Nakamura *et al.* 1998; Durell & Guy 1999; Kawano *et al.* 2001). Fehlt das KtrAB-System, ist *B. subtilis* nach einem hyperosmotischen Schock nicht mehr in der Lage weiter zu wachsen und zeigt ebenfalls einen Wachstumsnachteil bei erhöhter Osmolarität (Holtmann *et al.* 2003). Die Kaliumaufnahme über die Ktr-Systeme ist ein wichtiger Bestandteil der Anpassung sowohl nach einem hyperosmolaren Schock, wie auch bei kontinuierlichem Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen.

Über eine Akkumulation oder Synthese eines Gegeniones wie z.B. Glutamat oder Chlorid zur Aufrecherhaltung der Elektroneutralität der Zelle ist in *B. subtilis* nichts bekannt (Whatmore & Reed 1990). Gram-positive Bakterien haben aber generell einen hohen intrazellulären Glutamatpool, auch unter osmotisch stressfreien Bedingungen, der 60% bis 90% der gesamten freien Aminosäuren im Zytoplasma umfasst (Clark *et al.* 1972; Poolman & Glaasker 1998). Die Glutamatsynthese ist in *B. subtilis* nicht osmotisch reguliert (Kap. 1.5.3.3).

Im Gegensatz dazu ist in dem Gram-negativen Enterobakterium *Escherichia coli* die K^+-Aufnahme nach einem hyperosmotischen Schock an die Synthese von Glutamat gekoppelt, welches als Gegenion benutzt wird (Cayley *et al.* 1992; McLaggan *et al.* 1994; Yan *et al.* 1996). *Streptomyceten* benutzen dagegen Chlorid zum Ladungsausgleich, da ein Anstieg der Chlorid-Konzentration nach einem hyperosmotischen Schock beobachtet werden konnte (Killham & Firestone 1984).

1.5 Die zweite Anpassungsphase: Aufnahme und Synthese kompatibler Solute

Im Gegensatz zur Strategie halophiler *Halobacteria* (*Archaea*), die hohe Salzkonzentrationen im Zytoplasma tolerieren, transportieren die meisten *Bacteria* anorganische Ionen aktiv aus dem Zellinneren heraus. Sie akkumulieren unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen nichtionische organische Osmolyte, durch aktive Aufnahme aus der Umwelt über hoch affine Transporter und/oder durch *de novo* Biosynthese (Wood *et al.* 2001).

Zusammensetzung und Konzentration der kompatiblen Solute im Zytoplasma wird durch fein regulierte Transportvorgänge und/oder *de novo* Synthese unter hypertonen bzw. Efflux unter hypotonen Umweltbedingungen gesteuert (Kempf & Bremer 1998[a]; Holtmann *et al.* 2004[b]).

1.5.1 Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt

In ihren verschiedenen Habitaten steht den Mikroorganismen oft ein breites Spektrum kompatibler Solute zur Verfügung, die ihnen das Überleben unter hyperosmolaren Umweltbedingungen ermöglichen können, insofern sie über Transportsystem verfügen, um diese Substanzen in die Zelle zu transportieren. Diese Osmoprotektiva der verschiedensten Stoffklassen werden unter anderem von Pflanzen (Wurzelexudate), Tieren oder anderen Mikroorganismen (nach hypoosmotischen Schock) ausgeschieden oder stammen aus dem Abbau toter Mikroorganismen oder höherer Zellen (Welsh 2000).

Die Aufnahme exogener Osmoprotektiva stellt eine energetisch günstigere Alternative zur endogenen *de novo* Synthese dar und wird dieser deshalb bevorzugt. Sind in der unmittelbaren Umgebung des Mikroorganismus verwertbare kompatible Solute vorhanden, werden diese genutzt und die *de novo* Biosynthese auf transkriptioneller Ebene reprimiert (Galinski & Trüper 1994; Ventosa *et al.* 1998[a;] Bursy 2001).

Die meist hochaffinen, spezialisierten, osmotisch- und/oder substrat-induzierbaren Transporter exogener Osmolyte sind weit verbreitet (Jebbar *et al.* 1992; Galinski & Trüper 1994; Peter *et al.* 1997; Peter *et al.* 1998; Ventosa *et al.* 1998[a;] Morbach & Krämer 2002; Roessler *et al.* 2002; Sleator & Hill 2002; Schiefner *et al.* 2004[a;] Schiefner *et al.* 2004[b]).

Die Transporter gehören im Wesentlichen vier Proteinfamilien an. Dies sind zum einen die aktiven Transporter der ABC-Familie (**A**TP-**B**inding-**C**assette), die in Pro- und Eukaryonten weit verbreitet sind. Sie besitzen eine zytoplasmatische, membranständige ATPase und verbrauchen für den Transport ATP (ProU aus *E. coli*, OpuA, OpuB und OpuC aus *B. subtilis*) (Gowrishankar 1989; Lucht & Bremer 1994; Kempf & Bremer 1995; Kappes *et al.* 1996). OpuA ist das dominante Glycin-Betain-Transportsystem in *B. subtilis*, da es über eine höhere Transportkapazität als die beiden anderen Glycin-Betain-Transporter OpuC und OpuD verfügt (Kappes *et al.* 1996). OpuC hat ein sehr breites Substratspektrum (Abb. 6) und ist unter anderem für die Ectoin-Akkumulation als Osmoprotektivum verantwortlich (Jebbar *et al.* 1997). OpuB ist trotz seiner hohen Sequenzähnlichkeit zu OpuC (Kappes *et al.* 1999) lediglich für Cholin, das Substrat der Glycin-Betain Synthese, hochspezifisch (Holtmann *et al.* 2004[b]).

Die drei anderen Gruppen sind sekundäre Transporter, die den Transport ihrer Substrate mit dem Symport oder Antiport von Protonen oder Kationen, wie Natrium oder Kalium koppeln (ProP aus *E. coli*, OpuE aus *B. subtilis*, TeaABC aus *Halomonas elongata*). Dazu gehört die so genannte BCCT-Familie (**B**etain-, **C**arnitin, **C**holin-**T**ransporter) (Kempf & Bremer 1995; Csonka & Epstein 1996; Kappes *et al.* 1996; von Blohn *et al.* 1997; Paulsen *et al.* 1998). Zu dieser Familie gehört der Glycin-Betain-Transporter OpuD aus *B. subtilis*. In dieser Proteinfamilie sind ausschließlich bakterielle Transporter wie z.B. BetT und CaiT aus *E. coli* (Lamark *et al.* 1991; Eichler *et al.* 1994), BetL aus *L. monocytogenes* (Gerhardt *et al.* 1996; Sleator *et al.* 1999) und EctP aus *Corynebacterium glutamicum* (Peter *et al.* 1996; Paulsen *et al.* 1998) zu finden. Diese Proteine koppeln den Transport eines Solut-Moleküles mit der Aufnahme eines Natrium-Ions. Eine weitere Gruppe ist die Familie der SSS-Transporter (**S**odium **S**olute **S**ymporter) (Reizer *et al.* 1994; Saier 2000). Zu dieser Gruppe gehört der

Einzelkomponententransporter OpuE aus *B. subtilis* der für die Prolin-Aufnahme unter hochosmolaren Bedingungen verantwortlich ist (von Blohn *et al.* 1997). Die dritte Gruppe der sekundären Transporter ist TRAP-T (**Tr**ipartit **A**TP-independent **P**eriplasmic **T**ransporter), in die der osmotisch regulierte Ectoin-Transporter TeaABC aus *H. elongata* gehört. Auch diese Systeme nutzen nicht ATP, sondern sind Symporter für Protonen oder Na^+ (Grammann *et al.* 2002).

Meist besitzen Mikroorganismen mehrere dieser Transportsysteme, z. T. auch mit überlappendem Substratspektrum, um möglichst viele im Habitat vorhandene kompatible Solute nutzen zu können (Kempf & Bremer 1998[a]) oder eine möglichst genaue Steuerung der Aufnahme zu gewährleisten (Wood *et al.* 2001).

Den Osmolyttransporter kommt neben der Funktion der Akkumulation kompatibler Solute aus exogenen Quellen, auch die Funktion des sofortigen Rücktransportes der aus den Zellen austretenden Solute zu (von Blohn *et al.* 1997; Moses 1999; Grammann *et al.* 2002). Der Gradient der angereicherten Solute über die Zytoplasmamembran ist unter hyperosmolaren Bedingungen scheinbar so groß, dass die Zelle immer einen gewissen Teil „verliert". Um die energetischen Verluste gering zu halten oder konkurrierenden Organismen keine Solute zur Verfügung zu stellen, werden diese Substanzen sofort wieder reimportiert (von Blohn *et al.* 1997; Moses 1999; Grammann *et al.* 2002). Dieser Efflux und anschließende Reimport von Soluten unter isoosmotischen Bedingungen ist unter Mikroorganismen ein verbreitetes Phänomen und wurde auch für *Salmonella typhimurium* (Koo *et al.* 1991) und *H. elongata* (Grammann *et al.* 2002) beschrieben.

Die Konzentrationen osmotischer Schutzsubstanzen in den diversen Ökosystemen liegen meist im nano- bis unteren mikromolekularen Bereich und variieren in ihrer Zusammensetzung. Für eine effektive Aufnahme müssen Osmolyt-Transporter deshalb eine hohe Affinität (K_m-Werte im unteren mikromolaren Bereich) für ihre, oft auch verschiedenen Substrate besitzen und diese entgegen einem großen Konzentrationsgradienten, bis zu molaren Konzentrationen im Zytoplasma anreichern können (Kempf & Bremer 1995; Kappes *et al.* 1996; von Blohn *et al.* 1997; Kempf & Bremer 1998[a]; Kappes *et al.* 1999; Nau-Wagner *et al.* 1999; Bremer & Krämer 2000). Eine hohe Transportkapazität (V_{max}) ermöglicht eine schnelle Akkumulation der Solute im Zellinneren und damit eine schnelle Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock. Die Transportproteine können kompatible Solute hochaffin binden, obwohl sie nach dem Modell der Wirkung („preferential exclusion") eigentlich von der Hydrathülle des Proteines ausgeschlossen werden sollten (Arakawa & Timasheff 1985; Baskakov & Bolen 1998) Abb. 3). Die spezifische Bindung im Inneren eines Glycin-Betain/Prolin-Betain-Bindeproteines aus *E. coli* und *Archaeoglobus fulgidus* erfolgt über Kation-π-Interaktionen, die von konservierten aromatischen Aminosäureresten in der Bindetasche des Proteines koordiniert werden (Schiefner *et al.* 2004[a]; Schiefner *et al.* 2004[b]).

Die Transporter funktionieren auch unter hohen Osmolaritäten bzw. hohen Ionenkonzentrationen, bei denen andere Transporter, z.B. für Nährstoffe in ihrer Aktivität bereits beeinträchtigt werden (Bremer & Krämer 2000). Ein Beispiel für inhibierte Transporter sind die

Prolin-Permeasen (PutP-Homologe), die Prolin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle in die Zelle transportieren (Wood 1988; Moses 1999; Wood *et al.* 2001).

1.5.2 Transport der Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin

Die Aufnahme und Akkumulation der Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin als osmotische Schutzsubstanzen ist unter Gram-positiven, wie auch unter Gram-negativen Bakterien zu finden.

Der Transport dieser potenten kompatiblen Solute wird in Organismen die nicht zur *de novo* Synthese dieser Substanzen fähig sind, meist über Transportsysteme mit breitem Substratspektrum transportiert. Dies ist in *B. subtilis* der ABC-Transporter OpuC, welcher jedoch nur eine vergleichsweise geringe Affinität für Ectoin aufweist, so dass es nicht als primäres Osmoprotektivum genutzt wird (Jebbar *et al.* 1997). Dies scheint für das Genus *Bacillus* eine Ausnahme zu sein (Kuhlmann & Bremer 2002; Holtmann *et al.* 2004[b]). *E. coli*, auch ein Mikroorganismus der nicht zur Ectoin-Synthese befähigt ist, kann unter hochosmolaren Bedingungen den ABC-Transporter ProU und den SSS-Transporter ProP für die Aufnahme von Ectoin nutzen (Jebbar *et al.* 1992; Lucht & Bremer 1994; Csonka & Epstein 1996). Für *C. glutamicum* konnte gezeigt werden, dass im Medium vorhandenes Ectoin einen guten osmotischen Schutz vermittelt, da es über den BCCT-Transporter EctP (Na^+ Symporter), Ectoin mit hoher Affinität und großer Transportkapazität aufnehmen kann (Peter *et al.* 1996). Auch ProP (H^+ Symporter) aus *C. glutamicum* kann für den Ectoin-Transport benutzt werden (Peter *et al.* 1998). *L. monocytogenes* kann unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen nicht von exogenen Tetrahydropyrimidinen profitieren (Bayles & Wilkinson 2000). Eine schlechte bis gar keine protektive Wirkung von Ectoinen sind auf den schlechten bzw. fehlenden Transport dieser Substanz zurückzuführen und spiegeln in diesen Fällen nicht die generellen protektiven Eigenschaften dieser Substanzen wieder.

Organismen, die Ectoine *de novo* synthetisieren könne, verfügen meist über einen hochaffinen, Ectoin-spezifischen Transporter wie z.B. die Transporter der BCCT-Familie EctT aus *V. pantothenticus* (Kuhlmann 2002) und EctM aus *Marinococcus halophilus* (Vermeulen & Kunte 2004) oder TeaABC aus *H. elongata*, einem TRAP-T System (Grammann *et al.* 2002). Diese speziellen Transporter sind auch für den direkten Rücktransport von Ectoinen verantwortlich, die während des Wachstums unter hyperosmolaren Bedingungen aus der Zelle austreten (Grammann *et al.* 2002).

Für das Gram-negative Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* konnte gezeigt werden, dass Ectoin effizient und osmotisch reguliert transportiert wird und zu einer erhöhten Salztoleranz führt (Talibart *et al.* 1994). Der Transporter EhuABCD aus *S. meliloti* kann Ectoin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle transportieren und es gibt wahrscheinlich noch einen weiteren Ectoin-Transporter in diesem Organismus (Jebbar *et al.* 2005). Dieses System gehört zwar in die Familie der ABC-Transporter, weist aber keine signifikanten Identitäten zu Transportern für kompatible Solute auf (Jebbar *et al.* 2005). Für das pflanzenpathogene Bakterium *Erwinia chrysanthemi* wurde ein osmotisch induzierbarer SSS-Transporter OusA

beschrieben, welcher mit hoher Affinität Ectoin, aber auch Glycin-Betain, Prolin und Pipicolinsäure transportieren kann (Gouesbet *et al.* 1996).

Die weite Verbreitung und die Vielzahl der Transporter für kompatible Solute und deren biosynthetische Vorstufen zeigen die wichtige Rolle dieser Anpassungsstrategie unter osmotischem Stress. Transport kompatibler Solute ist aber auch von großer Bedeutung für die Anpassung an Hitze- und Kältestress (Kuhlmann 2002; Brigulla *et al.* 2003; Holtmann *et al.* 2003; Holtmann & Bremer 2004[c]).

1.5.3 *De novo* Biosynthese kompatibler Solute

Die Biosynthesewege der kompatiblen Solute für das Genus *Bacillus* und nah verwandte Genera sind in einigen Mikroorganismen charakterisiert worden. In dem Gram-positiven, komplett sequenzierten Modellorganismus *B. subtilis* (Kunst *et al.* 1997) wurden die Biosynthese-Mechanismen zur Akkumulation kompatibler Solute Prolin und Glycin-Betain zur Adaptation an osmotischen Stress aufgeklärt (Kempf & Bremer 1998[b]; Brill 2001) (Dolezal pers. Mitteilung). Darüber hinaus wurde die Ectoin-Biosynthese in *Sporosarcina pasteurii* und *V. pantothenticus* analysiert (Kuhlmann 2002; Kuhlmann & Bremer 2002). Weitere Untersuchungen der Ectoin-Synthese wurden mit *H. elongata* (Göller *et al.* 1998), *Chromohalobacter salexigens* (Canovas *et al.* 1998; Canovas *et al.* 1999; Arahal *et al.* 2001), *Vibrio cholerae* (Pflughoeft *et al.* 2003) und *M. halophilus* (Severin *et al.* 1992; Louis & Galinski 1997) durchgeführt.

1.5.3.1 Biosynthese von Prolin

Die Prolinsynthese als osmotischer Anpassungsmechanismus gehört zur zweiten Phase der Reaktionen auf eine hyperosmotische Umwelt. Prolin wird als kompatibles Solut im Zytoplasma angereichert. Damit ist eine langfristige Wiederherstellung des Turgors ohne störend hohe Ionenkonzentrationen in der Zelle gewährleistet.

Die *de novo* Prolin-Synthese zur Ausbildung einer Osmotoleranz ist in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu finden (Killham & Firestone 1984; Kawahara *et al.* 1989; Madkour *et al.* 1990; Guillouet & Engasser 1995). Aber auch in Pflanzen wird diese Aminosäure unter hypersalinen Bedingungen oder Wassermangel als Osmoprotektivum gebildet (Delauney & Verma 1993). Innerhalb der bis heute untersuchten Spezies des Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera stellt die alleinige Prolin-Synthese zu osmoprotektiven Zwecken eine Minderheit dar. Der Großteil, der bisher diesbezüglich untersuchten *Bacilli* und nah verwandter Taxa, gehört zu den Ectoin-Produzenten (Tab. 1) (Galinski & Trüper 1994; Kuhlmann & Bremer 2002; Bursy *et al.* 2005). Einige *Bacilli* nutzen die osmoprotektive Prolin-Produktion in Kombination mit der *de novo* Synthese des Tetrahydropyrimidines Ectoin, wie *V. pantothenticus* oder *Bacillus mojavensis* (Tab. 1, (Kuhlmann & Bremer 2002; Bursy *et al.* 2005).

In *B. subtilis* sind die vielschichtigen Funktionen von Prolin gut untersucht. (I) Prolin ist eine proteinogene Aminosäure und ist damit von entscheidender Bedeutung für den Anabolismus. (II) Unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen wird Prolin als kompatibles

Solut für die Aufrechterhaltung des Turgors und Stabilisierung von Proteinen benutzt (Measures 1975; Wood *et al.* 2001; Holtmann *et al.* 2004[b]). (III) Prolin kann effizient als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden. Die Synthese von Prolin in diesem Organismus wurde von Whatmore und Mitarbeitern untersucht (Whatmore *et al.* 1990). Analysen bei verschiedenen Salzkonzentrationen haben gezeigt, dass die akkumulierte Prolinmenge in einer linearen Beziehung zur externen Osmolarität steht und *B. subtilis* die Prolin-Produktion sehr fein reguliert (Brill & Bremer, unveröffentlicht). Dies erlaubt intrazelluläre Prolinkonzentrationen bis zu 1 M in Minimalmedium mit 1 M NaCl.

Als Substrat für die Synthese von Prolin, sowohl für anabole, wie auch für osmoprotektive Zwecke, wird in zahlreichen Mikroorganismen Glutamat benutzt, aus welchem in drei enzymatischen Schritten Prolin produziert wird (Abb. 4) (Vogel & Davis 1952; Leisinger 1996). *B. subtilis* besitz für die Prolin-Synthese zu osmoprotektiven Zwecken einen eigenen Syntheseweg (ProJ, ProA und ProH), der nahezu unabhängig von der Prolin-Synthese für den anabolen Stoffwechsel (ProB, ProA und ProG, ProI) ist, da dieser einer Substrathemmung unterliegt und somit für die Akkumulation großer Konzentrationen ungeeignet ist (Abb. 4) (Belitsky *et al.* 2001; Brill & Bremer, unveröffentlicht). Die Aktivität des ersten Enzyms dieser Reaktionsfolge (ProB) unterliegt bei diversen Mikroorganismen einer Endprodukthemmung. Schon bei geringen Prolin-Konzentrationen stoppt die Biosynthese und Prolin kann nicht in osmoprotektiv relevanten Mengen akkumuliert werden (Leisinger 1996; Sleator *et al.* 2001).

Das osmotisch regulierte *proHJ*-Operon kodiert für Orthologe zu ProB und ProI, und ist speziell für die Prolin-Synthese unter osmotischem Stress verantwortlich. Das ProA-Enzym wird für beide Synthesewege benutzt. Die Transkription der für die anabole Prolin-Produktion verantwortlichen Strukturgene *proI* und *proBA* werden über einen Antiterminationsmechanismus reguliert der die Transkription dieser Gene dem anabolen Prolinbedarf der Zelle angepasst (Brill 2001). Eine *proHJ*-Mutante hat keinen Prolin-auxotrophen Phänotyp, aber es ist keine Prolin-Akkumulation in osmotisch gestressten Zellen mehr möglich. Diese Mutanten zeigen einen Wachstumsnachteil unter hyperosmolaren Wachstumsbedingungen. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Prolin-Synthese für die Osmostressantwort in *B. subtilis*. Auch für die Produktion von Prolin gilt, falls nutzbare Solute extern vorhanden sind, wird der Transport der Synthese vorgezogen. So inhibiert externes Glycin-Betain die *de novo* Prolin-Produktion. Promotorstudien haben gezeigt, dass für eine osmotische Induktion der *proHJ*-Transkription 126 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes ausreichen. Mutagenesestudien innerhalb des σ^A-abhängigen Promotors führten nicht zu einem Verlust der osmotischen Regulation, obwohl das Maß der Expression beeinflusst werden konnte (Dolezal, pers. Mitteilung). Für diesen osmotisch regulierten Biosyntheseweg ist die Signaltransduktionskaskade unbekannt.

Im Genom von *Bacillus licheniformes* gibt es ein *proA* Ortholog direkt stromabwärts des *proHJ*-Genclusters, das zusammen mit den *proHJ*-Genen als Operon transkribiert wird. In diesem Organismus scheinen der anabole und der osmoprotektive Prolin-Syntheseweg komplett getrennt zu sind (Dolezal, pers. Mitteilung).

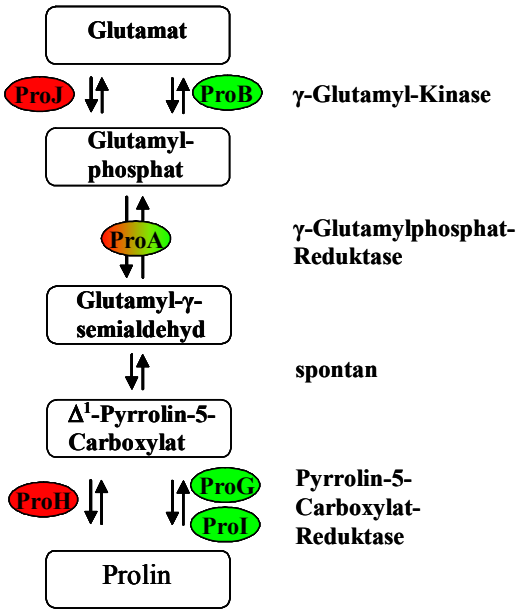


Abbildung 4. Synthesewege für Prolin in *Bacillus subtilis*.

Dargestellt ist auf der linken Seite in rot der Prolin-Biosyntheseweg für die Akkumulation von Prolin unter osmotischem Stress und auf der rechten Seite in grün der Prolin-Biosyntheseweg für den anabolen Stoffwechsel. Das Enzym ProA wird von beiden Synthesewegen genutzt.

1.5.3.2 Biosynthese von Glycin Betain

Die *de novo* Synthese von Glycin-Betain ist in einigen halophilen und halotoleranten phototrophen Cyanobakterien (Reed *et al.* 1986; Sibley & Yopp 1987), extrem halophilen *Archaea* (Lai & Gunsalus 1992; Lai *et al.* 1999) und zahlreichen höheren Pflanzen bei osmotischem Stress verbreitet.

Glycin-Betain ist eines der potentesten und am weitesten verbreiteten kompatiblen Solute in der Natur (Le Rudulier *et al.* 1984). Für die Synthese dieses trimethylierten Aminosäurederivates (Abb. 2) existieren in Mikroorganismen verschiedene Wege. Ein Vertreter der phototrophen Bakterien ist das Gram-negative, halophile, Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* (Galinski & Trüper 1982; Galinski *et al.* 1985; Galinski & Herzog 1990). Unter den heterotrophen Bakterien ist die *de novo* Synthese von Glycin-Betain nicht sehr verbreitet. Der extrem halophile Actinomycet *Actinopolyspora halophila* ist eines der wenigen heterotrophen Bakterien, die dazu in der Lage sind (Nyyssola & Leisola 2001). Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich der hohe energetische Aufwand der Glycin-Betain-Synthese.

Glycin-Betain wird in einer drei-stufigen Methylierungsreaktion der Aminosäure Glycin synthetisiert. S-Adenosyl-Methionin dient dabei als Methyl-Gruppen-Donor (Severin *et al.* 1992; Nyyssola *et al.* 2000; Nyyssola *et al.* 2001). Für die Regeneration einer aktiven Methylgruppe des S-Adenosyl-Methionins werden 12 ATP Äquivalente verbraucht (Atkinson 1977).

B. subtilis kann Glycin-Betain nicht *de novo* synthetisieren. Dieses Bakterium kann aber über eine zweistufige, energetisch günstigere Oxidationsreaktion mit den Enzymen GbsB und GbsA, Cholin zu Glycin-Betain umwandeln (Abb. 6) (Boch *et al.* 1994; Boch *et al.* 1996). Dafür muss Cholin als Vorstufe der Glycin-Betain -Synthese aus exogenen Quellen in die Zelle transportiert werden, was durch die ABC-Transporter OpuB und OpuC geleistet wird (Abb. 6)

(Kappes *et al.* 1999). Cholin liegt im Boden durch den mikrobiellen Abbau von tierischen und pflanzlichen cholinhaltigen Phospholipiden (Phosphatidylcholin) vor. Die Transkription der *gbsAB*-Gene in *B. subtilis* ist nicht osmotisch kontrolliert (Boch *et al.* 1996), sondern wird allein durch die Präsenz von Cholin stimuliert und ist unter der Kontrolle von GbsR einem Cholin-sensitiven Repressor. Dieser reguliert auch das *opuB*-Operon des Cholin-Aufnahmesystemes OpuB (Nau-Wagner 1999). *opuB* ist aber zusätzlich osmotisch induzierbar (Kappes *et al.* 1999).

1.5.3.3 Biosynthese von Glutamat

Die Akkumulation von Glutamat wurde in Zusammenhang mit der Osmostressantwort in verschiedenen Bakterien nachgewiesen (Csonka 1989; da Costa *et al.* 1998).

In Bakterien kann Glutamat über zwei Biosynthesewege synthetisiert werden. Einerseits katalysiert durch die Glutamat-Dehydrogenase (GDH), wobei eine Aminogruppe unter Verbrauch von NADH auf 2-Oxoglutarat übertragen wird, und zum Anderen durch die Glutamat-Synthase (2-Oxoglutarat-Glutamin-Aminotransferase, GOGAT) in Verbindung mit der Glutamin-Synthase (Abb. 5) (Csonka *et al.* 1994). In *E. coli* führt eine plötzliche Erhöhung der Osmolarität innerhalb einer Minute zur Stimulierung der Glutamatakkumulation (Csonka & Epstein 1996). Die Akkumulation von Glutamat wird dabei wahrscheinlich durch die Inhibierung einer anderweitigen Nutzung von Glutamat für die Synthese von Stickstoffverbindungen erreicht, da sich der Gesamtumsatz nicht verändert. So ist die Glutamat-Akkumulation unabhängig von der Glutamatsynthese (Csonka & Epstein 1996).

Die Anreicherung von Glutamat als Gegenion scheint nötig zu sein, um ein physiologisches Membranpotential unter hoher Osmolarität aufrecht zu erhalten (McLaggan *et al.* 1994). Wenn möglich, wird aber auch in diesem Fall der Import aus exogenen Quellen der *de novo* Synthese vorgezogen.

Gram-negative Bakterien wie *E. coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* akkumulieren nach einem hyperosmolaren Schock Glutamat und steigern dabei die Glutamatkonzentration von 30 mmol/l auf durchschnittlich 300 mmol/l (McLaggan *et al.* 1994; Velasco *et al.* 1995; Csonka & Epstein 1996). Neben dieser nur transienten Akkumulation dieser Aminosäure, kommt Glutamat in einigen Bakterien auch bei der Langzeitadaptation an hyperosmotische Wachstumsbedingungen eine Bedeutung zu. So wird Glutamat in verschiedenen *Bacilli* als einziges Solut bei osmotischem Stress *de novo* synthetisiert (Kuhlmann & Bremer 2002) und es konnte gezeigt werden, dass es in *E. coli* fördernd auf das Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen wirkt, wenn es exogen zur Verfügung steht (Gauthier *et al.* 1993). Das obere Limit der akkumulierten Glutamatmenge liegt bei ungefähr 500 mmol/l und wird oft nur transient erreicht, bevor in der zweiten Anpassungsphase ungeladene kompatible Solute benutzt werden um das K^+-Glutamat Ionenpaar zu ersetzen (Dinnbier *et al.* 1988; Welsh *et al.* 1991). Möglicherweise steuern pH-Wert-Änderungen und/oder K^+-Ionen die α-Glutamatanreicherung (Poolman & Glaasker 1998). Das Isomer β-Glutamat, eine relativ wenig verbreitete Aminosäure, wird von marinen methanogenen Spezies der Genera *Methanogenium* und *Methanococcus* (Robertson *et al.* 1990) sowie *Nocardiopsis* (Galinski & Trüper 1994) und *Thermotoga* (Martins *et al.* 1996) in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums intrazellulär angereichert. Aber

auch die unter hochosmolaren Bedingungen akkumulierten β-Glutamat-Konzentrationen sind limitiert und vergleichbar mit denen von α-Glutamat.

Glutamat besitzt bei physiologischem pH-Wert eine negative Nettoladung, die eine direkte Interaktion mit den polaren Bereichen der Proteinoberflächen ermöglicht, im Gegensatz zu den zwitterionischen kompatiblen Soluten, die bevorzugt von dieser ausgeschlossen zu werden. Über einen längeren Zeitraum hinweg kann eine Glutamat-Akkumulation die Bakterien daher lediglich bei geringfügiger Erhöhung der externen Osmolarität schützen (da Costa *et al.* 1998).

In *B. subtilis* oder *E. coli* kann Glutamat aber auch durch die Oxidation von Prolin gebildet werden (Abb. 6). Die dafür nötigen Enzyme sind aber unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen reprimiert, um einer Prolin-Akkumulation als kompatibles Solut nicht entgegenzuwirken (Wood 1987; Ekena & Maloy 1990; Fisher & Sonenshein 1991).

Wahrscheinlich wichtiger als die Funktion des Gegenions zu Kalium, ist Glutamat als direktes oder indirektes Substrat für die Prolin- und Ectoin-Biosynthese (Abb. 4; 9).

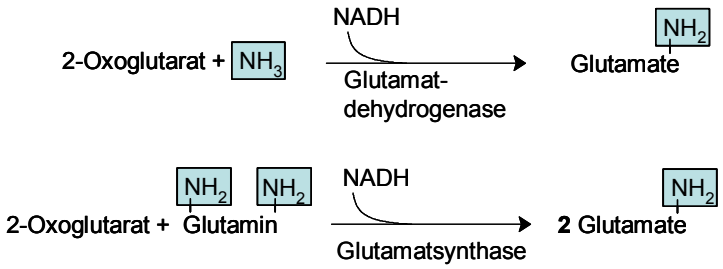


Abbildung 5. Biosynthese von Glutamat (Madigan *et al.* 2000)**.**

Dargestellt sind die vereinfachten Reaktionsgleichungen der Glutamatsynthese. Der Stickstoff im Molekül ist hervorgehoben.

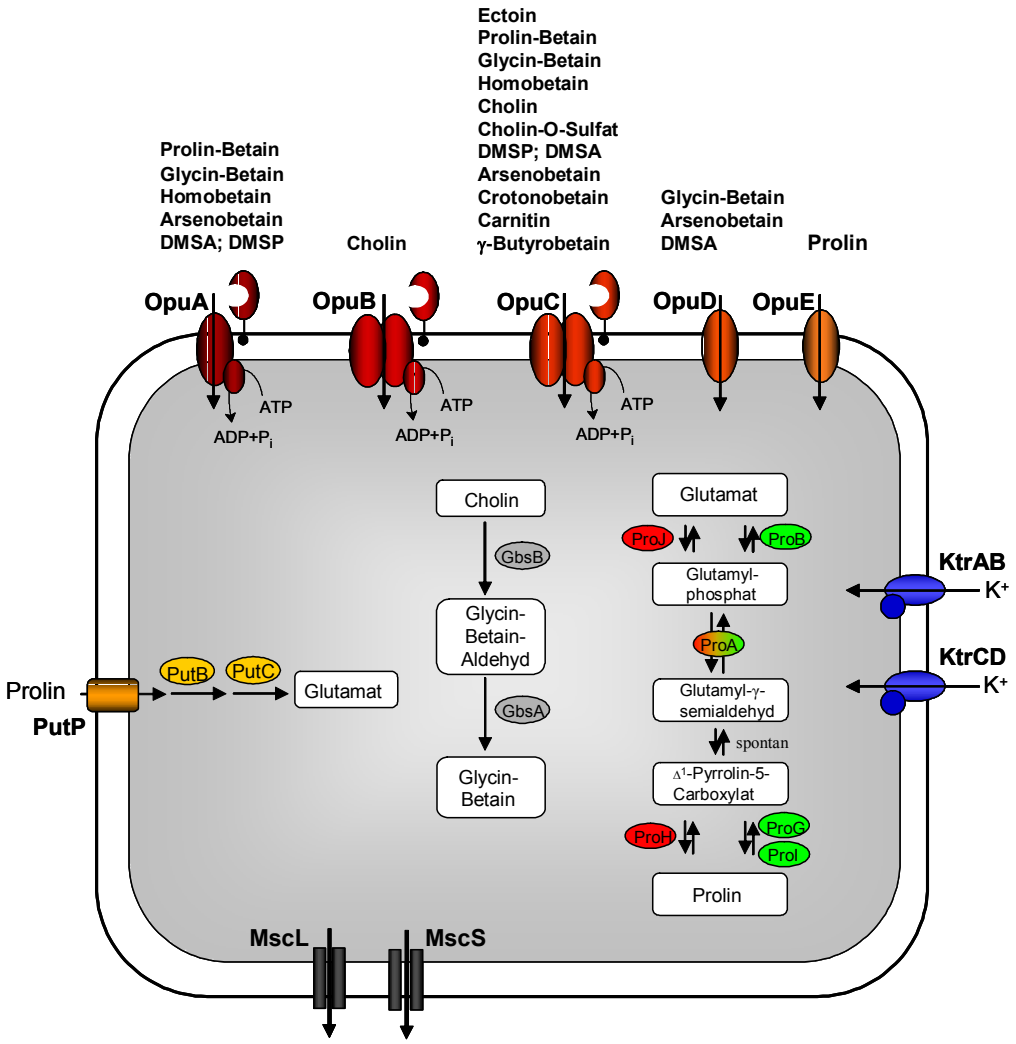


Abbildung 6. Efflux, Aufnahme- und Synthese-Systeme für kompatible Solute in *Bacillus subtilis*.

Schematisch dargestellt sind Transporter (Opu, Ktr) und Biosynthesewege (Gbs, Pro) für kompatible Solute, sowie mechanosensitive Kanäle (Msc) in dem Bodenbakterium *B. subtilis*. Als Gram-positiver Modellorganismen sind die Systeme für die Reaktionen auf osmotische Veränderungen in der Umwelt besonders gut untersucht. Der Prolin-Biosyntheseweg für anabole Zwecke ist grün, der osmoprotektive Zwecke rot dargestellt (Kempf & Bremer 1998[b]; Bremer 2002).

1.6 Ectoin und Hydroxyectoin

Ectoin [(*S*)-2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylsäure] (Abb. 2; 9) wurde erstmals in dem Gram-negativen halophilen phototrophen Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* entdeckt und als kompatibles Solut nachgewiesen (Galinski *et al.* 1985). Kurz darauf konnte in dem Gram-positiven Bodenbakterium *Streptomyces parvulus* zusätzlich zu Ectoin, ein hydroxyliertes Ectoin-Derivat, Hydroxyectoin [(*S,S*)-2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylsäure] (Abb. 2; 9) detektiert werden (Inbar & Lapidot 1988). Anfangs ging man davon aus, dass die Tetrahydropyrimidine als kompatible Solute eher selten sind. Inzwischen konnte aber für viele Bakterien gezeigt werden, dass sie diese Substanzen als eine Reaktion auf hohe Osmolarität endogen synthetisieren können oder zumindest über Transportsysteme intrazellular akkumulieren können und somit als Schutzsubstanzen nutzen (Galinski *et al.* 1985; Inbar & Lapidot 1988; Galinski & Trüper 1994;

Galinski 1995; da Costa *et al.* 1998; Kuhlmann & Bremer 2002). Trotz der weiten Verbreitung der Nutzung von Ectoin und Hydroxyectoin als Schutzsubstanz in vielfältigen Stress-Situationen ist der Biosyntheseweg von Hydroxyectoin sowohl auf genetischer, wie auch auf biochemischer Ebene weitgehend unerforscht.

Die Tetrahydropyrimidine als Aminosäurederivate blieben lange Zeit unentdeckt, da das einzelnen Elektronenpaar der beiden ringständigen Stickstoffatome in eine delokalisierte π-Elektronenwolke eingebunden ist (Abb. 9) und deshalb nicht mit herkömmlichen Nachweismethoden für Aminosäuren, wie Dinitrofluorobenzen oder Ninhydrin, reagieren kann (Galinski 1993). Ectoine können aber mittels ^{13}C-NMR Spektroskopie (**N**uclear **M**agnetic **R**esonance) nachgewiesen und mit einer HPLC-Methode (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) auch quantifiziert werden (Galinski 1993; Kunte *et al.* 1993; Kuhlmann & Bremer 2002).

Ectoine können chemisch als heterozyklische Aminosäuren, als teilweise hydrogenierte Pyrimidinderivate oder auch als N-acetylierte Diaminosäuren angesehen werden (Peters *et al.* 1990; Galinski 1993) und existieren als zwitterionische Moleküle in wässriger Lösung (Inbar *et al.* 1993). *Ab initio* Kalkulationen bestätigten zwei stabile, zwitterionische Ectoin-Strukturen, die mit mehr als vier Wassermolekülen interagieren können (Suenobu *et al.* 1998). Ectoine haben strukturelle Ähnlichkeiten zur Iminosäure Prolin und zum Tetramethylamin Glycin-Betain (Abb. 2). Sie weisen eine Ladungsverteilung wie die Betaine auf und ähneln der Ringstruktur von Prolin (Abb. 2, 32) (Galinski 1993). Es wird angenommen, dass die Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Strukturelementen im Molekül und die sterischen Konformation in Verbindung mit der Ladungsverteilung über das Molekül die Wasser-Osmolyt- und die Osmolyt-Protein-Interaktion entscheidend beeinflussen. Dabei scheinen Methylgruppen und ihre Position innerhalb des Moleküles eine entscheidende Rolle zu spielen (Galinski 1993). Der Unterschied zwischen Ectoin und Hydroxyectoin ist die Hydroxy-Gruppe am C5-Atom des Pyrimidin-Ringes. Sie muss zusätzlichen Einfluss auf die Wechselwirkungen haben, da die protektiven Eigenschaften beider kompatibler Solute zwar überlappen, aber nicht identisch sind (Bursy *et al.* 2005; Kuhlmann *et al.* 2005). Vermutlich kann diese Modifikation besser mit polaren Gruppen von Proteinen interagieren und fehlendes Wasser ersetzen, wodurch die native Konformation stabilisiert wird (Galinski 1993; da Costa *et al.* 1998). Wie Ectoin, wirkt auch Hydroxyectoin als kompatibles Solut *in vivo*, ist ein Osmoprotektivum und besitzt Protein-stabilisierende Eigenschaften *in vitro* (Lippert & Galinski 1992; Borges *et al.* 2002; Manzanera *et al.* 2002). Der Vergleich der protektiven Eigenschaften von Glycin-Betain mit denen von Ectoin unter hypersalinen Wachstumsbedingungen zeigt, dass Ectoin ein ebenso potentes kompatibles Solut wie Glycin-Betain ist (Jebbar *et al.* 1992; Talibart *et al.* 1994).

1.6.1 Verbreitung der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese

Die wachsende Anzahl verfügbarer Genomsequenzen, in denen die Gene der Ectoin-Biosynthese zu finden sind und physiologische Untersuchungen vor allem halotoleranter und halophiler Mikroorganismen haben gezeigt, dass die Fähigkeit Ectoin allein oder in Kombination

mit Hydroxyectoin zu synthetisieren, nicht auf einzelne Spezies beschränkt ist (Tab. 1; 13; Abb. 19).

Besonders im Genus *Bacillus* und nah verwandten Genera ist die Tetrahydropyrimidin-Biosynthese weit verbreitet. Beispiele sind *S. pasteurii* (früher *Bacillus pasteurii*; (Yoon *et al.* 2001)), *V. pantothenticus* (Kuhlmann & Bremer 2002; Kuhlmann *et al.* 2005), *Bacillus haloalcalophilus* und *Halobacillus halophilus* (Galinski & Trüper 1994; Ventosa *et al.* 1998[b]). Spezies der Genera *Brevibacterium* (Frings *et al.* 1993; Jebbar *et al.* 1995; Onraedt *et al.* 2004) und *Streptomyces* (Inbar & Lapidot 1988; Prabhu *et al.* 2004; Bursy *et al.* 2005) sowie das marine Bakterium *M. halophilus* (Severin *et al.* 1992) synthetisieren Ectoin allein oder in Kombination mit Hydroxyectoin. *B. epidermis* und *B. linens* akkumulieren unter hochosmolaren Bedingungen Ectoin, *B. linens* auch Hydroxyectoin (Frings *et al.* 1993; Onraedt *et al.* 2004). Diese halotoleranten Bakterien finden in der Käseherstellung industrielle Anwendung.

Auch in Gram-negativen Bakterien ist die Ectoin-Synthese unter hochosmolaren Bedingungen weit verbreitet und wurde besonders in *H. elongata* (Göller *et al.* 1998) und *C. salexigens* (Canovas *et al.* 1998; Canovas *et al.* 1999; Arahal *et al.* 2001) untersucht. In *Vibrio fischeri, Vibrio alginolyticus*, *Vibrio costicola* und dem humanpathogenen *V. cholerae* konnte die Synthese von Ectoin nachgewiesen werden (Regev *et al.* 1990; Severin *et al.* 1992; Pflughoeft *et al.* 2003).

Methanotrophe Organismen sind in vielen extremen Habitaten zu finden (Trotsenko & Khmelenina 2002; Doronina *et al.* 2003). So synthetisieren die Gram-negativen, aus salzhaltigen und alkalischen Habitaten stammenden, methanotrophen Bakterien, die eine wichtige Funktion bei der Senkung der Methanemission in die Atmosphäre spielen, als Anpassung an ihre spezifischen Lebensräume Ectoin (Khmelenina *et al.* 1999; Reshetnikov *et al.* 2004). Dazu gehören das haloalkaliphile Bakterium *Methylophaga alcalica* (Doronina *et al.* 2003) und das halotolerante *Methylomicrobium alcaliphilum* (Trotsenko & Khmelenina 2002), die Ectoin als Osmoprotektivum synthetisieren können.

Die Biosynthese von Ectoin wurde in mehreren Spezies physiologisch und genetisch untersucht (Louis & Galinski 1997; Canovas *et al.* 1998; Göller *et al.* 1998; Kuhlmann & Bremer 2002; Pflughoeft *et al.* 2003; Onraedt *et al.* 2004; Reshetnikov *et al.* 2004). Die Fähigkeit Ectoin zu synthetisieren ist weit verbreitet in der Domäne der *Bacteria*, doch nur eine Subgruppe innerhalb der Ectoin-Synthetisierer ist in der Lage, auch das hydroxylierte Ectoin-Derivat, 5-Hydroxyectoin zu produzieren (Inbar *et al.* 1993). Hydroxyectoin-Biosynthese wurde zuerst in dem Actinomyceten *S. parvulus* entdeckt (Inbar & Lapidot 1988) und es konnte gezeigt werden, dass dieses Hydroxyderivat von Ectoin auch in anderen Bakterien zu finden ist (Galinski & Trüper 1994; da Costa *et al.* 1998; Kuhlmann & Bremer 2002; Bursy *et al.* 2005; Bursy *et al.* 2005). Zum jetzigen Zeitpunkt konnte keine natürliche Tetrahydropyrimidin-Biosynthese in *Archaea* oder *Eukarya* nachgewiesen werden. Ectoin kann aber z. B. in transgenen pflanzlichen Zellen durch Einbringung der Ectoin-Biosynthesegene synthetisiert werden und wirkt dann osmoprotektiv (Nakayama *et al.* 2000).

Um einen Überblick über die in Prokaryoten verwendete Osmolyte und deren Verbreitung zu erhalten, wurden verschiedene *Bacteria* (Regev *et al.* 1990; Galinski & Trüper 1994; Ventosa

et al. 1998[a;] Kuhlmann & Bremer 2002; Oren 2002; Trotsenko & Khmelenina 2002; Bursy *et al.* 2005) und *Archaea* (Martins *et al.* 1997; Roberts 2000) mittels HPLC und ^{13}C-NMR-Analysen untersucht. Das Genus *Bacillus* und nah verwandte Taxa können anhand ihrer unter hochosmolaren Bedingungen synthetisierten kompatiblen Solute in drei Hauptgruppen eingeteilt werden (Tab. 1),

(I) Spezies, die nur Glutamat synthetisieren,
(II) Spezies, die Glutamat und Prolin synthetisieren, und
(III) Spezies, die Glutamat und Ectoin synthetisieren können,

wobei die Gruppe der Ectoin-Synthetisierer in drei weitere Subklassen unterteilt werden kann,

(I) Spezies, die nur Ectoin allein produzieren,
(II) Spezies, die Ectoin und Hydroxyectoin produzieren können, und
(III) Spezies, die Ectoin und Prolin produzieren können.

Ein phylogenetischer Stammbaum auf Grundlage der 16S rRNA Gene der in Tabelle 1 untersuchten Spezies (Dr. D. R. Arahal, Universität Valencia, Spanien), zeigt, dass sich keine eindeutigen Cluster anhand des Spektrums der synthetisierten kompatiblen Solute ableiten lassen (Abb. 1). Dies legt den Schluss nahe, dass die genetische Grundlage für die Synthese kompatibler Solute auch über horizontalen Gentransfer verbreitet worden ist. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass die Gene der bis heute untersuchten Biosynthesewege kompatibler Solute als Operon organisiert sind. Die Enzyme der Ectoin-Biosynthese z.B. weisen relativ hohe Aminosäureidentitäten untereinander auf (Kuhlmann & Bremer 2002), so dass eine evolutionär getrennte Entwicklung wenig wahrscheinlich ist.

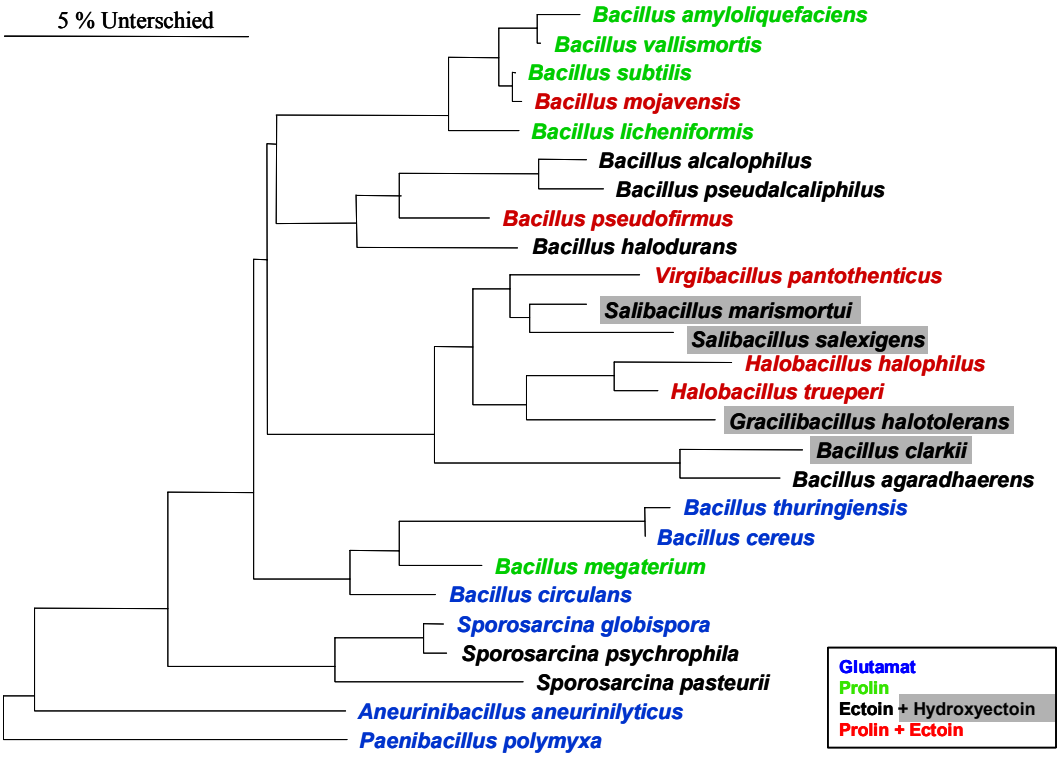


Abbildung 7. Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen.

Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen der *Bacilli* Spezies und Spezies verwandter Genera, die auf ihre *de novo* Osmolytsynthese untersucht wurden. Die jeweils synthetisierten kompatiblen Solute sind farblich gekennzeichnet. Die Outgroup (nicht gezeigt) bestand aus einer Sammlung von mehr als 100 vollständigen 16S RNA Gensequenzen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Die phylogenetische Analyse und der Stammbaum wurden von Dr. D. R. Arahal (Universität Valencia, Spanien) erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. ^{13}C-NMR Bestimmung der *de novo* synthetisierten organischen Osmolyte im Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera.
Die Hydroxyectoin synthetisierende Subgruppe ist grau unterlegt (Kuhlmann & Bremer 2002; Bursy *et al.* 2005).

Stamm	DSM Nummer	Medium ([NaCl])	Glutamat	Prolin	Ectoin	Hydroxy-Ectoin
Aneurinibacillus aneurinilyticus	DSM 5562^T	SMM (0.5 M)	+	-	-	
Bacillus cereus	DSM 31^T	SMM (0.5 M)	+	-	-	
Bacillus circulans	DSM 11^T	SMM (0.5 M)	+	-	-	
Bacillus thuringiensis	DSM 2046^T	SMM (0.5 M)	+	-	-	
Sporosarcina globispora	DSM 4^T	SMM (0.2 M)	+	-	-	
Paenibacillus polymyxa	DSM 36^T	SMM (0.5 M)	+	-	-	
Bacillus amyloliquefaciens	FZB 42	SMM (1.0 M)	+	+	-	
Bacillus licheniformis	DSM 13^T	SMM (1.0 M)	+	+	-	
Bacillus megaterium	DSM 32^T	SMM (1.0 M)	+	+	-	
Bacillus subtilis	JH642	SMM (1.0 M)	+	+	-	
Bacillus vallismortis	DSM 11031^T	SMM (1.8 M)	+	+	-	
Bacillus agaradhaerens	DSM 8721^T	SMM (1.3 M)	+	-	+	
Bacillus alcalophilus	DSM 485^T	SMM (1.0 M)	+	-	+	
Bacillus halodurans	DSM 497^T	SMM (1.6 M)	+	-	+	
Bacillus pseudalcaliphilus	DSM 8725^T	SMM (1.0 M)	+	-	+	
Sporosarcina psychrophila	DSM 3^T	SMM (1.0 M)	+	-	+	
Sporosarcina pasteurii	DSM 33^T	SMM (1.0 M)	+	-	+	
Bacillus clarkii	DSM 8720^T	SMM (1.8 M)	+	-	+	+
Gracilibacillus halotolerans	DSM 11805^T	SMM (2.0 M)	+	-	+	+
Salibacillus marismortui	DSM 12325^T	SMM (1.8 M)	+	-	+	+
Salibacillus salexigens	DSM 11483^T	MM (3.4 M)	+	-	+	+
Bacillus mojavensis	DSM 9205^T	SMM (1.5 M)	+	+	+	
Bacillus pseudofirmus	DSM 8715^T	SMM (1.6 M)	+	+	+	
Halobacillus halophilus	DSM 2266^T	802a (2.0 M)	+	+	+	
Halobacillus trueperi	DSM 10404^T	802a (2.5 M)	+	+	+	
Virgibacillus pantothenticus	DSM 26^T	SMM (1.0 M)	+	+	+	

1.6.2 Genetische Organisation und Biochemie der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese

Eine molekulare Analyse der Ectoin-Biosynthesegene in Gram-positiven und Gram-negativen Mikroorganismen hat gezeigt, dass die Ectoin-Biosyntheseenzyme von einem konservierten *ectABC*-Gencluster kodiert werden (Louis & Galinski 1997; Canovas *et al.* 1998; Göller *et al.* 1998; Kuhlmann & Bremer 2002; Pflughoeft *et al.* 2003; Reshetnikov *et al.* 2004). Da die *ectABC*-Gene nach Organisation und Größe, sowie die EctABC Enzyme nach ihrer Aminosäuresequenz eng miteinander verwandt sind, ist die Ectoin-Biosynthese offensichtlich ein evolutionär konservierter Syntheseweg (Abb. 9) (Louis & Galinski 1997; Canovas *et al.* 1998; Göller *et al.* 1998; Kuhlmann & Bremer 2002). In Gram-positiven, wie in Gram-negativen *Bacteria* werden die gleichen Substrate, sowie nahezu identische Enzyme für die Ectoin-Produktion benutzt (Peters *et al.* 1990; Ono *et al.* 1999)

Eine Zerstörung dieser Gene in *H. elongata*, *C. salexigens* oder *V. cholerae* führt zum Verlust der Ectoin-Biosynthesekapazität (Canovas *et al.* 1997; Göller *et al.* 1998; Pflughoeft *et*

al. 2003). Diese *ect*-Mutanten zeigen einen salzsensitiven Phänotyp, was die große Bedeutung der Ectoin-Biosynthese in der mikrobiellen Osmoadaptation belegt.

Der Biosyntheseweg für Ectoin wurde in *S. parvulus* (Inbar & Lapidot 1988) und in *H. elongata* erstmals beschrieben (Peters *et al.* 1990). Es handelt sich dabei um eine drei-stufige enzymatische Reaktion, in welcher L-Aspartat-β-Semialdehyd, ein Zwischenprodukt des Aminosäuremetabolismus, zu Ectoin umgewandelt wird (Peters *et al.* 1990; Louis & Galinski 1997; Ono *et al.* 1999).

Oxalacetat aus dem Citratzyklus wird von einer Aspartat-Aminotransferase unter Verwendung von Glutamat als Stickstoffquelle zu L-Aspartat, welches von einer Aspartokinase und einer Aspartat-β-Semialdehyd-Dehydrogenase zu L-Aspartat-β-Semialdehyd umgewandelt wird. Die Verfügbarkeit dieses Intermediates ist nicht nur für die Ectoin-Biosynthese von Bedeutung, es wird auch für die Synthese der Aminosäuren Methionin, Threonin, Lysin und Isoleucin benötigt. Die erste Reaktion der eigentlichen Ectoin-Synthese wird von der L-2,4-Diaminobutyrat-Transaminase (EctB) katalysiert. Dabei wird eine Aminogruppe von Glutamat auf L-Aspartat-ß-Semialdehyd übertragen und es entsteht L-2,4-Diaminobutyrat. Eine Ausnahme stellt das halotolerante *Methylomicrobium alcaliphilum* dar, welches Aspartat anstatt Glutamat für die Aminierung von Aspartat-Semialdehyd benutzt (Trotsenko & Khmelenina 2002). EctB gehört zur Subgruppe II der Aminotransferasen (Mehta *et al.* 1993). In einem zweiten Reaktionsschritt wird von der L-2,4-Diaminobutyrat-N_γ-Acetyltransferase eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf L-2,4-Diaminobutyrat übertragen. Als Zwischenprodukt entsteht N_γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat. Dieses wir in einem dritten Reaktionsschritt unter Wasserabspaltung zu einem Sechserring dem zyklischen Ectoin geschlossen. Diese Reaktion wird von einer N_γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat-Dehydratase (Ectoin-Synthase, EctC) katalysiert. Dieses Enzym ist markant für den Ectoin-Biosyntheseweg und seine Aminosäuresequenz kann sehr spezifisch für die Suche nach weiteren Ectoin-Biosynthese-Genclustern in Datenbanken genutzt werden.

Die Effizienz der Ectoin-Biosynthese wurde in *H. elongata* mit Wachstum auf Glucose bei 25 °C bestimmt (Maskow & Babel 2001). Die Synthese von Ectoin ist für Bakterien wahrscheinlich ein energetisch effizienter Prozess, da die theoretisch aufzuwendende Energie zur Bildung von Ectoin aus L-Aspartat-β-Semialdehyd relativ gering ist. Die Wachstumsrate und der –ertrag sind unabhängig von der Rate der Ectoin-Synthese. Mit L-Aspartat-β-Semialdehyd als Ausgangsmolekül der Ectoin-Biosynthese (Abb. 9) und Acetyl-CoA, als Co-Substrat in der Ectoin-Synthese, konnten der theoretische Energieaufwand für de Ectoin-Synthese berechnet werden. Grundlage für diese Kalkulationen sind: (I) Glukose wird über den Embden-Meyerhof- (EM) oder den Entner-Doudoroff- (ED) Weg vom Bakterium assimiliert und das Intermediat Oxalacetat durch heterotrophe CO_2-Fixierung (A) oder den Glyoxylat-Zyklus (B) synthetisiert (Abb. 8) (Maskow & Babel 2001).

A EM: $C_6H_{12}O_6 + 2\ NH_3 \longrightarrow C_6H_{10}O_2N_2$

ED: $C_6H_{12}O_6 + 2\ NH_3 + 1\ ATP \longrightarrow C_6H_{10}O_2N_2$

B EM: $3\ C_6H_{12}O_6 + 2\ NH_3 \longrightarrow 2\ C_6H_{10}O_2N_2 + 2\ CO_2 + 4\ ATP + 10\ NAD(P)H + 2\ FADH_2$

ED: $3\ C_6H_{12}O_6 + 2\ NH_3 \longrightarrow 2\ C_6H_{10}O_2N_2 + 2\ CO_2 + ATP + 10\ NAD(P)H + 2\ FADH2$

Abbildung 8. Schematische Zusammenfassung des theoretischen Biosyntheseweges von Glukose ($C_6H_{12}O_6$) zu Ectoin ($C_6H_{10}O_2N_2$) über Aspartat bzw. Aspartat-β-Semialdehyd als Vorläufermoleküle der Ectoin-Biosynthese.

(EM) Glukose wird über den Embden.Meyerhof-Weg oder (ED) den Entner-Doudoroff-Weg assimiliert. Oxalacetat als Vorstufe von Aspartat kann über (**A**) heterotrophe CO_2-Fixierung oder (**B**) den Glyoxylat-Zyklus synthetisiert werden (Maskow & Babel 2001).

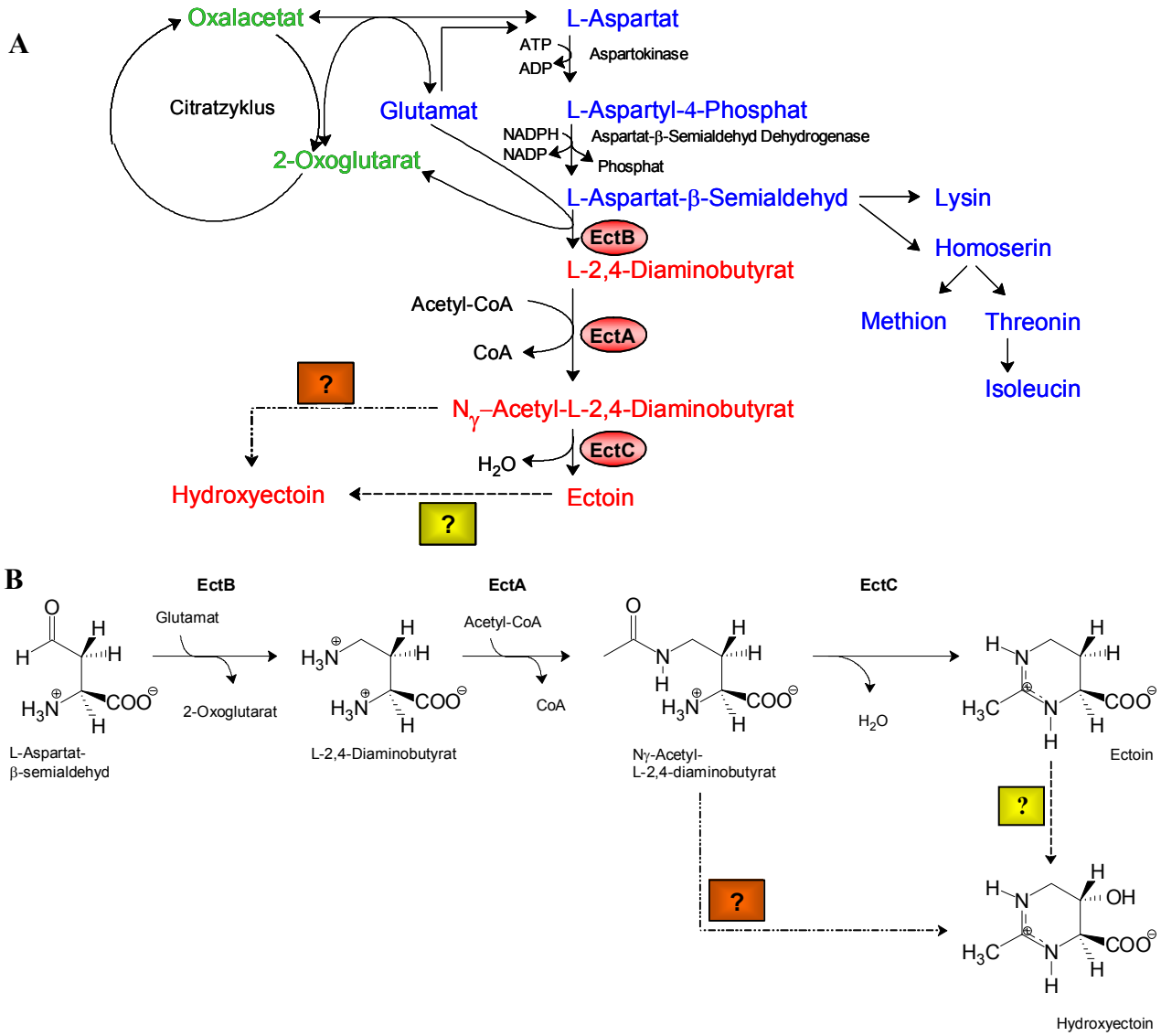


Abbildung 9. Ectoin-Biosynthese in aeroben chemoheteroptrophen Bakterien.

Biosynthese der Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin im Zusammenhang mit Citratzyklus und Aminosäuresynthese. (**A**) Zwischenprodukte des Citratzyklus, Intermediate des Aminosäurestoffwechsels und die Produkte der Tetrahydropyrimidin-Synthese sind farblich gekennzeichnet. (**B**) Ectoin- und potentielle Hydroxyectoin-Biosynthesewege: EctA: L-2,4-Diaminobutyrat-N_γ-Acetyltransferase, EctB: L-2,4-Diaminobutyrat Transaminase, EctC: Ectoin-Synthase. Nicht charakterisierte Reaktionen zum Hydroxyectoin sind als (**?**) dargestellt (modifiziert nach Louis & Galinski 1997; Ono *et al.* 1999; Madigan *et al.* 2000; Kuhlmann 2002).

Eine Subgruppe innerhalb der Ectoin-synthetisierenden Bakterien ist in der Lage, auch das hydroxylierte Ectoin-Derivat, 5-Hydroxyectoin zu produzieren (Inbar *et al.* 1993; Galinski & Trüper 1994; Kuhlmann & Bremer 2002; Bursy *et al.* 2005; Bursy *et al.* 2005). Da z. B. eine *ectA* Mutante in *H. elongata* weder Ectoin noch Hydroxyectoin synthetisieren kann (Galinski & Trüper 1994)), ist die Fähigkeit eines Mikroorganismus Hydroxyectoin zu synthetisieren offenbar mit der Fähigkeit der Ectoin-Biosynthese verknüpft. Der direkte Weg für die Biosynthese von Hydroxyectoin würde eine Hydroxylierung von Ectoin mittels einer substratspezifischen Hydroxylase darstellen (Abb. 9). Es könnte aber auch noch einen weiteren Biosyntheseweg geben. In *C. salexigens* kann Hydroxyectoin möglicherweise noch über eine alternative Route, von einem der Intermediate der Ectoin-Biosynthese ausgehend, synthetisiert werden. Eine *ectC*-Mutante kann immer noch Hydroxyectoin produzieren (Canovas *et al.* 1997; Canovas *et al.* 1999).

Während die EctABC-vermittelte Ectoin-Produktion im Detail untersucht wurde (Louis & Galinski 1997; Canovas *et al.* 1998; Ono *et al.* 1999; Kuhlmann & Bremer 2002; Pflughoeft *et al.* 2003), sind die molekularen und biochemischen Details der Biosynthese von Hydroxyectoin weitgehend unerforscht (Canovas *et al.* 1997; Prabhu *et al.* 2004).

1.6.3 Biosynthese von Ectoin und Hydroxyectoin

In allen Ectoin-produzierenden Bakterien die derzeit untersucht wurden, ist die Ectoin-Biosynthese stark verstärkt unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen. Ectoin-Biosynthese wird hauptsächlich in Zellen gefunden, die einer osmotischen Veränderung durch hohe Salinität oder hohe Osmolarität ausgesetzt wurden (Galinski & Trüper 1994; da Costa *et al.* 1998; Bremer & Krämer 2000; Kuhlmann & Bremer 2002). Konsistent mit der physiologischen Rolle von Ectoin für die Anpassung an eine veränderte Osmolarität in der Umgebung, ist die Transkription der *ectABC*-Gene in *S. pasteurii* (Kuhlmann & Bremer 2002) *C. salexigens* (Canovas *et al.* 1998), *H. elongata* (Göller *et al.* 1998) and *V. pantothenticus* (Kuhlmann *et al.* 2005) unter osmotischer Kontrolle. Die Ectoin-Akkumulation ist im Wesentlichen auf die transkriptionelle Aktivierung der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* zurückzuführen. In Mikroorganismen, die ausschließlich Ectoin allein oder in Kombination mit Hydroxyectoin produzieren, existiert offenbar eine lineare Korrelation zwischen der externen Osmolarität und dem intrazellulären Ectoin-Gehalt. Dies zeigt, dass die Bakterien den Ectoin-Pool sehr fein reguliert an den jeweiligen osmotischen Stress anpassen. Für *V. pantothenticus* konnte auch eine Aktivierung der Ectoin-Biosynthese bei Wachstum in der Kälte auf transkriptioneller Ebene gezeigt werden (Kuhlmann 2002).

Für die aus *H. elongata* gereinigten Ectoin-Biosynthese-Enzyme EctABC konnte *in vitro* eine Stabilisierung durch NaCl und KCl gezeigt werden (Ono *et al.* 1999), was eine posttranslationelle Aktivierung *in vivo* unter hypersalinen Wachstumsbedingungen nahe legt (Ono *et al.* 1999).

Durch diese detaillierten physiologischen, molekularen und biochemischen Studien ist der Ectoin-Biosyntheseweg gut verstanden.

1.6.4 Ectoin und Hydroxyectoin in der Industrie

Die vielfältigen protektiven und stabilisierenden Eigenschaften spezieller kompatibler Solute gegen die negativen Einflüssen von z. B. Hitze, Kälte, Gefriertrocknung, Austrocknung, UV-Strahlung, Radikalen, Toxinen, hoher Salzkonzentration und hoher Ionenstärke werden in einer wachsenden Palette von Anwendungen genutzt. Einige Beispiele sind die Kosmetikindustrie, mit der Nutzung von Ectoin in medizinischen Hautpflegeprodukten (Bartens 2001; Buenger & Driller 2004) (Brigitte 12/2001; Woman 2005); in der Pharmazie als Stabilisator für Enzyme und Antikörper; bei der Wirkstoffapplikation; in der Biotechnologie, Zell- und Mikrobiologie bei der Reinigung und Stabilisierung von nativen und rekombinanten Proteinen und Antikörpern, der Konservierung von Zellen und Geweben, und bei der PCR-Optimierung (Andersson *et al.* 2000; Barth *et al.* 2000; Borges *et al.* 2002; Hai *et al.* 2002; Arora *et al.* 2004; Manzanera *et al.* 2004; Manzanera *et al.* 2004; Schnoor *et al.* 2004).

Ectoine werden allein im kosmetischen Sektor von mehr als 19 internationalen Firmen in ihren Produkten verwendet (Merck KGaA, Marbert, Sebapharma GmbH & Co. KG, Kanebo Ltd., Klapp-Cosmetics, Dado Sens, Shiseido, …, Angaben nach bitop, www.bitop.de).

Ein „fed-batch"-Verfahren, auch als „Bakterienmelken" bezeichnet wurde für die industrielle Gewinnung von Ectoin aus *H. elongata* entwickelt (Sauer & Galinski 1998). Diese Verfahren macht sich die gute Adaptionsfähigkeit dieser Spezies an wechselnde Salzkonzentrationen zu nutze. Nach einer Kultivierungsphase unter hypersalinen Bedingungen und der damit verbundenen intrazellulären Akkumulation von Ectoin, wird das Medium gegen Medium mit wesentlich niedrigerer Osmolarität ausgetauscht. Als Reaktion auf diesen hypoosmotischen Schock gibt das Bakterium das angehäufte Ectoin ins Medium ab, aus dem es dann chromatographisch aufgereinigt und kristallisiert werden kann (Sauer & Galinski 1998). Da ein Großteil der Zellen diesen Prozess überlebt, kann direkt ein weiterer Produktionszyklus nach dem Umsetzen in das hypersaline Medium beginnen. Die Ausschleusung des Ectoines erfolgt wahrscheinlich über mechanosensitive Kanäle in der Zytoplasmamembran.

Die Biotechnologiefirma bitop AG (Witten, Deutschland) produziert Ectoin in industriellem Maßstab. Ectoin wird aus *H. elongata* gewonnen und Hydroxyectoin aus *Marinococcus* M52, der Ectoin in der stationären Wachstumsphase zu Hydroxyectoin umsetzt (Frings *et al.* 1995). Das „Melk-Verfahren" nach Sauer & Galinski (Sauer & Galinski 1998) ist für die Hydroxyectoin-Gewinnung aus *Marinococcus* M52 nicht geeignet, da dieses kompatible Solut nach einem hypoosmotischen Schock nicht ausgeschleust wird. Deshalb wird Hydroxyectoin über ein methanolisches Extraktionsverfahren aus den Zellen gereinigt (Frings *et al.* 1995). Die chemische Synthese von Hydroxyectoin wäre sehr aufwendig, da es zwei chirale Kohlenstoffatome besitzt.

Die Ectoin-Biosynthese ist nach heutigem Wissensstand natürlicherweise auf *Bacteria* beschränkt. Es ist jedoch gelungen, die *ectABC*-Gene aus *H. elongata* in transgenen Tabakpflanzen, *Nicotiana tabacum* L., unter der Kontrolle eines viralen Promotors zur Expression zu bringen. Das akkumulierte Ectoin verleiht den Pflanzen eine erhöhte osmotische Toleranz und ermöglicht Wachstum unter hochosmolaren Bedingung (Nakayama *et al.* 2000).

Dies könnte möglicherweise eine landwirtschaftliche Nutzung salzhaltiger Böden möglich machen bzw. die Erträge steigern.

2 Efflux osmotisch aktiver Substanzen nach einem hypoosmotischen Schock: Schutz vor extremem Turgor

Die Strategien und Reaktionen der Anpassung an hyperosmotische Wachstumsbedingungen wurden an ausgewählten Beispielen dargestellt. Ein ebenso großes Problem stellt jedoch eine hypoosmotische Umwelt für die mikrobielle Zelle dar, besonders dann, wenn es zu einem rapiden Abfall der externen Osmolarität, einem hypoosmotischen Schock kommt. Dies ist z.B. für Bodenmikroorganismen der Fall, wenn es durch Niederschläge, Überflutung oder Auswaschung in Süßwasser zu einer drastischen Reduktion der osmotischen Verhältnisse kommt (Miller & Wood 1996).

Die Anpassung von Mikroorganismen an hyperosmolare Bedingungen ist die Akkumulation zum Teil großer Mengen osmotisch aktiver Substanzen im Zytoplasma. Ein hypoosmotischer Schock resultiert in einem massiven Wassereinstrom entlang des osmotischen Gradienten in die Zelle, was eine Zunahme des Volumens und damit eine Erhöhung des Turgors zur Folge hat (Abb. 1). Ein Beispiel für die Auswirkung eines hypoosmotischen Schocks ist für *E. coli* berechnet worden. Eine Erniedrigung des externen Salzgehaltes um 0,3 M resultiert in einer Erhöhung des Turgors von 0,4 MPa auf etwa 1,1 MPa (Booth & Louis 1999).

Bis zu einem gewissen Grad kann ein erhöhter Turgor durch die Flexibilität des Mureinsacculus kompensiert werden (Höltje 1998; Wood 1999). Wird dieser Wert überschritten, platzt die Zelle. Um dies zu vermeiden, muss die Zelle die osmotisch aktiven Substanzen und Ionen aus der Zelle eliminieren. Als eine Art „Überdruckventil“ fungieren die so genannten mechanosensitiven Kanäle in der Zytoplasmamembran. Ab einem bestimmten kritischen Wert reagieren diese Proteinkomplexe in sehr kurzer Zeit (Millisekunden) auf Spannungen innerhalb der Membran und öffnen eine mehr oder weniger selektive Pore, um eine schnelle Druckreduktion durch den Ausstrom von Zytoplasma herbeizuführen (Moe *et al.* 1998; Blount & Moe 1999; Blount *et al.* 1999; Booth & Louis 1999; Martinac 2001; Folgering *et al.* 2005). Solche mechanosensitiven Kanäle wurden in *Archaea* uns *Bacteria* gefunden und die physiologische Funktion von zwei Typen solcher Kanäle (MscL und MscS; MscS/L: **m**echano **s**ensitive **c**hannel of **l**arge/**s**mall conductance) aus *E. coli* wurden charakterisiert. Die gleichzeitige Zerstörung der beiden Kanäle führt zum Zelltod nach einem hypoosmotischen Schock (Levina *et al.* 1999). *Lactococcus lactis* verfügt ebenfalls über beide Msc-Typen, obwohl MscL für diesen Organismus die Hauptrolle spielt. Eine MscL-Mutante hat einen entscheidenden Wachstumsnachteil nach einem hypotonen Schock (Folgering *et al.* 2005). Auch für *B. subtilis* konnte die Existenz von MscL- und MscS-Homologen (YdhY, YkuT, YfkC) gezeigt werden (Moe *et al.* 1998; Levina *et al.* 1999). Eine gleichzeitige Genunterbrechung von *mscL* und *ykuT* (*mscS*) führte zu einem *B. subtilis* Stamm, der deutlich schlechter eine plötzliche Senkung der Osmolarität kompensieren konnte als der Wildtyp (Hoffmann *et al.* in Vorbereitung).

3 Perzeption osmotischer Veränderungen und regulatorische Mechanismen

Zahlreiche biosynthetische Enzyme und Transportsysteme, die für die zytoplasmatische Akkumulation kompatibler Solute in Mikroorganismen verantwortlich sind, konnten in den vergangenen Jahren identifiziert und charakterisiert werden. Dem wachsenden Verständnis über die zellulären Anpassungsmechanismen auf Veränderungen in der externen Osmolarität steht immer noch die Frage gegenüber: „Was ist der eigentlich wahrgenommene Reiz?“ und: „Wie erfolgen Perzeption und Weiterleitung des Signales bis hin zur Regulation von Transkription, Stabilität der mRNA etc.?“.

Für einen positiven Turgor ist nicht die absolute Konzentration an osmotisch aktiven Substanzen entscheidend, sondern das Konzentrationsgefälle über die Zellmembran. Eine Änderung der externen Osmolarität kann mehrere direkte oder indirekte Effekte auf die Zelle haben. Zu diesen physikalischen und/oder chemischen Veränderungen gehören Änderungen in der Wasseraktivität, der Ionenstärke oder der intrazellulären Solutkonzentration (direct osmosensing), aber auch Veränderungen in der Struktur von Zellbestandteilen wie Proteinen, der DNA oder der Zytoplasmamembran (indirect osmosensing) (Poolman & Glaasker 1998; Wood 1999; Wood *et al.* 2001). Diese „Signale“ können zu einer direkten Aktivierung von Transportern oder Enzymen beitragen und/oder die Transkription von deren Strukturgenen aktivieren oder modulieren.

Dass die Struktur der Zellmembran Proteine beeinflussen kann, ist z. B. für die mechanosensitiven Kanäle gezeigt worden (Sukharev *et al.* 1997; Blount & Moe 1999). So liegt die Vermutung nahe, dass auch andere „Osmosensoren“ sich die Strukturveränderungen der Membran wie lateraler Druck, Schichtdicke, Struktur oder Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht, als Folge des Turgors zu nutze machen.

Reinigung und Rekonstitution in Proteoliposomen zeigen, dass die Transporter ProP aus *E. coli* (Racher *et al.* 1999), BetP aus *C. glutamicum* (Rübenhagen *et al.* 2000) und OpuA aus *L. lactis* (van der Heide & Poolman 2000) osmotische Veränderungen wahrnehmen und darauf reagieren können. Für BetP aus *C. glutamicum* (Peter *et al.* 1996; Rübenhagen *et al.* 2000; Poolman *et al.* 2002) und OpuA aus *L. lactis* (van der Heide & Poolman 2000) konnte eine Sensitivität gegenüber der Lipidkomposition in der Membran nachgewiesen werden.

In BetP aus *C. glutamicum* ist die osmotische Stimulierbarkeit abhängig von den C- und N-Termini, die an der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind (Peter *et al.* 1998; Rübenhagen *et al.* 2000). Eine Aktivierung von ProP aus *E. coli* ist abhängig von einer carboxyterminalen Extension, die zytoplasmatisch lokalisiert ist und die Bildung eines Homodimeres möglich macht (Culham *et al.* 2000). Die Aktivität von ProP hängt *in vivo* von einem weiteren Protein, ProQ, ab. Da eine Aktivierung von ProP aber auch in Abwesenheit dieses Proteins in Proteoliposomen stattfindet, wird ProQ eine Aufgabe bei der Fein-Regulation der Aktivität zugeschrieben (Wood 1999). Die Signale, die zur Stimulation der Aktivität von ProP beitragen, konnten bis heute nicht eindeutig identifiziert werden, es gibt aber Hinweise darauf, dass intrazelluläres Kalium als Signal in Betracht kommt (Wood 1999).

Auch Zweikomponenten-Systeme sind an der Osmoregulation beteiligt. Ein Beispiel hierfür ist KdpDE. Dieses System induziert die Expression des *kdpFABC* Operons aus *E. coli* bei einer Reduktion des Turgors nach einem hyperosmotischen Schock. KdpFABC ist ein Transportsystem für die Aufnahme von Kaliumionen (Altendorf & Epstein 1994; Altendorf *et al.* 1998). Die Sensorkinase KdpD ist ein membranständigens Protein mit Autokinase-, Phosphotransferase- und Phospho-KdpE-spezifische Phosphataseaktivität. Der Response-Regulator KdpE ist ein lösliches intrazelluläres Protein. KdpD autophosphoryliert sich an einem Histidinrest und transferiert die Phosphatgruppe anschließend auf KdpE. Das phosphorylierte KdpE-Protein induziert dann die Transkription des *kdpFABC* Operons. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Reduktion des Zellturgors, die Phospho-KdpE-spezifische Phosphataseaktivität des KdpD-Proteins direkt inhibiert, was zu einer Akkumulation des phosphorylierten KdpE und damit zu einer *kdpFABC*-Expression führt (Brandon *et al.* 2000; Heermann *et al.* 2000).

Ein plötzlicher Anstieg der externen Osmolarität oder erhöhte intrazelluläre Kalium-Konzentrationen führen zu einer verstärkten Transkription des *proU*-Operons in *E. coli*. Dabei haben DNA-Bindeproteine wie zum Beispiel H-NS, TopA, GyrAB, IHF und HU pleiotrope Effekte auf die Genexpression und die DNA-Topologie. Diese wird zudem von der intrazellulären Akkumulation von Kalium-Glutamat und Veränderungen im DNA-Supercoiling unter hochosmolaren Bedingungen beeinflusst (Lucht *et al.* 1994; Gowrishankar & Manna 1996). Im Einzelnen ist der molekulare Mechanismus, der die osmotisch regulierte *proU*-Expression kontrolliert, jedoch nicht verstanden. Es konnte aber eine Aktivierung einer RNA-Polymerase durch Kalium-Glutamat nach einem osmotischen Schock in *E. coli* nachgewiesen werden. Diese Aktivierung führt zur osmotisch induzierten Transkription RpoS-abhängiger Gene nach einer Kalium-Glutamat-Akkumulation (Lee & Gralla 2004).

Die Topologie der DNA, besonders in den Promotor-Regionen, und die Stabilität der RNA durch Sekundärstrukturen, sind direkt oder indirekt Ansatzpunkte für eine Regulation von Transkription und Translation, da sie sich je nach Salzgehalt und Ionenstärke verändert (Wood 1999). Ein Beispiel für die komplexe Regulation osmotischer Anpassungsmechanismen ist die Existenz mehrer Promotoren, die von unterschiedlichen Sigma-Faktoren abhängig sind, und so je nach Stresssituation die Transkription des Zielgenes kontrollieren.

Für die Nutzung kompatibler Solute bei nicht-optimalen Wachstumstemperaturen konnte eine Induktion der Transkription und die Beteiligung des generellen Stress-Regulons σ^B in *B. subtilis* festgestellt werden (Brigulla *et al.* 2003; Holtmann & Bremer 2004[c]). 1 mM Glycin-Betain im Medium verbessert nicht nur das Wachstum unter Kältestress, sondern verhilft auch einer unter diesen Bedingungen nicht wachstumsfähigen SigB Mutante wieder zu Wachstum (Brigulla *et al.* 2003). Dies zeigt, dass die Induktion des generellen Stress-Regulons und die Akkumulation eines kompatiblen Solutes voneinander unabhängige Wege darstellen, um unter Kältestress wachsen zu können. Die temperatursensitiven Strukturen sind dabei aber identisch mit denen, die auch von osmotischen Änderungen betroffen sind: Fluidität der Zellmembran, Konformation von Proteinen und Struktur von Nukleinsäuren.

Die Aktivierung von Transportsystemen und Biosynthesewegen kompatibler Solute durch osmotischen Stress erfolgt meist auf transkriptioneller Ebene, sowohl durch ionische, wie auch durch nicht-ionische Osmolyte. Die Aktivität dieser Aufnahmesysteme und das Expressionslevel ihrer Strukturgene ist von der Stärke und der Dauer des osmotischen Stresses abhängig (Csonka & Epstein 1996; von Blohn *et al.* 1997; Holtmann *et al.* 2004[b]). Auch unter Hitzestress findet eine Induktion auf transkriptioneller Ebene statt (Holtmann & Bremer 2004[c]). Die Transkription der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* in *V. pantothenticus* wird sowohl unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen, wie auch bei Wachstum in der Kälte verstärkt (Kuhlmann *et al.* 2005). OpuD aus *B. subtilis* (Kappes *et al.* 1996) und BetP aus *C. glutamicum* (Rübenhagen *et al.* 2000; Rübenhagen *et al.* 2001) sind zusätzlich zur osmotisch induzierten Transkription ihrer Strukturgene posttranslational durch einen hyperosmolaren Schock aktivierbar. Damit können die Organismen sehr schnell durch eine sofortige Aufnahme von Glycin-Betain auf die veränderten Bedingungen reagieren (Kappes *et al.* 1996).

Trotz einiger Hinweise auf mögliche Signale, welche zur osmotischen Regulation beitragen, ist das Gesamtnetzwerk sensorischer Komponenten und die Informationsweiterleitung und -verarbeitung weitgehend unverstanden.

4 Verwendung kompatibler Solute als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle

Um kohlenstoff- und/oder stickstoffhaltige Verbindungen in hohen Konzentrationen in der Zelle anhäufen zu können, müssen diese entweder metabolisch inert sein oder deren enzymatischer Abbau einer der jeweiligen Situation angepassten Regulation unterworfen sein. Ein Beispiel für einen regulierten Abbau ist bereits bei der Glutamat-Synthese beschrieben worden. Die Oxidation von Prolin zu Glutamat erfolgt dabei in zwei enzymatisch katalysierten Schritten (PutB, PutC; (Fisher & Sonenshein 1991; Moses 1999). Für *S. typhimurium* konnte gezeigt werden, dass der Abbau von Prolin unter hohen Osmolaritäten auf enzymatischer Ebene inhibiert ist (Ekena & Maloy 1990). Zudem agieren die bifunktionalen PutA-Proteine, die beide für den Abbau von Prolin zu Glutamat benötigten, katalytischen Domänen tragen, in Enterobakterien als Transkriptionsregulator und reprimieren in Anwesenheit von Prolin die Expression des *putA*-Genes, indem es an die DNA der *put*-Kontrollregion bindet (Wood 1987).

Tetrahydropyrimidine können nur in einigen Organismen, wie *S. meliloti* (Talibart *et al.* 1994; Gouffi *et al.* 1999; Jebbar *et al.* 2005) als C- oder N-Quelle dienen. In diesem Organismus sind mindestens zwei Abbauwege für Ectoin vorhanden (Jebbar *et al.* 2005). Auch *B. epidermis*, ein Ectoin-Produzent, kann dieses kompatible Solut als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen (Onraedt *et al.* 2004). In *Pseudomonas putida* KT2440 sind Ectoin und Hydroxyectoin nicht osmoprotektiv, sie können aber wie in den vorherigen Organismen als C- und N-Quelle dienen (Manzanera *et al.* 2002).

Im Gegensatz dazu kann *S. pasteurii* mit Ectoin als alleinige Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle im Minimalmedium nicht wachsen (Kuhlmann & Bremer 2002).

5 *Salibacillus salexigens*

Der in dieser Arbeit in Hinsicht auf die Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese bearbeitete Organismus ist *Salibacillus salexigens*. Dieses Bakterium wurde erstmals 1997 von Garabito *et al.* als *Bacillus salexigens* aus hypersalinen Böden in Spanien isoliert und beschrieben (Garabito *et al.* 1997). 1999 wurde er in das neu geschaffene Genus *Salibacillu*s transferiert und erhielt den Namen *Salibacillus salexigens* (Wainø *et al.* 1999). Im Jahr 2003 wurde der Stamm erneut umklassifiziert und der Name *Virgibacillus salexigens* wird empfohlen (Heyrman *et al.* 2003).

Der Speziesname *salexigens* setzt sich aus den lateinischen Worten „sal“ für Salz und „exigo“ für erfordern/ benötigen zusammen, und bringt damit zum Ausdruck, dass dieser Organismus für sein Wachstum Salz benötigt, also zur Gruppe der halophile Mikroorganismen gehört (Garabito *et al.* 1997; Heyrman *et al.* 2003). Dies kommt auch in der Genusbezeichnung *Salibacillus* zum Ausdruck. Die Genusbezeichnung *Virgibacillus* geht auf das lateinische Wort „virga“ für „Zweig“ zurück und bedeutet somit: Zweig/Seitenlinie, was sich auf die phylogenetische Position zum Genus *Bacillus* bezieht (Heyrman *et al.* 2003).

S. salexigens ist ein Gram-positives, strikt aerobes, bewegliches, Endosporen bildendes Bodenbakterium. Es kann über einen weiten Bereich an externer Salzkonzentration, 0,4 M bis mehr als 3,6 M NaCl, wachsen. Der Organismus kann in einem Temperaturbereich von 15 °C bis 45 °C wachsen, wobei das Optimum bei etwa 37 °C liegt. Wachstum ist in einem pH-Bereich von 6 bis 11 möglich, wobei das Optimum bei pH 7,5 liegt (Garabito *et al.* 1997). Der GC-Gehalt der DNA liegt zwischen 36,3 mol% und 39,5 mol% (Heyrman *et al.* 2003).

Dieser Organismus wurde als Modellorganismus für die Untersuchungen zur Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese von uns gewählt, da er der erste Organismus aus dem Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera war, bei dem Ectoin- **und Hydroxyectoin**-Biosynthese nachgewiesen werden konnte (Kuhlmann & Bremer 2002).

Bei dieser Gruppe halotoleranter und halophiler Bacillen (*Salibacillus* sp.; *Virgibacillus* sp.) könnte es sich um sehr „alte“ Genera handeln, da lebensfähige Sporen des halotoleranten *Salibacillus marismortui* (= *Virgibacillus marismortui*; (Heyrman *et al.* 2003)) aus einem Einschluss in einem 250 Millionen Jahre alten Salzkristall nachgewiesen werden konnten (Nicholson *et al.* 2000; Vreeland *et al.* 2000; Grant 2004).

5.1 Moderat halophile und halotolerante Mikroorganismen

Die ersten gezielten Untersuchungen halophiler Mikroorganismen begannen gegen Ende des 19. Jahrhunderts. Damals galt das Interesse hauptsächlich den Kontaminationen von Lebensmittel, deren Konservierung meist durch eine Reduzierung der Wasseraktivität durch Trocknen, Salzen oder Zuckern erreicht wurde. Trotzdem kam es immer wieder zu Kontaminationen mit bestimmten Mikroorganismen, deren besondere Anpassung an diese extremen Lebensräume genauer untersucht wurde, um diese zu umgehen und so eine längere Haltbarkeit der Lebensmittel zu gewährleisten.

Die meisten Mikroorganismen können in einem Habitat mit erniedrigter Wasseraktivität nicht mehr wachsen. Diese speziellen Bedingungen führen jedoch nicht zu einer „sterilen“ Umgebung, sondern lediglich zu einer Reduktion des Wachstums. Außerdem wird eine ökologische Nische für speziell an dieses Habitat angepasste Organismen geschaffen.

In aktuelleren Publikationen sind aber auch noch ganz andere „Habitate“ das Ziel von phylogenetischen Untersuchungen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass halotolerante und halophile Mikroorganismen an der „biogenen Zerstörung“ von Gemälden beteiligt sind. So sind untere anderen auch Spezies der Genera *Salibacillus* und *Virgibacillus* von Wandgemälden in Spanien isoliert worden (Heyrman & Swings 2001).

Aufgrund ihrer Bedürfnisse im Hinblick auf die Wasseraktivität, unter dem Einfluss hoher Konzentrationen anorganischer Ionen, werden diese Mikroorganismen als halotolerant bezeichnet, wenn sie bis zu einer bestimmten Konzentration an Salzen wachsen können, aber in Abwesenheit einer erhöhten Salzkonzentration besser wachsen. Halophile benötigen Salz für ihr Wachstum, wobei das Optimum mit der Spezies variiert. Es kann weiter unterteilt werden in mäßig halophil (1 % bis 6 % benötigter Salzgehalt), moderat halophil (6 % bis 15 % benötigter Salzgehalt) und extrem halophil (15 % bis 30 % benötigter Salzgehalt) (Madigan *et al.* 2000).

Studien hypersaliner Habitate habe die Präsenz taxonomisch sehr verschiedener Mikroorganismen gezeigt, welche in ihren Anforderungen an den Salzgehalt des Habitates und in ihren metabolischen Fähigkeiten sehr unterschiedlich sind (Wainø *et al.* 1999).

Halophile Mikroorganismen finden vielfältige Anwendung in der Industrie. Sie werden nicht nur bei der biotechnologischen Produktion von kompatiblen Soluten, sondern auch in der Lebensmittelindustrie und bei der Entsorgung industrieller Abfälle, die oft einen hohen Gehalt an Salzen und Schwermetallen aufweisen, eingesetzt (Ventosa *et al.* 1998[a]).

IV Ziel der Arbeit

Kompatible Solute werden in *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya* als osmotische Schutzsubstanzen, aber z. T. auch unter anderen Stresssituationen wie Hitze und Kälte synthetisiert und akkumuliert (Bohnert *et al.* 1995; Kempf & Bremer 1998[a]; Roberts 2000; Wood *et al.* 2001; Holtmann *et al.* 2004[b]). Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Verbindungen die Organismen auch vor Schäden durch freie Radikale oder Austrocknung bewahren. Damit kommt zumindest einigen Substanzen aus der Gruppe der kompatiblen Solute eher die Rolle genereller Stressprotektiva als „nur" die der Osmoprotektiva zu. Auch den Tetrahydropyrimidinen Ectoin und Hydroxyectoin kann diese allgemeinere Schutzfunktion zugeschrieben werden (Kuhlmann 2002; Bursy *et al.* 2005; Kuhlmann *et al.* 2005).

Salibacillus salexigens wurde als erster Organismus des Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera als Synthetisierer von Ectoin und Hydroxyectoin unter hochosmolaren Bedingungen per ^{13}C-NMR-Analyse identifiziert (Kuhlmann & Bremer 2002). Nach der Analyse weiterer vor allem halotoleranter und halophiler *Bacillus* Spezies hat sich gezeigt, dass die Synthese von Ectoin weit verbreitet ist und auch die Möglichkeit zur Biosynthese von Hydroxyectoin keine Seltenheit in diesem Genus darstellt (Tab. 1).

Die Ectoin-Biosynthese ist auf genetischer Ebene in verschiedenen Genera und auf molekulare Ebene in *Halomonas elongata* (Ono *et al.* 1999) bereits gut untersucht. Es war nur wenig bekannt über die Biosynthese von Hydroxyectoin, dem 5-Hydroxyderivat von Ectoin. Anhand von Mutanten der Ectoin-Biosynthese gab es zwei Hypothesen der Hydroxyectoin-Produktion. Entweder wird Hydroxyectoin auf direktem Wege durch Hydroxylierung von Ectoin synthetisiert (Ventosa *et al.* 1998[a]) oder über einen indirekten Syntheseweg ausgehend von einem der Intermediate der Ectoin-Biosynthese (Abb. 9) (Canovas *et al.* 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das gesamte Ectoin-Biosynthese-Gencluster aus *S. salexigens* zu isolieren, und zu charakterisieren. Des Weiteren sollten das oder die Gene für die Biosynthese von Hydroxyectoin aus *S. salexigens* isoliert, und der Biosyntheseweg auf physiologischer, molekularer und biochemischer Ebene erstmals charakterisiert werden, um die bis dahin unbekannte Struktur, Regulation und den Mechanismus der Synthese dieser potenten Schutzsubstanz aufzuklären.

V Material und Methoden

1 Chemikalien und Reagenzien

Sofern im Text nicht gesondert darauf hingewiesen wird, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Amersham Biosciences (Freiburg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt) und Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Die Bestandteile von Komplexmedien stammten von Becton Dickinson (Heidelberg), Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), Fermentas (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Eppendorf (Hamburg), Roche (Mannheim), Promega (Mannheim) oder Stratagene (Amsterdam; NL) bezogen.

1.1 Gase

Stickstoff (99,99 %) und Stickstoff-Wasserstoff-Gemisch (Formiergas 95 % N_2 und 5 % H_2) wurden von Messer Griesheim (Düsseldorf) bezogen.

1.2 Referenz-Substanzen für die HPLC-Analyse

Ectoin

(*S*)-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat
Summenformel: $C_6H_{10}N_2O_2$
Gewonnen aus: *Halomonas elongata*
Molekulare Masse (g mol^{-1}): 142,2
Bezugsquelle: BIOMOL (Hamburg)

Hydroxyectoin

(*S*,*S*)-β-2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat
Summenformel: $C_6H_{10}N_2O_3$
Gewonnen aus: *Marinococcus* M52
Molekulare Masse (g mol^{-1}): 158,2
Bezugsquelle: BIOMOL (Hamburg)

L-Prolin

Summenformel: $C_5H_9NO_2$
Molekulare Masse (g mol^{-1}): 115,3
Bezugsquelle: Sigma

Homoectoin

(*S*)-4,5,6,7-Tetrahydro-2-Methyl-1H-(1,3)-Diazepin-4-Carboxylat
Summenformel: $C_7H_{12}N_2O_2$
Molekulare Masse (g mol^{-1}): 156,184
Bezugsquelle: E. A. Galinski (University Bonn)

DHMICA

(*RS*)-4,5-Dihydro-2-Methyl-Imidazole-4-Carboxylat
Summenformel: $C_5H_8N_2O_2$
Molekulare Masse (g mol^{-1}): 128,131
Bezugsquelle: E. A. Galinski (University Bonn)

cis-3-Hydroxy-DL-Prolin

Summenformel: $C_5H_9NO_3$
Molekulare Masse (g mol^{-1}): 131,14
Bezugsquelle: Fluka

cis-4-Hydroxy-L-Prolin

Summenformel: $C_5H_9NO_3$
Molekulare Masse (g mol^{-1}): 131,13
Bezugsquelle: Fluka

2 Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgeführt. Der Tabelle 3 sind die verwendeten Plasmide und Tabelle 4 die verwendeten Oligonukleotide zu entnehmen.

Tabelle 2. Bakterienstämme und Bakteriophagen

Stamm	DSM-Nr.	Beschreibung	Referenz
Salibacillus salexigens	11483^T		(Garabito *et al.* 1997; Wainø *et al.* 1999; Heyrman *et al.* 2003)
Bacillus clarkii	8720^T		(Wainø *et al.* 1999)
Escherichia coli DH5α		*supE44 .lacU169* (Φ80 *lacZ.M15*) *hsdR17recA1 endA*1 *gyrA96 thi-1 elA1*	(Hanahan 1983)
Escherichia coli TOP10		*F´mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ80*lacZ* Δ M15 Δ*lacX*74 *recA*1 *deoR araD*139 Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA*1 *nup*G	TA® Cloning-Kit; Invitrogen, Carlsbad, CA
Escherichia coli XL1-Blue MRF'		Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE*44 *thi*-1 *recA*1 *gyrA*96 *relA*1 *lac* [F' - *proAB lacI*^{q}*Z*ΔM15 Tn10 (Tet^r)]	ZAP Express® Predigestet Vektor Kit *Eco*RI/CIAP[1]-Treated; Stratagene, Amsterdam, NL
Escherichia coli XLOLR		Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA*1 *thi*-1 *recA*1 *gyrA*96 *relA*1 *lac*[*F'* - *proAB lacI*^{q} *Z*ΔM15 Tn10 (Tet^r)] Su$^-$ (nonsuppressing)	ZAP Express® Predigestet Vektor Kit *Eco*RI/CIAP[1]-Treated; Stratagene, Amsterdam, NL

	λ^r (lambda resistant)	
λ-ZAP-Express™	Δ*cl,* Δ*att*, Δ*int*, Δ*xis*, ΔWL113, ΔKH54, Δ*nin*5, *red gam*$^+$, *bio*	ZAP Express® Predigestet Vektor Kit *Eco*RI/CIAP[1]-Treated; Stratagene, Amsterdam, NL
ExAssist™ Helferphage		ZAP Express® Predigestet Vektor Kit *Eco*RI/CIAP[1]-Treated; Stratagene, Amsterdam, NL

[1]CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)

Tabelle 3. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pASK-IBA3	*Strep*-tag® II Expressionsvektor für *E. coli*; kloniertes Gen ist unter Kontrolle des Promotors des *tetA* Resistenzgenes; Induktion mit Anhydrotetracyclin	IBA, Göttingen
pCR2.1	pUK18 Derivat, Vektor mit hoher Kopienzahl, 3'-Thyminüberhänge zur Klonierung von PCR-Produkten der *Taq*-Polymerase, Amp^R, Kan^R	Invitrogen,. Carlsberg, CA
pBK-CMV	Phagemid-Klonierungs- und Expressionsvektor mit sehr hoher Kopienzahl, Neo^R, Kan^R	ZAP Express® Predigestet Vektor Kit *Eco*RI/CIAP-Treated Stratagene, Amsterdam, NL
pBJ1	Vektor: pCR2.1-TOPO; Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler *Salibacillus salexigens* DNA (0,7 kb); '*ectA-ectB*'	(Bursy 2001)
pBJ6	Vektor: pCR2.1-TOPO; Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler *Salibacillus salexigens* DNA (0,27 kb); '*ectD*'	diese Arbeit
pBJ7	Vektor: pCR2.1-TOPO; Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler *Bacillus clarkii* DNA (0,27 kb); '*ectD*'	diese Arbeit
pBJ8	Vektor: pBK-CMV; Insert: *Eco*RI Restriktionsfragment chromosomaler *Salibacillus salexigens* DNA (6 kb); *ectABC* (Abb. 12)	diese Arbeit
pBJ9	Vektor: pBK-CMV; Insert: *Eco*RI Restriktionsfragment chromosomaler *Salibacillus salexigens* DNA (4,1 kb); *ectD* (Abb. 18)	diese Arbeit
pBJ10	Vektor: pASK-IBA3; Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler *Salibacillus salexigens* DNA (0,9 kb); *ectD*	diese Arbeit

Tabelle 4. Oligonukleotide

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Lage, Bemerkung
AK1	GAT ACC (G/T)(A/T)(G/T) TT(C/T) (A/G/C/T)TC TGG CAG GT	*ectA*; (Kuhlmann 1998; Bursy 2001); degeneriert, heterolog nach Marinococcus halophilus, Halomonas elongata
AK5	GCC TTC IAT GCA ITA IAC IGI ITC	*ectC*; bindet in *S. salexigens* in *ectB*, (Kuhlmann 1998; Bursy 2001); degeneriert, heterolog nach *Marinococcus halophilus, Halomonas elongata*
JB 3	CCG AGT TCT TCT GGC AGG	*ectA S. salexigens* (Bursy 2001); für DNA-Sonde
JB 4	CTG GCA GGT CCC GG	*ectB S. salexigens* (Bursy 2001); für DNA-Sonde
JB 1	CCG AAT GTG TGG TTG G	*ectA S. salexigens* (Bursy 2001); für RNA-Sonde
JB 2 T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGC TGG CAG GTC CCG G	*ectB S. salexigens* mit artifizieller T7 Promotersequenz an 5' (Bursy 2001); für RNA-Sonde
M 13 rev	CAGGAAACAGCTATGACC	liest in MCS von pCR2.1, IRD800
M 13 for	GTAAAACGACGGCCAGT	liest in MCS von pCR2.1, IRD800
pASK-IBA forward[a]	GTGAAATGAATAGTTCGAC	Sequenzierprimer für pASK-IBA-Vektoren; Sequenz nach IBA, Göttingen
pASK-IBA-reverse[a]	CGCAGTAGCGGTAAACGG	Sequenzierprimer für pASK-IBA-Vektoren; Sequenz nach IBA, Göttingen
S.s. ectD 5' *Bsa*I_1	GCG CGC GTT CTC TAA TGG AAG ATC TTT ATC CTT C	für Klonierung von *S. salexigens ectD* in pASK-IBA3; mit *Bsa*I-Schnittstelle; diese Arbeit
S.s. ectD 3' *Bsa*I_st	GCG CGC GGT CTC AGC GCT GTT TAC AGC ACT ATA CAC TGG	für Klonierung von *S. salexigens ectD* in pASK-IBA3; mit *Bsa*I-Schnittstelle; diese Arbeit
S.s. D_1	CCG ATA AAG TAA TAC GCG	*ectD S. salexigens*; diese Arbeit

		für RNA-Sonde
S.s. D_T7-3	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGC CAC CAG AAA ACG GCT CCA C	*ectD S. salexigens* mit artifizieller T7 Promotersequenz an 5'; diese Arbeit für RNA-Sonde
S.s. *marR*_1	GGG GTT CGA AAC GAT TTG GTG	*orfX S. salexigens*; diese Arbeit für RNA-Sonde
S.s. *marR* T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGC CAT ATT CTG TAA GCA CGT ACT C	*orfX S. salexigens* mit artifizieller T7 Promotersequenz an 5'; diese Arbeit für RNA-Sonde
Sequ *ectA*_81	GAA GAG TTA AGG TCT AGG TTA CC	IRD-800; für Primer Extension Analyse diese Arbeit
het_*ectD* 10	GAT TTT GAA AC(G/A/T) TGG CAT	degenerierter Primer für Amplifikation eines internen *ectD*-Fragmentes; diese Arbeit, für DNA-Sonde
het_*ectD* 11	AGA (A/T)CC (A/T)GC TTT (A/T)CC (A/T)GT	degenerierter Primer für Amplifikation eines internen *ectD*-Fragmentes; diese Arbeit, für DNA-Sonde

[a:] Oligonukleotide, die für Sequenzreaktionen bzw. Primer-Extension Reaktionen verwendet wurden, sind am 5' Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff IRD800 (Infrared dye 800) markiert. Diese Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

3 Kulturmedien, Zusätze und Wachstumsbedingungen

3.1 Medien

Zusätze wie Salze, Kohlenstoffquellen, Zucker, Aminosäurelösungen, Vitamine und Antibiotika sowie die osmoprotektiven Substanzen wurden als konzentrierte Stammlösung in Wasser (Chloramphenicol in 70 % Ethanol, X-GAL in DMF) angesetzt, sterilfiltriert (Sterilfilter 0,2 oder 0,45 µm Schleicher und Schuell, Dassel) und den maximal 50 °C warmen Medien zugesetzt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden Antibiotika und Zusätze, wie in Tabelle 8 angegeben, hergestellt.

3.1.1 Vollmedien

Für *S. salexigens* wurde das beschriebene Vollmedium benutzt (Garabito *et al.* 1997). *Escherichia coli* DH5α, XLOLR, XL1-Blue MRF' und *Bacillus clarkii* wurden auf Luria-Bertani-Broth (LB) (Sambrook 2001) kultiviert. Zur Herstellung von Festmedium wurden 15g Agar pro Liter Medium, beziehungsweise 0,7 % Agarose zur Herstellung von NZY Top Agar zugegeben.

Wurden die mit λ- beziehungsweise Helfer-Phagen infizierten XL1-Blue MRF' und XLOR Stämme vermehrt, wurden die Platten mit NZY Top Agarose überschichtet. Wurde der Stamm XL1-blue MRF' in LB-Flüssigmedium kultiviert, wurde diesem 10 mM $MgSO_4$ sowie 2 % Maltose zugegeben (ZAP Express® Predigestet Vektor Kit Manual; Stratagene, Amsterdam, NL).

3.1.2 Minimalmedien

Für *E. coli* wurde Minimalmedium A (MMA) (Miller 1992) verwendet. Für *S. salexigens* wurde das Mineralsalzmedium (MM) (Garabito *et al.* 1997) mit 0,5 % Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle, 1 % Casaminosäuren und den Vitaminlösungen A und B (Tabelle 5 und 6) als Minimalmedium verwendet.

Tabelle 5. Vitaminlösung A (10 ml/l)

Vitamin	Konzentration in Stammlösung (mg ml^{-1})	Endkonzentration im Medium (µg l^{-1})
Biotin	0,25	39
Nicotinsäure	0,5	78
Liponsäure	0,5	78
Folsäure	0,5	78

Die Vitamine wurden in H_2O gelöst, der pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm; Schleicher und Schuell, Dassel).

.

Tabelle 6. Vitaminlösung B (10 ml l^{-1})

Vitamin	Konzentration in Stammlösung (mg ml^{-1})	Endkonzentration im Medium (µg l^{-1})
Pantothenat	0,5	78
Pyridoxin (B_6)	0,5	78
Thiamin	0,5	78
p-Aminobenzoesäure	0,5	78
Cobalamin (B_{12})	0,01	1,6

Die Vitamine wurden in H_2O gelöst und anschließend sterilfiltriert.

Tabelle 7. Mineralsalzmedium für *S. salexigens*

Bestandteil	g (l Medium)$^{-1}$
NaCl	81
$MgCl_2$	7
$MgSO_4$	9,6
$CaCl_2$	0,36
KCl	2
$NaHCO_3$	0,06
NaBr	0,026

Die Salze wurden in Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf pH 7,5 eingestellt, anschließend wurde das Medium autoklaviert. Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde als 20 %ige Stammlösung angesetzt, autoklaviert und dem Medium 0,1 %ig direkt vor Gebrauch zugesetzt Für das Minimalmedium wurde eine 20 %ige Lösung an Casaminoacids angesetzt, autoklaviert und dem Minimalmedium zugegeben (1 %, wenn nicht anders angegeben). Ebenfalls direkt vor Gebrauch wurden die entsprechenden Volumina der Vitaminlösungen A und B zugegeben und das Volumen mit entionisiertem Wasser aufgefüllt.

Für Experimente mit variablem NaCl-Gehalt, wurde eine 2,5-fach konzentrierte Stammlösung der Salze ohne NaCl angefertigt und dann entsprechend mit einer 5M NaCl-Stammlösung supplementiert.

Die Osmolarität der Medien wurde durch Zugabe von NaCl mit einer autoklavierten 5 M Stammlösung eingestellt.

Für die NMR- und Wachstumsexperimente wurde Minimalmedium benutzt um Kontaminationen mit Osmoprotektiva zu vermeiden.

Den Medien wurden bei Bedarf die in Tabelle 8 aufgelisteten Antibiotika in den angegebenen Endkonzentrationen aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Chloramphenicol wurde in Ethanol gelöst, alle anderen Substanzen in H_2O.

Tabelle 8. Konzentrationen der Antibiotika für *E. coli*

Antibiotikum	Endkonzentration im Medium ($\mu g\ ml^{-1}$)
Ampicillin	150
Chloramphenicol	30

3.2 Sterilisation

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Puffer für 20 Minuten bei 121°C und einem bar Überdruck dampfsterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel) und Glaswaren für 3 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

3.3 Wachstumsbedingungen

Salibacillus salexigens

Die Kultivierung erfolgte immer aerob. Kulturen von 5 ml wurden in Kulturröhrchen bei 37 °C auf einem Roller inkubiert. Kulturen von 20 – 500 ml wurden in Erlenmeyerkolben von 100 bis 2000 ml bei 37 °C in Wasserbädern bzw. Luftinkubatoren mit 220 rpm geschüttelt. Für ^{13}C-NMR spektroskopische Untersuchungen wurden Kulturen von 300 ml in 2000 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD_{578} von 0,1 aus einer Übernachtkultur beimpft und bei 220 rpm bei 37 °C im Luftschüttler inkubiert. Für HPLC-Analysen wurden Kulturen von 80 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD_{578} von 0,1 beimpft und bei 37 °C in Schüttelwasserbädern gezogen. Für die Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD wurden *S. salexigens* in 4 l Medium in einer 10 l Glasflasche unter Druckluftbegasung und Rühren (500 rpm) kultiviert. Falls nicht anders erwähnt, wurde die Vorkultur in Minimalmedium mit 1,4 M NaCl kultiviert. Für Wachstumskurven bei 37 °C wurden 75 ml vorgewärmtes Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit exponentiell wachsenden Zellen (OD_{578} 0,5 bis 1,5) auf eine optische Dichte von 0,1 inokuliert und das Wachstum wurde über die Zeit durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt.

Escherichia coli

Kulturen von 5 ml wurden in Kulturröhrchen bei 37 °C auf einem Roller inkubiert. Kulturen von 20 – 500 ml wurden in Erlenmeyerkolben von 100 bis 2000 ml bei 37 °C in Wasserbädern bzw. Luftinkubatoren mit 220 rpm geschüttelt. Kulturen für die Produktion heterologer Proteine wurden in einem Volumen von 4 l in einer 10 l Glasflasche bei 37° C

kultiviert. Für eine effiziente Durchlüftung der Kultur wurde die Glasflasche mit einem Rührfisch versehen und das Medium bei 500 rpm gerührt.

3.3.1 Wachstumsbedingungen für die EctD-Reinigung aus *S. salexigens*

Die *S. salexigens* Kulturen für die Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD wurden in 4 Litern Minimalmedium (Garabito *et al.* 1997) mit 3,2 M NaCl bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase (OD_{578} ~2) kultiviert. Um gutes Wachstum zu gewährleisten, wurden die Kulturen 600 rpm auf einem Magnetrührer gerührt und zusätzlich über Schläuche mit steriler Druckluft begast.

3.3.2 Wachstumsbedingungen für die EctD-Reinigung aus *E. coli*

Expressionskulturen von 2 l wurden in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit einem Rührfisch versehen und auf einem Magnetrührer durch Rühren belüftet. Die Anzucht der Zellen erfolgte in bei 37 °C.

3.3.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur von *E. coli*, *S. coelicolor* A3(2) bzw. *S. salexigens* wurde photometrisch durch die Messung der optischen Dichte in einem UV/VIS Spektrophotometer (Ultrospec 3100 *pro* oder Ultrospec 2000, Amersham Biosciences, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}) bestimmt.

4 Molekularbiologische und genetische Methoden

4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1 %-igen Agarosegelen in TAE-Puffer (Sambrook *et al.* 1989). Als Größenstandard diente mit *Bst*EII geschnittene λ-DNA (Fermentas, St. Leon-Rot). Die DNA wurde 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg ml^{-1}) gefärbt (Sambrook & Russel 2001), durch UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und mit einer Kamera (INTAS, Göttingen) dokumentiert.

4.2 Präparation von Nukleinsäuren

4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly 1979) angewandt. Plasmid DNA für Restriktionsanalysen oder die für die Sequenzierung, wurde über das QIAGEN Plasmid-Midi-Kit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers präpariert.

4.2.2 Präparation von chromosomaler DNA

Genomische DNA *S. salexigens* und *B. clarkii* wurden nach einem Standardprotokoll mit Phenol/Chlorophorm extrahiert (Sambrook & Russel 2001). Vor dem Zellaufschluss durch SDS wurde die Zellwand der Gram-positiven Bakterien durch Lysozym (50 mg/ml Stammlösung) bei 37 °C entfernt. Die Protoplastierung wurde mikroskopisch kontrolliert.

4.2.3 Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *S. salexigens* (DSM 11483^T) Zellen wurde isoliert, wenn sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,5 bis 1) befand. Die Zellen wurden in Minimalmedium (Garabito *et al.* 1997) bei 37 °C und den angegebnen NaCl-Konzentrationen kultiviert. Bei Erreichen der entsprechenden Zelldichte, wurden 20 bis 40 ml der Kultur mit 20 ml eiskaltem „*Killing*"-Puffer (20 ml 1M Tris/HCl, pH 7,5; 5 ml 1M $MgCl_2$; 20 ml 1M NaN_3; mit Seradest auf 1 l aufgefüllt) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml kaltem „*Killing*"-Puffer resuspendiert und in einem Eppendorf-Gefäß zentrifugiert. Die Zellpellets wurden direkt in einem Trockeneis/Ethanol-Bad oder flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet in 200 µl „*Killing*"-Puffer aufgenommen und in Stickstoff gekühlte Probengefäße gefüllt. Nach mechanischer Disruption der Zellen für 2 min bei 2600 rpm (Mikro-Dismembrator S, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) wurde das Zellpulver in 4 ml Lysepuffer (118,16 g Guanidin-Thiocyanat, 2,08 ml 1,5 M Na-Acetat, pH 5,2, 12,5 ml 10 % (wt/vol) N-Lauroylsarcosin mit RNase-freiem Seradest auf 250 ml aufgefüllt) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff „schockgefroren".

Die Isolierung der RNA erfolgte nach einer modifizierten sauren Phenol-Methode (Ambulos *et al.* 1987; Majumdar *et al.* 1991). Nach Zugabe von einem Volumen saurem Phenol (Aqua-Phenol (Roth), Chloroform, Isoamylalkohol 50:48:2, mit Seradest ausschütteln) zu dem Zelllysat wurde die DNA an der organische Phase ausgefällt, wohingegen RNA in der wässrigen Phase verblieb. Die Phasentrennung wurde durch fünf minütige Zentrifugation bei 13000 rpm (Tischzentrifuge Eppendorf) beschleunigt Nach zweimaliger Extraktion mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (96:4) wurde die RNA durch eine Isopropanolfällung (1 ml Isopropanol, 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2) von den Lösungsmittelrückständen getrennt. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 10000 g (4 °C) wurde die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die RNA in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

Weiterhin wurde RNA unter Verwendung des „High Pure RNA Isolation Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) isoliert. Außer einer 10 minütigen Lysozymbehandlung wurde die Isolation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Zellpellet wurde hierzu in 200 µl 10 mM Tris pH 8 resuspendiert und mit 4 µl Lysozymlösung (50 mg ml^{-1}, 10 mM Tris, pH 8) versetzt. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37 °C für 10 min. Die Methode beruht darauf, dass die gesamte Nukleinsäure an das Säulenmaterial (Glasvlies) bindet, die DNA dann jedoch mit DNaseI verdaut wird.

Um zusätzlich einen visuellen Eindruck von der Qualität sowie der Quantität der RNA zu erhalten, wurden 3 µg mit gleichem Volumen Denaturierungspuffer versetzt, für 5 min bei 70 °C denaturiert, um Sekundärstrukturen zu lösen, dann sofort auf Eis gestellt und anschließend in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert (302 nm). Bei erfolgreicher Präparation und Denaturierung sind die zwei Banden der ribosomalen RNA's zu erkennen.

4.2.4 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurde photometrisch (Ultrospec 2000 und Ultrospec 3100 *pro*, Amersham Biosciences, Freiburg) durch die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine A_{260} von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg ml^{-1} und einer RNA-Konzentration von 40 µg ml^{-1}. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA (Sambrook *et al.* 1989).

4.3 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot)

4.3.1 DNA-Sonden-Synthese

Für die Herstellung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonden wurde Digoxigenin DIG-[11]-dUTP in einer herkömmlichen PCR unter Verwendung der Primer für die Sonde sowie 2 µl des „Labelling Mix“ („DIG DNA Labelling and Detection Kit“, Roche) verwendet.

Die 0,7 kb große DIG-*ectAB*-Sonde wurde mit den Primern JB 3 und JB 4 (Tab. 4), sowie dem Plasmid pBJ1 als Matrize in einer PCR amplifiziert. Die 0,27 kb große DIG-*ectD*-Sonde wurde mit den Primern het_*ectD* 10 und het_*ectD* 11 (Tab. 8), sowie das Plasmid pBJ6 (Tab. 3) als Matrize in einer PCR amplifiziert.

4.3.2 Southern Blot

Die Identifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von Southern-Hybridisierung (Sambrook & Russel 2001). Genomische DNA (5 bis 10 µg) wurde nach der Behandlung mit der angegebenen Restriktionsendonuklease in einem 0,9 %igen (wt/vol) TAE-Agarosegel über Nacht bei 35 V gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Vakuumblotapparatur (VacuGene XL, Pharmacia) durch anlegen eines Unterdrucks von 70 bis 80 mbar auf eine NY13N Membran (Schleicher & Schuell) transferiert. Als DNA-Größenstandard diente Digoxigenin-markierter „DNA molecular weight marker VII“ (Roche).

Während des Blotvorganges wurde das Gel zunächst mit Blotlösung 1 (0,25 M HCl) bis zur Entfärbung der Markerbande gewaschen. Das Gel wurde dann mit Blotlösung 2 (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) so lange überschichtet, bis der Indikator wieder eine Blaufärbung aufwies. Mit Blotlösung 3 (1 M NH_4-Acetat) wurde dann 30 bis 60 min überschichtet. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch „UV-crosslinking“ mittels UV-Stratalinker 2400 (Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

Die Membran wurde in Hybridisierungsröhren für mindestens 3 h bei 68 °C mit einer Hybridisierungs-Lösung (5 x SSC (0,75 M NaCl, 75 mM NaCitrat), 0,5 % (wt/vol) blocking-Reagenz (Roche Diagnostics), 0,1 % (wt/vol) N-Lauroylsarcosin, 0,02 % (wt/vol) SDS prähybridisiert. Die Sonde wurde nach Denaturierung für 10 min bei 95 °C und anschließendem Abkühlen (4 °C) mit frischem Hybridisierungs-Lösung auf die Membran gegeben und über Nacht bei 68 °C gerollt. Dann wurde die Membran bei 68 °C zweimal 5 min mit Waschlösung 1 (2 % SSC, 0,1 % SDS) sowie zweimal 15 min mit Waschlösung 2 (0,2 % (wt/vol) SSC, 0,1 % (wt/vol) SDS) behandelt. Nach einminütiger Inkubation in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 M NaCl, pH 7,5) bei Raumtemperatur wurden unspezifische Bindestellen durch 30 min Inkubation mit 1 % (wt/vol) blocking-Reagenz (100 mM Maleinsäurepuffer, 1 % (wt/vol) blocking-Reagenz) abgesättigt.

Im immunologischen Nachweis wurde an die Sonde ein Anti-DIG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, gebunden (15 ml Maleinsäurepuffer; 1 % (wt/vol) blocking-Reagenz, 1,5 µl α-DIG-Antikörper (Roche Diagnostics) für 30 min). Nach zwei Waschritten mit Maleinsäurepuffer wurde die Membran im Reaktionspuffer (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$) inkubiert.

Der Nachweis der markierten DNA-Fragmente erfolgte in einer chemilumineszenten Reaktion, bei der das Substrat ECF-Vistra (Amersham Biosciences, Freiburg) von der alkalischen Phosphatase umgesetzt wird. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem Phospho-Imager MD Storm 860 (Amersham Biosciences, Freiburg). Zur Analyse der Daten wurde die Software von Molecular Dynamics. Inc verwendet.

4.4 RNA-RNA-Hybridisierung (Northern-Blot)

Um die Stabilität der RNA zu gewährleisten, wurde, wie auch bei der Präparation der RNA, auf die Vermeidung der Kontamination mit RNasen besonderen Wert gelegt. Die Lösungen wurden mit DEPC behandelt (0,01 %; über Nacht bei 37 °C, anschließen autoklaviert) und für den Gellauf verwendete Elektrophorese-Kammern wurden mit Spülmittel über Nacht stehen gelassen und vor Benutzung mit DEPC-behandeltem Wasser gespült.

4.4.1 RNA-Sonden-Synthese

Die einzelsträngigen, antisense RNA-Sonden, spezifisch für die *ectAB*, *ectD* und *orfX* Transkripte aus *S. salexigens* wurden mittels *in vitro* Transkription mit dem Strip-EZ® RNA T7 Kit (Ambion, Inc., Austin, TX, USA) synthetisiert. Neben den unmarkierten Nukleotiden wurde Digoxygenin-UTP (Roche, Mannheim) als Substrat eingesetzt und damit die Sonde markiert. Als Matrize für die *in vitro* Transkription wurden gereinigte DNA-Fragmente (QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen, Hilden) benutzt, die mittels PCR und synthetischen Oligonukleotiden (Tab. 4) mit einer artifiziellen T7 Promotersequenz am 5' Ende des reverse-Primers, sowie chromosomaler *S. salexigens* DNA als Matrize amplifiziert wurden. Die Orientierung des T7-Promotors wurde so gewählt, dass antisense-RNA-Sonden generiert wurden. Durch Zugabe von DNaseI wurde die DNA-Matrize nach der *in vitro* Transkription abgebaut.

Der Herstellung der *ectAB*-Sonde diente ein 478 bp PCR-Produkt (JB 1 und JB 2 T7; Tab. 4) und der Herstellung der *ectD*-Sonde ein 596 bp PCR-Produkt (*S.s*.D_1 und *S.s*.D_T7-3; Tab. 4). Die *orfX*-Sonde hatte ein 148 bp PCR-Produkt (*S.s*. *marR*_1 und *S.s*. *marR* T7; Tab. 4) als Matrize.

Test der RNA-Sonden

Um die Qualität der DIG-RNA-Sonde und die Stärke der DIG-Markierung zu testen, wurde den Markierungsansätzen jeweils 1 µl entnommen und in 20xSSC (Sambrook & Russel 2001) seriell in 1:10er Schritten bis zu 1:10000 verdünnt. Jeweils 2 µl dieser Verdünnungen wurden auf eine Nylonmembran NY13N Membran (Schleicher & Schuell) getropft und mittels „UV-Crosslinking“ an diese kovalent gebunden. Die Membran wurde mit einem α-DIG-Antikörper inkubiert, gewaschen und anschließend mit dem Fluoreszenzsubstrat ECF-Vistra, wie später beschrieben, detektiert (Kap. 4.4.2).

4.4.2 Northern Blot

5 µg der isolierten Gesamt-RNA aus *S. salexigens* und 4 µg des Größenstandards peqGOLD High Range RNA-Leiter (peqlab, Erlangen) wurden bei 70 °C in einem Denaturierungs-Mix (10 mM MOPS pH 7 mit 50 % Formamid, 6,5 % Formaldehyd, 50 % Sucrose und Bromphenolblau) für 5 Minuten denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und anschließend elektrophoretisch in einem 1,4 %igen Agarose-MOPS-Gel mit 1 mal MOPS Puffer (10 x MOPS-Puffer: 200mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,0) als Laufpuffer für etwa 3 Stunden mit einer Spannung von 70 V aufgetrennt. Der Transfer der RNA auf eine Nylon-Membran (NY13N, 0,45; Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel) erfolgte über Nacht (12-16 Stunden) mit 10 x SSC (Sambrook *et al.* 1989). Danach wurde die RNA mit Hilfe von UV-Licht (Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) auf der Membran fixiert. Die Markerspur wurde abgeschnitten und die Banden

wurden durch Färben in Methylenblau (0,1 % (wt/vol) Methylenblau, 300 mM NaAcetat, pH 5,6) sichtbar gemacht.

Die Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre mit Hybridisierungs-Lösung (5 x SSC (10 x SSC: 1,5 M NaCl; 150 mM NaCitrat); 50 % (vol/vol) Formamid; 0,1 % (wt/vol) N-Lauroylsarcosin; 7 % (wt/vol) SDS; 2 % (wt/vol) blocking-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) für mindestens 3 h bei 68 °C prähybridisiert.

Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten einzelsträngigen antisense-RNA-Sonde, welche spezifisch für das nachzuweisende Transkript war. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte für circa 16 Stunden bei 68 °C in einer Hybridisierungs-Lösung (5 x SSC, 50 % Formamid, 2 % blocking-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 7 % SDS und 0,1 % N-Lauroylsarcosin). Anschließend wurde die Membran zwei mal 5 Minuten bei 70 °C in 2 x SSC und 0,1 % SDS und zwei mal 15 Minuten bei 70 °C in 0,2 x SSC und 0,1 % SDS gewaschen. Die weiteren Waschschritte erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook *et al.* 1989). Die Transkripte wurden auf einem Phospho-Imager MD Storm 860 (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 0,5 ml ECF-Vistra (Amersham Biosciences, Freiburg) als Substrat detektiert. Zur Verarbeitung der Daten wurde die Image QuaNT^{TM}-Software von Molecular Dynamics, Inc. verwendet.

4.5 Identifikation von mRNA-Startpunkten mittels Primer Extensions-Analyse

Für die Ermittlung des mRNA-Startpunktes des *ectABC* Operons wurde Gesamt-RNA aus *S. salexigens* verwendet, die aus Kulturen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,6 bis 0,8) isoliert worden war. *S. salexigens* wurde in Minimalmedium (Garabito *et al.* 1997) mit 3,4 M NaCl bei 37 °C kultiviert.

Für die reverse Transkription wurden 20 µg der isolierten *S. salexigens* Gesamt-RNA und 2 pmol eines *ectA*-spezifischen Oligonukleotides (Sequ *ectA*_81; Tab. 4) benutzt, welcher an seinem 5' Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD-800 markiert ist (MWG Biotech, Ebersberg). Diese wurden in dem AMV reverse Transkriptase Puffer (Promega, Mannheim) gemischt, für 3 Minuten auf 75 °C erhitzt und der Thermomixer anschließend auf 42 °C eingestellt, so dass ein langsames Abkühlen auf diese Temperatur erfolgte. Danach wurde 1 µl dNTP-Mix (8 mM) und 10 Units AMV (avian myeloblastosis virus) reverse Transkriptase (Promega GmbH, Mannheim) zugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 42 °C inkubiert. Die cDNA wurde mit kaltem, 96 %-igem Ethanol mit 1 µl Glycogen (10 mg ml^{-1}) gefällt und in 10 µl Formamidpuffer (Stop-Lösung des „Thermo Sequenase DYEnamic direct cycle sequencing Kit" (Amersham Biosciences, Freiburg)) aufgenommen. Parallel zu der reversen Transkription wurde eine Sequenzreaktion (Sambrook *et al.* 1989) mit demselben Oligonukleotid und dem *ectABC* Plasmid pBJ8 als Matrize durchgeführt und zur Ermittlung des mRNA-Startpunktes neben der cDNA auf dem LiCOR® DNA-Sequencer (Modell 4000, MWG) analysiert. Vor dem Auftragen auf das Sequenzgel wurden die Reaktionen 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

5 Konstruktion von Plasmiden, Genbanken und Bakterienstämmen

5.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Ansätze von 20 bis 100 µl Gesamtvolumen verwendet. Pro µg eingesetzter DNA wurde mindestens eine Enzymeinheit (U) Restriktionsenzym eingesetzt und im entsprechenden Puffer für 2 Stunden bzw. über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

5.2 Ligationen

Ligationen erfolgten mit etwa 100 ng Vektor-DNA und variierenden Verhältnissen des zu inserierenden DNA-Fragmentes. Der geschnittene Vektor wurde mit alkalischer Phosphatase (SAP, Amersham Biosciences) gemäß „SAP-Dephosphorylation protocol“ (Amersham Biosciences) behandelt, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Ligationsreaktionen mit einem Volumen von 20 µl wurden 2 bis 16 Stunden bei 16 °C in Ligationspuffer (nach Angaben des Herstellers) mit 1 Enzymeinheit T4 DNA Ligase (Roche, Mannheim) inkubiert.

5.3 Transformation von E. *coli*

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen erfolgte wie bei Ausubel et al. (Ausubel *et al.* 1994) beschrieben. Vor der Transformation wurden die Ligationsansätze mit Hilfe von Membranfiltern mit einer Porengröße von 0,02 µm (Typ VS, Millipore, Schwalbach) gegen destilliertes Wasser dialysiert, um Salze aus der Reinigung oder Ligation zu entfernen. Anschließend erfolgte die Transformation mittels Elektroporation mit dem „BioRad-Gene-Pulser®“ (BioRad, München). Dabei wurde nach Herstellerangaben („Bacterial electrotransformation and pulse controler instruction manual. Version 1.0“) verfahren.

5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction - PCR) nach Standardprotokollen (White 1993) eingesetzt. PCR-Reaktionen wurden mit der Taq-DNA-Polymerase (Amersham Biosciences, Freiburg oder Eppendorf, Hamburg) bzw. der Pfu-Turbo® DNA-Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) in einem „Trio-Thermoblock-Cycler“ (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tab. 4 zu entnehmen. Die Reaktionen wurden in PCR Mix-in-a-Tube EasyStart™100 (Fisher Scientific) durchgeführt.

5.5 Klonierung mit dem TOPO TA®- Cloning-Kit

Mit dem TA®- Cloning-Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) können PCR-Produkte direkt nach der Reaktion in den Vektor pCR2.1 inseriert werden. Die Methode der TA-Klonierung beruht auf der terminalen Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, die template-unabhängig an die 3’-Enden der amplifizierten PCR-Produkte ein Desoxyadenosin (A) anhängt. Der im Kit enthaltene Vektor pCR2.1-TOPO hingegen liegt linearisiert mit 3’-Desoxythymidin (T) Überhängen und einer kovalent daran gebundenen TopoisomeraseI vor. Das PCR-Produkt kann so über Wasserstoffbrückenbindungen in den Vektor inserieren (Lail-Trecker 1997), die TopoisomeraseI schließt die DNA-Stränge und diffundiert danach ab. Die Klonierung erfolgte nach dem Handbuch zum TOPO TA®-Cloning-Kit.

Das Plasmid pCR2.1 ist ein pUK18-Derivat, das einen ColE1 Origin besitzt und somit in sehr hoher Kopienzahl in *E. coli* vorliegt. Das Plasmid codiert für das *lacZ*α-Fragment, welches den ersten 146 Aminosäuren der β-Galaktosidase entspricht. Da sich die Muliple Cloning Site des Plasmides, in die das PCR-Produkt inseriert wird, im *lacZ*α-Fragment befindet und im verwendeten *E. coli* Stamm TOP10 eine *lacZ* ΔM15 Deletion vorliegt, existiert eine funktionsfähige β-Galaktosidase nur bei Nichtinsertion des PCR-Produktes. Positive Kolonien können so durch ein Blau-Weiß-Screening detektiert werden. Die vom Plasmid codierten Kanamycin- und Ampicillin-Resistenzen dienen zur Selektion auf plasmidtragende *E. coli*-Zellen.

Die M13 forward und M13 reverse Sequenzen ermöglichen die Sequenzierung der in das Plasmid inserierten Produkte von beiden Seiten unter Verwendung der M13 Standardprimer.

5.6 DNA-Sequenzierung

Nukleotidsequenzen wurden mit der Di-Desoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977) bestimmt. Dabei wurde das „Thermo Sequenase® DYEnamic direct cycle sequencing kit mit 7-deaza-GTP" (Amersham Biosciences) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tab. 4 zu entnehmen und sind an ihrem 5' Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD-800 markiert (MWG-Biotech, Ebersberg). In die Sequenzreaktion wurden 2 pmol Oligonukleotide und pro Kilobase Plasmid 0,5 µg DNA eingesetzt. Für die Auftrennung der Produkte und deren Detektion wurde ein LiCOR® DNA-Sequencer Modell 4000 (MWG, Ebersberg) verwendet.

Die Sequenzgele wurden aus Sequagel XR ultra pure und Sequagel complete ultra pure (Biozym, Hameln) nach Angaben des Herstellers gefertigt. Für das Einlesen des Gellaufes und die anschließende halbautomatische Ermittlung der Sequenz wurde die Base-ImageIR™-Software von MWG verwendet. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Lasergene Programme (DNA-Star Ltd., London, UK) und Vector NTI 8.0 (Invitrogen Bioinformatics, Karlsruhe) weiterverarbeitet und ausgewertet.

Zusätzlich zur Sequenzierung der klonierten *ectD*-Region aus *S. salexigens*, wurde das 3' Ende des *ectD*-Genes und weitere 459 bp durch direkte Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz) von DNA aus einer PCR mit chromosomaler DNA aus *S. salexigens* und einer „proof reading“ Polymerase (Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase; Finnzymes Oy, Espoo, Finland) ermittelt.

5.7 Herstellung einer *S. salexigens* Genbank und Klonierung von *ectABC*

Für die Klonierung eines genomischen Fragmentes mit den kompletten Ectoin-Biosynthesegenen *ectABC* aus *S. salexigens*, wurde chromosomale DNA aus *S. salexigens* DSM 11483^T) mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und in Southern-Blot-Analysen mit einer *ectAB*-spezifischen DIG-DNA-Sonde (0,7 kb), mittels PCR von dem *ectAB*' Plasmid pBJ1 amplifiziert, hybridisiert. Eines der genomischen Fragmente, welches mit der *ectAB*-spezifischen Sonde hybridisierte, war ein *Eco*RI-Fragment mit einer Größe von 6 kb. Um diese Fragment zu klonieren, wurden genomische *Eco*RI Fragmente von *S. salexigens* in den λ-ZAP Express® Vektor (ZAP Express® Predigested Vector Kit; Cat. #239211 & Gigapack® III Gold Packaging Extract; Stratagene, Amsterdam, NL) ligiert.

Die resultierende λ-ZAP Phagen-Genbank wurde der Anleitung des Herstellers folgend durchsucht. Für die Southern-Hybridisierungen wurde die DIG-markierte *ectAB* DNA-Sonde verwendet. Um positive Phagenklone zu identifizieren, die die gesuchte DNA enthalten, wurde eine Plaquehybridisierung mit der DIG-markierten *ectAB*-spezifischen Sonde durchgeführt. Hierzu wurden 600µl *E. coli*-Zellen einer frischen XL1-Blue MRF'-Kultur (OD_{578} 0,8 bis 1) mit den Phagenpartikeln der *S. salexigens Eco*RI-Genbank infiziert, mit Top-Agarose gemischt und auf 10 NZY-Agaroseplatten (Durchmesser 15 cm) ausgebreitet. Die Menge an Phagenlysat wurde hierbei so gewählt, dass sich nach der Inkubation etwa 10000 einzelne Plaques auf einer Platte befanden. Der anschließende Transfer der Phagen-DNA auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond™-N^+, Amersham Biosciences) erfolgte durch Auflegen der Membran für 2 min auf die Top-Agaroseschicht. Nach der folgenden 2 minütigen Denaturierung in einer 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl-Lösung und 5 minütigen Neutralisation in einer 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl (pH 8)-Lösung, wurde die Membran kurz mit 2 x SSC/0,2 M Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen, bevor die Phagen-DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht im UV-Stratalinker (Stratalinker 2400, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die

Membran gebunden wurde. Hybridisierung und Waschen der Membran erfolgte wie unter 4.2.2 beschrieben. Die Detektion positiver Signale erfolgte mit dem chromogenen Substrat NBT/BCIP (AppliChem, Darmstadt), welches bei der Umsetzung durch die an den Anti-DIG-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase zu einer violetten Färbung auf der Membran führt. Den entstehenden Signalen wurden die entsprechenden Plaques auf den Agarplatten zugeordnet und diese mit einer sterilen Pasteurpipette aus der Top-Agarose ausgestochen, in SM-Puffer aufgenommen und für ein zweites Screening erneut, wie oben beschrieben, ausplattiert und mit der Sonde hybridisiert. Alle Klone, die nach dreimaligem Ausplattieren noch immer zu positive Signalen führten, wurden *in vivo* zyklisiert (nach Protokoll des Herstellers).

Das aus dieser Genbank isolierte Derivat des pBK-CMV Phagemid-Vektors, pBJ8, enthielt ein Insert der Größe von 6 kb, welches die *ectABC* Gene und flankierende Regionen aus *S. salexigens* beinhaltete.

5.8 Klonierung von *ectD*

Um ein DNA-Fragment des Strukturgenes *ectD* der Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* zu klonieren, wurde eine PCR mit degenerierten Primern unter nicht stringenten Bedingungen durchgeführt.

Für die Bestimmung der Primersequenz wurden die Aminosäuresequenzen potentielle Ectoin-Hydroxylasen aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (NC003888), *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (www.tigr.org), *Bordetella parapertussis* 12822 (NC002928) und von einer L-Prolin 4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. (D78338) verglichen. Anhand konservierter Aminosäuren und der Analyse in *S. salexigens* häufig genutzter Codons wurden die degenerierten Primer het-*ectD*_10 und het-*ectD*_10 (Tab. 4, Abb. 14) abgeleitet. Diese Primer wurden in eine PCR mit chromosomaler *S. salexigens* DNA als Matrize unter nicht stringenten Bedingungen eingesetzt.

Das resultierende 270 bp große DNA-Fragment wurde unter Benutzung des TOPO TA Cloning Kit in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) kloniert. Eines der erhaltenen Plasmide erhielt die Bezeichnung pBJ6. Die Analyse der DNA-Sequenz zeigte, dass es sich dabei um Sequenzfragment mit Homologie zu den potentiellen Ectoin-Hydroxylasen handelte.

Für die Klonierung eines genomischen DNA-Fragmentes aus *S. salexigens* mit dem vollständigen *ectD*-Gen, wurde chromosomale DNA aus diesem Organismus mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen, welche kompatible Enden zum λ-ZAP Express® Vektor erzeugen, geschnitten. In Southern-Blot-Analysen wurden diese Fragmente mit einer *ectD*-spezifischen DIG-DNA-Sonde (0,27 kb), mittels PCR von dem '*ectD*' Plasmid pBJ6 amplifiziert, hybridisiert. Eines der genomischen Fragmente die mit der Sonde hybridisierten, war ein 4,1 kb großes *Eco*RI Fragment. Die für die Klonierung des *ectABC* Fragmentes aus *S. salexigens* verwendete genomischen *Eco*RI Phagen-Genbank wurde auch für Southern-Hybridisierungen, entsprechend der λ-ZAP Express® Predigested Vector Kit Anleitung, mit der *ectD*-spezifischen DIG-DNA-Sonde benutzt. Für diese Southern-Hybridisierungen wurde die *ectD*-spezifische DIG-DNA-Sonde, die mittels PCR von dem '*ectD*' Plasmid pBJ6 amplifiziert worden war, benutzt.

Das aus dieser Genbank isolierte Derivat des pBK-CMV Phagemid-Vektors, pBJ9, enthielt ein Insert der Größe von 4,1 kb, welches das *ectD* Gen und flankierende Regionen aus *S. salexigens* beinhaltete.

5.9 Konstruktion eines Expressionssystemes für die Ectoin-Hydroxylase EctD

Das heterologe Expressionssystem pASK-IBA3 (IBA, Göttingen) wurde für die Klonierung des *ectD*-Genes aus *S. salexigens* verwendet, um das EctD-Protein in *E. coli* unter

der Kontrolle des Anhydrotetracyclin-induzierbaren *tet*-Promotors als *Strep*-tag® II Fusionsprotein zytoplasmatisch zu produzieren. Bei der Ableitung der Primer, der Klonierung und der Produktion des Proteines wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

Für die PCR wurden die Primer *S.s. ectD* 5' *Bsa*I_1 und *S.s. ectD* 3' *Bsa*I_st (Tab. 4) und chromosomale DNA aus *S. salexigens* als Matrize verwendet. Durch die Primer wird an beiden Seiten des amplifizierten DNA-Fragmentes eine artifizielle Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bsa*I (GGTCTC) geschaffen, mit welchen in den mit demselben Enzym geöffneten Vektor kloniert werden kann. Das resultierende Protein trägt carboxyterminal einen *Strep*-Affinitätstag. Das resultierende Derivat von pASK-IBA3 wurde als pBJ10 bezeichnet.

6 Biochemische Methoden

6.1 Proteine

6.1.1 Puffer

Alle für die FPLC verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert, um mikrobielle Verunreinigungen und Partikel zu entfernen (Porengröße 0,2µm, Schleicher und Schuell, Dassel). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Puffer A wurde immer frisch angefertigt.

Tabelle 9. Verwendete Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH
Puffer A	100 mM TES (N-[Tris(Hydroxymethyl)Methyl]-2-Aminoethansulfonsäure; pH 7,5), 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0,5 mM Benzamidin, 0,5 mM Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF), 0,4 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 5 % (vol/vol) Glycerol	7,5
Puffer B	25 mM TES	7,5
Puffer C	3 mM Kaliumphosphat	7,4
Puffer D	500 mM Kaliumphosphat	7,4
Puffer E	1,5 M $(NH_4)_2SO_4$ in Puffer B	7,5
Puffer F	80 mM NaCl, 20 mM TES	7,5
Puffer G	80 mM NaCl, 20 mM TES, 2,5 mM Desthiobiotin	7,5
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure; $C_6H_{13}NO_4S$	5,5 6,0 6,5
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure; $C_8H_{18}N_2O_6S_2$ (Piperazin-1,4-Bis(2-Ethanesulfonic acid); Piperazin-N,N′-Bis(2-Ethanesulfonic acid))	6,5 7,0

TES	N-[Tris(Hydroxymethyl)Methyl]-2-Aminoethansulfonsäure; $C_6H_{15}NO_6S$ (2-[(2-Hydroxy-1,1-Bis(Hydroxymethyl)Ethyl)Amino]Ethansulfonsäure; N-[Tris(Hydroxymethyl)Methyl]-2-Aminoethansulfonsäure)	7,0 7,5 8,0
BICINE	*N,N*-Bis(2-Hydroxyethyl)Glycin; $C_6H_{13}NO_4$	8,0 8,5 9,0
CHES	2-(Cyclohexylamino)Ethansulfonsäure; $C_8H_{17}NO_3S$	9,0 9,5 10,0

6.1.2 Säulenmaterial, Fertigsäulen und Geräte

Alle Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C unter oxischen Bedingungen durchgeführt. Für die chromatographische Reinigung wurde ein FPLC-System (**f**ast **p**erformance **l**iquid **c**hromatography) verwendet (Amersham Biosciences).

Tabelle 10. Verwendete Säulen.

Material	Dimension	Hersteller
Source 15 Q	22 ml Säulenvolumen ; XK16 (Amersham Biosciences)	Amersham Biosciences, Freiburg
CHT (Macro-Prep® Ceramic Hydroxyapatite TYPE I, 20 µm)	10 ml Säulenvolumen ; XK16 (Amersham Biosciences)	Bio-Rad Laboratories, München,
Source 15 Phe	20 ml Säulenvolumen ; XK16 (Amersham Biosciences)	Amersham Biosciences, Freiburg
Mono Q	HR 5/5	Amersham Biosciences, Freiburg
Superdex 75 prep grade	HiLoad 16/60	Amersham Biosciences, Freiburg
Strep-Tactin®-Sepharose®	10 ml Säulenvolumen ; XK16 (Amersham Biosciences)	IBA GmbH, Göttingen

6.1.3 Aktivitätstest für die Ectoin-Hydroxylase

Ectoin-Hydroxylase Aktivität in Zellextrakten und während der Reinigung des EctD-Proteines wurde durch die Messung des Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehaltes im Reaktionsgemisch durch HPLC-Analysen nachgewiesen. Es konnte eine Abnahme der Ectoin- und eine proportionale Zunahme der Hydroxyectoin-Konzentration gezeigt werden.

Ein Einheit (Unit, U) an Ectoin-Hydroxylase Aktivität ist definiert als die Reaktion von 1 µmol Ectoin zu 1 µmol Hydroxyectoin pro Minute.

Während der EctD Reinigung, wurde die Ectoin-Hydroxylase Aktivität in einem Testansatz mit einem Volumen von 30 µl untersucht. Dieses Reaktionsgemisch bestand aus 10 mM N-Tris(Hydroxymethyl)Methyl-2-Aminoethanesulfonsäure (TES) Puffer (pH 7,5), 10

mM 2-Oxoglutarat, 6 mM (*S*)-Ectoin, 1 mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,3 kU Katalase aus Rinderleber (Roche, Mannheim) und maximal 20 µl der zu untersuchenden Proteinfraktion. Jeder Testansatz wurde bei einer Temperatur von 32 °C für 20 Minuten in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) unter schütteln (700 rpm) inkubiert, um das Reaktionsgemisch effektiv mit Luft-Sauerstoff zu versorgen, da EctD ein O_2-abhängiges Enzym ist. Die Ectoin-Hydroxylase Reaktion wurde durch die Zugabe von 30 µl Acetonitril (100 %; J.T.Baker, Deventer, NL) und sofortiger Zentrifugation gestoppt (10 min, 4 °C; 32 000 x g).

Der Überstand dieses Reaktionsgemisches wurde mittels HPLC-Analyse (SYKAM, Fürstenfeldbruck) auf den Ectoin und Hydroxyectoin-Gehalt untersucht. 20 µl wurden auf eine GROM-SIL 100 Amino-1PR Säule (125 x 4 mm; 3 µm Partikelgröße; GROM, Rottenburg-Hailfingen) geladen, mit welcher die beiden Tetrahydropyrimidine voneinander getrennt werden können. Ectoin und Hydroxyectoin wurden durch ihre Absorption bei 210 nm unter Verwendung eines UV/VIS Detektors (LINEAR UVIS 205; SYKAM, Fürstenfeldbruck) nachgewiesen. Als mobile Phase für die Trennung der Tetrahydropyrimidine wurde 80 % Acetonitril (vol/vol) verwendet. Die Chromatographie wurde isokratisch mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt (Kunte *et al.* 1993).

Die Retentionszeiten von Ectoin und Hydroxyectoin wurden unter Verwendung käuflichen Ectoines und Hydroxyectoines als Referenz ermittelt. Für die Quantifizierung von Ectoin und Hydroxyectoin wurde das ChromStar 6 Programm (SCPA, Stuhr) verwendet.

Mit 2 mU des gereinigten EctD-Proteines und Verwendung des beschrieben Aktivitätstestes wurden die Eigenschaften des Enzymes bestimmt. In Abhängigkeit von der Reaktionszeit wird Hydroxyectoin unter diesen Bedingungen für etwa 10 Minuten linear aus Ectoin synthetisiert. Die kinetischen Parameter des Enzymes wurden von der Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten fünf Minuten der Reaktion bestimmt. Die Substratkonzentrationen lagen in einem Bereich von 0,5 mM bis 20 mM für (*S*)-Ectoin und 0,1 bis 15 mM für 2-Oxoglutarat.

6.1.4 Chromatographische Reinigung der Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens*

S. salexigens (DSM 11483^T) wurde in 4 l Minimalmedium (Garabito *et al.* 1997) mit 0,5 % Glucose, 1 % Casaminosäuren, Vitaminlösung (10 ml l^{-1}) und 3,2 M NaCl bis zu einer OD_{578} von 1,3 bis 1,5 bei 37 °C aerob kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 5000 x g) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Alle Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C unter oxischen Bedingungen durchgeführt. Für die chromatographische Reinigung wurde ein FPLC-System verwendet (Amersham Biosciences).

Für eine Reinigung wurden etwa 20 g (Feuchtgewicht) Zellen in 40 ml Puffer A resuspendiert. Die Zellen wurden durch eine viermalige Passage durch eine gekühlte (4 °C) French-Press-Zelle (16 000 PSI) aufgeschlossen. Mittels Ultrazentrifugation (1 h; 95 000 x g) wurden Zelltrümmer und Membranen entfernt. Der klare Überstand mit dem EctD-Protein wurde bei 4 °C für mindestes 4 Stunden gegen 5 Liter Puffer B dialysiert, um endogen synthetisiertes Ectoin und Hydroxyectoin, sowie das NaCl aus dem Kulturmedium zu entfernen. Mit einem Sterilfilter (0,45 µm, Schleicher und Schuell, Dassel) wurde der Extrakt anschließend filtriert und auf eine in Puffer B equilibrierte Source 15Q Säule geladen. Die geladene Säule wurde mit 70 ml Puffer B gewaschen, anschließend wurden die Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 bis 0,4 M NaCl in Puffer B; 200 ml) eluiert. Die Ectoin-Hydroxylase eluierte von dieser Säule bei etwa 180 mM NaCl in Puffer B. Die Fraktionen, welche Ectoin-Hydroxylase-Aktivität zeigten, wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (10 kDa Ausschlussgröße; Centricon YM-10, Millipore GmbH, Schwalbach) konzentriert und mit Puffer C entsalzt. Die Proteine wurden auf eine in Puffer C equilibrierte CHT-Säule geladen

und diese mit 50 ml Puffer C gewaschen. Die Proteine wurden in einem linearen Kaliumphosphat-Gradienten mit Puffer D (3 mM to 200 mM in 170 ml) eluiert. Die enzymatisch aktiven Fraktionen eluierten um 123 mM Kaliumphosphat, wurden vereinigt und in demselben Volumen 3 M $(NH_4)_2SO_4$ aufgenommen, um die Proteine auf eine in Puffer E equilibrierte Source 15Phe-Säule zu laden. Die beladene Säule wurde mit 50 ml Puffer E gewaschen und die Proteine wurden mit einem linearen Ammoniumsulfat-Gradienten (1,5 M bis 0 M $(NH_4)_2SO_4$ in Puffer B; 200 ml) eluiert. Die Ectoin-Hydroxylase eluierte von der Source 15Phe-Säule bei circa 970 mM $(NH_4)_2SO_4$. Die Fraktionen mit Ectoin-Hydroxylase-Aktivität wurden vereinigt, konzentriert (10 kDa Ausschlussgröße; Centricon YM-10), mit Puffer B entsalzt und auf eine MonoQ-Säule aufgetragen, welche mit Puffer B equilibriert worden war. Die geladene Säule wurde mit 10 ml Puffer B gewaschen und die Proteine wurden in einem linearen NaCl-Gradienten (0 bis 0,5 M NaCl in Puffer B; 30 ml) eluiert. EctD eluierte von der MonoQ-Säule bei ungefähr 180 mM NaCl. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert (10 kDa Ausschlussgröße; Centricon YM-10) und auf eine HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Säule wurde in Puffer B mit 150 mM NaCl bei einer Temperatur von 25 °C equilibriert. Fraktionen mit Ectoin-Hydroxylase-Aktivität wurden isokratisch mit Puffer B mit 150 mM NaCl nach 56 ml eluiert.

Das gereinigte Enzym wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die enzymatischen Tests auf Ectoin-Hydroxylase-Aktivität der jeweiligen Fraktion wurde wie unter 6.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Reinigung der Ectoin-Hydroxylase und die Reinheit des EctD-Proteines wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert.

6.1.5 Heterologe Expression und Reinigung der Ectoin-Hydroxylase

Für die heterologe Expression und die Reinigung des *S. salexigens* EctD Proteines wurde der *E. coli* Stamm DH5α benutzt, welcher das Plasmid pBJ10 trägt. Dieses Plasmid ist ein Derivat des Vektors pASK-IBA3 und verfügt über das Strukturgen *ectD* des EctD Proteines aus *S. salexigens* unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors.

Eine 10 l Glasflasche mit 5 l MMA (Miller 1992) mit Ampicillin (100 µg ml^{-1}), Glucose (0,5 % (wt/vol)), Casaminosäuren (0,2 % (wt/vol)), Spurenelemente-Lösung (Harwood 1990) und $FeSO_4$ (1 mM) wurde auf eine OD_{578} von 0,1 von einer Übernachtkultur, welche in dem gleichen Medium kultiviert worden war inokuliert und bei 37 °C aerob bis zum Erreichen einer OD_{578} von 0,5 inkubiert. Die Transkription des *ectD*-Genes von dem plasmidkodierten *tet*-Promoter in pBJ10 wurde durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin (0,2 mg l^{-1}) induziert. Nach zwei Stunden weiterer Kultivierung zur Produktion des EctD Proteines, wurden die Zellen durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 5000 x g) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

Alle Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C unter oxischen Bedingungen durchgeführt. Für die chromatographische Reinigung wurde ein FPLC-System benutzt (Amersham Biosciences).

Für eine Reinigung wurden etwa 7 g (Feuchtgewicht) der gefrorenen Zellen in 20 ml Puffer A resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch viermalige Passage durch eine gekühlte (4 °C) French Press Zelle (16 000 PSI). Nach der Entfernung von Zelltrümmern und Membranen durch Ultrazentrifugation (1 h; 95 000 x g), wurde der EctD-enthaltende Überstand filtrierte (0,45 µm). Der Zellextrakt wurde auf eine *Strep*-Tactin® Affinitätssäule (IBA, Göttingen) geladen, welche mit Puffer F equilibriert worden war. Die Säule wurde mit fünf Säulenvolumen gewaschen und das gebundene *Strep*-tag®-EctD Protein wurde durch waschen mit Puffer G vom Säulenmaterial eluiert. Die Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-

PAGE auf Gehalt und Reinheit von EctD analysiert und die EctD-haltigen Fraktionen wurden vereinigt.

Das gereinigte EctD Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Durchschnittlich konnten etwa 1,5 mg EctD Protein aus einem Liter Kultur gereinigt werden.

6.1.6 *In vivo* Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin in *Escherichia coli* DH5α (pBJ10)

Für die heterologe Expression des *S. salexigens ectD*-Genes wurde der *E. coli* Stamm DH5α benutzt, welcher mit dem *ectD* tragenden Plasmid pBJ10 transformiert worden war. Dieser *ectD*$^+$ Stamm wurde in Minimalmedium A (MMA; (Miller 1992) mit Ampicillin (100 µg ml^{-1}), Glukose (0,5 % (wt/vol)), Casaminosäuren (0,2 % (wt/vol)), Spurenelemente-Lösung (Harwood 1990), $FeSO_4$ (1 mM), Ectoin (5 mM) und NaCl (250 mM) bei 37 °C aerob kultiviert. Als Negativkontrolle wurde der *E. coli* Stamm DH5α mit dem leeren Vektor pASK-IBA3 (IBA, Göttingen) transformiert und in den Versuchen eingesetzt.

Das Medium wurde auf eine OD_{578} von 0,1 aus einer Übernachtkultur in dem gleichen Medium, aber ohne Ectoin, inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C unter rühren bis zu einer OD_{578} von 0,5 kultiviert. Die Transkription des *ectD*-Genes von dem plasmidkodierten *tet*-Promoter in pBJ10 wurde durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (0,2 µg ml^{-1}) induziert. Die induzierten Kulturen wurden für eine weitere Stunde inkubiert, um eine Synthese des EctD-Proteines und die enzymatische Reaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin zu ermöglichen. Proben der Kulturen wurden nach 30 und 60 Minuten für eine HPLC-Analyse durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 5000 x g) geerntet.

6.1.7 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Größenbestimmung von Proteinen und zur Reinheitskontrolle des gereinigten EctD Proteins wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet. Die 12,5 %igen Polyacrylamid-Gele wurden nach den Angaben in Tabelle 11 gefertigt. Die Gel-Elektrophorese wurde in einer BioRad Elektrophorese Apparatur (Mini Protean II oder III; Bio-Rad Laboratories, München) durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden in Probenpuffer (240 mM Tris/HCl, pH 6,8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 10 mM DTT; 0,0004 % Bromphenolblau) aufgenommen, für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend direkt auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 35 mA in Laufpuffer (50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1 % SDS (wt/vol)). Als Größenstandard diente der Dalton Marker VII (Sigma, Deisenhofen) oder „Protein Molecular Weight Marker“ #SM0431 (Fermentas, Leon-Roth).

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurden die Gele 15 Minuten in einer Lösung, die aus 0,05 % (wt/vol) Coomassie Brillant Blau R250 in Wasser/Isopropanol/Eisessig (65:25:10, (vol/vol/vol)) bestand, bei ca. 80 °C inkubiert. Das Entfernen von nicht gebundenem Farbstoff erfolgte anschließend in einer Mischung aus Wasser/Isopropanol/Eisessig (81:12:7, (vol/vol/vol)).

Tabelle 11. Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele.

Lösungen	Zusammensetzung
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (Roth)	30 % Stammlösung, Verhältnis 37,5:1
Trenngel	12 %-ig: 4 ml Acrylamidlösung; 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) mit 0,1 % SDS; 3,5 ml H_2O; 10 µl Temed[a] (Roth), 40 µl 10 % APS[b]
Sammelgel	3 %-ig: 1,1 ml Acrylamidlösung; 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) mit 0,1 % SDS, 6,5 ml H2O, 20 µl Temed[a] (Roth), 40 µl 10 % APS[b]

[a] N,N,N´,N´-Tetramethyldiamin, [b] Ammoniumperoxidisulfat

6.1.8 Transfer von Proteinen auf Membranen

Für die Immunodetektion von EctD in *S. salexigens* Zellextrakten wurden pro Spur eines 12,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgels 30 µg Zellextrakt von Zellen, die bei den jeweils im Ergebnisteil angegebenen Bedingungen gezogen wurden, aufgetrennt. Als Größenstandard diente der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ #SM0671 (Fermentas, Leon-Rot). Die Proteine wurden anschließend in einer Mini-Blot Apparatur (BioRad, München) in Blot-Puffer (100 mM Tris-Glycin (pH 7,5); 100 mM NaCl; 20 % Methanol) bei 100 V für eine Stunde auf eine PVDF-Membran (Immobilon™-P; Millipore, Schwalbach) übertragen (Towbin *et al.* 1979).

6.1.9 Sequenzierung der aminoterminalen Aminosäuren

Für die Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz der aus *S. salexigens* gereinigten Ectoin-Hydroxylase wurde das Protein mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend in einer Mini-Blot Apparatur (BioRad, München) in Blot-Puffer (100 mM Tris-Glycin (pH 7,5); 100 mM NaCl; 20 % Methanol (HPLC-grade)) bei 100 V für eine Stunde auf eine Polyvenylidendifluorid (PVDF) Membran (Immobilon™-P, Millipore, Schwalbach) übertragen. Nach Anfärben des Proteines mit Coomassie Brillant Blau Färbelösung (0,05 % (wt/vol) Coomassie Brillant Blau R250 in Wasser/Isopropanol/Eisessig (65:25:10, (vol/vol/vol)) wurde die Proteinbande ausgeschnitten, gewaschen und zur aminoterminalen Sequenzierung durch sequenziellen Edman-Abbau an das Universitätsklinikum Münster, AG Proteinanalytik (Prof. G. Mersmann) geschickt.

6.1.10 Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot Analyse)

6.1.10.1 Herstellung eines EctD-spezifischen Antiserums

Um ein spezifisches Antiserum gegen EctD aus *S. salexigens* zu erhalten, wurden Aliquots von je 100 µl aus *S. salexigens* gereinigten EctD-Proteines (0,5 mg ml^{-1}; in 5 mM TES-Puffer) mit je 100 µl „AdjuPrime“ Lösung (10 mg ml^{-1}; Pierce, Rockford, Il., USA) gemischt. Von dieser Lösung wurden über einen Zeitraum von drei Monaten acht mal je 100 µg EctD in einen Hasen injiziert, dessen Blut zehn Tage nach der letzten Injektion zur Gewinnung des Antiserums verwendet wurde. Das EctD-Antiserum wurde in Western-Blot Analysen (1:8000 verdünnt) mit aus *S. salexigens* gereinigtem EctD-Protein und löslichen Proteinextrakten von *S. salexigens* auf seine Spezifität getestet.

6.1.10.2 Immunologische Detektion von EctD mit einem spezifischen Antiserum

Für den immunologischen Nachweis des EctD-Proteines in *S. salexigens*, wurde dieser bei 37 °C aerob in Minimalmedium (Garabito *et al.* 1997) bei den angegebenen NaCl-Konzentrationen bis zu den angegebenen OD_{578} kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min; 4 °C; 2800 x g) geerntet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation (4 °C, 20 min, 32 000 x g) von Zelltrümmern und Membranen getrennt. Vom Überstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt und gleiche Konzentrationen in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran (Immobilon™-P, Millipore) erfolgte wie unter 6.1.8 angegeben.

Die mit Protein beladenen PVDF-Membranen wurden zunächst über Nacht in TBST-Lösung (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20 (vol/vol)) mit 5 % Milchpulver inkubiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit dem EctD-spezifischen Antiserum in einer Verdünnung von 1:8000 in TBST mit 5 % Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Als zweiter Antikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase-konjugierter Ziege-anti-Hase-Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH München), der 1:8000 in TBST mit 5 % Milchpulver verdünnt wurde. Nach einstündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran zweimal für 10 Minuten in TBST gewaschen und anschließend in AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$) equilibriert. Die Detektion erfolgte in einem Phosphorimager (Storm 860, Amersham Biosciences; Freiburg) mit ECF-Vistra (Amersham Biosciences; Freiburg) als Substrat. Für die Analyse der Daten wurde die Software von Molecular Dynamics. Inc verwendet.

6.1.11 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) wurde das Bio Rad-Protein Assay von BioRad-Laboratories (München) verwendet. Als Referenz wurde Rinder-Serumalbumin (BSA, Amersham Biosciences, Freiburg) benutzt. Für eine Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 0,8 ml Probe oder Standard (0-20 µg) mit 0,2 ml Bio-Rad-Reagenz versetzt, und die Absorption der Lösung bei 595 nm (Ultrospec 2000 oder Ultrospec 3100 *pro*, Amersham Biosciences, Freiburg) nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bestimmt.

Die Proteinkonzentration des gereinigten Enzymes wurde mittels der Absorption bei 280 nm und des spezifischen Extinktionskoeffizienten (kalkuliert nach der Aminosäuresequenz) berechnet. Für das EctD- *Strep*-tag® II Fusionsprotein wurden die zehn zusätzlichen Aminosäuren des *Strep*-tag® bei der Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten berücksichtigt

6.1.12 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Eisen wurde kolorimetrisch mit Ferene [3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(5-Sulfo-2-Furyl)-1,2,4-Triazin] als Komplex quantifiziert (Pierik *et al.* 1992).

Zur Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen wurden folgende Lösungen verwendet:

1 %	HCl
7,5 %	Ammoniumacetat
2,5 %	Natriumdodecylsulfat (SDS)
4 %	Ascorbinsäure, frisch
1,5 %	Ferene [3-(2-Pyridyl)-5,6-Bis(5-Sulfo-2-Furyl)-1,2,4-Triazin], Eisenchelator
0,2 M	$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ x 6 H_2O, frisch, Eisenstandard

Nicht-Häm-Eisen wurde mit Salzsäure aus dem Protein freigesetzt und nach Reduktion mit Ascorbinsäure zu Fe^{2+} kolorimetrisch als Ferene-Komplex nachgewiesen. Dazu wurden die Proben (gereinigtes Protein) bzw. der Standard auf 100 µl verdünnt und mit 100 µl 1 % HCl versetzt und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und nacheinander mit folgenden Lösungen versetzt:

500 µl 7,5 % Ammoniumacetat, jeweils 100 µl 4 % Ascorbinsäure, 2,5 % SDS und Ferene. Nach Zentrifugation für 10 min bei 9000 × *g* wurde die Absorption bei 593 nm gegen Wasser gemessen.

6.1.13 Ectoin-Hydroxylase-Aktivitätstest unter anoxischen Bedingungen

Für einen Aktivitätstest der Ectoin-Hydroxylase EctD unter anoxischen Reaktionsbedingungen, wurden alle Komponenten des Reaktionsgemisches für 6 Stunden in einem Anaerobenzelte (Coy Laboratories, Ann Arbor MI, USA) offen gelagert, um in ihnen gelösten Sauerstoff zu entfernen. Die Atmosphäre im Zelt bestand aus einem Stickstoff-Wasserstoff-Gemisch (Formiergas 95 % N_2 und 5 % H_2; Messer Griesheim, Düsseldorf).

Der Aktivitätstest wurde wie unter 6.1.3 beschrieben durchgeführt. Direkt nach dem Ausschleusen aus dem Zelt wurde das Acetonitril zugegeben und direkt zentrifugiert (10 min, 4 °C; 32 000 x g) und anschließend mittels HPLC-Analyse analysiert (6.1.3).

6.1.14 Bestimmung der molekularen Masse eines Proteins mittels MALDI-TOF MS

Die molekulare Masse des aus *S. salexigens* gereinigten Enzymes EctD wurde mittels MALDI-TOF MS (**m**atrix **a**ssisted **l**aser **d**esorption **i**onization - **t**ime **o**f **f**light **m**ass **s**pectrometry) bestimmt. Ein µl verschiedener Verdünnungen des gereinigten Enzymes wurden mit gesättigter Sinapinsäure (in 0,1% Trifluoressigsäure; 67% Acetonitril) auf dem Probenträger gemischt und an der Luft getrocknet. Die anschließende Messung der Proben erfolgte in einem PerSeptive Biosystems Voyager-DE^{TM}RP Spectrometer (Applied Biosystems, Langen). Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die vom Hersteller mitgelieferte Software.

6.1.15 Bestimmung der relativen molekularen Masse eines Proteins mittels Gelfiltrations-Chromatographie

Die relative molekulare Masse des aus *S. salexigens* gereinigten EctD-Proteines wurde mittels Gelfiltrations-Chromatographie mit einer HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säule (Amersham Biosciences; Freiburg) bestimmt. Als Laufpuffer wurde Puffer B mit 150 mM NaCl benutzt und das gesamte System bei einer Temperatur von 25 °C betrieben.

Aprotinin der Rinder Lunge (6,5 kDa), Cytochrom C aus Pferdeherz (12,4 kDa), Carbonat Dehydratase aus Rinder Erythrozyten (29 kDa), Albumin aus Rinder Serum (66,2 kDa) and Dextran blue (2000 kDa) wurden als Referenz für die molekularen Massen benutzt (Sigma-Aldrich, München).

6.1.16 ^{1}H- Nuclear Magnetic Resonance-Spektroskopie

Das Produkt der von EctD katalysierten *in vitro* Reaktion, Hydroxyectoin, wurde mit ^{1}H-NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Dazu wurde mittels HPLC-Analyse überprüft, ob das Substrat Ectoin vollständig zu Hydroxyectoin umgesetzt wurde. Mittels Ultrafiltration (10 kDa Ausschlussgröße; Centricon YM-10, Millipore GmbH, Schwalbach) wurde das Protein abgetrennt, der Überstand lyophilisiert und anschließend in 0,5 ml D_2O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) und 0,5 ml D_2O mit internem Standard TSP (d4-3-Trimethylsilyl-Propionat; 7,5 mg) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) aufgenommen.

Die Messung erfolgte mit einem Bruker AC300 Spektrometer am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Hydroxyectoin *Marinococcus sp*. M52 der Firma Biomol wurde als Referenz unter gleichen Bedingungen vermessen.

6.2 HPLC Analyse

Bei allen für die HPLC (**h**igh-**p**erformance **l**iquid **c**hromatography) Analysen verwendeten Chemikalien und Lösungen handelte es sich um chromatographiereine Produkte (HPLC-Gradient oder HPLC-Ultra Grade) der Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Deisenhofen), J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) oder Merck (Darmstadt).

Die für den Nachweis und die Quantifizierung von Ectoin und dessen Derivaten, sowie von Prolin und dessen Derivaten wurde eine HPLC-Anlage der Firma Sykam (Fürstenfeldbruck) verwendet, die aus Autosampler (S5200), Säulenofen (S4011), Pumpensystem (S1121), „Low pressure gradient"-Mixer (S8111) und Vakuumdegaser (S7505) bestand.

6.2.1 HPLC-Analyse von Ectoin, Hydroxyectoin, Homoectoin und DHMICA

6.2.1.1 HPLC-Analyse von Ectoin und Hydroxyectoine aus Zellextrakten

Kulturen (80 ml) von *S. salexigens* wurden in Minimalmedium (Garabito *et al.* 1997) mit den angegebenen NaCl Konzentrationen bei 37 °C aerob bis zum Erreichen einer OD_{578} von 1 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min; 4 °C; 2800 x g) geerntet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Extraktion erfolgte mittels einer nach Bligh und Dyer (Bligh & Dyer 1959; Kunte *et al.* 1993) modifizierten Methode zur Extraktion kompatibler Solute. Diese Methode dient dazu, die Membranen ganzer Zellen aufzulösen und die Inhaltsstoffe freizusetzen. Die Zellpellets wurden zu diesem Zweck über Nacht in einem Christ Alpha 1-4-Lyophilisator (B. Braun Biotech, Melsungen) gefriergetrocknet und ihr Trockengewicht bestimmt. Die getrockneten Zellen wurden dann in 500 µl Methanol/Chloroform/Wasser 10:5:4 (vol/vol/vol) aufgenommen und zunächst für 15 Minuten in einem Ultraschallbad und anschließend für weiter 60 Minuten auf einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur homogenisiert. Danach wurden gleiche Mengen (jeweils 130 µl) Chloroform und Wasser zugegeben und die Suspension wurde weitere 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 21000 x g) wurde die Methanol/Wasser-Phase (450 µl), welche unter anderem die Tetrahydropyrimidine enthielt, abgenommen und bei 50 °C über Nacht eingetrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl Wasser und 400 µl Acetonitril resuspendiert, falls notwendig in 80 % Acetonitril (vol/vol) verdünnt. Der Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt der Zellen wurde mittels isokratischer HPLC-Analyse bestimmt (Kuhlmann & Bremer 2002).

Für die Analyse wurden 20 µl Probe auf einer GROM-SIL 100 Amino-1PR Säule (125 x 4 mm; 3 µm Partikelgröße; GROM, Rottenburg-Hailfingen) mit 80 % Acetonitril (vol/vol) als mobile Phase bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} und einer Temperatur von 20 °C aufgetrennt. Ectoin und Hydroxyectoin wurden durch ihre Absorption bei 210 nm unter Verwendung eines UV/VIS Detektors (LINEAR UVIS 205; SYKAM, Fürstenfeldbruck) nachgewiesen. Die Säulenkartusche stammte aus dem LiChroCart-Programm der Firma Merck (Darmstadt).

Für die Quantifizierung von Ectoin und Hydroxyectoin wurde das ChromStar 6 Programm (SCPA, Stuhr) verwendet. Als Referenz für die Retentionszeit und die konzentrationsabhängige Absorption bei 210 nm wurden käufliche Proben von Ectoin und Hydroxyectoin verwendet.

6.2.1.2 HPLC-Analyse von Homoectoin und DHMICA

Für die Detektion der synthetischen Ectoin-Derivate Homoectoin und DHMICA bzw. ihrer hydroxylierten Derivate nach dem Aktivitätstest mit der gereinigten Ectoin-Hydroxylase, wurde die gleiche Methode wie für den Nachweis und die Quantifizierung von Ectoin und Hydroxyectoin benutzt. Auch diese Substanzen sind durch ihre Konzentrationsabhängige Absorption bei 210 nm detektierbar.

6.2.2 HPLC Analyse von Prolin und Hydroxyprolin

Prolin wurde als Substrat in den Aktivitätstest der Ectoin-Hydroxylase eingesetzt und wurde mittels HPLC-Analyse nachgewiesen und Quantifiziert. Dazu wurde eine HPLC-Methode zum Nachweis von Aminosäuren mittels Vorsäulen-Derivatisierung (FMOC/ADAM) verwendet (Kunte *et al.* 1993). Mit dieser Methode war es ebenfalls möglich, die potentiellen Produkte einer EctD-katalysierten Prolin-Hydroxylierung, 3-Hydroxyprolin und 4-Hydroxyprolin, zu quantifizieren.

Der Aktivitätstest wurde wie unter 6.1.3 beschrieben durchgeführt, allerdings wurde nicht Ectoin, sondern L-Prolin als Substrat in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde nicht durch Zugabe von Acetonitril gestoppt, sondern wurde direkt ultrafiltriert (Vivaspin 0,5 ml Konzentrator; 10 kDa Ausschlussgröße, VivaScience, Hannover), um das EctD-Protein zu entfernen. Das Filtrat wurde anschließend mit 9-Fluorenyl-Methoxycarbonyl Chlorid (FMOC) derivatisiert. Als mögliche Produkte einer Hydroxylierung des eingesetzten L-Prolin wurden 3-Hydroxy DL-Prolin and 4-Hydroxy L-Prolin als Referenz verwendet und mit FMOC modifiziert.

FMOC reagiert schnell sowohl mit primären als auch mit sekundären Aminen und bildet intensiv fluoreszierende bei Raumtemperatur über 30 Stunden stabile Derivate. FMOC wird im Überschuss zugesetzt, um eine quantitative Umsetzung der Aminosäuren zu erzielen. Da jedoch FMOC selbst und der durch Hydrolyse und Decarboxylierung entstehende Fluorenylalkohol (FMOC-OH) gleichzeitig mit einigen derivatisierten Aminosäuren von der Säule eluieren und eine Auswertung des Chromatogrammes damit erschweren, muss der Überschuss entfernt werden. In einem zweiten Schritt wird FMOC durch die Zugabe von ADAM umgesetzt. Dieses Derivat ist hydrophober als die Derivate der zu analysierenden Aminosäuren und eluiert daher am Ende des Programms.

Für die Modifikation der Aminosäuren wurde der FMOC-Aminoadamantan (1-ADAM) Vorsäulen-Derivatisierungs-Methode der Firma Grom in leicht modifizierter Form gefolgt. Zu 40 µl Natriumborat-Puffer (0,5 M, pH 7,7) wurden 40 µl Probe zugegeben. Schließlich wurden 80 µl FMOC-Reagenz II (Grom) zugefügt, das Gemisch für 45 s gevortext, danach 100 µl ADAM Reagenz (40 mM ADAM in 0,5 M Boratpuffer pH 7,7/Aceton 1:1 (vol/vol)) zugefügt. Das ADAM Reagenz reagierte dann mit dem Überschuss des Fluoreszenzfarbstoffes FMOC unter Vortexen für 45 s. Anschließend wurden 140 µl Laufpuffer A (20 % Acetonitril, 0,5 % Tetrahydrofuran, 80 % 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5) der Mischung zugesetzt, und 10 µl der derivatisierten Probe wurden auf einer GROM-SIL 120 ODS-4 HE Säule (reversed phase-Matrix; 75 x 4 mm; 3 µm Partikelgröße; GROM, Rottenburg-Hailfingen) aufgetrennt. Die Vorsäule hatte eine Größe von 10 x 4 mm und war mit demselben Säulenmaterial gefüllt. Die chromatographische Trennung der Aminosäuren wurde bei einer Flussrate von 0,75 ml min^{-1} und bei 45 °C (Säulentemperatur) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor „FP-2020 plus“ (Jasco; Easton, MD, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm und einer Emissionswellenlänge von 316 nm. Die Retentionszeiten der einzelnen Aminosäuren wurden unter Verwendung käuflicher Proben von L-Prolin, 3-Hydroxy DL-Prolin and 4-Hydroxy L-Prolin bestimmt.

Für die Aufzeichnung, Identifizierung und Quantifizierung der Detektorsignale wurde das ChromStar 6 Programm verwendet (SCPA, Stuhr).

Tabelle 12. Gradient für die Auftrennung FMOC-derivatisierter Aminosäuren.

Zeit (min)	Puffer A (%) (20 % Acetonitril, 0,5 % Tetrahydrofuran, 75 % 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5)	Puffer B (%) (80 % Acetonitril, 20 % 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5)
0	100	0
2	100	0
17	91	9
25	70	30
27	0	100
32	0	100
34	100	0
39	100	0

7 Computergestützte Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem Programm Vector NTI 8.0 (Invitrogen Bioinformatics, Karlsruhe) analysiert. Die Suche nach Homologen in Datenbanken mit kompletten und noch nicht beendeten Genomprojekten anderer Organismen wurden über das Internet am National Center for Biotechnology Informations (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), bei PEDANT (pedant.gsf.de), am Sanger Institute (www.sanger.ac.uk), bei JGI (genome.jgi-psf.org) und bei TIGR (www.tigr.org) unter Verwendung des BLAST-Programmes (Altschul *et al.* 1997). Für den Vergleich der Aminosäuresequenzen wurde das Programm Vector NTI 8.0 (Invitrogen Bioinformatics, Karlsruhe) mit dem Clustal W Algorithmus unter Verwendung der Standardeinstellungen benutzt (Thompson *et al.* 1994). Die Werte der Sequenzidentitäten der Proteine wurden mit Vector NTI berechnet und basieren auf dem Vergleich der Aminosäuresequenzen.

7.1 Zugriffsnummern der Nukleotidsequenzen

Die Sequenz der *ectABC*-Region aus *S. salexigens* ist in der Datenbank Genbank des NCBI unter der Zugriffsnummer AY935521 und die *ectD*-Region aus diesem Organismus unter AY935522 abgelegt.

VI Ergebnisse

1 *De novo* Biosynthese von Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*

Die ^{13}C-Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie (NMR, **N**uclear **M**agnetic **R**esonance) wird häufig benutzt, um die domininaten organischen Osmolyte zu identifizieren, die von Mikroorganismen unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen synthetisieren werden (Tab. 1). Entsprechende Analysen verschiedener Gram-positiver Bakterien zeigten, dass die *de novo* Ectoin-Biosynthese unter hochosmolaren Bedingungen im Genus *Bacillus* und in nah verwandten Genera weit verbreitet ist. Außerdem gibt es innerhalb der Ectoin synthetisierenden Bakterien eine Subgruppe, die zusätzlich das hydroxylierte Ectoin-Derivat, Hydroxyectoin, synthetisieren kann.

Durch ^{13}C-NMR-Analysen konnte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in *S. salexigens* nachweisen (Bursy 2001). Die Fähigkeit zur Hydroxyectoin-Biosynthese macht diese Subgruppe halophiler *Bacilli* besonders interessant, da sowohl die beteiligten Enzyme, die katalysierte Reaktion, als auch die Strukturgene der verantwortlichen Enzyme bislang nicht identifiziert worden waren. Als ein Vertreter dieser Gruppe wurde *S. salexigens* als Modellorganismus für die Untersuchung der Hydroxyectoin-Biosynthese gewählt, da er der erste Mikroorganismus aus dem Genus *Bacillus* war, bei welchem die *de novo* Synthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin nachgewiesen wurde (Kuhlmann 2002).

Alle Untersuchungen zur Akkumulation oder *de novo* Biosynthese kompatibler Solute wurden in definiertem Minimalmedium durchgeführt, um eine Akkumulation durch Transport dieser in Vollmedien vorkommenden kompatiblen Soluten zu vermeiden.

1.1 Die Ectoin-Biosynthese in Abhängigkeit von der Salinität des Mediums

Um die Abhängigkeit der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese von der Salinität des Wachstumsmediums zu untersuchen, wurde *S. salexigens* in Minimalmedium mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen von 0,1 M NaCl, als minimale Salzkonzentration für diesen halophilen Mikroorganismus, bis 2,0 M NaCl kultiviert. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578} von ungefähr 1 geerntet und der Ectoin- und Hydroxyectoingehalt per HPLC-Analyse (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie) bestimmt. Die Menge des *de novo* synthetisierten Ectoines steigt in direkter Abhängigkeit von der externen Salzkonzentration an. Diese lineare Korrelation von intrazellulärem Ectoingehalt und externer Salzkonzentration ist fast über den gesamten getesteten Bereich hinweg zu erkennen. Der kleine nicht-lineare Anfangsbereich (0,1 M bis 0,2 M NaCl) ist wahrscheinlich mit einem gewissen Basislevel an Ectoin-Biosyntheseaktivität auch in Abwesenheit von Salzstress zu erklären. Ein Indiz für die Existenz eines solchen Basislevels an Ectoin-

Biosynthese ist auch auf transkriptioneller Ebene im Northern-Blot (Abb. 13) zu erkennen, da auch schon bei 0,4 M NaCl ein *ectABC*-Transkript detektierbar ist.

Obwohl die exponentiell wachsenden *S. salexigens* Zellen Ectoin in substantiellen Mengen akkumulieren, ist Hydroxyectoin in diesen Zellen nicht nachweisbar (Abb. 10). Dieses Ergebnis bestätigt auch die ^{13}C-NMR-Experimente, in denen ebenfalls die Signale von Hydroxyectoin erst in den Extrakten von *S. salexigens* Zellen der späten exponentiellen und der stationären Wachstumsphase zu detektieren waren (Bursy 2001).

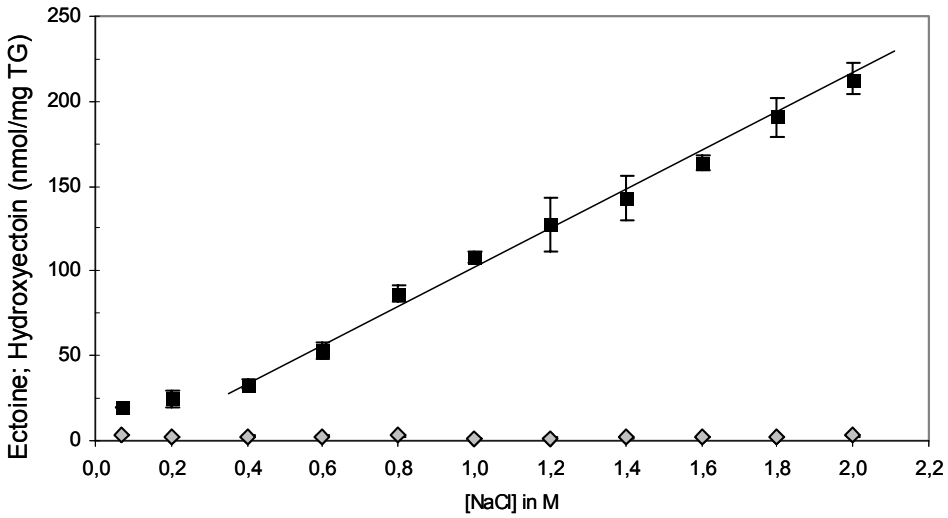


Abbildung 10. Akkumulation von Ectoin und Hydroxyectoin durch osmotisch regulierte Biosynthese in *Salibacillus salexigens*.

Dargestellt ist der durch *de novo* Biosynthese intrazellulär akkumulierte Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt während der exponentiellen Wachstumsphase von *S. salexigens*. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit den angegebenen NaCl Konzentrationen bei 37 °C kultiviert, bei einer OD_{578} von 1 geerntet und der Gehalt an Ectoin und Hydroxyectoin mittels HPLC-Analyse bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Experimenten.

1.2 Hydroxyectoin-Biosynthese in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Die ^{13}C-NMR Experimente (Bursy 2001) und die HPLC-Analysen der Zellextrakte hatten bereits gezeigt, dass die Hydroxyectoin-Biosynthese hauptsächlich zum Ende der exponentiellen bzw. in der stationären Wachstumsphase stattfindet. Obwohl die exponentiell wachsenden *S. salexigens* Zellen bei höheren NaCl-Konzentrationen einen beachtlichen Gehalt an Ectoin aufweisen, ist die Hydroxyectoin-Akkumulation in diesen Zellen kaum messbar (Abb. 10). Um dieses Phänomen der wachstumsphasenabhängigen Hydroxyectoin-Biosynthese weitergehend zu untersuchen, wurde *S. salexigens* in Minimalmedium mit 3,2 M NaCl kultiviert. An den in Abbildung 11 markierten Zeitpunkten wurde die OD_{578} bestimmt und Proben für eine HPLC-Bestimmung des Ectoin-Gehaltes entnommen. Der ermittelte Gehalt an Ectoin und Hydroxyectoin wurden entlang der Wachstumskurve in Abbildung 11 aufgetragen. Die Akkumulation von Ectoin durch *de novo* Synthese beginnt direkt nach dem Überimpfen in das hypersaline Wachstumsmedium, wohingegen zu diesem Zeitpunkt noch

keine Hydroxyectoin-Akkumulation zu erkennen ist. Hydroxyectoin ist erst detektierbar, wenn sich die Kultur in der späten exponentiellen und stationären Wachstumsphase befindet. Das Maximum an akkumuliertem Hydroxyectoin wird erreicht, wenn die Kultur aufgehört hat zu wachsen. In dieser stationären Wachstumsphase ist immer ein Gemisch aus Ectoin und Hydroxyectoin zu finden. Dies zeigt, dass die Zellen nur einen Teil des akkumulierten Ectoines zu Hydroxyectoin umwandeln.

Die Hydroxylierung von Ectoin scheint also nicht nur von der Verfügbarkeit des Substrates Ectoin, sondern auch von der Wachstumsphase abhängig zu sein. Es konnte auch eine Abhängigkeit vom der Sauerstoffversorgung der Kultur beobachtet werden. Mit zunehmendem Volumen und damit schlechterer Durchlüftung mit Sauerstoff, werden bei gleicher OD_{578} geringere Konzentrationen an Ectoin und Hydroxyectoin produziert.

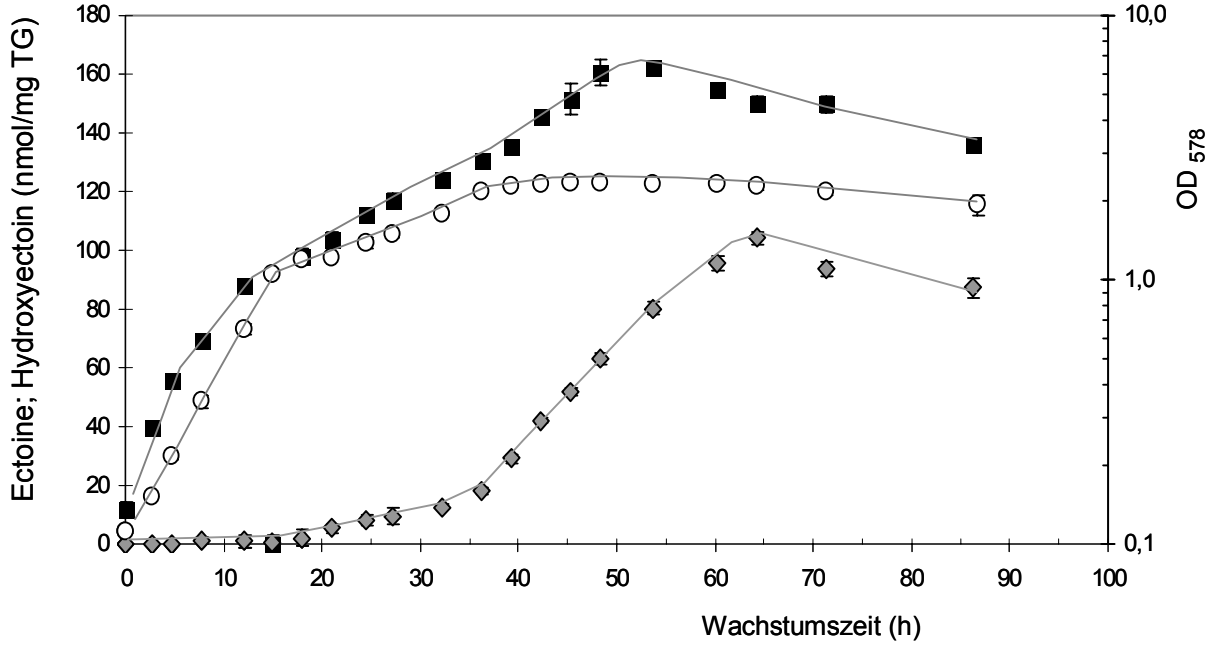


Abbildung 11. Akkumulation von Ectoin und Hydroxyectoin durch *de novo* Biosynthese. Dargestellt ist der intrazelluläre Gehalt des durch *de novo* Biosynthese akkumulierten Ectoines (■) und Hydroxyectoines (♦) nach der jeweiligen Wachstumszeit und bei der angegebenen OD_{578} (o) in *S. salexigens* bei Wachstum unter hypersalinen Bedingungen. *S. salexigens* wurde in Minimalmedium mit 3,2 M NaCl bei 37°C aerob kultiviert. An den angegeben Zeitpunkten wurden die OD_{578} bestimmt und Proben der Kultur geerntet und der Gehalt an Ectoin und Hydroxyectoin mittels HPLC-Analyse bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

2 Isolierung und Charakterisierung der Ectoin-Biosynthese-Gene *ectABC* aus *Salibacillus salexigens*

2.1 Klonierung der Ectoin-Biosynthese-Gene *ectABC*

Um die Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese auf molekularer Ebene zu analysieren, sollten die entsprechenden Strukturgene aus *S. salexigens* isoliert und im Hinblick auf Organisation und Regulation untersucht werden.

Die Gene für die Ectoin-Biosynthese (*ectABC*) wurden bereits aus diversen Gram-positiven und Gram-negativen *Bacteria* isoliert. Die anfängliche Arbeitshypothese ging von der Möglichkeit aus, dass das Strukturgen für die Ectoinhydroxylase, *ectD*, mit den Genen für die Ectoinbiosynthese, *ectABC* als Gencluster in direkter Abfolge (*ectABCD*) organisiert ist, da die Gene für Enzyme eines Syntheseweges im Genom von Mikroorganismen häufig zusammen organisiert sind.

2.1.1 Herstellung einer *Eco*RI-Phagenbank

Um ein Fragment der *ectABC* Gene aus *S. salexigens* zu isolieren, wurde eine PCR-Strategie mit degenerierten Primern unter nicht stringenten Bedingungen mit chromosomaler DNA aus *S. salexigens* als Matrize benutzt. Für das Primerdesign wurden die Aminosäuresequenzen der EctABC Proteine von *Halomonas elongata* (Göller *et al.* 1998) und *Marinococcus halophilus* (Louis & Galinski 1997) miteinander verglichen, um konservierte Bereiche zu identifizieren (Bursy 2001). Auf der Grundlage dieser konservierten Bereiche wurden degenerierte Primer abgeleitet (Kuhlmann 2002) und in einer PCR eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte zunächst ein 0,7 kb großes DNA-Fragment isoliert werden, welches den 3' Teil des *ectA* und den 5' Teil des *ectB* Genes enthielt. Dieses Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 kloniert. Das resultierende Plasmid war pBJ1 (Bursy 2001). Das DNA-Fragment aus pBJ1 wurde mittels PCR mit Digoxigenin (DIG) markiert und dann als homologe DNA-Sonde eingesetzt, um ein chromosomales Restriktionsfragment aus einer λ-Phagenbank zu isolieren, welches das gesamte Ectoin-Biosynthesecluster enthielt.

Um ein geeignetes Restriktionsenzym zu finden, welches ein genügend großes DNA-Fragment generiert, wurde chromosomale DNA aus *S. salexigens* mit einer Auswahl an Restriktionsenzymen verdaut und anschließend mittels Southern Blot-Hybridisierung mit der DIG-markierten '*ectA-ectB*' DNA-Sonde (0,7 kb, abgeleitet von pBJ1) detektiert. Es konnte ein 6 kb großes *Eco*RI-Fragment identifiziert werden, welches mit der homologen '*ectA-ectB*' DNA-Sonde hybridisierte. Dieses Fragment hatte eine akzeptable Größe für die Klonierung in den λ-ZAP Express® Vektor und war ausreichend groß, um das gesamte *ectABCD* Gencluster einschließlich flankierender Bereiche zu kodieren (Bursy 2001). Eine DNA-Genbank aus genomischen *Eco*RI Restriktionsfragmenten von *S. salexigens* wurde mit dem ZAP Express® Vektor hergestellt. λ-Phagen, deren DNA mit der '*ectA-ectB*' DNA-Sonde hybridisierte, wurden isoliert und *in vivo* zyklisiert. Das resultierende Derivat des Phagemides pBK-CMV mit dem 6 kb *Eco*RI-Insert wurde als pBJ8 bezeichnet. Die Sequenzierung und Sequenzvergleiche mit bereits bekannten *ect*-Genen ergab, dass dieses Insert die komplette Sequenz der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* enthielt (Abb. 12; 44; 46; 48).

Insgesamt wurde ein DNA-Fragment von 2893 bp doppelsträngig sequenziert und unter der Zugriffsnummer AY935521 in der Datenbank (Genbank) hinterlegt.

2.2 Sequenzanalyse der *ectABC*-Gene und der abgeleiteten EctABC Proteine aus *S. salexigens*

Eine Analyse der sequenzierten Region zeigte drei vollständige offene Leserahmen (*ectABC*) die alle in der gleichen Richtung orientiert und direkt hintereinander im Chromosom von *S. salexigens* angeordnet sind (Abb. 12). Im Gegensatz zur bisherigen Arbeitshypothese gab es in unmittelbarer Nähe zu den *ectABC*-Genen keinen offenen Leserahmen, der für ein Enzym kodieren könnte, was die Reaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin katalysieren könnte.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der aus *S. salexigens* klonierten *ectABC*-Gene zeigten bei Sequenzvergleichen in den Datenbanken des NCBI signifikante Identitäten zu Enzymen, die an der Ectoin-Biosynthese in *M. halophilus* (Louis & Galinski 1997), *H. elongata* (Göller *et al.* 1998), *Chromohalobacter salexigens* (Canovas *et al.* 1998), *Sporosarcina pasteurii* (Kuhlmann & Bremer 2002) und *Vibrio cholerae* (Pflughoeft *et al.* 2003) beteiligt sind (Abb. 44; 46; 48). Die Biosynthese des kompatiblen Solutes Ectoin basiert daher auch in *S. salexigens* auf den konservierten drei Enzymen, L-2,4-Diaminobutyrat-N_γ-Acetyltransferase (EctA), L-2,4-Diaminobutyrat Transaminase (EctB) und Ectoin-Synthase (EctC) (Abb. 9).

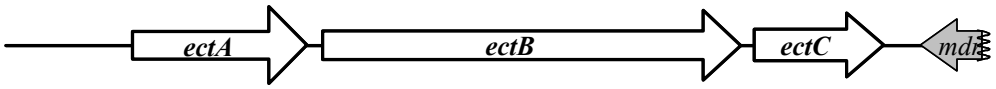
Die offenen Leserahmen *ectABC* kodieren für Proteine mit den abgeleiteten molekularen Massen von 19,8 kDa für EctA (174 Aminosäuren), 45,6 kDa für EctB (414 Aminosäuren) und 14,8 kDa für EctC (128 Aminosäuren).

Datenbankuntersuchungen zeigten die Existenz weiterer potentieller *ectABC*-Gencluster in den Genomen diverser Mikroorganismen. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen potentieller und bereits charakterisierter Proteine der Ectoin-Biosynthese anderer Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien sind im Anhang dargestellt (Abb. 44-49). Für die Analyse wurden nur Enzyme aus den Organismen verwendet, die über das gesamte Ectoin-Biosynthese-Gencluster *ectABC* verfügen.

Die Sequenzidentitäten der potentiellen EctABC-Enzyme aus *S. salexigens* zu potentiellen Ectoin-Biosyntheseenzymen anderer Organismen liegen zwischen 34 % und 78 % für EctA, zwischen 50 % und 84 % für EctB und 46 % und 87 % für EctC (Tab. 13). Der hohe Grad der Identitäten der Proteinsequenzen und vor allem die konservierte Organisation der *ectABC*-Gene in allen 30 Genomen der verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien legt den Schluss nahe, dass der gesamte Ectoin-Biosyntheseweg evolutionär hoch konserviert ist und möglicherweise über lateraler Gentransfer Verbreitung findet.

Grundsätzlich besitzen die potentiellen EctABC Proteine des Gram-positiven *S. salexigens* eine höhere Sequenzidentität zu den abgeleiteten Proteinsequenzen der Gram-positiven Bakterien als zu denen Gram-negativer Bakterien (Tab. 13).

A



B

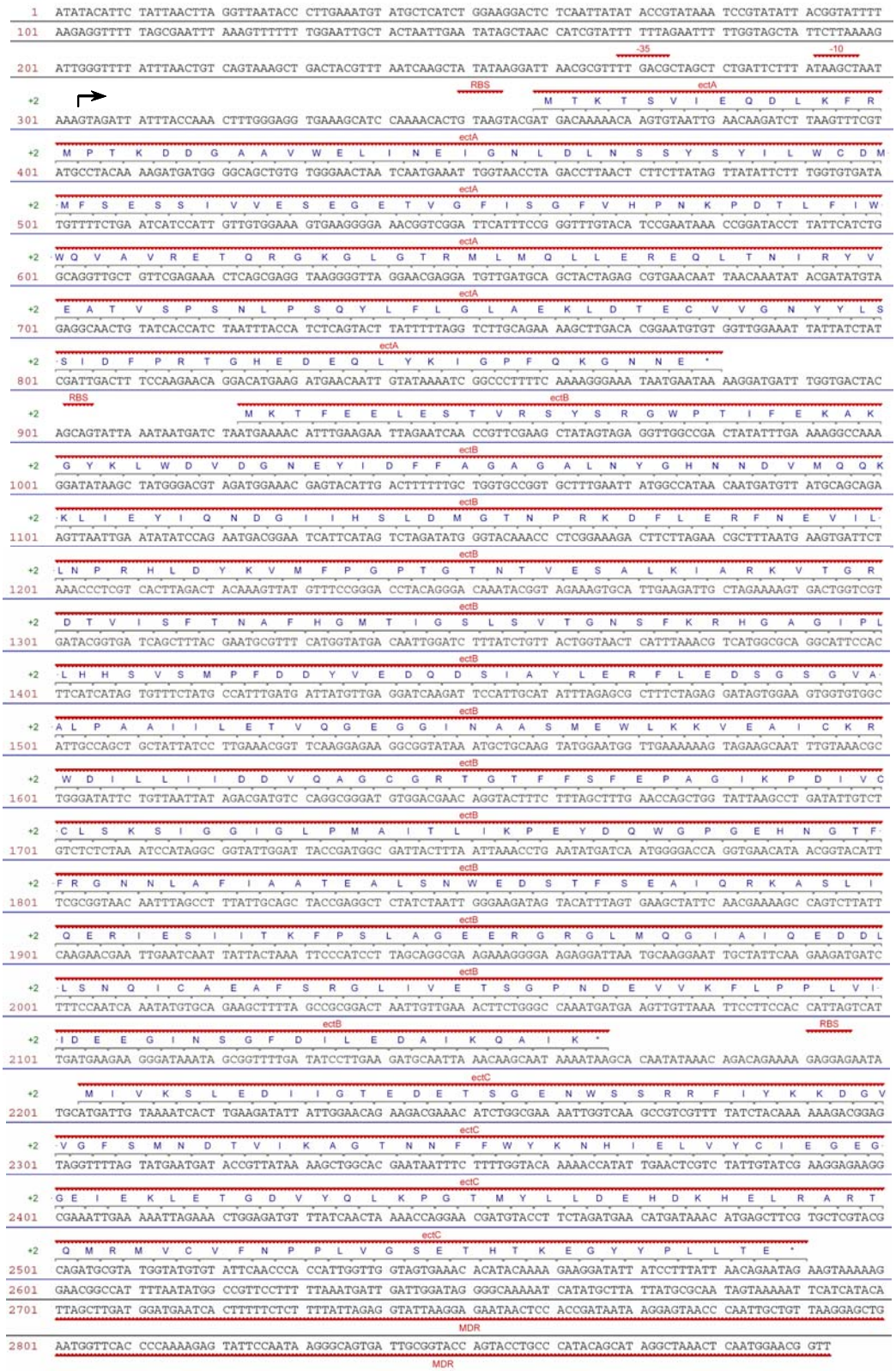


Abbildung 12. Nukleotidsequenz der *ectABC*-Region aus *S. salexigens*.
Dargestellt sind eine schematische Übersicht des *ectABC*-Ectoin-Biosynthese-Genclusters (**A**) und die DNA Sequenz der *ectABC*-Region (**B**) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der kodierten Proteine EctABC. Der potentielle *ectABC*-Promoter, der bestimmte Transkriptionstart, sowie potentielle Ribosomenbindestellen (rbs) sind gekennzeichnet. *ectA* kodiert für die L-2,4-Diaminobutyrat-N_γ-Acetyltransferasen (EctA), *ectB* für die L-2,4-Diaminobutyrat Transaminasen (EctB), *ectC* für die Ectoin-Synthase (EctC), mdr für ein Transportprotein. Die DNA-Sequenz ist unter der Zugriffsnummer AY935521 bei GenBank hinterlegt.

Tabelle 13. Sequenzidentitäten der potentiellen Ectoin-Biosyntheseenzyme EctABC aus *S. salexigens* zu den EctABC-Proteinen anderer *Bacteria*.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der EctABC-Proteine aus *S. salexigens* wurden mit den Aminosäuresequenzen der entsprechenden Proteine aus den angegebenen Mikroorganismen verglichen. Angegeben sind die Sequenzidentitäten in Prozent zu *S. salexigens* und das Gramfärbeverhalten als taxonomischer Marker. Der jeweils höchste und niedrigste Wert ist fett dargestellt.

Organismus	Gram positiv/ negativ	Sequenzidentität in %		
		EctA	EctB	EctC
Bacillus clausii	+	50	65	51
Bacillus halodurans C-125	+	42	67	63
Marinococcus halophilus	+	54	61	58
Virgibacillus pantothenticus	+	**78**	**84**	**87**
Oceanobacillus iheyensis	+	61	77	76
Sporosarcina pasteurii	+	48	67	53
Brevibacterium linens	+	44	58	51
Streptomyces scabies	+	45	58	51
Streptomyces avermitilis	+	42	58	51
Streptomyces coelicolor	+	48	58	48
Streptomyces chrysomallus	+	44	58	51
Nocardia farcinica	+	34	55	51
Rhodococcus sp. RHA1	+	49	59	47
Thermobifida fusca	+	47	60	53
Mycobacterium smegmatis	+	41	57	46
Nitrosococcus oceani	-	50	53	44
Wolinella succinogenes	-	41	55	49
Bordetella avium	-	42	52	50
Bordetella bronchiseptica	-	40	51	52
Bordetella parapertussis	-	40	51	52
Microbulbifer degradans	-	44	53	50
Chromohalobacter salexigens	-	37	53	50
Halomonas elongata	-	37	56	50
Hyphomonas neptunium	-	34	52	45
Silicibacter sp. TM1040	-	34	**50**	45
Sphingopyxis alaskensis	-	**33**	52	**41**
Vibrio cholerae	-	42	54	46
Vibrio parahaemolyticus	-	39	56	50

2.3 Transkriptionelle Analyse der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC*

Die Strukturgene für Enzyme eines Biosyntheseweges sind oft als Operon organisiert. Da die intergenen Regionen zwischen *ectA* und *ectB* nur 42 bp bzw. 36 bp zwischen *ectB* und *ectC* groß sind, lag der Schluss nahe, dass auch die Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* aus *S. salexigens* als Operon organisiert.

HPLC-Analysen zeigten dass die Ectoin-Biosynthese in *S. salexigens* osmotisch reguliert ist (Kap. 1.1). Um zu untersuchen, ob diese Regulation auf transkriptioneller Ebene stattfindet und ob die *ectABC* Gene tatsächlich als Operon organisiert sind, wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt.

Gesamt-RNA wurde aus *S. salexigens* Kulturen, die in Minimalmedium ohne (0,4 M NaCl) und mit Salzstress (1,4 M; 2,4 M; 3,4 M NaCl) kultiviert worden waren, isoliert, ihrer Größe nach in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran fixiert. Das gesuchte Transkript wurde mit einer DIG-markierten *'ectA-ectB*'-spezifischen antisense-RNA-Sonde detektiert. Es konnte eine einzelne RNA-Spezies mit einer Größe von circa 2,6 kb detektiert werden (Abb. 13), deren Größe mit der berechneten Größe für ein *ectABC*-Transkript von 2232 bp, ausgehend vom kodierenden Bereich, korrespondiert. Die Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* sind in *S. salexigens* demnach als Operon organisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das *ectABC*-Operon in Abhängigkeit von der Salinität des Wachstumsmediums transkribiert wird. In der ungestressten Kultur ist nahezu kein Transkript detektierbar, während für die gestressten Kulturen gilt: je höher die Osmolarität des Mediums, desto höher die Expressionsrate (Abb. 13). Dass bei einer externen NaCl-Konzentration von 0,4 M, was keinen Salzstress für diesen halophilen Organismus darstellen sollte, trotzdem ein *ectABC*-Transkript nachweisbar ist, spricht für die Existenz eines gewissen Basislevels an Ectoin-Biosyntheseaktivität, was sich auch in den physiologische Untersuchungen gezeigt hatte (Abb. 10).

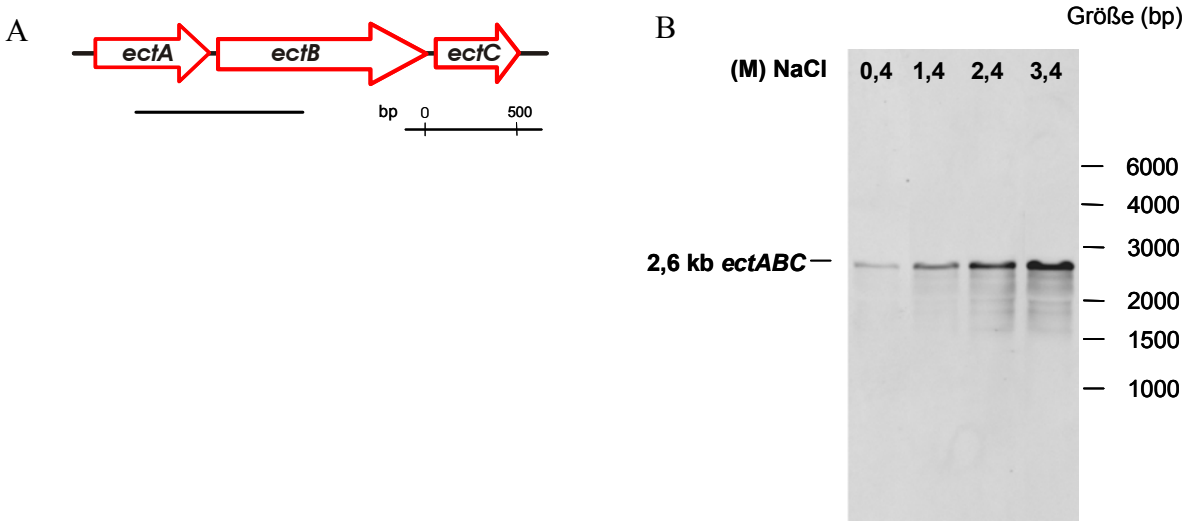


Abbildung 13. Das *ectABC*-Operon aus *S. salexigens* ist durch NaCl induzierbar.

(**A**) Dargestellt ist die genetische Organisation des Ectoin-Biosynthese-Genclusters *ectABC* in *S. salexigens*. Die Lage der verwendeten spezifischen RNA-Sonde für die Detektion des Transkriptes ist durch einen Balken dargestellt. (**B**) Northern-Blot-Analyse des *ectABC*-Transkriptes aus *S. salexigens*. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen (in Molar) bei 37 °C kultiviert. Gesamt-RNA wurde aus diesen Zellen extrahiert, wenn die Kultur eine OD_{578} von ungefähr 0,5 bis 0,8 erreicht hatte. Gleiche Mengen der isolierten RNA (5 µg pro Spur) wurden in einem MOPS-Agarosegel aufgetrennt und mit einer DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert, die spezifisch für *ectAB* aus *S. salexigens* ist. Die Identität und Größe des Transkriptes sind auf der linken, die relativen Größen nach einem RNA-Marker sind auf der rechten Seite angegeben.

2.4 Der Transkriptionsstart der *ectABC*-mRNA und Analyse des Promotors

Um den Promotor zu identifizieren, von welchem aus die osmotisch kontrollierte Transkription des *ectABC*-Operons in *S. salexigens* initiiert wird, wurde der stromaufwärts von *ectA* liegende Transkriptionsstartpunkt mit Hilfe von Primer-Extension-Analysen bestimmt.

Dazu wurde gesamt-RNA von *S. salexigens* Kulturen, welche ohne (0,4 M NaCl) und mit (3,4 M NaCl) osmotischen Stress in Minimalmedium kultiviert worden waren, wurde isoliert und in einer Primer-Extension Reaktion als Matrize eingesetzt. Als Primer wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 markiertes, *ectA*-spezifisches Oligonukleotid (Sequ *ectA*_81) benutzt. Die *ectABC*-mRNA wurde mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung desselben Oligonukleotids (Sequ *ectA*_81) wurde eine Sequenzreaktion mit dem Plasmid pBJ8 als Matrize durchgeführt, welches das *ectABC* Gencluster enthält. Diese Sequenzierungsreaktion wurde als Größenstandard neben den Produkten der reversen Transkription in einem Sequenzgel aufgetrennt und mit Hilfe eines Licor DNA-Sequenzer analysiert. Es konnte eine einzelne, osmotisch induzierte *ectA*-spezifische cDNA-Spezies detektiert werden (Abb. 14), deren 5'-Ende 56 bp stromaufwärts des potentiellen *ectA*-Startcodons liegt.

In der unmittelbaren Umgebung diese Initiationspunktes ist eine mögliche –35 und –10 Promotorsequenz erkennbar, welche Ähnlichkeiten zur Konsensussequenz eines Sigma-

Faktor A (σ^A) abhängigen Promotors in *Bacillus subtilis* aufweist (Helmann 1995). Die *ectABC*-Promotorregion in *S. salexigens* weist kein herausragendes DNA-Merkmal auf, das für eine osmotische Induzierbarkeit verantwortlich sein könnte.

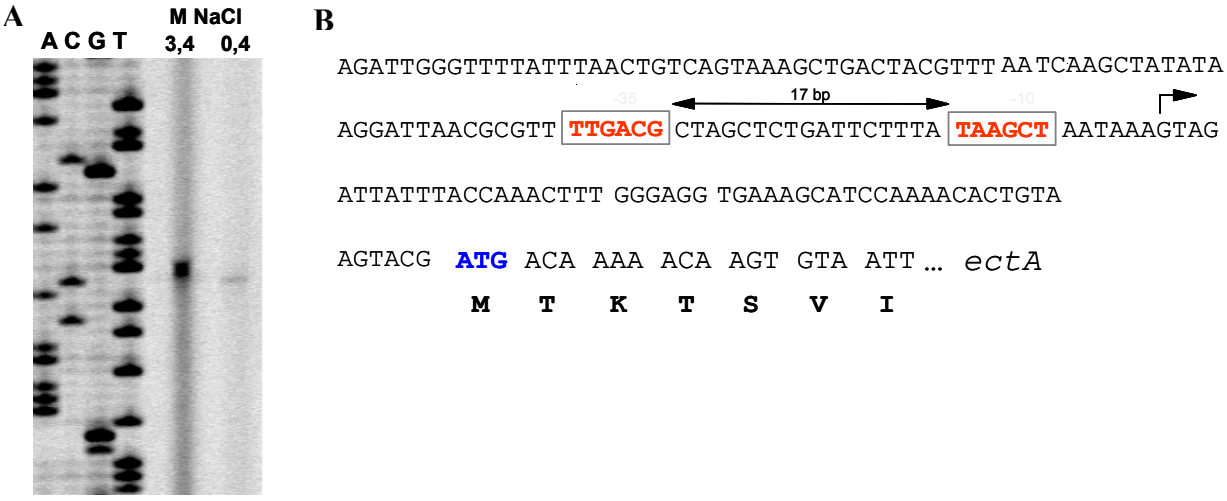


Abbildung 14. Primer-Extension-Analyse der *ectABC*-Promotorregion.

Identifikation des transkriptionellen Startpunktes des *ectABC*-Operons von *S. salexigens* und Analyse des potentiellen Promotors. (**A**) *S. salexigens* wurde in Minimalmedium mit 0,4 M oder 3,4 M NaCl bei 37 °C kultiviert, bis die Kultur eine OD_{578} von 0,5 bis 0,8 erreichte. Jeweils 20 µg der isolierten Gesamt-RNA wurden mit einem *ectA*-spezifischen DNA-Primer von einer reversen Transkriptase in cDNA transkribiert. Dieses Reaktionsprodukt wurde neben einer DNA-Sequenzierungsreaktion die mit demselben Oligonukleotid erhalten wurde, in einem Sequenzgel aufgetrennt. (**B**) Nukleotidsequenz der *ectABC*-Promotorregion aus *S. salexigens*. Die Initiationsstelle der Transkription ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die -10 und -35 Region des potentiellen σ^A abhängigen Promotors sind mit einem Rahmen um die jeweiligen Nukleotide markiert. Der Anfang des kodierenden Bereiches von *ectA* ist fett dargestellt und die abgeleiteten Aminosäuren von EctA sind unter der DNA-Sequenz angegeben.

3 Das Ectoin-Hydroxylase-Gen *ectD* aus *Salibacillus salexigens*

Nach eingehender Analyse der 5' und 3' flankierenden Regionen der klonierten *ectABC* Region aus *S. salexigens* konnte kein offener Leserahmen identifiziert werden, welcher für eine Hydroxylase kodieren könnte. Die Arbeitshypothese, dass das Strukturgen für die Ectoin-Hydroxylase in der unmittelbaren Nähe der *ectABC*-Gene liegen könnte, war damit widerlegt. Die Genorganisation für die Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese in *S. salexigens* ist offensichtlich ähnlich zu der in den Gram-negativen Bakterien *H. elongata* (Göller *et al.* 1998) und *C. salexigens* (Canovas *et al.* 1998). In diesen Ectoin- und Hydroxyectoin- synthetisierenden Organismen ist ebenfalls in direkter Umgebung der *ectABC*-Gene kein Gen für eine Ectoin-Hydroxylase zu finden.

Um die Hydroxyectoin-Biosynthese in *S. salexigens* molekularbiologisch und enzymatisch zu analysieren, sollte das Strukturgen (*ectD*) für die potentielle Ectoin-Hydroxylase kloniert und charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte das EctD-Protein isoliert und biochemisch untersucht werden.

3.1 Isolierung und Charakterisierung des Ectoin-Hydroxylase-Genes *ectD* aus *S. salexigens*

3.1.1 *In silico* Sequenzanalyse potentieller Ectoin-Hydroxylasen und einer L-Prolin-4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp.

Mit der kompletten Genomsequenz des Ectoin und Hydroxyectoin synthetisierenden Actinomyceten *Streptomyces coelicolor* A3(2) war es erstmals möglich, nach potentiellen Enzymen zu suchen, welche die Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin katalysieren könnten. Anders als in allen bisher bekannten Hydroxyectoin synthetisierenden Organismen wie *S. salexigens*, *H. elongata* und *C. salexigens* liegt in *S. coelicolor* A3(2) direkt stromabwärts der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* ein offener Leserahmen (GeneID:1097301), welcher eine limitierte Sequenzidentität (26%) zu einer L-Prolin-4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. (Shibasaki *et al.* 1999) aufweist (Kuhlmann 2002).

Mit der Sequenz dieser potentiellen Ectoin-Hydroxylase aus *S. coelicolor* A3(2) konnten zu diesem Zeitpunkt mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1997) in verschiedenen Datenbanken des NCBI („Microbial Genomes"; www.ncbi.nlm.nih.gov) oder mit „WU BLAST 2.08" bei TIGR (www.tigr.org/tdb) weitere Sequenzen möglicher Ectoin-Hydroxylasen in den Genomen von *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (NC002974) und *Bordetella parapertussis* 12822 (NC002928) identifiziert werden (Abb. 15). Ein wichtiges Indiz für eine tatsächliche Ectoin-Hydroxylase ist die Existenz der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* direkt stromaufwärts des *ectD* Genes oder zumindest im Genom des jeweiligen Bakteriums. Diese Konstellation der Gene ist wie bereits erwähnt in *S. coelicolor* A3(2), aber auch in *M. smegmatis* MC2 155 und in *B. parapertussis* 12822 zu finden (Abb. 20). Ein weiteres Argument dafür, dass die abgeleiteten Enzyme Ectoin-Hydroxylasen sind, ist die Identität der Aminosäuresequenzen untereinander (43 % bis 55%), die deutlich höher sind als zur erwähnten L-Prolin-4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. (26 % bis 32 %) (Shibasaki *et al.* 1999). Dies deutet darauf hin, dass diese Enzyme eher Ectoin-Hydroxylasen sind und nicht wie in den Anotationen der Genomprojekte postuliert, Prolin-Hydroxylasen.

3.1.2 PCR-Amplifikation eines internen Bereiches des Ectoin-Hydroxylase-Genes mit heterologen Primern

Mit einem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der potentiellen Ectoin-Hydroxylasen aus *S. coelicolor* A3(2) (NC003888), *M. smegmatis* MC2 (www.tigr.org) und *B. parapertussis* (NC002928), sowie der Prolin-4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. (D78338) konnten konservierte Bereiche identifiziert werden. Auf der Grundlage dieser konservierten Bereiche und einer Analyse häufig verwendeter Codons in *S. salexigens* wurden die degenerierte Primer het_*ectD* 10 und het_*ectD* 11 (Abb. 15; Tab. 4) abgeleitet und in eine PCR mit chromosomaler DNA aus *S. salexigens* als Matrize eingesetzt. Das resultierende PCR-Produkt mit einer Größe von 210 bp wurden mit dem TOPO TA-Cloning Kit in den Vektor pCR®2.1-TOPO® kloniert und anschließend sequenziert. Die abgeleitete

Aminosäuresequenz des klonierten DNA-Fragmentes wies eine hohe Sequenzidentität zu den erwähnten potentiellen Ectoin-Hydroxylasen auf. Es konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass das klonierte Fragment einen internen Sequenzanteil des *ectD*-Genes für die Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* darstellt.

Die abgeleiteten heterologen Primer het_*ectD* 10 und het_*ectD* 11 können möglicherweise als universelle Primer für die Amplifizierung des internen Sequenzanteiles der Ectoin-Hydroxylasen im Genus *Bacillus* und darüber hinaus benutzt werden. Ein PCR-Ansatz mit diesen Primern und chromosomaler DNA aus *Bacillus clarkii*, einem weiteren Ectoin und Hydroxyectoin synthetisierenden *Bacillus* (Tab. 1), ergab ebenfalls ein DNA-Fragment mit hoher Identität zu den bereits bekannten potentiellen Ectoin-Hydroxylasen.

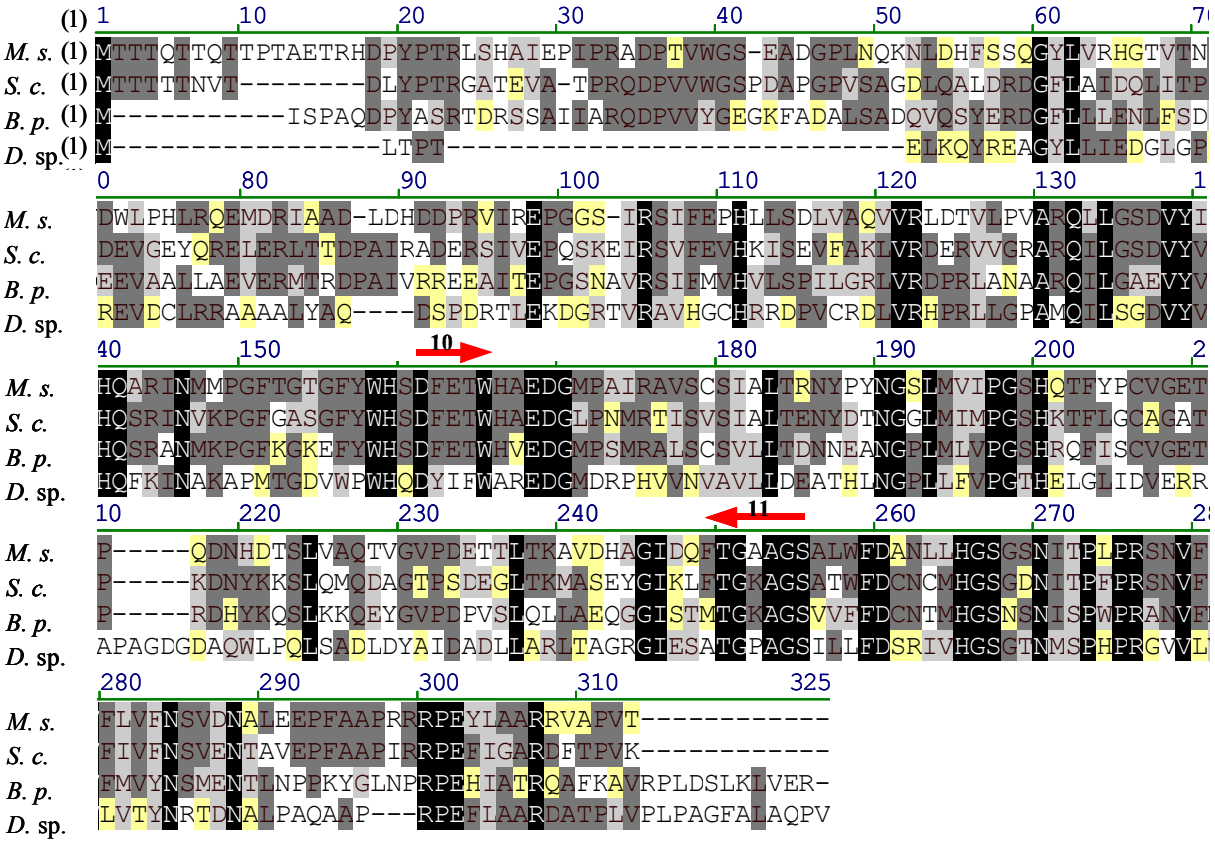


Abbildung 15. Vergleich der Aminosäuresequenz potentieller Hydroxylasen.

Die Aminosäuresequenzen potentieller Ectoin-Hydroxylasen aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (NC003888) (*S.c.*), *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (NC002974) (*M.s.*), *Bordetella parapertussis* 12822 (NC002928) (*B.p.*) und einer L-Prolin-4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. (D78338) (*D.*sp.) wurden miteinander verglichen. Identische Aminosäurereste sind schwarz unterlegt. Die Pfeile markieren die Lage der heterologen, degenerierten Primer het_*ectD* 10 und het_*ectD* 11, die für die Amplifizierung eines internen *ectD* Genfragmentes aus *Salibacillus salexigens* und *Bacillus clarkii* mittels PCR benutzt wurden.

3.1.3 Identifikation und Klonierung eines *Eco*RI-Restriktionsfragmentes mit dem *ectD*-Gen aus *Salibacillus salexigens*

Um die gesamte DNA-Sequenz sowie flankierende 5' und 3' Regionen des Genes für die Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* zu klonieren und zu sequenzieren, sollte ein genügend großes DNA Restriktionsfragment, welches das *ectD*-Gen trägt, identifiziert werden.

Für eine Southern Blot-Analyse wurde chromosomale DNA aus *S. salexigens* mit den Restriktionsenzymen *Sau*3AI, *Bgl*I, *Bam*HI, *Mun*I und *Eco*RI verdaut und in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die auf einer Nylon-Membran fixierten DNA-Fragmente wurden mit einer DIG-markierten *ectD*-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert, um ein Fragment mit dem *ectD*-Gen zu detektieren. Diese Sonde wurde mit den Primern het-*ectD* 10 und het_*ectD* 11 und dem Plasmid pBJ6 als Matrize mittels PCR synthetisiert und entspricht damit dem internen Sequenzfragment der putativen Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* welches unter 3.1.2 beschrieben wurde.

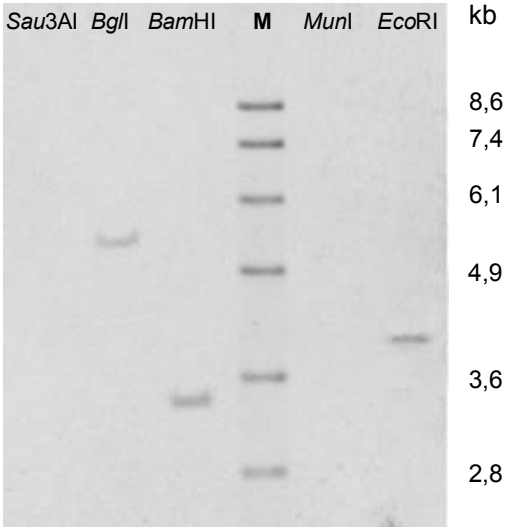


Abbildung 16. *ectD*-Southern Blot-Analyse chromosomaler DNA aus *S. salexigens*

Zur Identifizierung eines geeigneten Restriktionsfragmentes für eine Klonierung in den Vektor pBK-CMV wurde chromosomale DNA aus *S. salexigens* mit den angegebenen Endonukleasen restringiert und mit einer '*ectD*' spezifischen DIG-DNA Sonde hybridisiert. Die mit M gekennzeichnete Spur ist ein DIG-markierter DNA-Größenstandard.

Das Fragment, das mit einem *Eco*RI-Verdau erhalten wurde, hatte mit 4,1 kb eine akzeptable Größe, um das gesamte *ectD* Gen einschließlich flankierender Bereiche zu enthalten. Die *Eco*RI λ-Phagen-Genbank chromosomaler *S. salexigens* DNA, aus der bereits das *ectABC* Gencluster isoliert worden war, wurde mit der *ectD*-spezifischen DIG-DNA-Sonde nach positiven Klonen durchsucht.

Nach der Isolierung des *ectD*-enthaltenden Plasmides pBJ9 aus dieser Genbank wurde die Lage des *ectD* Genes innerhalb des klonierten Fragmentes mittels PCR bestimmt. Zu diesem Zweck wurden PCR mit den Primern „M13 forward“ bzw. „M13 reverse“, die in der Vektorsequenz nahe der multiplen Klonierungsstelle binden, und den Primern „het-*ectD* 10“ bzw. „het_*ectD* 11“, die in *ectD* binden, durchgeführt. Diese vier PCR Ansätze ergaben die zu erwartenden zwei Produkte mit den Größen von circa 900 bp für die Kombination „M13 reverse“ und „het_*ectD* 10“, sowie für die Kombination „M13 forward“ und „het_*ectD* 11“ ein Produkt der Größe von etwa 3,5 kb. Aufgrund dieser Größen konnte davon ausgegangen werden, dass das klonierte Fragment tatsächlich das gesamte *ectD* Gen plus flankierende Regionen enthält.

Die Sequenzierung von *ectD* und angrenzenden Bereichen wurde doppelsträngig und überlappend durchgeführt. Insgesamt wurden 1977 bp sequenziert (Abb. 18) und unter der Zugriffsnummer AY935522 bei Genbank (NCBI) hinterlegt. Zusätzlich zur Sequenzierung der klonierten Region wurde ein DNA-Fragment, das aus einer PCR mit chromosomaler *S. salexigens* DNA als Matrize stammte, direkt sequenziert, um mögliche Mutationen während der Klonierung auszuschließen. Dazu wurden Primer stromauf- und stromabwärts von *ectD*, und eine „Proof Reading Polymerase“ zur Amplifikation benutzt.

3.1.4 Sequenzanalyse des *ectD*-Genes

Eine Analyse der 2 kb-*ectD*-Region mit dem Vektor NTI Programm und Sequenzvergleichen mit dem CLUSTALW Algorithmus in den Datenbanken des NCBI zeigten das 5' Ende einer Sequenz, die für ein ATP-Bindeprotein eines ABC Transporters kodiert, einen kompletten offenen Leserahmen mit Homologie zu potentiellen Ectoin- und Prolin-Hydroxylasen, und weiter stromabwärts eine Sequenz mit Homologie zu MarR-Typ Transkriptionsregulatoren (Abb. 17).

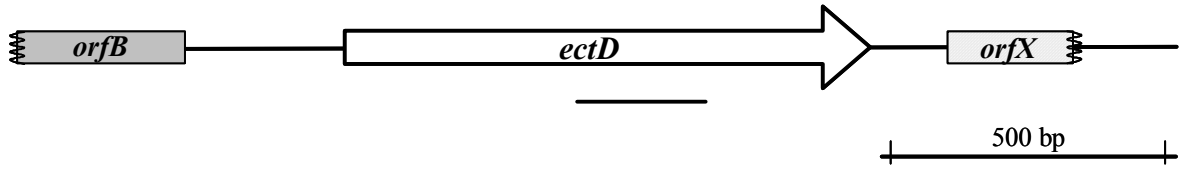


Abbildung 17. Struktur des sequenzierten Teils des *ectD*-Inserts aus pBJ9

Offene Leserahmen sind als Blockpfeile dargestellt. *orfB*: potentielles Bindeprotein eines ABC-Transporters; *ectD*: potentielle Ectoin-Hydroxylase; „*orfX*“: potentieller Transkriptionsregulator des MarR-Typ. Der Sequenzanteil von *ectD*, welcher mit den heterologen Primern „het_*ectD* 10“ und „het_*ectD* 11“ aus *S. salexigens* in einer PCR amplifiziert wurde, ist als Balken gekennzeichnet.

Der als *ectD* gekennzeichnete offene Leserahmen kodiert mit 903 Basen für ein Protein mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 34,4 kDa (300 Aminosäuren). Als Fortführung der Bezeichnung der drei Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* wurde dieser offene Leserahmen als *ectD* und das abgeleitete Protein als EctD bezeichnet.

Vor dem offenen Leserahmen von *ectD* konnte eine potentielle Ribosomenbindestelle identifiziert werden (Abb. 18), die sowohl im Abstand zum Start-Codon als auch in der Basenfolge einer typischen Ribosomenbindestelle aus *B. subtilis* ähnelt (Ma *et al.* 2002).

Aufgrund der hohen Sequenzidentität von 47 % bis 58 %, der ähnlichen Größe (291 Aminosäuren bis zu 307 Aminosäuren; Abb. 19) zu potentiellen Ectoin-Hydroxylasen anderer Organismen stellt *ectD* das erste charakterisierte Gen aus der Familie der Ectoin-Hydroxylasen dar.

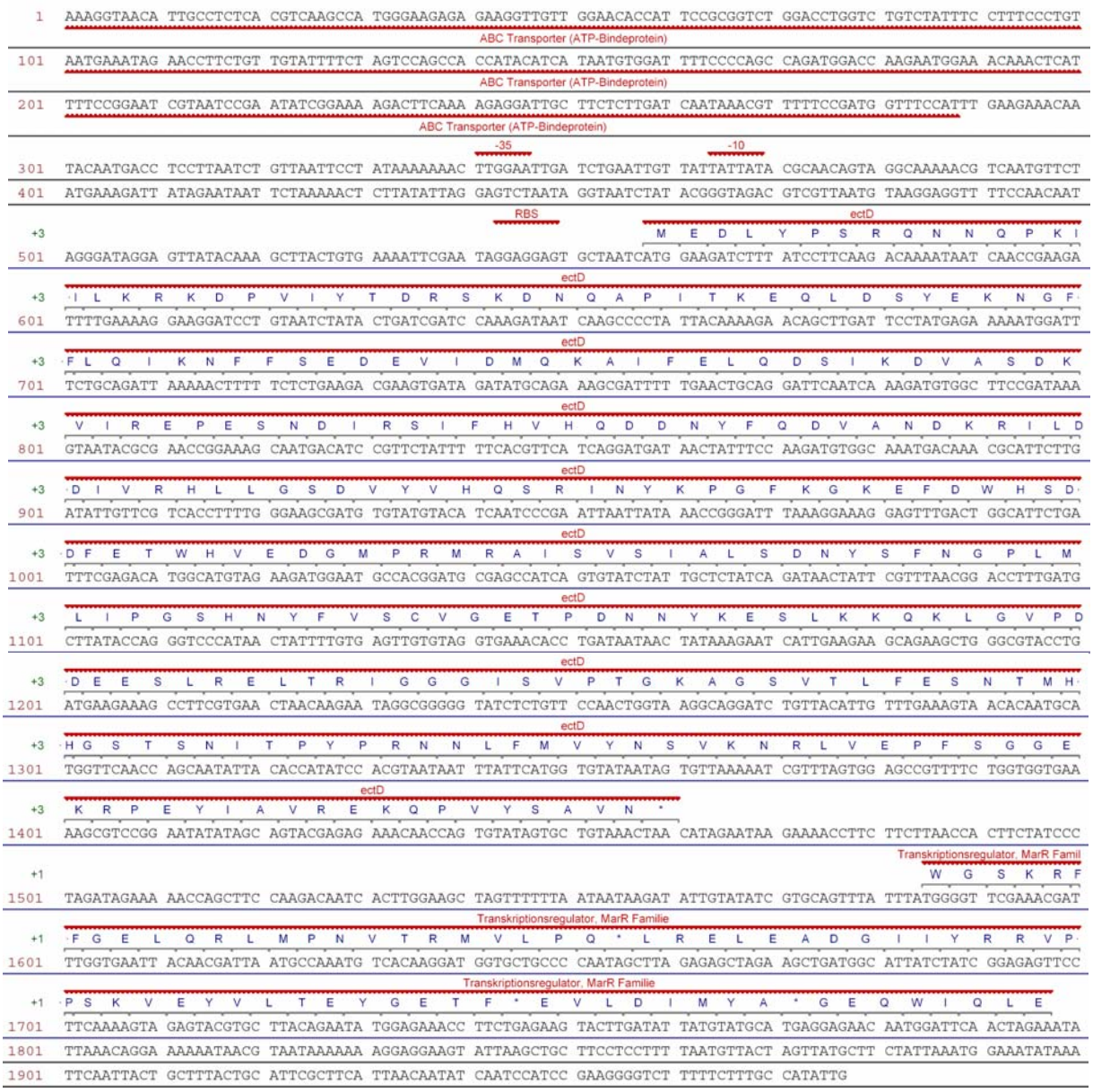


Abbildung 18. **Nukleotidsequenz der *ectD*-Region aus *S. salexigens*.**

Dargestellt ist die DNA Sequenz der *ectD*-Region und die abgeleitete Aminosäuresequenz des kodierten Proteines EctD. Der potentielle *ectD*-Promoter, sowie eine potentielle Ribosomenbindestelle (rbs) ist gekennzeichnet. Die DNA-Sequenz ist unter der Zugriffsnummer AY935522 bei GenBank hinterlegt.

3.1.5 Das Enzyme für die Hydroxyectoin-Biosynthese ist hoch konserviert in Gram-positiven und Gram-negativen Bacteria

Die schnell wachsende Zahl kompletter bakterieller Genome ermöglicht Datenbank-basierende Untersuchungen unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1997). Diese ergaben einen signifikant hohen Grad von Sequenzidentität (47% bis 58%) der Ectoin Hydroxylase aus *S. salexigens* zu den potentiellen Ectoin-Hydroxylasen aus *Bacillus clausii* KSM-K16 (NC006582), *Bordetella bronchiseptica* RB50 (NC002927), *Bordetella parapertussis* 12822 (NC002928), *Bordetella avium* (Sanger Institute; www.sanger.ac.uk), *Hyphomonas neptunium* ATCC 15444 (NC004738),

Brevibacterium linens BL2 (JGI; genome.jgi-psf.org), *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (NC002974), *Nocardia farcinica* IFM 10152 (NC006361), *Chromohalobacter salexigens* (AJ011103), *Halomonas elongata* (AF031489), *Rhodococcus* sp. RHA1 (www.rhodococcus.ca), *Rhodococcus equi* (Sanger Institute), *Nitrosococcus oceani* (JGI), *Microbulbifer degradans* (PEDANT; pedant.gsf.de), *Sphingopyxis alaskensis* RB 2256 T (PEDANT), *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (NC003155), *Streptomyces scabies* 87-22 (PEDANT), *Streptomyces coelicolor* A3(2) (NC003888) (Bursy *et al.* 2005) und *Streptomyces chrysomallus* (Grammel 2000).

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* mit potentiellen Ectoin-Hydroxylasen anderer Bakterien ist in Abbildung 19 dargestellt. Obwohl die Sequenzidentitäten zu EctD aus dem Gram-positiven *S. salexigens* insgesamt auf einem hohen Niveau liegen (47 % bis 58 %), sind die Ectoin-Hydroxylasen der Gram-negativen *Bordetella* spp., *N. oceani*, *S. alaskensis* und *H. neptunium* näher verwandt als die Enzyme der anderen Gram-positiven Bakterien (mit Ausnahme von *B. clausii*; Tab. 14; Abb. 20). Für die Enzyme der Ectoin-Biosynthese EctABC konnte deutlich zwischen Gram-positiv und Gram-negativ unterschieden werden (Tab. 13).

In zwölf der achtzehn Mikroorganismen, die über das *ectD*-Gen für die Ectoin-Hydroxylase verfügen, folgt dieses direkt stromabwärts der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* (Abb. 19). In *S. salexigens*, wie auch in *B. clausii*, *B. linens*, *R. equi* ist dieses Gen an anderer Stelle im Genom lokalisiert. In *Rhodococcus* sp. RHA1 und *C. salexigens*, die über zwei Gene für eine potentielle Ectoin-Hydroxylase verfügen, sind diese Gene ebenfalls nicht in unmittelbarer Nähe zu den *ectABC*-Genen lokalisiert (Abb. 20). Ein PCR-Ansatz mit *ectA*- bzw. *ectC*-spezifischen Primern und *ectD*-spezifischen Primern führte mit *S. salexigens* DNA zu keinem PCR-Produkt, was darauf schließen lässt, dass das *ectABC*-Gencluster und das *ectD*-Gen für eine Amplifikation in einer PCR mit der *Taq*-Polymerase (kann bis zu 8 kb polymerisieren) zu weit von einander entfernt im Genom von *S. salexigens* lokalisiert sind.

Alle zwanzig potentiellen Ectoin-Hydroxylasen sind etwa gleich groß (288 Aminosäuren bis zu 314 Aminosäuren) und die Identitäten der Aminosäuresequenzen erstrecken sich über die gesamte Länge des Proteines (Abb. 19. Die verschiedenen EctD-Proteine zeigen eine begrenzte Aminosäureidentität (26 % bis 32 %) zu einer L-Prolin-4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. RH1, welches das Enzym mit der höchsten Sequenzidentität außerhalb der Subfamilie der Ectoin-Hydroxylasen ist. Diese L-Prolin-4-Hydroxylase gehört zur Superfamilie der mononukleären Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.) (Shibasaki *et al.* 1999). Charakteristisch für diese Enzymfamilie ist ein hoch konserviertes Eisen-Bindemotiv, welches auch als 2-His-1-Carboxylat Triade (**H** X (**D**/E) $X_{50 - 207}$ **H**) bezeichnet wird (Abb. 39; 43) (Hegg & Que 1997; Prescott & Lloyd 2000; Costas *et al.* 2004). Dieses Eisen-Bindemotiv ist auch in der Aminosäuresequenz des *S. salexigens* EctD zu finden und ist in allen anderen potentiellen Ectoin-Hydroxylasen hoch konserviert (Abb. 19). Auch ein Arginin für die Koordination des Co-Substrates 2-Oxoglutarat im aktiven Zentrum des Enzymes ist in den Sequenzen der

Ectoin-Hydroxylasen in definiertem Abstand zum Eisen-Bindemotiv konserviert (Abb. 19, Tab. 17)

Die vollständig konservierten 9 Aminosäuren W-**H**-S-**D**-F-E-T-W-H, welche ein Histidin und das Aspartat des Eisen-Bindemotives enthalten (Abb. 19), können als Signatur-Sequenz für die Suche nach weiteren Ectoin-Hydroxylasen in Datenbanken verwendet werden. Die EctD-Typ Enzyme sind eine eng verwandte Proteinfamilie und bilden eine eigene Subfamilie innerhalb der Superfamilie der "nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen" (EC 1.14.11.; Abb. 51).

Der hohe Grad der Sequenzidentität auf der Ebene der Aminosäuren und die Kopplung mit der Ectoin-Biosynthese, sowie die direkt aufeinander folgenden Gene in der Mehrheit der untersuchten Organismen, legt den Schluss nahe, dass der Hydroxyectoin-Biosyntheseweg sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien evolutionär hoch konserviert ist und die Biosynthese von Hydroxyectoin direkt von der Fähigkeit zur Ectoin-Biosynthese abhängig ist.

Tabelle 14. Sequenzidentitäten der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* zu den potentiellen EctD-Proteinen anderer *Bacteria*.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des EctD-Proteines aus *S. salexigens* wurde mit den Aminosäuresequenzen potentieller EctD-Proteine aus den angegebenen Mikroorganismen verglichen (Abb. 19). Angegeben sind die Sequenzidentitäten in Prozent zu *S. salexigens* und das Gramfärbeverhalten als taxonomischer Marker.

Organismus	Gram	Sequenzidentität (%)
Bacillus clausii	+	57
Nitrosococcus oceani	-	58
Bordetella avium	-	54
Bordetella bronchiseptica	-	56
Bordetella parapertussis	-	55
Hyphomonas neptunium	-	51
Sphingopyxis alaskensis	-	56
Brevibacterium linens	+	52
Mycobacterium smegmatis	+	48
Nocardia farcinica	+	51
Streptomyces avermitilis	+	54
Streptomyces coelicolor	+	52
Streptomyces scabies	+	52
Streptomyces chrysomallus	+	52
Rhodococcus equi	+	50
Rhodococcus sp RHA1_1	+	50
*Rhodococcus s*p RHA1_2	+	51
Chromohalobacter salexigens_1	-	54
Chromohalobacter salexigens_2	-	47

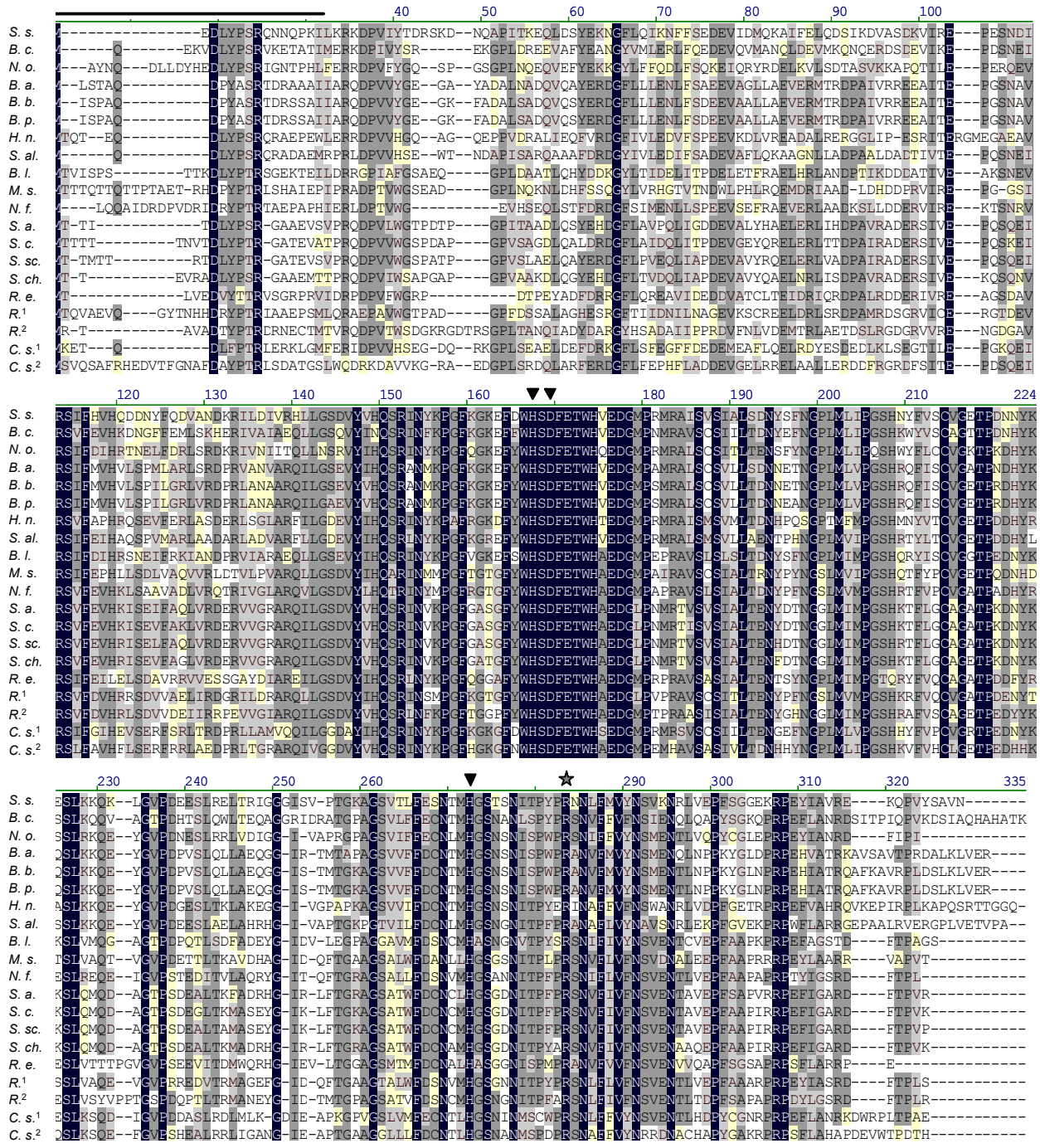


Abbildung 19. Vergleich der Aminosäuresequenz potentieller Ectoin-Hydroxylasen.

Dargestellt ist ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EctD aus *S. salexigens* (*S.s.*) mit den potentiellen Ectoin-Hydroxylasen aus *Bacillus clausii* KSM-K16 (NC006582) (*B.c.*), *Bordetella bronchiseptica* RB50 (NC002927) (*B.b.*), *Bordetella parapertussis* 12822 (NC002928) (*B.p.*), *Bordetella avium* (Sanger Institute; www.sanger.ac.uk) (*B.a.*), *Hyphomonas neptunium* ATCC 15444 (NC004738) (*H.n.*), *Brevibacterium linens* BL2 (genome.jgi-psf.org) (*B.l.*), *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (NC002974) (*M.s.*), *Nocardia farcinica* IFM 10152 (NC006361) (*N.f.*), *Chromohalobacter salexigens* (AJ011103) (*C.s.*), *Rhodococcus* sp. RHA1 (www.rhodococcus.ca) (*R.*), *Rhodococcus equi* (Sanger Institute) (*R.e.*), *Nitrosococcus oceani* (JGI) (*N.o.*), *Sphingopyxis alaskensis* RB 2256 T (PEDANT) (*S.al.*), *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (NC003155) (*S.a.*), *Streptomyces scabies* 87-22 (PEDANT) (*S.sc.*), *Streptomyces coelicolor* A3(2) (NC003888) (*S.c.*) und *Streptomyces chrysomallus* (AY524544) (*S.ch.*) verglichen. In allen Organismen konservierte Aminosäuren sind schwarz, in der Mehrheit der Organismen vorkommende Aminosäuren grau unterlegt. Das für die Familie der Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen typische, konservierte Motiv „H X (D/E) X_{50-207} H X_{10} R“ für die Koordination des mononukleären Eisen-Zentrums (▼) und Bindung des Co-Substrates 2-Oxoglutarat (★) sind gekennzeichnet. Der durch sequentiellen Edman-Abbau sequenzierte Bereich (15 Aminosäuren) des *S. salexigens* EctD-Enzymes ist durch einen schwarzen Balken markiert.

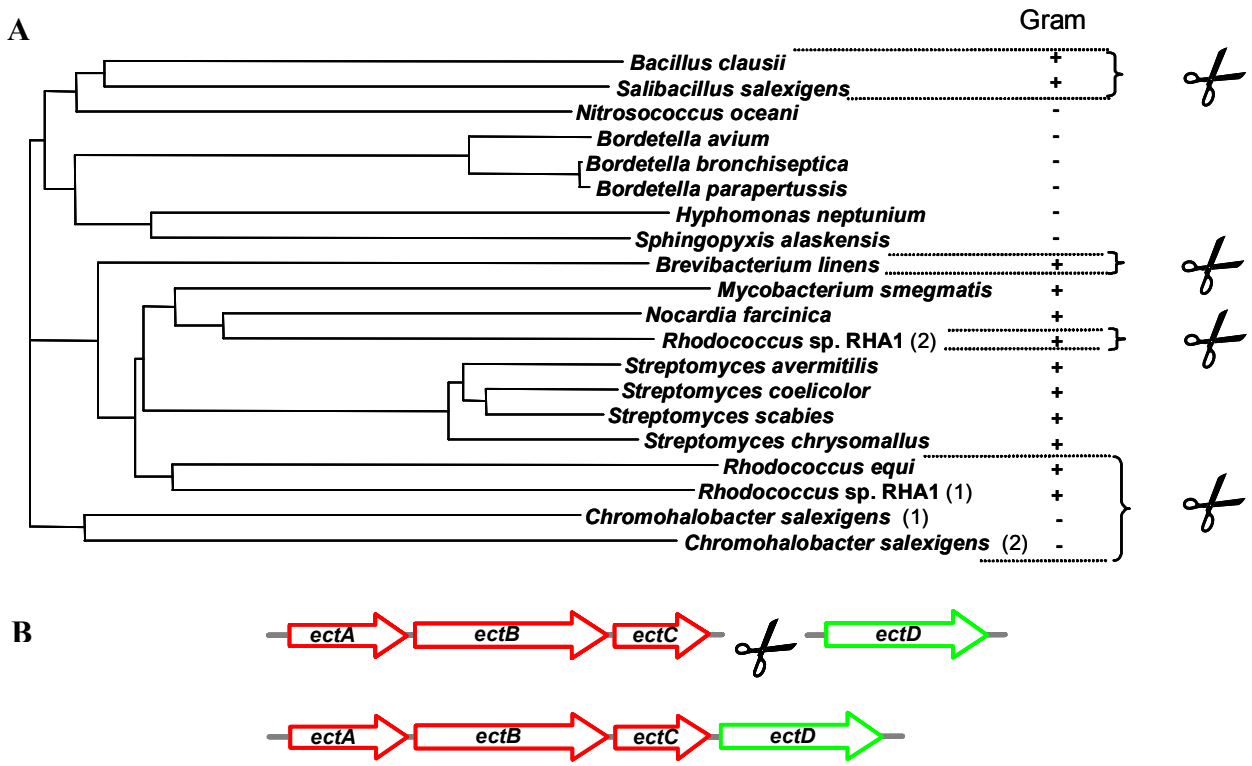


Abbildung 20. Stammbaum auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der potentiellen Ectoin-Hydroxylasen und genetische Organisation der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese.

(**A**) Dargestellt ist ein Stammbaum, welcher nach dem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der potentiellen EctD-Proteine (Abb. 19) durch den CLUSTAL W Algorithmus berechnet wurde. Das Gram-Färbeverhalten der Organismen ist als taxonomischer Marker angegeben. (**B**) Die Organisation der Strukturgene für die Biosynthese von Ectoin (*ectABC*) und Hydroxyectoin (*ectD*) ist durch Blockpfeile dargestellt, wobei (✂) eine getrennte Lokalisation der *ectABC*-Gene und des *ectD*-Genes im Genom symbolisiert.

3.1.6 Transkriptionelle Analyse der *ectD*-Region in *S. salexigens*

Um zu untersuchen, ob die Transkription des Ectoin-Hydroxylase Strukturgenes *ectD*, wie *ectABC*, osmotisch kontrolliert ist, wurde Gesamt-RNA aus *S. salexigens* Zellen, die in Minimalmedien unterschiedlicher Osmolarität gewachsen waren, in Northern Blot Experimenten untersucht. Als Sonden wurde DIG-markierte antisense RNA verwendet, die spezifisch für *ectD* und eine stromabwärts gelegene DNA Region, mit Homologien zu MarR-Typ Regulatoren (Abb. 16 - 18) ist.

Mit der *ectD* spezifischen Sonde konnten zwei osmotisch induzierte Transkripte detektiert werden. Das kleinere mit 1,1 kb entspricht dem monocistronischen Transkript von *ectD*. Die für EctD kodierende Sequenz ist 903 bp groß. Das 1,5 kb große Transkript ist offenbar eine bicistronische RNA mit *ectD* plus dem stromabwärts gelegenen „*orfX*“, was durch einen zweiten Northern Blot mit einer „*orfX*“-spezifischen RNA-Sonde bestätigt werden konnte (Abb. 21).

Es wurde gezeigt, dass sowohl das monocistronische *ectD*-Transkript als auch das bicistronische *ectD*-„*orfX*“-Transkript in Abhängigkeit von der Salinität des

Wachstumsmediums transkribiert werden. In der ungestressten Kultur (0,4 M NaCl) ist nahezu kein Transkript detektierbar, während für die gestressten Kulturen gilt, je höher die Salinität des Mediums, desto höher die Expressionsrate (Abb. 21).

Datenbankanalysen mit dem BLAST network service (Altschul *et al.* 1997) zeigten, dass die Region stromabwärts von *ectD* für einen partiellen Leserahmen kodiert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Homologie zu MarR-Typ Transkriptionsregulatoren aufweist. Der Leserahmen für dieses regulatorische Protein ist durch zwei Stop-Codons unterbrochen und es konnte kein Start-Codon im Leserahmen identifiziert werden. Entweder ist das Gen für diesen Regulator im Laufe der Evolution zerstört worden, oder es unterliegt einer besonderen Regulation, bei der ein Wechsel des Leserahmens oder die Suppression der Stop-Codons erfolgt.

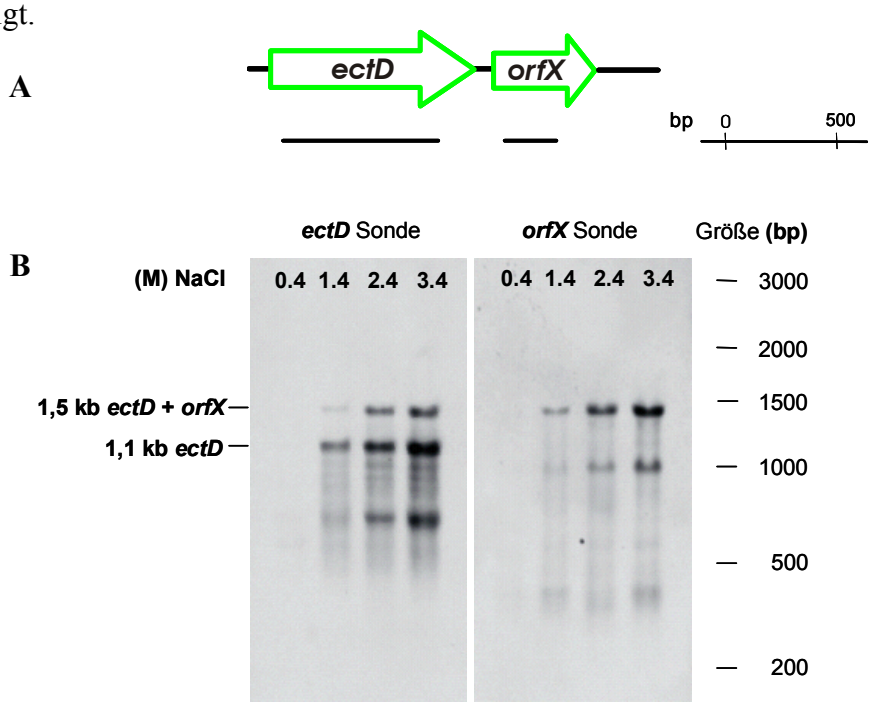


Abbildung 21. Northern-Blot-Analyse der *ectD*-Expression bei verschiedenen Salinitäten in *S. salexigens*.

(**A**) Dargestellt ist die genetische Organisation des Hydroxyectoin-Biosynthese-Genes *ectD* in *S. salexigens*. Die Lage der verwendeten spezifischen RNA-Sonden für die Detektion der Transkripte ist durch Balken dargestellt. (**B**) Northern Blot-Analyse des *ectD*-Transkriptes aus *S. salexigens*. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen (in Molar) bei 37 °C kultiviert. Gesamt-RNA wurde aus diesen Zellen extrahiert, wenn die Kultur eine OD_{578} von ungefähr 0,5 bis 0,8 erreicht hatte. Gleiche Mengen der isolierten RNA (5µg pro Spur) wurden in einem MOPS-Agarosegel aufgetrennt und mit einer DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert, die spezifisch für *ectD* bzw. *orfX* aus *S. salexigens* ist. Die Identität und Größe des Transkriptes sind auf der linken, die relativen Größen nach einem RNA-Marker sind auf der rechten Seite angegeben.

4 Biochemische und physiologische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*

Neben der molekularen Analyse des *ectD*-Genes, sollte das für die Hydroxylierung von Ectoin verantwortliche Enzym und dessen katalysierte Reaktion näher analysiert werden. Die Ectoin-Hydroxylase sollte nativ aus *S. salexigens* Ganzzellextrakten gereinigt und charakterisiert werden.

4.1 Entwicklung eines Aktivitäts-Testes zum Nachweis des EctD-Enzymes

Im Genom des Gram-positiven Actinomyceten *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.* 2002) ist direkt stromabwärts der Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* ein offener Leserahmen (GeneID:1097301) zu finden, welcher auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 30 % zu einer L-Prolin 4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. (Shibasaki *et al.* 1999) aufweist. Die Prolin-Hydroxylasen gehören zur Familie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.). Die Entwicklung des Aktivitätstestes basierte auf der Annahme, dass die Ectoin-Hydroxylasen, wie auch die Prolin-Hydroxylasen zur Familie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.) gehören, und ihnen deshalb ein ähnlicher Reaktionsmechanismus zugrunde liegt. Nach dem allgemeinen Reaktionsschema dieser Enzymfamilie wird 2-Oxoglutarat während der Hydroxylierung des Substrates stöchiometrisch oxidativ decarboxyliert, wobei ein Atom des molekularen Sauerstoffes in das Substrat eingebaut wird, und dort die Hydroxygruppe bildet, während das andere Sauerstoffatom auf das Co-Substrat 2-Oxoglutarate übertragen wird. Die abgespaltene Carboxygruppe vom Co-Substrat 2-Oxoglutarat wird als Kohlendioxid freigesetzt (Abb. 22).

Für die Entwicklung eines Aktivitätstestes wurden die Publikationen zur Reinigung und Charakterisierung einer L-Prolin 3-Hydroxylase aus *Streptomyces* sp. strain TH1 (Mori *et al.* 1997), einer Prolin 4-Hydroxylase aus *Streptomyces griseoviridus* P8648 (Lawrence *et al.* 1996) und der bereits erwähnten L-Prolin 4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. RH1 (Shibasaki *et al.* 1999) miteinander verglichen. Substrat, Puffer, Konzentrationen, Inkubation und Nachweis von Substrat und Produkt wurden für die Reinigung der Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* modifiziert und optimiert.

Für die Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* wurde ein Aktivitätstest mit Ectoin als Substrat, 2-Oxoglutarate und molekularen Sauerstoff aus der umgebenden Luft (aerobe Inkubation) als Co-Substrate verwendet. Da die Enzyme der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.) für die Katalyse Eisen(II) benötigen, wurde dem Reaktionsmix Eisensulfat (1 mM $FeSO_4$) zugegeben. Innerhalb dieser Proteinfamilie gibt es unterschiedliche Berichte über die Effekte von Ascorbat und Katalase auf die Enzymaktivät. Deshalb wurden in den ersten Reaktiosansätze Ascorbat und Katalase zugegeben (Lawrence *et al.* 1996; Prescott & Lloyd 2000; Costas *et al.*

2004). Der Reaktionsansatz wurde für 20 Minuten bei 32 °C im Schüttler unter aeroben Bedingungen inkubiert. Der Verbrauch des Substrates Ectoin und die Bildung des Produktes Hydroxyectoin wurden mittels HPLC-Analyse verfolgt. Als Referenz für die Retentionszeiten und zur Quantifizierung des Umsatzes wurden Ectoin- und Hydroxyectoin-Standards aus kommerziell verfügbaren Präparationen dieser Substanzen benutzt (Tab. 16).

Mit diesem Aktivitätstest für die Ectoin-Hydroxylase war es möglich, Enzymaktivität in *S. salexigens* Zellextrakten nachzuweisen. Die *S. salexigens* Zellen waren in Minimalmedium mit 3,2 M NaCl bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kultiviert worden, da unter diesen Bedingungen Hydroxyectoin synthetisiert wird (Abb. 11) und das verantwortliche Enzym also vorhanden sein muss. In Abwesenheit von Salzstress während des Wachstums, konnte keine Ectoin-Hydroxylase-Aktivität detektiert werden. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Hydroxyectoin nur in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen am Ende der exponentiellen und in der frühen stationären Wachstumsphase synthetisiert wird (Abb. 11).

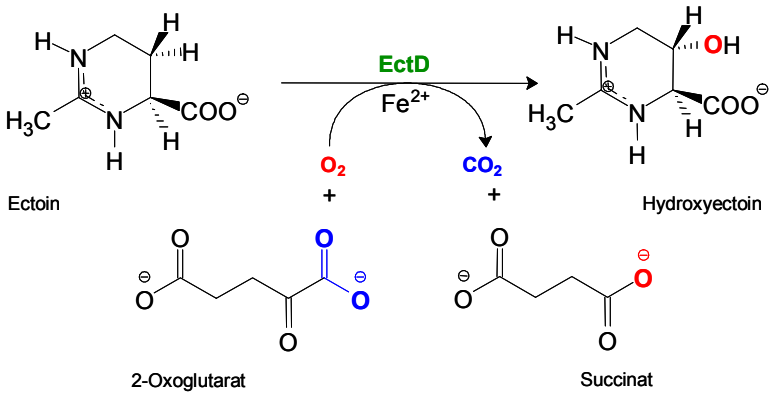


Abbildung 22. EctD-vermittelte Biosynthese von Hydroxyectoin in *S. salexigens*.
Dargestellt ist die Reaktion, die von der Ectoin-Hydroxylase katalysiert wird. Substrat für die Reaktion ist Ectoin, Co-Substrate sind 2-Oxoglutarat, welches decarboxyliert wird und molekularer Sauerstoff, von welchem ein Atom in die neu gebildete Hydroxygruppe am C5-Atom des Ectoines und das andere in die Carboxygruppe von Succinat eingebaut wird. Für die Aktivität des Enzymes ist die Zugabe von Eisen erforderlich.

4.2 Reinigung der Ectoin Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*

Um die Ectoin-Hydroxylase EctD nativ aus *S. salexigens* zu reinigen, wurden Kulturen in Minimalmedium mit 3,2 M NaCl angezogen. Unter diesen Wachstumsbedingungen wird eine hohe intrazelluläre Konzentration an Hydroxyectoin erreicht (Abb. 11). Deshalb wurde davon ausgegangen, dass unter diesen Bedingungen für eine Reinigung ausreichende Mengen an aktivem Protein in den Zellen vorhanden sein sollten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und mittels French Press aufgeschlossen. Da der Aktivitätstest auf dem Nachweis neu synthetisierten Hydroxyectoines unter Verbrauch zugegeben Ectoines basiert, wurde der nach Ultrazentrifugation zellfreie Extrakt gegen Puffer dialysiert, um die während des Wachstums unter Salzstress synthetisierten und akkumulierten

Tetrahydropyrimidine, Ectoin und Hydroxyectoin, zu entfernen. Ein weiterer Vorteil der Dialyse war eine Reduktion des NaCl-Gehaltes im Zellextrakt, da im ersten Reinigungsschritt eine Anionenaustausch-Chromatographie benutzt werden sollte. Salze, wie NaCl, würden eine Bindung der Proteine an das Säulenmaterial verhindern.

Nach einer Analyse der Proteineigenschaften der potentiellen Ectoin-Hydroxylasen und der sehr guten Trenneigenschaften des Source15Q Materials bei hoher Bindekapazität wurde als erste Chromatographiesäule dieser Aninonentauscher gewählt. Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten. Ectoin-Hydroxylase-Aktivität konnte in den Fraktionen um 180 mM NaCl detektiert werden. Als weiterer chromatographischer Reinigungsschritt wurde keramisches Hydroxyapatit verwendet. Eluiert wurde in einem linearen Gradienten mit Kaliumphosphat. Fraktionen mit Ectoin-Hydroxylase-Aktivität eluierten um 123 mM Kaliumphosphat. Als dritter Schritt folgte eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie an einer Source-Phe-Säule. Dabei eluierte die Ectoin-Hydroxylase mit absteigendem Ammoniumsulfat-Gradienten um 970 mM $(NH_4)_2SO_4$. In einem weiteren Reinigungsschritt wurde ein weiterer Anionentauscher, eine MonoQ HR 5/5 verwendet. Diese Säule wurde trotz gleichem Bindeprinzip wie die Source15Q an dieser Stelle verwendet, da sie es aufgrund ihrer geringen Größe und anderen Säulenmateriales ermöglichte, weitere Verunreinigungen abzutrennen. Die Ectoin-Hydroxylase eluierte bei 180 mM NaCl. Als letzter Schritt der Reinigung wurde eine Gelfiltrationssäule, Superdex 75 pg, bei 24 °C verwendet. Durch die Erhöhung der Temperatur kam es zu einer entscheidenden Verbesserung der Trenneigenschaften, was die Reinigung des Proteines zu apparenter Homogenität ermöglichte (Abb. 23). Für die Elution von der letzten Säule wurde das TES-Puffersystem benutzt, so dass das gereinigte Protein in einem definierten Puffer vorlagt, und für weitere Experimente nicht mehr dialysiert oder umgepuffert werden musste.

Das gereinigte Enzym konnte ohne messbaren Aktivitätsverlust in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Tabelle 15. Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*.

S. salexigens wurde in Minimalmedium mit 3,2 M NaCl bei 37 °C aerob kultiviert. Das Enzym wurde aus circa 15 g Feuchtzellen gereinigt. Angegeben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

Reinigungsschritt	Totale Aktivität [U]	Protein [mg]	Spezifische Aktivität [U · (mg Protein)$^{-1}$]	Ertrag [%]
Zellfreier Extrakt	54.3	702	0.08	100
Source 15 Q	41.1	35.7	1.15	76
CHT	33.8	11.4	2.97	62
Source 15 Phe	17.1	8.5	2.02	32
Mono Q	12.5	6.5	2.40	33
Superdex 75 pg	11	3.6	3.06	20

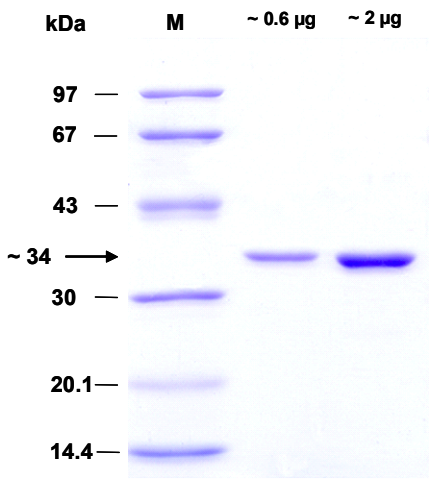


Abbildung 23. Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*.

Das Enzym wurde in mehreren chromatographischen Schritten zu apparenter Homogenität nativ aus *S. salexigens* gereinigt und elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Spur1 ist ein Proteinmarker, die entsprechenden molekularen Massen sind an der Seite in kDa angegeben; Spur 2 enthält 0,6 µg EctD-Protein; Spur 3 enthält 2 µg gereinigtes EctD-Protein.

4.3 Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz der Ectoin-Hydroxylase

Die aminoterminale Aminosäuresequenz des aus *S. salexigens* gereinigten Enzymes wurde mit der Edman-Methode durch einen sequentiellen Abbau und Bestimmung der jeweils freigesetzten Aminosäure ermittelt.

Die ersten fünfzehn Aminosäuren des Aminoterminus von EctD sind M-E-D-L-Y-P-S-R-Q-N-N-Q-P-K-I und entsprechen exakt den ersten fünfzehn Aminosäuren, die von der DNA-Sequenz des klonierten *ectD*-Genes abgeleitet werden konnten (Abb. 18; 19). Dies stellt einen Beweis dafür dar, dass das klonierte Gen *ectD*, tatsächlich das Strukturgen für die gereinigte Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* ist.

4.4 Bestimmung der molekularen Masse der Ectoin Hydroxylase EctD

Die aus *S. salexigens* gereinigte Ectoin-Hydroxylase verhält sich in einem SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) wie ein Polypeptid mit einer Masse von circa 34 kDa (Abb. 23).

Das Elutionsverhalten von der Gelfiltrationssäule Superdex 75 pg entspricht einer molekularen Masse von etwa 36 kDa. Dies zeigt, dass das Protein als ein Monomer vorliegt.

Die exakte molekulare Masse des gereinigten EctD Proteines wurde mit dem Verfahren der Massenspektrometrie bestimmt. Für die Berechnung der Masse wurden die zwei Peaks mit der größten Signalstärke (34337 und 17169) herangezogen und aus ihnen ein Mittelwert von 34,338 kDa berechnet (Abb. 24). Dieser Wert stimmt mit der molekularen Masse von 34,4 kDa der Aminosäuresequenz überein, die vom klonierten *ectD*-Gen abgeleiteten wurde.

Alle drei erkennbaren Signale lassen sich dem EctD-Protein zuordnen. Sie stellen ganze Vielfache des Ionisierungszustandes dar und geben jeweils ein Ganzes, die Hälfte bzw. ein Drittel der molekularen Masse wieder.

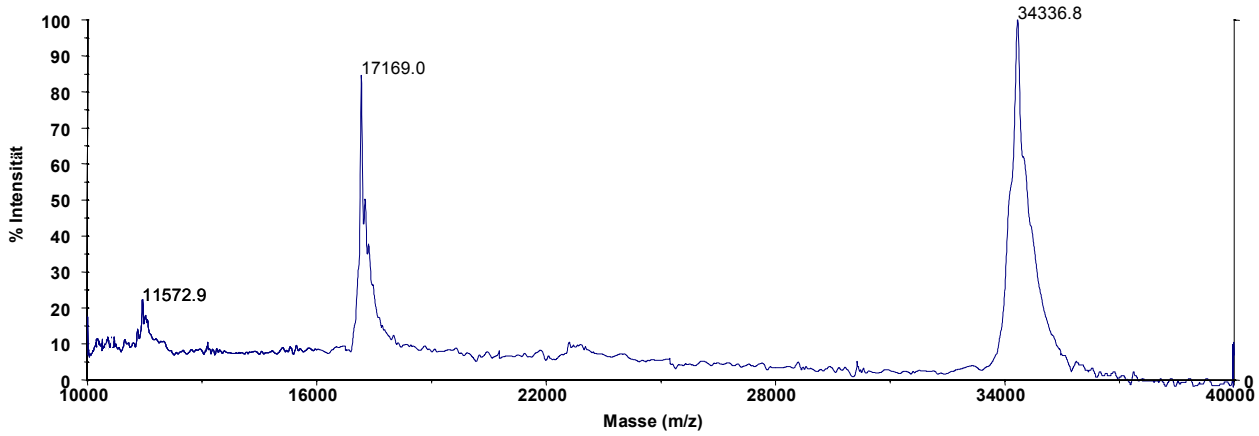


Abbildung 24. Massenspektrum der gereinigten Ectoinhydroxylase EctD.

Das Spektrum wurde mit Sinapinsäure als Matrix mit einem Voyager DE-RP Instrument aufgenommen Die Zahlen geben die molekulare Masse des vermessenen Proteines an. Die Peaks von rechts nach links spiegeln die unterschiedlichen Ionisierungszustände des Proteines wieder und sind ein Ganzes, die Hälfte und ein Drittel der molekularen Masse. Für die Bestimmung wurde der Mittelwert von 34,338 kDa berechnet.

4.5 Eindimensionale ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur Produktbestätigung

Die (4*S*,5*S*) stereochemische Konfiguration für die beiden chiralen Kohlenstoffatome C4 und C5 im Pyrimidinring von Hydroxyectoin (Abb. 25) wurde mit *in vivo* synthetisiertem Hydroxyectoin des Actinomyceten *Streptomyces parvulus* bestimmt (Inbar & Lapidot 1988; Inbar & Lapidot 1991; Inbar *et al.* 1993). In diesem Actinomyceten wurde das hydroxylierte Derivat von Ectoin erstmal nachgewiesen (Inbar & Lapidot 1988).

Um zu zeigen, dass das aus *S. salexigens* gereinigte EctD-Enzym tatsächlich Ectoin zu Hydroxyectoin umsetzt und ob es die gleiche stereochemische Konfiguration aufweist wie das in der Literatur beschriebene Hydroxyectoin aus *S. parvulus*, wurde das Reaktionsprodukt des *in vitro* Tests mit Hilfe der eindimensionalen Proton-Kernresonanzspetroskopie (^{1}H-NMR-Spektroskopie) analysiert.

Das Substrat (*S*)-Ectoin wurde mit der Ectoin-Hydroxylase EctD bis zur vollständigen Umsetzung zu Hydroxyectoin inkubiert. Dies wurde durch HPLC-Analyse überprüft. Das Protein des Reaktionsansatzes wurde durch Ultrafiltration (Ausschlussgröße 10 kDa) entfernt. Die stereochemische Konfiguration des *de novo* synthetisierten Hydroxyectoines wurde dann mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie (300 MHz) analysiert. Das resultierende Spektrum wurde dann mit dem ^{1}H-NMR-Spektrum von käuflichem Hydroxyectoin (industriell gereinigt aus *Marinococcus* M52) als Standard verglichen (Abb. 25). Beide ^{1}H-NMR-Spektren sind hinsichtlich chemischer Verschiebung und ^{1}H-^{1}H Kopplungs-Mustern identisch. Zusätzlich

wurden die Kopplungskonstanten mit den Literaturwerten für Hydroxyectoin aus *S. parvulus* verglichen (Inbar & Lapidot 1988; Inbar & Lapidot 1991; Inbar *et al.* 1993), wodurch gezeigt werden konnte, dass es sich tatsächlich um Hydroxyectoin handelt. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass das mit EctD *in vitro* synthetisierte Hydroxyectoin die gleiche (4*S*,5*S*) stereochemische Konfiguration aufweist, wie das Hydroxyectoin aus *S. parvulus* (Inbar *et al.* 1993) und *Marinococcus* M52.

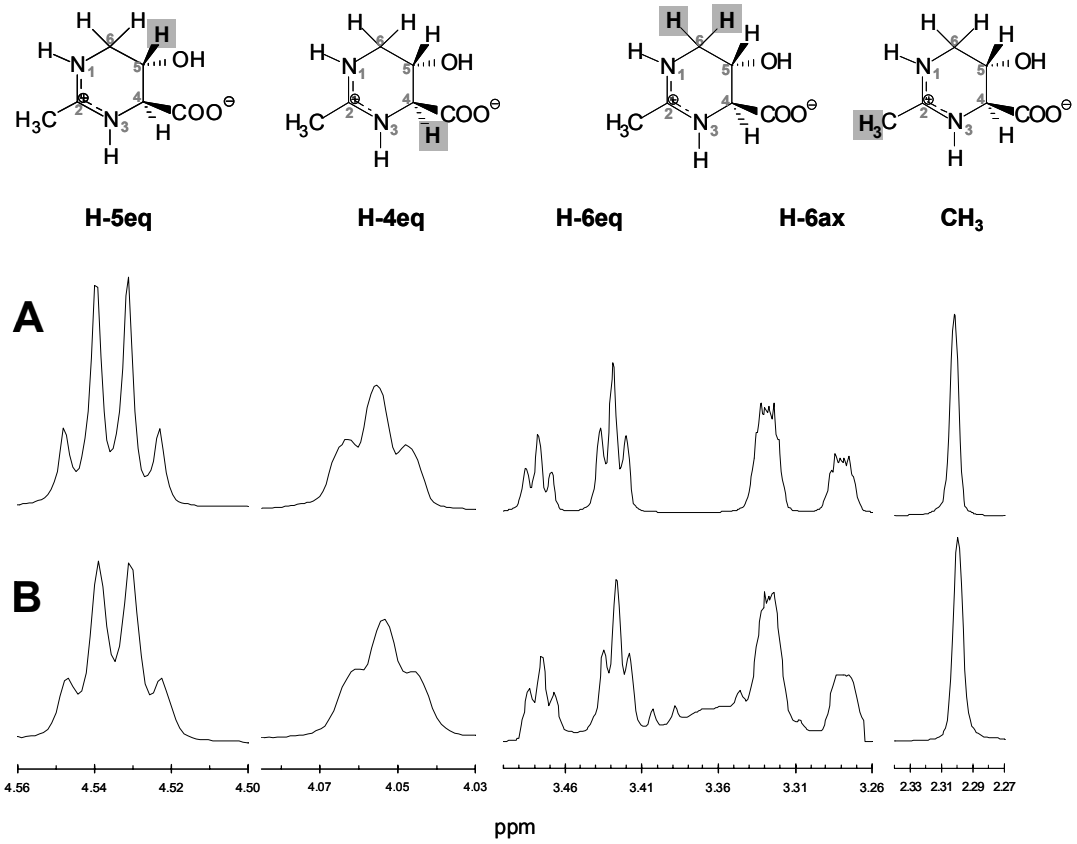


Abbildung 25. ^{1}H-NMR-Spektren von Hydroxyectoin.

(**A**) Dargestellt ist das ^{1}H-NMR Spektrum bei 300 MHz von käuflichem Hydroxyectoin aus *Marinococcus* M52. Es diente als Referenz für (**B**) *in vitro* synthetisiertes Hydroxyectoin, welches in einer EctD katalysierten Reaktion aus Ectoin gebildet wurde. Über den Spektren ist die Strukturformel von Hydroxyectoin angegeben. Die Wasserstoffatome, die für das jeweilige Signal verantwortlich sind, sind hervorgehoben. Die Nummer des jeweiligen Kohlenstoffatomes und die relative Lage zum Pyrimidinring sind angegeben (eq, equatorial, äquatorial; ax, axial).

4.6 Kinetische Parameter der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*

4.6.1 Enzym-Aktivität der Ectoin-Hydroxylase

Das aus *S. salexigens* gereinigte Enzym kann *in vitro* Ectoin zu Hydroxyectoin hydroxylieren. Mit 2 mU der gereinigten Ectoin-Hydroxylase konnte bei konstanten Testbedingungen, wie Inkubationstemperatur, Konzentrationen von Substrat und Co-Substraten eine lineare Abhängigkeit von der Inkubationszeit bis circa 10 Minuten festgestellt werden. Darüber hinaus verlangsamt sich die Reaktionsgeschwindigkeit durch Produkthemmung und die sinkende Substratkonzentration. Zu einer Verminderung der

Aktivität tragen wahrscheinlich auch die Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies bzw. Wasserstoffperoxyd bei, welche durch unspezifische Nebenreaktionen (2-Oxoglutarat wird, ohne eine Hydroxylierung von Ectoin, zu Succinat decarboxyliert) oder durch „Fenton"-Reaktionen unter Mitwirkung des Eisens generiert werden (Crichton *et al.* 2002).

Die kinetischen Parameter des Enzymes wurden deshalb mit Reaktionszeiten unter 5 Minuten bestimmt.

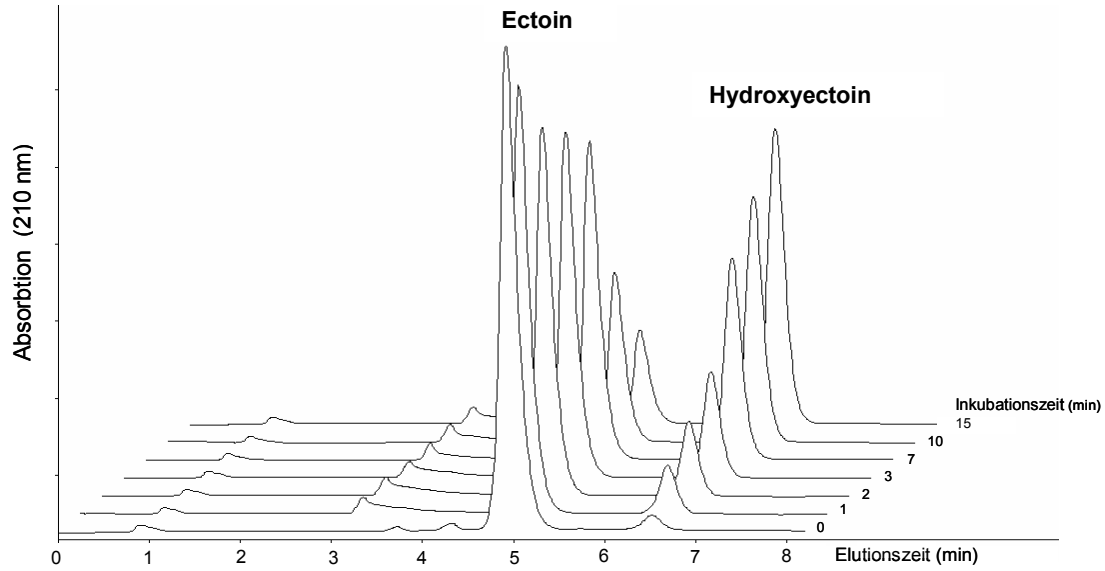


Abbildung 26. HPLC-Analyse der *in vitro* Aktivität der Ectoin-Hydroxylase EctD.

Dargestellt sind Chromatogramme der HPLC-Analyse der von gereinigtem EctD katalysierten *in vitro* Reaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin. An den einzelnen Chromatogrammen sind die jeweiligen Inkubationszeiten in Minuten angegeben. Der Testansatz (30 µl) wurde bei 32 °C mit 2 mU der gereinigten Ectoin-Hydroxylase EctD, 6 mM Ectoin, 10 mM 2-Oxoglutarat, 1 mM $FeSO_4$ und 1,3 kU Katalase aerob inkubiert. Die Retentionszeiten von Ectoin und Hydroxyectoin wurden mit kommerziell verfügbaren Proben als Standards ermittelt. Detektiert wurde die Absorption von Ectoin und Hydroxyectoin bei 201 nm.

4.6.2 Bestimmung des K_m -Wertes für das Substrat Ectoin

Die kinetischen Parameter der Ectoin-Hydroxylase wurden mit dem nativ aus *S. salexigens* gereinigtem Enzym bestimmt. Der K_m Wert für das Substrat Ectoin wurde mit Messungen im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 20 mM ermittelt. Die *in vitro* Reaktion (30µl Gesamtvolumen) wurde bei 32 °C für maximal 5 Minuten mit 10 mM 2-Oxoglutarat, 1 mM $FeSO_4$, 1,3 kU Katalase und jeweils 1 mM, 2 mM, 4 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM Ectoin aerob inkubiert. Molekularer Sauerstoff als zweites Co-Substrat wurde durch aerobe Inkubation im Thermomixer bei 700 rpm für die Reaktion zur Verfügung gestellt. Die Messungen für jede angegebene Konzentration wurden zweimal durchgeführt und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die mathematische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung und der Linearisierung nach

Lineweaver-Burk. Der ermittelte K_m-Wert für das Substrat Ectoin liegt bei 3,5 ± 0,2 mM, die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion V_{max} beträgt 0,46 ± 0,1 U/mg Protein (Abb. 27).

4.6.3 Bestimmung des K_m-Wertes für das Co-Substrat 2-Oxoglutarat

Ohne die Zugabe des Co-Substrates 2-Oxoglutarat konnte keine Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin detektiert werden.

Der K_m Wert für das Co-Substrat 2-Oxoglutarat wurde mit Messungen im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 15 mM ermittelt. Die *in vitro* Reaktion (30µl Gesamtvolumen) wurde bei 32 °C für maximal 5 Minuten mit 10 mM Ectoin, 1 mM $FeSO_4$, 1,3 kU Katalase und jeweils 1 mM, 2 mM, 4 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM 2-Oxoglutarat aerob inkubiert. Molekularer Sauerstoff als zweites Co-Substrat wurde durch aerobe Inkubation im Thermomixer bei 700 rpm für die Reaktion zur Verfügung gestellt.

Die Messungen für jede angegebene Konzentration wurden zweimal durchgeführt und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die mathematische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung und der Linearisierung nach Lineweaver-Burk. Der ermittelte K_m-Wert für Co-Substrat 2-Oxoglutarat liegt bei 5,2 ± 0,2 mM (Abb. 27).

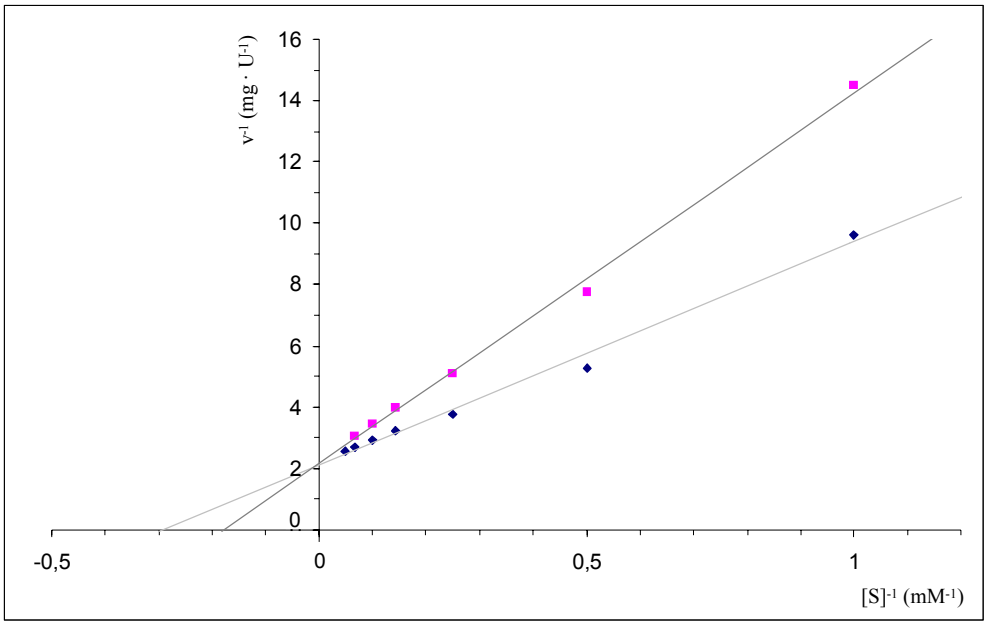


Abbildung 27. K_m-Bestimmung für das Substrat Ectoin und das Co-Substrat 2-Oxoglutarat.

Lineweaver-Burk-Darstellung: Reziproke Auftragung von spezifischer Aktivität gegen Substratkonzentration von Ectoin (♦) und 2-Oxoglutarat (■) zur Ermittlung von K_m Wert (-1/Schnittpunkt der X-Achse) und maximaler Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} (1/Schnittpunkt der Y-Achse). Die Messungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Standardabweichung war für eine Darstellung im Diagramm zu gering.

4.6.4 Molekularer Sauerstoff als Co-Substrat

Laut der Arbeitshypothese über die Zugehörigkeit zu der Enzymfamilie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.) sollte molekularer Sauerstoff als Co-Substrat für eine Hydroxylierung von Ectoin benötigt werden (Abb. 22). Dabei wird ein Sauerstoffatom in die Hydroxygruppe des Hydroxyectoines und das andere Sauerstoffatom in die Carboxygruppe des Succinates inkorporiert.

Für die Untersuchung ob molekularer Sauerstoff tatsächlich als Co-Substrat für die *in vitro* Hydroxylierung von Ectoin notwendig ist, wurde ein Reaktionsansatz unter anoxischen Bedingungen inkubiert. Alle zugegebenen Lösungen waren ebenfalls anoxisch. Auch bei längerer Inkubationszeit war keine Hydroxylase-Aktivität feststellbar, da weder Hydroxyectoin nachgewiesen oder eine Abnahme des Substrates Ectoin detektiert werden konnte. Molekularer Sauerstoff ist somit essentiell für eine EctD-abhängige Hydroxyectoin-Biosynthese aus Ectoin.

4.6.5 Abhängigkeit der Enzym-Aktivität von der $FeSO_4$-Konzentration

Eisen(II) ist essentiell für die Aktivität der Ectoin-Hydroxylase und muss zum *in vitro* Test zugegeben werden. Die Aktivität des Enzymes ist dabei von der $FeSO_4$-Konzentration abhängig. Ohne die Zugabe von Eisensulfat ist keine Hydroxylase-Aktivität zu verzeichnen. Bei $FeSO_4$-Konzentrationen bis 1 mM wird die Aktivierung des EctD-Enzymes erhöht. Eine $FeSO_4$–Konzentration von 0,75 mM bis 1 mM resultiert in der maximalen Aktivität des Enzymes. Bei höheren Konzentrationen ist eine Hemmung der *in vitro* Aktivität der Hydroxylase zu erkennen (Abb. 28).

Potentielle Szenarien, welche entweder allein oder gemeinsam zu einer eisenabhängigen EctD- „Aktivierung“ *in vitro* beitragen können sind: Da das Enzym aerob gereinigt wurde könnte das Eisen(II) des aktiven Zentrums zu Eisen(III) oxidiert und damit inaktiv sein. (**A**) Das zugegeben Eisen(II) könnte inaktives Eisen(III) aus dem aktiven Zentrum des Enzymes verdrängen; (**B**) dieses wieder zu Eisen(II) reduzieren und dadurch das Enzym aktivieren; oder (**C**) die leere Eisenbindestelle im Enzym wieder besetzen, falls das Eisen währen der Reinigung aus dem Protein gerissen wurde. Eine erhöhte Eisenkonzentration hat aber auch negative Effekte auf die Aktivität des Proteins (Abb. 28). Dies sind wahrscheinlich toxische Effekte einer hohen Konzentration nicht komplexierten Eisens, die auch aus lebenden Zellen im Zusammenhang mit oxidativem Stress und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und H_2O_2 (Fenton-Reaktion, (Crichton *et al.* 2002)) bekannt sind.

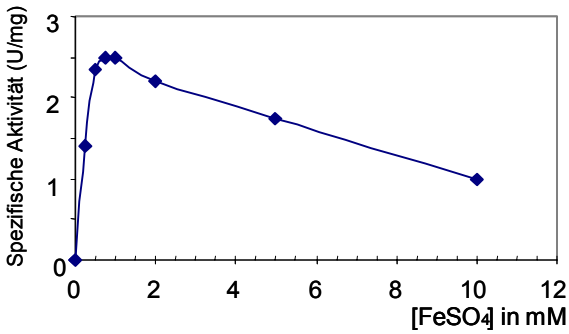


Abbildung 28. Abhängigkeit der EctD-Aktivität von der $FeSO_4$-Konzentration.

Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Ectoin-Hydroxylase EctD von der $FeSO_4$-Konzentration im *in vitro* Testansatz. Ectoin und 2-Oxoglutarat wurden 10 mM eingesetzt. Die Messungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Standardabweichung ist so gering, dass sie im Diagramm nicht dargestellt werden konnte.

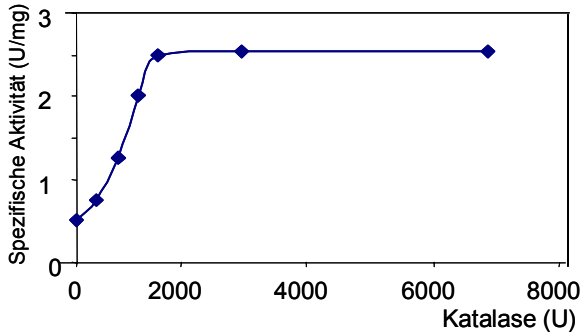
4.6.6 Abhängigkeit der Enzym-Aktivität von der Katalase-Konzentration

Für Prolin-Hydroxylasen sind in der Literatur unterschiedliche Einflüsse von Katalase im Reaktionsansatz beschrieben (Lawrence *et al.* 1996; Mori *et al.* 1997; Shibasaki *et al.* 1999).

Mit verschiedenen Katalase-Konzentrationen im Reaktionsgemisch konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym durch Katalase geschützt werden kann und dadurch die *in vitro* Hydroxylase-Aktivität von EctD über einen längeren Zeitraum erhalten werden konnte. Die Zugabe von 1,3 kU Katalase erhöhte die Aktivität um den Faktor fünf (Abb. 29). Eine weitere Erhöhung der Katalase-Konzentration hat keine weiteren Auswirkungen auf die Aktivität von EctD.

Die Katalase spaltet das während der *in vitro* Reaktion möglicherweise gebildete Wasserstoffperoxyd (Abb. 29B). Zum einen kann Eisen wie unter 4.6.5 zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen. Zum anderen wurde für Enzyme dieser Familie eine substratunabhängige Nebenreaktion postuliert, bei der unter Verbrauch der Co-Substrates 2-Oxoglutarat und Sauerstoff, Succinat und Wasserstoffperoxyd gebildet wird (Onishi *et al.* 1984), welches das Protein inaktiveren kann.

A



B

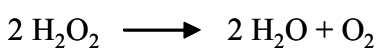


Abbildung 29. Abhängigkeit der EctD-Aktivität von der Katalase-Konzentration.

Ectoin und 2-Oxoglutarat wurden 10 mM eingesetzt. Die Messungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Standardabweichung ist zu gering für eine Darstellung im Diagramm.

4.6.7 Abhängigkeit der Enzym-Aktivität von der Ascorbat-Konzentration

Für einige Prolin-Hydroxylasen wurde eine Erhöhung der Enzymaktivität durch die Zugabe von Ascorbat zum Reaktionsansatz beschrieben. Der positive Effekt könnte auf einer Reduktion des Eisens im Aktiven Zentrum zurückzuführen sein, welches im während der Reinigung zu Eisen(III) oxidiert wurde.

Für die Ectoinhydroxylase EctD konnte dieser positive Effekt nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, die Zugabe von Ascorbat inhibierte die EctD Enzymaktivität um bis zu 70 %, wenn Ascorbat in einer Konzentration von 5 mM zum Reaktionsansatz zugegeben wurde (Abb. 30).

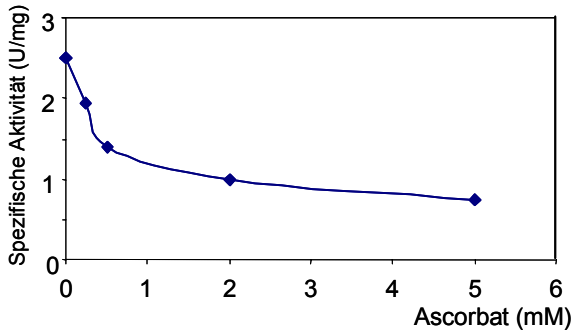


Abbildung 30. Abhängigkeit der EctD-Aktivität von der Ascorbat-Konzentration.

Die Messungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Standardabweichung ist so gering, dass sie im Diagramm nicht dargestellt werden konnte.

4.6.8 Abhängigkeit der Enzym-Aktivität von der Temperatur

Für die Bestimmung der Temperatur bei der die maximale Aktivität der Ectoin-Hydroxylase erreicht wird, wurden identische Reaktionsansätze bei den zu untersuchenden Temperaturen inkubiert. Die höchste Aktivität des EctD-Enzymes wurde bei einer Temperatur von 32 ± 2 °C im *in vitro* Testansatz erreicht.

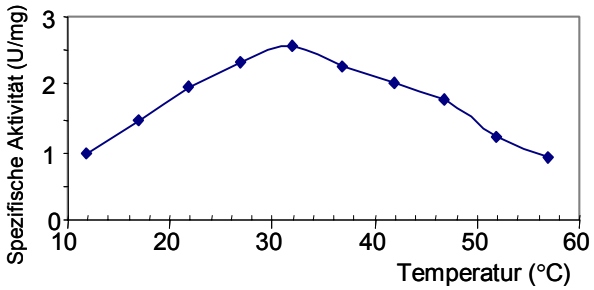


Abbildung 31. Abhängigkeit der EctD-Aktivität von der Inkubationstemperatur.

Die Messungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Standardabweichung ist so gering, dass sie im Diagramm nicht dargestellt werden konnte.

4.6.9 Abhängigkeit der Enzym-Aktivität vom pH-Wert

Um den pH-Bereich zu bestimmen, in welchem das Enzym seine höchste Aktivität *in vitro* aufweist, wurden mehrere Puffersystem mit überlappenden pH-Bereichen gewählt (MES (pH 5,5; 6; 6,5), PIPES (pH 6,5; 7), TES (pH 7; 7,5; 8), BICINE (pH 8; 8,5; 9) und CHES (pH 9; 9,5; 10)). Die höchste Aktivität wurde bei pH 7,5 ± 0,25 gemessen.

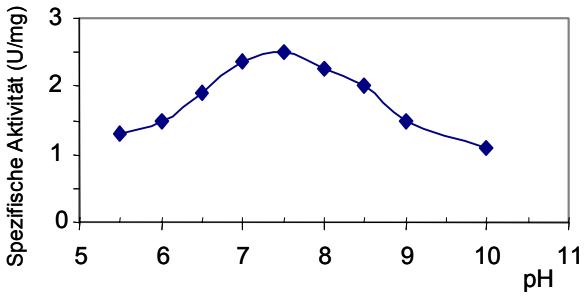


Abbildung 32. Abhängigkeit der EctD-Aktivität vom pH-Wert.

Die Messungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte.

4.6.10 Optimierter *in vitro* Aktivitätstest für die Ectoin-Hydroxylase EctD

Der in Anlehnung an die Aktivitätstest der Prolin-Hydroxylasen entwickelte Testansatz ist in Tabelle 16 neben dem nach Bestimmung der Eigenschaften der Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* optimierten Aktivitätstest dargestellt. Der Testansatz wurde während der Inkubation bei 700 rpm in einem Thermoblock geschüttelt, um eine ausreichende Versorgung mit dem Co-Substrat Sauerstoff zu ermöglichen. Durch Zugabe von Acetonitril bis zu einer Endkonzentration von 50 % und anschließender Zentrifugation bei 32000 g (15 min, 4 °C), wurde die Reaktion gestoppt und nicht lösliche Proteine gefällt, die eine HPLC-Analyse stören würden. Die Retentionszeiten und Konzentrationen von Ectoin und Hydroxyectoin wurden durch kommerzielle Standards dieser Substanzen ermittelt.

Tabelle 16. Aktivitätstest für die Reinigung und Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*.

			optimierter Aktivitätstest	
	µl	Endkonzentration (mM)	**µl**	**Endkonzentration (mM)**
Protein	92	~	max. **25** [a]	~
Ectoin	4	4	**1,8**	**6**
2-Oxoglutarat	1	5	**0,6**	**10**
$FeSO_4$	1	2	**1,5**	**1**
Ascorbat	1	5	**0**	**0**
Katalase	1	1,3 kU	**1**	**1,3 kU**
TES Puffer pH 7,5		10		**10**
Inkubationstemperatur		32 °C		**32 °C**
Inkubationszeit		20 min		**max. 5 min**

[a] Von den Fraktionen während der EctD-Reinigung wurden maximal 25 µl verwendet, für die biochemische Charakterisierung wurden 2 mU benutzt. Das restliche Volumen wurde mit entionisiertem Wasser aufgefüllt.

4.6.11 Die Ectoin-Hydroxylase EctD ist eine Dioxygenase

Die Bezeichnung des aus *S. salexigens* gereinigten Enzymes als „Ectoin-Hydroxylase“ bzw. als Dioxygenase basiert auf den Regeln des "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)“ (http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/rules.html).

Nach Regel 17, ist die Bezeichnung „Oxygenase“ zu verwenden, wenn das O_2 Molekül (oder Teile von ihm) direkt in das oder die Substrate eingebaut wird.

Nach Regel 20 gilt, werden beide Atome des O_2 eingebaut, wird die Bezeichnung **Di**oxygenase verwendet. Diese Vorgaben werden von dem EctD-Enzym erfüllt (Abb. 22).

Der Name „Ectoin-Hydroxylase“ wurde als Trivialname gewählt, da er die katalysierte Reaktion verdeutlicht: Ectoin wird Hydroxyliert.

4.6.12 Substratspezifität der Ectoin-Hydroxylase EctD

Einige Enzyme der Superfamilie der Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen akzeptieren auch strukturverwandte Substrate. Es sollte außerdem ausgeschlossen werden dass es sich bei der beobachteten Ectoin-Hydroxylase-Aktivität um kein zufälliges Artefakt oder eine unspezifische Nebenreaktion des gereinigten Proteines handelt.

4.6.12.1 Prolin ist kein Substrat des EctD-Enzymes

Die Bedingungen, unter welchen der Aktivitätstest für die Ectoin-Hydroxylase durchgeführt wurde, ähneln denen, die für die Bestimmung der Enzymaktivität verschiedener Prolin-Hydroxylasen benutzt wurden (Lawrence *et al.* 1996; Mori *et al.* 1997; Shibasaki *et al.* 1999). Außerdem zeigt Prolin einige strukturelle Gemeinsamkeiten zu Ectoin (Abb. 33), wie z.B. die Ringstruktur, die Carboxygruppe und den ringständigen Stickstoff in der Nachbarschaft zur Carboxygruppe (Abb. 33).

Um sicher zu stellen, dass es sich bei dem aus *S. salexigens* gereinigten Enzym nicht um eine der weit verbreiteten Prolin-Hydroxylasen handelt, welche eine artifizielle oder unspezifische Ectoin-Hydroxylase-Aktivität besitzt, wurde im Reaktionsansatz L-Prolin anstelle von Ectoin als Substrat eingesetzt. Das potentielle Substrat Prolin und die möglichen Produkte, 3-Hydroxyprolin oder 4-Hydroxyprolin, welche als Standards benutzt wurden, konnten mittels HPLC-Analyse (FMOC-Derivatisierung) nachgewiesen und voneinander eindeutig unterschieden werden (Abb. 33). Der Testansatz wurde bei 32°C mit 2 mU der gereinigten Ectoin-Hydroxylase, 10 mM Prolin, 10 mM 2-Oxoglutarat, 1 mM $FeSO_4$ und 1,3 kU Katalase für 30 Minuten aerob inkubiert. Detektiert wurde die Emission bei 315 nm bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm.

In den Reaktionsansätzen, in denen Prolin mit EctD inkubiert wurde konnte weder 3- noch 4-Hydroxy-Prolin detektiert werden. Des Weiteren war keine Abnahme der Prolinkonzentration zu beobachten (Abb. 33). Damit wurde eindeutig gezeigt, dass es sich bei dem aus *S. salexigens* gereinigten EctD Enzym um keine Prolin-Hydroxylase handelt.

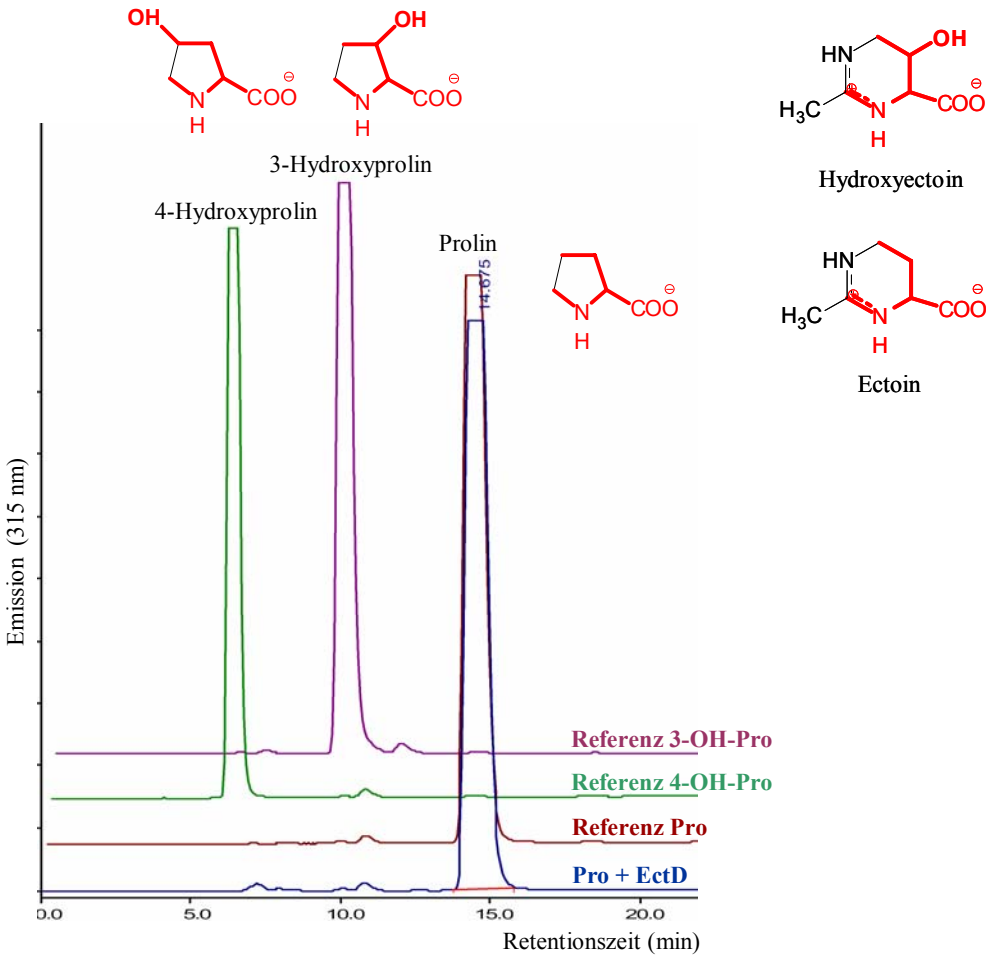


Abbildung 33. HPLC-Analyse der *in vitro* Prolin-Hydroxylase-Aktivität von EctD.

(A) Dargestellt sind Chromatogramme der HPLC-Analyse des Reaktionsgemisches von gereinigtem EctD mit Prolin als Substrat und die verwendeten Standards (kommerzielle Proben der Substanzen). Über den jeweiligen Peaks sind die Strukturformeln der Substanz angegeben. Strukturelle Gemeinsamkeiten zu Ectoin und Hydroxyectoin sind rot gekennzeichnet. An den einzelnen Chromatogrammen sind die jeweils verwendeten Substanzen angegeben. (B) Zum Vergleich der strukturellen Gemeinsamkeiten (in rot) wurden Ectoin und Hydroxyectoin dargestellt. Dieses Experiment wurde in einem zweiten unabhängigen Test reproduziert.

4.6.12.2 Synthetische Ectoin-Derivate als potentielle EctD-Substrate

Gegenwärtig sind zwei synthetische Ectoin-Derivate verfügbar (von Prof. E. A. Galinski zur Verfügung gestellt). Dies ist zum einen Homoectoin ((*S*)-4,5,6,7-tetrahydro-2-methyl-1H-(1,3)-Diazepin-4-Carboxylat) und zum anderen DHMICA ((*RS*)-4,5-Dihydro-2-Methyl-Imidazol-4-Carboxylat), welche sich in der Anzahl der am Ring beteiligten Kohlenstoff-Atome unterscheiden, ansonsten aber die gleichen funktionellen Gruppen und Landungsverteilung wie Ectoin aufweisen (Abb. 34). Homoectoin ist ein Molekül mit sieben Atomen im Ring, während DHMICA einen Imidazolring mit 5 Atomen besitzt. Im Gegensatz dazu hat Ectoin, mit einem Pyrimidinring als Grundstruktur, sechs Atome in einem Ring koordiniert.

Im Aktivitätstest wurden anstelle von Ectoin die beiden synthetische Strukturanaloga Homoectoin oder DHMICA als potentielles Substrat für EctD eingesetzt. Der Testansatz wurde bei 32 °C mit 2 mU der gereinigten Ectoin-Hydroxylase EctD, 10 mM des jeweiligen

Substrates, 10 mM 2-Oxoglutarat, 1 mM $FeSO_4$ und 1,3 kU Katalase aerob (700 rpm in einem Thermoblock) inkubiert.

In den Reaktionsansätzen, in denen Homoectoin oder DHMICA als Substrate in die Reaktion eingesetzt wurden, konnte kein hydroxyliertes Derivat dieser Substanzen detektiert werden. Eine Hydroxylierung dieser Substanzen kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, da keine hydroxylierten Formen dieser Substanzen existieren, die als Standards in der HPLC-Analyse hätten eingesetzt werden können, um die Auftrennbarkeit dieser Substanzen zu demonstrieren. Eine identische Retentionszeit beider Substrate und der jeweiligen hydroxylierten Produkte ist aufgrund der guten Auftrennbarkeit von Ectoin und Hydroxyectoin aber nahezu auszuschließen.

Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der aus *S. salexigens* gereinigten Ectoin-Hydroxylase EctD um ein sehr substratspezifisches Enzym handelt, was die spezifischen strukturellen Eigenschaften von Ectoin für die Hydroxylierungsreaktion benötigt.

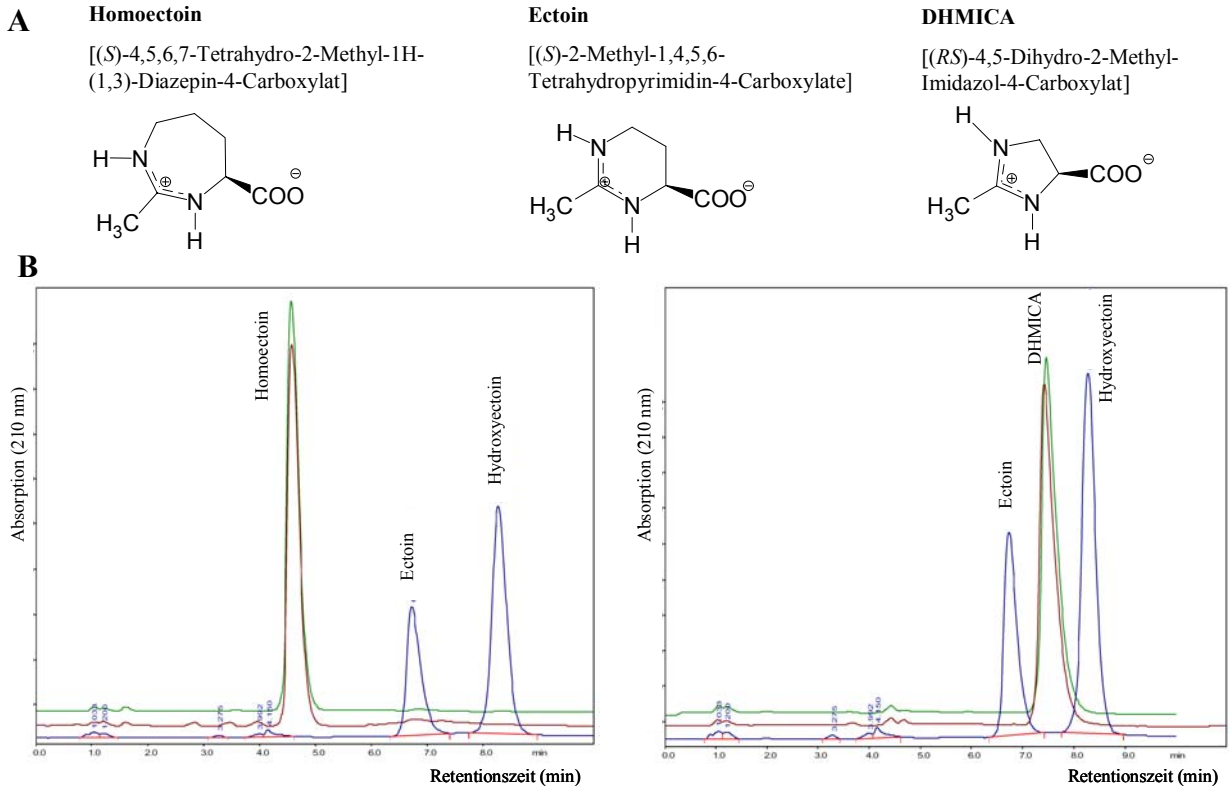


Abbildung 34. HPLC-Analyse der *in vitro* Aktivität der Ectoin-Hydroxylase EctD mit Homoectoin oder DHMICA als Substrate.

(**A**) Dargestellt sind die Strukturformeln von Ectoin und dessen synthetischen Derivaten Homoectoin und DHMICA. (**B**) Chromatogramme der HPLC-Analyse des Reaktionsgemisches von dem gereinigten EctD Enzym und den synthetischen Ectoin-Derivaten Homoectoin oder DHMICA als Substrat und die verwendeten Standards (Proben ohne Enzym). Die Reihenfolge der einzelnen Chromatogramme ist (von unten nach oben): Ectoin + EctD; Referenz Homoectoin; Homoectoin + EctD. Die EctD-katalysierte *in vitro* Reaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin wurde als Vergleich dargestellt. Die Retentionszeiten von Ectoin und Hydroxyectoin wurden mit kommerziell verfügbaren Proben als Referenz ermittelt. Detektiert wurde die Absorption bei 210 nm. Dieses Experiment wurde in einem zweiten unabhängigen Test reproduziert.

4.7 Synthese der Ectoin-Hydroxylase EctD in *S. salexigens*

In Zellen von *S. salexigens*, die unter Salzstress kultiviert werden, ist in der exponentielle Wachstumsphase (OD_{578} von 1) kein Hydroxyectoin nachweisbar, wogegen das Substrat der Ectoin-Hydroxylase, Ectoin, bereits in hohen Konzentrationen vorliegt.

Die *ectD*-Transkription ist in dieser Wachstumsphase deutlich induziert, was in den Northern Blot Analysen gezeigt wurde (Abb. 21). Um zu analysieren, ob das EctD Enzym ebenfalls schon in dieser Wachstumsphase in den Zellen vorhanden ist, wurde ein EctD-spezifischer Antikörper mit nativ aus *S. salexigens* gereinigtem Protein hergestellt (in Zusammenarbeit mit L. Kremp, AG Lingelbach, Universität Marburg). Dieser EctD-Antikörper wurde in Western-Blot Analysen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper spezifisch für EctD aus *S. salexigens* ist, da in Ganzzellextrakten dieses Organismus nur ein Protein detektiert werden konnte, das in einem SDS-Polyacrylamidgel die gleiche Eigenschaften wie das gereinigte EctD-Protein (~ 50 ng/Spur) aufwies.

Dieser EctD-spezifische Antikörper wurde für Western Blot-Analysen von Ganzzellextrakten von *S. salexigens*-Zellen eingesetzt, die in Minimalmedium mit 0,4 M NaCl und 3,2 M NaCl bei 37 °C kultiviert in der frühen und späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet worden waren (Abb. 35).

Wie nach der transkriptionellen Analyse von *ectD* zu erwarten war (Abb. 21), wird auch das Protein bei Wachstum in hohen Salzkonzentrationen verstärkt produziert (Abb. 35). Das EctD-Enzym ist schon in der frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578} 0,3) in den Zellen nachweisbar (Abb. 35), auch wenn in dieser exponentiellen Wachstumsphase noch kein Hydroxyectoin synthetisiert wird (Abb. 10; 11). Die wachstumsphasenabhängige Biosynthese des kompatiblen Solutes Hydroxyectoin wird nicht durch eine verzögerte *ectD*-Transkription oder EctD-Synthese verursacht oder gesteuert.

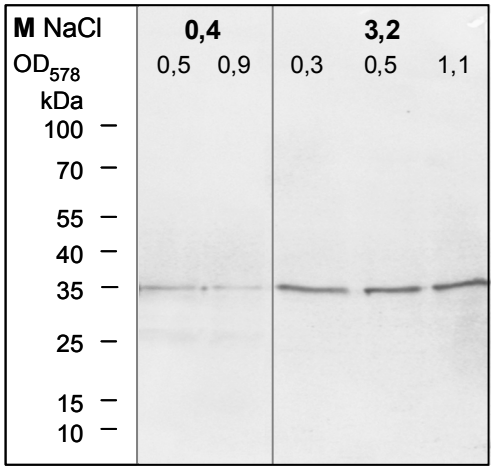


Abbildung 35. Analyse der EctD-Synthese in *S. salexigens*

Dargestellt sind Western Blot-Analysen von Zellextrakten aus *S. salexigens* Zellen die in Minimalmedium mit 0,4 M oder 3,2 M NaCl bis zu den angegebenen OD_{578} bei 37 °C kultiviert worden waren. Das EctD-Protein wurde mit dem im Rahmen dieser Arbeit erstellten EctD-spezifischen Antikörper detektiert.

4.8 Heterologe Produktion der *S. salexigens* Ectoin-Hydroxylase EctD in *Escherichia coli*

Für weitere biochemische und physiologische Untersuchungen mit der Ectoin-Hydroxylase EctD aus dem Gram-positiven *S. salexigens* wurde dieses Protein als „*Strep*-tag® II“ Fusionsprotein in dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* produziert und aus diesem gereinigt. *E. coli* ist nicht in der Lage Ectoin oder Hydroxyectoin *de novo* zu synthetisieren, da dieses Bakterium keine genetische Grundlage für diese Synthesewege besitzt (Blattner *et al.* 1997). *E. coli* besitzt aber Transportsysteme (ProU und ProP) mit denen exogen zugeführtes Ectoin oder Hydroxyectoin unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen akkumuliert werden können (Jebbar *et al.* 1992).

Das Strukturgen *ectD* wurde mittels PCR von chromosomaler DNA aus *S. salexigens* amplifiziert und in den Vektor pASK-IBA3 ligiert, was zu einer Fusion des EctD-Proteines mit einem carboxyterminalen „*Strep*-tag® II“ führt. Der resultierende Vektor, pBJ10, wurde in *E. coli* DH5α unter der Kontrolle des durch Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotors zur Expression gebracht.

4.8.1 Reinigung der *S. salexigens* Ectoin Hydroxylase EctD aus *Escherichia coli*

Das EctD-Protein wurde in Minimalmedium (MMA) ohne die Substrate Ectoin und 2-Oxoglutarat unter aeroben Bedingungen produziert. Dem Medium wurde Eisensulfat zugegeben (1 mM), um es dem Wirtsorganismus *E. coli* zu erleichtern, das aktive Zentrum des heterologen Proteines mit mononukleärem Eisen zu versehen, da nicht bekannt ist, ob dafür spezielle Enzyme benötigt werden. Aufgrund des carboxyterminalen „Affinitäts-Tag“ konnte das Enzym aus der löslichen Fraktion des ultrafiltrierten Ganzzellextraktes chromatographisch über eine *Strep*-Tactin®-Matrix isoliert werden. Die Reinigung lieferte ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 35 kDa, das apparente Homogenität aufwies. Die Größe korrespondiert mit der molekularen Masse von EctD plus den zusätzlichen acht Aminosäuren des „*Strep*-Tactin®-Affinitätstag“ Aus einem Liter Kultur konnten etwa 1,5 mg des EctD-Proteines gereinigt werden.

Aktivitätstest konnten zeigen, dass das heterolog produzierte Enzym vergleichbare katalytischen Fähigkeiten (K_m Ectoin 3,6 ± 0,2 mM; K_m 2-Oxoglutarat 5,4 ± 0,2 mM; V_{max} 0,49 ± 0,1 U/mg Protein) wie die nativ aus *S. salexigens* gereinigte Hydroxylase besitzt. Weder die heterologe Assemblierung des aktiven Zentrums mit mononukleärem Eisen, noch die Extension des Carboxyterminus durch den Affinitäts-Tag beeinflussen die enzymatischen Eigenschaften dieses Proteins.

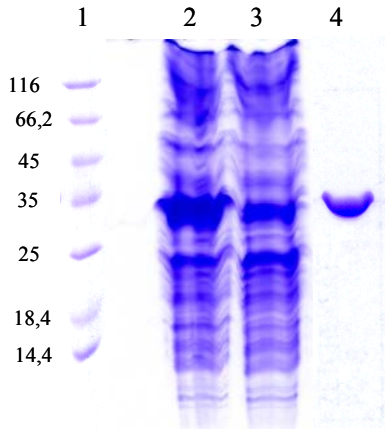


Abbildung 36. Heterologe Produktion und Reinigung der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *Escherichia coli*.

Das *ectD*-Gen aus *S. salexigens* wurde ein *E. coli* DH5α exprimiert, das produzierte EctD-Protein aus dem Zellextrakt mit Hilfe von Affinitätschromatographie gereinigt, in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Spur 1 zeigt den verwendeten Größenstandard (in kDa), Spur 2 Rohextrakt induzierter *E. coli*-Zellen, Spur 3 Rohextrakt uninduzierter *E. coli*-Zellen und in Spur 4 wurden 5 µg des gereinigten Proteins aufgetragen.

4.8.2 EctD-vermittelte Ectoin-Hydroxylase-Aktivität in *Escherichia coli*

Die Expression des *ectD*-Genes aus *S. salexigens* in *E. coli* unter der Kontrolle des durch Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotors, erlaubt eine steuerbare Produktion der Ectoin-Hydroxylase in diesem Organismus. Obwohl *E. coli* kein Ectoin *de novo* synthetisieren kann, ist dieses Bakterium in der Lage, über die osmotisch regulierten Transporter ProU und ProP Ectoin aus dem Medium in die Zelle zu transportieren und anzureichern (Jebbar *et al.* 1992; Lucht & Bremer 1994; Csonka & Epstein 1996).

Der *ectD*-positive *E. coli* DH5α wurde in Minimalmedium (MMA) mit 250 mM NaCl, 5 mM Ectoin und 1 mM Eisensulfat aerob bei 37 °C kultiviert. Bei Erreichen einer OD_{578} von 0,5 wurde die Expression von *ectD* durch Zugabe von Anhydrotetracyclin induziert. Direkt vor der Induktion (t_0), nach 30 und 60 Minuten wurde der intrazelluläre Gehalt an Ectoin und Hydroxyectoin mittels HPLC-Analyse bestimmt. Die heterologe Expression des *ectD*-Genes in *E. coli* resultiert in einem enzymatisch aktiven Protein, welches aus intrazellulär akkumuliertem Ectoin Hydroxyectoin synthetisieren kann. Die akkumulierte Ectoin-Menge im *ectD*-positiven (pBJ10) *E. coli* Stamm betrugen 1 Stunde nach Induktion 81 nmol · (mg Trockengewicht)$^{-1}$ und der Gehalt an synthetisiertem Hydroxyectoin war 138 nmol · (mg Trockengewicht)$^{-1}$, was einen intrazellulären Gesamtgehalt an Ectoinen von 219 nmol · (mg Trockengewicht)$^{-1}$ ergibt. Es wurden also 63 % des aufgenommenen Ectoines von dem *ectD*-Genprodukt in das Hydroxyderivat umgewandelt.

Als Negativkontrolle wurde *E. coli* DH5α mit dem leeren Vektor pASK-IBA3 unter den gleichen Bedingungen kultiviert und ebenfalls vor (t_0), 30 und 60 Minuten nach Zugabe von Anhydrotetracyclin die Menge der angereicherten Ectoin bestimmt. In diesem *ectD*-negativen

Stamm wurde ein Ectoingehalt von 213 nmol · (mg Trockengewicht)$^{-1}$ bestimmt. Wie zu erwarten, konnte kein Hydroxyectoin detektiert werden.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass das von *ectD* kodierte Protein auch *in vivo* Ectoin-Hydroxylase-Aktivität vermittelt. Dies stellt damit einen endgültigen Beweis dafür dar, dass es sich bei dem aus *S. salexigens* klonierten *ectD* Gen tatsächlich um das Strukturgen der aus diesem Organismus gereinigte Ectoin-Hydroxylase handelt.

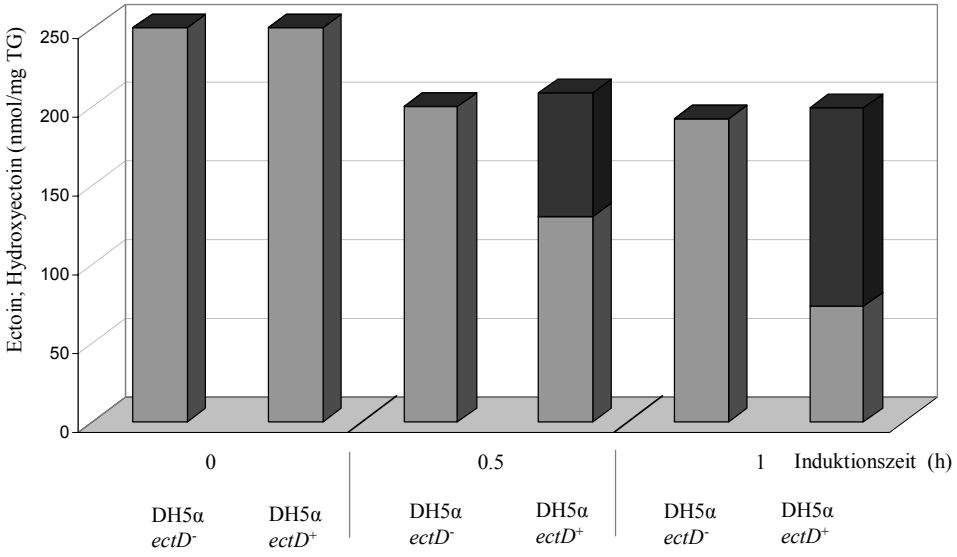


Abbildung 37. Hydroxyectoin-Akkumulation durch die EctD-katalysierte Hydroxylierung von Ectoin in *Escherichia coli*.

Dargestellt ist die Akkumulation exogen zur Verfügung gestellten Ectoines in *E. coli* Zellen, bei Kultivierung unter hypersalinen Bedingungen (250 mM NaCl). Der Stamm DH5α *ectD*$^+$ verfügt über das Strukturgen der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Nach Induktion ist eine *in vivo* Ectoin-Hydroxylase-Aktivität zu verzeichnen, da intrazellulär angereichertes Ectoin zu Hydroxyectoin umgewandelt wird, was auf die heterologe Produktion enzymatisch aktiven EctD-Proteines zurückzuführen ist. Die Messungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Standardabweichung lag unter 3 %.

4.9 Bestimmung des Eisengehaltes des aktiven EctD-Enzymes

Eine chemische Analyse des Nicht-Häm Eisen-Gehaltes des heterologen, aus *E. coli* gereinigten, enzymatisch aktiven Proteines ergab einen Wert von 0,6 mol Eisen pro mol Enzym. Dieser Wert von etwa eins ist konsistent mit dem mononukleären Eisen(II)-Zentrum, welches ein typisches Merkmal dieser Superfamilie der Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.) ist.

Die geringe Abweichung des ermittelten Wertes, liegt im Bereich der Messungenauigkeit dieser Methode. Eine andere plausible Erklärung könnte die heterologe Produktion großer Mengen diese Proteines in *E. coli* sein, so dass das Eisen nicht in genügender Menge zur Verfügung stand oder in dem heterologen Wirt nicht effizient genug in das aktive Zentrum des Enzymes eingebaut werden konnte.

4.10 Ist das gereinigte Enzym durch Salz aktivierbar?

In den biochemischen Analysen der Ectoin-Biosynthese-Enzyme EctABC aus *H. elongata* (Ono *et al.* 1999) konnte gezeigt werde, dass eine erhöhte Konzentration von Kaliumchlorid oder Natriumchlorid die Stabilität und Aktivität der gereinigten Enzyme erhöhen. Dies legt den Schluss nahe, dass diese Enzyme posttranslational durch erhöhte intrazelluläre Salzkonzentrationen aktivierbar bzw. stabilisierbar sind (Ono *et al.* 1999).

Um zu untersuchen, ob diese Effekte auch bei dem EctD-Enzym für die Hydroxyectoin-Biosynthese zu beobachten sind, wurden *in vitro* Aktivitätstest mit verschiedenen Salzen in unterschiedlichen Konzentrationen analysiert. Gewählte Salze und Konzentrationen (in Molar) waren NaCl (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3), KCl (0,25; 0,5; 1; 2), Na-Glutamat (0,25; 0,5; 1), K-Glutamat (0,25; 0,5; 1; 2), NH_4Cl (0,25; 0,5; 1; 2; 3). Natrium- und Kaliumchlorid wurden bereits von Ono und Mitarbeitern (Ono *et al.* 1999) für die Untersuchungen der EctABC-Enzyme aus *H. elongata* benutzt. Natrium- und Kaliumglutamat wurden gewählt, da unter osmotischem Stress oft Glutamat intrazellulär angereichert wird. Ammoniumchlorid wurde in diesen Untersuchungen genutzt, da es nur das Chlorid-Anion der von Ono und Mitarbeitern (Ono *et al.* 1999) getesteten Salze enthält.

Die Tests wurden gemäß der in Tabelle 16 angegebenen optimierten Standardbedingungen durchgeführt Es wurden Inkubationszeiten von 5 und 15 Minuten gewählt. Unter den getesteten Bedingungen konnte jedoch keine Aktivierung oder Stabilisierung des EctD-Enzymes festgestellt werden.

4.11 Kristallisation von EctD

Die Struktur des EctD-Proteines, als Prototyp einer neuen Subklasse in der Superfamilie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, könnte Aufschluss über die Aminosäuren geben, die an der Koordination des Substrates, der Co-Substrate und des Eisen(II) im aktiven Zentrum beteiligten sind. Dies könnte einen tieferen Einblick in den Reaktionsmechanismus der Hydroxylierung und in die Bindung des kompatiblen Solutes Ectoin im Reaktionszentrum ermöglichen könnte.

Die Interaktionen kompatibler Solute, die per Modell ihrer Wirkungsweise (Arakawa & Timasheff 1985; Bolen & Baskakov 2001) vom Protein ausgeschlossen werden sollten, sind von besonderem Interesse. Die kompatiblen Solute Glycin-Betain, Prolin-Betain und Ectoin werden in Bindeproteinen von Transportern über ein offenbar verbreitetes Prinzip der Koordination gebunden. In der Bindetasche dieser Proteine kommt es zu Kation-π-Interaktionen zu konservierten aromatischen Aminosäuren (Schiefner *et al.* 2004[a]; Schiefner *et al.* 2004[b]). Die EctD-Struktur wäre die Erste eines Proteines, das neben der Fähigkeit der Bindung eines kompatiblen Solutes auch noch katalytische Fähigkeiten hat.

Mit der Möglichkeit der heterologen Produktion großer Mengen enzymatisch aktiver Ectoin-Hydroxylase in *E. coli*, bestand die Möglichkeit, die Struktur dieses Proteins auf atomarer Ebene durch die Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Die Kristallisation wurde von

Dr. Klaus Reuter (Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie) durchgeführt. Bilder der ersten Kristalle sind in Abbildung 38 zu sehen. Die Qualität der Kristalle war bisher noch nicht ausreichend, um die Struktur des EctD-Proteines zu lösen.

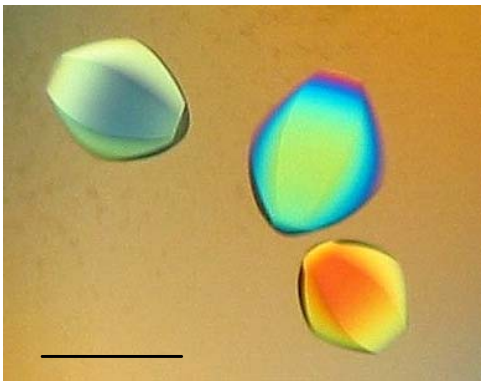


Abbildung 38. Kristalle der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*.

Dargestellt ist ein Foto von Kristallen der *S. salexigens*-Ectoin-Hydroxylase EctD (heterolog in *E. coli* produziert). Das Foto wurde von PD. Dr. K. Reuter (Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie) zur Verfügung gestellt. Der Balken entspricht einer Länge von 0,5 mm.

4.12 Strukturanalyse der EctD-Aminosäuresequenz

Ergänzend zum Kristallisationsansatz wurde die abgeleitete Aminosäuresequenz auf der Grundlage des Vergleiches mit anderen potentiellen Ectoin-Hydroxylasen (Abb. 19), struktureller Merkmale der Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Clifton *et al.* 2001; Elkins *et al.* 2002; Müller *et al.* 2004; Müller *et al.* 2005) und der Koordination kompatibler Solute in Bindeproteinen von Transportsystemen (Schiefner *et al.* 2004[a]; Schiefner *et al.* 2004[b]) *in silico* analysiert.

In Abbildung 39 ist ein Computermodell des aktiven Zentrums mit den konservierten Aminosäureresten des familientypischen Eisenbindemotiv, die 2-His-1-Carboxylat Triade, dargestellt. Die Architektur des Reaktionszentrums gibt eine potentielle Erklärung für die stereochemischen Konfiguration des Hydroxyectoin Moleküles. Die Bindungswinkel im Pyrimidinring des Ectoines und die Zugänglichkeit zum Eisenzentrum könnten zur 4S,5S-Konfiguration des Hydroxyectoines führen. Das dargestellte Computermodel des Ectoin-Moleküles wurde durch Röntgenstrukturanalysen eines Ectoin-Bindeproteines mit gebundenem Ectoin bestätigt (L. Schmitt & E. Bremer, unveröffentlicht).

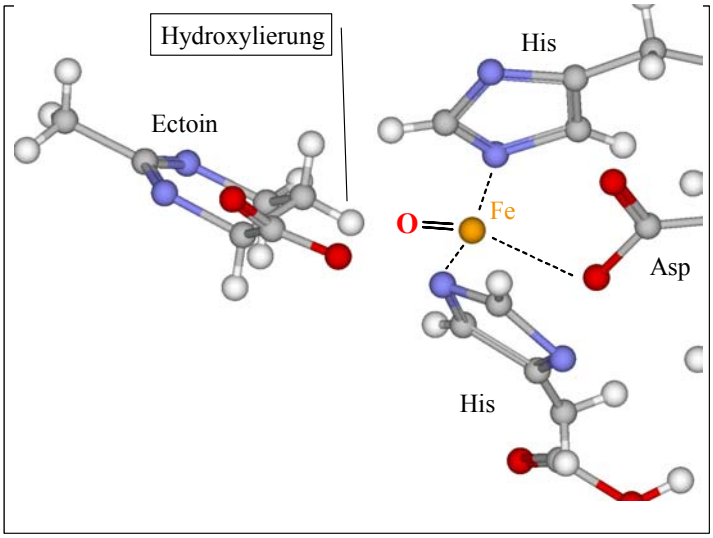


Abbildung 39. Computermodell des aktiven Zentrums der Ectoin-Hydroxylase.

Die konservierten Aminosäuren des Eisenbinde-Motifes (2-His-1-Carboxylat Triade) sind im Standard-3-Buchstabencode für Aminosäuren angegeben. Das mononukleäre Eisenzentrum ist als Kugel, das Substrat Ectoin und die Aminosäurereste des EctD-Proteines sind als Stabmodell dargestellt. Das Modell basiert auf den Kristallstrukturen einer Prolin 3-Hydroxylase (Clifton *et al.* 2001) und TauD aus *E. coli* (Elkins *et al.* 2002).

Aus Untersuchungen zur Koordination kompatibler Solute innerhalb eines Bindeproteines von Solut-Transportern ist bekannt, dass diese besonderen Substanzen über Kation-π-Interaktionen in der Bindetasche positioniert werden (Schiefner *et al.* 2004[a]; Schiefner *et al.* 2004[b]) (E. Bremer pers. Mitteilung). Diese Form der Interaktion zwischen einem Protein und einem kompatiblen Solut ist offensichtlich weit verbreitet. Da das Substrat Ectoin ebenfalls im aktiven Zentrum der Ectoin-Hydroxylase koordiniert werden muss, wurde nach konservierten aromatischen Aminosäuren gesucht.

In direkter Nachbarschaft zu einem Histidin und dem Aspartat, die an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt sind (2-His-1-Carboxylat Triade), sind in allen potentiellen Ectoin-Hydroxylasen konservierte Aromaten zu finden (Abb. 50). Es ist also möglich, dass auch in diesem katalytischen Protein, die Bindung eines kompatiblen Solutes über Kation-π-Interaktionen erfolgt, wie es für Bindeproteine gezeigt wurde.

4.13 Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese

Aufgrund der Erkenntnisse über die Ectoin-Biosynthese (Inbar & Lapidot 1988; Peters *et al.* 1990; Louis & Galinski 1997; Ono *et al.* 1999) und den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen zur Biosynthese von Hydroxyectoin lässt sich in Abbildung 40 dargestelltes Reaktionsschema für den Biosyntheseweg dieser beiden kompatiblen Solute ableiten.

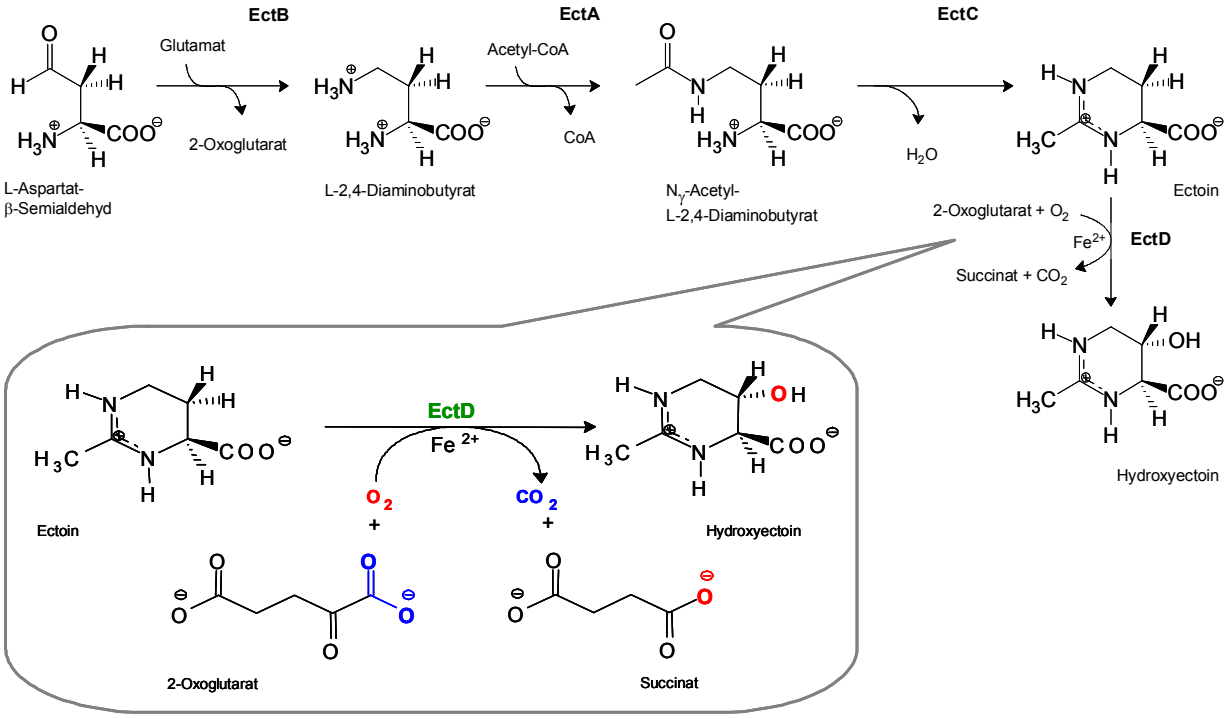


Abbildung 40. Biosyntheseweg für Ectoin und Hydroxyectoin.

Dargestellt sind die Reaktionen des Syntheseweges der kompatiblen Solute Ectoin und seines 5-Hydroxyderivates, Hydroxyectoin, ausgehend von L-Aspartat-β-Semialdehyd. Die beteiligten Enzyme sind eine L-2,4-Diaminobutyrat-N_γ-Acetyltransferase (EctA), eine L-2,4-Diaminobutyrat Transaminase (EctB) und die Ectoin-Synthase (EctC). Die Reaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin basiert auf den Ergebnissen dieser Arbeit und ist zusätzlich in einer detaillierten Ansicht dargestellt.

VII Diskussion

Die Wasseraktivität und die Temperatur sind entscheidende Parameter für das Wachstum und Überleben von Mikroorganismen in ihrem speziellen Lebensraum. Da Mikroorganismen keine Möglichkeit haben, Wasser aktiv über die Zellmembran aus der Zelle heraus oder in die Zelle hinein zu transportieren, sind sie darauf angewiesen, ihre intrazelluläre Konzentration osmotisch aktiver Substanzen den jeweiligen osmotischen Erfordernissen anzupassen, um einen Wasserausstrom aus der Zelle und die damit verbundenen negativen Effekte auf die Zellphysiologie und eine Reduktion des Turgors unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen zu verhindern (Wood *et al.* 2001; Grant 2004; Holtmann *et al.* 2004[b]). Untersuchungen der mikrobiellen Anpassungsreaktionen auf erhöhte oder fluktuierende Osmolaritäten begründeten eine neue funktionelle Gruppe organischer Moleküle, die von den Zellen mit Hilfe von Transportern oder durch *de novo* Synthese akkumuliert werden. Diese Substanzen sind osmotisch aktiv, haben aber auch in molaren Konzentrationen keine negativen Einflüsse auf zelluläre Komponenten. Sie erhielten deshalb den Namen „kompatible Solute“. Aufgrund ihrer Entdeckung in Zusammenhang mit der Reaktion auf osmotischen Stress wurde ihnen lange Zeit die ausschließliche Funktion als osmotische Schutzsubstanzen zugesprochen. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass verschiedene kompatible Solute auch Schutz vor anderen Stressfaktoren, wie z. B. hoher oder niedriger Temperatur oder Austrocknung, vermitteln können und sie neben ihren osmotischen Eigenschaften auch vielfältige andere protektive Fähigkeiten aufweisen. Ihnen kommt damit eine umfassende Bedeutung bei der Anpassung von Organismen an nicht-optimale Umweltbedingungen zu (Welsh 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation kompatibler Solute einen nicht nur bei Bakterien verbreiteten Anpassungsmechanismus darstellt (Galinski & Trüper 1994; Csonka & Epstein 1996; Kempf & Bremer 1998[a]; Bremer & Krämer 2000; Sleator & Hill 2002; Bursy *et al.* 2005; Bursy *et al.* 2005; Kuhlmann *et al.* 2005), sondern auch bei Vertretern der *Archaea* (Martin *et al.* 1999; Roberts 2000; Roessler *et al.* 2002; Schiefner *et al.* 2004[b]) und *Eucarya* (Rhodes & Hanson 1993; Bohnert *et al.* 1995; Nakayama *et al.* 2000) Protektion vor verschiedenen Stressformen vermittelt.

^{13}C-NMR spektroskopische- und HPLC- Analysen der *de novo* synthetisierten kompatiblen Solute wurden in den verschiedensten Genera Gram-positiver und Gram-negativer Mikroorganismen durchgeführt (Regev *et al.* 1990; Robertson *et al.* 1990; Talibart *et al.* 1994; Kuhlmann & Bremer 2002; Bursy *et al.* 2005). Diese Untersuchungen und besonders die umfangreiche Studie der *de novo* synthetisierten Solute im Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera (Tab. 1) machten deutlich, dass die Biosynthese der potenten Stressprotektiva Ectoin und seines 5-Hydroxyderivates, Hydroxyectoin, weit verbreitet ist (Kuhlmann & Bremer 2002; Bursy *et al.* 2005). Mehr als die Hälfte, fünfzehn von sechsundzwanzig, der zufällig ausgewählten *Bacilli* synthetisiert Ectoin unter hyperosmolaren

Wachstumsbedingungen. Vier davon synthetisieren zusätzlich zu Ectoin, Hydroxyectoin und können damit die höchsten in dieser Studie beobachteten Salzkonzentrationen tolerieren (Tab. 1).

Die Produktion von Hydroxyectoin neben Ectoin wurde auch in Vertretern anderen Genera, z. B. in *Halomonas elongata* (Göller *et al.* 1998), *Marinococcus halophilus* (Louis & Galinski 1997) und *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bursy *et al.* 2005) detailliert untersucht. Die Vielzahl identifizierter Sequenzen potentieller Ectoin-Biosynthesegencluster *ectABC* bzw. potentieller Ectoin-Hydroxylasen in Gram-positiven und Gram-negativen *Bacteria* ist ein weiterer Hinweis für eine weite Verbreitung der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese in taxonomisch diversen Spezies (Abb. 44 - 49; 19).

In der vorliegenden Arbeit wurde die osmotisch induzierte *de novo* Biosynthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin im Gram-positiven, moderat halophilen Bodenbakterium *Salibacillus salexigens* physiologisch und molekularbiologisch analysiert. Es konnte erstmals das Enzym für die direkte Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin, EctD, gereinigt (Abb. 23), biochemisch charakterisiert und heterolog und funktionell in *E. coli* synthetisiert werden.

1 Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese

1.1 Protektive Eigenschaften von Ectoin und Hydroxyectoin

Die Akkumulation kompatibler Solute, entweder durch Transport oder *de novo* Biosynthese, ist ein weit verbreiteter Anpassungsmechanismus an eine hyperosmotische Umgebung (Grant 2004). Unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen oder nach einem hyperosmotischen Schock werden diese Substanzen im Zytoplasma angereichert, um einen physiologischen Turgor aufrecht zu erhalten und zellulärer Komponenten vor den negativen Einflüssen einer erniedrigten Wasseraktivität zu schützen. Die vielfältigen protektiven Eigenschaften von Ectoin und Hydroxyectoin werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen genutzt. Dazu gehören nicht nur die Bakterien, die diese kompatiblen Solute *de novo* synthetisieren können, sondern auch solche, die Ectoin oder Hydroxyectoin mit Hilfe von Transportern aus ihrem Habitat aufnehmen können (Jebbar *et al.* 1992; Jebbar *et al.* 1997; Peter *et al.* 1998). Die Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin werden als äußerst potente Osmoprotektiva (Jebbar *et al.* 1992; Severin *et al.* 1992; Galinski & Trüper 1994; Galinski 1995; Jebbar *et al.* 1997; da Costa *et al.* 1998; Ventosa *et al.* 1998[b]; Kuhlmann & Bremer 2002), aber auch als Schutzsubstanz bei Wachstum in der Kälte (Bursy *et al.* 2005; Kuhlmann *et al.* 2005) oder bei Hitzestress, akkumuliert (Malin & Lapidot 1996; Bursy *et al.* 2005).

Das moderat halophile, Gram-positive Bakterium *S. salexigens* ist unter entsprechenden Wachstumsbedingungen in der Lage, Ectoin und das hydroxylierte Derivat, Hydroxyectoin, *de novo* zu synthetisieren. Dieser Organismus wurde deshalb als Modellorganismus aus dem

Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera ausgewählt, um die Physiologie der *de novo* Synthese von Ectoin in Kombination mit Hydroxyectoin zu analysieren.

Die Konzentration des akkumulierten Ectoines in *S. salexigens* korreliert linear mit der Salinität des Wachstumsmediums (Abb. 10). Diese Abhängigkeit ist auch in *Sporosarcina pasteurii* (Kuhlmann & Bremer 2002) und *Bacillus clarkii* (Bursy *et al.* 2005) zu erkennen. Die Zellen können den intrazellulären Ectoin-Gehalt offensichtlich sehr fein regulieren und diesen an die jeweils herrschende Osmolarität ihrer Umgebung anpassen, um einen physiologischen Turgor und einen entsprechenden intrazellulären Wassergehalt aufrecht zu erhalten.

Der Effekt einer fehlenden Ectoin-Akkumulation durch *de novo* Synthese wurde in *ect*-Mutanten der Gram-negativen Bakterien *H. elongata* (Göller *et al.* 1998), *Chromohalobacter salexigens* (Canovas *et al.* 1997) und *Vibrio cholerae* (Pflughoeft *et al.* 2003) unter hochosmolaren Bedingungen beobachtet. Auch diese Mutanten zeigten einen deutlichen Wachstumsnachteil unter hochosmolaren Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp. Dies zeigt, dass die Fähigkeit Ectoin *de novo* zu synthetisieren, in phylogenetisch und physiologisch verschiedenen Bakterien einen essentiellen Teil des zellulären Schutzes gegen hyperosmotischen Stress darstellt. In *S. salexigens* konnten keine Mutanten der Ectoin- oder Hydroxyectoin-Biosynthese erzeugt werden, da diese Spezies für genetische Manipulationen nicht zugänglich ist.

Ectoin und Hydroxyectoin sind in ihrer chemischen Struktur sehr ähnlich (Abb. 40). Sie unterscheiden sich lediglich in der Hydroxygruppe am C5-Atom des Pyrimidinringes. Das Spektrum der protektiven Eigenschaften beider kompatibler Solute ist zwar überlappend, aber nicht identisch. Hydroxyectoin verfügt *in vitro* über andere proteinstabilisierende Eigenschaften als Ectoin. Wahrscheinlich ist es deshalb von Vorteil für die Zelle, ein Gemisch aus beiden Ectoinen zu akkumulieren, so dass sich die positiven Effekte dieser beiden Substanzen ergänzen. Dieses Gemisch von Ectoin und Hydroxyectoin ist in *S. salexigens* während der späten exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase zu beobachten (Abb. 11). Der positive Einfluss einer Kombination beider kompatibler Solute auf das mikrobielle Wachstum konnte auch für eine unter hyperosmolare Bedingungen wachsende *S. coelicolor* A3(2) Kultur gezeigt werden. Eine Mischung beider kompatiblen Solute, 0,5 mM Ectoin und 0,5 mM Hydroxyectoin, vermittelte eine bessere Osmoprotektion als jeweils 1 mM Ectoin oder 1 mM Hydroxyectoin allein (Bursy *et al.* 2005). Das Gemisch aus Ectoin und Hydroxyectoin vermittelt aber auch bei Wachstum unter Kälte- oder Hitze-Stress den besten Schutz und erlaubt schnelleres Wachstum als die Kulturen mit nur einem Tetrahydropyrimidin oder gar ohne kompatibles Solut (Kuhlmann 2002; Bursy *et al.* 2005).

Die proteinstabilisierenden Effekte der kompatibler Solute Ectoin und Hydroxyectoin konnten in *E. coli* ebenfalls *in vivo* beobachtet werden (Manzanera *et al.* 2004). Für Insulin konnte eine Stabilisierung der nativen Konformation unter verschiedenen Stressbedingungen *in vitro* gezeigt werden (Arora *et al.* 2004). Das Enzym Lactatdehydrogenase konnte in *in vitro* Analysen durch Ectoin unter den negativen Effekten einer Oxidation in Gegenwart von

Metallionen und der Einwirkung von Wasserstoffperoxyd stabilisiert werden (Andersson *et al.* 2000). Für Hydroxyectoin konnte gezeigt werden, dass es zu einer korrekten Faltung und zur Stabilisierung eines Immunotoxins in einem rekombinanten *E. coli* Stamm beiträgt (Barth *et al.* 2000).

1.2 Transkriptionelle Induktion der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese unter hyperosmolaren Wachstumsbedingungen

Die *de novo* Biosynthese kompatibler Solute, sowie der effiziente Transport von kompatiblen Soluten aus der unmittelbaren Umgebung in das Zytoplasma der Zelle erscheint besonders für Bakterien, die Habitate fluktuierender Osmolarität und starker Temperaturschwankungen bewohnen, sinnvoll, da diese Substanzen den Effekten der unterschiedlichen Stressfaktoren entgegenwirken können. Für eine differenzierte und genau auf die vorherrschende Osmolarität und Temperatur abgestimmte intrazelluläre Akkumulation kompatibler Solute, sind eine sehr sensible Regulation, sowie eine Verknüpfung der einzelnen Signalwege unerlässlich.

Die Ectoin-Biosynthese und die daran beteiligten Enzyme wurden in ^{13}C-NMR-Analysen und enzymologisch in verschiedenen Bakterien-Spezies untersucht (Galinski *et al.* 1985; Peters *et al.* 1990; Regev *et al.* 1990; Galinski & Trüper 1994; Canovas *et al.* 1997; Louis & Galinski 1997; Göller *et al.* 1998; Ono *et al.* 1999). Allen gemeinsam ist, dass Ectoin in drei enzymkatalysierten Reaktionen, aus L-Aspartat-β-Semialdehyd (Galinski *et al.* 1985), einem Intermediat des Aminosäurestoffwechsels, gebildet wird (Abb. 9; 40). Zwischenprodukte dieser Reaktionen sind L-2,4-Diaminobutyrat und N_γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat. Die an der Ectoin-Synthese beteiligten Enzyme sind die L-2,4-Diaminobutyrat Transaminase (EctB), die L-2,4-Diaminobutyrat N_γ-Acetyltransferase (EctA) und die Ectoin Synthase (N_γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat Dehydratase; EctC) (Abb. 40) (Galinski & Trüper 1994; Canovas *et al.* 1997; Ono *et al.* 1999).

In Northern-Blot Analysen konnte für *S. salexigens* gezeigt werden, dass die Regulation der Ectoin-Produktion hauptsächlich auf einer exakt regulierten Stimulation der Transkription des *ectABC* Ectoin-Biosynthese-Gene unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen basiert. Mit steigender Salzkonzentration im Wachstumsmedium war eine Zunahme eines einzelnen Transkriptes detektierbar (Abb. 13). Solch eine osmotisch induzierte Transkription des *ectABC*-Operons ist ebenfalls in *S. pasteurii* (Kuhlmann & Bremer 2002), *V. pantothenticus* (Kuhlmann *et al.* 2005), *M. halophilus* (Louis & Galinski 1997) und *C. salexigens* (Canovas *et al.* 1997) zu beobachten. Für die *ect* Gene aus *M. halophilus* konnte in einem heterologen System, in *E. coli*, eine osmotisch induzierte Transkription der *ectABC*-Gene nachgewiesen werden. Ein Bereich von 150 bp stromaufwärts von *ectA* aus *M. halophilus* ist für eine osmotische Kontrolle nötig. Wird dieser Bereich deletiert, kommt es zu einer konstitutiven Expression der *ect* Gene und die Ectoin-Synthese ist nicht mehr osmotisch reguliert (Louis & Galinski 1997).

Die *ectABC* Gene in *S. salexigens* sind wie in *B. pasteurii* und *V. pantothenticus* (Kuhlmann 2002) als Operon organisiert, da nur ein einzelnes Transkripte detektierbar war. Die Größe dieser mRNA korrespondierte mit der Länge der drei Ectoin-Biosynthesegene *ectABC* (Abb. 12; 13). Diese Operonstruktur ist physiologisch sinnvoll, da für die Ectoin-Biosynthese alle drei Enzyme gleichermaßen benötigt werden. Diese Organisation der Enzyme eines Biosyntheseweges als Operon oder Gencluster ist generell weit verbreitet.

Eine zusätzlich zur transkriptionellen, osmotischen Kontrolle existierende Aktivierung und Stabilisierung der an der Ectoin-Biosynthese beteiligten EctABC-Enzyme kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Aktivität und Stabilität der aus *H. elongata* gereinigten EctABC-Proteine konnte *in vitro* durch NaCl oder KCl erhöht werden (Ono *et al.* 1999).

Mit Primer-Extension Analysen konnte der für die osmotische Regulation in *S. salexigens* genutzte Promotor der *ectABC*-Transkription identifiziert werden (Abb. 14). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Northern-Blot Analysen des *ectABC*-Operons konnte nur ein einziger osmotisch induzierbarer Promotor nachgewiesen werden. Die Initiationsstelle der Transkription befindet sich 56 bp stromaufwärts vom Translationsstart von EctA. Die identifizierte Promotorsequenz aus *S. salexigens* weist Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz eines Sigma A (σ^A) abhängigen Promotors aus *B. subtilis* (Helmann 1995) auf. Anhand der DNA-Sequenz ist kein Merkmal erkenntlich, warum das *ectABC*-Operon aus *S. salexigens* osmotisch reguliert ist.

Für mehrere osmotisch kontrollierte Gene, wie das *opuA*-Operon, das *opuB*-Operon, *opuD*, *opuE* und das *proHJ*-Operon in *B. subtilis*, konnte gezeigt werden, dass die Sequenz der Promotoren Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz σ^A abhängiger Promotoren aufweisen (Kempf & Bremer 1995; Spiegelhalter & Bremer 1998; Kappes *et al.* 1999; Brill 2001), Dolezal *et al.* in Vorbereitung). Der *ectABC*-Promoter in *S. pasteurii* zeigt ebenfalls Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz σ^A abhängiger Promotoren (Kuhlmann & Bremer 2002). Nach Sequenzvergleichen mit Konsensussequenzen von Promotoren anderer Organismen wurden für die Ectoin-Biosynthesegene in *M. halophilus* drei potentielle Promotorsequenzen vorgeschlagen, die aber nicht experimentell nachgewiesen werden konnten (Louis & Galinski 1997).

Die vegetativen oder „housekeeping"-Sigmafaktoren σ^A aus *B. subtilis* und σ^{70} aus *E. coli* ähneln sich sowohl strukturell und funktionell, als auch in der von ihnen erkannten Konsensussequenz (Henkin & Sonenshein 1987). Neben der konservierten -35 und -10 Region weisen einige Promotoren ein als –16 Region oder TG-Motiv bezeichnetes Elemente auf, was von unterschiedlicher Relevanz zu sein scheint (Moran *et al.* 1982; Henkin & Sonenshein 1987; Voskuil *et al.* 1995). Dieses TG-Motiv ist in zahlreichen Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien beschrieben worden (Bown *et al.* 1997) und ist 1 bp stromaufwärts der –10 Promotorregion lokalisiert. Dieses Motiv ist in *E. coli* nur mäßig konserviert (Ozoline *et al.* 1997), die osmotisch regulierten σ^{70}-abhängigen Promotoren des *proU*-Operons und von *proP* aus *E. coli* zeigen dieses TG-Motiv (Kempf & Bremer 1995). In *B. subtilis* verfügen dagegen 45 % der σ^A abhängigen Promotoren über ein TG-Motiv, wobei

der prozentuale Anteil der beiden Nukleotide (T: 52 %; G: 58 %) an den Konservierungsgrad einiger Positionen innerhalb der –10 und –35 Region heranreicht (Helmann 1995; Voskuil *et al.* 1995; Voskuil & Chambliss 1998). Vergleicht man die Promotoren osmotisch induzierter Gene in *B. subtilis*, so zeigen die σ^A-abhängigen Pomotoren von *opuA*, *opuD*, *opuE* und *proHJ* aus *B. subtilis* (Kempf & Bremer 1995; Spiegelhalter & Bremer 1998; Kappes *et al.* 1999; Spiegelhalter 1999; Brill 2001), ebenso wie der σ^A Promotor der *ectABC* Gene aus *S. pasteurii* (Kuhlmann & Bremer 2002) ein TG-Motiv. Im Gegensatz dazu ist in der Promotorsequenz des *ectABC*-Operons von *S. salexigens* kein TG-Motiv vorhanden. An der angegebenen Position ist lediglich das T zu finden (Abb. 14).

Neben der Sequenz der -10, -16 und –35 Promotorregion ist die Länge der Nukleotidsequenz zwischen den –10 und –35 Hexameren („spacer“) von Bedeutung für die Initiation der Transkription (Auble *et al.* 1986). Einige der osmotisch induzierbaren σ^A-abhängigen Promotoren besitzen im Gegensatz zur σ^A-Konsensussequenz mit einem 17 bp „spacer“ (Helmann 1995), 18 Basenpaare zwischen der -35 und -10 Region. Dazu gehören der *ectABC*-Promoter aus *S. pasteurii* (Kuhlmann 2002) und *opuA*-Promoter aus *B. subtilis* (Kempf & Bremer 1995). Der Promotor des *proHJ*-Operons hat dagegen einen „spacer“ von 16 bp (Brill 2001). Der in *S. salexigens* identifizierte *ectABC*-Promoter hat einen Abstand von 17 bp, was der Konsensussequenz σ^A-abhängiger Promotoren entspricht (Abb. 14).

Die genauen molekularen Grundlagen der Perzeption von osmotischem Stress im Allgemeinen, sowie Stärke und Dauer dieses Stresses im Speziellen, sind trotz intensiver Forschung noch nicht bekannt. Einige Hinweise gibt es aus der Analyse der Regulation von membranständigen Transportern kompatibler Solute. Es sind meist indirekte Auswirkungen einer erhöhten Osmolarität, wie z. B. die Veränderungen in der Membranspannung bzw. Membrankomposition, oder der Konzentration von „Signalsubstanzen“ wie Kalium oder Glutamat. Die Osmolarität des umgebenden Mediums ist wahrscheinlich kein direkt wahrgenommener Stimulus, da z. B. Glycerin nicht induzierend auf die Synthese kompatibler Solute wirkt (Kuhlmann 2002). Glycerin erhöht zwar die Osmolarität, aber da es in Bakterien membrangängig ist, kann kein osmotischer Gradient ausgebildet werde. Außerdem inhibiert die Zugabe kompatibler Solute zu hochosmolaren Medien, die sonst induzierte *de novo* Synthese, obwohl dadurch die Osmolarität des Mediums nicht gesenkt wird (Galinski & Trüper 1994; Ventosa *et al.* 1998[a]; Bursy 2001; Kuhlmann 2002). Wahrscheinlich werden die negativen Effekte der hohen Osmolarität durch das aus exogenen Quellen intrazellulär akkumulierte kompatible Solut so weit abgeschwächt, dass die „Signalstärke“ für eine Induktion der Transkription der Biosynthesegene nicht mehr ausreicht (Barron *et al.* 1986; Sutherland *et al.* 1986; Lucht & Bremer 1994; Spiegelhalter 1999; Kuhlmann 2002). Die Kontrolle der Aktivität eines osmotisch-induzierbaren Promotors beruht vermutlich eher auf Veränderungen der Struktur zellulärer Komponenten, die durch einer Erhöhung der Osmolarität ausgelöst werden, wie eine Abnahme des Turgors, Veränderungen in der Ionenstärke oder der Zusammensetzung des Zytoplasmas, oder Veränderungen im

Verwindungsgrad (supercoiling) der DNA (Sutherland *et al.* 1986; Higgins *et al.* 1988; Dattananda *et al.* 1991; Csonka & Epstein 1996; Conter *et al.* 1997; Wood *et al.* 2001).

Kaliumionen werden von vielen Bakterien als initiale Antwort auf osmotischen Stress im Zytoplasma akkumuliert (Record *et al.* 1998; Wood *et al.* 2001), was ebenfalls als Signal für die Induktion osmotisch-kontrollierter Gene dienen könnte. Salzgehalt oder Ionenstärke können zu Veränderungen in der Topologie der Nukleinsäuren, wie z. B. die Helizität oder Sekundärstrukturen führen. Als Reaktion auf veränderte osmotische Verhältnisse, könnte dies eine regulatorische Funktion, z. B. bei der Initiation der Transkription und der Geschwindigkeit der Translation haben (Higgins *et al.* 1988; Ni Bhriain *et al.* 1989; Sheehan *et al.* 1992; Mojica *et al.* 1993; Krispin & Allmansberger 1995; Alice & Sanchez-Rivas 1997; Conter *et al.* 1997; Wood 1999). Für *E. coli* konnte eine Aktivierung der RNA-Polymerase durch Kalium-Glutamat gezeigt werden. Dies führt nach einer Kalium-Glutamat-Akkumulation zur Transkription RpoS-abhängiger Gene (Lee & Gralla 2004).

1.3 Die osmotisch regulierte Hydroxyectoin-Biosynthese ist zusätzlich von der Wachstumsphase abhängig

In der vorliegenden Arbeit wurde das Strukturgen (*ectD*) der Ectoin-Hydroxylase (EctD) aus *S. salexigens* identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription des *ectD* Genes, wie die des Ectoin-Biosynthese-Operons, *ectABC*, unter osmotischer Kontrolle ist. Mit steigender Salzkonzentration im Medium konnten größere Mengen des *ectD*-Transkriptes detektiert werden (Abb. 21). Diese osmotische Abhängigkeit konnte auch in den anderen Hydroxyectoin-produzierenden *Bacillus* Spezies (Tab. 1; N. Pica, pers. Mitteilungen) und in *S. coelicolor* A3(2) (Kuhlmann 2002) beobachtet werden. Die Hydroxyectoin-Biosynthese unterliegt aber auch noch einem zweiten regulatorischen Mechanismus, da Hydroxyectoin in *S. salexigens* erst in der späten exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase synthetisiert wird (Abb. 11). Untersuchungen zur Hydroxyectoin-Biosynthese in den Ectoin und Hydroxyectoin-produzierenden Bakterien *S. coelicolor* A3(2) und *B. clarkii* (Tab. 1) zeigten den gleichen wachstumsphasenabhängigen Verlauf, wie der in *S. salexigens* beobachtete (Bursy *et al.* 2005; Bursy *et al.* 2005). Auch in dem Gram-positiven Bakterium *M. halophilus*, welches für die industrielle Biosynthese von Hydroxyectoin verwendet wird (bitop AG, Witten, D), zeigt sich diese wachstumsphaseabhängige Änderung des Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehaltes unter hochosmolaren Bedingungen (Louis & Galinski 1997). Für *H. elongata*, welcher für die industrielle Ectoin-Produktion benutzt wird (bitop AG, Witten, D), konnte ebenfalls eine Beziehung zwischen Wachstumsphase und Ectoin- bzw. Hydroxyectoin-Akkumulation gezeigt werden (Göller *et al.* 1998). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es sich bei der wachstumsphasenabhängigen Regulation um ein generelles Merkmal der Hydroxyectoin-Biosynthese unter hyperosmolaren Bedingungen handelt.

In Northern- und Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass sowohl die Transkription von *ectD*, wie auch die Synthese des kodierten Enzymes (EctD) bereits in der exponentiellen

Wachstumsphase stattfindet (Abb. 21, 35). Dagegen konnte das Produkt der vom EctD-Enzym katalysierten Reaktion, Hydroxyectoin, hauptsächlich in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden. Die wachstumsphasenabhängige Regulation der Hydroxyectoin-Biosynthese scheint also auf der Aktivitätsebene des Enzymes stattzufinden.

Eine mögliche Erklärung wäre eine Konzentrationsabhängigkeit vom Substrat Ectoin. Erst ab einer bestimmten intrazellulären Konzentration verfügbaren Ectoines kann daraus Hydroxyectoin synthetisiert werden. Es könnte aber auch eine Modulation der Hydroxyectoin-Synthese-Aktivität des EctD-Enzymes durch weitere Proteine existieren, die direkt auf die Hydroxylase wirkt. Indirekt könnte eine Regulation über die Verfügbarkeit von Eisen(II) bzw. dessen Oxidationszustand im aktiven Zentrum, oder die Verfügbarkeit von 2-Oxoglutarat, dem Co-Substrat der Hydroxylierungs-Reaktion, auf die Hydroxyectoin-Produktion wirken.

Über die physiologische Bedeutung der stationärphase-induzierten Hydroxylierung von Ectoin kann lediglich spekuliert werden. Hydroxyectoin besitzt ein geringfügig anderes Spektrum protektiver Eigenschaften als Ectoin, welches erst unter den speziellen Bedingungen der stationären Wachstumsphase (Nährstofflimitation, Akkumulation denaturierter Proteine) von Vorteil für die Zelle sein könnte. Ein anderer Grund könnte die ausreichende Verfügbarkeit des Substrates Ectoin für die Hydroxylierungsreaktion sein. Diese beruht vermutlich auf einem Radikal-Mechanismus, bei welchem ohne Substrat zytotoxische Nebenprodukte anfallen können (siehe Kapitel VII.2.2). Dies könnte bei niedrigen Ectoin-Konzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase einen Nachteil für die schnell wachsenden Zellen darstellen.

Hydroxyectoin wird von der Zelle wahrscheinlich nicht nur synthetisiert um osmotischen Stress zu kompensieren, sondern könnte auch bei der Stabilisierung der korrekten Faltung von Proteinen in der stationären Wachstumsphase helfen (Diamant *et al.* 2001; Diamant *et al.* 2003; Manzanera *et al.* 2004). Die Regulation dieser wachstumsphasenabhängigen Synthese von Hydroxyectoin und die physiologische Bedeutung dieses Phänomens konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

In den untersuchten Ectoin und Hydroxyectoin synthetisierenden *Bacillus* Spezies (Tab. 1; N. Pica, pers. Mitteilungen), einschließlich des in dieser Arbeit untersuchten *S. salexigens*, und in *S. coelicolor* A3(2) (Kuhlmann 2002; Bursy *et al.* 2005) ist immer ein Gemisch dieser beiden kompatiblen Solute zu finden. Dies ist jedoch erst in der späten exponentiellen und der stationären Wachstumsphase der Fall.

Besitzt ein Mikroorganismus zwei voneinander unabhängige Biosynthesewege für kompatible Solute, wie z. B. für Prolin und Ectoin (Tab. 1), werden diese in Abhängigkeit von der Salinität des Mediums unabhängig voneinander induziert oder reprimiert. Dies wurde für *V. pantothenticus* beschrieben (Kuhlmann 2002), welcher bei niedrigeren Salinitäten Prolin produziert, bei höheren Salinitäten aber hauptsächlich Ectoin synthetisiert. In *S. salexigens*, *B. clarkii* und *S. coelicolor* A3(2) konnte für die von der Ectoin-Synthese abhängige Hydroxyectoin-Synthese neben der osmotischen Abhängigkeit, die die akkumulierte Menge

bestimmt, eine wachstumsphasenabhängige Regulation nachgewiesen werden. Diese bestimmt den Zeitpunkt der Hydroxyectoin-Biosynthese. Die Hydroxyectoin-Biosynthese ist nicht als allein stehender Syntheseweg zu sehen, sonders ist durch die Kopplung an die Ectoin-Biosynthese als Erweiterung diese Syntheseweges anzusehen.

1.4 Die Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese ist konserviert in Gram-positiven und Gram-negativen *Bacteria*

Mehrere Studien, vor allem halotoleranter und halophiler Mikroorganismen, haben gezeigt, dass vor allem die *de novo* Biosynthese von Ectoin, aber auch die seines 5-Hydroxyderivates, Hydroxyectoin, unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen, im Reich der *Bacteria* in phylogenetisch und physiologisch diversen Spezies zu finden ist (Galinski *et al.* 1985; Inbar & Lapidot 1988; Galinski & Trüper 1994; da Costa *et al.* 1998; Kuhlmann & Bremer 2002; Bursy *et al.* 2005; Bursy *et al.* 2005).

Um die Verbreitung der einzelnen unter hyperosmolaren Wachstumsbedingungen *de novo* synthetisierten kompatiblen Solute im Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera phylogenetisch zu analysieren, wurde von den untersuchten Spezies (Tab. 1) ein Stammbaum auf der Grundlage der 16S rRNA Gene erstellt (Abb. 7). Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Biosynthese von Ectoin und Hydroxyectoin, wie auch die Synthese von Prolin und Glutamat unabhängig vom phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der untersuchten Spezies ist (Bursy *et al.* 2005). Obwohl Tendenzen einer Clusterbildung zu erkennen sind (Abb. 7), ist die Fähigkeit zur Synthese eines speziellen Solutes wahrscheinlich eher eine Anpassung an das jeweilige Habitat und dessen Osmolarität als ein taxonomischer Marker.

In allen bis jetzt untersuchten Organismen sind die drei Ectoin-Biosynthese-Gene *ectABC*, wie auch in *S. salexigens*, in einem osmotisch kontrollierten Operon organisiert (Louis & Galinski 1997; Canovas *et al.* 1998; Göller *et al.* 1998; Kuhlmann 2002; Kuhlmann & Bremer 2002; Pflughoeft *et al.* 2003; Kuhlmann *et al.* 2005). Aufgrund der Konservierung der an der Ectoin-Biosynthese beteiligten Enzyme und der Operonstruktur der Ectoin-Biosynthese-Gene *ectABC* ist eine Übertragung der entsprechenden DNA-Abschnitte durch horizontalen Gentransfer wahrscheinlich. Dafür spricht auch die genetische Organisation der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthesegene, die oft als *ectABCD*-Gencluster angeordnet sind (Abb. 20). Ein weiteres Indiz, dass die Hypothese des horizontalen Gentransfers stützt, ist der bei *S. coelicolor* A3(2), *Streptomyces avermitilis* und *Streptomyces chrysomallus* niedrigerer GC-Gehalt des Ectoin-Hydroxyectoin-Biosyntheseclusters, *ectABCD*, von circa 65 %, als der generatypisch hohe GC-Gehalt des restlichen Genomes von etwa 72 % bis 75 %.

Gegenwärtig sind in den öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken mehr als die in Abbildung 44 - 49 und Tabelle 13 angegebenen neunundzwanzig vollständigen oder partiellen Ectoin-Biosynthesecluster archiviert. Zu dieser phylogenetisch äußerst vielfältigen Gruppe der Ectoin-Synthetisierer gehören auch humanpathogene Bakterien wie *V. cholerae* (Pflughoeft *et al.* 2003) oder der für die Produktion von Sekundärmetaboliten (wie

Antibiotika) bekannte *S. coelicolor* A3(2) (Kuhlmann 2002; Bursy *et al.* 2005), sowie die in der Käseproduktion verwendeten *Brevibacterium epidermis* und *Brevibacterium linens*. In *M. halophilus* (Louis & Galinski 1997), *H. elongata* (Göller *et al.* 1998), *C. salexigens* (Canovas *et al.* 1999), *S. pasteurii* (Kaasen *et al.* 1994; Kuhlmann 2002; Kuhlmann & Bremer 2002), *V. pantothenticus* (Kuhlmann 2002; Kuhlmann *et al.* 2005) und *V. cholerae* (Pflughoeft *et al.* 2003; Pais *et al.* 2005) wurde die Ectoin-Biosynthese auch genetischen und molekularbiologisch untersucht und die Beteiligung der EctABC-Enzyme an der Ectoin-Biosynthese gezeigt.

Um die Gene der Ectoin-Biosynthese molekularbiologisch zu untersuchen, sind in der Literatur verschiedene Methoden der Isolierung beschrieben. Die Ectoin-Biosynthesegene aus dem Gram-positiven moderat halophilen *M. halophilus* wurden über funktionelle Komplementation in *E. coli* isoliert (Louis & Galinski 1997). Aus dem Gram-negativen *H. elongata* konnte ein Fragment der *ect*-Gene durch Transposonmutagenese und PCR-Amplifikation isoliert werden (Göller *et al.* 1998). Die Klonierung der *ectABC* Gene aus dem Gram-positiven *S. pasteurii* gelang über die Klonierung eines PCR-Fragmentes, welches mit heterologen Primern amplifiziert worden war und anschließender Isolierung eines Fragmentes aus einer genomischen Genbank (Kuhlmann 2002).

Ein ähnlicher Ansatz wurde auch für die Isolierung der *ectABC* Gene und des *ectD*-Genes aus *S. salexigens* verwendet. In einer PCR mit heterologen Primern und chromosomaler DNA aus *S. salexigens*, wurde ein *ectA-ectB*'- bzw. ein '*ectD*'-Fragment amplifiziert. Die Sequenzinformation dieser Fragmente diente als homologe Sonde für die Isolierung eines 6 kb großen Fragmentes aus einer λ-Phagenbank mit *Eco*RI Restriktionsfragmenten chromosomaler *S. salexigens* DNA, welches die *ectABC*-Gene und flankierende Bereiche enthielt. Auf die gleiche Weise konnte ein 4,1 kb großes Fragment mit dem *ectD*-Gen und flankierenden Bereichen isoliert werden.

Da mit den degenerierten Primern het_*ectD* 10 und het_*ectD* 11 auch aus einer anderen *Bacillus* Spezies, *B. clarkii*, ein *ectD*-Fragment amplifiziert werden konnte, und die Primer in einem konservierten Genbereich binden (Abb. 15, 19), könnten diese Primer als molekularbiologischen Werkzeug zur Isolierung weiterer Strukturgene der Ectoin-Hydroxylasen aus anderen Organismen benutzt werden.

Eine Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Ectoin-Biosyntheseenzyme EctABC aus *S. salexigens* zeigt signifikante Sequenzidentitäten (34 % bis 78 % für EctA; 50 % bis 84 % für EctB; 46 % bis 87 % für EctC) zu denen aus *S. pasteurii* (Kuhlmann 2002), *V. pantothenticus* (Kuhlmann 2002; Kuhlmann *et al.* 2005), *H. elongata* (Göller *et al.* 1998), *C. salexigens* (Canovas *et al.* 1998), *V. cholerae* (Pflughoeft *et al.* 2003) und weiteren potentiellen Ectoin-Biosynthese-Enzymen aus diversen Gram-positiven und Gram-negativen *Bacteria* (Abb. 44 - 49; Tab. 13). Dies lässt den Schluss zu, dass die Ectoin Biosynthese (Abb. 9; 40) evolutionär konserviert ist und auf dem *ectABC*-Gencluster beruht.

Datenbankanalysen mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* ergaben, dass in siebzehn weiteren Genomen Gram-positiver und Gram-negativer *Bacteria* für EctD-verwandte Proteine mit signifikanter Sequenzidentität (47 % und 58 %) kodiert wird. Diese EctD-Typ Proteine sind eng miteinander verwandt. Sie weisen Aminosäuresequenzidentitäten zwischen 43 % und 99 % zueinander auf (Abb. 19; 20; Tab. 14). Die Abgrenzung zu den L-Prolin-Hydroxylasen, die ebenfalls zur Familie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.; Abb. 51) gehören, zeigt sich in den limitierten Aminosäuresequenzidentitäten, die unter 26 % liegen. Im Genom des Gram-positiven Bakteriums *Rhodococcus* sp. RHA1 und dem des Gram-negativen *C. salexigens*, sind zwei Varianten dieses Enzymes kodiert, die sich sehr ähneln, aber nicht identisch sind (Identität 58 % bzw. 55 %; Abb. 19; 20; Tab. 14).

Die große Sequenzidentität der EctD verwandten Enzyme untereinander und die klare Abgrenzung zu den Prolin-Hydroxylasen (EC 1.14.11.2 und EC 1.14.11.7) andererseits begründet eine eigene Subfamilie innerhalb der Superfamilie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.). Das aus *S. salexigens* isolierte EctD-Enzym stellt als erste biochemisch und molekularbiologisch untersuchte Ectoin-Hydroxylase einen Prototyp dieser neuen Subfamilie dar. Die verschiedenen EctD-verwandten Proteine enthalten einen komplett konservierten Bereich von neun Aminosäuren, W-**H**-S-**D**-F-E-T-W-H, welcher auch einen Teil des Eisen-Bindemotives enthält (**H**-X-**D**) (Abb. 19; 39; 43). Diese Aminosäuresequenz kann als spezifische Signatursequenz für die Suche nach weiteren potentiellen Ectoin-Hydroxylasen in den Genom-Datenbanken verwendet werden und stellt ein konserviertes Strukturmerkmal der neuen Subfamilie der Ectoin-Hydroxylasen innerhalb der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.) dar.

In sechs der achtzehn Mikroorganismen mit einem Gen für eine potentielle Ectoin-Hydroxylase, ist dieses Strukturgen nicht direkt stromabwärts des Ectoin-Biosynthese-Genclusters *ectABC*, sondern separat im Genom lokalisiert. Zu diesen gehört auch der in dieser Arbeit untersuchte *S. salexigens* (Abb. 20). In allen anderen Bakterien ist das *ectD* Gen in direkter Abfolge von *ectABCD* angeordnet. In diesen Organismen besteht die Möglichkeit, dass dieses Gen mit den *ectABC* Genen als Operon co-transkribiert wird. Das wäre auch nicht zu einer stationärphasenabhängigen Synthese von Hydroxyectoin widersprüchlich, da in *S. salexigens* gezeigt werden konnte, dass die *ectD*-mRNA bereits in der exponentiellen Wachstumsphase nachweisbar war (Abb. 21).

Eine natürliche *de novo* Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese ist nach heutigem Wissensstand ausschließlich auf das Reich der *Bacteria* beschränkt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch in höheren Pflanzen eine artifizielle Ectoin-Biosynthese möglich ist. Die Nutzung der Biosynthesegene *ectABC* aus *H. elongata* unter der Kontrolle eines viralen Promotors und mit der damit verbundenen Akkumulation von Ectoin in transgenen Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) resultieren in einer erhöhten Osmotoleranz der Pflanze

(Nakayama *et al.* 2000). Dies verdeutlicht die universellen protektiven Eigenschaften dieser kompatiblen Solute, auch wenn die Fähigkeit zu deren *de novo* Biosynthese auf Bakterien beschränkt ist.

2 Die Ectoin-Hydroxylase EctD

Bisherige Studien der Produktion und Verbreitung von kompatiblen Soluten in den verschiedensten Genera zeigen, dass Hydroxyectoin nie in Kombination mit einem anderen kompatiblen Solut als Ectoin *de novo* synthetisiert wird (Tab. 1; (Inbar & Lapidot 1988; Galinski & Trüper 1994; Canovas *et al.* 1997; da Costa *et al.* 1998; Kuhlmann & Bremer 2002)). Die natürliche Fähigkeit zur Biosynthese von Hydroxyectoin ist immer an die *de novo* Synthese von Ectoin gekoppelt. Anhand von Mutagenesestudien der Ectoin-Biosynthese in *H. elongata* und *C. salexigens* (Göller *et al.* 1998; Canovas *et al.* 1999) wurden zwei möglich Synthesewege für Hydroxyectoin postuliert. Entweder wird Ectoin direkt von einem spezifisches Enzym am C5-Atom des Pyrimidinringes zu Hydroxyectoin hydroxyliert (Göller *et al.* 1998; Ventosa *et al.* 1998[a]), oder abzweigend von einem Intermediat der Ectoin-Synthese, N_γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat, erfolgen die Hydroxylierung und die Zyklisierung zum Hydroxyectoin (Canovas *et al.* 1999). In einer *ectA*-defekten Mutante von *H. elongata*, die nicht mehr in der Lage war, Ectoin zu produzieren, konnte auch keine Hydroxyectoin-Synthese mehr beobachtet werden. Wird Ectoin allerdings exogen zur Verfügung gestellt, kann Hydroxyectoin synthetisiert werden (Canovas *et al.* 1997; Göller *et al.* 1998). Es konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass die Biosynthese von Hydroxyectoin auf Ectoin als Substrat angewiesen ist (Göller *et al.* 1998; Ventosa *et al.* 1998[a]) oder möglicherweise auch von einem Intermediat der Ectoin-Biosynthese, N_γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat, ausgehend synthetisiert werden kann (Canovas *et al.* 1999). Für diesen Syntheseweg wären dann zwei Reaktionen nötig, eine Zyklisierung unter Wasserabspaltung zum Pyrimidinring und die Hydroxylierung.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* bestätigen den ersten der beiden postulierten Synthesewege für Hydroxyectoin. Es konnte ein Enzym (EctD) aus einer unter Salzstress kultivierten *S. salexigens* Kultur nativ gereinigt und charakterisiert werden, dass Ectoin direkt hydroxyliert (Abb. 23; 26; 40).

Der zweite postulierte Syntheseweg von Hydroxyectoin, ausgehend von N_γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere, da in den erst kürzlich zugänglichen Gesamtgenomsequenzen von *C. salexigens* und *Rhodococcus* sp. RHA1 zwei potentielle, nicht identische Ectoin-Hydroxylasen identifiziert werden konnten. (Abb. 19; 20; Tab. 14). Die Aminosäuresequenzidentität zueinander beträgt 55 % für *C. salexigens* und 58 % für *R.* sp. RHA1. Es wäre möglich, dass ein Enzym Ectoin als

Substrat für die Hydroxyectoin-Biosynthese verwendet, während das andere Enzym ausgehend von N_γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat Hydroxyectoin synthetisiert (Abb. 40).

Während der Biosyntheseweg von Ectoin mit den Enzymen EctABC gut untersucht ist, war die Bildung des hydroxylierten Derivates, Hydroxyectoin, weitgehend unerforscht (Abb. 9) (Kuhlmann & Bremer 2002; Prabhu *et al.* 2004). In dieser Arbeit wurde deshalb vor allem auf die genetische Grundlage und die Regulation der Biosynthese dieses kompatiblen Solutes, sowie die biochemischen Details dieser Reaktion in dem Ectoin- und Hydroxyectoin produzierenden Gram-positiven Bakterium *S. salexigens* fokussiert. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen, dass *S. salexigens* zur *de novo* Biosynthese von Ectoin und Hydroxyectoin mit den konservierten Enzymen EctABC und EctD fähig ist. Es wurde erstmals die Biosynthese des kompatiblen Solutes Hydroxyectoin molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert.

Die Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* konnte nativ gereinigt und charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, dass das substratspezifische EctD-Enzym das kompatible Solut Ectoin direkt sowohl *in vitro*, wie auch *in vivo* hydroxyliert. Das Strukturgen, *ectD*, der *S. salexigens* Ectoin-Hydroxylase wurde kloniert, sequenziert und seine osmotische regulierte Transkription in Northern Blot Analysen untersucht. Der Vergleich der vom klonierten *ectD* abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der experimentell bestimmten Sequenz der fünfzehn aminoterminalen Aminosäuren bestätigte, dass es sich bei *ectD* um das Strukturgen der aus *S. salexigens* gereinigten Ectoin-Hydroxylase EctD handelt.

Mit der abgeleiteten EctD-Aminosäuresequenz konnten in Datenbanken EctD-verwandte Proteine in diversen Gram-positiven und Gram-negativen *Bacteria* identifiziert werden, welche ebenfalls ein *ectABC*-Ectoin-Biosynthese-Gencluster in ihrem Genom aufweisen (Abb. 19; 20). Diese potentiellen Ectoin-Hydroxylasen in den taxonomisch diversen Mikroorganismen sind evolutionär nah verwandt und konstituieren eine neue Subfamilie innerhalb der Superfamilie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11.).

Es konnte gezeigt werden, dass die Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* Ectoin als Substrat, 2-Oxoglutarat und molekularen Sauerstoff als Co-Substrate verwendet. Für eine Aktivität *in vitro* wird Fe^{2+} als Co-Faktor benötigt (Abb. 28; 39; 40). Aufgrund der konservierten Sequenzmotive und der biochemischen Eigenschaften in Hinsicht auf Co-Substrat und Co-Faktor Fe^{2+} gehört dieses Enzym zur Familie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Prescott & Lloyd 2000; Ryle & Hausinger 2002; Costas *et al.* 2004), einer Enzymsuperfamilie (EC 1.14.11.) deren Enzyme die verschiedensten Reaktionen katalysieren (Abb. 42). Die enzymatischen Reaktionen in dieser Familie sind an eine oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat zu Succinat gekoppelt (Prescott & Lloyd 2000; Solomon *et al.* 2000; Ryle & Hausinger 2002; Costas *et al.* 2004). Dies trifft auch für die EctD-vermittelte Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin zu (Abb. 40).

Hydroxyectoin wurde erstmals aus dem Actinomyceten *Streptomyces parvulus* isoliert und strukturell beschrieben (Inbar & Lapidot 1988; Inbar *et al.* 1993). Mittels ^{1}H-NMR Spektroskopie wurde gezeigt, dass Hydroxyectoin eine (4*S*,5*S*) Konfiguration besitzt (Galinski *et al.* 1985; Inbar & Lapidot 1988; Inbar *et al.* 1993). ^{1}H-NMR spektroskopische Untersuchungen mit Hydroxyectoin, welches *in vitro* von dem gereinigten EctD Protein synthetisiert wurde, haben gezeigt, dass es sich hierbei um chemisch identische Substanzen handelt. Chemische Verschiebungen und die Proton-Proton-Kopplungen stimmten sowohl mit dem gemessenen Hydroxyectoin-Standard aus *M. halophilus* als auch mit den Literaturwerten aus *S. parvulus* überein. Die mittels EctD *in vitro* synthetisierte Substanz ist demnach Hydroxyectoin mit einer (4*S*,5*S*) Konfiguration (Abb. 25).

Das EctD-Enzym aus *S. salexigens* (diese Arbeit), wie auch das Homolog aus *S. coelicolor* A3(2) (Bursy *et al.* 2005) sind monomere Enzyme, wie das chromatographische Verhalten in einer Gelfiltrationssäule und massenspektrometrische Analysen zeigten (Abb. 24). In der Familie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gibt es monomere, homodimer, heterodimere und heterotetramere Enzyme (Prescott & Lloyd 2000). Die für das *S. salexigens* Enzym bestimmte Größe von 34,4 kDa liegt in dem typischen Größenbereich der Familie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen von etwa 30 kDa bis 40 kDa für eine Untereinheit.

Die kinetischen Parameter der Ectoin-Hydroxylase aus *S. salexigens* sind vergleichbar mit denen, die für das homologe Enzym aus *S. coelicolor* A3(2) bestimmt wurden (Bursy *et al.* 2005). Die K_m Werte liegen im unteren millimolaren Bereich, sowohl für Ectoin als auch für 2-Oxoglutarat, was aus physiologischer Sicht sinnvoll erscheint, da Ectoin als kompatibles Solut unter osmotischem Stress in sehr hohen Konzentrationen im Zytoplasma vorliegt. Auch 2-Oxoglutarat als wichtiges Intermediat vieler zellulärer Reaktionen sollte in ausreichenden Konzentrationen für diese Reaktion in der Zelle vorhanden sein. Temperatur und pH-Wert für eine maximale Aktivität des Enzymes entsprechen den optimalen Wachstumsbedingungen dieses Organismus (Garabito *et al.* 1997).

Auf die speziellen Einflüsse von Katalase und Ascorbat im *in vitro*-Testsystem wird in Kapitel VII.2 näher eingegangen.

Das Strukturgen *ectD* der Ectoin-Hydroxylase aus dem Gram-positiven Bodenbakterium *S. salexigens* konnte in dem Gram-negativen Enterobakterium *E. coli* unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors zur Expression gebracht werden. Die Synthese des heterologen *Strep*-tag® II Fusionsproteins in *E. coli* resultierte in einem enzymatisch aktiven Protein, welches akkumuliertes Ectoin zu Hydroxyectoin umwandeln konnte. Da *E. coli* nicht in der Lage ist, Hydroxyectoin *de novo* zu synthetisieren, muss die Hydroxylierung von Ectoin durch das heterologe *ectD*-Genprodukt katalysiert worden sein (Abb. 36). Dies stellt den Beweis dar, dass das aus *S. salexigens* isolierte Gen *ectD*, tatsächlich das Strukturgen für die gereinigte und charakterisierte Ectoin-Hydroxylase EctD ist. In einem ähnlichen Experiment konnte die Hydroxyectoin-Synthese in *H. elongata* durch die Expression des *thpD*-Genes aus

S. chrysomallus gesteigert werden (Prabhu *et al.* 2004). ThpD ist das EctD-Homolog aus diesem Gram-positiven Bakterium (Abb. 19; 20).

Die artifizielle Fähigkeit des *ectD*-positiven *E. coli*-Stammes aus akkumuliertem Ectoin Hydroxyectoin zu synthetisieren könnte von biotechnologischem Interesse sein. Hydroxyectoin wird gegenwärtig von der bitop AG (Witten, Deutschland) über eine methanolische Extraktion aus *Marinococcus* M52 gereinigt, der dieses kompatible Solut wie *S. salexigens* in der stationären Wachstumsphase *de novo* synthetisieren kann. *E. coli* ist möglicherweise mit geringerem Kostenaufwand und höherem Ertrag als *Marinococcus* M52 kultivierbar. Die Hydroxyectoin-Biosynthese ist in *E. coli* durch Zugabe von Anhydrotetracyclin induzierbar, so dass man nicht mehr bis zur stationären Wachstumsphase warten muss, da auch *Marinococcus* M52 erst in dieser Hydroxyectoin produziert. *E. coli* ist als Gram-negativer, komplett sequenzierter Modellorganismus sehr gut untersucht und für genetische Manipulationen zugänglich, so dass man die artifizielle Hydroxyectoin-Biosynthese in diesem Organismus weiter optimieren könnte.

2.1 Die Enzymfamilie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen

Erkenntnisse über die Strukturen, die katalysierten Reaktionen und den Mechanismus der enzymatischen Aktivierung molekularen Sauerstoffes konnten in Kombination verschiedenster Methoden erlangt werden. Dies waren vor allem Röntgenstrukturanalysen diverser Enzyme mit verschiedenen Variationen von Substraten, Co-Substraten und Inhibitoren, sowie spektroskopische und computerbasierende Modelle (Costas *et al.* 2004). Hauptsächlich die Forschungen der letzten zehn Jahre auf den Gebieten der Strukturbiologie, der mechanistischen Enzymologie, Biophysik und synthetischer Chemie haben zum Verständnis der Mechanismen der Aktivierung molekularen Sauerstoffes in den Eisenzentren dieser Enzyme beigetragen (Costas *et al.* 2004).

Die mononukleären Nicht-Häm Eisen Enzyme können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die Eisen(III) Dioxygenasen und die Eisen(II) Dioxygenasen. Die Eisen(III) Dioxygenasen sind vor allem bei Bodenbakterien verbreitet und haben eine große Bedeutung beim Abbau aromatischer Verbindungen zur weiteren Nutzung als Kohlenstoffquelle (Catechol-Dioxygenasen) (Que & Ho 1996; Solomon *et al.* 2000; Costas *et al.* 2004). Diese Enzyme katalysieren die oxidative Spaltung einer aromatischen Doppelbindung mit dem Einbau beider Sauerstoffatome in das Molekül (Costas *et al.* 2004). Da das Eisen(III)-Zentrum spektroskopisch gut nachweisbar ist, war diese Subklasse der mononukleären Nicht-Häm Eisen Enzyme die erste und besonders gut untersuchte. Die Lipoxygenasen, ebenfalls mit Eisen(III)-Zentrum, sind vor allem in Pflanzen und Tieren verbreitet. Sie spielen dort eine Rolle bei der Wachstumskontrolle und der Wundheilung (Pflanzen) oder bei Entzündungsreaktionen und Wachstumsregulation in Krebszellen (Tieren) (Costas *et al.* 2004).

Die Eisen(II)-abhängigen Enzyme sind vor allem durch die große Zahl verfügbarer Kristallstrukturen und die Vielfältigkeit der katalysierten Reaktionen in den Focus der Forschung gerückt. Diese Subklasse vereint diverse molekularen Sauerstoff aktivierende Metalloenzyme, die alle über ein gemeinsames strukturelles Motiv verfügen. Das Eisen(II)-Zentrum ist immer von drei Aminosäureresten des Proteines koordiniert. Dies sind zwei Histidin- und ein Aspartat- oder Glutamat-Rest, die eine Seite eines Oktaeders darstellen, die so genannte „2-His-1 Carboxylate-Facial-Triad“ (Abb. 43) (Hegg & Que 1997; Que 2000; Costas *et al.* 2004). Unter diesen Enzymen sind Dioxygenasen für den biologischen Abbau von aromatischen Molekülen (oxidative Ringspaltung; *cis*-Dihydroxylierung von Arenen), die Superfamilie mit 2-Oxoglutarat als Co-Substrat und Pterin-abhängige Hydroxylasen. Sequenzvergleiche zeigen, dass die 2-His-1-Carboxylate-Triade in jeder Subgruppe konserviert ist, wobei die Sequenzmotive voneinander abweichen. Dies lässt eine konvergente Evolution eines bevorzugten Metall-Bindemotives vermuten, welches verschiedenste Reaktionen zulässt (Costas *et al.* 2004). Diese Art der Anordnung um das Eisen-Zentrum lässt die verbleibenden drei Bindestellen auf der anderen Seite des Oktaeders zugänglich für exogene Liganden, das Substrat, das Co-Substrat und später im katalytischen Zyklus auch O_2 (Abb. 43).

Trotz der vielfältigen katalysierten Reaktionen konnte ein generelles mechanistisches Schema des Eisen(II)-Zentrums mit spektroskopischen und kristallographischen Studien entwickelt werden (Que 2000; Solomon *et al.* 2000; Solomon *et al.* 2003; Costas *et al.* 2004). Das Eisen(II) ist zu Beginn des katalytischen Zyklus sechsfach koordiniert und nicht reaktiv gegenüber Sauerstoff. Durch die Bindung von Substrat und/oder Co-Substrat wird das Metallzentrum fünffach koordiniert und erhöht damit seine Affinität zu O_2. Die Bindung molekularen Sauerstoffes initiiert dann den für jede Subklasse spezifischen oxidativen Mechanismus. Somit wird das Metallzentrum erst mit der Bindung von Substrat und/oder Co-Substrat zur O_2-Bindung „aktiviert“, was in einer strikten Kopplung der Reduktion von Sauerstoff und der Oxidation des Substrates resultiert (Costas *et al.* 2004). Dieses strukturelle Motiv erlaubt dem Eisen-Zentrum die gleichzeitige Aktivierung von Sauerstoff und Substrat, und bringt diese in unmittelbare Nachbarschaft für eine direkte Reaktion. Diese Verbindung von Sauerstoffaktivierung und sofortiger Reaktion am Substrat macht einen großen Teil der Vielseitigkeit dieses Reaktionsmechanismuses aus (Hegg & Que 1997; Que 2000; Costas *et al.* 2004).

Mitglieder der Superfamilie der Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen enthalten ein mononukleäres Eisen(II), welches das aktive Zentrum darstellt (Solomon *et al.* 2003; Costas *et al.* 2004). Der Nicht-Häm-Eisen-Gehalt der aus *S. salexigens* gereinigten Ectoin-Hydroxylase ergab 0,6 mol Eisen pro mol Protein, was mit dem familientypischen mononukleären Eisenzentrum übereinstimmt. Die *in vitro* Hydroxylierung von Ectoin durch EctD erfordert die Zugabe von Fe^{2+} ($FeSO_4$), welches vermutlich für eine Rekonstitution des aktiven Zentrums benötigt wird.

Das familientypische Eisenbindemotiv, die 2-His-1-Carboxylate-Triade, konnte auch in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EctD aus *S. salexigens* identifiziert werden (Abb. 19). Dieses Motiv ist in allen zwanzig potentiellen Ectoin-Hydroxylasen der verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen *Bacteria* komplett konserviert (Abb. 19). EctD aus *S. salexigens* und die anderen potentiellen Ectoin-Hydroxylasen (Abb. 19) sind demnach Enzyme mit einem mononukleären Eisen-Zentrum und gehören der Superfamilie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen an.

Proteine mit Nicht-Häm Eisenzentren sind in der Natur weit verbreitet. Die Enzyme, die 2-Oxoglutarat als Co-Substrat verwenden, stellen die größte und verschiedenartigste Familie mononukleärer Nicht-Häm Eisenenzyme dar. Sie katalysieren viele metabolisch bedeutsame Reaktionen (Schofield & Zhang 1999; Prescott & Lloyd 2000; Hanauske-Abel & Popowicz 2003) und haben eine bedeutende medizinische, pharmakologische, ökologische und biotechnologische Rolle (Fox 1998; Costas *et al.* 2004). Diese Enzyme sind in fast allen aeroben Organismen der *Bacteria* und der *Eucarya* zu finden. Auch in Viren wurde ein Gen, welches für ein Enzym dieser Familie, eine Prolyl-4-Hydroxylase, kodiert, identifiziert (Eriksson *et al.* 1999). Enzyme mit Nicht-Häm Eisen-Zentren katalysieren einen breiten Bereich an Reaktionen, hauptsächlich mit der Aktivierung von molekularem Sauerstoff für die Oxidation der verschiedensten Substrate.

Die Oxidation des Substrates wird von der oxidativen Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat begleitet. Bei den Hydroxylierungs-Reaktionen wird ein Atom des Sauerstoffes in das Produkt eingebaut, während das andere O-Atom in die Carboxy-Gruppe der Ketosäure eingebaut wird. Diese Enzyme werden als Dioxygenasen bezeichnet, obwohl die Sauerstoffatome in dieser intermolekularen Variante einer Dioxygenase-Reaktion meist in zwei unterschiedliche Moleküle inkorporiert werden (Abb. 40; 42) (Costas *et al.* 2004). Neben diesem typischen Schema für Hydroxylierungen gibt es noch andere oxidative Reaktionen, wie Zyklisierungen, Ringerweiterungen und Einführung einer Doppelbindung, bei denen nur ein Atom des O_2 Moleküles in das Succinat-Nebenprodukt eingebaut wird, während das andere als Wasser freigesetzt wird (Costas *et al.* 2004).

Einige wichtige Vertreter aus der Enzymfamilie der mononukleären Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen sind AlkB, welches in der DNA-Reparatur einzelsträngige DNA und RNA demethyliert; die Clavaminatsynthase (CAS), welche drei Reaktionsschritte in der Synthese des β-Lactamase-Inhibitors Clavaminat katalysiert und die Deacetoxycephalosporin C Synthase (DOACS), welche die Spaltung des Thiazolidin-Ringes von Penicillin N katalysiert (Costas *et al.* 2004). Zu dieser Enzymfamilie gehören auch wichtige Enzyme für die Nutzung alternativer Energiequellen wie Sulfonate oder Hypophosphite. So erlaubt z. B. TauD aus *E. coli* die die Nutzung von Taurin als Schwefelquelle unter Sulfatlimitation (Costas *et al.* 2004). Mit HtxA kann *Pseudomonas stutzeri* WM88 Phosphit und Hypophosphit oxidieren (White & Metcalf 2002) und somit reduzierten Phosphor als Phosphorquelle nutzen (Metcalf & Wolfe 1998). Eine weitere bedeutende Gruppe innerhalb der mononukleären Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-

abhängigen Dioxygenasen stellen die weit verbreiteten Prolyl-3-, Prolyl-4- und die Lysyl-Hydroxylasen dar. Sie sind z. B. für die post-translationale Modifikation von Prokollagen verantwortlich, welches entscheidend für die Bildung von Fibrillen in eukaryontischen Geweben ist (Hanauske-Abel & Popowicz 2003). Kollagen stellt in Vertebraten bis zu einem Drittel der Proteinmasse dar (Kleinig & Maier 1999). Weitere Enzyme, die dieser Proteinfamilie angehören, sind FIH-1 und HIF-1, die als Sauerstoffsensoren in humanen Zellen fungieren (Elkins *et al.* 2003; Costas *et al.* 2004).

Die meisten der Reaktionen die von Enzymen der Superfamilie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen katalysiert werden, stellen Chemiker vor große Schwierigkeiten diese im Labor, ohne die enzymatische Katalyse, nachzuvollziehen. Ein Beispiel ist die Funktionalisierung inerter C-H Bindungen in unterschiedlichen Substraten, die von verschiedenen Nicht-Häm Eisen Enzymen, unter anderen auch von der in dieser Arbeit charakterisierten Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens*, katalysiert wird (Que & Ho 1996; Solomon *et al.* 2000).

Trotz der großen Vielfältigkeit der Reaktionen, die diese Enzyme katalysieren können, gibt es einige identische Anforderungen. Sie benötigen ein Äquivalent Eisen(II), 2-Oxoglutarat und O_2 als Co-Substrate. Einige Enzyme benötigen für ihre volle Aktivität *in vitro* Ascorbat und/oder Katalase (Lawrence *et al.* 1996; Costas *et al.* 2004).

Kristallstrukturen unterschiedlicher 2-Oxoglutarat-abhängiger Enzyme zeigen eine doppelsträngige β-Helix, auch als „jellyroll“ bezeichnet, als eine gemeinsame Architektur innerhalb dieser Superfamilie (Valegard *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2000; Clifton *et al.* 2001; Dann *et al.* 2002; Elkins *et al.* 2002; Wilmouth *et al.* 2002; Clifton *et al.* 2003; Elkins *et al.* 2003). Dies lässt eine enge evolutionäre Verwandtschaft der einzelnen Enzyme untereinander vermuten. Trotz struktureller Ähnlichkeiten lassen sich durch Aminosäure-Sequenzvergleiche drei Klassen anhand der Abstände der konservierten Aminosäurereste der 2-His-1-Carboxylat Triade zueinander unterscheiden. Es gibt ein Motiv konservierter Aminosäurereste der Form **H** X (**D**/E) X_m **H** X_n (**R**/K) X S, mit jeweils unterschiedlicher Anzahl für m und n (Tab. 17). Aufgrund dieser Abstände der Aminosäuren zueinander, wurden drei Subklassen der innerhalb der Familie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen definiert (Tab. 17; (Hogan *et al.* 2000; Costas *et al.* 2004))

Der Teil **H** X (**D**/E) X_m **H** stellt die 2-His-1-Carboxylat Triade dar, die für die Bindung des mononukleären Eisen(II)-Zentrums verantwortlich ist, während das (**R**/K) X S Motiv für die Koordination des anionischen C5-Carboxylates des 2-Oxoglutarates zuständig ist. Die in dieser Arbeit charakterisierte Hydroxylase EctD gehört aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz zur Subklasse III (Tab. 17).

Obwohl viele dieser Enzyme nur eine minimale Sequenzidentität aufweisen, gibt es einen hohen Grad an strukturellen Ähnlichkeiten. Alle bisher kristallisierten Enzyme dieser Familie zeigen eine typische „β-barrel“-Struktur als Kern des Enzymes (Valegard *et al.* 2004). In dieser fassähnlichen Struktur aus β-Faltblättern ist auch das aktive Zentrum mit der 2-His-1-Carboxylat Triade zur Koordination des mononukleären Eisen(II) lokalisiert.

Tabelle 17. Konsensusmotive der Subklassen innerhalb der Familie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.

Die dargestellte Sequenz bildet die 2-His-1-Carboxylat Triade (fett gedruckt) und ist an der Koordination des anionischen C5-Carboxylates des 2-Oxoglutarates beteiligt (Hogan et al. 2000; Costas et al. 2004).

Subklassen	Vertreter dieser Subklasse	Konsensus-Sequenz		
I	IPNS, DAOCS, und verwandte Enzyme	**H** X **D**	X_{50-70}	**H** X_{10}(R/K) X S
II	TfdA, TauD, CAS, und verwandte Enzyme	**H** X (**D/E**)	$X_{138-207}$	**H** X_{10-13} R
III	Prolin-Hydroxylasen, Phytaconyl-CoA-Hydroxylase, und verwandte Enzyme	**H** X **D**	X_{72-101}	**H** X_{10} (R/K) X S
	S. salexigens Ectoin-Hydroxylase EctD	**H** X **D**	X_{101}	**H** X_{10} R

Das X steht für eine beliebige Aminosäure, die tiefgestellten Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren wieder.

IPNS ist eine Isopenicillin N Synthase, die in *Cephalosporium*, *Penicillium* und *Streptomyces* Spezies zu finden ist (Roach *et al.* 1997; Costas *et al.* 2004). DAOCS ist eine Deacetoxycephalosporin C Synthase aus *Streptomyces clavuligerus* und ist auch in anderen Prokaryoten zu finden (Lee *et al.* 2001; Valegard *et al.* 2004). CAS steht für Clavaminat Synthase (Zhang *et al.* 2000). TauD ist eine Taurin/2-Oxodlutarat Dioxygenase aus *Escherichia coli* (Elkins *et al.* 2002). TfdA ist eine 2,4-Dichlorophenoxyacetat/2-Oxodlutarat Dioxygenase aus *Ralstonia eutropha* (Hogan *et al.* 2000). Prolin-Hydroxylasen sind sowohl in Pro-, wie auch in Eukaryoten zu finden.

2.2 Reaktionsmechanismus

Daten der verschiedensten spektroskopischen und kristallographischen Analysen von Enzymen der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)-und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen erlauben die Vorhersage eines allgemeinen Reaktionsmechanismus (Que & Ho 1996; Solomon *et al.* 2000; Hanauske-Abel & Popowicz 2003; Costas *et al.* 2004). Das Eisen(II)-Zentrum des „ruhenden“ Enzymes ist koordiniert mit den beiden Histidin- und dem Aspartat-/Glutamat-Rest der 2-His-1-Carboxylat Triade, während die anderen drei Koordinationsstellen mit Wassermolekülen besetzt sind. Im ersten Schritt des Reaktionszyklus bindet das Co-Substrat 2-Oxoglutarat an zwei Koordinationsstellen, die vorher von Wassermolekülen besetzt waren. Die äquatoriale Ebene dieses Oktaeders besteht aus dem nahezu planaren Fünferring des chelierten α-Keto-Carboxylates, einem Histidin und dem Carboxylat der 2-His-1-Carboxylat Triade (Abb. 43). Für die Reihenfolge der Bindung von Substrat und Sauerstoff werden in der Literatur zwei Möglichkeiten beschrieben. Bevorzugt wird die Bindung des Substrates, gefolgt von der Bindung des Sauerstoffes. Analysen haben gezeigt, dass die Bindung des Substrates zu einem ungesättigten Eisen(II)-Zentrum führt, was durch den Verlust des letzten verbleibenden Wassermoleküles an der dritten Koordinationsstelle des Eisens hervorgerufen wird. Dies wiederum ermöglicht es, dass der Sauerstoff am Eisen gebunden werden kann und somit ein reaktives Zentrum entsteht

(Zhang *et al.* 2000; Elkins *et al.* 2002). Die Bindung von O_2 führt zu einem Eisen(III)-Superoxid-Radikal-Anion. Das Superoxid ist eine potentes Nukleophil, welches die α-Ketosäure decarboxylieren kann (San Filippo *et al.* 1976), insbesondere, wenn das α-Keto-C-Atom durch ein Metall aktiviert wird.

Direkte Hinweise auf das Vorkommen einer Eisen(IV)-Spezies während des Reaktions-Zyklus konnte erst kürzlich in einem TauD-2-OG-Taurin-Komplex mit O_2 erhalten werden (Price *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass diese Eisen(IV)-Spezies für den Reaktionsmechanismus signifikant ist (Price *et al.* 2003). In der Reaktion von Eisen(II) mit molekularem Sauerstoff, wird eine reaktive Eisen(IV)-Spezies in diesen Proteinen generiert (Abb. 41) (He & Mishina 2004).

Für die Hydroxylierung des Substrates wurde ein analoger Reaktionsmechanismus wie für Cytochrom P450 postuliert. Dieser zweistufige Prozess beinhaltet die Abspaltung eines Wasserstoffatomes durch die Oxo-Fe(IV)-Spezies, gefolgt von der Inkorporation des Sauerstoffes („radical-rebound-mechanism“) (Costas *et al.* 2004). Der Unterschied zum Cytochrom P450 ist die Nutzung eines Fe(III)/Fe(IV)=O Paares, während Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängige Enzyme eine Fe(II)/Fe(IV)=O Paar benutzen müssen (Costas *et al.* 2004). Dieser Radikal-Mechanismus erfordert eine ideale Positionierung der Ziel C-H-Bindung des Substrates zum aktiven Zentrum.

CO_2 als ein Produkt dieser Reaktionen wird direkt nach dem hydroxylierten Produkt aus dem aktiven Zentrum entlassen (Costas *et al.* 2004). Analysen von Kristallstrukturen zeigen eine lineare Bindung von CO_2 in der äquatorialen Ebene des Eisen-Zentrums (Lee *et al.* 2001).

In Anlehnung an die Reaktionsmechanismen der charakterisierten Enzyme der Familie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, im Besonderen der Prolin-Hydroxylasen (Prescott & Lloyd 2000; Costas *et al.* 2004), und der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wird folgender Reaktionsmechanismus für die Ectoin-Hydroxylase EctD aus *S. salexigens* vorgeschlagen: Während der Hydroxylierung des Substrates Ectoin zum Produkt Hydroxyectoin wird das Co-Substrat 2-Oxoglutarat stöchiometrisch zu Succinat und CO_2 decarboxyliert (Abb. 40; 42). Bei der Hydroxylierungsreaktion wird ein Atom des molekularen Sauerstoffes in die neu gebildete Hydroxygruppe am C5-Atom des Pyrimidinringes des Ectoines eingebaut. Das zweite Sauerstoffatom wird auf Succinat übertragen (Abb. 40).

Aktivitätstests mit dem aus *S. salexigens* gereinigten EctD Enzym zeigten deutlich, dass L-Prolin, trotz struktureller Ähnlichkeit, kein Substrat für dieses Enzym darstellt. Auch synthetische Ectoin-Derivate mit einem Fünfer- oder Siebenerring, statt des Sechserringes von Ectoin und Hydroxyectoin, werden nicht als Substrat verwendet (Abb. 34). Die EctD Hydroxylase von *S. salexigens* ist somit ein Enzym mit einer hohen Substratspezifität für Ectoin, welches in Abhängigkeit von 2-Oxoglutarat und Fe^{2+} zu Hydroxyectoin umgewandelt wird.

Für Enzyme der Familie der mononukleären Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen konnte gezeigt werden, dass die oxidative Decarboxylierung der α-Ketosäure auch ohne eine Reaktion am Substrat erfolgen kann, besonders dann, wenn kein Substrat zur Verfügung steht (Tuderman *et al.* 1977; Puistola *et al.* 1980; Myllyla *et al.* 1984; Costas *et al.* 2004). Während dieser unspezifischen Nebenreaktion entstehen reaktive Sauerstoffspezies, was unter anderem zu Schäden im Enzym oder zur Bildung von H_2O_2 führen kann. Diese potentielle Gefahr einer ungekoppelten Reaktion unter Bildung toxischer Produkte in Abwesenheit des Substrates könnte ein Hinweis auf die Synthese von Hydroxyectoin in der späten exponentiellen und stationären Wachstumsphase sein (Abb. 11). Mit einer verzögerten Aktivierung des EctD-Enzymes soll sichergestellt sein, dass für ein aktives Enzym ausreichend Substrat, Ectoin, zur Verfügung steht, was ab der späten exponentiellen Wachstumsphase gewährleistet ist (Abb. 11).

Im Zusammenhang mit dieser unspezifischen Generation reaktiver Sauerstoffspezies oder H_2O_2 im Enzym selbst oder durch Reaktionen am Eisen (Fenton Reaktion) im Reaktionsansatz scheint die Zugabe von Katalase einen protektiven Effekt auf die Hydroxylase zu haben. Dies wurde auch für eine Vielzahl anderer Hydroxylasen aus der Familie der mononukleären Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen beschrieben (Lawrence *et al.* 1996; Costas *et al.* 2004).

Einige der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen benötigen Ascorbat für ihre maximale *in vitro* Aktivität. Es wird angenommen, dass Ascorbat eine enzymatische Inaktivierung durch die Bildung von Eisen(III) bei einer entkoppelten Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat durch Reduktion des Eisens rückgängig machen kann (Costas *et al.* 2004). Für EctD aus *S. salexigens* konnte kein positiver Einfluss auf die Aktivität verzeichnet werden. Im Gegenteil, wie auch bei der Prolin-Hydroxylase aus *Streptomyces griseoviridus* P8648 wurde ein negativer Effekt einer erhöhten Ascorbat-Konzentration im *in vitro* Test beobachtete (Abb. 30) (Lawrence *et al.* 1996).

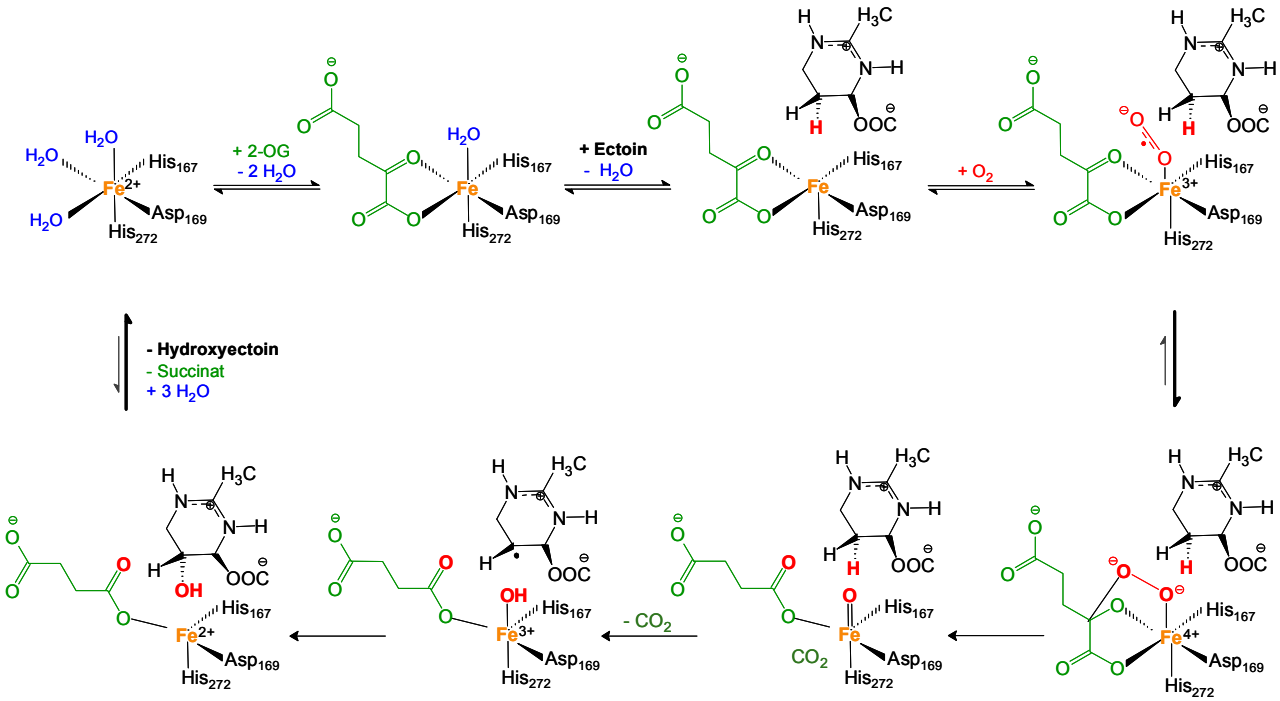


Abbildung 41. Potentieller Reaktionsablauf der Biosynthese von 5-Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*.

Dargestellt ist der für die Familie der Nicht-Häm Eisen(II) und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen typische Reaktionsablauf (Baldwin *et al.* 1991; Wu *et al.* 1999; Clifton *et al.* 2001; Costas *et al.* 2004). Die Hydroxylierung ist als ein Radikalmechanismus (Radical Rebound Mechanism) dargestellt. Eine Konformationsänderung während Bindung und Freigabe von Substraten und Produkten kann nicht ausgeschlossen werden (Lloyd *et al.* 1999).

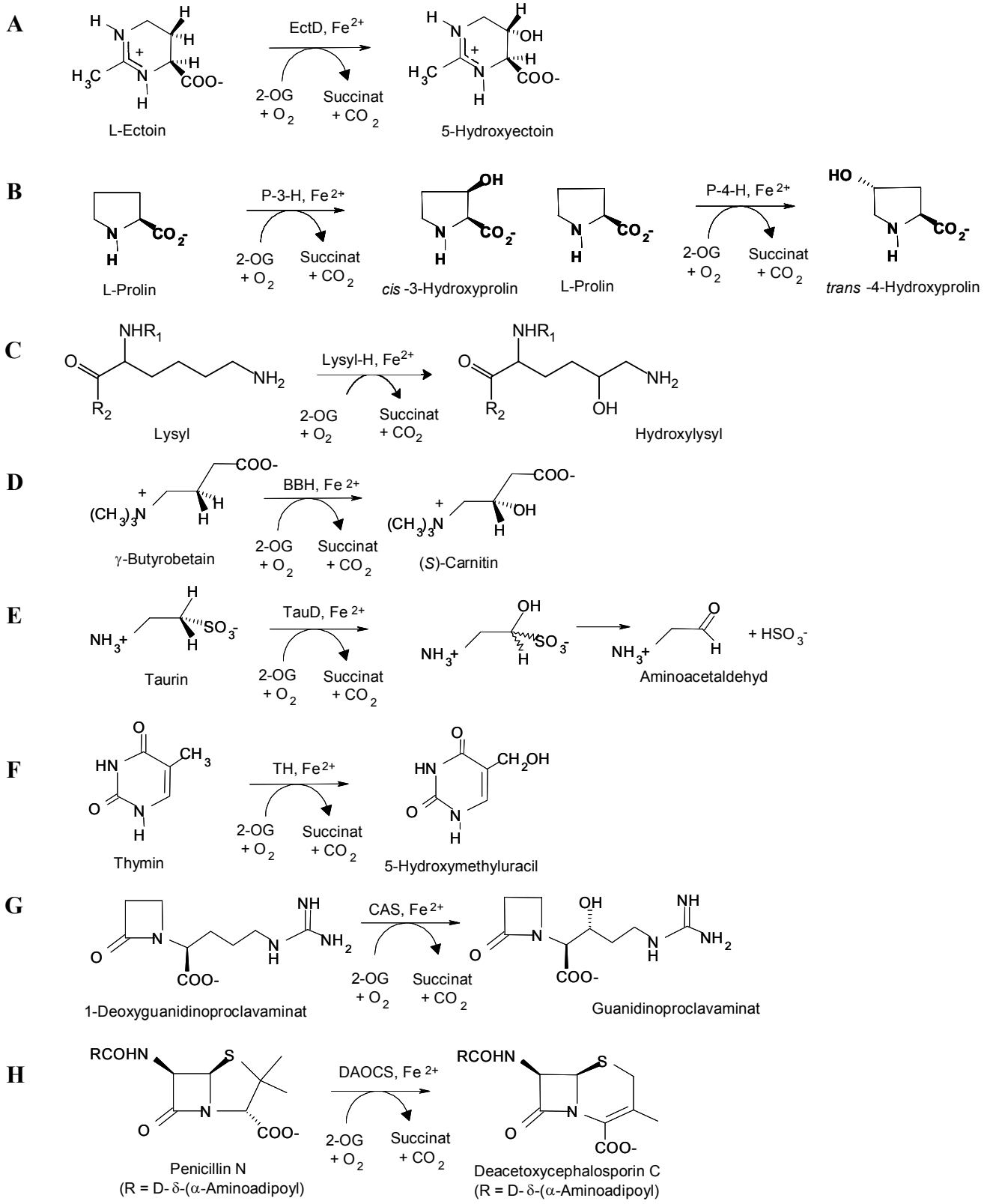


Abbildung 42. Ausgewählte Reaktionen, die von mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen katalysiert werden.

Dargestellt sind (**A**) Ectoin-Hydroxylase (EctD) aus *S. salexigens* (diese Arbeit) und *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bursy *et al.* 2005), (**B**) Prolin-3-Hydroxylase (P-3-H) und L-Prolin-4-Hydroxylase (P-4-H) (Clifton *et al.* 2001), (**C**) Lysyl-Hydroxylase (Lysyl-H) (Costas *et al.* 2004), (**D**) Butyrobetain-Hydroxylase (BBH), (**E**) Taurin/2-Oxoglutarat-Dioxygenase (TauD) aus *Escherichia coli* (Elkins *et al.* 2002), (**F**) Thymin-Hydroxylase (TH), (**G**) Clavaminat-Synthase (CAS) (Zhang *et al.* 2000), (**H**) Deacetoxycephalosporin-C-Synthase (DAOCS) aus *Streptomyces clavuligerus* und anderen Prokaryoten zu finden (Lee *et al.* 2001; Valegard *et al.* 2004).

2.3 Modell des aktiven Zentrums, der 2-His-1-Carboxylat-Triade

Kristallstrukturen verschiedener Mitglieder der Familie der mononukleären Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen geben einen tieferen Einblick in die Art der Koordination des Eisens und der Substrate, sowie mechanistische Details der katalysierten Reaktionen dieser Enzymklasse (Roach *et al.* 1997; Valegard *et al.* 1998; Burzlaff *et al.* 1999; Lloyd *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2000; Clifton *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001; Chance *et al.* 2002; Dann *et al.* 2002; Elkins *et al.* 2002; Wilmouth *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2002; Clifton *et al.* 2003; Elkins *et al.* 2003; O'Brien *et al.* 2003; Costas *et al.* 2004; Muller *et al.* 2004; Müller *et al.* 2004; Valegard *et al.* 2004).

Große Mengen des enzymatisch aktiven EctD-Strep-Tag Fusionsproteines konnten aus *E. coli* Kulturen zu apparenter Homogenität gereinigt werden. Das rekombinante EctD Protein wurde deshalb in Zusammenarbeit mit Dr. K. Reuter (Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie) für die Kristallisation zu Analyse der Röntgenkristallstruktur dieses Enzymes verwendet. Bisher war die Qualität der Kristalle jedoch noch nicht ausreichend, um die Struktur aufzuklären. Die Struktur dieses Proteines ist von besonderem Interesse, da es einen Prototyp für einen neue Subklasse innerhalb der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC1.14.11.) darstellt. Mit der Analyse dieser Struktur wäre auch eine Aufklärung der Bindung eines kompatiblen Solutes in einem katalytischen Enzymes möglich, da bisher nur Erkenntnisse über die Koordination in extrazellulären Bindeproteinen bekannt sind (Schiefner *et al.* 2004[a]; Schiefner *et al.* 2004[b]).

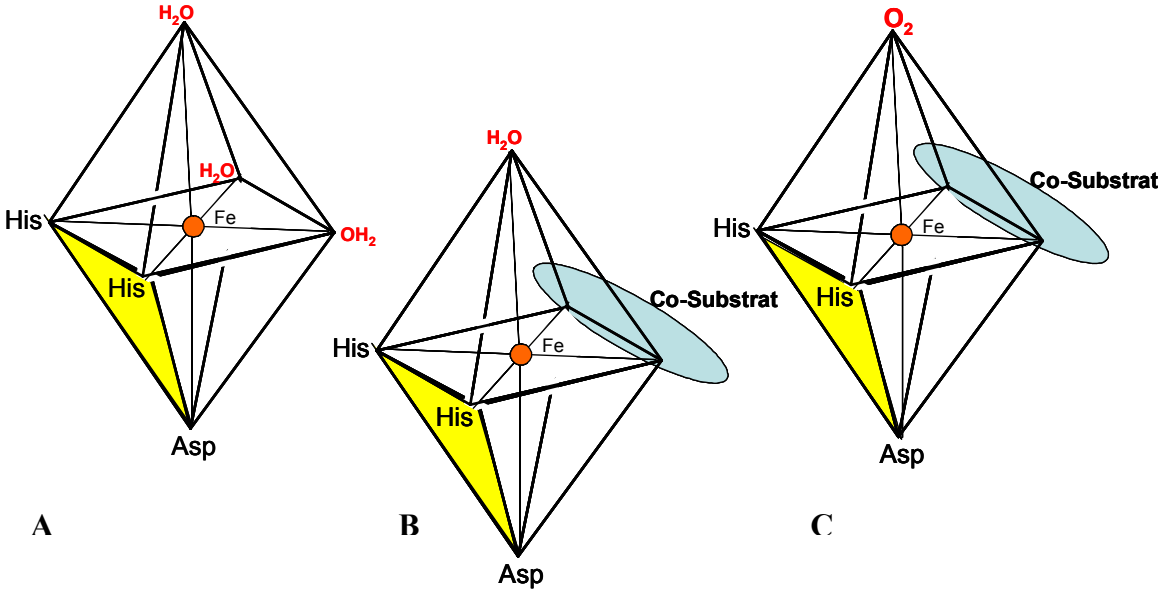


Abbildung 43. Modell des aktiven Zentrums einer mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase mit dem konservierten Eisen-Bindemotiv, der „2-His-1-Carboxylat-Triade".

(**A**) ohne Substrat und Co-Substrat sind die drei freien Bindestellen das mononukleäre Eisen-Zentrums mit Wassermolekülen besetzt; (**B**) das Co-Substrat 2-Oxoglutarat wird in der planaren Ebene an zwei Bindestellen des Eisens koordiniert; (**C**) durch die Bindung des Co-Substrates wird das Eisen-Zentrum aktiviert und Sauerstoff kann gebunden werden, was den Beginn eines Reaktions-Zyklus darstellt. (2-His-1-Carboxylat-Triade in gelb; 2-Oxoglutarat in blau; Eisen(II) ist als Kugel dargestellt (Solomon *et al.* 2000; Solomon *et al.* 2003; Costas *et al.* 2004).

VIII Literaturverzeichnis

Alice, A. F. und C. Sanchez-Rivas (1997). DNA supercoiling and osmoresistance in *Bacillus subtilis* 168. *Curr Microbiol* **35**: 309-315.

Altendorf, K. und W. Epstein (1994). Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. *Cell Physiol Biochem* **4**: 160-168.

Altendorf, K., M. Gassel, W. Puppe, T. Mollenkamp, A. Zeeck, C. Boddien, K. Fendler, E. Bamberg und S. Drose (1998). Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. *Acta Physiol Scand* **643**: 137-146.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

Ambulos, N. P., Jr., E. J. Duvall und P. S. Lovett (1987). The mRNA for an inducible chloramphenicol acetyltransferase gene is cleaved into discrete fragments in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**: 967-972.

Andersson, M. M., J. D. Breccia und R. Hatti-Kaul (2000). Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol Appl Biochem* **32**: 145-153.

Arahal, D. R., M. T. Garcia, C. Vargas, D. Canovas, J. J. Nieto und A. Ventosa (2001). *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1457-1462.

Arakawa, T. und S. N. Timasheff (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**: 411-414.

Arora, A., C. Ha und C. B. Park (2004). Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Lett* **564**: 121-125.

Atkinson, D. E. (1977). Cellular energy metabolism and its regulation, Academic Press, New York.

Auble, D. T., T. L. Allen und P. L. Dehaseth (1986). Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem* **261**: 11202-11206.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl (1994). Current protocols in molecular biology. New York, Wiley and Sons, Inc.

Baldwin, J. E., R. M. Adlington, N. P. Crouch, J. W. Keeping, S. W. Leppard, J. Pitlik, C. J. Schofield, W. J. Sobey und M. Wood (1991). Studies on the mechanism of deacetoxy deacetylcephalosporin-C synthase using cyclopropyl substituted cephalosporin probes. *J Chem Soc Chem Commun*: 768–770.

Barbour, E. A. und F. G. Priest (1986). The preservation of *Lactobacilli*: a comparison of three methods. *Lett Appl Microbiol* **2**: 68-71.

Barron, A., G. May, E. Bremer und M. Villarejo (1986). Regulation of envelope protein composition during adaption to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **167**: 433-438.

Bartens, W. (2001). "Forever young": Bakterien aus einem Wüstensee sollen die menschliche Haut vor Sonne und Wassermangel schützen. *DIE ZEIT* **41**.

Barth, S., M. Huhn, B. Matthey, A. Klimka, E. A. Galinski und A. Engert (2000). Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1572-1579.

Baskakov, I. und D. W. Bolen (1998). Forcing Thermodynamically Unfolded Proteins to Fold. *J Biol Chem* **273**: 4831-4834.

Bayles, D. O. und B. J. Wilkinson (2000). Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**: 23-27.

Bayles, K. W. (1993). The use of degenerate, sensor gene-specific, oligodeoxyribonucleotide primers to amplify DNA fragments from *Staphylococcus aureus*. *Gene* **123**: 99-103.

Belitsky, B. R., J. Brill, E. Bremer und A. L. Sonenshein (2001). Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 4389-4392.

Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper*, et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.

Bernhardt, J., U. Völker, A. Völker, H. Antelmann, R. Schmid, H. Mach und M. Hecker (1997). Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*--a two-deimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* **143**: 999-1017.

Beumer, R. R., M. C. Te Giffel, L. J. Cox, F. M. Rombouts und T. Abee (1994). Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1359-1363.

Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew*, et al.* (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.

Bligh, E. G. und W. J. Dyer (1959). A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.

Blount, P. und P. C. Moe (1999). Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. *Trends Microbiol* **7**: 420-424.

Blount, P., S. I. Sukharev, P. C. Moe, B. Martinac und C. Kung (1999). Mechanosensitive channels of bacteria. *Methods Enzymol* **294**: 458-482.

Boch, J., B. Kempf und E. Bremer (1994). Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**: 5364-5371.

Boch, J., B. Kempf, R. Schmid und E. Bremer (1996). Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* **178**: 5121-5129.

Bohnert, H. J., D. E. Nelson und R. G. Jensen (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.

Bolen, D. W. und I. V. Baskakov (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**: 955-963.

Booth, I. R. und P. Louis (1999). Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**: 166-169.

Borges, N., A. Ramos, N. D. Raven, R. J. Sharp und H. Santos (2002). Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles* **6**: 209-216.

Bourot, S., O. Sire, A. Trautwetter, T. Touze, L. F. Wu, C. Blanco und T. Bernard (2000). Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 1050-1056.

Bovell, C. R., L. Packer und R. Helgerson (1963). Permeability of *Escherichia coli* to Organic Compounds and Inorganic Salts Measured by Light-Scattering. *Biochim Biophys Acta* **75**: 257-266.

Bown, J. A., K. A. Barne, S. D. Minchin und S. J. W. Busby (1997). Extended -10 Promotors. In Nucleic acids and molecular biology. Edited by F. Eckstein & D. M. J. Lilley. Berlin, Springer Verlag.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Brandon, L., S. Dorus, W. Epstein, K. Altendorf und K. Jung (2000). Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the *kdp* ATPase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **38**: 1086-1092.

Bremer, E. (2002). Adaptation to changing osmolality. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Edited by J. A. Hoch, A. L. Sonenshein & R. Losick, ASM Press, Washington, D. C., USA**:** 385-391.

Bremer, E. und R. Krämer (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In Bacterial stress responses. Edited by G. Storz & R. Hengge-Aronis, ASM Press, Washington, D.C, USA**:** 79-97.

Brigulla, M., T. Hoffmann, A. Krisp, A. Völker, E. Bremer und U. Volker (2003). Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol* **185**: 4305-4314.

Brill, J. (2001). Biosynthese und Anhäufung der osmotischen Schutzsubstanz Prolin mittels *de novo* Synthese und Aufnahme prolinhaltiger Peptide in *Bacillus subtilis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Broeze, R. J., C. J. Solomon und D. H. Pope (1978). Effects of low temperatures on *in vivo* and *in vitro* protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **134**: 861-874.

Brown, A. D. (1963). The Peripheral Structures of Gram-Negative *Bacteria*.Iv. The Cation-Sensitive Dissolution of the Cell Membrane of the Halophilic Bacterium, H*alobacterium halobium*. *Biochim Biophys Acta* **75**: 425-435.

Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**: 803-846.

Buenger, J. und H. Driller (2004). Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* **17**: 232-237.

Burg, M. B., E. D. Kwon und D. Kultz (1997). Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* **59**: 437-455.

Bursy, J. (2001). Osmotisch kontrollierte Synthese von Ectoin und Hydroxy-Ectoin in *Salibacillus salexigens*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.

Bursy, J., H. Hartmann, A. U. Kuhlmann, A. J. Pierik und E. Bremer (2005). Ectoine hydroxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization of an enzyme responsible for the biosynthesis of the compatible solute hydroxyectoine. *Manuskript*.

Bursy, J., A. J. Pierik, N. Pica und E. Bremer (2005). Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *Manuskript*.

Burzlaff, N. I., P. J. Rutledge, I. J. Clifton, C. M. Hensgens, M. Pickford, R. M. Adlington, P. L. Roach und J. E. Baldwin (1999). The reaction cycle of isopenicillin N synthase observed by X-ray diffraction. *Nature* **401**: 721-4.

Calamita, G., W. R. Bishai, G. M. Preston, W. B. Guggino und P. Agre (1995). Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 29063-29066.

Calamita, G., B. Kempf, M. Bonhivers, W. R. Bishai, E. Bremer und P. Agre (1998). Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3627-3631.

Caldas, T., N. Demont-Caulet, A. Ghazi und G. Richarme (1999). Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology* **145 (Pt 9)**: 2543-2548.

Canovas, D., N. Borges, C. Vargas, A. Ventosa, J. J. Nieto und H. Santos (1999). Role of Ngamma-acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3774-3779.

Canovas, D., S. A. Fletcher, M. Hayashi und L. N. Csonka (2001). Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **183**: 3365-3371.

Canovas, D., C. Vargas, M. I. Calderon, A. Ventosa und J. J. Nieto (1998). Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol* **21**: 487-497.

Canovas, D., C. Vargas, F. Iglesias-Guerra, L. N. Csonka, D. Rhodes, A. Ventosa und J. J. Nieto (1997). Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **272**: 25794-25801.

Cayley, S., B. A. Lewis und T. M. Record, Jr. (1992). Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **174**: 1586-1595.

Chance, M. R., A. R. Bresnick, S. K. Burley, J. S. Jiang, C. D. Lima, A. Sali, S. C. Almo, J. B. Bonanno, J. A. Buglino, S. Boulton*, et al.* (2002). Structural genomics: a pipeline for providing structures for the biologist. *Protein Sci* **11**: 723-38.

Ciulla, R. A., S. Burggraf, K. O. Stetter und M. F. Roberts (1994). Occurrence and role of Di-myo-inositol-1,1'-phosphate in *Methanococcus igneus*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3660-3664.

Clark, V. L., D. E. Peterson und R. W. Bernlohr (1972). Changes in free amino acid production and intracellular amino acid pools of *Bacillus licheniformis* as a function of culture age and growth media. *J Bacteriol* **112**: 715-725.

Clifton, I. J., L. X. Doan, M. C. Sleeman, M. Topf, H. Suzuki, R. C. Wilmouth und C. J. Schofield (2003). Crystal structure of carbapenem synthase (CarC). *J Biol Chem* **278**: 20843-20850.

Clifton, I. J., L. C. Hsueh, J. E. Baldwin, K. Harlos und C. J. Schofield (2001). Structure of proline 3-hydroxylase. Evolution of the family of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Eur J Biochem* **268**: 6625-6636.

Conter, A., C. Menchon und C. Gutierrez (1997). Role of DNA supercoiling and RpoS sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol* **273**: 75-83.

Costas, M., M. P. Mehn, M. P. Jensen und L. Que, Jr. (2004). Dioxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates. *Chemical Reviews* **104**: 939-986.

Courtenay, E. S., M. W. Capp, C. F. Anderson und M. T. Record, Jr. (2000). Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of "osmotic stress" experiments *in vitro*. *Biochemistry* **39**: 4455-4471.

Crichton, R. R., S. Wilmet, R. Legssyer und R. J. Ward (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* **91**: 9-18.

Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**: 121-147.

Csonka, L. N. und W. Epstein (1996). Osmoregulation. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Edited by F. C. Neidhard, R. Curtiss III, J. L. Ingraham *et al.*, ASM Press, Washington, D. C., USA**:** 1210-1223.

Csonka, L. N. und A. D. Hanson (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* **45**: 569-606.

Csonka, L. N., T. P. Ikeda, S. A. Fletcher und S. Kustu (1994). The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolality but not induction of the *proU* operon. *J Bacteriol* **176**: 6324-6333.

Culham, D. E., B. Tripet, K. I. Racher, R. T. Voegele, R. S. Hodges und J. M. Wood (2000). The role of the carboxyl terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*. *J Mol Recognit* **13**: 309-322.

da Costa, M. S., H. Santos und E. A. Galinski (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117-153.

Dann, C. E., 3rd, R. K. Bruick und J. Deisenhofer (2002). Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15351-15356.

Dattananda, C. S., K. Rajkumari und J. Gowrishankar (1991). Multiple mechanisms contribute to osmotic inducibility of *proU* operon expression in *Escherichia coli*: demonstration of two osmoresponsive promoters and of a negative regulatory element within the first structural gene. *J Bacteriol* **173**: 7481-7490.

Delamarche, C., D. Thomas, J. P. Rolland, A. Froger, J. Gouranton, M. Svelto, P. Agre und G. Calamita (1999). Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J Bacteriol* **181**: 4193-7.

Delauney, A. J. und D. P. Verma (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* **4**: 215-223.

Dennis, P. P. und L. C. Shimmin (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic *Archaea*. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 90-104.

Diamant, S., N. Eliahu, D. Rosenthal und P. Goloubinoff (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* **276**: 39586-39591.

Diamant, S., D. Rosenthal, A. Azem, N. Eliahu, A. P. Ben-Zvi und P. Goloubinoff (2003). Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress. *Mol Microbiol* **49**: 401-410.

Dinnbier, U., E. Limpinsel, R. Schmidt und E. P. Bakker (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150**: 348-357.

Doronina, N. V., T. D. Darmaeva und Y. A. Trotsenko (2003). *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 223-229.

Durell, S. R. und H. R. Guy (1999). Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K^+ channel. *Biophys J* **77**: 789-807.

Eichler, K., F. Bourgis, A. Buchet, H.-P. Kleber und M.-A. Mandrand-Berthelot (1994). Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **13**: 775-786.

Eisenberg, H. und E. J. Wachtel (1987). Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **16**: 69-92.

Ekena, K. und S. Maloy (1990). Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: how do cells avoid a futile cycle? *Mol Gen Genet* **220**: 492-494.

Elkins, J. M., K. S. Hewitson, L. A. McNeill, J. F. Seibel, I. Schlemminger, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe und C. J. Schofield (2003). Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *J Biol Chem* **278**: 1802-1806.

Elkins, J. M., M. J. Ryle, I. J. Clifton, J. C. Dunning Hotopp, J. S. Lloyd, N. I. Burzlaff, J. E. Baldwin, R. P. Hausinger und P. L. Roach (2002). X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates. *Biochemistry* **41**: 5185-5192.

Eriksson, M., J. Myllyharju, H. Tu, M. Hellman und K. I. Kivirikko (1999). Evidence for 4-Hydroxyproline in Viral Proteins. *J Biol Chem* **274**: 22131-22134.

Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev* **57**: 1-33.

Fisher, S. H. und A. L. Sonenshein (1991). Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Microbiol* **45**: 107-135.

Fletcher, S. A. und L. N. Csonka (1998). Characterization of the induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* **15**: 307-317.

Folgering, J. H., P. C. Moe, G. K. Schuurman-Wolters, P. Blount und B. Poolman (2005). *Lactococcus lactis* uses MscL as its principal mechanosensitive channel. *J Biol Chem* **280**: 8784-8792.

Fox, B. G. (1998). Catalysis by non-heme iron. In Comprehensive Biological Catalysis. Edited, Academic Press Limitied. **III Radical Reactions and Oxidation/Reduction:** 261-348.

Frings, E., H. J. Kunte und E. A. Galinski (1993). Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiol Lett* **109**: 25-32.

Frings, E., T. Sauer und E. A. Galinski (1995). Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *Journal of Biotechnology* **43**: 53-61.

Galinski, E. A. (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interactions, stress protection. *Experientia* **49**: 487-496.

Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**: 272-328.

Galinski, E. A. und R. M. Herzog (1990). The role of trehalose as a substitute for nitrogencontaining compatible solutes. *Arch Microbiol* **153**: 607-613.

Galinski, E. A., H. P. Pfeiffer und H. G. Trüper (1985). 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem* **149**: 135-139.

Galinski, E. A. und H. G. Trüper (1982). Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiol Lett* **13**: 357-360.

Galinski, E. A. und H. G. Trüper (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 95-108.

Garabito, M. J., D. R. Arahal, E. Mellado, M. C. Marquez und A. Ventosa (1997). *Bacillus salexigens* sp. nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 735-741.

Gauthier, M. J., G. N. Fatau, P. M. Munro und R. L. Clement (1993). Glutamate uptake and synthesis by *Escherichia coli* cells in seawater: effects on culturability loss and glycinebetaine transport. *Microb Releases* **2**: 53-59.

Gerhardt, P. N. M., L. T. Smith und G. M. Smith (1996). Sodium-driven, osmotically activated glycine betaine transport in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *J Bacteriol* **178**: 6105-6109.

Göller, K., A. Ofer und E. A. Galinski (1998). Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **161**: 293-300.

Gouesbet, G., A. Trautwetter, S. Bonnassie, L. F. Wu und C. Blanco (1996). Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA*. *J Bacteriol* **178**: 447-455.

Gouffi, K., N. Pica, V. Pichereau und C. Blanco (1999). Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1491–1500.

Gowrishankar, J. (1989). Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 1923-1931.

Gowrishankar, J. und D. Manna (1996). How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? *Genetica* **97**: 363-378.

Grammann, K., A. Volke und H. J. Kunte (2002). New Type of Osmoregulated Solute Transporter Identified in Halophilic Members of the *Bacteria* Domain: TRAP Transporter TeaABC Mediates Uptake of Ectoine and Hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^{T}. *J Bacteriol* **184**: 3078-3085.

Grammel, N. (2000). Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei salzstressinduzierbaren Osmolyten, in *Streptomyces chrysomallus*. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin, Germany.

Grant, W. D. (2004). Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 1249-1267.

Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. Weber, K. Schröder und M. A. Marahiel (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol Microbiol* **25**: 741-756.

Graumann, P. L. und M. A. Marahiel (1999). Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 203-209.

Guillouet, S. und J. M. Engasser (1995). Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium*

glutamicum as a response to an osmotic upshock. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 315-320.

Gutierrez, C., T. Abee und I. R. Booth (1995). Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *Int J Food Microbiol* **28**: 233-244.

Hagemann, M., S. Richter und S. Mikkat (1997). The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **179**: 714-720.

Hai, T., F. B. Oppermann-Sanio und A. Steinbuchel (2002). Molecular characterization of a thermostable cyanophycin synthetase from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain MA19 and *in vitro* synthesis of cyanophycin and related polyamides. *Appl Environ Microbiol* **68**: 93-101.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.

Hanauske-Abel, H. M. und A. M. Popowicz (2003). The HAG mechanism: a molecular rationale for the therapeutic application of iron chelators in human diseases involving the 2-oxoacid utilizing dioxygenases. *Curr Med Chem* **10**: 1005-1019.

Harwood, C. R., and A. R. Archibald (1990). Growth, maintenance and general techniques. In Molecular biological methods for *Bacillus*. Edited by C. R. H. a. S. M. C. (ed.), John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom**:** 1-26.

He, C. und Y. Mishina (2004). Modeling non-heme iron proteins. *Curr Opin Chem Biol* **8**: 201-208.

Hecker, M., W. Schumann und U. Völker (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 417-428.

Hecker, M. und U. Völker (1998). Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol* **29**: 1129-1136.

Hecker, M. und U. Völker (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* **44**: 35-91.

Heermann, R., K. Altendorf und K. Jung (2000). The hydrophilic N-terminal domain complements the membrane-anchored C-terminal domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 17080-17085.

Hegg, E. L. und L. Que, Jr. (1997). The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur J Biochem* **250**: 625-629.

Helmann, J. D. (1995). Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigmaA-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res* **23**: 2351-2360.

Hengge-Aronis, R. (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. Edited by F. C. Neidhard, R. Curtiss III, J. L. Ingraham *et al.*, ASM Press, Washington, D. C., USA.**:** 1497-1512.

Hengge-Aronis, R. (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**: 148-152.

Hengge-Aronis, R., W. Klein, R. Lange, M. Rimmele und W. Boos (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 7918-7924.

Henkin, T. M. und A. L. Sonenshein (1987). Mutations of the *Escherichia coli lacUV5* promoter

resulting in increased expression in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **209**: 467- 474.

Heyrman, J., N. A. Logan, H. J. Busse, A. Balcaen, L. Lebbe, M. Rodriguez-Diaz, J. Swings und P. De Vos (2003). *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 501-511.

Heyrman, J. und J. Swings (2001). 16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of carmona, Seville, Spain). *Syst Appl Microbiol* **24**: 417-422.

Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May und E. Bremer (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**: 569-584.

Hino, A., K. Mihara, K. Nakashima und H. Takano (1990). Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1386-1391.

Hoffmann, T., C. Boiangiu und E. Bremer (in Vorbereitung). Mechanosensitive channels in *Bacillus subtilis*.

Hoffmann, T. und E. Bremer (in Vorbereitung). *Bacillus subtilis* at low temperature.

Hoffmann, T., A. Schütz, M. Brosius, A. Völker, U. Völker und E. Bremer (2002). High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**: 718-727.

Hogan, D. A., S. R. Smith, E. A. Saari, J. McCracken und R. P. Hausinger (2000). Site-directed mutagenesis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/alpha-ketoglutarate dioxygenase. Identification of residues involved in metallocenter formation and substrate binding. *J Biol Chem* **275**: 12400-12409.

Höltje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 181-203.

Holtmann, G. (2002). Charakterisierung eines ABC-Transporters für kompatible Solute in dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* und Untersuchungen zur thermoprotektiven Wirkung kompatibler Solute in *Bacillus subtilis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Holtmann, G., E. P. Bakker, N. Uozumi und E. Bremer (2003). KtrAB and KtrCD: two K^+ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol* **185**: 1289-1298.

Holtmann, G., C. Boiangiu, J. Brill, T. Hoffmann, A. U. Kuhlmann, S. Moses, G. Nau-Wagner, N. Pica und E. Bremer (2004[b]). Physiological and molecular responses of *Bacillus subtilis* to hypertonicity: utilization of evolutionarily conserved adaptation strategies. In Halophilic Microorganisms. Edited by A. Ventosa. Berlin, Germany, Springer-Verlag,**:** 115-134.

Holtmann, G. und E. Bremer (2004[c]). Thermoprotection of B*acillus subtilis* by Exogenously Provided Glycine Betaine and Structurally Related Compatible Solutes: Involvement of Opu Transporters. *J Bacteriol* **186**: 1683–1693.

Holtmann, G., M. Brigulla, L. Steil, A. Schutz, K. Barnekow, U. Völker und E. Bremer (2004[a]). RsbV-independent induction of the SigB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature. *J Bacteriol* **186**: 6150-6158.

Inbar, L., F. Frolow und A. Lapidot (1993). The conformation of new tetrahydropyrimidine derivatives in solution and in the crystal. *Eur J Biochem* **214**: 897-906.

Inbar, L. und A. Lapidot (1988). Metabolic regulation in *Streptomyces parvulus* during actinomycin D synthesis, studied with ^{13}C- and ^{15}N-labeled precursors by ^{13}C and ^{15}N nuclear magnetic resonance spectroscopy and by gas chromatography-mass spectrometry. *J Bacteriol* **170**: 4055-4064.

Inbar, L. und A. Lapidot (1988). The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ^{13}C- and ^{15}N-labeled L-glutamate and ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **263**: 16014-22.

Inbar, L. und A. Lapidot (1991). ^{13}C nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry studies of carbon metabolism in the actinomycin D producer *Streptomyces parvulus* by use of ^{13}C-labeled precursors. *J Bacteriol* **173**: 7790-7801.

Incharoensakadi, A., T. Takabe und T. Akazawa (1986). Effect of betaine on enzyme activity and subunit interaction of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from *Aphanothece halophytica*. *Plant Physiol* **81**: 1044-1049.

Ingraham, J. und A. G. Marr (1996). Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Edited by F. C. Neidhard, R. Curtiss III, J. L. Ingraham *et al.*, ASM Press, Washington, D. C., USA**:** 1570-1578.

Jebbar, M., G. Gouesbet, S. Himdi-Kabbab, C. Blanco und T. Bernard (1995). Osmotic adaptation in *Brevibacterium linens*: differential effect of proline and glycine betaine on cytoplasmic osmolyte pool. *JBIC* **1**: 380-386.

Jebbar, M., L. Sohn-Bösser, E. Bremer, T. Bernard und C. Blanco (2005). Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an Ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol* **187**: 1293-1304.

Jebbar, M., R. Talibart, K. Gloux, T. Bernard und C. Blanco (1992). Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol* **174**: 5027-5035.

Jebbar, M., C. von Blohn und E. Bremer (1997). Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 325-330.

Jiang, W., Y. Hou und M. Inouye (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli* is an RNA chaperone. *J Biol Chem* **272**: 196-202.

Kaasen, I., J. McDougall und A. R. Strom (1994). Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* **145**: 9-15.

Kappes, R. M., B. Kempf und E. Bremer (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* **178**: 5071-5079.

Kappes, R. M., B. Kempf, S. Kneip, J. Boch, J. Gade, J. Meier-Wagner und E. Bremer (1999). Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**: 203-216.

Kawahara, Y., T. Ohsumi, Y. Yoshihara und S. Ikeda (1989). Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric Biol Chem* **53**: 2475-2479.

Kawano, M., R. Abuki, K. Igarashi und Y. Kakinuma (2001). Potassium uptake with low affinity and high rate in *Enterococcus hirae* at alkaline pH. *Arch Microbiol* **175**: 41-45.

Kempf, B. und E. Bremer (1995). OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**: 16701-16713.

Kempf, B. und E. Bremer (1998[a]). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**: 319-330.

Kempf, B. und E. Bremer (1998[b]). Stress responses of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: uptake and synthesis of osmoprotectants. *J Biosci* **23**: 447-455.

Khmelenina, V. N., M. G. Kalyuzhnaya, V. G. Sakharovsky, N. E. Suzina, Y. A. Trotsenko und G. Gottschalk (1999). Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Arch Microbiol* **172**: 321-329.

Killham, K. und M. K. Firestone (1984). Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomycetes indigenous* to saline soils. *Appl Environ Microbiol* **47**: 301-306.

Kleinig, H. und U. Maier (1999). Zellbiologie. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.

Knapp, S., R. Ladenstein und E. A. Galinski (1999). Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* **3**: 191-198.

Ko, R., L. T. Smith und G. M. Smith (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **176**: 426-431.

Koch, A. L. (1983). The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv Microb Physiol* **24**: 301-366.

Koo, S. P., C. F. Higgins und I. R. Booth (1991). Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J Gen Microbiol* **137**: 2617-2625.

Krispin, O. und R. Allmansberger (1995). Changes in supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol Lett* **134**: 129-135.

Kuhlmann, A. U. (1998). Biosynthese der osmotischen Schutzsubstanz Ectoin in *Bacillus* spp. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.

Kuhlmann, A. U. (2002). Biosynthese und Transport des kompatiblen Solutes Ectoin in *Bacillus* spp. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Kuhlmann, A. U. und E. Bremer (2002). Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **68**: 772-783.

Kuhlmann, A. U., J. Bursy, S. Gimpel, T. Hoffmann und E. Bremer (2005). Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenticus* is triggered by two environmental stimuli: high salt and low temperature. *Manuskript*.

Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.

Kunte, J., E. A. Galinski und H. G. Trüper (1993). A modified FMOC-method for the detection of amino-acid type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines). *J Microbiol Meth* **17**: 129-136.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lai, M. C. und R. P. Gunsalus (1992). Glycine betaine and potassium ion are major compatible solutes in the extremely halophilic methanogen *Methanohalophilus* strain Z7302. *J Bacteriol* **174**: 7474-7477.

Lai, M. C., D. R. Yang und M. J. Chuang (1999). Regulatory factors associated with synthesis of the osmolyte glycine betaine in the halophilic methanoarchaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 828-833.

Lail-Trecker, K. (1997). Cloning PCR products utilizing the T/A overhang and a kit. In Methodes molecular biology. Edited by B. A. White. Totawa, NJ, USA, Humana Press Inc. **67:** 79-87.

Lamark, T., I. Kaasen, M. W. Eshoo, P. Falkenberg, J. Mcdougall und A. R. Strøm (1991). DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1049-1064.

Lamosa, P., L. O. Martins, M. S. Da Costa und H. Santos (1998). Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3591-8.

Lawrence, C. C., W. J. Sobey, R. A. Field, J. E. Baldwin und C. J. Schofield (1996). Purification and initial characterization of proline 4-hydroxylase from *Streptomyces griseoviridus* P8648: a 2-oxoacid, ferrous-dependent dioxygenase involved in etamycin biosynthesis. *Biochem J* **313**: 185-191.

Le Rudulier, D., A. R. Strøm, A. M. Dandekar, L. T. Smith und R. C. Valentine (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.

Lee, H. J., M. D. Lloyd, I. J. Clifton, K. Harlos, A. Dubus, J. E. Baldwin, J. M. Frere und C. J. Schofield (2001). Alteration of the co-substrate selectivity of deacetoxycephalosporin C synthase. The role of arginine 258. *J Biol Chem* **276**: 18290-5.

Lee, H. J., M. D. Lloyd, K. Harlos, I. J. Clifton, J. E. Baldwin und C. J. Schofield (2001). Kinetic and crystallographic studies on deacetoxycephalosporin C synthase (DAOCS). *J Mol Biol* **308**: 937-948.

Lee, S. J. und J. D. Gralla (2004). Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase. *Mol Cell* **14**: 153-162.

Leisinger, T. (1996). Biosynthesis of proline. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Edited by F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham *et al.*, ASM Press, Washington, D. C.**:** 434-441.

Levina, N., S. Totemeyer, N. R. Stokes, P. Louis, M. A. Jones und I. R. Booth (1999). Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *Embo J* **18**: 1730-1737.

Lippert, K. und E. A. Galinski (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 61-65.

Lloyd, M. D., H. J. Lee, K. Harlos, Z. H. Zhang, J. E. Baldwin, C. J. Schofield, J. M. Charnock, C. D. Garner, T. Hara, A. C. Terwisscha van Scheltinga, *et al.* (1999). Studies on the active site of deacetoxycephalosporin C synthase. *J Mol Biol* **287**: 943-960.

Loewen, P. C., B. Hu, J. Strutinsky und R. Sparling (1998). Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44**: 707-717.

Louis, P. und E. A. Galinski (1997). Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143 (Pt 4)**: 1141-1149.

Lucht, J. M. und E. Bremer (1994). Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system *proU*. *FEMS Microbiol Rev* **14**: 3-20.

Lucht, J. M., P. Dersch, B. Kempf und E. Bremer (1994). Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 6578-6586.

Ma, J., A. Campbell und S. Karlin (2002). Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J Bacteriol* **184**: 5733-5745.

Madigan, M. T., J. M. Martinko und J. Parker (2000). Biology of Microorganisms, Prentice Hall International Editions, Englewood Cliffs, N.J.

Madkour, M. A., L. T. Smith und G. M. Smith (1990). Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2876-2881.

Majumdar, D., Y. J. Avissar und J. H. Wyche (1991). Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: a new approach for isolating DNA. *Biotechniques* **11**: 94-101.

Malin, G., R. Iakobashvili und A. Lapidot (1999). Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. *J Biol Chem* **274**: 6920-6929.

Malin, G. und A. Lapidot (1996). Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol* **178**: 385-395.

Manzanera, M., A. Garcia de Castro, A. Tondervik, M. Rayner-Brandes, A. R. Strom und A. Tunnacliffe (2002). Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4328-4333.

Manzanera, M., S. Vilchez und A. Tunnacliffe (2004). High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol Lett* **233**: 347-352.

Manzanera, M., S. Vilchez und A. Tunnacliffe (2004). Plastic encapsulation of stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3143-3145.

Martin, R. G., W. K. Gillette, S. Rhee und J. L. Rosner (1999). Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol* **34**: 431-441.

Martinac, B. (2001). Mechanosensitive channels in procaryotes. *Cell Physiol Biochem* **11**: 61-76.

Martins, L., R. Huber, H. Huber, K. Stetter, M. Da Costa und H. Santos (1997). Organic solutes in hyperthermophilic *Archaea*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 896-902.

Martins, L. O., L. S. Carreto, M. S. Da Costa und H. Santos (1996). New compatible solutes related to Di-myo-inositol-phosphate in members of the order Thermotogales. *J Bacteriol* **178**: 5644-5651.

Maskow, T. und W. Babel (2001). Calorimetrically obtained information about the efficiency of ectoine synthesis from glucose in *Halomonas elongata*. *Biochim Biophys Acta* **1527**: 4-10.

May, G., P. Dersch, M. Haardt, A. Middendorf und E. Bremer (1990). The *osmZ* (*bglY*) gene encodes the DNA-binding protein H-NS (H1a), a component of the *Escherichia coli* K12 nucleoid. *Mol Gen Genet* **224**: 81-90.

Mazur, P. (1968). Survival of fungi after freezing and dessication. In The Fungi. Edited by G. C. Ainsworth & A. S. Sussman. New York, Academic Press**:** 325-394.

McLaggan, D., J. Naprstek, E. T. Buurman und W. Epstein (1994). Interdependence of K^+ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 1911-1917.

Measures, J. C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**: 398-400.

Mehta, P. K., T. I. Hale und P. Christen (1993). Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* **214**: 549-561.

Mendum, M. L. und L. T. Smith (2002). Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Appl Environ Microbiol* **68**: 813-819.

Metcalf, W. W. und R. S. Wolfe (1998). Molecular Genetic Analysis of Phosphite and Hypophosphite Oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J Bacteriol* **180**: 5547-5558.

Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manulal and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Miller, K. J. und J. M. Wood (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**: 101-136.

Moe, P. C., P. Blount und C. Kung (1998). Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol Microbiol* **28**: 583-592.

Mojica, F. J. M., G. Juez und F. Rodriguez-Valera (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst*I sites. *Mol Microbiol* **9**: 613-621.

Moran, C. P., Jr., N. Lang, S. F. J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero und R. Losick (1982). Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **186**: 339-346.

Morbach, S. und R. Krämer (2002). Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochemistry* **3**: 384–397.

Mori, H., T. Shibasaki, K. Yano und A. Ozaki (1997). Purification and cloning of a proline 3-hydroxylase, a novel enzyme which hydroxylates free L-proline to *cis*-3-hydroxy-L-proline. *J Bacteriol* **179**: 5677-5683.

Moses, S. (1999). Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolin-Verwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Müller, I., A. Kahnert, T. Pape, G. M. Sheldrick, W. Meyer-Klaucke, T. Dierks, M. Kertesz und I. Uson (2004). Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry* **43**: 3075-3088.

Müller, I., C. Stuckl, J. Wakeley, M. Kertesz und I. Uson (2005). Succinate complex crystal structures of the alpha -ketoglutarate-dependent dioxygenase AtsK: Steric aspects of ernzyme self-hydroxylation. *J Biol Chem* **280**: 5716-5723.

Myllyla, R., K. Majamaa, V. Gunzler, H. M. Hanauske-Abel und K. I. Kivirikko (1984). Ascorbate is consumed stoichiometrically in the uncoupled reactions catalyzed by prolyl 4-hydroxylase and lysyl hydroxylase. *J Biol Chem* **259**: 5403-5405.

Nakamura, T., R. Yuda, T. Unemoto und E. P. Bakker (1998). KtrAB, a new type of bacterial K^+-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **180**: 3491-3494.

Nakayama, H., K. Yoshida, H. Ono, Y. Murooka und A. Shinmyo (2000). Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol* **122**: 1239-1247.

Nau-Wagner, G. (1999). Physiologische und genetische Untersuchungen zur Biosynthese und Anhäufung osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Nau-Wagner, G., J. Boch, J. A. Le Good und E. Bremer (1999). High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in B*acillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 560-568.

Ni Bhriain, N., C. J. Dorman und C. F. Higgins (1989). An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol Microbiol* **3**: 933-942.

Nicholson, W. L., N. Mukenata, G. Hornenk, H. J. Melosh und P. Setlow (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Mol Biol Rev* **64**: 548–563.

Nunes, O. C., C. M. Manaia, M. S. Dacosta und H. Santos (1995). Compatible solutes in the thermophilic bacteria *Rhodothermus marinus* and *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2351-2357.

Nyyssola, A., J. Kerovuo, P. Kaukinen, N. Von Weymarn und T. Reinikainen (2000). Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J Biol Chem* **275**: 22196-22201.

Nyyssola, A. und M. Leisola (2001). *Actinopolyspora halophila* has two separate pathways for betaine synthesis. *Arch Microbiol* **176**: 294-300.

Nyyssola, A., T. Reinikainen und M. Leisola (2001). Characterization of glycine sarcosine N-methyltransferase and sarcosine dimethylglycine N-methyltransferase. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2044-2050.

O'Brien, J. R., D. J. Schuller, V. S. Yang, B. D. Dillard und W. N. Lanzilotta (2003). Substrate-Induced Conformational Changes in Escherichia coli Taurine/alpha-Ketoglutarate Dioxygenase and Insight into the Oligomeric Structure. *Biochemistry* **42**: 5547-54.

Onishi, M., Y. Okumura, R. Okamoto und T. Ishikura (1984). Proline hydroxylation by cell free extract of a streptomycete. *Biochem Biophys Res Commun* **120**: 45-51.

Ono, H., K. Sawada, N. Khunajakr, T. Tao, M. Yamamoto, M. Hiramoto, A. Shinmyo, M. Takano und Y. Murooka (1999). Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **181**: 91-99.

Onraedt, A., C. De Muynck, B. Walcarius, W. Soetaert und E. Vandamme (2004). Ectoine accumulation in *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnol Lett* **26**: 1481-1485.

Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 56-63.

Ozoline, O. N., A. A. Deev und M. V. Arkhipova (1997). Non-canonical sequence elements in the promoter structure. Cluster analysis of promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **25**: 4703-4709.

Pais, T. M., P. Lamosa, W. dos Santos, J. Legall, D. L. Turner und H. Santos (2005). Structural determinants of protein stabilization by solutes. The important of the hairpin loop in rubredoxins. *Febs J* **272**: 999-1011.

Pareek, A., S. L. Singla und A. Grover (1995). Immunological evidence for accumulation of two high-molecular-weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high temperature stress in diverse plant genera. *Plant Mol Biol* **29**: 293-301.

Paulsen, I. T., M. K. Sliwinski und M. H. Saier Jr. (1998). Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J Mol Biol* **277**: 573-593.

Peter, H., A. Bader, A. Burkovski, C. Lambert und R. Krämer (1997). Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes. *Arch Microbiol*: 143-151.

Peter, H., A. Burkovski und R. Krämer (1996). Isolation, characterization, and expression of the Corynebacterium glutamicum *betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J Bacteriol* **178**: 5229-5234.

Peter, H., B. Weil, A. Burkovski, R. Krämer und S. Morbach (1998). *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol* **180**: 6005-6012.

Peters, P., E. A. Galinski und H. G. Trüper (1990). The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 157-162.

Petersohn, A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Völker und M. Hecker (2001). Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 5617-5631.

Pflughoeft, K. J., K. Kierek und P. I. Watnick (2003). Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5919-5927.

Pierik, A. J., R. B. Wolbert, P. H. Mutsaers, W. R. Hagen und C. Veeger (1992). Purification and biochemical characterization of a putative [6Fe-6S] prismane-cluster-containing protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur J Biochem* **206**: 697-704.

Pollard, A. und R. G. Wyn Jones (1981). Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Planta* **144**: 291-298.

Poolman, B., P. Blount, J. H. Folgering, R. H. Friesen, P. C. Moe und T. van der Heide (2002). How do membrane proteins sense water stress? *Mol Microbiol* **44**: 889-902.

Poolman, B. und E. Glaasker (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* **29**: 397-407.

Prabhu, J., F. Schauwecker, N. Grammel, U. Keller und M. Bernhard (2004). Functional Expression of the Ectoine Hydroxylase Gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3130-3132.

Prescott, A. G. und M. D. Lloyd (2000). The iron(II) and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism. *Nat Prod Rep* **17**: 367-383.

Price, C. W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C. K. Murphy und P. Youngman (2001). Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **41**: 757-774.

Price, J. C., E. W. Barr, T. E. Glass, C. Krebs und J. M. Bollinger, Jr. (2003). Evidence for Hydrogen Abstraction from C1 of Taurine by the High-Spin Fe(IV) Intermediate Detected during Oxygen Activation by Taurine:α-Ketoglutarate Dioxygenase (TauD). *J Am Chem Soc* **125**: 13008-13009.

Price, J. C., E. W. Barr, B. Tirupati, J. M. Bollinger, Jr. und C. Krebs (2003). The First Direct Characterization of a High-Valent Iron Intermediate in the Reaction of an α-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase: A High-Spin Fe(IV) Complex in Taurine/α-Ketoglutarate Dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **42**: 7497-7508.

Puistola, U., T. M. Turpeenniemi-Hujanen, R. Myllyla und K. I. Kivirikko (1980). Studies on the lysyl hydroxylase reaction. II. Inhibition kinetics and the reaction mechanism. *Biochim Biophys Acta* **611**: 51-60.

Que, L., Jr. (2000). One motif--many different reactions. *Nat Struct Biol* **7**: 182-184.

Que, L., Jr. und R. Y. Ho (1996). Dioxygen Activation by Enzymes with Mononuclear Non-Heme Iron Active Sites. *Chem Rev* **96**: 2607-2624.

Racher, K. I., R. T. Voegele, D. E. Culham, J. M. Wood, H. Jung, M. Bacon, M. T. Cairns, S. M. Ferguson, W.-J. Liang, P. J. F. Henderson, *et al.* (1999). Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic upshifts. *Biochemistry* **38**: 1676-1684.

Record, M. T., Jr., E. S. Courtenay, D. S. Cayley und H. J. Guttman (1998). Responses of E. *coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem Sci* **23**: 143-148.

Reed, R. H., L. J. Borowitzka, M. A. Mackay, J. A. Chudek, R. Foster, S. C. R. Warr, D. J. Moore und W. D. P. Stewart (1986). Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 51-56.

Regev, R., I. Peri, H. Gilboa und Y. Avi-Dor (1990). ^{13}C NMR study of the interrelation between synthesis and uptake of compatible solutes in two moderately halophilic eubacteria. Bacterium Ba1 and *Vibro costicola*. *Arch Biochem Biophys* **278**: 106-112.

Reizer, J., A. Reizer und M. H. Saier (1994). A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim Biophys Acta* **1197**: 133-166.

Reshetnikov, A. S., V. N. Khmelenina und Y. A. Trotsenko (2004). Detection of ectoin biosynthesis genes in halotolerant aerobic methylotrophic bacteria. *Dokl Biochem Biophys* **396**: 200-202.

Rhodes, D. und A. D. Hanson (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 357-384.

Roach, P. L., I. J. Clifton, C. M. Hensgens, N. Shibata, C. J. Schofield, J. Hajdu und J. E. Baldwin (1997). Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature* **387**: 827-830.

Roberts, M. F. (2000). Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci* **5**: D796-812.

Robertson, D. E., M. F. Roberts, N. Belay, K. O. Stetter und D. R. Boone (1990). Occurrence of beta-glutamate, a novel osmolyte, in marine methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1504-1508.

Roeßler, M. und V. Müller (2001[a]). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental Microbiology* **3**: 743-754.

Roeßler, M. und V. Müller (2001[b]). Chloride dependence of glycine betaine transport in *Halobacillus halophilus*. *FEBS Lett* **489**: 125-128.

Roessler, M., K. Pfluger, H. Flach, T. Lienard, G. Gottschalk und V. Müller (2002). Identification of a salt-induced primary transporter for glycine betaine in the methanogen *Methanosarcina mazei* Gö1. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2133-2139.

Rübenhagen, R., S. Morbach und R. Krämer (2001). The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K^+. *Embo J* **20**: 5412-5420.

Rübenhagen, R., H. Rönsch, H. Jung, R. Krämer und S. Morbach (2000). Osmosensor and osmoregulator propterties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J Biol Chem* **275**: 735-741.

Ruzal, S. M., C. Lopez, E. Rivas und C. Sanchez-Rivas (1998). Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **36**: 75-79.

Ryle, M. J. und R. P. Hausinger (2002). Non-heme iron oxygenases. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 193-201.

Saier, M. H., Jr. (2000). Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology* **146**: 775-1795.

Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. E. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sambrook, J. und D. W. Russel (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

San Filippo, J., Jr., C. I. Chern und J. S. Valentine (1976). Oxidative cleavage of alpha-keto, alpha-hydroxy, and alpha-halo ketones, esters, and carboxylic acids by superoxide. *J Org Chem* **41**: 1076-1078.

Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.

Santos, H. und M. S. da Costa (2002). Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology* **4**: 501-509.

Sauer, T. und E. A. Galinski (1998). Bacterial Milking: A Novel Bioprocess for Production of Compatible Solutes. *Biotechnololgy and Bioengineering* **57**: 306-313.

Schiefner, A., J. Breed, L. Bösser, S. Kneip, J. Gade, G. Holtmann, K. Diederichs, W. Welte und E. Bremer (2004[a]). Cation-pi interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 5588-5596.

Schiefner, A., G. Holtmann, K. Diederichs, W. Welte und E. Bremer (2004[b]). Structural basis for the binding of compatible solutes by ProX from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem* **279**: 48270-48281.

Schnoor, M., P. Voss, P. Cullen, T. Boking, H. J. Galla, E. A. Galinski und S. Lorkowski (2004). Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 867-872.

Schofield, C. J. und Z. Zhang (1999). Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 722-731.

Scholz, S., J. Sonnenbichler, W. Schafer und R. Hensel (1992). Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett* **306**: 239-242.

Seliger, H. P. R. und D. Jones (1986). *Listeria*. *Bergey´s manual of systematic bacteriology* **2**: 1235-1245.

Severin, J., A. Wohlfahrt und E. A. Galinski (1992). The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 1629-1638.

Sheehan, B. J., T. J. Foster, C. J. Dorman, S. Park und G. S. Stewart (1992). Osmotic and growth-phase dependent regulation of the *eta* gene of *Staphylococcus aureus*: a role for DNA supercoiling. *Mol Gen Genet* **232**: 49-57.

Sheikh-Hammad, D., A. Garcia-Perez, J. D. Ferraris, E. M. Peters und M. B. Burg (1994). Induction of gene expression by heat shock versus osmotic stress. *Am J Physiol* **267**: F28-F34.

Shibasaki, T., H. Mori, S. Chiba und A. Ozaki (1999). Microbial proline 4-hydroxylase screening and gene cloning. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4028-4031.

Sibley, M. H. und J. H. Yopp (1987). Regulation of S-Adenosylhomocysteine hydrolase in the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*: a possible role in glycine betaine synthesis. *Arch Microbiol* **149**: 43-46.

Silva, Z., N. Borges, L. O. Martins, R. Wait, M. S. da Costa und H. Santos (1999). Combined effect of the growth temperature and salinity of the medium on the accumulation of compatible solutes by *Rhodothermus marinus* and *Rhodothermus obamensis*. *Extremophiles* **3**: 163-172.

Simione, F. P. und E. M. Brown (1991). ATCC preservation methods: freezing and freeze drying. Rockville, MD, American Type Culture Collection.

Sleator, R. D., C. G. Gahan, T. Abee und C. Hill (1999). Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2078-2083.

Sleator, R. D., C. G. M. Gahan und C. Hill (2001). Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: Effects on salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4560-4565.

Sleator, R. D. und C. Hill (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 49-71.

Smirnoff, N. und Q. J. Cumbes (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060.

Solomon, E. I., T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S. K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y. S. Yang und J. Zhou (2000). Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes. *Chem Rev* **100**: 235-350.

Solomon, E. I., A. Decker und N. Lehnert (2003). Bioinorganic Chemistry Special Feature: Non-heme iron enzymes: Contrasts to heme catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3589-3594.

Sonenschein, A. L. (2000). Endospore-Forming Bacteria. In Prokaryotic Development. Edited by Y. Brun & L. J. Shimkets, American Society for Microbiology.

Spaller, S. (1999). Transport und Nutzung von kompatiblen Soluten bei der Kälteanpassung in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Philipps Universität Marburg.

Spiegelhalter, F. (1999). Die transkriptionell kontrollierte Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis* am Beispiel der Prolin- und Glycin-Betain- Transportsysteme OpuE und OpuD. Dissertation, Philipps Universität Marburg.

Spiegelhalter, F. und E. Bremer (1998). Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Mol Microbiol* **29**: 285-296.

Suenobu, K., M. Nagooka, T. Yamabe und S. Nagata (1998). *Ab initio* orbital study on molecular and hydration structures of ectoine. *J Phys Chem* **102**: 7505-7511.

Sukharev, S. I., P. Blount, B. Martinac und C. Kung (1997). Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Annu Rev Physiol* **59**: 633-657.

Sutherland, L., J. Cairney, M. J. Elmore, I. R. Booth und C. F. Higgins (1986). Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J Bacteriol* **168**: 805-814.

Talibart, R., M. Jebbar, G. Gouesbet, S. Himdi-Kabbab, H. Wroblewski, C. Blanco und T. Bernard (1994). Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *J Bacteriol* **176**: 5210-5217.

Tatzelt, J., S. B. Prusiner und W. J. Welch (1996). Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *Embo J* **15**: 6363-6373.

Tesone, S., A. Hughes und A. Hurst (1981). Salt extends the upper temperature limit for growth of food-poisoning bacteria. *Can J Microbiol* **27**: 970-972.

Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

Timasheff, S. N. (1998). Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem* **51**: 355-432.

Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.

Trotsenko, Y. A. und V. N. Khmelenina (2002). Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch Microbiol* **177**: 123-131.

Tuderman, L., R. Myllyla und K. I. Kivirikko (1977). Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 1. Role of co-substrates. *Eur J Biochem* **80**: 341-348.

Valegard, K., A. C. Terwisscha van Scheltinga, A. Dubus, G. Ranghino, L. M. Oster, J. Hajdu und I. Andersson (2004). The structural basis of cephalosporin formation in a mononuclear ferrous enzyme. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 95-101.

Valegard, K., A. C. van Scheltinga, M. D. Lloyd, T. Hara, S. Ramaswamy, A. Perrakis, A. Thompson, H. J. Lee, J. E. Baldwin, C. J. Schofield*, et al.* (1998). Structure of a cephalosporin synthase. *Nature* **394**: 805-809.

van der Heide, T. und B. Poolman (2000). Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J Bacteriol* **182**: 203-206.

Velasco, R., R. Burgoa, E. Flores, E. Hernandez, A. Villa und S. Vaca (1995). Osmoregulation in *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic shock. *Rev Latinoam Microbiol* **37**: 209-216.

Ventosa, A., M. C. Marquez, M. J. Garabito und D. R. Arahal (1998[b]). Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles* **2**: 297-304.

Ventosa, A., J. J. Nieto und A. Oren (1998[a]). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504-544.

Vermeulen, V. und H. J. Kunte (2004). *Marinococcus halophilus* DSM 20408^T encodes two transporters for compatible solutes belonging to the betaine-carnitine-choline transporter family: identification and characterization of ectoine transporter EctM and glycine betaine transporter BetM. *Extremophiles* **8**: 175-84.

Vogel, H. J. und B. D. Davis (1952). Glutamic-γ-semialdehyde and Δ^1-pyrroline-5-carboxylic-acid, intermediates in the biosynthesis of proline. *J Am Chem Soc* **74**: 109-112.

Völker, U., B. Maul und M. Hecker (1999). Expression of the sigmaB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 3942-3948.

von Blohn, C., B. Kempf, R. M. Kappes und E. Bremer (1997). Osmostress response in B*acillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol* **25**: 175-187.

Voskuil, M. I. und G. H. Chambliss (1998). The -16 region of *Bacillus subtilis* and other grampositive bacterial promoters. *Nucl Acids Res* **26**: 3584-3590.

Voskuil, M. I., K. Voepel und G. H. Chambliss (1995). The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **17**: 271-279.

Vreeland, R. H., W. D. Rosenzweig und D. W. Powers (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**: 897-900.

Wainø, M., B. J. Tindall, P. Schumann und K. Ingvorsen (1999). *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 821-831.

Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 263-290.

Welsh, D. T., R. H. Reed und R. A. Herbert (1991). The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCBI 9484: Interaction of trehalose potassium and glutamate during osmoadaptation in continuous culture. *J Gen Microbiol* **137**: 745-750.

Whatmore, A. M., J. A. Chudek und R. H. Reed (1990). The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **136**: 2527-2535.

Whatmore, A. M. und R. H. Reed (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K^+ in turgor regulation. *J Gen Microbiol* **136**: 2521-2526.

White, A. K. und W. W. Metcalf (2002). Isolation and Biochemical Characterization of Hypophosphite/2-Oxoglutarate Dioxygenase. *J Biol Chem* **277**: 38262-38271.

White, B. A. (1993). PCR-protocols. In Methods in Microbiology. Edited by J. M. Walker. Totawa, NJ, USA, Humana Press Inc.

Wilmouth, R. C., J. J. Turnbull, R. W. Welford, I. J. Clifton, A. G. Prescott und C. J. Schofield (2002). Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from Arabidopsis thaliana. *Structure (Camb)* **10**: 93-103.

Winzor, C. L., D. J. Winzor, L. G. Paleg, G. P. Jones und B. P. Naidu (1992). Rationalization of the effects of compatible solutes on protein stability in terms of thermodynamic nonideality. *Arch Biochem Biophys* **296**: 102-107.

Wood, J. M. (1987). Membrane association of proline dehydrogenase in *Escherichia coli* is redox dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 373-377.

Wood, J. M. (1988). Proline porters effect the utilization for proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria. *J Membrane Biol* **106**: 183-202.

Wood, J. M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 230-262.

Wood, J. M., E. Bremer, L. N. Csonka, R. Kraemer, B. Poolman, T. van der Heide und L. T. Smith (2001). Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**: 437-460.

Wu, M., H. S. Moon, T. P. Begley, J. Myllyharju und K. I. Kivirikko (1999). Mechanism-based inactivation of the human prolyl-4-hydroxylase by 5-oxaproline-containing peptides: evidence for a prolyl radical intermediate. *J Am Chem Soc* **121**: 587–588.

Yan, D., T. P. Ikeda, A. E. Shauger und S. Kustu (1996). Glutamate is required to maintain the steady-state potassium pool in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6527-6531.

Yoon, J. H., K. C. Lee, N. Weiss, Y. H. Kho, K. H. Kang und Y. H. Park (2001). *Sporosarcina aquimarina* sp nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. *Intern J Syst Evol Microbiol* **51**: 1079-1086.

Zhang, Z., J. Ren, K. Harlos, C. H. McKinnon, I. J. Clifton und C. J. Schofield (2002). Crystal structure of a clavaminate synthase-Fe(II)-2-oxoglutarate-substrate-NO complex: evidence for metal centered rearrangements. *FEBS Lett* **517**: 7-12.

Zhang, Z., J. Ren, D. K. Stammers, J. E. Baldwin, K. Harlos und C. J. Schofield (2000). Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase. *Nat Struct Biol* **7**: 127-133.

Zhilina, T. N. und G. A. Zavarzin (1990). Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 315-322.

IX Anhang

1 Vergleich der Aminosäuresequenz der Ectoin-Biosynthese-Enzyme EctABC

1.1 EctA

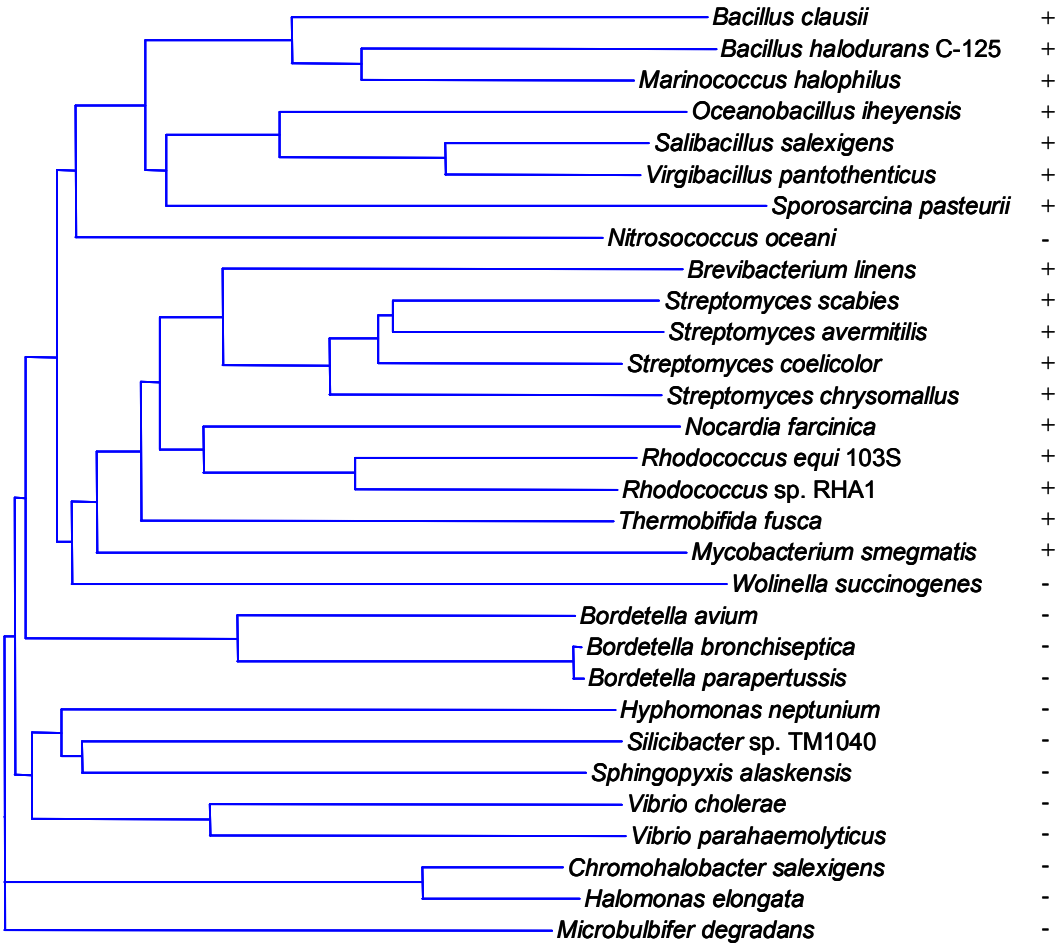


Abbildung 45. Stammbaum auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der potentiellen L-2,4-Diaminobutyrat-N_γ-Acetyltransferasen (EctA).

Dargestellt ist ein Stammbaum, welcher basierend auf den Identitäten der Aminosäuresequenzen der potentiellen EctA-Proteine nach dem Vergleich in Abb. 44 berechnet wurde. Das Gram-Färbeverhalten (+/-) der Organismen ist als taxonomischer Marker angegeben.

1.2 EctB

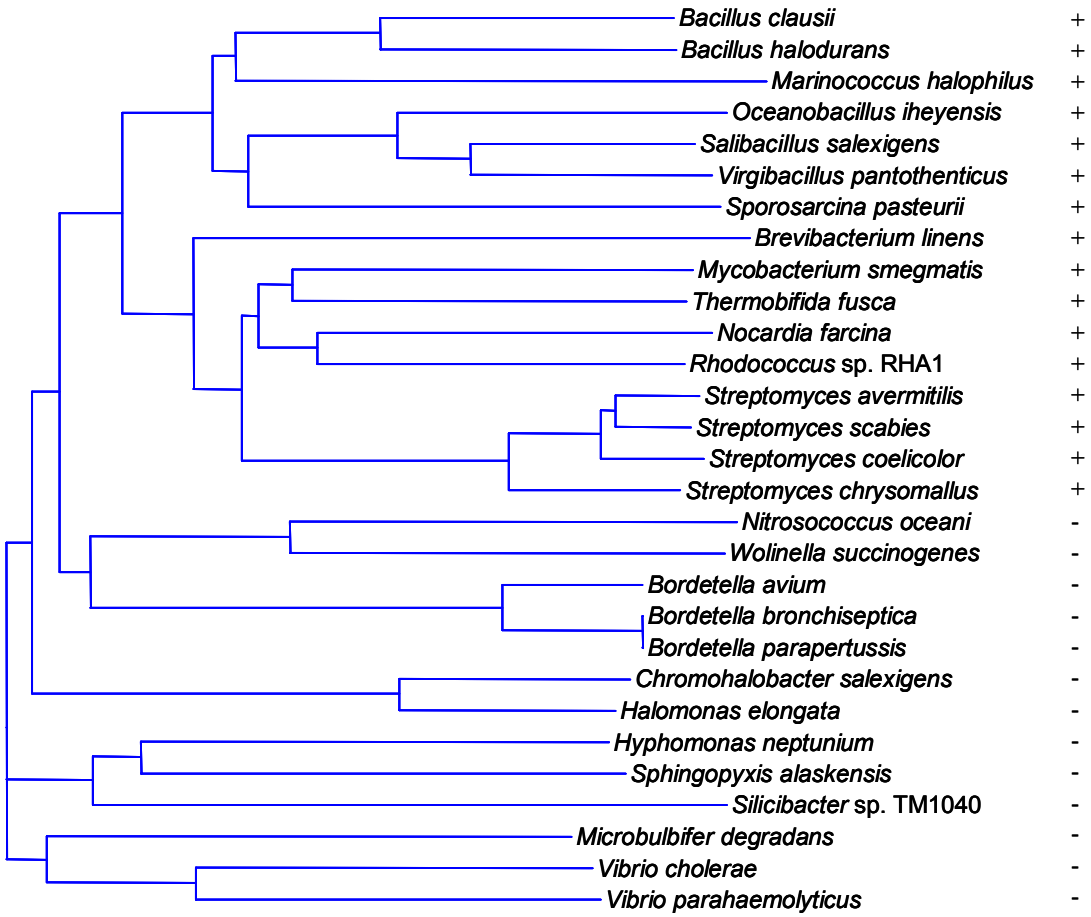


Abbildung 47. Stammbaum auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der potentiellen L-2,4-Diaminobutyrat Transaminasen (EctB).

Dargestellt ist ein Stammbaum, welcher basierend auf den Identitäten der Aminosäuresequenzen der potentiellen EctB-Proteine nach dem Vergleich in Abb. 46 berechnet wurde. Das Gram-Färbeverhalten (+/-) der Organismen ist als taxonomischer Marker angegeben.

1.3 EctC

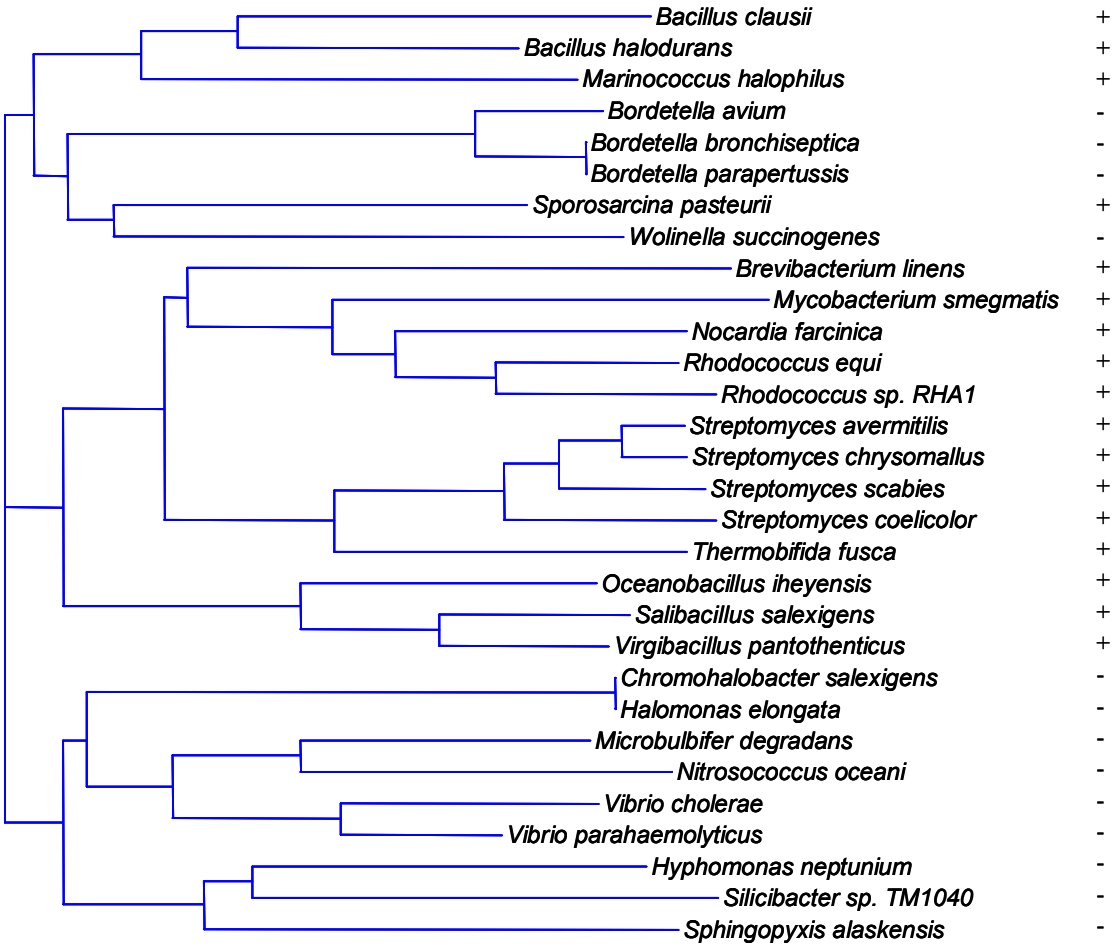


Abbildung 49. Stammbaum auf Grundlage der Aminosäuresequenzen der potentiellen L-Ectoin-Synthasen (EctC).

Dargestellt ist ein Stammbaum, welcher basierend auf den Identitäten der Aminosäuresequenzen der potentiellen EctC-Proteine nach dem Vergleich in Abb. 48 berechnet wurde. Das Gram-Färbeverhalten (+/-) der Organismen ist als taxonomischer Marker angegeben.

2 Konservierte aromatische Aminosäurereste in potentiellen Ectoin-Hydroxylasen

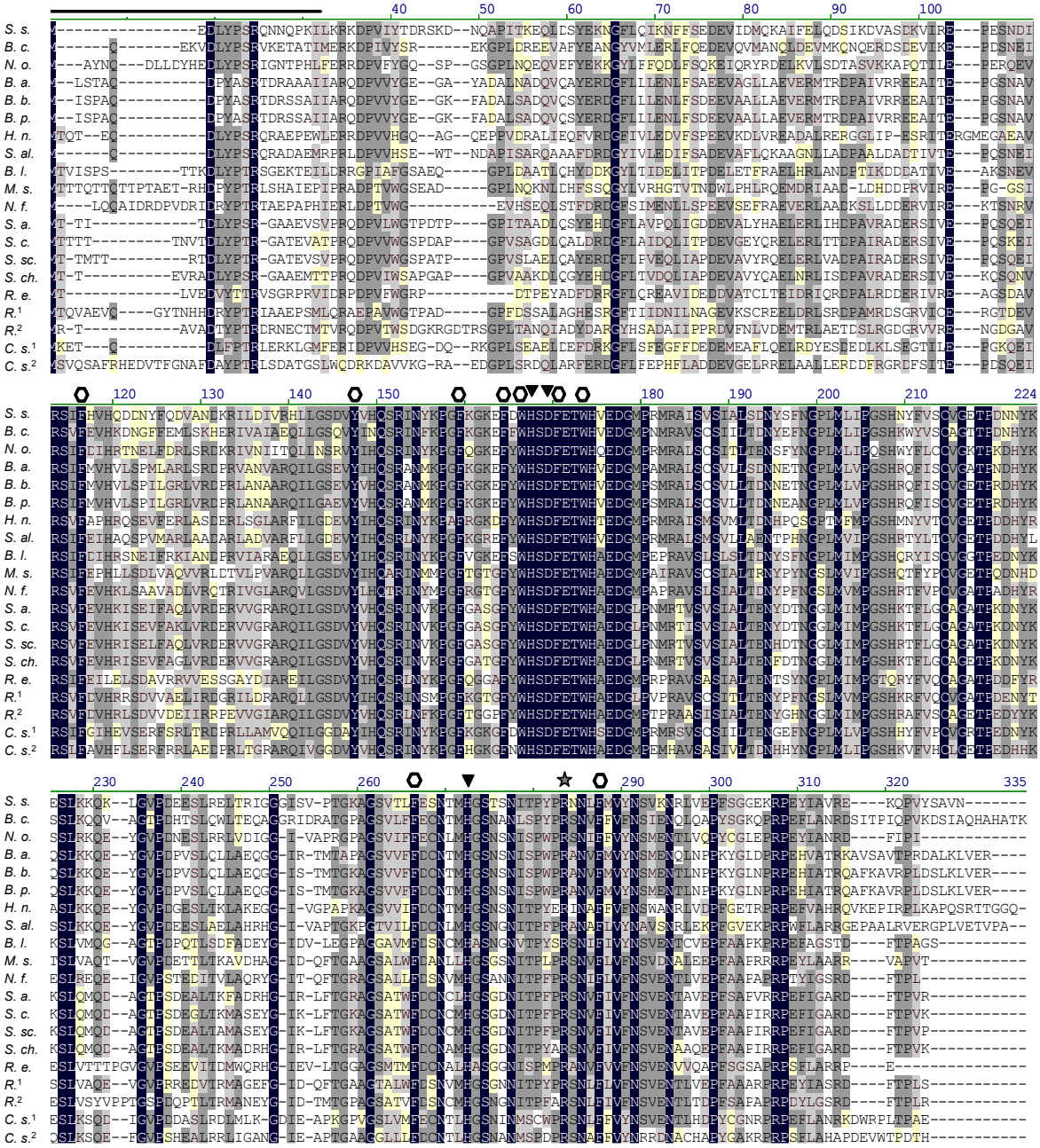


Abbildung 50. Vergleich der Aminosäuresequenz potentieller Ectoin-Hydroxylasen.
Dargestellt ist ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EctD aus *S. salexigens* (*S.s.*) mit den potentiellen Ectoin-Hydroxylasen aus *Bacillus clausii* KSM-K16 (NC006582) (*B.c.*), *Bordetella bronchiseptica* RB50 (NC002927) (*B.b.*), *Bordetella parapertussis* 12822 (NC002928) (*B.p.*), *Bordetella avium* (Sanger Institute; www.sanger.ac.uk) (*B.a.*), *Hyphomonas neptunium* ATCC 15444 (NC004738) (*H.n.*), *Brevibacterium linens* BL2 (genome.jgi-psf.org) (*B.l.*), *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (NC002974) (*M.s.*), *Nocardia farcinica* IFM 10152 (NC006361) (*N.f.*), *Chromohalobacter salexigens* (AJ011103) (*C.s.*), *Rhodococcus* sp. RHA1 (www.rhodococcus.ca) (*R.*), *Rhodococcus equi* (Sanger Institute) (*R.e.*), *Nitrosococcus oceani* (JGI) (*N.o.*), *Sphingopyxis alaskensis* RB 2256 T (PEDANT) (*S.al.*), *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (NC003155) (*S.a.*), *Streptomyces scabies* 87-22 (PEDANT) (*S.sc.*), *Streptomyces coelicolor* A3(2) (NC003888) (*S.c.*) und *Streptomyces chrysomallus* (AY524544) (*S.ch.*) verglichen. In allen Organismen konservierte Aminosäuren sind schwarz, in der Mehrheit der Organismen vorkommende Aminosäuren grau unterlegt. Das für die Familie der Nicht-Häm-Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen typische, konservierte Motiv „H X (D/E) X_{50-207} H X_{10} R“ für die Koordination des mononukleären Eisen-Zentrums (▼) und Bindung des Co-Substrates 2-Oxoglutarat (★) sind gekennzeichnet. Mit (⬣) sind in allen Proteinen konservierte aromatische Aminosäurereste markiert.

3 Überblick über die Familie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.

1. Oxidoreductases
   1.14. Acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen
   1.14.1. (not labelled)
   1.14.2. With ascorbate as one donor
   1.14.3. With reduced pteridine as one donor
   1.14.11. **With 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors**
      - **1.14.11.1 gamma-butyrobetaine dioxygenase**
      - **1.14.11.2 procollagen-proline dioxygenase**
      - **1.14.11.3 pyrimidine-deoxynucleoside 2'-dioxygenase**
      - **1.14.11.3 pyrimidine-deoxynucleoside 2'-dioxygenase**
      - **1.14.11.4 procollagen-lysine 5-dioxygenase**
      - **~~1.14.11.5~~ 5-hydroxymethyluracil,2-oxoglutarate dioxygenase**
      - **1.14.11.6 thymine dioxygenase**
      - **1.14.11.7 procollagen-proline 3-dioxygenase**
      - **1.14.11.8 trimethyllysine dioxygenase**
      - **1.14.11.9 naringenin 3-dioxygenase**
      - **1.14.11.10 pyrimidine-deoxynucleoside 1'-dioxygenase**
      - **1.14.11.10 pyrimidine-deoxynucleoside 1'-dioxygenase**
      - **1.14.11.11 hyoscyamine (6*S*)-dioxygenase**
      - **1.14.11.12 gibberellin-44 dioxygenase**
      - **1.14.11.13 gibberellin 2beta-dioxygenase**
      - **1.14.11.14 6beta-hydroxyhyoscyamine epoxidase**
      - **1.14.11.15 gibberellin 3beta-dioxygenase**
      - **1.14.11.16 peptide-aspartate beta-dioxygenase**
      - **1.14.11.17 taurine dioxygenase**
      - **1.14.11.18 phytanoyl-CoA dioxygenase**
      - **1.14.11.19 leucocyanidin oxygenase**
      - **1.14.11.20 desacetoxyvindoline 4-hydroxylase**
      - **1.14.11.21 clavaminate synthase**

Abbildung 51. Auszug aus der BRENDA-Datenbank.

Dargestellt ist ein Auszug aus der BRENDA-Datenbank (www.brenda.uni-koeln.de), mit dem Focus auf die Familie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Erhard Bremer für die Überlassung des interessanten Themas, das beständige Interesse an meiner Arbeit und die Bereitschaft, sich auf wissenschaftliche Diskussion und neue Ideen einzulassen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel für die ständige Bereitschaft zur Diskussion, seinen unermüdlichen Einsatz für das Graduiertenkolleg "Proteinfunktion auf atomarer Ebene" und die Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Antonio Pierik für die Unterstützung und die hilfreichen Tipps bei der Reinigung und Charakterisierung von EctD und seine Jagd nach neuen *ectD*-Sequenzen in den Weiten des „world wide web“.

Dr. Tamara Hoffmann möchte ich für die Unterstützung im Laboralltag und die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit danken.

Danken möchte ich Monika Dolezal, die immer für konstruktive Diskussionen und hilfreiche Gespräche zur Verfügung stand, sowie den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Bremer für die angenehme Zusammenarbeit, die zahlreichen Ratschläge und technischen Hilfestellungen.

Dr. Thorsten Selmer danke ich für die Unterstützung bei den MALDI-TOF MS Analysen. Dr. Daniel Darley für die Unterstützung bei den NMR-Analysen. Dr. Astrid Brandis-Heep möchte ich für die ständige Gesprächsbereitschaft und ihr unermüdliches Engagement am Institut für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg danken.

Den Mitgliedern der AG Buckel, insbesondere Dr. Marc Hetzel und Dr. Jihoe Kim, möchte ich sowohl für die theoretische und praktische Unterstützung meiner Arbeit, als auch die netten Gespräche danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Frau Jeannine und meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit motiviert und liebevoll unterstützt haben.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Osmotisch regulierte Biosynthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*: Biochemische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD und Identifizierung ihres Strukturgenes

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die vorliegende Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum) (Jan Bursy)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname	Bursy, Jan Uwe
Geburtsdatum/-ort	06.06.1976 in Löbau
Familienstand	verheiratet (2001), zwei Kinder (2004; 2005)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung:

1983 - 1991	Polytechnische Oberschule Seifhennersdorf
1991 - 1995	Gymnasium Seifhennersdorf, Abschluss: Abitur

Zivildienst: 03.07.1995 – 30.09.1996

Studium:

WS 1996 - SS 2001	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
Vordiplom	17.10.1998
Diplom	03.09.2001 Schwerpunkte: Mikrobiologie, Zellbiologie, Genetik, Virologie und Immunologie Titel der Diplomarbeit: Osmotisch kontrollierte Synthese von Ectoin und Hydroxy-Ectoin in *Salibacillus salexigens*
seit Okt. 2001	Promotion an der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. E. Bremer Titel der Dissertation: Osmotisch regulierte Biosynthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*: Biochemische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD und Identifizierung ihres Strukturgenes
01.01.2002 – 31.12.2005	Mitglied des Graduiertenkollegs „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“ an der Philipps-Universität Marburg
Praktika:	„Reinigung und Charakterisierung von Enzymen“ bei Dr. J. Vorholt, MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg; Molekulargenetisches Praktikum bei Prof. Dr. E. Bremer, Philipps-Universität Marburg;

Marburg, Juli 2005