

**Fachbereich Biologie
-Mikrobiologie-
Philipps-Universität Marburg**



Synthese und physiologische Funktion der chemischen Chaperone
Ectoin und Hydroxyectoin

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

vorgelegt von
Marco Pittelkow

aus Siegen

Marburg, Mai 2011

**Fachbereich Biologie
-Mikrobiologie-
Philipps-Universität Marburg**

Synthese und physiologische Funktion der chemischen Chaperone
Ectoin und Hydroxyectoin

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

vorgelegt von
Marco Pittelkow

aus Siegen

Marburg, Mai 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2007 bis Dezember 2010 im Laboratorium für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität in Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 31.05.2011

Gutachter dieser Arbeit waren:

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Thanbichler

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Prof. Dr. Uwe Maier

Prof. Dr. Johann Heider

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2011

In Zusammenarbeit mit der vorliegenden Dissertation wurden folgende Publikationen veröffentlicht und Manuskripte vorbereitet:

Bursy, J., Kuhlmann, A. U., **Pittelkow, M.**, Hartmann, H., Jebbar, M., Pierik, A. J. & Bremer, E. (2008). Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl Environ Microbiol* 74, 7286-7296.

Lecher, J.*, **Pittelkow, M.***, Zobel, S., Bursy, J., Bonig, T., Smits, S.H., Schmitt, L. & Bremer, E. (2009). The crystal structure of UehA in complex with ectoine-A comparison with other TRAP-T binding proteins. *J Mol Biol* 389, 58-73.

Reuter, K., **Pittelkow, M.**, Bursy, J., Heine, A., Craan, T. & Bremer, E. (2010). Crystal structure of the non-heme iron (II)-dependent dioxygenase EctD mediating synthesis of the compatible solute 5-hydroxyectoine from Ectoine. *PLoS ONE*, 5 (5):e10647.

Pittelkow, M. & Bremer, E. (2011). Cellular adjustments of *Bacillus subtilis* and other Bacilli to fluctuating salinities. In: Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends. (Eds. A. Ventosa, A. Ohren and Y. Ma).

Stöveken, N.*, **Pittelkow, M.***, Sinner, T., Heider, J., Jensen, R. A. & Bremer, E. (2011). A specialized aspartokinase supports the biosynthesis of the osmoprotectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *J Bacteriol* (under revision).

Pittelkow, M.*, Tschapek, B.*, Smits, S.H.J., Schmitt, L. & Bremer, E. (2011). The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC in complex with choline. *J Mol Biol* (accepted).

Tschapek, B.*, **Pittelkow, M.***, Sohn-Bösser, L., Holtmann, G., Smits, S.H.J., Gohlke, H., Bremer, E. & Schmitt, L. (2011). A single amino acid defines the high affinity state of the substrate binding protein AfProX. *J Mol Biol* (accepted).

Pittelkow, M., Buckel, W. & Bremer, E. (2011). Structure-guided mutagenesis of the 2-oxoglutarate and non-heme iron (II)-dependent ectoine hydroxylase from the moderate halophile *Virgibacillus salexigens*. (In Vorbereitung).

*gleichwertige Autorenschaft

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Zusammenfassung	2
3	Einleitung	3
3.1	Anpassung von Mikroorganismen an osmotischen Stress	3
3.2	Kompatible Solute	6
3.3	Die Eigenschaften der chemischen Chaperone Ectoin und Hydroxyectoin	7
3.4	Ectoin und Hydroxyectoin Aufnahmesysteme	10
3.5	Die Synthese der Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin.....	13
3.6	Das Ectoin Synthese-Gencluster	14
3.7	Die Hydroxylase EctD aus dem moderat halophilen Bakterium <i>V. salexigens</i>	15
3.8	Die Ectoin-Hydroxylase EctD katalysiert die Synthese von Ectoin zu Hydroxyectoin	17
3.9	Proteine aus der EctD Enzymfamilie mit strukturellen Ähnlichkeiten	18
3.10	Besonderheiten im Zusammenhang mit der Ectoin Synthese	20
3.11	Zielsetzung.....	23
4	Material und Methoden.....	24
4.1	Material	24
4.1.1	Chemikalien	24
4.1.2	Enzyme	24
4.1.3	Nukleotide und Synthese von Genen	24
4.1.4	Medien	25
4.1.5	Referenz-Substanzen für die HPLC-Analyse	26
4.1.6	Puffer.....	27
4.2	Mikrobiologische Methoden.....	30
4.2.1	Bakterienstämme, Vektoren und Plasmide.....	30
4.2.2	Kultivierung der Bakterien.....	35
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	36
4.3.1	Oligonukleotide	36
4.3.2	Präparation, Extraktion und Konzentrationsbestimmung von DNA aus <i>E. coli</i>	41
4.3.3	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	41
4.3.4	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten	42
4.3.5	Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	42
4.3.6	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	42

4.3.7	Transformation von elektro-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	43
4.3.8	Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	43
4.3.9	Sequenzierung von DNA	43
4.3.10	Konstruktion von Expressionsplasmiden und Klonierung in das Stargate [®] System von IBA	43
4.3.11	Synthese von DNA Sequenzen durch die Firma Genscript.....	45
4.3.12	Ortsgerichtete Mutagenese in <i>ectD</i>	46
4.4	Biochemische Methoden	47
4.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
4.4.2	Heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	48
4.4.3	Reinigung der Ectoin-Hydroxylasen sowie der EctD Mutanten von <i>V. salexigens</i> aus <i>E. coli</i> DH5 α	48
4.4.4	Produktion und Reinigung der Aspartokinasen aus <i>P. stutzeri</i> A1501	49
4.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	50
4.4.6	Ankonzentration von Proteinen.....	50
4.4.7	Aktivitätstest für die Ectoin-Hydroxylase.....	50
4.4.8	Aktivitätstest für die Aspartokinasen	51
4.4.9	Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen	52
4.4.10	Aufnahmeassays mit radioaktiv markiertem Ectoin	52
4.5	Bioinformatische Methoden	53
4.5.1	BLAST Analysen und Sequenzalignments	53
4.5.2	Analyse von Kristallstrukturen verschiedener Proteine	53
4.5.3	Erstellung einer Datenbank für die <i>ect</i> -Cluster und Programmierung verschiedener Scripte	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase EctD aus dem moderat halophilen Bakterium <i>V. salexigens</i>	55
5.1.1	Die Topologiedarstellung von EctD aus <i>V. salexigens</i> und strukturell ähnlichen Proteinen.....	58
5.1.2	Eisenbindemotiv in EctD aus <i>V. salexigens</i>	60
5.1.3	2-Oxoglutaratbindestelle der Ectoin-Hydroxylase EctD aus <i>V. salexigens</i>	61
5.1.4	Ein flexibler Deckel oberhalb des aktiven Zentrums in EctD aus <i>V. salexigens</i>	63
5.1.5	Konsensusmotiv in EctD aus <i>V. salexigens</i>	64
5.1.6	Ligandenbindestelle für Ectoin im aktiven Zentrum von EctD	65
5.2	EctD aus <i>V. salexigens</i> als “Prototyp“ einer großen Familie von Ectoin-Hydroxylasen	66
5.3	Synthese und Klonierung weiterer Hydroxylasen aus extremophilen Mikroorganismen	74
5.4	Heterologe Produktion und Reinigung weiterer EctD-Proteine	76

5.5	Aktivitätssay der gereinigten Hydroxylasen.....	77
5.5.1	Temperaturoptimum der gereinigten Ectoin-Hydroxylasen	77
5.5.2	pH-Optimum der gereinigten Ectoin-Hydroxylasen	79
5.5.3	Einfluss unterschiedlicher Salze auf die Enzymaktivität der Hydroxylasen.....	80
5.5.4	Einfluss von Katalase auf die Stabilität der Ectoin-Hydroxylasen	83
5.5.5	Einfluss von Chelatoren auf die Enzymaktivität von EctD	84
5.6	Biochemische Parameter der Ectoin-Hydroxylasen	86
5.6.1	Enzymkinetik der gereinigten Ectoin-Hydroxylasen	86
5.6.2	K_m Wert für das Co-Substrat 2-Oxoglutarat der gereinigten Ectoin-Hydroxylasen	88
5.7	Mutagenese von EctD aus <i>V. salexigens</i>	90
5.7.1	Aktivitätssay für die EctD-Substitutionsmutanten	92
5.8	Bestimmung des Eisengehaltes des Wildtyp EctD im Vergleich zu seinen Mutanten	97
5.9	Bioinformatische Analyse des Ectoin Synthese-Clusters	98
5.10	Bioinformatische Analysen zu Aspartokinasen in einem ect-Cluster... 102	
5.11	Klonierung der Aspartokinasen aus <i>P. stutzeri</i> A1501	103
5.12	Produktion und Reinigung der Aspartokinasen aus <i>P. stutzeri</i> A1501. 103	
5.12.1	Bestimmung der Enzymaktivität der Aspartokinasen aus <i>P. stutzeri</i> A1501	104
5.12.2	Bestimmung der biochemischen Parameter K_m und v_{max} der Aspartokinasen aus <i>P. stutzeri</i> A1501	104
5.13	Ectoin und Hydroxyectoin als Hitze protektivum in <i>S. coelicolor</i> A3(2) 106	
5.13.1	Wachstumsversuche mit <i>S. coelicolor</i> A3(2)	106
5.13.2	Aufnahme von Ectoin und Hydroxyectoin in <i>S. coelicolor</i>	108
6	Diskussion.....	109
6.1	Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase EctD aus <i>V. salexigens</i>	109
6.2	Das Eisenbindezentrum in EctD aus <i>V. salexigens</i>	111
6.3	Bindung des Co-Substrats 2-Oxoglutarat in EctD aus <i>V. salexigens</i> ... 114	
6.4	Das Konsensusmotiv der Ectoin-Hydroxylasen	116
6.5	Ein flexibler Deckelbereich in EctD	118
6.6	Vergleich der Struktur von EctD mit Ectoin/Hydroxyectoin-Transportproteinen	119
6.7	Mögliche Bindestelle von Ectoin in der Ectoin-Hydroxylase EctD.....	122
6.8	Ectoin-Hydroxylasen aus anderen Mikroorganismen	125
6.9	Das <i>ectD</i> Gen ist in "Bewegung"	127
6.10	Der Flaschenhals bei der Ectoin und Hydroxyectoin Synthese	130
6.11	Hydroxyectoin als Hitze protektivum	132
6.12	Ausblick	135
7	Literatur	137

8	Anhang	144
9	Lebenslauf.....	154
10	Erklärung	155

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Salt-in“ Methode bei hyperosmotischen Bedingungen	3
Abbildung 2: Oberflächenladungen von Proteinen in nicht- und halophilen Bakterien	4
Abbildung 3: Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten	5
Abbildung 4: Übersicht wichtiger kompatibler Solute	7
Abbildung 5: Ectoin und Hydroxyectoin	9
Abbildung 6: Das Ectoin Bindeprotein EhuB	11
Abbildung 7: Die Ectoin Bindeproteine UehA und TeaA	12
Abbildung 8: Schlüsselenzyme aus dem Ectoin/Hydroxyectoin Synthese Cluster	13
Abbildung 9: Organisation des Ectoin-Genclusters	14
Abbildung 10: Verwandtschaftsbeziehungen von <i>Virgibacillus salexigens</i> mittels 16 sRNA Sequenzen	16
Abbildung 11: Hydroxylierungsreaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin	18
Abbildung 12: Reaktionsweg der Aspartokinasen	21
Abbildung 13: Expressionsplasmid pASK-IBA3 der Firma IBA (Göttingen)	44
Abbildung 14: Expressionsplasmid pASG-IBA3 der Firma IBA (Göttingen)	45
Abbildung 15: SDS-Gel nach der Reinigung von EctD aus <i>V. salexigens</i>	55
Abbildung 16: Kristalle der Ectoin- Hydroxylase EctD aus <i>V. salexigens</i>	56
Abbildung 17: Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase EctD von <i>V. salexigens</i>	56
Abbildung 18: Topologiedarstellung von EctD aus <i>V. salexigens</i> und strukturell ähnlicher Proteine	59
Abbildung 19: Eisenbindemotiv von EctD aus <i>V. salexigens</i>	61
Abbildung 20: 2-Oxoglutaratbindestelle von EctD aus <i>V. salexigens</i> im Vergleich zu strukturell verwandten Proteinen	62
Abbildung 21: Konsensusmotiv von EctD	64
Abbildung 22: Oberflächenladung von EctD aus <i>V. salexigens</i>	65
Abbildung 23: Alignment aller gefundenen EctD Sequenzen nach einer BLAST Suche	67
Abbildung 24: Alignment aller verfügbaren EctD Sequenzen (Teil1)	68
Abbildung 25: Alignment aller verfügbaren EctD Sequenzen (Teil2)	69
Abbildung 26: Alle EctD Sequenzen nach dem Alignment in Baumdarstellung	70
Abbildung 27: Auswahl der Mikroorganismen mit einer Ectoin-Hydroxylase aus extremen Habitaten	74
Abbildung 28: Reinigung aller produzierten Ectoin-Hydroxylasen aus den verschiedenen Organismen	76
Abbildung 29: Temperaturoptimum der Ectoin-Hydroxylase aus <i>H. elongata</i>	78
Abbildung 30: pH-Optimum der Ectoin-Hydroxylase aus <i>H. elongata</i>	79
Abbildung 31: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus <i>H. elongata</i> unter verschiedenen KCl-Konzentrationen	80
Abbildung 32: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus <i>H. elongata</i> unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen	81

Abbildung 33: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus <i>H. elongata</i> unter verschiedenen K-Glutamat-Konzentrationen.....	82
Abbildung 34: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus <i>H. elongata</i> unter verschiedenen Ammoniumchlorid-Konzentrationen.....	82
Abbildung 35: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus <i>H. elongata</i> bei verschiedenen Katalase Konzentrationen.....	83
Abbildung 36: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus <i>H. elongata</i> bei verschiedenen EDTA Konzentrationen	84
Abbildung 37: Bestimmung von K_m und v_{max} für Ectoin von EctD <i>H. elongata</i>	87
Abbildung 38: Bestimmung von K_m für das Co-Substrat 2-Oxoglutarat von EctD aus <i>H. elongata</i>	88
Abbildung 39: Mögliche Aminosäuren für die Ectoin Bindung in EctD	92
Abbildung 40: Übersicht aller Mutanten von EctD aus <i>V. salexigens</i>	93
Abbildung 41: Aminosäuresubstitutionen in EctD aus <i>V. salexigens</i>	95
Abbildung 43: Übersicht der <i>ect</i> -Gencluster (Teil1).....	100
Abbildung 44: Übersicht der <i>ect</i> -Gencluster (Teil2).....	101
Abbildung 45: Übersicht der <i>ect</i> Gencluster (Teil3).....	102
Abbildung 46: Reinigung der Aspartokinase aus <i>P. stutzeri</i> A1501	103
Abbildung 47: K_m und v_{max} der Aspartokinase aus <i>P. stutzeri</i> A1501 für das Substrat L-Aspartat	104
Abbildung 48: K_m und v_{max} der Aspartokinase aus <i>P. stutzeri</i> A1501 für das Substrat ATP .	105
Abbildung 49: Wachstumsversuche mit <i>S. coelicolor</i>	107
Abbildung 50: Aufnahmeassays mit radioaktiv markiertem Ectoin in <i>S. coelicolor</i>	108
Abbildung 51: Schema der Hydroxylierungsreaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin im Detail ..	110
Abbildung 52: Struktureller Vergleich von Ectoin Bindeproteinen mit der errechneten Ectoin Bindestelle in EctD	121
Abbildung 53: Mögliche Position des Ectoins in EctD.....	123
Abbildung 54: Modifiziertes Schema der Ectoin und Hydroxyectoin Synthese	128
Abbildung 55: Chromatogramme der EctD Aktivitätsmessungen.....	144
Abbildung 56: Chromatogramme der EctD Aktivitätsmessungen.....	145
Abbildung 57: Chromatogramme der EctD Aktivitätsmessungen.....	146
Abbildung 58: Expressionsplasmid pMP32.....	147
Abbildung 59: Expressionsplasmid pMP40.....	148
Abbildung 60: Expressionsplasmid pMP41.....	149
Abbildung 61: Expressionsplasmid pMP43.....	150
Abbildung 62: Expressionsplasmid pMP44.....	151
Abbildung 63: Expressionsplasmid pMP45.....	152
Abbildung 64: Expressionsplasmid pMP48.....	153

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nährmedien für <i>E. coli</i>	25
Tabelle 2: Zusätze.....	25
Tabelle 3: Expressionsmedium für die heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	26
Tabelle 4: Referenz-Substanzen für die HPLC-Analyse.....	26
Tabelle 5: Puffer für Agarose-Gelelektrophorese	27
Tabelle 6: Puffer für Proteinaufreinigung	28
Tabelle 7: Puffer für SDS-PAGE	28
Tabelle 8: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	30
Tabelle 9: Vektoren und Plasmide	31
Tabelle 10: Plasmide aller <i>V. salicis</i> EctD Mutanten	33
Tabelle 11: Synthetische Oligonukleotide.....	36
Tabelle 12: PCR-Programm zur gerichteten Mutagenese	46
Tabelle 13: SDS-PAGE nach Laemmli	47
Tabelle 14: Lösungen für Eisenbestimmung.....	52
Tabelle 15: Parameter der ausgewählten EctD Sequenzen	75
Tabelle 16: Übersicht der gemessenen Parameter der EctD-Hydroxylasen.....	85
Tabelle 17: Bestimmung von K_m , k_{cat} und V_{max} der Hydroxylasen für Extol.....	87
Tabelle 18: Bestimmung des K_m für 2-Oxoglutarat der Hydroxylasen.....	88
Tabelle 19: Übersicht der Aktivität der EctD Mutanten in <i>V. salicis</i>	94

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADAM	1-Aminoadamantan
AHT	Anhydrotetrazyklin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FMOc	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxy-Säure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LB	Lysogeny-Broth-Medium
OD ₅₇₈	optische Dichte bei der Wellenlänge 578 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
ppm	Teile pro Million (parts per million)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
vol/vol	Volumen pro Volumen (volume per volume)
wt/vol	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

1 Abstract

A common strategy of bacteria to adapt to hypo osmotic environmental conditions is the uptake or synthesis of osmotic active substances, referred to as compatible solutes. This thesis deals mainly with aspects based on the synthesis of those compatible solutes. A commonly used compatible solute in bacteria is the tetrahydropyrimidine derivative ectoine, which can be converted enzymatically into the hydroxylated form hydroxyectoine by the ectoine hydroxylase EctD.

In order to understand the hydroxylation reaction in more detail, x-ray structure analysis were used to analyze the crystal structure of the ectoine hydroxylase EctD from *V. sallexigens* in cooperation with the working group of Prof. Dr. K. Reuter (University Marburg). With the intention to select amino acids for mutagenesis studies, three approaches were used: 1) the EctD crystal structure in complex with Fe^{3+} , 2) a comparative analysis of the active site of the EctD structure with putative ectoine binding proteins from ectoine transporters and 3) bioinformatics comparison of putative EctD protein sequences. Results from those mutagenesis studies of highly conserved amino acid revealed important information about their function and the possible synthesis mechanism of EctD enzyme.

As we were not able to crystallize EctD in a complex with its substrate ectoine or its co-substrate 2-oxoglutarate, putative ectoine hydroxylases from a variety of microorganisms were cloned and purified via affinity chromatography for further crystallization studies. All purified ectoine hydroxylases from the bacteria *Sphingopyxis alaskensis*, *Geobacillus. sp.* Y412MC10, *Pseudomonas stutzeri* A1501, *Alkalilimnicola ehrlichii*, *Acidiphilium cryptum* and *Halomonas elongata* as well as from the crenarchaeon *N. maritimus* were enzymatically active. The activity of each enzyme and their biochemical parameters like K_m , v_{max} and k_{cat} were measured after optimization of the assay conditions regarding pH value, temperature and salt concentration.

Additional bioinformatics of *ect* genes, which are mainly organized in gene clusters, showed interesting genes inside those gene clusters. Continually a *ask* gene encoding for an aspartokinase was identified. Aspartokinases synthesize the essential precursor for ectoine synthesis β -aspartate-semialdehyde from L-aspartate in cooperation with the Asd enzyme. The genome of *Pseudomonas stutzeri* A1501 contains two genes encoding for putative aspartokinases. Whereas one of those genes is located in the *ect* gene cluster, the other gene is found at another position in the genome. Both genes were cloned, the proteins were heterologously produced in *E. coli* and characterized by enzymatic approaches. Those analyses show important difference in features between both aspartokinases.

The physiological role of both competitive solutes ectoine and hydroxyectoine was investigated using growth studies with the actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Ectoine and hydroxyectoine protects *S. coelicolor* from the effects of high osmotic conditions and high temperatures. Thereby, the mixture of ectoine und hydroxyectoine in a 1:1 ratio leads to the most efficient protection.

In order to investigate the initiation of the uptake of competitive solutes by *S. coelicolor* at a certain degree of salinity and temperature, transport studies with radioactive labeled [^{14}C]-ectoine were used. The combination of both stress factors, high salt and high temperature, leads to the highest uptake of competitive solutes in the cell.

2 Zusammenfassung

Eine unter Bakterien weit verbreitete Anpassungsstrategie an hyperosmotische Umgebungsbedingungen ist die Aufnahme oder die Synthese von osmotisch wirksamen Substanzen, die sogenannten kompatiblen Solute. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Aspekte aus dem Bereich der Synthese von den sogenannten kompatiblen Soluten aufgeklärt. Ein häufig genutztes kompatibles Solut in Bakterien ist das Tetrahydropyrimidinderivat Ectoin. Dieses kompatible Solut kann in einem weiteren enzymatischen Schritt durch eine Ectoin-Hydroxylase EctD zu Hydroxyectoin hydroxyliert werden. Um diese Hydroxylierungsreaktion besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit durch Röntgenstrukturanalysen die Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens* in Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Dr. K. Reuter (Universität Marburg) aufgeklärt. Die Ergebnisse aus der Kristallstruktur von EctD mit gebundenem Eisen, ein Vergleich des aktiven Zentrums der EctD Struktur mit Ectoin bindenden Substratproteinen aus Ectoin Transportern sowie der bioinformatische Vergleich von putativen EctD Proteinsequenzen führten zu einer Auswahl an Aminosäuren, die für eine Mutagenesestudie herangezogen wurden. Die Ergebnisse der Mutagenesestudie von hoch-konservierten Aminosäuren lieferten wichtige Informationen über deren Funktion und über den möglichen Synthesemechanismus des EctD Enzyms. Da man jedoch keine EctD Struktur mit gebundenem Substrat Ectoin oder Co-Substrat 2-Oxoglutarat erhalten konnte, wurden weitere potentielle Ectoin-Hydroxylasen aus verschiedenen Mikroorganismen kloniert und affinitätschromatographisch gereinigt. Alle gereinigten Ectoin-Hydroxylasen aus den Bakterien *Sphingopyxis alaskensis*, *Geobacillus. sp.* Y412MC10, *Pseudomonas stutzeri* A1501, *Alkalilimnicola ehrlichii*, *Acidiphilium cryptum* und *Halomonas elongata* sowie dem Crenarchaeon *N. maritimus* waren enzymatisch aktiv. Dazu wurden die genauen Essaybedingungen jeder Ectoin-Hydroxylase in Bezug auf pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration angepasst und optimiert. Danach erfolgte die enzymatische Charakterisierung und die Ermittlung der biochemischen Parameter wie K_m , v_{max} und k_{cat} . Durch weitere bioinformatische Analysen der *ect* Gene, die überwiegend als ein geschlossenes Gencluster in den Organismen organisiert sind, wurden weitere interessante Gene innerhalb des *ect*-Genclusters identifiziert. Dabei trat immer wieder ein für eine Aspartokinase kodierendes *ask* Gen auf. Die Aspartokinasen synthetisieren aus L-Aspartat den für die Ectoin Synthese wichtigen Vorläufer β -Aspartat-Semialdehyd im Zusammenschluss mit einem Asd Enzym. Im Genom des Bakteriums *Pseudomonas stutzeri* A1501 wurden zwei Gene für potentielle Aspartokinasen gefunden. Ein Gen befindet sich im *ect*-Gencluster und das zweite *ask* Gen ist an anderer Stelle im Genom lokalisiert. Die beiden Gene der Aspartokinasen wurden kloniert, die Proteine heterolog in *E. coli* produziert und durch enzymatische Tests charakterisiert. Diese Untersuchungen zeigten wichtige Unterschiede im Hinblick auf die Eigenschaften der beiden studierten Aspartokinasen in diesem Bakterium. In Wachstumsanalysen mit dem Actinomyceten *Streptomyces coelicolor* A3(2) wurde die physiologische Bedeutung der beiden kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin untersucht. *S. coelicolor* wird durch Ectoin und Hydroxyectoin unter hohen osmotischen Bedingungen und hohen Temperaturen protektiert. Es konnte gezeigt werden, dass beim Einsatz eines 1:1 Gemischs von Ectoin und Hydroxyectoin diese Protektion am effektivsten ist. Des Weiteren wurde durch Transportstudien mit radioaktiv markiertem [¹⁴C]-Ectoin untersucht, bei welcher Salinität und bei welcher Temperatur die Aufnahme der kompatiblen Solute in *S. coelicolor* induziert wird. Durch die Kombination der beiden Stressfaktoren wie Hochsalz und hohe Temperatur, konnte gezeigt werden, dass in dieser Situation die Aufnahme am stärksten angeschaltet wird.

3 Einleitung

3.1 Anpassung von Mikroorganismen an osmotischen Stress

Alle Mikroorganismen sind durch ihre Umwelt permanentem Stress ausgesetzt. Als Stressfaktoren sind hierbei starke Temperaturschwankungen, große pH-Wert-Schwankungen, aggressive Strahlung durch radioaktive Substanzen und Lichtquellen, sowie Veränderungen der umgebenen Osmolarität zu nennen. Diese Stressbedingungen können massiv auf die Zelle einwirken und letztlich die Zelle töten. Um das Absterben der Zelle zu verhindern, haben sich die Mikroorganismen im Laufe der Evolution viele Mechanismen zum Schutz vor diesen äußeren Einflüssen angeeignet. Besonders im Boden angesiedelte Bakterien, wie das Bodenbakterium *Bacillus subtilis*, haben ständig damit zu kämpfen, dass sich die Osmolarität ihrer Umgebung ändert. Bei länger anhaltender Feuchtigkeit durch intensive Niederschläge kommt es zu einem Auswaschen des Bodens. Dabei sinkt die Osmolarität im Boden im Vergleich zur Osmolarität in der Zelle stark ab, weil viele Salze und osmotisch wirksame Stoffe aus der Erde herausgespült werden. Bei den Bakterien kommt es bei diesem hypoosmotischen Milieu und dem osmotischen Ungleichgewicht zu einem massiven Wassereinstrom in die Zelle (Booth *et al.*, 2007). Würde dieser Zustand länger andauern, so würde die Zelle unweigerlich platzen. Treten hingegen längere Trockenperioden auf so fließt das Wasser, aufgrund des hyperosmotischen Milieus aus den Zellen heraus und es kann zur Plasmolyse kommen (Bremer & Krämer, 2000; Kempf & Bremer, 1998). Da die Mikroorganismen keine Möglichkeit besitzen, aktiv den Wasserhaushalt in der Zelle zu regulieren (Csonka & Epstein, 1996), schützen sich die Bakterien gegen den Wasserausstrom aus der Zelle durch die Akkumulation von osmotisch wirksamen Substanzen im Cytoplasma (da Costa *et al.*, 1998). Eine schnelle und einfache Möglichkeit für die Bakterien sich vor der Plasmolyse zu schützen, besteht darin anorganische Ionen wie K^+ oder Cl^- als Ausgleich zu einem hyperosmotischen Milieu aktiv in die Zelle zu transportieren und anzureichern, während gleichzeitig das cytotoxische Na^+ aus der Zelle ausgeschleust wird (Abbildung 1).

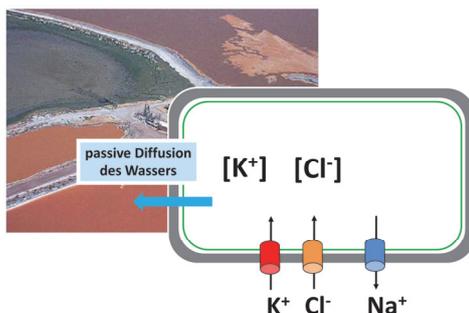


Abbildung 1: „Salt-in“ Methode bei hyperosmotischen Bedingungen. Eine bei halophilen Bakterien unter hohen osmotischen Bedingungen häufig genutzte Strategie ist die „salt-in“ Methode. Dabei werden das Kation K^+ und das Anion Cl^- in die Zelle und das cytotoxische Na^+ aus der Zelle transportiert, um die passive Diffusion des Wassers aus der Zelle zu verhindern.

Die sogenannte „salt-in“ Methode ist für die Organismen sehr energiesparend und kann sehr häufig bei halotoleranten und halophilen Bakterien beobachtet werden (Galinski & Trüper, 1994; Ventosa *et al.*, 1998). In der Zelle können die Salze bis zu hohen molaren Konzentrationen von bis zu 5 M akkumuliert werden (Grant, 2004). Im Laufe der Evolution haben sich einige Bacteria und Archaea an diese hohen Salzkonzentrationen adaptiert. Dies führte jedoch dazu, dass der gesamte Zellapparat an diese hohen Ionenstärken angepasst werden musste und viele Proteine eine Art „saure Signatur“ tragen (Rhodes *et al.*, 2010). Die Proteine aus halophilen Bakterien besitzen im Gegensatz zu Proteinen aus nicht-halophilen Bakterien eine deutlich negativere Oberflächenladung und zusätzlich dazu sinkt die Hydrophobizität der Proteine in halophilen Organismen ab (Abbildung 2).

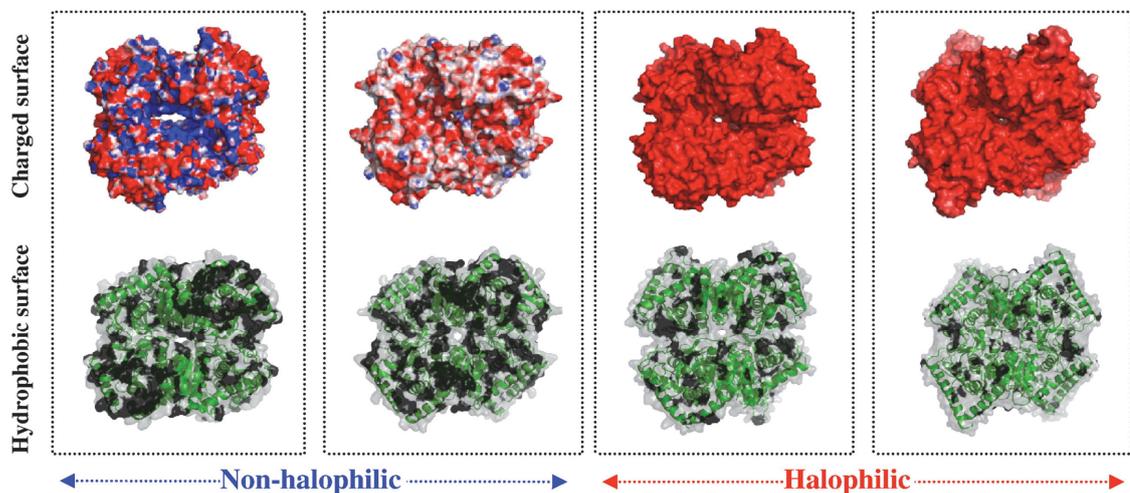


Abbildung 2: Oberflächenladungen von Proteinen in nicht- und halophilen Bakterien. Die Proteine in halophilen Bakterien sind deutlich negativer geladen als Proteine aus nicht-halophilen Bakterien (blau: positiv; rot: negativ). Dazu sinkt die Hydrophobizität bei halophilen Proteinen im Gegensatz zu nicht-halophilen Proteinen ab (schwarz: hydrophobe Oberfläche; grün: Proteinrückgrat; entnommen aus Coquelle *et al.*, 2010).

Solch angepasste Bakterien haben während der Evolution zwar ökologische Nischen wie z.B. salzreiche Seen erschließen können, jedoch unterliegen sie damit einer Abhängigkeit gegenüber ihres Lebensraums. Viele andere Organismen können diese hohen Salzkonzentrationen im Cytoplasma nicht lange tolerieren, da die Gefahr besteht, dass zelluläre Abläufe zum Erliegen kommen (Bremer & Krämer, 2000; Galinski & Trüper, 1994). Durch die hohen Salzkonzentrationen verändert sich die Topologie der DNA, hydrophobe Bindungen in Proteinen werden verstärkt und die Hydrathülle von Proteinen wird erheblich gestört, was zur Denaturierung der Proteine führen kann. Damit die Mikroorganismen nicht auf ein bestimmtes Biotop festgelegt sind, besitzen sie noch weitere Anpassungsmechanismen an schwankende Osmolaritäten in ihrer Umwelt. Die Zellen sind in der Lage, osmotisch wirksame

Substanzen selbst zu synthetisieren oder aus der Umwelt aufzunehmen (Abbildung 3). Bei diesen Substanzen handelt es sich um sogenannte kompatible Solute, die ebenfalls dazu führen, dass der Turgor in den Zellen stabil bleibt. Der Vorteil dieser kompatiblen Solute ist jedoch, dass sie nicht störend in den Metabolismus der Bakterien einwirken. Kompatible Solute sind gut lösliche organische Substanzen, die selbst bei hohen Konzentrationen gegenüber den Stoffwechselprozessen „kompatibel“ sind (Brown, 1976; Grant, 2004). Die kompatiblen Solute besitzen zumeist eine geringe molekulare Masse und können von den Zellen mit hoch affinen Transportsystemen in die Zelle aufgenommen werden (Bremer & Krämer, 2000; Ziegler *et al.*, 2010). Meistens handelt es sich dabei um die Ausscheidungsprodukte anderer Mikroorganismen oder um Substanzen, die durch den Abbau von tierischem und pflanzlichen Material bereitgestellt werden (Welsh, 2000).

Neben der Aufnahme von kompatiblen Soluten besitzen viele Mikroorganismen die Möglichkeit diese osmotisch wirksamen Moleküle selbst *de novo* zu synthetisieren (Abbildung 3). Die Fähigkeit zur Synthese von kompatiblen Soluten ist bei Bakterien sehr weit verbreitet. Da die Synthese von osmotischen Schutzsubstanzen einen hohen Energieaufwand für die Zellen bedeutet, erscheint es auf den ersten Blick als eine ineffektive Methode. Es hat jedoch für die Mikroorganismen den Vorteil, dass sie selbst aktiv auf ihre Umwelt reagieren können und entgehen damit der Abhängigkeit, dass in ihrer Umwelt genügend transportierbare kompatible Solute vorhanden sein müssen.

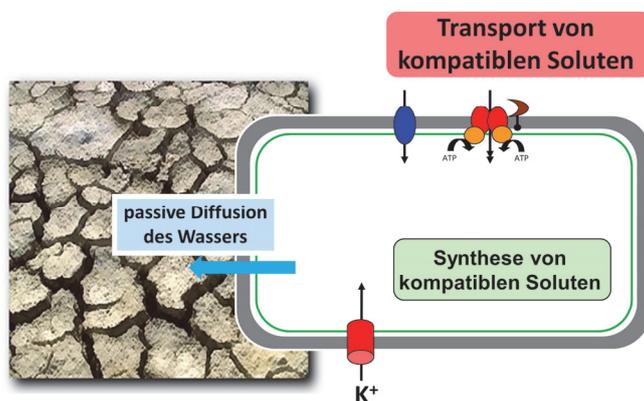


Abbildung 3: Aufnahme und Synthese von kompatiblen Soluten. Eine weit verbreitete Anpassungsstrategie von Bakterien bei hyperosmotischen Bedingungen ist die Aufnahme oder die Synthese von kompatiblen Soluten. Durch die Akkumulation der kompatiblen Solute im Cytoplasma wird verhindert, dass zu viel Wasser aus der Zelle ausströmt.

Wann die Synthese von kompatiblen Soluten in den Zellen erfolgt, ist zumeist sehr genau reguliert, um keine Ressourcen und Energie zu verschwenden (Kempf & Bremer, 1998). Ebenso ist es wichtig, die angereicherten kompatiblen Solute bei einer plötzlichen Änderung der Osmolarität wie einsetzendem Niederschlag schnell aus der Zelle schleusen zu können. Ein Abbau der Substanzen würde in diesem Fall zu lange dauern. Daher benutzen die Mikroorganismen unter diesen Bedingungen eine Art Schleuse, die ihnen als Anpassungsstrategie vor dem sicheren Absterben schützt.

Diese Schleusen werden als mechanosensitive Kanäle bezeichnet, die es den Bakterien ermöglichen binnen kurzer Zeit enorme Mengen an Substanzen aus der Zelle in die Umwelt passieren zu lassen (Booth et al., 2007).

3.2 Kompatible Solute

Die chemischen Eigenschaften der kompatiblen Solute sind insgesamt recht ähnlich. Sie besitzen eine polare Ladungsverteilung, sind osmotisch aktive organische Substanzen und unter physiologischen pH-Werten zwitterionisch und insgesamt ungeladen. Die Akkumulation von kompatiblen Soluten kann in den Mikroorganismen bis zu molaren Konzentrationen erfolgen und selbst bei diesen hohen Konzentrationen werden die zellulären Funktionen nicht gestört oder beeinträchtigt (Brown, 1976; Kaasen *et al.*, 1994; Le Rudulier *et al.*, 1984). Daher stammt auch der Name dieser Substanzen, da sie selbst bei hohen Konzentrationen immer noch „kompatibel“ mit dem gesamten Zellapparat sind. Kompatible Solute zeichnen sich auch durch ihre hohe Löslichkeit im Cytoplasma der Zellen aus (Csonka, 1989). Die chemische Eingruppierung der kompatiblen Solute erfolgt in vier Hauptgruppen: (i) Zucker, Heteroside und Polyole (z.B. Trehalose oder Glycerin), (ii) α - und β -Aminosäuren (z.B. Prolin oder Glutamat) und Aminosäure-Derivate (z.B. Ectoin und Hydroxyectoin), (iii) Trimethylammoniumverbindungen (z.B. Glycin-Betain oder Carnitin) und (iv) Methylsulfonium-Verbindungen und Sulfatester (z.B. Dimethyl-sulfonium-propionat oder Cholin-O-sulfat). Die Strukturformeln von wichtigen und häufig in Bakterien vorkommenden kompatiblen Soluten sind in Abbildung 4 dargestellt. Weil kompatible Solute keine störende Auswirkung auf die Proteine in den Zellen aufweisen, wird der zelluläre Ablauf (Katabolismus, Anabolismus, Proteinfaltung, DNA und RNA Synthese) nicht beeinflusst oder gestört (Csonka, 1989). Eine Erklärung dafür ist das Modell des preferentiellen Ausschluss von Proteinen (Blasiak *et al.*, 2006; Knapp *et al.*, 1999). Dieses so genannte „preferential exclusion model“ besagt, dass die kompatiblen Solute aus der Hydrathülle der Proteine ausgeschlossen werden und dadurch die Proteine eine für sie energetische günstige Konformation annehmen. Die kompatiblen Solute besitzen, neben ihrer Möglichkeit als osmotische Schutzsubstanzen zu wirken, zusätzliche für die Bakterien nützliche Eigenschaften. Sie verleihen den Organismen, die sie akkumulieren, weitere Vorteile. Bakterien sind weniger anfälliger gegenüber starken Temperaturschwankungen, wie plötzliche Kälte oder Hitze (Garcia-Estepa *et al.*, 2006; Holtmann & Bremer, 2004). Glycin Betain kann dazu beitragen, dass *B. subtilis* niedrige Temperaturen von bis zu 13 °C toleriert und bei diesen niedrigen Temperaturen wachsen kann (Hoffmann & Bremer, 2011). Das kompatible Solut 5-

Hydroxyectoin, das hydroxylierte Derivat des Ectoins, kann Bakterien bei hohen Temperaturen zu verbessertem Wachstum verhelfen (Bursy *et al.*, 2008).

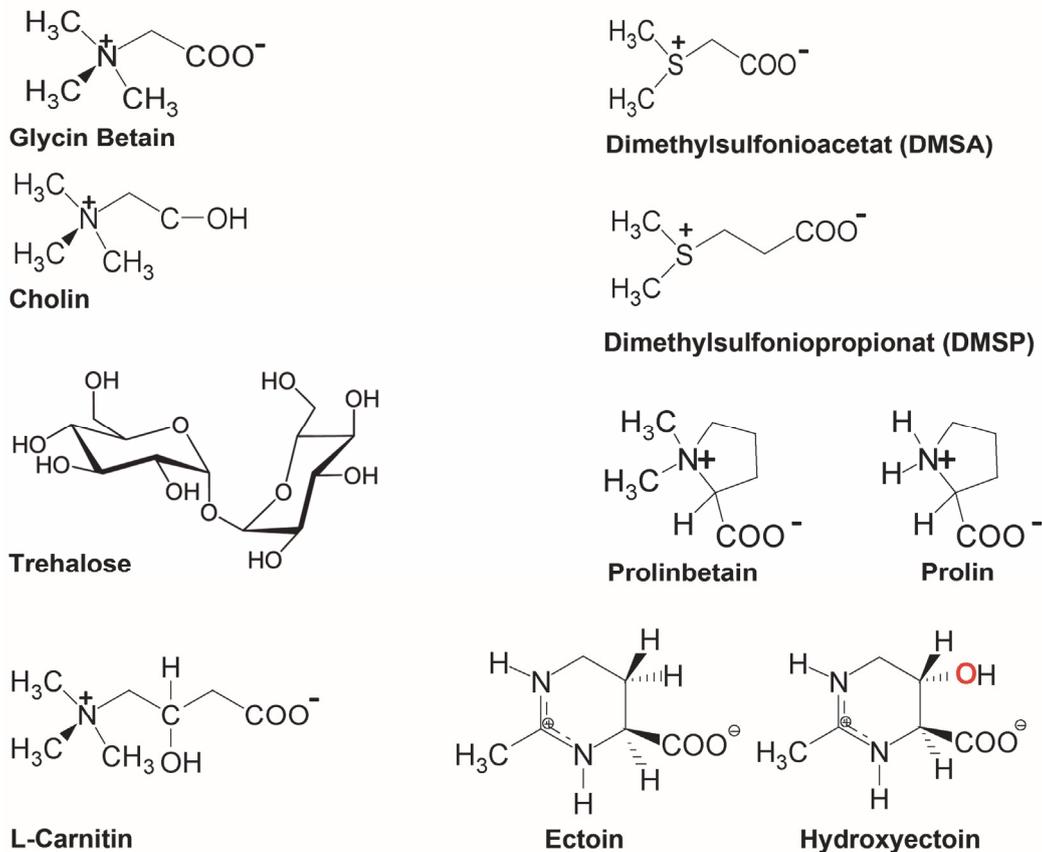


Abbildung 4: Übersicht wichtiger kompatibler Solute. Hier sind die Strukturformeln von häufig vorkommenden kompatiblen Soluten in Mikroorganismen dargestellt. Die in dieser Arbeit im Vordergrund stehenden Verbindungen sind Ectoin und Hydroxyectoin.

Direkte proteinstabilisierende Wirkungen konnten *in vivo* und *in vitro* untersucht werden (Arora *et al.*, 2004; Canovas *et al.*, 1999; Lippert & Galinski, 1992a). Für den Zellmetabolismus gefährliche Radikale können durch kompatible Solute abgefangen werden, wie zum Beispiel im Falle der Iminosäure Prolin, die die Eigenschaft hat, Hydroxyl-Radikale abzuschwächen (Smirnow & Cumbes, 1989). Die Denaturierung von Proteinen durch Wasserstoffperoxid konnte durch das Tetrahydropyrimidinderivat Ectoin herabgesetzt werden (Andersson *et al.*, 2000).

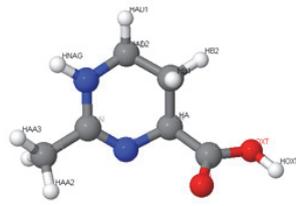
3.3 Die Eigenschaften der chemischen Chaperone Ectoin und Hydroxyectoin

Die Fähigkeit kompatible Solute aufzunehmen oder zu synthetisieren ist unter den Mikroorganismen weit verbreitet. Dabei wurden die Gene für Transportsysteme und für die Synthese von kompatiblen Soluten in vielen Bakterien und Archaea identifiziert (Pittelkow und Bremer, unveröffentlichte Daten). Der Gram-positive Modellorganismus *Bacillus subtilis* nutzt hauptsächlich das kompatible Solut Glycin

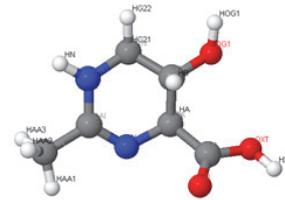
Betain, das er entweder aus der Umwelt aufnimmt oder aus dem Vorläufersubstrat Cholin über Glycin-Betain-Aldehyd synthetisiert (Bremer & Krämer, 2000; Ziegler *et al.*, 2010). Glycin Betain ist ein kompatibles Solut mit besonders protektiven Eigenschaften bei hyperosmotischen Bedingungen, da bereits geringe aufgenommene oder synthetisierte Mengen von Glycin Betain zu einem deutlichen Wachstumsvorteil führen (Bourot *et al.*, 2000; Kempf & Bremer, 1998).

Ebenso weit verbreitet ist das kompatible Solut Ectoin [(S)-2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxysäure]. Es wurde 1985 zum ersten Mal in dem Gram-negativen halophilen, phototrophen Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* entdeckt und als kompatibles Solut charakterisiert und beschrieben (Galinski *et al.*, 1985). Es ist sehr häufig in halotoleranten und halophilen chemoheterotrophen Eubacteria detektierbar (Grant, 2004; Kempf & Bremer, 1998; Severin *et al.*, 1992; Ventosa *et al.*, 1998). Beispielsweise akkumulieren jene Bakterien sehr häufig Ectoin, die in sehr hohen Salzkonzentrationen bis 12% NaCl leben (Khmelenina *et al.*, 1999). Das Ectoin-Derivat Hydroxyectoin [(S),(S)-2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxysäure] wurde nach der Entdeckung von Ectoin in dem Gram-negativen Bodenbakterium *Streptomyces parvulus* identifiziert (Inbar & Lapidot, 1988).

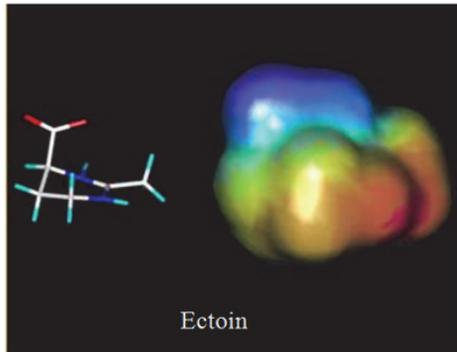
Im oberen Teil der Abbildung 5 sind die Strukturformeln von Ectoin und Hydroxyectoin dargestellt und im unteren Teil der Abbildung 5 sind die Ladungsverteilungen der beiden kompatiblen Solute durch *ab initio* Kalkulationen gezeigt (bitop, Witten). Man erkennt, dass es sich um polare Verbindungen handelt, die eine negative Ladungswolke im Bereich der Carboxygruppe und eine positive Ladungswolke im Bereich der beiden Stickstoffe aufweisen. Beide Tetrahydropyrimidine werden als Aminosäurederivate klassifiziert und blieben längere Zeit unentdeckt. Der Grund dafür war, dass das einzelne Elektronenpaar der beiden ringständigen Stickstoffatome in eine delokalisierte π -Elektronenwolke eingebunden ist. Daher konnten Ectoin und Hydroxyectoin nicht mit herkömmlichen Nachweismethoden für Aminosäuren detektiert werden (Galinski, 1993). Die Ectoine wurden chemisch als heterozyklische Aminosäuren beschrieben, als teilweise hydrogenierte Pyrimidinderivate oder auch als N-acetylierte Diaminosäuren (Galinski, 1993; Peters *et al.*, 1990).

**Ectoin**

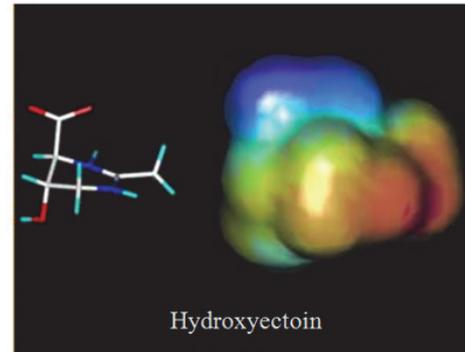
[(S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carboxylat]

**Hydroxyectoin**

[(S,S)-β-2-methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carboxylat]



Ectoin



Hydroxyectoin

Abbildung 5: Ectoin und Hydroxyectoin. In der Darstellung sind die beiden Strukturformeln der Pyrimidinderivate Ectoin und Hydroxyectoin dargestellt. Zusätzlich sind beide Moleküle als *ab initio* Modelle illustriert. Farblich verdeutlicht wird die Verteilung der Oberflächenladung (blau: negativ; rot: positiv; bitop AG).

Durch zahlreiche Studien konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen dieser beiden kompatiblen Solute nicht nur auf wenige, speziell an saline Umgebungen angepassten Mikroorganismen begrenzt ist, sondern in vielen Bakterien identifiziert werden konnten (Galinski *et al.*, 1985; Galinski & Trüper, 1994; Inbar & Lapidot, 1988; Kuhlmann *et al.*, 2008a). Ihr Nachweis erfolgte qualitativ mittels ^{13}C -NMR Spektroskopie und quantitativ mittels HPLC (Bursy, 2005; Galinski, 1993; Kuhlmann & Bremer, 2002; Kunte *et al.*, 1993). In wässrigen Lösungen sind sie als zwitterionische Moleküle nachweisbar (Inbar *et al.*, 1993). Die Ectoine haben starke strukturelle Ähnlichkeiten zur Iminosäure Prolin sowie zum Tetramethylamin Glycin-Betain. Ihre Ladungsverteilung ist vergleichbar mit der von Betainen und die Ringstruktur ist ähnlich der Struktur des Prolins (Galinski, 1993). Der genaue Unterschied zwischen Ectoin und Hydroxyectoin ist die Hydroxy-Gruppe am C5-Atom des Pyrimidinringes (Abbildung 5). Die osmoprotektiven Eigenschaften der beiden Substanzen sind ähnlich, jedoch nicht identisch, was auf die zusätzliche Hydroxy-Gruppe in Hydroxyectoin zurückzuführen ist (Bursy *et al.*, 2007; Kuhlmann *et al.*, 2008a). Es wird vermutet, dass diese Hydroxy-Gruppe mit polaren Gruppen von Proteinen besser interagieren kann und fehlendes Wasser ersetzt (da Costa *et al.*, 1998; Galinski, 1993). Ectoin und Hydroxyectoin dienen den Bakterien nicht ausschließlich als osmotische Schutzsubstanzen. Sie

können zudem positiv auf den kompletten Zellmetabolismus einwirken. Die beiden Tetrahydropyrimidine stabilisieren die Cytoplasmamembran, können die DNA vor schädigenden UV-Strahlen schützen und wirken sich positiv auf die Hydrathülle der Proteine aus, indem die Oberfläche der Proteine in eine energetisch günstige Konformation gedrängt und dadurch stabilisiert wird (Arakawa & Timasheff, 1985; Kolp *et al.*, 2006).

Die beiden kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin konnten nicht nur als nutzbringende Substanzen für Bakterien identifiziert werden. Die positiven Eigenschaften werden auch in Produkten für den Menschen untersucht und eingesetzt. Ectoin und Hydroxyectoin haben beispielsweise positive Eigenschaften auf die menschliche Haut. Die Anwendung der beiden kompatiblen Solute in Hautcremes führt dazu, dass die natürlichen Strukturen der Membranen, Proteine und Nukleinsäuren in der Haut stabilisiert werden. Stressfaktoren, ausgelöst durch UV-Strahlung, Trockenheit, Hitze und Kälte werden durch Ectoin minimiert und der Feuchtigkeitsgehalt in der Haut wird erhöht (Bartens, 2001). Daher ist Ectoin mittlerweile in vielen Kosmetikprodukten zu finden. Auch das Gemisch aus Ectoin und Hydroxyectoin wird in der Hautpflegeindustrie eingesetzt. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Ectoin einen schützenden Einfluss vor starker Sonnenstrahlung besitzt und findet daher Verwendung in Sonnenschutzcremes. Immer interessanter werden Ectoin und Hydroxyectoin für den Einsatz in Medizinprodukten. Ectoin wird in Spezialsalben gegen Neurodermitis und als Inhalationsspray bei Entzündungen im Rachen und Lungenbereich eingesetzt (bitop AG). Weitere nützliche Anwendungsgebiete werden zurzeit erprobt und klinisch getestet. Aufgrund dieser Einsatzgebiete wird Ectoin mittlerweile im Tonnenmaßstab durch die Firma bitop (Witten, Deutschland) in einem speziellem biotechnologischem Verfahren, dem sogenannten „Bacterial milking“-Verfahren, mit dem halophilen Bakterium *Halomonas elongata* produziert (Lentzen & Schwarz, 2006; Sauer & Galinski, 1998).

3.4 Ectoin und Hydroxyectoin Aufnahmesysteme

Damit die kompatiblen Solute in der Zelle akkumuliert werden können, müssen diese mit hochaffinen Aufnahmesystemen in die Zelle transportiert werden. In *B. subtilis* zum Beispiel sind für die Aufnahme vieler Osmoprotektiva hochaffine sekundäre Transporter wie OpuD und OpuE, aber auch ABC (ATP Binding Cassette) Transporter wie OpuA, OpuB und OpuC verantwortlich (Kappes *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999; Kempf & Bremer, 1995). Über den OpuC Transporter kann neben einer Vielzahl von kompatiblen Soluten mit einer Trimethylamonium-Kopfgruppe wie z.B.

Glycin Betain auch Ectoin in *B. subtilis* aufgenommen werden, allerdings mit niedriger Affinität (Jebbar *et al.*, 1997).

Für die spezifische Aufnahme von Ectoin und Hydroxyectoin existieren in den Mikroorganismen spezialisierte Aufnahmesysteme. Diese gehören entweder zu den ABC (ATP Binding Casette) Transportern oder zu den TRAP-T (Tripartite ATP-independent Periplasmic Transporter) Transportern (Hanekop *et al.*, 2007; Kuhlmann *et al.*, 2008b; Lecher *et al.*, 2009). In beiden Systemen wird die Substratauswahl durch Substratbindepoteine spezifiziert. Diese können bei Gram-negativen Bakterien im Periplasma lokalisiert oder bei Gram-positiven Bakterien an der Außenseite der Zellmembran durch Lipidanker verankert sein (Davidson *et al.*, 2008). Durch Kristallstrukturanalysen der Bindepoteine aus verschiedenen Bakterien konnte ein für die Ectoin Bindung wichtiges Bindemotiv analysiert werden. Im Falle des Bindepoteins EhuB des ABC Transporters aus dem Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* konnten dessen Strukturen mit gebundenem Substrat Ectoin und Hydroxyectoin mit einer Auflösung von 1,9 Å bzw. 2,3 Å aufgeklärt werden (Hanekop *et al.*, 2007). EhuB besteht aus zwei Domänen und die Substrate werden in einer tiefen Spalte zwischen den beiden Domänen gebunden (Abbildung 6).

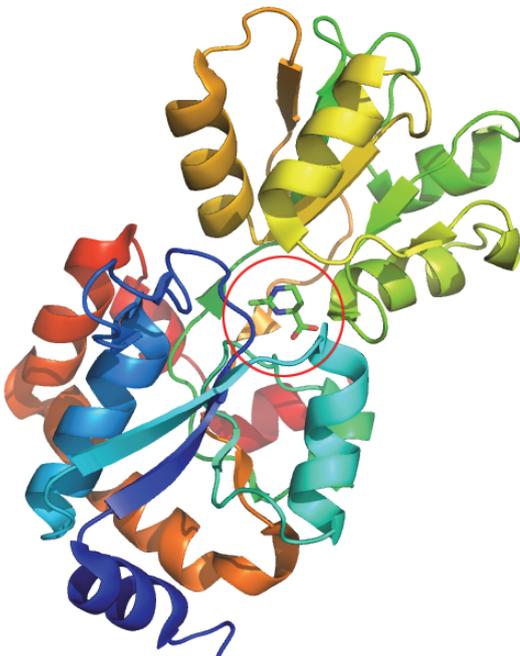


Abbildung 6: Das Ectoin Bindepotein EhuB. Das Bindepotein EhuB aus *Sinorhizobium meliloti* bindet Ectoin im Inneren des Proteins (roter Kreis). EhuB besteht aus zwei Domänen (Domäne I: gelb, grün; Domäne II: blau, rot), wobei sich die Bindestelle für Ectoin zwischen den beiden Domänen befindet.

Die Ergebnisse aus diesen Strukturen von EhuB zeigen die für die Ectoin bzw. Hydroxyectoin verantwortlichen und essentiellen Aminosäuren. Es handelt sich dabei um eine Kationen- π -Bindung durch eine Aromatenbindebox bestehend aus zwei Phenylalaninen und einem Tyrosin (Hanekop *et al.*, 2007).

Zusätzlich wird die Carboxygruppe der Substrate Ectoin und Hydroxyectoin durch die Ausbildung einer Salzbrücke mit einem wichtigem Arginin stabilisiert (Hanekop *et al.*, 2007). Diese Aromatenbindebox konnte ebenfalls in den Strukturen der Bindeproteine UehA aus *Silicibacter pomeroyii* und TeaA aus *Halomonas elongata* ermittelt werden (Abbildung 7).

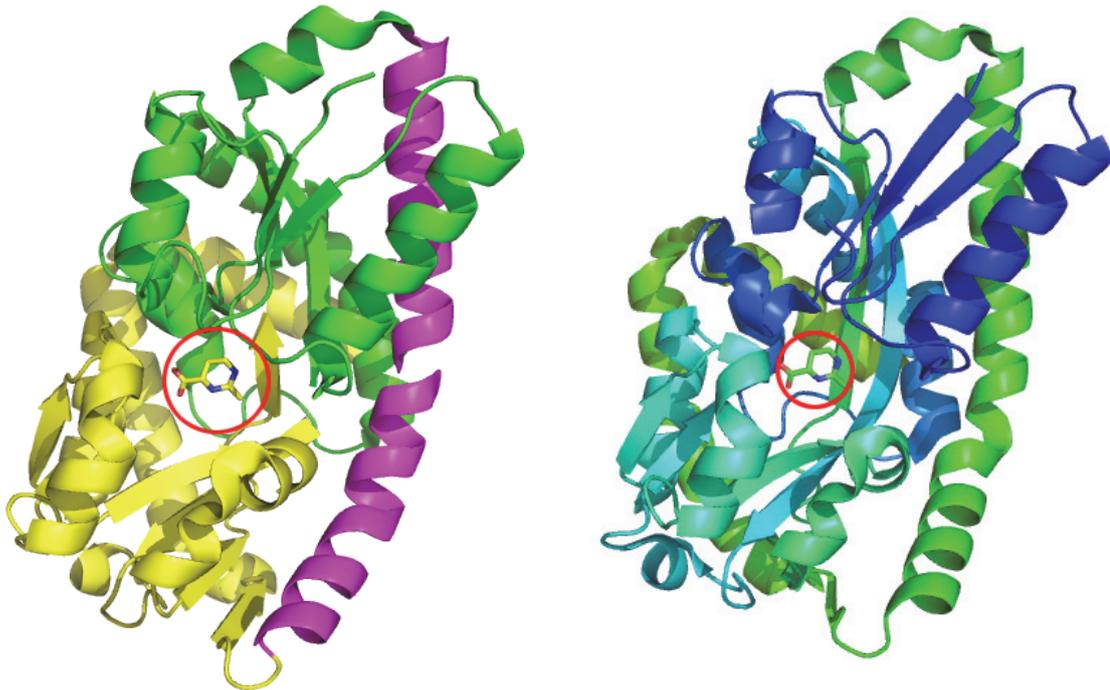


Abbildung 7: Die Ectoin Bindeproteine UehA und TeaA. Die Ectoin Bindeproteine UehA (links) aus *S. pomeroyii* und TeaA (rechts) aus *H. elongata* binden wie EhuB aus *S. meliloti* das Substrat Ectoin im Inneren der Bindeproteine (rote Kreise) (Kuhlmann *et al.*, 2008b; Lecher *et al.*, 2009). Zur Verdeutlichung des Aufbaus der Bindeproteine aus zwei Domänen wurde UehA entsprechend eingefärbt (gelb: Domäne I; grün: Domäne II; violett: Verbindungshelix der beiden Domänen).

Ectoin und Hydroxyectoin wird durch UehA aus *S. pomeroyii* ebenfalls durch eine Aromatenbindebox bestehend aus zwei Phenylalaninen und einem Tryptophan durch Kationen- π -Interaktion gebunden (Lecher *et al.*, 2009). Zur Stabilisierung der Carboxygruppe des Ectoins dient wieder ein Arginin und, um die Imidogruppe von Ectoin richtig zu orientieren, wurde eine Interaktion zu einem Glutamat identifiziert (Lecher *et al.*, 2009). Da sich TeaA aus *H. elongata* und UehA aus *S. pomeroyii* sehr ähnlich sind und eine hohe Homologie aufweisen, ist es nicht verwunderlich, dass die Bindebox in TeaA zu UehA nahezu identisch ist (Lecher *et al.*, 2009). Zusammenfassend kann man aus diesen Strukturen ein immer wiederkehrendes Bindemotiv für Ectoin und Hydroxyectoin erkennen. Ob dies auch auf ein Enzym zutrifft, das Ectoin als Substrat (z.B. die Ectoin-Hydroxylase EctD) benutzt, ist bisher ungeklärt.

3.5 Die Synthese der Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin

Der genaue enzymatische Reaktionsweg für die Synthese von Ectoin und die enzymatische Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin durch das Protein EctD ist in Abbildung 8 dargestellt.

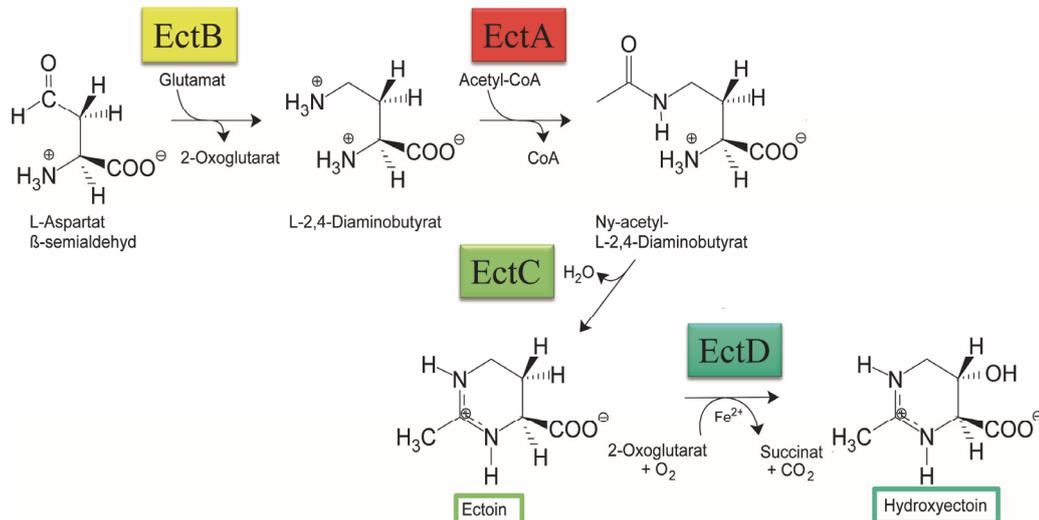


Abbildung 8: Schlüsselenzyme aus dem Ectoin/Hydroxyectoin Synthese Cluster. Die Ectoin bzw. Hydroxyectoin Synthese erfolgt durch verschiedene Enzyme die meistens in einem Operon organisiert sind. Die Vorstufen gehen über L-Aspartat-β-Semialdehyd zu L-2,4Diaminobutyrat (EctB), zu Ny-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat (EctA), zu Ectoin (EctC) und schließlich zu Hydroxyectoin (EctD).

Die Synthese zu Ectoin erfolgt durch einen vierstufigen Reaktionsweg (Abbildung 8). Als Vorläufersubstrat dient L-Aspartat-β-Semialdehyd, welches als Zwischenprodukt des Aminosäuremetabolismus anfällt. Aus L-Aspartat-β-Semialdehyd wird mit der Diaminobutyrat-Transaminase (EctB) und den Co-Substrat L-Glutamat eine Aminogruppe von L-Glutamat auf L-Aspartat-β-Semialdehyd übertragen und das Zwischenprodukt L-2,4-Diaminobutyrat und 2-Oxoglutarat synthetisiert. EctB wird in die Subgruppe II der Aminotransferasen klassifiziert (Mehta *et al.*, 1993). EctB kann neben Glutamat auch Aspartat für die Aminierung von L-Aspartat-β-Semialdehyd verwenden. Dies wurde in dem halotoleranten Bakterium *Methylobacterium alcaliphilum* beobachtet (Trotsenko & Khmelenina, 2002). Der zweite Reaktionsschritt umfasst die Acetylierung von L-2,4-Diaminobutyrat durch die L-2,4-Diaminobutyrat-Ny-Acetyltransferase (EctA) mithilfe von Acetyl-CoA, wobei Ny-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat entsteht. Der Ringschluss zum Ectoin erfolgt im letzten Schritt aus Ny-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat unter Wasserabspaltung durch die Ny-Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat-Dehydratase (EctC), wobei EctC auch als Ectoin Synthase bezeichnet wird. Das *ectC* Gen kann daher als diagnostisches Gen für die Ectoin Synthese herangezogen werden, da ohne die Ectoin Synthase der Ringschluss zum Ectoin nicht

durchgeführt werden kann und es auch keine anderen homologen Proteine zu EctC existieren. Besitzen die Bakterien die Möglichkeit das Ectoin zu hydroxylieren, wird durch die Ectoin-Hydroxylase EctD mittels der Co-Substrate 2-Oxolglutarat und mittels molekularen Sauerstoffs sowie dem Co-Faktor Eisen an die C5 Position des Ectoins eine Sauerstoffgruppe hydroxyliert (Bursy *et al.*, 2007). Es existieren in der Literatur Vorschläge für Alternativen bei der Hydroxyectoin Synthese, diese konnten aber bislang nicht experimentell nachgewiesen werden (Prabhu *et al.*, 2004).

3.6 Das Ectoin Synthese-Gencluster

Die für die Ectoin Synthese codierenden Gene treten überwiegend in einem Cluster auf. Das *ect*-Cluster ist in den meisten Fällen wie folgt organisiert: 1) *ectA* (codiert für eine Diaminobutyrat-Acetyltransferase) 2) *ectB* (codiert für eine Diaminobutyrat-2-Oxoglutarat- Aminotransferase) und 3) *ectC* (codiert für eine Ectoin-Synthase). An dieser Stelle ist wichtig zu erwähnen, dass die Abfolge der Gene des Clusters (*ectABC*) nicht der Reihenfolge der benötigten Enzyme während der Ectoin Synthese entspricht. Die Abfolge der Enzyme zur Ectoin Synthese ist EctB, EctA und dann EctC (Abbildung 8). In vielen Fällen, wie z.B. dem Actinomyceten *Streptomyces coelicolor*, enthält das *ect*-Cluster ein zusätzliches *ectD* Gen, das für eine Ectoin-Hydroxylase kodiert. Einige Bakterien, die in der Lage sind, Ectoin zu Hydroxyectoin zu hydroxylieren wie im Falle des moderat halophilen Bakteriums *Virgibacillus salexigens*, tragen das Gen für die Ectoin-Hydroxylase an einer anderen Stelle im Genom (Abbildung 9).

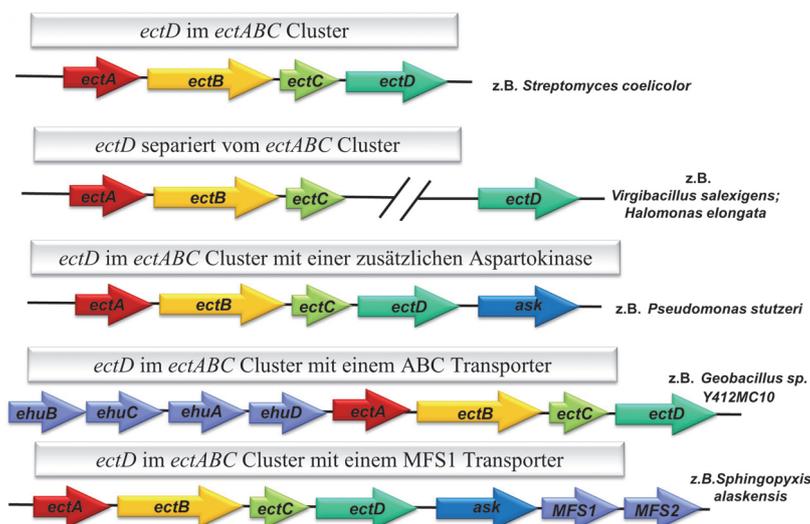


Abbildung 9: Organisation des Ectoin-Genclusters. Der Aufbau des Ectoin-Genclusters in verschiedenen Bakterien. Der Focus bei der Identifizierung der Ectoin Synthese-Gencluster lag dabei auf Organismen, die in der Lage sind, Ectoin zu Hydroxyectoin mit einer EctD Hydroxylase hydroxylieren zu können.

In vielen verschiedenen Organismen, findet man jedoch zahlreiche Varianten des Ectoin-Genclusters. Das Bakterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 enthält im *ect*-Gencluster zum Beispiel ein für eine Aspartokinase codierendes Gen (Abbildung 9). Ein weiteres Beispiel ist das thermophile Bakterium *Geobacillus sp.* Y412MC10, das in direkter Nachbarschaft zum *ect*-Gencluster die Gene für einen ABC Transporter enthält (Abbildung 9). Bioinformatische Analysen zu diesem Transporter ergaben, dass es sich hierbei um ein Ectoin Aufnahmesystem handelt, das hoch homolog zu bereits charakterisierten Ectoin Transportern wie dem Ehu System (Hanekop *et al.*, 2007) aus dem Bakterium *Sinorhizobium meliloti* ist (Pittelkow und Bremer; unveröffentlichte Daten). Im Genom des psychrophilen Organismus *Sphingopyxis alaskensis* folgen dem *ect*-Gencluster Gene, die für Proteine aus dem Bereich der MFS- (major facilitator superfamily) Transporter kodieren. Dabei ist anzunehmen, dass diese Transporter dafür verantwortlich sind, Ectoin in die Zelle aufzunehmen oder auszuschleusen.

3.7 Die Hydroxylase EctD aus dem moderat halophilen Bakterium *V. salexigens*

In Bakterien, die in Lebensräumen mit hohen oder extrem hohen Salzkonzentrationen wie NaCl oder CaCl₂ wachsen können, sind häufig viele unterschiedliche kompatible Solute zu finden. Die Habitate dieser halotoleranten oder halophilen Bakterien sind zum einen die Ozeane mit einem durchschnittlichen Salzgehalt von 3% oder zum anderen extrem salzreiche Böden oder Gewässer wie Salzseen oder Flüsse mit Brackwasser in der Nähe von Ozeanen. Die Ectoin-Hydroxylase EctD, die in dieser Arbeit strukturell analysiert wurde, konnte aus dem moderat halophilen Organismus *Virgibacillus salexigens* kloniert werden (Bursy *et al.*, 2007). *V. salexigens* wurde 1997 aus hypersalinen Böden in Spanien isoliert und beschrieben (Garabito *et al.*, 1997). In diesen Böden wurden sehr hohe Salzkonzentrationen gemessen, was dazu führte, dass nur besonders angepasste Mikroorganismen diese Biotope erschließen konnten. Für die Kultivierung von *V. salexigens* musste das Nährmedium auf eine NaCl Konzentration von 10% eingestellt werden, wobei auch noch bei einer Konzentration von 20% NaCl Wachstum zu verzeichnen ist (Garabito *et al.*, 1997). Das Bodenbakterium *V. salexigens* wird taxonomisch in das Phylum der Firmicutes und dort in die Familie der *Bacillaceae* eingeordnet. Es ist ein Gram-positives, strikt aerobes, bewegliches, Endosporen bildendes Bodenbakterium. Ursprünglich erhielt das Bakterium 1997 den Namen *Bacillus salexigens* und wurde 1999 als *Salibacillus salexigens* beschrieben (Garabito *et al.*, 1997; Waino *et al.*, 1999). 2003 wurde das Bakterium umklassifiziert und erhielt den Namen *Virgibacillus salexigens* (Heyrman *et al.*, 2003). Durch den Namen des

Bakteriums sollte die Lebensbedingung zum Ausdruck gebracht werden. Der Speziesname *salexigens* setzt sich aus den lateinischen Worten „sal“ für Salz und „exigo“ für erfordern/benötigen zusammen (Garabito *et al.*, 1997; Heyrman *et al.*, 2003). Die 1999 gewählte Genusbezeichnung *Salibacillus* hebt das bevorzugte Habitat noch einmal hervor. Die Genusbezeichnung *Virgibacillus* geht auf das lateinische Wort „virga“ für „Zweig“ zurück und bezieht sich auf die phylogenetische Position als Zweig oder Seitenlinie zum Genus *Bacillus* (Heyrman *et al.*, 2003).

Der Toleranzbereich für Salzkonzentrationen von *V. salexigens* variiert von 0,4 M bis über 3,6 M NaCl und das Bakterium kann in einem Temperaturbereich von 15°C bis 45°C wachsen, wobei das Optimum bei etwa 37°C liegt. Der optimale pH-Wert befindet sich bei pH 7,5, wobei ein Bereich von pH 6 – 11 toleriert wird (Garabito *et al.*, 1997). Der GC-Gehalt der DNA beträgt zwischen 36,3 mol% und 39,5 mol% (Heyrman *et al.*, 2003). *V. salexigens* wurde als Bakterium für die Untersuchungen zur Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese ausgewählt (Bursy *et al.*, 2007), da es das erste Bakterium aus dem Genus *Bacillus* und nah verwandter Genera war, bei dem Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese nachgewiesen werden konnte (Kuhlmann & Bremer, 2002).

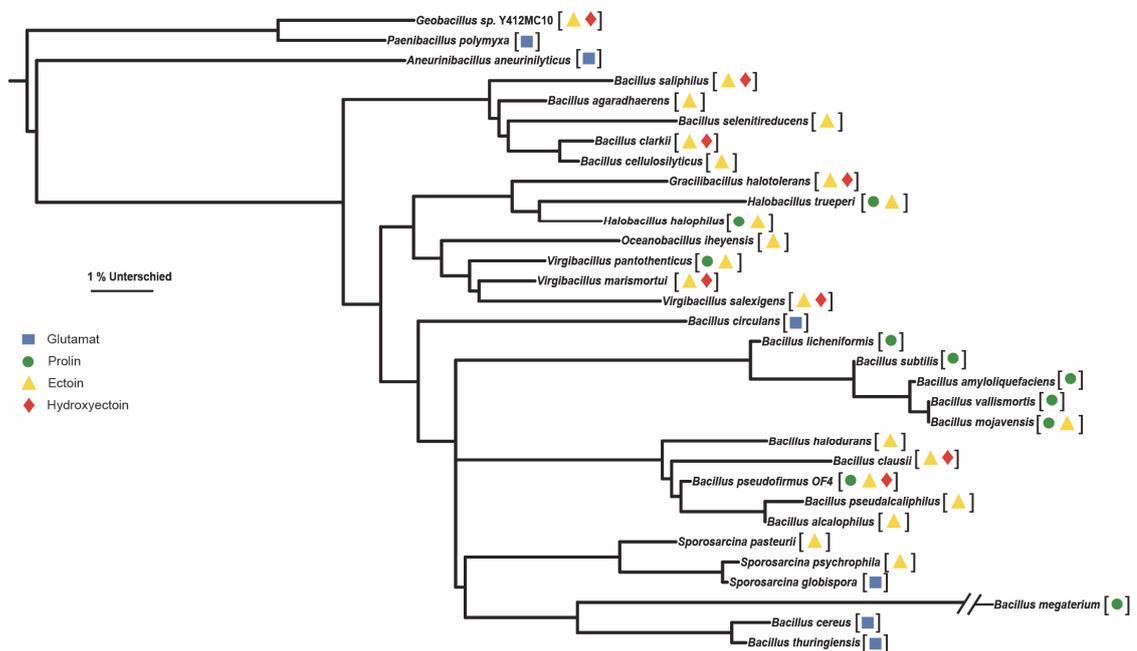


Abbildung 10: Verwandtschaftsbeziehungen von *Virgibacillus salexigens* mittels 16 sRNA Sequenzen. Der phylogenetische Stammbaum zeigt Bacilli Spezies und nah verwandte Genera. Alle Organismen wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaft der Osmolytsynthese durch NMR Analysen untersucht und die gebildeten Osmoprotektiva analysiert (Bursy *et al.*, 2007). Der Baum wurde mithilfe des Tools Arb (Ludwig *et al.*, 2004) durch ein Alignment der 16 sRNA Sequenzen aus diesen Organismen erstellt (Pittelkow & Bremer, 2011).

In Abbildung 10 ist die Verwandtschaftsbeziehung von *V. salexigens* zu anderen *Bacilli* Spezies durch 16 sRNA Analysen zusammen mit den Informationen zur Synthese der kompatiblen Solute Glutamat, Prolin, Ectoin und Hydroxyectoin gezeigt. Wie man aus Abbildung 10 erkennen kann, können die meisten Bakterien aus der Familie der *Bacilli* Ectoin synthetisieren. Ectoin durch das zusätzliche Enzym EctD in einem weiteren Schritt hydroxylieren zu können, ist innerhalb der *Bacilli* weniger verbreitet. Die Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen zeigt außerdem, dass die *ect* Gene nicht in allen *Bacilli* vorkommen und daher nicht als eindeutiger Marker genutzt werden kann.

3.8 Die Ectoin-Hydroxylase EctD katalysiert die Synthese von Ectoin zu Hydroxyectoin

Nachdem in Bakterien das hydroxylierte Derivat des Ectoins 5-Hydroxyectoin gefunden wurde (Inbar & Lapidot, 1988), konnte man mit dem Bakterium *V. salexigens* einen Vertreter der Firmicutes identifizieren, der neben Ectoin auch Hydroxyectoin synthetisieren kann (Bursy *et al.*, 2007) (Abbildung 10). Mithilfe von heterologen Primern, die von putativen *ectD* Gensequenzen abgeleitet wurden, konnte in *V. salexigens* ein für eine Hydroxylase codierendes Gen detektiert werden (Bursy *et al.*, 2007). Um die Hydroxyectoin-Biosynthese in *V. salexigens* molekularbiologisch und enzymatisch zu analysieren, wurde das für die potentielle Ectoin-Hydroxylase codierende Gen *ectD* kloniert, das Protein heterolog in *E. coli* produziert, affinitätschromatographisch durch einen C-terminal fusionierten *Strep*-tag gereinigt und in enzymatischen Tests charakterisiert (Bursy *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der *in vitro* Enzymassays zeigten, dass das gereinigte EctD Enzym, mit einer molekularen Masse von 34,4 kDa, aktiv ist und Ectoin zu Hydroxyectoin hydroxylieren kann. Vor dem offenen Leserahmen von *ectD* wurde eine potentielle Ribosomenbindestelle identifiziert, die sowohl im Abstand zum Start-Codon als auch in der Basenfolge einer typischen Ribosomenbindestelle aus *B. subtilis* ähnelt (Ma *et al.*, 2002). Durch die vergleichende Analyse der EctD Aminosäure-Sequenzen von verschiedenen Mikroorganismen mit der EctD-Sequenz von *V. salexigens* konnten hohe Identitäten zu potentiellen Ectoin-Hydroxylasen ermittelt werden. Das *ectD* Gen steht unter der Kontrolle eines Promotors, der abhängig von der Salinität in der Umgebung des Bakteriums ist (Bursy *et al.*, 2007). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Salzkonzentrationen von 0,4 M NaCl fast kein Transkript detektierbar ist, während bei einer erhöhten Salzkonzentration von 3,2 M und der damit ausgelösten Stressreaktion ein Anstieg der *ectD*-mRNA in der Zelle zu verzeichnen ist (Bursy *et al.*, 2007).

In Abbildung 11 ist die Hydroxylierungsreaktion von Ectoin zu 5-Hydroxyectoin durch die Hydroxylase EctD im Detail gezeigt.

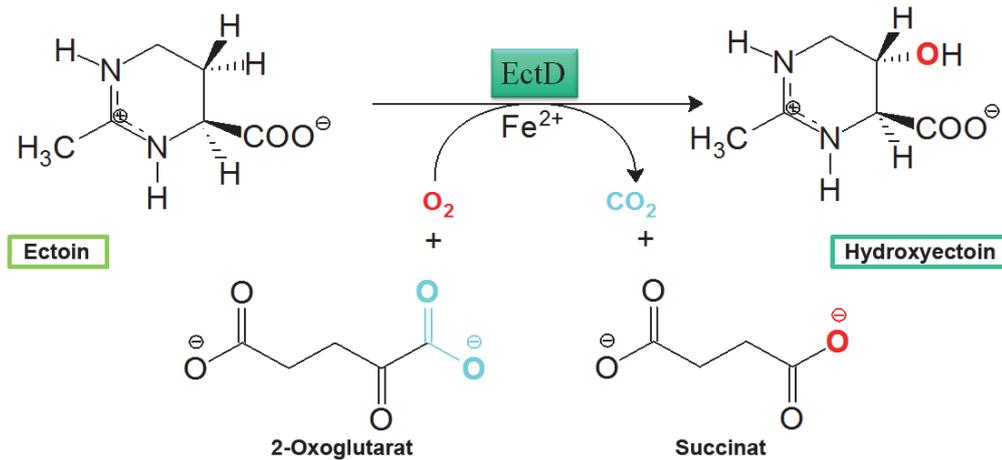


Abbildung 11: Hydroxylierungsreaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin. Der letzte Schritt der Hydroxyectoin Bildung durch die Ectoin-Hydroxylase EctD ist hier im Detail dargestellt. EctD benötigt das Co-Substrat 2-Oxoglutarat und molekularen Sauerstoff sowie den Co-Faktor Fe²⁺. Durch die Reaktion entsteht 5-Hydroxyectoin, Succinat und CO₂.

Das reduzierte Eisen (Fe²⁺) kann mit molekularem Sauerstoff (O₂) und dem Co-Substrat 2-Oxoglutarat ein Sauerstoff Atom an die C5 Position des Ectoins in trans-Stellung übertragen. Dabei wird das Co-Substrat 2-Oxoglutarat zu Succinat decarboxyliert und es entsteht (5S)-5-Hydroxyectoin.

3.9 Proteine aus der EctD Enzymfamilie mit strukturellen Ähnlichkeiten

Die Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salicigenens* konnte aufgrund ihres Reaktionsmechanismus in die Superfamilie der mononukleären Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11) eingeordnet werden (Bursy *et al.*, 2007; Reuter *et al.*, 2010). Die Proteine dieser Superfamilie benötigen für ihre enzymatische Funktionalität das Co-Substrat 2-Oxoglutarat und molekularen Sauerstoff sowie den Co-Faktor Eisen. Die katalytischen Reaktionen dieser Superfamilie sind sehr vielfältig und es entsteht durch die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat die Bernsteinsäure Succinat (Costas *et al.*, 2004; Prescott & Lloyd, 2000; Ryle & Hausinger, 2002; Solomon *et al.*, 2000). Alle Reaktionen müssen unter aeroben Bedingungen ablaufen, da ein Sauerstoffatom des molekularen Sauerstoffs aus der Luft in das Produkt und das zweite Sauerstoffatom in die Ketosäure Succinat eingebaut wird (Abbildung 11).

Das Spektrum an Reaktionen für Proteine aus dieser Familie umfasst Zyklisierungen, Ringerweiterungen und Einführungen von Doppelbindungen (Costas *et al.*, 2004). Wichtige Vertreter dieser Enzymfamilie ist die Dioxygenase AlkB, die in der DNA Reparatur einzelsträngige DNA und RNA demethyliert (Yang *et al.*, 2008). Wichtig zu erwähnen ist auch die Clavaminatsynthese (CAS), die in drei Reaktionsschritten die

Synthese des β -Lactamase-Inhibitors Clavaminat katalysiert (Zhang *et al.*, 2002). Die Deacetoxycephalosporin C-Synthase (DAOCS) ist nicht nur vom Substratspektrum mit EctD verwandt, sondern hat zudem viele strukturelle Gemeinsamkeiten. Das Enzym ist an der Spaltung des Thiazolidin-Ringes von Penicillin N beteiligt und wurde aus dem Bakterium *Streptomyces clavuligerus* gewonnen (Lee *et al.*, 2001; Valegard *et al.*, 2004).

Aus energetischer Sicht gibt es sehr viele interessante Vertreter aus der Gruppe der Superfamilie der mononukleären Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen, da alternative Energiequellen wie Sulfonate und Hypophosphite verstoffwechselt werden können. Ein Beispiel ist die Taurin-2-Oxoglutarat Dioxygenase TauD, die es dem Enterobakterium *E. coli* erlaubt, Taurin als Schwefelquelle zu nutzen (Elkins *et al.*, 2002). In *Pseudomonas stutzeri* WM88 dient das Enzym HtxA dazu, reduzierten Phosphor als Phosphorquelle zu nutzen, indem Phosphit zu Hypophosphit oxidiert wird (Metcalf & Wolfe, 1998). Eine wichtige Gruppe innerhalb der Superfamilie der mononukleären Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen sind die Prolyl- und Lysyl-Hydrolasen aus Pro- und Eukaryoten. Sie modifizieren posttranslational Prokollagen und sind für die Bildung von Fibrillen in eukaryontischen Geweben verantwortlich (Hanuske-Abel & Popowicz, 2003). Besonders interessant ist, dass die bisherigen Kristallstrukturen von Proteinen aus dieser Superfamilie eine hohe Ähnlichkeit vorweisen. Dabei ist immer wieder ein Strukturmotiv zu erkennen, dass als doppelsträngige β -Helix (DSBH) oder auch als „jellyroll“ bezeichnet wird (Clifton *et al.*, 2001; Clifton *et al.*, 2003; Elkins *et al.*, 2003; Valegard *et al.*, 1998; Wilmoth *et al.*, 2002). Da in diesen Proteinen der Co-Faktor Eisen für den Ablauf der Reaktion wichtig ist, so ist es nicht verwunderlich, dass die Koordinierung des Eisens in allen bisher aufgelösten Strukturen fast identisch ist. Für die Koordination des Eisen(II)-Zentrums sind immer drei Aminosäurereste des Enzyms verantwortlich. Durch zwei positive geladene Histidine und einem Aspartat oder Glutamat wird mit dem Eisen eine Seite eines Oktaeders aufgespannt und als „2-His-1-Carboxylat-Triade“ bezeichnet (Costas *et al.*, 2004; Hegg & L. Que, 1997; Que, 2000). Durch Sequenzvergleiche der Proteine innerhalb dieser Superfamilie konnte gezeigt werden, dass diese 2-His-1-Carboxylat-Triade in jeder Subgruppe konserviert ist, was auf eine konvergente Evolution des bevorzugten Metall-Bindemotives schließen lässt (Costas *et al.*, 2004). Diese Triade entspricht dem Motiv aus konservierten Aminosäureresten der Form H X (D/E) X_m H X_n (R/K) X S mit jeweils unterschiedlicher Anzahl für m und n. Das Motiv H X (D/E) X_m H ist daher die für die Bindung des mononukleären Eisen(II)-Zentrums verantwortlich, während das (R/K) X S Motiv für die Koordination des anionischen C5-

Carboxylates des 2-Oxoglutarates zuständig ist. Trotz der vielfältigen katalysierten Reaktionen konnte ein generelles Schema des Eisen(II)-Zentrums mit spektroskopischen und kristallographischen Studien entwickelt werden (Costas *et al.*, 2004; Que, 2000; Solomon *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2003). Das Eisen(II) ist zu Beginn des katalytischen Zyklus sechsfach koordiniert und nicht reaktiv gegenüber Sauerstoff. Durch die Bindung des Substrats und/oder des Co-Substrats wird das Metallzentrum fünffach koordiniert und erhöht damit seine Affinität zu O₂. 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 O₂-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 Kombination aus Sauerstoffaktivierung und sofortiger Reaktion am Substrat macht einen großen Teil der Vielseitigkeit dieses Reaktionsmechanismus aus (Costas *et al.*, 2004; Hegg & L. Que, 1997; Que, 2000).

Das mononukleäre Eisen(II) innerhalb dieser Superfamilie ist essentiell und stellt das aktive Zentrum des Proteins dar (Costas *et al.*, 2004; Solomon *et al.*, 2003). Für die *in vitro* Hydroxylierung von Ectoin zu Hydroxyectoin durch EctD ist die Zugabe von Fe²⁺ (FeSO₄) notwendig. Dabei fungiert das Eisen in der reduzierten Form jedoch eher als Reduktionsmittel und wird nicht nachträglich ins Protein integriert (Bursy *et al.*, 2007).

3.10 Besonderheiten im Zusammenhang mit der Ectoin Synthese

Wie man bereits bei näherer Betrachtung des Ectoin Synthese-Genclusters erkennen kann (Abbildung 9), befindet sich in dem *ect*-Cluster einiger Bakterien ein Gen, das für eine Aspartokinase codiert. Diese Aspartokinase synthetisiert aus dem Vorläufersubstrat L-Aspartat das Intermediat Aspartyl-β-Phosphat. In einem weiteren Reaktionsschritt wird durch die Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Asd) das für die Ectoin bzw. Hydroxyectoin Synthese wichtige Vorläufersubstrat Aspartat-β-Semialdehyd gebildet (Abbildung 12). Aspartat-β-Semialdehyd ist in vielen Mikroorganismen ein wichtiges metabolisches Ausgangssubstrat für verschiedene Stoffwechselwege (Lo *et al.*, 2009). Es werden zum Beispiel aus Aspartat-β-Semialdehyd die Aminosäuren Methionin, Threonin und Lysin synthetisiert (Lo *et al.*, 2009).

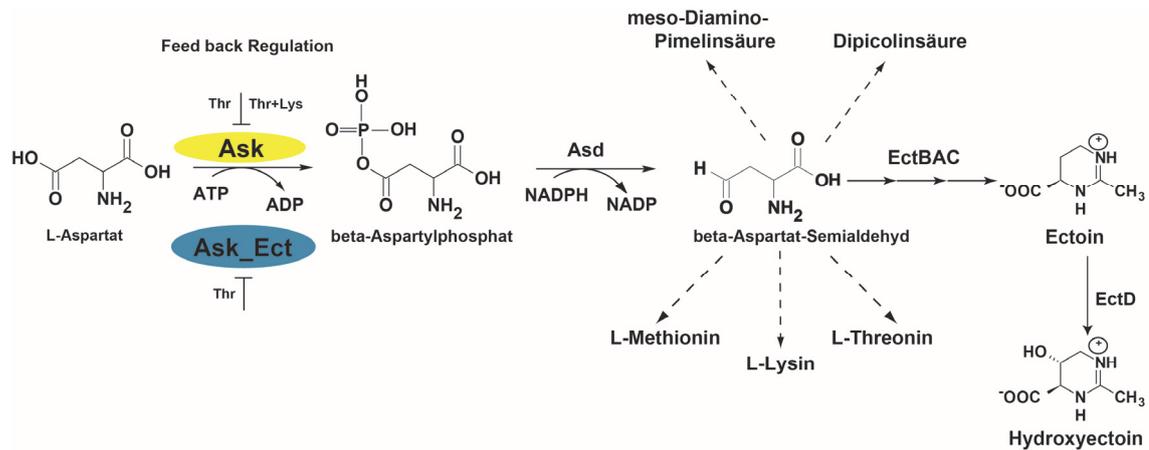


Abbildung 12: Reaktionsweg der Aspartokinasen. Die Aspartokinasen z.B. in *Pseudomonas stutzeri* A1501 synthetisieren aus dem Substrat L-Aspartat das Intermediat beta-Aspartyl-Phosphat, das durch Asd weiter zu beta-Aspartat-Semialdehyd synthetisiert wird. Beta-Aspartat-Semialdehyd dient als Vorläufersubstrat für die Ectoin Synthese und als Ausgangsprodukt vieler wichtiger Stoffwechselprozesse.

Des Weiteren wird Dipicolat gebildet, das in den Sporen von Gram-positiven Bakterien zu finden ist. Die meso-Dipicolinsäure für die Peptidoglycansynthese und aus Lysin abgeleitete Antibiotika sind weitere Produkte dieses wichtigen Intermediats (Cohen & Saint-Girons, 1987). Der zweistufige Reaktionsweg von L-Aspartat über Aspartyl-Beta-Phosphat zu Aspartat- β -Semialdehyd wird durch die Phosphorylierung von L-Aspartat durch das Enzym Ask unter ATP Verbrauch und durch eine reduzierende NADPH-abhängige Reaktion durch das Enzym Asd durchgeführt. Da diese Reaktion für den Metabolismus in den Zellen einen hohen Energieaufwand bedeutet, sind die Aspartokinasen durch Feedback-Mechanismen stark reguliert und die Gene stehen unter transkriptioneller Kontrolle (Lo *et al.*, 2009). Im Laufe der Evolution haben sich jedoch die Aspartokinasen in den Mikroorganismen je nach den Bedürfnissen der Reaktionswege entsprechend angepasst und verändert. Dies hatte zur Folge, dass sich die allosterische Regulation sowie die Kontrolle der Gene auch entsprechend verändert hat (Lo *et al.*, 2009). Als Gram-negativer Vertreter besitzt *E. coli* drei Ask Enzyme, die an die Synthese der Aminosäuren Lysin, Threonin und Methionin beteiligt aber unterschiedlich reguliert sind (Cohen & Saint-Girons, 1987). Das Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus subtilis* besitzt drei Aspartokinasen, die alle unterschiedlich reguliert sind (Zhang *et al.*, 1990). So steht zum Beispiel die durch das Gen *dapC* codierte Ask unter starker allosterischer Kontrolle von meso-Diaminopimelat. Die zweite Aspartokinase, codiert durch das Gen *lysC*, wird durch die Aminosäure Lysin inhibiert, wobei die Expression von *lysC* durch die Antwort auf einen Lysin-spezifischen Riboswitch kontrolliert wird (Phan & Schumann, 2009). Die dritte Ask, codiert durch das Gen *thrD*, wird ebenfalls durch die Aminosäuren Lysin und/oder Threonin allosterisch

reguliert. Zudem wirken die beiden Aminosäuren Lysin und Threonin als Co-Repressoren für die Expression von *thrD*.

Im Genom des Bakteriums *Pseudomonas stutzeri* A1501 existieren zwei Gene für Aspartokinasen. Eins dieser Gene befindet sich in direkter Nachbarschaft des *ectABCD*-Genclusters. Das zweite Gen befindet sich an einer anderen Stelle im Genom. Die Existenz von zwei Aspartokinasen, wovon die Eine vermutlich mit dem Operon des *ect*-Cluster assoziiert ist, könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich dabei um eine speziell für die Ectoin Synthese angepasste Aspartokinase handelt. Die zweite Aspartokinase außerhalb des *ect*-Genclusters könnte somit bei osmotischem Stress durch die zweite Aspartokinase entlastet werden. Zudem wurde angenommen, dass in *P. stutzeri* A1501 der Flaschenhals bei der Ectoin Synthese durch die Aspartokinase im *ect*-Cluster aufgelöst werden könnte. Ein Engpass bei der Ectoin Synthese kann auftreten, wenn nicht mehr genügend Vorläufersubstrat beta-Aspartat-Semialdehyd in der Zelle produziert werden kann (Abbildung 12). Durch die Co-Expression einer Feedback-resistenten Aspartokinase konnte gezeigt werden, dass dieser Engpass aufgelöst und deutlich mehr Ectoin produziert werden konnte (Bestvater *et al.*, 2008).

3.11 Zielsetzung

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die genaue Untersuchung der Synthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin. Ectoin und Hydroxyectoin dienen jedoch nicht nur als osmotische Schutzsubstanzen, sondern stabilisieren auch Proteine, Nukleinsäuren und Lipide vor Stressfaktoren wie Hitze, pH-Wert Schwankungen etc. Daher werden diesen beiden Tetrahydropyrimidine auch als chemische Chaperone bezeichnet. Um Hydroxyectoin aus Ectoin zu synthetisieren, benötigen die Mikroorganismen ein EctD Enzym aus der Familie der Nicht-Häm Eisen (II) enthaltenen Oxidoreduktasen. Da diese Hydroxylase in Mikroorganismen vorkommt, die an extreme Umgebungsbedingungen angepasst sind, sollte dieses Enzym strukturell als auch biochemisch näher analysiert werden. Für die strukturelle Aufklärung sollte die Ectoin-Hydroxylase aus dem moderat halophilen Bakterium *Virgibacillus salexigens* dienen. Das EctD Enzym aus *V. salexigens* sollte überproduziert, gereinigt und für Kristallscreenings eingesetzt werden, um die Kristallstruktur ermitteln zu können. Die Kristallstruktur wurde mit einer Auflösung von 1.8 Å aufgeklärt, jedoch konnten weder der Ligand Ectoin noch das Produkt Hydroxyectoin in der Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase aus *V. salexigens* detektiert werden. Um eine genaue Vorstellung über die Bedeutung vieler hoch-konservierter Aminosäuren rund um das aktive Zentrum der Ectoin-Hydroxylase zu erlangen, sollte eine umfassende Mutagenesestudie der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens* durchgeführt werden. Es sollten zudem weitere Ectoin-Hydroxylasen untersucht werden, um die biochemischen Eigenschaften miteinander zu vergleichen und um die Chance zu erhöhen, in einem weiteren Kristallscreening die Liganden in einer EctD Struktur auflösen zu können. Die Verbesserung von Kristallscreenings kann mit demselben Protein aus anderen Organismen erreicht werden. Daher sollten aus verschiedenen extremophilen Bakterien das entsprechende Gen für die Hydroxylase kloniert, das Protein gereinigt und biochemisch analysiert werden. Viele der Bakterien besitzen in ihren Ectoin Genclustern neben den Proteinen, die für die Synthese von Ectoin verantwortlich sind, auch solche, die für die Vorstufe von Ectoin wichtig sind. Dabei fällt ein Enzym aus der Klasse der Aspartokinasen auf. Dieses Protein synthetisiert aus L-Glutamat, das für die Ectoin Synthese benötigte Vorläufersubstrat L-Aspartyl-Phosphat. Durch dieses Gen im Ectoin-Gencluster kann wahrscheinlich ein vermeintlicher Engpass bei der Ectoin Synthese ausgeräumt werden, da mehr L-Aspartyl-Phosphat synthetisiert wird. Ein Vertreter aus dieser Klasse mit einem entsprechenden Gencluster ist das Bakterium *Pseudomonas stutzeri* A1501. Zusätzlich zu der Ectoin-Hydroxylase aus *P. stutzeri* A1501 sollte die Aspartokinase aus dem *ect*-Gencluster sowie die zweite Aspartokinase aus dem Genom kloniert, die Proteine gereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert werden. Da Ectoin und Hydroxyectoin auch die Fähigkeit besitzen, den gesamten Zellapparat und die enthaltenen Proteine sowie die DNA vor schädlichen Temperatureinflüssen zu bewahren, sollten Wachstumsversuche bei hohen Salzkonzentrationen kombiniert mit hohen Temperaturen mit dem Bakterium *Streptomyces coelicolor* durchgeführt werden. Da *S. coelicolor* neben der Synthese von Ectoin und Hydroxyectoin auch Ectoin aufnehmen kann, sollte festgestellt werden, wann in *S. coelicolor* die Aufnahme induziert wird.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Im Folgenden werden die in dieser Doktorarbeit verwendeten Materialien wie Chemikalien, Enzyme, Medien, usw. aufgelistet.

4.1.1 Chemikalien

Chemikalien und Reagenzien, die in dieser Arbeit verwendet und nicht gesondert im Text vermerkt sind, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), GE Healthcare (München), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und AppliChem (Darmstadt) bezogen. Die Bestandteile von Komplexmedien stammten von Becton Dickinson (Heidelberg). Ectoin und Hydroxyectoin stammten von der Firma bitop (Witten). Anhydrotetracyclin wurde entweder bei IBA (Göttingen) oder Acros Organics (New Jersey, USA) bestellt.

4.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen wurden von Fermentas (St. Leon-Rot), GE Healthcare (München), Eppendorf (Hamburg), Roche (Mannheim), Promega (Mannheim), Stratagene (Amsterdam; NL) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt) bezogen.

4.1.3 Nukleotide und Synthese von Genen

Die Herstellung synthetischer Oligonukleotide erfolgte bei den Firmen MWG Eurofins (München), Biomers (Ulm) und Invitrogen (Karlsruhe). Die Synthese von Genen wurde von der Firma GenScript USA Inc. (Piscataway, USA) durchgeführt.

4.1.4 Medien

Die Kultivierung der verwendeten *E.coli* Stämme erfolgte aerob auf Lysogeny-Broth (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989). Für heterologe Produktionen von Proteinen in *E. coli* wurde das Minimalmedium A (MMA) (Miller, 1992) mit entsprechenden Zusätzen verwendet.

Tabelle 1: Nährmedien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
Lysogeny Broth (LB)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium 15 g Agar
Minimalmedium A (MMA)	10,5 g Na ₂ HPO ₄ 4,5 g KH ₂ PO ₄ 1,0 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 g Na ₃ Citrat 957 ml dH ₂ O

Sollte das LB-Medium als Selektionsmedium verwendet werden, wurden ihm entsprechende Antibiotika zugefügt.

Tabelle 2: Zusätze

Zusatz	Endkonzentration	gelöst in
Ampicillin-Natriumsalz	100 µg/ml	H ₂ O
Kanamycin	50 µg/ml	H ₂ O
Thiamin	1 µg/ml	H ₂ O
Gentamycin	20 µg/ml	H ₂ O
AHT (Anhydrotetracyclin)	0,2 µg/ml	DMF oder Ethanol
X-Gal	25 µg/ml	DMF

Für die Produktion von Proteinen in *E. coli* wurde folgendes Expressionsmedium benutzt.

Tabelle 3: Expressionsmedium für die heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
Expressionsmedium	Minimalmedium A (MMA) 0,4 % (w/v) Casaminsäuren 0,4 % (w/v) Glucose 0,2 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O 1 ml Ampicillin (1mg/ml) / Endkonz.: 1µg/ml

Für die Anzucht von *S. coelicolor* A3(2) in Flüssigmedium wurden Vollmedien (DYT: Double Yeast Trypton; LB: Lysogeny Broth) verwendet. Für die Wachstumsversuche mit *S. coelicolor* A3(2) wurde ein spezielles Minimalmedium (SMMS) benutzt (Hopwood, 1967). Wird *S. coelicolor* A3(2) in Flüssigmedium kultiviert, mussten zur Verhinderung der Mycelbildung entweder ca. 25 Glasperlen oder 10 Metallperlen (Ø 3 mm, Sigma) pro 30 ml Medium im 250 ml Erlenmeyerkolben zugesetzt werden. Zum Inokulieren der Flüssigmedien wurden zuvor Sporensuspensionen von *S. coelicolor* hergestellt und der Titer der Sporen bestimmt um ein homogenes Animpfen zu ermöglichen.

4.1.5 Referenz-Substanzen für die HPLC-Analyse

Für die Durchführung von Standardmessungen sowie Kalibrierungsgeraden mittels HPLC wurden folgende Referenz-Substanzen verwendet.

Tabelle 4: Referenz-Substanzen für die HPLC-Analyse

Substanz	Beschreibung
Ectoin	(S)-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat Summenformel: C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂ Gewonnen aus: <i>Halomonas elongata</i> Molekulare Masse (g mol ⁻¹): 142,2 Bezugsquelle: Bitop (Witten)
Hydroxyectoin	(S,S)-β-2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat Summenformel: C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₃

	<p>Gewonnen aus: <i>Marinococcus</i> M52</p> <p>Molekulare Masse (g mol⁻¹): 158,2</p> <p>Bezugsquelle: Bitop (Witten)</p>
L-Prolin	<p>Summenformel: C₅H₉NO₂</p> <p>Molekulare Masse (g mol⁻¹): 115,3</p> <p>Bezugsquelle: Sigma (München)</p>
Homoectoin	<p>Summenformel: C₇H₁₂N₂O₂</p> <p>(S)-4,5,6,7-Tetrahydro-2-Methyl-1H-(1,3)-Diazepin-4-Carboxylat</p> <p>Molekulare Masse (g mol⁻¹): 156,2</p> <p>Bezugsquelle: Prof. Dr. E. A. Galinski (Universität Bonn)</p>
DHMICA	<p>Summenformel: C₅H₈N₂O₂</p> <p>(RS)-4,5-Dihydro-2-Methyl-Imidazol-4-Carboxylat</p> <p>Molekulare Masse (g mol⁻¹): 128,1</p> <p>Bezugsquelle: Prof. Dr. E. A. Galinski (Universität Bonn)</p>

4.1.6 Puffer

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

Tabelle 5: Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
1x TAE-Puffer	<p>40 mM Tris-Cl</p> <p>20 mM Essigsäure</p> <p>1 mM EDTA</p>
10x Ladepuffer	<p>60 % (v/v) Glycerin</p> <p>50 mM EDTA</p> <p>0,25 % (w/v) Bromphenolblau</p> <p>0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol</p>

6x Loading Dye Solution (Fermentas, St. Leon-Rot)	60 % Glycerin 60 mM EDTA 10 mM Tris-Cl, pH 7,6 0,03 % (w/v) Bromphenolblau 0,03 % (w/v) Xylen-Cyanol FF
--	---

Tabelle 6: Puffer für Proteinaufreinigung

Puffer	Zusammensetzung
1 M TES pH 7,5	N-[Tris(Hydroxymethyl)Methyl]-2-Aminoethansulfonsäure; C ₆ H ₁₅ NO ₆ S (2-[(2-Hydroxy-1,1-Bis(Hydroxymethyl)Ethyl)Amino]-Ethansulfonsäure)
Aufschlusspuffer (Puffer A)	100 mM TES, pH 7,5 2 mM DTT 0,5 mM Benzamidin 0,5 mM PMSF 5 % (vol/vol) Glycerin
Laufpuffer (Puffer L)	20 mM TES Puffer, pH 7,5 80 mM NaCl
Elutionspuffer (Puffer E)	20 mM TES Puffer, pH 7,5 80 mM NaCl 2,5 mM Desthiobiotin
Regenerationspuffer (Puffer R)	20 mM TES Puffer, pH 7,5 80 mM NaCl 2,5 mM HABA

Tabelle 7: Puffer für SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung
1x SDS-Probenpuffer (50 ml) (Fermentas, St. Leon-Rot)	6,25 ml 0,5 M Tris-Cl, pH 6,8 10 ml 10% (w/v) SDS

	5 ml Glycerin 121 mg DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau
1x SDS-Laufpuffer (pro Liter) (Fermentas, St. Leon-Rot)	1 g SDS 3 g Tris 14,4 g Glycin
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)	0,1-0,2 mg/ml pro Protein 62,5 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 7,5 1 mM EDTA 2 % (w/v) SDS 1 mM NaN ₃ 10 mM DTT 33 % Glycerin
PageRuler™ Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)	0,02-0,05 mg/ml pro Protein 62,5 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 7,5 1 mM EDTA 2 % (w/v) SDS 1 mM NaN ₃ 100 mM DTT 33 % (w/v) Glycerin 0,01 % Bromphenolblau
Coomassie Brilliant Blau R 250- Färbelösung (pro Liter)	25 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,5 % (w/v) CuSO ₄ 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250
Entfärbelösung (pro Liter)	12 % (v/v) 2-Propanol 7% (v/v) Essigsäure

4.2 Mikrobiologische Methoden

Der folgende Abschnitt beinhaltet alle verwendeten Bakterienstämme und die Beschreibung der Kultivierung dieser Bakterien.

4.2.1 Bakterienstämme, Vektoren und Plasmide

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen *E. coli* Stämmen gearbeitet. Alle *E. coli* Stämme sind in Tabelle 8, verwendete Vektoren und Plasmide sind in der Tabelle 9 aufgeführt. Die Plasmide aller *V. salexigens* EctD Mutanten sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stämme <i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>recA1 endA1 gyrA96 supE44 thi-1 relA1 lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i>	(Hanahan 1983)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 supE44 relA1 thi-1 lac</i> [<i>F'</i> – <i>proAB lacI</i> ^f Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, (Amsterdam, NL)
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMRmrr</i>) 173 <i>recA1 endA1 gyrA96 supE44 thi-1 relA1 lac</i> [<i>F'</i> – <i>proAB lacI</i> ^f Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, (Amsterdam, NL)
<i>Escherichia coli</i> BL21*	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal endA</i>	Stratagene, (Amsterdam, NL)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)*	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal \lambda</i> (DE3) <i>endA</i>	Stratagene, (Amsterdam, NL)
<i>Escherichia coli</i> Arctic Express (DE3) RIL*	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal \lambda</i> (DE3) <i>endA</i> [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r] [<i>argU ileY leuW</i> Str ^r]	Stratagene, (Amsterdam, NL)

* *E. coli* B Derivat. Diese *E. coli* Stämme sind generelle Protein-Expressionsstämme, denen die Lon und OmpT Protease fehlen.

Tabelle 9: Vektoren und Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pASK-IBA3	<i>Strep-tag</i> [®] II Expressionsvektor für <i>E. coli</i> ; transkriptionelle Kontrolle durch einen <i>tet</i> -Promotor, Induktion mit AHT; Amp ^R	IBA (Göttingen)
pEntry-IBA20	Eintrittsvektor für StarGate [®] -Klonierungssystem von IBA; Kan ^R	IBA (Göttingen)
pASG-IBA3plus	<i>Strep-tag</i> [®] II Akzeptorvektor für StarGate [®] -Klonierungssystem von IBA; Amp ^R ; transkriptionelle Kontrolle durch einen <i>tet</i> -Promotor, Induktion mit AHT	IBA (Göttingen)
pBJ10	Vektor: pASK-IBA3; Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler <i>V. salelixgens</i> DNA (0,9 kb); <i>ectD</i>	Bursy 2005
pMP32	Vektor: pASK-IBA3 Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler <i>H. elongata</i> DNA; <i>ectD</i>	diese Arbeit
pMP34	Vektor: pEntry-IBA20 Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 DNA (0,9 kb); <i>ectD</i>	diese Arbeit
pMP35	Vektor: pEntry-IBA20 Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 DNA (1431 kb); <i>ask_ect</i>	diese Arbeit
pMP36	Vektor: pEntry-IBA20 Insert: synthetisch hergestellte <i>Geobacillus sp.</i> Y412MC10 DNA (GenScript, Piscataway, USA); <i>ectD</i> (Accession: JN019032)	diese Arbeit
pMP37	Vektor: pEntry-IBA20 Insert: synthetisch hergestellte <i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1 DNA (GenScript, Piscataway, USA); <i>ectD</i> (Accession: JN019031)	diese Arbeit
pMP38	Vektor: pEntry-IBA20 Insert: synthetisch hergestellte <i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5 DNA (GenScript, Piscataway, USA); <i>ectD</i> (Accession: JN019030)	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMP39	Vektor: pEntry-IBA20 Insert: synthetisch hergestellte <i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1 DNA (GenScript, Piscataway, USA); <i>ectD</i> (Accession: JN019033)	diese Arbeit
pMP40	Vektor: pASK-IBA3 Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler <i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256 DNA; <i>ectD</i>	diese Arbeit
pMP41	Vektor: pASG-IBA3 Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 DNA (0,9 kb); <i>ectD</i>	diese Arbeit
pMP42	Vektor: pASG-IBA3 Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 DNA (1439 kb); <i>ask_ect</i>	diese Arbeit
pMP43	Vektor: pASG-IBA3 Insert: synthetisch hergestellte <i>Geobacillus sp.</i> Y412MC10 DNA (GenScript, Piscataway, USA); <i>ectD</i> (Accession: JN019032)	diese Arbeit
pMP44	Vektor: pASG-IBA3 Insert: synthetisch hergestellte <i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1 DNA (GenScript, Piscataway, USA); <i>ectD</i> (Accession: JN019031)	diese Arbeit
pMP45	Vektor: pASG-IBA3 Insert: synthetisch hergestellte <i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1 DNA (GenScript, Piscataway, USA); <i>ectD</i> (Accession: JN019033)	diese Arbeit
pMP48	Vektor: pASG-IBA3 Insert: synthetisch hergestellte <i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5 DNA (GenScript, Piscataway, USA); <i>ectD</i> (Accession: JN019030)	diese Arbeit
pMP-ask1	Vektor: pASK-IBA3 Insert: PCR-Produkt mit chromosomaler <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 DNA (1230 kb); <i>ask_lysC</i>	diese Arbeit

Tabelle 10: Plasmide aller *V. sallexigens* EctD Mutanten

Plasmid	Mutation	Referenz
pBJ10	Wildtyp <i>ectD</i>	Bursy 2005
pMP1	Phe ¹⁴³ [TTT]→Ala [TAT]	Pittelkow 2007
pMP2	Arg ²⁵⁹ [CGT]→Ala [GCG]	Pittelkow 2007
pMP3	Phe ¹⁴³ [TTT]→Tyr [GCG]	Pittelkow 2007
pMP4	Arg ²⁵⁹ [CGT]→Lys [AAG]	Pittelkow 2007
pMP5	Arg ²⁵⁹ [CGT]→His [CAC]	Pittelkow 2007
pMP6	Arg ²⁵⁹ [CGT]→Gln [CAA]	Pittelkow 2007
pMP7	Phe ²⁶³ [TTC]→Ala [GCC]	Pittelkow 2007
pMP8	Asn ²⁶¹ [AAT]→Ala [GCT]	Pittelkow 2007
pMP9	Asn ¹³³ [AAT]→Ala [GCT]	Pittelkow 2007
pMP10	Arg ¹³¹ [CGA]→Ala [GCA]	Pittelkow 2007
pMP11	Trp ¹⁵² [TGG]→Ala [GCG]	Pittelkow 2007
pMP12	Gln ¹²⁹ [CAA]→Ala [GCA]	Pittelkow 2007
pMP13	Ser ¹⁶⁷ [TCT]→Ala [GCT]	Pittelkow 2007
pMP14	Phe ⁹⁵ [TTT]→Ala [GCG]	Pittelkow 2007
pMP15	Phe ¹⁴³ [TTT]→Trp [GCG]	Pittelkow 2007
pMP16	Asn ¹⁷³ [AAC]→Ala [GCC]	Pittelkow 2007
pMP17	His ¹⁴⁶ [CAT]→Ala [GCT]	Pittelkow 2007
pMP18	Asp ¹⁴⁸ [GAT]→Glu [GAG]	Pittelkow 2007
pMP19	Asp ¹⁴⁸ [GAT]→Glu [GCT]	Pittelkow 2007
pMP20	Asp ²⁴⁸ [CAT]→Glu [GCT]	Pittelkow 2007
pMP21	Phe ²⁶³ [TTC]→Tyr [TAC]	Pittelkow 2007
pMP22	Phe ²⁶³ [TTC]→Trp [TGG]	Pittelkow 2007
pMP23	Phe ¹⁵² [TGG]→Trp [TTC]	Pittelkow 2007
pMP24	Phe ¹⁵² [TGG]→Tyr [TAC]	Pittelkow 2007
pMP25	Thr ¹⁹⁷ [ACA]→Ala [GCA]	Pittelkow 2007

<i>Plasmid</i>	<i>Mutation</i>	<i>Referenz</i>
pMP26	Ser ²⁰⁵ [TCA]→Ala [GCA]	Pittelkow 2007
pMP27	Leu ²⁰⁶ [TTG]→Ala [GCA]	Pittelkow 2007
pMP28	Leu ²⁰⁶ [TTG]→Gly [GGG]	Pittelkow 2007
pMP29	Pro ¹⁹⁸ [CCT]→Ala [GCT]	Pittelkow 2007
pMP30	Ser ²⁵⁰ [TCA]→Ala [GCA]	diese Arbeit

4.2.2 Kultivierung der Bakterien

Die verwendeten Medien, Lösungen und Kunststoff-Laborgeräte wurden mittels feuchter Hitze bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert. Die Sterilisation hitzeempfindlicher Lösungen (Antibiotika, Spurenelementlösung) erfolgte mittels Sterilfiltration (0,22 µm Porendurchmesser) und wurde dem abgekühlten Medium hinzugefügt. Laborgeräte wie Glaskolben, Metall und Keramik wurden im Hitzesterilisator für mindestens 3 Stunden bei 180°C trockener Hitze sterilisiert.

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme erfolgte aerob bei 37°C auf LB-Medium und bei Bedarf mit entsprechenden Zusätzen (Tabelle 2). Für Flüssigkulturen wurden die Bakterien in Erlenmeyerkolben (mindestens 10 x größeres Kolbenvolumen als Kulturvolumen: 100 ml Kolben für 10 ml Ansatz) auf horizontalen Kreisschüttlertischen bei 200-300 rpm oder im Reagenzglas auf einem Roller inkubiert, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Das Animpfen des Mediums erfolgte bei *E. coli*-Flüssigkulturen direkt mit einer Einzelkolonie. Die Produktion von Proteinen erfolgte in 2 L Erlenmeyerkolben mit einer 1 L Kultur schüttelnd bei 180 rpm. Für *E. coli* erfolgte die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm. Für die Stammhaltung wurden die Bakterien auf Festmedien kultiviert, wobei das Animpfen der Agarplatten nach der 3-Strich-Technik oder durch das Ausplattieren mit Hilfe des Drigalskispatels erfolgte. Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte maximal vier Wochen bei 4°C auf entsprechenden Festmedien. Für längere Lagerzeiten wurden die Bakterien bei -80°C aufbewahrt. Dafür wurde 1 ml einer frischen Bakterienkultur mit einer sterilen 80 % Glycerin-Lösung so verdünnt, dass die Endkonzentration von Glycerin 10 % betrug.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurde verschiedene synthetische Oligonukleotide verwendet, welche in Tabelle 11 aufgeführt sind.

Tabelle 11: Synthetische Oligonukleotide

Die unterstrichenen Sequenzen führten bei Mutagenesen zu Basenaustauschen. Die Abkürzung fwd steht für forward und rev für reverse.

Bezeichnung	Sequenz 5' zu 3' Richtung	Bemerkung
pASK-IBA fwd	GTGAAATGAATAGTTCGAC	Sequenzierprimer für pASK-IBAVektoren; Sequenz nach IBA, Göttingen
pASK-IBA rev	CGCAGTAGCGGTAAACGG	Sequenzierprimer für pASK-IBAVektoren; Sequenz nach IBA, Göttingen
Entry-Primer-fwd	GGTTATTGTCTCATGAGCG	Sequenzierprimer für pEntry-Vektoren
Entry-Primer-rev	CCCCTGATTCTGTGGATAACCG	Sequenzierprimer für pEntry-Vektoren
F143A fwd	GGATTTAAAGGAAAGGAG <u>GCG</u> ACTGG CATTCTGATTTTCG	Austausch von F143 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward-primer
F143A rev	CGAAATCAGAATGCCAGT <u>CGC</u> CTCCTT TCCTTTAAATCC	Austausch von F143 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse-primer
R259A fwd	GCATGGTTCAACCAGCAATATTACACCA TATCCAG <u>CTA</u> AATAATTTATTCATGG	Austausch von R259 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward-primer
R259A rev	CCATGAATAAATTATTAG <u>CT</u> GGATATGG TGTAATATTGCTGGTTGAACCATGC	Austausch von R259 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse-primer
F143Y fwd	GGATTTAAAGGAAAGGAG <u>TAT</u> ACTG GCATTCTGATTTTCG	Austausch von F143 gegen Tyrosin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward-primer

F143Y rev	CGAAATCAGAATGCCAGTC <u>ATA</u> CTCCTT TCCTTTAAATCCC	Austausch von F143 gegen Tyrosin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
R259K fwd	GCATGGTTCAACCAGCAATATTACACCA TATCCAA <u>AGA</u> AATAATTTATTCATGG	Austausch von R259 gegen Lysin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
R259K rev	CCATGAATAAATTATT <u>CTT</u> TGGATATGGT GTAATATTGCTGGTTGAACCATGC	Austausch von R259 gegen Lysin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
R259H fwd	GCATGGTTCAACCAGCAATATTACACCA TATCC <u>ACA</u> CAATAATTTATTCATGG	Austausch von R259 gegen Histidin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
R259H rev	CCATGAATAAATTATT <u>TGT</u> TGGATATGG TGTAATATTGCTGGTTGAACCATGC	Austausch von R259 gegen Histidin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
R259Q fwd	GCATGGTTCAACCAGCAATATTACACCA TATCC <u>ACA</u> GAATAATTTATTCATGG	Austausch von R259 gegen Glutamin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
R259Q rev	CCATGAATAAATTATT <u>CTG</u> TGGATATGG TGTAATATTGCTGGTTGAACCATGC	Austausch von R259 gegen Glutamin; reverse- primer
F263A fwd	CCATATCCACGTAATAATTTA <u>GCC</u> ATGG TGTATAATAGTG	Austausch von F263 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
F263A rev	CACTATTATACACCAT <u>GGC</u> TAAATTATTA CGTGGATATGG	Austausch von F263 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
N261A fwd	CCAGCAATATTACACCATATCCACGTAA T <u>GCT</u> TATTCATGGTG	Austausch von N261 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
N261A rev	CACCATGAATAA <u>AGC</u> ATTACGTGGATAT GGTGTAATATTGCTGG	Austausch von N261 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
N133A fwd	GTGTATGTACATCAATCCCGAATT <u>GCT</u> T ATAAACCGGGATTTAAAGG	Austausch von N133 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
N133A rev	CCTTTAAATCCCGGTTTATA <u>AGC</u> AATTC GGGATTGATGTACATACAC	Austausch von N133 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
R131A fwd	GGAAGCGATGTGTATGTACATCAATCC <u>G</u> <u>CA</u> ATTAATTATAAACCGGG	Austausch von R131 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer

R131A rev	CCCGGTTTATAATTAATT <u>G</u> CGGATTGAT GTACATACACATCGCTTCC	Austausch von R131 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
W152A fwd	GCATTCTGATTTCGAGACAG <u>C</u> GCATGTA GAAGATGGAATGC	Austausch von W152 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
W152A rev	GCATTCCATCTTCTACATG <u>C</u> GCTGTCTC GAAATCAGAATGC	Austausch von W152 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
Q129A fwd	GCGATGTGTATGTACATG <u>C</u> ATCCCGAAT TAATTATAAACCGGG	Austausch von Q129 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
Q129A rev	CCCGGTTTATAATTAATT <u>C</u> GGGATG <u>C</u> AT GTACATACACATCGC	Austausch von Q129 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
S167A fwd	CGGATGCGAGCCATCAGTGTAG <u>C</u> TATT GCTCTATCAG	Austausch von S167 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
S167A rev	CTGATAGAGCAATAG <u>C</u> TACACTGATGGC TCGCATCCG	Austausch von S167 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
F95A fwd	GCAATGACATCCGTTCTATT <u>G</u> CCACGT TCATCAGGATG	Austausch von F95 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
F95A rev	CATCCTGATGAACGTGG <u>G</u> CAATAGAAC GGATGTCATTGC	Austausch von F95 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
F143W fwd	GATTTAAAGGAAAGGAGTGGGACTGGC ATTCTGATTTCCG	Austausch von F143 gegen Tryptophan in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
F143W rev	CGAAATCAGAATG <u>C</u> CAGTCCCACTCCTT TCCTTTAAATC	Austausch von F143 gegen Tryptophan in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
N173A fwd	CTATTGCTCTATCAGATG <u>C</u> CTATTCGTTT AACGGACC	Austausch von N173 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
N173A rev	GGTCCGTTAAACGAATAG <u>G</u> CATCTGATA GAGCAATAG	Austausch von N173 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer

H146A fwd	GGAAAGGAGTTT <u>GACTGGG</u> CITCTGATT TCGAGAC	Austausch von H146 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward-primer
H146A rev	GTCTCGAAATCAGA <u>AAGCC</u> CAGTCAA ACTCCTTTCC	Austausch von H146 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse-primer
D148E fwd	GTTTGACTGGCATTCT <u>GAG</u> TTCGAGACA TGGCATG	Austausch von D148 gegen Glutamat in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
D148E rev	CATGCCATGTCTCGAA <u>CTC</u> AGAATGCCA GTCAAAC	Austausch von D148 gegen Glutamat in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
D148A fwd	GTTTGACTGGCATTCT <u>GCT</u> TTTCGAGACA TGGCATG	Austausch von D148 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
D148A rev	CATGCCATGTCTCGAA <u>AGC</u> AGAATGCCA GTCAAAC	Austausch von D148 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
H248A fwd	GTTTGAAAGTAACACAAT <u>GGCT</u> GGTTCA ACCAGCAATATTAC	Austausch von H248 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
H248A rev	GTAATATTGCTGGTTGA <u>ACCAG</u> CCATTG TGTTACTTTCAAAC	Austausch von H248 gegen Alanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
F263Y fwd	CCATATCCACGTAATAATTTAT <u>AC</u> ATGGT GTATAATAGTGTTAAAAATC	Austausch von F263 gegen Tyrosin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
F263Y rev	GATTTTTAACACTATTATACACCAT <u>GTAT</u> AAATTATTACGTGGATATGG	Austausch von F263 gegen Tyrosin in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
F263W fwd	CCATATCCACGTAATAATTTAT <u>GGAT</u> GG TGATAATAGTGTTAAAAATCG	Austausch von F263 gegen Tryptophan in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward- primer
F263W rev	CGATTTTTAACACTATTATACACCAT <u>CCA</u> TAAATTATTACGTGGATATGG	Austausch von F263 gegen Tryptophan in EctD <i>V. salexigens</i> ; reverse- primer
W152F fwd	CTGGCATTCTGATTT <u>CGAGACATT</u> CCAT GTAGAAGATGG	Austausch von W152 gegen Phenylalanin in EctD <i>V. salexigens</i> ; forward-primer

W152F rev	CCATCTTCTACATGGAATGTCTCGAAAT CAGAATGCCAG	Austausch von W152 gegen Phenylalanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse-primer
W152Y fwd	GGCATTCTGATTCGAGACATACCATGT AGAAGATGGAATGCC	Austausch von W152 gegen Tyrosin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
W152Y rev	GGCATTCCATCTTCTACATGGTATGTCT CGAAATCAGAATGCC	Austausch von W152 gegen Tyrosin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
T197A fwd	GTGAGTTGTGTAGGTGAAGCACCTGATA ATAACTATAAAGAATC	Austausch von T197 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
T197A rev	GATTCTTTATAGTTATTATCAGGTGCTTC ACCTACACAACTCAC	Austausch von T197 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
S205A fwd	CCTGATAATAACTATAAAGAAGCATTGA AGAAGCAGAAGCTGGG	Austausch von S205 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
S205A rev	CCCAGCTTCTGCTTCTTCAATGCTTCTTT ATAGTTATTATCAGG	Austausch von S205 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
L206A fwd	GATAATAACTATAAAGAATCAGCGAAGA AGCAGAAGCTGGGCG	Austausch von L206 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer;
L206A rev	GCCCAGCTTCTGCTTCTTCGCTGATTCT TTATAGTTATTATC	Austausch von L206 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer;
L206G fwd	GATAATAACTATAAAGAATCAGGGAAGA AGCAGAAGCTGGGCG	Austausch von L206 gegen Glycin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
L206G rev	GCCCAGCTTCTGCTTCTTCCTGATTCT TTATAGTTATTATC	Austausch von L206 gegen Glycin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
P198A fwd	GTGAGTTGTGTAGGTGAAACAGCTGATA ATAACTATAAAGAATC	Austausch von P198 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward- primer
P198A rev	GATTCTTTATAGTTATTATCAGCTGTTTC ACCTACACAACTCAC	Austausch von P198 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse- primer
S250A fwd	GTAACACAATGCATGGTGCAACCAGCAA TATTACACC	Austausch von S250 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; forward-primer

S250A rev	GGTGAATATTGCTGGTTGCACCATGCA TTGTGTTAC	Austausch von S250 gegen Alanin in EctD V. <i>salexigens</i> ; reverse-primer
ectD_Halo_fwd	ATGGTAGGTCTCAAATGTCAGTGCAGAC ATCGTCCAACC	Klonierungsprimer (forward) für <i>ectD</i> aus <i>Halomonas elongata</i> über <i>Bsal</i>
ectD_Halo_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTGCCATCCGG CGACCACGCC	Klonierungsprimer (reverse) für <i>ectD</i> aus <i>Halomonas elongata</i> über <i>Bsal</i>
ectD_Spha_fwd	ATGGTAGGTCTCAAATGCAAGACCTCTA CCCCTCGCGC	Klonierungsprimer (forward) für <i>ectD</i> aus <i>Sphingopyxis alaskensis</i> über <i>Bsal</i>
ectD_Spha_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTGCCGGCAC CGTTTCGACGAG	Klonierungsprimer (reverse) für <i>ectD</i> aus <i>Sphingopyxis alaskensis</i> über <i>Bsal</i>
ask_lysC_fwd	ATGGTAGGTCTCAAATGAACCAACCTGC TGCTGGAGCAC	Klonierungsprimer (forward) für <i>ask_LysC</i> aus <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 über <i>Bsal</i>
ask_lysC_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTGGCTGCGGC GATCACGTCGC	Klonierungsprimer (reverse) für <i>ask_LysC</i> aus <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 über <i>Bsal</i>
ask_ect_fwd	AAGCTCTTCAATGCATACCGTGAAAAAG ATCGGC	Klonierungsprimer (forward) für <i>ask_ect</i> aus <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 über <i>Lgul</i>
ask_ect_rev	AAGCTCTTCAACCCGGCTGCGGCGATCA CGTCGCCATGG	Klonierungsprimer (reverse) für <i>ask_ect</i> aus <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 über <i>Lgul</i>

4.3.2 Präparation, Extraktion und Konzentrationsbestimmung von DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* für Klonierungen oder Sequenzierungen wurde das QIAGEN-Säulen (tip-100) Plasmid Midi-Kit der Firma Qiagen (Hilden), oder das GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der DNA erfolgten mit dem Nanodrop® ND-1000 Spektrophotometer der Firma Nanodrop® (Wilmington).

4.3.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Gelkammern mit einem Elektrodenabstand von 12 cm verwendet. Die DNA-Proben wurden zum Beladen der Geltaschen mit 10x Ladepuffer oder mit 6x Loading Dye

Solution von Fermentas (St. Leon-Rot) versetzt (Tabelle 5). Die Proben wurden dann in Taschen von 1% Agarosegelen in 1x TAE-Puffer (Tabelle 5) pipettiert und bei einer Spannung von 120 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Ethidiumbromid lag als 10 mg/ml Stammlösung vor. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Agarosegel mit diesem interkalierenden Farbstoff angefärbt. Als Größenstandard dienten die DNA-Marker Lambda-Pst von Fermentas oder Genruler (St. Leon Rot). Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA durch das Ethidiumbromid bei UV-Durchlicht mit einer Wellenlänge von 302 nm mit einer Video-Dokumentationsanlage (INTAS) fotografiert.

4.3.4 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Der Restriktionsverdau von Plasmid- oder linearer DNA erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben. Dabei wurden die Ansätze nach Angaben des Herstellers inkubiert und anschließend zur Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt.

Für die Ligation von DNA Fragmenten wurde entweder die T4-Ligase von Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland) oder von USB (Affymetrix, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

4.3.5 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung elektro-kompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium (Tabelle 1) mit den entsprechenden *E. coli*-Zellen angeimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,5-0,6 bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Kultur 15 Minuten auf Eis abgekühlt und für 20 Minuten bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann 3 mal mit jeweils 500 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 50 ml eiskaltem Wasser aufgenommen, in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und ein letztes Mal zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde nun in 2 ml sterilem 10% Glycerin resuspendiert, zu jeweils 50 µl aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

4.3.6 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die $CaCl_2$ -Methode benutzt, wie sie von Sambrook beschrieben wurde (Sambrook & Russell, 2001). Dabei wurde die *E. coli* Kultur von einer Übernachtskultur auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis OD_{578} von 0,5 inkubiert. Anschließend erfolgte das Abzentrifugieren der Kultur und das Pellet wurde in eiskalter 1 M $CaCl_2$ Lösung resuspendiert. Anschließend wird erneut abzentrifugiert und die Zellen in 200 µl Fraktionen mit 10 % Glycerin bei -80°C aufbewahrt oder direkt verwendet.

4.3.7 Transformation von elektro-kompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde 0,3 µl der Plasmid-DNA verwendet. 50 µl elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA vermischt und in einer gekühlten Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite (Gene Pulser[®] Cuvette; BioRad, München) überführt. Danach erfolgte umgehend die Elektroporation am Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, München) mit einem Puls von 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF. Sofort wurde der Ansatz mit 1 ml auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium gemischt, für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, auf Selektivagarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der erhaltenen Transformanten wurde die Plasmid-DNA isoliert und per Restriktionsanalyse (4.3.4) und/oder Sequenzierung (4.3.9) überprüft.

4.3.8 Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen

Um die chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen zu transformieren, wurde nach dem Protokoll von Sambrook vorgegangen (Sambrook & Russell, 2001). Dabei wurden ca. 1 µg DNA mit den kompetenten Zellen vermischt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte ein kurzer Hitzepuls von 42°C für 30 s und eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min. Sofort wurde der Ansatz mit 0,5 ml auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium gemischt, für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, auf Selektivagarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der erhaltenen Transformanten wurde die Plasmid-DNA isoliert und per Restriktionsanalyse (4.3.4) und/oder Sequenzierung (4.3.9) überprüft.

4.3.9 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden mit dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger von der Firma MWG Eurofins (München) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit dem VectorNTI Software Paket (Invitrogen, Karlsruhe) analysiert.

4.3.10 Konstruktion von Expressionsplasmiden und Klonierung in das Stargate[®] System von IBA

Für die Konstruktion der Expressionsplasmide für die Überexpression gewünschter Proteine wurde das Stargate[®] Klonierungssystem der Firma IBA (Göttingen) verwendet. Der Vorteil des Stargate[®] Klonierungssystems bestand darin, dass der pEntry Vektor als Ausgangsvektor für eine ganze Auswahl von Zielvektoren diente. Dadurch war es möglich, verschiedene Tags C- und N-terminal zu fusionieren und miteinander zu kombinieren oder verschiedene Promotoren auszuwählen. In dieser Arbeit wurden die Vektoren pASK-IBA3 und pASG-IBA3 als Zielvektoren benutzt (Abbildungen 13 und 14). Beide Vektoren sind grundsätzlich gleich aufgebaut. Sie

enthalten die codierenden Sequenzen für einen C-terminalen *Strep*-tag und stehen unter der Kontrolle eines AHT-induzierbaren *tet* Promoters.

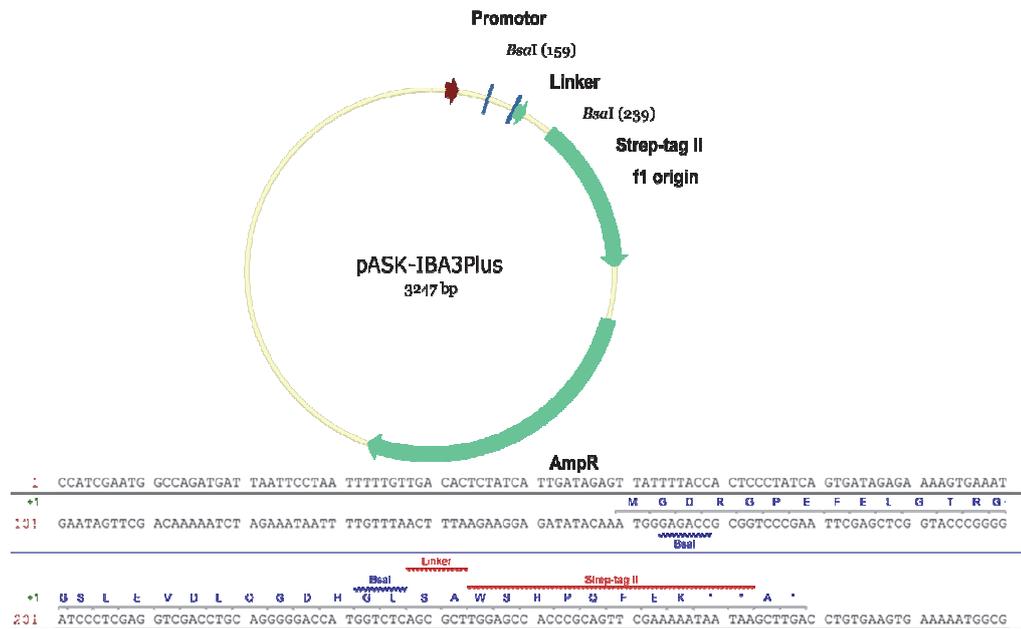


Abbildung 13: Expressionsplasmid pASK-IBA3 der Firma IBA (Göttingen). Der Vektor pASK-IBA3 beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen *Strep*-tag an das gewünschte Protein zu fusionieren.

Der Unterschied zwischen dem Vektor pASG-IBA3 und pASK-IBA3 besteht darin, dass der Vektor pASG-IBA3 für das Stargate Klonierungssystem (IBA, Göttingen) angepasst wurde.

Um das gewünschte Gen mittels Stargate® Klonierung in den Vektor pASG-IBA3 zu klonieren, wurde dieses zunächst über *Lgul* Schnittstellen in den Zwischenvektor pEntry kloniert. Der pEntry Vektor trug das α -Fragment für die β -Galaktosidase und ermöglichte durch den Zusatz von X-Gal den Blau-Weiß Test auf Agarplatten. Zusätzlich war im pEntry Plasmid die Sequenz der Kanamycin Resistenzcassette zur Antibiotikaselektion enthalten. Um das gewünschte DNA Segment vom pEntry Vektor in den Zielvektor pASG-IBA3 zu inserieren, wurden der zuvor sequenzierte pEntry Vektor mit inseriertem Gen zusammen mit dem pASG-IBA3 Vektor in einem Ansatz mithilfe des Restriktionsenzym *Esp3I* geschnitten und durch Zusatz von T4-Ligase ligiert. Durch dieses kombinatorische Klonierungssystem kam es dazu, dass das aus dem pEntry Vektor herausgeschnittene DNA Fragment in den geöffneten Zielvektor pASG-IBA3 inseriert und ligiert wurde, wobei die Schnittstelle für das *Esp3I* Enzym wegfiel. Je länger die Reaktion dauerte, desto mehr Insertionsereignisse fanden statt und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Insertion stieg.

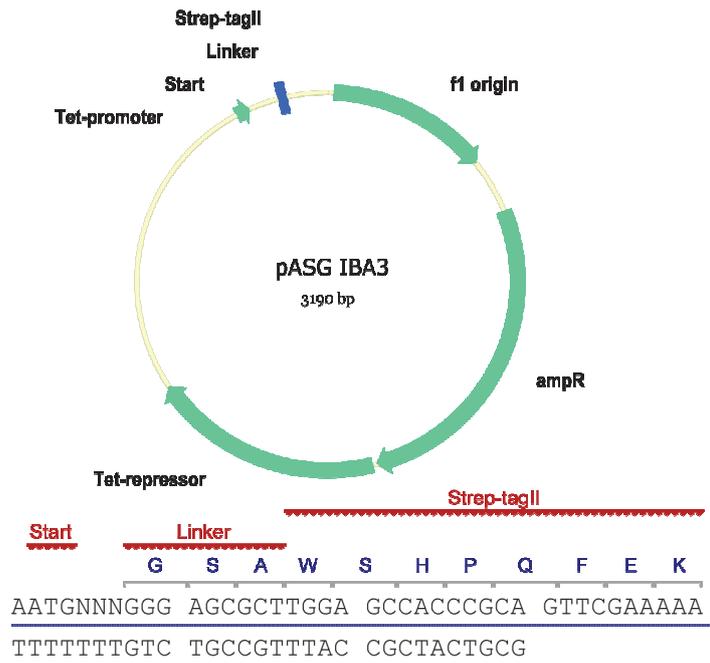


Abbildung 14: Expressionsplasmid pASG-IBA3 der Firma IBA (Göttingen). Der Vektor pASG-IBA3 beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen *Strep-tag* an das gewünschte Protein zu fusionieren. Dieser Vektor ist kompatibel mit dem Stargate Klonierungssystem der Firma IBA (Göttingen).

Für die Klonierung in den Vektor pASK-IBA3 wurde dieser mittels des Restriktionsenzym *Bsal* geöffnet und die per PCR amplifizierte DNA Fragmente mit kompatiblen Schnittstellen für *Bsal* in sense und antisense Richtung in den Vektor ligiert.

4.3.11 Synthese von DNA Sequenzen durch die Firma Genscript

Einige DNA Sequenzen für das *ectD* Gen aus verschiedenen Organismen wurden durch die Firma Genscript (NJ, USA) synthetisiert. Dazu wurde zunächst *in silico* die gewünschte DNA Sequenz über ein Webinterface an die Firma Genscript übermittelt, die nach einem Firmeneigenen System die DNA Sequenz für den gewünschten Wirtsorganismus optimieren. Dabei wurde die Codon Usage, die Sekundärstruktur, der G-C Gehalt und weitere störende Einflüsse berücksichtigt und angepasst. Die *ectD* Sequenzen wurden nach der Synthese in einem pUC57 Vektor geliefert. Für die Klonierung in die Zielvektoren wurden die gewünschten Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Lgul* in sense und antisense Richtung in die Sequenz des Gens eingefügt. Dadurch war es möglich, den pUC57 Vektor zusammen mit dem pEntry Vektor des Stargate® Systems als Zielvektor mit *Lgul* zu verdauen und anschließend mit dem *E. coli* Stamm DH5α zu transformieren. Nach der Ligation wurde der Zielvektor durch Sequenzierung auf Richtigkeit geprüft.

4.3.12 Ortsgerichtete Mutagenese in *ectD*

Zur Einführung von Punktmutationen in *ectD* wurde durch eine abgewandelte PCR eine lineare Amplifikation des Vektors mit dem inserierten Zielgen durchgeführt (Tabelle 12). Dazu wurden modifizierte Oligonukleotide (Tabelle 11) verwendet, die die mutierte DNA-Sequenz enthielten und so die Punktmutation an der gewünschten Stelle verursachten. Die Mutagenese wurde mit dem QuikChange®-Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Ausgangs-DNA diente das Plasmid pBJ10 (*ectD*⁺; Bursy 2005). Die Plasmid-DNA der Transformanden wurde per QIAprep Spin Miniprep-Kit von Qiagen (Hilden) isoliert und anschließend sequenziert (MWG Eurofins, München).

Tabelle 12: PCR-Programm zur gerichteten Mutagenese

	Schritt	Temperatur	Zeitdauer
	1. Initiale Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	2. Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	3. Primer-Anlagerung	55°C	1 min
*	4. Polymerisation	68°C	252 Sekunden
	5. Finale Polymerisation	68°C	600 Sekunden
	6. Aufbewahrung	4°C	∞

* = 16x wiederholt

4.4 Biochemische Methoden

Die Methoden, die unter anderem zur Produktion und Aufreinigung eines Proteins führen, werden im folgenden Abschnitt erläutert.

4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen und zur Größenbestimmung von Proteinen wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dazu wurden 12-15% SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet, die in Mini-Protean III Elektrophorese-Apparaturen der Firma BioRad (München) gegossen wurden. In Tabelle 13 ist die Zusammensetzung der Gele aufgeführt und die verwendeten Puffer sind in Tabelle 7 zu finden. Die Proben wurden in 1x SDS-Probenpuffer (Tabelle 7) aufgenommen und bei 95°C für 5 Minuten inkubiert, um Proteine zu denaturieren und Disulfidbrücken durch im Puffer enthaltenes DTT zu reduzieren. Als Größenmarker wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder oder Page-Ruler™ Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet (Tabelle 7). Es wurden jeweils 15 µl der Probe pro Spur in die Geltaschen gegeben, während von dem Größenmarker 4 µl aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte in der Mini-Protean III-Apparatur mit 1x SDS-Laufpuffer.

Die Proben wurden zunächst mit einer Stromstärke von 25 mA aufgetrennt, die auf eine Stromstärke von bis zu 40 mA erhöht wurde, sobald die Bande des Farbstoffs Bromphenolblau das Trenngel erreichte. Nachdem die Markerbande den unteren Rand des Trenngels erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel unter Schütteln 15 min in eine Coomassie Brillant Blau R 250-Färbelösung gelegt und danach mit einer Entfärbelösung 20 min entfärbt, um überschüssigen und ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach der Färbung wurden die Gele gescannt und für die weitere Aufbewahrung in Plastiktüten luftdicht verschlossen.

Tabelle 13: SDS-PAGE nach Laemmli

<i>Komponenten</i>	<i>Volumen</i>
Trenngel	
1,5 M Tris-Cl, pH 8,8	1,25 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	2 ml
H ₂ O	1,75 ml
TEMED	3,5 µl
10 % APS	30 µl

Sammelgel	
0,5 M Tris-Cl, pH 6,8	250 µl
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	100 µl
H ₂ O	650 µl
TEMED	6 µl
10 % APS	12 µl

4.4.2 Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli*

Für die heterologe Produktion von Proteinen wurde der entsprechende *E. coli*-Stamm (Tabelle 8) mit entsprechendem Plasmid im Expressionsmedium (Tabelle 3) mit den benötigten Zusätzen kultiviert (Tabelle 2). Zum generellen Nachweis der Überproduktion eines Proteins wurden Kulturvolumina von 10-250 ml eingesetzt, wobei die Kulturen für die spätere Proteinaufreinigung auf ein Volumen von bis zu 1000 ml im 2 L Erlenmeyerkolben oder 4 L im Fermenter hochgesetzt wurden. Als Vorkultur wurden 250 ml Expressionsmedium mit entsprechendem Antibiotika mit einer frisch transformierten *E. coli*-Kolonie von Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd bei ca. 200 rpm inkubiert. Aus der Vorkultur wurde die Hauptkultur mit dem Expressionsmedium auf eine OD₅₇₈ von 0,15 angeimpft und nach dem Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,7 die Produktion des Zielproteins durch die Zugabe von 100 µl AHT (2mg/ml) pro L induziert. Die Kultur wurde dann für 2 Stunden bei 32°C bis zur Zellernte schüttelnd inkubiert. Zur Kontrolle der Produktion erfolgten Probenentnahmen vor der Zugabe von AHT und 2 h nach der Induktion. Die Aliquots der Produktionskontrollen wurden zentrifugiert und das Pellet mit einer Protein-Endkonzentration von 1 g/ml in 1x SDS-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte nach einer SDS-PAGE über Coomassie-Färbung (4.4.1).

4.4.3 Reinigung der Ectoin-Hydroxylasen sowie der EctD Mutanten von *V. salexigens* aus *E. coli* DH5α

Alle Reinigungen der verschiedenen Ectoin-Hydroxylasen und der EctD Mutanten aus *V. salexigens* wurden analog durchgeführt. Dazu wurde die jeweilige Bakterienkultur 2 Stunden nach der Induktion durch Zentrifugation bei 5.000 rpm für min. 30 Minuten bei 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Fraktionen als Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverwendet. Für eine Reinigung wurden etwa 7 g (Feuchtgewicht) der gefrorenen Zellen in 20 ml Puffer A resuspendiert (Tabelle 6). Der Zellaufschluss erfolgte durch mindestens fünfmalige Passage durch eine auf 4°C gekühlte French Press Zelle bei einem Druck von

mindestens 1000 PSI. Um Zelltrümmer und Membranen zu entfernen, wurde die Probe bei 50.000 rpm für 1 h bei 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der EctD-enhaltende Überstand filtriert (0,45 µm), um störende Partikel während der Aufreinigung mit der FPLC zu entfernen.

Alle für die Protein-Produktion verwendeten Vektoren enthalten die Sequenz für einen *Strep-tag*^{®II}, welcher am 3'-Ende eines inserierten Gens kodiert wird und bei der Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie benötigt wird. Der Zellextrakt wurde dabei auf eine *Strep-Tactin*[®]-Sepharose[®] Säule (10 ml Säulenvolumen) von IBA (Göttingen) geladen, welche mit 5 Säulenvolumen Puffer L (Tabelle 6) equilibriert worden war. Nachdem die Säule mit der Probe beladen war, wurde mit 10-12 Säulenvolumen Puffer L (Tabelle 6) gewaschen, um ungebundenes Protein von der Säule zu entfernen. Das gebundene *Strep-tag*^{®II}-EctD Protein wurde mit 3 Säulenvolumen Elutionspuffer Puffer E (Tabelle 6) vom Säulenmaterial eluiert und über den Fraktionssammler in einzelnen Reagenzgläsern aufgefangen. Diese 3 ml Fraktionen wurden mittels 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 oder direkt in Enzymassays eingesetzt.

Zum Regenerieren der *Strep-Tactin*[®]-Sepharose[®] Säule wurde zunächst mit 7 Säulenvolumen Puffer R (Tabelle 6) und anschließend mit 12 Säulenvolumen Puffer L (Tabelle 6) gewaschen. Diese Affinitätschromatographie wurde mit der Anlage ÄKTAbasic der Firma GE Healthcare Europe (München) durchgeführt. Diese Anlage wird über die Unicorn-Software von GE Healthcare Europe (München) gesteuert. Alle verwendeten Puffer wurden vor ihrer Verwendung filtriert, um störende Partikel zu entfernen.

4.4.4 Produktion und Reinigung der Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501

Nachdem die mit den Plasmiden pMP42 (Ask_Ect) und pMP-ask1 (Ask_LysC) transformierten *E. coli* BL21 Zellen auf LB Selektivagarplatten mit Ampicillin gewachsen sind, wurden Vorkulturen in MMA Flüssigmedium (4.1.4) angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden Hauptkulturen von 1 L MMA inokuliert und bis zu einer OD₅₇₈ von ca. 0,5 angezogen. Dann erfolgte die Induktion mit 100 µl AHT (2 mg/ml). Nach zweistündiger Induktionsphase wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 0,8 geerntet und 30 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellepellet wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C zwischengelagert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte

nach dem Resuspendieren der Zellen im Aufschlusspuffer durch fünfmalige Passage durch eine French Press Zelle. Die *Strep*-tag Reinigung mit den produzierten Aspartokinase wurde analog wie für die Reinigung der Ectoin-Hydroxylase beschrieben durchgeführt. Nach der Affinitätschromatographie wurden die gereinigten Ask-Proteine entweder direkt verwendet oder bei -80°C mit 50% Glycerin gelagert.

4.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmungen von Proteinen wurden entweder mit dem BioRad Protein Assay (Bio-Rad, München) nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt oder mittels Nanodrop[®] (ND-1000 Spectrophotometer, peqlab Biotechnologie GmbH) photometrisch bestimmt. Als Proteinstandard wurde 0,1 g/l BSA verwendet. Bei Verwendung des Nanodrop[®] wurde die Proteinkonzentration bei einer Absorption von 280 nm und mittels des jeweiligen spezifischen Extinktionskoeffizienten (kalkuliert nach der Aminosäuresequenz) gemessen. Für *Strep*-tag[®]II Fusionsproteine wurden die zehn zusätzlichen Aminosäuren des *Strep*-tag[®]II bei der Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten berücksichtigt.

4.4.6 Ankonzentration von Proteinen

Für das Ankonzentrieren von Proteinlösungen mittels Ultrafiltration wurden der Vivaspin 0,5 ml Konzentrador (10 kDa Ausschlussgröße) von VivaScience (Hannover) verwendet. Die Auswahl der Filter war abhängig von der Proteingröße und des anzukonzentrierenden Volumens. Die Benutzung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach dem Ankonzentrieren des Proteins wurden die Proben mit Puffer gewaschen und damit teilweise entsalzt.

4.4.7 Aktivitätstest für die Ectoin-Hydroxylase

Die Ectoin-Hydroxylase-Aktivität in Zellextrakten und während der Reinigung des EctD-Proteins wurde durch die Messung des Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehaltes im Reaktionsgemisch durch HPLC-Analysen nachgewiesen.

Nach der EctD Reinigung, wurde die Ectoin-Hydroxylase-Aktivität in einem Testansatz mit einem Volumen von 30 μl untersucht. Dieses initiale Reaktionsgemisch bestand aus 10 mM TES Puffer pH 7,5, 10 mM 2-Oxoglutarat, 6 mM (S)-Ectoin, 1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 kU Katalase aus Rinderleber (Roche, Mannheim) und maximal 20 μl der zu untersuchenden Proteinfraction. Bei vorausgehenden Untersuchungen der *V. saluicigena* Hydroxylase wurden unter diesen Bedingungen die maximale Umsetzung beobachtet (Bursy *et al.*, 2007). 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 Sauerstoff zu versorgen, da EctD

ein O₂-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; 18000 rpm).

Der Überstand dieses Reaktionsgemisches wurde mittels HPLC-Analyse (SYKAM, Fürstenfeldbruck) auf den Ectoin- und Hydroxyectoin-Gehalt untersucht. 20 µl des Reaktionsansatzes 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 % (vol/vol) Acetonitril 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 Ectoins und Hydroxyectoins (bitopAG, Witten) als Referenz ermittelt. Für die Quantifizierung von Ectoin und Hydroxyectoin wurde die ChromStar 6 oder ChromStar 7 Software (SCPA, Stuhr) verwendet. Mit 4 µg des gereinigten EctD-Proteines und unter Verwendung des beschriebenen 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. Die mathematische und grafische Auswertung erfolgte mit der Software Prism der Firma GraphPad in der Version 4.

4.4.8 Aktivitätstest für die Aspartokinasen

Für die Ermittlung der Aktivität der gereinigten Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501 diente die Methode von Black und Wright (Black & Wright, 1955). Die Standardreaktion hatte ein Volumen von 0,5 ml in einer Quartzküvette und enthielt: 60 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 M L-Aspartat, 20 mM ATP, 20 mM MgCl₂, 0,1 M Hydroxylamin und 5 µg gereinigte Aspartokinase. Der Essay wurde für 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend durch die Zugabe von 0,5 ml saurer FeCl₃-Lösung (10 % FeCl₃, 3,3 % Trichloressigsäure, 0,7 N HCl) gestoppt. Anschließend wurde der Aspartyl-beta-hydroxamat-Eisen Komplex bei einer Absorption von 540 nm gemessen. Die

Kalibrierungsgeraden für den Komplex wurden mit Aspartyl-beta-Hydroxamat durchgeführt.

4.4.9 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Bei der Phenanthroline Eisenbestimmung wird Fe^{3+} mit Hydroxylamin zu Fe^{2+} reduziert, das einen stabilen Komplex mit Phenanthroline eingeht, der bei 500 – 550 nm Licht absorbiert (Lovenberg *et al.*, 1963). Für die Eisenbestimmung wurden folgende Lösungen angesetzt:

Tabelle 14: Lösungen für Eisenbestimmung

Lösung	Komponenten
A	25 % HCl
B	10 % Hydroxylamin / HCl
C	0,1 % Phenanthroline
D	Eisenstandard: 500 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$

Der Testansatz wurde in einem 250 μl Volumen angesetzt. Zu diesem Ansatz wurden 7,5 μl Lösung A gegeben. Der Testansatz wurde 10 min bei 80°C inkubiert, um das Eisen aus dem Protein herauszulösen. Danach wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde abgenommen und mit 750 μl H_2O , 50 μl 10 % Hydroxylamin, 250 μl 0,1 % Phenanthroline 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 512 nm gemessen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden zwei unabhängige Methoden wie Bradford und Nanodrop® (0) gewählt um die Genauigkeit der Proteinbestimmung zu gewährleisten. Um möglichst genaue Werte für die Eisenbestimmung aus Proteinen zu erhalten, wurde 10 nmol Protein eingesetzt. Die Kalibrierungsgeraden wurden mit dem Eisenstandard im Bereich von 5 – 40 nmol Eisen angefertigt.

4.4.10 Aufnahmeassays mit radioaktiv markiertem Ectoin

Die Aufnahme von Ectoin von *S. coelicolor* wurde mit Hilfe von [^{14}C]-markiertem Ectoin (4,22 MBq/mmol) bestimmt. [^{14}C]-markiertes Ectoin wurde von Dr. M. Jebbar (Universität Rennes, Frankreich) hergestellt (Jebbar *et al.*, 1992) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die *S. coelicolor* Kulturen wurden mit Vorkulturen, die über Nacht bei 28°C im Minimalmedium gewachsen waren, auf eine OD_{578} von 0,1 beimpft. Die Zellen wurden in 20 ml SMM unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen bis zur exponentiellen

Wachstumsphase (OD_{578} 0,5) inkubiert, 2 ml der Kultur wurden mit dem [^{14}C]-markierten Substrat (19 μM Endkonzentration) versetzt und weiter inkubiert. Nach definierten Zeitabständen (20-120 s) wurde jeweils 300 μl Probe entnommen, durch Nitrocellulosefilter (0,45 μm , Schleicher und Schuell, Dassel) gesaugt und mit 20 ml isotonischem Medium gespült. Die Filter wurden in 20 ml Scintillationsgefäße überführt, mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, Zinsser Analytic, Frankfurt) gemischt und die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität in einem Scintillationszähler (Packard, Liquid Scintillation Analyser 1900Ca) bestimmt. Als Referenz für die eingesetzte Menge an Radioaktivität diente 300 μl ungefilterte Probe. Für die Experimente der zeitabhängigen Aufnahme von *S. coelicolor* wurden die Zellen mit 20 ml SMM in 100 ml Erlenmeyerkolben in einem Wasserbad bei den entsprechenden Temperaturen bei 220 rpm inkubiert. Eine Stunde nach Zugabe von [^{14}C]-markiertem Ectoin (19 μM) wurden die Konzentrationen des akkumuliertem Ectoin mit Proben von jeweils 300 μl Zellen, wie oben beschrieben, bestimmt.

4.5 Bioinformatische Methoden

4.5.1 BLAST Analysen und Sequenzalignments

Um bestimmte Proteinsequenzen zu erhalten, wurden die Datenbanken des DOI Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) sowie des National Center for Biotechnology Information Institute (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mittels des BLAST Algorithmus durchsucht (Altschul *et al.*, 1997).

Alle Sequenzen wurden mithilfe des ClustalX Algorithmus und des Programms ClustalW (<http://www.clustal.org>) miteinander align und anschließend ausgewertet (Thompson *et al.*, 1997).

Für die Darstellung der alignen Sequenzen in einem phylogenetischen Baum diente das Webtool ITOL (<http://itol.embl.de/>) (Letunic & Bork, 2007).

Für die Analyse von 16sRNA Sequenzen und die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen wurde das ARB Software Package (<http://www.arb-home.de/>) verwendet (Ludwig *et al.*, 2004).

4.5.2 Analyse von Kristallstrukturen verschiedener Proteine

Um die Kristallstrukturen des EctD Proteins sowie verschiedener Ectoinbindeproteine zu analysieren und zu visualisieren, wurde das Programm PyMOL in der Version 1.01 verwendet (<http://pymol.org/>).

4.5.3 Erstellung einer Datenbank für die *ect*-Cluster und Programmierung verschiedener Scripte

Um die *ect*-Cluster aus verschiedenen Bakterien zu analysieren, wurden die entsprechenden Gene aus den oben beschriebenen Datenbanken herausgelesen und in eine eigene programmierte MySQL-Datenbank inseriert (<http://www.mysql.com>).

Für das Herauslesen der Informationen aus der MySQL-Datenbank und der Visualisierung der *ect*-Cluster diente zur Erstellung diverser Scripte die Programmiersprache PHP in der Version 5.3.6 (<http://de.php.net/>).

5 Ergebnisse

5.1 Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase EctD aus dem moderat halophilen Bakterium *V. salexigens*

Die Hydroxylase EctD aus dem moderat halophilen Bakterium *V. salexigens* konnte bereits in früheren Arbeiten in ein Expressionsplasmid kloniert und nach einer heterologen Produktion in *E. coli* affinitätschromatographisch gereinigt werden (Bursy *et al.*, 2007). Das Protein konnte als aktiv identifiziert und die biochemischen Parameter bestimmt werden (Bursy *et al.*, 2007).

Um ein tieferes Verständnis des Mechanismus der Ectoin Hydroxylierung zu erhalten, sollte mithilfe von Kristallstrukturanalysen der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens* die Tertiärstruktur ermittelt werden. Dazu wurde das Protein mit dem Plasmid pBJ10 (Bursy 2005) heterolog überproduziert und anschließend per *Strep*-tag Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt (Abbildung 15).

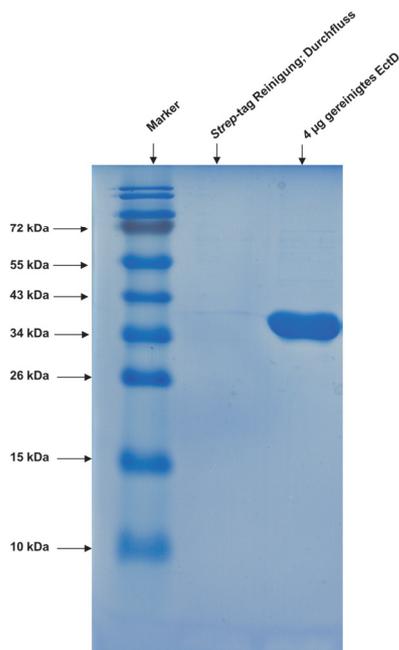


Abbildung 15: SDS-Gel nach der Reinigung von EctD aus *V. salexigens*.

4 µg des per *Strep*-tag aufgereinigten EctD Proteins wurden auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden ein Marker und der Durchfluss nach der *Strep*-tag Reinigung zusätzlich auf das Gel aufgetragen.

Nach jeder Reinigung wurde mithilfe eines Aktivitätstests überprüft (4.4.7), ob das gereinigte Protein aktiv war und damit für die Kristallscreenings eingesetzt werden konnte. Für die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Reuter (Pharmazie, Philipps-Universität Marburg) wurde fortlaufend aktives Protein für die Anzucht von Kristallen zur Verfügung gestellt, um die Kristallisations-Experimente zu ermöglichen.

Die Anzucht der Kristalle gestaltete sich als äußerst schwierig, da die gewachsenen Kristalle sehr klein und instabil waren und sich viele daher nicht für die Röntgenstrukturanalysen eigneten (Reuter *et al.*, 2010). Nach Optimierung der

Pufferbedingungen konnten Kristalle gewonnen werden, die eine geeignete Größe und Stabilität aufwiesen und für die Röntgenstrukturanalysen eingesetzt werden konnten (Abbildung 16).

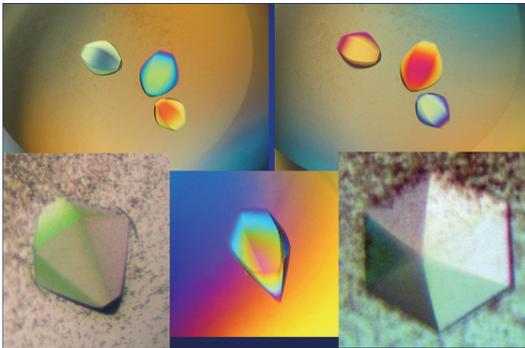


Abbildung 16: Kristalle der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens*. Viele der Kristalle der Ectoin-Hydroxylase EctD wiesen eine unterschiedliche Form auf und konnten nicht für eine Kristallstrukturanalyse verwendet werden. Zusätzlich waren viele Kristalle sehr klein und instabil (das Bild wurde von Prof. Dr. Klaus Reuter zur Verfügung gestellt).

Nur wenige Kristalle lieferten nach den Röntgenstrukturanalysen gute Datensätze. Es ist schließlich jedoch gelungen, die Kristallstruktur von EctD zu lösen (Abbildung 17).

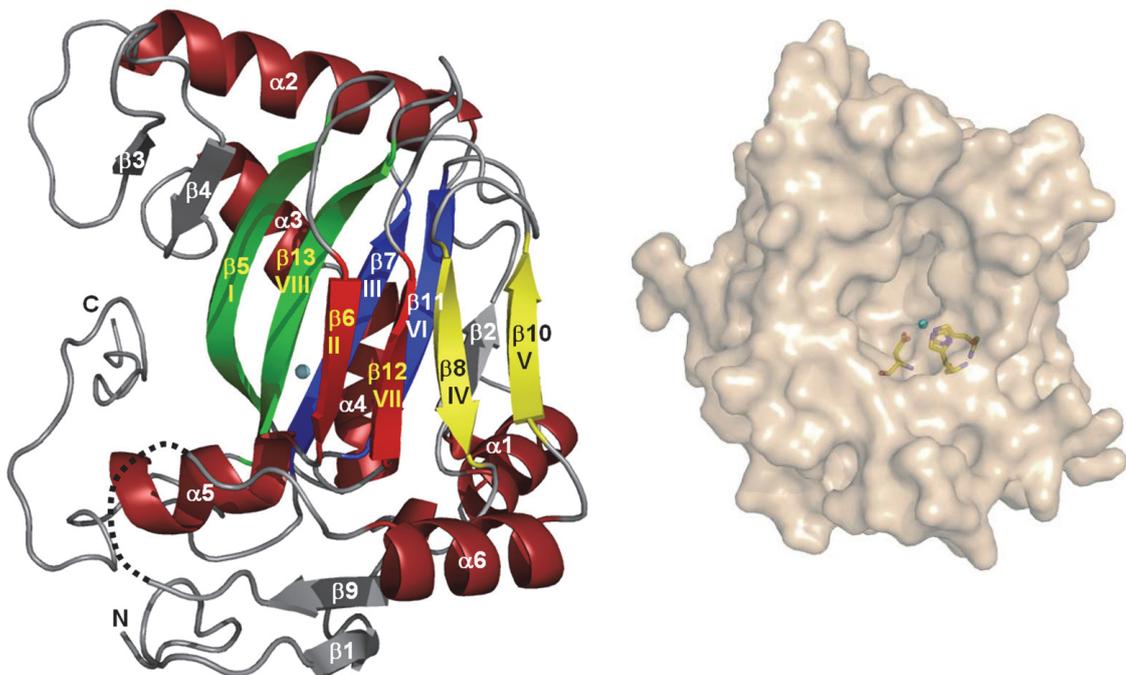


Abbildung 17: Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase EctD von *V. salexigens*. Durch Röntgenstruktur-Analysen von EctD Kristallen konnte die eindeutige Struktur der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens* ermittelt werden. Die Auflösung der Struktur beträgt 1,8 Å und entspricht einem Monomer. Auf der linken Seite ist die EctD Struktur mit allen nummerierten Helices und β-Faltblättern und auf der rechten Seite die Oberflächenstruktur mit dem aktivem Zentrum dargestellt (entnommen aus Reuter *et al.*, 2010).

Die Struktur der Ectoin-Hydroxylase, die einem Monomer entspricht, wurde mit einer Auflösung von 1,85 Å aufgelöst (Abbildung 17). Die molekulare Masse des EctD Wildtyp-Proteins beträgt 34,4 kDa und besteht aus 300 Aminosäuren. Die Struktur wurde in der Protein Data Bank (PDB) mit der Nummer 3EMR hinterlegt.

Bei der Kristallstruktur handelt es sich um eine Apo-Form, jedoch mit gebundenem Eisen. Das aktive Zentrum der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salelixigens* besteht aus einer doppelsträngigen β -Helix, die den Hauptteil des aktiven Zentrums ausmacht. Die EctD Struktur enthielt weder den Liganden Ectoin noch das Produkt Hydroxyectoin. Auch konnte kein Co-Substrat 2-Oxoglutarat in der aufgelösten Struktur ermittelt werden. Der Co-Faktor Fe^{3+} wurde jedoch in der Struktur gefunden, der in Abbildung 17 als blauer Punkt zwischen β -Faltblatt β -II und β -VII markiert ist. Die zwei doppelsträngigen β -Helices enthalten zudem mehrere β -Faltblätter, bestehend aus je zweimal vier β -Faltblättern, die das aktive Zentrum umschließen. Diese sind wie in Abbildung 17 gezeigt, nummeriert als β -5, β -6, β -7, β -8, β -10, β -11, β -12 und β -13. Für einen besseren Überblick wurden diese β -Faltblätter als β -I – β -VIII bezeichnet.

Wie in strukturell verwandten Proteinen der Klasse der Nicht-Häm Eisen(II)-enthaltenen und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen sind die β -Faltblätter β -II, β -VII, β -IV und β -V in ihrer Funktion aufgrund ihrer kürzeren Länge und ihrer etwas verdrehten Sekundärstruktur untergeordnet. Die β -Faltblätter β -I, β -VIII, β -III und β -VI hingegen bilden das Hauptzentrum von EctD. Das Zentrum von EctD wird zudem durch die β -Faltblätter β -2, β -3 und β -4 erweitert.

Das in *E. coli* produzierte rekombinante EctD Protein ist mit einem C-terminalen *Strep*-tag versehen, der jedoch nicht in der Struktur enthalten ist. Ebenso konnte ein flexibler Loop im Bereich der Aminosäuren von Gly-195 bis Leu-211 nicht durch die Röntgenstrukturanalysen aufgelöst werden (in Abbildung 17 als gestrichelte Linie dargestellt).

5.1.1 Die Topologiedarstellung von EctD aus *V. salexigens* und strukturell ähnlichen Proteinen

Bei der Durchführung eines strukturellen Alignments mittels des DALI Servers (Holm & Sander, 1996) und der Ectoin-Hydroxylase EctD als Suchobjekt erhält man die zu EctD strukturell am ähnlichsten Proteine der Familie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Die beiden Proteine mit dem höchsten „Z-Scores“ sind die menschliche Phytanoyl-CoA-2-hydroxylase PhyH (McDonough *et al.*, 2005) (Z-Score von 22,5) und die Halogenase SyrB2 aus *Pseudomonas syringae* (Blasiak *et al.*, 2006) (Z-Score von 18,5). Um diese strukturell ähnlichen Proteine mit EctD aus *V. salexigens* zu vergleichen, wurden die Topologien der Proteine nebeneinander dargestellt (Abbildung 18). Wie oben angegeben wurden durch die Suche mittels des DALI Servers zwei strukturell sehr ähnliche Proteine aus der Klasse der Familie der Nicht-Häm Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gefunden. In (A) ist die aus dem Mensch stammende Phytanoyl-CoA-2 Hydroxylase PhyH (PDB code: 2A1X), in (B) die Halogenase SyrB2 aus *Pseudomonas syringae* (PDB code: 2FCU), in (C) die Ectoin- Hydroxylase aus *V. salexigens* (PDB code: 3EMR) und in (D) die Cephalosporin-Synthase aus *Streptomyces clavuligerus* als Vertreter der Isopnicillin-N-Synthase (IPNS) und Deacetoxycephalosporin-C-Synthase (DAOCS) ähnlichen Enzyme (PDB code: 1DCS) abgebildet. Die β -Faltblätter werden durch Pfeile und die α -Helices durch Zylinder dargestellt.

Die β -Faltblätter I-VIII bilden das Doppelsträngige β -Helix-Motiv (DSBH-Motiv) und wurden nach dem Schema von Branden und Tooze eingefärbt (Branden & Tooze, 1999). In den Abbildungen von PhyH (A) und EctD (C) wurden die nicht aufgelösten Deckelstrukturen durch gestrichelte Linien angedeutet. Wie aus der Abbildung 18 hervorgeht, sind PhyH, SyrB2 und EctD im Bereich des N-terminus mit vier α -Helices erweitert ($\alpha 1 - \alpha 4$). Diese α -Helices stoßen an das Hauptsheet der doppelsträngigen β -Helix und bilden damit den Abschluss am N-terminus.

Die Topologien von PhyH, SyrB2 und EctD erinnern sehr stark an Proteine aus der Klasse der IPNS/DAOCS ähnlichen Enzyme. In diesen Enzymen sind die Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ jedoch zu einer langen Helix fusioniert.

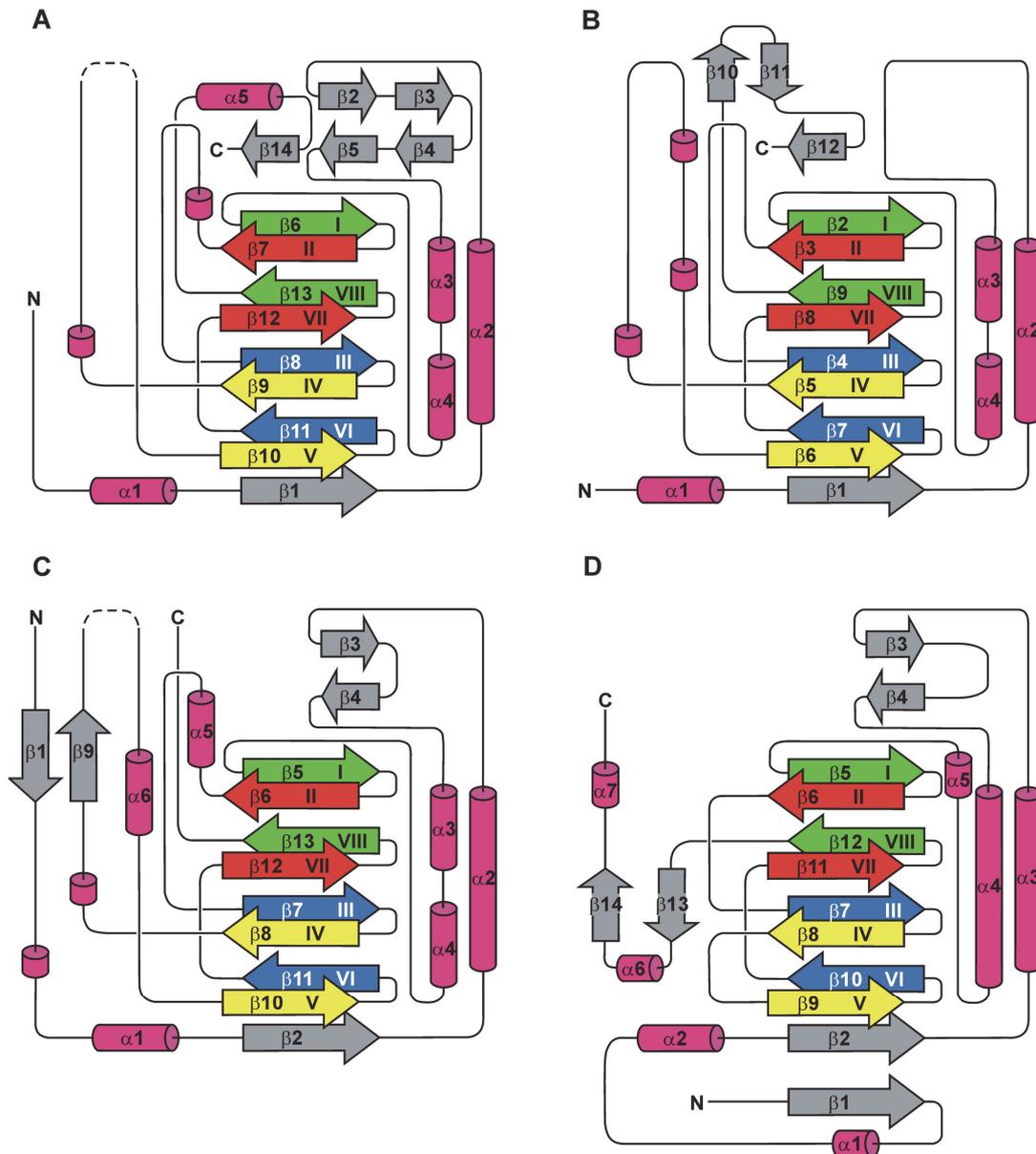


Abbildung 18: Topologiedarstellung von EctD aus *V. sallexigens* und strukturell ähnlichen Proteinen. Dargestellt ist die Topologie der Proteine (A) PhyH (PDB code: 2A1X), (B) SyrB2 (PDB code: 2FCU), (C) EctD (PDB code: 3EMR) und (D) von DAOCS (PDB code: 1DCS). Die Pfeile symbolisieren die β -Faltblätter und die Zylinder die α -Helices. Kleinere Helices sind auch als Zylinder dargestellt, aber nicht nummeriert. Die β -Faltblätter I-VIII bilden das doppelsträngige β -Helix-Motiv (DSBH-Motiv) und wurde nach dem Schema von Branden und Tooze eingefärbt (Branden & Tooze, 1999). In den Darstellungen von EctD und PhyH wurden die nicht aufgelösten Deckelstrukturen durch gestrichelte Linien gekennzeichnet (entnommen aus Reuter *et al.*, 2010).

Der Hauptunterschied zwischen den beiden Enzymklassen ist die Anordnung der β -Faltblätter IV und V der doppelsträngigen β -Helix. In den IPNS/DAOCS ähnlichen Enzymen wie der Cephalosporin-Synthase aus *S. clavuligerus* sind die beiden Faltblätter durch eine kurze Schleife miteinander verbunden. In PhyH, SyrB2 und EctD sind diese β -Faltblätter deutlich erweitert und beinhalten wichtige Teile des aktiven Zentrums. Die größten strukturellen Unterschiede zwischen den Proteinstrukturen von

PhyH, SyrB2 und EctD sind jedoch im Bereich des N- und C-Terminus zu finden. Auffällig ist auch der Bereich zwischen den Helices α_2 und α_3 . In PhyH und EctD sind dazwischen antiparallele β -Faltblätter zu finden, die jedoch in SyrB2 fehlen. Im Gegensatz zu PhyH und SyrB2 ist in EctD der N-Terminus deutlich erweitert und enthält neben der α -Helix α_1 noch das β -Faltblatt β_1 , welches genau antiparallel zu dem β -Faltblatt β_9 angeordnet ist. Im Gegensatz dazu ist in PhyH und SyrB2 der C-Terminus im Vergleich zu EctD mit einem β -Faltblatt mit antiparalleler Anordnung verlängert.

5.1.2 Eisenbindemotiv in EctD aus *V. salexigens*

Alle Enzyme der Klasse der Nicht-Häm Eisen(II)-enthaltenen und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum ein Eisen, welches essentiell für die Aktivität dieser Proteine ist (Flashman & Schofield, 2007; Hausinger, 2004; Purpero & Moran, 2007; Welford *et al.*, 2005). Dieses Eisen befindet sich im Inneren des DSBH-Motivs von EctD, in dem das Co-Substrat 2-Oxoglutarat und das Substrat gebunden werden. Die Koordinierung des Eisens in dieser Klasse von Enzymen wird fast ausschließlich durch drei Aminosäuren vorgenommen. Dieses Strukturmotiv beinhaltet das His-X-Asp/Glu Sequenzmotiv und wird als sogenannte 2-His-1-Carboxylat-Triade bezeichnet (Clifton *et al.*, 2006; Flashman & Schofield, 2007; Hausinger, 2004; Purpero & Moran, 2007; Welford *et al.*, 2005). Im Falle von EctD aus *V. salexigens* besteht das Eisenbindemotiv aus zwei Histidinen und einem Aspartat, die das Eisen stabilisieren. In der Abbildung 19 sind die drei Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248 um das Eisen, welches als orange Kugel in der Mitte dargestellt ist, angeordnet. Zusätzlich konnten in der Kristallstruktur drei Wassermoleküle aufgelöst werden, die in Abbildung 19 als rote Kugeln um das Eisen abgebildet sind.

Weder in den Medien während der Produktion und den Puffern zur Reinigung von EctD, noch in den Puffern für die Kristallisationsansätze wurde zusätzliches Eisen gegeben. Aber auch die Zugabe von Eisensulfat ins Medium während der Proteinproduktion führte nicht zu einem erhöhten Eisengehalt im EctD Protein (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass die Bindung des Eisens durch die 2-His-1-Carboxylat-Triade so effizient ist, dass das Eisen während der Faltung von EctD fest im Inneren des Proteins eingebaut wird und nicht während der Reinigung des rekombinanten EctD Proteins aus dem Inneren herausgelöst wird.

Die Anordnung der Aminosäuren His-146, Asp-148 und His 248 im Zusammenspiel mit den drei Wassermolekülen um das Eisenmolekül bildet eine fast perfekte oktaedrische Form aus (Abbildung 19).

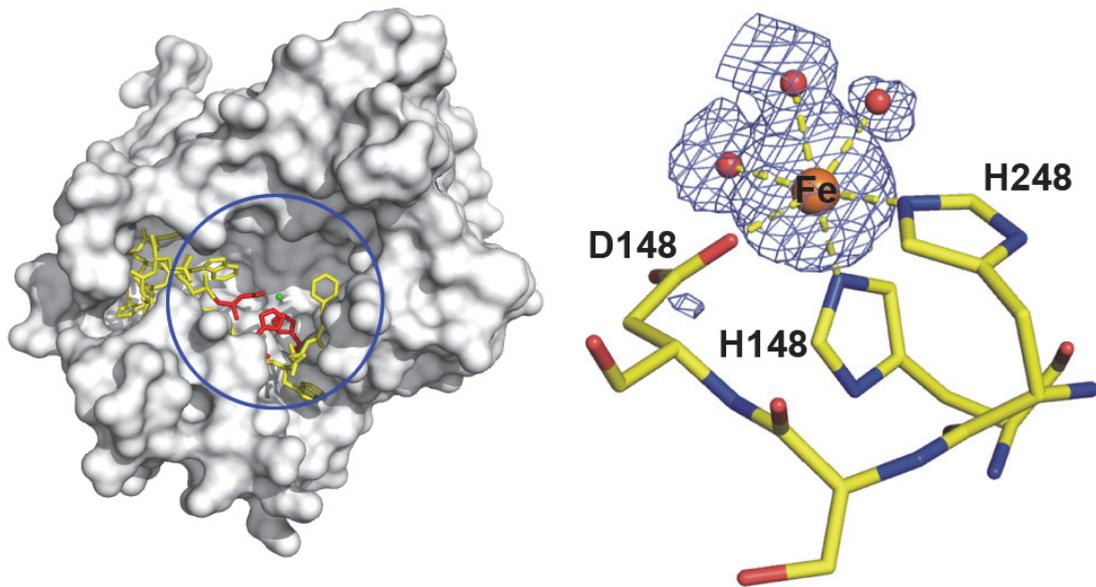


Abbildung 19: Eisenbindemotiv von EctD aus *V. salexigens*. Dargestellt ist das Eisenbindemotiv der Ectoin-Hydroxylase EctD mit dem gereinigten Co-Faktor Eisen. Auf der linken Seite ist die Oberflächenstruktur von EctD mit dem katalytischen Eisen-Zentrum gezeigt (blauer Kreis; eisenbindende Aminosäuren: rot). Die koordinierenden Aminosäuren für das Eisen (orange) sind die Aminosäuren His-146, Asp-146 und His-248, sowie drei umgebende Wassermoleküle (rot; rechts). Sie bilden die für diese Enzymklasse typische 2-His1-Carboxylat-Triade (entnommen aus Reuter *et al.*, 2010).

5.1.3 2-Oxoglutaratbindestelle der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens*

Das Co-Substrat 2-Oxoglutarat ist für die Reaktionen der Proteine der Klasse der Nicht-Häm Eisen(II)-enthaltenen und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen essentiell (Clifton *et al.*, 2006). Das 2-Oxoglutarat wird tief im aktiven Zentrum des jeweiligen Proteins gebunden. Zusätzlich erfüllt es eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Eisens durch das Carboxylat an C1 und dem Sauerstoff Rest an C2 durch eine Art Zangenmechanismus. Typischerweise wird das Carboxylat von 2-Oxoglutarat an der Position C5 durch eine Salzbrücke mit einem Arginin oder Lysin stabilisiert, unterstützt durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Hydroxyl-Rest des Proteins (Clifton *et al.*, 2006).

In Abbildung 20 ist die mögliche Stabilisierung des Co-Substrats 2-Oxoglutarat in EctD aus *V. salexigens* im Vergleich zu strukturell verwandten Proteinen dargestellt. Dabei sind die Strukturen von PhyH (A), SyrB2 (B), PtlH (C) und EctD (D) im Bereich der β -Faltblätter II, VII und VIII vergrößert. Man erkennt in allen Strukturen der verwandten Proteine zu EctD (A-C), dass das Carboxylat an C5 von 2-Oxoglutarat durch die basischen Reste eines Arginins stabilisiert werden, das an dem β -Faltblatt VIII lokalisiert ist.

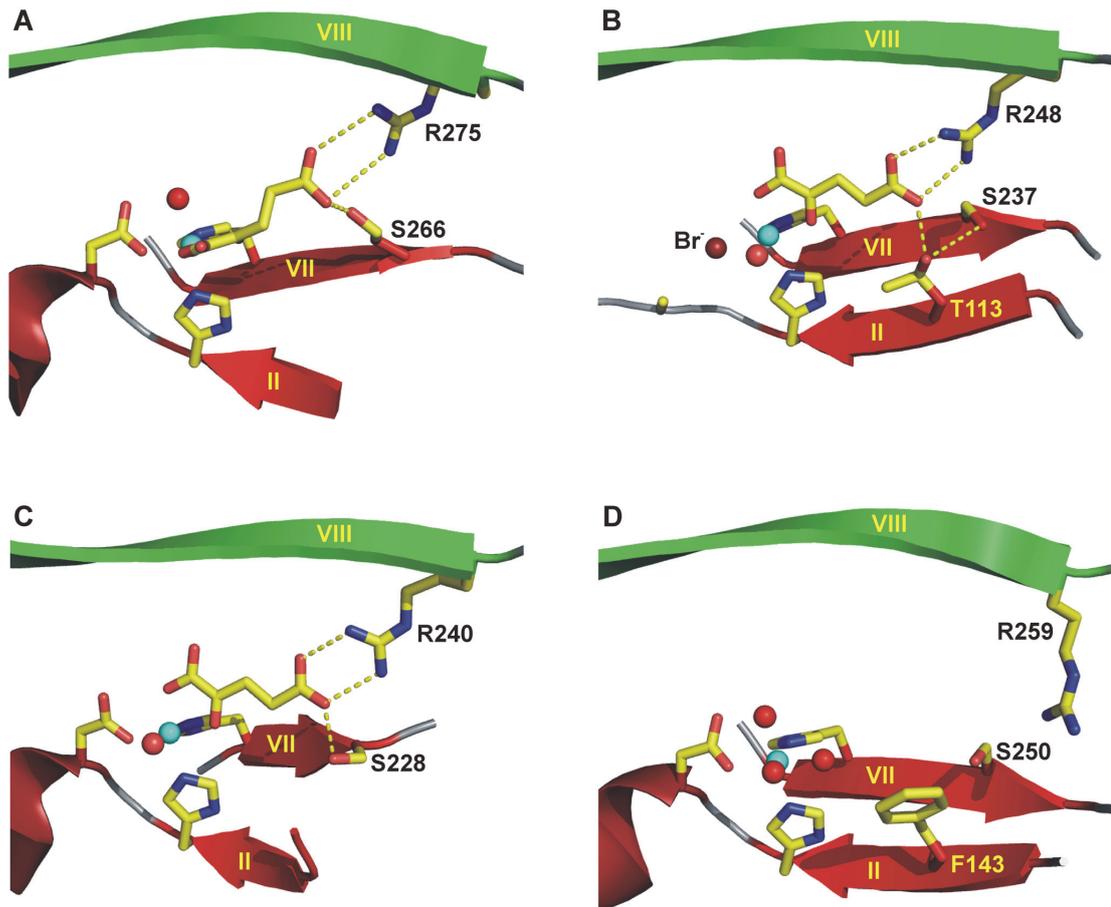


Abbildung 20: 2-Oxoglutaratbindestelle von EctD aus *V. salexigens* im Vergleich zu strukturell verwandten Proteinen. Dargestellt sind die wichtigen Aminosäuren der Bindestelle für 2-Oxoglutarat in EctD im Vergleich zu strukturell ähnlichen Proteinen wie (A) PhyH (PDB code: 2A1X), (B) SyrB2 (PDB code: 2FCU), (C) PtlH (PDB code: 2RDN) und (D) EctD (PDB code: 3EMR). Das Eisen ist hier als blaue Kugel dargestellt. Besonders wichtig für die Stabilisierung des 2-Oxoglutarats ist ein Phenylalanin, das mit dem aromatischen Ring eine Interaktion mit dem 2-Oxoglutarat eingeht. Weitere wichtige Eigenschaften für die Stabilisierung des 2-Oxoglutarats haben ein Serin und ein Arginin (entnommen aus Reuter *et al.*; 2010).

Ein solches Arginin ist ebenfalls in der Struktur von EctD an dem β -Faltblatt VIII lokalisiert und entspricht dem Arg-259. Zusätzlich zu dem Arginin tritt in den zu EctD verwandten Strukturen PhyH (A) und PtlH (C) ein Serin an β -Faltblatt VII auf, das direkte Wasserstoffbrückenbindungen zum Carboxylat des 2-Oxoglutarats ausbildet. In der Struktur von SyrB2 (B) wird diese Wasserstoffbrückenbindung indirekt über ein zusätzliches Threonin an Position 113 ausgebildet. In EctD befindet sich ebenfalls an dieser Position des β -Faltblatt VII ein Serin und könnte daher zur Stabilisierung des 2-Oxoglutarats dienen.

Mit Hilfe der Kristallstrukturanalysen konnte keine Struktur von EctD mit enthaltendem 2-Oxoglutarat ermittelt werden und daher kann über die genaue Bindung des Co-Substrats 2-Oxoglutarat nur spekuliert werden. Auffällig ist aber auf jeden Fall,

wie aus Abbildung 20 hervorgeht, dass ein ähnliches Strukturmotiv in EctD zu strukturell ähnlichen Proteinen aus der Klasse der Nicht-Häm Eisen(II)-enthaltenen und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen zu finden ist. In EctD ist am β -Faltblatt VIII ebenfalls das Arginin und an β -Faltblatt VII das Serin zu finden. Diese sind allerdings in der aufgelösten Struktur von EctD als hoch bewegliche Aminosäuren identifiziert worden, was daran liegen könnte, dass kein 2-Oxoglutarat in der EctD Struktur gebunden ist. Daher könnte man vermuten, dass sich diese beiden Aminosäuren bei gebundenen 2-Oxoglutarat in Richtung des Eisens positionieren wie im Falle der Kristallstrukturen von PhyH (A), SyrB2 (B) und PtlH (C).

Diese Stabilisierung des 2-Oxoglutarats ist in einigen Proteinen der Klasse der Nicht-Häm-Eisen(II)-enthaltenen und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen und der IPNS/DAOCS Enzyme durch ein Arg-X-Ser Motiv organisiert (Clifton *et al.*, 2006). In EctD ist zwar das Arginin zu finden, jedoch befindet sich an Position 261 kein Serin sondern ein Aspartat. In den strukturell verwandten Proteinen zu EctD konnte dieses Motiv ebenfalls nicht identifiziert werden. Vielmehr tritt ein Motiv in der Form His-X-Ser auf, wobei es sich um das zweite Histidin handelt, welches für die Eisenbindung essentiell ist. Demnach scheint die Bindung des 2-Oxoglutarats mit dem His-X-Ser Motiv ein typisches Merkmal von PhyH ähnlichen Proteinen zu sein.

Die Wichtigkeit der beiden Aminosäuren Arg-259 und Ser-250 wird auch durch ein Alignment aller momentan verfügbaren EctD Proteinsequenzen unterstützt (Abbildungen 24 und 25). In allen EctD Sequenzen sind diese beiden Aminosäuren streng konserviert.

Eine Besonderheit in der Struktur von EctD könnte noch das Phe-143 sein, das in den strukturell verwandten Proteinen nicht zu finden ist. Dieses Phenylalanin ragt in das aktive Zentrum von EctD und könnte zusätzlich das 2-Oxoglutarat stabilisieren.

5.1.4 Ein flexibler Deckel oberhalb des aktiven Zentrums in EctD aus *V. salexigens*

Wie bereits erwähnt, konnte durch die Kristallstrukturanalysen nicht das komplette EctD Molekül aufgelöst werden. Ein Bereich, bestehend aus den Aminosäuren Gly-195 bis Leu-211, konnte nicht aufgelöst und deshalb nicht in die Kristallstruktur eingefügt werden. In den Abbildungen 17 und 18 wurde dieser sehr flexible Bereich als gestrichelte Linie angedeutet. Wie aus diesen Abbildungen hervorgeht, befindet sich dieser nicht-aufgelöste Bereich zwischen den Faltblättern IV und V in EctD. Die flankierenden Aminosäuren Val-194 und das hoch-konservierte Gly-212 sind in direkter Nachbarschaft der möglichen Substratbindestelle und daher könnte

dieser Bereich als eine Art „Deckelstruktur“ fungieren. Durch diesen Deckel könnte vermutlich die Substratbindung unterstützt oder verbessert werden.

5.1.5 Konsensusmotiv in EctD aus *V. salexigens*

Durch vorhergehenden Alignments der verfügbaren EctD Proteinsequenzen, konnte ein hoch-konservierter Bereich in EctD ermittelt werden (Bursy *et al.*, 2007). Dieser Bereich umfasst die Aminosäuren W¹⁴⁵HSDFETWH¹⁵³ und wurde als Sequenz-Signatur Motiv postuliert (Bursy *et al.*, 2007). Durch neu hinzugekommene EctD Proteinsequenzen aus mikrobiellen Genomen und einem erneuten Alignment aller EctD Proteinsequenzen konnte das Signatur Motiv zu den Aminosäuren F¹⁴³-X-WHSDFETWH-X-EDG-M/L-P¹⁵⁹ spezifiziert werden (Abbildungen 24 und 25).

In Abbildung 21 ist dieses Konsensusmotiv in der EctD Struktur von *V. salexigens* gelb eingefärbt, zudem sind die Aminosäuren, die für die Eisenkoordination essentiell sind (His-146, Asp-148, His-248) in rot markiert.

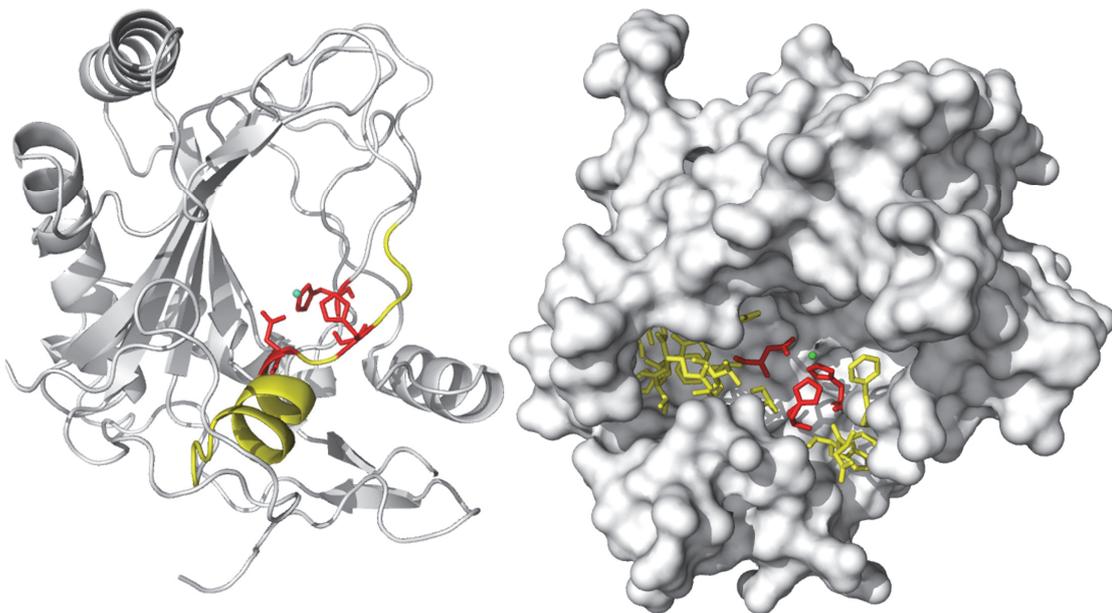


Abbildung 21: Konsensusmotiv von EctD. Dargestellt ist das Konsensusmotiv der Ecto-in-Hydroxylase EctD, das in gelb eingefärbt ist. Dieses Konsensusmotiv findet man in allen EctD Proteinsequenzen, die bisher in den Datenbanken zu finden sind. Das Alignment besteht zurzeit aus 98 EctD Sequenzen und das Konsensusmotiv umfasst die Aminosäuren F¹⁴³-X-WHSDFETWH-X-EDG-M/L-P¹⁵⁹. Die Reste (His-146, Asp-148, His-248), die für die Stabilisierung des Eisens wichtig sind wurden rot eingefärbt. Das Eisen ist als grüne Kugel in der Mitte dargestellt. Zur besseren Orientierung ist auf der rechten Seite die Oberflächenstruktur von EctD mit dem markierten Konsensusmotiv im aktiven Zentrum dargestellt (entnommen aus Pittelkow & Bremer, 2011).

Das Eisenatom befindet sich als grün eingefärbte Kugel in der Mitte des aktiven Zentrums der Hydroxylase EctD. Das Konsensusmotiv von EctD stellt vermutlich für

die Enzymaktivität einen sehr wichtigen Bereich dar. Wie man aus Abbildung 21 erkennen kann, befinden sich innerhalb des Konsensusmotivs auch die Aminosäuren, die für die Eisenbindung essentiell sind. Eine Helix in direkter Nachbarschaft der eisenbindenden Aminosäuren besteht zu einem sehr großen Teil (F^{149} - P^{159}) aus Aminosäuren des Konsensusmotivs. Weiterhin fällt auf, dass sich dieses Konsensusmotiv innerhalb einer Vertiefung im Protein befindet. Damit könnte es einen wesentlichen Teil des aktiven Zentrums in EctD ausmachen (Abbildung 21, rechts). Viele der Aminosäuren des Konsensusmotivs ragen zudem mit ihrer aktiven Seitenkette in Richtung des Eisens. Dies könnte dafür sprechen, dass dieses Motiv wichtige Aminosäuren beinhaltet, die für die Stabilisierung des 2-Oxoglutarats und das Substrats Ectoin zuständig sein könnten.

5.1.6 Ligandenbindestelle für Ectoin im aktiven Zentrum von EctD

Bei genauerer Analyse der Kristallstruktur von EctD fällt auf, dass man bei einer Darstellung der Oberflächenstruktur eine Vertiefung in der Proteinstruktur ausmachen kann (Abbildungen 17, 19 und 21). Diese Vertiefung umfasst im Wesentlichen den Bereich um das gebundene Eisen in EctD. Da in unmittelbarer Nähe des Eisens die enzymatische Hydroxylierungsreaktion ablaufen muss, da Eisen für die Reaktion essentiell ist, kann man diesen Bereich als das aktive Zentrum in EctD bezeichnen. Durch eine Analyse der Ladungsverteilung der Oberfläche der EctD Struktur erkennt man zudem, dass im aktiven Zentrum eine sehr positive Ladung vorzufinden ist (Abbildung 22).

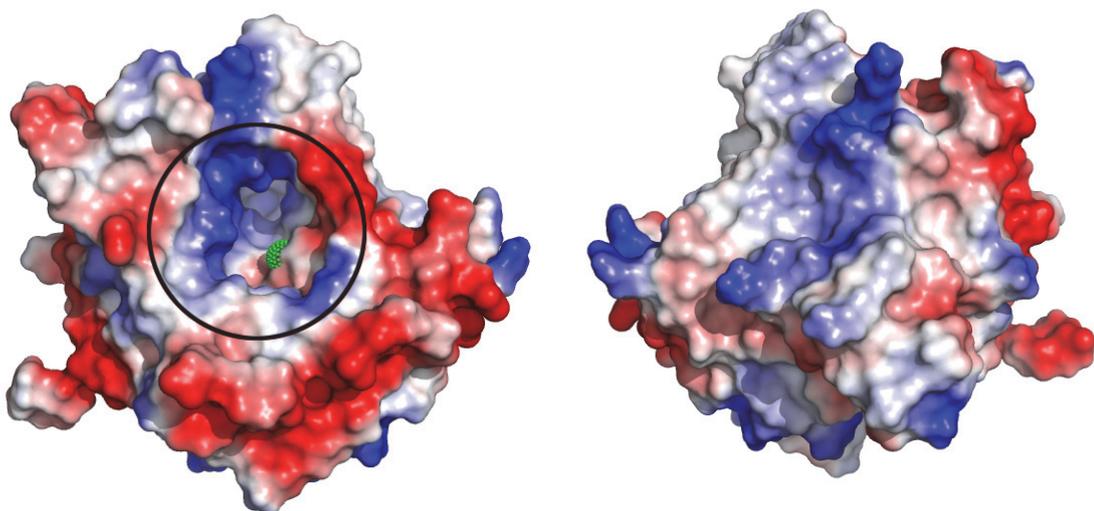


Abbildung 22: Oberflächenladung von EctD aus *V. salexigens*. Hier ist die Oberflächenladung der Ectoin-Hydroxylase EctD gezeigt (links: Blick ins Zentrum; rechts: 180° gedreht). Alle positiven Bereiche sind in blau und alle negativen Bereiche sind in rot eingefärbt. Die weißen Bereiche kennzeichnen ausgeglichene Ladungszustände. Im Bereich des Reaktionszentrums ist eine deutlich positivere Ladung zu erkennen (schwarzer Kreis). Im aktiven Zentrum ist das Eisen als grüner Kreis gezeigt.

Dadurch wird wahrscheinlich der Ligand Ectoin in die richtige Position zum Eisen und zum Co-Substrat 2-Oxoglutarat gebunden, um die Hydroxylierungsreaktion stattfinden zu lassen. Dieser Bereich, in dem das Eisenatom selbst und die Eisen-stabilisierenden Aminosäuren zu finden sind, ist von einem positiven Bereich ausgekleidet und stellt eine Art Reaktionskäfig dar. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, wie das Substrat Ectoin in EctD positioniert und gebunden werden kann.

Insgesamt ist bei der Analyse der Ladungsoberfläche keine Besonderheit zu erkennen. Eine stark negative Signatur, wie sie bei Proteinen aus halophilen Mikroorganismen vorkommen können (Abbildung 2), liegt bei der Kristallstruktur von EctD aus *V. salexigens* nicht vor.

5.2 EctD aus *V. salexigens* als "Prototyp" einer großen Familie von Ectoin-Hydroxylasen

Die Analyse aller derzeit verfügbaren Genomsequenzen von Mikroorganismen nach möglichen Ectoin Produzenten wurde mit der Proteinsequenz von EctC durchgeführt. Man kann davon ausgehen, dass nur die Mikroorganismen, die über eine Ectoin Synthase verfügen, in der Lage sind, Ectoin zu synthetisieren. Die Ergebnisse nach der Analyse von derzeit 1553 Bacteria- und 88 Archaea-Genomen lieferte 241 mögliche Ectoin Produzenten. Von diesen 241 Ectoin Produzenten konnten derzeit 98 EctD Sequenzen ermittelt werden. Bei dieser Analyse fiel auf, dass *Nitrosopumilus maritimus* als einziges Archaeon über das Ectoin Biosynthese Gencluster verfügt. Alle anderen EctD Sequenzen stammen von Bakterien. Nach den Blast-Analysen wurden alle verfügbaren EctD Proteinsequenzen mit der Proteinsequenz von EctD aus *V. salexigens* miteinander aligniert. Das komplette EctD Alignment ist in den Abbildungen 24 und 25 gezeigt. Im Alignment wurden die Aminosäuren des Konsensusmotivs in EctD markiert. Durch das Alignment erhält man einen Überblick über wichtige und hoch-konservierte Aminosäuren der Ectoin-Hydroxylase EctD. Die Identitäten der EctD Proteine liegen im Vergleich zu EctD aus *V. salexigens* zwischen 72% für EctD aus *Bacillus pseudofirmus* und 38% für EctD aus *Limnobacter sp. Med105*.

Auffällig ist, dass die Aminosäuren des Konsensusmotivs in allen EctD Sequenzen zu 100% konserviert sind. Durch die Erweiterung des Konsensusmotivs nach diesem Alignment auf die Aminosäuren F¹⁴³-X-WHSDFETWH-X-EDG-M/L-P¹⁵⁹, ist es möglich *bona fide* Ectoin-Hydroxylasen von anderen Proteinen klar zu unterscheiden. Außerdem zeigt sich, dass dieses Sequenzmotiv innerhalb der Ectoin-Hydroxylasen ein sehr wichtiges Motiv darstellt. Innerhalb des Konsensusmotivs befinden sich, wie oben erwähnt, zwei der drei wichtigen Aminosäuren, die für die

Eisenbindung verantwortlich sind (Asp-146 und His-148). Die beiden Aminosäuren sowie die dritte eisenbindende Aminosäure (His-248) sind in allen EctD Sequenzen zu 100% konserviert. Das deutet daraufhin, dass eine Veränderung an diesen Positionen nicht toleriert wurde und zu inaktiven Proteinen führen würde. Zu diesen hochkonservierten Aminosäuren kommen weitere streng konservierte Aminosäuren an vielen Positionen vor.

Interessanterweise kann man bei einem Blast Search nach Ectoin-Hydroxylasen einen klaren Bruch innerhalb der gefundenen Sequenzen erkennen.

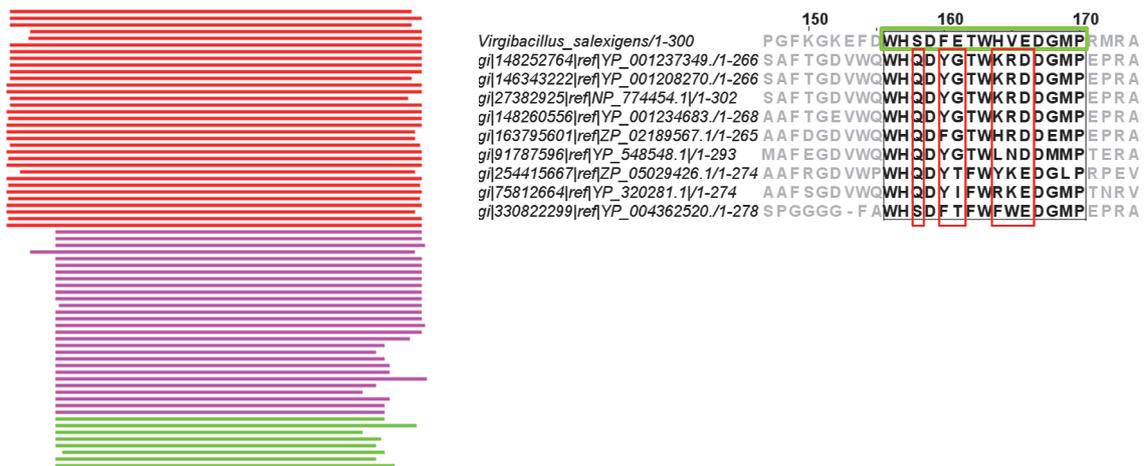


Abbildung 23: Alignment aller gefundenen EctD Sequenzen nach einer BLAST Suche. Führt man eine BLAST Suche nach EctD Proteinsequenzen mit der EctD Proteinsequenz von *V. salexigens* durch (NCBI (4.5.1)), so erhält man nach den zu EctD homologen Proteinen (links: rot), Proteine, die zwar ähnlich zu EctD Proteinen sind (links: pink, grün), sich aber durch das fehlende, Ectoin Hydroxylasen typische Konsensusmotiv F¹⁴³-X-WHSDFFETWH-X-EDG-M/L-P¹⁵⁹ unterscheiden (rechts). Daher stellen diese Proteine vermutlich keine Ectoin Hydroxylasen dar, obwohl einige von ihnen als solche annotiert sind.

Nach genauerer Analyse der Proteinsequenzen nach diesem Bruch fällt auf, dass diese Proteine nicht mehr das oben beschriebene Konsensusmotiv enthalten und demnach wahrscheinlich keine Ectoin-Hydroxylasen sind, obwohl sie teilweise als solche annotiert sind (Abbildung 23). Ein Beispiel dafür ist die Proteinsequenz aus *Bradyrhizobium sp.* BTAi1 (YP_001237349) die als putative Ectoin Hydroxylase annotiert ist, aber mit großer Wahrscheinlichkeit keine ist, da in einem Alignment mit der EctD Sequenz aus *V. salexigens* auffällt, dass das Konsensusmotiv nicht vollständig ist (Abbildung 23).

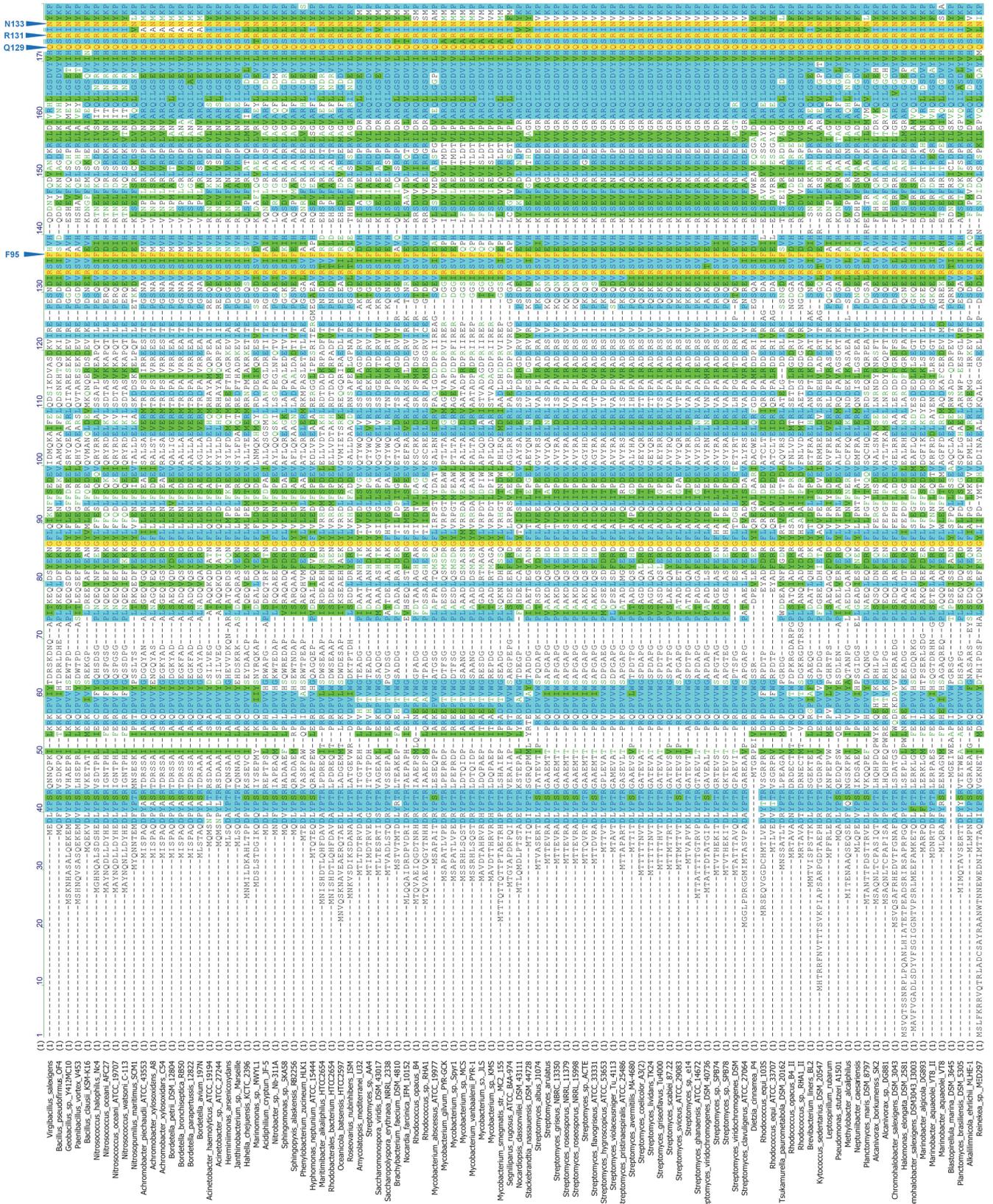


Abbildung 24: Alignment aller verfügbaren EctD Sequenzen (Teil1). Um die Proteinsequenzen aller momentan verfügbaren EctD Sequenzen miteinander zu vergleichen, wurden diese miteinander align.

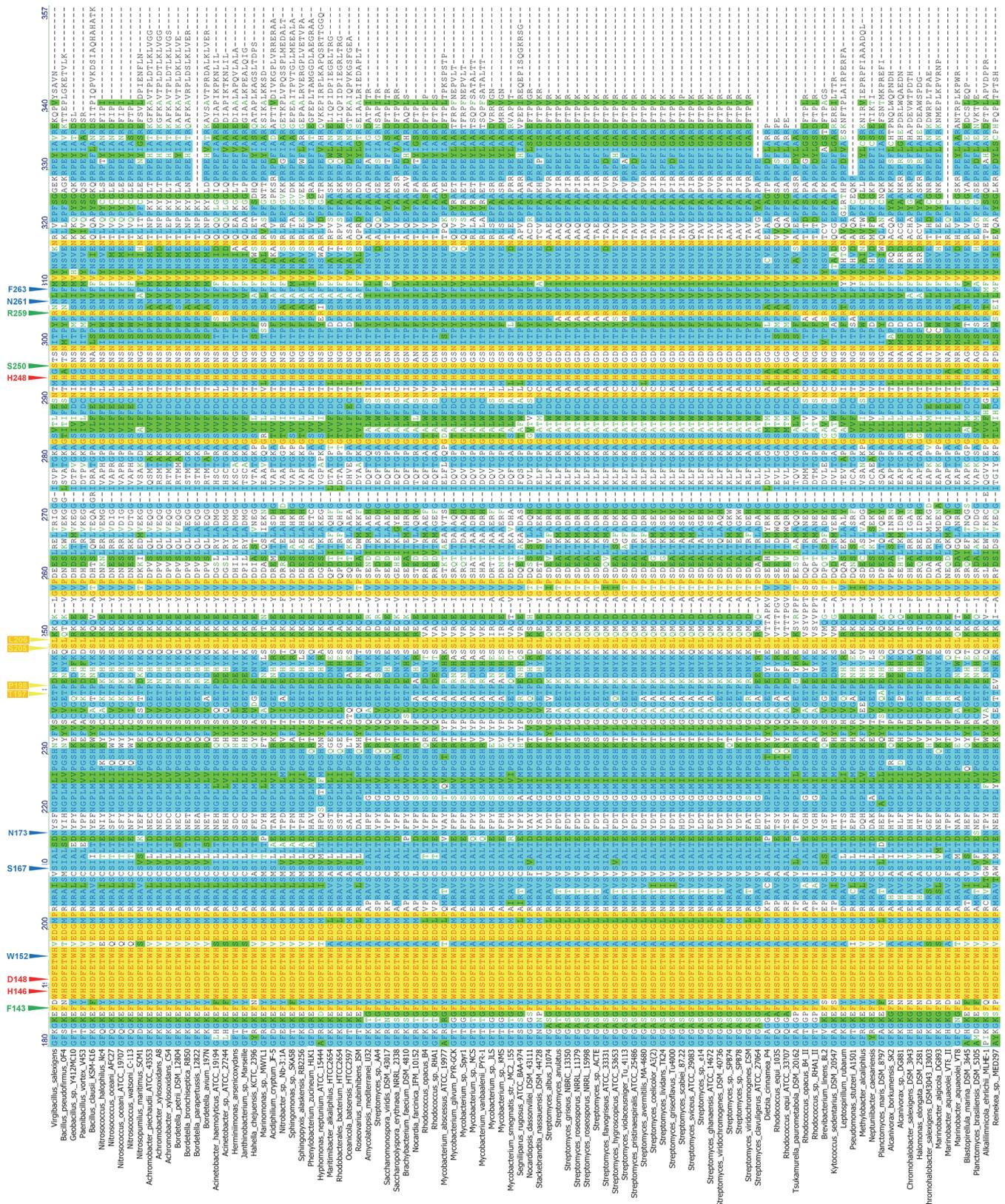


Abbildung 25: Alignment aller verfügbaren EctD Sequenzen (Teil2). Um die Proteinsequenzen aller momentan verfügbaren EctD Sequenzen miteinander zu vergleichen, wurden diese miteinander aligniert.

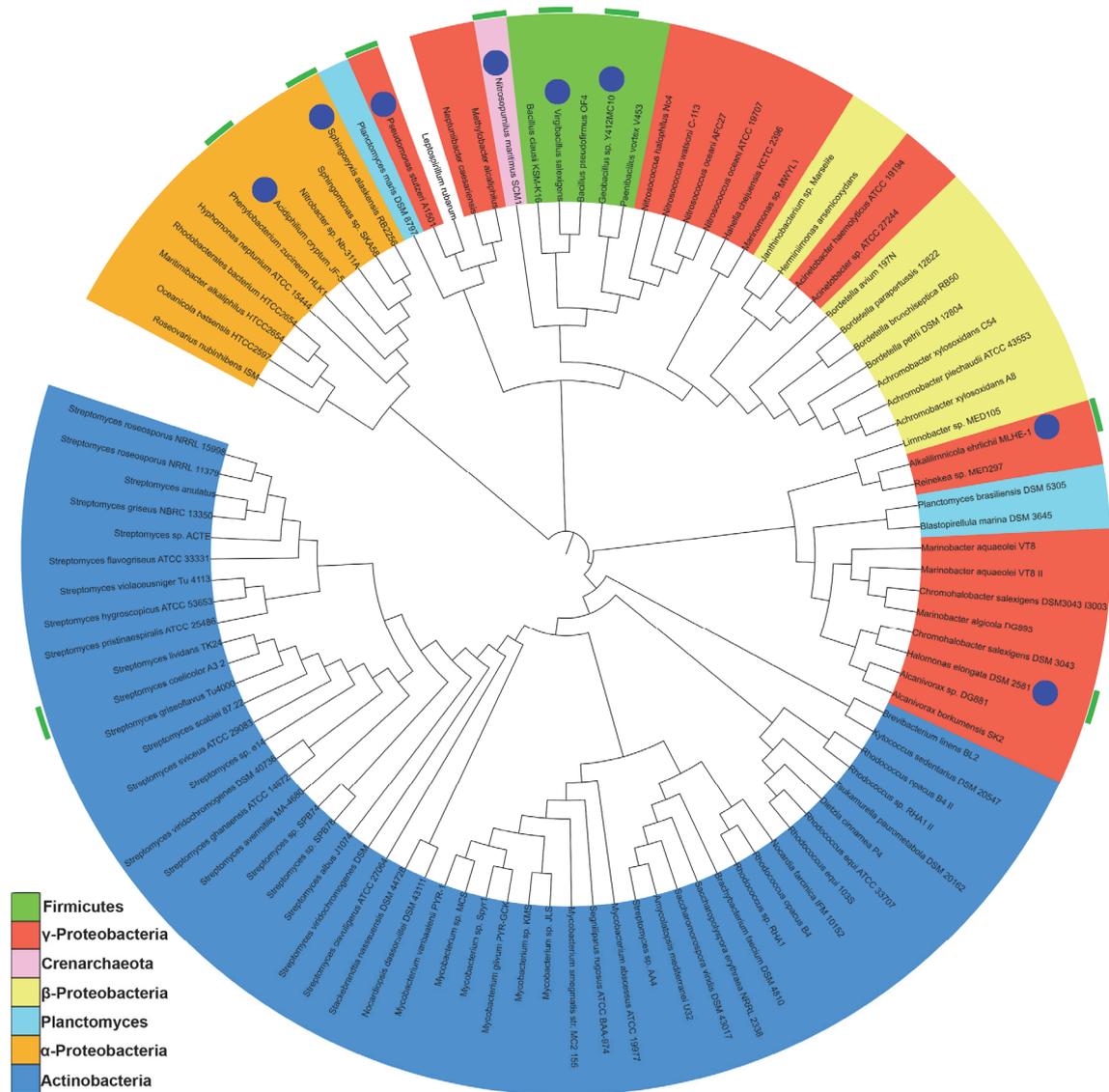


Abbildung 26: Alle EctD Sequenzen nach dem Alignment in Baumdarstellung. Alle bisher verfügbaren EctD Proteinsequenzen wurden miteinander aligniert und in einem Baum dargestellt. Die Farbdarstellung zeigt die Verteilung der verschiedenen EctD Sequenzen innerhalb der Familien der Bacteria. Das einzige bisher bekannte Archaeon mit einem EctD Protein ist das Crenarchaeon *Nitrosopumilus maritimus* (in rosa markiert). Als einziges Bakterium der Familie der Nitrospira ist *Leptospirillum rubarum* in weiß markiert. Alle blauen Kreise zeigen die klonierten EctD Proteine und die grünen Außenmarkierungen zeigen die Bakterien, aus denen biochemisch aktive EctD Proteine gewonnen wurden.

In Abbildung 26 ist das Ergebnis des Alignments aller momentan verfügbaren EctD Proteinsequenzen in einer Baumdarstellung gezeigt, um die Identitäten der einzelnen Proteine innerhalb der Bacteria/Archaea zu veranschaulichen. Zusätzlich wurden die jeweiligen Mikroorganismen in Bezug auf ihre taxonomische Zuordnung eingefärbt.

Den Hauptteil der EctD besitzenden Proteine machen die Actinobacteria mit 47% aus. Diese umfassen damit fast die Hälfte aller Mikroorganismen, die Ecto-in-hydroxylieren können. Auffällig dabei ist, dass es sich bei der Hälfte der Actinobacteria

um Bakterien der Gattung *Streptomyces* handelt. Sie bilden damit die größte und homogene Gruppe unter den Bacteria mit einem EctD Enzym. Es folgen die γ -Proteobacteria mit 23%, die α -Proteobacteria mit 11%, die β -Proteobacteria mit 10%, die Firmicutes mit 4%, die Planctomyceten mit 3% und die Nitrospira mit 1%. Die Crenarchaea sind mit 1% vertreten.

Die genauere Analyse der Abbildung 26 offenbart weitere interessante Vertreter aus dem Reich der *Bacteria* mit besonderen Eigenschaften und extremen Habitaten.

Das Gram-negative Bodenbakterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) aus der Klasse der Actinomyceten besitzt die Fähigkeit Ectoin und Hydroxyectoin zu synthetisieren. Das Genom von *S. coelicolor* A3(2) wurde 2002 veröffentlicht und beschrieben (Bentley *et al.*, 2002). Im Laufe der Zeit wurden aus diesem Bakterium eine Reihe wichtiger Antibiotika isoliert und charakterisiert (Hopwood, 2007). *S. coelicolor* besitzt in seinem Genom ein *ect*-Gencluster und zudem das für eine Hydroxylase codierende Gen *ectD*. Die Hydroxylase EctD aus *S. coelicolor* konnte bereits biochemisch analysiert und charakterisiert werden (Bursy *et al.*, 2008).

Als bisher einzigen Vertreter der Gattung der Nitrospira wurde das Bakterium *Leptospirillum rubarum* gefunden, das über eine Ectoin-Hydroxylase verfügt. Bei den Vertretern der Nitrospira handelt es sich um Bakterien der Nitrifizierer, die zu den wichtigsten Organismen im Stickstoffkreislauf gehören. Ob und wie viele weitere Bakterien dieser Klasse über das Ectoin Gencluster verfügen kann man derzeit nicht sagen, da es momentan erst vier komplette Genomsequenzen dieser Bakterien gibt.

Halomonas elongata ist ein Bakterium, das in hohen Salinitäten lebt. Es wird taxonomisch in die Klasse der γ -Proteobacteria eingruppiert und wurde ursprünglich aus einer Salzgewinnungsanlage in den Niederländischen Antillen isoliert (Vreeland *et al.*, 1980). *H. elongata* kann Salinitäten weit über 1,7 M (10 %) NaCl tolerieren und produziert dabei große Mengen an Ectoin und Hydroxyectoin (Göller *et al.*, 1998). Durch die Sequenzierung des Genoms 2010 konnten die verantwortlichen Gene für die Ectoin Synthese und deren Organisation analysiert werden (Schwibbert *et al.*, 2010). Diese sind in *H. elongata* als Cluster angeordnet, wobei sich das Gen für die Hydroxylase unabhängig vom Cluster an anderer Stelle im Genom befindet. *H. elongata* ist zudem in der Lage Ectoin und Hydroxyectoin zu metabolisieren und als N- und C-Quelle zu nutzen (Vargas *et al.*, 2006).

Ein Bakterium, das an einen Lebensraum mit extrem niedrigen Temperaturen angepasst ist, ist das aus Alaska isolierte marine Bakterium *Sphingopyxis alaskensis* RB2256. Die durchschnittliche Temperatur des Meerwassers, in dem *S. alaskensis*

lebt, beträgt 4° - 10°C. *S. alaskensis* konnte immer wieder in Wasserproben aus der nördlichen Nordsee sowie des nördlichen Pazifiks identifiziert werden (Lauro *et al.*, 2009). Daher entschied man sich, den Stamm im Labor zu kultivieren und das Genom zu sequenzieren. Das vollständig sequenzierte und annotierte Genom war daraufhin im Jahre 2009 verfügbar (Lauro *et al.*, 2009). Das Genom von *S. alaskensis* beinhaltet in Bezug auf die Ectoin Synthese eine interessante Besonderheit. Dem *ect*-Cluster von *S. alaskensis* schließen sich direkt die codierenden Gene für eine Hydroxylase und einer Aspartokinase in direkter Nachbarschaft an. Eine weitere physiologische Besonderheit ist die geringe Größe dieses Bakterium von <0,1 – 3 µM, so dass *S. alaskensis* als Ultramicrobium bezeichnet wird.

Ein Bakterium mit der Fähigkeit in heißen Quellen zu leben ist *Geobacillus* sp. Y412MC10 aus der Klasse der Firmicutes. Es wurde aus heißen Quellen im Yellow Stone National Park der USA isoliert und 2009 sequenziert. *Geobacillus* sp. Y412MC10 kann bei Temperaturen bis 93°C leben und wurde von der Firma Lucigen (Middletown, USA) aus biotechnologischem Interesse genauer untersucht, um eventuell neue Polymerasen und Restriktionsenzyme zu isolieren.

Zwei Vertreter der *Bacteria* mit besonders angepassten pH-Werten sind *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 und *Acidiphilium cryptum* JF-5. Das Gram-negative γ-Proteobakterium *A. ehrlichii* MLHE-1 wurde aus dem Mono-Lake in Mono County im zentral-östlichen Teil von Kalifornien (USA) isoliert. Der Mono-Lake ist ein alkalischer Salzsee mit einer Vielzahl gelöster Mineralien und einem durchschnittlichen pH-Wert von pH 10. *A. ehrlichii* MLHE-1 kann diesen hohen pH-Wert als auch den hohen Salzgehalt des Mono-Lake tolerieren (Hoeft *et al.*, 2007). Eine weitere Besonderheit von *A. ehrlichii* ist, dass es anorganische Elektronendonatoren wie Arsenit, Wasserstoff, Sulfid und Thiosulfat zum Wachstum nutzen kann (Hoeft *et al.*, 2007). Das Genom von *A. ehrlichii* wurde 2006 sequenziert und es konnte ein komplettes *ect*-Gencluster identifiziert werden, wobei das Gen der Ectoin-Hydroxylase an anderer Stelle im Genom lokalisiert ist.

Im Gegensatz zu *A. ehrlichii* kann das Gram-negative fakultativ anaerobe α-Proteobakterium *Acidiphilium cryptum* JF-5 in Habitaten mit extrem sauren pH-Werten (pH 2) leben (Küsel *et al.*, 1999). *A. cryptum* JF-5 wurde aus dem See einer alten Eisenmine im Osten Deutschlands isoliert. In den stillgelegten Eisenminen entstanden Seen mit extrem niedrigen pH-Werten, in denen nur besonders angepasste Organismen existieren können. *A. cryptum* kann nicht nur den sauren pH-Wert tolerieren, sondern auch durch die Oxidation von Glukose Eisen(III) reduzieren und somit als Elektronenakzeptor nutzen (Küsel *et al.*, 1999). Im Genom von *A. cryptum*

befindet sich ein kompletter *ect*-Gencluster inklusive der Gene für eine Ectoin-Hydroxylase und einer Aspartokinase.

Als bisher einziges Archaeon besitzt das Crenarchaeon *Nitrosopumilus maritimus* den kompletten Gencluster für die Ectoin Synthese inklusive des *ectD* Gens für eine Hydroxylase. Das Genom wurde 2006 sequenziert und 2010 veröffentlicht (Walker *et al.*, 2010). *N. maritimus* kann N₂ oxidieren und gehört zur der marinen Gruppe I der Archaea, die in der Mehrzahl in den Ozeanen vorkommen (Walker *et al.*, 2010). Da *N. maritimus* hauptsächlich im Meer zu finden und bisher das einzige Archaeon im Besitz der Ectoin Biosynthese Enzyme ist, könnte man vermuten, dass das Ectoin-Gencluster über horizontalen Gentransfer von im Meer lebenden Bakterien übernommen wurde, die über das *ect* Gencluster verfügen, wie z.B. *Nitrosococcus oceani*.

Ein weiteres Beispiel für horizontalen Gentransfer könnte das Bakterium *Planctomyces maris* DSM 8797 sein. Die EctD Sequenz clustert mit den EctD Sequenzen der γ -Proteobacteria und taucht dort isoliert auf (Abbildung 26). Zwei weitere Vertreter der Planctomyceten sind *Planctomyces brasiliensis* DSM 5305 und *Blastopirellula marina* DSM 3645. Die EctD Sequenzen dieser beiden Bakterien clustern zusammen mit marinen Vertretern der γ -Proteobacteria, was die Hypothese unterstützt, dass unter den marinen Bakterien das *ect*-Cluster durch horizontalen Gentransfer verbreitet wird.

5.3 Synthese und Klonierung weiterer Hydroxylasen aus extremophilen Mikroorganismen

Da in der Kristallstruktur von EctD aus *V. salexigens* das Co-Substrat 2-Oxoglutarat sowie das Substrat Ectoin fehlen, sollten weitere Ectoin-Hydroxylasen charakterisiert werden, um eventuell die vollständige EctD Kristallstruktur mit Substrat zu erhalten. Die Entscheidung fiel dabei auf Organismen aus extremen Habitaten.

Die Organismen aus unterschiedlichen, extremen Habitaten wurden ausgewählt, damit zum einen Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften der EctD Enzyme aus diesen angepassten Organismen identifiziert werden könnten, und um die Chancen bei einer erneuten Kristallisation zu erhöhen, eine Struktur mit Substrat oder Produkt zu erhalten. Es ist bekannt, dass sich Proteine derselben Klasse aus verschiedenen Organismen bei einer Kristallisation völlig unterschiedlich verhalten können und damit steigt die Wahrscheinlichkeit gute Kristalle für Röntgenstrukturanalysen zu erhalten (Dr. Sander Smits pers. Mitteilung). In Abbildung 27 sind die ausgewählten Bakterien in einer Übersicht zusammengefasst.

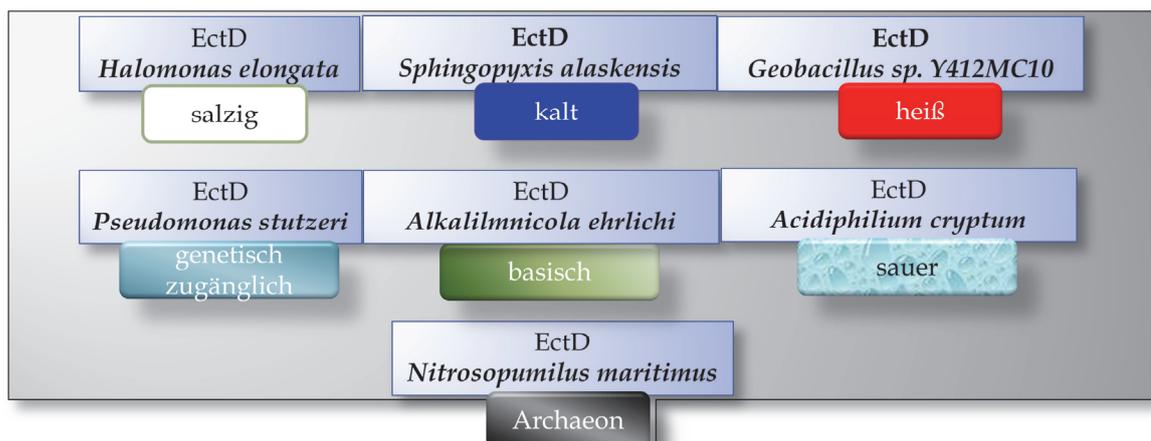


Abbildung 27: Auswahl der Mikroorganismen mit einer Ectoin-Hydroxylase aus extremen Habitaten. Um möglichst alle extremen Lebensräume von Bakterien abzudecken, wurden neben halophilen Bakterien, Mikroorganismen mit verschiedenen Temperatur-Optima und pH-Optima ausgewählt.

Als zusätzliches halophiles Bakterium zu *V. salexigens* wurde *Halomonas elongata* ausgewählt. Zwei Vertreter, die in Habitaten mit extremen pH-Werten vorkommen, sind *Acidiphilium cryptum* JF-5 (pH-Wert von 2) und *Alkalilimnicola ehrlichii* (pH-Wert von 10). *Sphingopyxis alaskensis* kann bei extrem niedrigen (bis 4° C) und *Geobacillus sp. Y412MC10* bei extrem hohen Temperaturen (bis 93° C) leben. Die Hydroxylase aus *Pseudomonas stutzeri* A1501 wurde ausgewählt, weil das *ect*-Gencluster eine Besonderheit bezüglich eines Gens für eine Aspartokinase aufweist, die im Weiteren noch biochemisch analysiert wurde. Als bisher einziges Archaeon mit der Möglichkeit

zur Ectoin und Hydroxyectoin Synthese wurde das Crenarchaeon *Nitrosopumilus maritimus* ausgewählt. Die Parameter der ausgewählten EctD Proteinsequenzen sind in Tabelle 15 zusammengefasst

Tabelle 15: Parameter der ausgewählten EctD Sequenzen

<i>EctD Wirtsorganismus</i>	<i>Länge [AS]</i>	<i>Molekulargewicht [kDa]</i>	<i>pI</i>	<i>Ladung bei pH 7,0</i>
<i>Virgibacillus salexigens</i>	300	34,4	5,8	-5,5
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	306	34,1	5,4	-10,2
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	332	37,3	5,7	-8,9
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	271	30,4	5,3	-10,3
<i>Geobacillus sp.</i> Y412MC10	302	34,8	5,6	-10,9
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1	302	34,2	5,6	-7,4
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	306	34,1	5,8	-6,3
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	304	34,6	5,8	-5,5

Alle Hydroxylasen aus den verschiedenen Organismen wurden analog zu der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens* entweder in den Vektor pASK-IBA3 oder pASG-IBA3 kloniert (4.3.10). Diese Vektorsysteme wurde deswegen gewählt, da man zuvor mit der heterologen Produktion und Reinigung der EctD Hydroxylase aus *V. salexigens* in *E. coli* gute Produktions- und Reinigungsergebnisse erzielen konnte und zusätzlich durch den C-terminal fusionierten *Strep*-tag eine bessere Vergleichbarkeit der Proteine untereinander erhält. Als *E. coli* Stamm wurde in allen Produktionen der Stamm DH5 α gewählt, da man in diesem *E. coli* Stamm ein stabiles Protein und eine gute Proteinausbeute für EctD aus *V. salexigens* erzielen konnte.

Für die Klonierung der für das EctD Enzym codierenden Gene wurden aus den Organismen *Pseudomonas stutzeri* A1501, *Sphingopyxis alaskensis* und *Halomonas elongata* die chromosomale DNA isoliert und anschließend über die Primer, wie in 4.3.1 angegeben, amplifiziert. Danach erfolge die Insertion der amplifizierten Fragmente mittels des Restriktionsenzym *Bsal* in den Zielvektor pASK-IBA3 (4.3.10).

Für die Klonierung der *ectD* Gene aus den Bakterien *Geobacillus sp.* Y412MC10, *Acidiphilium cryptum* und *Alkalilimnicola ehrlichii* sowie dem Archaeon *Nitrosopumilus maritimus* konnten die *ectD* Gene nicht über die chromosomale DNA erhalten werden. Die Gründe waren dafür einerseits, dass die Organismen entweder nicht über Stammsammlungen erhältlich waren (*G. sp.* Y412MC10) oder schwer kultivierbar sind (*N. maritimus*). Diese Gene wurden daher über die Firma Genscript

(Piscataway, USA) für die Zielvektoren pASG-IBA3 synthetisiert. Der Vorteil der Synthese dieser Gene war zudem, dass die DNA Sequenzen für den Expressionswirt *E. coli* optimiert werden konnten. Dafür wurden die Codons für *E. coli* als Expressionswirt angepasst. Zudem wurden durch die Firma Genscript (USA), mittels eines patentierten Verfahrens, störende Sekundärstrukturen entfernt und der GC Gehalt und weitere Parameter angepasst und verbessert. Durch die Synthese war es möglich, direkt die benötigten Schnittstellen für die Klonierung in das Stargate System von IBA (Göttingen) einzubringen. Dazu wurden die Sequenzen für das Restriktionsenzym *Lgul* in sense und antisense an die entsprechende Stelle der DNA Sequenz eingefügt. Anschließend wurde das synthetisierte Fragment in den gewünschten Zielvektor inseriert (4.3.10).

5.4 Heterologe Produktion und Reinigung weiterer EctD-Proteine

Alle Ectoin-Hydroxylasen der verschiedenen Organismen wurden heterolog in *E. coli* überproduziert und anschließend über eine *Strep-tag* Affinitäts-Chromatographiesäule gereinigt. In Abbildung 28 ist ein 15% SDS Gel gezeigt, in dem alle gereinigten Ectoin- Hydroxylasen aufgetrennt wurden. Die EctD Enzyme aus den verschiedenen Organismen haben eine unterschiedliche Größe und ein unterschiedliches Molekulargewicht (Tabelle 15).

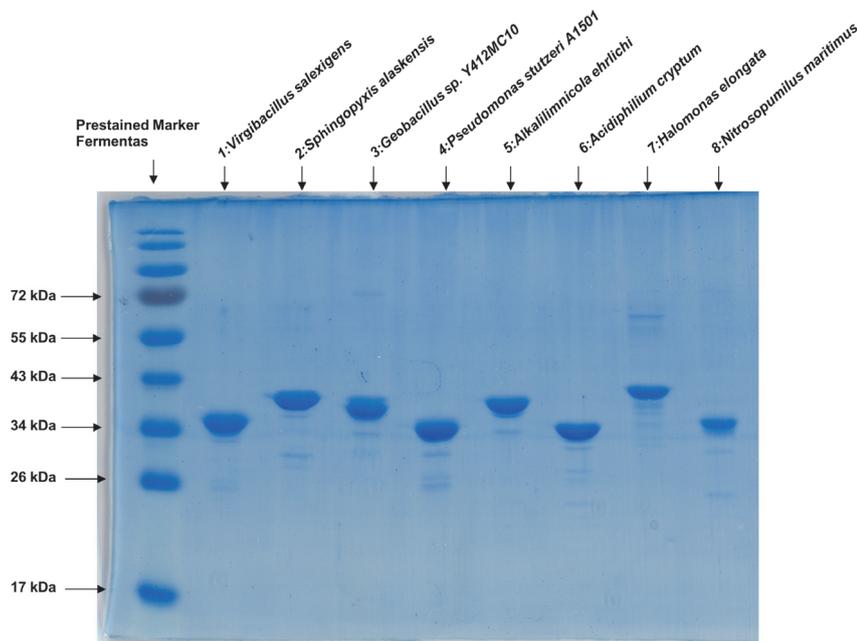


Abbildung 28: Reinigung aller produzierten Ectoin-Hydroxylasen aus den verschiedenen Organismen. Die Abbildung zeigt ein 15% SDS-Gel nach der FPLC-Reinigung aller klonierten EctD Enzyme mittels *Strep-tag*[®] II. Aufgetragen wurde jeweils 4 µg jedes gereinigten Proteins und die EctD Proteine wurden anschließend bei 25 mA ca. 180 min aufgetrennt. In Spur 1 wurde 7 µl des Größenmarkers PageRuler[™] Prestained Protein Ladder von Fermentas aufgetragen

Wie aus Abbildung 28 zu erkennen ist, konnten alle EctD Proteine in guter Reinheit per *Strep*-tag Reinigung gewonnen werden und für weitere Aktivitätstests verwendet werden.

5.5 Aktivitätstest der gereinigten Hydroxylasen

Um zu überprüfen, ob das jeweils gereinigte EctD Enzym in seiner Funktion aktiv ist, wurde für jede Hydroxylase ein Aktivitätstest, wie in 4.4.7 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde in einem initialen Aktivitätstest die Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin getestet. Um zu gewährleisten, dass genügend aktives Protein vorhanden ist, wurde eine Proteinmenge von 4 µg bis 16 µg eingesetzt und der Aktivitäts-Essay mindestens 30 min unter starkem Schütteln bei mindestens 750 rpm auf einem Thermocycler durchgeführt. Das starke Schütteln des Ansatzes ist notwendig, um eine ausreichende O₂-Versorgung während der enzymatischen Reaktion zu gewährleisten, da die EctD Proteine sauerstoffabhängig sind (Abbildung 11). Bei allen gereinigten EctD Enzymen aus den Bakterien *S. alaskensis*, *G. sp. Y412MC10*, *P. stutzeri* A1501, *A. ehrlichii*, *A. cryptum* und *H. elongata* konnte bereits bei einer Konzentration von jeweils 4 µg Protein innerhalb von 30 min fast die komplett eingesetzte Menge von 6 mM Ectoin zu Hydroxyectoin umgesetzt werden. Auch bei der Ectoin-Hydroxylase aus dem Archaeon *N. maritimus* reichten 4 µg des Enzyms um 6 mM Ectoin nahezu vollständig zu Hydroxyectoin umzusetzen. Um zu klären, in welchen Parametern sich die Hydroxylasen unterscheiden und ob die Proteine in dem jeweiligen Mikroorganismus den Umgebungsbedingungen in Bezug auf die Temperatur, den pH-Wert und den umgebenen osmotischen Druck angepasst sind, wurden initiale Tests mit jeder Hydroxylase bei diesen verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Um zu ermitteln, welche exakten chemischen Eigenschaften jede einzelne Hydroxylase besitzt, wurden, nach der Optimierung der Essaybedingungen, von jedem Enzym die kinetischen Parameter genauer untersucht.

5.5.1 Temperatureoptimum der gereinigten Ectoin-Hydroxylasen

Die einzelnen Ectoin-Hydroxylasen wurden hinsichtlich ihrer Temperatureigenschaften genauer untersucht. Diese waren zum Teil unterschiedlich, jedoch konnte bei fast allen Hydroxylasen eine ideale Temperatur für die Hydroxylierung von Ectoin im Bereich von 30°C - 40°C ermittelt werden (Tabelle 16). In den Analysen der EctD Enzyme wird nur die Hydroxylase aus *H. elongata* jeweils exemplarisch beschrieben. Diese Hydroxylase stammt aus dem Bakterium, das biotechnologisch genutzt wird, um Ectoin zu erhalten. Daher ist auch das biotechnologische Interesse an der Ectoin-Hydroxylase aus *H. elongata* sehr hoch, um die gewonnenen Erkenntnisse eventuell in Biotransformationsprozessen zu nutzen.

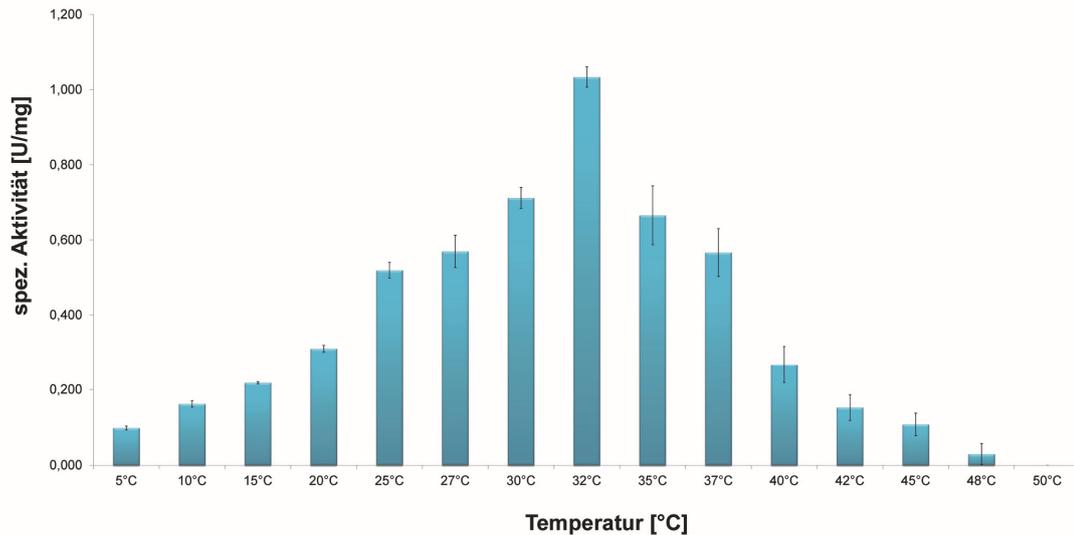


Abbildung 29: Temperaturoptimum der Ectoin-Hydroxylase aus *H. elongata*. Das Temperaturoptimum der Ectoin-Hydroxylase aus *Halomonas elongata* wurde getestet zwischen 5°C und 50°C und liegt bei 32°C.

In Abbildung 29 ist das Temperaturoptimum der Ectoin-Hydroxylase aus *H. elongata* exemplarisch aufgezeigt. Das Temperaturoptimum wurde durch den Aktivitätstest, wie in 3.4.6 beschrieben, bestimmt. Dazu wurden mindestens 16 µg jeder Hydroxylase mit 6 mM Ectoin für 10 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Jeder Essay wurde von einer Temperatur von 5°C bis mindestens 60°C in einem temperierbaren Wasserbad unter ständigem Schütteln für eine ausreichende Sauerstoffzufuhr durchgeführt. Wurde über 60°C noch Aktivität gemessen, wurde in 5°C Schritten entsprechend weiter gemessen. Die Temperaturoptima und der Temperaturbereich, in dem Aktivität gemessen werden konnte, sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Zum Vergleich wurden die bereits bestimmten Temperaturoptima der Ectoin-Hydroxylasen aus *V. salelixgens* sowie aus *S. coelicolor* A3(2) mit angegeben.

Wie aus den Ergebnissen der Temperaturoptima für die Hydroxylasen erkennbar ist (Tabelle 16), gibt es keine deutlichen Unterschiede. Als einzige Besonderheit sind die EctD Enzyme aus *S. alaskensis*, *A. cryptum* und *Geobacillus sp.* Y412MC10 hervorzuheben. Die Enzyme aus diesen Bakterien konnten deutlich höhere Temperaturen (75°C) tolerieren als die übrigen Hydroxylasen.

5.5.2 pH-Optimum der gereinigten Ectoin-Hydroxylasen

Um zu überprüfen, ob die gereinigten Hydroxylasen unterschiedliche pH Optima besitzen, wurde jede Hydroxylase mit unterschiedlichen Puffern in einem pH Bereich von 5,5 – 9,6 getestet. Dazu wurde jeweils die gleiche Menge Protein und immer dieselben Essaybedingungen eingehalten.

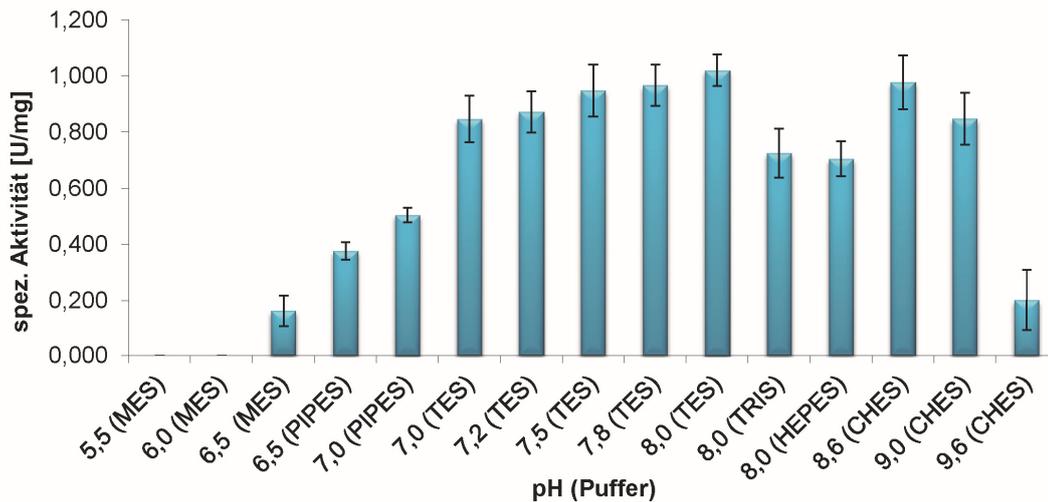


Abbildung 30: pH-Optimum der Ectoin-Hydroxylase aus *H. elongata*. Das pH-Optimum der Ectoin-Hydroxylase aus *Halomonas elongata* wurde getestet zwischen pH 5,5 und pH 9,6.

Das pH-Optimum für die Ectoin-Hydroxylase aus *H. elongata* ist in Abbildung 30 als Beispiel dargestellt. Die Ectoin-Hydroxylase setzte mit dem TES-Puffer bei einem pH-Wert von 8,0 am meisten Ectoin zu Hydroxyectoin um. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der pH-Optima aller getesteten Ectoin-Hydroxylasen zusammengefasst.

Hierbei ist, ähnlich wie bei den gemessenen Temperaturoptima, kein signifikanter Unterschied zwischen den Hydroxylasen gemessen worden. Alle Hydroxylasen bevorzugen einen pH-Wert zwischen pH 7,5 und pH 8,0. Als Puffersystem mit den besten Umsatzraten wurde der TES-Puffer für alle Hydroxylasen ermittelt. Die Ergebnisse des pH Bereichs, in denen noch Enzymaktivität messbar war, lieferten ebenfalls keine drastischen Unterschiede. Lediglich die EctD Proteine aus *H. elongata* und *A. ehrlichii* tolerierten keine pH-Werte unter pH 6,5. Im Falle des EctD Enzyms aus *A. ehrlichii* könnte dieses Ergebnis ein erstes Indiz auf die Anpassung des Bakteriums an das alkalische Habitat sein. Alle getesteten Hydroxylasen setzten bei pH-Werten über pH 9,6 kein Ectoin mehr um. Die Annahme, dass *A. ehrlichii* weitaus höhere und *A. cryptum* pH-Werte niedrige tolerieren könnten, bestätigte sich nicht.

5.5.3 Einfluss unterschiedlicher Salze auf die Enzymaktivität der Hydroxylasen

Um zu überprüfen, ob und welchen Einfluss verschiedene Salze auf die Aktivität der Hydroxylasen haben, wurden Hydroxylierungsreaktionen in Gegenwart verschiedener Salze und bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen durchgeführt.

In Abbildung 31 ist die Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin mit der Ectoin-Hydroxylase aus *H. elongata* bei unterschiedlichen KCl Konzentrationen exemplarisch gezeigt. Für diesen Versuch wurde jeder Essayansatz zunächst gleich angesetzt (10 mM TES pH 8,0, 6 mM Ectoin, 10 mM 2-Oxoglutarat, 1 mM FeSO₄ bei 32°C und 750 rpm im Thermomixer) und die KCl Konzentration variiert. Es konnte eine Verbesserung der Enzymaktivität bei Zugabe von KCl bis zu einer Konzentration von 150 mM gemessen werden. Darüber hinaus fiel die Aktivität wieder ab und wurde bei einer Konzentration von 1 M KCl völlig inhibiert. Auffällig hierbei war jedoch, dass bis zu einer Konzentration von 750 mM KCl annähernd so viel Ectoin hydroxyliert werden konnte wie in den Enzymessays ohne KCl.

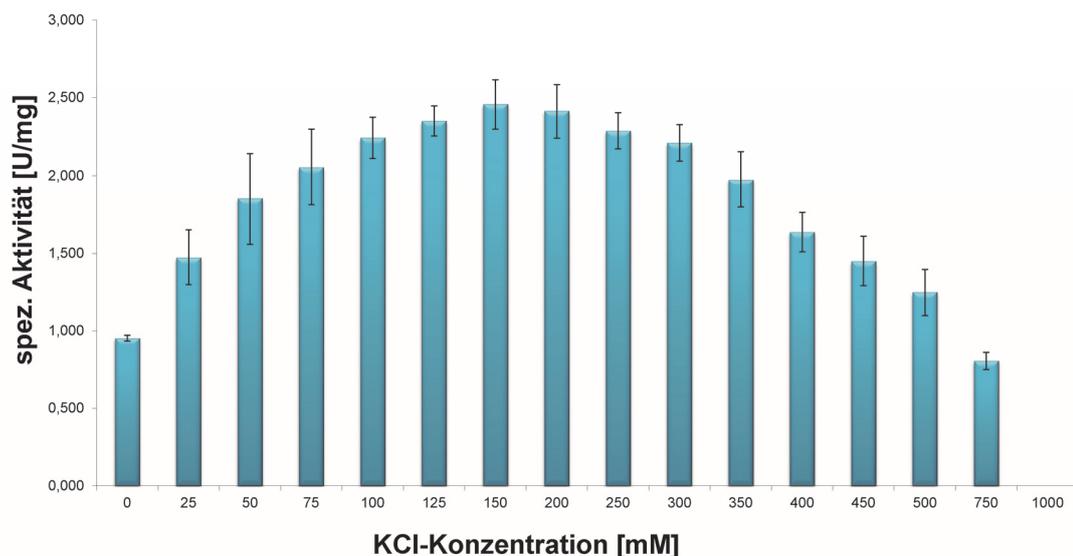


Abbildung 31: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus *H. elongata* unter verschiedenen KCl-Konzentrationen. Um zu überprüfen, ob KCl einen Einfluss auf die Enzymaktivität von EctD hat, wurde die Hydroxylierungsreaktion in Gegenwart von KCl in den Konzentrationen von 0 – 1000 mM durchgeführt. Bei der Hydroxylase aus *H. elongata* wurde bei einer Konzentration von 150 mM KCl die höchste Aktivität gemessen.

Die Bestimmung der Salzabhängigkeit von EctD Proteinen wurde auf die Ectoin-Hydroxylasen fokussiert, die aus halophilen Organismen stammen. Bei diesen konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Enzyme für die Synthese von Ectoin (EctABC) erst bei hohen Salzkonzentrationen aktiviert werden (Ono *et al.*, 1999). Zum Vergleich wurde die EctD Hydroxylase aus *V. salexigens*, *Geobacillus sp.*

Y412MC10, *S. alaskensis*, *A. ehrlichii* und *A. cryptum* JF-5 getestet. Bei den EctDs aus *V. salexigens*, *Geobacillus* sp. Y412MC10 und *S. alaskensis* konnte erst ab hohen Konzentrationen von 750 mM KCl die Aktivität inhibiert werden, wobei bis 750 mM KCl nahezu gleiche Umsatzraten in allen Enzymen gemessen wurden.

In den Abbildungen 32, 33 und 34 sind die Abhängigkeiten der Enzymaktivität von EctD aus *H. elongata* bei verschiedenen Salzen wie Natriumchlorid, Kalium-Glutamat und Ammoniumchlorid gezeigt. EctD aus *H. elongata* wurde für diese weiteren Messungen herangezogen, da bereits alle Enzyme des *ect*-Clusters aus *H. elongata* hinsichtlich ihrer Eigenschaften in Anwesenheit von verschiedenen Salzen analysiert wurden (Ono *et al.*, 1999). In allen Essays konnte eine verbesserte Hydroxylierungsreaktion durch die Zugabe des jeweiligen Salzes verzeichnet werden. Die Salz-Konzentrationen waren bei allen eingesetzten Salzen vergleichbar. So konnte eine maximale Enzymaktivität in Gegenwart von Kaliumchlorid bei 150 mM, in Gegenwart von Natriumchlorid bei 75 mM, in Gegenwart von Kalium-Glutamat bei 100 mM und in Gegenwart von Ammoniumchlorid bei 100 mM beobachtet werden. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der anderen Hydroxylasen zur Enzymaktivität unter verschiedenen KCl Konzentrationen zusammengefasst. Ob sich die anderen Hydroxylasen hinsichtlich ihrer Eigenschaft und Salztoleranz unterscheiden, muss in weiteren Analysen ermittelt werden.

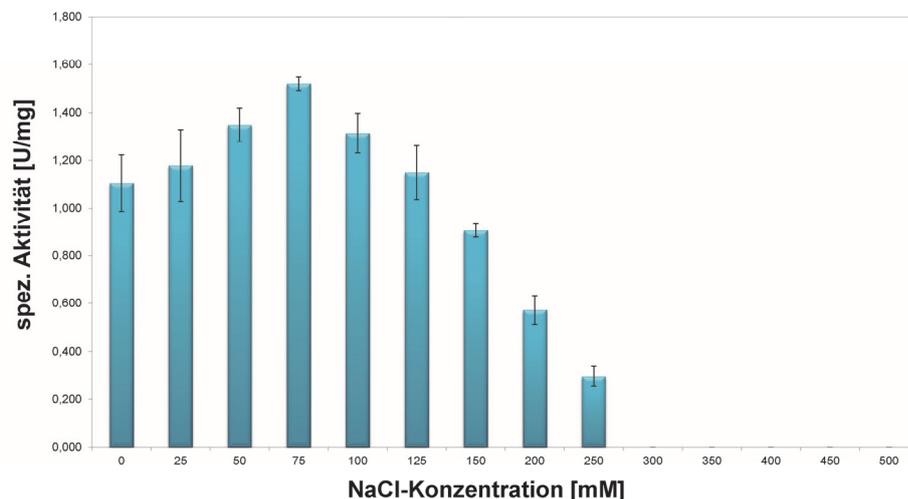


Abbildung 32: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus *H. elongata* unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen. Um zu überprüfen, ob NaCl einen Einfluss auf die Enzymaktivität von EctD hat, wurde die Hydroxylierungsreaktion in Gegenwart von NaCl in den Konzentrationen von 0 – 500 mM durchgeführt. Bei der Hydroxylase aus *H. elongata* wurde bei einer Konzentration von 75 mM NaCl die höchste Aktivität gemessen.

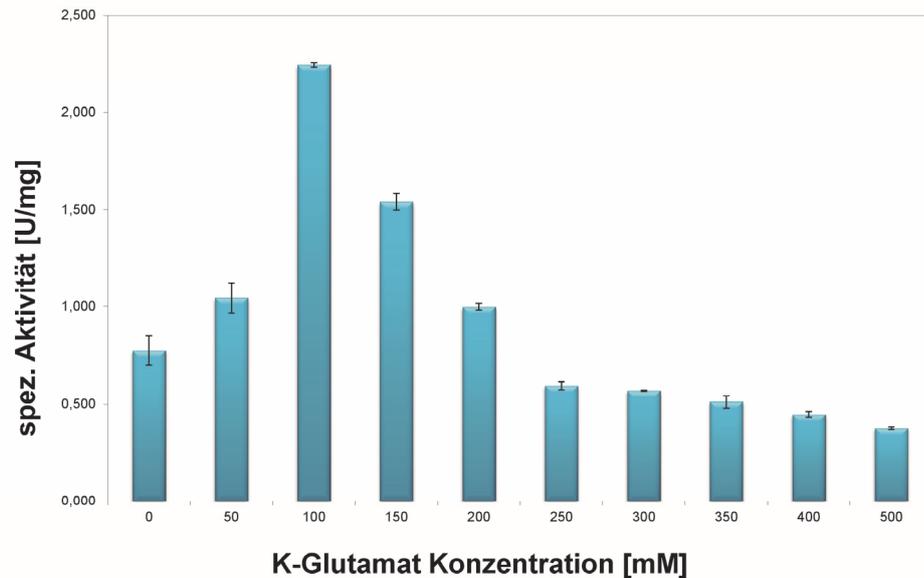


Abbildung 33: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus *H. elongata* unter verschiedenen K-Glutamat-Konzentrationen. Um zu überprüfen, ob Kalium-Glutamat einen Einfluss auf die Enzymaktivität von EctD hat, wurde die Hydroxylierungsreaktion in Gegenwart von Kalium-Glutamat in den Konzentrationen von 0 – 500 mM durchgeführt. Bei der Hydroxylase aus *H. elongata* wurde bei einer Konzentration von 100 mM Kalium-Glutamat die höchste Aktivität gemessen.

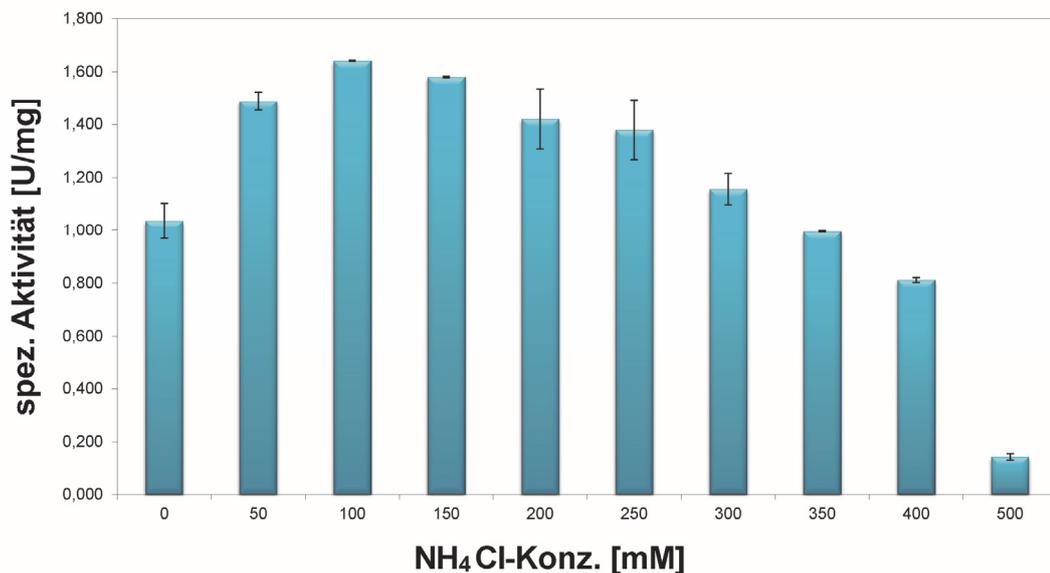


Abbildung 34: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus *H. elongata* unter verschiedenen Ammoniumchlorid-Konzentrationen. Um zu überprüfen, ob Ammoniumchlorid einen Einfluss auf die Enzymaktivität von EctD hat, wurde die Hydroxylierungsreaktion in Gegenwart von NH₄Cl in den Konzentrationen von 0 – 500 mM durchgeführt. Bei der Hydroxylase aus *H. elongata* wurde bei einer Konzentration von 100 mM NH₄Cl die höchste Aktivität gemessen.

5.5.4 Einfluss von Katalase auf die Stabilität der Ectoin-Hydroxylasen

Bei der Hydroxylierungsreaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin entsteht ein Sauerstoffradikal, welches zur Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) führen kann. Somit besteht die Gefahr, dass es im Verlauf der Hydroxylierungsreaktion zu einer Anreicherung von Sauerstoffradikalen kommen kann, was dazu führen könnte, dass das EctD Protein inaktiviert oder denaturiert wird. Um das EctD Protein vor diesem denaturierenden Effekt zu schützen, kann dem *in vitro* Essay das Protein Katalase zugefügt werden. Katalase kann Wasserstoffperoxid zu H_2O und O_2 spalten und so schädigende Sauerstoffradikale eliminieren. EctD aus *V. salexigens* konnte nach Zugabe von ca. 1300 U Katalase fünfmal mehr Ectoin zu Hydroxyectoin umsetzen (Bursy *et al.*, 2008). Im Vergleich dazu wurde mit EctD aus *H. elongata* untersucht, ob und welche Konzentration von Katalase zu einer verbesserten Enzymaktivität führt (Abbildung 35). Da nach diesen Essays und den anschließenden Messungen per HPLC immer wieder große Probleme während der HPLC-Analytik durch Verstopfung des Systems auftraten, konnten diese Messungen nicht für alle EctD Proteine durchgeführt werden. Alle biochemischen Parameter wurden daher ohne Zugabe von Katalase bestimmt.

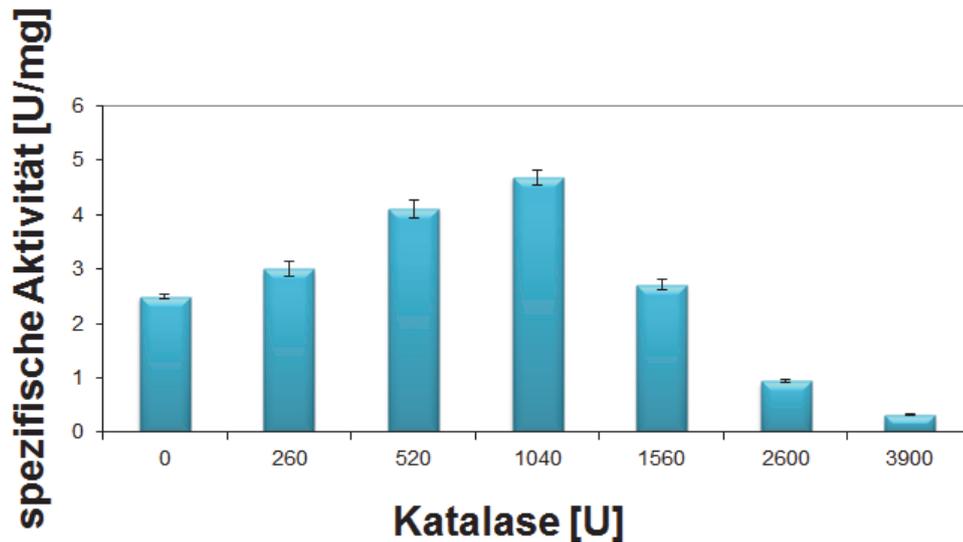


Abbildung 35: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus *H. elongata* bei verschiedenen Katalase Konzentrationen. Um zu überprüfen, ob Katalase einen Einfluss auf die Enzymaktivität von EctD hat, wurden steigende Konzentrationen von Katalase in die Hydroxylierungsreaktion gegeben. Bei der Hydroxylase aus *H. elongata* wurde in Gegenwart von 1040 U Katalase doppelt so viel Ectoin zu Hydroxyectoin hydroxyliert wie unter Normalbedingungen ohne Katalasezugabe.

5.5.5 Einfluss von Chelatoren auf die Enzymaktivität von EctD

EDTA ist ein Eisenchelator, der das Eisen in der Hydroxylase komplexiert, das Eisen aus dem Protein löst und dadurch die Enzymreaktion inhibiert. Daher wurde der Einfluss steigender EDTA-Konzentrationen auf die Enzymaktivität von EctD untersucht (Abbildung 36). Dabei konnte festgestellt werden, dass bereits 2 mM EDTA ausreicht, um die Hydroxylierungsreaktion für Ectoin vollständig zu inhibieren. Dieser Wert konnte bei allen Hydroxylasen vergleichbar bestimmt werden.

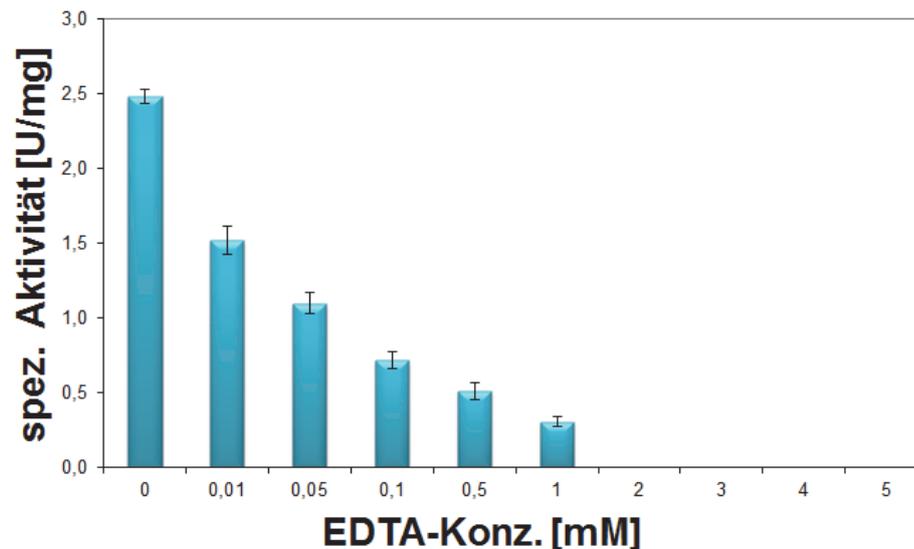


Abbildung 36: Abhängigkeit der Enzymaktivität von EctD aus *H. elongata* bei verschiedenen EDTA Konzentrationen. Um zu überprüfen, ob EDTA EctD inhibieren kann, wurden steigende Konzentrationen von EDTA in die Hydroxylierungsreaktion gegeben. Die Hydroxylase aus *H. elongata* wurde bei 2 mM EDTA vollständig inhibiert.

Dieses Ergebnis bestätigt zusätzlich, dass das Eisen in den EctD Enzymen absolut essentiell ist. Durch das Herauslösen des Eisens durch EDTA kann die Hydroxylierungsreaktion nicht mehr stattfinden und EctD ist inaktiv.

Tabelle 16: Übersicht der gemessenen Parameter der Ectoin-Hydroxylasen

EctID Wirtsorganismus	Temperaturoptimum [°C]	Temperaturbereich [°C]	pH-Optimum	pH-Bereich	KCl-Optimum [mM]	KCl-Aktivitätsbereich [mM]	KCl-Inhibition [mM]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	32	10 – 60	7,5	n.b.*	n.b.*	n.b.*	n.b.*
<i>Virgibacillus salexigens</i>	32	10 – 60	7,5	5 – 10	-	0 – 750	ab 750
<i>Halomonas elongata</i>	32	5 – 48	8,0	6,5 – 9,6	150	0 – 750	ab 750
<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	40	5 – 75	8,0	5,5 – 9,6	-	0 – 1000	ab 750
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC10	40	5 – 75	7,5	5,5 – 9,6	-	0 – 750	ab 750
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	35	10 – 50	7,5	5,5 – 9,6	n.b.*	n.b.*	n.b.*
<i>Alkalimnicola ehrlichi</i>	35	5 – 45	7,5	6,5 – 9,6	150	0 – 1000	ab 500
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	32	5 – 75	8,0	5,5 – 9,6	100	0 – 1000	ab 500
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	35	5 – 50	7,5	5,5 – 9,6	n.b.*	n.b.*	n.b.*

*n.b. = dieser Wert wurde nicht bestimmt; - = kein Optimum messbar; die Hydroxylaseaktivität wurde durch Zugabe von KCl nicht gesteigert

5.6 Biochemische Parameter der Ectoin-Hydroxylasen

Zu jeder Ectoin-Hydroxylase aus den unterschiedlichen Mikroorganismen wurden, nach der Ermittlung der idealen Messbedingungen, die kinetischen Parameter (K_m , v_{max} , k_{cat}) für die Umsetzung des Substrats Ectoin und des Co-Substrats 2-Oxoglutarat bestimmt.

5.6.1 Enzymkinetik der gereinigten Ectoin-Hydroxylasen

Um die enzymatische Aktivität der Hydroxylasen zu bestimmen, wurden von jeder Hydroxylase der K_m - und der v_{max} -Wert für die Umsetzung des Substrats Ectoin ermittelt. Zudem wurde die Wechselzahl k_{cat} errechnet. Für die Bestimmung des K_m -Wertes für Ectoin wurden steigende Ectoin-Konzentrationen von 0 mM bis 35 mM verwendet. Jeder Testansatz wurde auf die zuvor ermittelten idealen Testbedingungen hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Salzgehalt angepasst

Exemplarisch ist die Bestimmung der biochemischen Parameter an der Hydroxylase aus *H. elongata* in Abbildung 37 gezeigt. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM 2-Oxoglutarat, 1 mM $FeSO_4$, 150 mM KCl und 10 mM TES-Puffer (pH 8,0). Das Gesamtvolumen jedes Testansatzes betrug 30 μ l. Die Reaktion wurde nach dessen Ablauf mit 30 μ l Acetonitril gestoppt. Die Dauer der Inkubation betrug, in Abhängigkeit zur eingesetzten Proteinmenge, 5 min, um einen guten Umsatz von Ectoin zu Hydroxyectoin zu gewährleisten und um im linearen Bereich der Messung zu bleiben.

Der K_m für das Substrat Ectoin beträgt $5,7 \pm 0,6$ mM, der v_{max} $2,5 \pm 0,2$ U/mg. Die errechnete Wechselzahl k_{cat} liegt bei 1 s^{-1} .

Die Auftragung der Messungen erfolgte zum einen nach Michealis-Menten (Abbildung 37 links) und zum anderen im reziproken Plot nach Lineweaver-Burk (Abbildung 37 rechts). Alle Messungen wurden unabhängig jeweils 3-mal durchgeführt und mittels des Programms GraphPad Prism 6 geplottet.

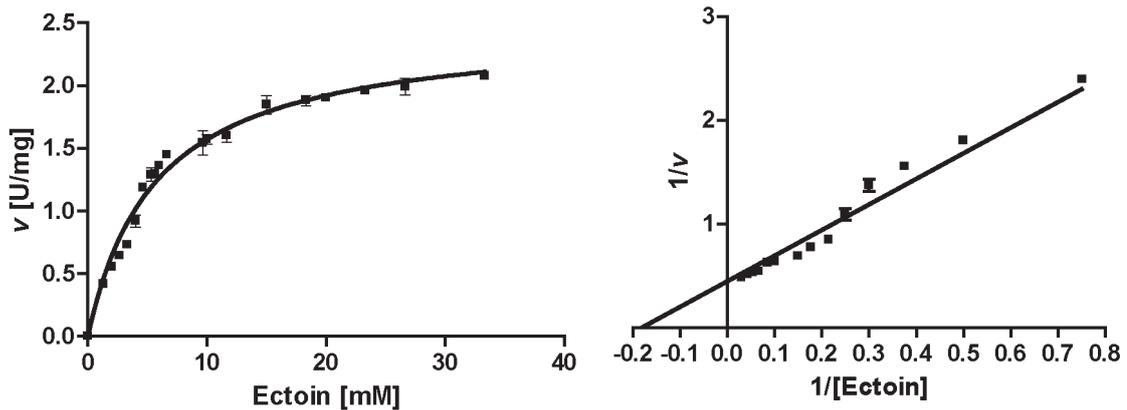


Abbildung 37: Bestimmung von K_m und v_{max} für Ectoin von EctD *H. elongata*. Um den K_m und v_{max} für die Hydroxylase aus *H. elongata* zu bestimmen wurden steigende Konzentrationen von Ectoin in Bezug auf die Umsatzgeschwindigkeit geplottet. Links ist die Auftragung nach Michealis-Menten und rechts nach Lineweaver-Burk abgebildet. Der K_m für das Substrat Ectoin beträgt $5,7 \pm 0,6$ mM, der v_{max} $2,5 \pm 0,2$ U/mg. Die errechnete Wechselzahl k_{cat} liegt bei 1 s^{-1} .

In Tabelle 17 sind die Werte für K_m , k_{cat} und v_{max} aller gemessenen Ectoin-Hydroxylasen für das Substrat Ectoin zusammengefasst. In die Tabelle wurden zum Vergleich auch die Werte der gereinigten Hydroxylasen aus *S. coelicolor* A3(2) und *V. salexigens* eingefügt.

Tabelle 17: Bestimmung von K_m , k_{cat} und V_{max} der Hydroxylasen für Ectoin

EctD Wirtsorganismus	K_m [mM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	$2,6 \pm 0,2^{\#}$	$20 \pm 1^{\#}$	-*
<i>Virgibacillus salexigens</i>	$3,5^{\blacksquare}$	$13,8^{\blacksquare}$	-*
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	$5,7 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,2$	1
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	$9,8 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,2$	1,7
<i>Geobacillus sp.</i> Y412MC10	-*	-*	-*
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	-*	-*	-*
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1	$9,0 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$	0,7
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	$10 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,3$	2,3
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	-*	-*	-*

* = dieser Wert wurde nicht bestimmt; # = ermittelt von (Bursy *et al.*, 2008) ; \blacksquare ermittelt von (Bursy *et al.*, 2007)

Bislang konnten die genauen kinetischen Parameter für die EctD Hydroxylasen aus *Geobacillus sp.* Y412MC10, *P. stutzeri* A1501 und *N. maritimus* noch nicht abschließend ermittelt werden. Erste Messreihen deuten darauf hin, dass sich die biochemischen Parameter im selben Bereich wie die übrigen EctD Enzyme befinden und keine deutlichen Unterschiede erkennbar sind.

5.6.2 K_m Wert für das Co-Substrat 2-Oxoglutarat der gereinigten Ectoin-Hydroxylasen

Um die Bindung des Co-Substrats 2-Oxoglutarat in den gereinigten Hydroxylasen zu bestimmen, wurde der K_m -Wert für 2-Oxoglutarat gemessen. In Abbildung 38 ist die Bestimmung des K_m -Werts für 2-Oxoglutarat für EctD aus *H. elongata* exemplarisch gezeigt. Der K_m für 2-Oxoglutarat für EctD aus *H. elongata* beträgt $5,7 \pm 0,6$ mM. Für alle weiteren Hydroxylasen wurde analog vorgegangen.

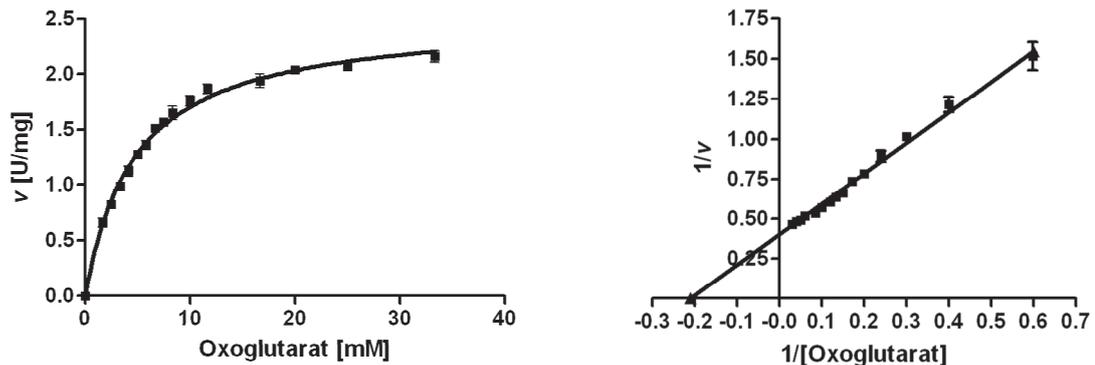


Abbildung 38: Bestimmung von K_m für das Co-Substrat 2-Oxoglutarat von EctD aus *H. elongata*. Um den K_m -Wert für die Hydroxylase aus *H. elongata* für das Co-Substrat zu bestimmen, wurden steigende Konzentrationen von 2-Oxoglutarat in Bezug auf die Umsatzgeschwindigkeit geplottet. Links ist die Auftragung nach Michealis-Menten und rechts nach Lineweaver-Burk abgebildet. Der K_m für 2-Oxoglutarat für EctD aus *H. elongata* beträgt $5,7 \pm 0,6$ mM.

In Tabelle 18 sind die K_m -Werte für 2-Oxoglutarat von den weiteren Ectoin-Hydroxylasen angegeben. Zum Vergleich wurden die bereits gemessenen K_m -Werte der Ectoin-Hydroxylasen aus *S. coelicolor* und *V. salexigens* angegeben.

Tabelle 18: Bestimmung des K_m für 2-Oxoglutarat der Hydroxylasen

EctD Wirtsorganismus	K_m [mM] für 2-Oxoglutarat
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	$6,2 \pm 0,2^{\#}$
<i>Virgibacillus salexigens</i>	$5,2 \pm 0,2^{\blacksquare}$
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	$4,8 \pm 0,4$
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	$2,7 \pm 0,3$
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC10	-*
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	-*
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1	$5,0 \pm 0,3$
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	-*
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	-*

* = dieser Wert wurde nicht bestimmt; # = ermittelt von (Bursy et al., 2008); \blacksquare = ermittelt von (Bursy et al., 2007)

Insgesamt kann man aus den Ergebnissen der biochemischen Parametern der untersuchten Hydroxylasen ableiten, dass die K_m -Werte, die spezifischen Aktivitäten (U/mg) und die max. Umsatzgeschwindigkeiten (v_{max}) vergleichbar sind (Tabellen 17 und 18).

Bei den K_m -Werten für Ectoin und 2-Oxolglutarat gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Hydroxylasen. Beim Vergleich der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) fällt auf, dass diese zum Teil bei den Hydroxylasen aus *S. coelicolor* und *V. salexigens* um den Faktor 5 – 10 höher waren als bei den anderen gemessenen Hydroxylasen. Für das EctD Enzym aus *S. coelicolor* könnte der Grund dafür sein, dass dieses Protein nicht heterolog in *E. coli* produziert wurde, sondern nativ aus dem Organismus gereinigt wurde. Bei der Hydroxylase aus *V. salexigens* wurde bei den Versuchen immer Katalase im Essay verwendet, was die Hydroxylierungsaktivität steigert (Bursy *et al.*, 2007). Dies konnte auch bei der Hydroxylase aus *H. elongata* beobachtet werden, da die Enzymaktivität mit Einsatz von ca. 1000 U Katalase nahezu verdoppelt werden konnte (Abbildung 35). Wie bereits erwähnt, traten beim Einsatz von Katalase und den folgenden HPLC Messungen erhebliche Probleme während der Analyse auf und deshalb wurde keine Katalase für alle enzymatischen Test eingesetzt.

Bisher konnte keine Ectoin-Hydroxylase ermittelt werden, die auffallend mehr Ectoin umsetzen kann als die anderen Hydroxylasen. Auch die Affinität des Ectoins zum Protein ist bei allen Hydroxylasen in etwa gleich. Das reaktive Zentrum der Ectoin-Hydroxylasen scheint demnach in etwa gleich aufgebaut zu sein, was auch durch die bioinformatischen Analysen unterstützt wird.

Für weitere Kristallisationsansätze könnten die EctD Proteine aus *Geobacillus sp.* Y412MC10 und *A. cryptum* in Betracht kommen. Diese EctD Proteine waren deutlich temperaturstabiler als die übrigen Hydroxylasen. Zusätzlich konnte bei diesen Hydroxylasen beobachtet werden, dass selbst eine Lagerung von bis zu 14 Tagen im Kühlschrank bei 4°C zu keinen deutlichen Aktivitätsverlusten führte, im Gegensatz zu den anderen EctD Proteinen (Daten nicht gezeigt). Daher scheinen diese beiden Enzyme etwas robuster zu sein.

5.7 Mutagenese von EctD aus *V. salexigens*

Auf der Grundlage der Tertiärstruktur der Ectoin-Hydroxylase aus *V. salexigens* (Reuter *et al.*, 2010) sollten in einer umfassenden Mutagenesestudie die Einflüsse von Substitutionen wichtiger Aminosäuren auf die Funktionalität bzw. Aktivität von EctD untersucht werden.

Wie man aus den Ergebnissen der Kristallstruktur erkennen kann, sind für die Eisenbindung im Enzym drei Aminosäuren verantwortlich (Abbildung 19). Es handelt sich um die Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248. Daher wurde an diesen Positionen durch Substitutionen zu Alanin das EctD Protein nacheinander mutagenisiert und die Auswirkungen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass keine der drei Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht werden darf, da dies sonst zu einem inaktiven Protein führt. Im Fall der Aminosäure Asp-148 wurde zudem versucht, diese Aminosäure durch die negativ-geladenen Aminosäure Glutamat zu ersetzen. Auch bei dieser Substitution wurde das EctD Protein enzymatisch inaktiv.

Da in der Kristallstruktur das Co-Substrat 2-Oxoglutarat fehlt, kann über die Aminosäuren, die für die Bindung und Stabilisierung von 2-Oxoglutarat verantwortlich sind, keine eindeutige Aussage getroffen werden. Durch den Vergleich strukturell verwandter Proteine konnten jedoch bestimmte Aminosäuren eingegrenzt werden, die vielleicht diese Aufgabe übernehmen könnten (Abbildung 18). Als sehr wahrscheinlich für die 2-Oxoglutarat Bindung in EctD wurden die Aminosäuren Phe-143, Ser-250 und Arg-259 identifiziert. Diese Annahme wird durch die Tatsache verdichtet, dass diese drei Aminosäuren in allen bisher gefundenen EctD Proteinsequenzen zu 100% konserviert sind. Die Auswirkungen der Substitutionen an diesen Positionen lieferten ein eindeutiges Ergebnis. Alle Mutationen zu Alanin führten zu inaktiven Ectoin-Hydroxylasen. Auch der konservative Austausch der aromatische Aminosäure Phe-143 zu Tyr oder Trp konnte keine Enzymaktivität wiederherstellen. Die Aminosäure Arg-259 wurde ebenfalls in ähnliche Aminosäuren wie Lys, His und Gln substituiert. Auch diese Substitutionen konnten die Enzymaktivität von EctD nicht wiederherstellen.

Aufgrund der Daten der Kristallstruktur von EctD wurde ein flexibler Loop identifiziert, der eventuell an der Hydroxylierungsreaktion beteiligt sein könnte. Dieser Bereich besteht aus den Aminosäuren zwischen Gly-195 bis Leu-211 (Abbildungen 17 und 18). In strukturell verwandten Proteinen wie AsnO aus *S. coelicolor* und VioC aus *Streptomyces vinaceus* konnte dieser Bereich erst durch die Bindung des Substrats in der Kristallstruktur aufgelöst werden (Helmetag *et al.*, 2009; Strieker *et al.*, 2007). Durch die Ergebnisse des Alignments der EctD Sequenzen fällt weiterhin auf, dass in

diesem Bereich ebenfalls hoch-konservierte Aminosäuren wie Thr-197, Pro-198, Ser-205 und Leu-206 lokalisiert sind. Die Ergebnisse der Mutagenesestudie zeigten, dass Leu-206 sehr wichtig innerhalb dieser Loop-Struktur zu sein scheint, da der jeweilige Austausch zu Alanin und Glycin zu inaktiven EctD Proteinen führte. Ebenso führte die Alaninsubstitution der Aminosäure Pro-198 zu einer inaktiven Hydroxylase. Die Substitutionen an den Positionen Thr-197 und Ser-205 zu Alanin wirkten sich, im Gegensatz zu den anderen beiden Aminosäuren aus der Loop-Struktur, weniger drastisch auf die Enzymaktivität von EctD aus und die mutagenisierten Proteine blieben aktiv.

Eine wichtige Information blieb durch die Ergebnisse der Kristallstrukturanalysen von EctD verwehrt. Es fehlte das zu hydroxylierende Substrat Ectoin in der Kristallstruktur. Daher können die für die Bindung des Substrats verantwortlichen Aminosäuren nicht detektiert werden. Ähnlich zu der Situation des Co-Substrats 2-Oxoglutarat liefern jedoch die Kristallstrukturen aus anderen Proteinen, wie Ectoin Bindeproteine, wichtige Erkenntnisse über eventuell involvierte Aminosäuren (Hanekop *et al.*, 2007; Lecher *et al.*, 2009; Ziegler *et al.*, 2010). Diese Kristallstrukturen zeigen, dass für die Stabilisierung der Carboxgruppe des Ectoins die positiv geladene Aminosäure Arginin und für die Stabilisierung der N-Gruppe des Ectoins negativ geladene Aminosäuren wie Glutamat und Asparagin benötigt werden. Diese Daten verdichteten die Auswahl bestimmter Aminosäuren, die für eine Mutagenesestudie in Frage kommen und dafür verantwortlich sein könnten das Ectoin in EctD gebunden wird. Mithilfe eines Alignments der aktuell verfügbaren EctD Aminosäure Sequenzen konnten viele solcher Aminosäuren als hoch-konservierte Bereiche in EctD detektiert werden (Abbildungen 24 und 25). Analysiert man das aktive Zentrum von EctD genauer, so kann man weitere Aminosäuren identifizieren, die in das aktive Zentrum hereinragen und dazu hoch-konserviert sind. In Abbildung 39 sind diese Aminosäuren in der Struktur markiert und eingefärbt worden (cyan). Es handelt sich um Phe-95, Gln-129, Arg-131, Trp-152, Ser-167, Asn-173, Asn-261 und Phe-263. Nach der Substitution dieser Aminosäuren zu Alanin konnte festgestellt werden, dass die meisten Substitutionen zu inaktiven EctD Proteinen führte. Lediglich die Austausche an den Positionen Ser-167, Asn-173 und Asn-261 hatten keinen Einfluss auf die Hydroxylierungsaktivität. Im Falle der aromatischen Aminosäuren Trp-152 und Phe-263 konnte die Hydroxylierungsaktivität nach dem Austausch zu anderen aromatischen Aminosäuren von Phe-263 zu Tyr beibehalten werden.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der Mutagenesestudie in der Abbildung 40 und in der Tabelle 19 aufgelistet.

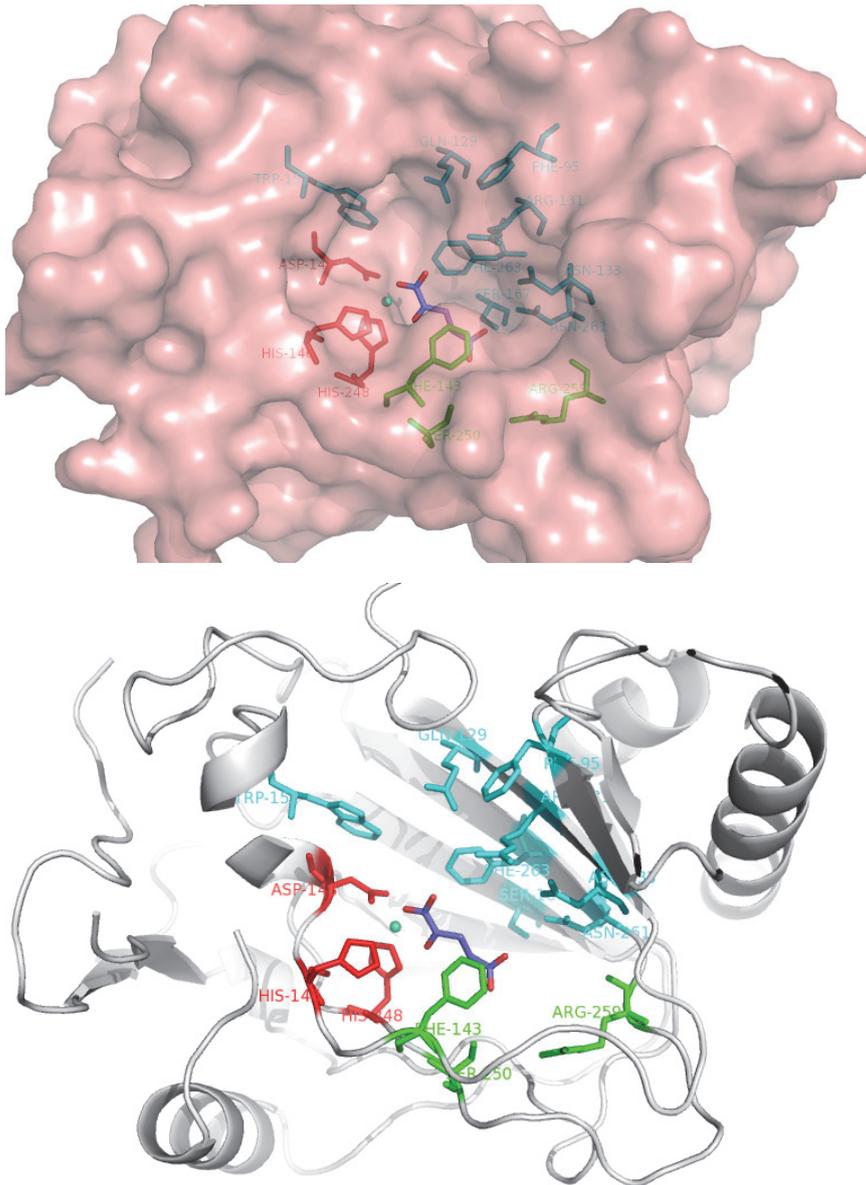


Abbildung 39: Mögliche Aminosäuren für die Ectoin Bindung in EctD. Auf der oberen Seite sind alle hoch-konservierten Aminosäuren um das aktive Zentrum in EctD gezeigt. Die Aminosäuren für die Eisenbindung (rot) und für die vermeintliche 2-Oxolglutaratbindung (grün) sind als Sticks dargestellt. Die Position des 2-Oxoglutarats wurde in die Nähe des Eisens in die Struktur hereingerechnet. Auf der unteren Seite ist dieser Bereich vergrößert und mögliche Ectoin bindende Aminosäuren sind in zudem in der Struktur hervorgehoben (cyan).

5.7.1 Aktivitätstest für die EctD-Substitutionsmutanten

Die Aminosäuren, die für die Mutagenesestudie ausgewählt wurden, sind in Abbildung 40 zusammengefasst. Zur besseren Übersicht wurden die postulierten Funktionen der Aminosäuren angegeben und mit einem Farbcode versehen. Um zu überprüfen, ob die jeweilige Substitution in EctD aus *V. salixigen* einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat, wurde jede EctD Mutante in einem initialen Enzymtest mit dem

Substrat Ectoin auf ihre Aktivität hin untersucht. Das Ergebnis dieses Aktivitätstests ist zusätzlich in der Abbildung gezeigt. Bei denjenigen Mutanten, bei denen keine Aktivität unter Standardbedingungen (3.4.6) gemessen werden konnte, wurde die Enzymaktivität bei höheren Ectoin-, 2-Oxoglutarat- und Fe^{2+} -Konzentrationen in einem weiteren *in vitro* Test gemessen.

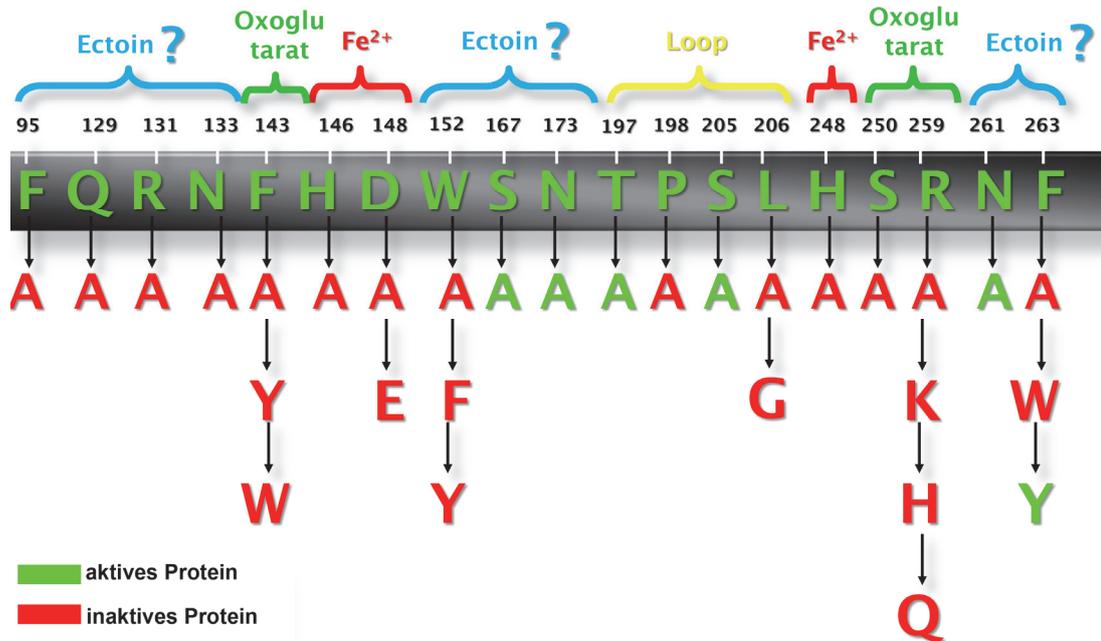


Abbildung 40: Übersicht aller Mutanten von EctD aus *V. salexigens*. Zur Übersicht, welche Aminosäuren in EctD aus *V. salexigens* substituiert wurden, sind alle Mutanten aufgelistet. Über den jeweiligen Aminosäuren ist deren vorausgesagte Funktion angegeben. Im Falle der Ectoin Bindung in EctD kann bisher noch kein abschließendes Ergebnis angegeben werden, da Ectoin und das Co-Substrat 2-Oxoglutarat in der aufgelösten Kristallstruktur fehlen. Alle Aminosäuren wurden in einem ersten Ansatz zu Alanin substituiert und im Falle von aromatischen Aminosäuren zu konservativen Aminosäuren mutagenisiert. Alle grün markierten Substitutionen zeigten Enzymaktivität und alle rot markierten keine oder sehr stark verminderte Enzymaktivität.

In Tabelle 19 sind alle Mutanten mit ihren jeweiligen Plasmiden zusammengefasst. Auch hier wurden die Mutanten mit dem bereits in Abbildung 40 verwendeten Farbcode versehen, um zu verdeutlichen, welche Funktion der ausgetauschten Aminosäure zugeordnet wird. Es wurden solche Aminosäuren substituiert, von denen man vermutet hat, dass sie einen Einfluss auf die Eisenbindung (rot), auf die Ectoinbindung (blau) und auf die 2-Oxoglutaratbindung (grün) haben könnten. Alle Mutanten mit Substitutionen, die sich in der Loop Region von EctD befinden, sind gelb markiert. War bei einer EctD Mutante aus *V. salexigens* Enzymaktivität zu verzeichnen, wurden die biochemischen Parameter im Vergleich zum Wildtyp-EctD gemessen. Aus Tabelle 19 geht hervor, dass die meisten Mutationen in EctD aus *V. salexigens* enzymatisch inaktiv waren.

Tabelle 19: Übersicht der Aktivität der EctD Mutanten in *V. salexigens*

	Mutante (Plasmid)	Plasmid (Nr.)	Enzym aktivität	K_m für Ectoin [mM]	V_{max} [U/mg]
	Wildtyp	pBJ10	ja	3,5	13,8
	F143A (pMP01)	1	-	-	-
	R259A (pMP02)	2	-	-	-
	F143Y (pMP03)	3	-	-	-
	R259K (pMP04)	4	-	-	-
	R259H (pMP05)	5	-	-	-
	R259Q (pMP06)	6	-	-	-
	F263A (pMP07)	7	-	-	-
	N261A (pMP08)	8	ja	$4,5 \pm 0,2$	$17,4 \pm 0,1$
	N133A (pMP09)	9	-	-	-
	R131A (pMP10)	10	-	-	-
	W152A (pMP11)	11	-	-	-
	Q129A (pMP12)	12	-	-	-
	S167A (pMP13)	13	ja	$1,9 \pm 0,2$	$16,9 \pm 0,1$
	F95A (pMP14)	14	-	-	-
	F143W (pMP15)	15	-	-	-
	N173A (pMP16)	16	ja	$2,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
	H146A (pMP17)	17	-	-	-
	D148E (pMP18)	18	-	-	-
	D148A (pMP19)	19	-	-	-
	H248A (pMP20)	20	-	-	-
	F263Y (pMP21)	21	ja	$4,0 \pm 0,2$	$13,7 \pm 0,1$
	F263W (pMP22)	22	-	-	-
	W152F (pMP23)	23	-	-	-
	W152Y (pMP24)	24	-	-	-
	T197A (pMP25)	25	-	-	-
	S205A (pMP26)	26	ja	$3,8 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$
	L206A (pMP27)	27	-	-	-
	L206G (pMP28)	28	-	-	-
	P198A (pMP29)	29	ja	$7,1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$
	S250A (pMP30)	30	-	-	-

- = es wurde keine Enzymaktivität gemessen

Ectoin Bindemutanten	Oxoglutarat Bindemutanten	Eisenbindemutanten	Loop Mutanten
-------------------------	------------------------------	--------------------	------------------

Um alle Aminosäuresubstitutionen in EctD aus *V. salexigens* besser einordnen zu können, wurde in Abbildung 41 das Reaktionszentrum mit allen Aminosäuren, die in die Mutagenesestudie einbezogen wurden, dargestellt.

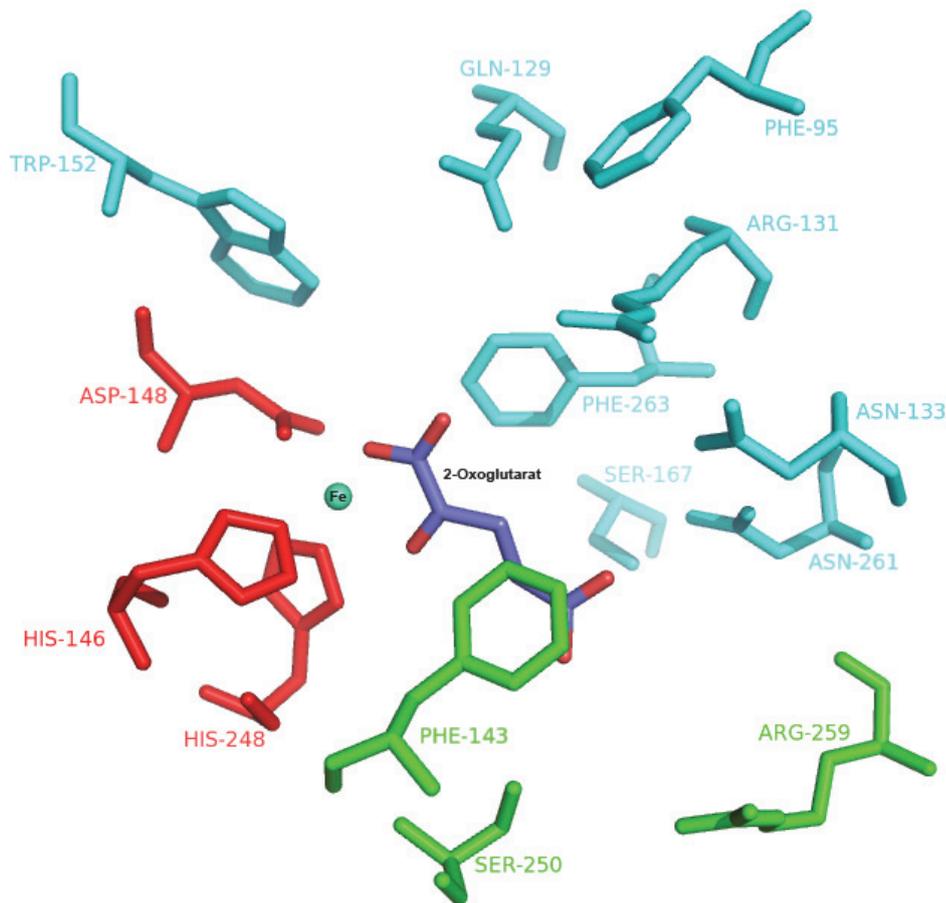


Abbildung 41: Aminosäuresubstitutionen in EctD aus *V. salexigens*. Übersicht aller Aminosäuren, die im aktiven Zentrum von EctD aus *V. salexigens* substituiert wurden. Die farbliche Markierung der Aminosäuren soll deren vermeintliche Funktion im EctD Protein verdeutlichen (rot: Eisenbindung; grün: 2-Oxoglutarat Stabilisierung; blau: Ectoin Stabilisierung). Die vermeintliche Position von 2-Oxoglutarat wurde hier in die Struktur aufgrund theoretischer Berechnungen eingefügt.

Insgesamt kann man aus den Ergebnissen der Mutagenesestudie ableiten, dass das Reaktionszentrum von EctD sehr empfindlich gegenüber einzelnen Mutationen ist. Besonders deutlich wurde dies beim Austausch der Aminosäuren, die für die Eisenbindung zuständig sind. Hier führte jeder Austausch zu einem inaktiven EctD Enzym. Versuche, diese inaktiven Proteine durch die Zugabe von bis zu 100 mal mehr Eisensulfat in den Assay zu aktivieren, waren nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

Auch die Aminosäuren, die für die vermeintliche Bindung von 2-Oxoglutarat zuständig sind, führen beim Austausch zu Alanin zum Verlust der Enzymaktivität. Die

Funktion konnte auch hierbei nicht durch den Einsatz von bis zu 250-mal mehr 2-Oxolglutarat wiederhergestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei den Aminosäuren, die für die Bindung des Ectoins in Frage kommen, wurde die Enzymaktivität beim Austausch der Aminosäuren Ser-167 und Asn-173 und Asn-261 zwar herabgesetzt, aber nicht vollständig entfernt. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Substitutionen an diesen Positionen zwar die Ectoin-Bindung stört, aber nicht dazu führt, dass kein Substrat mehr gebunden und hydroxyliert werden kann.

5.8 Bestimmung des Eisengehaltes des Wildtyp EctD im Vergleich zu seinen Mutanten

Die Kristallstruktur von EctD zeigt, dass EctD ein Eisenbindemotiv enthält (Abbildung 19). Um zu untersuchen, ob und wie viel Eisen gebunden wird, wurde mithilfe eines Eisentests die Korrelation zwischen Proteinmenge und Eisen in nmol für das Wildtyp EctD Protein ermittelt. Für die Bestimmung des Eisengehaltes von EctD diente ein Eisennachweistest mittels Phenanthroline (4.4.9). Die theoretische Annahme sagt einen Gehalt von 1 mol Eisen pro 1 mol Protein voraus. Um den Einfluss der Aminosäuresubstitutionen in EctD auf die Eisenbindung zu überprüfen, wurden neben dem Wildtyp EctD Protein die EctD-Mutanten H146A (MP17), D148A (MP19), D148E (MP18) und H248A (MP20) auf einen Defekt in der Eisenstabilisierung überprüft, indem der Eisengehalt bestimmt wurde. Zusätzlich wurden weitere EctD Mutanten gemessen, um auszuschließen, dass deren Inaktivität mit dem Verlust der Eisenbindung zu begründen ist. Dazu wurden die EctD Mutanten S250A (MP30), F143A (MP1), R259A (MP2), F143Y (MP3), R259K (MP4), R259H (MP5), R259Q (MP6), N261A (MP8), N133A (MP9) R131A (MP10) und F143W (MP15) auf ihren Eisengehalt hin untersucht. In Abbildung 42 ist das Ergebnis der Eisenbestimmung des EctD Wildtyp Proteins im Vergleich zu den EctD Mutanten in % gezeigt.

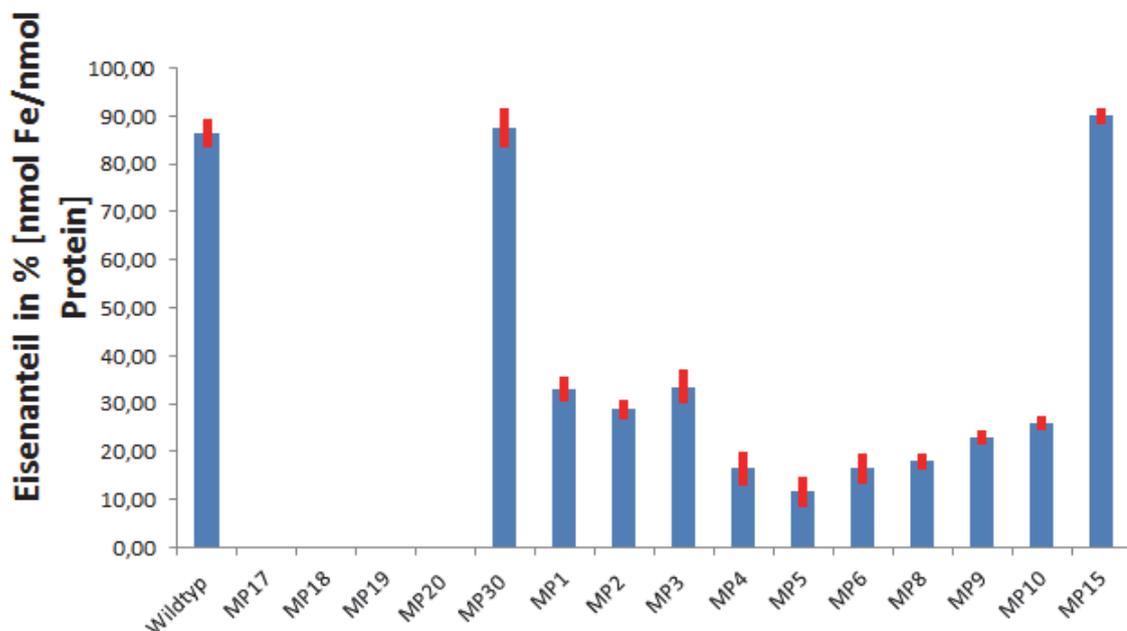


Abbildung 42: Bestimmung des Eisengehaltes aller EctD Mutanten. Dargestellt sind die ermittelten Eisen-Konzentrationen (mol Fe/mol Protein in %), die für das gereinigte Wildtyp EctD Protein sowie den EctD Mutanten Proteinen aus *V. salicigenens* (H146A (MP17), D148A (MP19), D148E (MP18), H248A (MP20), S250A (MP30), F143A (MP1), R259A (MP2), F143Y (MP3), R259K (MP4), R259H (MP5), R259Q (MP6), N261A (MP8), N133A (MP9) R131A (MP10) und F143W (MP15)) ermittelt wurden.

Die Konzentration von Eisen im EctD Wildtyp entsprach mit ca. 86 % ungefähr dem theoretischen Wert von 1 mol Eisen pro 1 mol Protein. Ähnliche Werte konnten für die Mutanten S250A (MP30) und F143W (MP15) gemessen werden. Deren Inaktivität ist demnach nicht auf einen Defekt in der Eisenbindung zurückzuführen.

Bei den EctD Mutanten, bei denen jeweils eine für die Eisenbindung relevante Aminosäure ausgetauscht wurde, konnte kein Eisen mehr ermittelt werden. Der Austausch zu Alanin jeweils einer für die Eisenbindung wichtigen Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248 führte dazu, dass kein Eisen in diesen Proteinen detektiert werden konnte. Der Austausch von Asp-148 zu Glutamat führte ebenfalls dazu, dass das Protein inaktiv wurde und kein Eisen mehr binden konnte. Das Aspartat konnte daher nicht durch die gleich geladene, aber etwas längere Aminosäure Glutamat ersetzt werden, ohne die Funktionalität des Proteins zu beeinflussen. Außerdem zeigten diese Mutanten, dass es nicht ausreicht, wenn zwei der drei Aminosäuren der 2-His-Carboxylat-Triade noch vorhanden sind, um Eisen zu binden.

In den Mutanten MP1-MP6, MP8-MP10 konnte man erkennen, dass weniger Eisen gebunden wurde. Dies ist eventuell auf strukturelle Einflüsse während der Faltung des Proteins oder auf den Verlust von wichtigen Aminosäuren in direkter Nachbarschaft zu den für die Eisenbindung relevanten Aminosäuren zurückzuführen. Es war zudem nicht möglich, durch eine Erhöhung der Eisenkonzentration im Essay die Hydroxylierungsfähigkeit dieser Mutanten wieder herzustellen (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass zum einen das Eisen im EctD Protein essentiell ist und zum anderen, dass das hoch-konservierte Eisenbindemotiv sehr empfindlich gegenüber Veränderungen ist. Es müssen alle drei Aminosäuren des Eisenbindezentrum vorhanden sein (H146, D148 und H248), da der Verlust einer Aminosäure des Eisenbindezentrum und die dadurch auftretende Inaktivität von EctD nicht durch die jeweils verbliebenen zwei Aminosäuren kompensiert werden können.

5.9 Bioinformatische Analyse des Ectoin Synthese-Clusters

Durch bioinformatische Analysen aller verfügbaren Bakterien- und Archaengenome mit einem für die Ectoin-Hydroxylase codierenden *ectD*-Gen konnte eine Übersicht aller vorhandenen *ect*-Gencluster in den Mikroorganismen erstellt werden (Abbildungen 43, 44 und 45).

Um die Übersicht der *ect*-Gencluster zu erstellen, wurden die Gene des *ect*-Genclusters selbst sowie die direkten benachbarten Gene von allen verfügbaren sequenzierten Genomen der Bakterien und Archaeen, die ein Ectoin Synthese-Cluster besitzen, in einer Datenbank gespeichert (4.5.3). Erweitert durch Informationen über

die Anzahl der Basenpaare und der Gen- Orientierung wurden die gesammelten Daten aus der Datenbank herausgelesen und als farblich markierte Pfeile mit variablen Längen entsprechend der Gengröße (Basenpaare) und der entsprechenden Orientierungen im Genom visualisiert. Dadurch war es möglich, interessante Gene innerhalb des *ect* Genclusters selbst und Gene in direkter Nachbarschaft des *ect* Genclusters zu identifizieren.

In vielen Fällen konnte ein Gen für einen MarR ähnlichen Transkriptionsregulator vor dem *ect* Gencluster identifiziert werden. Dieser Regulator wurde bereits als ein negativer Regulator des *ect*-Operons beschrieben (Mustakhimov *et al.*, 2010).

Zudem treten in der Umgebung der *ect* Cluster häufig Gene aus ABC-Transportern auf. Nach vereinzelt Analysen konnten Homologien zu bereits charakterisierten Ectoin ABC-Transportern ausgemacht werden. Dies scheint eine weitere Optimierung und Anpassung der Mikroorganismen zu sein, da durch solche Ectoin Transporter bereits synthetisiertes Ectoin und/ oder Hydroxyectoin von anderen Organismen oder aus der Umwelt aufgenommen werden kann.



Abbildung 43: Übersicht der ect-Gencluster (Teil1). Die ect-Gencluster der momentan verfügbaren Bakterien und Archaeengenome mit einem ectD Gen. Die einzelnen Gene sind unterschiedlich eingefärbt (ectA: dunkelgrün, ectB: orange, ectC: gelb, ectD: rot, ask: blau). Soweit die Informationen verfügbar waren, wurde die Größe der Gene durch die Pfeillänge verdeutlicht und die Gen-Orientierung angegeben.



Abbildung 44: Übersicht der ect-Gencluster (Teil2). Die ect-Gencluster der momentan verfügbaren Bakterien und Archaeengenome mit einem ectD Gen. Die einzelnen Gene sind unterschiedlich eingefärbt (ectA: dunkelgrün, ectB: orange, ectC: gelb, ectD: rot, ask: blau). Soweit die Informationen verfügbar waren, wurde die Größe der Gene durch die Pfeillänge verdeutlicht und die Gen-Orientierung angegeben.

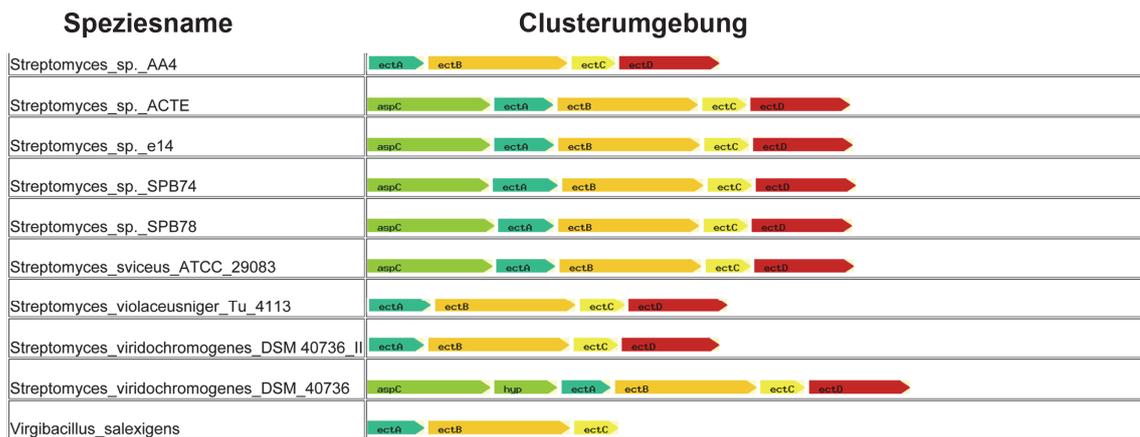


Abbildung 45: Übersicht der *ect* Gencluster (Teil3). Die *ect*-Gencluster der momentan verfügbaren Bakterien und Archaeengenome mit einem *ectD* Gen. Die einzelnen Gene sind unterschiedlich eingefärbt (*ectA*: dunkelgrün, *ectB*: orange, *ectC*: gelb, *ectD*: rot, *ask*: blau). Soweit die Informationen verfügbar waren, wurde die Größe der Gene durch die Pfeillänge verdeutlicht und die Gen-Orientierung angegeben.

Die Ergebnisse aus der Analyse der *ect* Cluster zeigen, dass in den meisten Organismen, das *ectD* Gen im *ect* Cluster vorzufinden ist (70%). Daher ist davon auszugehen, dass das ganze *ect* Cluster im Falle eines horizontalen Gentransfers inklusive *ectD* übertragen wird.

5.10 Bioinformatische Analysen zu Aspartokinasen in einem *ect*-Cluster

In einigen der für die Ectoinsynthese verantwortlichen Genclustern befindet sich ein Gen für eine Aspartokinase (Abbildungen 43, 44 und 45, blau markiert). Die Aspartokinase kann aus seinem Substrat L-Aspartat in einem Schritt L-Aspartyl-Phosphat, das Vorläufersubstrat für die Ectoin Synthese, synthetisieren.

Bei den Aspartokinasen, die sich in direkter Nachbarschaft zum *ect* Cluster befinden, könnte man davon ausgehen, dass diese für die Ectoin Synthese angepasst sind. Diese Anpassung könnte so erklärt werden, dass vielleicht durch diese zusätzliche Aspartokinase der Engpass bei der Ectoin Synthese durch das limitierte Vorläufersubstrat Aspartat- β -Semialdehyd aufgelöst und dadurch mehr Ectoin bzw. Hydroxyectoin synthetisiert werden könnte (Abbildung 12). Da in vielen Organismen nur eine Aspartokinase im Genom kodiert und diese zumeist durch einen positiven Feedback reguliert wird, wurde angenommen, dass in einem Mikroorganismus der mehr als eine Aspartokinase besitzt, entsprechende Unterschiede zwischen den Aspartokinasen vorhanden sein könnten. Die Feedback-Regulation der einzelnen Aspartokinasen könnte auf den entsprechenden Syntheseweg angepasst sein und durch unterschiedliche Substrate reguliert werden.

Um diese Annahmen zu untersuchen, wurde das Bakterium *P. stutzeri* A1501 ausgewählt, da dieses Bakterium im *ect* Cluster ein zusätzliches Gen für eine Aspartokinase besitzt und insgesamt über zwei Aspartokinasen verfügt. Die beiden Aspartokinasen aus dem Bakterium *P. stutzeri* A1501 wurden kloniert, die Proteine affinitätschromatographisch gereinigt und hinsichtlich ihrer Aktivität vermessen. Dabei wurde die Aspartokinase aus dem *ect*-Cluster als Ask_Ect und die zweite Aspartokinase als Ask_LysC bezeichnet, da das entsprechende Gen als *lysC* annotiert ist.

5.11 Klonierung der Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501

Der kodierende Bereich der Aspartokinase Ask_LysC wurde per PCR amplifiziert und in den Vektor pASK-IBA3 (IBA, Göttingen) über die Restriktionsenzyme *Bsa*I kloniert (4.3.10). Es entstand das Plasmid pMP-ask1 (Ask_LysC). Die Aspartokinase des *ect*-Genclusters wurde mit Hilfe des Stargate Klonierungssystems zunächst in den pEntry Vektor kloniert und dann in den Zielvektor pASG-IBA3 integriert, so dass das Plasmid pMP42 (Ask_Ect) entstand. Beide Vektoren stehen unter der Kontrolle eines AHT induzierbaren Promoters und codieren für einen *Strep*-tag am C-Terminus des rekombinanten Proteins. Die heterolog in *E. coli* BL21 produzierten Proteine wurden mittels *Strep*-tag Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend enzymatisch untersucht.

5.12 Produktion und Reinigung der Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501

Um die beiden Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501 näher zu untersuchen, wurden die beiden Proteine in *E. coli* BL21 Zellen produziert und per *Strep*-tag affinitätschromatographisch gereinigt. In Abbildung 46 ist ein 12% SDS-Gel gezeigt, mit dem die beiden gereinigten Proteine aufgetrennt und auf Reinheit überprüft wurden.

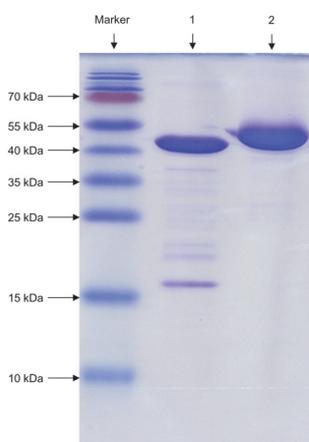


Abbildung 46: Reinigung der Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501. Die Aspartokinasen Ask_LysC und Ask_Ect aus *P. stutzeri* A1501 wurden heterolog produziert und anschließend per *Strep*-tag-Affinitätschromatographie gereinigt. In Spur 1 wurde 4 µg Ask_LysC und in Spur 2 4 µg Ask_Ect auf ein 12% SDS Gel aufgetragen.

Die Aspartokinase Ask_LysC hat eine Länge von 412 Aminosäuren und ein theoretisches Molekulargewicht von 44,3 kDa. Im SDS-Gel läuft Ask_LysC mit einer dominanten Proteinbande bei ca. 45 kDa (Abbildung 46). Zusätzlich erkennt man in Spur 1 eine weitere Bande bei ca. 17 kDa, die dem verkürzten C-Terminus des Gesamtproteins von Ask_LysC entspricht. Dieses Peptid wurde durch Edman Sequenzierung identifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Aspartokinase Ask_Ect besteht aus 476 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 52,4 kDa. Im SDS-Gel läuft die Proteinbande etwas unterhalb der 55 kDa und entspricht damit dem errechneten Molekulargewicht.

5.12.1 Bestimmung der Enzymaktivität der Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501

Um die Enzymaktivität der gereinigten Aspartokinasen zu bestimmen, wurde der Aktivitätssay, wie in 3.4.7 beschrieben, durchgeführt. Als Substrat wurde L-Aspartat eingesetzt. In einem initialen Test wurde die Umsetzung von L-Aspartat zu L-Aspartyl-Phosphat photometrisch detektiert. Beide Aspartokinasen zeigten entsprechende Aktivität und wurden zur Bestimmung der biochemischen Parameter wie K_m und v_{max} verwendet.

5.12.2 Bestimmung der biochemischen Parameter K_m und v_{max} der Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501

Für die K_m - und v_{max} -Bestimmungen der beiden Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501 wurde der Aktivitätssay, wie in 3.4.7 beschrieben, für das Substrat L-Aspartat verwendet. Dabei wurden steigende Konzentrationen an L-Aspartat von 0 – 125 mM eingesetzt. Der ermittelte K_m Wert für Ask_LysC aus *P. stutzeri* A1501 für das Substrat L-Aspartat beträgt $21,6 \pm 2,6$ mM. Der v_{max} von Ask_LysC beträgt $5,1 \pm 0,1$ U/mg. Für Ask_Ect wurde ein K_m von $29,7 \pm 2,5$ mM und ein v_{max} von $6,9 \pm 0,2$ U/mg für das Substrat L-Aspartat bestimmt. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse der Messungen für

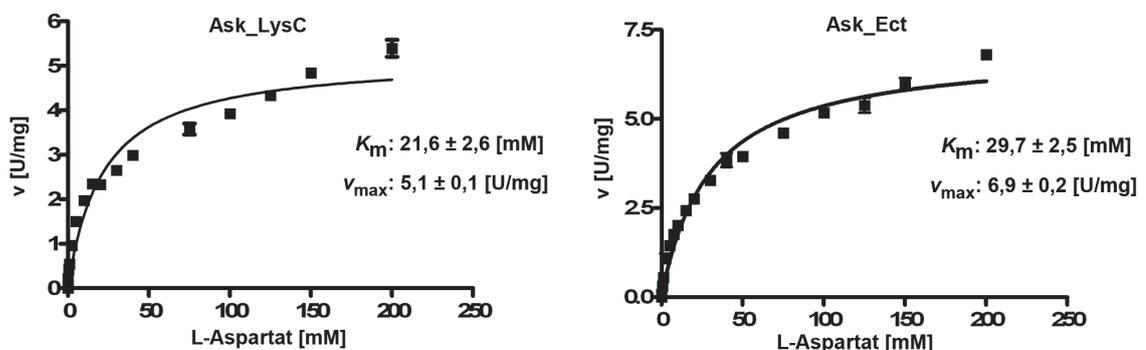


Abbildung 47: K_m und v_{max} der Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501 für das Substrat L-Aspartat. Beide Aspartokinasen wurden hinsichtlich ihrer biochemischen Parameter mit dem Substrat L-Aspartat analysiert. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse der Messungen von Ask_LysC und auf der rechten Seite von Ask_Ect gezeigt (Auftragung nach Michaelis-Menten).

die beiden Ask Proteine als Michaelis-Menten Plot dargestellt.

Da beide Aspartokinasen ATP abhängige Enzyme sind, wurden zusätzlich die biochemischen Parameter für das Substrat ATP bestimmt. Dazu wurden steigende ATP Konzentrationen von 0 – 25 mM ATP in dem Enzymtest eingesetzt (Abbildung 48). Der K_m -Wert für Ask_LysC lag für das Substrat ATP bei $3,8 \pm 0,4$ mM. Der v_{max} von Ask_LysC für ATP beträgt $5,9 \pm 0,2$ U/mg. Für Ask_Ect wurde ein K_m -Wert von $1,3 \pm 0,1$ mM und ein v_{max} von $6,8 \pm 0,1$ U/mg für das Substrat ATP bestimmt.

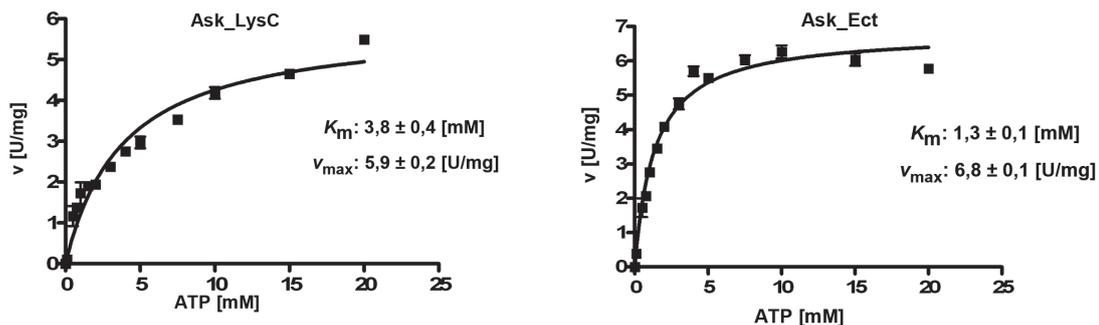


Abbildung 48: K_m und v_{max} der Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501 für das Substrat ATP. Beide Aspartokinasen wurden hinsichtlich ihrer biochemischen Parameter mit dem Substrat ATP bestimmt. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse der Messungen von Ask_LysC und auf der rechten Seite von Ask_Ect gezeigt (Auftragung nach Michaelis-Menten).

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass sich die biochemischen Parameter der beiden Aspartokinasen nicht drastisch unterscheiden und im gleichen Bereich anzusiedeln sind.

In Fortführung der Arbeiten an den Aspartokinasen hat *Stoeveken et al.* Inhibierungsstudien an diesen beiden Aspartokinasen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Aspartokinasen durch Threonin inhibiert werden können. Desweiteren kann diese Inhibierung durch erhöhte Salzkonzentration verringert werden (*Stoeveken et al.*, 2011).

Ein weitere interessantes Ergebnis ist, dass die Existenz der zusätzlichen Aspartokinase im Ectoin Synthese Cluster Ask_Ect dazu führt, das deutlich mehr Ectoin und Hydroxyectoin synthetisiert werden kann (*Stoeveken et al.*, 2011). Dies bestätigt die Annahme, dass es sich bei der zusätzlichen Aspartokinase um eine Optimierung der Ectoin Synthese handelt.

5.13 Ectoin und Hydroxyectoin als Hitzeprotectivum in *S. coelicolor* A3(2)

In vorhergehenden Studien wurden Wachstumsversuche mit dem Actinomyceten *S. coelicolor* A3(2) unter hohen osmotischen Bedingungen durchgeführt (Prof. Dr. E. Bremer, pers. Mitteilung). In diesen Untersuchungen mit dem *S. coelicolor* A3(2) Wildtyp Stamm konnte gezeigt werden, dass Ectoin bei hohen Salzkonzentrationen und hohen Temperaturen zum einen als kompatibles Solut wirkt und zum anderen der Zelle hilft, höhere Temperaturen zu tolerieren.

5.13.1 Wachstumsversuche mit *S. coelicolor* A3(2)

In weiteren Wachstumsversuchen sollte geklärt werden, wie *S. coelicolor* auf eine Verschärfung der Stressbedingungen durch höhere Salzkonzentrationen von bis zu 1,2 M NaCl bei gleichzeitiger Erhöhung der Temperaturen auf 39°C statt der normalerweise bevorzugten Temperatur von 28°C reagiert. Die Versuche mit *S. coelicolor* wurden in einem speziellen Minimalmedium (4.1.4) in Wasserbädern bei den entsprechenden Temperaturen und unter Einsatz von Glas- bzw. Metallkugeln durchgeführt. Die Glas- bzw. Metallkugeln dienen dazu, die Mycelbildung von *S. coelicolor* zu unterbinden, damit die Messung der optischen Dichte möglich bleibt.

Aus den Wachstumsversuchen in Abbildung 49 geht hervor, dass die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin mit einer Konzentration von 1 mM bei hoher Salinität von 1,2 M NaCl (A) und hoher Temperatur von 39°C (B) im Medium zu einer deutlichen Wachstumsverbesserung führen. Kombiniert man die beiden Stressfaktoren (C), hat *S. coelicolor* eine sehr lange lag Phase und kann nur unter Einsatz von Ectoin oder Hydroxyectoin weiter wachsen. In allen Versuchen konnte man beobachten, dass ein Mischungsverhältnis von 1:1 von Ectoin und Hydroxyectoin den besten Schutz liefert. Besonders auffällig ist dies bei den extremsten kombinierten Bedingungen von 1,2 M NaCl und 39°C (C).

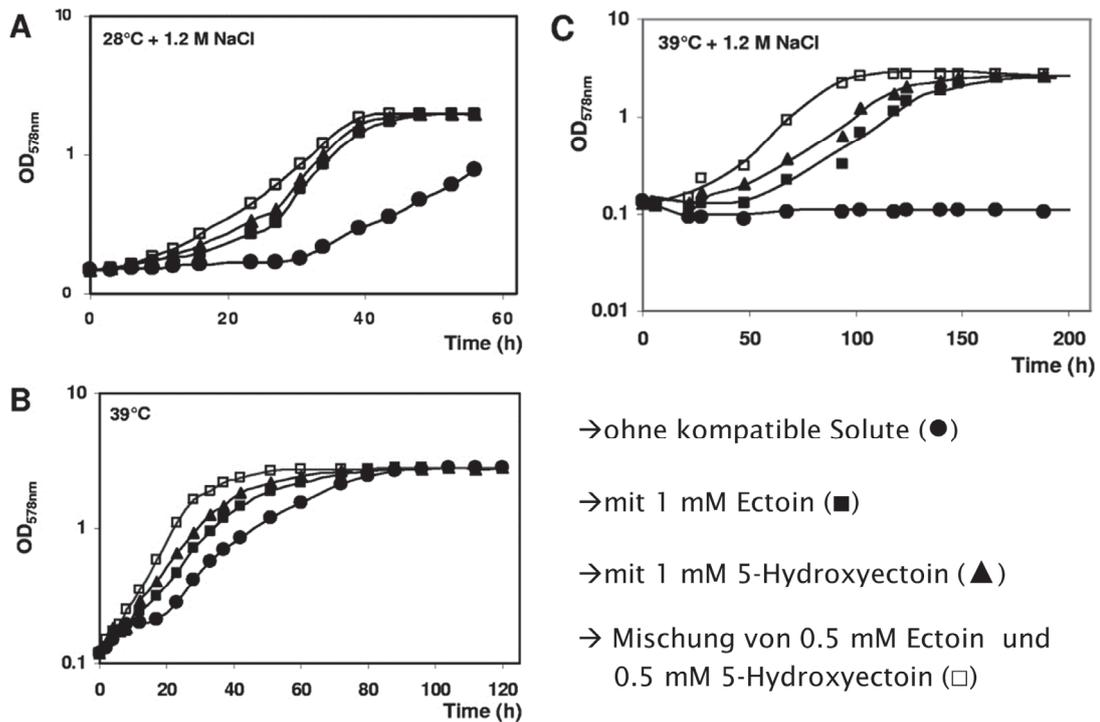


Abbildung 49: Wachstumsversuche mit *S. coelicolor*. Durch Wachstumsanalysen bei hoher Salinität bis 1,2 M NaCl sowie hohen Temperaturen von 39°C wurden die protektiven Eigenschaften der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin gemessen. Der Einsatz eines 1:1 Gemischs von Ectoin und Hydroxyectoin führte bei allen Wachstumsexperimenten zu einem deutlichen Wachstumsvorteil.

Dieses Ergebnis könnte ein weiteres Indiz für die Aufgabe einer Ectoin-Hydroxylase in der Zelle sein. Durch die Hydroxylierung des Ectoins zu Hydroxyectoin kann neben dem osmotischen Stress auch die Stressbedingung durch erhöhte Temperatur verringert werden und führt bei *S. coelicolor* zu einem Wachstumsvorteil.

5.13.2 Aufnahme von Ectoin und Hydroxyectoin in *S. coelicolor*

Mit Hilfe radioaktiver Aufnahmeassays sollte untersucht werden, wann und wie stark Ectoin von *S. coelicolor* aufgenommen wird. Dazu sind die *S. coelicolor* Zellen bis zu einer OD von 1 unter verschiedenen Bedingungen gewachsen und es wurde gemessen, wie schnell hinzugegebenes radioaktives Ectoin aufgenommen wird (4.4.10) (Abbildung 50 A). Unter normalen Wachstumsbedingungen bei 28°C und ohne Zugabe von NaCl erfolgt eine minimale Aufnahme von Ectoin. Bereits die Zugabe von 0,5 M NaCl induziert die Aufnahme von Ectoin, welche bei erhöhter Temperatur von 39°C weiter ansteigt. Vergleicht man die Aufnahme radioaktiven Ectoins zwischen dem Zeitpunkt 0 und nach 1 Stunde bei den entsprechenden Wachstumsparametern, kann man erkennen, dass die größte Menge an Ectoin bei 39°C und 0,5 M NaCl aufgenommen wurden (Abbildung 50 B).

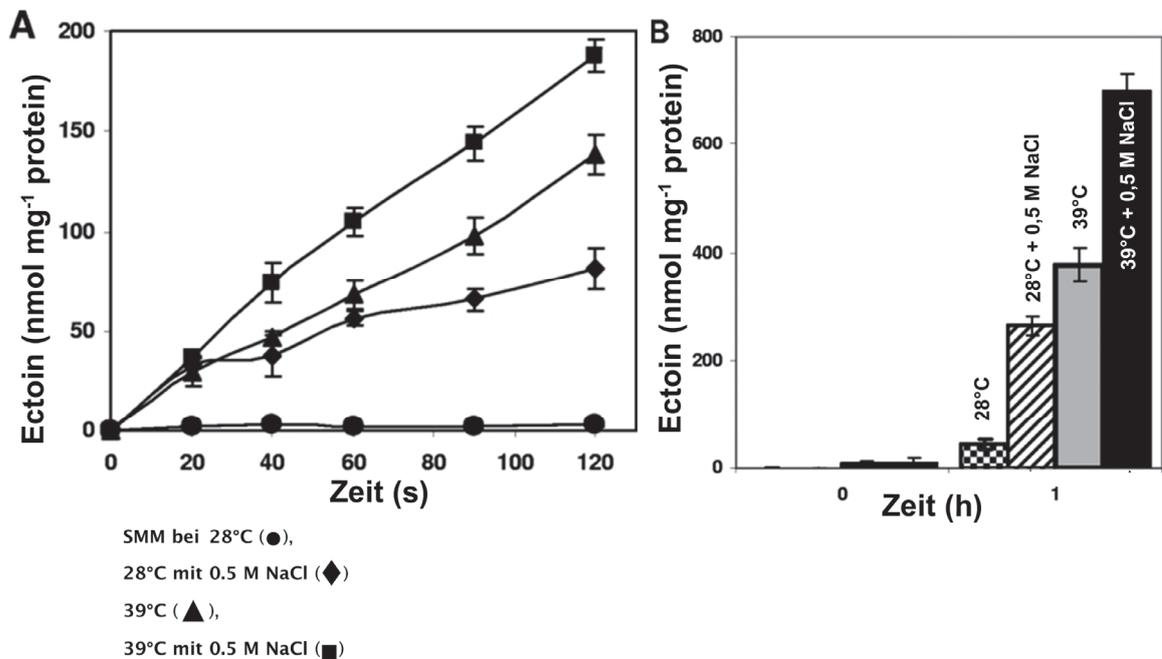


Abbildung 50: Aufnahmeassays mit radioaktiv markiertem Ectoin in *S. coelicolor*.

Durch Aufnahmeassays mit radioaktiv markiertem Ectoin, wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht, wann die Aufnahme von Ectoin in *S. coelicolor* induziert wird. Dazu wurden die Zellen bei 28°C, 28°C mit 0,5 M NaCl, 39°C und 39°C mit 0,5 M NaCl untersucht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme von Ectoin in *S. coelicolor* zum einen durch die Erhöhung des osmotischen Stresses und zum anderen durch die Erhöhung der Temperatur induziert wird. Die Kombination der beiden Stressbedingungen durch 0,5 M NaCl und 39°C führt dazu, dass die Aufnahme von Ectoin noch einmal gesteigert werden kann. Ectoin wird daher wahrscheinlich nicht nur als Osmoprotektivum, sondern auch als Thermoprotektivum genutzt.

6 Diskussion

6.1 Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens*

Um die Kristallstruktur von EctD aus *V. salexigens* zu ermitteln, wurde in *E. coli* produziertes und per *Strep*-tag gereinigtes rekombinantes Protein für die Kristallscreenings verwendet (5.1). Nachdem die Bedingungen für die Anzucht von EctD Kristallen optimiert waren und erste Kristalle für die Röntgenstrukturanalysen verwendet wurden, trat das Problem auf, dass die EctD Kristalle sehr instabil waren und häufig während der Untersuchungen zerbrachen. Dazu kam die Schwierigkeit, dass der Einsatz des Substrat Ectoins in die Puffer für die Kristallisationsansätze dazu führte, dass die Kristalle zerbrachen (Prof. Dr. Klaus Reuter, pers. Mitteilung).

Dennoch konnte die Kristallstruktur der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens* mit einer Auflösung von 1,85 Å aufgeklärt werden (Reuter *et al.*, 2010). Aus der Tertiärstruktur von EctD geht hervor, dass es sich um ein Monomer handelt und ist damit konsistent zu den von Bursy *et al.* gewonnenen Daten zur Größenbestimmung von EctD durch Size Exclusion Chromatography (Bursy *et al.*, 2007). EctD besteht aus 300 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa. In der Kristallstruktur konnte der Co-Faktor Eisen mit aufgelöst werden, jedoch fehlen in der Struktur das Substrat Ectoin oder das Produkt Hydroxyectoin sowie das Co-Substrat 2-Oxoglutarat. Mithilfe der Informationen aus der Tertiärstruktur von EctD konnten wichtige Struktur motive und Seitenketten, die für diese Klasse der Proteine wichtig sind, ermittelt werden (Reuter *et al.*, 2010).

Das EctD Enzym gehört zu der Klasse der Nicht-Häm-Eisen(II)-2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen (EC:1.14.11). Für die Mitglieder dieser Enzym-Klasse ist charakteristisch, dass für die Enzymreaktionen molekularer Sauerstoff, das Co-Substrat 2-Oxoglutarat und der Co-Faktor Eisen benötigt werden (Hausinger, 2004). Das genaue Reaktionsschema der Ectoin-Hydroxylase ist in Abbildung 51 abgebildet. Der vorgeschlagene Reaktionsweg wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wolfgang Buckel (Philipps-Universität Marburg) entworfen und vorgeschlagen. Für die Hydroxylierungsreaktion wird, neben dem Substrat Ectoin, das Co-Substrat 2-Oxoglutarat, der Co-Faktor Eisen und molekularer Sauerstoff benötigt. Dabei entsteht das Produkt 5-Hydroxyectoin und zusätzlich Succinat durch die Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat. Für die Hydroxylierungsreaktion ist es wichtig, dass Eisen in reduzierter Form vorliegt, um die Reaktion starten zu können. Das Eisen bindet den molekularen Sauerstoff und transferiert ein Sauerstoffatom auf das 2-Oxoglutarat und ein

Sauerstoffatom an die C-5 Position des Ectoins (Abbildung 51). Das Eisen stellt damit das fundamentale Zentrum der Hydroxylierungsreaktion dar und daher ist es sehr wahrscheinlich, dass das Substrat Ectoin in der Nähe des Eisenzentrums das Co-Substrat sowie gebunden werden muss.

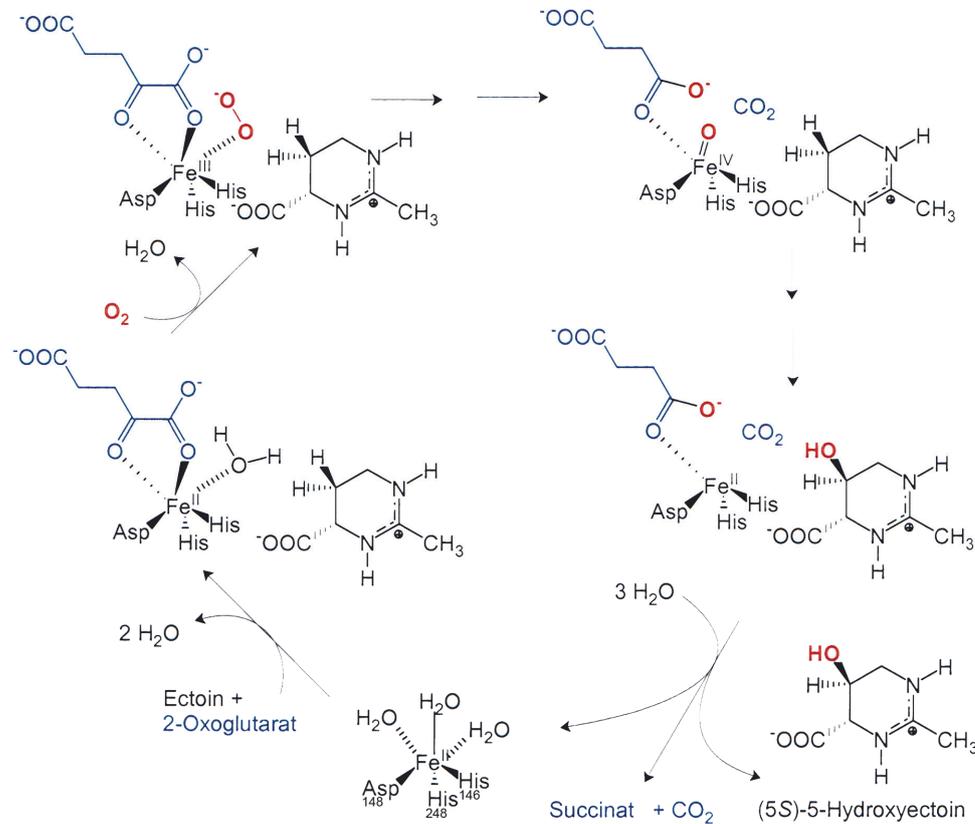


Abbildung 51: Schema der Hydroxylierungsreaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin im Detail. Die Hydroxylierungsreaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin benötigt das Co-Substrat 2-Oxoglutarat und molekularen Sauerstoff sowie den Co-Faktor Fe²⁺. Für die Reaktion ist es essentiell, dass das Eisen in EctD gebunden ist und in reduzierter Form vorliegt. Molekularer Sauerstoff oxidiert das Eisen und führt dazu, dass das 2-Oxoglutarat zunächst decarboxyliert wird und ein Sauerstoffatom an die C-5 Position des Ectoins übertragen wird. Durch die Reaktion entsteht 5-Hydroxyectoin, Succinat und CO₂ (Prof. Dr. Wolfgang Buckel, Universität-Marburg)

Die Strukturen aus dieser Proteinfamilie zeichnen sich zudem durch einen doppelsträngigen β-Helix Kern aus, den man als aktives Zentrum bezeichnet und der wie eine Art Fass aufgebaut ist. Der β-Helix Kern wird durch mehrere α-Helices umschlossen und dadurch stabilisiert (Clifton *et al.*, 2006). Durch die Kristallstrukturanalysen mit EctD aus *V. sallexigens*, konnte dieses spezielle Strukturmotiv ebenfalls in EctD gefunden werden (Reuter *et al.*, 2010). Der Kern des EctD Enzyms besteht, wie für die Proteine aus dieser Klasse typisch, aus der oben genannten doppelsträngigen β-Helix, die das aktive Zentrum beinhaltet. Die β-Faltblätter sind zur besseren Übersicht als β-I – β-VIII nummeriert (Abbildung 17).

Diese β -Faltblätter enthalten alle Aminosäuren, die für die Hydroxylierungsreaktion essentiell sein sollten, da sie zum einen in der Nähe der Aminosäuren sind, die an der Eisenbindung beteiligt sind und zum anderen hoch-konservierte Aminosäuren in räumlicher Nähe haben.

In direkter Nachbarschaft zum Eisen befinden sich für die Ectoin Bindung und Stabilisierung typische Aminosäuren, wie das Arg-259. Das Arginin an dieser Position stabilisiert wahrscheinlich das Co-Substrat 2-Oxoglutarat (Abbildung 20). Diese Annahme wird durch bioinformatische Analysen und durch die Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen dieser Arbeit untermauert, da alle Veränderungen an dieser wichtigen Position zu einem inaktiven Protein führten.

Die Kristallstruktur von EctD beinhaltet einen Bereich, der nicht durch die Röntgenstrukturanalysen ermittelt werden konnte. Dieser Bereich beinhaltet die Aminosäuren von Gly-195 bis Leu-211 und wurde als „flexibler Deckel“ (Loop) gekennzeichnet. Ein solcher flexibler Bereich ist oft in Proteinen aus der Klasse der Nicht-Häm-Eisen(II) abhängigen Dioxygenasen identifiziert worden. In zwei Kristallstrukturen der Proteine AsnO aus *S. coelicolor* und der AsnO verwandten L-Arginin-Oxygenase VioC aus *Streptomyces vinaceus* konnten diese flexiblen Bereiche in den Kristallstrukturen aufgelöst werden, wenn das für die Proteine spezifische Substrat gebunden wurde (Helmetag *et al.*, 2009; Strieker *et al.*, 2007).

6.2 Das Eisenbindezentrum in EctD aus *V. salexigens*

Das für die Enzymfamilie der Nicht-Häm-Eisen(II)-2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen typische Eisenbindemotiv, bestehend aus zwei Histidin-Imidazolen und dem Carboxylat eines Aspartats oder Glutamats, konnte in der Proteinstruktur von EctD aus *V. salexigens* gefunden werden (Abbildung 19). Die Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248 sind dabei essentiell für die Eisenbindung. Dieses Strukturmotiv wird als sogenannte 2-His-1-Carboxylat-Triade bezeichnet und stabilisiert den Co-Faktor Eisen im Inneren des EctD Enzyms (Flashman & Schofield, 2007; Hausinger, 2004; Purpero & Moran, 2007; Welford *et al.*, 2005). Das His-146 bildet zusammen mit dem Asp-148 ein hoch-konserviertes Sequenzmotiv, welches dem charakteristischen Sequenzmotiv His-X-Asp/Glu dieser Superfamilie entspricht (Clifton *et al.*, 2006; Flashman & Schofield, 2007; Hausinger, 2004; Purpero & Moran, 2007; Welford *et al.*, 2005). Eine Ausnahme in der Eisenbindung der Proteine aus Familie der Nicht-Häm-Eisen(II)-2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen stellen die Halogenasen dar. Die Sequenzanalyse und die Kristallstruktur der Halogenase SyrB2 zeigte, dass sich an der Position des Aspartats oder Glutamats des His-X-Asp/Glu Sequenzmotivs ein

Alanin befindet (Blasiak *et al.*, 2006; Matthews *et al.*, 2009). Die Stabilisierung des Eisens an dieser Stelle wird demnach nicht über das Carboxylat einer dieser Aminosäuren durchgeführt, sondern durch ein Halogenid-Ion, das durch das Substrat-Radikal entsteht (Matthews *et al.*, 2009).

Aus dem Alignment aller identifizierten EctD Proteinsequenzen wird deutlich, dass das Eisenbindezentrum in allen Ectoin-Hydroxylasen aus zwei Histidinen und einem Aspartat besteht, da sich dieses Motiv in allen EctD Sequenzen wiederfinden lässt (Abbildungen 24 und 25). In der EctD Struktur befand sich der Co-Faktor Eisen im Inneren des EctD Proteins und wird von den drei Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248 umschlossen und dadurch stabilisiert.

Die Bindung des Eisens scheint so stark zu sein, dass es nicht durch die chromatographischen Reinigungsprozesse aus EctD herausgelöst wurde. Dabei ist grundsätzlich nicht ausgeschlossen, dass Metalle aus Proteinen durch chromatographische Reinigungsprozesse z.B. mit Hilfe starker negativer Ladungen wie bei der Reinigung mit Proteinen, die mit einem His-Tag versehen sind, entfernt werden. Damit könnte das Eisen aus dem Protein herausgelöst und das Protein somit inaktiviert werden. Im Falle der EctD Reinigung wurde diese Problematik durch die Wahl eines C-terminalen *Strep*-tags umgangen. Interessanterweise reichte der Eisengehalt im Medium zur EctD Proteinproduktion in *E. coli* aus, um das Eisen im Inneren des Proteins einzubauen. Es wurde kein zusätzliches Eisen während der EctD Proteinproduktion oder in die Puffer für das Kristallscreening gegeben. Es war jedoch auch nicht möglich, den Anteil an aktivem Protein durch Zugabe von Eisensulfat ins Proteinproduktionsmedium zu erhöhen (Daten nicht gezeigt). Der Anteil an Eisen im Wildtyp EctD Protein lag im Durchschnitt bei 86 % und entsprach ungefähr dem theoretischen Wert von 1 mol Eisen pro 1 mol Protein (Abbildung 42).

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Aminosäuren, die aus der Kristallstruktur als essentiell für die Eisenbindung identifiziert wurden, tatsächlich um die wichtigen Aminosäureseitenketten der 2-His-Carboxylat-Triade handelt, wurden die Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248 in einer Mutagenesstudie jeweils zu Alanin substituiert. Nach der Substitution der Aminosäuren wurden die einzelnen EctD Mutanten im Vergleich mit dem EctD-Wildtyp Protein auf ihre Enzymaktivität hin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die an der Eisenbindung beteiligten Aminosäuren eine sehr wichtige Rolle für die Aktivität des Enzyms spielen, da die Substitutionen dieser wichtigen Aminosäuren zur Inaktivität der jeweiligen EctD Mutante führten. Dabei ist es bereits ausreichend, nur eine der drei Aminosäuren His-146, Asp-148 oder His-248 in ein Alanin auszutauschen, um die Stabilisierung des Eisens zu stören und damit das

Protein zu inaktivieren. Die jeweils verbliebenen beiden Aminosäuren des Eisenbindemotivs konnten demnach den Verlust der Eisenbindung nicht kompensieren.

Um sicherzustellen, dass die Mutagenese der Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248 zu einem Verlust der Eisenbindung führt und es sich dabei nicht um einen indirekten Effekt z.B. durch eine fehlerhafte Faltung des Proteins handelt, wurde der Eisengehalt jeder Eisenmutante im Vergleich zum Wildtyp gemessen. Aus den Eisenbestimmungen geht hervor, dass jede einzelne Alaninsubstitution im Bereich der eisenbindenden Aminosäuren zu einer drastischen Reduzierung des Eisengehalts im Protein führt (5.8). Der Eisengehalt des EctD Wildtyp Proteins ergab in unterschiedlichen Messungen jeweils eine nahezu 1:1 Korrelation von 1 mol Protein zu 1 mol gebundenen Eisen. In den Mutanten H146A, D148A, D148E und H248A konnte kein Eisen detektiert werden und erklärt damit die Inaktivität dieser Mutanten. Der Versuch den Wildtypphänotyp dieser Mutanten durch Zugabe von höheren Eisenkonzentrationen in Form von Eisensulfat im Reaktionspuffer des Essays wieder herzustellen, führte zu keinem Erfolg. Dabei wurden Eisenkonzentrationen gewählt, die 100 fach höher waren als die im Essay für den Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich das beschriebene Eisenzentrum in der Form der 2-His-1 Carboxylat-Triade in dieser Klasse von Proteinen im Verlaufe der Evolution fest evolviert hat und keine Veränderungen akzeptiert. Eine weitere Erkenntnis aus den bioinformatischen Analysen unterstützt diese Schlussfolgerung, da dieses Motiv in allen 98 EctD Proteinsequenzen zu 100% konserviert ist.

Um zu überprüfen, ob eine konservative Substitution einer der für die Eisenbindung wichtigen Aminosäuren zu einem weniger drastischen Phänotyp führt, wurde Asp-148 zu Glutamat ausgetauscht. Aber auch diese Mutation führte zu einem inaktiven Protein und enthielt ebenfalls kein Eisen mehr.

Es kann bei Mutagenesestudien nie ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp einer Mutante durch einen indirekten Effekt beispielsweise, durch eine fehlerhafte Faltung des Proteins, verursacht wird. Um eine inkorrekte Proteinfaltung auszuschließen, könnten z.B. CD-spektroskopische Analysen durchgeführt werden.

6.3 Bindung des Co-Substrats 2-Oxoglutarat in EctD aus *V. salexigens*

Wichtige Aminosäuren, die für die Bindung des Co-Substrats 2-Oxoglutarat verantwortlich sind, konnten in Proteinen der Familie der Nicht-Häm-Eisen(II)-2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen (EC. 1.14.11), in die auch EctD eingruppiert wurde, in vorangegangenen Studien durch Kristallstrukturanalysen identifiziert werden (Blasiak *et al.*, 2006; McDonough *et al.*, 2005; You *et al.*, 2007). In der Kristallstruktur des EctD Enzyms konnte kein Co-Substrat 2-Oxoglutarat ermittelt werden. Dennoch wurden zu strukturell ähnlichen Proteinen wie PhyH, SyrB2 und PtlH analoge Strukturmodule identifiziert (Abbildung 20).

Das Carboxylat an der C5 Position des 2-Oxoglutarats ist typischerweise durch eine Salzbrücke mit der basischen Gruppe eines Arginins oder Lysins stabilisiert und wird zusätzlich durch mindestens eine Wasserstoffbrückenbindung im Protein positioniert (Clifton *et al.*, 2006). Dieses Arginin befindet sich meistens im β -Faltblatt VIII des DSBH-Motiv, was durch Kristallstrukturen der Proteine aus der Familie der Nicht-Häm-Eisen(II) abhängigen Dioxygenasen hervorgeht (Clifton *et al.*, 2006). Übereinstimmend ist im β -Faltblatt VIII von EctD an Position 259 ein hochkonserviertes Arginin zu finden, das die Stabilisation des 2-Oxoglutarats übernehmen könnte. In wenigen Ausnahmen wird das 2-Oxoglutarat durch die Proteine der Familie der Nicht-Häm-Eisen(II)-abhängigen Dioxygenasen mit einem Arginin-X-Serin Sequenz-Motiv stabilisiert (Clifton *et al.*, 2006). Dieses Motiv kann in EctD nicht gefunden werden, da sich an Position 261 kein Serin sondern ein Asparagin befindet (Abbildung 25).

Betrachtet man die Bindung des 2-Oxoglutarats durch die Aminosäuren Arg-275 und Ser-266 in dem Enzym PhyH, das EctD strukturell am ähnlichsten ist, so fällt auf, dass Ser-266 zwei Aminosäuren nach dem zweiten der beiden Histidine lokalisiert ist, die an der Eisenbindung beteiligt sind. In PhyH befindet sich das Arg-275 auf dem β -Faltblatt VIII und das Ser-266 auf dem β -Faltblatt VII und liegen damit in räumlicher Nähe des Co-Faktors Eisen. Dabei wird das C5-Carboxylat von 2-Oxoglutarat durch die positiven Seitenketten des Arg-275 gebunden und zusätzlich durch das Ser-266 stabilisiert. Die Anordnung dieser zwei wichtigen Aminosäuren konnten ebenfalls in den zu EctD strukturell verwandten Proteinen SyrB2 und PtlH ermittelt werden (Abbildung 20). Hier befinden sich zwei Aminosäuren nach dem Histidin, das für die Eisenbindung verantwortlich ist, ein Serin. Auch in EctD ist zwei Positionen nach dem His-248 ein Serin lokalisiert, das zudem in allen EctD Proteinsequenzen hochkonserviert ist. Somit könnte das 2-Oxoglutarat in EctD durch dieses Ser-250 im β -

Faltblatt VII und zusätzlich durch das Arg-259 im β -Faltblatt VIII stabilisiert werden. Allerdings ist das Arg-259 relativ weit weggedreht und steht dadurch in einem ungünstigen Winkel zu einem möglichen gebundenen 2-Oxoglutarat. Daher müsste es sich weiter in Richtung des Eisens positionieren. Da es sich an dieser Position in EctD mit dem Arg-259 um einen relativ flexiblen Bereich in EctD handelt, ist die richtige Ausrichtung des Arg-259 bei gebundenem 2-Oxoglutarat vorstellbar. Aminosäuresubstitutionen von Arg-259 im EctD Protein aus *V. salexigens* wie MP2 (R259A), MP4 (R259K), MP5 (R259H) und MP6 (R259E) führten zu inaktiven EctD Hydroxylasen. Bei den Substitutionen R259K und R259H, bei denen das konservierte Arg-259 durch die positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin bzw. Histidin ersetzt wurde, konnte keine Aktivität in den Mutanten gemessen werden. Dies deutet daraufhin, dass dieses konservierte Arg-259 und dessen positive Ladung in einem nicht veränderbaren Abstand zum 2-Oxoglutarat positioniert sein und damit die zentrale Rolle bei der Bindung des Co-Substrats 2-Oxoglutarat spielen muss.

Mit einer Ausnahme, der Proly-4-Hydroxylase aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Koski *et al.*, 2007), konnte bisher in allen zu EctD verwandten Strukturen der Nicht-Häm-Eisen(II) abhängigen Dioxygenasen kein Arg-X-Ser Motiv gefunden werden. Vielmehr tritt das His-X-Ser Strukturmotiv auf und scheint daher charakteristisch für PhyH ähnliche Enzyme wie EctD zu sein.

Eine weitere strukturelle Ähnlichkeit der Proteine PhyH, SyrB2 und PtlH zu EctD ist ein Phenylalanin im β -Faltblatt II. Dieses Phe-143 scheint durch die aromatische Seitenkette zusätzlich wichtig für die Positionierung des 2-Oxoglutarats zu sein. Die Substitutionen von Phe-143 zu Alanin und weiterhin zu den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan führten zu inaktiven Mutanten und deuten darauf hin, dass diese Aminosäure essentiell für die 2-Oxoglutaratstabilisierung ist.

Neben den Mutanten mit Alaninsubstitutionen der Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248 wurden auch Eisenkonzentrationsbestimmungen mit anderen, weiteren EctD Mutanten durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob die konservierten Aminosäuren in der räumlichen Nähe der Aminosäuren His-146, Asp-148 und His-248 einen Einfluss auf die Eisenbindung haben könnten. Die Substitutionen der aromatischen Aminosäure Phe-143 zu Alanin und Tyrosin führten zu deutlich reduzierten Eisenkonzentrationen in den Mutanten. Im Gegensatz dazu hatte die Mutante F143W fast genauso viel Eisen gebunden wie das Wildtyp-Protein. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es durch den Austausch des Phe-143 zu Alanin zu einer Störung der 2-Oxoglutarat Bindung kommt und damit indirekt die zusätzliche Eisenstabilisierung durch das Co-Substrat verhindert wird. Der Austausch zu Tyrosin

hatte fast den gleichen Einfluss auf den Eisengehalt wie die Alaninsubstitution. Dabei scheint die zusätzliche OH-Gruppe des Tyrosins negative Auswirkungen auf das 2-Oxoglutarat zu haben. Die aromatische Aminosäure Tryptophan hingegen scheint die Bindung des Eisens nicht zu beeinflussen und die enzymatische Inaktivität dieses Proteins muss einen anderen Grund haben. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Indolring weiter in das aktive Zentrum ragt und damit einen störenden Einfluss auf die Substratbindung bzw. Co-Substratbindung hat.

Ein weiterer interessanter Befund war, dass die Mutanten mit Substitutionen an bestimmten Positionen im EctD Protein, die nicht in direktem Zusammenhang mit der Eisenbindung stehen, einen geringeren Eisenanteil im Protein enthielten. Von der Aminosäure Arg-259 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie vermutlich in EctD die zentrale Rolle bei der 2-Oxoglutaratbindung spielt und 2-Oxoglutarat zusätzlich das Eisen mit dem C1-Carboxylat in einem zweizahnigen Mechanismus stabilisieren könnte, wie bereits bei strukturell verwandten Proteinen wie SyrB2, PhyH und PtlH beschrieben wurde (Blasiak *et al.*, 2006; McDonough *et al.*, 2005; You *et al.*, 2007). Alle Messungen des Eisengehalts in Arg-259 Mutanten [R259A (MP2), R259K (MP4), R259H (MP5), R259Q (MP6)] zeigten, dass sich weniger Eisen in den Mutanten im Gegensatz zum EctD Wildtyp Protein befand (Abbildung 42). Die Daten aus der Kristallstruktur zeigen zwar, dass trotz ungebundenem 2-Oxoglutarat Eisen gebunden werden kann, aber vielleicht führt die Anwesenheit von gebundenem 2-Oxoglutarat zu einem höheren Anteil von Eisen im Protein.

Die Hypothese, dass die richtige Orientierung des 2-Oxoglutarats das Eisenatom im Protein zusätzlich stabilisiert, wird damit untermauert. Auch die Mutanten N261A (MP8), N133A (MP9) und R131A (MP10) wiesen einen geringeren Eisengehalt verglichen mit dem Wildtyp EctD auf. Dies könnte daran liegen, dass diese Aminosäuren im β -Faltblatt VII und VIII lokalisiert sind und ebenfalls für die richtige Positionierung des 2-Oxoglutarats verantwortlich sein könnten. Die Analyse des EctD Proteinsequenzalignments zeigt (Abbildung 24), dass die Aminosäuren Gln-261, Gln-133 und Arg-131 in allen EctD Proteinen bis auf eine Ausnahme zu 100% konserviert sind und damit sehr wichtig für die Funktion der Ectoin-Hydroxylasen sein müssen. Ein indirekter Effekt auf die Proteinfaltung ist jedoch auch hier nicht auszuschließen.

6.4 Das Konsensusmotiv der Ectoin-Hydroxylasen

In vorhergehenden Studien konnte durch bioinformatische Analysen ein für die Ectoin-Hydroxylasen typisches Konsensusmotiv ermittelt werden (Bursy *et al.*, 2007). Dieses Konsensusmotiv umfasste die Aminosäuren $W^{145}HSDFETWH^{153}$. Durch

weiterführende bioinformatische Analysen im Rahmen dieser Arbeit konnte dieses Motiv erweitert werden. Es umfasst die Aminosäuren F¹⁴³-X-WHSDFETWH-X-EDG-M/L-P¹⁵⁹ und konnte in den 98 analysierten EctD Proteinsequenzen gefunden werden. Das Konsensusmotiv als höchster konservierter Bereich in den Ectoin-Hydroxylasen kann dazu herangezogen werden, *bona fide* Ectoin-Hydroxylasen von anderen ähnlichen Proteinen abzugrenzen und eindeutig zu identifizieren.

In Abbildung 21 ist das Konsensusmotiv gelb hervorgehoben und als Helix im Bereich des gebundenen Eisens im EctD Protein zu erkennen. Da das Konsensusmotiv in der Nähe der eisenbindenden Aminosäuren lokalisiert ist, könnte diese Struktur unter anderem daran beteiligt sein, zwei für die Eisenbindung wichtigen Aminosäuren (His-146 und Asn-148) in der richtigen Position zu stabilisieren. Des Weiteren ist in dem Konsensusmotiv, dass bereits in 5.3 erwähnte Phe-143 zu finden. Verschiedene Substitutionen lassen darauf schließen, dass diese Aminosäure an der Positionierung des 2-Oxoglutarats beteiligt ist.

Viele EctD Sequenzen sind in den Protein-Datenbanken als Prolin-Hydroxylasen annotiert. Es gibt jedoch einen klaren Unterschied zwischen Prolin-Hydroxylasen und Ectoin-Hydroxylasen im Hinblick auf bestimmte Aminosäuresequenzen. Dies zeigten die bioinformatischen Analysen der EctD Proteinsequenzen in dieser Arbeit. Wie aus dem Alignment in Abbildung 15 hervorgeht, befindet sich an der Position 143, dementsprechend in der ersten Aminosäure der Konsensussequenz, ein Phenylalanin in allen EctD Sequenzen. In einem Alignment der Proteinsequenzen mit putativen Prolin-Hydroxylasen kann man erkennen, dass diese eindeutige Signatursequenz für Ectoin-Hydroxylasen fehlt und stattdessen ein Tryptophan an dieser ersten Position zu finden ist.

Die Hypothese war, dass die Substitution des Phe-143 zu Tryptophan in EctD in einer Hydroxylierung von Prolin resultieren könnte. Diese Hypothese konnte allerdings experimentell nicht bestätigt werden. In allen getesteten Ectoin-Hydroxylasen konnte nur bei dem EctD Enzym aus *H. elongata* eine geringe Aktivität zur Prolinhydroxylierung gemessen werden. Allerdings ist zu vermuten, dass es sich dabei um eine Nebenreaktion handelt, die sehr langsam abläuft. Das zeigten Versuche, bei denen separate Aktivitätssays mit jeweils 6 mM Ectoin bzw. 6 mM Prolin nach einer Stunde per HPLC gemessen wurden. Im Ansatz mit Ectoin konnte das EctD Protein innerhalb von einer Stunde nahezu die gesamte Menge Ectoin zu Hydroxyectoin hydroxylieren. Im Gegensatz dazu konnte im Enzymassay mit Prolin keine nennenswerte Menge an Hydroxyprolin detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Erst nach einer Messung des Prolinessays, der 24 Stunden inkubiert wurde, konnten

geringe Mengen an Hydroxyprolin nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, dass das komplexe aktive Zentrum der Ectoin-Hydroxylasen sehr spezifisch für das natürliche Substrat Ectoin ist. Alle zu Ectoin ähnlichen Substrate können wahrscheinlich gebunden werden, aber nicht gezielt hydroxyliert werden.

6.5 Ein flexibler Deckelbereich in EctD

Ein durch die Kristallstrukturanalysen in EctD nicht aufgelöster Bereich besteht aus den Aminosäuren zwischen Gly-195 und Leu-211. In dem zu EctD strukturell ähnlichem Protein PhyH (Abbildung 18) konnte die flexible Region zwischen den Aminosäuren 223 und 233 ebenfalls nicht aufgelöst werden (McDonough *et al.*, 2005). In der Struktur des PhyH Proteins fehlte zudem das typische Substrat Phytanoyl-CoA. Dies deutet darauf hin, dass dieser flexible Bereich eine wichtige Funktion für die Substratabschirmung haben könnte und zusätzlich noch das Substrat Ectoin für die Hydroxylierungsreaktion richtig positioniert.

Dass es sich in EctD um eine flexible Struktur handeln muss, zeigen die Probleme, das Elektronengitter dieses Bereichs durch Röntgenstrukturanalysen eindeutig zuzuordnen (pers. Mitteilung von K. Reuter). Dieser als Loop vorhergesagte Bereich ist ein Teil des verlängerten Bereichs der β -Faltblätter IV und V in EctD (Abbildungen 17 und 18). Die flankierenden Aminosäuren Val-194 und das hoch konservierte Gly-212 befinden sich an den Kanten gegenüber des hypothetischen aktivem Zentrums des EctD Proteins. Bei der Bindung von Ectoin an diesen flexiblen Bereich könnte sich dieser Loop eventuell über das aktive Zentrum legen und die enzymatische Reaktion dadurch abschirmen.

Im Gegensatz zu EctD und PhyH ist es gelungen, diesen flexiblen Bereich in der Struktur der Nicht-Häm-Eisen(II) abhängigen Asparagin Hydroxylase AsnO aus *S. coelicolor* in der Kristallstruktur aufzulösen (Strieker *et al.*, 2007). Der Loop, der mit dem von EctD vergleichbar ist, beinhaltet in AsnO die Aminosäuren 208 bis 223 und ist in der Apo-Form des Proteins als ein undefinierter Bereich ermittelt worden. Erst in der Struktur mit gebundenem Liganden konnte dieser flexible Loop Bereich aufgelöst und klar identifiziert werden (Strieker *et al.*, 2007). Eine weitere Struktur, die eine solche Loop-Region definiert, ist die mit AsnO verwandte L-Arginin Oxygenase VioC aus dem Bakterium *Streptomyces vinaceus* (Helmetag *et al.*, 2009). Auch in diesem Enzym konnte in der Kristallstruktur das typische Substrat dieses Proteins Viomycin aufgelöst werden und der flexible Bereich war eindeutig zu erkennen. Die Aufklärung dieser flexiblen Bereiche in den Kristallstrukturen AsnO und VioC liefern ein tieferes Verständnis für die Funktion dieses Bereiches. Durch diese Loop/Deckelstrukturen wird

das aktive Zentrum der Proteine vor störenden Einflüssen während der enzymatischen Reaktion geschützt. Zusätzlich interagieren bestimmte Aminosäuren dieser Region mit den Substraten und führen zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Substrats.

In EctD könnten bestimmte Aminosäuren dieses nicht aufgelösten Deckelbereichs zusätzlich das Substrat Ectoin stabilisieren. Die bioinformatischen Analysen der EctD Proteinsequenzen zeigen zudem hoch-konservierte Aminosäuren in diesem Bereich und unterstützen damit diese Hypothese. Um die Auswirkungen von Substitutionen in diesem flexiblen Bereich zu untersuchen, wurden diese hoch-konservierten Aminosäuren Tyr-197, Pro-198, Ser-205 und Leu-206 zu Alanin ausgetauscht. Die Substitutionen von Y197A und S250A führten zu keiner Beeinträchtigung der Enzymaktivität. Im Gegensatz dazu verloren die Mutanten mit den Substitutionen P198A und L206A ihre Aktivität. Daher scheinen bestimmte Reste innerhalb dieses Loops für die Enzymaktivität wichtig zu sein. Eine Hypothese für die Funktion eines solchen Deckels in EctD wäre, dass mit seiner Hilfe das aktive Zentrum des Enzyms geschlossen und dadurch die Hydroxylierungsreaktion gestartet bzw. geschützt wird.

In Ectoin Bindeproteinen ist es so, dass Ectoin im Inneren des jeweiligen Proteins gebunden wird. Diese Bindung erfolgt an der Stelle, an der die Domänen des Proteins miteinander verbunden sind (Hanekop *et al.*, 2007; Kuhlmann *et al.*, 2008b; Lecher *et al.*, 2009). Durch das Binden des Substrats Ectoin kommt es zu einer Bewegung der Domänen, diese schließen sich wie eine Art Venusfliegenfalle und verankern so das Ectoin. Vielleicht existiert dieser Mechanismus in abgewandelter Form in EctD um Ectoin in die endgültige Lage zu positionieren. Ohne eindeutige EctD Struktur mit Ectoin kann jedoch darüber nur spekuliert werden.

6.6 Vergleich der Struktur von EctD mit Ectoin/Hydroxyectoin-Transportproteinen

Durch Kristallstrukturanalysen der Substratbindeproteine für Ectoin bzw. Hydroxyectoin konnten wichtige Struktur motive und Aminosäuren ermittelt werden, die für die Bindung dieser beiden kompatiblen Solute essentiell sind. Bisher wurden das Ectoin Substratbindeprotein (SBP) EhuB aus einem ABC Transportsystem von *S. mellotti* sowie die Bindeproteine der TRAP-Transporter UehA aus *S. pomeroyi* und TeaA aus *H. elongata* strukturell aufgeklärt (Hanekop *et al.*, 2007; Kuhlmann *et al.*, 2008b; Lecher *et al.*, 2009). Die Ergebnisse der Strukturanalysen des EctD Enzyms im Vergleich mit den Strukturen der SBP aus Transportsystemen für Ectoin und Hydroxyectoin lassen die Schlussfolgerung zu, dass ein ähnlicher Bindemechanismus in der Hydroxylase vorhanden sein könnte. Die beiden kompatiblen Solute Ectoin und

Hydroxyectoin werden in den SBP durch konservierte Aromatenboxen mit den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin durch Kationen- π -Interaktionen gebunden (Hanekop *et al.*, 2007). Ein genauer Blick in das aktive Zentrum der EctD Kristallstruktur zeigt, dass sich dort ebenfalls aromatische Aminosäuren befinden (Phe-95, Phe-143, Trp-152 und Phe-263), die für die Kationen- π -Interaktion mit dem Substrat Ectoin in Frage kommen. Wenn man diese aromatischen Aminosäuren im EctD Alignment vergleicht, stellt man fest, dass diese Aminosäuren alle hoch-konserviert in den EctD Proteinen sind. Alle Substitutionen an diesen Positionen führten zu inaktiven Proteinen. An den Positionen 143 und 263 wurde zudem versucht, die aromatische Aminosäure Phenylalanin durch die zwei anderen aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zu ersetzen. Nur die Mutante F263Y war ohne Auswirkung auf die Funktionalität des Enzyms, während die anderen Mutationen zu Alanin oder Tryptophan zu einem Defekt in der Hydroxylierungsfähigkeit von EctD führten.

Für die direkte Interaktion mit dem Substrat Ectoin ist durch die Kristallstrukturanalysen der Ectoin Bindeproteine bekannt, dass bestimmte Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind, bei den verschiedenen Ectoinbindeproteinen immer wieder auftreten (Hanekop *et al.*, 2007; Lecher *et al.*, 2009; Ziegler *et al.*, 2010). Man kann bei der Substratbindung von einem spezifischen Mechanismus sprechen, bei dem die Carboxylgruppe des Ectoins über Salzbrücken mit einem Arginin und die beiden Stickstoffatome mithilfe eines Glutamats und eines Asparagins stabilisiert werden. Zusätzliche hydrophobe Interaktionen zum Substrat Ectoin werden durch die Aminosäuren Glutamat, Phenylalanin und Methionin ausgebildet und führen zu einer zusätzlichen Stabilisierung von Ectoin im Protein. Vergleicht man diese Erkenntnisse mit den hoch-konservierten Resten in der Struktur der Ectoin-Hydroxylase, so erkennt man klare Parallelen. An Position 259 befindet sich ein hoch-konserviertes Arginin, das in allen EctD Proteinsequenzen zu finden ist. Dieses Arg-259 ist wahrscheinlich zum einen an der Stabilisierung des 2-Oxoglutarats und zum anderen an der Stabilisierung der Carboxylgruppe des Ectoins beteiligt. Eine Substitution des Arg-259 zu Alanin führt zum Verlust der Hydroxylierungsfähigkeit in EctD. Die Substitutionen von Arg-259 zu anderen positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin oder Histidin führten ebenfalls zu inaktiven Enzymen. An Position 173 befindet sich in EctD ein Asparagin, das im EctD Alignment als hoch-konserviert auftritt und sich in räumlicher Nähe zum Arg-259 befindet. An Position 261 ist ein weiteres hoch-konserviertes Asparagin in der Ectoin-Hydroxylase lokalisiert, das an der Interaktion mit einem Stickstoffatom in Ectoin beteiligt sein

könnte. Um Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, könnten ein hochkonserviertes Serin an Position 167 und ein Lysin an Position 135 in Frage kommen. Das Lys-135 ist im EctD Alignment nicht in allen EctD Proteinen zu finden. An dieser Stelle taucht in 17% der EctD Sequenzen ein Methionin auf. Dieses Methionin ist jedoch konform mit den Strukturen aus den Bindeproteinen, da dort ebenfalls Methionine zu finden sind, die die Aufgabe des Lysins ersetzen könnten. Ein interessantes Ergebnis dazu ist, dass die Substitutionen an den drei Positionen (Ser-167, Asn-173 und Asn-261) nicht zu einer Inaktivierung von EctD führten. Dies ist analog zu Ergebnissen aus Mutagenesestudien mit Bindeproteinen, in denen der Austausch jeweils einer Ecto-inbindenden Aminosäure nicht zum Verlust der Bindefähigkeit des Proteins führte (Hanekop *et al.*, 2007). Die anderen Aminosäuren, die ebenfalls für die Bindung des Substrats Ectoin verantwortlich sind, konnten das Fehlen einer wichtigen Aminosäure für die Ectoin Bindung kompensieren (Hanekop *et al.*, 2007).

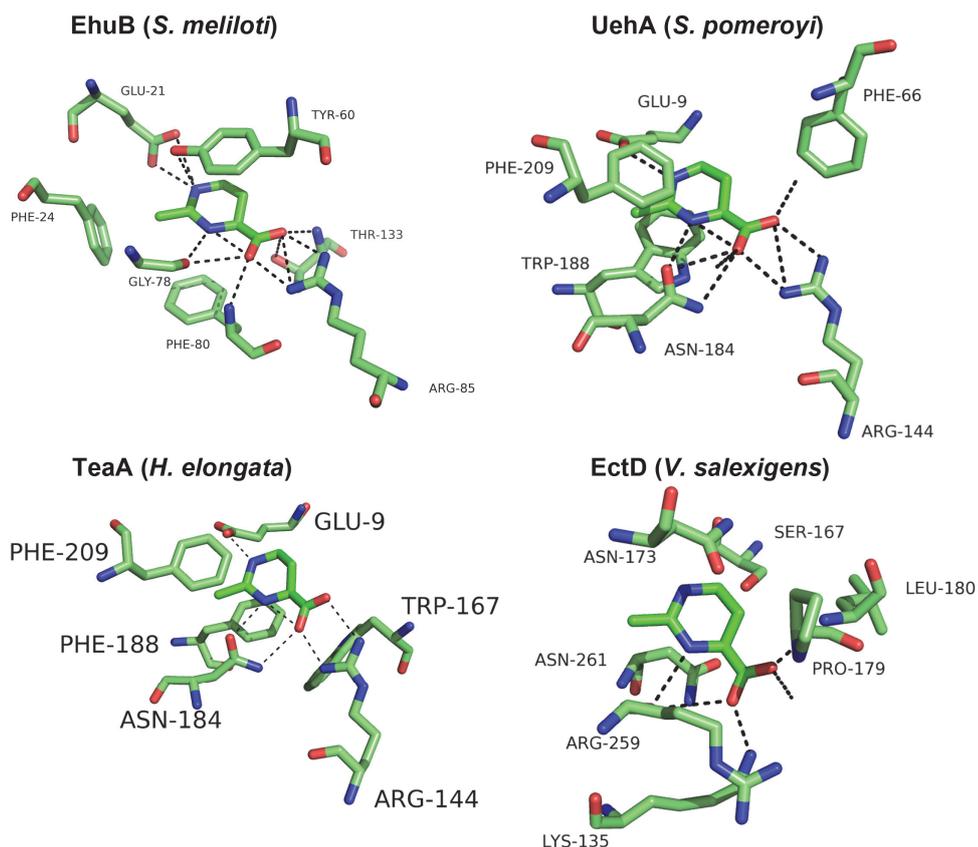


Abbildung 52: Struktureller Vergleich von Ectoin Bindeproteinen mit der errechneten Ectoin Bindestelle in EctD. Die für die Ectoin Bindung verantwortlichen Aminosäuren wurden in den verfügbaren Kristallstrukturen aus den Bindeproteinen EhuB aus *S. meliloti*, UehA aus *S. pomeroyi* und TeaA aus *H. elongata* mit einem *in silico* Modell der Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens* gegenübergestellt. Das *in silico* Modell von EctD beinhaltet die mögliche, theoretische berechnete Position von Ectoin und die wahrscheinlich beteiligten Aminosäuren (Sander Smits, Universität Düsseldorf).

Die Abbildung 52 zeigt einen strukturellen Vergleich der Kristallstrukturen von Ectoin Bindeproteinen zu EctD. Man erkennt in den Ectoin-Bindeproteinen das immer wieder auftretende Bindemotiv bestehend aus einem wichtigen Arginin für die Stabilisierung der Carboxygruppe des Ectoins und die Aminosäuren wie Glutamat, Glycin und Asparagine die die Stickstoffe des Ectoins stabilisieren. Im Vergleich dazu, zeigt die Struktur der Ectoin-Hydroxylase EctD, in der das Substrat Ectoin eingerechnet wurde (Dr. Sander Smits, AG Lutz Schmitt, Universität Düsseldorf), dass das Arginin relativ weit von der Carboxygruppe des Ectoins weggedreht ist und in einem ungünstigen Winkel zum Substrat steht. Für eine Bindung der Stickstoffe des Arg-259 mit der Carboxygruppe des Ectoins müsste sich diese Aminosäure weiter in die Richtung des Substrats bewegen. Dies kann jedoch durch die Flexibilität des Arginins relativ leicht bewerkstelligt werden.

Die in EctD für die Koordination der Stickstoffe des Ectoins verantwortlichen Aminosäuren, sind wahrscheinlich die Aminosäuren Asn-173, Asn-261, Ser-167 und Lys-135. Auffällig ist, dass diese Aminosäuren in allen EctD Proteinsequenzen hochkonserviert sind. Daher ist davon auszugehen, dass die Bindung des Ectoins in EctD mit der Bindearchitektur der Ectoin-Bindeproteine vergleichbar ist. Dabei muss es sich jedoch in EctD um eine schwächere Bindung als in den Ectoinbindeproteinen handeln, da sonst das Ectoin bzw. Hydroxyectoin nicht mehr aus dem Protein entlassen werden könnte. In den Bindeproteinen wird Ectoin mit Bindekonstanten im Bereich von 1 μM hoch affin gebunden, aber bei der Interaktion mit den Transportproteinen der Membran wieder aus dem Bindekomplex entlassen. Da EctD nicht mit einem anderen Protein interagiert, muss die Möglichkeit bestehen, dass Ectoin bzw. das hydroxylierte Produkt Hydroxyectoin selbst wieder aus dem aktiven Zentrum von EctD zu entlassen. Die relativ hohen K_m -Werte der gemessenen EctD Enzyme im Bereich von 5 mM unterstützen diese Theorie.

6.7 Mögliche Bindestelle von Ectoin in der Ectoin-Hydroxylase EctD

Die Erkenntnisse aus der Kristallstruktur mit gebundenem Eisen, die Mutagenesestudie mit EctD, die bioinformatischen Analysen zu den EctD Proteinsequenzen und der Vergleich von EctD zu Kristallstrukturen von Ectoin Bindeproteinen liefern Hinweise darauf, wie und wo Ectoin im Inneren des EctD Proteins stabilisiert und hydroxyliert werden könnte.

Damit die Hydroxylierungsreaktion im aktiven Zentrum der Ectoin-Hydroxylasen stattfinden kann, muss das Substrat Ectoin in der Nähe des Eisens liegen. Erst durch die Reduktion des Eisens und mit Hilfe des molekularen Sauerstoffs kommt es zu

einem nukleophilen Angriff des Co-Substrats 2-Oxoglutarat auf die C5 Position des Ectoins (Abbildung 51). Das Co-Substrat 2-Oxoglutarat muss dabei ebenfalls in räumlicher Nähe zum Eisen und zum Ectoin sein.

Durch Strukturberechnungen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lutz Schmitt der Universität Düsseldorf wurde ein *in silico* Modell für eine mögliche Bindestelle des Ectoins berechnet (Abbildung 53). Die Erkenntnisse aus dieser errechneten Position des Ectoins in EctD zusammen mit den Informationen des EctD Alignments im Vergleich zu den Ergebnissen aus den Kristallstrukturanalysen der Ectoin-Bindeproteine führen zur Eingrenzung möglicher Aminosäuren, die für die Substratbindung wichtig sein könnten. Zusätzlich war bei dieser Auswahl zu beachten, dass die hoch-konservierten Aminosäuren, wie bereits erwähnt, in unmittelbare Nähe zum Eisenzentrum lokalisiert sein mussten. Im Zuge der Mutagenesestudien von möglichen Aminosäuren, die an der Ectoin Bindung beteiligt sein könnten, wurden die Aminosäuren an den Positionen 95, 129, 131, 133, 152, 167, 173, 261 und 263 in EctD für eine Substitution zu Alanin ausgewählt. Im Falle von aromatischen Aminosäuren wie an Position 152 und 263 wurden zusätzliche Substitutionen zu anderen aromatischen Aminosäuren durchgeführt. Die Ergebnisse der Mutagenesestudie mit den theoretischen Berechnungen und dem Alignment führen zu einem hypothetischen Modell für die Ectoinbindung (Abbildung 53).

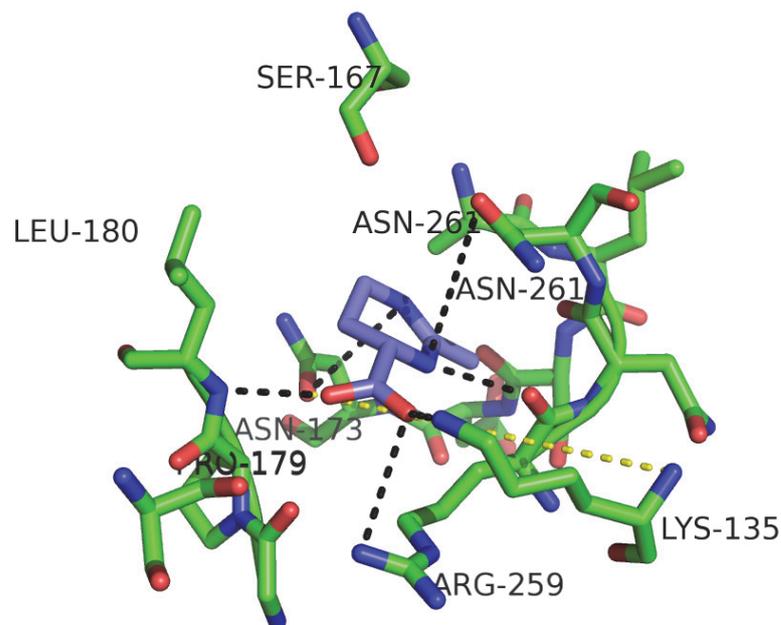


Abbildung 53: Mögliche Position des Ectoins in EctD. Durch *in silico* Berechnungen mit der EctD Struktur von *V. salexigens* und dem Substrat Ectoin konnten mögliche Aminosäuren, die für die Stabilisierung des Ectoins verantwortlich sind, identifiziert werden (Dr. Sander Smits, Universität Düsseldorf).

Dieses Modell postuliert, dass das Arg-259 das Substrat Ectoin wie auch das Co-Substrat 2-Oxoglutarat stabilisiert, und damit die zentrale und essentielle Aminosäure in EctD darstellt. Das Arg-259 müsste sich dazu in die Richtung des Eisenzentrums bewegen, um das Ectoin in die Nähe des Eisens zu bringen, was durch die Flexibilität des Arg-259 gut vorstellbar ist. Für den Aufbau einer zu den Ectoin-Bindeproteinen analogen Aromatenbox könnten die aromatischen Aminosäuren an den Positionen 95, 152 und 263 dienen. Die direkte Interaktion zum Ectoin könnte über die Aminosäuren Ser-167, Asn-173, Pro-179 und Asn-261 erfolgen.

Die Bindung des Ectoins muss im Vergleich zu den Ectoin-Bindeproteinen dabei aber etwas weniger affin sein, was der Vergleich des durchschnittlichen K_m -Werts von 5 mM der Ectoin-Hydroxylasen im Gegensatz zu K_D – Werten der Bindeproteine von 1 μ M erkennen lässt. Die geringere Affinität von EctD zu Ectoin ist notwendig, um das Produkt Hydroxyectoin nach der Hydroxylierungsreaktion wieder entlassen zu können. Zusätzlich dazu legt sich vermutlich der flexible Loop Bereich, bestehend aus den Aminosäuren Gly-195 bis Leu-211, bei gebundenem Ectoin über das aktive Zentrum und schirmt das Reaktionszentrum ab. Nach der enzymatischen Reaktion könnte das „Wegklappen“ von Arg-259 zusammen mit dem Aufrichten des Loops dazu führen, das Produkt Hydroxyectoin aus dem aktiven Zentrum zu entlassen. Bis jedoch keine EctD Struktur mit gebundenem Substrat Ectoin oder das hydroxylierte Derivat Hydroxyectoin vorliegt, kann dies nicht mit Sicherheit bestätigt werden.

Bei der weiteren Analyse des *in silico* Modells fällt auf, dass das Substrat Ectoin zu weit vom Eisen entfernt ist, um die Hydroxylierungsreaktion stattfinden zu lassen. Die Erklärung hierfür könnte sein, dass die *in silico* Berechnungen aus der vermutlich offenen EctD Struktur stattgefunden haben. Die Bindung von Ectoin durch die beschriebenen Aminosäuren könnte daher zwar stattfinden, jedoch bedarf es zur enzymatischen Hydroxylierung des Ectoins einer kompakteren EctD Struktur, damit das Ectoin in die Nähe des Eisens positioniert werden kann. Wahrscheinlich wird die Reaktion erst durch eine Konformationsänderung des EctD Proteins und die damit zusammenhängende Verdichtung des aktiven Zentrums gestartet. Für die Abschirmung der Reaktion könnte der flexible Loop dienen.

6.8 Ectoin-Hydroxylasen aus anderen Mikroorganismen

Die Ectoin-Hydroxylase EctD aus *V. salexigens* war die erste Hydroxylase die heterolog in *E. coli* produziert und affinitätschromatographisch durch einen C-terminal fusionierten *Strep*-tag aufgereinigt und biochemisch charakterisiert wurde (Bursy *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden unter anderem die Ergebnisse der Kristallstrukturanalysen dieses gereinigten EctD Proteins vorgestellt, wobei die wichtigen Substrate Ectoin und das Co-Substrat 2-Oxoglutarat in der Struktur fehlen (Reuter *et al.*, 2010). Um die Chancen bei einer erneuten Kristallstrukturanalyse des EctD Proteins zu erhöhen, eine Struktur mit gebundenem Ectoin und oder 2-Oxoglutarat zu erhalten, wurden weitere Hydroxylasen aus unterschiedlichsten Mikroorganismen kloniert und in *E. coli* produziert. EctD wurde aus folgenden Bakterien gereinigt: *H. elongata*, *Geobacillus sp.* Y412MC10, *P. stutzeri* A1501, *A. ehrlichii*, *A. cryptum* und *S. alaskensis*. Als einziges Archaeon wurde das Crenarchaeon *N. maritimus* mit einem *ectD* Gen identifiziert und als weitere EctD Quelle herangezogen. Nachdem die heterolog in *E. coli* produzierten EctD Proteine per *Strep*-tag Affinitätschromatographie aufgereinigt wurden, konnte in einem ersten Aktivitätstest bestätigt werden, dass alle EctD Proteine enzymatisch aktiv waren.

Die weiteren biochemischen Eigenschaften dieser EctD Proteine wurden daraufhin bestimmt. Dazu wurde als erstes ermittelt, welche idealen Versuchsbedingungen für die Hydroxylasen verwendet werden müssen. Hierbei zeigte sich, dass es durchaus Unterschiede in der Stabilität der einzelnen EctD Proteine gab, zum Beispiel bezüglich der unterschiedlichen Temperatur- bzw. pH-Wert-Optima, die aufgrund der extremen Lebensbedingungen einiger Mikroorganismen zu erwarten waren.

Bei den Hydroxylasen der Bakterien *S. alaskensis* und *Geobacillus sp.* Y412MC10, die in ihren Habitaten extremen Temperaturen ausgesetzt sind, wurde deutlich, dass die gereinigten Ectoin-Hydroxylasen ein breites Temperaturspektrum zeigten. Das EctD Enzym aus dem thermophilen Vertreter *Geobacillus sp.* Y412MC10 konnte Temperaturen bis 80°C tolerieren. Dies ist insofern interessant, als dass es sich dabei um ein sehr robustes Protein handelt und dem Bakterium eventuell bei den hohen Temperaturen zum Wachstum verhilft. Aus vorangegangenen Studien konnte man bereits sehen, dass Hydroxyectoin den Bakterien einen Wachstumsvorteil bei höheren Temperaturen verschafft (Bursy *et al.*, 2008; Garcia-Esteba *et al.*, 2006). Diese können neben hohen osmotischen Bedingungen auch höhere Temperaturen tolerieren. Da *Geobacillus sp.* Y412MC10 aus heißen Quellen des Yellow Stone National Park der USA isoliert wurde (Lucigen, USA), in denen Temperaturen von bis zu 90°C gemessen

wurden, wäre dies eine weitere Bestätigung dieser Hypothese. Ein interessantes Ergebnis ist, dass das EctD Protein von *G. sp.* Y412MC10 auch noch bei einer niedrigen Temperatur von 5°C aktiv ist. Dies konnte bei fast allen Ectoin Hydroxylasen bis auf die EctDs aus *P. stutzeri*, *S. coelicolor* und *V. salexigens* beobachtet werden. Bei der Hydroxylase aus *S. alaskensis* könnte man erwarten, dass die Hydroxylierung bei Temperaturen unter 5°C stattfindet, da *S. alaskensis* in seinem marinen Habitat deutlich geringeren Temperaturen ausgesetzt ist. Dies konnte nicht bestätigt werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Temperatur von 5°C um die kritische Temperatur, bei der die Hydroxylierung noch ablaufen kann.

In der Anpassung an extreme pH-Werte konnte zwischen den EctD Proteinen aus extrem lebenden Organismen und EctDs aus Bakterien mit gemäßigten Habitaten kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Auffällig ist, dass jedes EctD Protein im Bereich von pH 6,5 bis pH 9,6 Aktivität zeigte. Das Optimum aller Hydroxylasen lag zwischen pH 7,5 und pH 8. Die besten Umsatzraten wurden in einem TES Puffer erzielt, der für diesen pH Bereich optimiert wurde.

Ein interessantes Ergebnis ist, dass einige Ectoin-Hydroxylasen durch Zugabe von Salzen in ihrer Hydroxylierungsfähigkeit gesteigert werden können. Im Fall von KCl ist eine Konzentration von 150 mM für die Umsatzrate des EctD Proteins von *H. elongata* förderlich und es kommt zu einer Steigerung der Enzymaktivität um 100 %. Dies könnte man darauf zurückführen, dass eine Salzkonzentration von 150 mM ungefähr dem osmotischen Potenzial in der Zelle entspricht. Im Fall von NaCl konnte ein analoger Effekt beobachtet werden. Verwendet man eine NaCl Konzentration bis 75 mM, wird die Umsatzrate des Enzyms gesteigert, wobei Konzentrationen über 75 mM zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität führten. Bei einer NaCl Konzentration ab 250 mM ist das Protein vollständig inaktiviert.

Insgesamt kann man aus den Ergebnissen der biochemischen Charakterisierung der EctD Proteine schließen, dass deren biochemischen Parameter sehr ähnlich sind und nur geringfügig unterscheiden. Es konnte keine Hydroxylase ermittelt werden, die erheblich mehr oder schneller Ectoin zu Hydroxyectoin synthetisieren kann.

Um in weiteren Kristallstrukturanalysen auch das Substrat Ectoin bzw. das Produkt Hydroxyectoin detektieren zu können, sind die gewonnen Ergebnisse über die Ectoin-Hydroxylasen aus den verschiedenen Organismen sehr hilfreich. Als vielversprechend gelten die Ectoin-Hydroxylasen aus dem thermophilen Vertreter *Geobacillus sp.* Y412MC10 oder dem acidophilen Bakterium *A. cryptum*, da sich diese

EctD Enzyme als besonders robuste Proteine gezeigt haben. Selbst nach zweiwöchiger Lagerung bei 4°C konnte bei diesen Enzymen noch Aktivität gemessen werden, im Gegensatz zu den anderen gereinigten EctD Proteinen, die nach dieser Zeit inaktiv waren. Diese EctD Proteine werden daher in zukünftigen Kristallisationsscreenings eingesetzt, um eine EctD Struktur mit gebundenem Ectoin bzw. sein hydroxyliertes Derivat Hydroxyectoin erhalten zu können.

6.9 Das *ectD* Gen ist in “Bewegung“

Die bioinformatischen Analysen zu der Verbreitung des *ectD* Gens in Mikroorganismen zeigen, dass das für die Ectoin-Hydroxylase codierende Gen *ectD* in vielen unterschiedlichen Organismen vorkommt (Abbildung 26). Die Ectoin Produzenten mit der Fähigkeit zur Hydroxyectoin Synthese findet man hauptsächlich bei Vertretern aus dem Reich der Bacteria. Eine Ausnahme stellt bisher lediglich das Crenarchaeon *N. maritimus* dar. Dabei ist davon auszugehen, dass *N. maritimus* das Ectoin Gencluster durch horizontalen Gentransfer erhalten hat, da es mit dem Ozean als Habitat den gleichen Lebensraum mit vielen anderen Ectoin Produzenten, wie z.B. das Bakterium *Nitrosococcus oceani*, teilt.

Das Ectoin in Eukaryoten produziert wird, konnte bisher nicht beobachtet werden. Es gibt lediglich Hinweise darauf, dass bestimmte Domänenstrukturen, die Cupin-2-ähnlich und für eine Ectoin Synthase charakteristisch sind, in dem Lanzettfisch *Branchiostoma floridae* vorkommen. Nach einer Blast-Suche mit der EctD Proteinsequenz von *V. salexigens* auf Eukarya, findet man in *B. floridae* ein putatives uncharakterisiertes Protein (Accession: C3Z6Y8), das eine Identität von 39% zu der Proteinsequenz von EctD hat. Zudem besitzt dieses Protein, das oben beschriebene Konsensusmotiv. Daher könnte es sein, dass auch Eukaryoten Ectoin bzw. Hydroxyectoin synthetisieren können.

Die Position des *ectD* Gens ist in den Genomen der verschiedenen Organismen überwiegend gleich organisiert. In 70% der Fälle kommt es direkt im *ect*-Cluster neben dem *ectC* Gen assoziiert vor. Es kann sich aber auch isoliert an einer anderen Stelle im Genom befinden. Zudem existieren auch Mischformen, in denen *ectC* und *ectD* in direkter Nachbarschaft isoliert im Genom vorkommen, wie z.B. bei dem Bakterien *Streptomyces flavovogriseus* und *Leptospirillum rubarum* (Abbildungen 43, 44 und 45).

Wie bereits erwähnt, ist in 69 der 98 *ect*-Cluster mit einer Ectoin-Hydroxylase das *ectD* Gen hinter dem *ectABC* Cluster lokalisiert (Abbildungen 43, 44 und 45). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass es bei einem möglichen horizontalen Gentransfer

überwiegend zu einem Austausch des kompletten *ect*-Cluster mit der Hydroxylase kommt.

Die häufigsten Vertreter der Bacteria mit einem *ectD* Gen sind die Actinobacteria (47%). Dann folgen die γ -Proteobacteria (23%), die α -Proteobacteria (11%), die β -Proteobacteria (10%), die Firmicutes (4%), die Planctomyceten (3%), die Nitrospira (1%) und die Crenarchaeota (1%). Die Identitäten zwischen den EctD Sequenzen lagen im Vergleich zu EctD aus *V. salaxigens* bei 72% bis 38%. Auffällig dabei ist, dass die meisten Actinobacteria die gleiche Organisation des *ect*-Genclusters aufweisen. Der *ect*-Cluster wird häufig durch ein Gen, das für ein hypothetisches Protein sowie einem *aspC* Gen, das für eine Aminotransferase codiert, flankiert (Abbildungen 43, 44 und 45). Diese Tatsache könnte so erklärt werden, dass das *aspC* Gen, das für eine Aspartat-Aminotransferase codiert, eine vergleichbare Optimierung der Ectoin Synthese darstellen könnte, wie das *ask* Gen, welches sich ebenfalls im *ect*-Cluster befindet. AspC kann aus dem Vorläufer L-Aspartat unter Verbrauch von 2-Oxoglutarat zu Oxalacetat das für die Ectoin Synthese benötigte Glutamat synthetisieren (Abbildung 54).

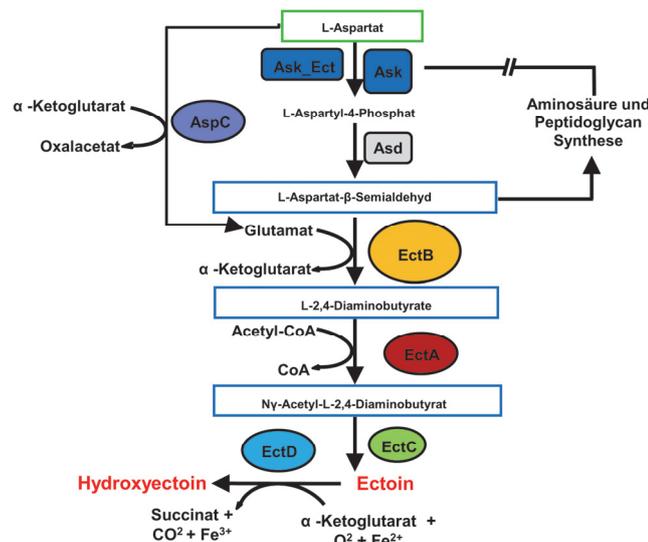


Abbildung 54: Modifiziertes Schema der Ectoin und Hydroxyectoin Synthese.

Durch bioinformatische Analysen der *ect* Gencluster, konnte neben dem *ask* Gen für die Aspartokinase auch ein *aspC* Gen für eine Aminotransferase ermittelt werden.

Diese Überlegung wird gestützt durch die Beobachtungen, dass der Anteil an Ectoin durch Zugabe von Glutamat ins Medium erhöht werden kann (Prof. E. Bremer, pers. Mitteilung). Ob AspC zu einer erhöhten Produktion von Ectoin führen kann, müsste durch Untersuchungen bestätigt werden. Wie man aus Abbildung 54 erkennen kann, könnte durch AspC eine Art Feedback Loop entstehen, durch den Glutamat für das Protein EctB gebildet wird. Glutamat könnte dann wiederum als Co-Substrat zu 2-

Oxoglutarat umgeformt werden. Das 2-Oxoglutarat könnte entweder als Co-Substrat für AspC dienen oder bei der Ectoin Hydroxylierung durch EctD verwendet werden.

Interessanterweise tritt dieses zusätzliche AspC Protein nur in den *ect*-Clustern der Streptomyceten auf. Demnach könnte diese Zusammensetzung des Ectoin Syntheseclusters eine Besonderheit innerhalb dieser Klasse der Bakterien darstellen.

6.10 Der Flaschenhals bei der Ectoin und Hydroxyectoin Synthese

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Ectoin Synthese von ausreichend Vorläufersubstraten abhängig ist (Bestvater *et al.*, 2008). Für molare Konzentrationen an Ectoin werden auch molare Konzentrationen der Vorläufersubstrate benötigt. Das wichtigste Ausgangsmolekül für die Ectoin Biosynthese ist L-Aspartat, das durch eine Aspartokinase (Ask) zu β -Aspartyl-Phosphat und dann durch eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Asd) zum Ectoin-Vorläufersubstrat β -Aspartat-Semialdehyd synthetisiert wird. Bei der Synthese von β -Aspartyl-Phosphat durch Ask kann es zu einem Flaschenhals bei der Ectoin Synthese kommen, da die Aspartokinasen häufig durch ihre Produkte Feedback reguliert sind und durch eine zu hohe Konzentration ihrer Produkte inhibiert werden.

Durch bioinformatische Analysen konnten im Reich der Bacteria Vertreter identifiziert werden, die zwei *ask* Gene im Genom codieren. In diesen Vertretern wie zum Beispiel *P. stutzeri* A1501, befindet sich zusätzlich zum *ask* Gen im *ect*-Gencluster ein weiteres Aspartokinase codierendes Gen im Genom (Abbildungen 43, 44 und 45). Dabei ist davon auszugehen, dass die Aspartokinase im *ect*-Gencluster für die Ectoin Synthese optimiert ist. Aspartokinasen unterliegen in den verschiedenen Organismen einer strengen Kontrolle (Kanapathipillai *et al.*, 2008; Reshetnikov *et al.*, 2006). Diese ist zum einen die transkriptionelle Regulation und zum anderen die direkte allosterische Hemmung durch bestimmte Aminosäuren. Dies lässt sich damit erklären, dass β -Aspartat-Semialdehyd ein wichtiges Vorläufersubstrat für bestimmte Aminosäuren, wie Methionin, Lysin und Threonin und wichtige Moleküle des Zellwandaufbaus wie meso-Diamino-Pimelinsäure und Dipicolinsäure darstellt. Damit immer nur so viel Vorläufersubstrat wie nötig produziert wird, müssen Schlüsselenzyme kontrolliert werden. Unter diese Kontrolle fällt unter anderem die Aspartokinase.

Um die zwei Aspartokinasen aus einem Organismus näher zu untersuchen, fiel die Wahl auf das Bakterium *P. stutzeri* A1501. *P. stutzeri* A1501 besitzt eine Aspartokinase im Genom, die als LysC bezeichnet wird, und einer zweiten, die sich direkt im *ect*-Gencluster nach *ectD* befindet und als Ask_Ect bezeichnet wurde (Abbildung 9). Die beiden *ask* Gene wurden aus *P. stutzeri* A1501 amplifiziert und in die Expressionsvektoren pASK-IBA3 bzw. pASG-IBA3 kloniert. Dadurch konnten die beiden Aspartokinasen in *E. coli* heterolog produziert und durch anschließende *Strep*-tag Affinitätschromatographie gereinigt werden. Durch enzymatische Aktivitätstests konnten die Aktivität der Aspartokinasen und deren biochemischen Parameter bestimmt werden. Für Ask_LysC wurde ein K_m von $21,6 \pm 2,6$ mM für das Substrat L-

Aspartat und ein v_{\max} von $5,1 \pm 0,1$ U/mg bestimmt. Für die Aspartokinase Ask_Ect wurde ein K_m von $29,7 \pm 2,5$ mM und ein v_{\max} von $6,9 \pm 0,2$ U/mg gemessen. Prinzipiell kann man feststellen, dass sich diese beiden biochemischen Parameter im gleichen Bereich befinden und nur geringfügige Unterschiede aufweisen. Diese rekombinanten Proteine dienen der Grundlage für die weitere Charakterisierung dieser beiden Enzyme.

Um zu ermitteln, warum Bakterien mehrere Aspartokinasen besitzen und welche Substrate allosterisch die Funktion der beiden Proteine inhibieren, wurden umfangreiche Inhibierungsstudien mit verschiedenen Aminosäuren, die dem Aktivitätstest hinzugegeben wurden, durchgeführt (Stöveken *et al.* 2011). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe der Aminosäuren Alanin, Glycin, Isoleucin oder Methionin zu keinen signifikanten Aktivitätsverlusten führten. Bei der Zugabe von Threonin kam es zur deutlichen Hemmung beider Aspartokinasen. Bei der Ask_LysC Aspartokinase führte eine Mischung der Aminosäuren Lysin und Threonin zur stärksten Inhibierung des Enzyms (Stöveken *et al.* 2011). Demnach konnte eine ähnliche allosterische Regulation wie bei der Aspartokinase aus *Corynebacterium glutamicum* beobachtet werden (Yoshida *et al.*, 2009). Neu ist jedoch, dass die allosterische Hemmung durch Threonin in Kombination von Lysin verstärkt werden konnte. Durch weiterführende Versuche, die Aspartokinase Ask_Ect durch Mutagenesestudien so zu verändern, dass die allosterische Hemmung aufgehoben wird, könnte zu einer erhöhten Konzentration von Ectoin in der Zelle bei hohen Salinitäten führen. Dabei könnten die bereits gewonnenen Ergebnisse aus Studien mit Aspartokinasen in diese Mutagenesestudie miteinfließen (Hamano *et al.*, 2007; Schrumpf *et al.*, 1992). Die Mutagenese bestimmter Bereiche in den Aspartokinasen, führte dabei zum Verlust der allosterischen Hemmung. Dadurch könnten eventuell auftretende Engpässe während der Ectoin bzw. Hydroxyectoin Synthese umgangen und eventuell zu deutlich höheren Ausbeuten bei der Produktion von Ectoin bzw. Hydroxyectoin erzielt werden. Die Ergebnisse aus den Versuchen, in denen das *ect*-Gencluster mit und ohne *ask* in *E. coli* transferiert wurden und die synthetisierte Menge an Ectoin verglichen wurden, zeigten, dass mit Hilfe der Aspartokinase Ask_Ect 5 mal mehr Ectoin/Hydroxyectoin produziert werden kann (Stöveken *et al.* 2011). Dies untermauert die Hypothese, dass die Aspartokinasen in den *ect*-Clustern dazu beitragen, deutlich mehr der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin zu synthetisieren.

6.11 Hydroxyectoin als Hitzeprotektivum

Physiologische Untersuchungen unter hohen osmolaren Bedingungen in Kombination mit hohen Temperaturen mit den Bakterien *Chromohalobacter salexigens* und *S. coelicolor* A3(2) zeigten, dass Ectoin und Hydroxyectoin sehr effektive kompatible Solute sind, die den Bakterien auch zu thermoprotektiven Eigenschaften verhelfen (Bursy *et al.*, 2008; Garcia-Esteba *et al.*, 2006). Des Weiteren ist auffällig, dass Bakterien mit extremen Habitaten oftmals in der Lage sind, Hydroxyectoin zu produzieren. In Zusammenhang mit der Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase aus *S. coelicolor* wurde durch Wachstumsversuche untersucht, ab welcher NaCl Konzentration *S. coelicolor* nicht mehr in der Lage ist, ohne Zusatz von kompatiblen Soluten zu wachsen (Bursy *et al.*, 2008). Durch diese Salztoleranz-Experimente konnte eine kritische Salzkonzentration von 1,2 M NaCl ermittelt werden, bei der nur noch geringes Wachstum gemessen werden konnte (Bursy *et al.*, 2008). Wird dem Medium Ectoin, Hydroxyectoin oder beide kompatiblen Solute im 1:1 Mischungsverhältnis zugefügt, so kann *S. coelicolor* höhere Salzkonzentrationen tolerieren und wieder wachsen. Hervorzuheben ist dabei, dass das Gemisch beider kompatiblen Solute die beste Protektion bei hoher Salinität lieferte. Setzt man *S. coelicolor* zusätzlich zu einer hohen Salinität einer erhöhten Temperatur von 39°C aus, konnte dieselbe Protektion durch die Mischung beider kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin beobachtet werden. Vereint man demnach die beiden Stressfaktoren, so lässt sich aus den Ergebnissen dieser Experimente schließen, dass Ectoin und Hydroxyectoin als Hitzeprotektiva wirken (Bursy *et al.*, 2008). Den besten Schutz zeigte hier wiederum die Kombination von Ectoin und Hydroxyectoin in einem 1:1 Verhältnis. Die Hydroxylierungsreaktion von Ectoin zu Hydroxyectoin in Mikroorganismen scheint daher neben der Salztoleranz auch etwas mit ihrer Temperaturanpassung zu tun zu haben.

Bei der Untersuchung, wann die Aufnahme der beiden kompatiblen Solute in *S. coelicolor* induziert wird, fiel auf, dass bei einer hohen Salzkonzentration eine hohe Aufnahme festzustellen ist. Jedoch führte die erhöhte Temperatur von 39°C zu einer vermehrten Aufnahme von Ectoin, die schließlich in Kombination der beiden Stressbedingungen am höchsten war. Die Beobachtung, dass durch eine erhöhte Temperatur mehr Ectoin und Hydroxyectoin in die Zelle transportiert wird, zeigt, wie wichtig die kompatiblen Solute bei schädigenden Temperaturen für die Zelle sind. *S. coelicolor* ist unter diesen Bedingungen selbst nicht mehr in der Lage durch *de novo* Synthese genügend Ectoin und Hydroxyectoin zu bilden. Dies zeigt die lange lag Phase des Wildtyps unter diesen Stressbedingungen, wenn keine kompatiblen Solute

ins Medium gegeben wurden (Abbildung 49). Somit führt wahrscheinlich die Kombination aus der Aufnahme von Ectoin und von der Zelle synthetisiertem Ectoins und Hydroxyectoins zum besten Schutz.

Die Sinnhaftigkeit, warum Bakterien für die Hydroxylierung von Ectoin zusätzliche Energie investieren, der den Zellen in Bezug auf den osmotischen Schutz keinen Vorteil verschafft, scheint durch diese Ergebnisse klarer zu werden. Denn um den hohen osmotischen Druck der Umgebung zu tolerieren, würde es ausreichen, nur das kompatible Solut Ectoin zu synthetisieren. Hydroxyectoin hat in Bezug auf den osmotischen Schutz die gleichen Eigenschaften wie Ectoin. Möglicherweise ist die Mischung der beiden kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin das Geheimnis der Existenz der Ectoin-Hydroxylase. Dabei könnte man sich vorstellen, dass Ectoin und Hydroxyectoin zwar als gute Osmoprotektiva wirken, aber das Spektrum der protektiven Eigenschaften mit Hilfe der Ectoin-Hydroxylase EctD durch die kleine chemische Veränderung des Ectoins durch einen zusätzlichen Sauerstoff am C5 Atom des Ectoins deutlich erweitert werden kann. Es ist bekannt, dass Ectoin und Hydroxyectoin vorteilhaft für den gesamten Zellapparat der Mikroorganismen sind (Graf *et al.*, 2008; Lentzen & Schwarz, 2006; Lippert & Galinski, 1992b). DNA und Proteine werden nicht nur bei osmotischen Ungleichgewichten, sondern auch bei hohen Temperaturschwankungen stabilisiert.

Wahrscheinlich konnten sich Bakterien durch den zusätzlichen Erwerb einer Ectoin- Hydroxylase an besonders hohe Temperaturen anpassen. Es ist auch vorstellbar, dass die Transkription von Genen für stressprotektive Chaperone mit einem Anstieg der Hydroxyectoinkonzentration induziert wird. Hydroxyectoin könnte demnach bei hohen Temperaturen als Signal wirken und dadurch verhindern, dass Proteine denaturieren. Dies konnte zum Beispiel bei der Akkumulation niedriger Konzentrationen von Glycin Betain in *E. coli* beobachtet werden, was dazu führte, dass das gesamte molekulare Chaperon System aktiviert wird (Diamant *et al.*, 2003).

Die Existenz der extremophilen Bakterien, wie dem extremophilen Bakterium *Geobacillus sp.* Y412MC10, das in Habitaten bis 90°C leben kann, sowie dem kälteangepassten Bakterium *Sphingopyxis alaskensis*, das Habitate mit besonders niedrigen Temperaturen bewohnt (4° - 8°C) (Vancanneyt *et al.*, 2001), könnte durch die Fähigkeit zur Hydroxyectoin Synthese erklärt werden. Hydroxyectoin könnte dazu beizutragen, dass Proteine bei höheren Temperaturen nicht so schnell denaturiert werden bzw. unter kalten Temperaturen noch funktionieren. Interessant dabei ist auch, dass die Ectoin-Hydroxylase unabhängig vom jeweiligen Organismus relativ hohe Temperaturen toleriert (5.5.1). Die gereinigte Ectoin-Hydroxylase aus *S. coelicolor* mit

dem Temperaturoptimum von 32°C zeigt selbst bei Temperaturen von 60°C noch Enzymaktivität (Bursy *et al.*, 2008).

Welchen Einfluss der Verlust des *ectD* Gens bzw. des gesamten *ect*-Gencluster in *S. coelicolor* auf das Wachstum in Bezug auf hohe Salinität und hoher Temperatur hätte, müsste durch Mutationsstudien geklärt werden.

6.12 Ausblick

Die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin sind nicht nur für die Bakterien nützliche kompatible Solute, sondern haben auch für den Menschen nutzbringende Eigenschaften. Sie werden daher in Hautpflegeprodukten und Medizinprodukten eingesetzt (Graf *et al.*, 2008; Kanapathipillai *et al.*, 2005; Kanapathipillai *et al.*, 2008; Lentzen & Schwarz, 2006). Daher ist das biotechnologische Interesse hoch, Bakterien zu finden, die in der Lage sind, große Mengen an Ectoin und/oder Hydroxyectoin zu produzieren.

Im Bereich der Medizinprodukte gibt es mittlerweile eine Vielzahl an Produkten mit Ectoin, wie z.B. spezielle Cremes gegen Neurodermitis. Außerdem werden zurzeit Inhalationssprays mit Ectoin bei Patienten mit Lungenentzündungen erprobt. Ob die Einnahme bzw. das Inhalieren bei bestimmten Lungen-Erkrankungen das Mittel der Wahl ist, bleibt abzuwarten. Durch die bioinformatischen Analysen von Ectoin Produzenten konnten einige pathogene Vertreter identifiziert werden. Darunter auch einige Bakterien, die für Erkrankungen der Atemwege verantwortlich sind, wie *Bordetella parapertussis* oder *Bordetella bronchiseptica* RB50. Diese Bakterien könnten durch die Einnahme von Ectoin bzw. Hydroxyectoin eine positive Selektion erfahren, was für den jeweiligen Patienten katastrophale Auswirkungen haben könnte. Man würde zwar versuchen, den Entzündungsprozess zu lindern, aber auch den pathogenen Bakterien die Möglichkeit liefern, Ectoin als kompatibles Solut oder Nahrungsquelle zu nutzen und zu deren Vermehrung beizutragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Hitzeprotektion von Ectoin in *S. coelicolor*, könnten zu weiteren neuen Einsatzgebieten bei der Entwicklung neuer Präparate führen. Es wäre denkbar, Hydroxyectoin in Brandsalben einzusetzen und somit der Haut zu einer schnelleren Heilung zu verhelfen.

Für die Optimierung von Produktionsprozessen bei der Ectoingewinnung könnten die Arbeiten an den Aspartokinasen aus *P. stutzeri* A1501, die an der Ectoinsynthese beteiligt sind, hilfreich sein. In den Inhibierungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Asks durch bestimmte Aminosäuren inhibiert werden. Durch gezielte Mutagenesen von Ask_Ect könnte die allosterische Kontrolle der Aspartokinase entfernt werden. Dadurch könnte eventuell mehr Vorläufersubstrat für die Ectoin Synthese generiert werden und somit die Ectoinausbeute gesteigert werden.

Es bleibt jedoch weiterhin die Frage offen, ob es möglich ist, mehr Ectoin zu gewinnen, wenn in das Ectoin-Gencluster das *asd* Gen für das Asd Enzym sowie das *aspC* Gen, das für eine Aspartat Aminotransferase codiert, im Rahmen eines

synthetisch aufgebauten Clusters inseriert werden würde. Es wäre ebenfalls denkbar, stärkere Promotoren vor das *ect*-Cluster zu positionieren und damit eine zusätzliche Steigerung der Ectoin Synthese zu erreichen. Hierbei stellt sich allerdings die Frage, wie hoch die maximale Kapazität von Ectoin bzw. Hydroxyectoin in der Zelle ist. Es wurde beobachtet, dass während der Ectoin/Hydroxyectoin Synthese immer ein gewisser Anteil der kompatiblen Solute im Medium detektierbar ist (Pittellkow & Bremer unveröffentlichte Daten). Die genauen Mechanismen dahinter liegen jedoch noch im Dunkeln. Auffällig ist jedoch, dass viele der Ectoin und Hydroxyectoin produzierenden Organismen ein Transportsystem für die beiden kompatiblen Solute besitzen. Somit könnte es zu einem permanenten Recycling zwischen den *de novo* produzierten und aufgenommenen kompatiblen Soluten kommen. Durch die übermäßige Synthese der kompatiblen Solute in der Zelle, könnte es ebenfalls zum Anstieg des Turgors kommen, der durch diese speziellen Transportsysteme oder durch mechanosensitive Kanäle reguliert wird.

Ein interessanter Vertreter aus dem Reich der Bacteria mit potentiellen Ectoin Synthese Genen ist das Actinobakterium *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736. Bei der genaueren Betrachtung des *ect*- Genclusters fiel auf, dass dieses Bakterium zwei komplette *ect*-Gencluster inklusive *ectD* sowie Gene für ein Ectoin Transportsystem besitzt. Dies ist insofern interessant, als das dieses Bakterium durch den Besitz von zwei vollständigen *ect*-Genclustern vielleicht erheblich mehr Ectoin und Hydroxyectoin produzieren könnte. Ob das wirklich der Fall ist, müsste zunächst in physiologischen Versuchen unter hohen Salinitäten untersucht werden.

7 Literatur

- 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.
- 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.
- 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.
- Bartens, W. (2001).** "Forever young": Bakterien aus einem Wüstensee sollen die menschliche Haut vor Sonne und Wassermangel schützen. *Die Zeit* **41**.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga & other authors (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- Bestvater, T., P. Louis und E. A. Galinski (2008).** Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Systems* **4**, 12.
- Black, S. und N. G. Wright (1955).** beta-Aspartokinase and beta-aspartyl phosphate. *J Biol Chem* **213**, 27-38.
- Blasiak, L. C., F. H. Vaillancourt, C. T. Walsh und C. L. Drennan (2006).** Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis. *Nature* **440**, 368-371.
- Booth, I. R., M. D. Edwards, S. Black, U. Schumann und S. Miller (2007).** Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nat Rev Microbiol* **5**, 431-440.
- 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.
- 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**, 248-254.
- Branden, C. und J. Tooze (1999).** The jelly roll barrel is usually divided into two sheets, pp. 77-78. New York, USA: Garland Publishing Inc.
- Bremer, E. und R. Krämer (2000).** Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In *Bacterial stress responses* pp. 79 - 97. Edited by G. Storz & R. Hengge-Aronis. Washington, DC, USA ASM Press.
- Brown, A. D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**, 803-846.
- Bursy, J. (2005).** Osmotisch regulierte Biosynthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in *Salibacillus salexigens*: Biochemische Charakterisierung der Ectoin-Hydroxylase EctD und Identifizierung ihres Strukturgenes. In *Fachbereich Biologie*, pp. 179. Marburg: Philipps-Universität Marburg.
- Bursy, J., A. J. Pierik, N. Pica und E. Bremer (2007).** Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J Biol Chem* **282**, 31147-31155.
- Bursy, J., A. U. Kuhlmann, M. Pittelkow, H. Hartmann, M. Jebbar, A. J. Pierik und E. Bremer (2008).** Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7286-7296.
- Canovas, D., N. Borges, C. Vargas, A. Ventosa, J. J. Nieto und H. Santos (1999).** Role of N-gamma-acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3774-3779.

- 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.
- 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., M. A. McDonough, D. Ehrismann, N. J. Kershaw, N. Granatino und C. J. Schofield (2006). Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded beta-helix fold proteins. *J Inorg Biochem* **100**, 644-669.
- Cohen, G. N. und I. Saint-Girons (1987). Biosynthesis of threonine, lysine, and methionine. In *In Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, pp. 429-444. Edited by J. L. I. F. C. Neidhardt, K. Brooks Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington, DC: American Society of Microbiology.
- Coquelle, N., R. Talon, D. H. Juers, E. Girard, R. Kahn und D. Madern (2010). Gradual adaptive changes of a protein facing high salt concentrations. *J Mol Biol* **404**, 493-505.
- Costas, M., M. P. Mehn, M. P. Jensen und J. L. Que (2004). Dioxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates. *Chemical Reviews* **104**, 939-986.
- 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.
- 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.
- Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle und J. Chen (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 317-364.
- 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.
- Elkins, J. M., M. J. Ryle, I. J. Clifton, J. C. D. 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.
- 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.
- Flashman, E. und C. J. Schofield (2007). The most versatile of all reactive intermediates? *Nat Chem Biol* **3**, 86-87.
- Galinski, E. A., H. P. Pfeiffer und H. G. Truper (1985). 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem* **149**, 135-139.
- Galinski, E. A. (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interactions, stress protection. *Experientia* **49**, 487-496.
- 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. Arahall, 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.
- Garcia-Esteva, R., M. Argandona, M. Reina-Bueno, N. Capote, F. Iglesias-Guerra, J. J. Nieto und C. Vargas (2006). The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Bacteriol* **188**, 3774-3784.

- 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.
- Graf, R., S. Anzali, J. Buenger, F. Pfluecker und H. Driller (2008).** The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin Dermatol* **26**, 326-333.
- Grant, W. D. (2004).** Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 1249-1266.
- Hamano, Y., I. Nicchu, T. Shimizu, Y. Onji, J. Hiraki und H. Takagi (2007).** epsilon-Poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*, has feedback-inhibition resistant aspartokinase. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 873-882.
- Hanuske-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.
- Hanekop, N., M. Hoing, L. Sohn-Bosser, M. Jebbar, L. Schmitt und E. Bremer (2007).** Crystal structure of the ligand-binding protein EhuB from *Sinorhizobium meliloti* reveals substrate recognition of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine. *J Mol Biol* **374**, 1237-1250.
- Hausinger, R. P. (2004).** Fell/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**, 21-68.
- Hegg, E. L. und J. L. Que (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.
- Helmetag, V., S. A. Samel, M. G. Thomas, M. A. Marahiel und L. O. Essen (2009).** Structural basis for the erythro-stereospecificity of the L-arginine oxygenase VioC in viomycin biosynthesis. *FEBS J* **276**, 3669-3682.
- 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.
- Hoefl, S. E., J. S. Blum, J. F. Stolz, F. R. Tabita, B. Witte, G. M. King, J. M. Santini und R. S. Oremland (2007).** *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 504-512.
- Hoffmann, T. und E. Bremer (2011).** Protection of *Bacillus subtilis* against Cold Stress via Compatible-Solute Acquisition. *J Bacteriol* **193**, 1552-1562.
- Holm, L. und C. Sander (1996).** Mapping the protein universe. *Science* **273**, 595-603.
- Holtmann, G. und E. Bremer (2004).** Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol* **186**, 1683-1693.
- Hopwood, D. A. (1967).** Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol Rev* **31**, 373-403.
- Hopwood, D. A. (2007).** *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. *Oxford University Press, Oxford, United Kingdom*.
- Inbar, L. und A. Lapidot (1988).** The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ¹³C- and ¹⁵N-labeled L-glutamate and ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **263**, 16014-16022.
- 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.
- 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.
- 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**.
- Kanapathipillai, M., G. Lentzen, M. Sierks und C. B. Park (2005).** Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. *FEBS Lett* **579**, 4775-4780.
- Kanapathipillai, M., S. H. Ku, K. Girigoswami und C. B. Park (2008).** Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 808-813.
- 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.
- 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).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**, 319-330.
- 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.
- Kolp, S., M. Pietsch, E. A. Galinski und M. Gutschow (2006).** Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 1234-1242.
- Koski, M. K., R. Hieta, C. Bollner, K. I. Kivirikko, J. Myllyharju und R. K. Wierenga (2007).** The active site of an algal prolyl 4-hydroxylase has a large structural plasticity. *J Biol Chem* **282**, 37112-37123.
- 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 (2008a).** Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenicus* is triggered by high salinity and low growth temperature. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4560-4563.
- Kuhlmann, S. I., A. C. Terwisscha van Scheltinga, R. Bienert, H. J. Kunte und C. Ziegler (2008b).** 1.55 Å structure of the ectoine binding protein TeaA of the osmoregulated TRAP-transporter TeaABC from *Halomonas elongata*. *Biochemistry* **47**, 9475-9485.
- 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.
- Küsel, K., T. Dorsch, G. Acker und E. Stackebrandt (1999).** Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3633-3640.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lauro, F. M., D. McDougald, T. Thomas & other authors (2009).** The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15527-15533.
- 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.
- Lecher, J., M. Pittelkow, S. Zobel, J. Bursy, T. Bonig, S. H. Smits, L. Schmitt und E. Bremer (2009).** The crystal structure of UehA in complex with ectoine-A comparison with other TRAP-T binding proteins. *J Mol Biol* **389**, 58-73.

- 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**, 18290-18295.
- Lentzen, G. und T. Schwarz (2006). Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 623-634.
- Letunic, I. und P. Bork (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* **23**, 127-128.
- Lippert, K. und E. A. Galinski (1992a). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 61-65.
- Lippert, K. und E. A. Galinski (1992b). Enzyme stabilisation by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 61 - 65
- Lo, C. C., C. A. Bonner, G. Xie, M. D'Souza und R. A. Jensen (2009). Cohesion group approach for evolutionary analysis of aspartokinase, an enzyme that feeds a branched network of many biochemical pathways. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 594-651.
- Lovenberg, W., B. B. Buchanan und J. C. Rabinowitz (1963). Studies on the Chemical Nature of Clostridial Ferredoxin. *J Biol Chem* **238**, 3899-3913.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram & other authors (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**, 1363-1371.
- 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.
- Matthews, M. L., C. S. Neumann, L. A. Miles, T. L. Grove, S. J. Booker, C. Krebs, C. T. Walsh und J. M. Bollinger, Jr. (2009). Substrate positioning controls the partition between halogenation and hydroxylation in the aliphatic halogenase, SyrB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17723-17728.
- McDonough, M. A., K. L. Kavanagh, D. Butler, T. Searls, U. Oppermann und C. J. Schofield (2005). Structure of human phytanoyl-CoA 2-hydroxylase identifies molecular mechanisms of refsum disease. *J Biol Chem* **280**, 41101-41110.
- 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.
- 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 manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mustakhimov, Il, A. S. Reshetnikov, A. S. Glukhov, V. N. Khmelenina, M. G. Kalyuzhnaya und Y. A. Trotsenko (2010). Identification and characterization of EctR1, a new transcriptional regulator of the ectoine biosynthesis genes in the halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *J Bacteriol* **192**, 410-417.
- 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.
- Peters, P., E. A. Galinski und H. G. Trüper (1990). The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**, 157-162.
- Phan, T. T. und W. Schumann (2009). Transcriptional analysis of the lysine-responsive and riboswitch-regulated lysC gene of *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **59**, 463-468.
- Pittelkow, M. und E. Bremer (2011). Cellular adjustments of *Bacillus subtilis* and other Bacilli to fluctuating salinities. In: *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*. Edited by A. Ventosa, A. Ohren & Y. Ma. Heidelberg: Springer.

- 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.
- Purpero, V. und G. R. Moran (2007).** The diverse and pervasive chemistries of the alpha-keto acid dependent enzymes. *J Biol Inorg Chem* **12**, 587-601.
- Que, L., Jr. (2000).** One motif--many different reactions. *Nat Struct Biol* **7**, 182-184.
- Reshetnikov, A. S., V. N. Khmelenina und Y. A. Trotsenko (2006).** Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph "*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z". *Arch Microbiol* **184**, 286-297.
- Reuter, K., M. Pittelkow, J. Bursy, A. Heine, T. Craan und E. Bremer (2010).** Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD. *PLoS one* **5**, e10647.
- Rhodes, M. E., S. T. Fitz-Gibbon, A. Oren und C. H. House (2010).** Amino acid signatures of salinity on an environmental scale with a focus on the Dead Sea. *Environ Microbiol* **12**, 2613-2623.
- Ryle, M. J. und R. P. Hausinger (2002).** Non-heme iron oxygenases. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 193-201.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989).** Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor N.Y. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sauer, T. und E. A. Galinski (1998).** Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* **59**, 128.
- Schrumpf, B., L. Eggeling und H. Sahl (1992).** Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 566-571.
- Schwibbert, K., A. Marin-Sanguino, I. Bagyan & other authors (2010).** A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *Environ Microbiol*.
- Severin, J., A. Wohlfart und E. A. Galinski (1992).** The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**, 1629-1638.
- 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 & other authors (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.
- Strieker, M., F. Kopp, C. Mahlert, L. O. Essen und M. A. Marahiel (2007).** Mechanistic and structural basis of stereospecific C β -hydroxylation in calcium-dependent antibiotic, a daptomycin-type lipopeptide. *ACS Chem Biol* **2**, 187-196.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin und D. G. Higgins (1997).** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Trotsenko, Y. A. und V. N. Khmelenina (2002).** Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch Microbiol* **177**, 123-131.
- Valegard, K., A. C. v. Scheltinga, M. D. Lloyd & other authors (1998).** Structure of a cephalosporin synthase. *Nature* **394**, 805-809.
- Valegard, K., A. C. T. v. 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.

- Vancanneyt, M., F. Schut, C. Snauwaert, J. Goris, J. Swings und J. C. Gottschal (2001).** *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 73-79.
- Vargas, C., M. Jebbar, R. Carrasco, C. Blanco, M. I. Calderon, F. Iglesias-Guerra und J. J. Nieto (2006).** Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Appl Microbiol* **100**, 98-107.
- Ventosa, A., J. J. Nieto und A. Oren (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 504-544.
- Vreeland, R. H., C. D. Litchfield, Martin. und E. Elliot (1980).** *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **30**, 485-495.
- Waino, 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 Pt 2**, 821-831.
- Walker, C. B., J. R. de la Torre, M. G. Klotz & other authors (2010).** *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8818-8823.
- Welford, R. W., J. M. Kirkpatrick, L. A. McNeill, M. Puri, N. J. Oldham und C. J. Schofield (2005).** Incorporation of oxygen into the succinate co-product of iron(II) and 2-oxoglutarate dependent oxygenases from bacteria, plants and humans. *FEBS Lett* **579**, 5170-5174.
- 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.
- 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.
- Yang, C. G., C. Yi, E. M. Duguid, C. T. Sullivan, X. Jian, P. A. Rice und C. He (2008).** Crystal structures of DNA/RNA repair enzymes AlkB and ABH2 bound to dsDNA. *Nature* **452**, 961-965.
- Yoshida, A., T. Tomita, H. Kono, S. Fushinobu, T. Kuzuyama und M. Nishiyama (2009).** Crystal structures of the regulatory subunit of Thr-sensitive aspartate kinase from *Thermus thermophilus*. *FEBS J* **276**, 3124-3136.
- You, Z., S. Omura, H. Ikeda, D. E. Cane und G. Jogl (2007).** Crystal structure of the non-heme iron dioxygenase PtIIH in pentalenolactone biosynthesis. *J Biol Chem* **282**, 36552-36560.
- Zhang, J. J., F. M. Hu, N. Y. Chen und H. Paulus (1990).** Comparison of the three aspartokinase isozymes in *Bacillus subtilis* Marburg and 168. *J Bacteriol* **172**, 701-708.
- Zhang, Z., J. Ren, K. Harlos, C. H. McKinnon, I. J. Clifton und C. J. Schofield (2002).** Crystal structure of a clavamate synthase-Fe(II)-2-oxoglutarate-substrate-NO complex: evidence for metal centered rearrangements. *FEBS Lett* **517**, 7-12.
- Ziegler, C., E. Bremer und R. Kramer (2010).** The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol Microbiol* **78**, 13-34.

8 Anhang

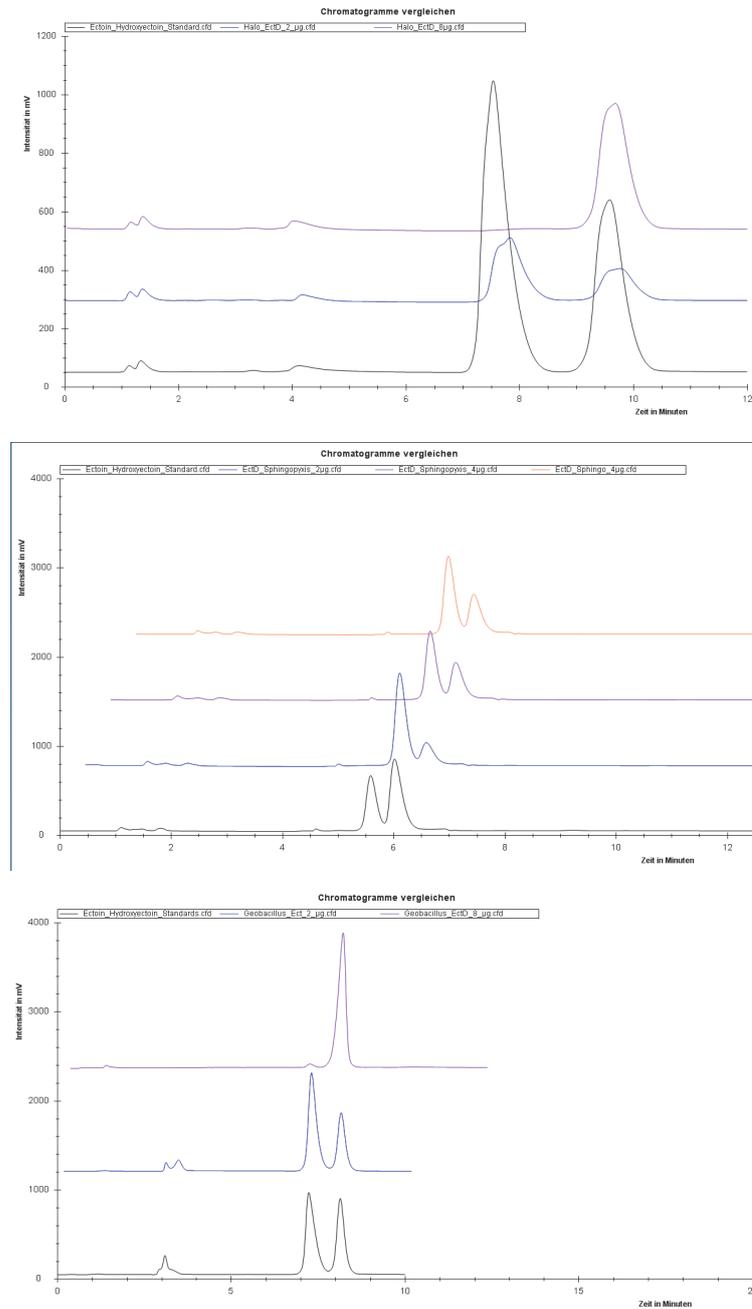


Abbildung 55: Chromatogramme der EctD Aktivitätsmessungen. Dargestellt sind die Chromatogramme der HPLC Analytik der EctD Proteine aus *H. elongata* (oben), *S. alaskensis* (Mitte) und *Geobacillus sp. Y412MC10*. Alle rekombinanten EctD Proteine wurde mit steigender Konzentration in den Enzymtest eingesetzt und anschließend die Ectoin Hydroxylierung ausgewertet. Reines Ectoin und Hydroxyectoin diente jeweils als Standard.

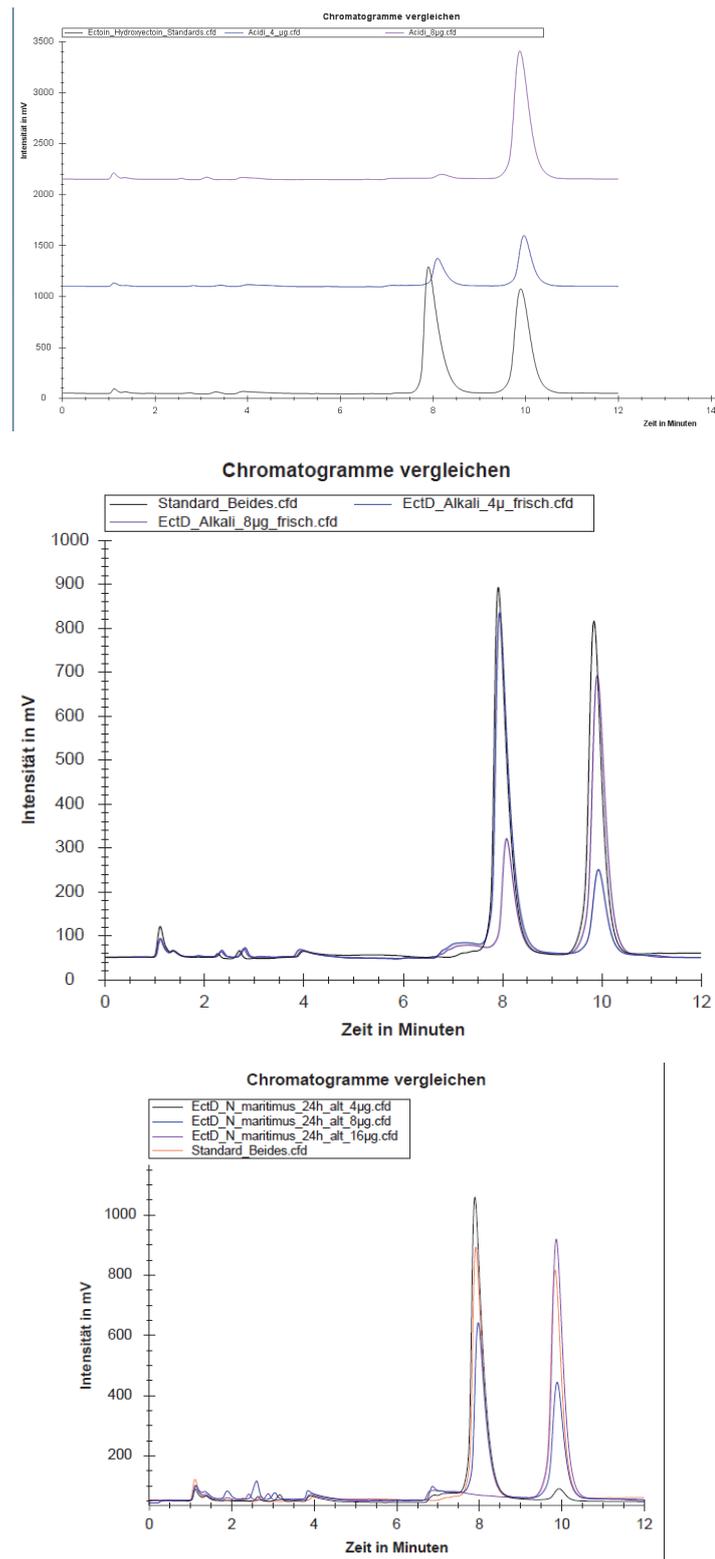


Abbildung 56: Chromatogramme der EctD Aktivitätsmessungen. Dargestellt sind die Chromatogramme der HPLC Analytik der EctD Proteine aus *A. cryptum* (oben), *A. ehrlichii* (Mitte) und *N. maritimus*. Alle rekombinanten EctD Proteine wurde mit steigender Konzentration in den Enzymtest eingesetzt und anschließend die Ectoin Hydroxylierung ausgewertet. Reines Ectoin und Hydroxyectoin diente jeweils als Standard.

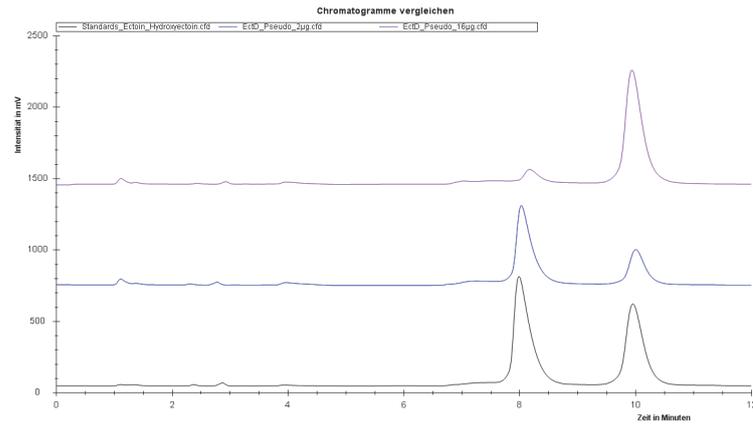


Abbildung 57: Chromatogramme der EctD Aktivitätsmessungen. Dargestellt ist das Chromatogramm der HPLC Analytik des EctD Proteins aus *P. stutzeri*.

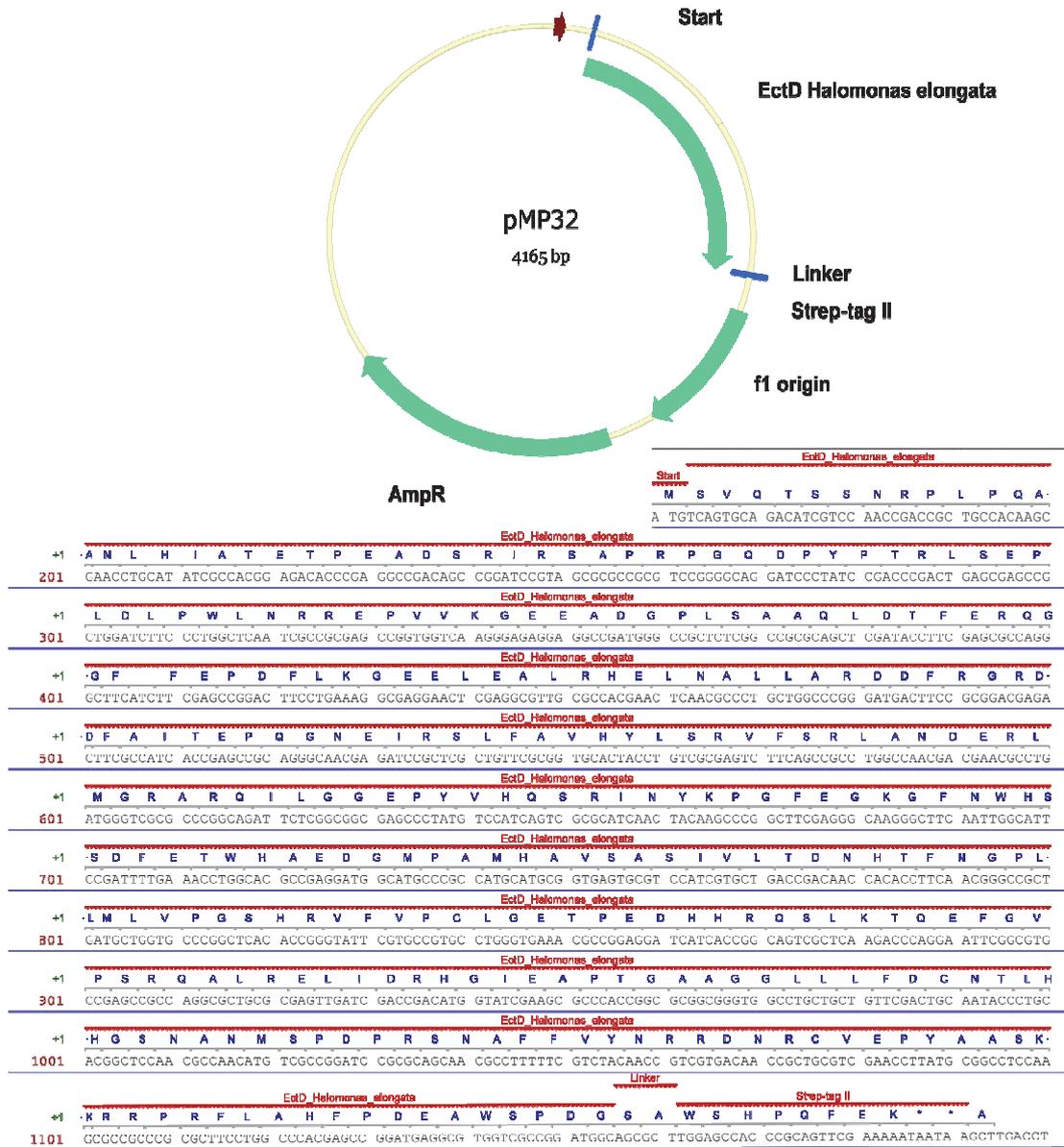


Abbildung 58: Expressionsplasmid pMP32. Der Vektor pMP32 ist ein Derivat des Vektors pASK-IBA3 (IBA, Göttingen) mit der inserierten *ectD* Sequenz aus *Halomonas elongata* und beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen *Strep-tag* an das gewünschte Protein zu fusionieren.

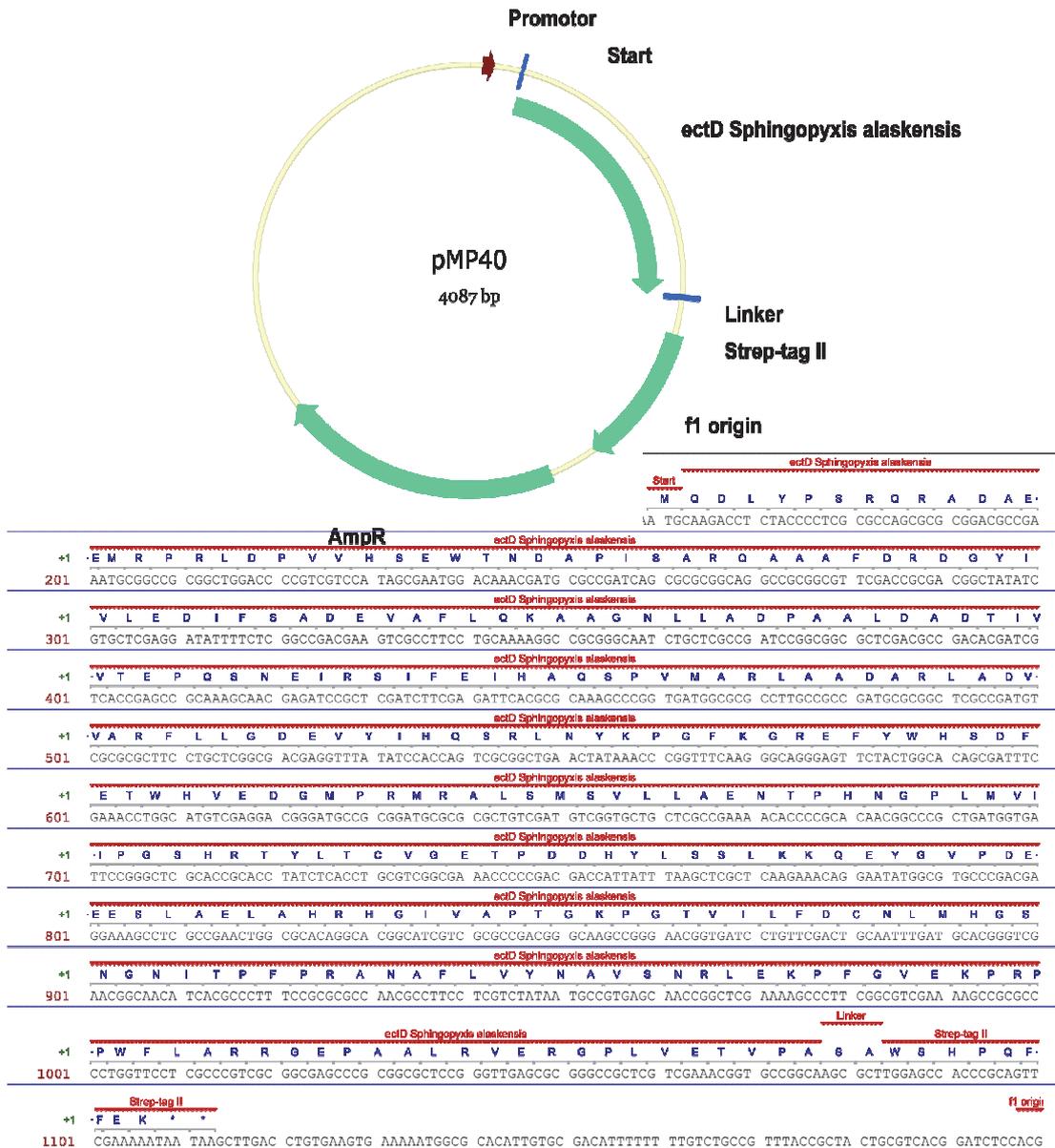


Abbildung 59: Expressionsplasmid pMP40. Der Vektor pMP40 ist ein Derivat des Vektors pASK-IBA3 (IBA, Göttingen) mit der inserierten *ectD* Sequenz aus *Shingopyxis alaskensis* und beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen *Strep-tag* an das gewünschte Protein zu fusionieren.

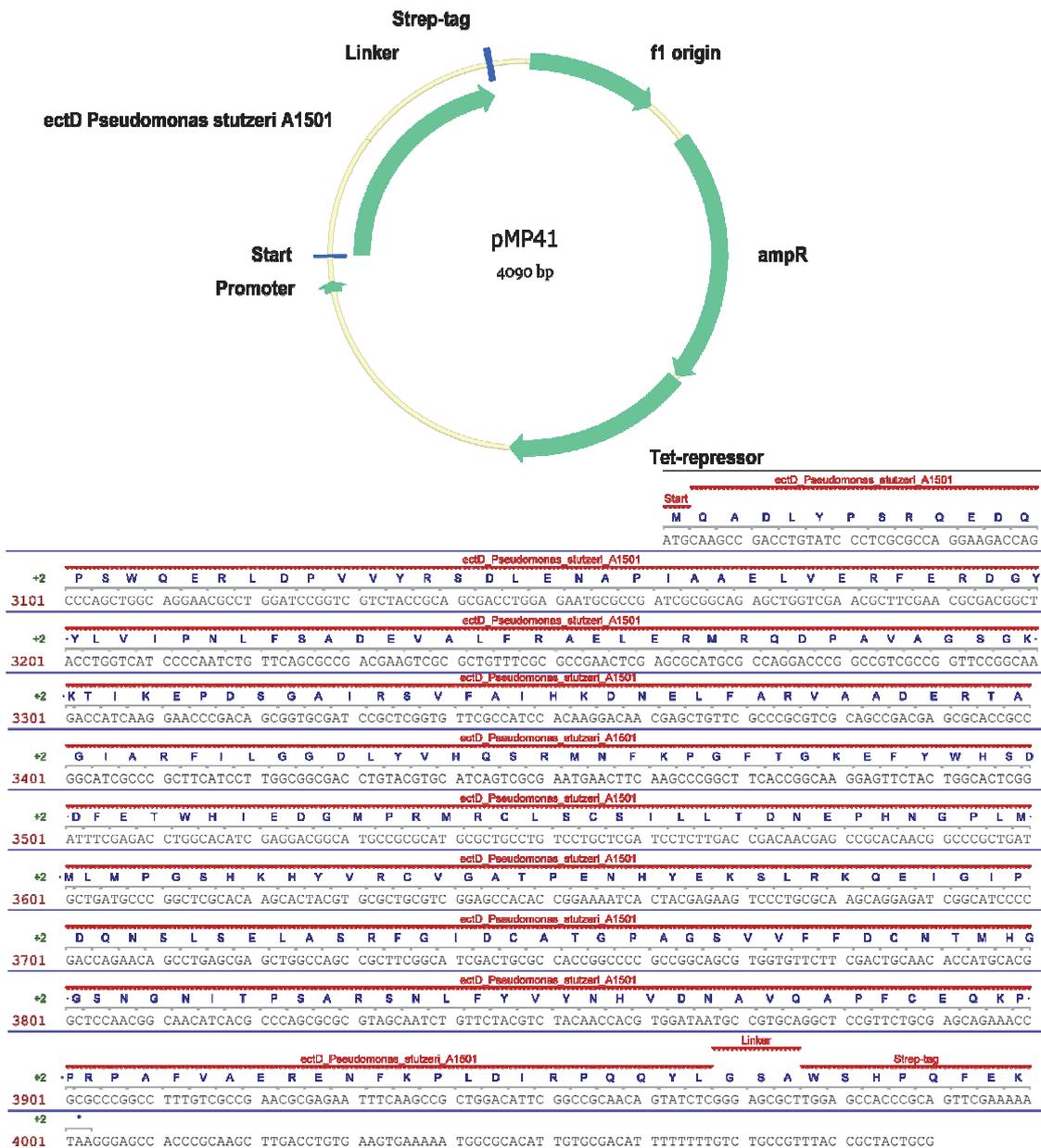


Abbildung 60: Expressionsplasmid pMP41. Der Vektor pMP41 ist ein Derivat von pASG-IBA3 (IBA, Göttingen) mit der inserierten *ectD* Sequenz aus *Pseudomonas stutzeri* und beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen *Strep*-tag an das gewünschte Protein zu fusionieren.

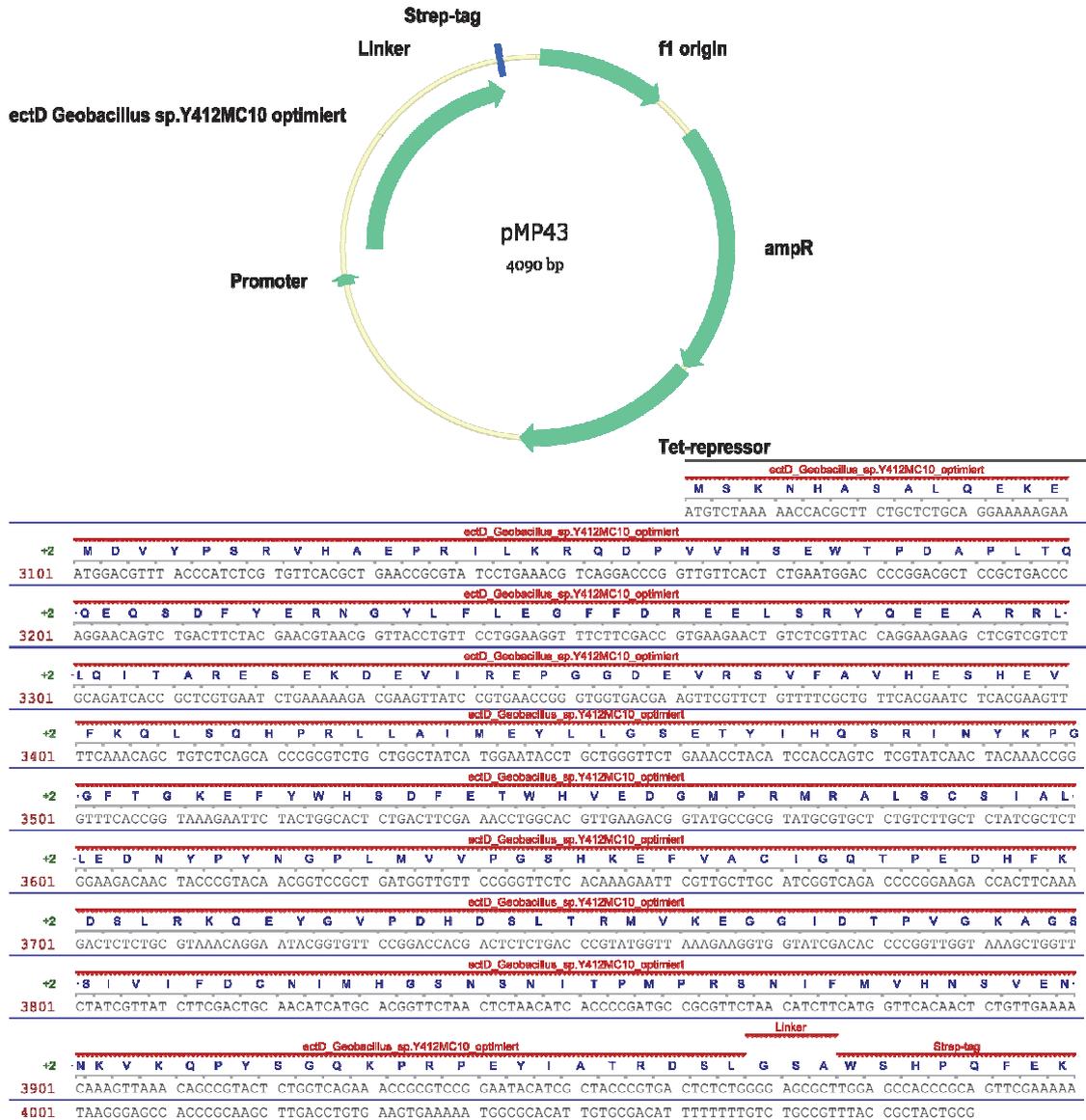


Abbildung 61: Expressionsplasmid pMP43. Der Vektor pMP43 ist ein Derivat von pASG-IBA3 (IBA, Göttingen) mit der inserierten, für *E. coli* codon optimierten *ectD* Sequenz aus *Geobacillus sp.* Y412MC10 und beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen Strep-tag an das gewünschte Protein zu fusionieren.

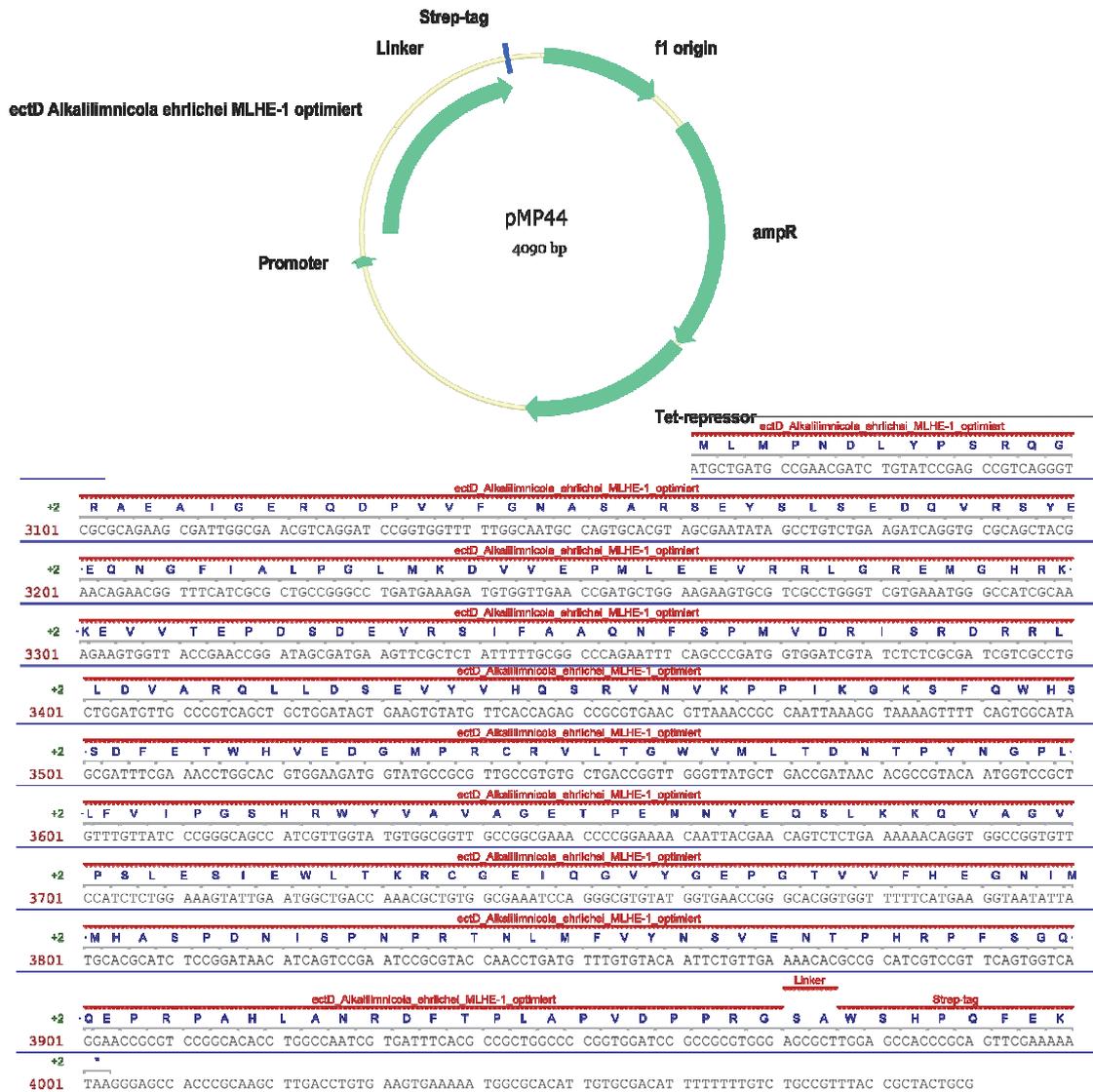


Abbildung 62: Expressionsplasmid pMP44. Der Vektor pMP44 ist ein Derivat von pASG-IBA3 (IBA, Göttingen) mit der inserierten, für *E. coli* codon optimierten *ectD* Sequenz aus *Alkalilimnicola ehrlichii* und beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen *Strep-tag* an das gewünschte Protein zu fusionieren.

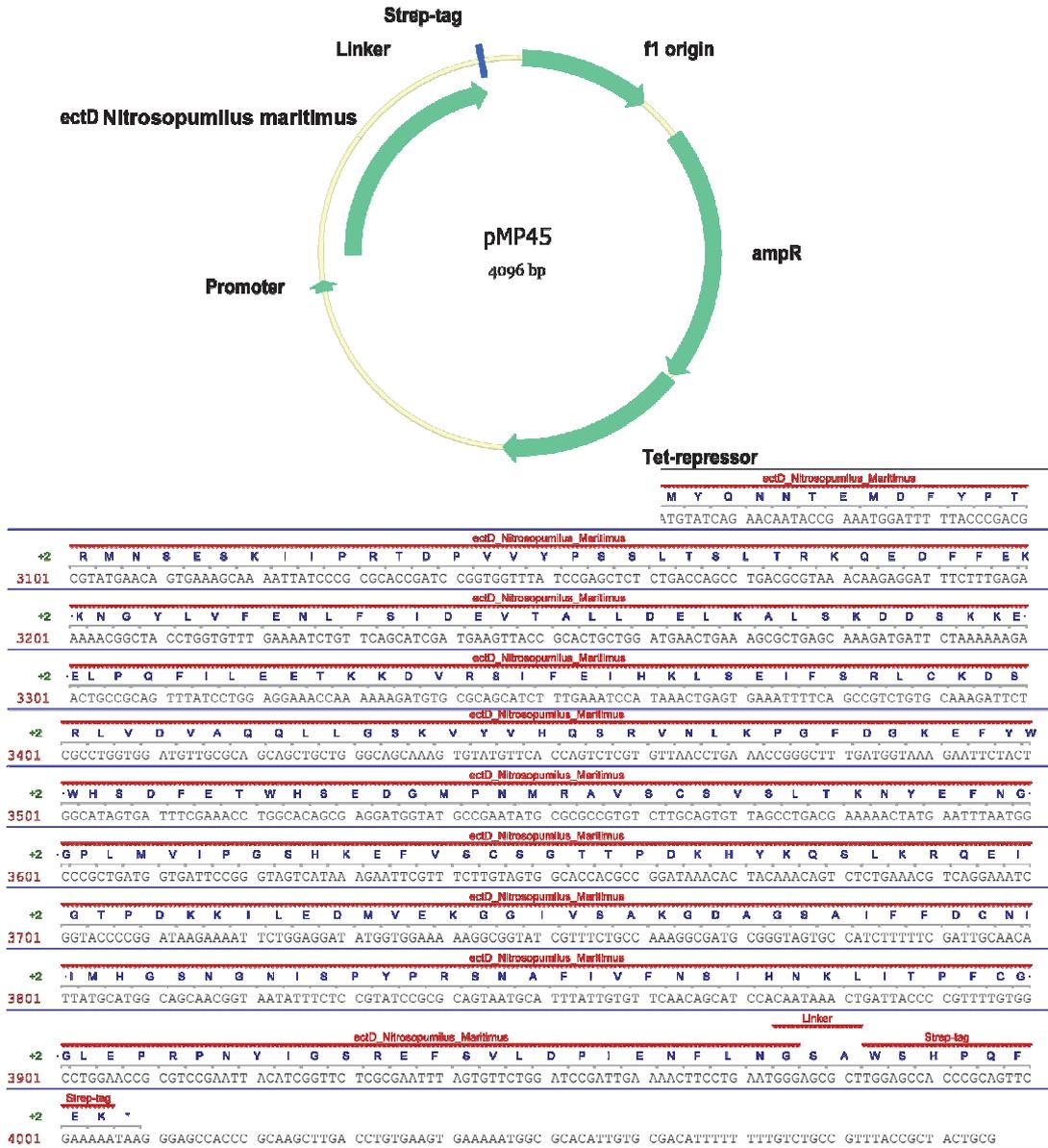


Abbildung 63: Expressionsplasmid pMP45. Der Vektor pMP45 ist ein Derivat von pASG-IBA3 (IBA, Göttingen) mit der inserierten, für *E. coli* codon optimierten *ectD* Sequenz aus *Nitrosopumilus maritimus* und beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen *Strep-tag* an das gewünschte Protein zu fusionieren.

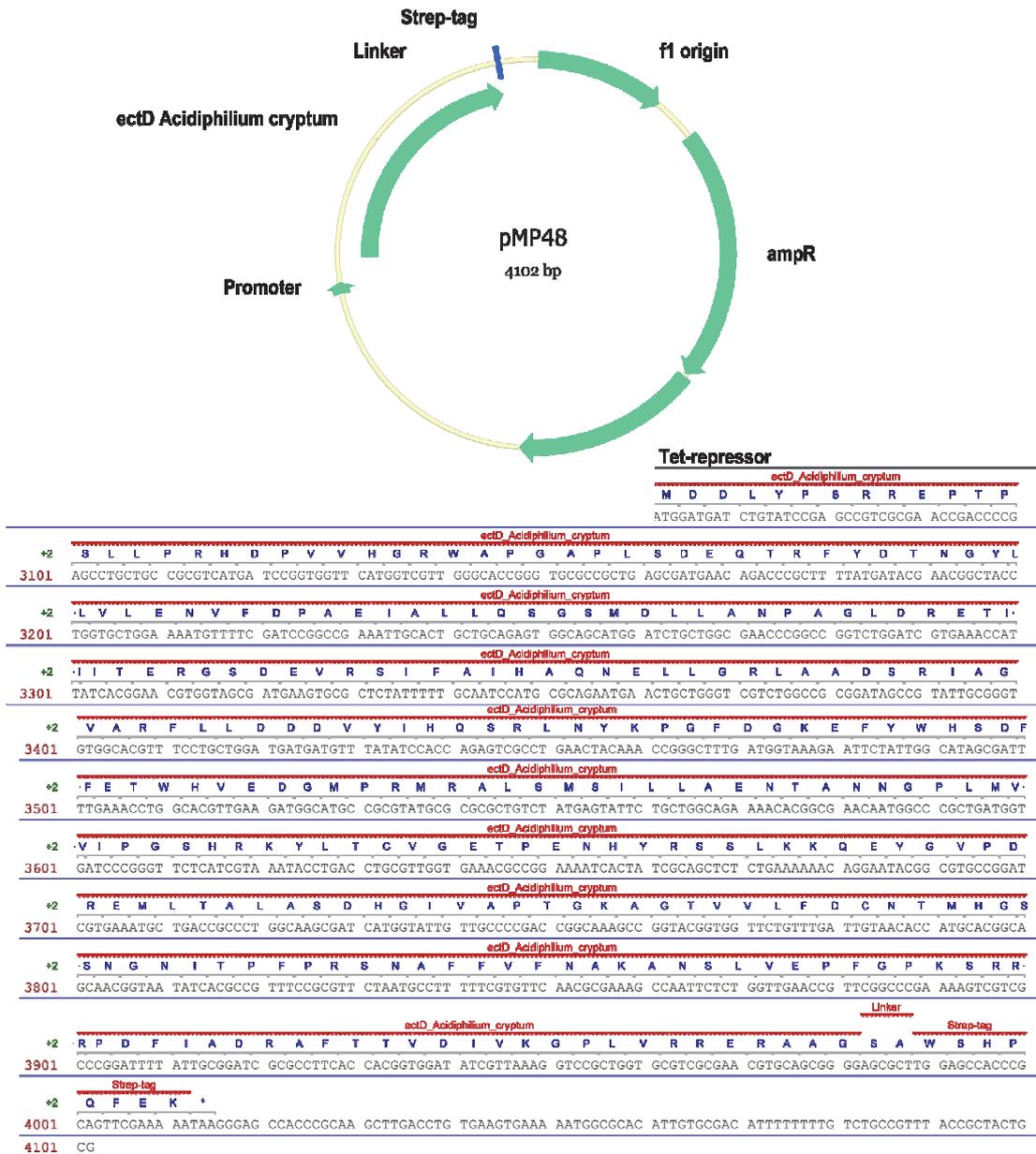


Abbildung 64: Expressionsplasmid pMP48. Der Vektor pMP48 ist ein Derivat von pASG-IBA3 (IBA, Göttingen) mit der inserierten, für *E. coli* codon optimierten *ectD* Sequenz aus *Acidiphilium cryptum* und beinhaltet die Sequenzen um einen C-terminalen *Strep-tag* an das gewünschte Protein zu fusionieren.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Marco Pittelkow

Geburtsdatum 27.07.1975 in Siegen

Ausbildungsdaten

06/1996 *Abitur* am Gymnasium der Gemeinde Neunkirchen

07/1996-04/1997 *Wehrdienstpflichtiger* im 1. Sanitätsbataillon Rennerod

10/1997-10/2006 *Studium der Biologie* an der Philipps-Universität, Marburg
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Informatik

10/2006-08/2007 *Diplomarbeit* am Fachbereich Biologie im Fachgebiet
Mikrobiologie (AG Bremer) an der Philipps-Universität
Marburg,
„Gerichtete Mutagenese der Ectoin Hydroxylase EctD aus
Salibacillus salexigens“

08/2007 *Diplom* in Biologie (Dipl.Biol.)

Seit 08/2007 *Promotion* am Fachbereich Biologie im Fachgebiet
Mikrobiologie (AG Bremer) an der Philipps-Universität
Marburg

Marburg, Mai 2011

10 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Synthese und physiologische Funktion der chemischen Chaperone Ectoin und Hydroxyectoin“

selbstständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marco Pittelkow

Ort, Datum