

**Biosynthese und Transport  
des kompatiblen Solute Ectoin  
in *Bacillus* spp.**

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

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Anne Uta Kuhlmann**  
aus Bottrop

Marburg/Lahn, 2002

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von November 1998 bis September 2001 im Laboratorium für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

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

Erstgutachter: Prof. Dr. E. Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung:

**Meinen Eltern**

**Nur der Schein trügt nicht**

**Josef Albers**

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Veröffentlichungen erstellt oder befinden sich in Vorbereitung:

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

Holtmann, G., Boiangiu, C. D., Brill, J., Hoffmann, T., Kuhlmann, A. U., Moses, S., Nau-Wagner, G., Pica, N. und E. Bremer. (2002). Physiological and molecular responses of *Bacillus subtilis* to hypertonicity: utilization of evolutionarily conserved adaptation strategies. In: A. Ventosa (Ed.), *Halophiles*. (Im Druck)

Kuhlmann, A. U., Jebbar, M. und E. Bremer. (2002). EctT: a sigma B-dependent BCCT-transporter for ectoine and hydroxyectoine involved in osmotic stress adaptation and chill protection of *Virgibacillus pantothenicus*. (Manuskript in Vorbereitung)

Kuhlmann, A. U. und E. Bremer. (2002). Synthesis of the compatible solute ectoine confers protection against high osmolality and chill stress to *Virgibacillus pantothenicus*. (Manuskript in Vorbereitung)

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
<b>1</b>	<b>Adaptation von Mikroorganismen an veränderliche Umweltbedingungen</b> .....	<b>2</b>
1.1	Mikroorganismen und osmotischer Stress .....	2
1.2	Mikrobielle Anpassungen an hyperosmolare Bedingungen .....	4
<b>2</b>	<b>Charakteristika und Funktionen kompatibler Solute</b> .....	<b>5</b>
2.1	Ectoine: weitverbreitete Stressprotektiva .....	7
<b>3</b>	<b>Osmotische Adaptation in <i>Bacilli</i></b> .....	<b>9</b>
3.1	Erste Reaktion auf hochosmolare Bedingungen: Aufnahme von $K^+$ .....	10
3.2	Zweite Anpassungsphase: Synthese und Transport kompatibler Solute .....	13
3.2.1	Osmotisch regulierte Prolinsynthese .....	13
3.2.2	Osmotisch regulierte Ectoinsynthese .....	15
3.2.3	Osmotisch regulierte Glycin Betain Synthese .....	19
3.2.4	Aufnahme kompatibler Solute in <i>B. subtilis</i> .....	20
3.2.5	Ectoitransport in Mikroorganismen .....	22
<b>4</b>	<b>Ausstoß osmotisch aktiver Substanzen bei hypoosmolarem Stress</b> .....	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Perzeption von osmotischem Stress</b> .....	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>26</b>
<b>III.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
<b>1</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b> .....	<b>27</b>
1.1	Verwendete osmotische Schutzsubstanz .....	27
1.2	Sonstige Chemikalien und Reagenzien .....	28
<b>2</b>	<b>Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Medien, Wachstumsbedingungen, Zusätze und Osmolalität</b> .....	<b>34</b>
3.1	Medien .....	34
3.2	Wachstum .....	37
3.3	Zusätze und Antibiotika.....	38
3.4	Osmolalität .....	39
<b>4</b>	<b>Molekularbiologische und genetische Methoden</b> .....	<b>39</b>
4.1	Allgemeine Methoden der molekularbiologischen und genetischen Manipulation.....	39
4.2	DNA-DNA-Hybridisierung (Southernblotting).....	42
4.3	RNA-Isolation .....	42
4.4	RNA-Hybridisierung .....	43

4.4.1	Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden mit dem Strip-EZ Kit (Ambion) .....	43
4.4.2	Test der RNA-Sonden .....	43
4.4.3	RNA-RNA-Hybridisierung (Northernblotting) .....	44
4.5	Identifikation von mRNA-Startpunkten mittels Primer Extension-Analyse .....	44
<b>5</b>	<b>Konstruktion von Plasmiden, Genbanken und Bakterienstämmen .....</b>	<b>45</b>
5.1	Konstruktion von Plasmiden .....	45
5.2	Herstellung von <i>S. pasteurii</i> - und <i>V. pantothenicus</i> -Genbanken .....	47
5.2.1	Herstellung einer eingeschränkten <i>EcoRI</i> -Genbank aus chromosomaler <i>S. pasteurii</i> -DNA .....	47
5.2.2	Herstellung einer überlappenden <i>Sau3A</i> -Genbank aus chromosomaler <i>V. pantothenicus</i> -DNA .....	47
5.3	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> - und <i>V. pantothenicus</i> -Stämmen .....	48
5.3.1	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> -Stämmen .....	48
5.3.2	Konstruktion von <i>V. pantothenicus</i> -Stämmen .....	49
<b>6</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>49</b>
6.1	Messung der Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-markierten osmotischen Schutzsubstanzen .....	49
6.1.1	Untersuchungen zur Aktivierung des Ectoin-Transportes in <i>V. pantothenicus</i> .....	50
6.1.2	Kinetische Parameter des Ectointransportes unter hochosmolaren Bedingungen in <i>V. pantothenicus</i> .....	50
6.2	Expression der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthesegene in <i>B. subtilis</i> .....	51
6.3	Analyse von Zellextrakten durch <sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie .....	51
6.4	HPLC Analyse von Ectoin und Hydroxyectoin .....	52
6.5	HPLC-Analyse von Aminosäuren mittels Vorsäulen-Derivatisierung (FMOC/ADAM) .....	52

## IV. Ergebnisse 53

<b>1</b>	<b>de novo Synthese organischer Osmolyte innerhalb des Genus <i>Bacillus</i> und verwandter Genera .....</b>	<b>53</b>
1.1	Glutamat, Prolin und Ectoin: weitverbreitete, <i>de novo</i> synthetisierte Osmoprotektiva in <i>Bacillus</i> spp. ....	53
1.2	16S rRNA-Stammbaum der untersuchten Bakterienspezies .....	56
1.3	Hypertone Bedingungen stimulieren die endogene Osmolytsynthese .....	57
<b>2</b>	<b>Die Ectoinbiosynthese in <i>S. pasteurii</i> ist osmotisch stimuliert .....</b>	<b>60</b>
<b>3</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung der Ectoinsynthesegene aus <i>S. pasteurii</i> .....</b>	<b>61</b>
3.1	DNA-Sequenzanalyse der <i>ectABC</i> -Region aus <i>S. pasteurii</i> .....	62
3.1.1	Die Ectoinbiosynthese ist hoch konserviert in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien .....	62
3.2	Funktionelle Expression der Ectoinbiosynthesegene in <i>B. subtilis</i> .....	64
3.3	Transkriptionelle Analyse des <i>ectABC</i> -Operons aus <i>S. pasteurii</i> .....	64
3.4	Identifizierung des Transkriptionsstarts des <i>ectABC</i> -Operons .....	65

<b>4</b>	<b>Osmoprotektion von <i>S.pasteurii</i> durch die Aufnahme exogen vorhandener kompatiblen Soluten</b> .....	<b>67</b>
4.1	Aufnahme exogen zugeführter kompatibler Solute unter hyperosmolarem Stress in <i>S. pasteurii</i> .....	67
4.2	Osmoprotektion von Ectoin und Glycin Betain in <i>S. pasteurii</i> .....	67
4.3	Transport von [ <sup>14</sup> C]-Glycin Betain in <i>S. pasteurii</i> .....	69
<b>5</b>	<b>Ectoin, Hydroxyectoin und Prolin sind metabolisch inert in <i>S. pasteurii</i> und <i>V. pantothenicus</i></b> .....	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>de novo Synthese der kompatiblen Solute Prolin und Ectoin unter hochosmolaren Bedingungen in <i>V. pantothenicus</i></b> .....	<b>70</b>
6.1	Prolin- und Ectoinbiosynthese werden in <i>V. pantothenicus</i> osmotisch induziert .....	70
6.2	Osmotisch regulierter Wechsel zwischen Prolin- und Ectoinbiosynthese in <i>V. pantothenicus</i> .....	73
<b>7</b>	<b>Isolierung der Ectoinbiosynthesegene aus <i>V. pantothenicus</i></b> .....	<b>75</b>
7.1	PCR-Amplifikation der Ectoinbiosynthesegene aus <i>V. pantothenicus</i> .....	75
7.2	DNA-Sequenzanalyse der 'ectB-ectC' Gene aus <i>V. pantothenicus</i> .....	76
7.3	Transkriptionelle Analyse der Ectoinbiosynthesegene in <i>V. pantothenicus</i> .....	77
7.3.1	Induktion des ectABC-Operons durch einen hyperosmotischen Schock .....	78
<b>8</b>	<b>Konstruktion und physiologische Analyse einer 'ectB-ectC'- Deletion in <i>V. pantothenicus</i></b> .....	<b>80</b>
8.1	Konstruktion des Stammes AKB3 [ $\Delta(ectB::tet)1$ ] .....	80
8.2	Die ectABC codierten Enzyme sind für die Ectoinbiosynthese bei hochosmolarem Stress verantwortlich .....	81
8.3	Phänotypische Charakterisierung des ectB-Stammes AKV3 unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen .....	81
<b>9</b>	<b>Kompatible Solute: Psychroprotektiva für Bakterien bei niedriger Temperatur</b> .....	<b>83</b>
9.1	Synthese kompatibler Solute in <i>S. psychrophila</i> .....	84
9.2	de novo Ectoin- und Prolinbiosynthese bei niedrigen Wachstumstemperaturen in <i>V. pantothenicus</i> .....	84
9.3	Kältereulation der Transkription des Ectoinbiosyntheseoperons .....	85
9.3.1	Kältereulierte Transkription des ectABC-Operons .....	86
9.4	Phänotypische Charakterisierung der ectB-Mutante AKV3 bei niedriger Wachstumstemperatur .....	88
<b>10</b>	<b>Ectoinaufnahme unter hochosmolarem Stress in <i>V. pantothenicus</i></b> .....	<b>90</b>
10.1	Isolierung des Gens eines Ectoin-Transportsystems aus <i>V. pantothenicus</i> .....	90
10.2	Analyse der isolierten Genregion aus <i>V. pantothenicus</i> .....	91
10.3	Analyse der abgeleiteten Polypeptidsequenz von ectT .....	92
10.3.1	EctT ist ein neues Mitglied der BCCT-Transporter Familie .....	92
10.3.2	Mögliche topologische Organisation von EctT .....	93

10.4	Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz des Leserasters2 .....	95
<b>11</b>	<b>Physiologische Charakterisierung von EctT .....</b>	<b>96</b>
11.1	Tetrahydropyrimidin-Transport durch EctT im heterologen System.....	96
11.2	Charakterisierung einer <i>ectT</i> -Genunterbrechungsmutante in <i>V. pantothenicus</i> .....	97
11.2.1	Konstruktion einer chromosomalen <i>ectT</i> -Genunterbrechung in <i>V. pantothenicus</i> .....	97
11.2.3	Phänotypische Charakterisierung der <i>ectT</i> -Mutante AKV2 unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen.....	99
11.2.4	Einfluss von EctT auf den kompatiblen Solut Transport bei Kälte.....	100
11.3	EctT ist der einzige osmotisch stimulierte Ectoitransporter in <i>V. pantothenicus</i> ...	101
11.4	Die Stimulation der EctT-Transportaktivität ist ein echter osmotischer Effekt.....	102
11.5	Kinetische Parameter des EctT-vermittelten Ectoitransportes unter hochosmolarem Stress .....	103
11.6	Ectoinflux unter hochosmolaren Bedingungen in der <i>ectT</i> - Mutante AKV2 .....	104
<b>12</b>	<b>Regulation von <i>ectT</i> unter hoher Osmolalität und bei Kälte .....</b>	<b>105</b>
12.1	Analyse des Startpunktes <i>ectT</i> -spezifischer mRNA in <i>V. pantothenicus</i> .....	105
12.2	Analyse des Startpunktes <i>ectT</i> -spezifischer mRNA im heterologen System.....	107
12.3	Induktion der <i>ectT</i> -Transkription nach einen hyperosmolaren Schock .....	109
<b>13</b>	<b>Posttranslationale Regulation von EctT bei hoher Osmolalität.....</b>	<b>111</b>
<b>14</b>	<b>Induktion der <i>ectT</i>-Transkription bei Kälte .....</b>	<b>112</b>
14.1	Primer Extension-Analyse von <i>ectT</i> -spezifischer mRNA bei Kälte .....	113
14.2	Induktion der <i>ectT</i> -Transkription durch Kälteschock.....	113
<b>15</b>	<b>Streptomyceten synthetisieren Ectoin und Hydroxyectoin .....</b>	<b>115</b>
15.1	<i>de novo</i> Tetrahydropyrimidinsynthese in <i>St. coelicolor</i> .....	116
15.2	Eine Dioxygenase katalysiert die Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin in <i>St.</i> <i>coelicolor</i> A3(2).....	117
<b>16</b>	<b>Exogen zugeführtes Ectoin und Hydroxyectoin schützen <i>St. coelicolor</i> A3(2) bei hoher Osmolalität.....</b>	<b>121</b>
<b>17</b>	<b>Exogen zugeführtes Ectoin und Hydroxyectoin schützen <i>St. coelicolor</i> A3(2) bei hoher Temperatur.....</b>	<b>122</b>
<b>V.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>124</b>
<b>1</b>	<b><i>de novo</i> Osmolytsynthese in <i>Bacilli</i> und verwandten Genera .....</b>	<b>125</b>
1.1	Die Ectoinbiosynthese ist hochkonserviert und weit verbreitet in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien .....	128
1.2	Die Synthese von Hydroxyectoin in <i>St. coelicolor</i> wird durch eine Dioxygenase katalysiert.....	130
<b>2</b>	<b>Regulation der Ectoinbiosynthese in Gram-positiven Bakterien – Adaptation an hochosmolare Bedingungen .....</b>	<b>134</b>
<b>3</b>	<b>Ectoin und Hydroxyectoin schützen vor zahlreichen Stressbedingungen .....</b>	<b>139</b>

3.1	Ectoine als Psychroprotektiva unterstützen die Kälteadaptation in Bakterien .....	139
3.2	Kompatible Solute erhöhen die Osmo- und Kältetoleranz von Pflanzen .....	144
3.3	Thermoprotektion durch Ectoin und Hydroxyectoin in Mikroorganismen.....	145
<b>4</b>	<b>Ectointransport in Bakterien .....</b>	<b>149</b>
4.1	Transport kompatibler Solute in <i>S. pasteurii</i> .....	149
4.2	EctT: Ein osmotisch regulierter Ectointransporter der BCCT-Transporterfamilie aus <i>V. pantothenicus</i> .....	150
4.2.2	Der Ectointransport durch EctT unterliegt einer dualen osmotischen Kontrolle .....	152
4.2.3	Ein Homolog des alternativen Transkriptionsfaktors $\sigma^B$ reguliert die <i>ectT</i> - Expression in <i>V. pantothenicus</i> .....	155
4.2.4	Die Funktion von EctT für den Ectoinefflux unter hochosmolaren Bedingungen .....	157
<b>5</b>	<b>EctT ist für den Transport von Tetrahydropyrimidinen bei Kältestress verantwortlich.....</b>	<b>158</b>
<b>6</b>	<b>Die koordinierte Synthese und Aufnahme von Ectoin in <i>V. pantothenicus</i> .....</b>	<b>162</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>164</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>195</b>
<b>1</b>	<b><sup>13</sup>C-NMR Spektren hochosmolar gestresster <i>Bacilli</i> .....</b>	<b>195</b>
1.1	Glutamat synthetisierende <i>Bacilli</i> .....	195
1.1.1	<i>Bacillus cereus</i> (DSM 31 <sup>T</sup> ).....	195
1.1.2	<i>Bacillus circulans</i> (DSM 9 <sup>T</sup> ) .....	196
1.1.3	<i>Bacillus thuringensis</i> (DSM 2046 <sup>T</sup> ).....	196
1.1.4	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> (DSM 5562 <sup>T</sup> ).....	197
1.1.5	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (DSM 36 <sup>T</sup> ) .....	197
1.2	Prolin synthetisierende <i>Bacilli</i> .....	198
1.2.1	<i>Bacillus subtilis</i> JH642.....	198
1.2.2	<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 13 <sup>T</sup> ) .....	198
1.2.3	<i>Bacillus megaterium</i> (DSM 32 <sup>T</sup> ) .....	199
1.3	Ectoin synthetisierende Bakterien.....	199
1.3.1	<i>Bacillus alcalophilus</i> (DSM 485 <sup>T</sup> ).....	199
1.3.2	<i>Sporosarcina psychrophila</i> (DSM 3 <sup>T</sup> ) .....	200
1.3.3	<i>Salibacillus salexigens</i> (DSM 11438 <sup>T</sup> ).....	200
<b>2</b>	<b>DNA-Sequenz des <i>ectABC</i>-Operons aus <i>S. pasteurii</i> .....</b>	<b>201</b>
<b>3</b>	<b>DNA-Sequenz der '<i>ectB-ectC</i>' Region aus <i>V. pantothenicus</i> .....</b>	<b>203</b>
<b>4</b>	<b>Aminosäuresequenzvergleich der Ectoinsyntheseenzyme .....</b>	<b>204</b>
4.1	EctA .....	204
4.2	EctB .....	205

---

4.3	EctC .....	207
<b>5</b>	<b>DNA-Sequenz von <i>ectT</i> aus <i>V. pantothenicus</i>.....</b>	<b>208</b>
<b>6</b>	<b>Aminosäuresequenzvergleich von EctT mit anderen BCCT- Transportern .....</b>	<b>210</b>

## Abkürzungen

ADAM	1-Aminoadamantan
Amp <sup>r</sup>	resistent gegen Ampicillin
ACN	Acetonitril
BGSC	Bacillus Genetic Stock Center
CmI <sup>r</sup>	resistent gegen Chloramphenicol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
dpm	Zerfall pro minute (disintegration per minute)
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
δ	chemische Verschiebung
Fmoc	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
Kan <sup>r</sup>	resistent gegen Kanamycin
MLS	Makrolid-Lincosamin-Streptogramin
OD <sub>578</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge 578 nm
ppm	Frequenz (parts per million)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
Sp <sup>c</sup>	resistent gegen Spectinomycin
Tet <sup>r</sup>	resistent gegen Tetracyclin
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-Indolyl-β-D-Galactosid

## I. Zusammenfassung

Zahlreiche Mikroorganismen sind in der Lage, den durch hochosmolare Umweltbedingungen hervorgerufenen Wasserstrom aus der Zelle durch die intrazelluläre Akkumulation organischer Solute, die auch als kompatible Solute bezeichnet werden, entgegenzuwirken. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie und HPLC-Analyse untersucht, welche kompatiblen Solute repräsentative Vertreter des Genus *Bacillus* und verwandter Spezies unter hochosmolarem Stress synthetisieren. Es konnten fünf *Bacilli*-Gruppen anhand der unter hochosmolaren Bedingungen *de novo* synthetisierten kompatiblen Solute, den Aminosäuren Glutamat und Prolin sowie den Aminosäurederivaten Ectoin und Hydroxyectoin, unterschieden werden. Es zeigte sich, dass die *de novo* Synthese des Solutes Ectoin bei osmotischem Stress in *Bacilli* weit verbreitet ist. In der vorliegenden Arbeit wurden der Ectoinbiosyntheseweg und die verantwortlichen regulatorischen Mechanismen in den *Bacillus*-Verwandten *Sporosarcina pasteurii*, der Ectoin allein und in *Virgibacillus pantothenicus*, der Ectoin in Kombination mit Prolin synthetisiert, untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ectoinsynthese in *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* in Abhängigkeit zur Osmolalität des Mediums gesteuert wird und drei Schritte, die durch die Enzyme EctB, EctA und EctC katalysiert werden, umfasst. Darüber hinaus wurde die Induktion der *de novo* Synthese von Ectoin und Hydroxyectoin auch durch Kälte- und Hitzestress in Gram-positiven Bakterien nachgewiesen. Eine im EctB-Enzym defekte *V. pantothenicus* Mutante ist nicht mehr in der Lage, Ectoin zu synthetisieren und besitzt daher einen starken Wachstumsnachteil unter hyperosmolaren Bedingungen und bei niedriger Wachstumstemperatur. Die im Rahmen dieser Arbeit aus *S. pasteurii* und aus *V. pantothenicus* isolierten Ectoinsynthesegencluster *ectABC* und '*ectB-ectC*' weisen hohe Konserviertheit in Organisation und abgeleiteter Aminosäuresequenz zu anderen Ectoinclustern Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien auf. Durch Northern Blot-Analysen in *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* wurde erstmalig demonstriert, dass die Transkription von *ectABC* als osmotisch fein reguliertes Operon in Bakterien erfolgt. Primer Extension-Analysen in *S. pasteurii* zeigten, dass die Transkription des *ectABC*-Operons bei hochosmolarem Stress von einem Promotor kontrolliert wird, der Sequenzübereinstimmungen mit einem vom vegetativen Sigmafaktor  $\sigma^A$  abhängigen Promotor in *B. subtilis* besitzt. Durch eine plötzliche Erhöhung der Osmolalität oder durch einen Kälteschock wird die Transkription des *ectABC*-Operons in *V. pantothenicus* induziert und in ihrer Stärke und Dauer dem auslösenden Umweltstimulus angepasst.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, schützt sich *V. pantothenicus* vor hochosmolarem Stress und vor Kälte auch durch die Aufnahme vorgeformter Ectoine aus der Umwelt. Ein hochaffiner Ectointransporter EctT, der zur BCCT-Transporterfamilie gehört, ist allein für den Ectointransport unter hochosmolaren Bedingungen und bei Kältestress in *V. pantothenicus* verantwortlich. Eine *ectT*-defekte Mutante ist nicht mehr in der Lage, exogenes Ectoin aufzunehmen und hat daher einen deutlichen Wachstumsnachteil bei hoher Osmolalität und bei niedriger Wachstumstemperatur. Northern Blot-Analysen zeigten eine Induktion der *ectT*-Transkription nach einem hyperosmolaren Schock oder einer plötzlichen Temperatursenkung, deren Niveau proportional zur externen Osmolalität oder Temperatur aufrechterhalten wird, solange der jeweilige Stress andauert. Die osmotisch- und temperaturregulierte Transkription von *ectT* erfolgt allein durch einen Promotor, dessen Sequenz genau mit der Konsensussequenz eines vom alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  in *B. subtilis* kontrollierten Promotors übereinstimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermitteln einen detaillierten Überblick über eine durch verschiedene Stressbedingungen koordiniert regulierte Ectoin-Synthese und -Aufnahme, die zahlreichen *Bacilli* die flexible Anpassung an stark wechselnde Umweltbedingungen erlauben.

## II. Einleitung

### 1 Adaptation von Mikroorganismen an veränderliche Umweltbedingungen

Mikroorganismen sind in ihren natürlichen Lebensräumen zahlreichen abiotischen Stressfaktoren und Nährstofflimitationen ausgesetzt. Besonders bodenbewohnende Mikroorganismen wie *Bacilli* sind in ihrem Habitat einer Vielzahl sich gegenseitig beeinflussender Stresssituationen ausgesetzt, denn durch die Oligotrophie der oberen Bodenschichten besteht einerseits Nährstofflimitation, während Mikroorganismen andererseits verschiedenen physikalischen Stressfaktoren wie hohe oder niedrige Temperatur, pH-Wert-Schwankungen und vor allem wechselnder Wasserverfügbarkeit ausgesetzt sind (Galinski und Trüper 1994; Wood 1999; Hecker und Völker 2001). Die Austrocknung des Bodens führt zu hochosmolaren Bedingungen, Niederschlag dagegen erzeugt eine hypoosmotische Umwelt. Bodenmikroorganismen müssen sich daher flexibel hyper- und hypoosmotischen Bedingungen anpassen können, um zu überleben (Bremer und Krämer 2000). Die Wasserverfügbarkeit ist zudem mit dem Vorhandensein von Sauerstoff gekoppelt, dem bevorzugten terminalen Elektronenakzeptor von *Bacilli*. Darüber hinaus verursachen hohe Salzkonzentrationen Eisenlimitation im Boden, was einen zusätzlich wachstumslimitierenden Faktor für *Bacillus* darstellt (Hoffmann *et al.* 2002). Im Freiland sind Bodenmikroorganismen ständig Kombinationen verschiedener Umweltstressfaktoren ausgesetzt. Sie besitzen daher zahlreiche Anpassungsmechanismen für ihr Überleben unter wachstumslimitierenden Bedingungen.

#### 1.1 Mikroorganismen und osmotischer Stress

Pflanzen- und Bakterienzellen sind, im Gegensatz zu tierischen Zellen, von einer elastischen Zellwand umgeben (Ingraham und Marr 1996). Diese ist für die meisten Ionen und niedermolekularen Substanzen permeabel. Eine Barriere für den Einstrom zahlreicher, im Wasser gelöster Substanzen wie Makromoleküle, Ionen und organische Verbindungen ist die semipermeable Zytoplasmamembran (Bovell *et al.* 1963). Die Zytoplasmamembran ist jedoch für amphipatische Verbindungen wie Wasser, Glycerin und Ethanol durchlässig. Die Semipermeabilität der Zytoplasmamembran ist durch ihren Aufbau als Lipiddoppelschicht bedingt. Für die kontrollierte Aufnahme bestimmter Ionen und Moleküle wird sie von speziellen Proteinen durchspannt. Das Zytoplasma von Bakterienzellen besteht aus einer wässrigen Lösung osmotisch aktiver Substanzen. Die Gesamtkonzentration der Osmolyte im Zytoplasma ist in der Regel höher als in der Umgebung der Zelle. Dies führt zu einem Wassereinstrom aus der Umgebung entlang des osmotischen Gradienten in die Zelle, so dass sich ein nach außen gegen die Zellwand gerichteter Druck, der Turgor aufbaut (Ingraham und Marr 1996; Wood 1999). Die Aufrechterhaltung eines positiven Turgors ist unerlässlich für das Überleben der Zelle sowie die geregelte Zellteilung und stellt möglicherweise die mechanische Kraft für die

Ausdehnung der Zellwand während des Zellwachstums dar (Koch 1983; Höltje 1998).

Der Turgor Gram-positiver Bakterien beträgt ungefähr  $20 \cdot 10^5$  Pa (Whatmore und Reed 1990) und ist somit wesentlich höher als der Gram-negativer Mikroorganismen, welcher bei 3 bis  $10 \cdot 10^5$  Pa liegt (Koch 1984; Csonka 1989; Ingraham und Marr 1996). Die hohe Innendrucktoleranz Gram-positiver Bakterien ist vermutlich durch die Stabilität des elastischen Mureinsacculus, der aus über 25 Peptidoglykanschichten besteht, bedingt (Whatmore und Reed 1990).

Änderungen der externen Osmolalität beeinflussen den Wasserstrom entlang des osmotischen Gradienten über der Zytoplasmamembran. Dabei bewirken hyperosmolare Bedingungen einen Wasserausstrom aus der Zelle, wobei das Zytoplasma dehydriert. Unter besonders starkem osmotischem Stress bricht der Zellturgor zusammen und die Zytoplasmamembran löst sich von der Zellwand ab. Dieser als Plasmolyse bezeichnete Vorgang bewirkt eine Konzentrationserhöhung der zytoplasmatischen Inhaltsstoffe, wodurch in der entstehenden hochviskosen Umgebung zahlreiche physiologische Prozesse inhibiert werden (Meury 1988; Csonka 1989). Unter hypoosmolaren Bedingungen findet ein Wassereinstrom in das Zytoplasma statt, und der Turgor steigt. Die elastische aber dennoch stabile Zellwand der Bakterien ist in der Lage dem erhöhten Innendruck über einen gewissen Bereich standzuhalten (Carpita 1985). Darüber hinaus sind Bakterien bemüht, über mechanosensitive Kanäle osmotisch aktive Zellinhaltsstoffe aus dem Zytoplasma auszuschleusen, um das Bersten der Zelle unter extrem hypoosmotischen Bedingungen zu verhindern (Ruffert *et al.* 1997; Poolman und Glaesker 1998; Booth und Louis 1999).

Mikroorganismen besitzen keine Systeme für eine aktive Wasseraufnahme. Daher erfolgt der Wasserstrom über die Zytoplasmamembran allein durch Diffusion und wird durch die osmotischen Drücke des Zytoplasmas und der Umgebung der Bakterienzelle bestimmt (Booth und Louis 1999). Die einfache Diffusion des Wassers reicht aus, um geringere osmotische Schwankungen auszugleichen. Ein deutlich beschleunigter Wasserfluss konnte in *E. coli* für den Wasser-selektiven Kanal AqpZ (Aquaporin) beobachtet werden (Calamita *et al.* 1995). AqpZ ist homolog zu Aquaporinen aus pflanzlichen und tierischen Zellen (Chrispeels und Agre 1994; Johansson *et al.* 2000) und gehört zur Familie der „Major Intrinsic Proteins“ (MIP) (Calamita *et al.* 1995). Wie eukaryotische Aquaporine vermittelt es einen schnellen, bidirektionalen Wasserfluss durch die Zytoplasmamembran als Antwort auf plötzliche hypo- oder hyperosmotische Änderungen (Agre *et al.* 1995) (Maurel *et al.* 1997; Delamarche *et al.* 1999). AqpZ ist das bisher einzige identifizierte prokaryotische Aquaporin. Im Genom von *B. subtilis* konnte kein AqpZ-Homolog identifiziert werden (Calamita 2000). Daher besitzt *B. subtilis* entweder gar keine Aquaporine oder Aquaporine eines bisher unbekanntes Typs.

## 1.2 Mikrobielle Anpassungen an hyperosmolare Bedingungen

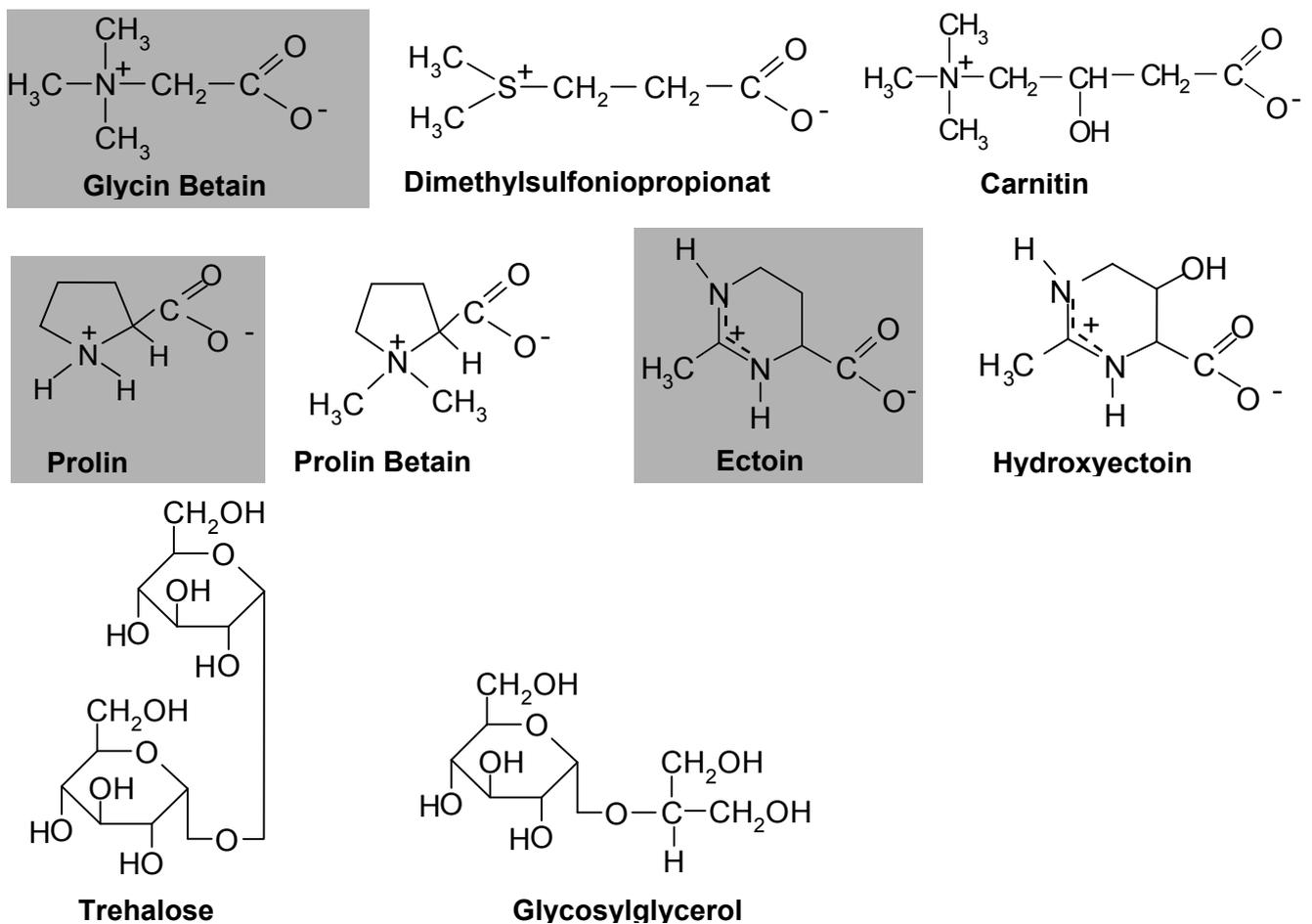
Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen sind durch mehrstufige Anpassungsprozesse in der Lage, aktiv auf eine erhöhte Osmolalität ihrer Umgebung zu reagieren (Galinski und Trüper 1994; Csonka und Epstein 1996; Miller und Wood 1996). Ziel dieser Stressreaktion ist die Aufrechterhaltung eines positiven Turgors,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

Der erste Mechanismus beruht auf der intrazellulären Akkumulation von Ionen, um die osmotische Aktivität des Zytoplasmas dem umgebenden Medium anzupassen (Galinski und Trüper 1994; Ventosa *et al.* 1998a). Diese Strategie erfordert eine evolutionäre Adaptation aller zellulären Komponenten an die hohen intrazellulären Ionenkonzentrationen, damit regulatorische und metabolische Prozesse der Zelle ungehindert ablaufen können (Zhilina und Zavarzin 1990; Dennis und Shimmin 1997). Gleichzeitig führt diese Anpassung zu einer Abhängigkeit an hohe intrazelluläre Ionenkonzentrationen. So benötigen halophile Mikroorganismen für zahlreiche biochemische Reaktionen hohe  $K^+$  Konzentrationen (Ventosa *et al.* 1998a; Martin *et al.* 1999). Mikroorganismen, die dieses Adaptationsschema zeigen, sind sehr eng an ihr spezifisches Habitat (Salzseen, Salinen) angepasst und gehören hauptsächlich zum Reich der *Archaea* (Roberts 2000). Einige halotolerante *Bacteria* sind auf diese Weise ebenfalls in der Lage, Hochsalzhabitate zu besiedeln (Galinski und Trüper 1994; Ventosa *et al.* 1998a).

Die „salt-out“ Anpassungsstrategie besteht dagegen in der intrazellulären Anreicherung osmotisch aktiver nicht-ionischer Schutzsubstanzen bei einer Erhöhung der externen Osmolalität. Zahlreiche Bakterien und Archaeen, die Habitate moderater Salinität oder wechselnder Osmolalität bewohnen, nutzen diese flexiblere Anpassung (Galinski und Trüper 1994), (Ventosa *et al.* 1998a; Martin *et al.* 1999; Roberts 2000). Die Mikroorganismen vermeiden hohe Ionenkonzentrationen in ihrem Zytoplasma und akkumulieren stattdessen unter hochosmolaren Bedingungen organische Osmolyte. Diese halten den Turgor aufrecht, ohne dabei den Zellmetabolismus und weitere Zellkomponenten zu beeinträchtigen (Brown 1976). Diese organischen Solute werden wegen ihrer hohen Verträglichkeit für die Zelle als kompatible Solute bezeichnet. Sie können von Mikroorganismen selbst synthetisiert und/oder aus der Umgebung durch spezifische Transporter aufgenommen werden (Galinski und Trüper 1994; Csonka und Epstein 1996; Wood 1999; Bremer und Krämer 2000). Die „salt-out“ Strategie bietet den Vorteil einer flexibleren Adaptation an verschiedene Salzkonzentrationen und erfordert keine evolutionäre Anpassung von Zellkomponenten und biochemischer Prozesse an hohe zytoplasmatische Ionenkonzentrationen (Galinski und Trüper 1994). Die hohe Flexibilität der „salt-out“ Strategie ist vermutlich die Ursache für die weite Verbreitung dieses Anpassungsprinzips auch in *Eucarya* (Burg *et al.* 1997; Hohmann 1997; McNeil *et al.* 1999).

## 2 Charakteristika und Funktionen kompatibler Solute

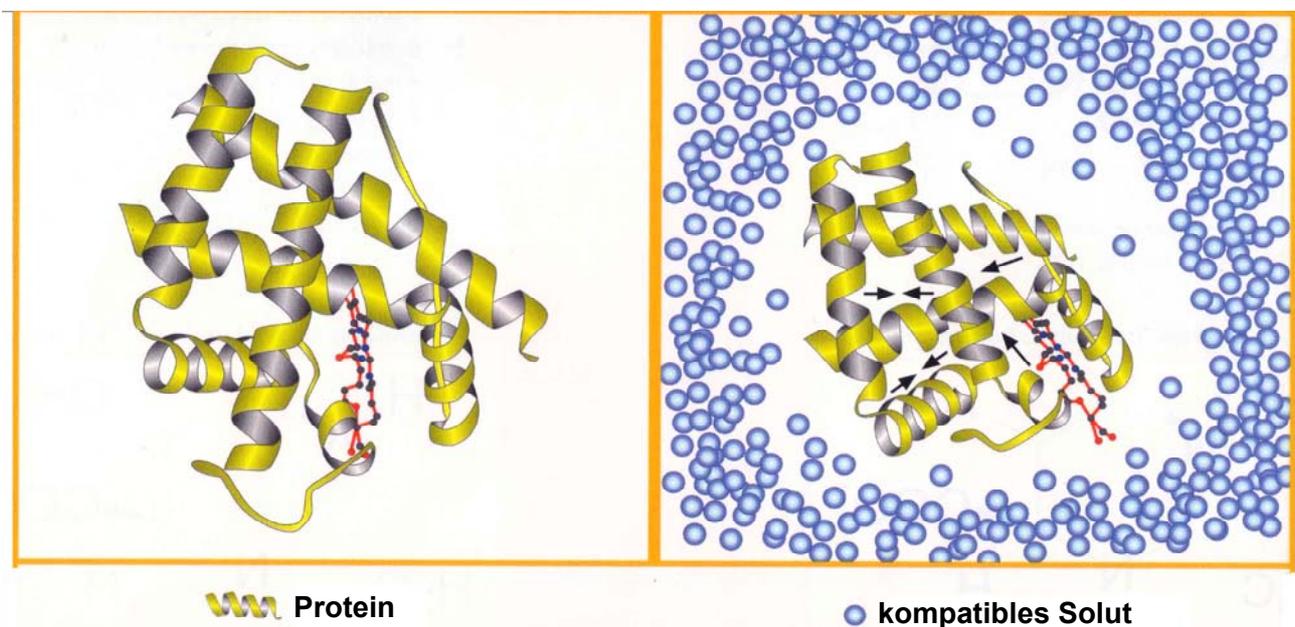
Kompatible Solute, die von *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya* unter hochosmolaren Bedingungen akkumuliert werden, rekrutieren sich aus wenigen Stoffklassen (Le Rudulier *et al.* 1984; Delaunay und Verma 1993; Miller und Wood 1996; Bremer und Krämer 2000): Zucker (z. B. Trehalose, Saccharose), Polyole (z. B. Glycerin, Glykosylglycerin), freie Aminosäuren (z. B. Prolin, Glutamat), Aminosäurederivate (z. B. Ectoin, Prolinbetain), quartäre Amine und deren Schwefelanaloga (z. B. Glycin Betain, Carnitin, Dimethylsulfoniopropionat), Sulfatester (z. B. Cholin-O-sulfat), *N*-acetylierte Diaminosäuren und kleine Peptide (z. B. *N*δ-Acetylorithin, *N*-Acetylglutamyglutaminamid Dimethylsulfoniopropionat), Sulfatester (z. B. Cholin-O-sulfat), *N*-acetylierte Diaminosäuren und kleine Peptide (z. B. *N*δ-Acetylorithin, *N*-Acetylglutamyglutaminamid) (Abb. 1) (da Costa *et al.* 1998; Bremer und Krämer 2000).



**Abb. 1** Typische kompatible Solute in *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya*

In Gram-positiven Bakterien weitverbreitete kompatible Solute sind grau unterlegt.

Kompatible Solute können bei niedriger Wasseraktivität der Umgebung in hohen Konzentrationen im Zytoplasma der Zelle angereichert werden, ohne die DNA-Replikation, regulatorische Vorgänge oder den Zellmetabolismus zu inhibieren (Brown 1976; Strøm und Kaasen 1993). Einerseits sorgen sie mittels ihrer osmotischen Aktivität für die Aufrechterhaltung des Turgors durch den Wiedereinstrom von Wasser aus der Umgebung in die Zelle, andererseits stabilisieren sie Proteine und andere zelluläre Makromoleküle *in vitro* und *in vivo* bei hoher Ionenstärke (Lippert und Galinski 1992; Göller *et al.* 1998; Malin *et al.* 1999; Bourrot *et al.* 2000; Courtenay *et al.* 2000; Samuel *et al.* 2000). Die von *Bacteria* und *Eucarya* akkumulierten kompatiblen Solute besitzen gemeinsame Eigenschaften wie Polarität, hohe Löslichkeit und fehlende Nettoladung bei physiologischem pH-Wert. Darüber hinaus interagieren sie nicht direkt mit Proteinen (Csonka 1989; Galinski und Trüper 1994). *Archaea* reichern dagegen häufig kompatible Solute an, die durch Carboxyl-, Sulfat- und Phosphatgruppen negativ geladen sind und somit als Gegenanionen für hohe intrazelluläre  $K^+$ -Konzentrationen wirken (Martin *et al.* 1999; Roberts 2000). Die proteinstabilisierenden, Chaperon-ähnlichen Eigenschaften kompatibler Solute lassen sich am besten durch das „preferential exclusion model“ beschreiben (Arakawa und Timasheff 1985; Baskakov und Bolen 1998) (Abb. 2): Kompatible Solute werden aufgrund energetisch ungünstiger Wechselwirkungen mit dem Peptidrückrad (Bolen und Baskakov 2001) bevorzugt von der direkten Hydrathülle der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Dies führt zu einer Ungleichverteilung der Solute im Zytoplasma und somit zu einer energetisch ungünstigen Situation. Um die Entropieabnahme gering zu halten, nehmen die Proteine ein möglichst kleines Volumen ein.



**Abb. 2** Proteinstabilisierung durch kompatible Solute

Dargestellt ist die Stabilisierung der dreidimensionalen Proteinstruktur durch kompatible Solute wie durch das „preferential exclusion“ Modell beschrieben: (A) Protein in nativer Konformation unter idealen Bedingungen; (B) Stabilisierung der Proteinstruktur durch den bevorzugten Ausschluss kompatibler Solute von der Hydrathülle des Proteins. (Abbildung aus Informationsunterlagen der Firma Bitop, Witten.)

Dies stabilisiert sowohl ihre native Konformation als auch die quartären Proteinstrukturen durch eine verstärkte Interaktion der einzelnen Proteinuntereinheiten (Incharoensakadi *et al.* 1986). Bei niedrigen pH-Werten verlieren kompatible Solute ihre proteinstabilisierenden Eigenschaften, da sich der ionische Charakter des Solut und des Proteins verstärkt. Das Solut interagiert direkt mit der Proteinoberfläche anstatt bevorzugt von ihr ausgeschlossen zu sein (Knapp *et al.* 1999).

Protein- und membranstabilisierende Eigenschaften kompatibler Solute sowie ihre Unterstützung bei der nativen Proteinfaltung konnten auch bei Hitze, Frost und Austrocknung *in vitro* beobachtet werden (Lippert und Galinski 1992; Vuillard *et al.* 1998; Canovas *et al.* 1999). Darüber hinaus besitzen diese Solute *in vivo* protektive Eigenschaften für bakterielle und pflanzliche Zellen bei Hitzestress (Fletcher und Csonka 1995; Malin und Lapidot 1996; Caldas *et al.* 1999; Canovas *et al.* 2001; Diamant *et al.* 2001) und Kältestress (Ko *et al.* 1994; Deshniem *et al.* 1997; Rajashekar *et al.* 1999; Bayles und Wilkinson 2000; Xing und Rajashekar 2001). Thermophile und hyperthermophile *Bacteria* und *Archaea* synthetisieren, wenn sie Hitzestress ausgesetzt sind spezielle kompatible Solute, wie cyclisches 2,3-Bisphosphoglycerat, Di-*myo*-Inositol-1,1'(3,3')-phosphat (DIP) und Mannosylglycerat. Diese kompatiblen Solute konnten nicht in mesophilen Prokaryoten nachgewiesen werden (Nunes *et al.* 1995; Martins *et al.* 1997; Lamosa *et al.* 1998; Silva *et al.* 1999). Vermutlich besitzen diese Solute spezielle thermoprotektive Eigenschaften, die bei extrem hohen Temperaturen wirksam werden.

## 2.1 Ectoine: weitverbreitete Stressprotektiva

Die Akkumulation von kompatiblen Soluten erfolgt entweder durch die direkte Aufnahme aus der Umwelt oder über die endogene Synthese. Zahlreiche Mikroorganismen besitzen beide Möglichkeiten der Solutanreicherung, bevorzugen aber aus energetischen Gründen die Aufnahme exogen vorhandener kompatibler Solute unter Stressbedingungen (Galinski und Trüper 1994). Aerobe chemoheterotrophe Mikroorganismen synthetisieren unter hochosmolaren Bedingungen typischerweise das kompatible Solut Ectoin (2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat) allein oder in Kombination mit anderen Osmolyten wie beispielsweise Hydroxyectoin (2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat) (Abb. 1) (Galinski 1995). Diese weitverbreiteten Osmolyte blieben lange Zeit unentdeckt, da das einzelne Elektronenpaar der beiden Stickstoffatome in eine delokalisierte  $\pi$ -Elektronenwolke eingebunden ist und daher mit den üblichen Aminosäurenachweisreagenzien keine Bindung eingehen kann. Ectoine lassen sich aber durch HPLC und NMR-Spektroskopie nachweisen. Ectoin wurde erstmals bei dem Gram-negativen, halophilen, phototrophen Schwefelbakterium *Ectothiorodospira halochloris* entdeckt (Galinski *et al.* 1985). Die endogene Synthese von Hydroxyectoin konnte gemeinsam mit der Ectoinproduktion zum ersten Mal im Actinomyceten *Streptomyces parvulus* nachgewiesen werden (Inbar und Lapidot 1988). Die weite Verbreitung von Ectoinen als Osmoprotektiva beruht vermutlich auf guten protektiven Eigenschaften

und einem energetisch günstigen Biosyntheseweg (Kap. 4.2.2 Einleitung) (Maskow und Babel 2001). Bisher konnte Ectoinakkumulation nur in *Bacteria* nachgewiesen werden. Aber auch transgenen Tabakpflanzen, die zur Ectoinsynthese befähigt wurden, verleiht die intrazelluläre Ectoinakkumulation Schutz bei hoher Osmolalität (Nakayama 2000).

Ectoine vereinen strukturelle Eigenschaften von Betainen und Prolin miteinander. Sie besitzen die gleiche Ladung und Ladungsverteilung wie Betaine und weisen eine Ringstruktur sowie acetylierte Diaminosäuren (NH-C=X) wie Prolin auf (Galinski 1993).



Ectoine werden als cyclische Kondensationsprodukte von *N*-acetylierten Diaminosäuren angesehen (Galinski 1993) und existieren als zwitterionische Moleküle in wässriger Lösung (Inbar *et al.* 1993). *Ab initio* Kalkulationen bestätigten zwei stabile, zwitterionische Ectoinstrukturen, die mit mehr als vier Wassermolekülen interagieren können (Suenobu *et al.* 1998). Ectoin und Hydroxyectoin besitzen enzymstabilisierende Eigenschaften bei Hitze, Kälte, Gefriertrocknung und unter dem Einfluss chaotrophen Harnstoffs, wie *in vitro* Experimente bestätigten (Lippert und Galinski 1992; Ramos *et al.* 1997; Göller *et al.* 1998; Knapp *et al.* 1999). Unter Hitzestress konnte *in vivo* die endogene Synthese von Ectoinen in *Streptomyces griseus* nachgewiesen werden (Malin und Lapidot 1996). Das Wachstum von *E. coli* bei hohen Temperaturen verbesserte sich durch exogen zugeführte Tetrahydropyrimidine (Ectoin und Hydroxyectoin) (Malin und Lapidot 1996). Die besonders guten protektiven Eigenschaften von Hydroxyectoin auf gefriergetrocknete Proteine und Bakterienzellen (Lippert und Galinski 1992; Louis *et al.* 1994) beruhen vermutlich auf der Substitution des entzogenen Wassers aus Proteinen und Membranen durch die OH-Gruppe des Solute (da Costa *et al.* 1998).

Die oben aufgeführten protektiven Eigenschaften lassen eine weite Nutzung der Ectoine in der Biotechnologie und Pharmakologie zu. Allerdings sind Ectoine, besonders Hydroxyectoin mit den zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen, nur kostspielig chemisch zu synthetisieren. Das von Sauer *et al.* 1998 beschriebene „Bakterienmelk-Verfahren“ ermöglicht die biotechnologische Gewinnung beider Solute aus halophilen und halotoleranten Bakterien, in denen die *de novo* Synthese von Ectoinen weit verbreitet ist. Mittlerweile wird Ectoin als Feuchthaltefaktor in Kosmetikcremes eingesetzt (Brigitte 12/2001). Zudem werden Ectoin und Hydroxyectoin als Bestandteile in Proteinstabilisierer-Kits verkauft (Firma Bitop, Witten). Durch den Einsatz von Ectoin konnte die periplasmatische Expression funktioneller rekombinanter Proteine unterstützt werden (Barth *et al.* 2000) und die Aktivität eines gereinigten bakteriellen Proteins bei erhöhter Temperatur länger aufrechterhalten werden (Hai *et al.* 2002).

### 3 Osmotische Adaptation in *Bacilli*

Das Genus *Bacillus* umfasst eine heterogene Gruppe aerober oder fakultativ aerober, endosporenbildender Bakterien, die in der Natur weitverbreitet sind. Viele Spezies dieses Genus können Lebensräume, die durch extreme physikalische und chemische Bedingungen gekennzeichnet sind, besiedeln. Die hohe morphologische und biochemische Diversität des Genus *Bacillus* machte seine Reklassifizierung unter Einbeziehung von 16S rRNA Sequenzen notwendig (Ash *et al.* 1991). Bis heute wurden neben dem Genus *Bacillus* acht weitere Genera klassifiziert. Diese rekrutieren sich mehrheitlich aus ehemaligen reklassifizierten *Bacillus* Spezies (Goto *et al.* 2000). Im einzelnen sind dies die Genera *Alicyclobacillus* (Wisotzkey *et al.* 1992), *Aneurinibacillus* (Shida *et al.* 1996b), *Brevibacillus* (Shida *et al.* 1996a), *Gracilibacillus* (Wainö *et al.* 1999), *Paenibacillus* (Ash *et al.* 1991; Ash *et al.* 1993), *Salibacillus* (Wainö *et al.* 1999) und *Virgibacillus* (Heyndrickx *et al.* 1998). Der typische Vertreter des Genus *Bacillus* ist *Bacillus subtilis*. Durch seine einfache Kultivierung und genetische Zugänglichkeit entwickelte er sich zu einem Gram-positiven Modellorganismus, dessen vollständige Genomsequenz heute bekannt ist (Kunst *et al.* 1997). Besonders intensiv wurde die Fähigkeit zur Endosporenbildung unter wachstumslimitierenden Umweltbedingungen in *B. subtilis* untersucht (Hoch 1993; Hoch 1998, 2000). Auch die physiologischen Anpassungsmechanismen vegetativer *B. subtilis* Zellen an die stark wechselnden, abiotischen Stressfaktoren in seinem natürlichen Habitat, den oberen Bodenschichten, sind in den letzten Jahren eingehend untersucht worden (Hecker und Völker 2001). Neben Nährstofflimitation inhibiert auch osmotischer Stress das Wachstum von *B. subtilis* im Freiland. Im Boden ist *B. subtilis* starken Schwankungen der Osmolalität durch Sonneneinstrahlung und Regenfälle sowie durch Auswaschung in Süß- oder Salzwasser ausgesetzt (Miller und Wood 1996). Zahlreiche physiologische und molekulare Anpassungen zur Aufrechterhaltung des Zellurgors unter hyper- und hypoosmolaren Bedingungen konnten in den letzten Jahren aufgeklärt werden (Kempf und Bremer 1998; Bremer und Krämer 2000). Verwandte Adaptationsmechanismen besonders an hochosmolaren Bedingungen existieren in dem nah verwandten, Gram-positiven Lebensmittelpathogen *Listeria monocytogenes* (Ko *et al.* 1994; Sleator *et al.* 1999; Fraser *et al.* 2000; Sleator *et al.* 2000; Sleator *et al.* 2001a; Sleator *et al.* 2001b; Sleator *et al.* 2001c) und dem Milchsäurebakterium *La. lactis* (Obis *et al.* 1999; van der Heide und Poolman 2000a). Diese Erkenntnisse unterstreichen den Modellcharakter der *B. subtilis* Anpassung an wechselnde Osmolalität für andere Gram-positive Bakterien mit niedrigem G + C-Gehalt der DNA.

*Bacilli* besitzen die Fähigkeit, unter Nährstofflimitation ebenso wie bei hohen Zelldichten Endosporen zu bilden, die gegen zahlreiche physikalische und chemische Stressfaktoren resistent sind und dem Bakterium die Überdauerung der limitierenden Umweltbedingungen erlauben. Kürzlich konnte ein Bakterium aus einem 250 Millionen Jahre alten Salzkristall isoliert werden, das eng mit den halotoleranten *Bacillus marismortui* und *Virgibacillus pantothenicus* verwandt ist (Vreeland *et al.* 2000). Vermutlich überlebte der *Bacillus*-Verwandte als Spore in den anaeroben Einschlüssen des Kristalls und keimte unter den optimalen Laborbedingungen wieder als vegetative Zelle aus. Die

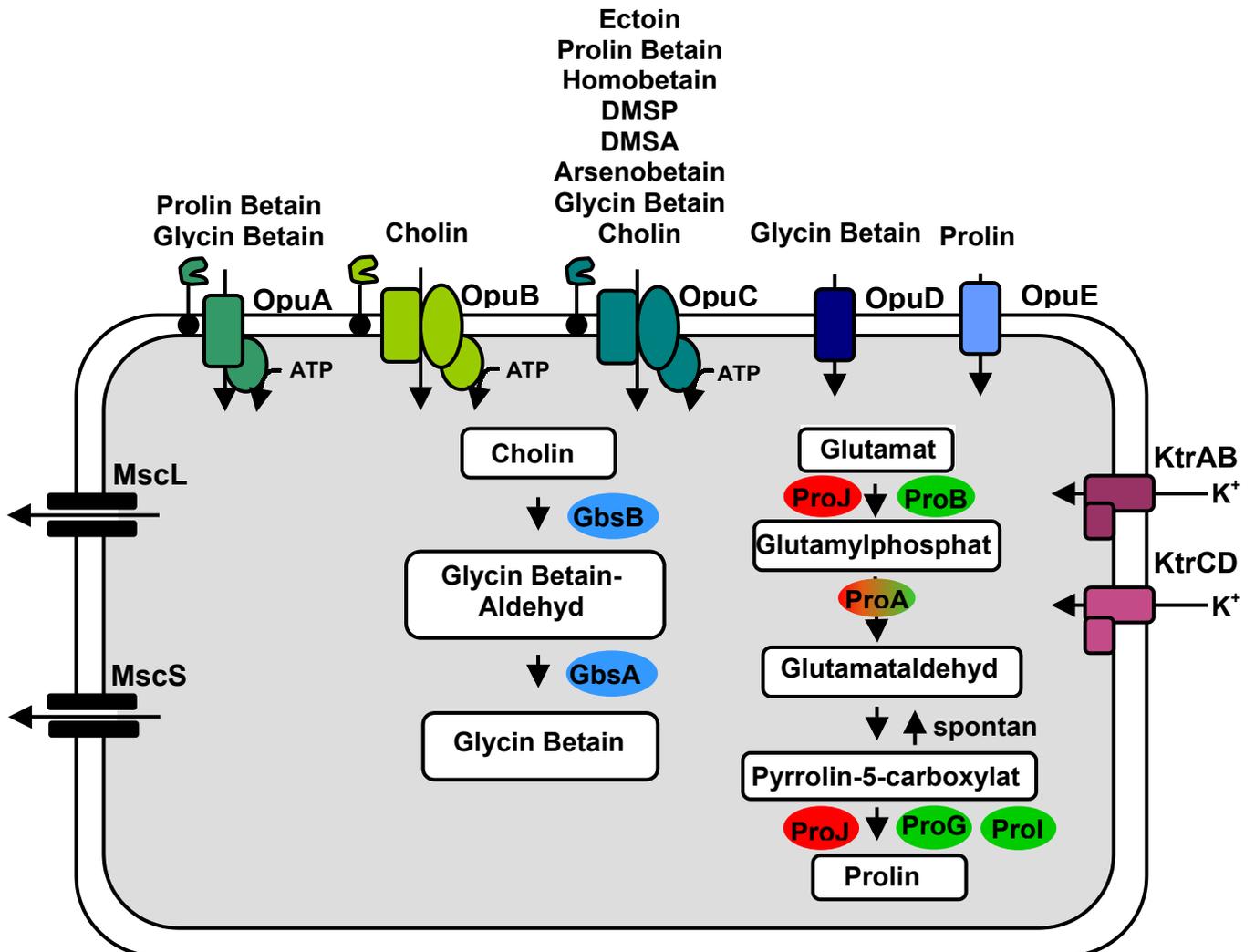
Endosporenbildung geht mit dem Tod der Sporenmutterzelle und dem zeitweisen Verlust der ökologischen Nische einher. Sporulation scheint aber nicht die bevorzugte Anpassungsreaktion von *Bacilli* an hochosmolare Bedingungen zu sein, da der mehrstufige Prozess der Sporulation unter Salzstress in Phase II abbricht (Ruzal *et al.* 1998). Die Aktivierung der frühen Sigmafaktoren  $\sigma^E$  und  $\sigma^F$  wird unter diesen Bedingungen blockiert und die Sporulationskaskade unterbrochen.

Die Besiedelung des Lebensraumes Boden erforderte die Entwicklung eines komplexen Regulationssystems, das der Zelle in der Stationärphase und unter verschiedenen Stresssituationen das Überleben sichert, ohne dass Sporulation und somit der temporäre Verlust der ökologischen Nische notwendig wird. Diese generelle Stressantwort in *Bacilli* und anderen Gram-positiven Bakterien wird durch eine Vielzahl von Umweltstressfaktoren wie Nährstoff- oder Sauerstoffmangel, Hitzeschock, Salz-, Ethanol-, Säure- und Alkalistress transient induziert (Hecker *et al.* 1996; Hecker und Völker 2001). Die Stressfaktoren aktivieren das *sigB*-Regulon, das seinerseits durch den alternativen Transkriptionsfaktor SigB ( $\sigma^B$ ) die direkte oder indirekte Expression von über 200 an der generellen Stressadaptation beteiligten Gene reguliert (Petersohn *et al.* 2001; Price *et al.* 2001). Die generelle Stressanpassung in Gram-positiven Bakterien ist auf physiologischer Ebene eng verwandt mit der Stressantwort, die vom alternativen Transkriptionsfaktor RpoS in Gram-negativen Bakterien vermittelt wird (Hengge-Aronis 1996; Loewen *et al.* 1998). Unter Salzstress wurde in *B. subtilis* eine gesteigerte Expression des  $\sigma^B$ -Regulons gemeinsam mit spezifischen ausschließlich osmotisch regulierten Genen festgestellt (Bernhardt *et al.* 1997). Eine *sigB* Mutante besaß nach einem hyperosmotischen, wachstumslimitierenden Salzschock eine deutlich verringerte Überlebensrate im Vergleich zum *B. subtilis* Wildtyp (Völker *et al.* 1999). Unter kontinuierlichen, moderat hochosmolaren Bedingungen besaß die Mutante gegenüber dem Wildtyp jedoch keinen Wachstumsnachteil (Boylan *et al.* 1993; von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter und Bremer 1998). Direkt nach einem hyperosmotischen Schock sorgt  $\sigma^B$  für die transiente Expression der Gene *opuD* und *opuE*, welche Transporter für die Aufnahme kompatibler Solute codieren. In hochosmolar adaptierten *B. subtilis* Kulturen erfolgt die Transkription beider Gene nicht  $\sigma^B$ -abhängig, sondern spezifisch osmotisch reguliert, solange der Stimulus andauerte (von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter und Bremer 1998). Es existieren in *B. subtilis* demnach zwei voneinander zu unterscheidende Signalkaskaden, die die spezifisch osmotische und die generelle Stressantwort kontrollieren.

### 3.1 Erste Reaktion auf hochosmolare Bedingungen: Aufnahme von $K^+$

Das in der Natur weit verbreitete Kalium wird in ionischer Form im Zytoplasma gespeichert. Selbst unter isoosmolaren Bedingungen ist Kalium das vorherrschende Ion mit Konzentrationen von 100 bis 150 mM im Zytoplasma von Mikroorganismen. Es ist an der Aufrechterhaltung des Turgors, des physiologischen pH-Wertes und an zahlreichen biochemischen Vorgängen beteiligt (Csonka und Hanson 1991). Direkt nach einem hyperosmolaren Schock akkumuliert *B. subtilis* hohe

Kaliummengen im Zytoplasma, die nach einiger Zeit aufgrund ihrer Unverträglichkeit für den Zellmetabolismus durch die Akkumulation kompatibler Solute ersetzt werden. Durch Zugabe von 0,4 M NaCl verdoppelt dieser innerhalb einer Stunde seine  $K^+$ -Konzentration von 315 mM auf 650 mM (Whatmore *et al.* 1990). *B. subtilis* besitzt zwei Kaliumtransportsysteme, KtrAB und KtrCD, die für die osmotisch induzierte Aufnahme verantwortlich sind und zu einer kürzlich entdeckten Kaliumtransporterfamilie (Ktr) in Mikroorganismen und Pflanzen gehören (Abb. 3) (Nakamura *et al.* 1998; Durell und Guy 1999; Holtmann 1999; Tholema *et al.* 1999). Ktr-Transporter bestehen aus einer Membrandomäne, die evolutionär mit den KcsA  $K^+$ -Kanälen verwandt ist, und einem membranassoziierten Polypeptid, das eine potentielle Nukleotid-Bindestelle besitzt. Das hochaffine Transportsystem KtrAB ist das wichtigste  $K^+$ -Aufnahmesystem unter hochosmolaren Bedingungen in *B. subtilis* (Holtmann, Bakker, Uozumi, Bremer eingereicht zur Veröffentlichung). Eine *B. subtilis* *ktrAB* Mutante kann nach einem hyperosmolaren Schock nicht mehr weiterwachsen, und eine



**Abb. 3 Adaptation von *B. subtilis* an hoch- und niederosmolare Bedingungen**

Dargestellt sind Systeme für die Aufnahme und den Ausstoß kompatibler Solute in *B. subtilis*. Des Weiteren ist der Prolinbiosyntheseweg für anabole Zwecke mit grün markierten und der unter hochosmolarem Stress aktive Prolinbiosyntheseweg mit rot markierten Enzymen dargestellt. ProA:  $\gamma$ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase; ProB/ProJ:  $\gamma$ -Glytamyl-Kinase; ProG/ProI/ProH:  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase. Der Glycin Betain Syntheseweg mit den blau markierten Enzymen GbsB: Typ-III-Alkohol-Dehydrogenase; GbsA: Glycin Betain-Aldehyd-Dehydrogenase ist ebenfalls dargestellt.

Doppelmutante beider Transportsysteme (KtrAB und KtrCD) besitzt auch unter kontinuierlich hochosmolaren Bedingungen einen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp (Holtmann 1999). Beide Transportsysteme spielen daher eine wichtige Funktion sowohl für die initiale Anpassung an osmotischen Stress als auch für das Wachstum unter andauernd hochosmolaren Bedingungen. In *E. coli* wird die Elektronenneutralität des Zytoplasmas nach einem hyperosmolaren Schock aufrechterhalten, indem der  $K^+$ -Influx an eine Glutamatakkumulation gekoppelt ist (Cayley *et al.* 1992; McLaggan *et al.* 1994). Die initiale  $K^+$ -Akkumulation nach einem hyperosmolaren Schock können in Mikroorganismen jedoch auch die Anreicherung anderer Anionen wie  $Cl^-$  sowie Putrescin Exkretion oder Protonenefflux begleiten (Killham und Firestone 1984; Csonka 1989). Gram-positive Bakterien haben generell unter osmotisch stressfreien Bedingungen einen hohen intrazellulären Glutamatpool, der 60% bis 90% der gesamten freien Aminosäuren im Zytoplasma umfasst (Clark *et al.* 1972; Poolman und Glaasker 1998). In *B. subtilis* verändert sich die intrazelluläre Glutamatkonzentration nach einer plötzlichen Erhöhung der Osmolalität kaum und scheint nicht mit der gesteigerten  $K^+$ -Aufnahme gekoppelt zu sein (Whatmore *et al.* 1990).

Gram-negative Bakterien wie *E. coli* synthetisieren nach einem hyperosmolaren Schock osmotisch reguliert Glutamat und steigern dabei die Glutamatkonzentration von 30 mmol/l auf durchschnittlich 300 mmol/l (McLaggan *et al.* 1994; Csonka und Epstein 1996). Das obere Limit der akkumulierten Glutamatmenge liegt bei ungefähr 500 mmol/l und wird oft nur transient erreicht, bevor in der zweiten Anpassungsphase an hochosmolare Bedingungen ungeladene kompatible Solute akkumuliert werden und so das  $K^+$ -Glutamat Ionenpaar ersetzen (Dinnbier *et al.* 1988; Welsh *et al.* 1991). Trotz der zentralen Funktion von  $\alpha$ -Glutamat für den bakteriellen Zellmetabolismus ist die genaue Regulation der Glutamatakkumulation unter hochosmolaren Bedingungen unbekannt. Möglicherweise stimulieren pH-Wert-Änderungen und/oder  $K^+$ -Ionen die  $\alpha$ -Glutamatsynthese durch die Aktivierung der Glutamatdehydrogenase (Poolman und Glaasker 1998). Das Isomer  $\beta$ -Glutamat, eine relativ gering verbreitete Aminosäure, wird von marinen methanogenen Bakterienspezies der Genera *Methanogenium* und *Methanococcus* (Robertson *et al.* 1990) sowie *Norcardiopsis* (Galinski und Trüper 1994) und *Thermotoga* (Martins *et al.* 1996) in Abhängigkeit von der Osmolalität des Mediums synthetisiert. Aber auch die unter hochosmolaren Bedingungen intrazellulär akkumulierten  $\beta$ -Glutamatkonzentrationen sind limitiert und vergleichbar mit den akkumulierten  $\alpha$ -Glutamatmengen. Vermutlich liegt die Ursache für die geringen Glutamatkonzentrationen in den gleichzeitig aufgenommenen  $K^+$ -Gegenionen. Diese sind in höheren Konzentrationen über einen längeren Zeitraum im Zytoplasma schädlich für die bakterielle Zellphysiologie. Darüber hinaus besitzt Glutamat bei physiologischem pH-Wert eine Nettoladung, die eine direkte Interaktion mit den polaren Bereichen der Proteinoberflächen ermöglicht, anstatt wie zwitterionische kompatible Solute, bevorzugt von dieser ausgeschlossen zu werden. Über einen längeren Zeitraum hinweg kann eine endogene, osmotisch regulierte Glutamatsynthese die Bakterien daher lediglich bei geringfügiger Erhöhung der externen Osmolalität schützen (da Costa *et al.* 1998).

### 3.2 Zweite Anpassungsphase: Synthese und Transport kompatibler Solute

Da hohe intrazelluläre  $K^+$ -Konzentrationen über einen längeren Zeitraum für den Zellmetabolismus zahlreicher Mikroorganismen schädlich sind, ersetzen sie  $K^+$ -Ionen bei kontinuierlich hochosmolarem Stress durchpatible Solute. Diese sind selbst in hohen Konzentrationen gut mit der Zellphysiologie verträglich, erhalten den positiven Turgor aufrecht und stabilisieren Proteine und Membranstrukturen unter osmotischem Stress. In *Bacilli* ist die *de novo* Prolin- und Ectoinsynthese unter hochosmolaren Bedingungen weitverbreitet. Darüber hinaus können Mikroorganismen vorgeformtepatible Solute aus der Umwelt durch hochaffine Transportsysteme aufnehmen. Generell wird aus energetischen Gründen der Transport gegenüber der *de novo* Synthese bevorzugt.

#### 3.2.1 Osmotisch regulierte Prolinsynthese

Prolin wird osmotisch reguliert von zahlreichen Bodenbakterien wie *Corynebacterium glutamicum* (Guillouet und Engasser 1995), *Streptomyces griseus* (Killham und Firestone 1984) und *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.* 1989) sowie von dem  $N_2$ -fixierenden, Gram-negativen Bakterium *Azospirillum brasilense* (Madkour *et al.* 1990) synthetisiert. Seine protektiven Eigenschaften machen es darüber hinaus zu dem weitverbreitetesten kompatiblen Solut in Pflanzen, die osmotischem Stress ausgesetzt sind (Delaunay und Verma 1993). Prolin kann Pflanzen zudem vor oxidativem Stress und vor freien Radikalen schützen (Hong *et al.* 2000).

Seit über 25 Jahren ist bekannt, dass *B. subtilis* unter hochosmolaren Bedingungen Prolin akkumuliert (Measures 1975). Whatmore *et al.* (1990) zeigten, dass die intrazelluläre Prolinkonzentration in *B. subtilis* von 16 mM auf 700 mM anstieg, wenn das Bakterium einem moderaten osmotischen Schock von 0,4 M NaCl ausgesetzt worden war und das Medium keine osmoprotektiv wirkenden Substanzen enthielt. War dem Medium dagegen daspatible Solut Glycin Betain zugesetzt, wurde kein Prolin synthetisiert. Die intrazellulär akkumulierte Prolinkonzentration steht in linearer Abhängigkeit zur externen Osmolalität (Brill und Bremer 2002). Die Steigerung der Prolinsynthese ist vermutlich von der vorhergehenden Akkumulation der  $K^+$ -Ionen abhängig. Der Anstieg der  $K^+$ -Ionenkonzentration könnte ein Signal für die Zelle sein, um osmotische Änderungen zu perzipieren (Whatmore und Reed 1990).

Die anabolen Prolinbiosynthese umfasst in zahlreichen Mikroorganismen wie beispielsweise *E. coli* drei Reaktionen (Abb. 3). Im ersten Reaktionsschritt wird Glutamat zu  $\gamma$ -Glutamylphosphat durch ProB, einer  $\gamma$ -Glutamylkinase, phosphoryliert. Im zweiten Reaktionsschritt wird  $\gamma$ -Glutamylphosphat durch eine  $\gamma$ -Glutamylphosphatreduktase (ProA) zu Glutamat- $\gamma$ -semialdehyd reduziert. Das Aldehyd

zyklisiert dann, unter Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$ , spontan zu  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat. Im letzten Reaktionsschritt wird  $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylat durch eine Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase (ProC) zu Prolin reduziert (Leisinger 1996). Die Aktivität des ersten Enzyms dieser Reaktionsfolge ProB unterliegt bei verschiedenen Mikroorganismen einer Endprodukthemmung, d. h.: Schon bei geringen Prolinkonzentrationen stoppt die Biosynthese, und Prolin kann nicht in osmoprotektiv relevanten Mengen akkumuliert werden (Leisinger 1996; Sleator *et al.* 2001c). Demnach muss in *B. subtilis* und anderen prolinakkumulierenden Mikroorganismen eine spezifischere Anpassung an hochosmolare Bedingungen vorliegen, die die Synthese dieser Aminosäure auch bei sehr hohen intrazellulären Prolinkonzentrationen erlaubt. Denkbar wäre: (i) Durch osmotischen Stress bedingte Modifikationen der  $\gamma$ -Glutamykinase könnte die allosterische Endprodukthemmung des Enzyms aufgehoben werden. Einzelne Aminosäuresubstitutionen in ProB Gram-negativer Bakterien führten zu einer Aufhebung der Inhibition durch hohe intrazelluläre Prolinkonzentrationen und zu einer Überproduktion von Prolin (Dandekar und Uratsu 1988; Sleator *et al.* 2001c). Die Mutanten waren deutlich osmotoleranter als der Wildtyp (Leisinger 1996; Sleator *et al.* 2001c). (ii) Eine weitere Möglichkeit wäre ein zweiter Prolinbiosyntheseweg, der erst unter hochosmolaren Bedingungen aktiviert wird und nicht durch Prolin inhibiert wird.

Kürzlich konnten die molekularen Details der osmotisch regulierten Prolinbiosynthese in *B. subtilis* aufgeklärt werden. Demnach besitzt *B. subtilis* einen zweiten Syntheseweg für die osmotisch regulierte Prolinproduktion, der mit dem Prolinbiosyntheseweg für anabole Zwecke verbunden ist (Abb. 3) (Brill und Bremer 2002). Zwei Isoenzyme, ProH ( $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-Carboxylreduktase) und ProJ ( $\gamma$ -Glutamykinase), ersetzen unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen die unter isoosmotischen Bedingungen aktiven Proteine ProB, ProI/ProG des anabolen Prolinbiosyntheseweges (Belitsky *et al.* 2001). Beide Biosynthesewege sind über ProA ( $\gamma$ -Glutamyolphosphatreduktase) miteinander verbunden (Brill und Bremer 2002). *B. subtilis* nutzt für die anabole und die hochosmolare Prolinbiosynthese ähnliche Enzyme, aber beide Synthesewege unterscheiden sich entsprechend der physiologischen Funktion in ihrer Regulation. Das *proHJ*-Operon wird unter der Kontrolle des „Housekeeping“-Transkriptionsfaktors ( $\sigma^A$ ) von *B. subtilis* osmotisch reguliert transkribiert (Brill und Bremer 2002). Die Signaltransduktionskaskade für die spezifische osmotische Regulation der Prolinbiosynthese in *B. subtilis* konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Die osmotisch regulierte Prolinbiosynthese in *B. subtilis* warf die Frage auf, ob die meisten *Bacilli* Prolin unter hochosmolaren Bedingungen endogen synthetisieren und als dominantes kompatibles Solut nutzen. Grundlegende Untersuchungen der *de novo* synthetisierten Osmoprotektiva aerober chemoheterotropher Bakterien zeigten, dass nicht Prolin das weitverbreiteteste endogen synthetisierte kompatible Solut Gram-positiver Mikroorganismen ist, sondern das Aminosäurederivat Ectoin (Galinski und Trüper 1994). *B. subtilis* gehört als Prolinsynthetisierer, der nicht in der Lage ist, Ectoin zu produzieren, zu einer Minderheit der untersuchten Bakterien.

### 3.2.2 Osmotisch regulierte Ectoinsynthese

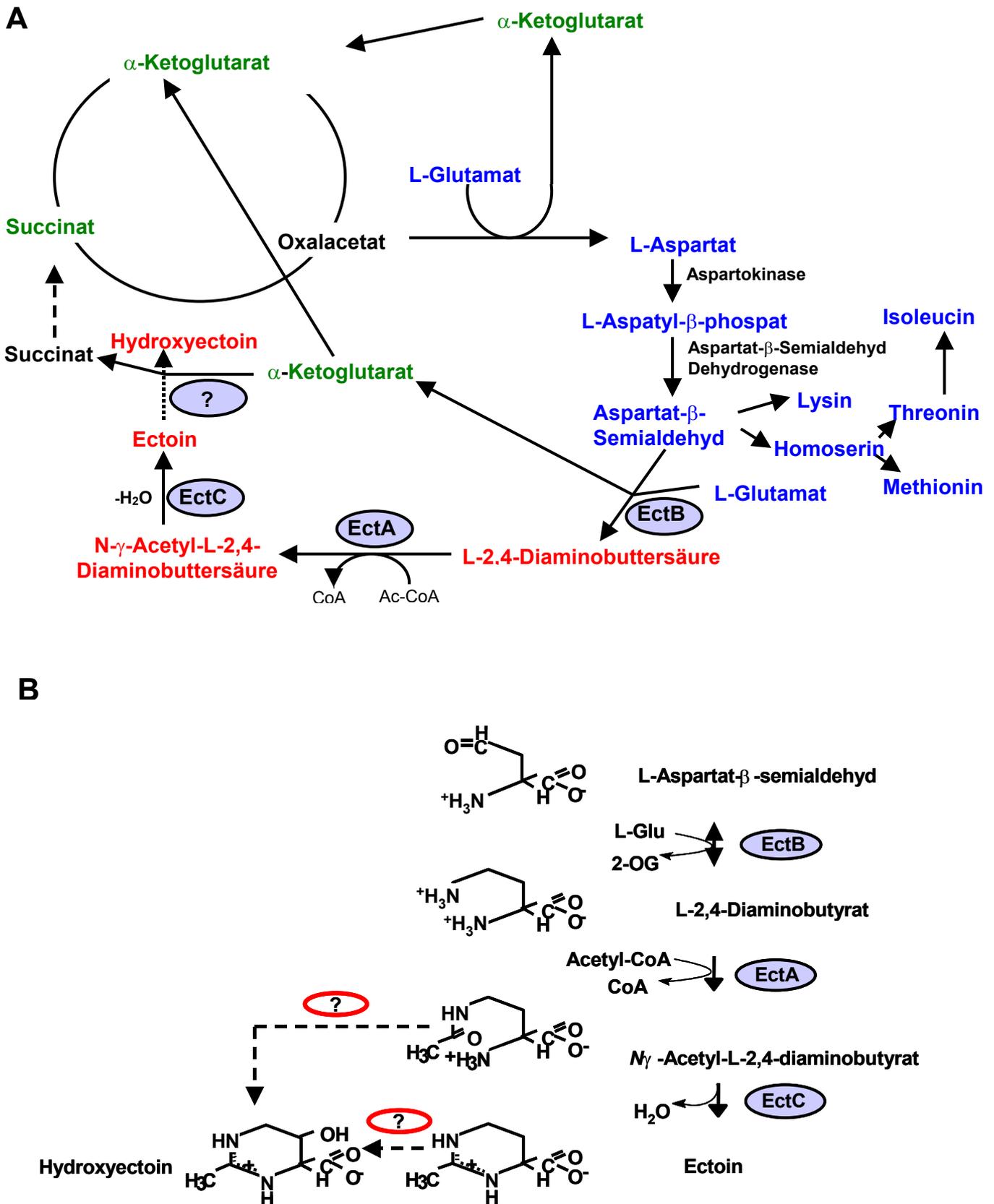
Galinski und Trüper demonstrierten 1994 die weite Verbreitung der *de novo* Ectoinsynthese unter hochosmolaren Bedingungen in aeroben chemoheterotrophen Mikroorganismen im Allgemeinen sowie in halotoleranten und halophilen Bakterien im Besonderen. In bisher 18 Spezies des Genus *Bacillus* und verwandter Genera, die per Definition (Kusher und Kamekura 1988) als halophil oder halotolerant klassifiziert werden (Arahal und Ventosa 2001), konnte endogene Ectoinsynthese nachgewiesen werden. So synthetisieren *Sporosarcina* (früher *Bacillus*) *pasteurii* (Yoon *et al.* 2001) und *Virgibacillus* (früher *Bacillus*) *pantothenticus* (Heyndrickx *et al.* 1998) sowie die moderat halophilen Spezies *Bacillus haloalcalophilus* und *Bacillus halophilus* (Galinski und Trüper 1994; Ventosa *et al.* 1998b) unter hochosmolarem Stress *de novo* Ectoin. Eine osmotisch regulierte Ectoinsynthese konnte für *S. pasteurii* und *V. pantothenticus* belegt werden (Kuhlmann 1998). Für *V. pantothenticus* wurde zudem erstmals eine osmotisch induzierte Prolinsynthese nachgewiesen (Kuhlmann 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ectoinbiosynthese in diesen beiden Gram-positiven *Bacillus* verwandten Spezies eingehend auf physiologischer und molekularer Ebene untersucht. *V. pantothenticus* wurde von Proom und Knight aus salinem Boden isoliert und 1950 beschrieben. Es ist der einzige *Bacillus*, der eine Auxotrophie für Pantothersäure besitzt (Proom und Knight 1950; Claus und Berkeley 1986). Sein Wachstum wird bei NaCl-Konzentrationen von 0,5 M stimuliert und durch 1,8 M NaCl nicht inhibiert. *S. pasteurii* wurde aus harnstoffhaltigem Boden isoliert (Chester 1898) und ist durch eine hochaktive Urease in der Lage, Habitate mit hohen Harnstoffkonzentrationen zu besiedeln. Er wurde nach dem französischen Chemiker und Bakteriologen Louis Pasteur benannt (Claus und Berkeley 1986). *S. pasteurii* benötigt Harnstoff für sein Wachstum (Proom und Knight 1950). Dieser wird in kurzer Zeit vollständig zu Ammoniak umgesetzt, der das Zytoplasma alkalisiert und so vermutlich mehrere membrangebundene, durch den intrazellulären pH-Wert regulierte Systeme aktiviert und eine bessere ATP-Synthese ermöglicht (Jahns 1998).

Verschiedene andere Gram-positiver Bodenbakterien wie *Brevibacteria* (Frings *et al.* 1993) (Jebbar *et al.* 1995) und *Streptomyces* (Inbar und Lapidot 1988) sowie das Gram-positive marine Bakterium *Marinococcus halophilus* (Severin *et al.* 1992) synthetisieren Ectoin allein oder in Kombination mit Hydroxyectoin. Auch in Gram-negativen Bakterien ist die Ectoinsynthese unter hochosmolaren Bedingungen weitverbreitet und wurde besonders intensiv in *Halomonas elongata* (DSM 2581) (Göller und Galinski 1998) und *Chromohalobacter salexigens* (früher *Halomonas elongata* DSM 3043 (Arahal *et al.* 2001)) (Canovas *et al.* 1998; Canovas *et al.* 1999) untersucht. Ebenfalls synthetisieren Gram-negative, aus salzhaltigen und alkalischen Habitaten stammende, methanotrophe Bakterien, die eine wichtige Funktion bei Senkung der Methanemission in die Atmosphäre spielen, als Anpassung an ihre spezifischen Lebensräume Ectoin (Khmelenina *et al.* 1999).

Der Ectoinbiosyntheseweg wurde in *Halomonas elongata* (Peters *et al.* 1990) und *St. parvulus* (Inbar und Lapidot 1988) aufgeklärt (Abb. 4B). Später konnten die an der Ectoinsynthese beteiligten Enzyme aus *H. elongata* gereinigt und charakterisiert werden (Min-Yu *et al.* 1993; Ono *et al.* 1999). Der Ausgangspunkt der Ectoinsynthese ist Aspartat- $\beta$ -semialdehyd, ein Intermediat des Aminosäurestoffwechsels. Aus dem Intermediat des Zitratzyklus Oxalacetat und aus L-Glutamat wird durch eine Aspartat-Aminotransferase L-Aspartat gebildet, welches durch eine Aspartokinase und eine Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Dehydrogenase in L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd umgewandelt wird (Abb. 4A). Die Konzentration des Aminosäurestoffwechselintermediates L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd muss in osmotisch gestressten Zellen hoch sein, um einerseits die weitere Biosynthese der Aminosäuren Lysin, Threonin, Isoleucin und Methionin sicherzustellen und andererseits dem Bakterium die Synthese großer Mengen des kompatiblen Solutes Ectoin zu ermöglichen. Die eigentliche Ectoinbiosynthese umfasst drei Schritte (Abb. 4B). Das erste an der Ectoinsynthese beteiligte Enzym EctB ist eine L-Diaminobutyrratransaminase, die die Umsetzung von Aspartat- $\beta$ -semialdehyd zu L-2,4-Diaminobutyrat katalysiert. EctB gehört zur Subgruppe II der Aminotransferasen (Mehta *et al.* 1993) und liegt vermutlich als Homohexamer im Zytoplasma vor. EctB ist eine pyridoxalphosphat-abhängige Aminotransferase, die durch  $K^+$  stabilisiert wird und L-Glutamat als Aminogruppendonor nutzt (Ono *et al.* 1999). Im zweiten Reaktionsschritt wird L-2,4-Diaminobutyrat durch die L-Diaminobutyrat-Acetyltransferase (EctA) mit Acetyl-CoA als Acetylgruppdonor zu N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-diaminobutyrat umgewandelt. In einem dritten Reaktionsschritt wird unter Wasserabspaltung N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-diaminobutyrat zu Ectoin umgewandelt. Dieser Schritt wird durch die für N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-diaminobutyrat hoch spezifische N- $\gamma$ -Acetyldiaminobutyrat Dehydratase (Ectoinsynthase, EctC) katalysiert. Die Aktivität der drei Enzyme lässt sich *in vitro* durch die Zugabe von 0,5 M NaCl steigern (Ono *et al.* 1999). Dieser Effekt deutet auf eine posttranskriptionelle Aktivierung *in vivo* durch hochosmolare Bedingungen hin.

Die Ectoinbiosynthese läuft sehr effizient ab. Die aufzuwendende biologisch nutzbare Energie ist sehr gering. Annähernd 100% des Kohlenstoffsubstrates Glukose werden in Ectoin umgewandelt (Maskow und Babel 2001). Mit Aspartat- $\beta$ -semialdehyd und Acetyl-CoA als Metabolite für die Ectoinsynthese konnten der theoretische Ertrag und der Energieaufwand der Synthese des kompatiblen Solutes berechnet werden. Die Bedingungen für diese Berechnungen waren: Glukose wird über den Embden-Meyerhof-Parnas-(EMP) und den Entner Doudoroff-(ED) Weg vom Bakterium assimiliert und der Vorläufer Oxalacetat über heterotrophe  $CO_2$ -Fixierung (1) oder die Glykolyse (2) synthetisiert.



**Abb. 4 Ectoinbiosynthese in aeroben chemoheterotrophen Bakterien**

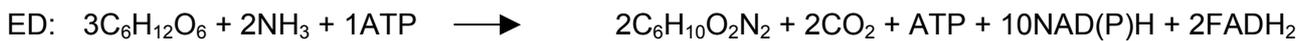
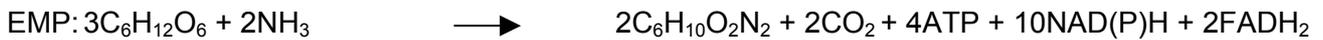
Dargestellt ist die Synthese von Tetrahydropyrimidinen und ihren Vorläufermolekülen. (A) Zwischenprodukte des Citratzyklus (■), Intermediate des Aminosäurestoffwechsels (■) und die Produkte der Tetrahydropyrimidinsynthese (■) sind markiert. (B) Ectoin- und potentielle Hydroxyectoinbiosynthesewege: EctA: Acetyltransferase, EctB: Aminotransferase, EctC: Ectoinsynthese. L-Glu: L-Glutamat;  $\alpha$ -Keto:  $\alpha$ -Ketoglutarat.

Unter diesen Voraussetzungen lauten die Reaktionsgleichungen für die Ectoinsynthese:

(1) Pyruvatcarboxilierung



(2) Glykolyse



Die drei Ectoinbiosyntheseenzyme sind im Genom von *M. halophilus* (Louis und Galinski 1997), *H. elongata* (Göller *et al.* 1998) und *Ch. salexigens* als *ectABC*-Gencluster organisiert. Die drei Gencluster sind in Organisation, Größe und abgeleiteter Aminosäuresequenz hoch konserviert. Durch heterologe PCR-Primer, die von den DNA-Sequenzen der Gencluster abgeleitet worden waren, konnte ein Teil der Ectoinsynthesegene aus dem Bacillus-Verwandten *S. pasteurii* isoliert werden (Kuhlmann 1998). Dieses DNA-Fragment stellte ein wichtiges Werkzeug für die detaillierte molekularbiologische Untersuchung der Ectoinsynthese in *Bacilli* im Rahmen der vorliegenden Arbeit dar. Die molekularen Grundlagen der Ectoinbiosynthese in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien war weitgehend ungeklärt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass das *ectABC*-Cluster aus *M. halophilus* osmotisch reguliert in *E. coli* zur Expression gebracht werden kann (Louis und Galinski 1997; Bestvater und Galinski 2002). Die Ectoinbiosynthesegene aus *Ch. salexigens* konnten dagegen nicht im heterologen Wirt *E. coli* funktionell zur Expression gebracht werden (Canovas *et al.* 1998). Die bedeutende integrale Stellung der Ectoinbiosynthese für die Anpassung und das Wachstum unter hochosmolarem Stress konnte durch den deutlichen Wachstumsnachteil ectoinbiosynthese-defizienter Stämme von *H. elongata* und *Ch. salexigens* demonstriert werden (Canovas *et al.* 1997; Göller *et al.* 1998). In zahlreichen Bakterien ist die Ectoinbiosynthese insbesondere in der stationären Wachstumsphase mit der Hydroxyectoinproduktion gekoppelt (Galinski und Trüper 1994). In *H. elongata* wurde in einer *ectA* Mutante keine Ectoinproduktion und auch keine Hydroxyectoinsynthese festgestellt, so dass ein Syntheseschritt zur Hydroxyectoinbildung, katalysiert durch eine Hydroxylase mit Ectoin als Substrat, vermutet wurde (Abb. 4) (Göller *et al.* 1998). In *Ch. salexigens* deuten die intrazellulär akkumulierten kompatiblen Solute in osmotisch gestressten *ectA* und *ectC* Mutanten auf zwei Biosynthesewege für die Hydroxyectoinproduktion hin (Canovas *et al.* 1999). Ein Biosyntheseweg soll Ectoin als direkten Vorläufer nutzen. Ein alternativer Weg verwendet das Intermediat der Ectoinsynthese N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-diaminobutyrat ohne Beteiligung von Ectoin als Substrat für die Hydroxyectoinsynthese (Abb. 4B) (Canovas *et al.* 1999). Aber der Biosyntheseweg der Hydroxyectoinproduktion und seine Regulation wurden bisher nicht aufgeklärt.

### 3.2.3 Osmotisch regulierte Glycin Betain Synthese

Als Gegenstück zu Ectoin, den typisch endogen produzierten kompatiblen Solut aerober chemoheterotropher Mikroorganismen, ist die *de novo* Synthese von Glycin Betain in halophilen und halotoleranten phototrophen Cyanobakterien (Reed *et al.* 1986; Sibley und Yopp 1987), extrem halophilen Archaeen (Lai und Gunsalus 1992; Lai *et al.* 1999) und zahlreichen höheren Pflanzen bei osmotischem Stress verbreitet. Auch das phototrophe haloalkalophile Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris*, das ebenfalls Ectoin synthetisieren kann, produziert Glycin Betain *de novo* (Galinski und Trüper 1982; Galinski *et al.* 1985; Galinski und Herzog 1990). Der extrem halophile Actinomycet *Actinopolyspora halophila* ist eines der wenigen heterotrophen Bakterien, das Glycin Betain *de novo* aus einfachen Kohlenstoffverbindungen wie Glycin synthetisieren kann (Severin *et al.* 1992; Nyssola *et al.* 2000). Die Biosynthese umfasst drei aufeinanderfolgende Methylierungsschritte über die Zwischenstufen Sarcosin und Dimethylglycin mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppendedonator (Nyssola *et al.* 2000; Nyssola *et al.* 2001). Die *de novo* Synthese von Glycin Betain ist sehr kostspielig für die Zelle, da die Regeneration einer aktiven Methylgruppe des S-Adenosylmethionins 12 ATP Äquivalente verbraucht (Atkinson 1977). Sie ist deswegen vermutlich in heterotrophen Bakterien nicht verbreitet. *A. halophila* besitzt noch einen zweiten, energetisch günstigeren Glycin Betain Syntheseweg: Wie *B. subtilis* und zahlreiche andere Mikroorganismen (Landfald und Strøm 1986; Boch *et al.* 1994) oxidiert *A. halophila* aus der Umgebung aufgenommenes Cholin in zwei Schritten zum Glycin Betain (Nyssola und Leisola 2001).

*B. subtilis* besitzt zwei ABC-Transportsysteme für die Aufnahme von Cholin, die eine Sequenzidentität von 80% besitzen und vermutlich aus einer Genduplikation hervorgegangen sind (Kappes *et al.* 1999). Cholin liegt im Boden durch den mikrobiellen Abbau von tierischen und pflanzlichen cholinhaltigen Phospholipiden vor. Die beiden Transportsysteme für die Cholinaufnahme in *B. subtilis* besitzen trotz der hohen Sequenzidentität unterschiedliche Substratspektren. OpuC (Osmo Protectant Uptake) transportiert verschiedene kompatible Solute (Kappes *et al.* 1998), während OpuB ausschließlich Cholin mit hoher Affinität aufnimmt (Abb. 3) (Kappes *et al.* 1999). Das Enzym GbsB (Glycin Betain Synthesis), eine Typ III Alkohol-Dehydrogenase, katalysiert den ersten Schritt der Synthese, die Oxidation von Cholin zum Glycin Betain-Aldehyd. Der zweite Schritt, die Oxidation vom Glycin Betain-Aldehyd zu Glycin Betain, wird von GbsA, einer Glycin Betain-Aldehyd-Dehydrogenase katalysiert (Abb. 3) (Boch *et al.* 1996). Die Expression des Glycin Betain-Syntheseoperons *gbsAB* wird lediglich durch zugeführtes Cholin stimuliert, wohingegen die Transkription des *opuB*-Operons zusätzlich durch erhöhte Osmolalität induziert wird (Nau-Wagner *et al.* 1999). Der stromaufwärts von *gbsAB* codierte, entgegengesetzt orientierte Cholinsensor GbsR reguliert als Repressor sowohl die Transkription des *gbsAB*-Operons als auch die des *opuB*-Operons. Dies geschieht in Abhängigkeit von der exogenen CholinKonzentration (Nau-Wagner und Bremer persönliche Mitteilung)(Bremer 2002). GbsR koordiniert somit die Glycin Betainsynthese durch die gleichzeitige Kontrolle der Cholinaufnahme und der Transkription der Synthesegene.

### 3.2.4 Aufnahme kompatibler Solute in *B. subtilis*

Die verschiedenen Habitate von *Bacilli* (Boden, Rhizosphäre von Pflanzenwurzeln) bieten eine Vielzahl vorgeformter kompatibler Solute, die durch hypoosmotisch gestresste Mikroorganismen, Wurzelexudate und durch den Abbau mikrobieller, pflanzlicher und tierischer Zellen in das Ökosystem Boden eingetragen worden sind (Welsh 2000). Mikroorganismen sind über hoch effiziente Transportsysteme in der Lage, diese vorgeformten kompatiblen Solute aus der Umwelt aufzunehmen und im Zytoplasma anzureichern. Die Solute ermöglichen den Mikroorganismen das Überleben und das Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen wie hoher Osmolalität (Kempf und Bremer 1998; (Bremer und Krämer 2000) und Hitze und Kälte (Bayles 1993; Malin und Lapidot 1996; Caldas *et al.* 1999; Canovas *et al.* 2001).

*B. subtilis* akkumuliert vorgeformte kompatible Solute aus der Umwelt, die strukturell mit der Aminosäure Prolin, der trimethylierten Ammoniumverbindung Glycin Betain und dem Tetrahydropyrimidin Ectoin verwandt sind (Bremer 2002). Er nutzt jedoch unter hochosmolaren Bedingungen keine Zucker wie Trehalose, das endogen synthetisierte Osmolyt in *E. coli* (Dinnbier *et al.* 1988; Kempf und Bremer 1998). Verschiedene Transportsysteme (OpuA bis OpuE) mit sich überschneidenden Substratspezifitäten und Energiekopplungsmechanismen ermöglichen *B. subtilis* die Aufnahme einer Vielzahl vorgeformter kompatibler Solute aus der Umwelt. Alle Transporter haben hohe Affinitäten für ihre Substrate mit mikromolaren  $K_m$ -Werten und erlauben die Aufnahme von Soluten, selbst wenn diese in geringsten Konzentrationen in der Umwelt vorliegen. Die hohe Transportkapazität ( $V_{max}$ ) der Opu-Systeme ermöglicht zusätzlich die schnelle zytoplasmatische Akkumulation ihrer Substrate.

*B. subtilis* besitzt nur einen Transporter für die Prolinaufnahme unter hochosmolaren Bedingungen, den substratspezifischen Einzelkomponententransporter OpuE (von Blohn *et al.* 1997). Das OpuE-System gehört zur Familie der SSS-Transporter (Sodium/Solute Symporter) (Reizer *et al.* 1994; Saier 2000), der auch Transporter aus Eukaryoten angehören, die dort die Substrataufnahme durch den Symport von  $Na^+$ -Ionen energetisieren. OpuE dient nicht nur der Prolinaufnahme aus exogenen Quellen, sondern sorgt auch für den Retransport von aus der Zelle ausgetretenem Prolin (von Blohn *et al.* 1997). Der Prolingradient über der Zytoplasmamembran durch die *de novo* Synthese bei hoher Osmolalität ist vermutlich so groß, dass *B. subtilis* endogen synthetisiertes Prolin an seine Umgebung verliert. Dieses wird aber unmittelbar über OpuE wieder in die Zelle zurücktransportiert (von Blohn *et al.* 1997; Moses 1999). Der Glycin Betain Transporter OpuD ist wie OpuE ein sekundäres Aufnahmesystem, gehört aber zur BCCT-Transporterfamilie (Betain Cholin Carnitin Transporter) (Tab. 18) (Kappes *et al.* 1996) (Reizer *et al.* 1994; Saier *et al.* 1999). Dieser Transporterfamilie gehören ausschließlich bakterielle Transporter wie BetT und CaiT aus *E. coli* (Lamark *et al.* 1991; Eichler *et al.* 1994), BetL aus *L. monocytogenes* (Gerhardt *et al.* 1996; Sleator *et al.* 1999) und BetP sowie EctP aus *C. glutamicum* (Peter *et al.* 1996; Peter *et al.* 1998b) an. Die

Transporter koppeln die Solutaufnahme mit einer Na<sup>+</sup>-Aufnahme. BCCT-Transporter besitzen eine hohe Substratspezifität für methylierte Ammoniumverbindungen wie Glycin Betain und Carnitin. Der einzige nicht osmotisch regulierte Transporter dieser Familie ist CaiT (Eichler *et al.* 1994). Er nimmt Carnitin zu Stoffwechszwecken in *E. coli* auf. Wie BetP (Rübenhagen *et al.* 2000; Rübenhagen *et al.* 2001) wird OpuD im Gegensatz zu OpuE durch eine plötzliche Erhöhung der externen Osmolalität aktiviert (Kappes *et al.* 1996; von Blohn *et al.* 1997). Diese posttranslationelle Aktivierung von OpuD ermöglicht *B. subtilis* die sofortige Aufnahme von Glycin Betain bei osmotischem Stress. Die Expression der *opuE* und *opuD* Gene ist mit der generellen  $\sigma^B$ -kontrollierten Stressantwort in *B. subtilis* verknüpft, aber beide Gene werden auch von einem zweiten,  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor kontrolliert (von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter und Bremer 1998; Spiegelhalter 1999). Eine plötzliche Erhöhung der Osmolalität stimuliert die Expression des  $\sigma^B$ -Regulons (Price 2000; Hecker und Völker 2001). Entsprechend wird auch die Expression von *opuE* und *opuD* unter diesen Bedingungen durch  $\sigma^B$  induziert (Kappes *et al.* 1996; von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter und Bremer 1998; Spiegelhalter 1999). Diese Induktion wird unmittelbar aktiv, ist aber nur vorübergehend. In *B. subtilis* Zellen, die längere Zeit erhöhter Osmolalität ausgesetzt sind, erfolgt die Transkription beider Gene ausschließlich durch den  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor in Abhängigkeit von Stärke und Dauer des osmotischen Stresses. Die osmotische Regulation des  $\sigma^A$ -abhängigen Promotors erfolgt vollständig unabhängig vom  $\sigma^B$ -Regulon. Dies deutet auf zwei unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden in *B. subtilis* hin: Die eine beruht auf den osmosensorischen und osmoregulatorischen Proteinen des  $\sigma^B$ -Regulons, die andere auf bisher unidentifizierten Sensoren und Regulatoren der spezifischen osmotischen Stressantwort.

Die kompatiblen Solut Transporter OpuA, OpuB und OpuC gehören zur ABC (ATP Binding Cassett)-Transporterfamilie, die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten weitverbreitet ist und die Soluttranslokation durch die Hydrolyse von ATP energetisiert (Abb. 3) (Kempf und Bremer 1995; Kappes *et al.* 1996). Das *opuA*-Operon besteht aus drei Genen, die eine membranassoziierte ATPase (OpuAA), eine Transmembrankomponente (OpuAB) und ein Substratbindeprotein (OpuAC) codieren. Das *opuB*- und das *opuC*-Operon bestehen aus vier Genen und unterscheiden sich von OpuA durch jeweils eine zweite Transmembrankomponente (OpuCD bzw. OpuBD). Da *B. subtilis* keine äußere Membran besitzt, sind die Bindeproteine dieser Transporter, im Gegensatz zum dem im Periplasma von *E. coli* frei beweglichen Bindeprotein des verwandten ABC-Transporters ProU, über eine N-terminale Lipidmodifikation in der Zytoplasmamembran verankert (Kempf *et al.* 1997). In dem Gram-positiven Bakterium *La. lactis* konnte ein OpuA-Homolog mit einem für Prokaryoten erstmals entdeckten Aufbau identifiziert werden. Dieser ABC-Transporter besteht aus nur zwei Untereinheiten: Der membranassoziierten ATPase (OpAA) und einer Fusion der Translokatorodomäne mit der Substratbindeinheit (OpuBC) (Obis *et al.* 1999; van der Heide und Poolman 2000a). Auch in *L. monocytogenes* konnte ein OpuA- (Ko *et al.* 1994) und ein OpuC-Homolog (Fraser *et al.* 2000; Sleator *et al.* 2001b) identifiziert werden, die einen identischen Aufbau der *B. subtilis* Transporter

aufweisen. OpuA ist das dominante Glycin Betain Transportsystem in *B. subtilis*, da es über eine höhere Transportkapazität als die beiden anderen Glycin Betain Transporter OpuC und OpuD verfügt (Kappes *et al.* 1996). OpuC kann acht verschiedene kompatible Solute einschließlich dem Glycin Betain Vorläufer Cholin aus der Umwelt aufnehmen (Kappes *et al.* 1998; Nau-Wagner *et al.* 1999; Bremer und Krämer 2000). OpuC ist auch der einzige Transporter in *B. subtilis*, der das Tetrahydropyrimidin Ectoin aufnehmen kann (Jebbar *et al.* 1997). OpuC hat aber nur eine geringe Affinität für Ectoin. Eine OpuC-vermittelte Glycin Betain Aufnahme wird erst in Gegenwart von 1,5 mM Ectoin inhibiert (Jebbar *et al.* 1997).

Anders als die Expression von *opuB* ist die Transkription von *opuA*, *opuC*, *opuD* und *opuE* nicht durch exogen vorhandene Substrate stimuliert. Im Gegensatz dazu wird die Transkription von jedem Transporterstrukturgenen aber durch eine Erhöhung der externen Osmolalität induziert und in genauer Abhängigkeit zur Stärke und Dauer des osmotischen Stresses reguliert.

### 3.2.5 Ectointransport in Mikroorganismen

*B. subtilis* kann nur durch den ABC-Transporter OpuC Ectoin aus der Umwelt aufnehmen. OpuC hat nur eine geringe Affinität für Ectoin, das daher nur in relativ niedrigen Konzentrationen im Zytoplasma akkumuliert werden kann und somit von *B. subtilis* weniger genutzt werden kann als das durch hochaffinen Transport akkumulierte Glycin Betain (Jebbar *et al.* 1997). *L. monocytogenes* wird unter hochosmolaren Bedingungen gar nicht durch exogen vorhandenes Ectoin oder Hydroxyectoin protektiert (Bayles und Wilkinson 2000). *C. glutamicum* hingegen wird durch im Medium vorhandenes Ectoin sehr gut osmotisch protektiert, da der BCCT-Transporter EctP Ectoin mit hoher Affinität ( $K_m$  63  $\mu$ M) aufnehmen kann und durch die erhebliche Transportkapazität ( $V_{max}$  27 nmol Ectoin (min\*Protein)<sup>-1</sup>) Ectoin schnell im Zytoplasma akkumuliert (Peter *et al.* 1998b). Die schlechte bis gar nicht vorhandene Ausnutzung exogen vorhandener Ectoine zur Osmoprotektion durch *B. subtilis* und *L. monocytogenes* reflektieren den geringen bis fehlenden Transport dieser Solute unter hochosmolaren Bedingungen. Sie können nicht zur generellen Einschätzung der osmoprotektive Eigenschaften dieser Sulfamilie herangezogen werden.

Auch Gram-negative Bakterien können Ectoine aus der Umwelt aufnehmen. *E. coli* ist unter hochosmolaren Bedingungen in der Lage, Ectoin durch den ABC-Transporter ProU und den Na<sup>+</sup>/Solut-Symporter ProP im Zytoplasma zu akkumulieren (Jebbar *et al.* 1992). ProU besitzt die höhere Affinität von beiden Transportern ( $K_m$  200  $\mu$ M;  $V_{max}$  50,3 nmol Ectoin (min\*Protein)<sup>-1</sup>) für Ectoin bei osmotischem Stress (Jebbar *et al.* 1992). Ectoin und Hydroxyectoin können *E. coli* auch Thermoprotektion bei Hitzestress vermitteln, wenn sie im Medium vorhanden sind (Malin und Lapidot 1996). Daher muss *E. coli* auch effektive Ectointransportsysteme unter Hitzestress besitzen. Auch das Gram-negative Bodenbakterium *Rhizobium meliloti* transportiert effizient und osmotisch induziert

Ectoin ( $K_m$  80  $\mu$ M;  $V_{max}$  20 nmol Ectoin (min\*Protein)<sup>-1</sup>). Akkumuliertes Ectoin erlaubt *R. meliloti* ein Wachstum bei erhöhter Salinität (Talibart *et al.* 1994). In dem Gram-negativen Pflanzenpathogen *Erwinia chrysanthemi* konnte der Einkomponententransporter OusA isoliert werden, der wie ProP aus *E. coli* ein Mitglied der SSS-Transporterfamilie ist (Gouesbet *et al.* 1996). OusA ist durch einen hyperosmotischen Schock induzierbar und transportiert Ectoin ( $K_m$  70  $\mu$ M;  $V_{max}$  22 nmol Ectoin (min\*Protein)<sup>-1</sup>), Glycin Betain, Prolin und Pipicolinsäure mit hohen Affinitäten.

Kürzlich konnte ein hochaffiner Ectointransporter aus dem Gram-negativen halophilen Bakterium *H. elongata*, das Ectoin als dominantes kompatibles Solut unter hoher Osmolalität auch *de novo* synthetisiert, isoliert werden (Kunte pers. Mitteilung). Der Ectoin/Hydroxyectointransporter TeaABC aus *H. elongata* gehört zur TRAP-T Transporterfamilie (Tripartit ATP-independent Periplasmic Transporter), der sowohl Transporter aus Archaeen als auch aus Bakterien angehören (Forward *et al.* 1997; Rabus *et al.* 1999; Saier 2000). Zwei integrale Membranuntereinheiten, bestehend aus 12 und 4 Transmembranbereichen, und ein periplasmatisches Bindeprotein bilden eine TRAP Permease. Die TRAP-T Familie ist die einzige Familie, bei der ein periplasmatisches Bindeprotein zusammen mit einem sekundären Transporter, der durch protonenmotorische Kraft energetisiert wird, arbeitet (Saier 2000). TeaABC aus *H. elongata* ist das erste Mitglied dieser Transporterfamilie, das kompatible Solute osmotisch reguliert transportiert. Die Strukturgene des Transporters *teaABC* liegen direkt benachbart im Genom von *H. elongata* vor. Der Ectointransporter TeaABC scheint in *H. elongata* der einzige Transporter für die dominant endogen synthetisierten Osmolyte Ectoin und Hydroxyectoin zu sein (Kunte pers. Mitteilung). Es fehlen jedoch detaillierte Untersuchungen zur Regulation des Tetrahydropyrimidintransportes in *H. elongata*.

## 4 Ausstoß osmotisch aktiver Substanzen bei hypoosmolarem Stress

Sonnenschein, Hitze und fehlender Niederschlag schaffen hyperosmolare Bedingungen in den oberen Bodenschichten, denen sich *Bacilli* vorrangig durch die *de novo* Synthese und den Transport kompatibler Solute anpassen. Die osmotischen Bedingungen im Boden können sich aber schnell und drastisch durch Niederschlag, Überflutung und Auswaschung ändern (Miller und Wood 1996). Die Hypoosmolarität der Umgebung führt zu einem Wassereinstrom in die mit osmotisch aktiven Substanzen angefüllte Zelle. Dieser Vorgang führt zu einer Erhöhung des Turgors, der unter extremen Bedingungen die Zelle zum Bersten bringen kann. Normalerweise kompensiert der elastische Mureinsacculus der Zelle eine Erhöhung des Turgors (Höltje 1998; Wood 1999). Wird der Zellinnendruck zu groß, muss der Mikroorganismus wasserbindende kompatible Solute und Ionen aus dem Zytoplasma schleusen. In zahlreichen *Archaea* und *Bacteria* konnten mechanosensitive Kanäle identifiziert werden, die wie „Sicherheitsventile“ für den schnellen Ausstoß dieser Substanzen sorgen, wenn der Turgor zu groß wird (Blount und Moe 1999; Booth und Louis 1999; Martinac 2001).

Die Öffnung mechanosensitiver Kanäle beruht allein auf der Erhöhung des Zellinnendrucks und der damit einhergehenden mechanischen Dehnung der Zytoplasmamembran. Sie arbeiten unabhängig von den oben angeführten Aufnahmesystemen für osmotisch aktive Substanzen. Mechanosensitive Kanäle existieren in zwei Formen: MscL und MscS (Mechanosensitive Channel of Large and Small conductance). Ihre physiologische Funktion wurde in *E. coli* detailliert untersucht (Levina *et al.* 1999). Die gleichzeitige Unterbrechung von *mscL* und *mscS* resultierte im Zelltod durch Platzen nach einem hypoosmolaren Schock (Levina *et al.* 1999).

Auch in *B. subtilis* konnten Homologe von MscL und MscS aus *E. coli* identifiziert werden (Moe *et al.* 1998). Eine gleichzeitige Genunterbrechung von *mscL* und *ykuT* (*mscS*) führte zu einem *B. subtilis* Stamm, der deutlich schlechter eine plötzliche Senkung der Osmolalität überlebte als der Wildtyp (Boiangiu 2001). Auch der Gram-positive Modellorganismus *B. subtilis* besitzt demnach zwei dehnungsaktivierbare Kanäle. Diese sind Homologe von MscL und MscS aus *E. coli* und besitzen eine überlebenswichtige Funktion für *B. subtilis* bei der Änderung einer hyperosmolaren zu einer hypoosmolaren Umwelt.

## 5 Perzeption von osmotischem Stress

Allein durch die Anpassung der Zusammensetzung zytoplasmatischer Solute sind Mikroorganismen in der Lage, die Inhibition ihres Wachstums durch widrige osmotische Bedingungen zu überwinden. Dem fortgeschrittenen Verständnis der zellulären Maschinerie, die die osmotische Homöostase vermittelt, stehen die weitgehend ungeklärten Mechanismen der Wahrnehmung osmotischer Änderungen und die damit verbundene Regulation der für die Akkumulation von kompatiblen Soluten verantwortlichen Gene und Enzyme gegenüber. Änderungen bestimmter physikalischer und/oder chemischer Gegebenheiten müssen Signalfunktion ausüben, die direkt die Aktivität von Enzymen sowie Transportsystemen und/oder die Expression ausgewählter Strukturgene kontrollieren (Poolman und Glaasker 1998). Ein potentieller Osmosensor könnte direkt die extrazelluläre Wasseraktivität oder Osmolalität erfassen. Jedoch ist für die Ausbildung des Turgors nicht die absolute Konzentration extrazellulärer Solute entscheidend, sondern der Konzentrationsgradient osmotisch aktiver Substanzen über der Zytoplasmamembran. Daher würde eine ausschließliche Erfassung der externen Osmolalität nicht genügend Informationen für eine Anpassung der intrazellulären Osmolytkonzentration liefern. Gleiches gilt auch für einen Osmosensor, der lediglich die intrazelluläre Wasseraktivität oder Osmolalität erfassen könnte. Wahrscheinlich sind Osmosensoren daher in der Zytoplasmamembran und dem Nukleoid von Bakterien lokalisiert, wo sie Konsequenzen einer geänderten Osmolalität in der Zellstruktur am besten detektieren können (Wood 1999). Zellwand und Zytoplasmamembran könnten bei Änderungen der externen Osmolalität gestaucht oder gedehnt und in ihrer chemischen Zusammensetzung verändert werden. Potentielle Nukleoid-assoziierte Osmosensoren könnten Änderungen der DNA-Topologie in Abhängigkeit von

osmotischen Bedingungen erfassen. Darüber hinaus kann auch die Konzentration von intrazellulären Signalmolekülen durch Membran- und Nukleoid-lokalisierte Osmosensoren perzipiert werden (Wood 1999; Parsegian *et al.* 2000).

Die membranlokalisierten Transportsysteme für kompatible Solute ProP aus *E. coli* (Milner *et al.* 1998; Culham *et al.* 1993), BetP aus *C. glutamicum* (Peter *et al.* 1998a; Rübenhagen *et al.* 2000) und OpuA aus *Lactococcus lactis* (van der Heide und Poolman 2000b; van der Heide *et al.* 2001) können Änderungen der externen Osmolalität wahrnehmen und den eigenen Transport kompatibler Solute osmotisch regulieren. Alle drei Transporter wurden gereinigt, und die osmotisch regulierte Aktivierung ihres Transports wurde in Proteoliposomen untersucht. Die Aktivität von ProP und BetP wurde vor allem durch eine Erhöhung des Membranpotentials, hervorgerufen durch Erhöhung der internen  $K^+$  Konzentration nach einem hyperosmolaren Schock, stimuliert. Beide Transporter besitzen im Zytoplasma lokalisierte Termini, die vermutlich die Veränderungen der  $K^+$ -Konzentrationen erfassen können und unter hyperosmolaren Bedingungen eine strukturelle Änderung der Transporter vom inaktiven zum aktiven Zustand bewirken (Culham *et al.* 2000; Racher *et al.* 2001; Rübenhagen *et al.* 2001). Die Aktivitäten der Transporter OpuA und BetP werden durch veränderte Membraneigenschaften, die die Transporter-Lipid Interaktionen unter hochosmolaren Bedingungen beeinflussen, stimuliert (Rübenhagen *et al.* 2000; van der Heide und Poolman 2000b).

Die Strukturgene *proVWX* des Glycin Betain ABC-Transporters ProU aus *E. coli* werden als Operon osmotisch reguliert zur Expression gebracht (Stirling *et al.* 1989; Lucht *et al.* 1994; Gowrishankar und Manna 1996). Ein Anstieg der externen Osmolalität sorgt für eine verstärkte *proU* Expression unter den pleiotropen Effekten der DNA-Bindeproteine H-NS, TopA, IHF und HU, welche die DNA-Struktur verändern. Unter hochosmolaren Bedingungen beeinflussen akkumuliertes  $K^+$ -Glutamat und eine Erhöhung der negativen DNA-Überwindungen durch GyrAB zusätzlich die Expression von *proU* (Gowrishankar und Manna 1996).

Auch wenn die aufgeführten auslösenden Signale osmotischen Stresses und einige sensorische Zellkomponenten bekannt sind, ist die vollständige osmotische Perzeption und Signalverarbeitung in Mikroorganismen weitgehend unverstanden.

## 6 Zielsetzung der Arbeit

Die Akkumulation kompatibler Solute unter hochosmolaren Bedingungen ist eine entscheidende Anpassung, die besonders bodenbewohnenden Mikroorganismen das Überleben in einem Habitat ermöglicht, das durch schnell wechselnde, extreme osmotische Bedingungen gekennzeichnet ist (Miller und Wood 1996; Bremer und Krämer 2000). In der vorliegenden Arbeit sollten die unter hyperosmolarem Stress *de novo* synthetisierten kompatiblen Solute von repräsentativ ausgewählten *Bacilli* und verwandten Spezies identifiziert werden und die Regulation der Solutsynthese in Abhängigkeit von der externen Osmolalität charakterisiert werden.

Erste Untersuchungen von Galinski und Trüper (1994) demonstrierten, dass neben der Prolinsynthese die Ectoinsynthese in *Bacilli* verbreitet ist und der Gram-positive Modellorganismus *B. subtilis* als ausschließlich prolinsynthetisierendes Bakterium zu einer Minderheit aerober chemoheterotropher Bakterien gehört. Vorhergehende Untersuchungen konnten die Ectoinsynthese in den *Bacillus*-verwandten Spezies *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* nachweisen. Somit standen zwei *Bacilli* für eine detaillierte physiologische und molekulare Charakterisierung der Ectoinbiosynthese zur Verfügung. *V. pantothenicus* kann darüber hinaus neben Ectoin auch Prolin endogen zu synthetisieren (Kuhlmann 1998). Auch dieses erstmals beobachtet Muster der Osmolytsynthese sollte eingehend untersucht werden. Durch die PCR-Amplifikation eines DNA-Fragmentes aus dem Genom des Ectoinproduzenten und *Bacillus*-Verwandten *S. pasteurii*, das ein Fragment der Ectoinbiosynthesegene enthielt ('*ectB-ectC*') (Kuhlmann 1998), stand ebenfalls ein wichtiges Werkzeug für die vollständige Isolation und transkriptionelle Charakterisierung der Ectoinsynthesegene in *Bacilli* zur Verfügung.

Vorgeformtes Ectoin und Hydroxyectoin kann von zahlreichen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien durch osmotisch regulierte Transportsysteme aus der Umwelt aufgenommen und im Zytoplasma akkumuliert werden (Jebbar *et al.* 1992; Talibart *et al.* 1994; Gouesbet *et al.* 1996; Jebbar *et al.* 1997; Peter *et al.* 1998b). In der vorliegenden Arbeit sollte der Transport von Ectoin in *Bacilli* und von verwandten Spezies, die bei hyperosmolarem Stress *de novo* Ectoin synthetisieren, analysiert werden. Mögliche Tetrahydropyrimidintransportsysteme sollten aus einer ectoinproduzierenden *Bacillus* Spezies isoliert und auf molekularer sowie physiologischer Ebene charakterisiert werden.

## III. Material und Methoden

### 1 Chemikalien und Reagenzien

#### 1.1 Verwendete osmotische Schutzsubstanz

##### Ectoin

(S)-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat

Summenformel:  $C_6H_{10}N_2O_2$

Gewonnen aus: *Halomonas elongata*

Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 142, 2

Bezugsquelle: BIOMOL (Hamburg)

##### Hydroxyectoin

(S,S)- $\beta$ -2-Methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carboxylat

Summenformel:  $C_6H_{10}N_2O_3$

Gewonnen aus: *Marinococcus M52*

Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 158, 2

Bezugsquelle: BIOMOL (Hamburg)

##### Glycin Betain

Summenformel:  $C_5H_{11}N_1O_2$

Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 117, 1

Bezugsquelle: Sigma

##### L-Prolin

Summenformel:  $C_5H_9N_2$

Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 115, 3

Bezugsquelle: Sigma

##### Cholinchlorid

Summenformel:  $C_4H_{14}NOCl$

Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 139, 6

Bezugsquelle: Sigma

##### Carnitin

Summenformel:  $C_7H_{15}NO_3$

Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 161, 3

Bezugsquelle: Sigma

##### Cholin-O-Sulfat

Summenformel:  $C_5H_{13}NSO_4$

Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 183

Bezugsquelle: Nau-Wagner, G.; Universität Marburg

##### Dimethylsulfonioacetat (DMSA)

Summenformel:  $C_4H_{10}SO_2 \cdot HCl$

Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 157

Bezugsquelle: Bernard, T.; Universität Rennes, Frankreich

**Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)**

Summenformel:  $C_5H_{12}SO_2$   
 Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 172  
 Bezugsquelle: Bernard, T.; Universität Rennes, Frankreich

**Prolin Betain**

Summenformel:  $C_7H_{13}NO_2$   
 Molekulare Masse ( $g\ mol^{-1}$ ): 179,6  
 Bezugsquelle: Extrasynthese, Frankreich

**1.2 Sonstige Chemikalien und Reagenzien**

[1- $^{14}C$ ]-Glycin Betain 55 mCi/mmol ARC Inc., St. Louis, Mo, USA  
 [ $^{14}C$ ]-Ectoin 0,3 mCi/mmol Jebbar, M., Universität Rennes, Frankreich

$^2H_2O$  mit dem internen Standard  $D_4$ -3-(Trimethylsilyl)propionat wurde von Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Alle anderen Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht näher bezeichnet, von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Komplexmedien und Casaminosäuren stammten von Becton Dickinson (Augsburg).

**2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 (*Escherichia coli*), Tabelle 2 (*Bacillus subtilis*) und Tabelle 3 (Gram-positive Bakterien) aufgeführt. Der Tabelle 4 sind die verwendeten Plasmide und Tabelle 5 die verwendeten Oligonukleotide zu entnehmen. Übersichtsskizzen, die die Lage und Orientierung der zur Sequenzierung und Klonierung der einzelnen DNA-Fragmente verwendeten Primer wiedergeben, sind in Abbildung 5 dargestellt.

Alle angegebenen *E. coli*-Stämme sind Derivate von *E. coli* K-12. Die Stämme Gram-positive Bakterien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Bezeichnung der Gene für *E. coli* folgt der Nomenklatur nach Bachmann (Bachmann 1990).

**Tabelle 1. *E. coli*-Stämme**

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan 1983)
MC4100	<i>F</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169 araD139 rpsL150</i> <i>ptsF25 flbB5301 rbsR deoC1 relA1</i>	(Casadaban 1976)
MKH13	MC4100 $\Delta$ ( <i>betTIBA</i> ) <sup>a</sup> <i>U169</i> $\Delta$ ( <i>putPA</i> )101 $\Delta$ ( <i>proP</i> )2 $\Delta$ ( <i>proU</i> )608 [ <i>Spc</i> <sup>r</sup> ]	(Haardt <i>et al.</i> 1995)

<sup>a</sup> *betTIBA* Gencluster wird durch  $\Delta$ (*argF-lac*) *U169* unterbrochen

**Tabelle 2. *B. subtilis*-Stämme**

Stamm	Beschreibung	Referenz
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	BGSC <sup>a</sup> , 1A96, J. Hoch
BLOB22	JH642 ( <i>sigBΔ2::cml</i> )	(von Blohn <i>et al.</i> 1997)
KE30	Φ( <i>yckH-comS-erm-ycxA</i> ) ( <i>amyE'</i> - <i>cat-p<sub>spac</sub>-comS-lacl'</i> - <i>amyE</i> )	(Eppelmann <i>et al.</i> 2001)
AKB2	JH642 ( <i>amyE::ectABC</i> )	diese Arbeit
AKB4	KE30 [Φ( <i>yckH-kan-comS-P<sub>T5/N25</sub>-ectABC<sup>b</sup>-ycxA</i> ) ( <i>amyE'</i> - <i>cat-p<sub>spac</sub>-comS-lacl'</i> - <i>amyE</i> )]	diese Arbeit
AKB7	KE30 [Φ( <i>yckH-kan-comS-P<sub>T5/N25</sub>-ectABCD<sup>c</sup>-ycxA</i> ) ( <i>amyE'</i> - <i>cat-p<sub>spac</sub>-comS-lacl'</i> - <i>amyE</i> )]	diese Arbeit

<sup>a</sup> *Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, Ohio, USA

<sup>b</sup> *ectABC* aus *S. pasteurii*

<sup>c</sup> *ectABCD* aus *St. coelicolor*

**Tabelle 3. Stämme Gram-positiver Bakterien**

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Virgibacillus pantothenicus</i> (DSM 26 <sup>T</sup> )		(Proom und Knight 1950) (Heyndrickx <i>et al.</i> 1998)
AKV2	<i>V. pantothenicus</i> ( <i>ectT::tet</i> )	diese Arbeit
AKV3	<i>V. pantothenicus</i> [Δ( <i>ectB::tet</i> )]	diese Arbeit
<i>Sporosarcina pasteurii</i> (DSM 33 <sup>T</sup> )		(Chester 1898) (Yoon <i>et al.</i> 2001)
<i>Sporosarcina psychrophila</i> (DSM 3 <sup>T</sup> )		(Nakamura 1984) (Yoon <i>et al.</i> 2001)
<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 13 <sup>T</sup> )		(Chester 1898)
<i>Bacillus megaterium</i> (DSM 32 <sup>T</sup> )		(de Bary 1884)
<i>Bacillus cereus</i> (DSM 31 <sup>T</sup> )		(Frankland und Frankland 1887)

**Fortsetzung Tabelle 3. Stämme Gram-positiver Bakterien**

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Bacillus alcalophilus</i> (DSM 485 <sup>T</sup> )		(Vedder 1934)
<i>Bacillus circulans</i> (DSM 9 <sup>T</sup> )		(Jordan 1890)
<i>Salibacillus salexigens</i> (DSM 11438 <sup>T</sup> )		(Wainö <i>et al.</i> 1999)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (DSM 2046 <sup>T</sup> )		(Ash <i>et al.</i> 1991)
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> (DSM 5562 <sup>T</sup> )		(Shida <i>et al.</i> 1996b)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> (DSM 36 <sup>T</sup> )		(Ash <i>et al.</i> 1993)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) <sup>a</sup> (DSM 40783)		(Williams <i>et al.</i> 1983)

<sup>a</sup> Stamm von W. Wohlleben (Tübingen) zur Verfügung gestellt

**Tabelle 4. Plasmide**

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCR2.1	pUC18-Derivat, Vektor mit hoher Kopienzahl, 3'-Thyminüberhänge zur Klonierung von PCR-Produkten, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pHSG575	Klonierungsvektor mit niedriger Kopienzahl Cml <sup>r</sup>	(Takeshita <i>et al.</i> 1987)
pBSK-	pBlueskript <sup>®</sup> II SK- Phagemidvektor, Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pRB373	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> Shuttlevektor, Amp <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	(Brückner 1992)
pJMB1	Vektor geringer Kopienzahl, (pACYC177 Replikationsursprung) mit promotorlosem <i>treA</i> , Amp <sup>r</sup> Cml <sup>r</sup>	(Jebbar und Bremer 1997)
pUS19	Klonierungsvektor mit hoher Kopienzahl, Amp <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup>	(Benson und Haldewang 1993)
pOB26	Derivat von pBSK-, trägt Tet <sup>r</sup> -Kassette	(Schmitt-Kittler 1997)
pDG1515	Derivat von pBSK+, trägt Tet <sup>r</sup> -Kassette	(Guérout-Fleury <i>et al.</i> 1996)
pSD270	Klonierungsvektor hoher Kopienzahl, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	(Dökel und Marahiel)
pSPICE1	pCR2.1-Derivat, ' <i>ectB/ectC</i> '- Region aus <i>S. pasteurii</i>	diese Arbeit
pSPICE2	Derivat von pHSG575, <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i>	diese Arbeit
pSPICE3	pCR2.1-Derivat, ' <i>ectB/ectC</i> '- Region aus <i>V. pantothenicus</i>	diese Arbeit
pAK2	Derivat von pBSK-, ' <i>ectB</i> ' <i>S. pasteurii</i>	diese Arbeit
pAK8	Derivat von pJMB1, <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i>	diese Arbeit
pAK9	Derivat von pHSG575, <i>ectT</i> aus <i>V. pantothenicus</i>	diese Arbeit
pAK10	Derivat von pHSG575, ' <i>ectB/C</i> ' aus <i>V. pantothenicus</i>	diese Arbeit
pAK11	Derivat von pUS19, <i>ectT</i> aus <i>V. pantothenicus</i>	diese Arbeit
pAK12	Derivat von pAK11, [ <i>ectT::tet</i> ] <sup>1</sup>	diese Arbeit
pAK13	Derivat von pDG270, [ $\Phi$ ( <i>yckH-kan-comS-P<sub>T5/N25</sub>-ectABC-ycxA</i> )], <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i>	diese Arbeit
pAK14	Derivat von pRB373, <i>ectT</i> , Amp <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	diese Arbeit
pAK15	Derivat von pAK10, [ $\Delta$ ( <i>ectB::tet</i> ) <sup>1</sup> ], <i>ectB</i> aus <i>V. pantothenicus</i>	diese Arbeit
pAK17	Derivat von pSD270, [ $\Phi$ ( <i>yckH-kan-comS-P<sub>T5/N25</sub>-ectABCD-ycxA</i> )], <i>ectABCD</i> aus <i>St. coelicolor</i> A3(2)	diese Arbeit

**Tabelle 5. Verwendete Oligonukleotide**

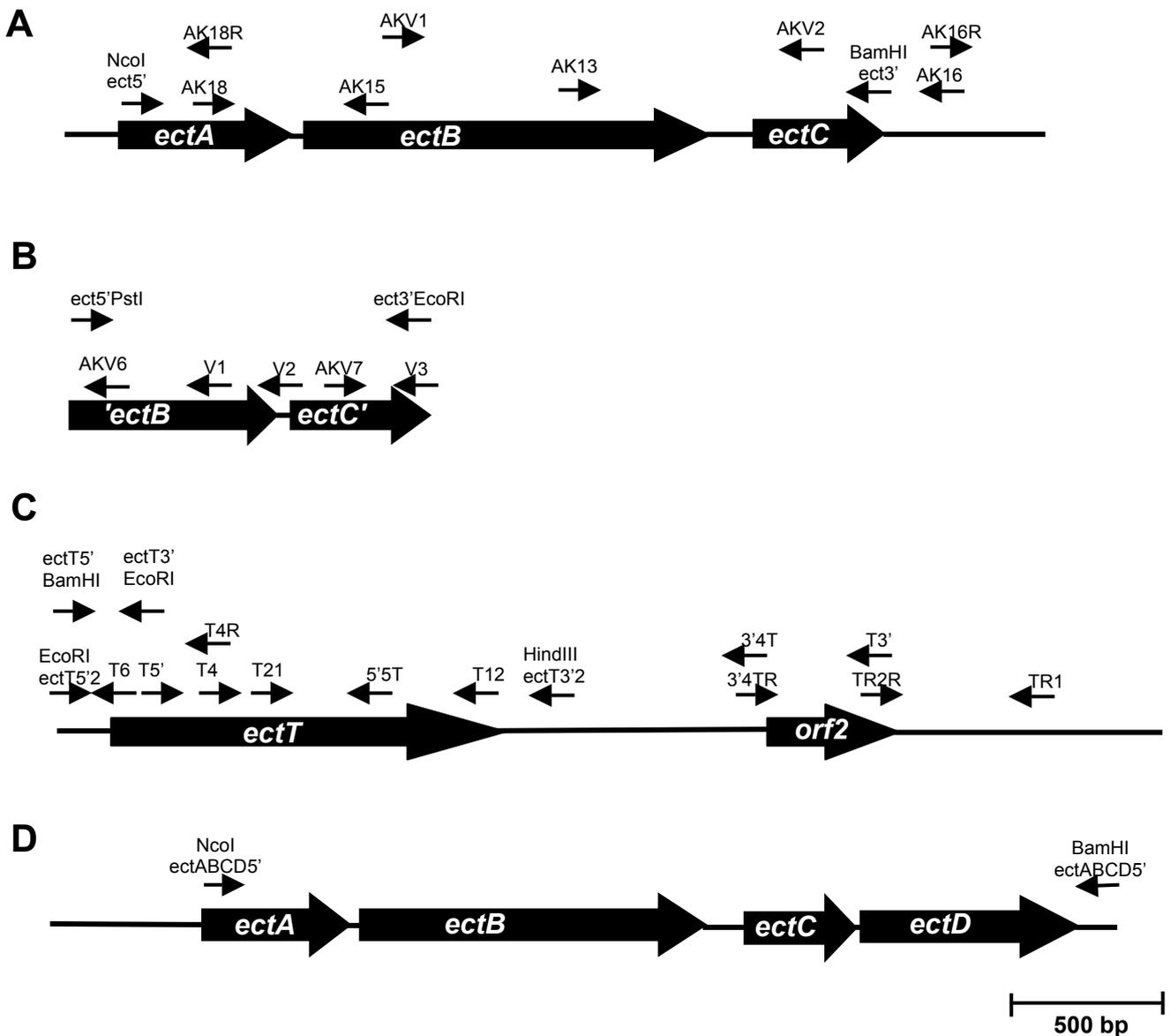
Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Lage, Bemerkungen
pHSG Neu	gtgtggaattgtgagcgg	hinter MCS von pHSG575 IRD800 <sup>a</sup>
lacZ-40	gtttcccagtcacgac	vor MCS von pHSG575, IRD800
M13 rev.	caggaaacagctatgacc	hinter MCS von pCR2.1, IRD800
AK13	ccaggaaagggacacgaa	2435-2452 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i> , IRD800
AK15	caaaatcgcttgcaaca	1267-1250 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i> , IRD800
AK16	gatgagaacaaaataatt	3010-3027 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i> , IRD800
AK16R	aattattttgttctcatc	3027-3010 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i> , IRD800
AK18	ggcaagttgcagcgatg	688-704 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i> , IRD800
AK18R	catcgctgcaacttgcc	704-688 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i> , IRD800
APP1	ccatattgctttgccgtcatcttccg	517-492 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i> , IRD800
Ncolect5'	aaccatggtttgggtaataagtaagc	16-437 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i>
BamHlect3'	aaggatccgcagctgtattagatc	3093-3076 bp <i>ectABC</i> aus <i>S. pasteurii</i>
AKV1	gc(ga)gc(cg)(at)tgatc(gc)taga (ga)ac(ac)gt(at)ca(ga)gg	513-637 bp <i>ectB</i> aus <i>S.pasteurii</i> <sup>b</sup>
AKV2	g(ct)ta(gc)(ga)(ct)gat(ct)tg(gt) gtttc(at)gtacc	133-157 bp <i>ectC</i> aus <i>S.pasteurii</i> <sup>b</sup>
AKV6	cccaacgctcacaaatag	69-52 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
AKV7	gatgcggatggtttgcg	967-983 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
V1	gccttacaatttctgaagc	490-471 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
V2	atcccacattgtccttttcatg	770-748 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
V3	tgtaggtgattgggtttcag	1029-1008 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
ectT7	taatacgactcactatagggagga attccctc	586-576 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i>
ect V. panto. 1	caggctggatgcggcag	96-112 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i>
ect5'PstI	aactgcaggcagccagtatagagtg	18-35 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i>
ect3'EcoRI	aagaattcccgcatctgtgttttagc	973-956 bp <i>ect'BC'</i> aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
TR1	cctgcaaatactgcatagc	3664-3646 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800

Fortsetzung Tabelle 5. Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Lage, Bemerkungen
TR2R	gccaccatctatgatg	3063-3078 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
T4	gcaatattaatctgggg	1313-1329 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
T4R	ccccagattaatattgc	1329-1313 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
T6	tggtcataacaattcc	559-544 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
T5'	ccgacttcgatttgggac	1213-1231 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
T3'	catcatagatggtggcttgcg	3080-3058 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
5'5T	cctatgacaacaatcc	1738-1753 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
3'4T	ggatgctcggttgccgcc	2639-2622 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
3'4TR	gccggcaaccgagcatcc	2622-2639 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
TE21	gtgttcgtctttatggc	1348-1364 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
TE12	ccaccagctaacagcaa	1928-1912 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
ectT3'T7	taatcgcactcactatagggaggg cctccgttcactcg	1190-1177 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i>
ectT5'	cctccgttcactcg	588-601 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i>
ectTPE	ggcagagtagctccg	638-624 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
EcoRIectT5'2	aagaattcccaacttctatcatccc	141-157 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i>
HindIIIectT3'	aaaagcttgctattctttatcctgttc	2060-2041 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i>
ectT5'BamHI	aaggatccggcatttagttgggcg	103-117 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
ectT3'EcoRI	aagaattcgactcataggttcagc	889-874 bp <i>ectT</i> -Region aus <i>V. pantothenicus</i> , IRD800
NcoI ectABCD5'	aaccatggactgccgcgcaagcaga	1524-1543 bp <i>ectABCD</i> -Region aus <i>St. coelicolor</i>
BamHI ectABCD3'	aaggatccggggcctcccgtcccacag	4911-4892 bp <i>ectABCD</i> -Region aus <i>St. coelicolor</i>

<sup>a</sup> für Sequenzanalysen und Primer Extension Reaktionen verwendete Oligonukleotide (bezogen von der Firma MWG) sind an ihrem 5'-Ende mit dem im Infrarotbereich fluoreszierenden Farbstoff IRD800 modifiziert.

<sup>b</sup> degenerierte Primer, abgeleitet von *ectABC* DNA-Sequenzvergleichen von *S. pasteurii* und *M. halophilus*.



**Abb. 5** Lage der zur Amplifikation und Sequenzierung der untersuchten DNA-Fragmente verwendeten Oligonukleotide

Lage und Orientierung der für Sequenzierung und PCR-Amplifikation von Fragmenten der (A) *ectABC*-Region aus *S. pasteurii*, (B) der *ect'BC'*-Region, (C) der *ectT*-Region aus *V. pantothenicus* und (D) der *ectABCD*-Region aus *St. coelicolor* verwendeten Oligonukleotide. Die Länge der Oligonukleotide ist nicht maßstabsgetreu dargestellt, Startpunkt des Oligonukleotides ist der Beginn des Pfeils.

### 3 Medien, Wachstumsbedingungen, Zusätze und Osmolalität

#### 3.1 Medien

##### Vollmedien

Die Vollmedien LB (Luria-Bertani Broth) und DYT (Double Yeast Tryptone) wurden wie beschrieben (Miller 1992; Sambrook *et al.* 2000) hergestellt. Zur Herstellung von Festmedium wurde 15 g Agar pro Liter Medium zugegeben.

*E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* MC4100, *E. coli* MKH13, *B. subtilis* JH642, *B. subtilis* KE30, *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup>, *B. megaterium* DSM 32<sup>T</sup>, *S. psychrophila* DSM 3<sup>T</sup>, *B. cereus* DSM 31<sup>T</sup>, *Bacillus circulans* DSM 9<sup>T</sup>, *Bacillus thuringiensis* DSM 2046<sup>T</sup>, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* DSM

5562<sup>T</sup>, *Paenibacillus polymyxa* DSM 36<sup>T</sup>, *Streptomyces coelicolor* A3(2) DSM 40783 und *V. pantothenicus* DSM 26<sup>T</sup> wurden auf den Vollmedien (DYT: Double Yeast Trypton; LB: Luria-Bertani Broth) kultiviert und vermehrt. Wenn *St. coelicolor* A3(2) in Flüssigmedium gezogen wurde, mussten zur Verhinderung der Mycelbildung ca. 50 Glasperlen (Ø 3 mm, Sigma) pro 30 ml Medium im 250 ml Erlenmeyerkolben zugesetzt werden. *S. pasteurii* DSM 33<sup>T</sup> wurde auf LB-Medium mit 2% (w/v) Harnstoff kultiviert. *B. alcalophilus* DSM 485<sup>T</sup> wurde mit LB-Medium, dem 100 mM Na-Sesquicarbonat Lösung (pH 9.7) zugesetzt worden war, kultiviert. *Sa. salexigens* DSM 11483<sup>T</sup> wurde Vollmedium (Garabito *et al.* 1997) vermehrt.

### Minimalmedien

Für *E. coli* wurde Minimalmedium A (MMA, Miller, 1992) verwendet.

Spizizen's Minimal Medium (SMM) (Spizizen 1958) mit 0,5% (w/v) Glukose als Hauptkohlenstoff-Quelle, L-Tryptophan (20 mg l<sup>-1</sup>), L-Phenylalanin (18 mg l<sup>-1</sup>) und eine Spurenelementlösung (Harwood und Archibald 1990a) wurden zur Anzucht von *B. subtilis* JH642 verwendet. *B. licheniformis* DSM 13<sup>T</sup>, *B. megaterium* DSM 32<sup>T</sup>, *S. psychrophila* DSM 3<sup>T</sup>, *B. cereus* DSM 31<sup>T</sup>, *Bacillus circulans* DSM 9<sup>T</sup>, *B. thuringiensis* DSM 2046<sup>T</sup>, *A. aneurinilyticus* DSM 5562<sup>T</sup>, *P. polymyxa* DSM 36<sup>T</sup> und *V. pantothenicus* DSM 26<sup>T</sup> wurden in SMM, das mit einer Aminosäure-Stammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 6) und einer Vitaminsammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 7) supplementiert wurde und 0,5% (w/v) Glukose sowie der oben beschriebenen Spurenelementlösung wachsen gelassen.

*S. pasteurii* DSM 33<sup>T</sup> wurde in SMM mit 2% (w/v) Harnstoff, 0,5% (w/v) Glukose, der Aminosäurestammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 6), der Vitaminsammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 7), L-Aspartat (20 mg l<sup>-1</sup>) und L-Glutamat (60 mg l<sup>-1</sup>; pH 7 eingestellt mit 1 M NaOH), kultiviert.

*B. alcalophilus* DSM 485<sup>T</sup> wurde in SMM mit 100 mM Na-Sesquicarbonat Lösung (pH 9,7), 0,5% (w/v) Glukose, der Aminosäurestammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 6) und der Vitaminsammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 7) kultiviert.

*Sa. salexigens* DSM 11483<sup>T</sup> wurde in einem Mineralsalz-Medium (MM) (Tab.8), modifiziert nach (Garabito *et al.* 1997), mit 0,5 % Glukose (w/v), der Aminosäurestammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 6) und der Vitaminsammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 7) vermehrt.

*Streptomyces coelicolor* A3(2) DSM 40783 wurde in einem modifizierten "supplemented liquid minimal medium (SM)" (Tab. 9) mit Spurenelementen (Tab. 10) (Kieser *et al.* 2000) kultiviert. Als Kohlenstoff-Quelle diente 1% Glukose (w/v), und das Medium wurde mit der Aminosäurestammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>) (Tab. 6) supplementiert.

**Tabelle 6. Aminosäurestammlösung<sup>a</sup> (10 ml l<sup>-1</sup>)**

Aminosäure	Konzentration in Stammlösung (g l <sup>-1</sup> )
DL-Alanin	4
L-Asparagin	8
DL-Serin	1
L-Cystein <sup>b</sup>	1
L-Tryptophan	0,8
L-Histidin	1,3
L-Phenylalanin	2
DL-Valin	5
L-Lysin	5
DL-Methionin	2
Glycin	5
DL-Isoleucin	5
DL-Leucin	5
L-Arginin	4

<sup>a</sup> Die Aminosäurestammlösung wurden in 1l H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend sterilfiltriert.

<sup>b</sup> Die L-Cystein-Stammlösung wurde separat immer frisch angesetzt, da Cystein schnell zu unlöslichen Kristallen oxidiert.

**Tabelle 7. Vitaminstammlösung (10 ml l<sup>-1</sup>)**

Vitamin	Konzentration in Stammlösung (mg l <sup>-1</sup> )
Biotin	25
Nicotinsäure	50
Pantothenat	50
Thiamin	50
Pyridoxin	50
p-Aminobenzoessäure	50
Liponsäure	50
Folsäure	50
Cobalamin	1

<sup>a</sup> Die Vitamine wurden in 1l H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend sterilfiltriert.

**Tabelle 8. Zusammensetzung Mineralsalz-Medium<sup>a</sup> für *Sa. salexigens***

Bestandteil	g (l Medium <sup>-1</sup> )
NaCl	81
MgCl <sub>2</sub>	7
MgSO <sub>4</sub>	9,6
CaCl <sub>2</sub>	0,36
KCl	2
NaHCO <sub>3</sub>	0,06
NaBr	0,026
Glukose	5
Aminosäurestammlösung	10 ml
Vitaminstammlösung	10 ml

<sup>a</sup> Salze und Glukose wurden in Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf pH 7,5 eingestellt, anschließend wurde das Medium autoklaviert. Danach wurde das Volumen mit Wasser, Aminosäure- und Vitamin-Stammlösung auf 1l aufgefüllt.

**Tabelle 9. Zusammensetzung modifiziertes SM<sup>a</sup> für *St. coelicolor* A3(2)**

Bestandteil	ml (l Medium) <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	5
TES (0,25 M, pH 7,2)	100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM)	10
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM)	10
Glukose (20%, w/v)	5
Spurenelemente <sub>st.</sub>	0,1
Aminosäurestammlösung	10
L-Glycin-Lösung (20%, w/v)	25

<sup>a</sup> Es wurden jeweils die Stammlösungen der einzelnen Komponenten, mit Ausnahme der Aminosäurestammlösung, angesetzt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren bzw. Sterilfiltrieren wurden die einzelnen Lösungen zusammengegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 1l Gesamtvolumen aufgefüllt.

**Tabelle 10. Zusammensetzung der Spurenelement-Lösung<sub>St.</sub><sup>a</sup> für *St. coelicolor* A3(2)**

Bestandteil	Konzentration in Stammlösung (g l <sup>-1</sup> )
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,1
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,1
CaCl·6H <sub>2</sub> O	0,1
NaCl	0,1

<sup>a</sup> Die Spurenelement-Stammlösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Nach 4 Wochen wurde eine frische Lösung hergestellt. Zusammensetzung siehe Tab. 10.

### Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert, Glaswaren 3 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert.

## 3.2 Wachstum

### *E. coli*

Kulturen von 5 ml wurden in Kulturröhrchen bei 37°C auf einem Roller inkubiert. Kulturen von 20 - 500 ml wurden in Erlenmeyerkolben von 100 bis 2000 ml bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

### *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. alcalophilus*, *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *A. aneurinilyticus*, *P. polymyxa*

Kulturen von 20 ml wurden über Nacht in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Für <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie-Analysen wurden Kulturen von 300 ml in 2000 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 von einer Übernachtskultur beimpft und bei 220 rpm bei 37°C im Luftschüttler bis zur jeweiligen gewünschten OD<sub>578</sub> inkubiert.

### *B. cereus*, *B. licheniformis*, *Sa. salexigens*

Kulturen von 20 ml wurden über Nacht in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Für <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie Untersuchungen wurden Kulturen von 300 ml in 2000 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 aus einer Übernachtskultur beimpft und bei 220 rpm bei 37°C im Luftschüttler inkubiert. Für HPLC-Analysen wurden Kulturen von 80 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 beimpft und bei 37°C in Schüttelwasserbädern gezogen.

### *S. psychrophila*

Kulturen von 20 ml wurden über Nacht in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 25°C und 220 rpm inkubiert. Für <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie Untersuchungen wurden Kulturen von 300 ml in 2000 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 aus einer Übernachtskultur beimpft und bei 220 rpm bei 25°C im Luftschüttler inkubiert.

### *V. pantothenicus*, *S. pasteurii*

Kulturen von 20 ml wurden über Nacht in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Für <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie Untersuchungen wurden Kulturen von 300 ml in 2000 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 aus einer Übernachtskultur beimpft und bei 220 rpm bei 37°C im Luftschüttler inkubiert. Für Wachstumskurven, RNA-Isolierungen, Transportversuche und HPLC-Analysen wurden Kulturen von 80 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>578</sub> von 0,03 bis 0,1 beimpft und bei 37°C, 35°C, 30°C, 25°C, 20°C und 15°C in Schüttelwasserbädern gezogen.

**St. coelicolor A3(2)**

Kulturen von 30 ml wurden für 48 Stunden in 250 ml Erlenmeyerkolben bei 28°C und 39°C bei 300 rpm inkubiert. Für Wachstumskurven und HPLC-Analysen wurden Kulturen von 60 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 aus einer Übernachtskultur beimpft und bei 39°C und 28°C in Schüttelwasserbädern gezogen. Hier wurden, wie oben beschrieben, zur Verhinderung der Mycel-Bildung ca. 50 Glasperlen (Ø 3 mm, Sigma) pro 50 ml Medium im 250 ml Erlenmeyerkolben zugesetzt.

**Bestimmung der Zelldichte**

Die Zelldichte sowohl der *E. coli*-Kulturen als auch der Gram-positiven Bakterien-Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm durch ein Ultrospec<sup>®</sup> Plus Photometer (Amersham) bestimmt und ist als OD<sub>578</sub> angegeben.

**3.3 Zusätze und Antibiotika**

Zusätze wie Salze, Kohlenstoffquellen, Zucker, Aminosäurestammlösungen, Vitamine und Antibiotika sowie die osmoprotektiven Substanzen wurden als konzentrierte Stammlösung in Wasser (Chloramphenicol und Tetracyclin in 70% Ethanol, X-GAL in DMF) angesetzt, sterilfiltriert (Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm Schleicher und Schuell, Dassel) und den auf 50 °C abgekühlten Medien zugesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurden Antibiotika und Zusätze, wie in Tabelle. 11 angegeben, eingesetzt.

**Tabelle 11. Antibiotika und Medienzusätze**

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>V. pantothenicus</i> <i>S. pasteurii</i>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml		
Chloramphenicol	30 mg/ml	30 µg/ml		
Kanamycin	50 mg/ml	5 µg/ml	5 µg	5 µg
Tetracyclin	10 mg/ml	10 µg/ml		10 µg/ml
Erythromycin	25 mg/ml	25 µg/ml		
Lincomycin	1 mg/ml	1 µg/ml		
Ectoin	100 mM	1 mM		1 mM
Glycin Betain	100 mM	1 mM		1 mM
L-Prolin	100 mM	1 mM		1 mM
Cholinchlorid	100 mM	1 mM		1 mM
Carnitin	100 mM	1 mM		1 mM
Cholin-O-Sulfat	100 mM	1 mM		1 mM
Dimethylsulfoacetat (DMSA)	100 mM	1 mM		1 mM
Dimethylsulfonium-propionat (DMSP)	100 mM	1 mM		1 mM
Prolin Betain	100 mM	1 mM		1 mM

### 3.4 Osmolalität

Die Osmolalität wurde mit Hilfe eines Dampfdruckosmometers (Model 5.500; Wescor Inc., Logan, Utah, USA) bestimmt und durch die Zugabe unterschiedlicher Volumina konzentrierter NaCl-, KCl-, Saccharose-, Lactose- und Glycerin-Lösungen erhöht (Tab. 12).

**Tabelle 12. Osmolalität der Minimalmedien**

Bezeichnung des Mediums	Osmolalität [mosmol kg Wasser <sup>-1</sup> ]
SMM	340
SMM + 0.4 M NaCl	1100
SMM + 0.5 M NaCl	1290
SMM + 1 M NaCl	2240
SMM + 1,5 M NaCl	3190
SMM + 2% Harnstoff	680
SMM + 2% Harnstoff + 0.4 M NaCl	1440
SMM + 2% Harnstoff + 0.5 M NaCl	1630
SMM + 2% Harnstoff + 1 M NaCl	2580
SMM + 2% Harnstoff + 1,5 M NaCl	3530
SMM + 2% Harnstoff + 2 M NaCl	4480
SMM + 100 mM Na-Sesquicarbonat	460
SMM + 100 mM Na-Sesquicarbonat + 1,5 M NaCl	2360
MM	4510
MM + 2 M NaCl	9190

## 4 Molekularbiologische und genetische Methoden

### 4.1 Allgemeine Methoden der molekularbiologischen und genetischen Manipulation

#### Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) oder der hierauf beruhenden Methode aus dem „Qiagen Plasmid Handbuch“ (Quiagen, Hilden) gewonnen.

#### Präparation von chromosomaler DNA

Genomische DNA von *S. pasteurii*, *V. pantothenicus* und *St. coelicolor* wurden, wie in einem Standardprotokoll beschrieben (Sambrook *et al.* 2000), gewonnen. Vor dem Zellaufschluss durch SDS wurden die Zellwand der Gram-positiven Bakterien durch Lysozym (50 mg/ml Stammlösung) bei 37°C entfernt. Die Protoplastierung wurde mikroskopisch kontrolliert.

### Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Ultrospec® 2000 Photometer (Pharmacia) bestimmt. Die Konzentration der Nukleinsäuren ist zur Absorption proportional, wobei eine  $A_{260}$  von 1 einer Konzentration von 50 µg DNA pro ml entspricht.

### DNA-Restriktion

Mit Ausnahme des Partialverdauens für die *Sau3A*-Genbank, wurde zur Restriktion der DNA pro µg eingesetzter DNA mindestens eine Enzymeinheit eingesetzt. Puffer und Inkubationstemperatur wurden gemäß den Angaben des Herstellers gewählt. Die Inkubationszeit betrug 2 bis 15 Stunden. Die Restriktionsenzyme stammten von Amersham, Roche (Grenzach) oder NEB (Schwalbach).

### Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 0,8 bis 1,0 %igen Agarosegelen in TAE-Laufpuffer (Sambrook *et al.* 2000). Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA, die zur Klonierung verwendet werden sollten, erfolgte in 1,2 %igen Agarosegelen niedriger Schmelztemperatur (peqLab). Nach der Auftrennung wurden die Gele mit einer Ethidiumbromid-Lösung ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) gefärbt (Sambrook *et al.* 2000) und unter UV-Licht (302 nm) mit Hilfe eines Video-Printers dokumentiert. Als DNA-Größenmarker diente mit *BstEII* geschnittene  $\lambda$  DNA.

### Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde ein modifiziertes Protokoll der Firma Promega genutzt. Die Agarose-Gelfragmente wurden für 5 min bei 70°C geschmolzen. Das flüssige Agarose-DNA-Gemisch wurde mit 1 ml Resin-Puffer versetzt und unter gelegentlichem Schütteln 30 min bis 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die mit DNA beladene Silicamatrix über Filtersäulchen (Promega) von der übrigen Lösung getrennt. Die Silicamatrix wurde mit 80 % (v/v) Isopropanol gewaschen, danach wurde die DNA mit destilliertem Wasser vom Trägermaterial eluiert.

### Polymerase-Kettenreaktion und Bestimmung von Nukleotidsequenzen

Zur Amplifikation von DNA-Segmenten wurde die PCR (Polymerase Chain Reaction)-Technik nach Standardmethoden (White, 1993) in einem Trioblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die PCR-Reaktionen mit Taq DNA-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Mit Hilfe der PCR-Technik wurde ein Fragment der Ectoinbiosynthesegene aus *V. pantothenicus* direkt aus dem Chromosom mit den synthetischen, degenerierten Oligonukleotiden AKV1 und AKV2 (Tab. 3) amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde unter unstringenten Bedingungen bei einer Anlagerungstemperatur von 45°C und 2 mM  $\text{MgCl}_2$  durchgeführt.

DNA-Sequenzen wurden nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977) unter Verwendung des Thermo Sequenase fluorescent-labelled primer cycle sequencing kit (Amersham) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Gelelektrophorese und Detektion der Reaktionsprodukte erfolgten mit einem Li-COR DNA-Sequencer Modell 4000 (MWG, Ebersberg). Die Gele wurden nach Angaben des Herstellers (Biozym) aus Sequagel complete ultra pure hergestellt. Zum Einlesen des Gellaufes und zur anschließenden halbautomatischen Ermittlung der Sequenz wurde die Base-ImageIR™-Software (MWG) verwendet.

## Ligationen

Ligationen wurden mit etwa 100 ng Vektor-DNA und einem drei- bis zehnfachen Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragmentes durchgeführt. Die 20 µl Ligationsansätze enthielten 1 Einheit T4-Ligase (Roche) und Ligationspuffer (nach Angaben des Herstellers zugesetzt). Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Ansätze auf Filtern mit 0,02 µm Porengröße (Typ VS, Millipore) gegen destilliertes Wasser dialysiert, um Salze zu entfernen. Die Vektor-DNA wurde, falls diese nur mit einer Endonuklease verdaut worden war, mit Phosphatase (SAP, Amersham) gemäß „SAP- Dephosphorylation Protocol“ (Amersham) behandelt, aber die SAP wurde nicht, wie vorgeschrieben, verdünnt.

## Transformation von *E. coli*

Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation (Gene-Pulser, BioRad) gemäß dem BioRad-Protokoll (Bacterial electro-transformation and pulse controller instruction manual, V1.0) in *E. coli*-Zellen transformiert.

## Transformation von *B. subtilis*

Zur Transformation von *B. subtilis* wurde die Zwei-Schritt-Methode (Harwood und Cutting 1990b) verwendet. Um Gene auf dem Chromosom zu unterbrechen oder zu ersetzen (Niaudet und Ehrlich 1982), wurde *B. subtilis* mit ca. 50 ng chromosomaler DNA bzw. ca. 30 µg linearisierter Plasmid-DNA transformiert.

## Transformation von *V. pantothenicus*

*V. pantothenicus* wurde ebenfalls mit der Zwei-Schritt-Methode (Harwood und Cutting 1990b) transformiert. Entscheidend für eine erfolgreiche Transformation war die Reinheit der eingesetzten Plasmid-DNA und ihre Menge. Ebenfalls war die Transformation nur dann erfolgreich, wenn die Plasmid-DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen über Nacht verdaut wurde und am nächsten Tag für drei Stunden, wie oben beschrieben, mit T4-Ligase bei 16°C inkubiert wurde. Um Gene auf dem Chromosom zu unterbrechen (Niaudet und Ehrlich 1982), wurde *V. pantothenicus* mit ca. 200 ng linearisierter und wiederum multimerisierter Plasmid-DNA transformiert.

## Computergestützte DNA-Sequenzanalysen

Die Kombination primärer Sequenzdaten und die Prozessierung der DNA- und abgeleiteter Aminosäuresequenzen erfolgte unter Verwendung des Programmpakets DNASTar Lasergene (DNASTar Ltd, London, UK). Protein- und DNA-Sequenzen wurden mit der Clustal Methode (Higgins und Sharp 1989) verglichen.

Datenbankvergleiche mit bekannten DNA- und Protein-Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) am National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) online durchgeführt.

Zur Vorhersage der Sekundärstrukturen von Membranproteinen wurde ein Hydropathieplot mit Hilfe des Programms TMHMM (Krogh *et al.* 2001) [<http://www.cbs.dtu.dk>] erstellt.

Eine phylogenetische Analyse der *Bacillus* Spezies und der Spezies verwandter Genera, die während dieser Arbeit auf die endogene Synthese von kompatiblen Soluten untersucht worden sind, wurde, basierend auf 16S rRNA Gensequenzen aus öffentlichen Datenbanken, mit dem ARB Software Paket (Ludwig und Strunk 1996) [<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation/arb.ps>] durchgeführt. Für die Konstruktion einer Ähnlichkeitsmatrix und die Erstellung eines Stammbaums, basierend auf dieser Matrix, wurden die 16S rRNA Gensequenzen der untersuchten Spezies und der mit ihnen nah verwandter Stämme zusammen mit mehr als einhundert 16S rRNA Gensequenzen entfernt verwandter Spezies

(Outgroup) verwendet. Multiple Basen-Änderungen an einer Position der Sequenzen wurden mittels der „Neighbor-Joining“-Methode (Jukes und Cantor 1969) in der Ähnlichkeitsmatrix korrigiert. Um die Darstellung zu vereinfachen, wurden die Outgroup-Spezies und die anderen, nicht untersuchten *Bacillus*-Spezies nicht dargestellt. Diese phylogenetische Analyse wurde freundlicherweise von Dr. D. R. Arahal (Universität Valencia, Spanien) durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

### Nukleotidsequenz-Zugriffsnummern

Die Nukleotidsequenz der *ectABC*-Gene aus *S. pasteurii* und der flankierenden Sequenzen wurden in GenBank hinterlegt und haben die Zugriffsnummer (Acc. no.) AF316874. Die Nukleotidsequenz des *ectT*-Gens aus *V. pantothenicus* und der flankierenden Sequenzen wurden in GenBank hinterlegt und haben die Zugriffsnummer AF421189.

## 4.2 DNA-DNA-Hybridisierung (Southernblotting)

Die Identifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von Southern-Hybridisierung (Sambrook *et al.* 2000). Genomische oder Plasmid-DNA (5–10 µg) wurde nach der Behandlung mit einer Restriktionsendonuklease gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aus dem Gel wurde sie mit einer Vakuumblotapparatur (VacuGene™XL, Pharmacia LKB) auf eine NY13N Membran (Schleicher & Schuell) transferiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht im UV-Stratalinker (Stratagene) auf die Membran fixiert.

Die verwendeten DNA-Sonden wurden mit Digoxigenin DIG-[11]-dUTP, unter Verwendung des „DIG DNA Labelling und Detektion Kit“ (Roche), markiert. Die zu identifizierende DNA wurde mit dieser Sonde hybridisiert (Southern-Hybridisierung). Alle Versuchsschritte der Hybridisierung und der Detektion der DNA-DNA-Hybride wurden, wie im „DIG User's Guide“ (Roche) beschrieben, durchgeführt. Als DNA-Größenstandard diente Digoxigenin-markierter „DNA molecular weight marker VII“ (Roche). Im immunologischen Nachweis wird an die Sonde ein Anti-DIG-Antikörper gebunden, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Letztere ist in der Lage, in einer chemilumineszenten Reaktion ECF-Vistra (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) umzusetzen. Diese Reaktion wurde mit dem Phospho-Imager MD Storm 860 (Amersham, Freiburg) dokumentiert.

## 4.3 RNA-Isolation

Soweit nicht anders angegeben, wurden für RNA-Isolation und nachfolgende Experimente ausschließlich RNase-freie Reagenzien und Lösungen benutzt. Das verwendete Wasser war mit DEPC (0,1 % (I<sup>-1</sup>)) behandelt.

### Zellernte für die Gesamt-RNA-Isolation

Die Zellernte von *V. pantothenicus* und *B. subtilis* Kulturen wurde auf „Killingpuffer“ (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaN<sub>3</sub>; mit DEPC-Wasser auf 1l aufgefüllt), der zunächst auf 4°C gekühlt worden war, durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurden 10 ml Kultur bei OD<sub>578</sub> 1 in Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Killingpuffer gefüllt und für 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde sofort in einem Trockeneis/Ethanol-Gemisch eingefroren und bei -80°C gelagert.

*S. pasteurii* Kulturen wurden wie für *B. subtilis* und *V. pantothenicus* beschrieben, aber bei OD<sub>578</sub> 0,4 bis 0,6, geerntet. Bei *S. pasteurii* Kulturen wurde auf Killingpuffer-Zugabe verzichtet. Das Zellpellet wurde sofort in einem Trockeneis/Ethanol-Gemisch eingefroren und bei -80°C gelagert.

Sollte die Transkription bestimmter Gene untersucht werden, die schon an die jeweiligen Wachstumsbedingungen angepasst waren, wurden die Kulturen mit einer Vorkultur, die bis zu OD<sub>578</sub> 0,5 bei Kälteadaptation (15°C) oder OD<sub>578</sub> 2 bei osmotischer Anpassung in Minimalmedium unter den zu untersuchenden Bedingungen gewachsen war, zu einer OD<sub>578</sub> von 0,1 beimpft. Die Proben für die

RNA-Isolation wurden wie oben beschrieben entnommen

Wurde der zeitliche Verlauf der Transkriptionsinduktion bestimmter Gene nach einem hyperosmotischen Schock oder einem Kälteschock untersucht, wurden *V. pantothenicus* Kulturen mit einer bei 37°C im Minimalmedium gezogenen Vorkultur zu einer OD<sub>578</sub> 0,05 beimpft und bis OD<sub>578</sub> 0,5 wachsen gelassen. Dann wurden die Kulturen entweder durch Zugabe einer vorgewärmten 5 M NaCl-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 0,5 M NaCl oder durch weitere Inkubation bei 15°C einem Schock ausgesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Schock wurden jeweils 10 ml Kultur für die RNA-Präparation entnommen.

### RNA-Isolation mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche)

Zur Isolation der RNA aus *B. subtilis* und *V. pantothenicus* wurde der „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche, Mannheim) genutzt. Außer einer 10 minütigen Lysozymbehandlung wurde die Isolation nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Zellpellet wurde hierzu in 200 µl 10 mM Tris pH 8 resuspendiert und mit 4 µl Lysozymlösung (50 mg ml<sup>-1</sup>, 10 mM Tris, pH 8) versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 10 min. Zur Isolation der RNA aus *S. pasteurii* wurde der „Total RNA Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) genutzt, wobei den Angaben des Herstellers gefolgt wurde.

### RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm mit einem Ultrospec® 2000 Photometer (Amersham) bestimmt. Die Nukleinsäuren absorbieren bei 260 nm, noch vorhandene Proteine bei 280 nm. Die Konzentration der Nukleinsäuren ist proportional zur Absorption, und eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA/ml. Der Quotient der Messwerte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm erlaubt eine Aussage über die Reinheit der RNA. Er sollte nicht unter 1,7 liegen.

## 4.4 RNA-Hybridisierung

### 4.4.1 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden mit dem Strip-EZ Kit (Ambion)

Markierte RNA-Proben wurden durch *in vitro*-Transkription von DNA mit der T7- oder T3-RNA-Polymerase hergestellt. Neben den unmarkierten Nukleotiden wurde Digoxigenin-UTP als Substrat eingesetzt. Dadurch wurde mit ca. 1 µg DNA in der Reaktion ungefähr 10 µg DIG-markierte RNA hergestellt. Als Matrize für die Markierungsreaktion wurden ein linearisiertes Plasmid oder PCR-Fragmente verwendet, die zuvor über „spin columns“ der Firma Qiagen, den Vorschriften des Herstellers folgend, gereinigt wurden. Der Promotor für die T7- oder T3-Polymerase lag in beiden Matrizen-Arten am 3'-Ende des Zielgens und zeigte in Richtung der zu markierenden Fragmente. Die Transkriptionsrichtung der Fragmente ist der Promotorrichtung entgegengesetzt, damit eine „antisense“-RNA entsteht. Diese markierte „antisense“-RNA bindet dann an die in der immobilisierten Gesamt-RNA enthaltene spezifische Ziel-RNA.

Die Sonden wurden nach den Angaben des Herstellers (Ambion Inc, Houston, USA) hergestellt. Es wurden jeweils 1 µg DNA-Matrize pro Markierungsreaktion eingesetzt. Erfolgte die *in vitro* Transkription mit T7-Polymerase, wurde das T7-Polymerase/RNase-Inhibitor Gemisch des Herstellers (Ambion) verwendet; erfolgte die *in vitro* Transkription mit T3-Polymerase, wurden T3-Polymerase (Roche) und RNase-Inhibitor (Roche) einzeln zugegeben.

### 4.4.2 Test der RNA-Sonden

Um die Qualität der DIG-RNA-Sonde und damit die Stärke der DIG-Markierung zu testen, wurde den Markierungsansätzen jeweils 1 µl entnommen und in 20xSSC (Sambrook *et al.* 2000) seriell in 1:10er Schritten bis zu 1:10000 verdünnt. Jeweils 2 µl dieser Verdünnungen wurden auf eine

Nylonmembran NY13N Membran (Schleicher & Schuell) getropft und mittels UV-Licht an diese kreuzgebunden. Die Membran wurde mit einem DIG-Antikörper inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem Fluoreszenzsubstrat, wie später beschrieben, detektiert (siehe Kap. 4.4.3).

#### 4.4.3 RNA-RNA-Hybridisierung (Northernblotting)

Bei dieser Methode wird die RNA auf einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert, auf welcher sie mit UV-Licht fixiert wird. Die spätere Hybridisierung mit DIG-markierten RNA Sonden liefert Informationen über die Größe und die Integrität des Transkripts in der aufgetragenen Probe. Zur Analyse von *ectABC* aus *S. pasteurii* diente ein 444 bp großes '*ectB*'-Fragment aus dem Plasmid pAK2, für die transkriptionelle Analyse der *ectABC* Gene aus *V. pantothenicus* ein 490 bp großes PCR-Fragment und zur transkriptionellen Analyse von *ectT* aus *V. pantothenicus* ein 602 bp großes PCR-Fragment. 5 µg Gesamt-RNA für die Northern Blot-Analyse der *ectABC* Gene und 15 µg Gesamt-RNA für die Northern Blot-Analyse des *ectT*-Gens wurden auf einem Agarosegel (1 % Agarose, 1x MOPS-Elektrophoresepuffer) in 1x MOPS-Puffer (Sambrook *et al.* 2000) für 3 Stunden bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt, nachdem sie mit einem Volumen RNA-Probenpuffer versetzt worden und bei 70°C für 5 min denaturiert worden war. Um die Größe der Transkripte nach der Detektion bestimmen zu können, benutzte man ein RNA-Größenstandard (NEB), der ebenfalls denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Der Transfer der RNA auf eine Nylon-Membran NY13N Membran (Schleicher & Schuell) erfolgte über Nacht mit 10xSSC. Durch Bestrahlung mit UV-Licht im UV-Stratalinker (Stratagene) wurde die RNA auf die Membran fixiert. Die RNA-RNA-Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 72°C (*ectABC* aus *S. pasteurii*) oder 68°C (*ectABC* und *ectT* aus *V. pantothenicus*) in einer Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5xSSC, 2% Blocking Reagent (Roche), 0,1% N-Laurylsarcosin, 7% SDS), in der auch die DIG-RNA-Sonden gelagert wurden. Der Filter wurde anschließend nach Standardmethoden gewaschen (Sambrook *et al.* 2000) und mit dem Chemilumineszenz-Reagenz ECF-Vistra (12 µl/cm<sup>2</sup>Blot; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert.

Der Nachweis der RNA-RNA-Hybride erfolgte über die Quantifizierung der Chemiefluoreszenz mit dem Phospho-Imager MD STORM 860 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Dabei wird die Fluoreszenz durch einen Photomultiplier gemessen und als digitalisiertes Bild in dem Programm Image Quant visualisiert und quantifiziert. Bei der Quantifizierung wurde darauf geachtet, dass die Bestimmung im linearen Bereich des Photomultipliers erfolgte. Dazu wurden die Membranen zu verschiedenen Zeiten nach Substratzugabe eingelesen und eine im linearen Bereich liegende Aufnahme ausgewertet. Die weitere Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

#### 4.5 Identifikation von mRNA-Startpunkten mittels Primer Extension-Analyse

Zur Analyse von Transkriptionsstartpunkten wurde Gesamt-RNA aus *S. pasteurii*, *V. pantothenicus* und *B. subtilis* isoliert, wobei die *V. pantothenicus*- und *B. subtilis*-Stämme den zu untersuchenden Promotor auf dem Derivat des *B. subtilis*-*E. coli* Shuttle Vektors pRB373 trugen. So wurde erreicht, dass der auf dem Plasmid codierte 5'-Bereich der zu analysierenden mRNA-Spezies in der Gesamt-RNA überrepräsentiert ist und somit wesentlich größere Mengen revers transkribiert werden können. Bei der Primer Extension-Analyse der *ectABC* Gene aus *S. pasteurii* konnte auf Erhöhung der zu analysierenden mRNA-Spezies Menge durch ein Shuttle-Plasmid verzichtet werden.

Die Zellen wurden im jeweiligen Minimalmedium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,6 – 1 gezogen. *S. pasteurii* Kulturen wurden ohne und mit 0,5 M NaCl wachsen gelassen, die *B. subtilis*- und *V. pantothenicus*-Stämme wurden im Minimalmedium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 kultiviert, dann wurden sie durch Zugabe von 4 M NaCl auf eine Endkonzentration von 0,4 M NaCl für 10, 30 und 60 Minuten einem hyperosmotischen Schock ausgesetzt. Ethanolstress wurde auf den *V. pantothenicus*-Stamm durch Zugabe von Ethanol (96% v/v) auf eine Endkonzentration von 4 % (v/v) ausgeübt. Um vor der RNA-Präparation sicherzugehen, dass die Zellen das jeweilige Plasmid trugen, wurde aus einem 1,5 ml Aliquot Plasmid-DNA isoliert. Für die Primer Extension-Reaktion wurden 20 µg Gesamt-RNA mit 10 pmol 5'-IRD-markiertem Oligonukleotid in 20 µl 1 x „avian myoblastosis virus reverse transcriptase (AMV)“-Puffer (Promega) gemischt. Als *S. pasteurii* *ectA*-spezifischer Primer wurde APP1 verwendet,

als *V. pantothenicus* *ectT*-spezifischer Primer wurde *ectTPE* verwendet. In einem Eppendorf-Thermomixer wurden die Gemische für 3 min auf 75°C erhitzt und der Thermomixer anschließend auf 42°C eingestellt, sodass ein langsames Abkühlen der Lösung erfolgte. Nach Zugabe von 1 µl dNTP-Mix (je 8 mM in 1 x AMV RT-Reaktionspuffer) und 10 Einheiten AMV reverse transcriptase (Promega) wurden die Ansätze für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit TE auf 200 µl aufgefüllt und mit 2,5 Volumen Ethanol auf Trockeneis gefällt. Nach Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C für 30 min wurde das Pellet in 10 µl 1 x Stopplösung (Thermo Sequenase Kit) aufgenommen. Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsprodukte auf dem Li-COR DNA-Sequencer Modell 4000 (siehe auch 5.1) wurden die Produkte in 1 x Stopplösung in 1:5er Schritten bis zu 1:25 verdünnt und anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert.

## 5 Konstruktion von Plasmiden, Genbanken und Bakterienstämmen

### 5.1 Konstruktion von Plasmiden

#### pAK2

Um eine DIG-markierte Gegenstrang-RNA-Sonde (siehe auch 5.4.1) eines '*ectB*'-Fragmentes aus *S. pasteurii* herzustellen, wurde ein 444 bp großes, internes '*ectB*' *Clal*-*XhoI*-Fragment aus pSPICE2 in den mit *Clal* und *XhoI* linearisierten Vektor pSK- ligiert. Das resultierende Plasmid pAK2 wurde zur Präparation einer Gegenstrang-RNA-Sonde unter der Kontrolle des T3 Phagen Promotors genutzt.

#### pAK8

Zur Herstellung von pAK8 wurde das Plasmid pJMB1 mit *EcoRI* verdaut, und ein 3537 bp großes *EcoRI*-Fragment aus pSPICE2, welches die vollständigen *ectABC* Gene mit dem Promotorbereich umfasst, wurde in den geschnittenen Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid war pAK8.

#### pAK9

Dieses Plasmid wurde aus der *Sau3A*-Genbank von *V. pantothenicus* (Kap. 6.2 Material und Methoden) isoliert. In das Plasmid pHSG575 war ein 4475 bp großes, chromosomales DNA-Fragment von *V. pantothenicus* ligiert worden, welches das *ectT*-Gene und ein Gen, das homolog zu einem Chaperon aus *B. subtilis* ist, enthält.

#### pAK10 und pAK15

Unter Verwendung der Primer *ect5'*PstI und *ect3'*EcoRI (Tab 5), die eine *PstI*- bzw. eine *EcoRI*-Schnittstelle erzeugen, wurde ein 955 bp großes '*ectB/ectC*' Fragment aus dem *S. pasteurii* Chromosom mittels PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit *PstI* und *EcoRI* verdaut und in das mit *PstI* und *EcoRI* linearisierte Plasmid pHSG575 ligiert. Das resultierende Plasmid war pAK10. Ein 2,1 kb großes *SmaI*-*XhoI* Restriktionsfragment, das ein Tetracyclin Resistenzgen enthielt, wurde aus pDG1515 isoliert und in das mit *EcoRV* und *XhoI* verdaute Plasmid pAK10 ligiert. In dem resultierenden Plasmid pAK15 ist ein internes Fragment (77 bp) von *ectB* durch die Tet<sup>r</sup>-Resistenzkassette ersetzt.

### pAK11 und pAK12

Unter Verwendung der Primer EcoRlectT5'2 und HindIIIlectT3' (Tab 5), die eine *EcoRI*- bzw. eine *HindIII* -Schnittstelle erzeugen, wurde ein 1919 bp großes *ectT*-Fragment aus dem *V. pantothenicus* Chromosom mittels PCR amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut und in das mit *EcoRI* und *HindIII* linearisierte Plasmid pUS19 ligiert. Das resultierende Plasmid war pAK11. Ein 2,3 kb großes *PvuII* Restriktionsfragment, das ein Tetracyclin Resistenzgen enthielt, wurde aus pOB26 isoliert und in das mit *PvuII* verdaute Plasmid pAK11 ligiert. In dem resultierenden Plasmid pAK12 ist *ectT* durch die Tet<sup>r</sup>-Resistenzkassette unterbrochen.

### pAK13

Unter Verwendung der Primer NcolectABCD und BamHlectABCD (Tab 5), die eine *NcoI*- bzw. eine *BamHI* -Schnittstelle erzeugen, wurde ein 2675 bp großes *ectABC* Fragment aus dem *S. pasteurii* Chromosom mittels PCR amplifiziert. Es wurde der „Master Amp Taq DNA Polymerase Mix“ (Epicentre Technologies, USA) für die PCR-Amplifikation verwendet. Dieses Fragment wurde mit *NcoI* und *BamHI* verdaut und in das mit *NcoI* und *BamHI* linearisierte Expressionsplasmid pSD270, welches den T5 P<sub>N25</sub> Phagen Promotor trägt, ligiert. Das resultierende Plasmid pAK13 trägt die [ $\Phi$ (*yckH-kan-comS-P<sub>T5/N25</sub>-ectABC-ycxA*)]-Fusion.

### pAK14

Unter Verwendung der Primer *ectT5'*BamHI und *ectT3'*EcoRI (Tab 5), die eine *BamHI*- bzw. eine *EcoRI*-Schnittstelle erzeugen, wurde ein 568 bp großes Fragment des *ectT*-Promotorbereiches und von *ectT'* aus dem *V. pantothenicus* Chromosom mittels PCR amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten *E. coli-B. subtilis* Shuttle-Vektor pRB373 ligiert. Das entstandene Plasmid wurde pAK14 genannt.

### pAK17

Unter Verwendung der Primer Ncolect5' und BamHlect3' (Tab 5), die eine *NcoI*- bzw. eine *BamHI* -Schnittstelle erzeugen, wurde ein 3382 bp großes *ectABCD* Fragment aus dem *St. coelicolor* A2(3) Chromosom mittels PCR amplifiziert. Es wurde der Master Amp Taq DNA polymerase Mix (Epicentre Technologies, USA) für die PCR-Amplifikation verwendet. Dieses Fragment wurde mit *NcoI* und *BamHI* verdaut und in das mit *NcoI* und *BamHI* linearisierte Expressionsplasmid pSD270, welches den T5 P<sub>N25</sub> Phagen Promotor trägt, ligiert. Das resultierende Plasmid pAK17 trägt die [ $\Phi$ (*yckH-kan-comS-P<sub>T5/N25</sub>-ectABCD-ycxA*)]-Fusion.

### pSPICE2

Das Plasmid pSPICE2 wurde aus einer eingeschränkten *EcoRI*-Genbank (siehe 6.2 Material und Methoden beschrieben) chromosomaler *S. pasteurii* DNA und dem Plasmid pHSG575 isoliert. pSPICE2 enthält ein 3537 bp großes DNA-Fragment, das die *ectABC* Gene und flankierende DNA-Regionen aus *S. pasteurii* enthält.

### pSPICE3

Das Plasmid pSPICE3 ist ein Derivat des Plasmids pCR2.1, in das ein 1024 bp großes PCR-Fragment, welches aus dem *V. pantothenicus* Chromosom amplifiziert wurde und einen Teil der Ectoinbiosynthesegen (*'ectB-ectC'*) trägt, integriert ist. Mit Hilfe des TA-Klonierungskits (Initrogen, Groningen, Niederlande) können PCR-Produkte direkt in den Vektor pCR2.1 inseriert werden. Die TA-Klonierung beruht auf der Eigenschaft der *Taq*-Polymerase, an die 3'-Enden jedes PCR-Produkts

ein Desoxyadenosin (A) zu heften. Der im Kit enthaltene, linearisierter Vektor pCR2.1 besitzt ein Desoxythymidin (T) an jedem 3'-Ende, sodass das PCR-Produkt über Wasserstoffbrückenbildung in den Vektor integrieren kann. Bei dieser Methode kann auf PCR-Primer mit Restriktionsschnittstellen verzichtet werden. In diesen Vektor wurden das PCR-Produkt der *'ectB-ectC'*-Gene aus *V. pantothenicus*, erhalten mit den heterologen Primern AKV1 und AKV2, integriert. Bei diesen Klonierungen wurde genau dem Handbuch des Herstellers (Invitrogen) gefolgt.

## 5.2 Herstellung von *S. pasteurii*- und *V. pantothenicus*-Genbanken

### 5.2.1 Herstellung einer eingeschränkten *EcoRI*-Genbank aus chromosomaler *S. pasteurii*-DNA

Um das vollständige Ectoinbiosynthese-Gencluster aus *S. pasteurii* zu isolieren, wurde chromosomale DNA des Bakteriums mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mit einer DIG-markierten *'ectB/ectC'* DNA-Sonde (1,4 kb Größe; hergestellt aus Plasmid pSPICE1) hybridisiert (Southern Blot-Analyse, siehe Abschnitt 5.2 Material und Methoden). Ein 3,5 kb großes, genomisches *EcoRI* DNA-Fragment reagierte mit der Sonde. Um diese DNA-Region aus dem Chromosom zu isolieren, wurden chromosomale *EcoRI* DNA-Restriktionsfragmente der entsprechenden Größe (3 bis 4 kb) aus präparativen Agarosegelen niedriger Schmelztemperatur isoliert und in den dephosphorylierten Vektor pHSG575, der zuvor mit *EcoRI* verdaut worden war, ligiert. Das Plasmid pHSG575 wurde gewählt, da es in der Zelle nur in wenigen Kopien vorliegt und somit die Isolation von Genen erlaubt, die in hoher Kopienzahl schädlich für die Bakterienzelle sein könnten.

Diese eingeschränkte Genbank wurde in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  transformiert, und die resultierenden Transformanten wurden in 10 Gruppen von jeweils 50 Kolonien geteilt. Die Plasmid-DNA wurde aus jeder Gruppe isoliert und nachfolgend mittels Southern Blot-Analyse, unter Verwendung der *'ectB/ectC'* DNA-Sonde, überprüft. Plasmid-DNA der Kolonien einer Gruppe, die positiv reagierten, wurden dann individuell in Southern Blot-Analysen auf das Vorhandensein der Ectoinbiosynthesegene getestet. Das resultierende Plasmid war pSPICE2, welches die *ectABC* Gene und flankierende DNA-Regionen aus *S. pasteurii* enthält.

### 5.2.2 Herstellung einer überlappenden *Sau3A*-Genbank aus chromosomaler *V. pantothenicus*-DNA

Um einen Ectointransporter aus *V. pantothenicus* zu isolieren, wurde die Methode der funktionellen Komplementation gewählt. Zunächst wurde eine überlappende *Sau3A*-Genbank aus chromosomaler *V. pantothenicus* DNA im Vektor pHSG575 hergestellt. Dazu wurden 7 mal ca. 10  $\mu$ g chromosomaler DNA, jeweils in einem Volumen von 20  $\mu$ l, für 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5 und 7 min bei 37 °C mit je 2 Einheiten der Endonuklease *Sau3A* verdaut, welche sofort danach bei 70 °C für 20 min hitzeinaktiviert wurde. Alle Ansätze wurden auf einem 1 %igem Agarosegel niedriger Schmelztemperatur aufgetrennt und DNA innerhalb der Größen zwischen 5 und 15 kb, dem Protokoll der Firma Promega folgend, aus dem Gel eluiert (siehe auch 5.1). Die eluierte DNA wurde in 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 6  $\mu$ g *Bam*HI-verdautem, dephosphoryliertem Vektor pHSG575 ligiert. Die Ligation wurde komplett in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Bis auf das Kontrollaliquot wurden alle Transformationen auf LB-Platten mit Cml ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von ca. 20000 Kolonien waren 90 % Lac<sup>-</sup> und trugen wahrscheinlich Plasmide. Dies ergab die Kontrolle mit einem Aliquot der Transformation, das auf LB-Platten mit XG, IPTG und Cml ausplattiert wurde. Alle Kolonien wurden von den Platten geschabt und in 50 ml LB-Medium mit Cml für 3 Stunden in 37 °C-Schüttelschrank inkubiert. 5 Aliquots von je 1 ml wurden für spätere Plasmidpräparationen mit Glycerin eingefroren, und vom Rest der Kultur wurde die Plasmid-DNA präpariert.

Die zur funktionellen Komplementation genutzte *E. coli*-Mutante MKH13 ist defizient für alle *E. coli* Gene, die Transporter für organische Osmolyte codieren. Diese Mutante wurde mit der *Sau3A*-Genbank von *V. pantothenicus* retransformiert, die Zellen auf LB-Agarplatten mit Cml ausplattiert und am nächsten Morgen auf MMA-Agarplatten mit 0,8 M NaCl, 1 mM Ectoin und Cml replikaplattiert.

Die Agarplatten wurden für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Falls ein Retransformant ein Plasmid mit einem oder mehreren Genen für einen Ectoimporter enthält und diese Gene funktionell in *E. coli* MKH13 exprimiert wurden, so konnte die Zelle auf den verwendeten Selektionsplatten wachsen und isoliert werden. Auf diesem Weg wurden 20 Retransformanten isoliert, die Plasmid-DNA aus diesen Zellen isoliert, welche nachfolgend mit den Oligonukleotiden pHSneu und lacZ-40 sequenziert wurden. Alle Plasmide enthielten die gleiche DNA-Region des *V. pantothenicus* Chromosoms. Das Plasmid pAK9, das so isoliert wurde, trägt ein 4475 bp großes Insert, welches das Gen für den Ectoimporter *ectT* aus *V. pantothenicus* enthält.

## 5.3 Konstruktion von *B. subtilis*- und *V. pantothenicus*-Stämmen

### 5.3.1 Konstruktion von *B. subtilis*-Stämmen

#### AKB2

Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes AKB2 [(*amyE::ectABC*)1] wurde das Plasmid pAK8 mit dem Restriktionsenzym *Cla*I linearisiert und in den Stamm JH642 transformiert. pAK8, ein Derivat des Plasmids pJMB1, trägt ein 543 bp Fragment des 5'-Endes („*amyE* back“) und ein 768 bp Fragment des 3'-Endes („*amyE* front“) des *amyE*-Gens aus *B. subtilis*. Zwischen diesen *amyE*-Fragmenten befindet sich die vollständige *ectABC*-Genregion (3537 bp) aus *S. pasteurii*. Diese Genregion wurde mittels homologer Rekombination zwischen der genomischen *amyE*-Sequenz und den *amyE*-Fragmenten, die die *ectABC*-Genregion flankieren, in das Genom von *B. subtilis* JH642 integriert. Es wurde auf chloramphenicolresistente Transformanten selektiert. Um die korrekte Integration der *ectABC*-Genregion in das *amyE*-Gen von *B. subtilis* zu überprüfen, wurde der AmyE-Phänotyp mittels des Amylase-Aktivitätstest (Cutting und Vander Horn 1990) bestimmt. Zur weiteren Kontrolle wurde eine Southern Blot-Analyse mit einer *amyE*-spezifischen Sonde durchgeführt, sodass in der Southern Hybridisierung sowohl die „*amyE* back“- als auch die „*amyE* front“- Region erfasst wurde.

#### AKB4 und AKB7

Zur Konstruktion des *B. subtilis*-Stammes AKB4 [ $\Phi$ (*yckH-kan-comS-P<sub>T5/N25</sub>-ectABC-ycxA*)(*amyE'*-*cat-p<sub>spac</sub>-comS-lacI'-amyE*)] wurde das Plasmid pAK13 mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Spe*I linearisiert und in den Stamm KE30 [ $\Phi$ (*yckH-comS-erm-ycxA*)(*amyE'*-*cat-p<sub>spac</sub>-comS-lacI'-amyE*)] transformiert. pAK13 ist ein Derivat des Plasmids pSD270 und trägt die *yckH*- und *ycxA*-Genregion aus *B. subtilis*. Zwischen diesen beiden Genen befindet sich ein Kanamycinresistenzgen und der T5 Phagen Promotor P<sub>N25</sub>, der vom vegetativen Sigmafaktor A aus *B. subtilis* erkannt wird (Schon & Schumann, 1994). Diesem Promotor ist eine LacI abhängige Operator-Region vorgestellt, die die Transkription in Anwesenheit von LacI unterdrückt, bis eine Induktion mit IPTG stattfindet. Im Plasmid pAK13 wurde eine Operonfusion der *ectABC* Gene aus *S. pasteurii* mit dem T5 Phagen Promotor P<sub>N25</sub> hergestellt, so dass die Transkription der Gene durch IPTG induziert werden kann. Diese P<sub>T5/N25</sub>-*ectABC*-Fusion wurde mittels homologer Rekombination zwischen den genomischen *yckH*- und *ycxA*-Sequenzen und den *yckH*- und *ycxA*-DNA-Fragmenten von pAK13 in das Genom von KE30 integriert. Der *B. subtilis* Stamm AKB4 trägt in seinem *amyE* Gen ein *cat* Gen und unter der Kontrolle eines *spac*-Promotors ein *comS* Gen. Zusätzlich trägt er das *lacI* Gen, dessen Genprodukt die Transkription des *ectABC*-Operons in AKB4 reprimiert. Es wurde auf kanamycinresistente Transformanten selektiert, die anschließend auf den Verlust der MLS-Resistenz überprüft wurden. So wurden Transformanten isoliert, die die *ectABC*-Operonfusion in ihr Genom über homologe Rekombination integriert hatten.

Der *B. subtilis*-Stamm AKB7 [ $\Phi$ (*yckH-kan-comS-P<sub>T5/N25</sub>-ectABCD-ycxA*)(*amyE'*-*cat-p<sub>spac</sub>-comS-lacI'-amyE*)] entstand aus der Transformation des Stammes KE30 mit dem Plasmid pAK17, das zuvor mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Spe*I linearisiert wurde. Das Plasmid pAK17 ist ein Derivat des Plasmids pSD270 (Beschreibung s. AKB4) mit einer Fusion der *ectABCD* Gene aus *St. coelicolor* mit dem T5 Phagen Promotor P<sub>N25</sub>, so dass die Transkription der Gene durch IPTG induziert werden kann. Diese P<sub>T5/N25</sub>-*ectABCD*-Fusion wurde mittels homologer Rekombination zwischen den

genomischen *yckH*- und *ycxA*-Sequenzen und den *yckH*- und *ycxA*-DNA-Fragmenten von pAK17 in das Genom von KE30 integriert. Die Selektion auf Transformanten mit der in das Genom integrierten *ectABCD*-Fusion wurde, wie bei AKB4 beschrieben, durchgeführt.

### 5.3.2 Konstruktion von *V. pantothenicus*-Stämmen

#### AKV2

Der *V. pantothenicus*-Stamm AKV2 [(*ectT::tet*)1] entstand aus der Transformation von *V. pantothenicus* mit dem Plasmid pAK12, das zuvor mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *Acc65I* linearisiert worden war. Es wurde auf tetracyclinresistente Transformanten selektiert. Anwesenheit und Struktur der [(*ectT::tet*)1] Mutation wurde mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse überprüft. Als Sonde diente ein 1,9 kb großes PCR-Fragment, das das gesamte *ectT* Gen enthielt.

#### AKV3

Zur Konstruktion des *V. pantothenicus*-Stammes AKV3 [ $\Delta$ (*ectB::tet*)1] wurde das Plasmid pAK15 mit den Restriktionsenzymen *ScaI* und *PvuII* linearisiert und unter Ausnutzung der natürlichen Kompetenz von *V. pantothenicus* in den Wildtyp-Stamm eingebracht. Es wurde auf tetracyclinresistente Mutanten selektiert. Die Anwesenheit der Mutation wurde durch eine Southern Blot-Analyse überprüft. Als Sonde diente das 1 kb große *EcoRI*-Fragment aus pSPICE3.

## 6 Biochemische Methoden

### 6.1 Messung der Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-markierten osmotischen Schutzsubstanzen

Die Aufnahme von osmotischen Schutzsubstanzen von *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* wurde mit Hilfe von [<sup>14</sup>C]-markiertem Glycin Betain (2,03 GBq/mmol) und [<sup>14</sup>C]-markiertem Ectoin (4,22 MBq/mmol) bestimmt. [<sup>14</sup>C]-markiertes Ectoin wurde von M. Jebbar (Universität Rennes, Frankreich) hergestellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Kulturen der jeweiligen Bakterien-Stämme wurden mit Vorkulturen, die über Nacht bei 37°C in den entsprechenden Minimalmedien gewachsen waren, auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 beimpft. Die Bakterien-Stämme wurden in 20 ml des jeweiligen Minimalmediums ohne und mit 0,4 M NaCl bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>578</sub> 0,3) gezogen, 2 ml der Kultur wurden mit dem [<sup>14</sup>C]-markierten Substrat (10-500 µM Endkonzentration) versetzt und bei 37°C 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 ca. 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 dienten 300 µl unfiltrierte Probe. Die gemessenen Zerfälle (dpm-Werte) wurden mit folgender Formel umgerechnet:  $\text{dpm} \cdot \text{nmol Substanz}_{(300 \mu\text{l})} \cdot (\text{OD}_{578} \cdot 0,03 \text{ mg Protein} \cdot \text{dpm}_{(300 \mu\text{l}) \text{ Referenz}})^{-1} = \text{nmol aufgenommene Substanz pro mg Zellprotein}$ . Bei der Berechnung wurde angenommen, dass eine OD<sub>578</sub> von 1 ungefähr 100 µg Protein pro ml Kultur entspricht (Miller 1992).

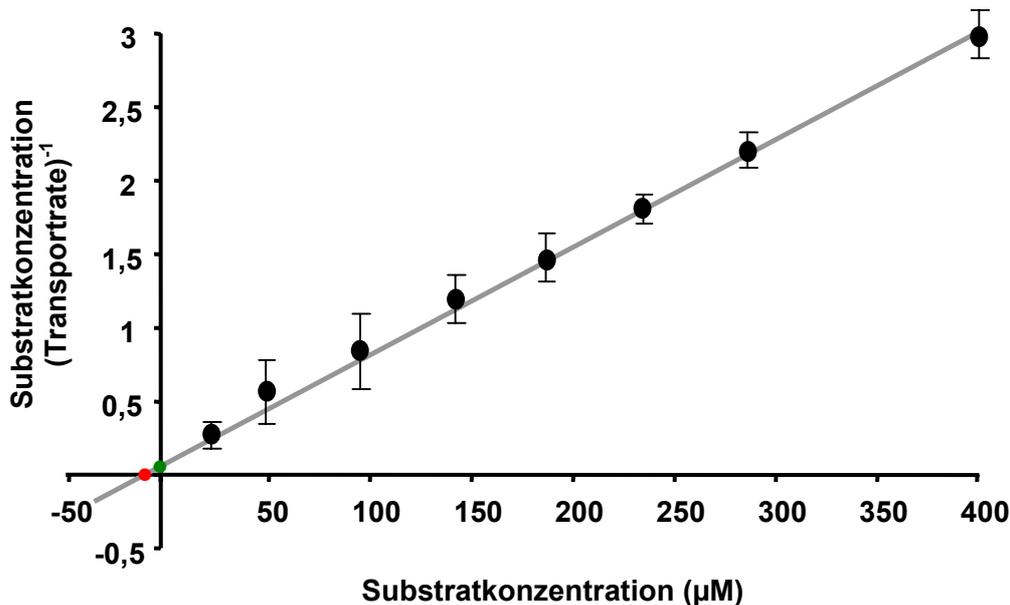
Ebenfalls wurden bei der Untersuchung der [<sup>14</sup>C]-markierten Glycin Betain Aufnahme in *S. pasteurii* Konkurrenzexperimente mit dem unmarkierten Kompetitor Ectoin durchgeführt. Unmarkiertes Ectoin wurde, in einer Endkonzentration von 1 mM gleichzeitig mit dem [<sup>14</sup>C]-markiertem Glycin Betain (Endkonzentration 10 µM) der Kultur zugesetzt. Nach Zugabe der Substrate wurde auch hier, wie oben beschrieben der [<sup>14</sup>C]-markiertem Glycin Betain Transport in *S. pasteurii* bestimmt.

### 6.1.1 Untersuchungen zur Aktivierung des Ectoin-Transportes in *V. pantothenicus*

Um die Aktivierung des Ectointransports zu untersuchen, wurde der *V. pantothenicus*-Wildtyp Stamm in Minimalmedium bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Die Ausgangskultur wurde dann in drei Einzelkulturen aufgeteilt. Ein Teil wurde mit  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  Chloramphenicol zum Zeitpunkt Null behandelt. Von allen drei Kulturen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die initiale Ectoinaufnahme, wie oben beschrieben, bestimmt. Die chloramphenicolbehandelte und eine weitere Kultur wurden nach 50 min einem hyperosmotischen Schock ausgesetzt. Dies erfolgte durch Zugabe einer auf  $37^\circ\text{C}$  temperierten, 4 M NaCl-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 0,4 M NaCl im Medium. Zu der dritten, ungestressten Kultur wurde die gleiche Menge vorgewärmtes Minimalmedium gegeben.

### 6.1.2 Kinetische Parameter des Ectointransportes unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus*

Um die kinetischen Parameter des Ectointransportes unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus* zu bestimmen, wurde der Wildtyp-Stamm, wie unter 7.1.1 beschrieben, in Minimalmedium kultiviert und dann einem hyperosmotischen Schock ausgesetzt, da vorhergehende Experimente gezeigt hatten, daß die  $[^{14}\text{C}]$ -Ectoinaufnahme 60 min nach einem hyperosmotischen Schock am größten ist. Diese Versuchsdurchführung sollte gewährleisten, dass auch bei geringen Ectoinkonzentrationen eine aussagekräftige Transportrate bestimmt werden konnte. In den jeweiligen Messungen wurde die  $[^{14}\text{C}]$ -Ectoinkonzentration von 10 bis 400  $\mu\text{M}$  variiert und nach graphischer



**Abb. 6**  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Bestimmung des osmotisch stimulierten Ectointransportes durch EctT

Darstellung in der Hanes-Woolf-Auftragung. Der Schnittpunkt mit der x-Achse =  $-K_m$  (●) und der Schnittpunkt mit der y-Achse =  $K_m V_{max}^{-1}$  (●) sind eingezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen ( $n_3$ ) und die Standardabweichung.

Auftragung der berechneten Transportwerte gegen die Zeit für jede Substratkonzentration die Transportrate  $v$  [ $\text{nmol mg Protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ ] errechnet. Zur Berechnung der  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werte wurde die Hanes-Woolf-Auftragung gewählt:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]+K_m}{V_{\max}}$$

Bei dieser Auftragungsmethode wird  $[S] v^{-1}$  gegen  $[S]$  aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden gibt dann nach einfach linearer Regression  $V_{\max}^{-1}$ , der Schnittpunkt mit der x-Achse  $-K_m$  und der Schnittpunkt mit der y-Achse  $K_m V_{\max}^{-1}$  an.

## 6.2 Expression der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthesegene in *B. subtilis*

Der *B. subtilis* Stamm AKB4 [ $\Phi(yckH\text{-}kan\text{-}comS\text{-}P_{T5/N25}\text{-}ectABC\text{-}ycxA)(amyE'\text{-}cat\text{-}p_{spac}\text{-}comS\text{-}lacl'\text{-}amyE)$ ] trägt eine Kopie der Fusion der Ectoinbiosynthesegene *ectABC* aus *S. pasteurii* mit dem T5 Phagen Promotor  $P_{N25}$  in seinem Chromosom. Der *B. subtilis* Stamm AKB7 [ $\Phi(yckH\text{-}kan\text{-}comS\text{-}P_{T5/N25}\text{-}ectABCD\text{-}ycxA)(amyE'\text{-}cat\text{-}p_{spac}\text{-}comS\text{-}lacl'\text{-}amyE)$ ] trägt eine Kopie der Fusion der Ectoin/Hydroxyectoinbiosynthesegene *ectABCD* aus *St. coelicolor* mit dem T5 Phagen Promotor  $P_{N25}$  in seinem Chromosom. Diesem Promotor ist eine *Lacl* abhängige Operator-Region vorgestellt, welche die Transkription in Anwesenheit von *Lacl* unterdrückt, bis eine Induktion mit IPTG stattfindet. Zur Induktion der Ectoin- und Hydroxyectoin-Biosynthese in *B. subtilis* wurden zwei Kulturen von beiden Stämmen in 80 ml LB-Medium bis zu einer  $OD_{578}$  von 0,7 wachsen gelassen. Dann wurde aus einer IPTG-Stammlösung (1 M) dieses Substrat zu einer Endkonzentration von 1 mM jeweils einer der Kulturen zugesetzt, der anderen Kultur wurde kein IPTG zugesetzt. Sie diente als Kontrolle. Die vier Kulturen wurden dann für weitere 2 h bei 220 rpm und 37°C im Schüttelschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min geerntet. Die Zellpellets wurden, wie unter 7.4 beschrieben, extrahiert und die Zellextrakte in der HPLC vermessen. Ebenfalls wurden Zellen von AKB7, wie oben beschrieben, aber in 2l LB-Medium für die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie (siehe 7.3) gezogen.

## 6.3 Analyse von Zellextrakten durch $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Zum Nachweis der intrazellulär akkumulierten osmotischen Schutzsubstanzen von verschiedenen *Bacillus*-Spezies und Spezies verwandter Genera wurden  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren (nuclear magnetic resonance) von ethanolischen Ganzzellextrakten aufgenommen. Dazu wurden 2x300 ml-Kulturen der verschiedenen Bakterien-Stämme in 2-Liter Erlenmeyerkolben bei 220 rpm im Schüttelschrank mit dem jeweiligen Minimalmedium angezogen. Die Osmolalität des Mediums wurde durch Zugabe von NaCl aus einer 5 M Stammlösung erhöht. Die Stämme wurden bei 37°C angezogen bis auf *S. psychrophila*, der bei 25°C wachsen gelassen wurde. Die Zellen wurden, wenn sie eine  $OD_{578}$  zwischen 2 und 3 erreicht hatten, durch Zentrifugation geerntet, einmal mit dem entsprechenden Medium ohne Glukose, aber mit gleicher Osmolalität gewaschen und wiederum abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellenpellet mit 80 % Ethanol (v/v) auf Eis für 30 min extrahiert, danach wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 15000 rpm entfernt. Der Überstand wurde in einem Rotationsverdampfer (Roth) eingedampft und anschließend in 0,5 ml  $\text{D}_2\text{O}$  (Fluka) und 0,5 ml  $\text{D}_2\text{O}$  mit internem Standard TSP ( $\text{D}_4\text{-3-Trimethylsilyl-Propionat}$ ; 7,5 mg) (Aldrich, Inc., USA) aufgenommen. Die [ $^{13}\text{C}$ ]-Kernresonanzspektren wurden, falls nicht anders angegeben, mit einem Bruker AC300 Spektrometer mit 75 Mhz mit einem dualen Probekopf aufgenommen (Nau-Wagner *et al.* 1999). Zum direkten Vergleich wurden die Spektren von je 100 mM der Reinsubstanzen Ectoin, Hydroxyectoin, Prolin und Glutamat aufgenommen. Die Lage aller Spektren wurde relativ zum Standard TSP bestimmt.

## 6.4 HPLC Analyse von Ectoin und Hydroxyectoin

Zellextrakte für die isokratische HPLC Analyse der Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin wurden nach einer modifizierten Blight und Dyer-Technik hergestellt (Kunte *et al.* 1993). Die untersuchten Bakterien wurden dazu unter den entsprechenden Bedingungen wachsen gelassen und Kulturvolumina, die 20 ml Kultur einer OD<sub>578</sub> von 1 entsprachen, wurden zur weiteren Analyse bei 5000 rpm abzentrifugiert und lyophilisiert. Das Trockengewicht der Zellpellets wurde bestimmt, und anschließend wurden die Zellen für 60 min mit 400 µl Extraktionslösung (Methanol/Chloroform/Wasser 10:5:4 (vol)) auf einem Vortexer stark geschüttelt. Dem folgte eine Zugabe von jeweils 130 µl Wasser und Chloroform. Die Mischung wurde für weitere 30 min geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min verstärkt. Die wässrige Phase, welche unter anderem die kompatiblen Solute enthielt, wurde über Nacht lyophilisiert. Das Pellet wurde in 100 µl Wasser und 400 µl Acetonitril (AcN) resuspendiert, falls notwendig in 80 % AcN (v/v) verdünnt und anschließend mittels HPLC analysiert.

Die für den Tetrahydropyrimidin-Nachweis und für die Aminosäure-Analyse (siehe auch 7.4) verwendete HPLC-Anlage stammte von der Firma Sykam (Gilching). 20 µl jeder Probe wurden mit einer GROM-SIL 100 Amino-1PR, 125x4 mm (3 µm) Säule (Grom, Herrenberg) aufgetrennt. Die Säulenkartusche stammte aus dem LiChroCart-Programm der Firma Merck (Darmstadt). Die Tetrahydropyrimidine wurden bei einer Wellenlänge von 210 nm mit einem UV/VIS-Detektor (SYKAM, Gilching) vermessen. Als Laufmittel wurde 80 % AcN (v/v) verwendet. Die Chromatographie wurde isokratisch mit einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup> bei 20°C durchgeführt. Retentionszeiten von Ectoin und Hydroxyectoin wurden durch die HPLC-Analyse von Standardlösungen beider Substanzen bestimmt.

## 6.5 HPLC-Analyse von Aminosäuren mittels Vorsäulen-Derivatisierung (FMOC/ADAM)

Die Bakterienzellen für die quantitativen Konzentrationsbestimmungen der Aminosäuren Prolin und Glutamat mittels HPLC wurden in den entsprechenden Minimalmedien mit verschiedenen Osmolalitäten gezogen. Die Zellen wurden auf die gleiche Weise extrahiert, wie unter 7.4 (Material und Methoden) beschrieben. Proben und Aminosäurestandardlösungen wurden mit 9-Fluorenyl-Methoxycarbonyl Chlorid (FMOC) derivatisiert. Dazu wurde der FMOC/1-Aminoadamantan (ADAM) Vorsäulenderivatisierungsmethode der Firma Grom in leicht modifizierter Form gefolgt. Zu 40 µl Natriumborat-Puffer (0,5 M, pH 7,7) mit dem internen Standard Taurin (50 µM) wurden 40 µl Probe oder Aminosäurestandard in angemessener Konzentration (5 – 60 µM) zugegeben. Schließlich wurden 80 µl FMOC-Reagenz II (Grom) zugefügt, das Gemisch für 45 s gevortext, danach 100 µl ADAM Reagenz (40 mM ADAM in Aceton/Wasser 1:1 (v/v)) zugefügt. Das ADAM Reagenz reagierte dann mit dem Überschuss des Fluoreszenzfarbstoffes FMOC unter Vortexen für 45 s. Anschließend wurden 140 µl Laufpuffer A (20 % AcN und 0,5 % Tetrahydrofuran in 50 mM Na-Acetatpuffer, pH 4,6) der Mischung zugesetzt, und 10 µl der derivatisierten Probe wurden auf einer Supersphere 60 RP-8 125x4 mm (3 µm) Säule (Grom) analysiert.

Die Säulenkartusche stammte aus dem LiChroCart-Programm der Firma Merck (Darmstadt). Zur Analyse der Aminosäurekonzentrationen wurde ein Gradient zwischen Laufpuffer A und B (80 % AcN in 50 mM Na-Acetatpuffer, pH 4,6) angelegt (E. A. Galinski, pers. Mitteilung). Die chromatographische Trennung der Aminosäuren wurde bei einer Flussrate von 1,25 ml min<sup>-1</sup> und bei 45°C durchgeführt. Fluoreszenz-markierte Aminosäuren wurden mit einem Fluoreszenzdetektor (SYKAM, Model S3400) bei einer Anregungswellenlänge von 245 nm und einer Emissionswellenlänge von 316 nm gemessen. Die Retentionszeiten der einzelnen Aminosäuren wurden durch die HPLC-Analyse von kommerziell erworbenen Aminosäure-Standardlösung bestimmt.

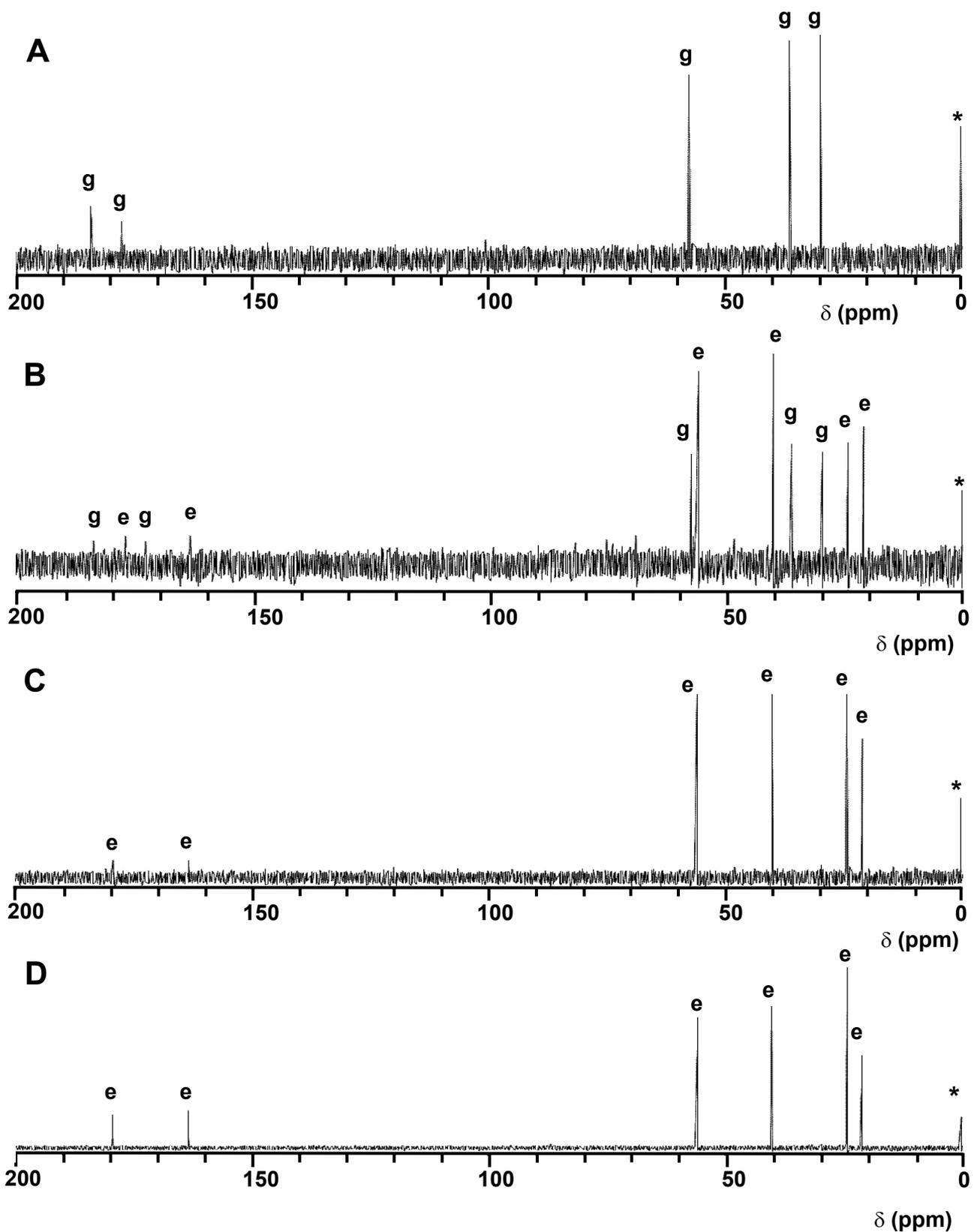
## IV. Ergebnisse

### 1 *de novo* Synthese organischer Osmolyte innerhalb des Genus *Bacillus* und verwandter Genera

Mittels  $^{13}\text{C}$ -Kernmagnetischer Resonanz Spektroskopie (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) ist es möglich, die intrazelluläre Anhäufung endogen synthetisierter kompatibler Solute zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode genutzt, um Vertreter des Genus *Bacillus* und verwandter Genera, die unter hochosmolaren Bedingungen gewachsen waren, auf die *de novo* Synthese organischer Osmolyte zu untersuchen. Alle zu untersuchenden Spezies wurden in definierten Minimalmedien gezogen, um die Akkumulation von exogen vorhandenen Osmoprotektiva (z. B. Glycin Betain), die in Bestandteilen von Vollmedien vorkommen, zu verhindern (Dulaney *et al.* 1968). Die aus der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse der untersuchten Spezies *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. thuringensis*, *B. alcalophilus*, *S. psychrophila*, *Sa. salexigens*, *A. aneurinilyticus* und *P. polymyxa* resultierenden Spektren sind im Anhang (Kap. 1) zu finden. Repräsentative Spektren von ethanolischer Zellextrakten aus *S. pasteurii* Kulturen, die in Minimalmedium ohne und mit 0,5, 1 und 1,5 M NaCl gewachsen waren, sind in Abbildung 7 dargestellt.

#### 1.1 Glutamat, Prolin und Ectoin: weitverbreitete, *de novo* synthetisierte Osmoprotektiva in *Bacillus* spp.

In voller Übereinstimmung mit Beobachtungen, dass Glutamat die vorherrschende Aminosäure im Zytoplasma von osmotisch ungestressten *B. subtilis* Kulturen (Whatmore *et al.* 1990) und *B. licheniformis* Kulturen (Clark *et al.* 1972) ist, konnte in der vorliegenden Arbeit Glutamat als das dominierende organische Molekül in allen untersuchten *Bacilli* Spezies identifiziert werden, wenn diese keinem osmotischen Stress ausgesetzt waren (Abb. 7) (Abb. 15) (Kap.1 Anhang). Eine Erhöhung der Osmolalität der Medien durch NaCl-Zugabe führte in den untersuchten Bakterienspezies zur Synthese der organischen Osmolyte Ectoine, Hydroxyectoin und Prolin, die glutamatspezifischen Signale wurden durch die kernmagnetischen Resonanzen der kompatiblen Solute unterdrückt (Abb. 7) (Abb. 15) (Kap.1 Anhang). An Hand der dreizehn untersuchten Bakterien-Spezies konnten fünf Muster der endogenen Osmolyt- Synthese unterschieden werden. Die resultierenden Gruppen repräsentieren: (i) Spezies, die Glutamat synthetisieren, (ii) Spezies, die Prolin synthetisieren, (iii) Spezies, die Ectoin produzieren, (iv) eine Spezies, die sowohl Ectoin als auch Hydroxyectoin synthetisiert und (v) eine Spezies, die neben Ectoin auch Prolin *de novo* synthetisieren kann. Fünf der dreizehn untersuchten Bakterien-Spezies sind in der Lage das Aminosäurederivat Ectoin allein oder in Kombination mit Prolin bzw. Hydroxyectoin unter hochosmolaren Bedingungen zu synthetisieren.



**Abb. 7**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren ethanolischer Zellextrakte

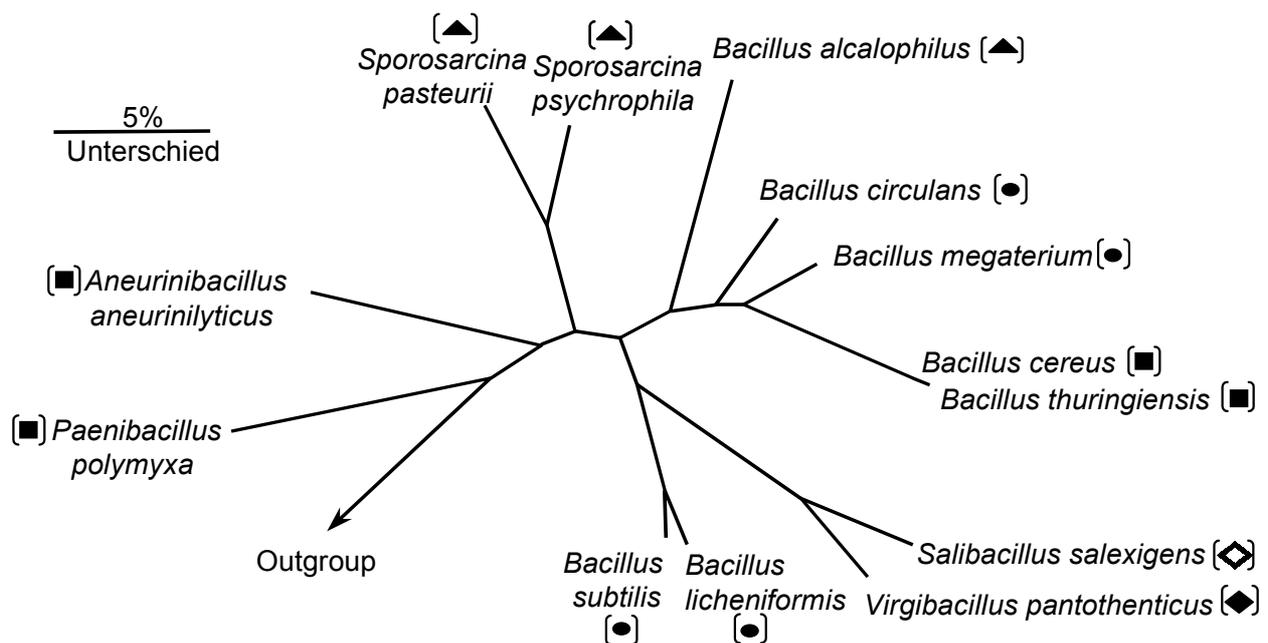
(A) *S. pasteurii* (DSM 33<sup>T</sup>) wurde in Minimalmedium (SMM) ohne NaCl gezogen, (B) in SMM mit 0,5 M NaCl, (C) in SMM mit 1,0 M NaCl, (D) in SMM mit 1,5 M NaCl. Resonanzen von Glutamat (g), Ectoin (e) und dem Standard  $\text{D}_4$ -3-Trimethylsilylpropionat (\*) sind markiert. Die chemischen Verschiebungen [angegeben in ppm relativ zum Standard  $\text{D}_4$ -3-Trimethylsilylpropionat] sind für Glutamat 27,9; 34,6; 55,8; 175,3; 184,1 und für Ectoin 19,6; 23,5; 38,3; 54,4; 161,9 und 177,8.

**Tabelle 13. Bei hoher Osmolalität *de novo* synthetisierte organische Osmolyte verschiedener *Bacillus* Spezies und verwandter Genera analysiert mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie**

Stamm	Medium (M NaCl)	Ectoin	Prolin	Glutamat	andere
<i>Bacillus cereus</i> (DSM 31 <sup>T</sup> )	SMM (0,5)	-	-	+	
<i>Bacillus circulans</i> (DSM 9 <sup>T</sup> )	SMM (0,5)	-	-	+	
<i>Bacillus thuringensis</i> (DSM 2046 <sup>T</sup> )	SMM (0,5)	-	-	+	
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> (DSM 5562 <sup>T</sup> )	SMM (0,5)	-	-	+	
<i>Paenibacillus polymyxa</i> (DSM 36 <sup>T</sup> )	SMM (0,5)	-	-	+	
<i>Bacillus subtilis</i> (JH642)	SMM (1)	-	+	+	
<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 13 <sup>T</sup> )	SMM (1)	-	+	+	
<i>Bacillus megaterium</i> (DSM 32 <sup>T</sup> )	SMM (1)	-	+	+	
<i>Bacillus alcalophilus</i> (DSM 485 <sup>T</sup> )	SMM (1)	+	-	+	
<i>Sporosarcina psychrophila</i> (DSM 3 <sup>T</sup> )	SMM (1)	+	-	+	
<i>Sporosarcina pasteurii</i> (DSM 33 <sup>T</sup> )	SMM (1)	+	-	+	
<i>Salibacillus salexigens</i> (DSM 11438 <sup>T</sup> )	MM (3,4)	+	-	+	Hydroxyectoin
<i>Virgibacillus pantothenicus</i> (DSM 26 <sup>T</sup> )	SMM (1)	+	+	+	

## 1.2 16S rRNA-Stammbaum der untersuchten Bakterienspezies

Um zu untersuchen, ob die Muster der endogenen Osmolyt-synthese ein phylogenetisches Merkmal darstellen, wurde ein Stammbaum, basierend auf den Sequenzen der 16S rRNA-Gene der untersuchten Bakterienspezies, erstellt (Abb. 8). Die jeweils *de novo* synthetisierten Osmoprotektiva sind durch Symbole den entsprechenden Bakterien zugeordnet (Abb. 8). Eine Analyse der Daten aus Tabelle 13 unter Berücksichtigung des Verwandtschaftsgrades der Stämme lässt den Schluss zu, dass phylogenetisch nah verwandte Bakterienspezies auch die gleichen Osmoprotektiva unter hochosmolaren Umweltbedingungen synthetisieren. So produzieren *B. subtilis* und *B. licheniformis*, die nah verwandt sind, unter hochosmolaren Bedingungen die Aminosäure Prolin. Eine Ausnahme bilden *S. salexigens* und *V. pantothenicus*. Beide Mikroorganismen sind ebenfalls eng miteinander verwandt und synthetisieren *de novo* Ectoin, aber *S. salexigens* ist ebenfalls in der Lage, Hydroxyectoine unter hypertonen Bedingungen zu produzieren. *V. pantothenicus* hingegen synthetisiert als zweites dominierendes Osmoprotektivum Prolin.



**Abb. 8 Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen**

Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen der *Bacilli* Spezies und Spezies verwandter Genera, die in dieser Arbeit auf ihre *de novo* Osmolyt-synthese untersucht wurden. Glutamat synthetisierende Spezies (■), Prolin synthetisierende Spezies (●), Ectoin synthetisierende Spezies (▲), Ectoin/Prolin synthetisierende Spezies (◆) und Ectoin/Hydroxyectoin synthetisierende Spezies (◇) sind gekennzeichnet. Die Linie repräsentiert 5 % Sequenzunterschied. Die Outgroup (nicht gezeigt) bestand aus einer Sammlung von mehr als 100 vollständigen 16S RNA Gensequenzen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Die phylogenetische Analyse und der Stammbaum wurden von Dr. D. R. Arahal (Universität Valencia, Spanien) erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

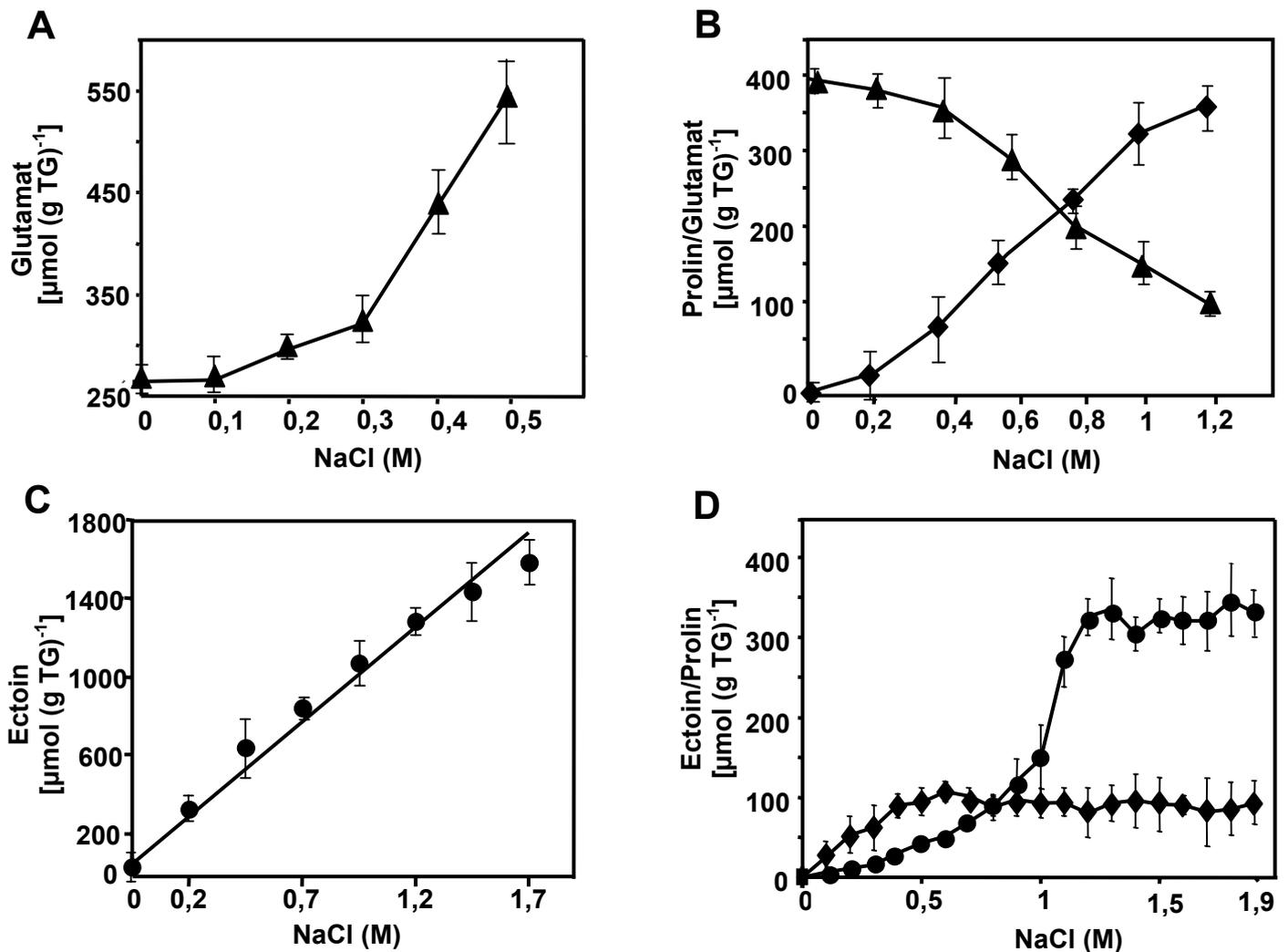
### 1.3 Hypertone Bedingungen stimulieren die endogene Osmolytsynthese

Neben der qualitativen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse der *de novo* Synthese von organischen Soluten unter hochosmolaren Bedingungen wurde ebenfalls eine quantitative Untersuchung der Osmolyt-Konzentrationen in Abhängigkeit zur Osmolalität des Mediums mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) durchgeführt. Fünf Bakterienspezies wurden stellvertretend für die identifizierten Osmolytsynthesemuster in osmotisch gestressten Gram-positiven Bakterien analysiert (Abb. 9).

*B. cereus* als Vertreter der Gruppe von Bakterien, bei denen lediglich Glutamat mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse detektiert werden konnte, synthetisiert Glutamat in osmotisch regulierter Weise. Bei erhöhter Osmolalität des Mediums steigt auch die Glutamatkonzentration in den Zellen. Dennoch bilden die glutamatsynthetisierenden Bakterien die osmosensitivste der fünf Gruppen (Abb. 9A). *B. licheniformis* wurde auf die endogene, osmotisch stimulierte Synthese des Osmoprotektivums Prolin untersucht. Auch in diesem Bakterium konnte eine Stimulation der Prolinbiosynthese durch hochosmolare Bedingungen festgestellt werden (Abb. 9B). Ebenfalls war zu beobachten, dass die intrazelluläre Glutamatkonzentration bei einer Erhöhung der Osmolalität des Mediums abnahm. Vermutlich ist die unter hochosmolaren Bedingungen stark erhöhte Prolinsynthese in *B. licheniformis* verantwortlich für die Abnahme der Glutamatkonzentration. In *S. pasteurii* wurde die Ectoinbiosynthese ebenfalls in Abhängigkeit zur Osmolalität des Mediums analysiert. In diesem Organismus ist die Ectoinbiosynthese fein auf die Salinität der Umgebung abgestimmt und steht in linearer Abhängigkeit zu ihr (Abb. 9C).

*V. pantothenicus* ist in der Lage, sowohl Ectoin als auch Prolin unter hochosmolaren Bedingungen zu synthetisieren. Die HPLC-Analyse von Kulturen, die bei unterschiedlichen Osmolalitäten im Minimalmedium gezogen worden waren, ergab, dass Prolin das dominierende Osmoprotektivum bei niedrigen NaCl-Konzentrationen ist, während Ectoin nur in geringen Mengen unter diesen Bedingungen im Zytosol vorliegt. Bei hoher Osmolalität (0,9 bis 1,9 M NaCl) ist hingegen Ectoin das vorherrschende kompatible Solut. Die intrazelluläre Prolin Konzentration erreicht bei 0,6 M NaCl ihr Maximum und bleibt auf diesem Niveau, unabhängig von einer weiteren Erhöhung der NaCl-Konzentration des Mediums (Abb. 9D). Weiterhin konnte keine Abhängigkeit der Ectoin- und Prolinbiosynthese von der Wachstumsphase in *V. pantothenicus* festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

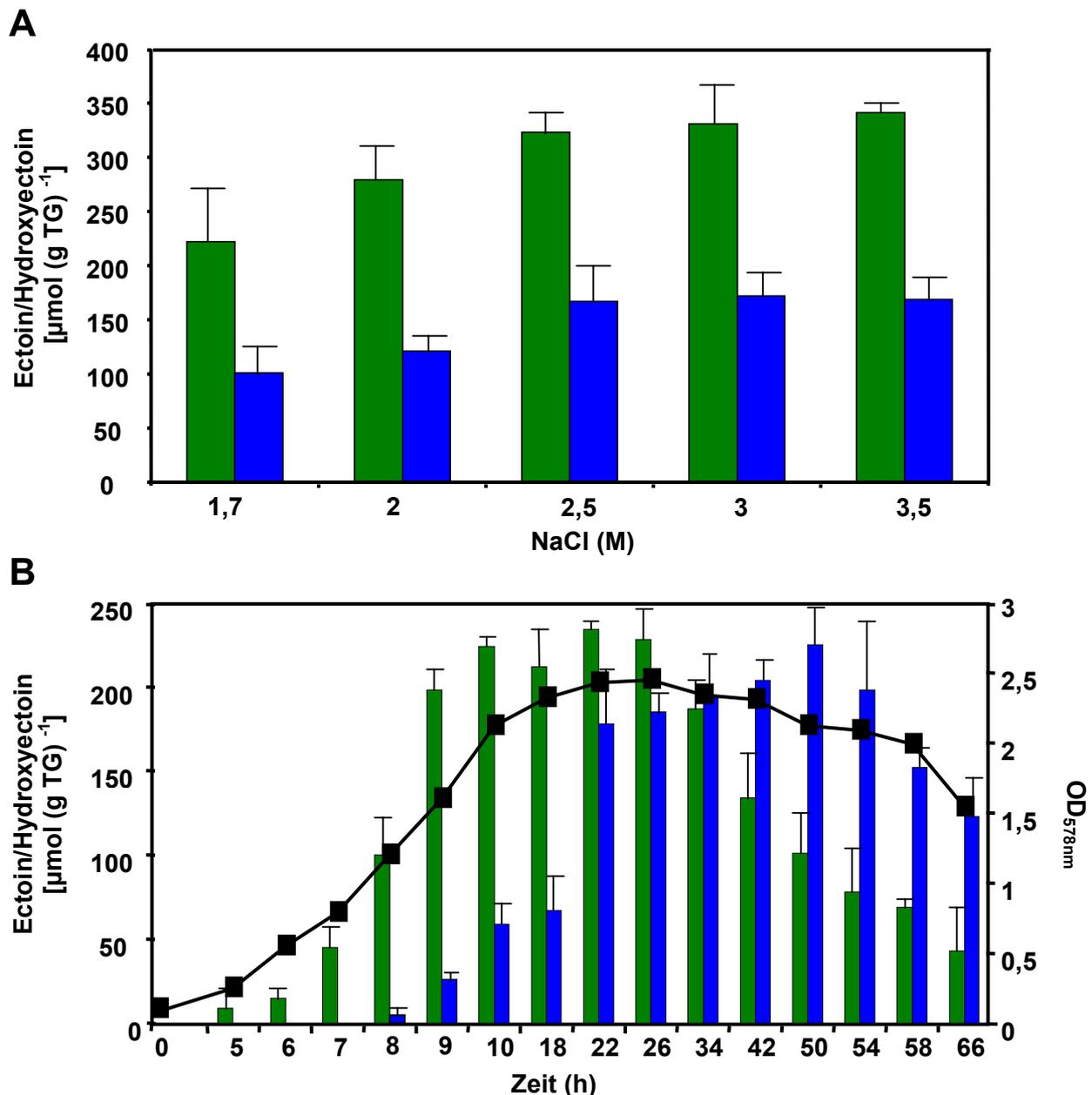
*Sa. salaxigens* war die einzige untersuchte Spezies, die sowohl Ectoin als auch Hydroxyectoin synthetisieren kann (Abb. 10) (Kap. 1.3.3 Anhang). Zunächst wurden die Konzentrationen der beiden Osmoprotektiva in Abhängigkeit zur NaCl-Konzentration des Mediums bestimmt. Die Kulturen wurden alle bei  $\text{OD}_{578} = 1$  in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet.



**Abb. 9 Osmotisch kontrollierte Synthese kompatibler Solute in *Bacillus* spp. und verwandter Genera**

Alle untersuchten Stämme wurden in dem entsprechenden Minimalmedien mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen angezogen und bei einer  $OD_{578}$  von 1 geerntet. Die Konzentrationen der kompatiblen Solute wurde mittels HPLC bestimmt. Die Osmolyte wurden wie folgt gekennzeichnet: Glutamat ( $\blacktriangle$ ), Prolin ( $\blacklozenge$ ) und Ectoin ( $\bullet$ ). Die *de novo* Osmolytsynthese wurde in (A) *B. cereus*; (B) *B. licheniformis*; (C) *S. pasteurii*; (D) *V. pantothenicus* untersucht.

Bei steigender externer Salinität nimmt sowohl die intrazelluläre Ectoin als auch die Hydroxyectoin Konzentration in *Sa. salexigens* zu (Abb. 10A). Ectoin ist das dominierende kompatible Solut unter diesen Bedingungen und liegt ungefähr im Verhältnis 2:1 zu Hydroxyectoin vor (Abb. 10A). Untersuchungen der Hydroxyectoinsynthese in anderen Bakterien hatten gezeigt, dass diese wachstumsphasenabhängig reguliert wird: Während in der exponentiellen Wachstumsphase Ectoin das dominierende Osmoprotektivum ist, ist Hydroxyectoin das vorherrschende kompatible Solut in der Stationärphase (Galinski 1995). Um eine mögliche wachstumsphasenabhängige Änderung zwischen Ectoin und Hydroxyectoin Konzentration in *Sa. salexigens* zu identifizieren, wurde das Bakterium im Minimalmedium mit 1,5 M NaCl wachsen gelassen und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben



**Abb. 10 Die Hydroxyectoinsynthese in *Sa. salexigens* ist von der Wachstumsphase und der Osmolalität abhängig**

(A) *Sa. salexigens* wurde in Minimalmedium der angegebenen Osmolalität wachsen gelassen und bei OD<sub>578</sub> 1 geerntet. Der Ectoin- (■) und Hydroxyectoin-Gehalt (■) der Proben wurde mittels HPLC bestimmt. (B) *Sa. salexigens* wuchs in Minimalmedium mit 1,7 M NaCl. Das Wachstum (■) wurde photometrisch durch OD<sub>578</sub>-Messung bestimmt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Kultur Proben für die HPLC-Analyse entnommen. Die Ectoin- (■) und Hydroxyectoin-Konzentration (■) sind dargestellt. Aufgetragen wurden Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen HPLC-Messungen (n<sub>3</sub>).

für die HPLC-Analyse entnommen. Auch in *Sa. salexigens* konnte eine Zunahme der Hydroxyectoinkonzentration in der Stationärphase festgestellt werden, die Ectoinkonzentration hingegen nahm in dieser Wachstumsphase ab (Abb. 10B). Im *Sa. salexigens* Kulturen der späten Stationärphase liegt Ectoin in Verhältnis 1:2 zu Hydroxyectoin vor.

## 2 Die Ectoinbiosynthese in *S. pasteurii* ist osmotisch stimuliert

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse der verschiedenen Gram-positiven Bakterien zeigte, dass die *de novo* Ectoinbiosynthese unter hochosmolaren Bedingungen im Genus *Bacillus* und in nah verwandten Genera weitverbreitet ist. Um die Biosynthese dieses kompatiblen Solute in *Bacillus* spp. detaillierter zu untersuchen, wurde *Sporosarcina pasteurii* als Modellorganismus für weitere Experimente gewählt, da dieses Bakterium ausschließlich Ectoin unter hochosmolaren Bedingungen synthetisiert. *S. pasteurii* war früher Mitglied des Genus *Bacillus*, wurde aber kürzlich umklassifiziert und wird seither zum Genus *Sporosarcina* gezählt (Yoon *et al.* 2001).

Es wurde untersucht, ob die Ectoinbiosynthese eine osmotische oder eine salzspezifische Anpassungsreaktion in diesem Bakterium darstellt. *S. pasteurii* wurde dazu in Minimalmedium gezogen, dessen Osmolalität durch Zugabe äquiosmolarer Mengen ionischer (NaCl, KCl) und nichtionischer (Saccharose, Laktose, Glycerin) osmotisch aktiver Solute erhöht worden war. Die Zellen wurden mittels HPLC auf ihren Ectoingehalt analysiert (Tab. 14).

**Tabelle 14. Osmotisch stimulierte Ectoinbiosynthese in *S. pasteurii***

Medium <sup>a</sup>	Ectoin [ $\mu\text{mol (g TG)}^{-1}$ ] <sup>b</sup>
SMM (680 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	n. d. <sup>c</sup>
SMM mit 0,4 M NaCl (1 400 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	400 $\pm$ 43
SMM mit 0,4 M KCl (1 400 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	590 $\pm$ 83
SMM mit 0,64 M Saccharose (1 400 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	594 $\pm$ 97
SMM mit 0,68 M Laktose (1 400 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	360 $\pm$ 77
SMM mit 1,1 M Glycerin (1 400 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	n. d. <sup>c</sup>
SMM mit 0,4 M NaCl + 1 mM Glycin Betain (1 400 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	n. d. <sup>c</sup>
SMM mit 0,68 M Saccharose + 1 mM Glycin Betain (1 400 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	n. d. <sup>c</sup>

<sup>a</sup> *S. pasteurii* (DSM33<sup>T</sup>) Kulturen wurden in SMM mit den angegebenen ionischen und nichtionischen Osmolyten gezogen. Ectoin wurde mittels HPLC quantifiziert.

<sup>b</sup> Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängig gewachsenen Kulturen. Der Ectoingehalt jeder Kultur wurde doppelt bestimmt.

<sup>c</sup> n. d.: Ectoin konnte nicht detektiert werden.

Es konnte eine Induktion der Ectoinbiosynthese durch ionische (NaCl, KCl) und nichtionische (Saccharose, Laktose) osmotisch aktive Substanzen festgestellt werden (Tab. 14). Die Ectoinbiosynthese in *S. pasteurii* stellt demnach eine Anpassungsreaktion an eine erhöhte Osmolalität der Umwelt dar.

Da Glycerin durch die Zytoplasmamembran diffundieren kann, ist es nicht in der Lage, einen osmotischen Gradienten über dieser aufzubauen. Es konnte daher kein Ectoin in Kulturen mit Glycerin als zugesetztem Osmolyt detektiert werden (Tab. 14). Die Anwesenheit des potenten kompatiblen Solute Glycin Betain, das auch *S. pasteurii* osmotisch schützt (Abb. 13), unterdrückte unter hochosmolaren Bedingungen die endogene Ectoinbiosynthese. Dieses Ergebnis zeigt, dass *S. pasteurii* die Aufnahme bereits synthetisierter kompatibler Solute aus der Umwelt ihrer *de novo* Synthese vorzieht.

### **3 Isolierung und Charakterisierung der Ectoinsynthese gene aus *S. pasteurii***

Um die Ectoinbiosynthese in *S. pasteurii* auch auf molekularer Ebene näher zu untersuchen, wurden die Ectoinbiosynthese gene aus diesem Bakterium isoliert. Zunächst konnte ein 1,4 kb großes DNA-Fragment aus *S. pasteurii* isoliert werden, das einen Teil des *ectB*- sowie des *ectC*-Gens enthielt. Dieses DNA-Fragment konnte mittels PCR, durchgeführt mit degenerierten Primern und unter unstringenten Bedingungen, aus dem Chromosom von *S. pasteurii* amplifiziert und kloniert werden. Das resultierende Plasmid war pSPICE1 (Diplomarbeit Anne Kuhlmann). Die Nukleotidsequenz der degenerierten Primer wurden an hand der Sequenzen bekannter Ectoinbiosynthese gene cluster von *Marinococcus halophilus* (Louis und Galinski 1997) und *Halomonas elongata* (Göller *et al.* 1998) abgeleitet. Das DNA-Fragment aus pSPICE1 diente dann als homologe DIG-markierte DNA-Sonde, um ein chromosomales Restriktionsfragment aus *S. pasteurii* zu isolieren, welches das vollständige Ectoinsynthese gene cluster enthielt. Es konnte auf diesem Weg ein 3,5 kb großes *EcoRI* Restriktionsfragment identifiziert werden, welches mit der '*ectB/ectC*'-Sonde hybridisierte. Eine DNA-Genbank aus genomischen, mit *EcoRI* verdauten, 3 bis 4 kb großen Restriktionsfragmenten wurde mit dem Vektor niedriger Kopienzahl pHSG575 hergestellt. Plasmide, die mit der '*ectB/ectC*'-Sonde hybridisierten, wurden daraus isoliert. Eines der Plasmide war pSPICE2, welches ein 3,5 kb chromosomales DNA-Fragment aus *S. pasteurii* enthielt. Die Sequenzierung des Inserts ergab, dass es das vollständige Ectoinbiosynthese gene cluster (*ectABC*) und stromaufwärts 415 bp umfassende bzw. stromabwärts 682 bp umfassende flankierende DNA-Bereiche enthielt (Kap. 2 Anhang).

### 3.1 DNA-Sequenzanalyse der *ectABC*-Region aus *S. pasteurii*

Die Sequenz des gesamten chromosomalen DNA-Inserts (3537 bp) des Plasmids pSPICE2 wurde bestimmt. Eine Analyse dieser DNA-Region mittels des DNASTAR Computerprogrammes zeigte, dass drei offene Leserahmen, alle in die gleiche Richtung orientiert, in diesem DNA-Bereich vorhanden waren (Abb. 11A). Diese offenen Leserahmen codierten potentielle Proteine mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 20,1 kDa (182 Aminosäuren, EctA), 47,1 kDa (427 Aminosäuren, EctB) und 14,9 kDa (135 Aminosäuren, EctC). Vor jedem der offenen Leserahmen konnte eine potentielle Ribosomenbindestelle identifiziert werden, die jeweils homolog zu typischen Ribosomenbindestellen aus *B. subtilis* war. Es konnte keine Sequenz für eine Rho-Faktor unabhängige Termination der Transkription durch visuelle Untersuchung der DNA-Sequenz unter dem Transkriptionsterminations-Codon von *ectC* gefunden werden. Solche Sequenzen bestehen typischerweise aus 7 bis 18 bp, die eine haarnadelförmige Sekundärstruktur bilden und von mehreren Thymin-Basen gefolgt werden (Kap. 2 Anhang). Die beschriebenen offenen Leserahmen wurden als *ectABC* bezeichnet und die potentiellen codierten Proteine als EctABC.

#### 3.1.1 Die Ectoinbiosynthese ist hoch konserviert in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

Datenbank-basierende Untersuchungen unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) ergaben einen signifikant hohen Grad von Sequenzidentität der potentiellen EctABC Proteine aus *S. pasteurii* mit Enzymen, die an der Ectoinbiosynthese in den moderat halophilen Bakterien *M. halophilus* (DSM 20408<sup>T</sup>) (Louis und Galinski 1997), *H. elongata* (DSM 2581<sup>T</sup>) (Göller *et al.* 1998) und *Ch. salexigens* (DSM 3043) (Canovas *et al.* 1997; Canovas *et al.* 1998) (Tab. 15) beteiligt sind. Ein Aminosäuresequenzvergleich der potentiellen EctABC-Proteine aus *S. pasteurii* mit potentiellen und bereits charakterisierten Ectoinbiosyntheseproteinen anderer Bakterien ist im Anhang (Kap. 4) dargestellt. Weitere Datenbankuntersuchungen zeigten auch potentielle *ectABC*-Gencluster in vollständig sequenzierten Genomen von *B. halodurans* (Takami *et al.* 2000), *Vibrio cholerae* (Heidelberg *et al.* 2000) und dem teilweise sequenzierten Genom von *Streptomyces coelicolor* (Acc. no. AL591322) (Tab. 15). Grundsätzlich besitzen die potentiellen EctABC Proteine aus *S. pasteurii* eine höhere Sequenzidentität zu den abgeleiteten Proteinsequenzen der Gram-positiven Bakterien *M. halophilus*, *B. halodurans* und *St. coelicolor* als zu denen Gram-negativer Bakterien wie *C. salexigens*, *H. elongata* and *V. cholerae* (Tab. 15). Der bemerkenswert hohe Grad der Sequenzidentität (bis zu 64%) der Proteinsequenzen und die konservierte Organisation der *ectABC*-Gene in allen sieben Mikroorganismen legt den Schluss nahe, dass der gesamte Ectoinbiosyntheseweg evolutionär hoch konserviert in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vorliegt.

**Tabelle 15. Sequenzidentitäten der potentiellen EctABC-Proteine aus *S. pasteurii* mit den EctABC-Proteine aus *M. halophilus*, *H. elongata*, *B. halodurans*, *V. cholerae* und *St. coelicolor***

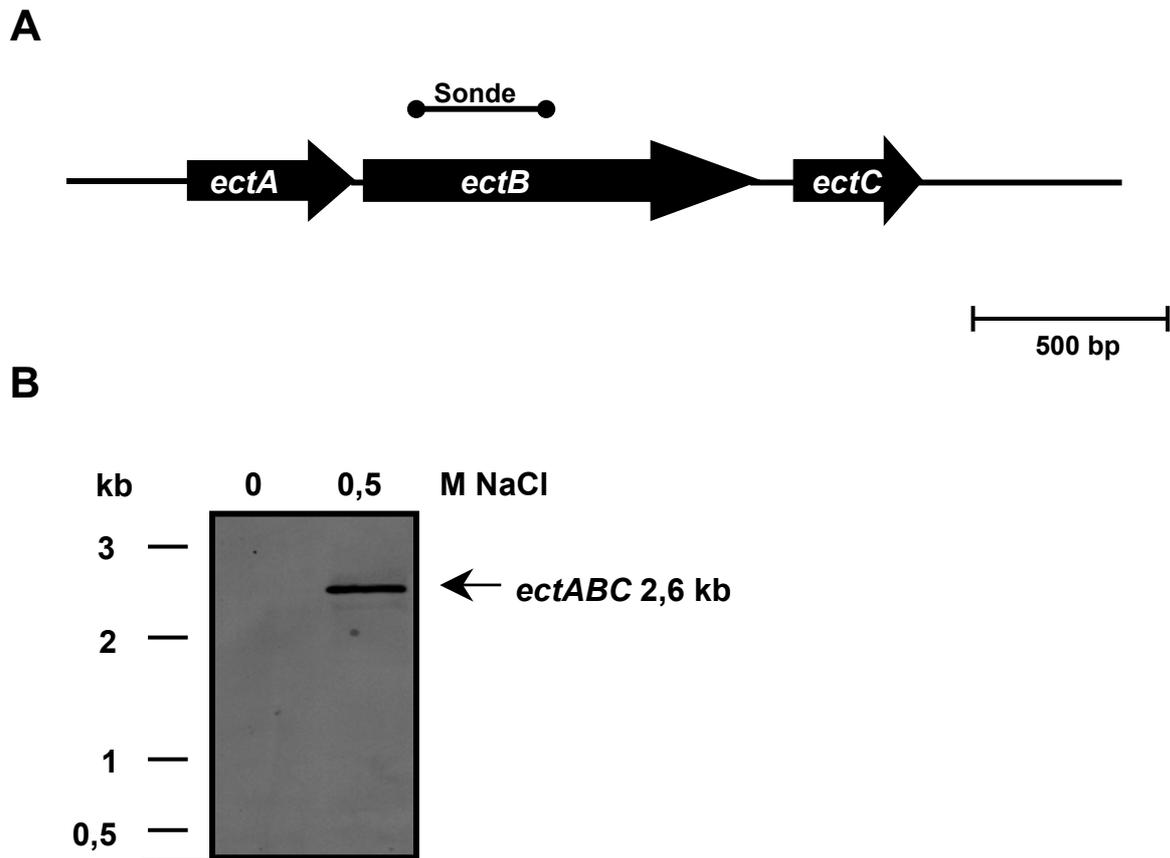
Protein	Sequenzidentitäten (%)						
	<i>S. pasteurii</i> (DSM 33 <sup>T</sup> )	<i>M. halophilus</i> (DSM 20408 <sup>T</sup> )	<i>H. elongata</i> (DSM 2581 <sup>T</sup> )	<i>Ch. salexigens</i> (DSM 3043 <sup>T</sup> )	<i>B. halodurans</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>St. coelicolor</i> A3(2)
EctA	100	40,1	26,5	28,7	36,5	29,5	28,8
EctB	100	58,5	49,9	48,5	62,9	48,4	52,5
EctC	100	58,9	48,5	50,0	64,3	55,6	48,5

### 3.2 Funktionelle Expression der Ectoinbiosynthesegene in *B. subtilis*

Es sollte festgestellt werden, ob die *ectABC*-Gene aus *S. pasteurii* in *E. coli* und *B. subtilis* funktionell exprimiert werden und zu einer Ectoinsynthese in diesen Bakterien, die natürlicherweise nicht zur Ectoinsynthese fähig sind, führen. Weder der *E. coli* Stamm MC4100, transformiert mit dem Plasmid pSPICE2, das die vollständige *ectABC*-DNA Region aus *S. pasteurii* enthielt, noch der *B. subtilis* Stamm AKB2, der eine Kopie der *ectABC*-Gene im *amyE* Genort trug, produzierten unter hochosmolaren Bedingungen Ectoin, wie HPLC-Analysen ergaben (Daten nicht gezeigt). Um dennoch zu beweisen, dass die *ectABC*-Gene aus *S. pasteurii* für die Ectoinproduktion verantwortlich sind, wurde eine Fusion der Gene mit dem IPTG induzierbaren T5 Phagen Promotor P<sub>N25</sub> (Schön und Schumann 1994) als Kopie in das Chromosom des *B. subtilis* Stammes KE30 eingebracht. Der resultierende Stamm war AKB4. Kulturen von AKB4 wurden in LB-Medium mit und ohne IPTG (1 mM) wachsen gelassen und nachfolgend mittels HPLC auf Ectoinproduktion untersucht. In der AKB4 Kultur ohne IPTG konnte kein Ectoin detektiert werden, aber in Gegenwart von IPTG erfolgte in AKB4 die Transkription der *ectABC*-Gene aus *S. pasteurii*, vermittelt durch den T5 Phagen Promotor P<sub>N25</sub>, wodurch der natürliche „Nicht-Ectoinproduzierer“ *B. subtilis*  $16 \pm 1,85 \mu\text{mol Ectoin (g TG)}^{-1}$  synthetisierte. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die *ectABC*-Gene aus *S. pasteurii* für die Synthese des Tetrahydropyrimidins Ectoin verantwortlich sind. Der native *S. pasteurii* Promotor der *ectABC*-Gene ist weder in *E. coli* noch in *B. subtilis* hinreichend für eine funktionelle Expression der Gene.

### 3.3 Transkriptionelle Analyse des *ectABC*-Operons aus *S. pasteurii*

In *S. pasteurii* trennt eine intergene Region von 49 bp das *ectA* und das *ectB* Gen, während *ectB* durch 158 bp von *ectC* getrennt ist. Diese nahe Lokalisation der Gene konnte ein Hinweis auf die gemeinsame Transkription als Operon sein. Außerdem zeigten die physiologischen Untersuchungen, dass die Ectoinbiosynthese in *S. pasteurii* osmotisch reguliert wird. Um festzustellen, ob diese Regulation auf transkriptioneller Ebene stattfindet und ob die Gene als Operon organisiert sind, wurde eine Northern Blot-Analyse der *ectABC*-Gene durchgeführt. Aus *S. pasteurii* Kulturen, die in Minimalmedium ohne und unter osmotischem Stress (0,5 NaCl) gezogen worden waren, wurde die Gesamt-RNA isoliert. Diese RNA wurde dann ihrer Größe nach auf einem Agarosegel getrennt, anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und schließlich mit einer DIG-markierten '*ectB*' RNA-Sonde hybridisiert (Abb. 11A). Es wurde ein Transkript von 2,6 kb detektiert (Abb. 11B); die Größe des Transkriptes entsprach der berechneten Größe (2440 bp) der *ectABC*-Gene, ausgehend vom *ectA*-Startcodon bis zum Terminations-Codon von *ectC*. Die transkriptionelle Analyse der *ectABC*-Gene mittels Northern Blot ergab demnach, dass die drei Gene als Operon zur Expression gebracht werden. Ebenfalls konnte das *ectABC*-Transkript nur in der osmotisch



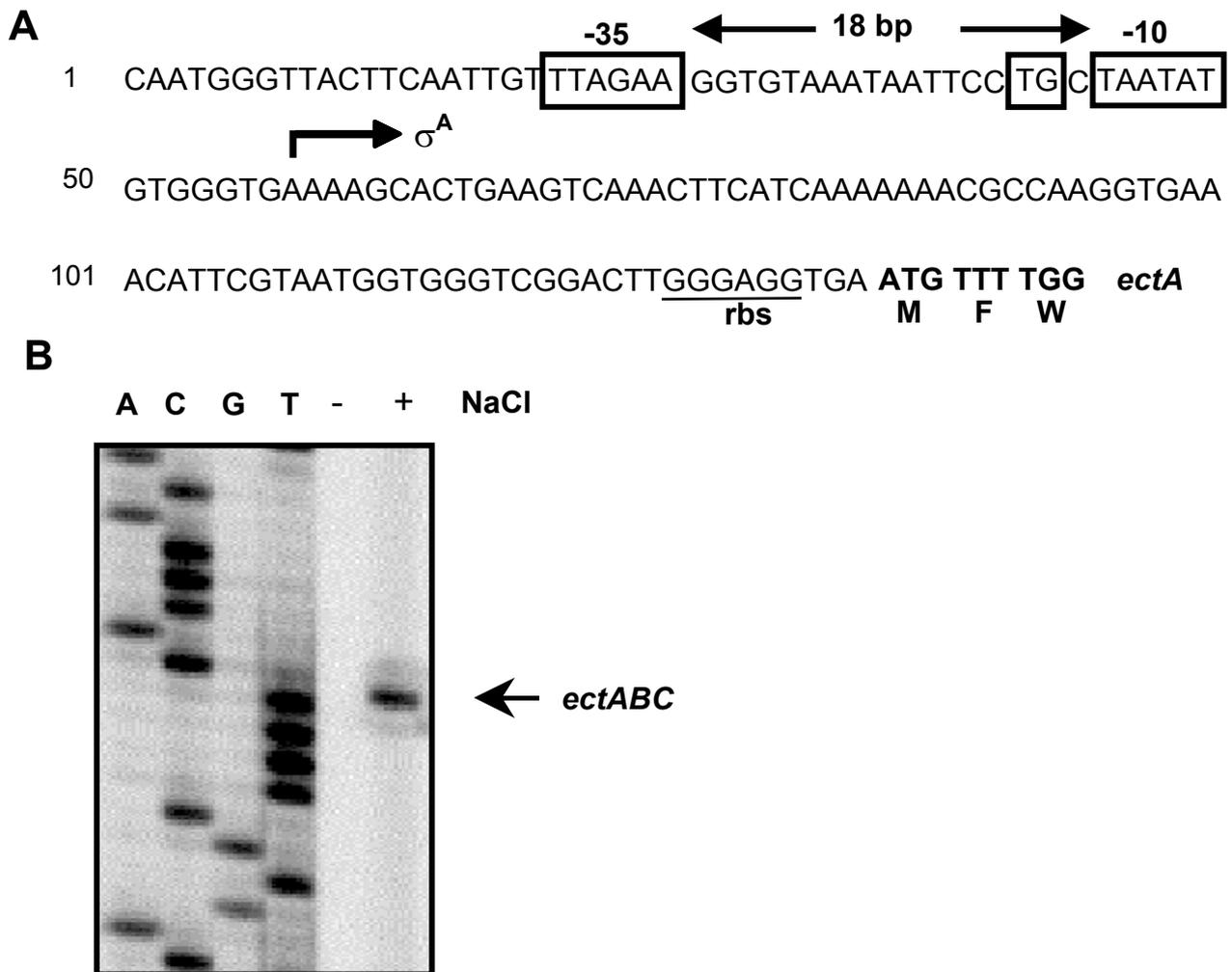
**Abb. 11 Genetische Organisation und Northern Blot-Analyse der *ectABC*-Region aus *S. pasteurii***

(A) Dargestellt sind die genetische Organisation der *ectABC*-Gene aus *S. pasteurii* und die Position der RNA Sonde, die für die transkriptionelle Analyse der *ectABC*-Gene genutzt wurde. (B) Northern Blot-Analyse des *ectABC*-Operons. Gesamt-RNA wurde aus *S. pasteurii* (DSM 33<sup>T</sup>) Kulturen, die in SMM ohne oder mit 0,5 M NaCl gewachsen waren, isoliert und mit einer *ectB*-spezifischen RNA Sonde hybridisiert.

gestressten *S. pasteurii* Kultur nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die *ectABC*-Gene als Operon in *S. pasteurii* osmotisch reguliert exprimiert werden.

### 3.4 Identifizierung des Transkriptionsstarts des *ectABC*-Operons

Zur Identifikation des Transkriptionsstarts und des putativen Promotors des *ectABC*-Operons wurde eine Primer Extension-Analyse durchgeführt reverser Transkriptase verlängert. Aus *S. pasteurii*-Kulturen, die in Minimalmedium und Minimalmedium mit 1,5 M NaCl gewachsen waren, wurde Gesamt-RNA isoliert. Die isolierte RNA wurde dann mit dem *ectA*-spezifischen Primer APP1, der an seinem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 markiert war, hybridisiert. Das Hybridisierungsprodukt wurde mittels reverser Transkriptase verlängert. Es zeigte sich eine einzelne, osmotisch regulierte *ect*-spezifische mRNA-Spezies (Abb. 12B), deren 5'-Ende 78 bp vom *ectA* ATG Startcodon entfernt ist. Eine Untersuchung der DNA-Sequenz oberhalb des mRNA Initiationsortes



### Abb. 12 Identifikation des *ectABC*-Transkriptionsstartes

Nukleotidsequenz der *ectABC*-Promotorregion. Die putative -10 und -35 Regionen des *ect* Promotors sind markiert, ebenso wie der Transkriptionsstart, die TG-Box und die putative Ribosomen-Bindungsstelle (RBS). (B) Primer Extension-Analyse des *ectABC*-spezifischen Transkriptes. Gesamt-RNA wurde aus *S. pasteurii* (DSM 33<sup>T</sup>) Kulturen, die in SMM ohne (-) oder mit 1,5 M NaCl (+) gewachsen waren, isoliert. Der Transkriptionsstart der *ectABC*-Region wurde durch Primer Extension-Analyse unter Verwendung eines *ectA*-spezifischen Primers bestimmt.

zeigte eine putative -10 und -35 Promotorsequenz, die mit der Konsensussequenz eines Sigma Faktor A ( $\sigma^A$ ) abhängigen Promotors in *B. subtilis* in hohem Maße übereinstimmte. Die -10 und -35 Regionen sind 18 bp voneinander entfernt, ein TG-Motiv befindet sich an der Position -16 (Abb. 12A). Ein solches TG-Motiv ist in vielen *B. subtilis* Promotorsequenzen vorhanden und stellt ein wichtiges Element für die erfolgreiche Initiation der Transkription dar (Helman 1995).

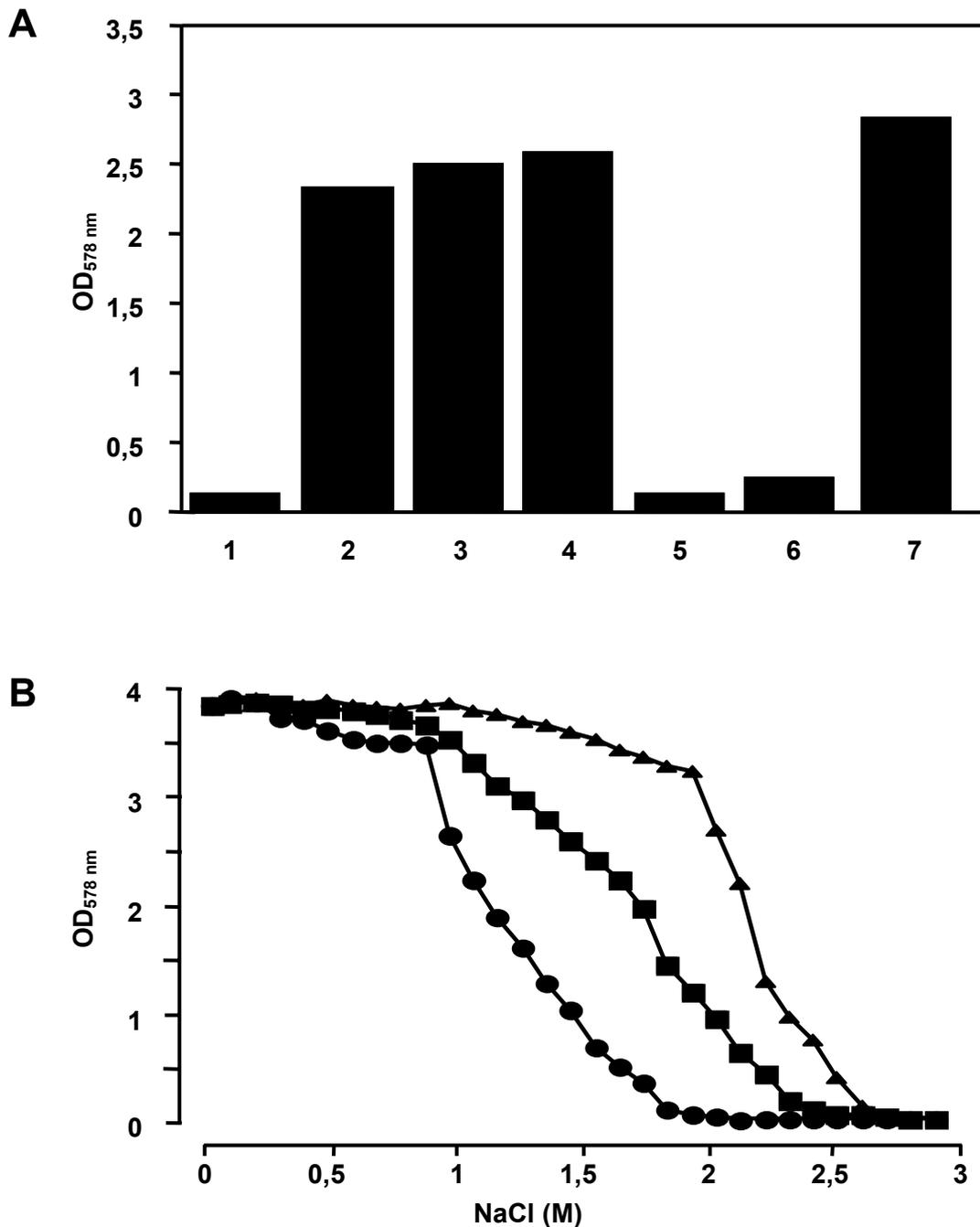
## 4 Osmoprotektion von *S.pasteurii* durch die Aufnahme exogen vorhandener kompatiblen Solute

### 4.1 Aufnahme exogen zugeführter kompatibler Solute unter hyperosmolarem Stress in *S. pasteurii*

Der Gram-positive Modellorganismus *B. subtilis* besitzt fünf Transporter, das sogenannte Opu (osmoprotectant uptake) System, das für die osmotisch regulierte Aufnahme einer Vielzahl exogen vorhandener Osmoprotektiva verantwortlich ist (Kempf und Bremer 1998; Bremer und Krämer 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob *S. pasteurii* ebenfalls in der Lage ist, extern zugeführte kompatible Solute in das Zytoplasma zu transportieren und als Osmoprotektiva zu nutzen. In diesem Experiment wurde *S. pasteurii* unter hochosmolaren, wachstumshemmenden Bedingungen in SMM inkubiert. Diesem Medium wurde jeweils 1 mM der Osmoprotektiva Ectoin, Hydroxyectoin, Prolin, Glycin Betain, Carnitin oder Cholin zugesetzt. Exogen zugegebenes Cholin und Prolin hatten keinen osmoprotektiven Effekt auf *S. pasteurii*. Alle anderen getesteten kompatiblen Solute konnten von *S. pasteurii* als Osmoprotektiva genutzt werden, was sich durch Wachstum der Kulturen zeigte (Abb. 13A). Dieses Bakterium besitzt demnach zwei Strategien, um sich vor hoher Osmolalität zu schützen: (i) die endogene Synthese des Tetrahydropyrimidins Ectoin und (ii) die effektive Aufnahme zahlreicher, vorgeformter Osmoprotektiva aus der Umwelt einschließlich Ectoin. Im Gegensatz zu *B. subtilis* (von Blohn *et al.* 1997) ist *S. pasteurii* nicht in der Lage, Prolin unter hochosmolaren Bedingungen in die Zelle zu transportieren. Ebenfalls scheint *S. pasteurii* keinen Glycin Betain Syntheseweg zu besitzen, der Cholin als Vorläufermolekül nutzt, während *B. subtilis* Cholin aus der Umgebung aufnehmen und zum potenten Osmoprotektivum Glycin Betain oxidieren kann (Boch *et al.* 1996; Kappes *et al.* 1999).

### 4.2 Osmoprotektion von Ectoin und Glycin Betain in *S. pasteurii*

Um die osmoprotektiven Effekte von Ectoin und Glycin Betain auf das Wachstum von *S. pasteurii* detaillierter zu untersuchen, wurden Kulturen von unterschiedlichen Osmolalitäten, die entweder die kompatiblen Solute Ectoin oder Glycin Betain (jeweils 1 mM) oder kein Osmoprotektivum enthielten, mit *S. pasteurii* beimpft und für 16 Stunden wachsen gelassen. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Kulturen bestimmt. Bei mehr als 1 M NaCl im Medium konnte eine deutliche Abnahme der nach 16 Stunden erreichten Zelldichte bei den Kulturen, denen kein Osmoprotektivum zugesetzt war, festgestellt werden (Abb. 13B). Durch die Zugabe von Ectoin oder Glycin Betain konnte das Wachstum der osmotisch gestressten Kulturen verbessert werden (Abb. 13B). Das Wachstum der Kulturen, denen Glycin Betain zugesetzt worden war, war besser als das der *S. pasteurii* Kulturen, denen Ectoin zugesetzt worden war (Abb. 13B).

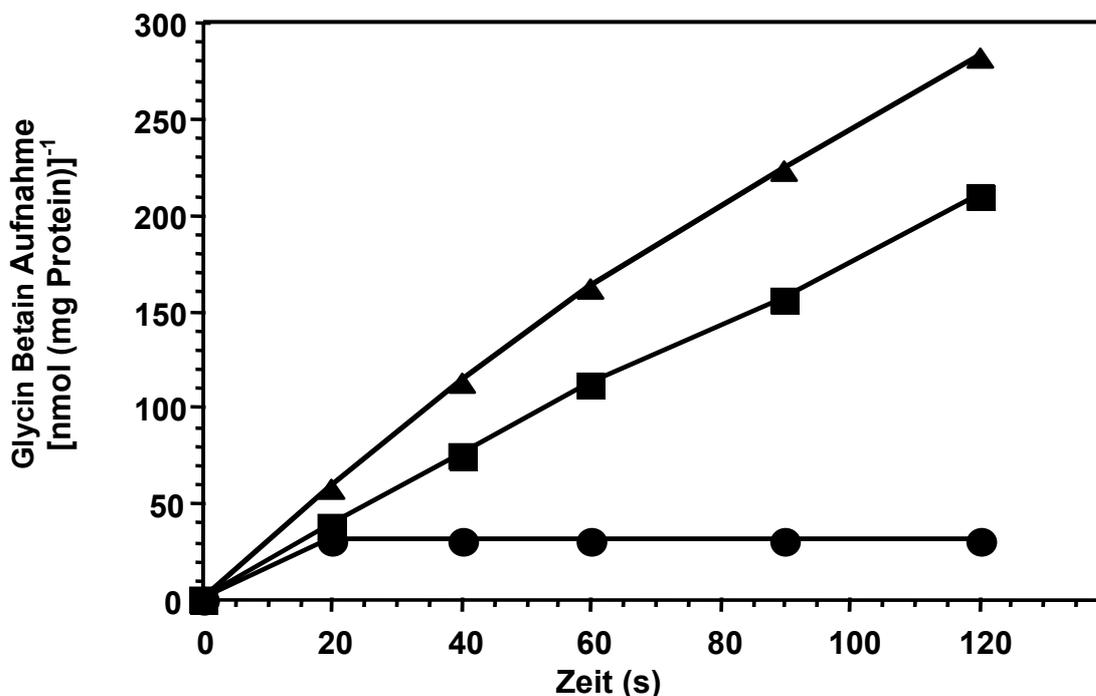


**Abb. 13 Osmoprotektion von *S. pasteurii* durch compatible Solute**

*S. pasteurii* wurde in hochosmolarem Minimalmedium (2 M NaCl) mit oder ohne Osmoprotektivum (Endkonzentration 1 mM) wachsen gelassen. Die Kulturen wurden bei 37°C aerob inkubiert. Das Wachstum jeder Kultur wurde photometrisch durch Messung der OD<sub>578</sub> nach 16 Stunden Inkubation bestimmt. 1: kein Osmoprotektivum; 2: DL-Carnitin; 3: Ectoin; 4: Hydroxyectoin; 5: Cholin; 6: Prolin; 7: Glycin Betain. (B) Ectoin und Glycin Betain schützten *S. pasteurii* gegen die wachstumshemmenden Effekte hoher Osmolalität. 20 ml Kulturen (in 100 ml Erlenmeyerkolben) Minimalmedium unterschiedlicher Osmolalität wurden mit einer OD<sub>578</sub> von 0,1 mit einer Übernachtskultur, die in Minimalmedium ohne NaCl gewachsen war, beimpft. Die Kulturen wurden für 16 Stunden ohne (●) oder mit 1 mM Ectoin (■) oder 1 mM Glycin Betain (▲) inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum jeder Kultur photometrisch bestimmt.

### 4.3 Transport von [ $^{14}\text{C}$ ]-Glycin Betain in *S. pasteurii*

Die Aufnahme von radioaktiv markiertem Glycin Betain durch die *S. pasteurii* Zellen wurde bei einer Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  gemessen. Es konnte ein stark osmotisch stimulierter Transport von Glycin Betain in *S. pasteurii* festgestellt werden (Abb. 14). Mikroorganismen besitzen häufig mehrere Glycin Betain Transportsysteme, und in einigen Bakterien (z. B. *E. coli*, *B. subtilis*, *Corynebakterium glutamicum*, *Sinorhizobium meliloti* und *Erwinia chrysanthemi*) dienen diese Transport-Systeme auch der Aufnahme von Ectoin (Jebbar *et al.* 1992; Talibart *et al.* 1994; Gouesbet *et al.* 1996; Jebbar *et al.* 1997; Peter *et al.* 1998b). Die Zugabe eines 100 fachen Überschusses von Ectoin hatte in *S. pasteurii* jedoch nur einen geringen Effekt auf die osmotisch stimulierte [ $^{14}\text{C}$ ]-Glycin Betain Aufnahme (Abb. 14). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass dieses Bakterium zusätzliche Ectoin-Transportsysteme besitzt, die getrennt von den Glycin Betain-Aufnahmesystemen arbeiten.



**Abb. 14** Osmotisch regulierter Glycin Betain Transport in *S. pasteurii*

Der Glycin Betain Transport in *S. pasteurii* wurde in Kulturen bestimmt, die in Minimalmedium ohne NaCl (●) oder mit 0,4 M NaCl (▲) gewachsen waren. Die Glycin Betain Aufnahme wurde bei einer Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  gemessen. Bei einer Kultur wurde die Glycin Betain Aufnahme in Gegenwart von 1 mM Ectoin (■) bestimmt.

## **5 Ectoin, Hydroxyectoin und Prolin sind metabolisch inert in *S. pasteurii* und *V. pantothenicus***

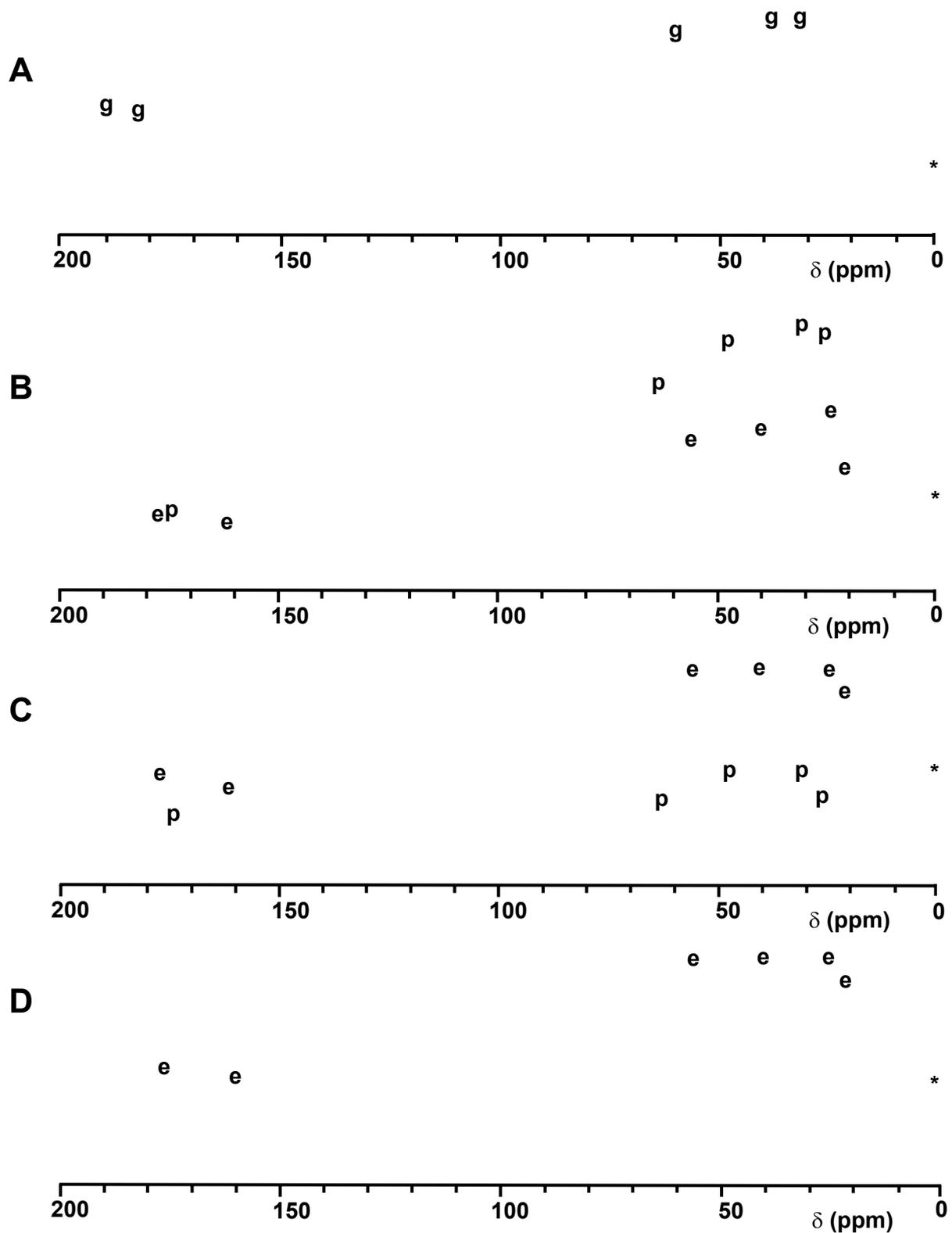
Es wurde untersucht, ob Ectoin, Hydroxyectoin oder Prolin von *S. pasteurii* oder *V. pantothenicus*, dessen Osmolytsynthese im Rahmen dieser Arbeit auch eingehend analysiert wurde, als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Energiequelle genutzt werden können. Ectoin, Hydroxyectoin und Prolin erlauben das Wachstum von *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* nicht, wenn sie in einer Konzentration von 30 mM als einzige Kohlenstoff- und Energie-Quelle dem Minimalmedium zugesetzt sind. Ebenfalls kann keine der Substanzen (in der Konzentration von jeweils 30 mM zugesetzt) als Stickstoff-Quelle in einem modifizierten Minimalmedium, bei dem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  durch die entsprechende Konzentration von  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ersetzt worden war, von *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* genutzt werden. Somit dienen weder Ectoin, Hydroxyectoin noch Prolin assimilatorischen Zwecken in *S. pasteurii* oder *V. pantothenicus*.

## **6 *de novo* Synthese der kompatiblen Solute Prolin und Ectoin unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus***

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in *Virgibacillus pantothenicus* Kulturen, die bei erhöhter Osmolalität in einem definierten Minimalmedium (SMM) gewachsen waren, die Akkumulation der Aminosäure Prolin und des Tetrahydropyrimidins Ectoin durch *de novo* Synthese festgestellt. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sind in Abbildung 15 dargestellt. Dieses erstmals beobachtete Muster der endogenen Osmolytsynthese in einem Bakterium wurde auf physiologischer und molekularer Ebene in *V. pantothenicus* detailliert untersucht.

### **6.1 Prolin- und Ectoinbiosynthese werden in *V. pantothenicus* osmotisch induziert**

Es wurde geprüft, ob die bei erhöhter NaCl-Konzentration in *V. pantothenicus* beobachtete Prolin- und Ectoinbiosynthese spezifische Anpassungen an Salzstress darstellen oder generell durch hochosmolare Umweltbedingungen induziert werden. Zu diesem Zweck wurde *V. pantothenicus* wie der Ectoinsynthetisierer *S. pasteurii* (siehe Kap. 2; Tab. 14) in Minimalmedium angezogen, dessen Osmolalität durch Zugabe äquiosmolarer Konzentrationen von ionischen (NaCl, KCl) und nichtionischen (Saccharose, Laktose, Glycerin) Osmolyten erhöht worden war. Der Prolin- und Ectoingehalt wurde mittels HPLC bestimmt. Sowohl die ionischen (KCl, NaCl) als auch die nichtionischen (Saccharose, Laktose) Osmolyte stimulieren Prolin- und Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus* (Tab. 16). Somit sind Prolin- und Ectoinbiosynthese in diesem Bakterium osmotische Effekte, und Prolin ist das dominante kompatible Solute bei der untersuchten Osmolalität unabhängig,



**Abb. 15**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren ethanolischer Zellextrakte

(A) *V. pantothenicus* (DSM 26<sup>T</sup>) wurde in Minimalmedium (SMM) ohne NaCl, (B) in SMM mit 0,5 M NaCl, (C) in SMM mit 1,0 M NaCl, und (D) in SMM mit 1,5 M NaCl wachsen gelassen. Resonanzen von Glutamat (g), Ectoin (e), Prolin (p) und dem Standard ( $\text{D}_4$ -3-(Trimethylsilyl)propionate) (\*) sind markiert. Die chemischen Verschiebungen [angegeben in ppm relativ zum Standard ( $\text{D}_4$ -3-(Trimethylsilyl)propionate)] sind für Glutamat 27,9; 34,6; 55,8; 175,3; 184,1 für Ectoin 19,6; 23,5; 38,3; 54,4; 161,9 und 177,8 und für Prolin 25,5; 33,1; 48,8; 61,3; 175,2.

ob der hyperosmotische Stress durch ionische oder nicht-ionische osmotisch aktive Substanzen erzeugt wurde. Glycerin ist nicht in der Lage, Ectoin- oder Prolinbiosynthese in *V. pantothenicus* zu induzieren, da es keinen osmotischen Gradienten über der Zytoplasmamembran aufbauen kann (Tab. 16).

Der Zusatz von 1 mM Glycin Betain, einem potenten Osmoprotektivum für *V. pantothenicus*, unterdrückt die endogene Synthese der kompatiblen Solute Ectoin und Prolin in hyperosmotisch gestressten Kulturen (Tab. 16).

**Tabelle 16. Osmotisch stimulierte Ectoin- und Prolinbiosynthese in *V. pantothenicus***

Medium <sup>a</sup>	Ectoin [ $\mu\text{mol (g TG)}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	Prolin [ $\mu\text{mol (g TG)}^{-1}$ ] <sup>b</sup>
SMM (340 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	n. d. <sup>c</sup>	n. d. <sup>c</sup>
SMM mit 0,4 M NaCl (1 100 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	40 $\pm$ 6	77 $\pm$ 12
SMM mit 0,4 M KCl (1 100 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	37 $\pm$ 9	74 $\pm$ 19
SMM mit 0,64 M Saccharose (1 100 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	43 $\pm$ 5	84 $\pm$ 15
SMM mit 0,68 M Laktose (1 100 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	33 $\pm$ 11	69 $\pm$ 20
SMM mit 1,1 M Glycerin (1 100 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	n. d. <sup>c</sup>	n. d. <sup>c</sup>
SMM mit 0,4 M NaCl + 1 mM Glycin Betain (1 100 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	n. d. <sup>c</sup>	n. d. <sup>c</sup>
SMM mit 0,68 M Saccharose + 1 mM Glycin Betain (1 100 [ $\text{mosmol (kg Wasser)}^{-1}$ ])	n. d. <sup>c</sup>	n. d. <sup>c</sup>

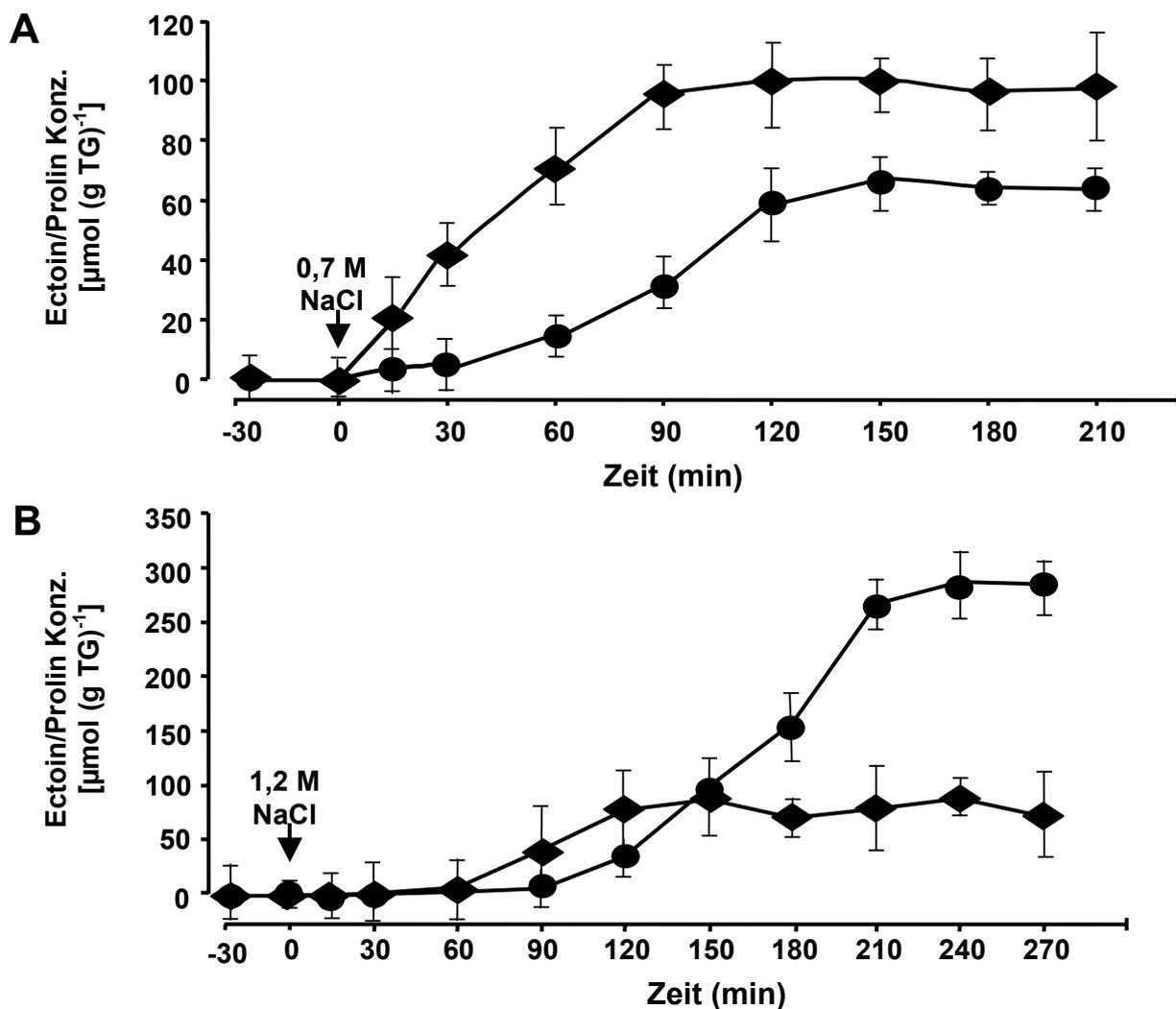
<sup>a</sup> *V. pantothenicus* (DSM 26<sup>T</sup>) Kulturen wurden in SMM mit den angegebenen ionischen und nichtionischen Osmolyten gezogen. Intrazelluläre Ectoin- und Prolinkonzentrationen wurde mittels HPLC quantifiziert.

<sup>b</sup> Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängig gewachsenen Kulturen, und von jeder Kultur wurde der Ectoin- und Prolingehalt doppelt bestimmt.

<sup>c</sup> n. d.: Ectoin und Prolin konnte nicht detektiert werden.

## 6.2 Osmotisch regulierter Wechsel zwischen Prolin- und Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus*

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren der *V. pantothenicus* Kulturen zeigten einem Wechsel zwischen der Synthese von Prolin, dem dominanten Osmoprotektivum bei niedriger Osmolalität und der Synthese von Ectoin, dem vorherrschenden kompatiblen Solute unter hochosmolaren Bedingungen.  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren stellen zwar umfassend die dominanten organischen Solute in der Zelle dar, lassen aber quantitative Aussagen über die Konzentration der Moleküle nur begrenzt zu. Daher wurden, um den Prolin- und Ectoingehalt genau zu bestimmen, HPLC-Analysen mit *V. pantothenicus* Kulturen, die bei unterschiedlichen Osmolalitäten gewachsen waren, durchgeführt (Abb. 9D). Die HPLC-Analyse bestätigte einen deutlichen Wechsel zwischen der vorherrschenden Prolinsynthese bei niedriger Osmolalität (0,1 bis 0,7 M NaCl) und der gesteigerten Ectoinsynthese, unter hochosmolaren



**Abb. 16** Induktion der endogenen Osmolyt-synthese nach einem hyperosmotischen Schock in *V. pantothenicus*

*V. pantothenicus* wurde in SMM bis zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,5 gezogen. Anschließend wurden 0,7 M (A) oder 1,2 M NaCl (B) dem Medium zugesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und deren Ectoin-(●) bzw. Prolingehalt (◆) mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten ( $n_3$ ).

Bedingungen (0,7 bis 2 M NaCl) (Abb. 9D). Die Prolinkonzentration erreicht das Maximum bei 0,6 M NaCl und bleibt auch bei deutlicher Erhöhung der Osmolalität auf diesem Niveau, hingegen nimmt die Ectoinkonzentration bei niedriger Osmolalität nur langsam zu und erreicht bei 1,2 M NaCl ihren Höchstwert (Abb. 9D).

Die HPLC-Analyse bestätigte, dass sowohl die Prolin- als auch die Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus* durch eine erhöhte Osmolalität der Umwelt induziert sind. Die osmotisch unterschiedlich stark gestressten *V. pantothenicus* Kulturen zeigen einen dynamischen Wechsel zwischen dem jeweils dominanten Osmoprotektivum in Abhängigkeit von der Osmolalität des Mediums.

In einem weiteren physiologischen Experiment wurde die Induktion der Prolin- und Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus* nach hyperosmotischen Schocks unterschiedlicher Stärke untersucht. Die Kulturen wuchsen in SMM und wurden bei einer  $OD_{578}$  von 0,5 einer plötzlichen Erhöhung der externen Osmolalität durch NaCl-Zugabe ausgesetzt. Den Kulturen wurde NaCl bis zum Erreichen der Endkonzentrationen von 0,7 M bzw. 1,2 M zugesetzt. Vor und nach der Erhöhung der Osmolalität des Mediums wurden den Kulturen zu bestimmten Zeitpunkten Proben für die Bestimmung der Ectoin und Prolinkonzentration mittels HPLC entnommen. Sowohl nach einem moderaten hyperosmotischen Schock als auch nach einer starken Erhöhung der externen Osmolalität wurde zuerst Prolin in den Zellen synthetisiert (Abb. 16). Während in osmotisch adaptierten Kulturen eine jeweils fein auf die Osmolalität der Umgebung abgestimmte Mischung der kompatiblen Solute Prolin und Ectoin vorliegt.

Bei einem moderaten hyperosmotischen Schock (0,7 M NaCl) konnten Prolin und Ectoin 15 Minuten nach NaCl-Zugabe nachgewiesen werden, die Prolinkonzentration erreichte schneller ihren Maximalwert als die Ectoinkonzentration. Prolin war das dominante kompatible Solut, sowohl während der Anpassung der Zellen an die erhöhte Osmolalität als auch in der osmotisch adaptierten Kultur (Abb. 16A).

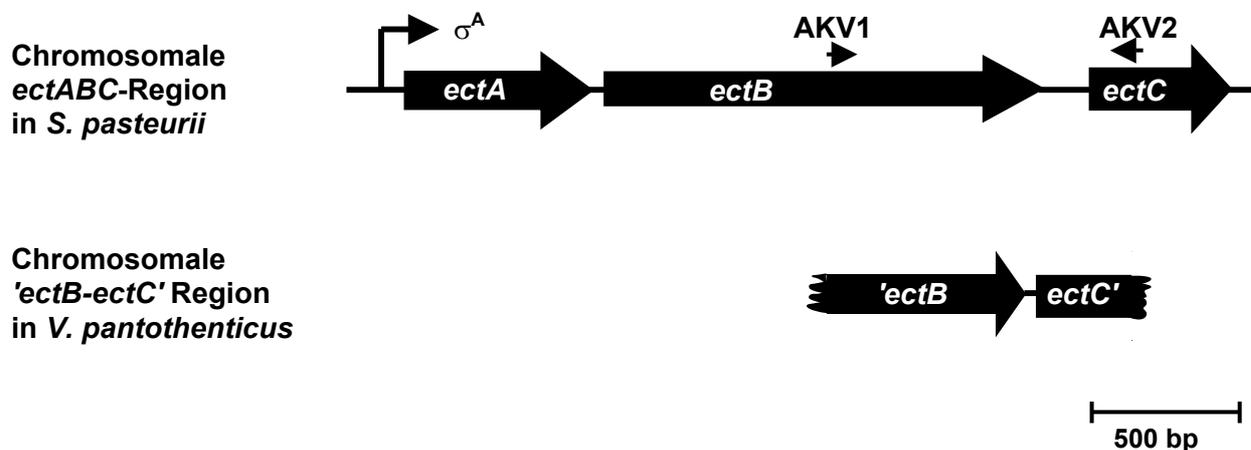
Nach einem starken hyperosmotischen Schock (1,2 M NaCl) konnte Prolin erst nach 60 Minuten und Ectoin nach 90 Minuten nachgewiesen werden, aber auch unter diesen Bedingungen erreicht die Prolinkonzentration ihren Maximalwert schneller als die Ectoinkonzentration. Prolin war 140 Minuten nach NaCl-Zugabe das dominante kompatible Solut in *V. pantothenicus*, in der osmotisch adaptierten Kultur war bei gleicher Osmolalität Ectoin das vorherrschende Osmoprotektivum (Abb. 16B).

## 7 Isolierung der Ectoinbiosynthese gene aus *V. pantothenicus*

Um die Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus*, der sowohl Ectoin als auch Prolin *de novo* unter hypertonen Bedingungen synthetisieren kann, auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde ein Teil der Ectoinbiosynthese gene isoliert und sequenziert. Die Untersuchung der Gene sollte weiteren Aufschluss über Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der Ectoinbiosynthese in *S. pasteurii* (Abschnitt 2 und 3 Ergebnisse), und in *V. pantothenicus* geben.

### 7.1 PCR-Amplifikation der Ectoinbiosynthese gene aus *V. pantothenicus*

Ein 1024 bp großes DNA-Fragment, das einen Teil der Ectoinbiosynthese gene ('*ectB-ectC*') trug, konnte durch PCR mit Hilfe degenerierter Primer und unter nicht-stringenten Bedingungen aus dem Chromosom von *V. pantothenicus* isoliert werden (Abb. 17). Die heterologen Primer wurden von den bekannten Ectoinbiosynthese genclustern *ectABC* der Gram-positiven, nah mit *V. pantothenicus* verwandten Bakterien *M. halophilus* (Louis und Galinski 1997) und *S. pasteurii* (Acc. no. AF316874) abgeleitet. Die Lage beider Primer, AKV1 (29 bp) und AKV2 (25 bp) ist in Abbildung 17 dargestellt. Das DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 ligiert, das resultierende Plasmid war pSPICE3.



**Abb. 17** Übersicht der Ectoinbiosynthese genregionen aus *S. pasteurii* und *V. pantothenicus*

In der chromosomalen *ectABC*-Region von *S. pasteurii* ist die Lage der heterologen Primer, die zur Amplifikation der '*ectB-ectC*' Fragmentes aus *V. pantothenicus* genutzt wurden, dargestellt. Die Länge der Primer ist nicht maßstabgetreu dargestellt, aber die Startpunkte der Pfeile entsprechen ihren Anlagerungsorten.

## 7.2 DNA-Sequenzanalyse der 'ectB-ectC' Gene aus *V. pantothenicus*

Die DNA-Sequenz des gesamten chromosomalen Inserts (1024 bp) von pSPICE3 wurde bestimmt und mit dem DNASTAR Computerprogramm analysiert (Kap. 3 Anhang). Es konnten zwei offene Leseraster identifiziert werden, die die gleiche Orientierung besaßen (Abb. 17). Die offenen Leseraster codierten zwei potentielle Proteinsequenzen, die 212 Aminosäuren bzw. 118 Aminosäuren umfassten. Die Datenbank-Analyse unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) ergab, dass beide Leseraster unvollständig waren. Die abgeleitete Proteinsequenz des ersten offenen Leserasters war homolog zu EctB Proteinen und die abgeleitete Proteinsequenz des zweiten Leserasters war homolog zu EctC Proteinen aus *S. pasteurii* (Acc. no. AF316874), *M. halophilus* (Louis und Galinski 1997), *B. halodurans* (Takami *et al.* 2000), *St. coelicolor* (Acc. no. AL591322), *Ch. salexigens* (Canovas *et al.* 1998), *V. cholerae* (Heidelberg *et al.* 2000) und *H. elongata* (Göller *et al.* 1998). Das *ectB* DNA-Fragment (637 bp) umfasste den 3'-Bereich des Gens mit dem entsprechenden Stop-Codon, der 5'-Anfang des Gens fehlte; dem isolierten *ectC* DNA-Fragment (356 bp) fehlte das 3'-Ende (Kap. 3 Anhang). Im folgenden wurde dieses DNA-Fragment als 'ectB-ectC' und die codierten potentiellen Proteine als 'EctB und EctC' bezeichnet. Die Gene sind durch einen intergenen Bereich von 31 bp getrennt, in dem sich eine potentielle Ribosomenbindestelle vor *ectC* befindet (Kap. 3 Anhang).

**Tabelle 17. Sequenzidentitäten zwischen 'EctB- und EctC'-Proteinregionen aus *V. pantothenicus*, *B. halodurans* und *S. pasteurii***

Protein <sup>a</sup>	Sequenzidentität der Ect-Proteine <sup>b</sup>		
	<i>V. pantothenicus</i>	<i>B. halodurans</i>	<i>S. pasteurii</i>
'EctB	100%	67.1%	59.7%
EctC'	100%	56.3%	52.4%

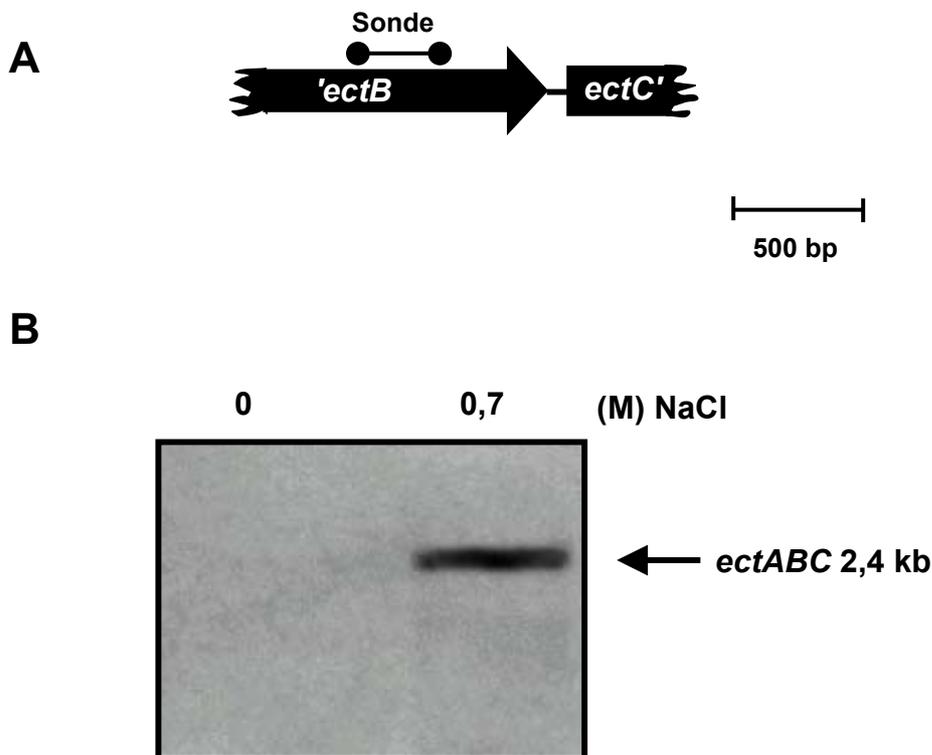
<sup>a</sup> potentielle Proteinsequenzen abgeleitet von DNA-Sequenzen der 'ectB-ectC' Gene aus *V. pantothenicus*.

<sup>b</sup> potentielle Proteinsequenzen abgeleitet von DNA-Sequenzen der *ect*-Gene der angegebenen Organismen. Proteinsequenzidentitäten wurden durch das DNASTAR Computerprogramm ermittelt.

Die potentiellen und unvollständigen 'EctB und EctC' Proteine aus *V. pantothenicus* zeigten die höchsten Sequenzidentitäten zu den korrespondierenden EctB und EctC Proteinbereichen nah verwandter Gram-positiver Bakterien (*B. halodurans* und *S. pasteurii*) (Tab. 17). Durch den hohen Grad der Sequenzidentität und die konservierte Organisation der *ectBC*-Region besonders innerhalb des Genus *Bacillus* erscheint es wahrscheinlich, dass auch in *V. pantothenicus* das erste Gen des Ectoinbiosynthese-genclusters ein *ectA* Homolog ist.

### 7.3 Transkriptionelle Analyse der Ectoinbiosynthesegene in *V. pantothenicus*

Die physiologischen Daten der Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus* und die hohe Konservierung in Sequenz und Organisation der *ect*-Biosynthesegene aus *V. pantothenicus* und *S. pasteurii* legte die Vermutung nahe, dass die Ectoinbiosynthesegene aus *V. pantothenicus* auch als osmotisch reguliertes Operon zur Expression gebracht werden. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde eine Northern Blot-Analyse der Ectoinbiosynthesegene aus *V. pantothenicus* durchgeführt. Gesamt-RNA wurde aus *V. pantothenicus* Kulturen isoliert, die in SMM ohne und unter osmotischem Stress (0,7 M NaCl) gewachsen waren. Die RNA wurden dann, der Größe entsprechend, in einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-markierten RNA-Sonde, die ein internes *ectB*-Fragment umfasste, hybridisiert (Abb. 18A). Ein Transkript von 2,4 kb



**Abb. 18 Northern Blot-Analyse der Expression der Ectoinbiosynthesegene bei hoher Osmolalität**

(A) Chromosomale '*ectB-ectC*' Genregion aus *V. pantothenicus*. Die Position der *ectB*-spezifischen Sonde, die für die Northern Blot-Analyse verwendet wurde, ist angegeben. (B) *V. pantothenicus* Kulturen wuchsen in Minimalmedium bei 37°C ohne und mit 0,7 M NaCl. Die Gesamt-RNA dieser Kulturen wurde mit der *ectB*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert.

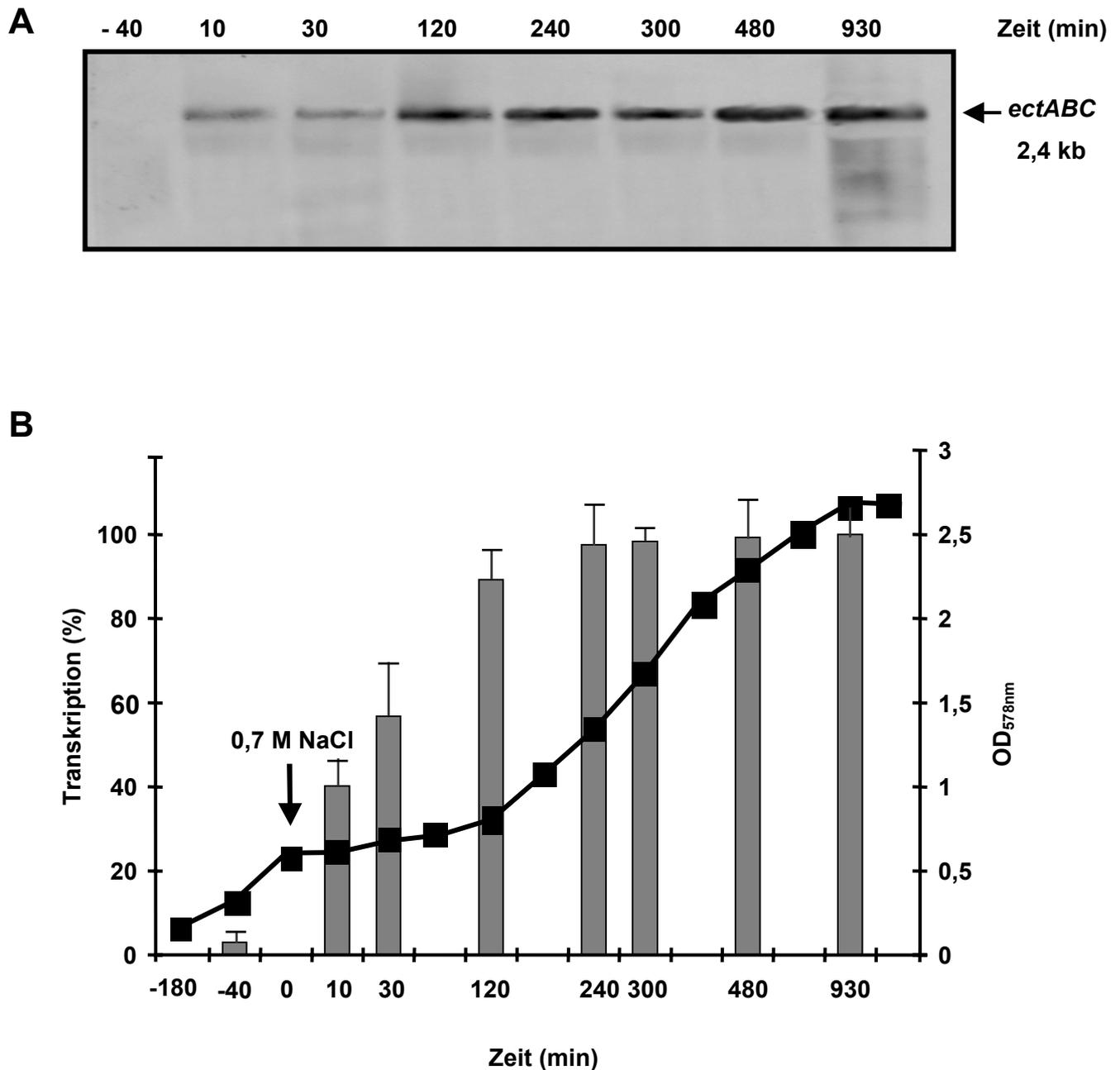
Länge wurde in der RNA der hochosmolar gestressten Kulturen detektiert, dagegen konnte in RNA aus ungestressten *V. pantothenicus* Kulturen kein *ect*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 18B). Die Transkription der Gene wurde unter hochosmolaren Bedingungen um den Faktor 6 induziert. Wie für *S. pasteurii* beschrieben, erfolgte auch die Transkription des *ect*-Biosyntheseoperons aus *V. pantothenicus* osmotisch reguliert (Abb. 18B). Die Größe des Transkriptes korrespondiert mit der Länge der *ectABC*-Gencluster von *S. pasteurii* (2440 bp) und *B. halodurans* (2538 bp). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass ein drittes Gen, vermutlich ein *ectA* Homolog, im *ect*-Biosyntheseoperon von *V. pantothenicus* enthalten ist.

### 7.3.1 Induktion des *ectABC*-Operons durch einen hyperosmotischen Schock

Um die Induktion und den zeitlichen Verlauf der Ectoinbiosynthese nach einer plötzlichen Erhöhung der Osmolalität des Mediums auch auf transkriptioneller Ebene in *V. pantothenicus* zu untersuchen, wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt.

*V. pantothenicus* Kulturen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  0,5) wachsen gelassen. Die Wachstumsrate  $\mu$  betrug zu diesem Zeitpunkt  $0,33 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ . Dann wurden die Kulturen durch Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 0,7 M einem osmotischen Schock ausgesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Schock wurden Proben für die RNA-Präparation entnommen. Die Gesamt-RNA wurde präpariert und mit der DIG-markierten *ectB*-RNA-Sonde hybridisiert (Abb. 19). Bereits 10 Minuten nach dem osmotischen Schock, während sich die Zellen in der Anpassungsphase an die hochosmolaren Bedingungen befanden und ihr Wachstum stoppten, konnte die Transkription des *ect*-Operons detektiert werden (Abb. 19A). Nach 240 Minuten erreichte die Transkriptionsrate ihr Maximum während die Kulturen exponentiell weiter wuchsen (Abb. 19B). Die Wachstumsrate nach dem hochosmotischen Schock war etwas geringer als zuvor und betrug  $\mu = 0,293 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$ . Die frühzeitige transkriptionelle Induktion der Ectoinbiosynthesegene nach einem hyperosmotischen Schock in *V. pantothenicus* stellt somit eine Anpassungsreaktion dar, die den Zellen das Wachstum unter hochosmolaren Umweltbedingungen erleichtert. Auch in den osmotisch adaptierten *V. pantothenicus* Kulturen blieb die Transkription des *ect*-Operons auf maximalem Niveau erhalten und bestätigt somit die osmoprotektive Funktion von Ectoin in der Langzeitanpassung an erhöhte Osmolalität.

Diese Daten stimmen mit der Beobachtung überein, dass Ectoin schon 15 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock der gleichen Stärke in *V. pantothenicus* nachgewiesen werden konnte (Kap. 1 Ergebnisse; Abb. 9D).



**Abb. 19 Bestimmung des Expressionsprofils des Ectoinbiosyntheseoperons nach einem hyperosmotischen Schock in *V. pantothenicus***

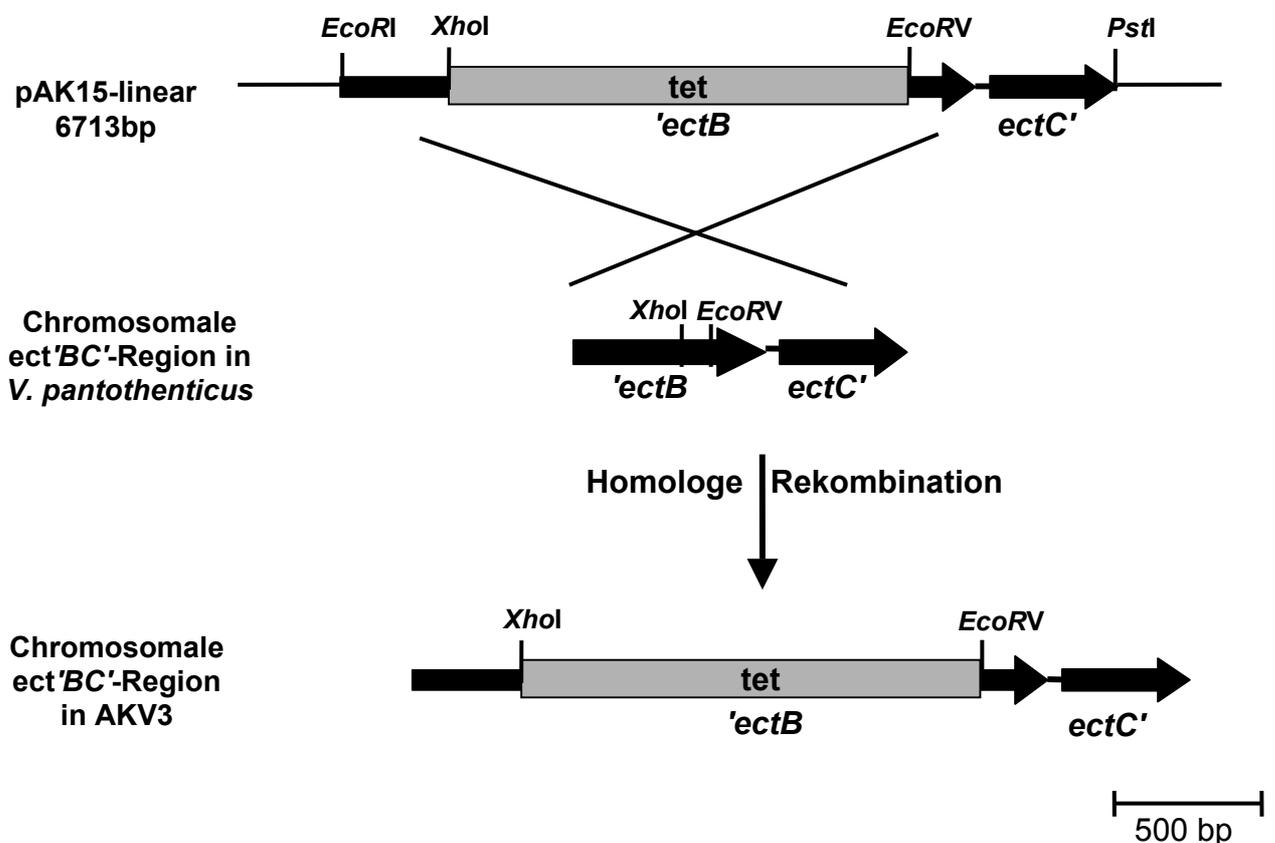
(A) Die Northern Blot-Analyse der *ectBC*-Genregion wurde mit Gesamt-RNA aus *V. pantothenicus* Kulturen durchgeführt, die einem osmotischen Schock von 0,7 M NaCl ausgesetzt worden waren. Vor und nach dem Schock wurden den Kulturen Proben entnommen, die Gesamt-RNA präpariert und diese mit einer *ectB*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. (B) Die Abbildung zeigt das Induktionsprofil für das Ectoinbiosyntheseoperon. Die Stärke der Expression ist in % angegeben, bezogen auf die maximal detektierte Induktion über den untersuchten Zeitraum. Die Zeiten der Probennahmen beziehen sich auf  $t_0$ , den Zeitpunkt des hyperosmotischen Schocks. Das Wachstum der Kultur wurde ebenfalls erfasst (■). Die Zeitskala korreliert nicht mit den tatsächlichen Zeitabständen zwischen den einzelnen Messpunkten. Es wurden drei unabhängige Northern Blot-Analysen durchgeführt ( $n_3$ ), die Transkriptionsstärke quantifiziert und die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

## 8 Konstruktion und physiologische Analyse einer 'ectB-ectC'-Deletion in *V. pantothenicus*

Das Tetrahydropyrimidin Ectoin wird in zahlreichen *Bacilli* und in Spezies verwandter Genera als Hauptosmolyt *de novo* unter hochosmolaren Bedingungen synthetisiert. Um die physiologische Relevanz der Ectoinbiosynthese in diesen Genera detailliert untersuchen zu können, sollte eine chromosomale *ect*-Mutante in *V. pantothenicus* hergestellt werden. Diese Mutation sollte die Prolinbiosynthese unter hypertonen Bedingungen unbeeinflusst lassen. Vorhergehende Transformationsexperimente hatten gezeigt, dass *V. pantothenicus* mit einer modifizierten Zwei-Schritt-Methode transformierbar war. Im Gegensatz dazu entzog sich *S. pasteurii* vergleichbaren Mutantanalysen, da diese Spezies mit keiner bekannten Methode transformiert werden konnte.

### 8.1 Konstruktion des Stammes AKB3 [ $\Delta(ectB::tet)1$ ]

Zur Konstruktion der *V. pantothenicus* *ect*-Mutante wurde eine plasmidcodierte Deletion in 'ectB' eingeführt. Der deletierte Teil des 'ectB' Gens wurde durch Insertion einer Resistenzkassette (Tet<sup>r</sup>) ersetzt und das Gen somit zerstört. *V. pantothenicus* wurde mit dem so entstandenen Plasmid



**Abb. 20** Konstruktion des *V. pantothenicus*-Stammes AKV3

Dargestellt ist die Konstruktion des *ectB*-Mutanten Stammes durch homologe Rekombination in *V. pantothenicus*.

pAK15 (Abb. 20), das vorher linearisiert worden war, transformiert. Mittels eines Doppelrekombinationsereignisses zwischen der aufgenommenen Plasmid-DNA und dem entsprechenden homologen genomischen DNA-Bereich von *V. pantothenicus* kam es zu einem Austausch des Markers zwischen den beiden Rekombinationsorten (marker replacement). Der entstandene *V. pantothenicus*-Stamm AKV3 (Tab. 3) trägt eine in *ectB* inserierte Tet-Kassette und synthetisiert somit kein funktionelles EctB mehr (Abb. 20) (Abb. 21A).

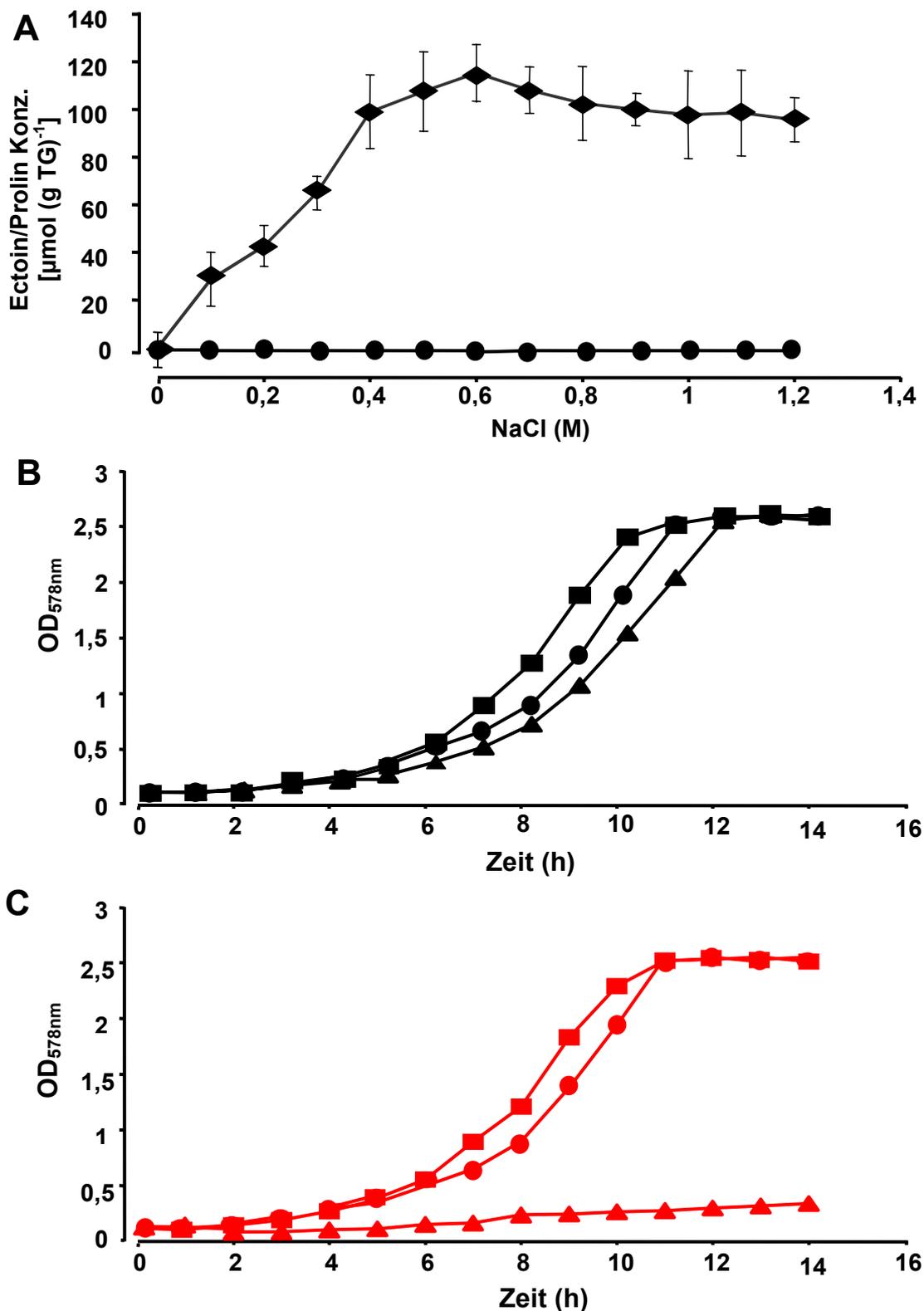
## 8.2 Die *ectABC* codierten Enzyme sind für die Ectoinbiosynthese bei hochosmolarem Stress verantwortlich

Um zu überprüfen, ob in AKV3 [ $\Delta(ectB::tet)1$ ] unter hochosmolaren Bedingungen keine endogene Ectoinbiosynthese mehr stattfindet und die Prolinbiosynthese unbeeinflusst abläuft, wurde der Ectoin- und Prolingehalt in AKV3 Kulturen, die bei unterschiedlichen Osmolalitäten gewachsen waren, mittels HPLC bestimmt (Abb. 21A). Es konnte bestätigt werden, dass die Zerstörung von *ectB* im Stamm AKV3 die *de novo* Synthese von Ectoin unter hochosmolaren Bedingungen vollständig verhindert. Somit sind die von *ectABC* codierten Enzyme allein für die Ectoinbiosynthese unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus* verantwortlich. Die Prolinproduktion unter hochosmolaren Bedingungen findet in AKV3 aber weiterhin wie im Wildtyp statt (Abb. 21A).

## 8.3 Phänotypische Charakterisierung des *ectB*-Stammes AKV3 unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen

Um die Rolle der Ectoinbiosynthesegene in der Anpassung an osmotischen Stress in *V. pantothenicus* genauer zu untersuchen, wurden vergleichende Wachstumsexperimente mit dem Wildtyp Stamm und dem Stamm AKV3 [ $\Delta(ectB::tet)1$ ] durchgeführt (Abb. 21BC). Beide Stämme wuchsen in SMM, SMM mit 1,2 M NaCl und SMM mit 1,2 M NaCl in Anwesenheit von 1 mM Ectoin. Es zeigte sich ein deutlicher Wachstumsnachteil der *ectB*-Mutante unter hochosmolaren Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp, der in der Lage war, die optische Dichte der ungestressten *V. pantothenicus* Kultur zu erreichen (Abb. 21BC; ▲ ▲). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus* einen wichtigen Beitrag zum Schutz des Bakteriums bei hochosmolaren Bedingungen bietet. Die endogene Prolinsynthese, die in AKV3 auf Wildtyp-Niveau stattfindet (Abb. 21A), kann den salzsensitiven Phänotyp der *ectB*-Mutante nicht kompensieren.

Die Wildtyp- und AKV3-Kulturen in SMM ohne NaCl wuchsen gleich gut (Abb. 21BC; ■ ■). Die Ectoinbiosynthese hat daher keinen Einfluss auf das Wachstum von osmotisch ungestressten *V. pantothenicus*. Der osmosensitive Phänotyp der [ $\Delta(ectB::tet)1$ ] Mutante konnte durch die externe



**Abb. 21** Der *ectB*-Stamm AKV3 nicht mehr in der Lage, unter hochosmolaren Bedingungen Ectoin endogen zu synthetisieren und besitzt einen deutlichen osmosensitiven Phänotyp ist

(A) Der *V. pantothenicus* Stamm AKV3 wurde in SMM mit unterschiedlichen NaCl Konzentrationen bis zu OD<sub>578</sub> 1 wachsen gelassen, die Zellen wurden geerntet, und der Ectoin- (◆) und Prolingehalt (■) wurde mittels HPLC bestimmt. (B) *V. pantothenicus* Wildtyp Kulturen (■ ▲ ●) und (C) Kulturen des Stammes AKV3 [ $\Delta(ectB::tet)1$ ] (■ ▲ ●) wurden mit einer OD<sub>578</sub> von 0,1 mit einer Übernachtskultur beimpft, die in SMM ohne NaCl gewachsen war. Die Kulturen wuchsen in SMM (■ ■) und SMM mit 1,2 M NaCl in Abwesenheit (▲ ▲) oder Anwesenheit (● ●) von 1 mM Ectoin.

Gabe des kompatiblen Solutes Ectoin (Abb. 21BC; ● ●) wieder aufgehoben werden. Die Mutante und der *V. pantothenicus*-Wildtyp wuchsen unter diesen Bedingungen gleich gut, und beide Kulturen erreichten die optische Dichte der osmotisch ungestressten Kulturen (Abb. 21BC; ■ ■). *V. pantothenicus* ist demnach in der Lage, beide Osmoprotektiva effektiv unter hochosmolaren Bedingungen im Zytoplasma durch Transport in Konzentrationen zu akkumulieren, die das Fehlen von endogen synthetisiertem Ectoin ausgleichen.

## 9 Kompatible Solute: Psychroprotektiva für Bakterien bei niedriger Temperatur

Eine weitere physiologische Funktion kompatibler Solute, der Schutz vor Kältestress, wurde in dem Gram-positiven, mesophilen Bakterium *L. monocytogenes* beobachtet. Ko *et al.* zeigten 1994, dass sich das Wachstum von *L. monocytogenes* durch extern zugesetztes Glycin Betain bei hoher Osmolalität oder bei niedriger Wachstumstemperatur deutlich verbesserte. Weitere Experimente zeigten, dass die als Osmoprotektiva in *L. monocytogenes* wirkenden kompatiblen Solute Acetylcarnitin, Carnitin und Prolin Betain dem Bakterium auch Schutz bei niedriger Temperatur boten (Bayles *et al.* 2000). *L. monocytogenes* muss Transportsysteme besitzen, die die Akkumulation von extern vorhandenen kompatiblen Soluten im Zytoplasma ermöglichen. In den zitierten Arbeit wurden kompatible Solute, die dem Bakterium Schutz bei Kälte vermitteln, als Kryoprotektiva bezeichnet. Der Begriff *krýos* (griech. Frost) beschreibt aber Bedingungen in wässrigen Lösungen von Biomolekülen unterhalb des Gefrierpunktes von Wasser. Da die Experimente bei Temperaturen oberhalb von 0°C durchgeführt wurden, bezeichnet der in der vorliegenden Arbeit verwendete Begriff *psychrós* (griech. Kälte) genauer die experimentellen Bedingungen. Im folgenden wurden daher kompatible Solute, die Zellen Schutz bei niedrigen Temperaturen vermitteln, als Psychroprotektiva bezeichnet.

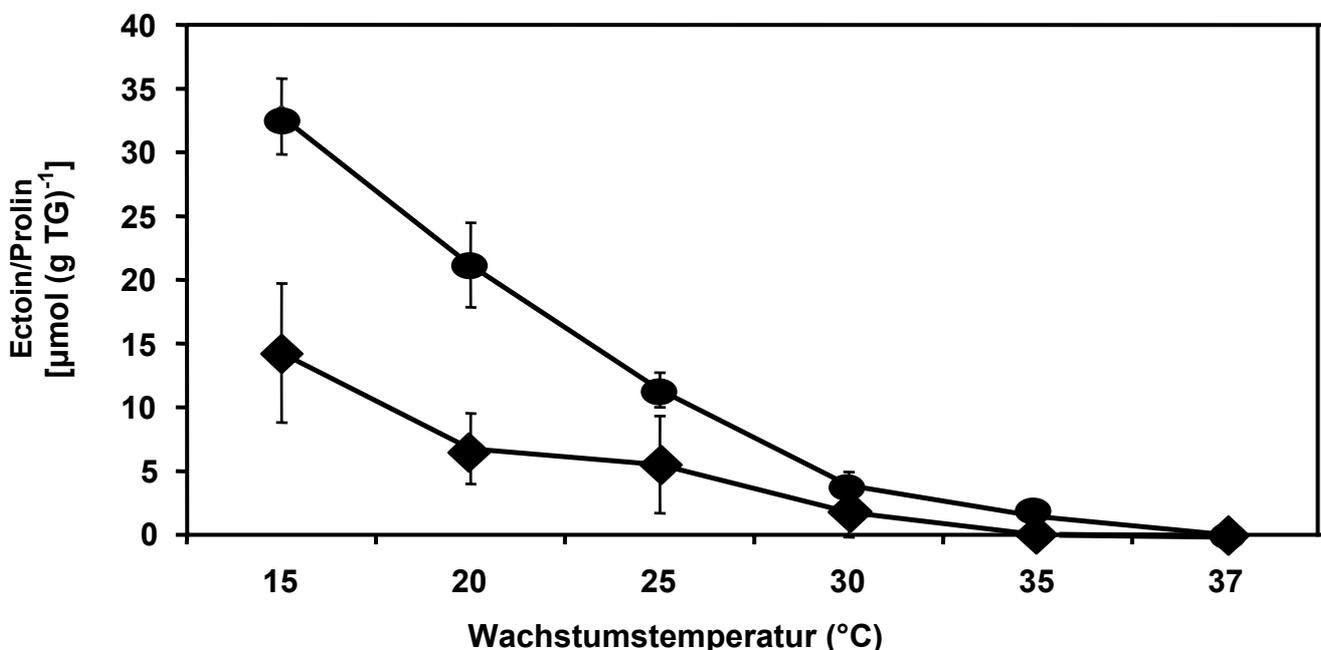
Die Nutzung von exogen zugeführten kompatiblen Soluten als Psychroprotektiva in *L. monocytogenes* warfen die Frage auf, ob auch die endogene Synthese kompatibler Solute durch niedrige Wachstumstemperaturen induziert werden kann. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem psychrophilen und einem mesophilen Bakterium, die beide mit dem Genus *Bacillus* nah verwandt sind und unter hochosmolaren Bedingungen Ectoin synthetisieren, bearbeitet.

## 9.1 Synthese kompatibler Solute in *S. psychrophila*

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse der Zellextrakte des kälteliebenden Bakteriums *Sporosarcina* (früher *Bacillus*). *psychrophila* (Yoon *et al.* 2001) hatten gezeigt, dass dieser Organismus in der Lage ist, Ectoin *de novo* in osmotisch ungestressten Kulturen, die bei der optimalen Wachstumstemperatur der Bakteriums von 25°C gewachsen waren, zu produzieren (Kap. 1.3.2 Anhang). Das Bakterium wurde in diesem Experiment keinem Kältestress ausgesetzt, sondern synthetisierte als Anpassung an seine optimale Wachstumsbedingungen Ectoin. Wurde *S. psychrophila* osmotischem Stress ausgesetzt, nahm der Ectoingehalt der Kulturen in Abhängigkeit zu Osmolalität zu, wie HPLC-Untersuchungen zeigten (Daten nicht gezeigt). Ectoin wird von psychrophilem *Bacillus*-Verwandten *S. psychrophila* somit permanent synthetisiert und schützt das Bakterium auch bei einer Erhöhung der Osmolalität.

## 9.2 *de novo* Ectoin- und Prolinbiosynthese bei niedrigen Wachstumstemperaturen in *V. pantothenicus*

Um zu überprüfen, ob Ectoin im mesophilen *V. pantothenicus* auch bei Kältestress synthetisiert wird, wurden Kulturen in SMM bei Temperaturen, die niedriger waren als die optimale Wachstumstemperatur von 37°C, gezogen und der Ectoin- und Prolingehalt der Kulturen mittels HPLC-Analyse bestimmt (Abb. 22). Die *V. pantothenicus* Kulturen wurden mit einer Vorkultur, die bei 37°C ( $\text{OD}_{578}$  2) gewachsen war, auf eine  $\text{OD}_{578}$  von 0,1 beimpft und bei einer  $\text{OD}_{578}$  von 1 für die



**Abb. 22** Temperaturabhängige *de novo* Synthese von Ectoin und Prolin *V. pantothenicus*

*V. pantothenicus* wurde in SMM bei verschiedenen Wachstumstemperaturen bis zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 1 wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet, und der Ectoin-(●) und Prolingehalt (◆) der Kulturen mittels HPLC bestimmt.

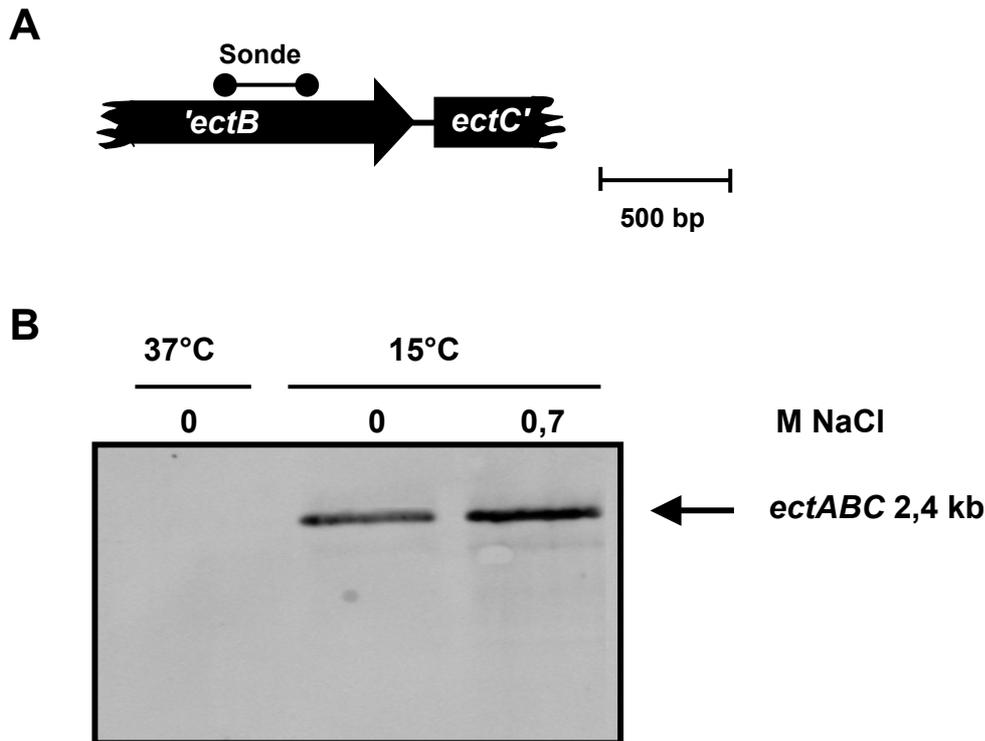
HPLC-Analyse geerntet. Dieses Experiment demonstrierte, dass eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Wachstumstemperatur und der endogenen Synthese der Solute in *V. pantothenicus* bestand. In der Kultur, die bei 37°C gewachsen war, konnte keines der beiden kompatiblen Solute nachgewiesen werden. Bei abnehmender Wachstumstemperatur aber synthetisierte *V. pantothenicus* sowohl Ectoin als auch Prolin *de novo* (Abb. 22). Ectoin war das dominant produzierte kompatible Solut bei allen Temperaturen, und die Konzentration beider Solute erreichte bei 15°C, der niedrigsten untersuchten Wachstumstemperatur von *V. pantothenicus*, ihr Maximum. Die Ectoinkonzentration bei 15°C entsprach dem Ectoingehalt in *V. pantothenicus* Kulturen, die bei optimalen Wachstumstemperaturen (37°C) durch die Zugabe von 0,4 M NaCl osmotisch gestresst worden waren (Abb. 9D), die Prolinkonzentration bei 15°C entsprach ungefähr der Menge in 37°C-Kulturen, denen 0,1 M NaCl zugesetzt worden war (Abb. 9D).

Sowohl die Ectoin- als auch die Prolinbiosynthese sind in *V. pantothenicus* kälteinduziert, und die Synthese der kompatiblen Solute erfolgt fein abgestimmt auf die jeweilige Wachstumstemperatur.

### 9.3 Kältereulation der Transkription des Ectoinbiosyntheseoperons

Die vorliegenden physiologischen Daten demonstrierten, dass die Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus* kältereuliert ist. Um festzustellen, ob diese Regulation auf transkriptioneller Ebene stattfindet, wurde eine Northern Blot-Analyse der Ectoinbiosynthesegene durchgeführt. Gesamt-RNA wurde aus *V. pantothenicus* Zellen isoliert, die bei 15°C in SMM ohne und mit 0,7 M NaCl und bei 37°C gewachsen waren. Diese RNA wurde dann mit der beschriebenen DIG-markierten *ectB*-RNA-Sonde hybridisiert (Abb. 23A).

Die Northern Blot-Analyse zeigte, dass die Transkription des Ectoinbiosyntheseoperons deutlich kälteinduziert ist: Es konnte kein *ectABC*-Transkript in *V. pantothenicus* Kulturen detektiert werden, die in SMM bei 37°C gewachsen waren (Abb. 23B), während die Transkription des Ectoinsyntheseoperons 8 fache induziert war, wenn die Wachstumstemperatur der Kulturen um 22°C auf 15°C erniedrigt worden war (Abb. 23B). Ebenfalls konnte ein additiver Effekt der transkriptionellen Induktion durch Salzzugabe festgestellt werden. In *V. pantothenicus* Kulturen, die bei erhöhter Osmolalität und niedriger Wachstumstemperatur gewachsen waren wurden die stärksten Signale der spezifischen *ectB*-RNA nachgewiesen. Die Induktion des *ectABC*-Operons war dreimal stärker als in Kulturen, die bei 15°C ohne zusätzliches NaCl gewachsen waren (Abb. 23B). Die Größe des Transkriptes (2,4 kb) das in 15°C-Kulturen identifiziert wurde (Abb. 23B), stimmte genau mit der des Transkriptes von Kulturen überein, die unter hochosmolaren Bedingungen bei 37°C wuchsen (Abb. 18B).



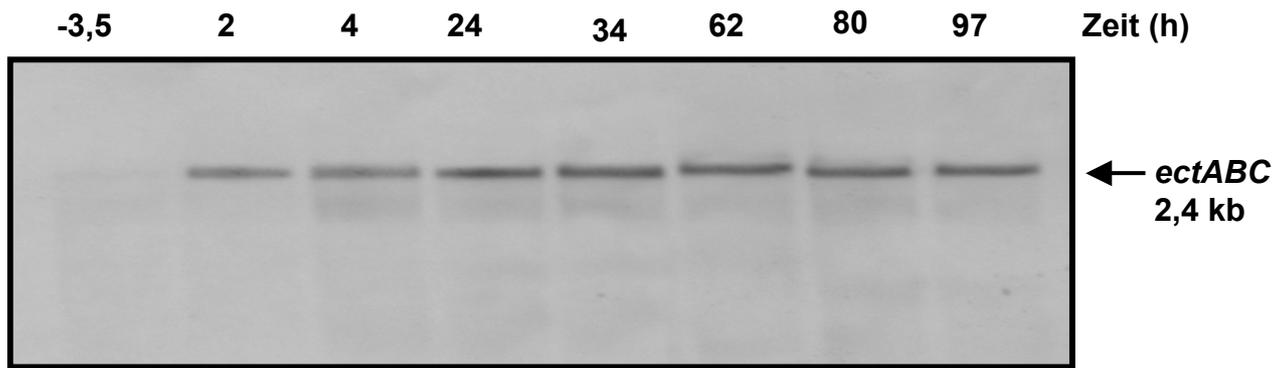
### Abb. 23 Northern Blot-Analyse der *ectABC*-Expression bei niedriger Wachstumstemperatur

(A) Genetische und physikalische Organisation der '*ectB-ectC*' Genregion, die Position der *ectB*-spezifischen Sonde, die für die Northern Blot-Analyse verwendet wurde, ist angegeben. (B) *V. pantothenicus* Kulturen wuchsen in Minimalmedium bei 15°C ohne und mit 0,7 M NaCl. Die Gesamt-RNA dieser Kulturen wurde mit der *ectB*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert.

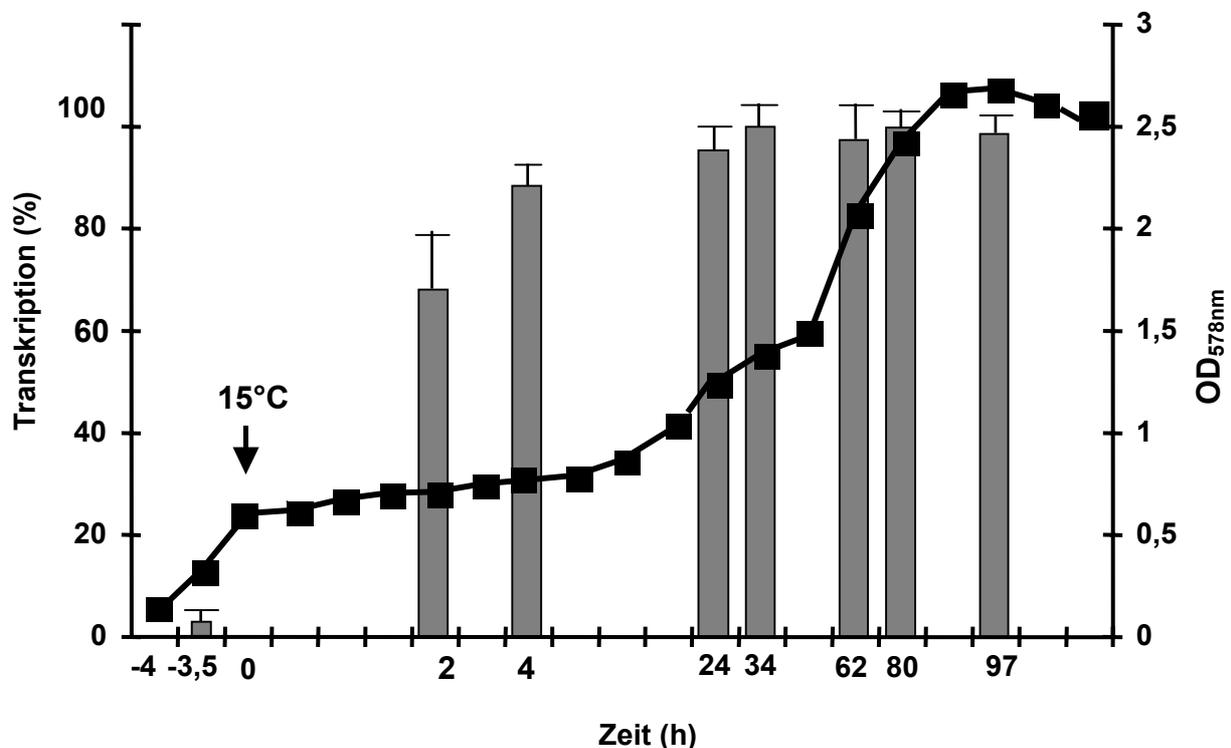
#### 9.3.1 Kälteregulierte Transkription des *ectABC*-Operons

Die Induktion und der zeitliche Verlauf der Transkription des Ectoinsyntheseoperons nach einer plötzlichen Senkung der Wachstumstemperatur wurden durch eine Northern Blot-Analyse in *V. pantothenicus* untersucht. *V. pantothenicus* Kulturen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{578}$  0,5) mit einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,321 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$  gezogen. Dann wurden die Kulturen durch Umsetzen zu 15 °C einem Kälteschock ausgesetzt, und zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Schock wurden Proben für die RNA-Isolation entnommen. Die Gesamt-RNA wurde präpariert und, wie oben beschrieben (Kap. 9.3), mit der DIG-markierten *ectB*-RNA-Sonde hybridisiert. Bereits 2 Stunden nach dem Kälteschock, während sich die Zellen in der Anpassungsphase an die niedrige Wachstumstemperatur befanden und kein Wachstum stattfand, konnte die Transkription der *ect*-Synthesegene detektiert werden (Abb. 24A). 24,5 Stunden nach dem Kälteschock, als die Bakterien mit einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,102 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$  weiter wuchsen, erreichte die Transkriptionsinduktion ihr Maximum (Abb. 24B). *V. pantothenicus* ist somit in der Lage, die Transkription der *ect* Gene nach einem Kälteschock schnell zu induzieren und die Transkription solange aufrecht zu erhalten wie der Kältestress andauert.

A



B



**Abb. 24 Bestimmung des Expressionsprofils des Ectoinbiosyntheseoperons nach einem Kälteschock in *V. pantothenicus***

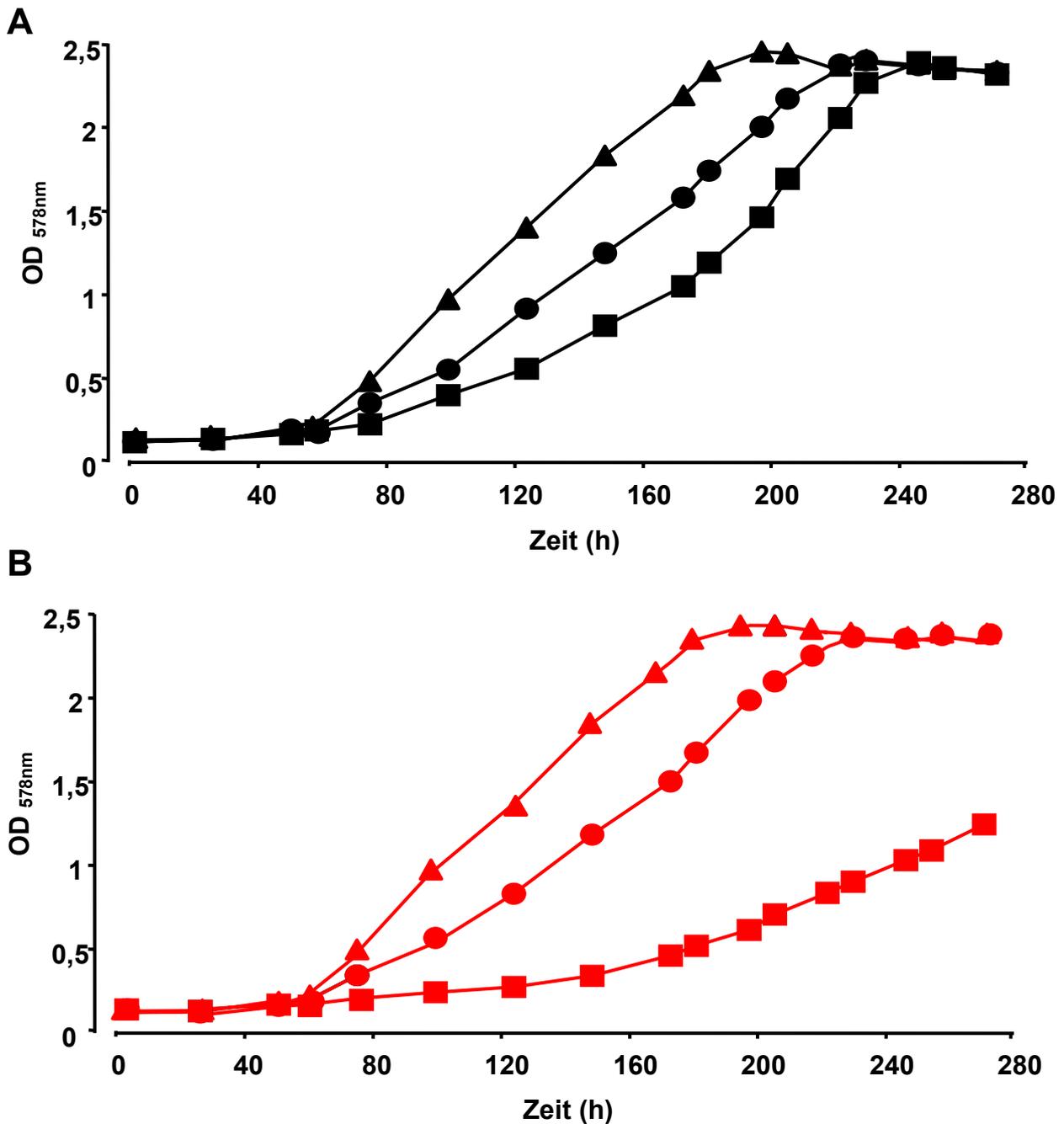
(A) Northern Blot-Analyse der Ectoinsynthesegene wurde mit Gesamt-RNA aus *V. pantothenicus* Kulturen durchgeführt, die einem Kälteschock durch Umsetzen der Kultur von 37°C zu 15°C ausgesetzt worden waren. Vor und nach dem Schock wurden den Kulturen Proben entnommen, die Gesamt-RNA präpariert und diese mit einer *ectB*-spezifischen Sonde hybridisiert. (B) Die Abbildung zeigt das Induktionsprofil für das Ectoinbiosyntheseoperon. Die Stärke der Expression ist in % angegeben, bezogen auf die maximal detektierte Expression über den untersuchten Zeitraum. Die Zeiten der Probennahmen beziehen sich auf  $t_0$ , den Zeitpunkt des hyperosmotischen Schocks. Das Wachstum der Kultur wurde ebenfalls erfasst (■). Die Zeitskala korreliert nicht mit den tatsächlichen Zeitabständen zwischen den einzelnen Messpunkten. Es wurden drei unabhängige Northern Blot-Analysen ( $n_3$ ) durchgeführt, die jeweilige Transkriptionsstärke, ihre Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

Der zeitliche Verlauf und die Stärke der transkriptionellen Induktion des Ectoinsyntheseoperons nach einem hochosmolaren Schock oder einem Kälteschock sind in *V. pantothenicus* vergleichbar. Noch während der Anpassungsphase der Kulturen an die geänderten Umweltbedingungen wird die Transkription der Ectoinsynthesegene induziert. Wachsen die Kulturen unter dem jeweiligen Umweltstress weiter, erreicht die Transkriptionsrate der *ectABC*-Gene jeweils ein Maximum, das, in Übereinstimmung mit den produzierten Ectoinkonzentrationen bei 15°C und 0,7 M NaCl (Abb. 22) (Abb. 9D), bei 15°C niedriger war als bei 0,7 M NaCl (Abb. 23) (Abb. 18).

#### 9.4 Phänotypische Charakterisierung der *ectB*-Mutante AKV3 bei niedriger Wachstumstemperatur

Um vergleichende Wachstumsexperimente mit der *ectB*-Mutante AKV3 und dem *V. pantothenicus* Wildtyp bei Kälte durchführen zu können, wurde untersucht, ob AKV3 bei 15°C nicht mehr in der Lage ist Ectoin endogen zu synthetisieren und die Prolinbiosynthese unter diesen Bedingungen unbeeinflusst abläuft. Der *V. pantothenicus* Stamm AKV3 wurde bei 15°C in SMM bis zu einer  $OD_{578}$  von 1 wachsen gelassen, und der Gehalt von Ectoin bzw. Prolin wurde mittels HPLC bestimmt. In AKV3 konnte kein Ectoin detektiert werden, aber die Prolinkonzentration betrug  $18 \pm 6,7 \mu\text{mol (g TG)}^{-1}$ , eine dem Wildtyp vergleichbare Konzentration (Daten nicht gezeigt). Der Stamm AKV3 kann bei niedrigen Temperaturen kein Ectoin mehr durch *de novo* Synthese akkumulieren, während die Prolinbiosynthese in AKV3 wie im Wildtyp abläuft. Es konnte somit gezeigt werden, dass nur ein Ectoinsyntheseoperon in *V. pantothenicus* existiert, das für die Synthese dieses kompatiblen Solutes sowohl unter hochosmolaren Bedingungen als auch bei Kälte verantwortlich ist.

Die Funktion der endogenen Ectoinsynthese für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen wurde in vergleichende Wachstumsexperimente mit dem Wildtyp Stamm und dem [ $\Delta(ectB::tet)1$ ] Stamm AKV3 untersucht. Ein deutlicher Wachstumsunterschied konnte zwischen der *ectB*-Mutante und dem Wildtyp beobachtet werden, wenn beide Stämme in SMM bei 15 °C wuchsen (Abb. 25; ■ ■). Während der Wildtyp die stationäre Wachstumsphase erreichte, hatte die *ectB*-Mutante bei Kälte einen deutlichen Wachstumsnachteil (Abb. 25). Dieses Ergebnis zeigte, dass endogen synthetisiertes Ectoin in *V. pantothenicus* psychroprotektiv wirkt und die *de novo* Ectoinsynthese eine wichtige Funktion für die Anpassung und das Wachstum bei Kälte hat. Das endogen synthetisierte Prolin reichte nicht aus, um den kältesensitiven Phänotyp der *ectB*-Mutante zu kompensieren. Beide Stämme wuchsen am besten, wenn dem Medium 1 mM Glycin Betain zugesetzt war. Unter diesen Bedingungen war kein Unterschied im Wachstum zwischen Mutante und Wildtyp feststellbar (Abb. 25; ▲ ▲). Ebenfalls konnte kein Wachstumsunterschied zwischen den beiden Stämmen in SMM mit 1 mM Ectoin festgestellt werden. Die Kulturen, die mit Glycin Betain supplementiert worden waren, hatten aber eine generell höhere Wachstumsrate als die Kulturen, denen das Tetrahydropyrimidin Ectoin zugesetzt worden war (Abb. 25; ● ●).



**Abb. 25 Der *ectB*-Stamm AKV3 besitzt einen deutlichen kältesensitiven Phänotyp**

*V. pantothenicus* Wildtyp Kulturen (■ ▲ ●) und Kulturen seines [ $\Delta(ectB::tet)1$ ] Derivatstammes AKV3 (■ ▲ ●) wurden mit einer  $OD_{578}$  von 0,1 mit Kulturen beimpft, die in SMM bei 37°C bis zu  $OD_{578}$  von 0,5 gewachsen waren. Die Kulturen wurden in SMM (■ ■) und SMM in Anwesenheit (▲ ▲) von 1 mM Glycin Betain oder Anwesenheit (● ●) von 1 mM Ectoin bei 15°C wachsen gelassen.

hochosmolaren Bedingungen extern vorhandenes Glycin Betain und Ectoin in die Zelle transportieren. Beide extern zugeführten kompatiblen Solute konnten den kältesensitiven Phänotyp der *ectB*-Mutante komplementieren und wirkten somit psychoprotektiv in *V. pantothenicus*. Weiterhin ließen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass *V. pantothenicus* mindestens ein Transportsystem besitzen muss, das bei Kälte wie bei hochosmolaren Bedingungen extern vorhandenes Glycin Betain und Ectoin in die Zelle transportieren.

## 10 Ectoinaufnahme unter hochosmolarem Stress in *V. pantothenicus*

Neben der endogenen Synthese kompatibler Solute ist die Aufnahme von bereits vorgeformter Solut aus exogenen Quellen durch spezielle Transportsysteme ein weitverbreitete Anpassungsstrategie von Mikroorganismen bei hyperosmotischem Stress. Ein gut untersuchtes Beispiel für den osmotisch induzierten Transport von kompatiblen Soluten in Gram-positiver Bakterien mit niedrigem G + C Gehalt ist *B. subtilis* (Kempf und Bremer 1998; Kappes *et al.* 1999). Dieses Bakterium besitzt fünf Transportsysteme, die für die osmotisch regulierte Aufnahme verschiedener Osmoprotektiva aus der Umwelt zuständig sind. Gemeinsam bilden sie das sogenannte Opu-System (osmoprotectant uptake). *B. subtilis* kann beispielsweise das von ihm dominant unter hochosmolaren Bedingungen synthetisierte Prolin auch effektiv über den Transporter OpuE aus der Umwelt aufnehmen (von Blohn *et al.* 1997) und ist in der Lage, das Tetrahydropyrimidin Ectoin über den Transporter OpuC im Zytoplasma zu akkumulieren (Jebbar *et al.* 1997). Bisher wurde aber kein Ectointransportsystem aus einem Gram-positiven Bakterium, das endogen dieses Osmoprotektivum synthetisiert, isoliert.

*V. pantothenicus* synthetisiert bei osmotischem und bei Kältestress endogen Ectoin (Kap. 1, 6, 9) und ist in der Lage, unter hochosmolaren Bedingungen und bei Kälte Ectoin aus dem Medium durch Transport aufzunehmen, im Zytoplasma zu akkumulieren und somit die wachstumsinhibierenden Effekte hypertoner Bedingungen und niedriger Wachstumstemperatur zu kompensieren (Abb. 21) (Abb. 25). *V. pantothenicus* muss demnach mindestens ein Ectointransportsystem besitzen, dass die effiziente Aufnahme von Ectoin unter beiden abiotischen Stressbedingungen aus der Umgebung ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals der Ectointransport in einem ectoinproduzierenden *Bacillus* detailliert untersucht werden. Daher wurde der genetisch manipulierbare *V. pantothenicus* für diese Untersuchungen gewählt.

### 10.1 Isolierung des Gens eines Ectoin-Transportsystems aus *V. pantothenicus*

Um *V. pantothenicus*-Gene, die ein Ectoin-Transportsystem codieren, zu klonieren, wurde ein genetischer Ansatz gewählt, der auf funktioneller Komplementation beruht. Durch diese nachfolgend beschriebene Methode konnten in früheren Arbeiten kompatible Solut Transporter aus *B. subtilis*, *E. chrysanthemi*, *C. glutamicum* und *L. monocytogenes* isoliert werden (Kempf und Bremer 1994; Kappes *et al.* 1996; von Blohn *et al.* 1997; Gouesbet *et al.* 1996; Peter *et al.* 1996; Sleator *et al.* 1999). Der hier verwendete *E. coli*-Stamm MKH13 (Haardt *et al.* 1994) besitzt weder das hochaffine (ProP) noch das niederaffine Transportsystem für Ectoin (ProU), noch kann er Glycin Betain aus dem Vorläufermolekül Cholin synthetisieren. MKH13 kann daher auf Minimalmedium (MMA)-Agarplatten

mit 0,8 M NaCl und 1 mM Ectoin im Gegensatz zu seinem Vaterstamm MC4100 (*proU*<sup>+</sup> *proP*<sup>+</sup>) nicht wachsen. MKH13 wurde mit einer *Sau3A*-Genbank von chromosomaler DNA aus *V. pantothenicus* in dem Vektor niedriger Kopienzahl pHSG575 transformiert, die Transformanten auf LB-Agarplatten mit 30 µg/ml Cm ausplattiert und am nächsten Morgen auf Selektionsplatten (MMA-Agarplatten mit 0,8 M NaCl, 1 mM Ectoin und 30 µg/ml Cm) replikaplattiert. Auf diesen Platten sollten nur Transformanten wachsen können, denen mit einem rekombinanten Plasmid das Gen (die Gene) für ein Ectoin-Transportsystem aus *V. pantothenicus* übertragen wurde, das den Ectoin-Transportdefekt von MKH13 komplementiert. Auf 20 replikaplattierten Selektionsplatten wuchsen nach drei Tagen 50 Transformanten, von 20 wurden Plasmide präpariert und analytisch mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Es wurde nur eine Klasse von Plasmiden gefunden, die sich auch stabil in *E. coli* replizierten. Zwei Plasmide wurden in MKH13 zurücktransformiert und die Retransformanten auf MMA-Agarplatten mit 0,8 M NaCl mit und ohne 1 mM Ectoin ausgestrichen. Wie die ursprünglichen Klone wuchsen alle Retransformanten auf den Selektionsplatten, die Ectoin enthielten, aber nicht auf den Hochsalzplatten ohne Ectoin. Die Plasmide aller Transformanten schienen demnach ein Ectoin-Transportsystem aus *V. pantothenicus* zu codieren, das in *E. coli* funktionell exprimiert wird.

Um zu verifizieren, dass das isolierte DNA-Fragment tatsächlich aus *V. pantothenicus* stammte, wurde aus dem gesamten 4,4 kb *Bam*HI-Fragment eines der isolierten Plasmide (pAK9) eine DIG-markierte DNA-Sonde hergestellt und gegen chromosomale DNA von *B. subtilis* JH642, *E. coli* MC4100, *S. pasteurii* und *V. pantothenicus*, die zuvor mit *EcoRI* verdaut worden waren, hybridisiert. In diesem Southern Blot konnte nur eine Reaktion der Sonde mit chromosomaler *V. pantothenicus* DNA detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit wurde eindeutig die Herkunft des isolierten DNA-Fragmentes aus dem Genom von *V. pantothenicus* nachgewiesen.

## 10.2 Analyse der isolierten Genregion aus *V. pantothenicus*

Die DNA-Sequenz des gesamten chromosomalen DNA-Inserts (4377 bp) des Plasmids pAK9 wurde bestimmt. Eine Analyse dieser DNA-Region mittels des DNASTAR Computerprogrammes zeigte, dass zwei offene Leserahmen, die in die gleiche Richtung orientiert sind, in diesem DNA-Bereich vorhanden waren (Kap. 5 Anhang) (Abb. 5C). Das Leseraster1 hatte eine Größe von 1504 bp und das Leseraster2 von 314 bp. Beide Leseraster waren durch eine 1754 bp umfassende und somit ungewöhnlich langen intergene Region von einander getrennt. Diese offenen Leserahmen codierten potentielle Proteine mit einer molekularen Masse von 55,1 kDa (501 Aminosäuren) für Leseraster1 und 11,5 kDa (104 Aminosäuren) für Leseraster2. Vor jedem der offenen Leserahmen konnte eine potentielle Ribosomenbindestelle identifiziert werden, die jeweils homolog zu typischen Ribosomenbindestellen von *B. subtilis* war. Es konnte keine Sequenz für eine Rho-Faktor unabhängige Termination der Transkription durch visuelle Untersuchung der DNA-Sequenz stromabwärts des Stop-Codons von Leseraster1 oder von Leseraster2 gefunden werden.

### 10.3 Analyse der abgeleiteten Polypeptidsequenz von *ectT*

#### 10.3.1 EctT ist ein neues Mitglied der BCCT-Transporter Familie

Das Leseraster1 codiert ein potentielles Protein aus 501 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 55,1 kDa. Eine Datenbanksuche unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) ergab signifikant hohe Sequenzidentitäten von Leseraster1 zu potentiellen und bereits charakterisierten Transportern der BCCT (betaine choline carnitine transport)-Transporter Familie (Reizer *et al.* 1994; Saier *et al.* 1999; Saier 2000) ([http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/2\\_15.html](http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/2_15.html)). Besonders hohe Sequenzidentitäten konnten zu einem nicht näher charakterisierten potentiellen BCCT-Transporter aus *B. halodurans* (49 %) (GenBank-Zugriffsnummer NP244763) (Takami *et al.* 2000), OpuD aus *B. subtilis* (42,5 %) (GenBank-Zugriffsnummer NP390885) (Kappes *et al.* 1996) und dem BCCT-Transporter BetL aus *L. monocytogenes* (42,9 %) (GenBank-Zugriffsnummer NP465616) (Sleator *et al.* 1999) festgestellt werden. Geringere Sequenzidentitäten von EctT zeigten sich zu den BCCT-Transportern EctP (33 %) und BetP (34 %) aus *Corynebakterium glutamicum* (Peter *et al.* 1996; Peter *et al.* 1998b) und BetT (31 %) aus *E. coli* (Lamark *et al.* 1991). Das Leseraster1 wurde daher als *ectT* (ectoine transporter) und das codierte Proteine als EctT bezeichnet. Eine schematische Darstellung des isolierten DNA-

**Tabelle 18. Mit EctT verwandte BCCT-Transporter**

Protein (Identität)	Organismus	Substrat	osmotisch reguliert	Anzahl der AS	
				N-Terminus	C-Terminus
EctT (100%)	<i>V. pantothenicus</i>	Ect <sup>1</sup> , OH-Ect <sup>2</sup>	ja	8	15
Acc. no. AP001520 (49%)	<i>B. halodurans</i>	(?)	?	11	29
OpuD (43%)	<i>B. subtilis</i>	Glycin Betain	ja	9	30
BetL (43%)	<i>L. monocytogenes</i>	Glycin Betain	ja	8	26
BetP (34%)	<i>C. glutamicum</i>	Glycin Betain	ja	61	56
EctP (33%)	<i>C. glutamicum</i>	Ect <sup>1</sup> , GB <sup>3</sup> , Pro <sup>4</sup>	ja	25	109
BetS (33%)	<i>Si. meliloti</i>	GB <sup>3</sup> , PB <sup>5</sup>	ja	52	169
y917 (31%)	<i>M. tuberculosis</i>	Glycin Betain	?	23	90
yh06 (38%)	<i>H. influenzae</i>	Cholin	?	11	182
Acc. no. AL002114 (30%)	<i>V. cholerae</i>	(?)	?	38	15
BetT (31%)	<i>E. coli</i>	Cholin	ja	17	182
CaiT (28%)	<i>E. coli</i>	Carnitin	nein	14	12
y679 (28%)	<i>Treponema pallidum</i>	(?)	?	13	11

<sup>1</sup> Ectoin; <sup>2</sup> Hydroxyectoin; <sup>3</sup> Glycin Betain; <sup>4</sup> Prolin; <sup>5</sup> Prolin Betain

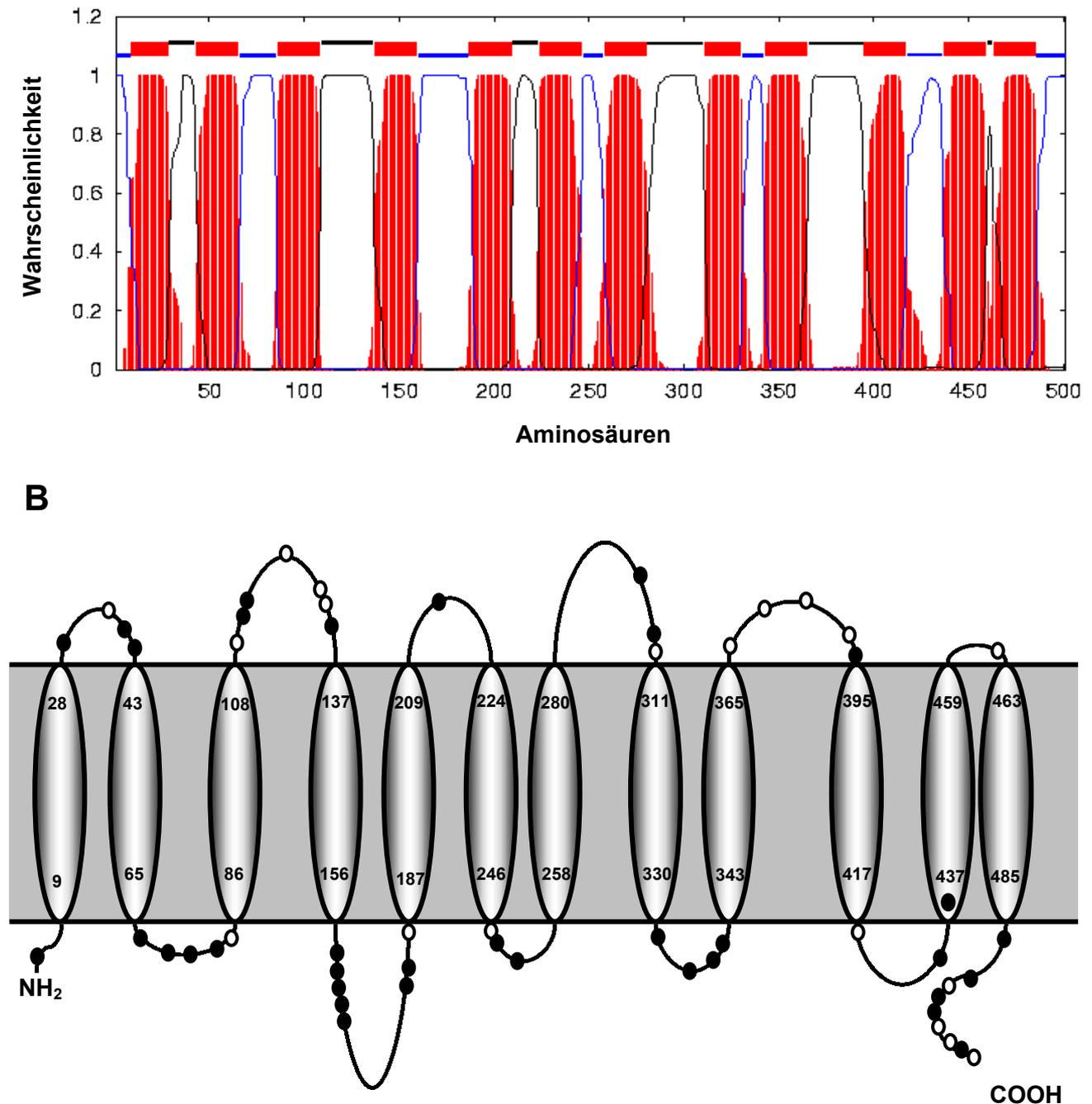
Fragmentes aus *V. pantothenicus* mit den zwei identifizierten Leserastern ist in Abbildung 5C dargestellt. Das *ectT*<sup>+</sup> Plasmid wurde pAK9 genannt, alle in dieser Arbeit konstruierten *ectT*-Plasmide stammen von ihm ab. Ein Aminosäurevergleich verschiedener BCCT-Transporter, der auch EctT beinhaltet, ist im Anhang (Kap. 6) dargestellt.

Die BCCT-Transporter Familie wird von sekundären Transportsystemen für trimethylierte organische Ammoniumverbindungen aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gebildet (Reizer *et al.* 1994; Saier *et al.* 1999; Saier 2000) (Tab. 18). BCCT-Transporter sind Einzelkomponententransporter, die den Protonengradienten mit dem Soluttransport koppeln. EctT hat die höchsten Sequenzidentitäten zu BCCT-Transportern aus Gram-positiven Mikroorganismen mit niedrigem G + C-Gehalt der DNA, die für die Aufnahme von positiv geladenen, methylierten Ammoniumverbindungen unter hochosmolaren Bedingungen zuständig sind.

### 10.3.2 Mögliche topologische Organisation von EctT

Eine Hydrophobizitätsanalyse mit dem Programm TMHMM (Transmembrane Protein Topology prediction with a hidden Markov Model (www.cbs.dtu.dk) (Krogh *et al.* 2001) ergab, dass EctT zwölf für die sekundäre Transporter typische, hydrophobe und potentiell membranspannende Segmente aufweist, die jeweils ungefähr zwanzig Aminosäuren umfassen (Abb. 26). Die Anwendung der sogenannten „positive-inside-rule“ (von Heijne 1992) lässt vermuten, dass sowohl der Carboxy- als auch der Aminoterminus in das Zytoplasma ragen und EctT damit eine für sekundäre Transporter typische Topologie aufweist (Abb. 26). Das Topologiemodell von EctT zeigt eine asymmetrische Verteilung der 35 positiv geladenen Aminosäuren (Arg, Lys und His): 24 der positiven Ladungen befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite, nur 10 auf der extrazellulären Seite. Eine positiv geladene Aminosäure befindet sich in dem Transmembransegment 11. Die Verteilung der negativen Ladungen ist genau umgekehrt: Nur 4 negativ geladene Aminosäurereste befinden sich in cytoplasmatischen und 11 in extrazellulären Proteinsegmenten (Abb. 26B). Die Ladungsverteilung und die potentielle Sekundärstruktur von EctT sind denen anderer BCCT-Transporter (Kappes *et al.* 1996; Peter *et al.* 1998a; Boscari *et al.* 2002) sehr ähnlich und bestätigt die Datenbankanalysen der primären Aminosäuresequenz von EctT bezüglich seiner Zugehörigkeit zur dieser Transporterfamilie.

Generell haben BCCT-Transporter, von den variablen C- und N-Termini abgesehen, annähernd gleiche Größen (zwischen 481 und 706 Aminosäuren) (Tab. 18). Der C-Terminus von EctT besteht aus 15 Aminosäuren, von denen 9 saure oder basische Reste sind, der N-Terminus umfasst 8 Aminosäuren und ist nur schwach polar. BCCT-Transporter sind für die Aufnahme methylierter, partiell positiv geladener organischer Ammoniumverbindungen zuständig. So ist das Hauptsubstrat von OpuD aus *B. subtilis*, von BetL aus *L. monocytogenes*, von BetP aus *C. glutamicum* Glycin Betain, während das primäre Substrat von BetT aus *E. coli* Carnitin ist. EctP aus *C. glutamicum* ist der



**Abb. 26 Hydrophobizitätsanalyse und Topologiemodell von EctT**

(A) Dargestellt ist der Hydrophobizitäts-Plot des potentiellen EctT Proteins aus *V. pantothenicus*, erstellt durch das Computerprogramm TMHMM (<http://genome.cbs.dtu.dk>). Auf der y-Achse ist die Wahrscheinlichkeit aufgetragen mit der Bereiche des Proteins die Zytoplasmamembran durchspannen, auf der x-Achse sind die Aminosäurepositionen in EctT angegeben. Die rotmarkierten Bereiche stellen hydrophobe Transmembranbereiche dar. Blau wurden hydrophile Bereiche, die in das Zytoplasma reichen, schwarz wurden hydrophile Bereiche, die im extrazytoplasmatischen Raum lokalisiert sind, markiert. (B) Gezeigt ist das aufgrund des Hydrophobizitäts-Plots unter Anwendung der „positive-inside-rule“ vorgeschlagene Modell von EctT. Positiv geladene, basische Aminosäuren (Arg, Lys, His) (●) und negativ geladene, saure Aminosäuren (Glu, Asp) (○) sind markiert. Die Zahlen geben die jeweils ersten potentiell membranlokalisierten Aminosäuren an.

	8																		9												
EctT <i>V. pantothenicus</i>	W	T	I	F	Y	W	A	W	S	T	A	W	S	P	F	V	G	A	F	I	A	R	V	S	R	G	R	S	I	R	30
<i>B. halodurans</i>	W	T	I	F	Y	W	A	W	A	I	A	W	S	P	Y	V	G	A	F	V	A	R	V	S	R	G	R	T	I	R	30
BetL <i>L. monocytogenes</i>	W	T	I	F	Y	W	A	W	W	L	S	W	S	P	F	V	G	I	F	I	A	R	I	S	R	G	R	T	I	R	30
OpuDB <i>S. subtilis</i>	W	T	I	F	Y	W	A	W	W	I	S	W	S	P	F	V	G	I	F	I	A	R	V	S	R	G	R	T	I	R	30
BetP <i>C. glutamicum</i>	W	T	I	F	Y	W	A	W	W	I	S	W	S	P	F	V	G	M	F	L	A	R	I	S	R	G	R	S	I	R	30
EctP <i>C. glutamicum</i>	W	T	V	F	Y	W	A	W	T	I	C	W	S	P	Y	V	G	M	F	V	A	R	I	S	R	G	R	T	V	R	30
EctT <i>V. pantothenicus</i>	Q	Y	V	L	G	V	L	V	S	P	A	I	A	C	I	W	I	A	A	F	G	G	T	A							55
<i>B. halodurans</i>	E	F	I	V	G	V	M	I	V	P	P	L	I	A	C	L	W	I	A	T	F	G	G	T							54
BetL <i>L. monocytogenes</i>	Q	F	L	L	G	V	I	V	L	P	A	L	V	S	V	F	W	F	A	V	F	G	G	S	A	I	F	V			58
OpuDB <i>S. subtilis</i>	E	F	L	I	G	V	L	V	T	P	C	I	L	T	F	L	W	F	S	I	F	G	V	S							54
BetP <i>C. glutamicum</i>	E	F	I	L	G	V	L	L	V	P	A	G	V	S	T	V	W	F	S	I	F	G	G	T	A	I	V	F			58
EctP <i>C. glutamicum</i>	E	F	I	G	G	V	L	A	L	P	A	I	F	G	V	V	W	F	S	I	F										51

**Abb. 27 Vergleich der Aminosäuresequenz der Transmembranbereiche 8 und 9 und dem verbindenden cytoplasmatischen Loop von EctT und anderen BCCT-Transportern**

Die Aminosäuresequenzen der Transmembranbereiche 8 und 9 und ihre hydrophile, zytoplasma-lokalisierte Verbindung von EctT wurden mit den korrespondierenden Aminosäurebereichen von BCCT-Transportern aus *B. halodurans* (potentieller Glycin Betain Transporter)(Acc. no. AP001520), BetL von *L. monocytogenes* (Acc. no. AF102174), OpuD aus *B. subtilis* (Acc. no. AF008220), BetP aus *C. glutamicum* (Acc. no. X93514), EctP aus *C. glutamicum* (Acc. no. AJ001436) und BetP aus *E. coli* (Acc. no. AP002551) verglichen. Die Transmembranbereiche von EctT wurden mit Linien markiert. Konservierte aromatische Aminosäuren in den verglichenen Aminosäuresequenzen wurden ebenfalls markiert (▼).

einzig bekannte Transporter dieser Familie, der wie EctT aus *V. pantothenicus* das Tetrahydropyrimidin Ectoin aus der Umwelt aufnehmen kann. Trotz der verschiedenen Substrate der Transporter ist es in einem Aminosäuresequenzvergleich offensichtlich, dass die Transmembranhelices 8 und 9 und die sie verbindende cytoplasmatische Schleife in dieser Transporterfamilie hochkonserviert sind (Abb. 27) (Kap. 6 Anhang). Besonders die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin sind in diesem Bereich zahlreich und konserviert (Abb. 27). Es wäre möglich, dass diese aromatischen Aminosäurereste in BCCT-Transportern an der Substratbindung beteiligt sind.

## 10.4 Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz des Leserasters2

Das bei der Sequenzierung des chromosomalen DNA-Fragmentes gefundene stromabwärts von *ectT* liegende Leseraster2 besitzt die gleiche Orientierung wie *ectT*. Das Leseraster2 ist vollständig in dem DNA-Fragment enthalten (Kap. 5 Anhang). Die abgeleitete Proteinsequenz zeigt Sequenzidentitäten zu dem Protein SugE aus *E. coli*, das eine Größe von 11,3 kDa besitzt. Das *sugE* Gen ist bei 94 Minuten auf dem *E. coli*-Chromosom lokalisiert, unterdrückt eine *groEL* Mutation und mimikriert den Effekt einer GroEL Überproduktion (Greener *et al.* 1993). SugE ist ein Mitglied der

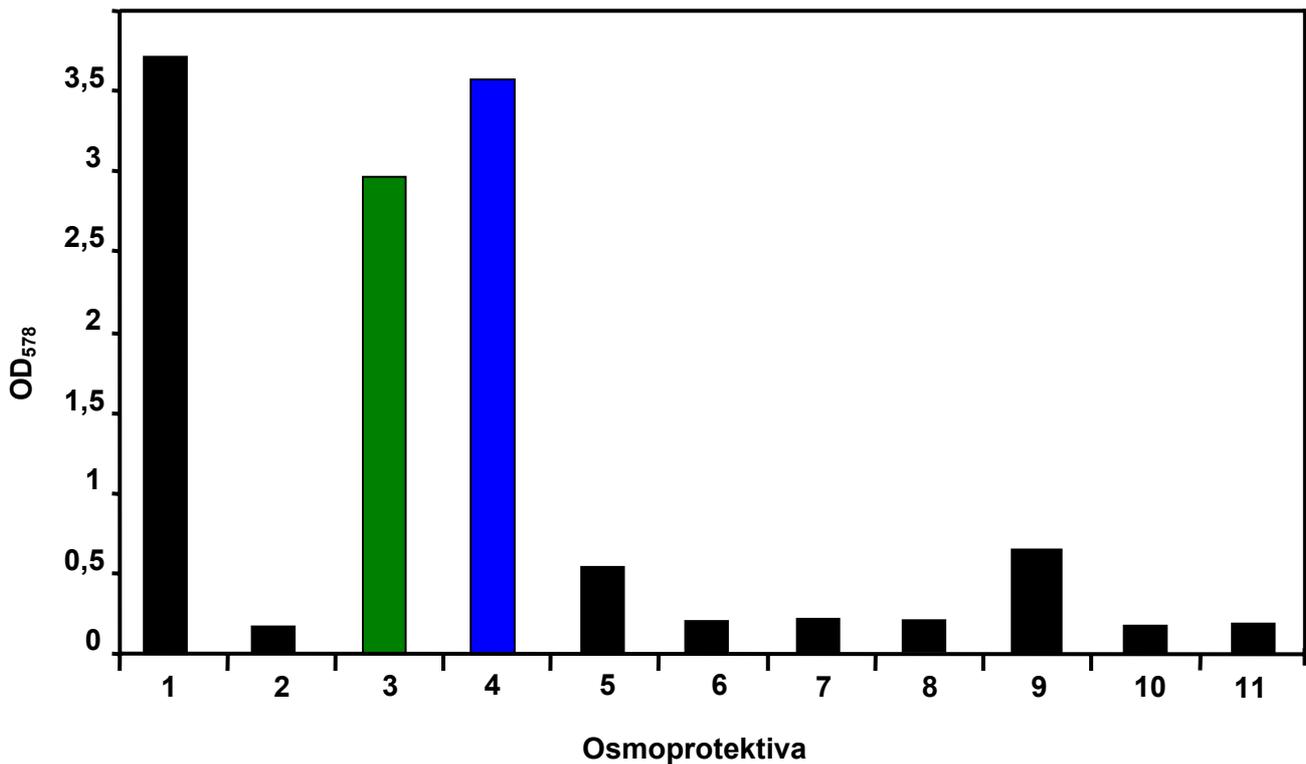
„small multidrug resistance pump“ (SMR) Familie (Chung und Saier 2001) und vermittelt *E. coli* Resistenz gegen toxische Aminoverbindungen indem es diese Substanzen aus dem Zytoplasma pumpt (Chung und Saier 2002). Eine Hydrophobizitätsanalyse der abgeleitete Aminosäuresequenz von Leseraster2 mit dem Computerprogramm TMHMM ([www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) (Krogh *et al.* 2001) zeigte, dass auch die zweidimensionale Struktur dieses Proteins die für Mitglieder der SMR-Familie typischen vier Transmembranbereichen enthält. Dieses Ergebnis lässt auf eine Lokalisation der SugE Homologs in der Zytoplasmamembran von *V. pantothenicus* schließen. Die gemeinsame Lokalisation von Leseraster2, der potentiellen Effluxpumpe für toxische Aminoverbindungen, und *ectT*, das einen BCCT-Transporter codiert, konnte nur in *V. pantothenicus* beobachtet werden und scheint ohne weitere direkte physiologische Relevanz für die Funktion von EctT zu sein.

## 11 Physiologische Charakterisierung von EctT

Zahlreiche Mitglieder der BCCT-Transporterfamilie sind für die Aufnahme trimethylierter kompatibler Solute unter hochosmolaren Bedingungen verantwortlich (Saier *et al.* 1999; Saier 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte ein BCCT-Transporter aus *V. pantothenicus* isoliert werden, der funktionell in *E. coli* MKH13 exprimiert wird und in diesem Stamm Ectoin so effizient transportiert, dass *E. coli* bei hochosmolarem Stress durch die Ectoinaufnahme geschützt wird. Da in *V. pantothenicus*, neben der *de novo* Ectoinsynthese, die Aufnahme von Ectoin aus exogenen Quellen einen wichtigen Anpassungsmechanismus an hochosmolare Bedingungen darstellt (Kap. 6; Abb. 21) wurde die Funktion von EctT bei der Ectoinaufnahme unter hoher Osmolalität in *V. pantothenicus* untersucht.

### 11.1 Tetrahydropyrimidin-Transport durch EctT im heterologen System

Zur Klonierung von *ectT* wurde eine Selektion des *E. coli* Stammes MKH13, transformiert mit der *V. pantothenicus* Genbank, auf Minimalmedium (MMA) mit einer wachstumsinhibierenden NaCl-Konzentration (0,8 M NaCl) und 1 mM Ectoin durchgeführt (siehe auch Kapitel 13). Um zu überprüfen welche Osmoprotektiva von EctT im heterologen *E. coli*-System transportiert werden können, wurde der Stamm MKH13, der das *ectT*<sup>+</sup> Plasmid pAK9 trug, in MMA und MMA mit 0,8 M NaCl ohne und mit 1 mM verschiedener Osmoprotektiva angezogen. Die optische Dichte der Kulturen wurde nach 48 Stunden photometrisch bestimmt (Abb. 28). Dieses Experiment bestätigte die Wachstumsversuche auf den Selektionsplatten und zeigte darüber hinaus, dass neben Ectoin auch Hydroxyectoin effektiv von EctT im heterologen *E. coli* System transportiert wird (Abb. 28). Mit deutlich geringerer Affinität transportierte EctT Glycin Betain und Prolin (Abb. 28). Eine Aussage, ob der Transport der kompatiblen Solute osmotisch reguliert erfolgte, lässt dieses Experiment nicht zu.



**Abb. 28** EctT vermittelt dem *E. coli*-Stamm MKH 13 einen osmotischen Schutz durch den Transport von Ectoin und Hydroxyectoin.

Der *E. coli*-Stamm MKH13, der das *ectT*<sup>+</sup>-Plasmid pAK9 trug, wurde in MMA Medium kultiviert, dem 0,8 M NaCl zugesetzt worden waren. Den Kulturen wurden verschiedene Osmoprotektiva, jeweils in der Endkonzentration von 1 mM, zugesetzt. Eine Kontrolle wurde in MMA ohne NaCl (1), eine andere Kontrolle wurde in MMA + 0,8 M NaCl, aber ohne Osmoprotektivum (2) wachsen gelassen. Die OD<sub>578</sub> der einzelnen Kulturen wurde nach 16 h Wachstum bei 37°C photometrisch bestimmt. 3: Ectoin; 4: Hydroxyectoin; 5: Glycin Betain; 6: Cholin; 7: Carnitin; 8: Cholin-O-Sulfat; 9: Prolin; 10: DMSA; 11: DMSP.

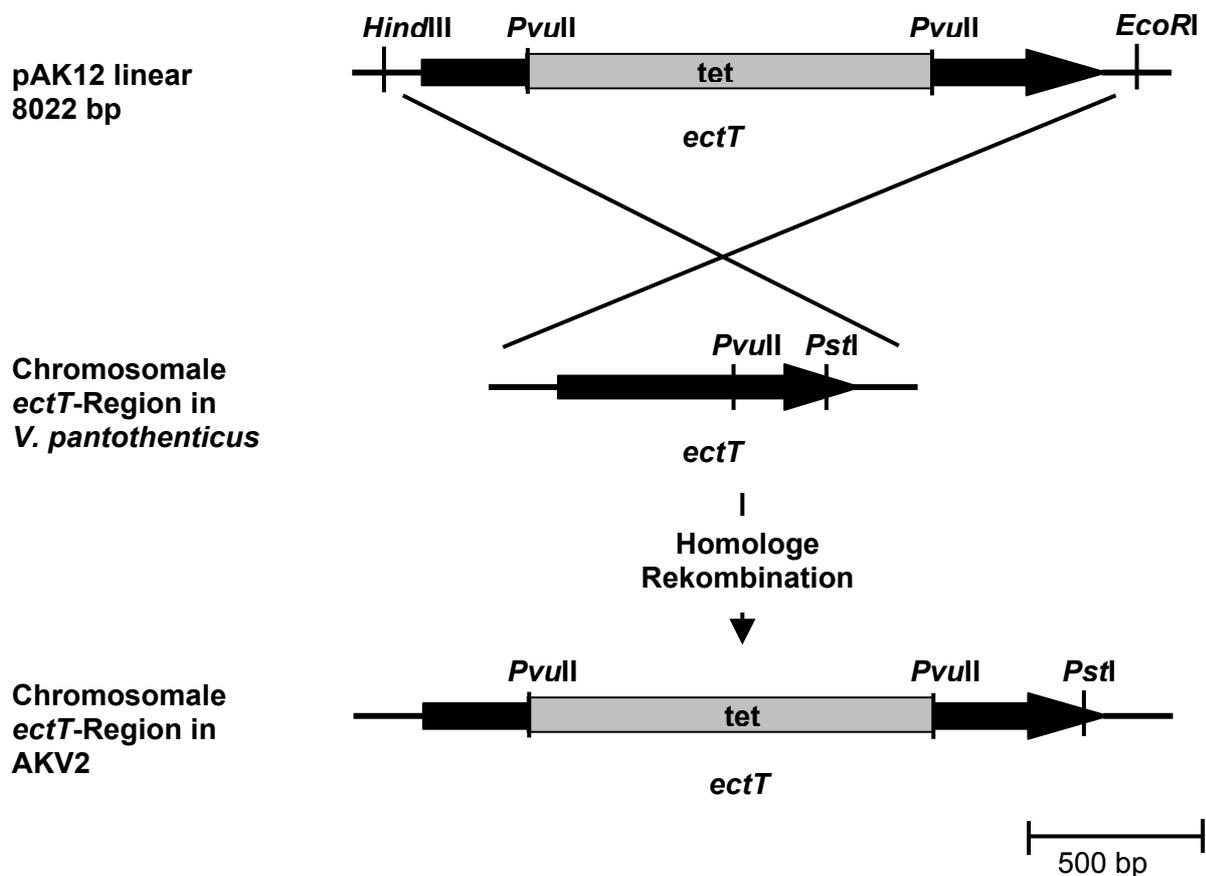
## 11.2 Charakterisierung einer *ectT*-Genunterbrechungsmutante in *V. pantothenicus*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in *V. pantothenicus* beobachtet werden, dass exogen zugeführtes Ectoin den Zellen einen Schutz sowohl unter hochosmolaren Bedingungen wie auch bei Kälte vermittelte und Ectoin durch Transport in der Zelle akkumuliert wird. Zur genaueren Untersuchung der Funktion von EctT beim Ectointransport bei Kälte und unter hochosmolaren Umweltbedingungen sollte eine *ectT*-Genunterbrechung im Chromosom eingeführt werden.

### 11.2.1 Konstruktion einer chromosomalen *ectT*-Genunterbrechung in *V. pantothenicus*

Zur Herstellung einer chromosomalen *ectT*-Genunterbrechungsmutante in *V. pantothenicus* wurde das Plasmid pAK11, das einen Teil des *ectT*-Gens trägt, mit *Pvu*II verdaut und ein DNA-Fragment, das das Gen für eine Tetracyclin-Resistenz trägt, in diese Schnittstelle eingesetzt (Abb.

29). Das so entstandene Plasmid war pAK12 (Abb. 29). Linearisierte man pAK12 mit *KpnI* und *AccI* und transformierte man damit *V. pantothenicus* unter Ausnutzung seiner natürlichen Kompetenz, so rekombinierte die DNA des Plasmids mit der entsprechenden homologen chromosomalen DNA-Region von *V. pantothenicus*. Eine Doppelrekombination der Marker fand statt, und der entstandene *V. pantothenicus* Stamm trug das Tetracyclinresistenzgen in das *ectT*-Gen inseriert, wodurch das Gen nicht mehr exprimiert wird (Abb. 29). Auf Tetracyclin-resistente Transformanten wurde selektiert, und die korrekte Rekombination wurde mit Hilfe eines Southern Blots überprüft (Daten nicht gezeigt). Der so konstruierte *V. pantothenicus*-Stamm heißt AKV2 und besitzt den [(*ectT::tet*)1] Genotyp.

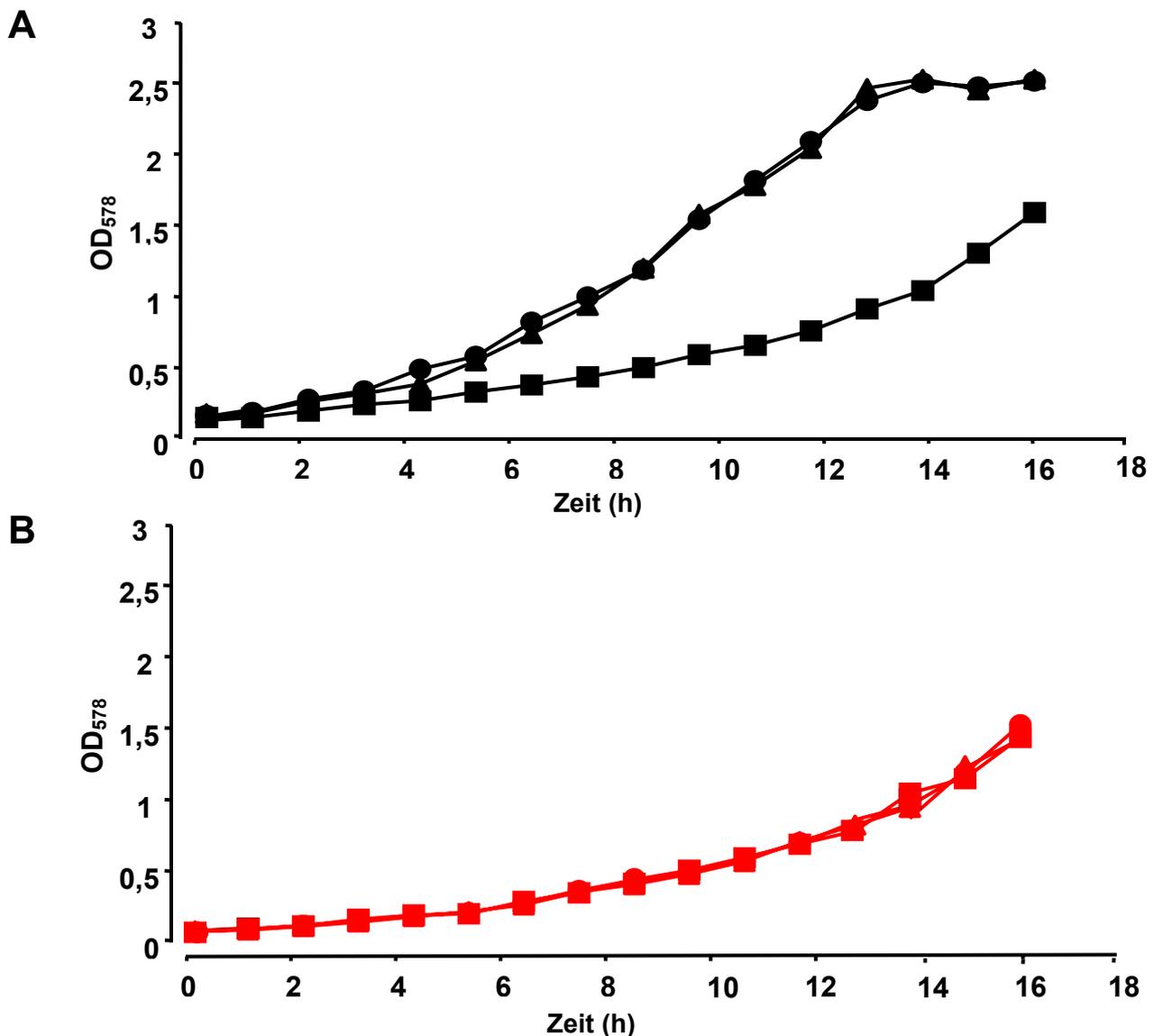


**Abb. 29** Konstruktion einer *ectT*-Genunterbrechung in *V. pantothenicus*

Dargestellt ist die Konstruktion des *ectT*-Mutanten Stammes durch homologe Rekombination in *V. pantothenicus*.

### 11.2.3 Phänotypische Charakterisierung der *ectT*-Mutante AKV2 unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen

Die mögliche Funktion von EctT für die Anpassung an hochosmolaren Stress wurde in vergleichenden Wachstumsexperimente mit dem *V. pantothenicus* Wildtyp-Stamm und dem [(*ectT::tet*)1] Stamm AKV2 untersucht. Beide Stämme wuchsen in SMM mit 1,6 M NaCl und SMM mit 1,6 M NaCl in Anwesenheit von 1 mM Ectoin oder 1 mM Hydroxyectoin (Abb. 30). Ein deutlicher Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp und *ectT*-Mutante zeigte sich in SMM mit 1,6 M NaCl, dem



**Abb. 30** Die *ectT*-Mutante AKV2 ist nicht mehr in der Lage unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen exogen zugeführte Ectoine aufzunehmen

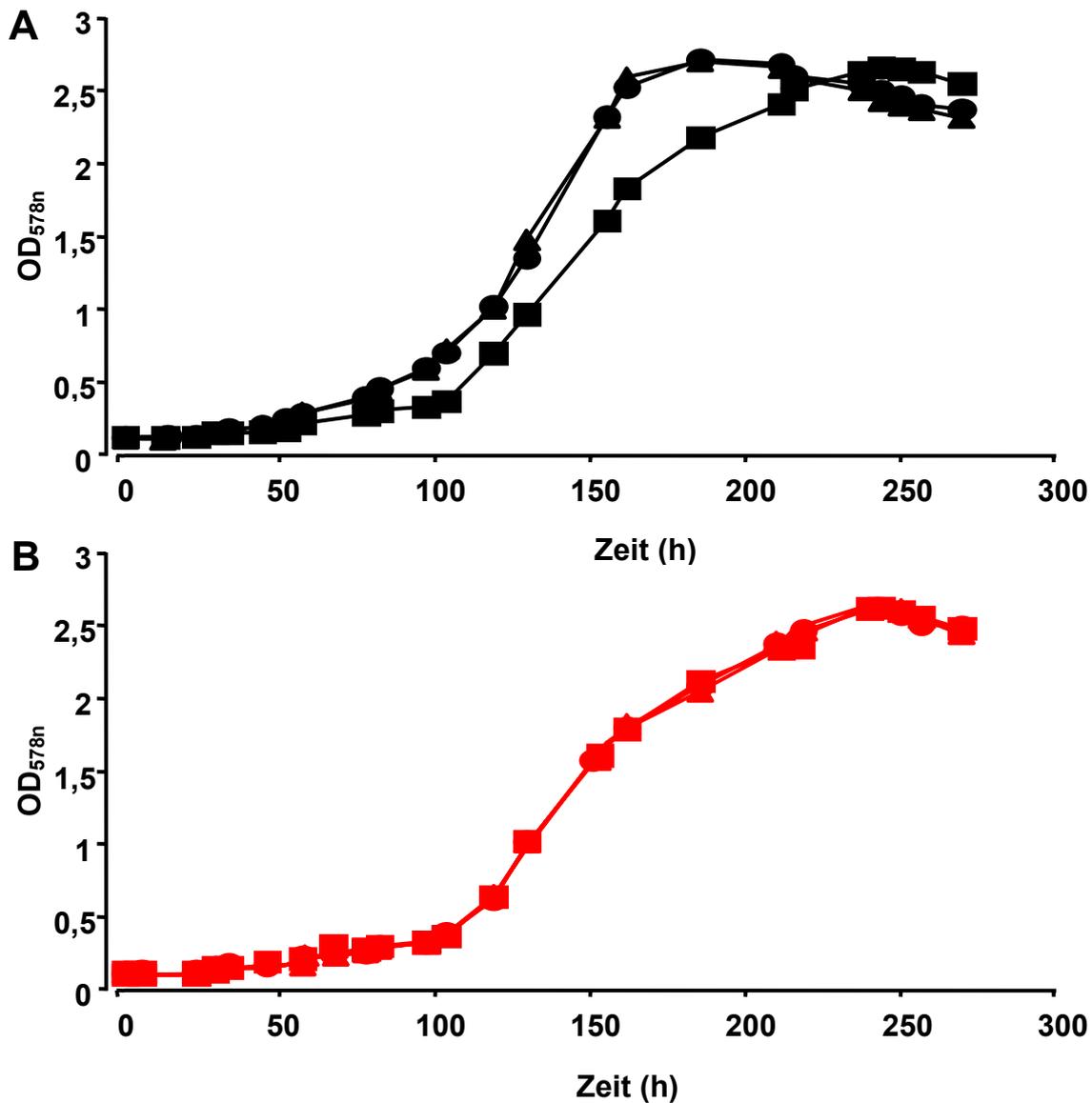
(A) *V. pantothenicus* Wildtyp Kulturen (■ ● ▲) und Kulturen seines [(*ectT::tet*)1] Derivatstammes AKV2 (■ ● ▲) wurden mit einer  $OD_{578}$  von 0,1 mit Übernachtskulturen beimpft, die in SMM ohne NaCl gewachsen waren. Die Kulturen wurden in SMM mit 1,6 M NaCl (■ ●) und SMM mit 1,6 M NaCl in Anwesenheit von 1 mM Ectoin (● ●) bzw. 1 mM Hydroxyectoin (▲ ▲) wachsen gelassen.

1 mM Ectoin bzw. 1 mM Hydroxyectoin zugesetzt worden war (Abb. 30). Die Erhöhung der Osmolalität beeinflusste das Wachstum des Wildtypes nicht nachteilig, da der Stamm in der Lage war, die extern vorhandenen Osmoprotektiva in die Zelle zu transportieren. Der so gegen hochosmolare Bedingungen geschützte Wildtyp konnte die stationäre Wachstumsphase erreichen (Abb. 30A; ● ▲). Die *ectT*-Mutante AKV2 hingegen zeigte kein verbessertes Wachstum durch die Zugabe von Ectoin oder Hydroxyectoin unter hochosmolaren Bedingungen (Abb. 30B; ● ▲). Dieser Wachstumsnachteil ist durch das Fehlen von EctT begründet. EctT kommt daher eine entscheidende Funktion für den Ectoin- und Hydroxyectointransport unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus* zu. Als Kontrolle für das Wachstum beider *V. pantothenicus* Stämme unter hochosmolaren Bedingungen dienten Kulturen, die in SMM mit 1,6 M NaCl ohne zugesetzte kompatible Solute wuchsen (Abb. 30AB; ■ ■). Beide *V. pantothenicus* Stämme zeigten hier ein vergleichbar schlechtes Wachstum.

#### 11.2.4 Einfluss von EctT auf den kompatiblen Solut Transport bei Kälte

Die Beteiligung von EctT am Ectoin- und Hydroxyectointransport in *V. pantothenicus* bei niedrigen Wachstumstemperaturen sollte auf physiologischer Ebene durch vergleichende Wachstumsexperimente mit dem Wildtyp-Stamm und dem [(*ectT::tet*)1] Stamm AKV2 untersucht werden. Beide Stämme wurden dazu in SMM und SMM, dem 1 mM Ectoin bzw. 1 mM Hydroxyectoin zugesetzt worden war, bei einer Wachstumstemperatur von 15°C wachsen gelassen (Abb. 31).

Es bestand ein deutlicher Wachstumsunterschied zwischen der *ectT*-Mutante und dem Wildtyp, wenn beide Stämme in SMM in der Gegenwart von Ectoin (Abb. 31AB; ● ●) bzw. Hydroxyectoin (Abb. 31AB; ▲ ▲) bei 15 °C inkubiert wurden. Unter diesen Bedingungen wuchs der Wildtyp deutlich besser als die *ectT*-Mutante und die Wildtyp- und AKV2-Kultur, denen keine kompatiblen Solute bei Kälte exogen zugesetzt worden waren (Abb. 31AB; ■ ■). Ectoin und Hydroxyectoin zeigten gleich gute psychoprotektive Eigenschaften in *V. pantothenicus*. Die *ectT*-Mutante dagegen wuchs unter diesen Bedingungen so schlecht wie in SMM ohne zusätzliche kompatible Solute. Der Stamm AKV2 kann weder Ectoin noch Hydroxyectoin in Mengen aufnehmen, die einen ausreichenden Schutz vor Kälte bieten, da offensichtlich der wichtigste Transporter für die beiden kompatiblen Solute, EctT, nicht mehr funktionell in AKV2 exprimiert wird. Der deutlich kältesensitive Phänotyp der *ectT*-Mutante deutet darauf hin, dass EctT möglicherweise der einzige Transporter für Ectoin und Hydroxyectoin bei Kälte in *V. pantothenicus* ist. Wuchsen der Wildtyp und die *ectT*-Mutante in SMM ohne exogen zugesetzte Psychoprotektiva bei 15°C, so zeigten beide Stämme ein vergleichbares Wachstum (Abb. 31AB; ■ ■).



**Abb. 31 Die *ectT*-Mutante AKV2 wird nicht durch exogen zugeführte Tetrahydropyrimidine psychroprotektiert**

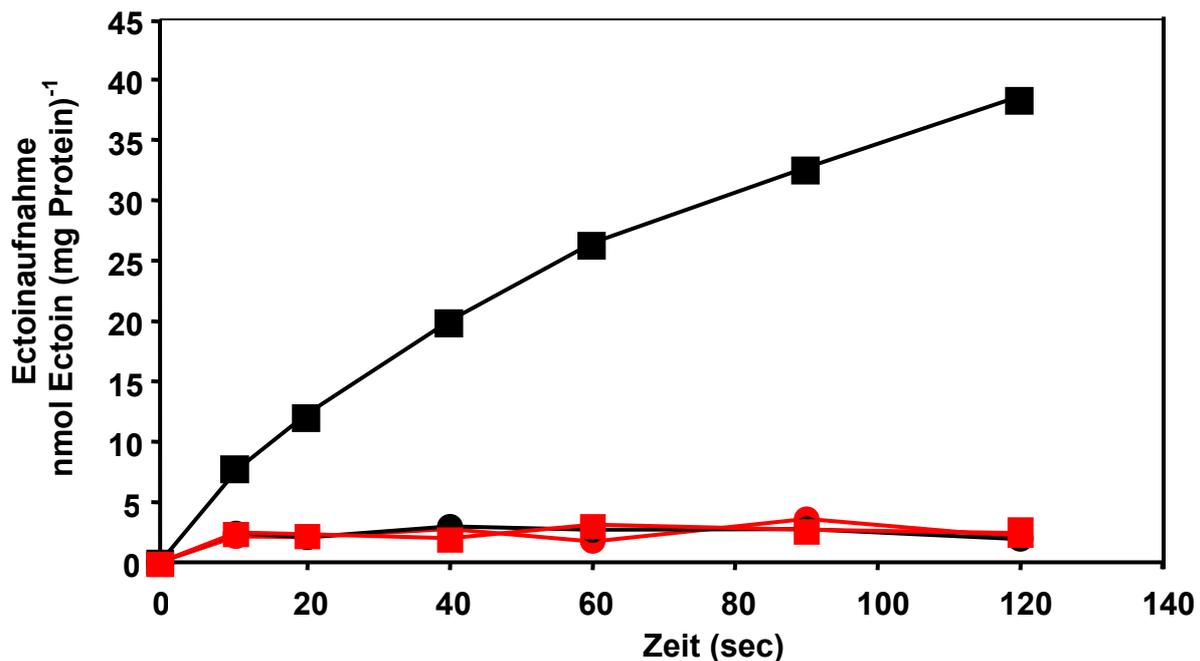
(A) *V. pantothenicus* Wildtyp Kulturen (■ ● ▲) und (B) Kulturen seines [*ectT::tet*1] Derivatstammes AKV2 (■ ● ▲) wurden mit einer OD<sub>578</sub> von 0,1 mit Kulturen beimpft, die in SMM bei 37°C bis zu OD<sub>578</sub> von 0,5 gewachsen waren. Die Kulturen wurden in SMM (■ ■) und SMM in Anwesenheit von 1 mM Ectoin (● ●) oder in Anwesenheit von 1 mM Hydroxyectoin (▲ ▲) bei 15°C wachsen gelassen.

### 11.3 EctT ist der einzige osmotisch stimulierte Ectointransporter in *V. pantothenicus*

Die Ergebnisse der Wachstumsexperimente mit der *ectT*-Mutante AKV2 zeigten, dass EctT vermutlich der einzige unter hochosmolaren Bedingungen aktive Transporter in *V. pantothenicus* ist (Abb. 30). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Ectoin im *V. pantothenicus* Wildtyp und in AKV2 [*ectT::tet*1] bestimmt.

Kulturen beider Stämme wuchsen in SMM ohne und mit 0,7 M NaCl, und zu Beginn der

exponentiellen Wachstumsphase wurde die Ectoinaufnahme bestimmt (Abb. 32). Es konnte ein osmotisch stimulierter Ectointransport im Wildtyp gemessen werden. Die *ectT*-Mutante war im Gegensatz dazu nicht mehr in der Lage Ectoin unter hochosmolaren Bedingungen aufzunehmen (Abb. 32). In dem osmotisch ungestressten Wildtyp und in AKV2 Kulturen konnte ebenfalls kein Ectointransport beobachtet werden (Abb. 32). EctT ist somit der einzige unter hochosmolarem Stress aktive Ectointransporter in *V. pantothenicus*. Darüber hinaus erfolgt keine Ectoinaufnahme unter isoosmolaren Bedingungen in diesem Bakterium.



**Abb. 32 EctT ist der einzige Ectointransporter unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus***

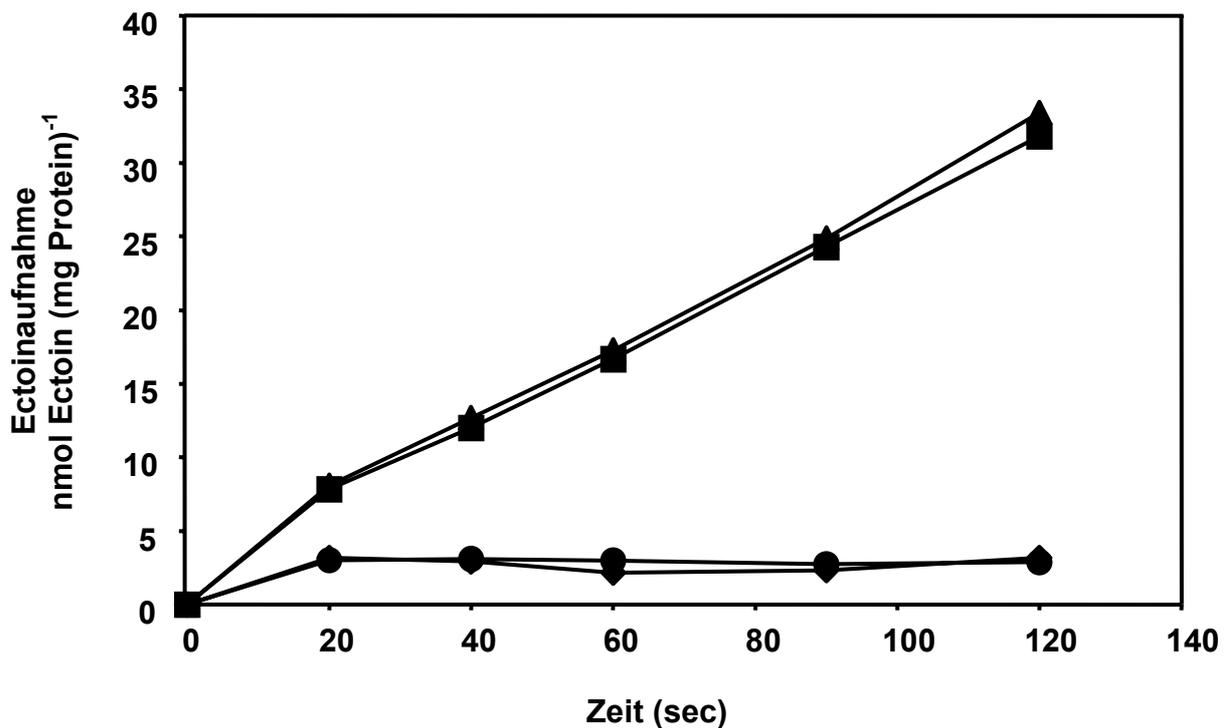
Die [<sup>14</sup>C]-Ectoinaufnahme wurde in *V. pantothenicus* Wildtyp (● ■) und in der *ectT*-Mutante AKV2 [*ectT::tet*1] (● ■) bei einer Substratkonzentration von 14 μM bestimmt. Die Kulturen wuchsen bis zur exponentiellen Wachstumsphase in SMM (● ●) bzw. SMM mit 0,4 M NaCl (■ ■) und wurden dann in den Transporttest eingesetzt.

#### 11.4 Die Stimulation der EctT-Transportaktivität ist ein echter osmotischer Effekt

In allen bisher geschilderten Versuchen wurde die Osmolalität des Mediums durch NaCl-Zugabe erhöht. Auf diese Weise ist die Ectoinaufnahme durch EctT zu stimulieren (Abb. 32). Um festzustellen, ob die Stimulation des Ectointransportes durch EctT in *V. pantothenicus* eine Anpassung an erhöhte Salz-Konzentrationen oder eine echte, osmotisch induzierte Antwort an eine erhöhte Osmolalität der Umwelt darstellt, wurde *V. pantothenicus* in SMM mit 0,4 M des ionischen Osmolyts NaCl oder der äquimolaren Konzentration der nicht-ionischen Osmolyte Saccharose und

Glycerin bis zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase wachsen gelassen. Die Ectoinaufnahme in diesen Kulturen wurde bestimmt (Abb. 33).

Es konnte eine identische Erhöhung der Transportaktivität in Kulturen, die mit NaCl oder Saccharose gewachsen waren, im Vergleich zur Kontrolle (SMM ohne weitere Zusätze) festgestellt werden. Die Stimulierung von EctT unter hypertonen Bedingungen ist demnach ein echter osmotischer Effekt. Die Glycerinzugabe induzierte die Ectoinaufnahme hingegen nicht (Abb. 33), da Glycerin durch die Zytoplasmamembran diffundiert und daher keinen osmotischen Gradienten über ihr aufbauen kann.



**Abb. 33 Die Aktivierung des Ectointransportes durch EctT ist ein echter osmotischer Effekt**

Dargestellt ist die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Ectoin bei einer Substratkonzentration von 14  $\mu$ M in *V. pantothenicus*. Die Osmolalität wurde auf 1100 mOsm durch Zugabe von 0,4 M NaCl (■), 670 mM Saccharose (▲) und 680 mM Glycerin (◆) erhöht. In der Kontrollkultur wurde die Osmolalität nicht erhöht (●).

### 11.5 Kinetische Parameter des EctT-vermittelten Ectointransportes unter hochosmolarem Stress

Um die kinetischen Parameter des durch EctT vermittelten Ectoin-Transportes unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus* zu bestimmen, wurde eine Wildtyp Kultur in SMM bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase angezogen und dann einem hyperosmotischen Schock durch 0,7 M NaCl ausgesetzt. 50 Minuten nach dem osmotischen Schock wurden die Transportraten bei verschiedenen Ectoinkonzentrationen (20 bis 400  $\mu$ M) bestimmt.

Die Daten wurden in der Hanes-Woolf-Auftragung dargestellt und die maximale Transportrate

$V_{\max}$  im Wildtyp unter hochosmolaren Bedingungen bestimmt (Abb. 6). Die  $V_{\max}$  für den Ectoitransport durch EctT betrug  $32 \pm 4$  nmol (min \* mg Protein)<sup>-1</sup>. Daher ermöglicht EctT eine schnelle Akkumulation von Ectoin im Zytoplasma von *V. pantothenicus* bei osmotischem Stress.  $K_m$ -Werte geben allgemein die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der aktiven Zentren von Transportproteinen mit Substrat besetzt sind, und stellen ein Maß für die Affinität der Proteine zu ihrem Substrat dar. Der  $K_m$ -Wert für den Ectoin-Transport durch EctT unter hochosmolaren Bedingungen wurde ebenfalls bestimmt und betrug  $5 \pm 0,6$   $\mu$ M Ectoin. Diese Daten demonstrieren, dass EctT unter hochosmolarem Stress in *V. pantothenicus* eine hochaffine Ectoinaufnahme ermöglicht.

### 11.6 Ectoinerflux unter hochosmolaren Bedingungen in der *ectT*-Mutante AKV2

Von *B. subtilis*, *Synechocystis* sp. und zahlreichen anderen Bakterien wird berichtet, dass das bei hoher Osmolalität endogen synthetisierte kompatible Solut an die Umgebung abgegeben wird (Mikkat *et al.* 1996; Hagemann *et al.* 1997; von Blohn *et al.* 1997). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob das im Vergleich zum Wildtyp unter hochosmolaren Bedingungen ohne exogenes Ectoin verringerte Wachstum der *ectT*-Mutante AKV2 (Abb. 30) auf einem Ectoinerflux beruht. Tatsächlich konnte im Kulturüberstand von *V. pantothenicus* Wildtyp, der bei 1 M NaCl für 24 Stunden im Minimalmedium gewachsen war,  $42 \pm 11$   $\mu$ M Ectoin und in der *ectT*-Mutante AKV2  $101 \pm 19$   $\mu$ M Ectoin detektiert werden. Aber auch der intrazelluläre Ectoinerhalt des *V. pantothenicus* Wildtyps und der *ectT*-Mutante war unter hochosmolaren Bedingungen unterschiedlich. Der Wildtyp akkumulierte im Minimalmedium mit 1 M NaCl  $151 \pm 28$   $\mu$ mol (g TZ)<sup>-1</sup> Ectoin und die *ectT*-Mutante  $88 \pm 21$   $\mu$ mol (g TZ)<sup>-1</sup> Ectoin.

Das von *V. pantothenicus* endogen unter hochosmolaren Bedingungen synthetisierte und teilweise an das Medium abgegebene Ectoin kann durch die Deletion von *ectT* nicht mehr in das Zytoplasma zurücktransportiert werden, was die hohe Ectoinkonzentration im Kulturüberstand und der geringere intrazelluläre Ectoinerhalt der *ectT*-Mutante belegen. Durch den verringerten intrazellulären Ectoinerhalt ist der optimale osmotische Schutz des Stammes AKV2 im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr gewährleistet. Ebenfalls muss AKV2 größere Ectoinmengen synthetisieren, um selbst die verringerte intrazelluläre Ectoinkonzentration aufrecht zu erhalten. AKV2 hat dadurch weniger Energie für das Wachstum unter osmotischem Stress zur Verfügung. Die geringeren intrazellulären Ectoinkonzentration sowie der höhere Energieaufwand für die verstärkte Ectoinbiosynthese sind für den Wachstumsnachteil von der *ectT*-Mutante AKV2 im Vergleich zum Wildtyp unter hochosmolaren Bedingungen verantwortlich.

## 12 Regulation von *ectT* unter hoher Osmolalität und bei Kälte

Die Ergebnisse der Wachstums- und Transportexperimente mit der *ectT*-Mutante haben gezeigt, dass EctT der einzige Ectointransporter unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus* ist (Abb. 30) (Abb. 32). Die molekularen Grundlagen, welche für die transkriptionelle Regulation von *ectT* in Abhängigkeit zur Osmolalität der Umwelt verantwortlich sind, wurden in dieser Arbeit detaillierter durch Northern Blot- und Primer Extension-Analysen untersucht.

Bremer und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die spezifische Anpassungsreaktion an hochosmolare Umweltbedingungen in *B. subtilis* eng mit der, vom alternativen Transkriptionsfaktor  $\sigma^B$ -abhängigen, generellen Stressantwort verbunden ist (von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter und Bremer 1998; Spiegelhalter 1999). Die osmotisch regulierte Expression von *opuD* und *opuE*, die beide Transporter für die Aufnahme kompatibler Solute unter hochosmolaren Bedingungen codieren, unterliegt einer dualen Kontrolle durch zwei Promotoren. Einer der Promotoren (P1) ist vom vegetativen Transkriptionsfaktor  $\sigma^A$ -abhängig, und der andere Promotor (P2) ist  $\sigma^B$ -abhängig. Diese Ergebnisse führten zur Überlegung, dass auch der *Bacillus*-Verwandte *V. pantothenicus* ein  $\sigma^B$ -Homolog besitzen könnte, das an der transkriptionellen Regulation des BCCT-Transporters EctT beteiligt ist.

### 12.1 Analyse des Startpunktes *ectT*-spezifischer mRNA in *V. pantothenicus*

Zunächst erfolgte eine visuelle Untersuchung der DNA-Region stromaufwärts von *ectT*. So sollten mögliche, den -10 und -35 Hexameren potentieller  $\sigma^A$ - und/oder  $\sigma^B$ -abhängige Promotoren aus *B. subtilis* ähnliche Sequenzen im *V. pantothenicus* Genom identifiziert werden. Diese erste Untersuchung zeigte einen potentiellen  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor stromaufwärts von *ectT*. Eine Erkennungssequenz für den vegetativen Transkriptionsfaktor  $\sigma^A$  aus *B. subtilis* wurde nicht gefunden. Um eine mögliche Abhängigkeit der transkriptionellen Induktion von *ectT* bei osmotischem Stress durch ein  $\sigma^B$ -Homolog in *V. pantothenicus* experimentell abzusichern, wurde eine Primer Extension-Analyse durchgeführt (Abb. 34). Für diese Primer Extension-Analyse wurde *V. pantothenicus* mit dem *E. coli*-*B. subtilis* Shuttleplasmid pAK14 transformiert. Kulturen dieses Stammes wurden in SMM bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase wachsen gelassen. Dann wurde eine Kultur für 10 Minuten einem hyperosmotischen Schock durch Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 0,7 M NaCl ausgesetzt, eine weitere Kultur wuchs für etwa 5 Stunden in SMM mit 0,4 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase. Da der Transkriptionsfaktor  $\sigma^B$  auch nach Ethanolstress die Transkription der Gene der generellen Stressproteine in *B. subtilis* induziert (Boylan *et al.* 1993), wurde einer dritten Kultur für 10 Minuten Ethanol (Endkonzentration 4 %) zugegeben.

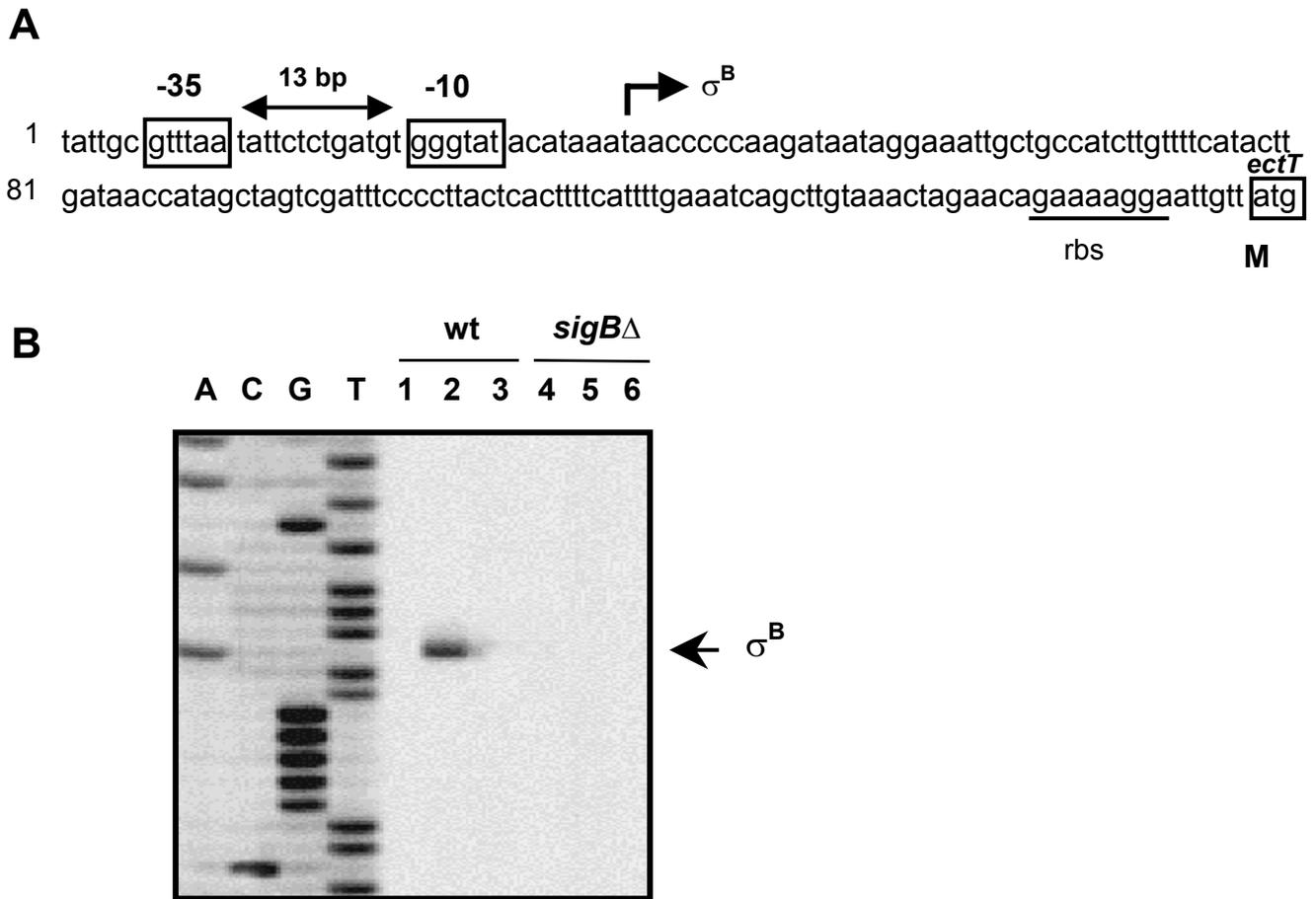


Allen Kulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, aus denen die Gesamt-RNA isoliert wurde. Das Transkript von *ectT* konnte nur in *V. pantothenicus* Zellen detektiert werden, die entweder einem hyperosmotischen (Abb. 34B Spur 2) oder Ethanolstress ausgesetzt worden waren (Abb. 34C Spur 2). Im Gegensatz dazu konnte kein *ectT*-Transkript in der *V. pantothenicus* Kultur, die bereits an hohe Osmolalität adaptiert war, nachgewiesen werden (Abb. 34B Spur 3). Die Identifikation des Transkriptionsstartpunktes, der sich 127 Nukleotide vor dem *ectT*-Startcodon befindet (Abb. 34A), offenbarte einen durch hyperosmotischen Schock und Ethanolstress stark stimulierbarer Promotor, der die Synthese des *ectT*-Transkriptes kontrolliert. Er war bereits durch visuelle Analyse der *ectT*-Promotorregion identifiziert worden war. Die Sequenz des potentiellen *ectT*-Promotors stimmt exakt mit der Konsensussequenz eines  $\sigma^B$ -abhängigen Promotors in *B. subtilis* übereinstimmt (Abb. 34A) (Abb. 48) (Tatti und Moran 1984). *V. pantothenicus* muss demnach ein Homolog des alternativen Transkriptionsfaktors  $\sigma^B$  aus *B. subtilis* besitzen, welches durch hyperosmotischen Schock und Ethanolstress induziert wird.

## 12.2 Analyse des Startpunktes *ectT*-spezifischer mRNA im heterologen System

Das Ergebnis der Primer Extension-Analyse des Transkriptionsstartes von *ectT* in *V. pantothenicus* forderte die Durchführung des gleichen Experimentes in *B. subtilis*, in dem die Regulation der generellen Stressanpassung durch  $\sigma^B$  eingehend untersucht ist (Price 2000; Hecker und Völker 2001) Mit dem *B. subtilis*-Stamm BLOB22 (*sigB* $\Delta$ 2::*cml*) stand darüber hinaus eine *sigB*-Mutante zur Verfügung. Es sollte untersucht werden, ob die Transkription von *ectT* in *B. subtilis* vom selben  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor wie in *V. pantothenicus* erfolgt oder ob andere Promotoren im heterologen System an der *ectT*-Transkription beteiligt sind (Abb. 35). Ebenfalls konnte auf diesem Weg ein weiterer Beweis für ein funktionell und strukturell verwandtes  $\sigma^B$ -Homolog in *V. pantothenicus* erbracht werden.

Für die Primer Extension-Analyse wurde Gesamt-RNA aus *B. subtilis* JH642 und BLOB22 Zellen isoliert, die jeweils das *E.coli-B.subtilis* Shuttleplasmid pAK14 in sich trugen. pAK14 ist ein Derivat des Plasmids pRB373, das die ersten 336 bp des *ectT*-Leserasters sowie weitere 450 bp stromaufwärts davon trägt. Die Kulturen beider Stämme wuchsen in SMM bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase und wurden einem moderaten hyperosmotischen Schock durch Zugabe von NaCl auf eine Endkonzentration von 0,4 M NaCl ausgesetzt. Vor und 10 Minuten nach dem osmotischen Schock wurden den Kulturen Proben für die Gesamt-RNA Präparation entnommen. Weitere Kulturen von JH642 und BLOB22 wuchsen für etwa fünf Stunden in SMM mit 0,4 M NaCl bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase. Die reverse Transkription *ectT*-spezifischer mRNA von dem Primer *ectTPE* aus ergab nur ein Transkript in den *B. subtilis* Wildtyp Zellen, die einem



**Abb. 35 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes *ectT*-spezifischer mRNA in heterologen Wirt *B. subtilis***

(A) DNA-Sequenz *ectT*-Promotorregion. Markiert sind die  $-35$  und  $-10$  Elemente eines  $\sigma^B$ -abhängigen Promotors, eine Ribosomenbindestelle sowie das Startcodon des *ectT*-Leserahmens. Der Pfeil kennzeichnet den Transkriptionsstartpunkt. (B) Gelelektrophoretische Analyse der Primer Extension-Produkte von Gesamt-RNA aus den *B. subtilis* Stämmen JH642 und BLOB22, die das *ectT*-Plasmid pAK14 trugen. Die Zellen wurden in SMM kultiviert (Spur 1) und einem hyperosmotischen Schock mit 0,4 M NaCl für 10, 30 und 60 Minuten ausgesetzt (Spuren 2, 3, 4). Zwei weitere Kulturen (5) waren für 5 h in SMM + 0,7 M NaCl gewachsen.

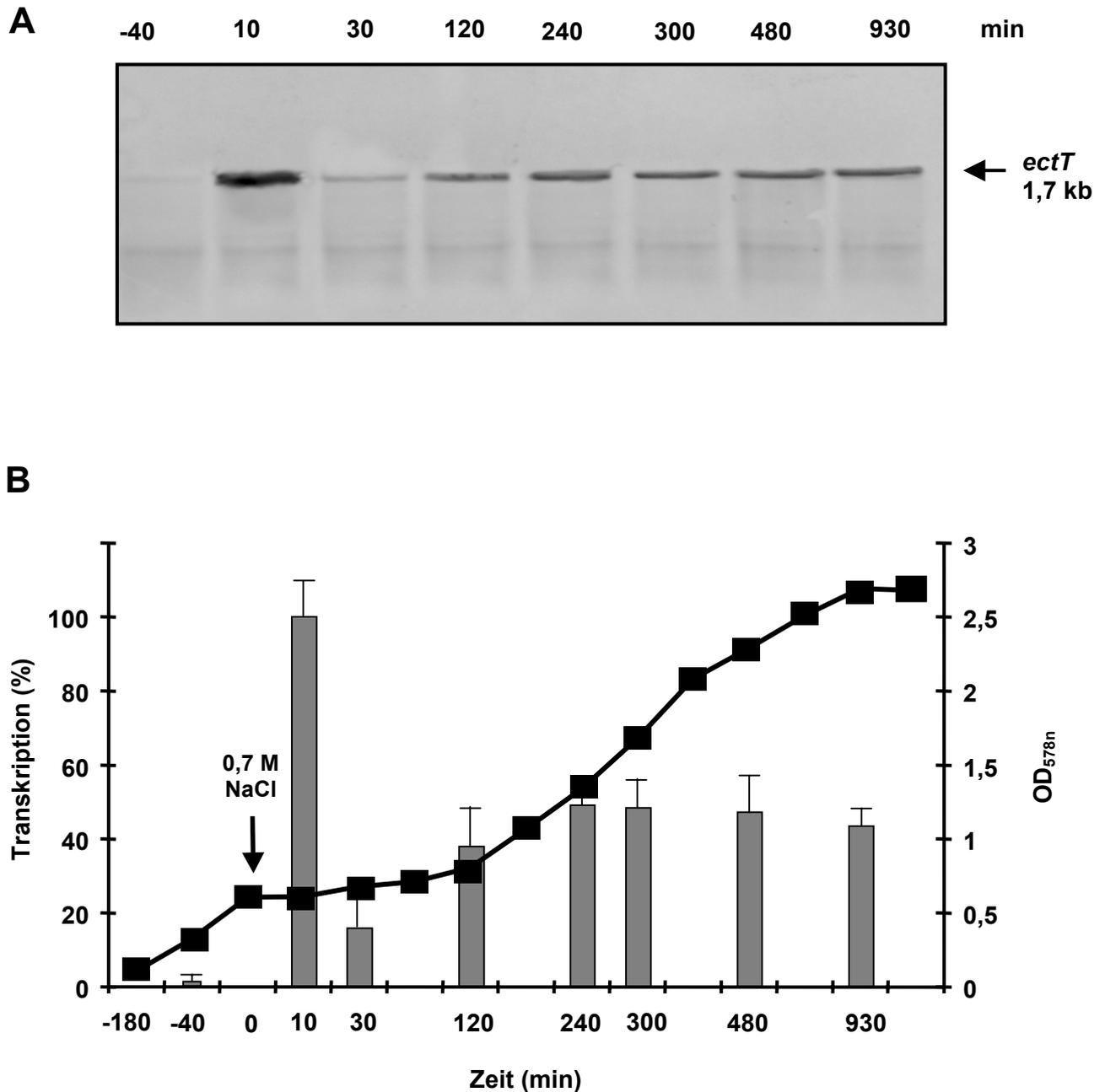
hyperosmotischen Schock ausgesetzt worden waren (Abb. 35B Spur 2), welches an der gleichen Position, wie in *V. pantothenicus* bereits nachgewiesen, 127 bp stromaufwärts des *ectT*-Startcodons begann (Abb. 35A). Die ausschließliche Abhängigkeit der *ectT*-Transkription von  $\sigma^B$  in *B. subtilis* wurde durch das Fehlen eines *ectT*-spezifischen Transkriptes im *sigB* $\Delta$ -Stamm BLOB22 belegt (Abb. 35B Spuren 4, 5, 6). In den JH642 und BLOB22 Kulturen, die an hochosmolare Bedingungen angepasst waren, konnte wie in *V. pantothenicus* kein *ectT*-Transkript detektiert werden (Abb. 35B Spuren 3 und 6). Diese Primer Extension-Analyse zeigte, dass die Transkription von *ectT* im heterologen Wirt *B. subtilis* allein von einem  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor erfolgt, der unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock stark induziert wird. Der zeitliche Verlauf der Transkriptionsinduktion nach dem osmotischen Schock entspricht der typischen transienten Induktion der Transkription eines

$\sigma^B$ -regulierten Gens in *B. subtilis* (Völker *et al.* 1994): 10 bis 30 Minuten nach dem hochosmolaren Schock ist die Induktion eines  $\sigma^B$ -kontrollierten Gens am stärksten und fällt dann auf ihr Basalniveau zurück. Diese Ergebnisse stimmen mit der Primer Extension-Analyse *ectT*-spezifischer Transkripte in *V. pantothenicus* überein (Abb. 34B), da auch in *B. subtilis* die transkriptionelle Induktion von *ectT* nach NaCl Stress allein von einem  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor kontrolliert wird. Weiterhin bestätigt dieses Experiment die Vermutung, dass *V. pantothenicus* einen durch osmotischen Stress aktivierbaren Transkriptionsfaktor besitzt, der vermutlich mit dem alternativen Transkriptionsfaktor  $\sigma^B$  aus *B. subtilis* verwandt ist.

### 12.3 Induktion der *ectT*-Transkription nach einem hyperosmolaren Schock

Durch die Primer Extension-Analyse konnte der potentielle Promotor für die *ectT*-Transkription bei hyperosmolaren Bedingungen identifiziert werden, aber die detektierten Transkripte stammten dominant vom einem Shuttle-Plasmid mit der *ectT*-Promotorregion. Um nur die Transkription von chromosomalem *ectT* ohne mögliche artifizielle Effekte, ihren zeitlichen Verlauf und die Größe des Transkripts nach einer plötzlichen Erhöhung der Osmolalität zu bestimmen, wurden eine Northern Blot-Analyse der *ectT*-Expression durchgeführt. *V. pantothenicus* Kulturen wurden bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase wachsen gelassen. Dann wurden die Kulturen durch Zugabe einer 5 M NaCl-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 0,7 M NaCl einem osmotischen Schock ausgesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Schock wurden Proben für die RNA-Präparation entnommen. Die Gesamt-RNA wurde präpariert und mit der DIG-markierten *ectT*-RNA-Sonde, die ein internes Fragment des Gens umfasste, hybridisiert (Abb. 36).

Diese Northern Blot-Analyse zeigte die unter hochosmolaren Bedingungen stimulierte transkriptionelle Expression von *ectT* mit einer Transkriptgröße von 1,7 kb (Abb. 36). Die Transkriptgröße entsprach der Größe des vollständigen *ectT* Genes mit dem identifizierten Promotorbereich (Kap. 5 Anhang). Bereits 10 Minuten nach dem osmotischen Schock konnte die Transkription von *ectT* detektiert werden, und zu diesem Zeitpunkt hatte die Transkriptionsinduktion ihr Maximum (Abb. 36). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Primer Extension-Analysen der durch hyperosmotischen Schock stimulierbaren *ectT* Transkription sowohl in *B. subtilis* als auch in *V. pantothenicus* und zeigen, direkt nach dem osmotischen Schock, das typische Induktionsmuster eines  $\sigma^B$ -abhängigen Gens in *B. subtilis*. Im Gegensatz zu  $\sigma^B$ -regulierten Genen in *B. subtilis* sank aber die Induktion von *ectT* 40 bis 60 Minuten nach dem hyperosmotischen Schock nicht wieder auf ihr Basalniveau ab, sondern entsprach auch 15,5 Stunden nach dem osmotischen Schock noch 40 % der maximalen Induktion (Abb. 36B). Diese transkriptionelle Induktion von *ectT* in Kulturen, die langzeitadaptiert an hochosmotische Bedingungen waren, konnte weder durch die Primer Extension-Analyse von *ectT* in *V. pantothenicus* noch in *B. subtilis* nachgewiesen werden. Eine Erklärung für



**Abb. 36 Bestimmung des *ectT*-Expressionsprofils nach einem hyperosmotischen Schock in *V. pantothenicus***

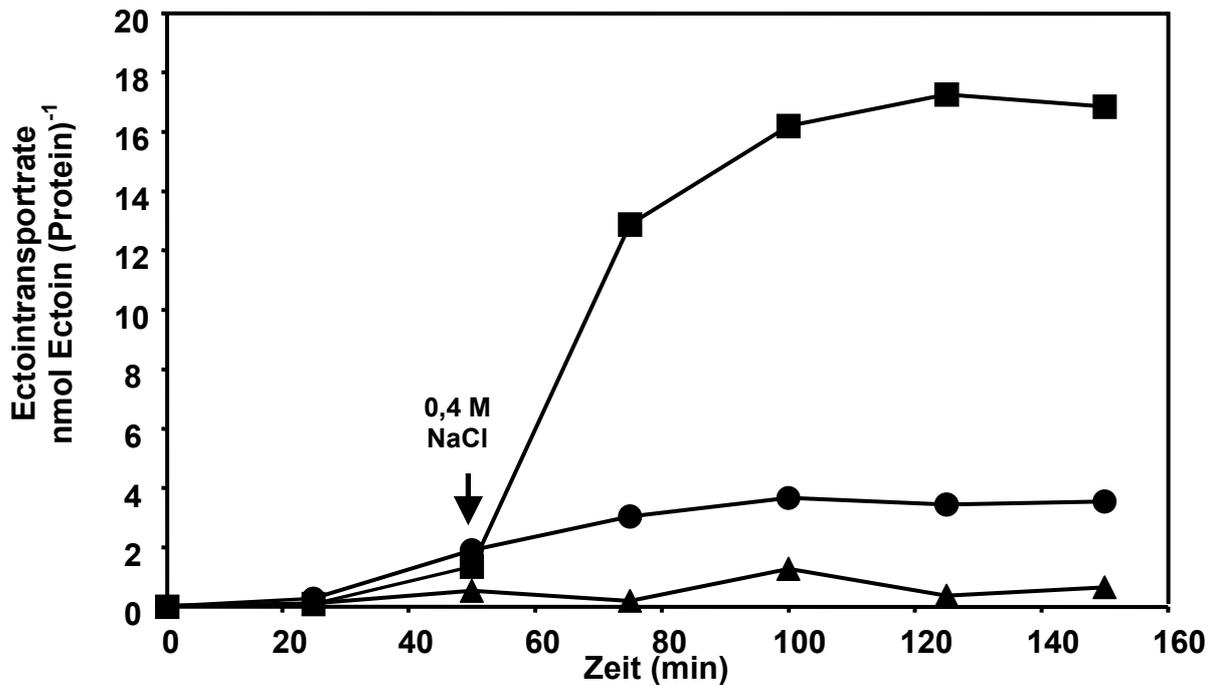
(A) Die Northern Blot-Analyse von *ectT* wurde mit Gesamt-RNA aus *V. pantothenicus* Kulturen durchgeführt, die einem osmotischen Schock von 0,7 M NaCl ausgesetzt worden waren. Vor und nach dem Schock wurden den Kulturen Proben entnommen, die Gesamt-RNA präpariert und diese mit einer *ectT*-spezifischen Sonde hybridisiert. (B) Die Abbildung zeigt das Induktionsprofil der *ectT*-Transkription. Die Stärke der Induktion ist in % angegeben, bezogen auf die maximal detektierte Transkription über den untersuchten Zeitraum. Die Zeiten der Probenahmen beziehen sich auf  $t_0$ , den Zeitpunkt des hyperosmotischen Schocks. Das Wachstum der Kultur wurde ebenfalls erfasst (■). Die Zeitskala gibt nicht mit den tatsächlichen Zeitabständen zwischen den einzelnen Messpunkten wieder. Es wurden drei unabhängige Northern Blot-Analysen durchgeführt ( $n_3$ ), die Transkriptionsstärke quantifiziert und die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

diese Beobachtung kann eine Destabilität von mRNA Transkripten des Shuttleplasmids sein. Es wurde in *B. subtilis* beobachtet, dass Transkripte in Primer Extension-Analysen mit Stämmen, die die zu untersuchende DNA-Region auf einem Shuttleplasmid trugen, nach kurzer Zeit nicht mehr nachzuweisen waren aber in Northern Blot-Analysen über einen langen Zeitraum detektiert werden konnten (Kempf, persönliche Mitteilung).

### 13 Posttranslationale Regulation von EctT bei hoher Osmolalität

Nachdem die transkriptionelle Induktion von *ectT* eingehend charakterisiert worden war, sollte darüber hinaus untersucht werden, ob der durch hochosmotische Bedingungen stimulierte Ectoin-Transport in *V. pantothenicus* zusätzlich auch auf der Aktivierung von bereits vorhandenen EctT-Transporterproteinen beruhte. In *B. subtilis* zeigte sich eine Addition beider Effekte bei dem Glycin Betain-Transporter OpuD (Kappes *et al.* 1996), hingegen wird die Stimulation des Prolin-Transportes von OpuE allein durch Proteinneusynthese vermittelt (von Blohn *et al.* 1997). Unterscheiden konnte man beide regulatorische Mechanismen durch den Vergleich der Transportraten von *V. pantothenicus* Kulturen, wobei in der einen Kultur die Proteinneusynthese durch Zugabe des Antibiotikums Chloramphenicol unterbunden wurde, während die andere Kultur in SMM ohne Chloramphenicol wuchs. Beide Kulturen wurden einem moderaten hyperosmotischen Schock durch die Zugabe von 0,4 M NaCl ausgesetzt, und zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem osmotischen Schock wurde die Ectoin-Transportrate durch Zugabe von [<sup>14</sup>C]-Ectoin in beiden Kulturen bestimmt (Abb. 37). In der mit dem Antibiotikum behandelten Kultur konnte nur noch die Aktivierung bereits vorhandener EctT-Transporterproteinen unter hochosmolaren Bedingungen gemessen werden, in der unbehandelten Kultur konnte die Summe aus der Aktivierung vorhandener EctT-Transporterproteinen und möglicher Proteinneusynthese gemessen werden.

Es zeigte sich, dass beide Wege der Aktivierung des Ectointransports durch EctT unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen sind in *V. pantothenicus* verwirklicht sind (Abb. 37). Die Steigerung der Ectointransportrate unter hochosmolaren Bedingungen setzte sich zu ungefähr 80 % aus EctT-Neusynthese und zu ungefähr 20 % aus der Aktivierung vorhandener EctT-Proteine zusammen (Abb. 37). Lediglich die Kontrollkultur, die nicht osmotisch geschockt wurde, zeigte keinen Ectointransport (Abb. 37). Die starke Abhängigkeit des Ectointransportes unter hochosmolaren Bedingungen von der EctT-Neusynthese steht im Einklang mit der starken transkriptionellen Regulation von *ectT* durch den  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor (Abb. 34). Auch die Northern Blot-Analyse zeigte eine starke Induktion der Transkription von *ectT* direkt nach einem hyperosmotischen Schock, die auch in Zellen, welche bereits an hochosmolare Bedingungen angepasst waren, in schwächerer Form erhalten blieb (Abb. 36).



**Abb. 37** Aktivierung des Ectointransportes unter hochosmolaren Bedingungen erfolgt durch Neusynthese und durch Aktivierung von vorhandenem EctT

Dargestellt sind die Ectointransportraten zu unterschiedlichen Zeitpunkten in *V. pantothenicus*. Eine Kultur dieses Bakteriums wurde bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert und dann in drei Kulturen aufgeteilt. Zum Zeitpunkt  $t_0$  wurde zu einer Kultur Chloramphenicol (Endkonzentration 100  $\mu\text{g/ml}$ ) gegeben (●). Zum Zeitpunkt  $t_{50}$  (Pfeil) wurden zwei Kulturen durch NaCl-Zugabe (Endkonzentration 0,4 M) osmotisch geschockt (■). Als Kontrolle wurde der dritten Kultur weder Chloramphenicol noch NaCl zugesetzt (▲).

## 14 Induktion der *ectT*-Transkription bei Kälte

Wachstumsexperimente bei Kälte in *V. pantothenicus* hatten gezeigt, dass dieses Bakterium in der Lage ist, auch unter diesen Umweltbedingungen exogen zugeführtes Ectoin und Hydroxyectoin durch Transport aus der Umwelt aufzunehmen und beide Solute als Psychroprotektiva zu nutzen (Abb. 25).

In *L. monocytogenes* wirken ebenfalls kompatible Solute wie Glycin Betain und Carnitin sowohl unter hochosmolaren Bedingungen als Osmoprotektiva als auch bei niedriger Wachstumstemperatur als Psychroprotektiva (Ko *et al.* 1994; Bayles und Wilkinson 2000). *L. monocytogenes* muss daher auch unter beiden Stressbedingungen Transportsysteme für die Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt besitzen. Das Glycin Betain Transportsystem Gbu ist sowohl am Glycin Betain Transport bei hoher Osmolalität als auch bei niedriger Temperatur in *L. monocytogenes* beteiligt (Gerhardt *et al.* 2000; Mendum und Smith 2002), aber die Grundlagen des kältestimulierten kompatiblen Soluttransportes in Mikroorganismen sind völlig ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die transkriptionelle Regulation der *ectT*-Expression bei niedriger Wachstumstemperatur in *V. pantothenicus* untersucht.

### 14.1 Primer Extension-Analyse von *ectT*-spezifischer mRNA bei Kälte

Es wurde eine Primer Extension-Analyse durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Transkription von *ectT* bei Kälte stattfindet und um mögliche Startpunkte *ectT*-spezifischer mRNA in *V. pantothenicus* bei Kälte zu identifizieren (Abb. 34).

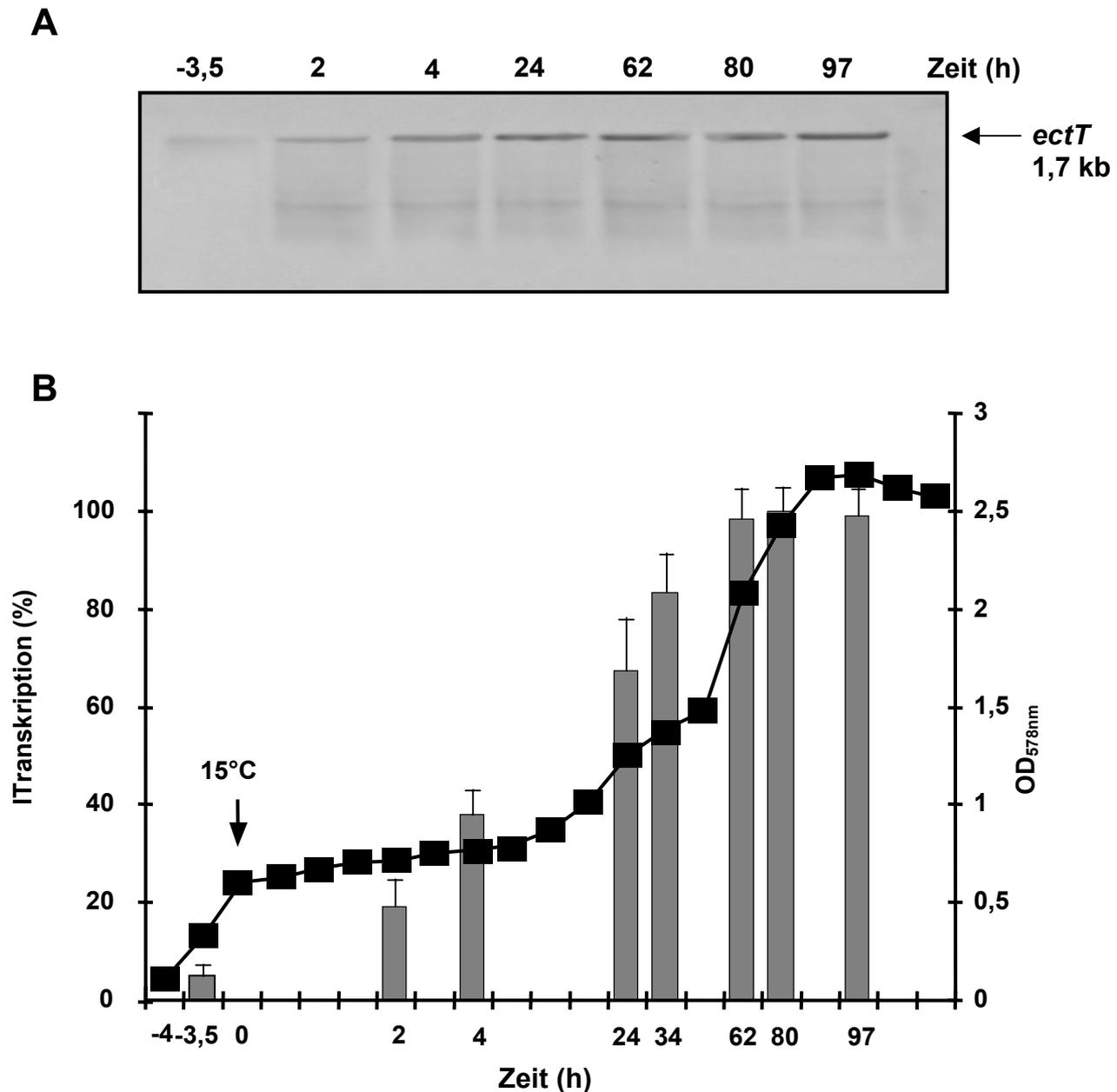
Die Kulturen wurden mit einer Vorkultur des *V. pantothenicus* Stammes mit dem Shuttleplasmid pAK14, die in SMM bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 gewachsen war, auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 beimpft, und eine der Kulturen wurde bei 37°C und die andere Kultur bei 15°C weiter inkubiert. Von beiden Kulturen wurden in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase Proben für die RNA-Präparation entnommen und die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Die reverse Transkription *ectT*-spezifischer mRNA erfolgte wiederum von dem Primer ectTPE aus und wies ein kälteinduziertes *ectT*-Transkript nach, das 127 bp vor dem *ectT*-Startcodon beginnt (Abb. 34D Spur 1). Bei 37°C erfolgte keine Transkription von *ectT* (Abb. 34D Spur 2). Daher kontrolliert derselbe potentielle  $\sigma^B$ -abhängige Promotor, der die *ectT*-Transkription unter hochosmolaren Bedingungen induziert (Abb. 34A), auch die temperaturabhängige Synthese des *ectT*-Transkriptes in *V. pantothenicus*.

Das  $\sigma^B$ -Homolog in *V. pantothenicus* muss neben der Induktion durch hyperosmotischen Stress und Ethanolstress auch durch Kältestress stimuliert werden und seinerseits die Transkription von *ectT* unter diesen Umwelteinflüssen aktivieren.

### 14.2 Induktion der *ectT*-Transkription durch Kälteschock

Die Induktion und der zeitliche Verlauf der *ectT*-Transkription nach einer plötzlichen Senkung der Wachstumstemperatur in *V. pantothenicus* wurde durch eine Northern Blot-Analyse untersucht. *V. pantothenicus* Kulturen wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase gezogen. Dann wurden die Kulturen durch Umsetzen zu 15 °C einem Kälteschock ausgesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Schock wurden Proben für die RNA-Präparation entnommen. Die Gesamt-RNA wurde präpariert, und wie oben beschrieben, mit der DIG-markierten *ectT*-RNA-Sonde hybridisiert (Abb. 38).

Diese Northern Blot-Analyse zeigte, dass die transkriptionelle Expression von *ectT* kältestimuliert ist, da nur nach dem Kälteschock ein *ectT*-Transkript in *V. pantothenicus* detektiert werden konnte. Die Größe des Transkriptes von 1,7 kb entsprach der Größe von *ectT* mit dem identifizierten Promotorbereich und hatte die gleiche Größe wie das osmotisch induzierte *ectT*-Transkript (Abb. 36A). Nach dem Kälteschock stoppten die Zellen das Wachstum und begannen erst



**Abb. 38 Bestimmung des Expressionsprofils von *ectT* in *V. pantothenicus* nach einem Kälteschock**

(A) Die Northern Blot-Analyse von *ectT* wurde mit Gesamt-RNA aus *V. pantothenicus* Kulturen durchgeführt, die einem Kälteschock von 22°C (Umsetzen der Kultur von 37°C zu 15°C) ausgesetzt worden waren. Vor und nach dem Schock wurden den Kulturen Proben entnommen, die Gesamt-RNA präpariert und diese mit der *ectT*-spezifischen Sonde hybridisiert. (B) Die Abbildung zeigt das Transkriptionsprofil für *ectT*. Die Stärke der Transkription ist in % angegeben, bezogen auf die maximal detektierte Induktion über den untersuchten Zeitraum. Die Zeiten der Probennahmen beziehen sich auf  $t_0$ , den Zeitpunkt des Kälteschocks. Das Wachstum der Kultur wurde ebenfalls erfasst (■). Die Zeitskala gibt nicht mit den tatsächlichen Zeitabständen zwischen den einzelnen Messpunkten wieder. Es wurden drei unabhängige Northern Blot-Analysen durchgeführt ( $n_3$ ), die Transkriptionsstärke quantifiziert und die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

nach 7 Stunden wieder mit einer geringeren Wachstumsrate zu wachsen (Abb. 25) (Abb. 38). Die Northern Blot-Analyse zeigte, dass die *ectT*-Transkription bereits 2 Stunden nach dem Kälteschock detektierbar war und mit erneutem Beginn des Wachstums zunahm. Die *ectT*-Transkription erreichte ihr Maximum ungefähr 60 Stunden nach dem Kälteschock (Abb. 38). Vergleicht man die transkriptionelle Induktion der *ectT* nach einem Kälteschock und nach einem hochosmolaren Schock, so unterscheiden sich die Induktionsmuster deutlich. Nach einem Kälteschock wird *ectT* nicht transient transkribiert, sondern die Transkription beginnt während der Anpassung der Zelle an die gesenkte Wachstumstemperatur und erreicht erst mit dem erneuten exponentiellen Wachstum der Kultur nach 120 Stunden ihr Maximum (Abb. 38B). Nach einem hyperosmotischen Schock wurde die maximale Induktion der *ectT*-Transkription bereits 10 Minuten nach der NaCl-Zugabe detektiert und fiel dann auf 40 % in osmotisch adaptierten Zellen ab (Abb. 36).

Die Transkription von *ectT* wird sowohl nach einem hyperosmotischen Schock als auch nach einem Kälteschock durch denselben  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor induziert (Abb. 34), die Transkriptionsinduktion durch beide Umweltstressfaktoren ist aber völlig unterschiedlich. Daher muss die Regulation des  $\sigma^B$ -Homologs in *V. pantothenicus* bei osmotischem Stress oder bei Kälte auf unterschiedliche Weise erfolgen.

## 15 Streptomyceten synthetisieren Ectoin und Hydroxyectoin

Die Arbeitsgruppe von A. Lapidot entdeckte 1988, dass das Bodenbakterium *Streptomyces parvulus* in der Lage ist, die Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin *de novo* zu synthetisieren. In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Vertreter dieses Genus in der Lage sind, die beiden Osmoprotektiva zu produzieren. Der Genus *Streptomycetaceae* gehört zur Gruppe der Actinomyceten, deren DNA einen hohen G + C-Gehalt (durchschnittlich 74 %) (Kieser *et al.* 2000) aufweist. Die Ordnung der Actinomycetales zeichnet sich darüber hinaus durch die Fähigkeit, zahlreiche niedermolekulare Sekundärmetabolite (u. a. Antibiotika) und extrazelluläre Enzyme zu produzieren, aus.

Im Zusammenhang mit der Tetrahydropyrimidinsynthese in *Streptomyces griseus* konnte beobachtet werden, dass die *de novo* Synthese der beiden kompatiblen Solute sowohl durch osmotischen als auch durch Hitzestress induziert werden konnte (Malin und Lapidot 1996). Die Beobachtung der Induktion der *de novo* Tetrahydropyrimidinsynthese durch Erhöhung der Wachstumstemperatur deutete auf eine weitere stressprotektive Funktion dieser kompatiblen Solute hin. Durch *in vitro* Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Ectoine in der Lage sind, verschiedene Enzyme vor Hitzedenaturierung zu schützen (Lippert und Galinski 1992).

Der Hydroxyectoinbiosyntheseweg und seine Regulation konnten bisher nicht aufgeklärt werden, obwohl die Hydroxyectoinsynthese in zahlreichen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien verbreitet ist. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Hydroxyectoinsynthese auch in einem *Bacillus*-Verwandten, *Sa. salexigens*, nachgewiesen werden (Kap. 1.3 Ergebnisse) (Abb. 10). *Sa. salexigens* ist vermutlich nur schwer genetisch manipulierbar ist. Datenbank-Analysen unter Verwendung des BLAST-Algorithmus hatten aber ein potentiell Ectoinsynthesegencluster in Genom von *Streptomyces coelicolor* A3(2) identifizierten. Daher wurde in diesem Actinomyceten untersucht, ob er, wie seine Verwandten *St. parvulus* und *St. griseus*, Ectoin und/oder Hydroxyectoin unter hochosmolaren Bedingungen und bei Hitzestress *de novo* synthetisieren kann. In diesem Bakterium, dessen Genomsequenz vollständig bekannt ist und das sowohl physiologisch als auch molekular gut charakterisiert ist, konnte die mögliche Hydroxyectoinsynthese eingehender untersucht werden als in *Sa. salexigens*.

### 15.1 *de novo* Tetrahydropyrimidinsynthese in *St. coelicolor*

Um zu untersuchen, ob Ectoin und Hydroxyectoin in *St. coelicolor* A3(2) unter hochosmolaren Bedingungen und bei Hitzestress synthetisiert werden, wurde das Bakterium in supplementiertem Minimalmedium (SM) bei seiner optimalen Wachstumstemperatur von 28°C und unter Hitzestress von 39°C ohne und mit NaCl (0,6 M) wachsen gelassen. Die *St. coelicolor* A3(2) Kulturen wurden mit einer Vorkultur (OD<sub>578</sub> von 2), die bei 28°C gewachsen war, auf OD<sub>578</sub> von 0,1 beimpft, das Wachstum der Kulturen wurde photometrisch bestimmt, und zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums wurden Proben für die HPLC-Analyse entnommen, um die Tetrahydropyrimidinkonzentrationen zu bestimmen (Abb. 39).

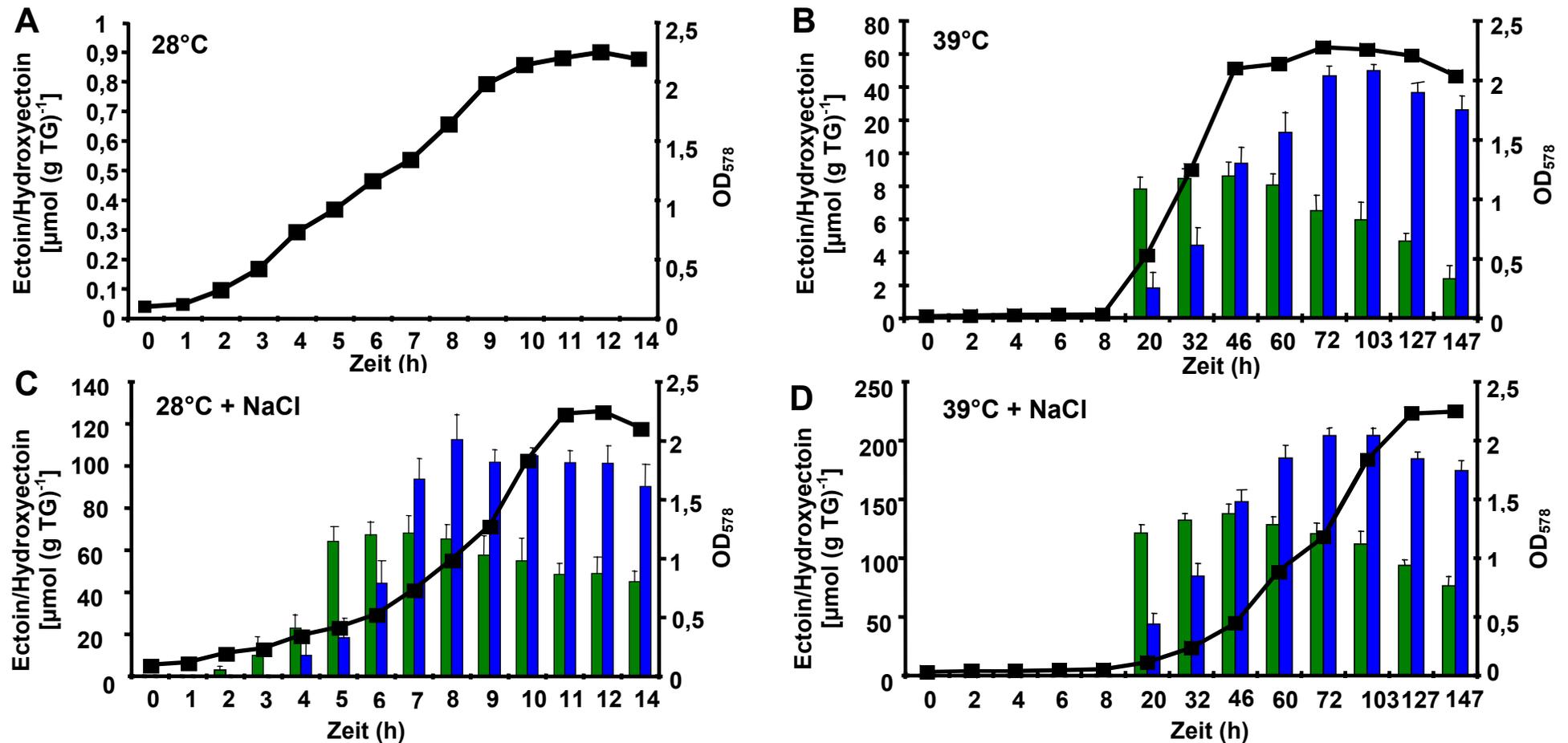
Es konnte festgestellt werden, dass die endogene Ectoin- und Hydroxyectoinproduktion in *St. coelicolor* A3(2) durch hochosmolare Bedingungen induziert wird, da die Tetrahydropyrimidinderivate in osmotisch gestressten Kulturen, die bei 28°C und 39°C gewachsen waren, nachgewiesen werden konnten (Abb. 39CD). In der Kultur, die bei 28°C ohne NaCl-Zugabe gewachsen war, wurden keine Tetrahydropyrimidine detektiert (Abb. 39A). Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass in *St. coelicolor* A3(2) die Tetrahydropyrimidinsynthese durch Hitzestress induziert wird. In der Kultur, die bei 39°C ohne NaCl-Zugabe gewachsen war, konnte die Synthese beider Tetrahydropyrimidine nachgewiesen werden (Abb. 39B). Ihre Konzentrationen erhöhten sich in 39°C-Kultur denen NaCl zugesetzt worden war um die gleichen Mengen, die in den Kulturen, die bei 28°C mit NaCl gewachsen waren, detektiert wurden (Abb. 39CD). Beide Stressbedingungen, hohe Osmolalität und Hitze, addieren sich in ihren induzierenden Effekten auf die Tetrahydropyrimidinsynthese. Schließlich zeigte dieses Experiment, dass die Synthese von Hydroxyectoin zusätzlich stationärphaseabhängig reguliert wird.

Sowohl in den Kulturen, die entweder hoher Osmolalität oder Hitze ausgesetzt waren, als auch in der Kultur, die der Kombination beider Stressfaktoren ausgesetzt worden war, nahm die Hydroxyectoinkonzentration deutlich in der stationären Wachstumsphase zu, während der Ectoingehalt sein Maximum in der späten exponentiellen Wachstumsphase erreichte und in der Stationärphase abnahm (Abb. 39BCD). Im exponentiellen Wachstum betrug das Ectoin/Hydroxyectoinverhältnis in Kulturen mit NaCl bei 28°C und 39°C 2:1, während sich in der Stationärphase das Ectoin/Hydroxyectoinverhältnis zu 1:2 umkehrte. Diese Beobachtungen stimmen mit den Daten der Ectoin- und Hydroxyectoinbiosynthese in *Sa. salicigena* überein: Auch in diesem Bakterium findet eine verstärkte Hydroxyectoinbiosynthese in der stationären Wachstumsphase statt (Abb. 10B). Eine noch deutlichere wachstumsphasenabhängige Änderung im Ectoin/Hydroxyectoinverhältnis wurde in der *St. coelicolor* Kultur, die bei 39°C ohne NaCl gewachsen war, festgestellt. Während des exponentiellen Wachstums lagen Ectoin und Hydroxyectoin im Verhältnis 2:1 vor, in der stationären Wachstumsphase änderte sich das Verhältnis zu 1:10 (Abb. 39B).

## 15.2 Eine Dioxygenase katalysiert die Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin in *St. coelicolor* A3(2)

Die Biosynthese des Tetrahydropyrimidines Ectoin konnte im Gram-negativen Bakterium *Halomonas elongata* durch Peters *et al.* 1993 aufgeklärt werden. Die hohen Sequenzidentitäten der an der Ectoinsynthese beteiligten Enzyme (Tab. 15) (Tab. 17) und die nahezu gleiche Organisation der Ectoinsynthesegene aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien legen den Schluss nahe, dass die Biosynthese dieses Osmolytes sehr ähnlich auch in entfernt verwandten Bakterien ablaufen könnte. Mit der Entdeckung von Hydroxyectoin im Streptomyceten *St. parvulus* 1988 stellte sich die Frage nach der Synthese dieses ebenfalls sehr potenten Osmoprotektivums (Inbar und Lapidot 1988). Es existieren zwei Modelle, die die Hydroxyectoinbiosynthese in Mikroorganismen beschreiben. Das erste Modell geht von der direkten Hydroxyectoinsynthese aus dem Vorläufer Ectoin durch eine Hydroxylase aus (Abb. 4) (Göller *et al.* 1998). Es scheint aber auch möglich, dass Hydroxyectoin aus dem Intermediat der Ectoinbiosynthese, N- $\gamma$ -Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure, synthetisiert wird ohne Beteiligung von Ectoin und dieser Syntheseweg zwei katalytische Schritte umfasst (Abb. 4) (Canovas *et al.* 1999). Keines dieser Modelle konnte bisher jedoch experimentell bestätigt werden.

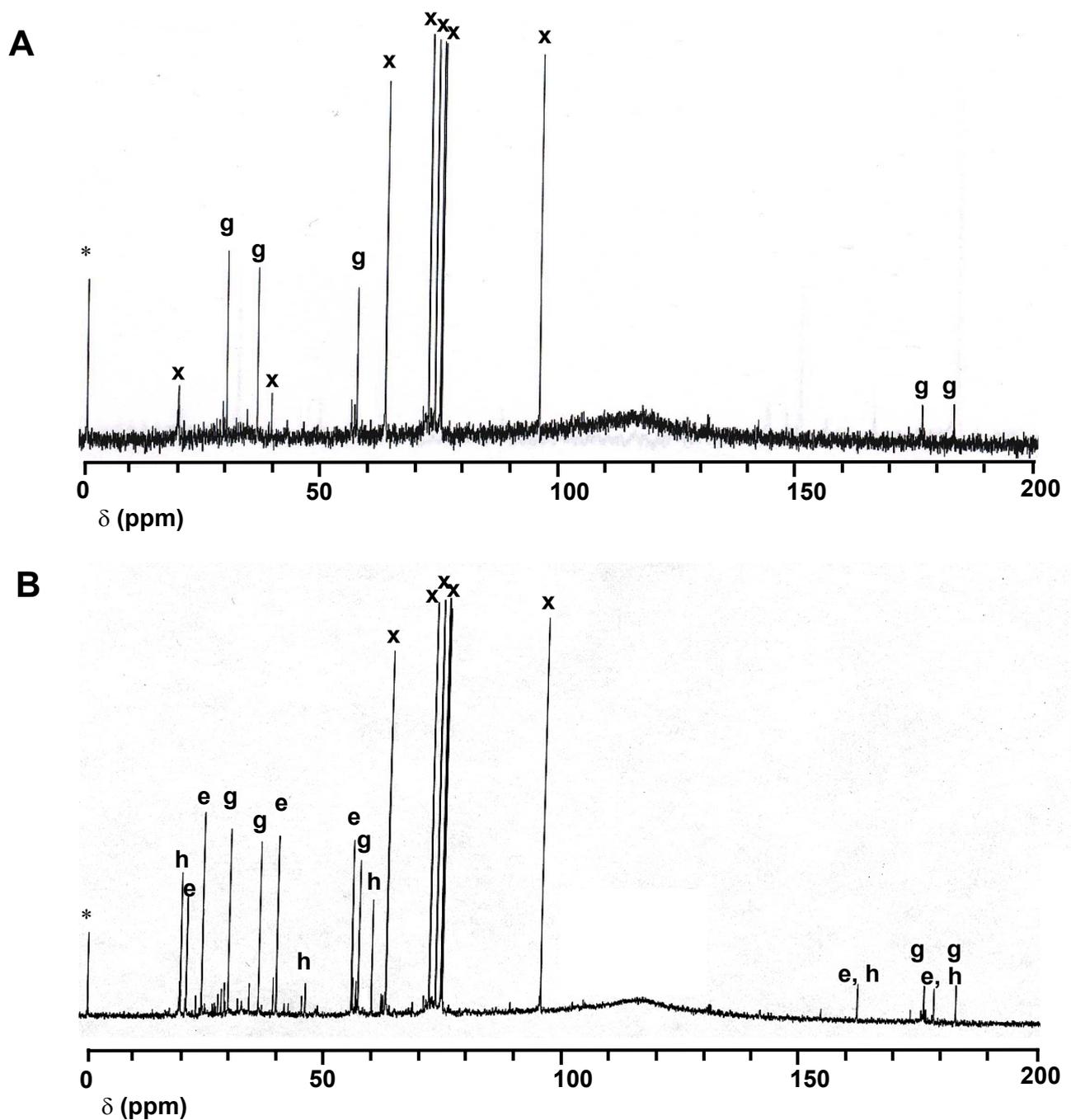
Durch Analyse des Genoms von *St. coelicolor* A3(2) bestand die Möglichkeit potentielle Gene, die an der Hydroxyectoinsynthese in Streptomyceten beteiligt sind, zu identifizieren. Datenbankbasierende Untersuchung der an die *ectABC*-Gene angrenzenden DNA-Regionen von *St. coelicolor* A3(2) konnte ein Leseraster (*orf4*) stromabwärts von *ectC* identifiziert werden, das Homologien zu einer L-Prolin-4-Hydroxylase aus dem Actinomyceten *Dactylosporangium sp.* (Sequenzidentität 28 %) aufwies (Abb. 40). Dieses Enzym gehört zur Klasse der  $\alpha$ -Ketoglutarat-



**Abb. 39** Die Ectoin- und Hydroxyectoin-Produktion in *St. coelicolor* A(3)2 wird von der Osmolalität, der Wachstumstemperatur und der Wachstumsphase kontrolliert

*St. coelicolor* A(3)2 wurde in SM bei 28°C (A + C) und 39°C (B + D) mit (C + D) und ohne (A + B) 0, 5 M NaCl wachsen gelassen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden den Kulturen Proben für die HPLC-Analyse entnommen. Die Ectoin- (■) und Hydroxyectoin-Konzentration (■) sind dargestellt. Die Zeitskala der X-Achse stimmt nicht mit den tatsächlichen zeitlichen Abständen zwischen den Messpunkten überein. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen ( $n_3$ ).





**Abb. 41**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren ethanolischer Zellextrakte von *B. subtilis*-Stamm AKB7

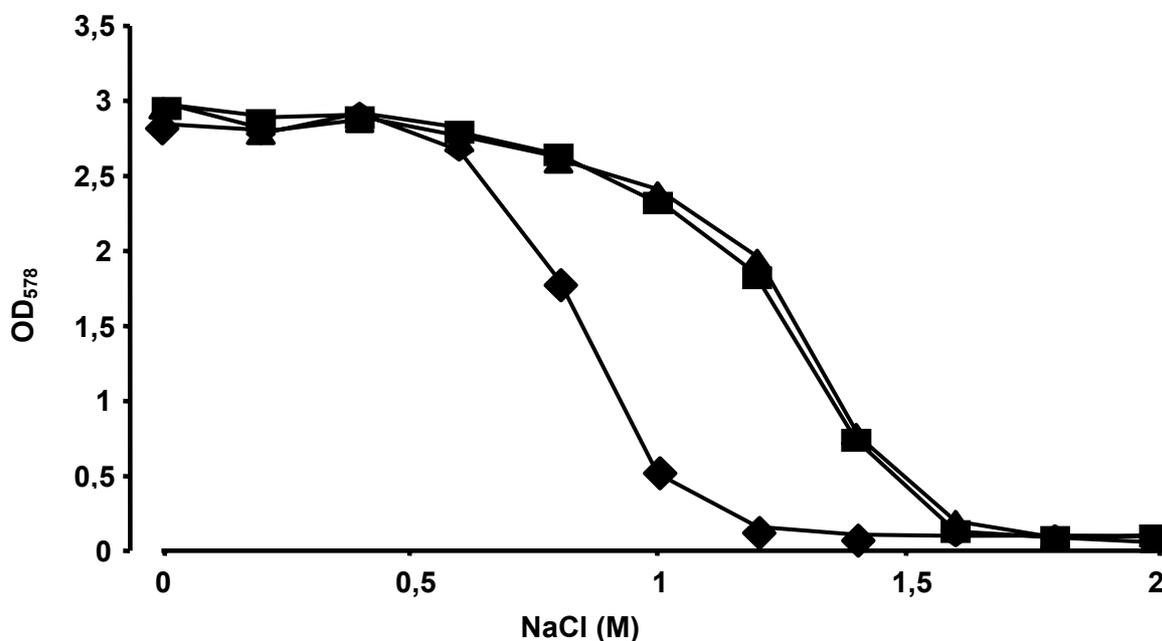
*B. subtilis* AKB7 [ $\Phi(yckH\text{-}kan\text{-}comS\text{-}P_{T5/N25}\text{-}ectABCD\text{-}ycxA)$  (*amyE'*-*cat*-*p*<sub>spac</sub>-*comS*-*lacI'*-*amyE*)] wuchs in LB-Medium. (A) in LB ohne 1 mM IPTG; (B) in LB mit 1 mM IPTG. Resonanzen von Glutamat (g), Ectoin (e), Hydroxyectoin (h), dem Standard  $D_4$ -3-(Trimethylsilyl)propionate (\*) und nicht identifizierbare Resonanzen (x) sind markiert. Die chemischen Verschiebungen [angegeben in ppm relativ zum Standard  $D_4$ -3-(Trimethylsilyl)propionate] sind für Glutamat 27,9; 34,6; 55,8; 175,3; 184,1, für Ectoin 19,6; 23,5; 38,3; 54,4; 161,9; 177,8 und für Hydroxyectoin 17,9; 42,6; 59,8; 160,5; 174,3.

In der AKB7 Kultur ohne IPTG konnte weder Ectoin noch Hydroxyectoin detektiert werden, aber in Gegenwart von IPTG erfolgte in AKB7 die gemeinsame Transkription der *ectABC*-Gene und des *orf4* aus *St. coelicolor* A3(2), vermittelt durch den T5 Phagen Promotor  $P_{N25}$ , da sowohl Ectoin als auch Hydroxyectoin produziert wurde (Abb. 41). Somit konnte gezeigt werden, dass die *ectABC*-Gene und

*orf4* aus *St. coelicolor* A3(2) ausreichen, um den nicht-Tetrahydropyrimidinproduzierer *B. subtilis* mit der Fähigkeit zur Synthese der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin auszustatten. Ein Promotor vor *ectA* ist ausreichend um alle vier Gene gemeinsam zur Expression zu bringen und lässt vermuten, dass *ectABC* und *orf4* als Operon in *St. coelicolor* A3(2) organisiert sind. *orf4* wurde im folgenden als *ectD* bezeichnet, das codierte Protein wurde EctD genannt. *ectD* codiert somit eine potentielle Dioxygenase, welche die direkte Umwandlung von Ectoin zu Hydroxyectoin in *St. coelicolor* A3(2) katalysiert.

## 16 Exogen zugeführtes Ectoin und Hydroxyectoin schützen *St. coelicolor* A3(2) bei hoher Osmolalität

Um festzustellen, ob vorgeformte Tetrahydropyrimidine *St. coelicolor* A3(2) einen Schutz vor hochosmolaren Bedingungen bieten, wurde *St. coelicolor* A3(2) in SM mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen ohne und mit 1 mM Ectoin oder 1 mM Hydroxyectoin bei 28°C wachsen gelassen (Abb. 42). Nach 24 Stunden wurde die optische Dichte der Kulturen photometrisch bestimmt. *St. coelicolor* A3(2) wurde in gleichem Maße unter hochosmolaren Bedingungen durch exogen vorhandenes Ectoin und Hydroxyectoin geschützt (Abb. 42). Die *St. coelicolor* A3(2) Kulturen, denen



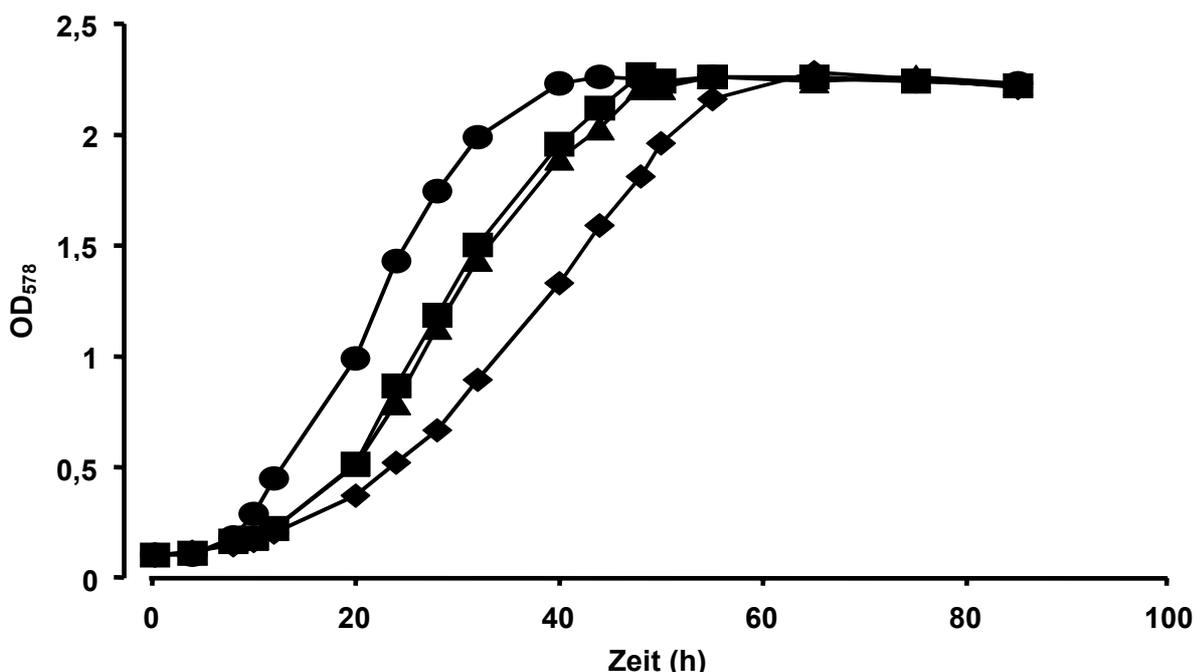
**Abb. 42 Ectoin und Hydroxyectoin schützen *St. coelicolor* A3(2) gegen die wachstumsinhibierenden Effekte hoher Osmolalität.**

Die Kulturen im Minimalmedium (SM) unterschiedlicher Osmolalität wurden mit einer OD<sub>578</sub> von 0,1 mit einer Übernachtskultur, die in SM ohne NaCl gewachsen war, beimpft. Die Kulturen wurden für 24 Stunden ohne (◆) oder mit 1 mM Ectoin (■) oder 1 mM Hydroxyectoin (▲) inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum jeder Kultur photometrisch bestimmt.

kein Osmoprotektivum im Medium zugesetzt worden war, hatten bei mehr als 0,6 M NaCl im Medium einen deutlichen Wachstumsnachteil (Abb. 42). Demnach muss das Bakterium Transportsysteme für die Aufnahme der kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin unter hochosmolaren Bedingungen besitzen.

## 17 Exogen zugeführtes Ectoin und Hydroxyectoin schützen *St. coelicolor* A3(2) bei hoher Temperatur

Da *St. coelicolor* in der Lage ist, bei Hitzestress Ectoin und Hydroxyectoin endogen zu synthetisieren, sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, ob auch exogen zugesetztes Ectoin und Hydroxyectoin thermoprotektive Eigenschaften für dieses Bakterium besitzen. *St. coelicolor* wurde in SM, SM mit 1 mM Ectoin bzw. 1 mM Hydroxyectoin und SM mit jeweils 0,5 mM Ectoin und Hydroxyectoin bei 39°C gezogen, und das Wachstum der Kulturen wurde verglichen.



**Abb. 43 Exogen zugeführtes Ectoin und Hydroxyectoin schützen *St. coelicolor* A3(2) bei Hitzestress**

*St. coelicolor* wurde mit einer  $OD_{578}$  von 0,1 mit einer Übernachtskultur beimpft, die in SM bei 28°C gewachsen war. Die Kulturen wuchsen in SM (◆), SM mit 1 mM Ectoin/Hydroxyectoin (●), SM mit 1 mM Ectoin (▲) und SM mit 1 mM Hydroxyectoin (■) bei 39°C. Das Wachstum der Kulturen wurde photometrisch bestimmt.

Die *St. coelicolor* Kultur, der die Mischung beider Osmoprotektiva zugesetzt worden war, zeigte das beste Wachstum der vier Kulturen bei 39°C (Abb. 43). Die *St. coelicolor* Kultur ohne Tetrahydropyrimidin wuchs am schlechtesten bei dieser Temperatur. Die Kulturen, denen entweder Ectoin oder Hydroxyectoin zugesetzt worden waren, wuchsen gleich gut und zeigten ein deutlich

besseres Wachstum als die Kultur, die kein Tetrahydropyrimidin enthielt, aber wuchsen schlechter als die Kultur, der die Ectoin/Hydroxyectoin Mischung zugesetzt worden war (Abb. 43). Diese Ergebnisse zeigen, dass *St. coelicolor* Transportsysteme besitzt, die sowohl unter osmotischem Stress (Kap. 16 Ergebnisse) wie auch unter Hitzestress die kompatiblen Solute Ectoin und Hydroxyectoin in die Zelle transportieren. Beide Solute wirken thermoprotektiv, aber nur eine Mischung beider verleiht dem Bakterium den besten Schutz bei hoher Temperatur.

## V. Diskussion

Die Osmolalität eines Habitats stellt einen entscheidenden abiotischen Faktor für das Überleben und das Wachstum von Mikroorganismen dar. Bakterien, die nicht in Biotopen konstanter Osmolalität leben, müssen sich aktiv die damit einhergehende wechselnde Wasserverfügbarkeit ihrer Umgebung adaptieren. Die Anpassungsmechanismen an Umweltbedingungen wechselnder Osmolalität wurden detailliert in dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* untersucht, welches in seinem natürlichen Habitat, den oberen Bodenschichten, starken Schwankungen der Wasserverfügbarkeit ausgesetzt ist (Miller und Wood 1996). *B. subtilis* und andere bodenbewohnende Mikroorganismen verändern aktiv die Osmolalität ihres Zytoplasmas, um den Turgor und so die Teilungsfähigkeit der Zelle aufrechtzuerhalten. Die Stressreaktionen von *Bacilli* in Anpassung an hochosmolare Umweltbedingungen bestehen einerseits in der Aufnahme spezieller organischer Solute wie Glycin Betain, Prolin und Ectoin durch hochaffine und osmotisch regulierte Transportsysteme (Kempf und Bremer 1998) und andererseits in der endogenen Synthese von kompatiblen Soluten bei Mangel an exogen verfügbaren osmotischen Schutzsubstanzen (Galinski und Trüper 1994; Bremer und Krämer 2000). Die beschriebenen zellulären Anpassungsmechanismen bei hoher Osmolalität sind in *B. subtilis* entweder Teil des Sigma B-kontrollierten generellen Stressregulons (von Blohn *et al.* 1997; Hecker und Völker 1998; Hecker und Völker 2001) oder spezifisch durch osmotischen Stress kontrolliert (Kempf und Bremer 1998; Bremer 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anpassung verschiedener *Bacillus* Spezies und nah verwandter Spezies an hochosmolare Wachstumsbedingungen durch *de novo* Osmolytsynthese untersucht. Es zeigte sich, dass die in dieser Gram-positiven Bakteriengruppe weitverbreitetsten, unter hochosmolaren Bedingungen *de novo* synthetisierten kompatiblen Solute Ectoin, Prolin und Glutamat sind. Die weitverbreitete Ectoinbiosynthese konnte detailliert auf physiologischer und molekularer Ebene in *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* analysiert werden. Die Synthese des kompatiblen Solut und Ectoinderivates Hydroxyectoin wurde in dem Gram-positiven, G+C-reichen Bodenbakterium *St. coelicolor* untersucht und das Gen einer potentiellen Dioxygenase identifiziert, die allein die Synthese von Hydroxyectoin aus Ectoin katalysiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *de novo* Ectoin- und Hydroxyectoinbiosynthese in Gram-positiven Bakterien nicht nur durch osmotischen Stress, sondern auch durch Kälte und Hitze induziert werden können und beide Solute als Stressprotektiva unter wachstumslimitierenden Temperaturen wirken. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Gen eines Ectoin- und Hydroxyectointransporters aus *V. pantothenicus* isoliert, der zur BCCT-Transporterfamilie gehört. EctT ist der einzige Ectoin- und Hydroxyectointransporter unter hochosmolaren Bedingungen und bei Kälte in *V. pantothenicus*. Die Expression von *ectT* wird ausschließlich durch einen Promotor reguliert, dessen Konsensussequenz

exakt mit der eines  $\sigma^B$ -abhängigen Promotors in *B. subtilis* übereinstimmt. Die Aktivität des potentiellen  $\sigma^B$ -Homologs in *V. pantothenicus* wird durch Kälte und hohe Osmolalität stimuliert, so dass unter diesen Umweltbedingungen die Expression von *ectT* induziert ist.

## 1 *de novo* Osmolytsynthese in *Bacilli* und verwandten Genera

Die Synthese kompatibler Solute in *Archaea* (Martin *et al.* 1999; Roberts 2000) und *Bacteria* (Galinski und Trüper 1994) ist ein hochkonservierter Mechanismus, um den Zellturgor unter hyperosmolaren Umweltbedingungen aufrechtzuerhalten.

Die in dieser Arbeit durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse untersuchten Spezies Gram-positiver Bakterien produzieren unter hochosmolaren Bedingungen die kompatible Solute Glutamat, Prolin oder Ectoin (Tab. 13) (Abb. 7) (Abb. 15) (Kap. 1 Anhang). Obwohl die Zahl der untersuchten Spezies limitiert ist, konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit, diese drei Osmolyte *de novo* zu synthetisieren weitverbreitet ist. Es existieren verschiedene Muster der Ectoin- und Prolinsynthese, da diese Osmoprotektiva entweder allein oder in Kombination synthetisiert werden können. Keine der untersuchten Spezies war in der Lage, Glycin Betain *de novo* durch die direkte Methylierung einfacher Kohlenstoffverbindungen zu synthetisieren, wie dies für extrem halophile Bakterien oder Archaeen gezeigt werden konnte (Lai und Gunsalus 1992; Nyysola *et al.* 2000).

Unter den dreizehn getesteten Bakterienspezies befinden sich fünf (*B. cereus*, *B. thuringensis*, *B. circulans*, *A. aneurinilyticus*, *P. polymyxa*), die weder Prolin noch Ectoin synthetisieren können, aber die Aminosäure Glutamat als dominantes Osmoprotektivum produzieren. In *B. cereus*, einem Vertreter dieser Bakteriengruppe, ist die Glutamatsynthese osmotisch stimuliert, wie die Zunahme der intrazelluläre Glutamatkonzentration bei einer Erhöhung der externen Osmolalität demonstriert (Abb. 9A). Glutamat wird als kompatibles Solut in *B. cereus* für die Langzeitanpassung an erhöhte Osmolalität genutzt und erfüllt somit nicht nur in der initialen Antwort auf hyperosmolare Bedingungen, wie für verschiedene Gram-negative Bakterien beschrieben (Csonka 1989), eine wichtige Funktion. Die Akkumulation von Glutamat, das kein typisches kompatibles Solut darstellt, weil es bei physiologischem pH als Anion vorliegt, wird unter hochosmolaren Bedingungen in Mikroorganismen durch die gleichzeitige Anhäufung des Gegenions Kalium limitiert (da Costa *et al.* 1998), das, wenn es in hohen Konzentrationen im Zytoplasma vorliegt, störend auf zahlreiche zelluläre Funktionen wirkt. Glutamat kann wegen seiner Netto-Ladung mit den polaren Regionen von Proteinen direkt interagieren und sorgt so nicht, wie zwitterionische kompatible Solute, für eine energetisch ungünstige Entropieabnahme, die Proteine in ihrer nativen Struktur stabilisiert. Der salzsensitive Phänotyp der fünf ausschließlich Glutamat-akkumulierenden Spezies resultieren einerseits aus den vergleichsweise geringen unter osmotischem Stress *de novo* synthetisierten

Glutamatkonzentrationen und andererseits aus den geringen osmoprotektiven Eigenschaften dieser Aminosäure. Es scheint, dass die Fähigkeit, Ectoin oder Prolin, die alle Charakteristika kompatibler Solute *sensu stricto* besitzen, zu synthetisieren, eine höhere Toleranz gegenüber hochosmolaren Wachstumsbedingungen vermittelt als die alleinige Synthese von Glutamat.

Drei der untersuchten Bakterienspezies (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*) synthetisieren ausschließlich Prolin unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen. Die in *B. subtilis* beobachtete osmotisch regulierte Prolinsynthese stimmt mit vorhergehenden Untersuchungen dieser *Bacillus* Spezies überein (Measures 1975; Whatmore *et al.* 1990). Die Prolinbiosynthese in Abhängigkeit von der Osmolalität des Mediums wurde in der vorliegenden Arbeit in *B. licheniformis* genauer untersucht, und es konnte festgestellt werden, dass der Prolingehalt der Zellen mit zunehmender NaCl-Konzentration des Mediums anstieg. Interessanterweise nahm die Glutamat-Konzentration mit steigender Osmolalität und steigender Prolin-Konzentration ab (Abb. 9B). Der starke Anstieg der Prolinbiosynthese unter hochosmolaren Bedingungen ist vermutlich für die Abnahme der Glutamat-Konzentration verantwortlich, da Glutamat als Vorläufermolekül der Prolinsynthese von vielen Mikroorganismen genutzt wird.

Eine verstärkte Prolinbiosynthese unter hochosmolaren Bedingungen konnte auch in Mikroorganismen wie *C. glutamicum* (Guillouet und Engasser 1995) und *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara *et al.* 1989) nachgewiesen werden. In *L. monocytogenes* konnte von Sleator *et al.* 2001 gezeigt werden, dass eine Zerstörung des *proBA*-Locus zu einem prolinauxotrophen und salzsensitiven Phänotyp führte. Die endogene Prolinsynthese scheint auch diesem Bakterium einen Schutz unter hochosmolaren Bedingungen zu bieten. Die molekularen Grundlagen der Regulation der Prolinbiosynthese in Anpassung an anabole Bedürfnisse und die Osmolalität des umgebenden Mediums wurden in den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* detailliert untersucht (Smith *et al.* 1984; Leisinger 1996; Belitsky *et al.* 2001). In zahlreichen Bakterien unterliegt die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke einer Endproduktthemmung (Leisinger 1996; Sleator *et al.* 2001c). Die *proB*-codierte  $\gamma$ -Glutamylkinase, das erste Enzym der Prolinbiosynthese, wird in *E. coli* und *L. monocytogenes* durch diese Regulation kontrolliert und schon durch geringe Prolinkonzentrationen inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch einer Aminosäure in ProB den allosterischen Effekt der Inhibition durch Prolin in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien aufheben kann (Le Rudulier *et al.* 1982; Dandekar und Uratsu 1988; Sleator *et al.* 2001c). Da unter hochosmolaren Bedingungen aber hohe Prolinkonzentrationen in den untersuchten *Bacillus* Spezies vorliegen, muss eine andere Regulation der Prolinbiosynthese stattfinden oder ein zweiter nicht endprodukt inhibierter Prolinbiosyntheseweg unter hypertonen Bedingungen aktiv sein. Die osmotisch stimulierte Prolinakkumulation in *B. subtilis* wurde schon vor längerer Zeit beobachtet (Measures 1975; Whatmore *et al.* 1990), aber erst kürzlich konnten die molekularen Details dieser osmotisch stimulierten Prolinbiosynthese in *B. subtilis* aufgeklärt werden (Brill und Bremer 2002). Es wurde ein zweiter Prolinbiosyntheseweg, der vermutlich nicht feedback inhibiert ist, neben dem für

anabole Zwecke identifiziert (Brill und Bremer 2002). Zwei Isoenzyme, ProH ( $\Delta^1$ -Pyrrolin-5-carboxylreduktase) und ProJ ( $\gamma$ -Glutamylkinase), ersetzen unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen, die unter isoosmotischen Bedingungen aktiven Proteine ProB, ProG und ProI des anabolen Prolinbiosyntheseweges. Beide Biosynthesewege sind über ProA ( $\gamma$ -Glutamylphosphatreduktase), das an beiden Synthesewegen beteiligt ist, miteinander verbunden (Brill und Bremer 2002). *B. subtilis* nutzt für die anabole und die hochosmolare Prolinbiosynthese ähnliche Enzyme, aber beide Synthesewege unterscheiden sich entsprechend der physiologischen Funktion in ihrer Regulation. Es scheint möglich, dass auch die mit *B. subtilis* nah verwandten Spezies *B. licheniformis* und *B. megaterium* einen zweiten, hochosmolar induzierten Prolinbiosyntheseweg neben dem Syntheseweg für anabole Zwecke besitzen.

Fünf (*S. psychrophila*, *S. pasteurii*, *B. alcalophilus*, *V. pantothenicus*, *Sa. salexigens*) der dreizehn analysierten Bakterien sind in der Lage, das Aminosäurederivat Ectoin allein oder in Kombination mit anderen Osmoprotektiva endogen unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen zu produzieren (Tab. 13). Zusätzlich zu den in dieser Arbeit untersuchten *Bacilli* konnten in *Bacillus halophilus*, *Bacillus haloalcalophilus* und in zwei *Bacillus* Spezies ungeklärter taxonomischer Position (Galinski und Trüper 1994; Ventosa *et al.* 1998b) endogene Ectoinbiosynthese unter hochosmolaren Bedingungen nachgewiesen werden. Weiterführende Analysen der *de novo* synthetisierten Osmoprotektiva in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien haben gezeigt, dass Ectoin ein weitverbreitetes kompatibles Solut in aeroben chemoheterotrophen Bakterien ist (Galinski 1995; da Costa *et al.* 1998). Dennoch war über die Regulation der Ectoinsynthese auf molekularer und physiologischer Ebene nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal in einem Bakterium die gemeinsame endogene Synthese der Osmoprotektiva Prolin und Ectoin beobachtet werden (Tab. 13) (Abb. 9D) (Abb. 15). In *V. pantothenicus* erfolgt die Synthese beider Osmoprotektiva in Abhängigkeit zur Osmolalität des Mediums: Während bei niedriger Osmolalität Prolin das dominante Osmoprotektivum ist, wird Ectoin bei hoher Osmolalität verstärkt synthetisiert (Abb. 9D). Die unter hochosmolaren Bedingungen stimulierte Prolinbiosynthese in *V. pantothenicus* wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht, aber es ist möglich, dass auch *V. pantothenicus*, wie der nah verwandte *B. subtilis*, zwei Prolinbiosynthesewege besitzt, von denen einer anabolen Zwecken dient und der andere unter hochosmolaren Bedingungen aktiv ist. Die regulatorischen Grundlagen des osmotisch induzierten Wechsels zwischen Prolin- und Ectoinbiosynthese in *V. pantothenicus* sind unklar, könnten aber auf speziellen Unterschieden der osmoprotektiven Eigenschaften beider kompatiblen Solute und der Energiebilanzen ihrer Synthesen beruhen. Einen ähnlichen Wechsel zwischen den dominant produzierten Osmoprotektiva in Abhängigkeit zur NaCl-Konzentration der Umgebung zeigt das thermophile Archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus* (Ciulla *et al.* 1994; Martin *et al.* 2000). Es produziert  $\beta$ -Glutamat und  $\alpha$ -Glutamat als dominante Osmoprotektiva in Medium, das weniger als 1 M NaCl enthält. Erhöht sich die Osmolalität des Mediums auf mehr als 1 M NaCl, wird Acetyl- $\beta$ -Lysin

das vorherrschende endogen synthetisierte kompatible Solut (Martin *et al.* 2000). Auch in diesem Mikroorganismus sind die molekularen Grundlagen des Wechsels zwischen den dominant synthetisierten Osmoprotektiva unklar.

*Sa. salexigens* ist die einzige bekannte *Bacillus*-verwandte Spezies, die neben Ectoin auch Hydroxyectoin *de novo* unter hochosmolaren Bedingungen synthetisiert (Tab. 13) (Abb. 10). In *Sa. salexigens* findet eine verstärkte Hydroxyectoinsynthese in der stationären Wachstumsphase unter hochosmolaren Bedingungen statt (Abb. 10B): Während die Konzentration des dominanten Osmolytes der exponentiellen Wachstumsphase Ectoin abnimmt, bis schließlich Hydroxyectoin das dominante Osmoprotektivum der Stationärphase ist. Der Actinomycet *St. coelicolor* (Abb. 39) und das Gram-positive Bakterium *M. halophilus* zeigen auch diesen wachstumsphaseabhängigen Wechsel zwischen Ectoin- und Hydroxyectoinproduktion unter hochosmolaren Bedingungen (Galinski und Louis 1999). Es konnten zwei unterschiedliche regulatorische Muster der Osmolytsynthese in *Sa. salexigens*, *St. coelicolor* und *V. pantothenicus*, die alle zwei Osmoprotektiva *de novo* synthetisieren, identifiziert werden. Während die Prolin- und Ectoinproduktion in *V. pantothenicus* allein von der externen Osmolalität abhängig ist, bestimmt bei *Sa. salexigens* und *St. coelicolor* die externe Osmolalität die Menge der synthetisierten Tetrahydropyrimidine, das Konzentrationsverhältnis beider Solute zueinander wird aber durch Wachstumsphase der Kultur kontrolliert.

## 1.1 Die Ectoinbiosynthese ist hochkonserviert und weit verbreitet in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

Del Moral *et al.* stellten 1994 die Vermutung an, dass die Analyse endogen synthetisierter Osmoprotektiva Aufschluss über die phylogenetische Verwandtschaft von Bakterienspezies geben könnte. Um diese Theorie zu prüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Stammbaum, basierend auf den Sequenzen der 16S rRNA Genen der Gram-positiven Bakterien, die auf die endogen unter hochosmolaren Bedingungen synthetisierten Osmoprotektiva untersucht worden waren, erstellt (Abb. 8). Eine erste Analyse der Verwandtschaft und der synthetisierten Osmoprotektiva ergab, dass die phylogenetisch nah verwandten Bakterienspezies auch gleichen Osmoprotektiva unter hochosmolaren Bedingungen synthetisierten.

Eine weiterführende Analyse der endogen produzierten organischen Osmolyte einer größeren Zahl moderat halophiler und halotoleranter *Bacilli* und Spezies verwandter Genera, die aus Salzseen, Salinen, hypersalinen und moderat salinen Böden isoliert worden waren (Arahal und Ventosa 2001), ergab, dass die Ectoin- und Hydroxyectoinbiosynthese in den untersuchten Spezies unter hochosmolaren Bedingungen weit verbreitet und unabhängig vom phylogenetischen Verwandtschaftsgrad ist (Nathalie Pica, pers. Mitteilung). Vermutlich stellt die Synthese eines spezifischen kompatiblen Solutes eine evolutionäre Anpassung an den jeweiligen Lebensraum der

Spezies dar und ist somit nur beschränkt ein Kennzeichen phylogenetischer Verwandtschaft. Aus diesen weiterführenden Untersuchungen kann geschlossen werden, dass Ectoin und Hydroxyectoin die dominant *de novo* produzierten Osmoprotektiva in *Bacilli* und verwandten Spezies aus Habitaten mit erhöhtem Salzgehalt sind. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen der dominant endogen produzierten kompatiblen Solute moderat halophiler Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien überein, die zeigten, dass Ectoin und Hydroxyectoin die weiterbreitesten *de novo* produzierten Osmoprotektiva in dieser taxonomisch heterologen Bakteriengruppe sind (Severin *et al.* 1992; Galinski und Trüper 1994).

Ectoin wurde 1985 in dem extrem halophilen phototrophen Schwefelbakterium *Ectothiorhodospira halochloris* entdeckt (Galinski *et al.* 1985). Obwohl es zunächst als Osmoprotektivum mit geringer Verbreitung angesehen wurde, zeigten verbesserte HPLC- und <sup>13</sup>C-NMR-Analysemethoden, dass Ectoin in zahlreichen taxonomisch und physiologisch verschiedenen Bakterienspezies *de novo* synthetisiert wird (Galinski und Trüper 1994). Im Gegensatz dazu konnte Ectoin weder in *Archaea* noch in *Eukarya* nachgewiesen werden. Es wurde aber festgestellt, dass Ectoin Tabakzellen eine erhöhte Toleranz gegenüber hochosmolaren Bedingungen verleiht, wenn die Ectoinbiosynthesegene (*ectABC*) aus *H. elongata* OUT30018 in den Pflanzenzellen heterolog zur Expression gebracht worden waren (Nakayama *et al.* 2000). Ectoin wirkt demnach auch in komplexeren Zelltypen osmoprotektiv.

Physiologische Untersuchungen (Peters *et al.* 1990) hatten gezeigt, dass drei potentielle Enzyme (EctABC) an der Ectoinsynthese beteiligt sind und die codierenden Gene (*ectABC*) als Cluster organisiert in den Genomen des Gram-positiven Bakteriums *M. halophilus* (Louis und Galinski 1997) und der Gram-negativen Bakterien *H. elongata* (Göller *et al.* 1998) und *Ch. salexigens* (Canovas *et al.* 1997) vorlagen. Ono *et al.* konnten 1999 die Ectoinbiosyntheseenzyme aus *H. elongata* reinigen und biochemisch charakterisieren. Die Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Ectoinbiosynthesegene aus *S. pasteurii* und *V. pantothenicus*, die in dieser Arbeit isoliert wurden (Kap. 3 und Kap. 4 Anhang), ergaben hohe Sequenzidentitäten dieser potentiellen Proteine mit den bereits charakterisierten Ectoinsyntheseenzymen aus *H. elongata* und weiteren potentiellen Ectoinsyntheseenzymen sowohl aus Gram-negativen als auch aus Gram-positiven Bakterien (Tab. 15) (Tab. 17). Vermutlich nutzen ectoinsynthetisierende *Bacilli* den gleichen Syntheseweg für die Produktion dieses Tetrahydropyrimidins unter hochosmolaren Bedingungen. Die Ectoinbiosynthese ist sowohl in den beteiligten Enzymen als auch in der genetischen Organisation der *ectABC*-Gene hoch konserviert. Kürzliche Datenbank-Analysen zeigten weitere Ectoinbiosynthesegencluster in dem haloalkalophilen *B. halodurans*, dem pathogen Bakterium *V. cholerae* und dem Bodenbakterium *St. coelicolor* (Tab. 15). Die Ectoinproduktion in *B. halodurans* konnte durch <sup>13</sup>C NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden (N. Pica, pers. Mitteilung), und auch in *St. coelicolor* konnte die Ectoinproduktion durch HPLC-Analysen bestätigt werden (Abb. 39).

Bisher konnten in keinem Bakterium Enzyme identifiziert werden, die am Abbau von Tetrahydropyrimidinen beteiligt sind. Für *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* konnte gezeigt werden, dass sowohl Ectoin als auch Hydroxyectoin metabolisch inert sind und unter den untersuchten Bedingungen weder als Kohlenstoff- noch als Stickstoffquelle dienen. *H. elongata* hingegen ist in der Lage, Ectoin und Hydroxyectoin als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Göller *et al.* 1998).

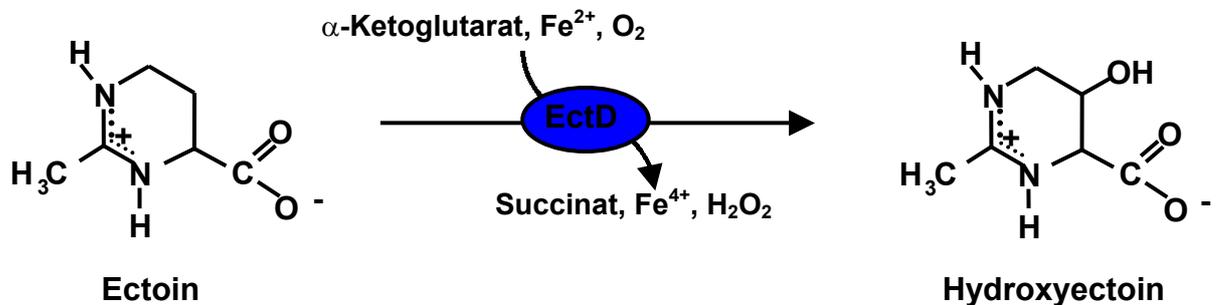
## 1.2 Die Synthese von Hydroxyectoin in *St. coelicolor* wird durch eine Dioxygenase katalysiert

Abhängig von der Wachstumsphase und den Wachstumsbedingungen sind zahlreiche ectoinsynthetisierende Bakterien in der Lage, auch Hydroxyectoin zu produzieren (Galinski und Louis 1999), so auch der in der vorliegenden Arbeit auf Hydroxyectoinsynthese untersuchte *Bacillus*-Verwandte *Sa. salexigens* (Abb. 10) und der Actinomyceten *St. coelicolor* (Abb. 39).

Neben den regulatorischen Mechanismen der Hydroxyectoinproduktion konnte auch die Biosynthese dieses kompatiblen Solutes bisher nicht aufgeklärt werden. Hydroxyectoin wird nie allein oder in Kombination mit der endogenen Produktion eines anderen Osmolyts als Ectoin in einem Bakterium synthetisiert. Ebenfalls konnte in einer *ectA*-defekten Mutante von *H. elongata*, die nicht mehr in der Lage war, Ectoin zu synthetisieren, auch keine Hydroxyectoinproduktion mehr nachgewiesen werden (Göller *et al.* 1998). Daher wurde vermutet, dass die Hydroxyectoinsynthese an die Ectoinproduktion gekoppelt ist und Hydroxyectoin entweder direkt durch die Hydroxylierung von Ectoin gebildet wird (Göller *et al.* 1998; Ventosa *et al.* 1998a) oder durch zwei katalytische Schritte aus dem Intermediat der Ectoinbiosynthese N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat synthetisiert wird (Canovas *et al.* 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen einer potentiellen Dioxygenase aus *St. coelicolor* identifiziert, die allein für die Synthese von Hydroxyectoin aus Ectoin verantwortlich ist. Stromabwärts der Ectoinbiosynthesegene *ectABC* im Genom von *St. coelicolor* (Abb. 45) wurde ein offener Leserahmen (*orf4*, Acc. no. AL591322) entdeckt, dessen Genprodukt kürzlich als Hydroxylase in der Datenbank gekennzeichnet wurde. Die gemeinsame Expression von *ectABC* und *orf4* in *B. subtilis*, der selbst nicht in Lage ist Ectoin oder Hydroxyectoin *de novo* zu synthetisieren, unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors führte zur Ectoin- und Hydroxyectoinproduktion in diesem Bakterium (Abb. 41). Die durch *orf4* codierte potentielle Hydroxylase, im Folgenden als EctD bezeichnet, ist in *St. coelicolor* daher allein für die Synthese von Hydroxyectoin aus Ectoin verantwortlich.

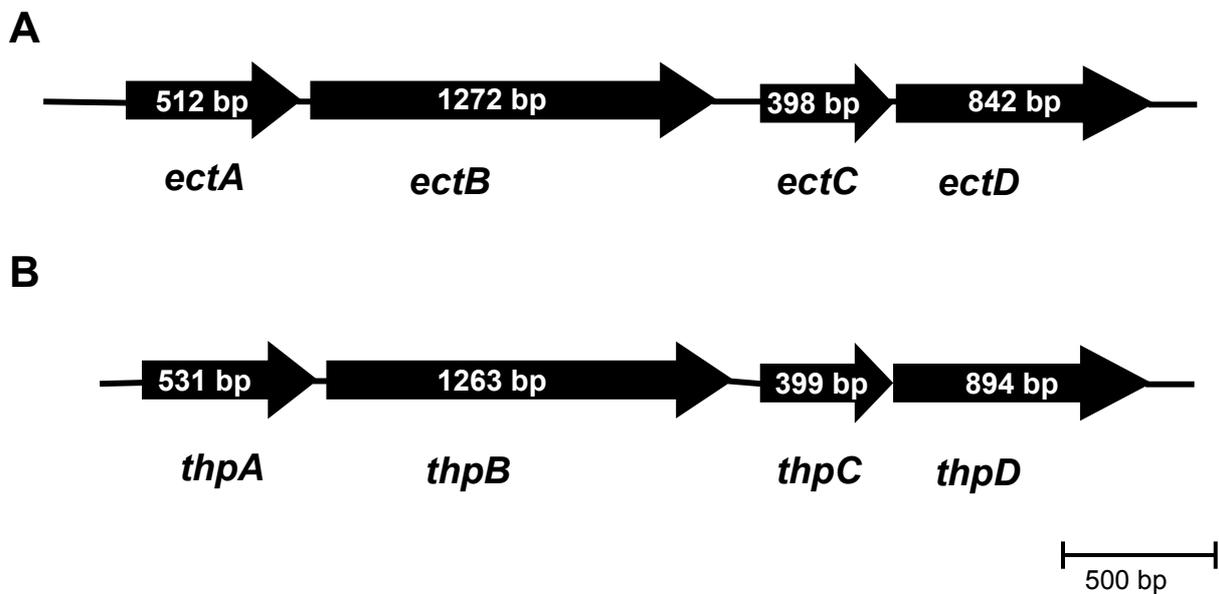
Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *ectD* zeigte bei computerbasierenden Analysen nur Sequenzidentitäten zu einer Dioxygenase aus dem Ascomyceten *Dactylosporangium* sp. RH1 (Acc. no. D78338) (Abb. 40). Diese Prolin-4-Hydroxylase katalysiert die Hydroxylierung von freiem L-Prolin zu *trans*-4-Hydroxy-L-Prolin (Shibasaki *et al.* 2000a, Shibasaki *et al.* 2000b). Interessanterweise wurde von Hydroxyprolin berichtet, dass es frei oder in Prolin-Hydroxyprolin Dipeptiden unter hochosmolaren Bedingungen in großen Mengen im Zytoplasma von *L. monocytogenes* akkumuliert wurde (Amezaga *et al.* 1995). Wahrscheinlich besitzt neben Prolin auch Hydroxyprolin, wie das hydroxylierte Derivat von Ectoin, osmoprotektive Eigenschaften in Mikroorganismen. Prolin-4-Hydroxylasen konnten auch in anderen Gram-positiven Mikroorganismen nachgewiesen werden, wie *St. griseoviridus* P8648 (Lawrence *et al.* 1996). In diesem Bakterium ist die Prolin-4-Hydroxylase an



**Abb. 44**      **Möglicher Mechanismus der durch die EctD katalysierten Hydroxylierung von Ectoin**

der Synthese des Sekundärmetabolits Etamycin beteiligt und benötigt  $\alpha$ -Ketoglutarat und  $\text{O}_2$  als Co-Substrate und Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) als Co-Faktor (Lawrence *et al.* 1996). In *St. griseoviridus* sind auch, wie in Prolin-4-Hydroxylasen aus Algen und Vertebraten (Myllyla *et al.* 1992), Histidinresten im katalytischen Zentrum des Enzyms an der Eisenbindung beteiligt (Lawrence *et al.* 1996). Das eisenbindende Histidin-Motiv ist auch in zahlreichen anderen  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen konserviert (Shibasaki *et al.* 2000b) und konnte auch in der potentiellen Dioxygenase aus *St. coelicolor* identifiziert werden (Abb. 40). Zusammenfassend zeigen die bisher charakterisierten bakteriellen Prolin-4-Hydroxylasen alle Charakteristika der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasefamilie (Lawrence *et al.* 1996). Anhand der vorliegenden Daten des katalytischen Mechanismus von Prolin-4-Hydroxylasen lässt sich die Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin durch die potentielle Dioxygenase EctD formulieren (Abb. 44): In dieser Reaktion werden  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinat und Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid umgesetzt, der Co-Faktor von EctD  $\text{Fe}^{2+}$  wird zu  $\text{Fe}^{4+}$  oxidiert.

Der mögliche Reaktionsmechanismus der Umsetzung von Ectoin zu Hydroxyectoin durch die Ectoin-Hydroxylase EctD in *St. coelicolor* wird durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe von PD U. Keller (Technische Universität Berlin) unterstützt. Dort konnte kürzlich eine Dioxygenase aus *Streptomyces chrysomallus* isoliert werden, die *in vitro* Ectoin zu Hydroxyectoin umsetzt. Diese enzymatische Reaktion erfolgte nur in Gegenwart von  $\alpha$ -Ketoglutarat,  $\text{FeSO}_4$  und L-Ascorbinsäure, die zur Regeneration des Co-Faktors Eisen *in vitro* diente (Grammel 2000). Das Gen (*thpD*), das diese Dioxygenase codiert, ist das vierte Gen eines bisher nicht veröffentlichten Tetrahydropyrimidinsynthesegenclusters aus *St. chrysomallus*, in der Doktorarbeit von F. Grammel als *thpABCD* bezeichnet, und folgt direkt auf das Stop-Codon von *thpC*. Eine vergleichende Übersicht der Ectoinbiosynthesegencluster aus *St. coelicolor* und *St. chrysomallus* ist in Abbildung 45 dargestellt, ein Aminosäuresequenzvergleich von *ectD* aus *St. coelicolor* und *thpD* aus *St. chrysomallus* ergab eine Sequenzidentität von 85 % und zeigt die enge Verwandtschaft der Gene (Abb. 46). ThpD besitzt auch, wie EctD, das für die Eisenbindung notwendige Histidin-Motiv  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängiger Dioxygenasen (Abb. 46).



**Abb 45** Organisation der Tetrahydropyrimidinsynthesegencluster aus *St. coelicolor* und *St. chrysomallus*

Dargestellt sind (A) der *ectABCD*-Locus aus *St. coelicolor* und (B) das *thpABCD*-Gencluster aus *St. chrysomallus*.

Zusammenfassend konnte durch die Identifikation von EctD als Ectoinhydroxylase die Hydroxyectoinbiosynthese in *St. coelicolor* weitgehend aufgeklärt werden und gemeinsam mit den Daten aus *St. chrysomallus* kann geschlossen werden, dass die Hydroxyectoinsynthese in verschiedenen Streptomycetenspezies durch eng verwandte Ectoinhydroxylasen stattfindet. Die Identifikation von *ectD* stellt ein wichtiges Werkzeug für die Aufklärung der Regulation der Hydroxyectoinbiosynthese dar. Die nahe Lokalisation von *ectABCD* lässt vermuten, dass die Gene als Operon unter induzierenden Bedingungen zur Expression gebracht werden.

ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>M</b> T T E V R A D L Y P S R G A A E M T <b>T P R Q D P V I</b> W S A 30
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>M</b> - - - - - - - - - - - - - - - - - A T P R Q D P V V W G S 13
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>P G A P G P V A A K D L Q G Y E H D G F L T V D Q L I A P D</b> 60
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>P D A P G P V S A G D L Q A L D R D G F L A I D Q L I T P D</b> 43
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>E V A V Y Q A E L N R L I S D P A V R A D E R S I V E K Q S</b> 90
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>E V G E Y Q R E L E R L T T D P A I R A D E R S I V E P Q S</b> 73
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	Q N V <b>R S V F E V H R I S E V F A G L V R D E R V V G R A R</b> 120
EctD	<i>St. coelicolor</i>	K E I <b>R S V F E V H K I S E V F A K L V R D E R V V G R A R</b> 103
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>Q I L G S D V Y V H Q S R I N V K P G F G A T G F Y W H S D</b> 150
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>Q I L G S D V Y V H Q S R I N V K P G F G A S G F Y W H S D</b> 133
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>F E T W H A E D G L P N M R T V S V S I A L T E N F D T N G</b> 180
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>F E T W H A E D G L P N M R T I S V S I A L T E N Y D T N G</b> 163
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>G L M I M P G S H K T F L G C A G E T P K D N Y K K S L Q M</b> 210
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>G L M I M P G S H K T F L G C A G A T P K D N Y K K S L Q M</b> 193
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>Q D A G T P S D E A L T K M A D R H G I R L F T G R A G S A</b> 240
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>Q D A G T P S D E G L T K M A S E Y G I K L F T G K A G S A</b> 223
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>T W F D C N A M H G S G D N I T P Y A R S N V F I V F N S V</b> 270
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>T W F D C N C M H G S G D N I T P F P R S N V F I V F N S V</b> 253
ThpD	<i>St. chrysomallus</i>	<b>E N A A Q E P F A A P I R R P E F I G A R D F T P V K</b> 297
EctD	<i>St. coelicolor</i>	<b>E N T A V E P F A A P I R R P E F I G A R D F T P V K</b> 280

**Abb. 46** Vergleich der Aminosäuresequenzen von EctD aus *St. coelicolor* A3(2) und ThpD aus *St. chrysomallus*

Dargestellt sind die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von EctD aus *St. coelicolor* A3(2) (Acc. no. AL591322) und ThpD aus *St. chrysomallus*; das konservierte HisXAsp-Motiv wurde markiert (—).

Die DNA-Sequenzen beider Streptomycceten-Gencluster besitzen einen vergleichsweise geringen G + C-Gehalt von 65 %, da der durchschnittliche G + C-Gehalt eines Streptomycceten-Genoms 75 % beträgt. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf die Übertragung des Tetrahydropyrimidinsynthesegenclusters durch horizontalen Gentransfer sein. Somit könnten auch Bakterien anderer Genera *ectABCD*-Cluster auf diese Weise erhalten haben und *ectD* konserviert in Sequenz und Organisation in Hydroxyectoin-synthetisierenden Bakterien vorliegen. Zukünftige molekularbiologische und physiologische Untersuchungen der Hydroxyectoinsynthese in *Sa salexigens*, einem Gram-positiven Bakterium mit niedrigem G + C-Gehalt, könnten die Ergebnisse aus Streptomycceten ergänzen und vervollständigen.

## 2 Regulation der Ectoinbiosynthese in Gram-positiven Bakterien – Adaptation an hochosmolare Bedingungen

Ectoin wurde nach seiner Entdeckung als ein kompatibles Solut mit geringer Verbreitung angesehen, aber verbesserte Untersuchungsmethoden zeigten, dass zahlreiche taxonomisch und physiologisch verschiedene Spezies der *Bacteria* in der Lage sind, unter hochosmolaren Umweltbedingungen Ectoin als osmotische Schutzsubstanz *de novo* zu synthetisieren. Obwohl die osmotisch stimulierte Synthese dieses kompatiblen Solutes in Mikroorganismen weit verbreitet ist und ein vollständiges Ectoinbiosynthesecluster aus *M. halophilus* isoliert werden konnte (Louis und Galinski 1997), fehlten tiefergehende Kenntnisse über die Regulation der Ectoinsynthese durch osmotischen Stress. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine vergleichende physiologische und molekulare Analyse der Ectoinbiosynthese in *S. pasteurii* und *V. pantothenicus*, zwei moderat halotoleranten Gram-positiven Bakterien, die Ectoin allein oder in Kombination mit Prolin unter hochosmolaren Bedingungen synthetisieren, durchgeführt.

Beide Bakterien sind in der Lage, die aktuelle Osmolalität ihrer Umgebung zu erfassen und bei hochosmolarem Stress Ectoin zu synthetisieren. Die intrazellulär akkumulierte Ectoinmenge in osmotisch langzeitadaptierten *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* Kulturen ist genau auf die Stärke des zu kompensierenden hochosmolaren Stresses abgestimmt (Abb. 9C) (Abb. 9D). In *S. pasteurii* besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der endogen synthetisierten Ectoinmenge und der NaCl-Konzentration des Mediums, in *V. pantothenicus* erhöht sich der Ectoingehalt in sigmoider Abhängigkeit zur steigenden Osmolalität. Dieser Unterschied beruht vermutlich auf der zusätzlichen Prolinbiosynthese unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus*. Die initial akkumulierte Prolinmenge reicht bei niedrigen Osmolalitäten aus, um *V. pantothenicus* einen osmotischen Schutz zu bieten, erst bei stärkerem osmotischem Stress (0,7 bis 2 M NaCl) ist Ectoin das dominant synthetisierte Osmoprotektivum (Abb. 19). Nach einem hyperosmotischen Schock kam es zu einer Induktion der Prolin- und Ectoinsynthese in *V. pantothenicus* (Abb. 19), in den osmotisch adaptierten Zellen stellte sich ein Konzentrationsverhältnis beider Solute zueinander ein, das genau in Abhängigkeit zur Stärke des osmotischen Stresses stand. *V. pantothenicus* kann demnach eine plötzliche Erhöhung der Osmolalität seiner Umwelt wahrnehmen und darüber hinaus Stärke und Dauer des osmotischen Stresses detektieren. Dementsprechend kann *V. pantothenicus* die Stärke der Osmolyt-Synthese und die Art des synthetisierten Osmoprotektivums genau auf die vorherrschende Osmolalität abstimmen.

Die molekularen Grundlagen dieser Osmostressperzeption in Bakterien sind noch unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, welcher Art die physikalisch-chemischen Größen sein könnten, die die Synthese kompatibler Solute unter hochosmolaren Bedingungen aktivieren. Verschiedene ionische und nicht-ionische Osmolyte induzieren die Ectoin- und Prolinbiosynthese in beiden Bakterien, nicht aber Glycerin, das die Membran passiert und somit keinen osmotischen Gradienten

über dieser aufbauen kann (Tab. 14) (Tab. 16). Die Synthese kompatibler Solute in *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* ist daher ein echter osmotischer Effekt und beruht nicht auf einer ionischen Induktion durch NaCl. Dennoch ist die Osmolalität der Umwelt *per se* vermutlich nicht für die Induktion der Biosynthese der kompatiblen Solute verantwortlich. Die Zugabe von 1 mM des potenten Osmoprotektivums Glycin Betain zum Medium verhinderte die endogene Synthese von Ectoin in *S. pasteurii* und Ectoin und Prolin in *V. pantothenicus* bei hoher Osmolalität (Tab. 14) (Tab.16). Die beobachtete Repression der endogenen Synthese kompatibler Solute in *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* beruht vermutlich auf dem intrazellulär akkumulierten Glycin Betain, das die zellulären Veränderungen durch hohe Osmolalität mildert, so dass diese nicht mehr zu einer Aktivierung der Osmolytsynthese führen, obwohl die hohe Osmolalität der Umgebung erhalten bleibt. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung haben Experimente mit *B. subtilis* gezeigt, dass intrazellulär akkumuliertes Glycin Betain die Promotoraktivität der Prolinpermease OpuE unter hochosmolaren Bedingungen stark vermindert (Spiegelhalter 1999).

Es konnten mittlerweile zahlreiche physiologische Veränderungen durch hochosmolare Umweltbedingungen in Mikroorganismen identifiziert werden, die Funktionen in der osmotischen Kontrolle der Synthese und Aufnahme kompatibler Solute spielen könnten. Die Abnahme des Zellurgors und eine daraus resultierende Verminderung der Membranspannung gehören zu den ersten Veränderungen der Zellmorphologie, die durch den Wasserausstrom aus der Zelle unter hochosmolare Bedingungen induziert werden und denen Signalfunktionen für die Anpassung der Zelle an die geänderten Umweltbedingungen zukommen könnten (Poolman und Glaasker 1998). Es konnten weiterhin Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung der Zytoplasmamembran (Lopez *et al.* 2000) und geänderte Eigenschaften der Zellwand unter hypertonen Bedingungen in *B. subtilis* beobachtet werden (Lopez *et al.* 1998), die aktivierend auf membranlokalisierte Rezeptoren wirken könnten. Kaliumionen, die Bakterien nach einem hyperosmolaren Schock als initiale Stressantwort im Zytoplasma akkumulieren (Record *et al.* 1998), werden als Signal für die Induktion osmotisch regulierter Gene diskutiert. Modifikationen der Nukleoidstruktur (Higgins *et al.* 1988; Ni Bhriain *et al.* 1989; Sheehan *et al.* 1992; Mojica *et al.* 1993; Krispin und Allmansberger 1995; Alice und Sanchez-Rivas 1997; Conter *et al.* 1997), wie Superspiralisierung der DNA als notwendige Anpassung an hohe Osmolalität, werden Funktionen für die osmotische Regulation der Transkription zugeschrieben.

Durch Northern Blot- und Primer Extension-Analysen wurde in *S. pasteurii* und *V. pantothenicus* die transkriptionelle Regulation der Ectoinbiosynthese unter osmotischem Stress untersucht. In beiden Bakterien werden die Ectoinbiosynthesegene als osmotisch induzierbares Operon zur Expression gebracht, da in hyperosmolar gestressten *S. pasteurii* und in *V. pantothenicus* Kulturen jeweils nur ein Transkript, das alle drei Gene umfasste, nachgewiesen werden konnte (Abb. 11) (Abb. 18). Die in physiologischen Experimenten gezeigte Regulation der Ectoinbiosynthese in Abhängigkeit zu einer erhöhten externen Osmolalität beruht in *S. pasteurii* und

*V. pantothenicus* vor allem auf einer osmotisch fein regulierten Transkription ihrer Ectoinsynthesegene (Abb. 11) (Abb. 19). Bereits 10 Minuten nach einem hyperosmotischen Schock wurde die Transkription des Ectoinsyntheseoperons in *V. pantothenicus* induziert, und in der osmotisch adaptierten Kultur erreichte die Transkriptionsrate nach 240 Minuten ihr Maximum, das dauerhaft bei hoher Osmolalität aufrechterhalten wurde (Abb. 19). Es wäre möglich, dass eine zusätzliche Regulation der Ectoinbiosynthese in *Bacillus*-verwandten Bakterien auf posttranskriptionaler Ebene erfolgt, da für *H. elongata* OUT30018 gezeigt werden konnte, dass die Aktivität der drei Ectoinbiosyntheseenzyme EctABC durch die Zugabe von 0,5 M NaCl *in vitro* stimuliert werden konnte (Ono *et al.* 1999).

Durch Primer Extension-Analyse gelang die Identifikation des *S. pasteurii* *ectABC*-Promotors, von dem aus die osmotisch regulierte Transkription des *ectABC*-Operons erfolgt (Abb. 12). In voller Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Northern Blot-Analyse des *ectABC*-Operons konnte nur ein osmotisch stimulierbarer Promotor, der 78 bp stromaufwärts vom *ectA* Startcodon lokalisiert war, in *S. pasteurii* nachgewiesen werden (Abb. 12). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Computerprogramm-basierenden Vorhersagen über drei potentielle Promotoren, die für die Regulation der *ectABC*-Gene in *M. halophilus* verantwortlich sein sollten (Louis und Galinski 1997). Bisher wurden diese potentiellen Promotoren weder durch Northern Blot-Analysen noch durch Primer Extension Experimente bestätigt. Die Promotorsequenz des *ectABC*-Operons aus *S. pasteurii* zeigte große Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz eines Transkriptionsfaktor A ( $\sigma^A$ ) abhängigen Promotors aus *B. subtilis* (Abb. 47). Vermutlich besitzt *S. pasteurii* ein Homolog des vegetativen Sigmafaktors A aus *B. subtilis*, der für die Expression des *ectABC*-Operons verantwortlich ist. Für verschiedene osmotisch regulierte Gene aus *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass sie der transkriptionellen Kontrolle durch  $\sigma^A$  unterliegen. So erfolgt osmotisch regulierte Transkription der *opuA*-Operons, des *opuB*-Operons, des *opuD*-Gens und des *opuE*-Gens sowie des *proHJ*-Operons in *B. subtilis* durch einen  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor (Kempf und Bremer 1995; Spiegelhalter und Bremer 1998; Kappes *et al.* 1999; Spiegelhalter 1999; Brill und Bremer 2002).

Der vegetative Sigmafaktor aus *B. subtilis* besitzt auf proteinchemischer und funktioneller Ebene viele Gemeinsamkeiten mit dem „housekeeping“-Sigmafaktor 70 ( $\sigma^{70}$ ) aus *E. coli*. Beide Transkriptionsfaktoren erkennen Promotoren mit der gleichen Konsensussequenz, aber *B. subtilis*-Promotoren zeigen durchschnittlich weniger Abweichungen von dieser Konsensus-Sequenz als *E. coli* Promotoren (Henkin und Sonenshein 1987). Zusätzlich werden  $\sigma^A$ -abhängige Promotoren aus *B. subtilis* in *E. coli* problemlos transkribiert als umgekehrt  $\sigma^{70}$ -abhängige Promotoren aus *E. coli* in *B. subtilis*, was auf eine generell unspezifischere Erkennung der Promotoren durch das RNA-Polymerase (RNAP)- $\sigma^{70}$ -Holoenzym in *E. coli* im Vergleich zum RNAP- $\sigma^A$ -Holoenzym aus *B. subtilis* hindeutet (Yamada *et al.* 1991; Chang *et al.* 1992; Helman und Moran 2002). Ein als TG-Motiv oder – 16 Region bezeichnetes Promotorelement, das auch der *ectABC*-Promotor aus *S. pasteurii* besitzt (Abb. 12) (Abb. 47), ist teilweise für die unterschiedlich spezifische Promotorerkennung in *E. coli* und

		<b>-35</b>			<b>-16</b>		<b>-10</b>
<i>ectABC</i>	GT	TTAGAA	GGTGTAATAATTCC		TG	C	
	TAATAT	GTG					
<i>proHJ</i>	AC	TTGACA	TCATTCCTCACG	TG	G	TAACAT	TTT
<i>opuA</i>	GT	TTGTGT	GGGAAGTTACATAAA		TG	T	TACGGT
	AAT						
<i>opuD (P1)</i>	AT	TTGAAC	ATTCCCCGCATTCA		TG	T	TAGGGT
	GAG						
<i>opuE (P1)</i>	GC	TTGAAT	GGCCGGGAATACTT		TG	T	
	TAGGTT	AAG					
<i>proU</i>	GG	TTGCCT	CAGATTCTCAGTA		TG	T	TAGGGT
	AGA						
<i>proP</i>	AG	TTGATC	ACAAATTTAAACAC		TG	G	TAGGGT
	AAA						

**Abb. 47** Vergleich osmotisch regulierter  $\sigma^A$ -abhängiger Promotoren aus *B. subtilis* und  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren aus *E. coli* mit dem Promotor des *ectABC*-Operons aus *S. pasteurii*

Die –35, –10 und –16 Region der jeweiligen Promotoren sind grau unterlegt.

*B. subtilis* verantwortlich (Henkin und Sonenshein 1987). Das TG-Motiv, das in zahlreichen Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien beschrieben worden ist (Bown *et al.* 1997) und 1 bp stromaufwärts der –10 Promotorregion lokalisiert ist, kann in *E. coli* eine kanonische –35-Region entbehrlich machen (Kelty und Rosenberg 1987; Kumar *et al.* 1993). Es ist in *E. coli* nur mäßig konserviert (Ozoline *et al.* 1997), aber die osmotisch regulierten  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotoren des *proU*-Operons und des *proP*-Gens aus *E. coli* weisen das TG-Motiv auf (Abb. 47) (Kempf und Bremer 1995). In *B. subtilis* besitzen 45% der  $\sigma^A$ -abhängigen Promotoren das 5'-TG-3' Promotorelement, und die Konserviertheit der einzelnen Nukleotide (T: 52%;G: 58%) reicht an die einiger Basen in den –10 und –35 Hexameren heran (Helman 1995; Voskuil *et al.* 1995). Auch in den  $\sigma^A$  Promotoren von *opuA*, *opuD*, *opuE* und *proHJ* befindet sich ein TG-Motiv (Abb. 47) (Kempf und Bremer 1995; Spiegelhalter und Bremer 1998; Kappes *et al.* 1999; Spiegelhalter 1999; Brill und Bremer 2002). Die Mutation des TG-Dinukleotids des *opuE* Promotors zu AC resultierte in einer starken Abschwächung der Aktivität des Promotors und dem Verlust der osmotischen Stimulierbarkeit (Spiegelhalter 1999). Neben der

Sequenz der -10, -16 und -35 Promotorregion ist die Länge der Nukleotidsequenz zwischen den -10 und -35 Hexameren („spacer“) von Bedeutung für die Initiation der Transkription (Auble *et al.* 1986).

Der Abstand zwischen der -10 und -35 Region des *ectABC*-Promotors aus *S. pasteurii* ist mit 18 bp zu lang im Vergleich zum  $\sigma^A$  Konsensus (17 bp) (Helman 1995). Der *opuA*-Promotor aus *B. subtilis* besitzt ebenfalls eine nicht-optimale Spacerregion von 18 bp (Kempf und Bremer 1995). Es wird angenommen, dass die Unterwindung der DNA-Doppelhelix Promotoren mit geringfügig zu langen Abständen zwischen -10 und -35 Region aktivieren kann, indem die Topologie der -10 und -35 Hexamere zueinander der eines Promotors mit einer optimalen Spacerregion angeglichen wird (Dai und Rothman-Denes 1999). Trotz der großen Übereinstimmungen in Sequenz und Topologie des *ectABC*-Promotors aus *S. pasteurii* mit  $\sigma^{70}$ - und  $\sigma^A$ - abhängigen Promotoren konnten die Gene unter der Kontrolle ihres nativen Promotors weder in *E. coli* noch in *B. subtilis* funktionell zur Expression gebracht werden. Nur unter Kontrolle des IPTG induzierbaren T5 Phagen Promotors P<sub>N25</sub> (Schön und Schumann 1994) konnten eine funktionelle Expression der Gene und eine damit einhergehende Ectoinproduktion in *B. subtilis* erreicht werden. Daher zeigte sich, dass die isolierten *ectABC*-Gene aus *S. pasteurii* für die Synthese des Tetrahydropyrimidins Ectoin ausreichen. In *B. subtilis* aber müssen spezielle regulatorische Elemente fehlen, die in *S. pasteurii* vorhanden sind, um das *ectABC*-Operon osmotisch reguliert durch den nativen Promotor zur Expression zu bringen. Die *ectABC*-Gene bieten ein Werkzeug, um diese potentiellen Regulatoren zu isolieren. Es wäre möglich, einen *B. subtilis* Stamm zu konstruieren, der eine *in frame* Fusion des nativen *ectABC*-Promotors mit einem Reporter gen trägt. Dieser *B. subtilis* Stamm könnte mit einer *S. pasteurii* Genbank transformiert werden, die die Gene möglicher Regulatoren umfasst. Durch ein Screening nach *B. subtilis* Transformanten, in denen das Reporter gen exprimiert wird, könnten Gene potentieller Regulatoren des Ectoinsyntheseoperons aus *S. pasteurii* isoliert werden. Die *ectABC*-Gene aus *Ch. salexigens* (DSM 3043) konnten, wie das *ectABC*-Operon aus *S. pasteurii*, in *E. coli* nicht zur Expression gebracht werden. Daher war die funktionelle, osmotisch regulierte Expression der Ectoinsynthesegene aus *M. halophilus* in *E. coli*, wie von Louis und Galinski 1997 beschrieben, eine bemerkenswerte Ausnahme. Um dieses Ergebnis zu verifizieren und auszuschließen, dass die Expression der *ectABC*-Gene aus *M. halophilus* durch einen auf dem Plasmid vorhandenen Promotor zufällig erfolgt, wurde *E. coli* mit Plasmid-DNA, die eine Fusion der potentielle Promotorregion stromaufwärts von *ectA* mit dem *gfp* (grünfluoreszierenden Protein) Reporter gen trug, transformiert (Bestvater und Galinski 2002). Es konnte mit im artifiziellen System durchgeführten Experimenten bestätigt werden, dass die Promotorregion der *ectABC*-Gene aus *M. halophilus* in *E. coli* unter hochosmolaren Bedingungen aktiviert wird. Möglicherweise unterstützen gemeinsam mit den Ectoinbiosynthesegenen aus *M. halophilus* isolierte, potentielle cis-aktive Regulatorelemente oder osmotisch kontrollierte Regulatoren des heterologen Wirtes *E. coli* in trans die Expression der Gene.

Die Unterbrechung von *ectB* im Genom von *V. pantothenicus* verhindert vollständig die Synthese des kompatiblen Solutes Ectoin bei erhöhter Osmolalität (Abb. 21) und ist für einen

massiven Wachstumsnachteil der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp unter hypertonen Bedingungen verantwortlich (Abb. 21). So konnte erstmals in einem Gram-positiven Bakterium die zentrale Funktion der endogenen Ectoinsynthese für die Anpassung und das Wachstum unter hochosmolarem Stress demonstriert werden. Bisher wurde der Effekt einer fehlenden Ectoinakkumulation durch *de novo* Synthese nur in *ect*-Mutanten der Gram-negativen Bakterien *H. elongata* (DSM 2581) (Göller *et al.* 1998) und *Ch. salexigens* (DSM 3043) (Canovas *et al.* 1997) unter hochosmolaren Bedingungen beobachtet. Auch diese Mutanten zeigten einen deutlichen Wachstumsnachteil unter hochosmolaren Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp. Zusammenfassend demonstrieren diese Daten, dass die gemeinsame Fähigkeit, *de novo* Ectoin zu synthetisieren, in taxonomisch und physiologisch verschiedenen Bakterien einen essentiellen Teil des zellulären Schutzes gegen hochosmolaren Stress darstellt. Darüber hinaus konnte durch die *ectB*-Genunterbrechung zum ersten Mal in *V. pantothenicus* die natürliche Kompetenz und eine gezielte genetische Manipulation dieses Organismus demonstriert werden.

### **3 Ectoin und Hydroxyectoin schützen vor zahlreichen Stressbedingungen**

Die chemischen Eigenschaften kompatibler Solute und ihre Interaktion mit biologischen Makromolekülen können Mikroorganismen, die diese Solute im Zytoplasma akkumulieren, auch Schutz vor anderen Umweltstressbedingungen als hoher Osmolalität vermitteln. Mikroorganismen, die zahlreichen und fluktuierenden Stressbedingungen in ihrem Habitat, den oberen Bodenschichten, ausgesetzt sind, sind *Bacilli* und ihre Verwandten (Miller und Wood 1996). Durch Regen und Verdunstung ändert sich die Osmolalität ihrer direkten Umwelt. Sonnenschein bewirkt, neben einer Erhöhung der Osmolalität, auch eine Erwärmung des Bodens und somit Hitzestress. Eine längere Hitzeperiode kann zusätzlich zur Austrocknung der Bakterienzelle führen. Während der meisten Zeit des Jahres wirkt aber auf *Bacilli* in den oberen Bodenschichten gemäßigter Breiten Kältestress. Die Temperatur des Bodens liegt weit unter den optimalen Wachstumstemperaturen der Bakterien, so dass diese nur sehr langsam oder überhaupt nicht wachsen.

#### **3.1 Ectoine als Psychroprotektiva unterstützen die Kälteadaptation in Bakterien**

Da *Bacilli* in ihrem natürlichen Habitat, dem Boden, häufig und über längere Zeit niedrigen Wachstumstemperaturen ausgesetzt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich der intrazelluläre Pool organischer Solute der mesophilen Spezies *V. pantothenicus* (optimale Wachstumstemperatur 37°C) durch Wachstum bei 15°C, der niedrigsten Temperatur bei der *V. pantothenicus* noch proliferieren kann (Heyndrickx *et al.* 1998), änderte. HPLC-Analysen zeigten,

dass dieser *Bacillus*-Verwandte in der Lage ist, bei abnehmender Wachstumstemperatur vermehrt das kompatible Solut Ectoin und auch geringe Mengen Prolin im Zytoplasma durch *de novo* Synthese zu akkumulieren (Abb. 22). Die Synthese beider kompatibler Solute erfolgte fein abgestimmt auf die jeweils vorherrschende Temperatur, und die Akkumulation von Ectoin und Prolin wurde solange aufrechterhalten wie der Kältestimulus andauerte (Abb. 22). Im Rahmen dieser Arbeit war es somit zum ersten Mal möglich, die kältestimulierte *de novo* Synthese kompatibler Solute in einem Mikroorganismus nachzuweisen. Die physiologische Rolle der Ectoinakkumulation bei 15°C wurde durch vergleichende Wachstumsexperimente des *V. pantothenicus* Wildtyps und der im EctB Enzym defekten Mutante, die auch bei Kälte kein Ectoin synthetisieren kann (Kap. 9.4 Ergebnisse), untersucht. Die Mutante hatte einen deutlichen Wachstumsnachteil bei Kälte (Abb. 25), der auf der fehlenden Ectoinproduktion beruhte. Die Akkumulation von Ectoin bietet daher *V. pantothenicus* einen großen Wachstumsvorteil bei Kälte und stellt einen wichtigen und integralen Teil der Kältestressadaptation in diesem Bakterium dar.

Die psychroprotektiven Eigenschaften kompatibler Solute in Mikroorganismen konnten bisher nur im Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Deshnium *et al.* 1997) und *L. monocytogenes* (Ko *et al.* 1994; Bayles und Wilkinson 2000) belegt werden. Die Transformation von *Synechococcus* sp. PCC 7942 mit dem *codA* Gen der Cholinoxidase aus *Arthrobacter globiformis* unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors ermöglichte dem Bakterium die Synthese von Glycin Betain bei niedriger Wachstumstemperatur. Durch die Glycin Betain Akkumulation im Zytoplasma wurden das Wachstum der Zellen bei Kälte deutlich verbessert und die Inhibition der Photosynthese verhindert (Deshnium *et al.* 1997). Ko *et al.* zeigten 1994, dass das Wachstum von *L. monocytogenes* durch die exogene Gabe von Glycin Betain bei Kälte deutlich zu verbessern war, und Bayles und Wilkinson erweiterten 2000 die Gruppe der kompatiblen Solute, die bei exogener Gabe sowohl osmoprotektiv als auch psychroprotektiv in *L. monocytogenes* wirken, um Acetylcarnitin, Carnitin,  $\gamma$ -Butyrobetain, Prolin Betain und 3-Dimethylsulphoniopropionat. Weder Ectoin noch Hydroxyectoin hatten osmoprotektive Eigenschaften für *L. monocytogenes* wenn sie dem Medium zugesetzt wurden und ihr psychroprotektives Potential für dieses Bakterium wurde nicht untersucht (Bayles und Wilkinson 2000).

Northern Blot-Analysen der *ectABC*-Gene in *V. pantothenicus* zeigten, dass sie bei Kälte wie auch unter hochosmolaren Bedingungen gemeinsam zur Expression gebracht werden und dass die Ectoinsynthese bei Kälte auf einer feinen Regulation der Transkription des *ectABC*-Operons in Abhängigkeit zur Temperatur beruht (Abb. 23) (Abb. 24). Bereits 2 Stunden nach einem Kälteschock konnte die Transkription des *ectABC*-Operons in *V. pantothenicus* nachgewiesen werden, während sich die Kultur noch in der Anpassungsphase an die niedrige Temperatur befand, und mit erneutem exponentiellen Wachstum von *V. pantothenicus* erreichte die *ectABC*-Transkriptionsrate ihr Maximum, das auch in der stationären Wachstumsphase erhalten blieb (Abb. 24). *V. pantothenicus* ist demnach in der Lage, eine plötzliche Senkung der Umgebungstemperatur und darüber hinaus das

Ausmaß und die Dauer der Temperatursenkung zu erfassen. Das Bakterium prozessiert diese Umweltinformation zu einer fein abgestimmten Transkriptionsrate des *ectABC*-Operons und damit zu einer Anpassung der Ectoinbiosynthesekapazität an die Temperaturverhältnisse der Umgebung.

Die transkriptionellen Regulationen des *ectABC*-Operons in *V. pantothenicus* unter osmotischem und Kältestress weisen zahlreiche Gemeinsamkeiten auf (Abb. 19) (Abb. 24). Ebenso zeigen physiologische Untersuchungen, dass sowohl unter hochosmolaren Bedingungen als auch bei Kälte die Synthese von Ectoin eine wichtige Funktion für die Anpassung und das Wachstum von *V. pantothenicus* erfüllt (Abb. 21) (Abb. 25). Es stellt sich daher die Frage, ob Kältestress vergleichbare Signale wie eine Erhöhung der Osmolalität hervorruft und daher die gleichen Mechanismen der Zellen eine Aktivierung der Ectoinbiosynthese unter beiden Stressbedingungen bewirken? Die additive Verstärkung der *ectABC*-Expression bei gleichzeitigem Einwirken der Signale Kälte und hohe Osmolalität lassen auf eine gleichzeitige Perzeption und anschließende Prozessierung der Stimuli schließen (Abb. 23). Wie diese Signaltransduktion auf molekularer Ebene erfolgt, ist bisher weder bei hoher Osmolalität noch bei Kälte geklärt. Untersucht man, ob die Senkung der Wachstumstemperatur eine Senkung der Wasseraktivität  $a_w$  der Umwelt hervorruft, wie das bei Erhöhung der Osmolalität der Fall ist, stellt sich die Situation als kompliziert dar. Grundsätzlich gilt, dass reines Wasser bei allen Temperaturen eine  $a_w = 1$  besitzt. Wird  $a_w$  durch den Zusatz von osmotisch aktiven Substanzen, die  $a_w$  senken, vom idealen in den nicht-idealen Zustand überführt kann die Aktivität der wässrigen Lösung  $a_i$  durch folgende Formel beschrieben werden:

$$a_i = \gamma_i x_i$$

$\gamma_i$  und  $x_i$  sind der Aktivitätskoeffizient beziehungsweise die molare Menge der  $i$ -ten, dem Wasser zugesetzten, thermodynamisch aktiven Substanz und es gilt:  $0 < a_i < 1$ . Der Aktivitätskoeffizient  $\gamma_i$  hängt seinerseits von der Temperatur der Lösung ab:

$$\ln \gamma_i = \Delta G / R \cdot T$$

wobei  $\Delta G$  Arbeit ist, die geleistet werden muss, um der Abschirmung der Ionen der gelösten Substanz durch Moleküle andere thermodynamisch wirksamer Substanzen entgegenzuwirken. Daher gilt generell, dass bei einer Senkung der Temperatur die Aktivitätskoeffizienten  $\gamma_i$  der gelösten thermodynamisch aktiven Substanzen kleiner werden und somit auch die Aktivität der wässrigen Lösung  $a_i$  kleiner wird. Mit Hilfe dieser Näherung kann man davon ausgehen, dass Kälte eine Senkung der Wasseraktivität des Mediums hervorruft, die aber nur gering ist. Die Änderung der Wasserverfügbarkeit und zusätzlich resultierende Stressbedingungen durch Einfrieren (Änderungen des pH-Wertes, Eiskristallbildung, Ausfallen von Salzen) sind deutlich gravierender für bakterielle Zellen und müssen getrennt vom Stress „Kälte“ betrachtet werden. Die relativ geringen Konzentrationen der akkumulierten Solute Ectoin und Prolin bei 15°C lassen sich durch die geringe Minderung der Wasseraktivität des Mediums erklären (Abb. 22).

Neben der Senkung der spezifischen Aktivität eines wässrigen Systems bewirkt Kälte in poikilothermen Organismen wie *B. subtilis* (Aguilar *et al.* 1998), zahlreichen Cyanobakterien (Sato

und Murata 1980; Sakamoto *et al.* 1997), *L. monocytogenes* (Annous *et al.* 1997), *Tetrahymena* (Thompson und Nozawa 1977), *Caenorhabditis elegans* (Tanaka *et al.* 1996) und Karpfen (Cossins 1994) eine Zunahme ungesättigter Fettsäuren in Membranen, um deren Fluidität bei niedrigen Temperaturen zu gewährleisten. In *B. subtilis* konnte eine Kälte-induzierbare  $\Delta 5$ -Lipiddesaturase identifiziert werden, die die Umwandlung von gesättigten Fettsäuren in ungesättigte katalysiert (Aguilar *et al.* 1998), ebenfalls findet eine Umwandlung zahlreicher Fettsäuren von der iso zur anteiso Form bei Kälte in *B. subtilis* und *L. monocytogenes* statt (Klein *et al.* 1999). Die Transkription des Strukturgens der Desaturase *des* ist bei 37°C reprimiert, wird aber durch einen Kälteschock in *B. subtilis* stark induziert (Aguilar *et al.* 1999). Die Regulation der *des* Transkription erfolgt durch ein Zwei-Komponenten System (DesK-DesR), das seinerseits durch Änderungen der Membranfluidität reguliert wird (Aguilar *et al.* 2001) und ein Modell für ein kälteaktiviertes Regulatorsystem, wie es auch in *V. pantothenicus* zur Regulation der *ectABC*-Gene vorliegen könnte, darstellt. Bei Kälte ändert sich die Membranfluidität vom flüssigen-kristallinen (ungeordnet) zum gel-ähnlichen (geordneten) Zustand und bewirkt eine Aktivierung der Autokinaseaktivität des integralen Membransensors DesK (Aguilar *et al.* 2001). Die Phosphorylgruppe im aktiven Zentrum von DesK wird direkt auf den zytoplasmatischen Regulator DesR übertragen, der die Transkription von *Des* aktiviert (Aguilar *et al.* 2001). Sind einige Zeit nach dem Kälteschock wieder genug ungesättigte Fettsäuren in der Zytoplasmamembran von *B. subtilis* vorhanden, ändert sich die Konformation von DesK zum inaktiven Zustand, die *des* Transkription erfolgt daher transient. Eine transiente Transkription der Ectoinsynthesegene konnte in *V. pantothenicus* nicht beobachtet werden, wohl aber ein kontinuierlicher Anstieg der Transkriptionsrate nach einem Kälteschock (Abb. 24). Eine mögliche Senorkinase für die Regulation des *ectABC*-Operons müsste demnach bei Kälte angeschaltet werden und permanent aktiv sein. Auch im Cyanobacterium *Synechocystis* sp. konnte kürzlich eine Histidinkinase identifiziert werden, die für die transkriptionelle Regulation zahlreicher kälteinduzierbarer Gene in diesem Organismus verantwortlich ist (Suzuki *et al.* 2001).

Bei Kälte kommt es in *B. subtilis* und anderen Prokaryoten einschließlich hyperthermophilen *Archaea* (Grau *et al.* 1994; Lopez-Garcia und Forterre 1997) zu einer Erhöhung des negativen Supercoilings der DNA, das in *B. subtilis* auch unter hochosmolaren Bedingungen beobachtet werden konnte (Krispin und Allmansberger 1995). Man geht von einer regulatorischen Funktion des Supercoiling bei Kälte und unter hochosmolaren Bedingungen aus. Das Schmelzen der DNA-Doppelhelix durch die RNA-Polymerase könnte bei niedriger Temperatur erschwert sein, und eine Erhöhung der negativen Überwindung der DNA könnte das Schmelzen des Promotorbereichs energetisch erleichtern (Graumann und Marahiel 1999). Eine negative Überwindung der DNA könnte auch an der Regulation des *ectABC*-Operons in *V. pantothenicus* bei hoher Osmolalität und Kälte beteiligt sein.

Die Kälteschock-Antwort von *B. subtilis* bietet ein Modell für die initialen zytoplasmatischen Anpassungsreaktionen auf plötzliche Kälte in *V. pantothenicus* und zeigt weitere Möglichkeiten für

die kältere regulierte Genexpression. Im Zytosol von *B. subtilis* findet nach einem Kälteschock eine deutliche Änderung der Proteinsynthese statt. Die Synthese sogenannter Cold-stressed induced Proteins (CiPs) und Cold-acclimatization Proteins (CAPs) findet transient induziert statt, während die Synthese der meisten anderen Proteine zurückgeht. 2 Stunden nach dem Kälteschock ist ein neues Gleichgewicht der Proteinsynthese entstanden, das erhalten bleibt, solange die Bakterien bei 15°C gehalten werden (Graumann und Marahiel 1999). Zahlreiche CiPs und CAPs sind an der Regulation der Transkription und Translation bei Kälte beteiligt, und einige von ihnen konnten auch nach einem hyperosmotischen Schock in *B. subtilis* nachgewiesen werden. Auch die Gryase, die für die Einführung von negativen Überwindungen verantwortlich ist, gehört zu den CiPs (Graumann und Marahiel 1999). Diese Kälteschockantworten konnten bisher auch in *Bacillus stearothermophilus* (Wu und Welker 1991), *L. monocytogenes* (Bayles *et al.* 2000) und *E. coli* (Panoff *et al.* 1998) beobachtet werden. Daher ist es möglich, dass auch *V. pantothenicus* spezielle Proteine als Antwort auf einen Kälteschock synthetisiert, die an der kältere regulierten *ectABC*- Expression beteiligt sind.

Die molekularen Mechanismen der Psychroprotektion von Mikroorganismen durch kompatible Solute sind vermutlich mit den Modellen der auch für die osmoprotektiven Eigenschaften dieser Molekülfamilie diskutierten identisch und können durch das „preferential exclusion“ Modell von Arakawa und Timasheff (Arakawa und Timasheff 1985) beschrieben werden. Wie oben dargestellt vermindert sich durch niedrige Temperaturen die Wasseraktivität der Umgebung einer Bakterienzelle, so dass ein Wasserausstrom aus dem Zytoplasma entlang des osmotischen Gradienten erfolgt. Die Akkumulation kompatibler Solute bei Kälte wirkt dem Wasserausstrom entgegen und erhält die Hydrathülle um Proteine und andere Makromoleküle aufrecht. Die Aufrechterhaltung der Hydrathülle und die resultierende Stabilisierung von Proteinen sind bei Kälte von besonderer Bedeutung, da durch die niedrige Temperatur der Umwelt, die auch in der Bakterienzelle vorliegt, Kinetiken in der Zelle verlangsamt ablaufen und nicht genügend thermodynamische Energie zur korrekten Proteinfaltung vorhanden ist (Jaenicke 1990). Bei Kälte werden hydrophobe Interaktionen geschwächt, und ionische Interaktionen nehmen zu, so dass Proteinkonformationen, die Interaktionen von Proteinuntereinheiten und Protein-Membran-Interaktionen geschwächt werden (Privalov und Gill 1988). In *in vitro* Frost-Tau-Experimenten mit Laktatdehydrogenase und Phosphofruktokinase konnten Ectoin und Hydroxyectoin hervorragende proteinstabilisierende Eigenschaften nachgewiesen werden (Lippert und Galinski 1992). Die Ergebnisse sind zwar nur bedingt auf Kältestress bei Temperaturen über 0°C zu übertragen, bestätigen aber die Stabilisierung von Proteinen durch Ectoine.

Von Rudolph *et al.* (Rudolph *et al.* 1986) wurde eine Erhöhung der Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen unter dem Einfluss kompatibler Solute festgestellt. Auch in *Synechococcus* senkte die Akkumulation von Glycin Betain die Temperatur der Phasenänderung vom flüssigen zum gel-ähnlichen Zustand der Zytoplasmamembran (Deshnium *et al.* 1997). Die Erhöhung des anteiso-C<sub>15:0</sub> Fettsäuregehaltes stellt eine wichtige Determinante der Membranadaptation an niedrige

Temperaturen in *L. monocytogenes* (Annous *et al.* 1997) und *B. subtilis* (Klein *et al.* 1999) dar. Die Anwesenheit von Glycin Betain bei Kältestress in *L. monocytogenes* verstärkte die Erhöhung des anteiso-C<sub>15:0</sub> Fettsäuregehaltes der Zytoplasmamembran durch die Stabilisierung der verantwortlichen Desaturase (Annous *et al.* 1997).

### 3.2 Kompatible Solute erhöhen die Osmo- und Kältetoleranz von Pflanzen

Mit Ausnahme tropischer Gebiete bewohnen Pflanzen Habitate auf der ganzen Welt, in denen sie Temperaturen unterhalb ihrer optimalen Wachstumstemperatur ausgesetzt sind und die sie als hauptsächlich sessile Organismen bei widrigen Umweltbedingungen nicht verlassen können. Daher ist es für Pflanzen besonders wichtig, zahlreiche Anpassungsmechanismen zu entwickeln, die ihnen ein Überleben und Wachstum bei niedrigen Temperaturen ermöglichen (Guy 1999). In den letzten 10 Jahren konnten über 100 Pflanzengene identifiziert werden, die bei Kältestress exprimiert werden. Ein gemeinsames Ziel vieler dieser Untersuchungen der Kältestressadaptation in Pflanzen, besonders in Nutzpflanzen, ist die Verbesserung ihrer Kälteresistenz und damit verbundene Verminderungen wirtschaftlicher Einbußen durch Kälte und Frost.

In zahlreichen Pflanzen konnte die Akkumulation des kompatiblen Soluts Glycin Betain sowohl unter hochosmolaren Bedingungen und Trockenheit als auch bei Kältestress nachgewiesen werden (Rhodes und Hanson 1993; Xing und Rajashekar 2001). Die *de novo* Synthese von Glycin Betain bei niedrigen Temperaturen wurde in den Nutzpflanzen Weizen (Allard *et al.* 1998), Gerste (Kishitani *et al.* 1994) und Erdbeeren (*Fragaria X ananassa* Duch.) (Rajashekar *et al.* 1999), sowie im pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (Xing und Rajashekar 2001) nachgewiesen. *A. thaliana* akkumuliert bei niedrigen Temperaturen (4°C tagsüber und 2°C nachts, 10 Stunden Photoperiode) Glycin Betain (Xing und Rajashekar 2001). Wurden kälteadaptierte Pflanzen anschließend Temperaturen unter 0°C ausgesetzt, so waren sie deutlich kryoresistenter als unadaptierte Pflanzen (Xing und Rajashekar 2001). Diese Ergebnisse stimmten mit ähnlichen Beobachtungen in Erdbeeren überein, denen eine vorangegangene Kälteanpassung durch endogene Glycin Betain Synthese eine verbesserte Frostresistenz vermittelte (Rajashekar *et al.* 1999). *A. thaliana*, die endogen nur geringe Mengen Glycin Betain synthetisieren kann, wurde mit dem *codA*-Gen, das eine Cholinoxidase aus dem Bakterium *Arthrobacter globiformis* codiert und unter der Kontrolle eines konstitutiv exprimierten Promotors stand, transformiert (Alia *et al.* 1998). Die transgenen Pflanzen synthetisierten durch *CodA* mehr Glycin Betain, und Samen der Transformanten konnten so bei 0°C quellen, die Pflanzenkeimlinge wurden deutlich kälteresistenter, ihr Wachstum bei 10°C beschleunigte sich im Vergleich zum Wildtyp (Alia *et al.* 1998). Auch voll entwickelte *Arabidopsis* Pflanzen wurden durch die zusätzliche Glycin Betain Synthese deutlich kryoresistenter (Sakamoto *et al.* 2000). Tabakpflanzen, die natürlicherweise kein Glycin Betain synthetisieren können, wurden mit den Glycin Betain

Synthesegenen *betAB* aus *E. coli* transformiert, und es entstanden Glycin Betain akkumulierende, transgene Pflanzen, die deutlich resistenter gegen Kälte und hohe Osmolalität waren als der Wildtyp (Holmström *et al.* 2000).

Bei der Untersuchung regulatorischer Mechanismen der Kälteperzeption und nachfolgender Expression kälteinduzierter Gene wurde oft beobachtet, dass zahlreiche kälteinduzierte Gene auch durch hohe Osmolalität in Pflanzen aktiviert wurden (Curry *et al.* 1991; Holappa und Walker-Simmons 1995; Mantyla *et al.* 1995). Darüber hinaus konnte in *A. thaliana* ein in *cis* wirkendes 9 bp umfassendes Promotorelement identifiziert werden, das die Expression des Gens *rd29A* bei hoher Osmolalität und Kälte induziert (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1994; Jiang *et al.* 1996). Schließlich wurde die Kryoresistenz in zahlreichen Pflanzen (Guy *et al.* 1992; Mantyla *et al.* 1995) durch hohe Osmolalität des Bodens verbessert, was auf der osmotisch stark stimulierten Synthese von Glycin Betain beruhte. Diese Daten deuteten auf eine enge Verknüpfung der Signalkaskaden für die Expression osmotisch regulierter Gene und kälteregulierter Gene in Pflanzen hin. Eine Verknüpfung dieser zwei Stressfaktoren über gemeinsame Regulationswege scheint auch in Bakterien möglich, da ein additiver Effekt auf die Transkriptionsrate des *ectABC-Operons* aus *V. pantothenicus* durch gleichzeitig wirkende hohe Osmolalität und Kälte beobachtet werden konnte (Abb. 23).

### 3.3 Thermoprotektion durch Ectoin und Hydroxyectoin in Mikroorganismen

Stark wechselnde Temperaturen kennzeichnen den Lebensraum der oberen Bodenschichten genauso wie stark fluktuierende osmotische Verhältnisse. Daher stellt auch Hitze einen Stressfaktor für bodenbewohnende Bakterien dar, dem sie sich durch physiologische und molekulare Änderungen flexibel anpassen müssen.

1996 berichteten Malin und Lapidot, dass der mesophile, bodenbewohnende Streptomyces *St. griseus de novo* Ectoin und Hydroxyectoin sowohl bei hoher Osmolalität als auch bei hoher Temperatur synthetisieren kann. Die endogene Synthese beider Tetrahydropyrimidine unter hochosmolaren Bedingungen und unter Hitzestress konnte im Rahmen dieser Arbeit auch in *St. coelicolor* festgestellt werden (Abb. 39). Die Synthese beider Solute erfolgt osmotisch oder hitzeinduziert, die vermehrte Synthese von Hydroxyectoin wurde aber in Abhängigkeit zur Wachstumsphase reguliert (Abb. 39). Die Gesamtkonzentration beider Tetrahydropyrimidine bleibt auch in der Stationärphase konstant, nur das Verhältnis von Ectoin zu Hydroxyectoin verschob sich von 2:1 während des exponentiellen Wachstums zu 1:10 in der Stationärphase. Ectoin wird demnach

vermehrt in der Stationärphase zu Hydroxyectoin umgewandelt, unabhängig ob osmotischer oder Thermostress die Ectoinsynthese induziert hatte. Die regulatorischen Grundlagen der wachstumsphasenabhängigen Induktion der Hydroxyectoinsynthese sind unbekannt, könnten aber auf einer stationärphasenabhängigen Aktivierung der Ectoinhydroxylase auf transkriptioneller oder translationeller Ebene beruhen.

Bisher konnte die hitzeinduzierte Synthese von kompatiblen Soluten auch in hyperthermophilen *Archaea* der Genera *Thermococcus* (Lamosa *et al.* 1998) und *Pyrococcus* (Martins und Santos 1995) und in dem thermophilen Bakterium *Rhodothermus marinus* (Silva *et al.* 1999) beobachtet werden. *R. marinus* akkumuliert  $\alpha$ -Mannosylglyceramid bei hoher Osmolalität und optimaler Wachstumstemperatur (65°C), während  $\alpha$ -Mannosylglycerat das dominant akkumulierte kompatible Solut unter hohen Wachstumstemperaturen (77,5°C) ist und  $\alpha$ -Mannosylglyceramid nicht mehr nachgewiesen werden kann (Silva *et al.* 1999). Die Aktivität der Mannosylglyceratsynthese wird in *R. marinus* durch Temperaturen oberhalb seiner optimalen Wachstumstemperatur gesteigert (Martins *et al.* 1999). Vermutlich besitzt  $\alpha$ -Mannosylglycerat besondere thermoprotektive Eigenschaften, da es nur von thermophilen Bakterien unter Hitzestress, der für mesophile Bakterien letalen ist, akkumuliert wird.

Neben Akkumulation von Ectoin und Hydroxyectoin durch endogene Synthese ist *St. coelicor* auch in der Lage, beide Solute bei hoher Temperatur aus exogenen Quellen mittels Transport aufzunehmen (Abb. 43). Dabei vermittelte eine Mischung beider Tetrahydropyrimidine *St. coelicolor* einen optimalen Schutz vor hoher Temperatur im Vergleich zu nur einem exogen zugeführten kompatiblen Solut (Abb. 43), was vermutlich auf unterschiedlichen thermoprotektiven Eigenschaften beider Solute beruht. *St. coelicolor* muss demnach mindestens ein Transportsystem besitzen, das bei hoher Temperatur beide Tetrahydropyrimidine aufnehmen kann. Auch *E. coli*, der Ectoine nicht *de novo* synthetisieren kann, konnte durch die exogene Gabe von Ectoin und/oder Hydroxyectoin thermoprotectiert werden (Malin und Lapidot 1996) und besitzt daher auch Transportsysteme, die die Aufnahme beider Ectoine bei Hitze vermitteln. Die Akkumulation beider Solute im Zytoplasma der *E. coli* Zellen bei 44°C konnte durch <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie nachgewiesen werden (Malin und Lapidot 1996). Im Gegensatz dazu ist in *E. coli* keine verstärkte Cholinaufnahme und daher keine erhöhte Glycin Betain Synthese unter Hitzestress festzustellen (Caldas *et al.* 1999). In *Lactococcus lactis* konnte die thermoinduzierte Aufnahme von Glycin Betain in Transportmessungen beobachtet werden (Guillot *et al.* 2000). Die aufgenommene Glycin Betain Menge verdreifachte sich, wenn das Bakterium bei 40°C anstatt bei 30°C inkubiert wurde (Guillot *et al.* 2000).

Die hitzeabhängige Regulation der Synthese und des Transportes osmotischer Schutzsubstanzen ist, wie auch bei hochosmolaren Bedingungen, bisher auf molekularer Ebene unverstanden. Eine Senkung der Wasseraktivität durch Temperaturerhöhung kann thermodynamisch für ein geschlossenes System ausgeschlossen werden, da eine Temperaturerhöhung zu einer

---

Erhöhung des spezifischen Aktivitätskoeffizienten und daher sogar zu einem leichten Anstieg der Wasseraktivität im Medium führen kann (Kap. 3.1 Diskussion).

Bei hohen Temperaturen verändert sich die Zytoplasmamembran und wird fluider (Sajbidor 1997; Vigh *et al.* 1998). Die Änderungen in der Membranfluidität könnten, wie unter hochosmolaren Bedingungen und bei Kälte, eine Konformationsänderungen einer membrangebundenen Sensorkinase bewirken, die die *ectABCD* Gene in *St. coelicolor* aktiviert.

Eine erhöhte Thermotoleranz konnte in zahlreichen Bakterien wie *E. coli* (Gross 1996), *B. subtilis* (Hecker *et al.* 1996) und *St. coelicolor* (Guglielmi *et al.* 1991) durch die Induktion der Hitzeschockantwort beobachtet werden, die die Synthese zahlreicher Proteine wie Chaperonen und Proteasen umfasst. Die Hitzeschockproteine sorgen für das Überleben der Zelle bei einer plötzlichen Erhöhung der Temperatur, indem sie die Aggregation von denaturierten Proteinen durch erneutes Falten verhindern oder fehlgefaltete Proteine abbauen. In *E. coli* und *B. subtilis* konnte, im Gegensatz zur Kälteschockantwort, gezeigt werden, dass die alternativen Transkriptionsfaktoren  $\sigma^H$  bzw.  $\sigma^B$  an der Expression zahlreicher Hitzeschockproteine beteiligt sind (Gross 1996; Hecker *et al.* 1996; Hengge-Aronis 1996; Arsene *et al.* 2000). Es wäre denkbar, dass auch die Transkription der *ectABCD* Gene in *St. coelicolor* durch einen alternativen, hitzeaktivierten Transkriptionsfaktor reguliert wird oder dass ein Hitzeschockprotein als Regulator für die Synthese der Ectoine wirkt.

Kompatiblen Soluten kommt bei Hitze in wechselwarmen Bakterien eine besondere Funktion zu, da sich durch die Erwärmung der Umgebung auch das Zytoplasma erwärmt und Zellbestandteile denaturieren. Dies ist bedingt durch Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen bei hoher Temperatur und Schwächung der hydrophobe Wechselwirkungen; beide Effekte führen zur Erhöhung der Wärmekapazität, die die Denaturierung von Proteinen bei Hitze fördert (Privalov und Gill 1988; Jaenicke 1990). Die intrazelluläre Wirkungsweise kompatibler Solute wie Ectoin und Hydroxyectoin als Thermoprotektiva kann, wie bei hyperosmolarem Stress und Kältestress, am treffendsten durch den bevorzugten Ausschluss der Solute von der Proteinhydrathülle beschrieben werden, die die globuläre dreidimensionale Faltung von Proteinen thermodynamisch begünstigt und somit stabilisiert (Arakawa und Timasheff 1985) (Kap. 2 Einleitung).

Eine weitere thermoprotektive Wirkung von kompatiblen Soluten, auch als die eines chemischen Chaperones bezeichnet (Tatzelt *et al.* 1996), konnte in einer *E. coli* *dnak* Deletionsmutante beobachtet werden (Caldas *et al.* 1999). Exogen zugeführtes Glycin Betain und Cholin komplementierten dort den thermosensitiven Phänotyp der Mutante bei 42°C, so dass sie bei dieser Temperatur wachsen konnte (Caldas *et al.* 1999). Die molekularen Grundlagen der thermoprotektiven Wirkung von kompatiblen Soluten auf Chaperone bei einem Hitzeschock wurde kürzlich *in vivo* in *E. coli* und auch durch *in vitro* Experimente aufgeklärt (Diamant *et al.* 2001). Glycin Betain, das zunächst von *E. coli* unter hochosmolaren Bedingungen aus exogen zugeführtem Cholin synthetisiert worden war, verlieh den Zellen bei einem nachfolgenden Hitzeschock Thermoprotektion, die unter anderem auf einer Verringerung der *de novo* Proteinaggregation bei Hitze beruhte (Diamant *et al.* 2001). Durch *in vitro* Experimente konnte ein aktivierender Effekt der kompatiblen Solute Glycin

Betain, Trehalose, Prolin und Glycerin auf die Faltungsaktivität der molekularen Chaperone GroEL, DnaK und ClpB auf hitzedenaturierte Malatdehydrogenase nachgewiesen werden (Diamant *et al.* 2001). Vermutlich aktivieren niedrige Konzentrationen kompatibler Solute die molekularen Chaperone, indem sie die lokale Faltung der Chaperon-gebunden Polypeptide fördern und das native Endprodukt der Reaktion bei Hitze stabilisieren (Diamant *et al.* 2001).

In den oberen Bodenschichten, dem natürlichen Habitat von *St. coelicolor*, ist Hitzestress eng mit hochosmolaren Bedingungen gekoppelt, da Sonneneinstrahlung den Boden aufwärmt, zur Verdunstung von Wasser führt und daraus ein Anstieg der Osmolalität im Lebensraum des Bakteriums resultiert. Einen indirekten Beweis für die Verknüpfung von hochosmolar und hitzeinduzierter Stressantwort in zahlreichen Bakterien, Pilzen (Neidhardt *et al.* 1990) und in Streptomycceten (Flett *et al.* 1992) bieten die sogenannten „osmotically remedial“ Phänotypen thermosensitiver Mutanten. Es wird angenommen, dass die thermosensitiven Phänotypen durch die bei hochosmolaren Bedingungen synthetisierten Osmoprotektiva komplementiert werden (Csonka 1989). In *E. coli* wird der alternative Transkriptionsfaktor  $\sigma^S$  (RpoS,  $\sigma^{38}$ ), ein zentraler Modulator der Genexpression, auf posttranskriptioneller Ebene bei Hitze und hoher Osmolalität stabilisiert und sorgt für die Expression des *otsAB*-Operons bei Hitze und hypertonen Bedingungen (Hengge-Aronis *et al.* 1991; Muffler *et al.* 1996). Die codierten Enzyme OtsA (Trehalose-6-Phosphat-Synthetase) und OtsB (Trehalose-6-Phosphatase) sind für die Trehalosesynthese in *E. coli* verantwortlich. Trehalose ist das einzige endogen synthetisierte kompatible Solut in *E. coli* und wirkt sowohl osmoprotektiv als auch thermoprotektiv (Dinnbier *et al.* 1988; Hengge-Aronis *et al.* 1991; Muffler *et al.* 1996). Ebenfalls erhöhte sich durch die Voradaptation an hochosmolare Bedingungen das obere Wachstumstemperaturlimit von *Salmonella typhimurium* von 43°C auf 45°C (Fletcher und Csonka 1998; Fletcher *et al.* 2001). Die Ursache für die erhöhte Thermotoleranz durch Adaptation an hohe Osmolalität in *Salmonella typhimurium* ist die sowohl durch hohe Osmolalität als auch durch Hitze induzierte Trehalosesynthese (Canovas *et al.* 2001).

Die endogene Synthese kompatibler Solute und deren effiziente Aufnahme aus exogenen Quellen durch Transportsysteme erscheint besonders für Bakterien, die Habitate fluktuierender Osmolalität und starker Temperaturschwankungen bewohnen, sinnvoll, da diese Solute der durch die unterschiedlichen Stressfaktoren ausgelösten Zellveränderungen entgegenwirken. Für eine differenzierte und genau auf die vorherrschende Osmolalität und Temperatur abgestimmte intrazelluläre Akkumulation kompatibler Solute ist eine regulatorische Verknüpfung der einzelnen Signalwege unerlässlich.

## 4 Ectointransport in Bakterien

Neben der *de novo* Synthese kompatibler Solute können Mikroorganismen über spezielle Transportsysteme diese Solute aus der Umwelt im Zytoplasma akkumulieren. Der Transport wird generell gegenüber der Neusynthese bevorzugt, da er energetisch günstiger ist. Im Habitat Boden liegen kompatible Solute in variablen Mengen und unterschiedlichsten Kombinationen vor. Die Konzentrationen von Ectoin und Hydroxyectoin in den oberen Bodenschichten ist nicht bekannt, aber da Bakterien die bisher einzigen Organismen sind, die Ectoin und sein Hydroxyderivat synthetisieren können, dürften die Konzentrationen der beiden Tetrahydropyrimidine im Boden vergleichsweise gering sein. Wahrscheinlich gelangen Ectoine hauptsächlich nach einem hypoosmotischen Schock durch Expulsion oder Zellyse aus den Bakterienzellen in die Umgebung bodenbewohnender Mikroorganismen. Daher ist es besonders wichtig, dass Bakterien effektive Transportsysteme für die Aufnahme von Ectoin und Hydroxyectoin besitzen, um diese unter Stressbedingungen in entsprechend hohen Konzentrationen im Zytoplasma zu akkumulieren. Die Relevanz von Ectoinen als Stressprotektiva wird durch den Transport dieser kompatiblen Solute unter hochosmolaren Bedingungen in zahlreichen, nicht-ectoinsynthetisierenden Bakterien deutlich. So verleiht exogen vorhandenes Ectoin durch Akkumulation in der Zelle via Transport *E. coli* (Jebbar *et al.* 1992; Malin und Lapidot 1996), *B. subtilis* (Jebbar *et al.* 1997), *C. glutamicum* (Peter *et al.* 1998a), *Erwinia chrysanthemi* (Gouesbet *et al.* 1996), und *Sinorhizobium meliloti* (Talibart *et al.* 1994; Boscari *et al.* 2002) Schutz bei hochosmolaren Bedingungen. Da bisher der Ectointransport in einem Bakterium, das Ectoin auch endogen synthetisieren kann, nicht näher untersucht worden war, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Ectoinaufnahme in Gram-positiven, ectoinsynthetisierenden *Bacilli* eingehend analysiert.

### 4.1 Transport kompatibler Solute in *S. pasteurii*

Sowohl Ectoin und Hydroxyectoin als auch Glycin Betain und Carnitin werden von *S. pasteurii* als Osmoprotektiva genutzt, wenn sie exogen vorhanden sind (Abb. 13). Die Aufnahme von Glycin Betain wurde in *S. pasteurii* nur gering durch die Anwesenheit von Ectoin inhibiert (Abb. 14), daher müssen zwei unabhängige Transportsysteme für Glycin Betain und Ectoin in *S. pasteurii* arbeiten. Diesem Bakterium fehlt ein Homolog des hochaffinen und osmoregulierten OpuE Transporters aus *B. subtilis* (von Blohn *et al.* 1997), da exogen zugeführtes Prolin in *S. pasteurii* nicht als Osmoprotektivum wirkt (Abb. 13). *S. pasteurii* wird ebenfalls nicht durch Cholin osmoprotectiert und ist daher nicht in der Lage Cholin zu Glycin Betain umzuwandeln, wie dies verschiedenen Bakterien einschließlich *E. coli* (Lamark *et al.* 1991) und *B. subtilis* (Boch *et al.* 1996; Kappes *et al.* 1998) durch Oxidation von Cholin vermögen.

## 4.2 EctT: Ein osmotisch regulierter Ectoitransporter der BCCT-Transporterfamilie aus *V. pantothenicus*

Da *S. pasteurii* für genetische Untersuchungen des Transports von Tetrahydropyrimidinen nicht zugänglich war, wurde der Ectoitransport im genetisch manipulierbaren *V. pantothenicus*, der unter hochosmolaren Bedingungen das von ihm endogen synthetisierte kompatible Solut Ectoin auch aus exogenen Quellen aufnehmen kann (Abb. 21), eingehend charakterisiert. Transportexperimente mit radioaktiv markiertem Ectoin zeigten, dass in *V. pantothenicus* der Ectoitransport osmotisch stimuliert ist und unter isoosmolaren Bedingungen kein Ectoitransport messbar ist (Abb. 32) (Abb. 33). Mittels funktioneller Komplementation in *E. coli* war es möglich, ein chromosomales DNA-Fragment aus *V. pantothenicus* zu isolieren, das das Gen für den Ectoitransporter EctT enthielt. Bei EctT handelt es sich um einen Einzelkomponententransporter, dessen Hauptsubstrate unter hochosmolaren Bedingungen im heterologen Wirt *E. coli* (Abb. 28) und in *V. pantothenicus* Ectoin und Hydroxyectoin sind (Abb. 30). Eine *V. pantothenicus ectT*-Mutante ist nicht mehr in der Lage, bei hoher Osmolalität Ectoin aus exogenen Quellen durch Transport zu akkumulieren (Abb. 30). EctT ist somit der einzige Transporter für die Ectoinaufnahme unter hochosmolaren Bedingungen in *V. pantothenicus*. Die zentrale Rolle von EctT bei der Aufnahme von Ectoin und Hydroxyectoin bei hoher Osmolalität wurde durch Wachstumsexperimente bei 1,6 M NaCl in Anwesenheit von Ectoin oder Hydroxyectoin demonstriert. Unter diesen Bedingungen hat die *ectT*-Mutante einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber dem *V. pantothenicus* Wildtyp, der sowohl Ectoin als auch Hydroxyectoin transportieren kann und daher osmoprotectiert wird (Abb. 30). Auch *B. subtilis* besitzt einen osmotisch regulierten Transporter für das von ihm endogen synthetisierte kompatible Solut Prolin. OpuE transportiert ausschließlich Prolin unter hochosmolaren Bedingungen (von Blohn *et al.* 1997). Im Gegensatz zur Situation in *V. pantothenicus* ist eine *B. subtilis opuE*-Mutante aber auch unter isoosmolaren Bedingungen in der Lage, Prolin zu transportieren (von Blohn *et al.* 1997). Die Prolinpermease PutP aus *B. subtilis* ist für diese osmotisch nicht stimulierbare Aufnahme von Prolin als C- und N-Quelle verantwortlich (Moses 1999). *V. pantothenicus* aber, der nicht in der Lage ist Ectoin für metabolische Zwecke zu nutzen (Kap. 5 Ergebnisse), benötigt vermutlich kein weiteres nicht-stress induziertes Ectoinaufnahmesystem.

Datenbankanalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz von EctT ergaben, dass EctT Mitglied der Betain Cholin Carnitin-Transporterfamilie (BCCT) ist (Kappes *et al.* 1996; Saier *et al.* 1999). Dieser kleinen, aber mit fortschreitender Genomsequenzierung von Mikroorganismen wachsenden Transporterfamilie gehören die physiologisch und molekular eingehend charakterisierten bakteriellen Transporter OpuD aus *B. subtilis* (Kappes *et al.* 1996), BetP und EctP aus *C. glutamicum* (Peter *et al.* 1998b), BetL aus *L. monocytogenes* (Sleator *et al.* 1999), BetS aus *Si. meliloti* (Boscari *et al.* 2002) und BetT (Lamark *et al.* 1991) und CaiT (Eichler *et al.* 1994) aus *E. coli* an. Darüber hinaus zeigt EctT hohe Sequenidentitäten zu potentiellen BCCT-Transportern in den vollständig sequenzierten Genomen von *B. halodurans* (Takami *et al.* 2000) und *Vibrio cholerae* (Heidelberg *et*

al. 2000), die beide auch Ectoinsynthesegencluster besitzen (Tab. 18), sowie zu den putativen BetP Proteinen aus *Haemophilus influenza* (Fleischmann *et al.* 1995) und *Mycobacterium tuberculosis* (Philipp *et al.* 1996). Während CaiT an der nicht-osmotisch regulierten Carnitinaufnahme für metabolische Zwecke beteiligt ist (Eichler *et al.* 1994), ist die Aufnahme der methylierten Aminosäurederivate durch die charakterisierten Mitglieder der BCCT-Familie osmotisch reguliert (Tab. 18).

Proteine der BCCT-Familie variieren in der Länge zwischen 481 und 706 Aminosäuren, wobei Länge und Aufbau der zwölf Transmembranbereiche annähernd identisch sind. Dagegen sind aber die C- und N-terminalen, vermutlich zytoplasmatisch orientierten Anhänge in ihrer Länge sehr verschieden (Tab. 18). BCCT-Transporter werden durch protonenmotorische Kraft, den Symport von Na<sup>+</sup>-Ionen, energetisiert (Saier *et al.* 1999; Rübenhagen *et al.* 2000; Saier 2000). Bisher konnten BCCT-Transporter nur in Bakterien identifiziert werden (Saier *et al.* 1999). EctT ist der einzige Transporter dieser Familie, dessen Hauptsubstrat keine trimethylierte Ammoniumverbindung wie Glycin Betain, Carnitin oder Cholin ist, sondern der ausschließlich die Tetrahydropyrimidine Ectoin und Hydroxyectoin transportiert. Ectoin wird unter hochosmolaren Bedingungen mit hoher Affinität und Effektivität durch EctT in *V. pantothenicus* aufgenommen, wie ein K<sub>m</sub>-Wert von 5 ± 0,6 µM und eine V<sub>max</sub>-Wert von 32 ± 4 nmol Ectoin (min\*Protein)<sup>-1</sup> belegen. Der EctT-vermittelte Ectointransport läuft deutlich effektiver ab als in EctP, einem BCCT-Transporter aus *C. glutamicum*, der neben Ectoin mit einem K<sub>m</sub>-Wert von 63 µM auch Glycin Betain und Prolin transportieren kann (Peter *et al.* 1998b). Daher ist die gemeinsame funktionelle Eigenschaft von Transportern der BCCT-Familie die Aufnahme methylierter Aminosäurederivate, wobei die meisten Transporter ein enges Substratspektrum für ein oder zwei Moleküle besitzen. Auf der Suche nach strukturellen Merkmalen, die für die methylierte Aminosäurederivat Spezifität von BCCT-Transportern verantwortlich sind, fielen eine große Anzahl von hoch konservierten aromatischen Aminosäureresten in den Transmembranbereichen 8 und 9 und des verbindenden zytoplasmatische Loops auf (Kappes *et al.* 1998; Peter *et al.* 1998a). Auch in EctT konnten diese konservierten aromatischen Aminosäurereste, die fünf Tryptophane (Trp, W), drei Phenylalanine (Phe, F) und ein Tyrosin (Tyr, Y) umfassen, vor allem in der potentiellen Transmembranhelix 8 identifiziert werden (Kap. 10.3 Ergebnisse) (Abb. 27). Der mögliche, an der Bindung von methylierten Aminosäurederivaten beteiligte Mechanismus durch aromatische Aminosäuren konnte kürzlich durch die Kristallisation des periplasmatischen Substratbindeproteins ProX des osmotisch regulierten Glycin Betain ABC-Transporters ProU aus *E. coli* aufgeklärt werden (Breed *et al.* 2001). Das ProU Transportsystem vermittelt neben der Glycin Betain Aufnahme auch die zytoplasmatische Akkumulation von strukturell verwandten Aminoverbindungen und Ectoin unter hochosmolaren Bedingungen (Jebbar *et al.* 1992; Csonka und Epstein 1996; Cosquer *et al.* 1999). Die Kristallisation von ProX wurde mit dem gebundenen Substrat Glycin Betain durchgeführt und die Kristallstruktur offenbarte, wie kompatible Solute, deren proteinstabilisierende Wirkung auf ihrem bevorzugten Ausschluss von der Proteinoberfläche beruht (Arakawa und Timasheff 1985; Qu *et al.* 1998; Bolen 2001), dennoch von substratbindenden

Proteinen mit hoher Affinität gebunden werden. An der Glycin Betain Bindung im aktiven Zentrum von ProX sind drei Tryptophanreste beteiligt, wobei der Rest Trp 188 essentiell für die Bindung ist und die beiden anderen Tryptophanreste Glycin Betain in dieser Bindung stabilisieren (Bremer und Bösser pers. Mitteilung). ProX gebundenes Glycin Betain wird zum integralen Membranprotein ProW des Transportsystems transferiert und die membranlokalisierte ATPase ProV energetisiert die Translokation des Substrates durch ProW (Gowrishankar 1988). Glycin Betain wird durch Kationen- $\pi$ -Interaktionen im aktiven Zentrum von ProX gebunden (Bremer pers. Mitteilung). Die positive Partialladung der trimethylierten Ammoniumgruppe von Glycin Betain bindet an die delokalisierten  $\pi$ -Elektronenwolken der aromatischen Tryptophanreste (Bremer pers. Mitteilung). Diese nicht-kovalente Interaktion kann als elektrostatische Anziehung zwischen einer positiven Ladung und dem Quadrupolmoment des Aromaten definiert werden (Dougherty 1996). In zahlreichen biologischen Systemen konnten Kationen- $\pi$ -Interaktionen bei der Erkennung und Bindung von Kationen und Molekülen mit positiver Partialladung durch die Interaktion mit den aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Trp, Phe und Tyr nachgewiesen werden (Dougherty 1996; Ma und Dougherty 1997).

*Ab initio* Kalkulationen des Hauptsubstrats von EctT, Ectoin, in wässriger Lösung haben gezeigt, dass Ectoin in zwei Konformationen vorliegen kann, die beide ein Dipolmoment besitzen (Suenobu *et al.* 1998). Ectoin besitzt demnach in beiden möglichen Konformationen eine positive Partialladung am methylierten C5 (Suenobu *et al.* 1998), das als Kation für die Interaktion mit den aromatischen Aminosäureresten der Helix 8 und 9 im BCCT-Transporter dienen könnte. Der Transport von Ectoin durch EctT wird vermutlich durch den Symport von  $\text{Na}^+$  energetisiert, wie auch für BetP und BetS beschrieben (Rübenhagen *et al.* 2000; Boscari *et al.* 2002). Das Kation  $\text{Na}^+$  kann auch durch Interaktion mit dem  $\pi$ -Elektronensystem der konservierten Tryptophanreste gebunden werden, da die berechnete Bindungsenergie höher ist (Indol (Trp) 32 kcal/mol) als die Energie für die  $\text{Na}^+$ -Bindung an ein Wassermolekül (18 kcal/mol) (Dougherty 1996; Ma und Dougherty 1997). Durch die Kation- $\pi$ -Interaktionen kann die Bindung von partiell positiv geladenen kompatiblen Soluten in den substratbindenden, aus aromatischen Aminosäuregruppen bestehenden Regionen von Transportsystemen erklärt werden. Die molekularen Grundlagen für die hohe Spezifität von EctT für Tetrahydropyrimidine bleibt aber ungeklärt.

#### 4.2.2 Der Ectointransport durch EctT unterliegt einer dualen osmotischen Kontrolle

Die Aufnahme des kompatiblen Soluts Ectoin verleiht *V. pantothenicus* einen Schutz gegenüber hochosmolaren Umweltbedingungen (Abb. 30). Dabei vermittelt der BCCT-Transporter EctT allein den Ectointransport bei hoher Osmolalität (Abb. 32). Durch die hohe Affinität des EctT-Aufnahmesystems für Ectoin (Kap. 11.3 Ergebnisse) ist *V. pantothenicus* in der Lage, auch geringste Mengen exogenen Ectoins unter osmotischem Stress zu nutzen. Die Aktivität des EctT Systems wird

entscheidend von der Osmolalität der Umgebung kontrolliert. Während in osmotisch ungestressten Zellen kein Ectoitransport stattfindet, wird durch die Zugabe ionischer oder nicht-ionischer Osmolyte die Ectoinaufnahme in *V. pantothenicus* stimuliert (Abb. 32). Die Aktivierung des Ectoitransports durch EctT ist daher ein „echter“ osmotischer Effekt, der sowohl auf der Aktivierung des EctT Proteins als auch auf der genetischen Kontrolle der *ectT*-Expression beruht.

Der Glycin Betain Transporter BetP aus *C. glutamicum* zählt neben BetS, BetT, OpuD und EctT (Abb. 37) zu den Mitgliedern der BCCT-Proteinfamilie, die erwiesenermaßen durch einen hyperosmolaren Schock posttranslational aktivierbar sind (Wood 1999). Experimente in Proteoliposomen haben gezeigt, dass BetP als Osmosensor und Osmoregulator für die Glycin Betain Aufnahme fungiert (Rübenhagen *et al.* 2000) und über die interne Kaliumionenkonzentration reguliert wird (Rübenhagen *et al.* 2001). Weiterhin konnten eine direkte osmotische Regulation von BetP durch Membran Interaktionen und die Lipidzusammensetzung der Membran beobachtet werden (Rübenhagen *et al.* 2000). Leider sind diese Ergebnisse auf die posttranslationale Aktivierung von EctT nur bedingt zu übertragen, da EctT wie OpuD vermutlich N-terminal keinen Anhang und C-terminal eine wesentlich kürzere Erweiterung als BetP besitzt, und diese Bereiche für die Sensor- und Regulatorfunktion von BetP verantwortlich sind (Peter *et al.* 1998a). Deletionsanalysen zeigten nämlich, dass der 55 Aminosäurereste lange, positiv geladene C-terminale Anhang von BetP für den osmotisch regulierten Glycin Betain Transport unbedingt erforderlich ist. Dem negativ geladenen, 62 Aminosäuren umfassenden N-Terminus kommt eine wichtige Funktion für das Osmosensing zu, da seine Deletion in einem verkürzten BetP Protein resultierte dessen maximale Aktivierung zu höheren Osmolalitäten hin verschoben war (Peter *et al.* 1998a).

Der transkriptionelle Beitrag zur osmotischen EctT-Regulation konnte durch Northern Blot- und Primer Extension-Analysen charakterisiert werden. In osmotisch ungestressten *V. pantothenicus* Kulturen konnte, wie durch die Transportmessungen zu erwarten (Abb. 32), kein *ectT*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 36). Nach einem hyperosmotischen Schock erreichte die Transkription von *ectT* innerhalb von 10 Minuten ihre maximale Stärke, sank innerhalb von 2 Stunden auf ungefähr 40% ihres Maximums ab und blieb konstant auf diesem Niveau, solange der osmotische Stress andauerte (Abb. 36). Die transient regulierte Transkription von *ectT* nach einem hyperosmolaren Schock ähnelte der von *B. subtilis* Genen, deren Expression vom alternativen Transkriptionsfaktor  $\sigma^B$  reguliert wird (Hecker und Völker 2001).  $\sigma^B$  vermittelt in *B. subtilis* die Expression von über 150 Genen. Die Aktivierung dieses Regulons vermittelt den Zellen eine präventive, unspezifische Resistenz gegenüber einer Reihe ungünstiger Umweltbedingungen. Zwei Klassen von Umweltsignalen induzieren  $\sigma^B$  auf unterschiedlichen Wegen: (i) Umweltstressfaktoren wie Hitze, massive pH-Änderungen, hohe Ethanolkonzentrationen und hohe Osmolalität üben physikalischen Stress auf die Zellen aus, zum anderen (ii) wird  $\sigma^B$  durch Signale aus dem Energiehaushalt der Zellen wie Kohlenstoff-, Phosphat-, und Sauerstoffmangel induziert. Im Gegensatz zu einer ausschließlich  $\sigma^B$ -abhängigen, transienten Transkription wurde die Expression von *ectT* auch in osmotisch

	-35		-10
$\sigma^B$ Konsensus	GTTTAA - 13-15 bp - GGGTAT		
<i>ectT</i>	GTTTAA - 13 bp -		GGGTAT
<i>opuD</i> (P2)	GTTTTG - 17 bp -		GGGTAT
<i>opuE</i> (P2)	GTTTCA - 16 bp -		GGGAAT

**Abb. 48** Vergleich  $\sigma^B$ -abhängiger Promotoren aus *B. subtilis* und *V. pantothenicus* mit der Konsensussequenz  $\sigma^B$ -abhängiger Promotoren aus *B. subtilis*

Die -35 und die -10 Region der jeweiligen Promotoren sind grau unterlegt.

adaptierten *V. pantothenicus* Zellen aufrechterhalten und fiel nicht auf das Basalniveau ab. Die transkriptionelle Regulation von *ectT* in *V. pantothenicus* war mit der Expression der Strukturgene für die osmotisch regulierten Transporter OpuE und OpuD aus *B. subtilis* vergleichbar. Die Induktion der Transkription direkt nach einem hyperosmolaren Schock wurde auch für den Prolintransporter OpuE und den Glycin Betain Transporter OpuD beobachtet, die Transkription beider Strukturgene wurde aber auch in hyperosmolar adaptierten *B. subtilis* Zellen aufrechterhalten (von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter und Bremer 1998; Spiegelhalter 1999). Die molekularen Grundlagen für diese Regulation lagen in einer Verknüpfung der  $\sigma^B$ -abhängigen generellen Stressantwort und der spezifischen  $\sigma^A$ -abhängigen Anpassung an hochosmolare Bedingungen in *B. subtilis*. Beide Transporter unterlagen einer zweifachen Kontrolle durch zwei Promotoren, wobei jeweils der stromabwärtsgelegene Promotor (P1) von der RNA-Polymerase mit dem vegetativen Sigmafaktor  $\sigma^A$  (Abb. 47) und der stromaufwärtsgelegene Promotor (P2) von  $\sigma^B$  erkannt wurde (Abb. 48) (von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter und Bremer 1998; Spiegelhalter 1999).

Die Induktionsprofile von *opuD* und *opuE* bei verschiedenen Stressfaktoren einschließlich einem hyperosmolaren Schock waren typisch  $\sigma^B$ -abhängig, *opuD* und *opuE* blieben aber unter hochosmolaren Bedingungen weiter durch die  $\sigma^A$ -kontrollierte Transkription induziert (von Blohn *et al.* 1997; Spiegelhalter und Bremer 1998; Spiegelhalter 1999). Durch Primer Extension-Analyse konnte in *V. pantothenicus* aber nur ein potentieller Promotor identifiziert werden, der allein für die Transkription von *ectT* nach einem hyperosmotischen Schock verantwortlich war (Abb. 34). Die Sequenz des potentiellen Promotors von *ectT* in *V. pantothenicus* stimmte genau mit der

Konsensussequenz eines  $\sigma^B$ -abhängigen Promotors in *B. subtilis* überein (Abb. 48). Die transkriptionelle Regulation von *ectT* durch ein  $\sigma^B$ -Homolog in *V. pantothenicus* wurde durch eine Primer Extension-Analyse der *ectT*-Promotorregion in heterologen Wirt *B. subtilis* bestätigt (Abb. 35). Im *B. subtilis* Wildtyp erfolgte die Transkription von *ectT* nach einem hyperosmolaren Schock durch den gleichen Promotor wie in *V. pantothenicus*, der aber in einer *B. subtilis sigB* Mutante nicht erkannt wurde (Abb. 35). Das Fehlen eines *ectT* Transkriptes in osmotisch adaptierten *V. pantothenicus* und *B. subtilis* Kulturen ist auf die Instabilität der Transkripte von Shuttle-Plasmiden zurückzuführen, in die die *ectT*-Promotorregion kloniert worden war, um aussagekräftige Primer Extension-Analysen in *V. pantothenicus* und *B. subtilis* durchzuführen. Diese Instabilität von Shuttle-Plasmid Transkripten wurde auch wiederholte Male für Transkripte von *B. subtilis* Genen in vergleichbaren Experimenten beobachtet (Bremer pers. Mitteilung). Weiterhin zeigt die Northern Blot-Analyse der *ectT*-Transkription in *V. pantothenicus* die Induktion von *ectT* auch in osmotisch adaptierten Zellen, und da die Primer Extension-Analyse keinen weiteren, in osmotisch adaptierten Zellen von *V. pantothenicus* aktivierten, potentiellen Promotor offenbarte, ist auch für die Induktion der *ectT*-Transkription in hyperosmotisch angepassten Zellen allein der identifizierte  $\sigma^B$ -abhängige Promotor verantwortlich.

#### 4.2.3 Ein Homolog des alternativen Transkriptionsfaktors $\sigma^B$ reguliert die *ectT*-Expression in *V. pantothenicus*

Die Primer Extension-Analysen der *ectT*-Promotorregion in *V. pantothenicus* und *B. subtilis* haben gezeigt, dass ein Homolog des alternativen Transkriptionsfaktors  $\sigma^B$  in *V. pantothenicus* für die transkriptionelle Kontrolle der *ectT*-Expression direkt nach einem hypoosmotischen Schock und in hochosmotisch adaptierten Zellen verantwortlich ist. Die genaue Übereinstimmung zwischen der Konsensussequenz der  $\sigma^B$ -abhängiger Promotoren aus *B. subtilis* und des *ectT*-Promotors aus *V. pantothenicus* und die Erkennung der Promotorregion durch  $\sigma^B$  in *B. subtilis* lassen auf strukturelle Gemeinsamkeiten beider Transkriptionsfaktoren besonders in den beiden Regionen für die Erkennung der -35 und -10 Hexamere schließen (Helman und Chamberlin 1988). Die Transkription von *ectT* wird nach einem hyperosmotischen Schock transient induziert, darüber hinaus wird das  $\sigma^B$  Homolog in *V. pantothenicus* wie in *B. subtilis* durch Ethanolstress aktiviert (Abb. 34). Neben strukturellen Gemeinsamkeiten ist auch die Regulation des  $\sigma^B$  Homolog in *V. pantothenicus* in einigen Punkten mit der Regulation von  $\sigma^B$  in *B. subtilis* vergleichbar, unterscheidet sich aber grundlegend in der andauernden Aktivität des Transkriptionsfaktors unter hochosmolaren Bedingungen. Die Induktion von  $\sigma^B$  in *B. subtilis* wird durch die freie Verfügbarkeit des Sigmafaktors durch zwei sequentiell verbundene Partnertausch-Module kontrolliert (Hecker und Völker 2001). Die zentrale Rolle spielt dabei der Anti-Sigmafaktor RsbW, der entweder vom Anti-Anti-Sigmafaktor RsbV komplexiert wird oder den Sigmafaktor bindet. Durch die Bindung an RsbW wird  $\sigma^B$  inaktiviert (Benson und Haldewang 1993). Kritisch für die Kontrolle dieser Bindung ist der

Phosphorylierungsstatus von RsbV. Wird nach Stresseinwirkung der Anti-Anti-Sigmafaktor durch die Phosphatase RsbU dephosphoryliert, bindet er den Anti-Sigmafaktor, wodurch  $\sigma^B$  freigesetzt wird und zur Bildung von RNAP/ $\sigma^B$ -Komplexen zur Verfügung steht (Völker *et al.* 1995). Eine positive Autoregulation über den  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor des *sigB*-Operons verstärkt daraufhin die transiente Induktion des alternativen Sigmafaktors (Benson und Haldewang 1993; Boylan *et al.* 1993). Die Kinase-Aktivität des Anti-Sigmafaktors RsbW ist an der Aufhebung des induzierten Zustandes beteiligt, der sich durch die Phosphorylierung des Anti-Anti-Sigmafaktors von diesem befreit und wieder zur  $\sigma^B$ -Inaktivierung verfügbar ist. Außerdem wird gemeinsam mit  $\sigma^B$  der negative Regulator RsbX induziert, der ebenfalls im *sigB*-Operon codiert ist. RsbX bewirkt indirekt die Inhibierung der Phosphatase RsbU und trägt somit zur Wiederherstellung der kritischen Phosphorylierung des Anti-Anti-Sigmafaktors bei.

In *V. pantothenicus* ist das  $\sigma^B$  Homolog allein in der Lage, das Expressionsmuster von *ectT* an die verschiedenen physiologischen Bedürfnisse der Zelle anzupassen: Einerseits kann die Ectoinaufnahme direkt nach einem hyperosmotischen Schock durch die transiente Transkription rasch initiiert werden, andererseits wird die Ectoinaufnahme in Abhängigkeit zur Höhe der externen Osmolalität kontinuierlich aufrechterhalten, solange hochosmolare Bedingungen vorliegen. Mittlerweile konnten in einer Vielzahl Gram-positiver, aerober Bakterien wie *B. licheniformis* (Brody und Price 1998), *B. anthracis* (Fouet *et al.* 2000), *L. monocytogenes* (Becker *et al.* 1998), *Staphylococcus aureus* (Wu *et al.* 1996) und *St. coelicolor* (Cho *et al.* 2001) sowie in Cyanobakterien (Kaneko *et al.* 1996a, 1996b; Bhaya *et al.* 1999) Homologe von  $\sigma^B$  aus *B. subtilis* identifiziert werden (Hecker und Völker 2001). Die genetische Organisation der  $\sigma^B$  Gencluster aus *S. aureus* und *B. anthracis* weisen bemerkenswerte Unterschiede zum *sigB*-Operon aus *B. subtilis* auf, da ihnen regulatorische Proteine wie der negative Regulator des  $\sigma^B$ -Aktivität RsbX fehlen (Wu *et al.* 1996; Kullik und Giachino 1997; Fouet *et al.* 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass selbst in nah verwandten *Bacillaceae* das *sigB*-Operon vermutlich unterschiedlich reguliert ist und somit die durch  $\sigma^B$  Homologe vermittelte generelle Stressantwort in den einzelnen Spezies, wie in *V. pantothenicus* beobachtet, variieren kann.

Das  $\sigma^B$  Homolog in *L. monocytogenes* scheint neben der Vermittlung der generellen Stressantwort auch eine zentrale Funktion bei der spezifischen Anpassung an hochosmolare Bedingungen zu erfüllen. Das im Gram-positiven, pathogenen Bakterium *L. monocytogenes* identifizierte *sigB*-Operon zeigt in Organisation (*rsbVW-sigB-rsbX*) und DNA-Sequenz zahlreiche Übereinstimmungen mit dem *sigB*-Operon aus *B. subtilis* (Becker *et al.* 1998). So spielt das  $\sigma^B$  Homolog aus *L. monocytogenes* eine maßgebliche Rolle bei der Ausbildung der Toleranz gegen niedrigen pH-Wert (Wiedmann *et al.* 1998), oxidativen Stress und Kohlenstofflimitation (Ferreira *et al.* 2001), ebenso ist es an der Anpassung an hohe Osmolalität beteiligt (Becker *et al.* 1998). Die möglicherweise entscheidende Funktion von  $\sigma^B$  bei der Koordination der physiologischen Anpassung

an hochosmolare Bedingungen in *L. monocytogenes* wurde von der wesentlich stärkeren Stimulation des  $\sigma^B$ -abhängigen Promotors des *sigB*-Operons durch die Zugabe von NaCl als durch Hitze-, Säure-, Ethanol- oder oxidativen Stress abgeleitet (Becker *et al.* 1998). Weiterhin ist die Nutzung von Glycin Betain und Carnitin in einer *sigB* Mutante beeinträchtigt. Transportversuche mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Glycin Betain zeigten, dass für eine Stimulation des Transportes durch erhöhte Osmolalität ein intaktes *sigB* erforderlich ist (Becker *et al.* 1998). Im Einklang hiermit wird ein potentieller  $\sigma^B$ -abhängiger Promotor stromaufwärts des Strukturgens für den Glycin Betain Transporter BetL aus *L. monocytogenes*, der wie EctT zur Familie der BCCT-Transporter gehört, vermutet (Sleator *et al.* 1999). Bisher konnte die  $\sigma^B$ -regulierte Expression von *betL* nicht experimentell bestätigt werden, aber die im Northern Blot nach einem hyperosmotischen Schock beobachtete Induktion der *betL* Transkription deutet auf eine  $\sigma^B$ -abhängige Regulation hin (Sleator *et al.* 2000). Kürzlich konnte in physiologischen Experimenten gezeigt werden, dass die Glycin Betain Aufnahme durch BetL in *L. monocytogenes* durch einen hochosmolaren Schock schnell stimulierbar ist, der Glycin Betain Transport unter länger andauernden hyperosmolaren Bedingungen aber durch ein zweites Aufnahmesystem, den ABC-Transporter Gbu, erfolgt, was wiederum auf eine transiente Aktivierung von BetL schließen lässt (Sleator *et al.* 1999; Sleator *et al.* 2000; Mendum und Smith 2002).

#### 4.2.4 Die Funktion von EctT für den Ectoinefflux unter hochosmolaren Bedingungen

Die gleichzeitige Aktivität von *ectT* und *ectABC* unter hochosmolaren Bedingungen ist in *V. pantothenicus* ausgesprochen sinnvoll, da dieses Bakterium wie *B. subtilis* und *Synechocystis* sp. das endogen synthetisierte kompatible Solut bei hoher Osmolalität an die Umgebung abgibt (Mikkat *et al.* 1996; Hagemann *et al.* 1997; von Blohn *et al.* 1997). Die *ectT*-Mutante AKV2 weist beim Wachstum unter hochosmotischen Bedingungen ohne exogenes Ectoin ein verringertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 30) (Kap. 11.6 Ergebnisse). Zusätzlich konnte im Kulturüberstand der hochosmolal gestressten *ectT*-Mutante AKV2 ungefähr doppelt so viel Ectoin detektiert werden als im Medium osmotisch gestresster Wildtyp Kulturen. Daher kann das endogen unter hochosmolaren Bedingungen synthetisierte und teilweise an das Medium abgegebene Ectoin durch die Deletion von *ectT* nicht mehr in das Zytoplasma zurücktransportiert werden, und der optimale osmotische Schutz der Zellen ist nicht mehr gewährleistet. Ebenfalls muss AKV2 größere Ectoinmengen synthetisieren, um selbst die verringerte intrazelluläre Ectoinkonzentration aufrecht zu erhalten (Kap. 11.6 Ergebnisse). AKV2 hat dadurch weniger Energie für das Wachstum unter osmotischem Stress zur Verfügung.

Der Reimport von osmotischen Schutzsubstanzen scheint im Rahmen der Osmoadaptation von zentraler Bedeutung zu sein, da in verschiedenen Bakterien für das endogen synthetisierte kompatible Solute auch ein effektives Transportsystem exprimiert wird. In *V. pantothenicus* erfolgt die

Aufnahme von exkretiertem Ectoin durch das Transportsystem EctT, dessen Transkription gleichzeitig mit der der Ectoinsynthesegene auch in Abwesenheit von exogenem Ectoin induziert wird (Abb. 36) (Abb. 21). Auch *B. subtilis* nimmt exportiertes Prolin über OpuE erneut in die Zelle auf, eine *opuE* Mutante besaß wegen fehlendem Prolinrücktransport unter hochosmolaren Bedingungen einen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp (von Blohn *et al.* 1997). *E. coli* synthetisiert *de novo* Trehalose bei hoher Osmolalität und kann in das Wachstumsmedium abgegebene Trehalose mit einer osmotisch stimulierten Trehalase zu Glukose spalten und diese wieder aufnehmen (Boos *et al.* 1987) Synthese, Efflux und Reimport des *de novo* produzierten kompatiblen Solut Glykosylglycerin konnte auch in *Synechocystis* sp. beobachtet werden (Hagemann *et al.* 1997). Dieses Bakterium exprimiert auch ein Substratbindeprotein-abhängiges Transportsystem für Glykosylglycerin, obwohl diese Substanz im natürlichen Habitat von *Synechocystis* vermutlich nicht vorhanden ist. Die Deletion des Transporters führte zu einem Glykosylglycerin Nettoefflux bei hoher Osmolalität (Hagemann *et al.* 1997). *Actinopolyspora halophila*, ein heterotrophes Bakterium, das Glycin Betain *de novo* aus einfachen Kohlenstoffverbindungen synthetisieren kann, produziert, exportiert und importiert Glycin Betain gleichzeitig bei osmotischem Stress (Nyysola und Leisola 2001). Da die *de novo* Synthese von Glycin Betain durch Methylierungen sehr kostspielig ist (Atkinson 1977), kommt dem „Recycling“ von synthetisiertem Glycin Betain durch Transport besonders große Bedeutung zu.

Der Efflux von osmotischen Schutzsubstanzen ist für verschiedene Bakterien beschrieben worden (Csonka 1988; Tschichholz und Trüper 1990; Koo *et al.* 1991; Lamark *et al.* 1992; Fischel und Oren 1993; Blum 1996; Glaasker *et al.* 1996a, 1996b; Hagemann *et al.* 1997; Ruffert *et al.* 1997; von Blohn *et al.* 1997), der Mechanismus wurde aber nur in wenigen Arbeiten genauer untersucht. Auch in *V. pantothenicus* ist ungeklärt, ob der Ectoin-efflux unter hochosmolarem Stress auf einfacher Diffusion (Klein *et al.* 1971; In 't Veld *et al.* 1992), „exchange diffusion“ durch eine Permease (Kepes 1985; van Iwaarden *et al.* 1993), einem speziellen Transporter (Glaasker *et al.* 1996a) oder einem unbekanntem Mechanismus beruht.

## 5 EctT ist für den Transport von Tetrahydropyrimidinen bei Kältestress verantwortlich

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Psychroprotektion von *V. pantothenicus* durch die *de novo* Synthese von Ectoin in Wachstumsexperimenten demonstriert werden (Abb. 25). Darüber hinaus konnte der kältesensitive Phänotyp einer *ectB*-Mutante in diesem Bakterium durch die exogene Gabe von 1 mM Ectoin komplementiert werden, so dass *V. pantothenicus* ein oder mehrere Aufnahmesystem(e) für Ectoin bei Kälte besitzen musste (Abb. 25). EctT, der einzige osmotisch regulierter Ectointransporter in *V. pantothenicus*, ist auch allein für den Ectointransport bei 15°C verantwortlich, wie der psychrosensitive Phänotyp einer *ectT*-Mutante zeigte (Abb. 31). Hydroxyectoin wird ebenfalls durch EctT bei Kälte transportiert und wirkt als Psychroprotektivum in *V. pantothenicus*

(Abb. 31). EctT nimmt als einziger Transporter für Tetrahydropyrimidine sowohl bei hoher Osmolalität als auch bei niedrigen Temperaturen eine zentrale Funktion für die Anpassung und das Wachstum von *V. pantothenicus* unter diesen Stressbedingungen ein.

Auch in *L. monocytogenes* konnte Psychroprotektion durch die exogene Gabe der kompatiblen Solute Glycin Betain, Acetylcarnitin, Carnitin,  $\gamma$ -Butyrobetain, Prolin Betain und 3-Dimethylsulphoniopropionat erreicht werden, die unter hochosmolaren Bedingungen auch osmoprotektiv in diesem Bakterium wirken (Ko *et al.* 1994; Bayles und Wilkinson 2000). Die Stimulation eines kompatiblen Solut Transporters durch hohe Osmolalität und Kälte konnte für den ABC-Transporter Gbu aus *L. monocytogenes* demonstriert werden (Ko und Smith 1999; Gerhardt *et al.* 2000; Mendum und Smith 2002). Durch Membranvesikelexperimente konnte eine Aktivierung des Gbu-vermittelten Glycin Betain Transportes durch hohe Osmolalität und niedrige Temperaturen (4°C-15°C) festgestellt werden. Die Aktivierung des Transportes beruht vermutlich auf Veränderungen der Membranstruktur unter den jeweiligen Stressbedingungen (Gerhardt *et al.* 2000). Eine *gbu*-Mutante war nicht mehr in der Lage, Glycin Betain bei Kälte zu transportieren und zeigte einen verminderten Transport von Glycin Betain bei hoher Osmolalität (Mendum und Smith 2002). Schließlich konnte auch in Erdbeerpflanzen und in *A. thaliana* eine erhöhte Kälteresistenz durch exogene Glycin Betain Gabe auf die Blätter beobachtet werden. Pflanzen besitzen demnach vermutlich auch kälteaktive Transportsysteme für kompatible Solute (Rajashekar *et al.* 1999; Xing und Rajashekar 2001).

## 5.1 $\sigma^B$ kontrolliert allein die kälteinduzierte Expression von EctT

Die regulatorischen Grundlagen des Ectoitransportes durch EctT bei Kälte konnten durch Northern Blot- und Primer Extension-Analysen aufgeklärt werden. Die Aktivierung des Ectoitransportes erfolgt auf transkriptioneller Ebene und wird früh im zellulären Anpassungsprozess an Kälte in *V. pantothenicus* initiiert (Abb. 37). Mit dem Beginn des erneuten Wachstums nach einem Kälteschock erreichte die Expressionsrate von *ectT* ihr Maximum und wird auch in kälteadaptierten Kulturen aufrechterhalten. *V. pantothenicus* kann die Temperaturänderung in ihrer Dauer und Stärke erfassen, die Transkription von *ectT* entsprechend induzieren und somit den Ectoitransport bei Kälte noch während der Anpassungsphase der Zellen sicherstellen. Darüber hinaus erhalten kälteadaptierte *V. pantothenicus* Kulturen den psychroprotektiven Ectoitransport durch Stimulation der *ectT*-Expression aufrecht. Somit ist EctT das erste BCCT-Transportsystem, dessen Transkription durch Kälte induziert wird.

Wie Primer Extension-Analysen zeigten erfolgt die Regulation der *ectT*-Transkription durch den gleichen, auch für die osmotisch stimulierte Expression von *ectT* verantwortlichen,  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor (Abb. 34). Durch die allein  $\sigma^B$ -abhängige *ectT*-Expression bei Kälte konnte in *V.*

*pantothenicus* zum ersten Mal die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktor durch niedrige Temperatur in einem *Bacillus*-verwandten Bakterium demonstriert werden. Bisher war bekannt, dass  $\sigma^B$  in *B. subtilis* durch die Stressfaktoren Ethanol, Hitze, hohe Osmolalität, Säure und Nährstofflimitation aktiviert wird (Hecker und Völker 2001). Durch die kältere regulierte Expression von *ectT* konnte ein neuer  $\sigma^B$  induzierender Stressfaktor identifiziert werden. Die Induktion von  $\sigma^B$  durch Kälte ist nicht auf *V. pantothenicus* beschränkt, wie 2D-Gel-Elektrophorese von *B. subtilis* Kulturen, die permanent bei 15°C gewachsen waren, belegen. Diese kürzlich durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass alle im *sigB*-Operon von *B. subtilis* codierten Proteine bei Kälte exprimiert werden (Hoffmann, Völker, Bremer unveröffentlichte Daten). Da die meiste Zeit im Jahr in den oberen Bodenschichten gemäßiger Breiten niedrige Temperaturen vorherrschen, spielt die Anpassung an Kältestress eine besonders große Rolle für das Überleben bodenbewohnende *Bacilli*. Weitere Untersuchungen könnten Aufschluss über die Funktion der durch niedrige Wachstumstemperaturen induzierten  $\sigma^B$  abhängigen Stressantwort für die Anpassung und das Überleben Gram-positiver Bodenbakterien unter dem in ihrem natürlichen Lebensraum oft vorherrschenden Kältestress geben. Deutlich seltener hingegen sind *Bacilli* in ihrem natürlichen Habitat plötzlichem Hitzestress, der auch  $\sigma^B$  und somit das generelle Stressregulon in *B. subtilis* aktiviert (Hecker *et al.* 1996), ausgesetzt. Die *in vivo* (Abb. 43) (Malin und Lapidot 1996) und *in vitro* (Lippert und Galinski 1992) (Knapp *et al.* 1999) demonstrierte Hitze protektion von Bakterien durch exogen zugeführte Ectoine und die ausschließlich  $\sigma^B$  regulierte Expression von *ectT* fordern zukünftige Untersuchungen in *V. pantothenicus*. Es könnte geklärt werden, ob auch dieses Bakterium durch exogen vorhandenes Ectoin und/oder Hydroxyectoin hitzeprotectiert wird und EctT für die Aufnahme von Ectoinen bei Hitzestress verantwortlich ist. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Transkription von *ectT* durch Hitze induziert wird und  $\sigma^B$  auch bei hohen Wachstumstemperaturen die *ectT*-Expression in *V. pantothenicus* kontrolliert.

Bemerkenswerterweise erfolgte in *V. pantothenicus* die maximale Expression von *ectT* durch  $\sigma^B$  nicht direkt nach einem Kälteschock, sondern die *ectT*-Transkription steigerte sich langsam mit fortschreitender Adaptation der Zellen an die niedrige Temperatur (Abb. 36). Im Gegensatz dazu konnte die maximale *ectT*-Expression direkt nach einem hyperosmolaren Schock in *V. pantothenicus* detektiert werden (Abb. 36) und auch alle bisher identifizierten  $\sigma^B$  induzierenden Stressfaktoren riefen in *B. subtilis* eine transiente Expressionsinduktion des alternativen Sigmafaktors und der von ihm kontrollierten Gene hervor (Hecker und Völker 2001). Die nicht-transiente, mit zeitlicher Anpassung an niedrige Wachstumstemperaturen einhergehende Steigerung der  $\sigma^B$ -abhängigen *ectT*-Expression in *V. pantothenicus* deutet auf eine unterschiedliche Regulation von  $\sigma^B$  bei osmotischem Stress und Kältestress hin. Vermutlich existieren zwei unterschiedliche Signalkaskade für die durch hochosmolare Bedingungen und Kälte kontrollierte  $\sigma^B$  Aktivität. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse in *B. subtilis* Kulturen, die kontinuierlich bei 15°C gewachsen waren, unterstützt. Das bei allen anderen  $\sigma^B$  induzierenden Stressbedingungen als Anti-Anti-Sigmafaktor wirkend RsbV hat keinen Einfluss auf die kälteabhängige Aktivierung von  $\sigma^B$  (Völker pers. Mitteilung). Unter den bisher

in *B. subtilis* untersuchten Stressbedingungen Ethanol, Hitze, hohe Osmolalität, Säure und Nährstofflimitation entscheidet der Phosphorylierungsstatus von RsbV ob  $\sigma^B$  inaktiv im Komplex mit den Anti-Sigmafaktor RsbW vorliegt oder ungebunden und aktiv das generelle Stressregulon zur Expression bringt (Dufour und Haldewang 1994; Hecker und Völker 2001).

Kürzlich konnte auch in *L. monocytogenes* die Aktivierung von  $\sigma^B$  durch Kälte beobachtet werden (Becker *et al.* 2000). Die Aktivierung eines ausschließlich  $\sigma^B$  kontrollierten Promotors in *L. monocytogenes* zeigte ein ähnliches Transkriptionsprofil wie *ectT*: Während der Kälteschockanpassung begann die Transkription des  $\sigma^B$  regulierten Gens und steigerte sich mit erneutem Wachstum von *L. monocytogenes* (Becker *et al.* 2000). Becker *et al.* vermuteten, dass die nicht-transiente Transkription  $\sigma^B$  regulierter Gene bei Kälte in *L. monocytogenes* auf einer verspäteten Translation von  $\sigma^B$  beruht, da nach einem Kälteschock die bakterielle Translation generell stark verlangsamt abläuft, verursacht durch die Reparatur von kältegeschädigten und/oder der Neusynthese speziell kälteadaptierter Ribosomen (Bayles *et al.* 2000; Becker *et al.* 2000). In *E. coli* wurde nach einem Kälteschock die Synthese von Ribosomen mit zwei zusätzlichen, speziell für die Kälteanpassung benötigten Proteinen beobachtet (Jones *et al.* 1996a; Jones und Inouye 1996b): Die Synthese der Proteine CsdA und RbfA ist kälteinduziert, und RbfA ist an der Initiation der Translation beteiligt, CsdA wird für die Aufschmelzung von vermehrt bei Kälte auftretenden Sekundärstrukturen der mRNA benötigt.

Die psychroprotektive Nutzung von exogen vorhandenem Glycin Betain und Carnitin ist in einer *sigB* Mutante von *L. monocytogenes* beeinträchtigt, da die für die Aufnahme verantwortlichen Transportsysteme vermutlich teilweise  $\sigma^B$ -abhängig kältere reguliert sind (Becker *et al.* 2000). Überraschenderweise ist der bei 37°C mutmaßlich  $\sigma^B$ -abhängig regulierte BCCT-Transporter BetL nur gering an der Glycin Betain Aufnahme bei Kälte beteiligt, und das ABC-Transportsystem Gbu vermittelt hauptsächlich den Kältetransport (Becker *et al.* 2000; Sleator *et al.* 2000; Mendum und Smith 2002). Die kälteinduzierte  $\sigma^S$ -abhängigen Expression des *proU*-Operons durch seinen P1 Promotor konnte kürzlich in *E. coli* beobachtet werden (Rajkumari und Gowrishankar 2001). Der alternative Transkriptionsfaktor  $\sigma^S$  erfüllt in *E. coli* eine ähnliche Funktion wie  $\sigma^B$  in *B. subtilis*: Auch hier sind  $\sigma^S$ -abhängige Gene an der Anpassung der Zellen an eine Vielzahl ungünstiger Umwelteinflüsse und an der Umstellung auf die stationäre Wachstumsphase beteiligt (Hengge-Aronis 1996; Loewen *et al.* 1998). Bei 37°C und bei Hitzestress wird die Expression des  $\sigma^S$ -Regulons und somit der  $\sigma^S$ -abhängigen Gene über die intrazelluläre Konzentration des  $\sigma^S$ -Proteins reguliert. Dies geschieht auf den Ebenen der *rpoS*-Transkription und –Translation (Lange und Hengge-Aronis 1994; Lange *et al.* 1995) (Loewen *et al.* 1998) sowie der Stabilität des gebildeten Sigmafaktors (Muffler *et al.* 1996; Muffler *et al.* 1997). Die Spezifität für  $\sigma^S$ -abhängige Promotoren wird durch zusätzliche regulatorische Proteine wie H-NS, Fis, Lrp oder CRP erhöht (Hengge-Aronis 1999). RpoS wurde auch in *E. coli* bei 20°C in hohen Konzentrationen akkumuliert (Sledjeski *et al.* 1996). Für die

Kälteexpression von RpoS ist die untranslatierte RNA DsrA notwendig (Sledjeski *et al.* 1996). DsrA aktiviert die RpoS Translation durch Bindung an den Leader der mRNA (Majdalani *et al.* 2001). Die Transkription von *dsrA* und die Stabilität der DsrA RNA werden ihrerseits durch Kälte deutlich erhöht (Repoila und Gottesman 2001). Das *proU*-Operon wird  $\sigma^S$ -abhängig kältereguliert und deutet auf die Aufnahme kompatibler Solute in Anpassung an niedrige Wachstumstemperaturen auch in *E. coli* hin (Rajkumari und Gowrishankar 2001).

## 6 Die koordinierte Synthese und Aufnahme von Ectoin in *V. pantothenicus*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die weite Verbreitung der endogenen Ectoinbiosynthese bei hochosmolarem Stress in Gram-positiven, bodenbewohnenden *Bacilli* demonstriert werden. Die Ectoinsynthese und der Ectointransport verleihen *V. pantothenicus* Schutz bei hoher Osmolalität und auch bei Kälte. Diese Ergebnisse deuten auf eine generelle Schutzfunktion von Ectoin für Bakterienzelle auch bei anderen Umweltstressbedingungen als hoher Osmolalität hin. Zusätzliche protektiven Eigenschaften kompatibler Solute könnten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung osmoadaptiver Strategien in Mikroorganismen, die einer wechselnden Vielzahl dieser Umweltstressbedingungen in ihrem Habitat ausgesetzt sind, gespielt haben. Die Schutzfunktion von Ectoin und seinem Hydroxyderivat bei zahlreichen physikalischen Stressbedingungen wie Hitze, unphysiologischen pH-Werten, Austrocknung und hohen Harnstoffkonzentrationen wurde einerseits in *in vitro* Proteinstabilisierungsexperimente bestätigt (Lippert und Galinski 1992; Göller und Galinski 1999; Knapp *et al.* 1999). Andererseits schützt sich auch *St. coelicolor in vivo* bei hochosmolarem Stress und Hitzestress durch die Synthese und den Transport von Ectoinen.

*V. pantothenicus* koordiniert die Ectoinsynthese und die Ectoinaufnahme bei hoher Osmolalität und bei Kälte durch die gleichzeitige Transkription des Ectoinsyntheseoperons *ectABC* und des Ectointransporters *ectT*. Die Parallelen in Transkriptionskontrolle und stressprotektiver Funktion der Ectoin-Synthese und –Aufnahme lassen eine gemeinsame Regulation des *ectABC*-Operons und *ectT*-Gens vermuten. Die Expression von *ectT* wird durch ein Homolog des alternativen Transkriptionsfaktors  $\sigma^B$  reguliert, das selbst durch hohe Osmolalität und Kälte in *V. pantothenicus* aktiviert wird. Die Expression von *ectABC* könnte ebenfalls durch  $\sigma^B$  reguliert werden, aber um diese Vermutung zu überprüfen, muss die 5'-Region des Operons isoliert und der potentielle Promotor durch Primer Extension-Analysen osmotisch gestresster und kältegestresster *V. pantothenicus* Kulturen identifiziert werden. Es wäre denkbar, dass  $\sigma^B$  ein zentraler Regulator der Adaptation von *V. pantothenicus* an hohe Osmolalität und Kälte ist. Dem alternativen Transkriptionsfaktor kommt im natürlichen Lebensraum von *V. pantothenicus* und anderen *Bacilli* besondere Bedeutung zu, da dort fast permanent Nährstofflimitation und physikalischer Stress das Wachstum der Bakterienzelle begrenzen (Kjelleberg *et al.* 1993; Hecker und Völker 2001). Die durch  $\sigma^B$  regulierte generelle

Stressantwort vermittelt *B. subtilis* Schutz vor dem präsenten, induzierenden Stress, in oligotrophen Böden häufig Nährstofflimitation, aber auch Schutz vor zusätzlichen, zukünftigen Stressfaktoren wie Kälte, Hitze, hoher Osmolalität und Austrocknung (Hecker und Völker 2001). Die zentrale Funktion der  $\sigma^B$  regulierten generellen Stressantwort für das Überleben von bodenbewohnenden *Bacilli* wird durch ihre in dieser Arbeit erstmals demonstrierte Induktion bei niedriger Wachstumstemperatur hervorgehoben, da im den oberen Bodenschichten oft Kältestress vorherrscht und die Anpassung an niedrige Temperaturen besondere physiologische Relevanz für *Bacilli* besitzt.

Aus noch unbekanntem Gründen verliert *V. pantothenicus* einen Teil des endogen bei hoher Osmolalität produzierten Ectoins an seine Umgebung. Eine wichtige Funktion von EctT, dem einzigen osmotisch induzierten Ectoitransporter, ist der Retransport dieses Ectoins in das Zytoplasma. Ohne dieses „Recycling“ würde eine große Energiemenge zur Ectoinsynthese verwendet werden und sich dennoch der intrazelluläre Ectoingehalt verringern. Ohne die gleichzeitig koordinierte Ectoin-Synthese und -Aufnahme würde ein Nettoefflux von Ectoin stattfinden und in einer verringerten Osmoprotektion von *V. pantothenicus* resultieren. Außerdem wird durch den Retransport von Ectoin verhindert, dass andere um das Habitat von *V. pantothenicus* konkurrierende Bakterien Ectoin als kompatibles Solut und/oder Nährstoffquelle nutzen können und einen Wachstumsvorteil unter Stressbedingungen erhalten.

## VI. Literaturverzeichnis

- Agre, P., Brown, D. und Nielsen, S. (1995).** Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr Opin Cell Biol* **7**:472-483.
- Aguilar, P. S., Cronan, J. E., Jr. und De Mendoza, D. (1998).** A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* **180**:2194-2200.
- Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C. und De Mendoza, D. (2001).** Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **20**:1681-1691.
- Aguilar, P. S., Lopez, P. und De Mendoza, D. (1999).** Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the  $\Delta 5$  desaturase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**:7028-7033.
- Alia, Hayashi, H., Sakamoto, A. und Murata, N. (1998).** Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J* **16**:155-161.
- Alice, A. F. und Sanchez-Rivas, C. (1997).** DNA supercoiling and osmoresistance in *Bacillus subtilis* 168. *Curr Microbiol* **35**:309-315.
- Allard, F., Houde, M., Krol, M., Ivanov, A., Huner, N. P. A. und Sarhan, F. (1998).** Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol* **39**:1194-1202.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
- Amezaga, M. R., Davidson, I., Mclaggan, D., Verheul, A., Abee, T. und Booth, I. R. (1995).** The role of peptide metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 at high osmolarity. *Microbiology* **141**:41-49.
- Annous, B. A., Becker, L. A., Bayles, D. O., Labeda, D. P. und Wilkinson, B. J. (1997).** Critical role of anteiso-C<sub>15:0</sub> fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* **63**:3887-3894.
- Arahal, D. R., Garcia, M. T., Vargas, C., Canovas, D., Nieto, J. J. und Ventosa, A. (2001).** *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1457-1462.
- Arahal, D. R. und Ventosa, A. (2001).** Moderately halophilic and halotolerant species of *Bacillus* and related genera. Im Druck.

- Arakawa, T. und Timasheff, S. N. (1985).** The stabilization of proteins by osmolytes. *Biochem J* **47**:411-414.
- Arsené, F., Tomoyasu, T. und Bukau, B. (2000).** The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **55**:3-9.
- Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. und Collins, M. D. (1991).** Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**:343-346.
- Ash, C., Priest, F. G. und Collins, M. D. (1993).** Molecular identification of rRNA group 3 *bacilli* (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**:253-260.
- Atkinson, D. E. (1977).** Cellular energy metabolism and its regulation. Academic, New York.
- Auble, D. T., Allen, T. L. und Dehaseth, P. L. (1986).** Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem* **261**:11202-11206.
- Bachmann, B. J. (1990).** Linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol Rev* **54**:130-197.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A. und Engert, A. (2000).** Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**:1572-1579.
- Baskakov, I. und Bolen, D. W. (1998).** Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. *J Biol Chem* **273**:4831-4834.
- Bayles, D. O., Tunick, M. H., Foglia, T. A. und Miller, A. J. (2000).** Cold shock and its effect on ribosomes and thermal tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**:4351-4355.
- Bayles, D. O. und Wilkinson, B. J. (2000).** Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**:23-27.
- Bayles, K. W. (1993).** The use of degenerate, sensor gene-specific, oligodeoxyribonucleotide primers to amplify DNA fragments from *Staphylococcus aureus*. *Gene* **123**:99-103.
- Becker, L. A., Cetin, M. S., Hutkins, R. W. und Benson, A. K. (1998).** Identification of the gene encoding the alternative sigma factor  $\sigma^B$  from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J Bacteriol* **180**:4547-4554.
- Becker, L. A., Evans, S. N., Hutkins, R. W. und Benson, A. K. (2000).** Role of  $\sigma^B$  in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J Bacteriol* **182**:7083-7087.

- Belitsky, B. R., Brill, J., Bremer, E. und Sonenshein, A. L. (2001).** Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:4389-4392.
- Benson, A. K. und Haldewang, W. G. (1993).** Regulation of  $\sigma^B$  levels and activity in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**:2347-2356.
- Bernhardt, J., Völker, U., Völker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H. und Hecker, M. (1997).** Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* - a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* **143**:999-1017.
- Bestvater, T. und Galinski, E. A. (2002).** Investigation into a stress-inducible promoter region from *Marinococcus halophilus* using green fluorescent protein. *Extremophiles* **6**:15-20.
- Bhaya, D., Watanabe, N., Ogawa, T. und Grossman, A. R. (1999).** The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:3188-3193.
- Blount, P. und Moe, P. C. (1999).** Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. *Trends Microbiol* **7**:420-424.
- Blum, J. J. (1996).** Effects of osmotic stress on metabolism, shape, and amino acid content of *Leishmania*. *Biol Cell* **87**:9-16.
- Boch, J., Kempf, B. und Bremer, E. (1994).** Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**:5364-5371.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R. und Bremer, E. (1996).** Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* **178**:5121-5129.
- Boiangiu, C. (2001).** Contribution physiologique des canaux mécanosensibles et des protéines de la famille BspA dans la protection contre le stress osmotique chez *Bacillus subtilis* et *Erwinia chrysanthemi*. Dissertation, Universitäten Marburg und Rennes.
- Bolen, D. W. (2001).** Protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Meth Mol Biol* **168**:17-36.
- Bolen, D. W. und Baskakov, I. V. (2001).** The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**:955-963.
- Boos, W., Ehmann, U., Bremer, E., Middendorf, A. und Postma, P. (1987).** Trehalase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**:13212-13218.
- Booth, I. R. und Louis, P. (1999).** Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**:166-169.

- Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., M.-C., P. und Le Rudulier, D. (2002).** BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. Manuskript in Revision.
- Bourot, S., Sire, O., Trautwetter, A., Touze, T., Wu, L. F., Blanco, C. und Bernard, T. (2000).** Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**:1050-1056.
- Bovell, C. R., Packer, L. und Helgerson, R. (1963).** Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. *Biochim Biophys Acta* **75**:257-266.
- Bown, J. A., Barne, K. A., Minchin, S. D. und Busby, S. J. W. (1997).** Extended -10 Promotors. *In*: F. Eckstein und D. M. J. Lilley (Herausg.), *Nucleic acids and molecular biology*, Springer Verlag, Berlin und Heidelberg.
- Boylan, S. A., Redfield, A. R., Brody, M. S. und Price, C. W. (1993).** Stress-induced activation of the  $\sigma^B$  transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**:7931-7937.
- Breed, J., Kneip, S., Gade, J., Welte, W. und Bremer, E. (2001).** Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the periplasmic binding protein ProX from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**:448-450.
- Bremer, E. (2002).** Adaptation to changing osmolality. *In*: J. A. Hoch, A.L. Sonenshein und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, S. 385-391. ASM Press, Washington, D. C., USA.
- Bremer, E. und Krämer, R. (2000).** Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *In*: G. Storz und R. Hengge-Aronis (Herausg.), *Bacterial stress responses*, S. 79-97. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Brill, J. und Bremer, E. (2002).** A separate biosynthetic pathway mediates accumulation of the compatible solute proline in response to hypertonicity in *Bacillus subtilis*. Manuskript in Revision.
- Brody, M. S. und Price, C. W. (1998).** *Bacillus licheniformis sigB* operon encoding the general stress transcription factor  $\sigma^B$ . *Gene* **212**:111-118.
- Brown, A. D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**:803-846.
- Brückner, R. (1992).** A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* **122**:187-192.
- Burg, M., Kwon, E. und Kültz, D. (1997).** Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* **59**:437-455.

- Calamita, G. (2000).** The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Mol Microbiol* **37**:254-262.
- Calamita, G., Bishai, W. R., Preston, G. M., Guggino, W. B. und Agre, P. (1995).** Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**:29063-29066.
- Caldas, T., Demont-Caulet, N., Ghazi, A. und Richarme, G. (1999).** Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology* **145**:2543-2548.
- Canovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Rhodes, D., Ventosa, A. und Nieto, J. J. (1997).** Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **272**:25794-25801.
- Canovas, D., Vargas, C., Calderon, M. I., Ventosa, A. und Nieto, J. J. (1998).** Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol* **21**:487-497.
- Canovas, D., Borges, N., Vargas, C., Ventosa, A., Nieto, J. J. und Santos, H. (1999).** Role of N- $\gamma$ -acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Appl Environ Microbiol* **65**:3774-3779.
- Canovas, D., Fletcher, S. A., Hayashi, M. und Csonka, L. N. (2001).** Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol* **183**:3365-3371.
- Carpita, N. C. (1985).** Tensile strength of cell walls of living cells. *Plant Physiol* **79**:485-488.
- Casadaban, M. J. (1976).** Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**:541-555.
- Cayley, S., Lewis, B. A. und Record, T. M., Jr. (1992).** Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **174**:1586-1595.
- Chang, B. Y., Shyu, Y. T. und Doi, R. H. (1992).** The interaction between *Bacillus subtilis*  $\sigma^A$  and RNA polymerase with promoters. *Biochimie* **74**:601-612.
- Chester, F. D. (1898).** Report of the mycologist: bacteriological work. *Del Agric Exp Stn Bull* **10**:47-137.
- Cho, Y. H., Lee, E. J., Ahn, B. E. und Roe, J. H. (2001).**  $\sigma^B$ , an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **42**:205-214.
- Chrispeels, M. J. und Agre, P. (1994).** Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. *Trends Biochem Sci* **19**:421-425.

- Ciulla, R., Clougherty, C., Belay, N., Krishnan, S., Zhou, C., Byrd, D. und Roberts, M. F. (1994).** Halotolerance of *Methanobacterium thermoautotrophicum*  $\Delta$ H and Marburg. J Bacteriol **176**:3177-3187.
- Clark, V. L., Peterson, D. E. und Bernlohr, R. W. (1972).** Changes in free amino acid production and intracellular amino acid pools of *Bacillus licheniformis* as a function of culture age and growth media. J Bacteriol **112**:715-725.
- Claus, D. und Berkeley, R. C. W. (1986).** Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp und J. G. Holt (Herausg.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2, S. 1202- 1139. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Conter, A., Menchon, C. und Gutierrez, C. (1997).** Role of DNA supercoiling and RpoS sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *Escherichia coli* K12. J Mol Biol **273**:75-83.
- Cosquer, A., Pichereau, V., Pocard, J. A., Minet, J., Cormier, M. und Bernard, T. (1999).** Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate, and glycine betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*. App Environ Microbiol **65**:3304-3311.
- Cossins, A. R. (1994).** Temperature adaptation of biological membranes. Portland Press, London.
- Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F. und Record, M. T., Jr. (2000).** Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of "osmotic stress" experiments *in vitro*. Biochemistry **39**:4455-4471.
- Csonka, L. N. (1988).** Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium*: effect of osmotic stress on synthesis, degradation, and cellular retention of proline. J Bacteriol **170**:2374-2378.
- Csonka, L. N. (1989).** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol Rev **53**:121-147.
- Csonka, L. N. und Epstein, W. (1996).** Osmoregulation. In: F. C. Neidhard, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. cellular and molecular biology, S. 1210-1223. ASM Press, Washington, D. C., USA
- Csonka, L. N. und Hanson, A. D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. Annu Rev Microbiol **45**:569-606.
- Culham, D. E., Lasby, B., Marangoni, A. G., Milner, J. L., Steer, B. A., Van Nues, R. W. und Wood, J. M. (1993).** Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. J Mol Biol **229**:268-276.

- Culham, D. E., Tripet, B., Racher, K. I., Voegelé, R. T., Hodges, R. S. und Wood, J. M. (2000).** The role of the carboxyl terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transporter ProP of *Escherichia coli*. *J Mol Recognit* **13**:309-322.
- Curry, J., Morris, C. F. und Walker-Simmons, M. K. (1991).** Sequence analysis of a cDNA encoding a group 3 LEA mRNA inducible by ABA or dehydration stress in wheat. *Plant Mol Biol* **16**:1073-1076.
- Cutting, S. M. und Van der Horn, P. B. (1990).** Genetic analysis. *In*: C. R. Harwood und S. M. Cutting (Herausg.), *Molecular biological methods for Bacillus*, S. 27-74. John Wiley & Sons Inc., Chichester, UK.
- Da Costa, M. S., Santos, H. und Galinski, E. A. (1998).** An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**:117-153.
- Dai, X. und Rothman-Denes, L. B. (1999).** DNA structure and transcription. *Curr Opin Microbiol* **2**:126-130.
- Dandekar, A. M. und Uratsu, S. L. (1988).** A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *J Bacteriol* **170**:5943-5945.
- De Bary, A. (1884).** Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Delamarche, C., Thomas, D., Rolland, J. P., Froger, A., Gouranton, J., Svelto, M., Agre, P. und Calamita, G. (1999).** Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J Bacteriol* **181**:4193-4197.
- Delaunay, A. J. und Verma, D. P. S. (1993).** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* **4**:215-223.
- Del Moral, A., Severin, J., Ramos-Cormenzana, A.; Trüper, H. G. und Galinski, E. A. (1994).** Compatible solutes in new moderately halophilic isolates. *FEMS Microbiol Lett* **122**:165-172.
- Dennis, P. P. und Shimmin, L. C. (1997).** Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic *Archaea*. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:90-104.
- Deshnium, P., Gombos, Z., Nishiyama, Y. und Murata, N. (1997).** The action *in vivo* of glycine betaine in enhancement of tolerance of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 to low temperature. *J Bacteriol* **179**:339-344.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D. und Goloubinoff, P. (2001).** Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* **276**:39586-39591.

- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmidt, R. und Bakker, E. P. (1988).** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150**:348-357.
- Dökel, S. und Marahiel, M. A.** unveröffentlichte Daten.
- Dougherty, D. A. (1996).** Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr and Trp. *Science* **271**:163-168.
- Dulaney, E. L., Dulaney, D. D. und Rickes, E. L. (1968).** Factors in yeast extract which relieve growth inhibition of bacteria in defined medium of high osmolarity. *Dev Ind Microbiol* **9**:260-269.
- Durell, S. R. und Guy, H. R. (1999).** Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biophys J* **77**:789-807.
- Eichler, K., Bourgis, F., Buchet, A., Kleber, H.-P. und Mandrand-Berthelot, M.-A. (1994).** Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **13**:775-786.
- Eppelmann, K., Doekel, S. und Marahiel, M. A. (2001).** Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **276**:34824-34831.
- Ferreira, A., O'byrne, C. P. und Boor, K. J. (2001).** Role of  $\sigma^B$  in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **67**:4454-4457.
- Fischel, U. und Oren, A. (1993).** Fate of compatible solutes during dilution stress in *Ectothiorhodospira marismortui*. *FEMS Microbiol Lett* **113**:113-118.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J.-F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., Mckenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geoghagen, N. S. M., Gnehm, C. L., Mcdonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O. und Venter, J. C. (1995).** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd.. *Science* **269**:496-512.
- Fletcher, S. A. und Csonka, L. N. (1995).** Fine-structure analysis of the transcriptional silencer of the *proU* operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**:4508-4513.
- Fletcher, S. A. und Csonka, L. N. (1998).** Characterization of the induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* **15**:307-317.

- Fletcher, S. A., Rhodes, D. und Csonka, L. N. (2001).** Analysis of the effects of osmoprotectants on the high osmolality-dependent induction of increased thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* **18**:345-354.
- Flett, F., Platt, J. und Oliver, S. G. (1992).** Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2) blocked in macromolecular synthesis. *J Gen Microbiol* **138**:579-585.
- Forward, J. A., Behrendt, M. C., Wyborn, N. R., Cross, R. und Kelly, D. J. (1997).** TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **179**:5482-5493.
- Fouet, A., Namy, O. und Lambert, G. (2000).** Characterization of the operon encoding the alternative  $\sigma^B$  factor from *Bacillus anthracis* and its role in virulence. *J Bacteriol* **182**:5036-5045.
- Frankland, G. C. und Frankland, P. F. (1887).** Studies on some new microorganisms obtained from air. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* **178**:257-287.
- Fraser, K. R., Harvie, D., Coote, P. J. und O'byrne, C. P. (2000).** Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**:4696-4704.
- Frings, E., Kunte, H. J. und Galinski, E. A. (1993).** Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiol Lett* **109**:25-32.
- Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1982).** Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiol Lett* **13**:357-360.
- Galinski, E. A., Pfeiffer, H. P. und Truper, H. G. (1985).** 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem* **149**:135-139.
- Galinski, E. A. und Herzog, R. M. (1990).** The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch Microbiol* **153**:607-613.
- Galinski, E. A. (1993).** Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interactions, stress protection. *Experientia* **49**:487-496.
- Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1994).** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**:95-108.
- Galinski, E. A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**:272-328.

- Galinski, E. A. und Louis, P. (1999).** Compatible solutes: ectoine production and gene expression (Herausg.), Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments, S. 187-202. CRC Press, Boca Rato, USA.
- Garabito, M. J., Arahall, D. R., Mellado, E., Marquez, M. C. und Ventosa, A. (1997).** *Bacillus salexigens* sp. nov, a new moderately halophilic *Bacillus* species. Intern J Syst Bacteriol **47**:735-741.
- Gerhardt, P. N., Tombras Smith, L. und Smith, G. M. (2000).** Osmotic and chill activation of glycine betaine porter II in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. J Bacteriol **182**:2544-2550.
- Gerhardt, P. N. M., Smith, L. T. und Smith, G. M. (1996).** Sodium-driven, osmotically activated glycine betaine transport in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. J Bacteriol **178**:6105-6109.
- Glaasker, E., Konings, W. N. und Poolman, B. (1996a).** Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypo-osmotic shock. J Biol Chem **271**:10060-10065.
- Glaasker, E., Konings, W. N. und Poolman, B. (1996b).** Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. J Bacteriol **178**:575-582.
- Göller, K. und Galinski, E. A. (1999).** Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. J Mol Catalysis B: Enzym **7**:37-45.
- Göller, K., Ofer, A. und Galinski, E. A. (1998).** Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. FEMS Microbiol Lett **161**:293-300.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y. und Y., S. (2000).** Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. J Gen Appl Microbiol **46**:1-8.
- Goesbet, G., Trautwetter, A., Bonnassie, S., Wu, L. F. und Blanco, C. (1996).** Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA*. J Bacteriol **178**:447-455.
- Gowrishankar, J. (1988).** Osmoregulation in *Enterobacteriaceae* role of proline-betaine transport Systems. Current Science:225-234.
- Gowrishankar, J. und Manna, D. (1996).** How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved? Genetica **97**:363-378.
- Grammel, N. (2000).** Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei salzstreßinduzierbaren Osmolyten, in *Streptomyces chrysomallus*. Dissertation, Technische Universität Berlin. [http://edocs.tu-berlin.de/diss/2000/grammel\\_nicolas.htm](http://edocs.tu-berlin.de/diss/2000/grammel_nicolas.htm)

- Grau, R., Gardiol, D., Glikin, G. C. und De Mendoza, D. (1994).** DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **11**:933-941.
- Graumann, P. L. und Marahiel, M. A. (1999).** Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**:203-209.
- Greener, T., Govezensky, D. und Zamir, A. (1993).** A novel multicopy suppressor of a *groEL* mutation includes two nested open reading frames transcribed from different promoters. *EMBO J* **12**:889-896.
- Gross, C. A. (1996).** Function and regulation of the heat shock proteins. *In*: R. C. I. F. C. Neidhard, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schächter, H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and Molecular Biology, S. 1497-1512. ASM Press, Washington DC., USA.
- Guérout-Fleury, A.-M., Frandsen, N. und Stragier, P. (1996).** Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**:57-61.
- Guglielmi, G., Mazodier, P., Thompson, C. J. und Davies, J. (1991).** A survey of the heat shock response in four *Streptomyces* species reveals two *groEL*-like genes and three GroEL-like proteins in *Streptomyces albus*. *J Bacteriol* **173**:7374-7381.
- Guillot, A., Obis, D. und Mistou, M. Y. (2000).** Fatty acid membrane composition and activation of glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Int J Food Microbiol* **55**:47-51.
- Guillouet, S. und Engasser, J. M. (1995).** Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic upshock. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**:315-320.
- Guy, C. (1999).** Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**:231-242.
- Guy, C., Haskell, D., Neven, L., Klein, P. und Smelser, C. (1992).** Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta* **188**:265-270.
- Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. und Bremer, E. (1995).** The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **246**:783-786.
- Hagemann, M., Richter, S. und Mikkat, S. (1997).** The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. *J Bacteriol* **179**:714-720.
- Hai, T., Oppermann-Sanio, F. B. und Steinbuchel, A. (2002).** Molecular characterization of a thermostable cyanophycin synthetase from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain MA19 and *in vitro* synthesis of cyanophycin and related polyamides. *Appl Environ Microbiol* **68**:93-101.

- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:577.
- Harwood, C. R. und Archibald, A. R. (1990).** Growth, maintenance and general techniques. *In*: C. R. Harwood und S. M. Cutting (Herausg.), *Molecular biological methods for Bacillus*, S. 1-26. John Wiley & Sons Inc., Chichester, UK.
- Harwood, C. R. und Cutting, S. M. (1990).** Molecular biological methods for *Bacillus*. *In*: C. R. Harwood und S. M. Cutting (Herausg.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Inc., Chichester, UK.
- Hecker, M., Schumann, W. und Völker, U. (1996).** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**:417-428.
- Hecker, M. und Völker, U. (1998).** Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the  $\sigma^B$  regulon. *Mol Microbiol* **29**:1129-1136.
- Hecker, M. und Völker, U. (2001).** General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microbial Physiol* **44**:35-91.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L., Gill, S. R., Nelson, K. E., Read, T. D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M. D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., Mcdonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R. D., Nierman, W. C. und White, O. (2000).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477-483.
- Helman, J. D. und Chamberlin, M. J. (1988).** Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**:839-872.
- Helman, J. D. (1995).** Compilation and analysis of *Bacillus subtilis*  $\sigma^A$ -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res* **23**:2351-2360.
- Helman, J. D. und Moran, C. P. (2002).** RNA polymerase and sigma factors. *In*: J. A. Hoch, A. L. Sonenshein und R. Losick (Herausg.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, S. 289-312. ASM Press, Washington, D. C., USA.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M. und Boos, W. (1991).** Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**:7918-7924.
- Hengge-Aronis, R. (1996).** Back to log phase:  $\sigma^S$  as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**:887-893.

- Hengge-Aronis, R. (1996).** Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: F. C. Neidhard, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. cellular and molecular biology, S. 1497-1512. ASM Press, Washington, D. C., USA.
- Hengge-Aronis, R. (1999).** Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**:148-152.
- Henkin, T. M. und Sonenshein, A. L. (1987).** Mutations of the *Escherichia coli lacUV5* promoter resulting in increased expression in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **209**:467-474.
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, G. und Logan, N. A. (1998).** *Virgibacillus*: a new genus to accomodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int J Syst Bacteriol* **48**:99-106.
- Higgins, C. F., Dorman, C. J., Stirling, D. A., Waddell, L., Booth, I. R., May, G. und Bremer, E. (1988).** A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-584.
- Higgins, D. G. und Sharp, P. M. (1989).** Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* **5**:151-153.
- Hoch, J. A. (1993).** Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Microbiol* **47**:441-465.
- Hoch, J. A. (1998).** Initiation of bacterial development. *Curr Opin Microbiol* **1**:170-174.
- Hoch, J. A. (2000).** Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**:165-170.
- Hoffmann, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U. und Bremer, E. (2002).** High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**:718-727.
- Hohmann, S. (1997).** Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. In: S. Hohmann und W. H. Mager (Herausg.), *Yeast stress responses*, S. 101-145. Springer, New York.
- Holappa, L. D. und Walker-Simmons, M. K. (1995).** The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA PKABA1, is upregulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. *Plant Physiol* **108**:1203-1210.
- Holmström, K. O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T. E. und Welin, B. (2000).** Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J Exp Bot* **51**:177-185.
- Höltje, J. V. (1998).** Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:181-203.

- Holtmann, G. (1999).** Kaliumaufnahme in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. und Verma, D. P. (2000).** Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* **122**:1129-1136.
- In 'T Veld, G., Driessen, A. J. und Konings, W. N. (1992).** Effect of the unsaturation of phospholipid acyl chains on leucine transport of *Lactococcus lactis* and membrane permeability. *Biochim Biophys Acta* **1108**:31-39.
- Inbar, L. und Lapidot, A. (1988).** The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -labeled L-glutamate and  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **263**:16014-16022.
- Inbar, L., Frolow, F. und Lapidot, A. (1993).** The conformation of new tetrahydropyrimidine derivatives in solution and in the crystal. *Eur J Biochem* **214**:897-906.
- Incharoensakadi, A., Takabe, T. und Akazawa, T. (1986).** Effect of betaine on enzyme activity and subunit interaction of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from *Aphanothece halophytica*. *Plant Physiol* **81**:1044-1049.
- Ingraham, J. und Marr, A. G. (1996).** Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. In: R. C. I. F. C. Neidhard, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schächter, H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, S. 1570-1578. ASM Press, Washington, D. C., USA.
- Jaenicke, R. (1990).** Protein structure and function at low temperatures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **326**:535-551.
- Jahns, T. (1998).** Funktion der Harnstoffhydrolyse in *Bacillus pasteurii*. *Biospektrum* **3**:41-42.
- Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T. und Blanco, C. (1992).** Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol* **174**:5027-5035.
- Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Blanco, C. und Bernard, T. (1995).** Osmotic adaptation in *Brevibacterium linens*: differential effect of proline and glycine betaine on cytoplasmic osmolyte pool. *JBIC* **1**:380-386.
- Jebbar, M. und Bremer, E. (1997).** Unveröffentlichte Daten.
- Jebbar, M., Von Blohn, C. und Bremer, E. (1997).** Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC. *FEMS Microbiol Lett* **154**:325-330.

- Jiang, C., lu, B. und Singh, J. (1996).** Requirement of a CCGAC *cis*-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* **30**:679-684.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. und Kjellbom, P. (2000).** The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta* **1465**:324-342.
- Jones, P. G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W. und Inouye, M. (1996a).** Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:76-80.
- Jones, P. G. und Inouye, M. (1996b).** RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol Microbiol* **21**:1207-1218.
- Jordan, E. O. (1890).** A report on certain species of bacteria observed in sewage. In: Sedgewick, areport of biological work of Lawrence Experiment Station, including an account of methods employed and results obtained in the microscopical and bacteriological investigation of sewage and water. Reports of the Massachusetts Board of Public Health **II**:821-844.
- Jukes, T. H. und Cantor, C. R. (1969).** Evolution of protein molecules. *In*: H. N. Munro (Herausg.), *Mammalian Protein Metabolism*, S. 21-132. Academic Press, New York.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996a).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**:109-136.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996b).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res* **3**:185-209.
- Kappes, R. und Bremer, E. (1998).** Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and  $\gamma$ -butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**:83-90.
- Kappes, R. M., Kempf, B. und Bremer, E. (1996).** Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* **178**:5071-5079.
- Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J. und Bremer, E. (1998).** 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.

- Kappes, R. M., Kempf, B., Kneip, S., Boch, J., Gade, J., Meier-Wagner, J. und Bremer, E. (1999).** Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**:203-216.
- Kawahara, Y., Ohsumi, T., Yoshihara, Y. und Ikeda, S. (1989).** Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric Biol Chem* **53**:2475-2479.
- Keilty, S. und Rosenberg, M. (1987).** Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J Biol Chem* **262**:6389-6395.
- Kempf, B. und Bremer, E. (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 Bremer, E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**:319-330.
- Kempf, B., Gade, J. und Bremer, E. (1997).** Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J Bacteriol* **179**:6213-6220.
- Kepes, F. (1985).** Mechanisms of efflux of a substrate accumulated by a lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochimie* **67**:69-73.
- Khmelenina, V. N., Kalyuzhnaya, M. G., Sakharovsky, V. G., Suzina, N. E., Trotsenko, Y. A. und Gottschalk, G. (1999).** Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Arch Microbiol* **172**:321-329.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. und Hopwood, D. A. (2000).** *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation Norwich, UK.
- Killham, K. und Firestone, M. K. (1984).** Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomyces indigenus* to saline soils. *Appl Environ Microbiol* **47**:301-306.
- Kishitani, S., Watanabe, K., Yasuda, S., Arakawa, K. und Takabe, T. (1994).** Accumulation of glycine betaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant Cell Environ* **17**:89-95.
- Kjelleberg, S., Albertson, N., Flardh, K., Holmquist, L., Jouper-Jaan, A., Marouga, R., Ostling, J., Svenblad, B. und Weichart, D. (1993).** How do non-differentiating bacteria adapt to starvation? *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**:333-341.
- Klein, R. A., Moore, M. J. und Smith, M. W. (1971).** Selective diffusion of neutral amino acids across lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **233**:420-433.

- Klein, W., Weber, M. H. und Marahiel, M. A. (1999).** Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J Bacteriol* **181**:5341-5349.
- Knapp, S., Ladenstein, R. und Galinski, E. A. (1999).** Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes  $\beta$ -hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* **3**:191-198.
- Ko, R. und Smith, L. T. (1999).** Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **65**:4040-4048.
- Ko, R., Smith, L. T. und Smith, G. M. (1994).** Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **176**:426-431.
- Koch, A. L. (1983).** The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv Microbiol Physiol* **24**:301-336.
- Koch, J. (1984).** Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic stress. *J Bacteriol* **159**:919-924.
- Koo, S. P., Higgins, C. F. und Booth, I. R. (1991).** Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J Gen Microbiol* **137**:2617-2625.
- Krispin, O. und Allmansberger, R. (1995).** Changes in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol Lett* **134**:129-135.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**:567-580.
- Kuhlmann, A. (1998).** Biosynthese der osmotischen Schutzsubstanz Ectoin in *Bacillus* spp.. Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Kullik, I. I. und Giachino, P. (1997).** The alternative sigma factor  $\sigma^B$  in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Arch Microbiol* **167**:151-159.
- Kumar, A., Malloch, R. A., Fujita, N., Smillie, D. A., Ishihama, A. und Hayward, R. S. (1993).** The minus 35-recognition region of *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J Mol Biol* **232**:406-418.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F. und Danchin, A. (1997).** The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.

- Kunte, J., Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1993).** A modified Fmoc-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines ectoines. *J Microbiol Meth* **17**:129-136.
- Kusher, D. J. und Kamekura, M. (1988).** Physiology of halophilic eubacteria. CRC Press Inc., Boca Rato, USA.
- Lai, M.-C. und Gunsalus, R. P. (1992).** Glycine betaine and potassium ion are major compatible solutes in the extremely halophilic methanogen *Methanohalophilus* strain Z7302. *J Bacteriol* **174**:7474-7477.
- Lai, M. C., Yang, D. R. und Chuang, M. J. (1999).** Regulatory factors associated with synthesis of the osmolyte glycine betaine in the halophilic methanoarchaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Appl Environ Microbiol* **65**:828-833.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., Mcdougall, J. und Strøm, A. R. (1991).** DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**:1049-1064.
- Lamark, T., Styrvold, O. B. und Strøm, A. R. (1992).** Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **96**:149-154.
- Lamosa, P., Martins, L. O., Da Costa, M. S. und Santos, H. (1998).** Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp.. *Appl Environ Microbiol* **64**:3591-3598.
- Landfald, B. und Strøm, A. R. (1986).** Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**:849-855.
- Lange, R., Fischer, D. und Hengge-Aronis, R. (1995).** Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:4676-4680.
- Lange, R. und Hengge-Aronis, R. (1994).** The cellular concentration of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription translation, and protein stability. *Genes Dev* **8**:1600-1612.
- Lawrence, C. C., Sobey, W. J., Field, R. A., Baldwin, J. E. und Schofield, C. J. (1996).** Purification and initial characterization of proline 4-hydroxylase from *Streptomyces griseoviridis* p8648 - a 2-oxoacid, ferrous-dependent dioxygenase involved in etamycin biosynthesis. *Biochem J* **313**:185-191.
- Le Rudulier, D., Strøm, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T. und Valentine, R. C. (1984).** Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**:1064-1068.
- Le Rudulier, D., Yang, S. S. und Csonka, L. N. (1982).** Nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* during osmotic stress. Effect of exogenous proline or a proline overproducing plasmid. *Biochim Biophys Acta* **719**:273-283.

- Leisinger, T. (1996).** Biosynthesis of proline. *In*: R. C. I. F. C. Neidhard, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schächter, H. E. Umbarger (Herausg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, S. 434-441. ASM Press, Washington D.C., USA.
- Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. und Booth, I. R. (1999).** Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J* **18**:1730-1737.
- Lippert, K. und Galinski, A. A. (1992).** Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**:61-65.
- Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J. und Sparling, R. (1998).** Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44**:707-717.
- Lopez, C. S., Heras, H., Ruzal, S. M., Sanchez-Rivas, C. und Rivas, E. A. (1998).** Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium. *Curr Microbiol* **36**:55-61.
- Lopez, C. S., Heras, H., Garda, H., Ruzal, S., Sanchez-Rivas, C. und Rivas, E. (2000).** Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *Int J Food Microbiol* **55**:137-142.
- Lopez-Garcia, P. und Forterre, P. (1997).** DNA topology in hyperthermophilic *Archaea*: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol Microbiol* **23**:1267-1279.
- Louis, P. und Galinski, E. A. (1997).** Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**:1141-1149.
- Louis, P., Trüper, H. G. und Galinski, E. A. (1994).** Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**:648-688.
- Lucht, J. M., Dersch, P., Kempf, B. und Bremer, E. (1994).** Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**:6578-6586.
- Ludwig, W. und Strunk, O. (1996).** ARB - a software environment for sequence data.
- Ma, J. C. und Dougherty, D. A. (1997).** The Cation- $\pi$  Interaction. *Chem Rev* **97**:1303-1324.
- Madkour, M. A., Smith, L. T. und Smith, G. M. (1990).** Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**:2876-2881.

- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K. und Gottesman, S. (2001).** Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* **39**:1382-1394.
- Malin, G. und Lapidot, A. (1996).** Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol* **178**:385-395.
- Malin, G., Iakobashvili, R. und Lapidot, A. (1999).** Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. *J Biol Chem* **274**:6920-6929.
- Mantyla, E., Lang, V. und Palva, E. T. (1995).** Role of abscisic acid in drought-induced, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107**:141-148.
- Martin, D. D., Ciulla, R. A. und Roberts, M. F. (1999).** Osmoadaptation in *Archaea*. *Appl Environ Microbiol* **65**:1815-1825.
- Martin, D. D., Ciulla, R. A., Robinson, P. M. und Roberts, M. F. (2000).** Switching osmolyte strategies: reponse of *Methanococcus thermolithotrophicus* to changes in external NaCl. *Biochim Biophys Acta* **1524**:1-10.
- Martinac, B. (2001).** Mechanosensitive channels in prokaryotes. *Cell Physiol Biochem* **11**:61-76.
- Martins, L. O. und Santos, H. (1995).** Accumulation of mannosylglycerate and di-myo-inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Appl Environ Microbiol* **61**:3299-3303.
- Martins, L. O., Carreto, L. S., Dacosta, M. S. und Santos, H. (1996).** New compatible solutes related to di-myo-inositol-phosphate in members of the order *Thermotogales*. *J Bacteriol* **178**:5644-5651.
- Martins, L., Huber, R., Huber, H., Stetter, K., Da Costa, M. und Santos, H. (1997).** Organic solutes in hyperthermophilic *Archaea*. *Appl Environ Microbiol* **63**:896-902.
- Martins, L. O., Empadinhas, N., Marugg, J. D., Miguel, C., Ferreira, C., Da Costa, M. S. und Santos, H. (1999).** Biosynthesis of mannosylglycerate in the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. Biochemical and genetic characterization of a mannosylglycerate synthase. *J Biol Chem* **274**:35407-35414.
- Maskow, T. und Babel, W. (2001).** Calorimetrically obtained information about the efficiency of ectoine synthesis from glucose in *Halomonas elongata*. *Biochim Biophys Acta* **1527**:4-10.
- Maurel, C., Tacnet, F., Guclu, J., Guern, J. und Ripoche, P. (1997).** Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:7103-7108.

- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E. T. und Epstein, W. (1994).** Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. J Biol Chem **269**:1911-1917.
- Mc Neil, S. D., Nuccio, M. L. und Hanson, A. D. (1999).** Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. Plant Physiol **120**:945-950.
- Measures, J. C. (1975).** Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature **257**:398-400.
- Mehta, P. K., Hale, T. I. und Christen, P. (1993).** Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. Eur J Biochem **214**:549-261.
- Mendum, M. L. und Smith, L. T. (2002).** Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. Appl Environ Microbiol **68**:813-819.
- Meury, J. (1988).** Glycinebetaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. Arch Microbiol **149**:232-239.
- Mikkat, S., Hagemann, M. und Schoor, A. (1996).** Active transport of glucosylglycerol is involved in salt adaptation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Microbiology **142**:1725-1732.
- 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, USA.
- Miller, K. J. und Wood, J. M. (1996).** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. Annu Rev Microbiol **50**:101-136.
- Milner, J. L., Grothe, S. und Wood, J. M. (1988).** Proline porter II is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of *Escherichia coli* K12. J Biol Chem **263**:14900-14905.
- Min-Yu, L., Ono, H. und Takano, M. (1993).** Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp. Ann Rep Intern Center Coop Res Biotechnol **16**:193-200.
- Moe, P. C., Blount, P. und Kung, C. (1998).** Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. Mol Microbiol **28**:583-592.
- Mojica, F. J. M., Juez, G. und Rodriguez-Valera, F. (1993).** Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst*I sites. Mol Microbiol **9**:613-621.

- Moses, S. (1999).** Molekulare und physiologische Charakterisierung der Prolin-Verwertung in *Bacillus subtilis* und Untersuchungen zum Efflux und Recycling von osmotischen Schutzsubstanzen. Dissertation, Universität Marburg.
- Muffler, A., Barth, M., Marschall, C. und Hengge-Aronis, R. (1997).** Heat shock regulation of  $\sigma^S$  turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by  $\sigma^S$  and  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli*. J Bacteriol **179**:445-452.
- Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G. und Hengge-Aronis, R. (1996).** The response regulator RssB controls stability of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. EMBO **15**:1333-1339.
- Myllyla, R., Gunzler, V., Kivirikko, K. I. und Kaska, D. D. (1992).** Modification of vertebrate and algal prolyl 4-hydroxylases and vertebrate lysyl hydroxylase by diethyl pyrocarbonate. Evidence for histidine residues in the catalytic site of 2-oxoglutarate-coupled dioxygenases. Biochem J **286**:923-927.
- Nakamura, L. K. (1984).** *Bacillus psychrophilus* sp. nov., nom. rev. Int J Syst Bacteriol **34**:121-123.
- Nakamura, T., Yuda, R., Unemoto, T. und Bakker, E. P. (1998).** KtrAB, a new type of bacterial  $K^+$ -uptake system from *Vibrio alginolyticus*. J Bacteriol **180**:3491-3494.
- Nakayama, H. Y. K., Ono H., Murooka Y., Atsuhiko Shinmyo (2000).** Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. Plant Physiol **122**:1239-1247.
- Nau-Wagner, G., Boch, J., Le Good, J. A. und Bremer, E. (1999).** High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol **65**:560-568.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. und Schächter, M. (1990).** Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Ni Bhriain, N., Dorman, C. J. und Higgins, C. F. (1989).** An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. Mol Microbiol **3**:933-942.
- Niaudet, B. und Ehrlich, S. D. (1982).** Insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis*: mechanism and use in gene cloning. Gene **19**:277-284.
- Nunes, O. C., Manaia, C. M., Da Costa, M. S. und Santos, H. (1995).** Compatible solutes in the thermophilic bacteria *Rhodothermus marinus* and *Thermus thermophilus*. Appl Environ Microbiol **61**:2351-2357.
- Nyysola, A., Kerovuoto, J., Kaukinen, P., Von Weymarn, N. und Reinikainen, T. (2000).** Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. J Biol Chem **275**:22196-22201.

- Nyysola, A. und Leisola, M. (2001).** *Actinopolyspora halophila* has two separate pathways for betaine synthesis. *Arch Microbiol* **176**:294-300.
- Nyysola, A., Reinikainen, T. und Leisola, M. (2001).** Characterization of glycine sarcosine N-methyltransferase and sarcosine dimethylglycine N-methyltransferase. *Appl Environ Microbiol* **67**:2044-2050.
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J. C., Renault, P., Bolotin, A. und Mistou, M. Y. (1999).** Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system BusA in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J Bacteriol* **181**:6238-6246.
- Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M. und Murooka, Y. (1999).** Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **181**:91-99.
- Ozoline, O. N., Deev, A. A. und Arkhipova, M. V. (1997).** Non-canonical sequence elements in the promoter structure. Cluster analysis of promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **25**:4703-4709.
- Panoff, J. M., Thammavongs, B., Gueguen, M. und Boutibonnes, P. (1998).** Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiol* **36**:75-83.
- Parsegian, V. A., Rand, R. P. und Rau, D. C. (2000).** Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: a comparison of perspectives. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:3987-3992.
- Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R. (1996).** Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J Bacteriol* **178**:5229-5234.
- Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R. (1998a).** Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **273**:2567-2574.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Kramer, R. und Morbach, S. (1998b).** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol* **180**:6005-6012.
- Peters, P., Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1990).** The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**:157-162.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U. und Hecker, M. (2001).** Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:5617-5631.

- Philipp, W. J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., Bergh, S., Bloom, B. R., Jacobs, W. R. und Cole, S. T. (1996).** An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* h37rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. Proc Natl Acad Sci USA **93**:3132-3137.
- Poolman, B. und Glaesker, E. (1998).** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. Mol Microbiol **29**:397-407.
- Price, C. W. (2000).** Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. In: G. Storz und R. Hengge-Aronis (Herausg.), Bacterial stress responses, S. 179-197. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Price, C. W., Fawcett, P., Ceremonie, H., Su, N., Murphy, C. K. und Youngman, P. (2001).** Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol **41**:757-774.
- Privalov, P. L. und Gill, S. J. (1988).** Stability of protein structure and hydrophobic interaction. Adv Protein Chem **39**:191-234.
- Proom, M. und Knight, B. C. J. C. (1950).** *Bacillus pantothenicus* (n. sp.). J Gen Microbiol **4**:539-541.
- Proom, M. und Knight, B. C. J. C. (1950).** A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus *Bacillus*. J Gen Microbiol **4**:508-538.
- Qu, Y., Bolen, C. L. und Bolen, D. W. (1998).** Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. Proc Natl Acad Sci USA **95**:9268-9273.
- Rabus, R., Jack, D. L., Kelly, D. J. und Saier, M. H., Jr. (1999).** TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. Microbiology **145**:3431-3445.
- Racher, K. I., Culham, D. E. und Wood, J. M. (2001).** Requirements for osmosensing and osmotic activation of transporter ProP from *Escherichia coli*. Biochemistry **40**:7324-7333.
- Rajashekar, C. B., Zhou, H., Marcum, K. B. und Prakash, O. (1999).** Glycine betaine accumulation and induction of cold tolerance in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) plants. Plant Science **148**:175-183.
- Rajkumari, K. und Gowrishankar, J. (2001).** *In vivo* expression from the RpoS-dependent P1 promoter of the osmotically regulated *proU* operon in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*: activation by *rho* and *hns* mutations and by cold stress. J Bacteriol **183**:6543-6550.
- Ramos, A., Raven, N. D. H., Sharp, R. J., Bartolucci, S., Rossi, M., Cannio, R., Lebbink, J., Vanderoost, J., Devos, W. M. und Santos, H. (1997).** Stabilization of enzymes against thermal stress and freeze-drying by mannosylglycerate. Appl Environ Microbiol **63**:4020-4025.

- Record, M. T., Jr., Courtenay, E. S., Cayley, D. S. und Guttman, H. J. (1998).** Responses of *Escherichia coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *TIBS* **23**:143-148.
- Reed, R. H., Borowitzka, L. J., Mackay, M. A., Chudek, J. A., Foster, R., Warr, S. C. R., Moore, D. J. und Stewart, W. D. P. (1986).** Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **39**:51-56.
- Reizer, J., Reizer, A. und Saier, M. H., Jr. (1994).** A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim Biophys Acta* **1197**:133-166.
- Repoila, F. und Gottesman, S. (2001).** Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *J Bacteriol* **183**:4012-4023.
- Rhodes, D. und Hanson, A. D. (1993).** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**:357-384.
- Roberts, M. F. (2000).** Osmoadaptation and osmoregulation in *Archaea*. *Front Biosci* **5**:796-812.
- Robertson, D. E., Roberts, M. F., Belay, N., Stetter, K. O. und Boone, D. R. (1990).** Occurrence of  $\beta$ -glutamate a novel osmolyte in marine methanogenic *Bacteria*. *Appl Environ Microbiol* **56**:1504-1508.
- Rübenhagen, R., Morbach, S. und Kramer, R. (2001).** The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic  $K^+$ . *EMBO J* **20**:5412-5420.
- Rübenhagen, R., Ronsch, H., Jung, H., Kramer, R. und Morbach, S. (2000).** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J Biol Chem* **275**:735-741.
- Rudolph, A. S., Crowe, J. H. und Crowe, L. M. (1986).** Effects of three stabilizing agents proline, betaine, and trehalose on membrane phospholipids. *Arch Biochem Biophys* **245**:134-143.
- Ruffert, S., Lambert, C., Peter, H., Wendisch, V. F. und Krämer, R. (1997).** Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur J Biochem* **247**:572-580.
- Ruzal, S. M., López, C., Rivas, E. und Sánchez-Rivas, C. (1998).** Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **36**:75-79.
- Saier, M. H., Jr. (2000).** Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology* **146**:1775-1795.

- Saier, M. H., Jr., Eng, B. H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D. A., Hutchinson, W. J., Jack, D. L., Lai, E. C., Liu, H. J., Nusinew, D. P., Omar, A. M., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Quan, J. A., Sliwinski, M., Tseng, T. T., Wachi, S. und Young, G. B. (1999).** Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* **1422**:1-56.
- Sajbidor, J. (1997).** Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit Rev Biotechnol* **17**:87-103.
- Sakamoto, A., Valverde, R., Alia, Chen, T. H. und Murata, N. (2000).** Transformation of *Arabidopsis* with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *Plant J* **22**:449-453.
- Sakamoto, T., Higashi, S., Wada, H., Murata, N. und Bryant, D. A. (1997).** Low-temperature-induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *FEMS Microbiol Lett* **152**:313-320.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2000).** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Samuel, D., Kumar, T. K., Ganesh, G., Jayaraman, G., Yang, P. W., Chang, M. M., Trivedi, V. D., Wang, S. L., Hwang, K. C., Chang, D. K. und Yu, C. (2000).** Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci* **9**:344-352.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467.
- Sato, N. und Murata, N. (1980).** Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga, *Anabaena variabilis*: the central role of diacylmonogalactosylglycerol in thermo-adaptation. *Biochim Biophys Acta* **619**:353-366.
- Schmitt-Kittler, O. (1997).** Molekulare und physiologische Analyse des *bsaA*-Gens von *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Schön, U. und Schumann, W. (1994).** Construction of His<sub>6</sub>-tagging vectors allowing single-step purification of GroES and other polypeptides produced in *Bacillus subtilis*. *Gene* **147**:91-94.
- Severin, J., Wohlfahrt, A. und Galinski, E. A. (1992).** The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**:1629-1638.
- Sheehan, B. J., Foster, T. J., Dorman, C. J., Park, S. und Stewart, G. S. (1992).** Osmotic and growth-phase dependent regulation of the *eta* gene of *Staphylococcus aureus*: a role for DNA supercoiling. *Mol Gen Genet* **232**:49-57.
- Shibasaki, T., Mori, H., Chiba, S. und Ozaki, A. (1999).** Microbial proline 4-hydroxylase screening and fene cloning. *Appl Environ Microbiol* **65**:4028-4031.

- Shibasaki, T., Hashimoto, S., Mori, H. und Ozaki, A. (2000a).** Construction of a novel hydroxyproline-producing recombinant *Escherichia coli* by introducing a proline 4-hydroxylase gene. *J Biosci Bioengin* **90**:522-525.
- Shibasaki, T., Mori, H. und Ozaki, A. (2000b).** Enzymatic production of trans-4-hydroxy-L-proline by regio- and stereospecific hydroxylation of L-proline. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:746-750.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Yano, H. und Komagata, K. (1996a).** Differentiation of species in the *Bacillus brevis* group and the *Bacillus aneurinolyticus* group based on the electrophoretic whole-cell protein pattern. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**:31-39.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. und Komagata, K. (1996b).** Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**:939-946.
- Sibley, M. H. und Yopp, J. H. (1987).** Regulation of S-Adenosylhomocysteine hydrolase in the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*: a possible role in glycine betaine synthesis. *Arch Microbiol* **149**:43-46.
- Silva, Z., Borges, N., Martins, L. O., Wait, R., Da Costa, M. S. und Santos, H. (1999).** Combined effect of the growth temperature and salinity of the medium on the accumulation of compatible solutes by *Rhodothermus marinus* and *Rhodothermus obamensis*. *Extremophiles* **3**:163-172.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G., Abee, T. und Hill, C. (1999).** Identification and disruption of *BetL*, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl Environ Microbiol* **65**:2078-2083.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., O'Driscoll, B. und Hill, C. (2000).** Analysis of the role of *betL* in contributing to the growth and survival of *Listeria monocytogenes* LO28. *Int J Food Microbiol* **60**:261-268.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. und Hill, C. (2001a).** Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**:2571-2577.
- Sleator, R. D., Wouters, J., Gahan, C. G., Abee, T. und Hill, C. (2001b).** Analysis of the role of *OpuC*, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **67**:2692-2698.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. und Hill, C. (2001c).** Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: effects on salt tolerance and murine infection. *Appl Environ Microbiol* **67**:4560-4565.
- Sledjeski, D. D., Gupta, A. und Gottesman, S. (1996).** The small RNA, *DsrA*, is essential for the low temperature expression of *RpoS* during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J* **15**:3993-4000.

- Smith, C. J., Deuch, A. H. und Rushlow, K. E. (1984).** Purification and characteristics of a  $\gamma$ -glutamylkinase involved in *Escherichia coli* proline biosynthesis. *J Bacteriol* **157**:545-551.
- Spiegelhalter, F. (1999).** Die transkriptionell kontrollierte Aufnahme osmotischer Schutzsubstanzen in *Bacillus subtilis* am Beispiel der Prolin- und Glycin Betain-Transportsysteme OpuE und OpuD. Dissertation, Universität Marburg.
- Spiegelhalter, F. und Bremer, E. (1998).** Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis* - contributions of the  $\sigma^A$ - and  $\sigma^B$ -dependent stress-responsive promoters. *Mol Microbiol* **29**:285-296.
- Spizizen, J. (1958).** Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci USA* **44**:1072-1078.
- Stirling, D. A., Hulton, C. S. J., Waddell, L., Park, S. F., Stewart, G. S. A. B., Booth, I. R. und Higgins, C. F. (1989).** Molecular characterization of the *proU* loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betaine transport systems. *Mol Microbiol* **3**:1025-1038.
- Strøm, A. R. und Kaasen, I. (1993).** Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol* **8**:205-210.
- Suenobu, K., Nagooka, M., Yamabe, T. und Nagata, S. (1998).** *Ab initio* orbital study on molecular and hydration structures of ectoine. *J Phys Chem* **102**:7505-7511.
- Suzuki, I., Kanesaki, Y., Mikami, K., Kanehisa, M. und Murata, N. (2001).** Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol Microbiol* **40**:235-244.
- Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hiram, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S. und Horikoshi, K. (2000).** Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **28**:4317-4331.
- Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W. und Hashimoto-Gothoh, T. (1987).** High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ*  $\alpha$ -complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* **61**:63-74.
- Talibart, R., Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Wróblewski, H., Blanco, C. und Bernard, T. (1994).** Osmoadaptation in *Rhizobia*: ectoine-induced salt tolerance. *J Bacteriol* **176**:5210-5217.
- Tanaka, T., Ikiat, K., Ashida, T., Motoyama, Y., Yamaguchi, Y. und Satouchi, K. (1996).** Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids* **31**:1173-1178.
- Tatti, K. M. und Moran, C. P., Jr. (1984).** Promoter recognition by  $\sigma^{37}$  RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **175**:285-297.

- Tatzelt, J., Prusiner, S. B. und Welch, W. J. (1996).** Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J* **15**:6363-6373.
- Tholema, N., Bakker, E. P., Suzuki, A. und Nakamura, T. (1999).** Change to alanine of one out of four selectivity filter glycines in KtrB causes a two orders of magnitude decrease in the affinities for both K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> of the Na<sup>+</sup> dependent K<sup>+</sup> uptake system KtrAB from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett* **450**:217-220.
- Thompson, G. A., Jr. und Nozawa, Y. (1977).** *Tetrahymena*: a system for studying dynamic membrane alterations within the eukaryotic cell. *Biochim Biophys Acta* **472**:55-92.
- Tschichholz, I. und Trüper, H. G. (1990).** Fate of compatible solutes during dilution stress in *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiol Rev* **73**:181-186.
- van der Heide, T. und Poolman, B. (2000a).** Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J Bacteriol* **182**:203-206.
- van der Heide, T. und Poolman, B. (2000b).** Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:7102-7106.
- van der Heide, T., Stuart, M. C. und Poolman, B. (2001).** On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J* **20**:7022-7032.
- van Iwaarden, P. R., Driessen, A. J., Lokema, J. S., Kaback, H. R. und Konings, W. N. (1993).** Exchange, efflux, and substrate binding by cysteine mutants of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**:5419-5424.
- Vedder, A. (1934).** *Bacillus alcalophilus* n. sp.; benevens enkele ervaringen met sterk alcalische voedingsbodems. *Antonie van Leeuwenhoek* **1**:143-147.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. und Oren, A. (1998a).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:504-544.
- Ventosa, A., Marquez, M. C., Garabito, M. J. und Arahál, D. R. (1998b).** Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles* **2**:297-304.
- Vigh, L., Maresca, B. und Harwood, J. L. (1998).** Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci* **23**:369-374.
- Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmidt, R., Mach, H. und Hecker, M. (1994).** Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140**:741-752.

- Völker, U., Maul, B. und Hecker, M. (1999).** Expression of the  $\sigma^B$ -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**:3942-3948.
- Völker, U., Völker, A., Maul, B., Dufour, A. und Haldenwang, W. G. (1995).** Separate mechanisms activate  $\sigma^B$  of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol* **177**:3771-3780.
- Von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M. und Bremer, E. (1997).** Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system OpuE regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor  $\sigma^B$ . *Mol Microbiol* **25**:175-187.
- Von Heijne, G. (1992).** Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**:487-494.
- Voskuil, M. I., Voepel, K. und Chambliss, G. H. (1995).** The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **17**:271-279.
- Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D. und Powers, D. W. (2000).** Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**:897-900.
- Vuillard, L., Rabilloud, T. und Goldberg, M. E. (1998).** Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate *in vitro* protein renaturation. *Eur J Biochem* **256**:128-135.
- Wainö, M., Tindall, B. J., Schumann, P. und Ingvorsen, K. (1999).** *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**:821-831.
- Welsh, D. T. (2000).** Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**:263-290.
- Welsh, D. T., Reed, R. H. und Herbert, R. A. (1991).** The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCBI 9484: Interaction of trehalose potassium and glutamate during osmoadaptation in continuous culture. *J Gen Microbiol* **137**:745-750.
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A. und Reed, R. H. (1990).** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **136**:2527-2535.
- Whatmore, A. M. und Reed, R. H. (1990).** Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for  $K^+$  in turgor regulation. *J Gen Microbiol* **136**:2521-2526.
- Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J. und Boor, K. J. (1998).** General stress transcription factor  $\sigma^B$  and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **180**:3650-3656.

- Williams, S. T., Googfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A. und Sakin, M. J. (1983).** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol* **129**:1743-1813.
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Jr., Fox, G. E., Deinhard, G. und Poralla, K. (1992).** Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov.. *Int J Syst Bacteriol* **42**:263-269.
- Wood, J. M. (1999).** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:230-262.
- Wu, L. und Welker, N. E. (1991).** Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. *J Bacteriol* **173**:4889-4892.
- Wu, S., De Lencastre, H. und Tomasz, A. (1996).**  $\sigma^B$ , a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J Bacteriol* **178**:6036-6042.
- Xing, W. und Rajashekar, C. B. (2001).** Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot* **46**:21-28.
- Yamada, M., Kubo, M., Miyake, T., Sakaguchi, R., Higo, Y. und Imanaka, T. (1991).** Promotor sequence analysis in *Bacillus* and *Escherichia*: construction of strong promoters in *E. coli*. *Gene* **99**:109-114.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (1994).** A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**:251-264.
- Yoon, J. H., Lee, K. C., Weiss, N., Kho, Y. H., Kang, K. H. und Park, Y. H. (2001).** *Sporosarcina aquimarina* sp nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. *Intern J Syst Evol Microbiol* **51**:1079-1086.
- Zhilina, T. N. und Zavarzin, G. A. (1990).** Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **87**:315-322.

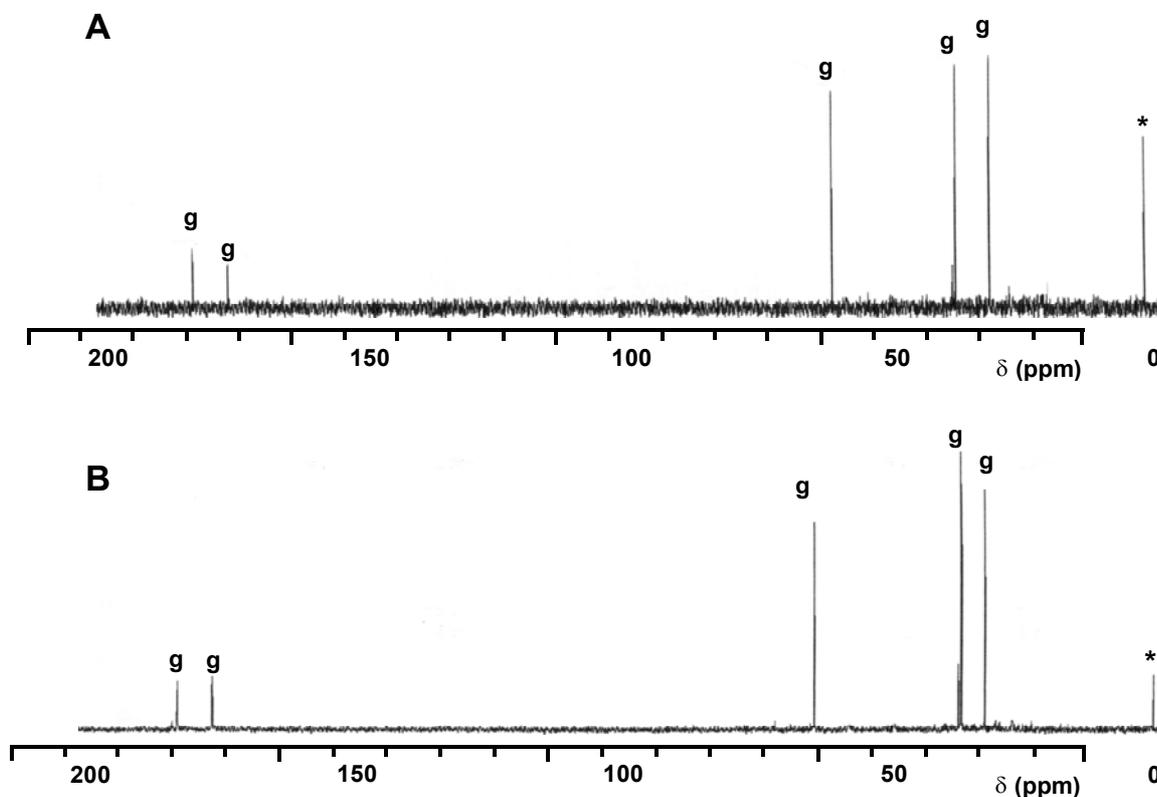
## VII. Anhang

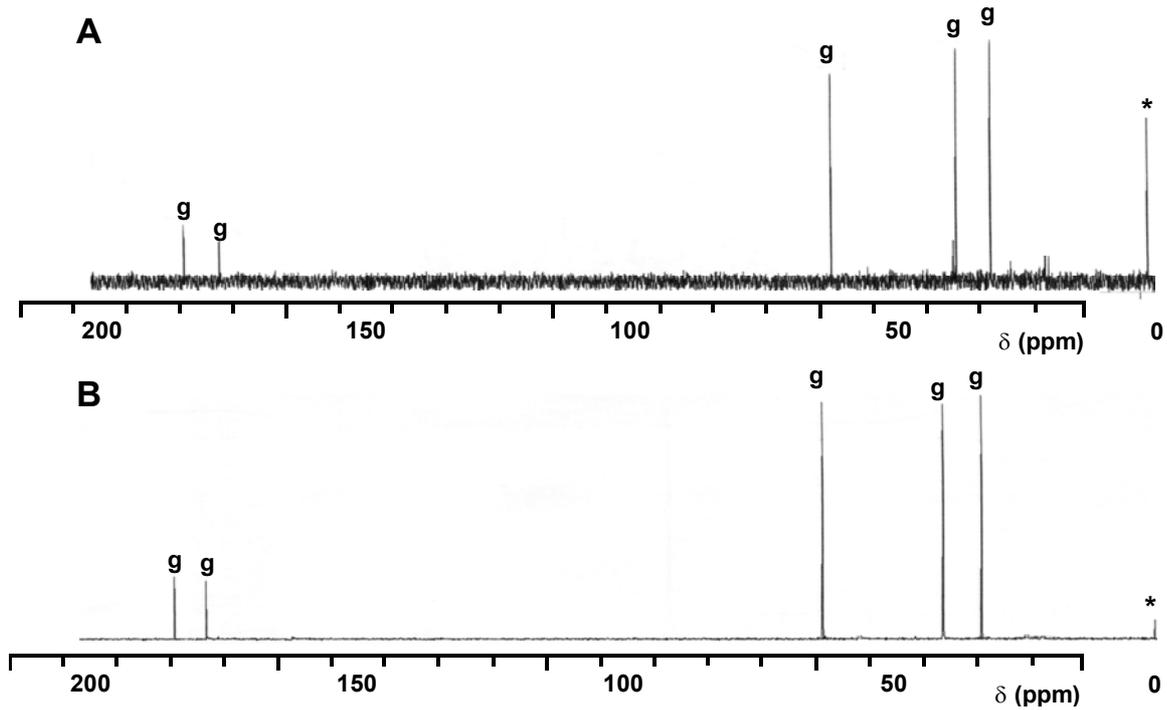
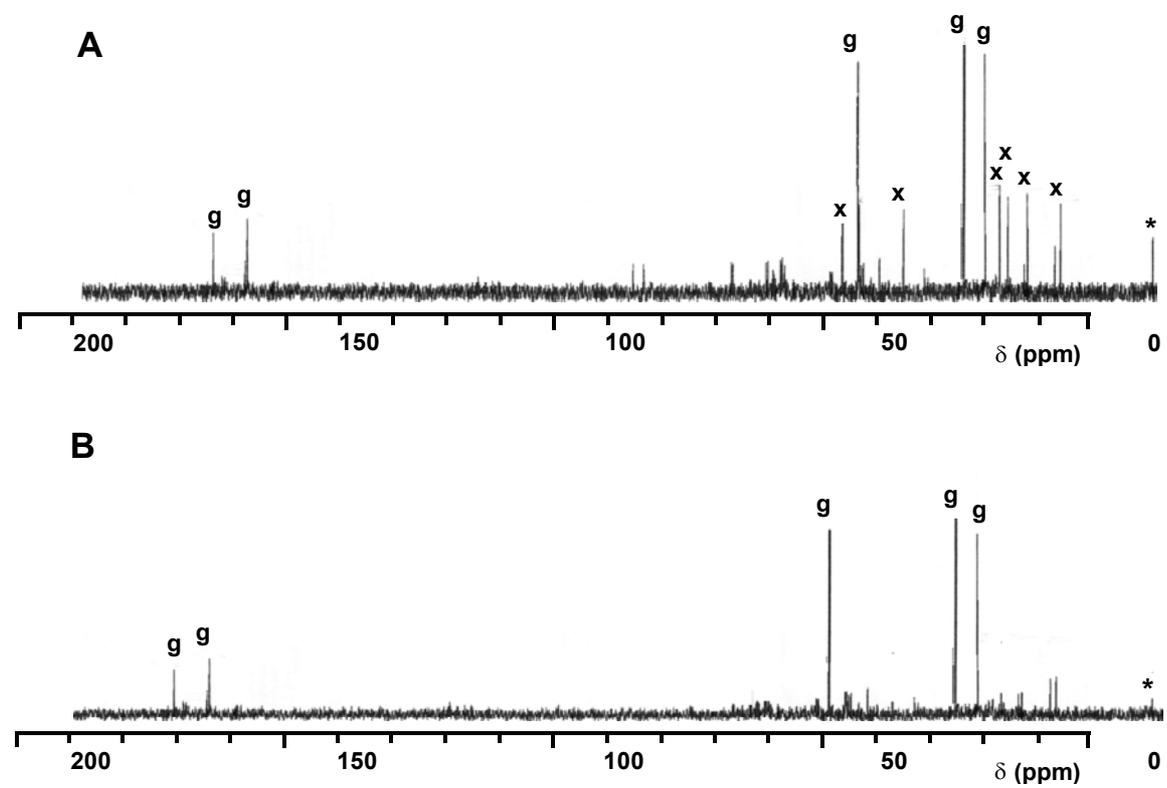
### 1 <sup>13</sup>C-NMR Spektren hochosmolar gestresster *Bacilli*

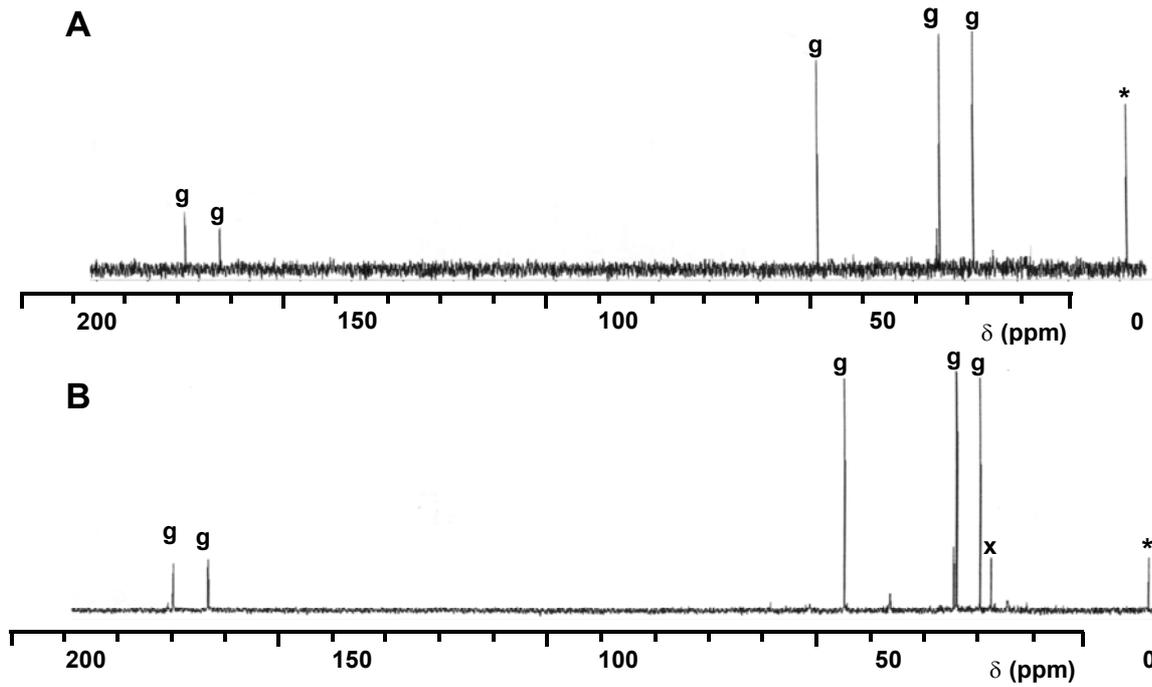
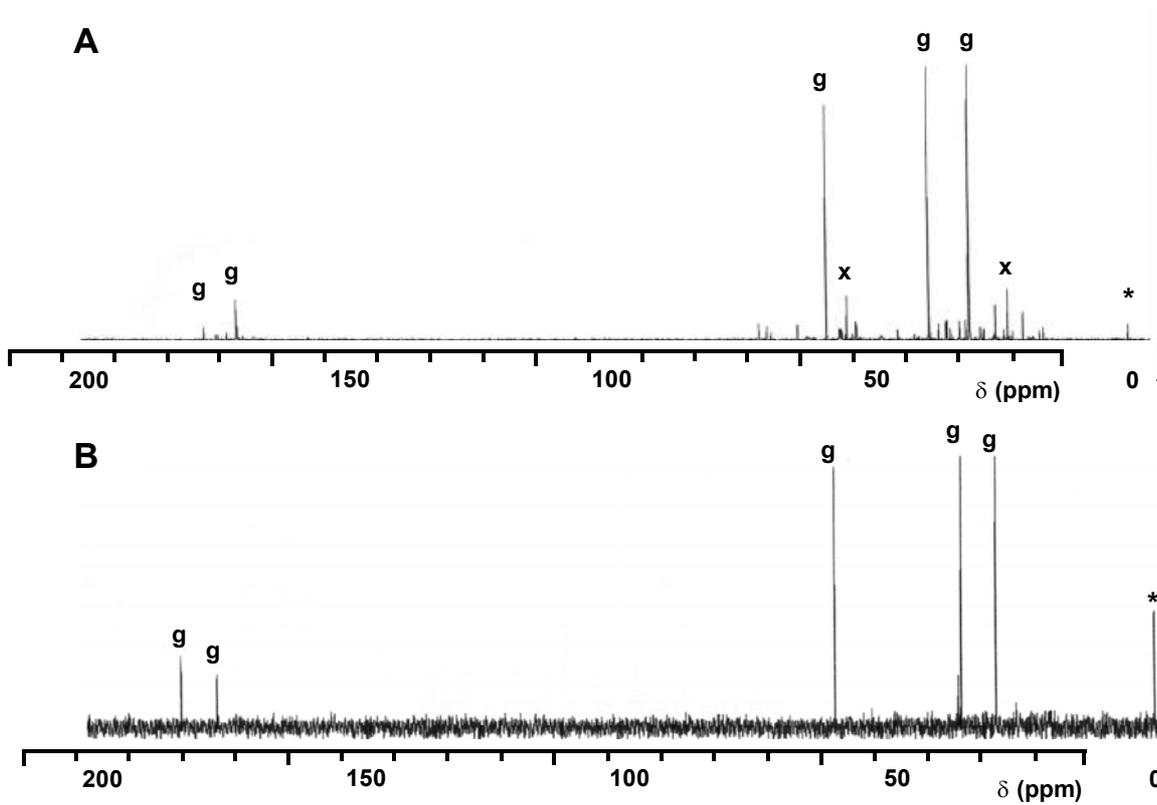
Die untersuchten Bakterienspezies wurden in den in Kapitel 3 Material und Methoden beschriebenen definierten Minimalmedien und unter den dort angegebenen Wachstumsbedingungen ohne NaCl-Zugabe und unter NaCl-Stress angezogen. Dargestellt sind die <sup>13</sup>C-NMR Spektren der ethanolischen Ganzzellextrakte der jeweiligen osmotisch ungestressten (A) und gestressten (B) Kultur einer Bakterienspezies. Resonanzen von Glutamat (g), Prolin (p), Ectoin (e), Hydroxyectoin (h), dem Standard D<sub>4</sub>-3-(Trimethylsilyl)propionate (\*) und nicht identifizierbare Resonanzen (x) sind markiert. Die chemischen Verschiebungen [angegeben in ppm relativ zum Standard D<sub>4</sub>-3-(Trimethylsilyl)propionat] sind für Glutamat 27,9; 34,6; 55,8; 175,3; 184,1, für Prolin 25,5; 33,1; 48,8; 61,3; 175,2, für Ectoin 19,6; 23,5; 38,3; 54,4; 161,9; 177,8 und für Hydroxyectoin 17,9; 42,6; 59,8; 160,5; 174,3.

#### 1.1 Glutamat synthetisierende *Bacilli*

##### 1.1.1 *Bacillus cereus* (DSM 31<sup>T</sup>)

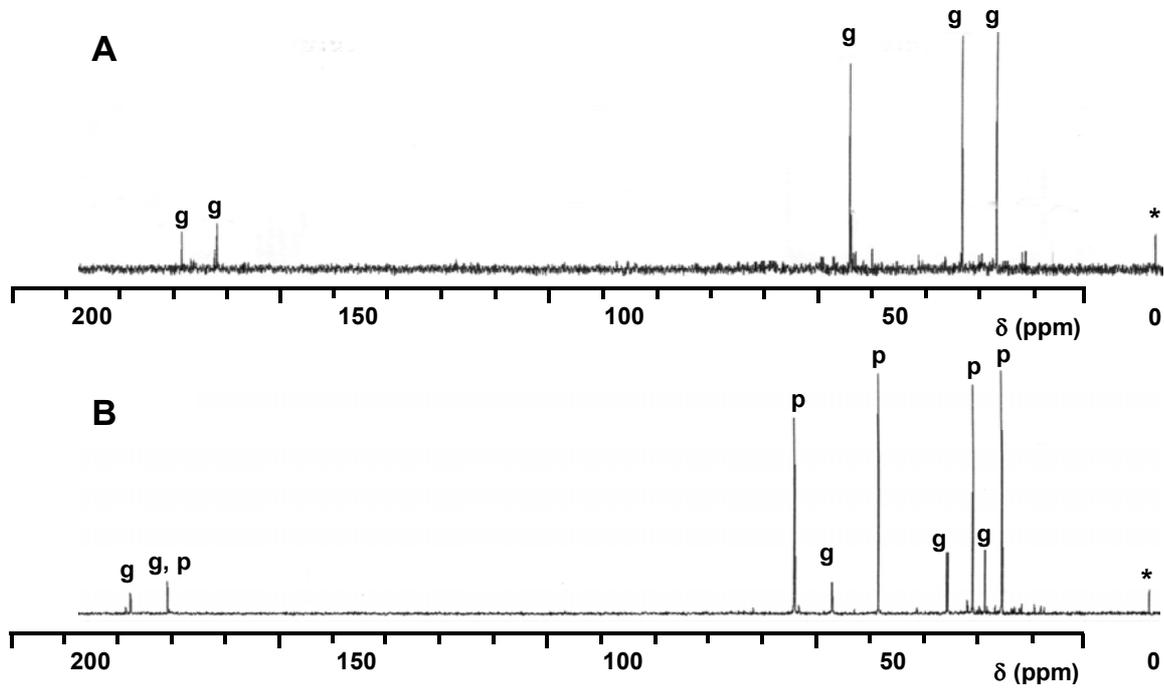


1.1.2 *Bacillus circulans* (DSM 9<sup>T</sup>)1.1.3 *Bacillus thuringiensis* (DSM 2046<sup>T</sup>)

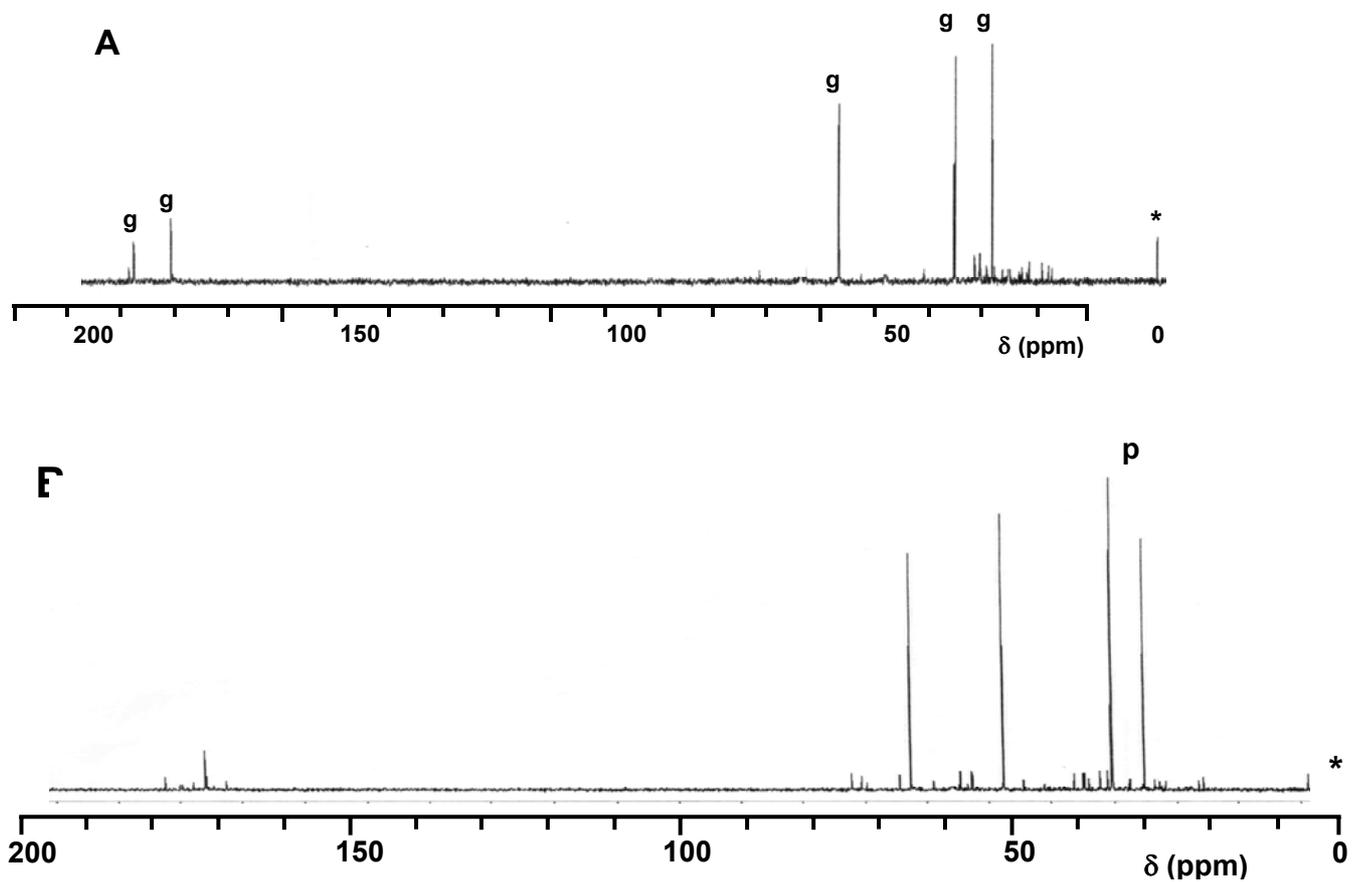
1.1.4 *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (DSM 5562<sup>T</sup>)1.1.5 *Paenibacillus polymyxa* (DSM 36<sup>T</sup>)

## 1.2 Prolin synthetisierende *Bacilli*

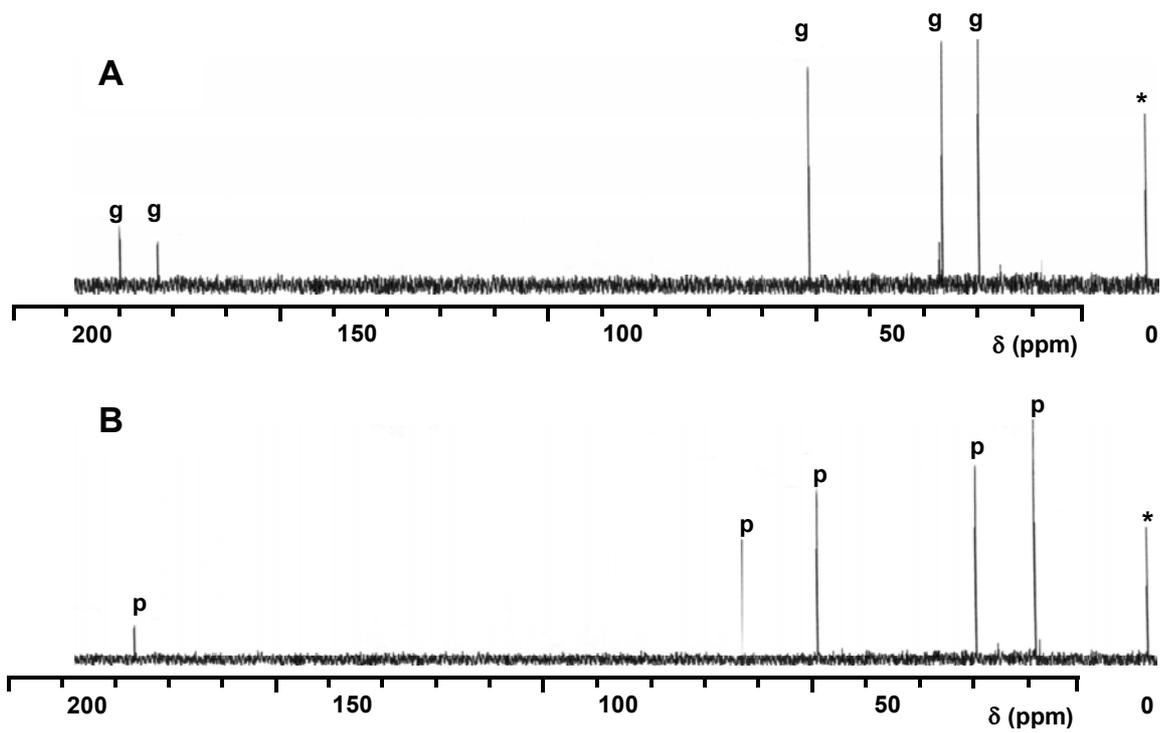
### 1.2.1 *Bacillus subtilis* JH642



### 1.2.2 *Bacillus licheniformis* (DSM 13<sup>T</sup>)

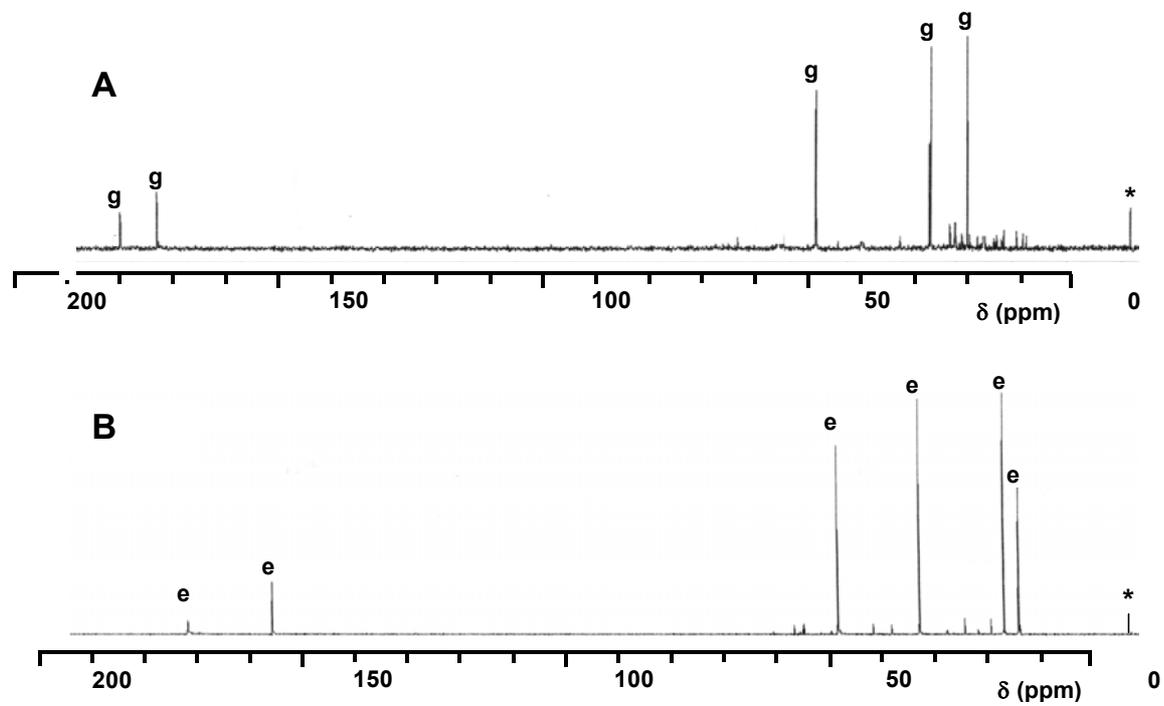


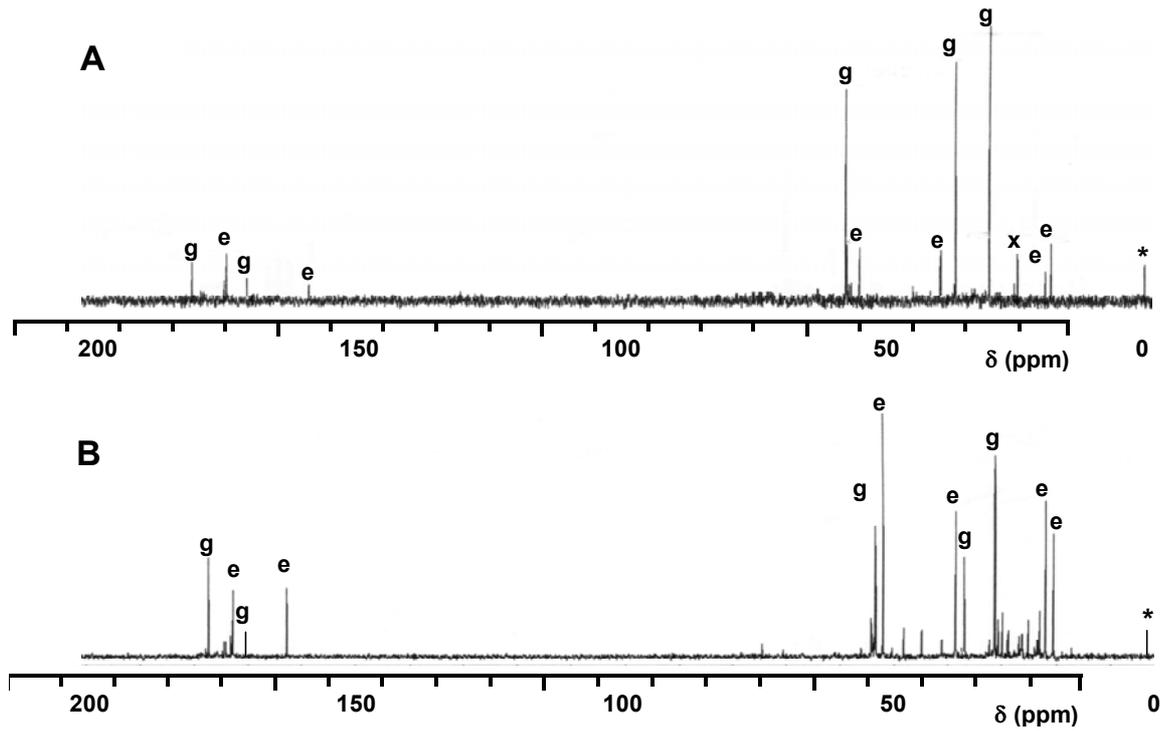
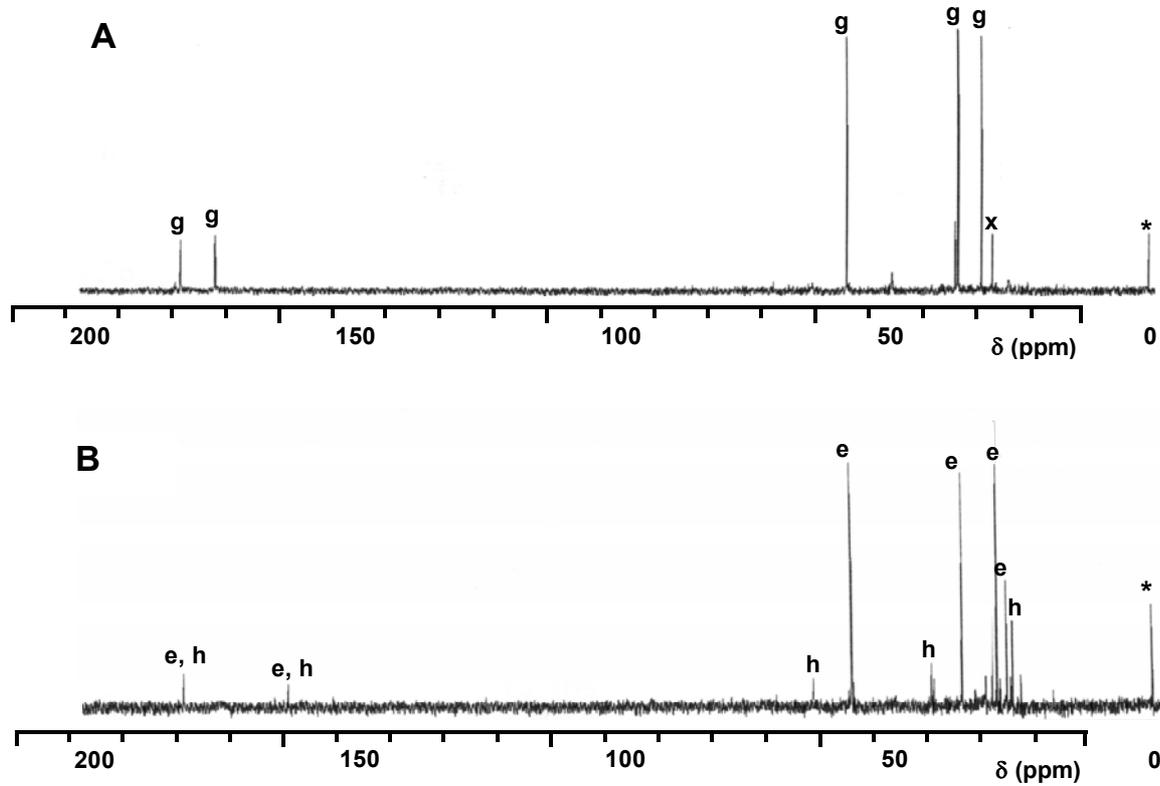
### 1.2.3 *Bacillus megaterium* (DSM 32<sup>T</sup>)



## 1.3 Ectoin synthetisierende Bakterien

### 1.3.1 *Bacillus alcalophilus* (DSM 485<sup>T</sup>)



1.3.2 *Sporosarcina psychrophila* (DSM 3<sup>T</sup>)1.3.2 *Salibacillus salexigens* (DSM 11438<sup>T</sup>)

## 2 DNA-Sequenz des *ectABC*-Operons aus *S. pasteurii*

GAATTCCTTTTGAAGGCGCTAATTTTGTCTTTCATACTGCAAGGCAGAAAACAGCCCAATGATGATGTCGCCAGCAATTCCTAAGCGGGCGATAA 100  
 AAAGTCACCAATTACCCCTTGTATATCCACTTTATAATTTCTTCATGAGGACTTATCGGGAATGTAAAAACAATCCTTGATCAGCCACCCTCTCTAAA 200  
 CTCTTATCTTGATACGATTAACATCGTACTGCGGGAACGATCTTTTCACATGAATAAATTCCTCAAGTTTCATAGGATCAACAATGGGTACTTCAAT 300

**-35**                      **-16**                      **-10**                        $\sigma^{70}$

**ectA**

TTAGAAAGGTGTAATAATTCCTGCTAATAATGTGGGTGAAAAGCACTGAAGTCAAATTCATCAAAAAACGCCAAGGTGAAACATTCGTAATGGTGG 400  
 GGACTTGGGAGGTGAATGTTTTGGGTAATAAGTAAGCAGGGATCAACAGCAGTCGCTGAGCAAGAAGAGACCCTGGTCTTCAGAGTACCAACGGAAG 500  
**rbs**                      M F W V I S K Q G S T A V A E Q E E T L V F R V P T E  
 ACGGCAAAGCAATATGGAATCTTATTAACATCCCGGTGTACTCGATTTACTATCTTCGTATAGTTATTTTATGTGGGCGAAGTTTTTTGACCAAAC 600  
 D G K A I W N L I N Y P G V L D L L S S Y S Y F M W A K F F D Q T  
 TGTAGTTGGTGAACAACGAACAAATTGTGGTTTTTATATCGGGCTTCATAACAACGAATACGGCCAGATACGCTTTTTTATTTGGCAAGTTGC 700  
 V V G E T N E Q I V G F Y I G L H T T E Y G P D T L F Y L A S C  
 GATGAAACCCAGCGACAGAAAGGGCTTGCTTCAAGGATGTTGCAAGCGATTTTGCACCGCTATGCATGGCGGAATATCCGGTATTTGGAGGCGACTG 800  
 D E T Q R Q K G L A S R M L Q A I L H R Y A W R N I R Y L E A T  
 GGACTTCAAACGAAGCACCCGAAGCCTTATTTCAAAGTTATCAAGAGACTTGAAGACGGCGTACCATGTGACAGAATTTTTTACTGAAGACCAGTT 900  
 G T S N E A P E A L F Q K L S R D L K T A Y H V T E F F T E D Q F  
 AGGAAAGGGACACGAAGACGAACGGTTATTTCAAATCGGCCCTTTTTCAGCAAGTATGAAAAGATGAGAACAAAATAATTGAACGTAAAAAGTGGAGG 1000  
 G K G H E D E R L F K I G P F Q Q V .

**ectB**

GTCAAACCAATGTTATTAACATAAGAAAAAATGGTATGGAAATTATTGAAGAACGTGAGTCAGCAGTCAGAAGTTATAGCCGTAGTTTTCCAACAG 1100  
**rbs**                      M E I I E E R E S A V R S Y S R S F P T V  
 TTGAGAAAGCGAAGGATCATTGGTGTGGGATGTAGACGGTAAAGAGTATATCGATTTCTTCGCAGGTGCAGGTTCACTGAACTATGGCCATAATAA 1200  
 F E K A K D H L V W D V D G K E Y I D F F A G A G S L N Y G H N N  
 GAAGATGAAGACGAAATCATGGACTATGTGATGAATGATGGCATCTCACATAGCCTGGATATGGGGACGGTTGCCCGGCTGAATTTCTCGAGACA 1300  
 K M K T K I M D Y V M N D G I S H S L D M G T V A R A E F L E T  
 AACGAAGTTATTTAAGGCCACGGAATTTAGATTATAAAGTATGTTCCAGGTCCAACGGAACAAACACAGTCGAAAGTGCCTTAAAGATTGCAA 1400  
 N E V I L R P R N L D Y K V M F P G P T G T N T V E S A L K I A  
 AGGTAACCTGGACGTCAGAACATTATAAGCTTTACAAATGCTTTTCATGGTATGACGTTGGGTTGCTATCTATCTCGGAAATTCATCAATTCGTAA 1500  
 K V T G R Q N I I S F T N A F H G M T L G S L S I S G N S S I R N  
 AGCCGGGGTCCCGCTGACAAACACGATTTCCATGCCGTATGATACTTTCTTTAAAAATGGCAATGCAATTGATTATCTTGAACAGTATTTGGAGGAT 1600  
 A G V P L T N T I S M P Y D T F F K N G N A I D Y L E Q Y L E D  
 GGAAGTGGGGTAGACCTGCCGCGGCCATGATCCTAGAAACAGTTCAAGGGGAAGGGGCATCAACGCTGCAAGCTTTGAATGGTTACGAGGGATTG 1700  
 G S G V D L P A A M I L E T V Q G E G G I N A A S F E W L R G I  
 AGTTATGCCGTCGTTATGATATTTGCTCATTATCGATGATGTGCAAGCGGGGTGGTTCGAACCGGCACGTTCTTTAGCTTTGAACCCGAGGCAT 1800  
 K L C R R Y D I L L I I D D V Q A G C G R T G T F F S F E P A G I  
 ACCTGATATCGTTTGCTTGTCTAAGTCAATTTGGTGGGTATGGTTTGCATTAGCCATCACGTTAATTAACCAGAACATGATATATGGGAGCCAGGC 1900  
 P D I V C L S K S I G G Y G L P L A I T L I K P E H D I W E P G  
 CATAATGGCACATTTTCGTTGTAATAATATGGCAATCGTCGCTGCGACAGAAGCCTTATCTTACTGGAAAACAGACGACTTAGCGAAATCTGTTCAA 2000  
 H N G T F R G N N M A I V A A T E A L S Y W K T D D L A K S V Q  
 AATCTAAGATTATAAAATGCGTTTCGAGCAAATCGTTGAAGATTATCCAGAATTAAGCGACAACACGTTGGCCGAGGTTTTATGCAAGGCATCGC 2100  
 K S K I I K L R F E Q I V E D Y P E L K A T T R G R G F M Q G I A  
 TGGAAAAGGAAAAGGCATATGCAACAAAAATTTGTGCGAAAGCTTTTGAAGGGGTCATCATGAAACGTCAGGACCTAGCGGGGAAGTCGTG 2200  
 G K G K E A Y A T K I C A K A F E K G V I M E T S G P S G E V V  
 TTTCTAGGCGCGTTAACAATGACGAAACGAGTTAATCAAAGGCTTAGGTATTTTAGAAGAAGCAACTGAAGAAGTCGTTCCGTCATAAGGATAGA 2300  
 F L G A L T I D E T S L I K G L G I L E E A T E E V V R Q  
 TGTGTGAATGGATTTTGTATCAACGTGTAGGTCGGATAAGTCAGGACCGTCTGCTCGTGATAAGTTGCCTACCTCAAACCTTAGGTGGGGGATA 2400

*ectC*

```

TAACCCCACTCATTAAATTTTTTAACTTACAAAGGGAGAGATGAAGAAATGATCGTTTGAACGATTGATGAAATCATAGGAACAGAAAATGAAGT 2500
      rbs
TCGGACACATGGACGAGTCGCCGTTTACTACTTGAAAAAGATGGCATGGGCTTTTCATTTTCATGAAACGATTATCTATGCAGGTACAGAAACGCAT 2600
S D T W T S R R L L L E K D G M G F S F H E T I I Y A G T E T H
ACTATCAAACCATTTAGAACGGTGTACTGTGTCGGTGGAGATGGAGAGATTGAAACGGTCTCGGATGGAAAAGTGTATCCGATTCAAGACGGAA 2700
H Y Q N H L E A V Y C V G G D G E I E T V S D G K V Y P I Q D G T
GTATGCATTGGATCAACATGATGAGCATTATCCCCGCGGGGAAAAACGGATATGAGGCTAATTTGTACATTCAATCCACCGCTCGTCCGTACCGA 2800
Y A L D Q H D E H Y P R G G K T D M R L I C T F N P P L V G T E
CATGATGAAAATGGTGTGTACCCACTTCTTTCGAAACAACCTGTTGGAAAATAAGGTGAGTTTTGATCAAATGTCTATATTGTTCATCATAGGTTG 2900
H D E N G V Y P L L S K Q P V G K H G E F F S N V L Y C H H R L
GAGATTCCTTACGCTAATTGTCTGAGGGAACACTGGAATAAAATAGCCTTTATTGTTAACAATAAAGGCTTTTTATTCTTGAATAAACGAGTTCC 3000
R D S L R .
ATTTATATAGTGCTGATGATCGCACTGGCACTGTAGGAATATATTACCGTTGAAAATAGCGCTCCTTTATTATAAGATACTAATACAAGCTGCATT 3100
GTATCATTATTAAGTTTTAACCTTTAAGCTGTAAAAGGGAGTTTTATGATTGAAACTGAAATGGCAAGCCTCGTCTTTTTAATTAACAACGAGGAC 3200
AGGCAAGTTTCTGCGAACACCCACTTTGAGGAGTGGTGGTTTAAGACTTTCTAGAGACGTACGGCAGAGGCGGCTGATACATAATTCATAATAAAT 3300
TAACTATATATAAGCATCCTCCGAAACTCACACAAATGGTCCGTTATGCAATTCAACATTGATGGCGGACAATCCATTTTCATAATTATAAATAAGT 3400
AAATCACCAACGTTAATTACTCAAAAATATACCCCTTCAAACCTTTTGGCAAAAAAAGTTCGAAGGGGGATTTCATTTCACATAAAAAGTATT 3500
TCGTAATGAAGAAATGAAAGAATATACATTGAATT 3537

```

**Abb. 49 Nukleotidsequenz des *ectABC*-Operons aus *S. pasteurii***

Dargestellt ist die DNA Sequenz des *ectABC*-Operons und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine. Die potentiellen Startcodons sind markiert, sowie die Ribosomenbindestellen (rbs). Der Transkriptionsstartpunkt und der Promotor mit der potentiellen -35 und -10 Region sind ebenfalls markiert. Die DNA-Sequenz ist unter der Zugriffsnummer AF316874 in GenBank hinterlegt.

### 3 DNA-Sequenz der 'ectB-ectC'-Region aus *V. pantothenicus*

```

ectB'
GAGAAAGGCGGTATTAATGCAGCCAGTATAGAGTGGCTACAAAAGATTGCCTCTATTTGTGAGCGTTGGGATATTTTGTGATC&TGC&TGTGTTGAGGC 100
R E G G I N A A S I E W L Q K I A S I C E R W D I L L I I D D V Q A
TGGATGCGGCAGAACAGGCACATTTTTGAGCTTTGAGCCAGCTGGTATAGCACCCGGATATTGTCTGTTTGTCTAAATCAATTGGTGGCATCGGTCTTCCA 200
G C G R T G T F F S F E P A G I A P D I V C L S K S I G G I G L P
ATGGCGATTACATTAAATCAAGCCAGAATATGATCAGTGGGGTCTGGGGAGCATAAATGGGACATTCCGTGGAAATAACTTAGCTTTTATTGCAGCAACAG 300
M A I T L I K P E Y D Q W G P G E H N G T F R G M N L A F I A A T
AAGCCTTAACTGCATTTTGGCAGGATAAATACATTTTCAAAATCTATTATCCAAAAAAGTAAACTGGTTAGACAGCGTATAGATCGTATCATCGATAAATT 400
E A L T A F W Q D N T F S K S I I Q K S K L V R Q R I D R I I D K F
CCC&TAC&TAC&GGGAGAAGCTCGAGGAAGGGGGCTTATGCAAGGAATTGTG&TCCAGAGCCTA&ATTGTGCTTCAGAA&TTTGTAA&GGCAGC&ATTG&T 500
P S L Q G E A R G R G L M Q G I V I P E P M C A S E I C K A A F D
ATCGGTTTAA&TGTGAGAGC&TCTGGTCC&AA&AGGATG&AG&TGTCAA&ATTCCTACCGCCTTAA&TATTGAT&AA&AGGG&AA&TAA&CCA&AG&ATTG&ATA 600
I G L I V E T S G P N D E V V K F L P P L I I D K E G I N Q G F D

ectC'
TTTTAGAA&TAA&TATGGAGC&TGTATTG&AAAA&TAA&TAA&TCA&TAA&TAA&GAC&AA&AGG&AG&AG&AC&AT&AC&AA&T&G&ATT&GT&G&AA&AT&CG&CTT&G&AC&G&AC&ATT&AT&AG&T 700
I L E V S M E H V L K K . rbs M I V K S L D D I I G
ACAGAC&GAT&G&AA&AC&AT&CG&AG&T&G&AT&AA&T&GG&AC&G&AG&T&CG&CC&G&ATTT&AT&C&AT&G&AA&AA&AG&G&AC&AA&T&GT&GG&G&ATTT&AG&CTT&AA&AT&G&AT&AC&G&CTT&ATT&AA&AG&CT&G 800
T D D E T S S D N W T S R R F I M K K D N V G F S L N D T L I K A
GAAC&G&ACC&AA&TTT&CTTTT&GG&T&AT&AA&AA&AT&C&AT&ATT&G&AG&G&CT&G&TTT&ACT&GT&ATT&G&AA&GG&AG&AG&GG&G&AA&AT&G&AA&AA&ACT&G&G&AA&AC&AG&GT&G&AA&AT&AT&ATA&A 900
G T T N F F W Y K N H I E A V Y C I E G E G E I E K L E T G E I Y K
ACT&AA&AG&G&CT&G&G&AA&AC&G&AT&GT&AT&CT&ACT&AA&AT&G&AA&C&AT&G&AT&AA&AC&C&G&AA&CTT&CGT&G&CT&AA&AA&AC&C&AG&AT&G&CG&G&AT&G&G&TTT&G&CG&TTT&TTT&AA&T&C&CT&C&CTT&G 1000
L K A G T M Y L L N E H D K H E L R A K T Q M R M V C V F N P P L
GTGG&T&ACT&G&AA&AC&CC&AA&AT&C&AC&CT&AA&CA 1029
V G T E T Q I T . Q

```

**Abb. 50** Nukleotidsequenz der 'ectB-ectC'-Region aus *V. pantothenicus*

Dargestellt ist die DNA Sequenz der 'ectB-ectC'-Region und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine. Das potentiellen Startcodon von *ectC* sind markiert, sowie die Ribosomenbindestelle (rbs).

## 4 Aminosäuresequenzvergleich der Ectoinsyntheseenzyme

### 4.1 EctA

EctA	<i>S. pasteurii</i>	M - - - - - F W V I S K Q C S T A V A R T L V F I V P T E D D	29
EctA	<i>B. halophilus</i>	M Q V Q C N E K A F K C G F I I N S Q I A T A P P K T T I D T I G I P T V E D	41
EctA	<i>M. halophilus</i>	M E T K - - - - - M T C T M C S V I V F D K P T V E D	24
EctA	<i>St. coelicolor</i>	M T A A Q A D L - - - Q I - D R P R V A D C A - - - L - - - A - - - -	21
EctA	<i>Ch. salexigens</i>	M T P T T E N F T P S A D L - A R P S V A D T V I C S T L K F K I R K P T T D D	40
EctA	<i>H. elongata</i>	M N A T T E P F T P S A D L - A K P S V A D A V V C H E L P S I R K P S P D D	40
EctA	<i>V. cholerae</i>	M I Y P Q I - - - - - M - H K P A L - - - - - V F R P T Q E D	23
EctA	<i>S. pasteurii</i>	G K A I W N L I N Y P G L D I L S S Y S Y F - - M W A K F F D Q T S - V V G E T	67
EctA	<i>B. halophilus</i>	G A A N W E L V N - K S L D T I N S P Y K Y - - I M M C E Y F A E T C - V V A K E	78
EctA	<i>M. halophilus</i>	G A D N W E L V K - N S L D I N S S Y K Y F T I M M C E I F A E T C - V V A K E	63
EctA	<i>St. coelicolor</i>	- W P I - - - A R D S E L D I N S S Y S Y L - - L W C R F A A T S A V V R D C	56
EctA	<i>Ch. salexigens</i>	G W G I Y E L V K A C P L D V N S G Y A Y L - - L I A T Q F R D T C A V A T D E	79
EctA	<i>H. elongata</i>	G W G I Y E L V K S C P L D V N S A Y A Y L - - L I A T Q F R D S C A V A T N E	79
EctA	<i>V. cholerae</i>	G L S I H E L I A Q C A L D Q N S A Y C N F - - L Q S S F Q T T C - L M A E Q	61
EctA	<i>S. pasteurii</i>	N E Q I V G E Y I G L H T E Y G P D T L I Y L A S C D E T Q R Q K G L A S M	108
EctA	<i>B. halophilus</i>	N E R L V G R V T A F I P E H - Q D V I F V W Q I G D S S Q R G R G L A K L	118
EctA	<i>M. halophilus</i>	N D E I V G R V T A F I P E K - Q D T V F V W Q V G D T S Q R G R G L A S L	103
EctA	<i>St. coelicolor</i>	H C V I V G R I T G Y V R P D - P D T I L V W Q V A D G T Y R G R G L A A T L	96
EctA	<i>Ch. salexigens</i>	138 G E I V G R V S G Y V K R N - P D T Y F L W Q V A V E K A R C T G L A R R L	119
EctA	<i>H. elongata</i>	E G E I V G R V S G Y V K S N - P D T Y F L W Q V A V E K A R C T G L A R R L	119
EctA	<i>V. cholerae</i>	Q E L L V G R V S A Y R K E - Q Q N I L F I W Q V A V H P S R G K G L A Y Q M	101
EctA	<i>S. pasteurii</i>	L Q A - - I L E R Y A W I N I R Y L E A V G T S N E A P E A L F Q K S R D L K	147
EctA	<i>B. halophilus</i>	L Q E - - L I R D I C S N V N Y V E A T V T P S N K A S Q A L F Q K A R E Y N	157
EctA	<i>M. halophilus</i>	L N A F T L L I R D V C N V L Y L E A I T P S N E A S Q A L F K K L A Q K R E	144
EctA	<i>St. coelicolor</i>	V D G L - A D R V A R E I T I L E T T I S P I N T A S Q P L F T S F A E R R G	136
EctA	<i>Ch. salexigens</i>	137 E A V - L M R P G M G - D V L E T T I T P I N E A S W G L F K R L A D R W Q	158
EctA	<i>H. elongata</i>	V E A V - M T R P E M A - E V L E T T I T P I N Q A S W G L F R R L A D R W Q	158
EctA	<i>V. cholerae</i>	L K H L - L A R E D L A - I D T V L E T T I T P S N Q A S W P L F Q K D R E Q C	140
EctA	<i>S. pasteurii</i>	T A Y R V T E F F T E D Q F P K G H E D E R L - - F K I C P F Q - - V	180
EctA	<i>B. halophilus</i>	T Q C E V S E C F S E D L F P Q D D H E A E L - - F R I C P L H P	189
EctA	<i>M. halophilus</i>	T R V I V S E C F T E D L F P D D H E E E L F T F R I C P I T K	178
EctA	<i>St. coelicolor</i>	A R L E R E V F D T A V F P D G H E P E V L - - Y I C P L S A G C	170
EctA	<i>Ch. salexigens</i>	139 A P L N S E Y F S T G Q L - G G E H D P E N L - - V I C P I E P Q Q I	192
EctA	<i>H. elongata</i>	A P L N S E Y F S T D Q L - G G E H D P E N L - - V I C P F T D Q I	192
EctA	<i>V. cholerae</i>	E Q G S V S T F L I E T C H F E G H D T E Y L - - Y P I - P L Q S S N	173

Abb. 51 Aminosäuresequenzvergleich von EctA

Dargestellt ist ein Aminosäuresequenzvergleich des abgeleiteten EctA-Proteins von *S. pasteurii* mit den charakterisierten oder potentiellen L-2,4-Diaminobutyrat Acetyltransferasen (EctA) aus *B. halodurans* (Acc. no. AP001510), *M. halophilus* (Acc. no. O06059), *St. coelicolor* (Acc. no. AL591322), *Ch. salexigens* (Acc. no. AJ011103), *H. elongata* (Acc. no. AF031489) und *V. cholerae* (Acc. no. AE004410). Aminosäuren von EctA aus *S. pasteurii*, die in mindestens drei weiteren Proteinsequenzen konserviert sind, wurden schwarz unterlegt.

4.2 EctB

EctB *S. pasteurii* M L L T K E K N G M E I E E R E S A V R S Y S R S F P T V E K A K D H L V W40  
 EctB *B. halophilus* M - - - S Q T D M N V E Q L E S E V R S C R S F P T V T K A K G Y K M W36  
 EctB *M. halophilus* M M - - - Q N D L S V F N E S E V R S V R G F P T V H Q A K G Y K L W36  
 EctB *St. coelicolor* 51Mr- - T I T Q P D L S V E T V E S E V R S C R G M P T V E D R A V G S R M Y38  
 EctB *Ch. salexigens* M - - Q T Q - - - - E M R M E S E V T Y S R S F P T V T E A K G A R L H33  
 EctB *H. elongata* M - - Q T Q - - - - E M R M E S E V T Y S R S F P T V T E A K G A R L H33  
 EctB *V. cholerae* M - - D I - - - - - F K E S Q V Q S Y A N H F P V L F G T A K G S W L Y31

EctB *S. pasteurii* D V D G K E Y I D F - - F G A G S L N Y G H N E K I R T K I I D Y V M M D G 78  
 EctB *B. halophilus* D E A G K E Y I D F - - F G A G A L N Y G H D E K I R K A L V D Y I M D D G 74  
 EctB *M. halophilus* D L D G K E Y V D F T F F S G A G A L N Y G H D E N I R Q R L L T Y I Q E D G 76  
 EctB *St. coelicolor* 51BrE D G H E Y L D - - F F A G A G S L N Y G H N A V I R K R A L I D Y L E P D G 76  
 EctB *Ch. salexigens* A E D G N Q Y I D - - F L A G A G T L N Y G H H P K I R Q A L A D Y I A S D G 71  
 EctB *H. elongata* A E D G N Q Y I D - - F L A G A G T L N Y G H H P K I R Q A L A D Y I A S D G 71  
 EctB *V. cholerae* S Q C G D A Y L D - - F L S G A G A L N Y G H N A V I R Q A L L E Y I E R D G 69

EctB *S. pasteurii* I S H S L D M G T V A R A E F I E T F N E I L R P R N L D - - Y K V M F P G E 116  
 EctB *B. halophilus* I T H S L D M A T T E K G R F I Q K F H D I L K P R N L D - - Y K V M F P G E 112  
 EctB *M. halophilus* V T H S L D M A T K A R G E F I D A F Q N I L K P R N M D F T Y K I M F P G E 116  
 EctB *St. coelicolor* 51WrT H G L D M S T T A R R R E I E T F Q N I L R P R D L P - - Y K V M F P G E 114  
 EctB *Ch. salexigens* I V H G L D M W S A A R R D Y L E T L E E I L K P R G L D - - Y K V H L P G P 109  
 EctB *H. elongata* I V H G L D M W S A A R R D Y L E T L E E I L K P R G L D - - Y K V H L P G P 109  
 EctB *V. cholerae* L T H G L D M H S E A R A H F I Q A L Q T I L R P R G L N - - Y K L Q F T G P 107

EctB *S. pasteurii* T G T I T V E S A L K L A R K V T G R Q N I I S F T N A F H G M T L G S L S I S 156  
 EctB *B. halophilus* T G T I T V E S A L K L A R K T C R T D I I S F T N G P H M T I G S L S V T 152  
 EctB *M. halophilus* T G A N S V E S A L K L A R K T C R T N V V S F T N G P H M T I G A L S V T 156  
 EctB *St. coelicolor* 51T G T I A V E S A L K L A R K K C R E S I V S F T N A F H G M S I G S L A V T 154  
 EctB *Ch. salexigens* T G T I A V E A A I R L A F N A H C R H N I V T F T N G P H V T M G A L A T T 149  
 EctB *H. elongata* T G T I A V E A A I R L A F N A H C R H N I V T F T N G P H V T M G A L A T T 149  
 EctB *V. cholerae* T G T I A V E A A L K L A R K T C R H N V V T F T N G P H C S I G A L A A T 147

EctB *S. pasteurii* G M - S S I R N G A G V - - P L T N T I M P Y D T F F K N G - N A I Y D L E Q 192  
 EctB *B. halophilus* G M - S F R R R K G A G I - - P L T N V V M P Y D N F V S E S L D T L Y D L E R 189  
 EctB *M. halophilus* G M - K F R R M G A G M F T P L S N T S T P Y D Q F L K E S N N S I Y I E N 195  
 EctB *St. coelicolor* 51G M A - F R R A G A G I - - P L V H G T M P F D N Y F D G T V E D F I E E R 191  
 EctB *Ch. salexigens* G M R K F R E A T G I - - P T Q G A S M P F D G Y M G E G V D T L Y S F E K 187  
 EctB *H. elongata* G M R K F R E A T G I - - P T Q G A S M P F D G Y M G E G V D T L Y S F E K 187  
 EctB *V. cholerae* G N Q - H E R Q G A G L - - A L S G V Y R P Y D G Y - - A G V D G L T E F T 182

EctB *S. pasteurii* Y L E D T G S G V D L P A A M I L E T V Q G E G C I A A S F E W - - L R G I E 230  
 EctB *B. halophilus* F L E D G G S G V E I P A A M I L E T V Q G E G C I A A R T E W - - L Q R V E 227  
 EctB *M. halophilus* F L D N G G S G L I K P A A F I V E T V Q G E G L N A A S S E W F T L R S I E 235  
 EctB *St. coelicolor* 51B L E D Q G S G I N K P A A V I V E T V Q G E G C I V A R A E W - - L R A L A 229  
 EctB *Ch. salexigens* L L G D N S G L D V P A A V I I E T V Q G E G C I P A G I E W - - L Q R I E 225  
 EctB *H. elongata* L L G D N S G L D V P A A V I I E T V Q G E G C I P A G I E W - - L Q R I E 225  
 FctR *V. cholerae* M L Q D N S S G L I K P A A V L I E T V Q G E G L N V A S D A W - - L Q R V Q 220

EctB *S. pasteurii* K L C E R Y D I L L I I D D V Q A G C G R T T F F S F P A G I Q P D I V C L 270  
 EctB *B. halophilus* K I C K R W G L L I I D D V Q A G V G R T O T F F S F D A G I T P D I V C L 267  
 EctB *M. halophilus* K I C E R F D I K L I L D D V Q A G V G R T O T F F S F P A G I K P D F V C L 275  
 EctB *St. coelicolor* 51BrL C E R C D M L L I V D D I Q A G C C R T A F F S F E A G I T P D I V T V 269  
 EctB *Ch. salexigens* K I C I D H D M L L I V D D I Q A G C C R T K F F S F H A G I T P D I V T N 265  
 EctB *H. elongata* K I C I D H D M L L I V D D I Q A G C C R T K F F S F H A G I T P D I V T N 265  
 EctB *V. cholerae* A I C E A Q Q I L L I V D D I Q A G C G R T T F F S F P S G I E P D M V T L 260

EctB	<i>S. pasteurii</i>	S K S I G G Y G L P L A I T - - L I K P E H D I W E P G E H N G T F R G N N M A	308
EctB	<i>B. halophilus</i>	S K S I G G F G L P L A I T - - L F R P E L D I W A P G E H N G T F R G N N H A	305
EctB	<i>M. halophilus</i>	S K S I G G N G S P L A I T F T L V A P E Y D K F A P G E H N G T F R G N N F A	315
EctB	<i>St. coelicolor</i>	S K S I S G Y G M P M A L T - - L F K P E L D V W E P G E H N G T F R G N N P A	307
EctB	<i>Ch. salexigens</i>	S K S L S G F G L P F A H V - - L M R P E L D I W K P G Q Y N G T F R G F N L A	303
EctB	<i>H. elongata</i>	S K S L S G F G L P F A H V - - L M R P E L D I W K P G Q Y N G T F R G F N L A	303
EctB	<i>V. cholerae</i>	S K S L S G Y G L P M A L V - - L F K P E W D Q W K P G E H N G T F R G N N H A	298
EctB	<i>S. pasteurii</i>	I V A A T E A L S - Y W K T D D - L A K S V Q K K S K I I K L R F E Q I V - - E	344
EctB	<i>B. halophilus</i>	F V T A T E A L S - Y W E D D S - F E K D I Q E K S A T I S D F L V K L V - - T	341
EctB	<i>M. halophilus</i>	F V T G T E A L M - Y W K D D R - L E K N V Q E K S E R I T S F L D D M I F T K	353
EctB	<i>St. coelicolor</i>	F V T A T A T L E A Y W A D G S A M E K Q T R K R G E Q V E Q H M - - I A I T E	345
EctB	<i>Ch. salexigens</i>	F V T A A A A M R H F W S D D T - F E R D V Q R K G R V V E D R F Q K L A S F M	342
EctB	<i>H. elongata</i>	F V T A A A A M R H F W S D D T - F E R D V Q R K G R V V E D R F Q K L A S F M	342
EctB	<i>V. cholerae</i>	F V T A T R A L E A Y W A N Q D - F Q T H I A A R S E Q V T Q A L - - L Q C L S	335
EctB	<i>S. pasteurii</i>	D Y P E L K A T T R G R G F M Q G I A C G K G K E A Y A T K I C A K A F E K G V	384
EctB	<i>B. halophilus</i>	E Y P E I K G E V K G K G F M V G I A S D V - - E G F A S K V T E E A F S R G L	379
EctB	<i>M. halophilus</i>	K H P E M K G V R K G R G F M Q G I M S P I - - E D L A D N I A G R C F E H G L	391
EctB	<i>St. coelicolor</i>	E N L A D V K E Y R G R G L V W G L - - E F H D K D R A G R V A K R A F E L G L	383
EctB	<i>Ch. salexigens</i>	T E K G H P A S E R G R G L M R G L - - D V G D G D M A D K I T A Q A F K N G L	380
EctB	<i>H. elongata</i>	T E K G H P A S E R G R G L M R G L - - D V G D G D M A D K I T A Q A F K N G L	380
EctB	<i>V. cholerae</i>	R Y P T L F S G L K G R G L M Q G L - - A C H N G D I A R D I A A L C F Q K G L	373
EctB	<i>S. pasteurii</i>	I M E T S G P S G E V V K F L G A L T I - - D E T S L I K G L G I L E E A - - -	419
EctB	<i>B. halophilus</i>	I M E T S G P N D E V F K L F P P L T I - - D D E G L E K G L A I I E E S I K A	417
EctB	<i>M. halophilus</i>	I M E T A G A E D E V F K L F P P I T I F T D D E G L E R G L S I L Q Q A I E E	431
EctB	<i>St. coelicolor</i>	L I E T S G P E S E V V K L L P A L T I - - T P D E L D E G M K T L A R A V R E	421
EctB	<i>Ch. salexigens</i>	I I E T S G H S G Q V I K C L C P L T I - - T D E D L V G G L D I L E Q S V K E	418
EctB	<i>H. elongata</i>	I I E T S G H S G Q V I K C L C P L T I - - T D E D L V G G L D I L E Q S V K E	418
EctB	<i>V. cholerae</i>	I I E T A G A E D E V L K V F C P L T I - - T E A D L A H G L T I I E R V L L E	411
EctB	<i>S. pasteurii</i>	- - - T E E V V R Q	426
EctB	<i>B. halophilus</i>	L V E T K E L V M Q	427
EctB	<i>M. halophilus</i>	V T A E S N L V A K	441
EctB	<i>St. coelicolor</i>	T - - - - - A	423
EctB	<i>Ch. salexigens</i>	V - - - - F G Q A	423
EctB	<i>H. elongata</i>	V - - - - F G Q A	423

**Abb. 52 Aminosäuresequenzvergleich von EctB**

Dargestellt ist ein Aminosäuresequenzvergleich des abgeleiteten EctB-Proteins von *S. pasteurii* mit den charakterisierten oder potentiellen L-2,4-Diaminobutyrat Acetyltransferasen (EctA) aus *B. halodurans* (Acc. no. AP001510), *M. halophilus* (Acc. no. O06059), *St. coelicolor* (Acc. no. AL591322), *Ch. salexigens* (Acc. no. AJ011103), *H. elongata* (Acc. no. AF031489) und *V. cholerae* (Acc. no. AE004410). Aminosäuren von EctB aus *S. pasteurii*, die in mindestens drei weiteren Proteinsequenzen konserviert sind, wurden schwarz unterlegt.

4.3 EctC

EctC	<i>S. pasteurii</i>	M I V I T I E E I I C T E N E V - - E S D I W T S R R L L E K D C M G F S F	38
EctC	<i>B. halophilus</i>	M R V V K L E D V G T E Q E V - - K G E W T S R R L L K K D C M Y S V H	38
EctC	<i>M. halophilus</i>	M K V I K L E D L C T E R E V - - D D G W V S R F F I M K I D N M G Y S V N	38
EctC	<i>St. coelicolor</i>	N I V I S F E E F E G T D R E V K S A S G W E S T R I V L A K E K V G F S V H	40
EctC	<i>Ch. salexigens</i>	M I V I N L E E C R E T E R F V E A E N G M W D S T R I V L A D D N V G F S I N	40
EctC	<i>H. elongata</i>	M I V I N L E E A R G T D R L V T A E N G M W D S T R I S L A E D G G N G S F H	40
FctC	<i>V. cholerae</i>	M I V I T L E E C R Q S E R R V V A E N - - W E S V R M L L K D D H M G F S F	38
EctC	<i>S. pasteurii</i>	E T I I Y A - - T E T H I H Y Q N H L E A V V G G D C E I E T S D C K V	76
EctC	<i>B. halophilus</i>	D T I I K A G - - T E T H W Y Q N H L E A V Y I E C E G E V E T W K D G K V	76
EctC	<i>M. halophilus</i>	O T I I R A C F T T E T H W Y Q N H L T V Y C I E C D G E I E L S D N K V	78
EctC	<i>St. coelicolor</i>	E T I L Y A G - - T E T S M U Y A N H I E A V V C T K G D A E L I D R E G K T	78
EctC	<i>Ch. salexigens</i>	E T R I H P G - - T E T H I H K H H F E A V F C Y E C G E G E V E T L A D G H I	78
EctC	<i>H. elongata</i>	I T R I F E G - - T E T H I H K H H F R A V Y I E G	66
FctC	<i>V. cholerae</i>	I T T I Y A N - - T Q T H I H R N H L E S V Y C M S C E G E I E V V G - G K T	75
EctC	<i>S. pasteurii</i>	Y P I Q D G T M Y A L D Q H D Y P R C G K T D M F L - - C T F N P P V G	114
EctC	<i>B. halophilus</i>	W P I K A N E Y A L I E H D E L L R A - K I D M F M - - C V F N P I T G	113
EctC	<i>M. halophilus</i>	Y Q L E I G V I Y A L I K N D E F M L R C G S H D M F M F T V C V F N P P S G	118
EctC	<i>St. coelicolor</i>	W H I T P G T M Y L L D G H E R H T L K V K E D - - F H C V F N P I V T G	115
EctC	<i>Ch. salexigens</i>	A H P I K A G D M Y L L D Q H D E L L R C K E K C M T V - - C V F N P A L T G	116
EctC	<i>H. elongata</i>		66
EctC	<i>V. cholerae</i>	Y P I Q P G T L Y I L D Q H D E Y L R A F S S M V M - - C V F N P P T G	113
EctC	<i>S. pasteurii</i>	T E T H D E N C V Y P L S K Q P V - - - - - G	133
EctC	<i>B. halophilus</i>	K E T H D E N C V Y P V D D E	129
EctC	<i>M. halophilus</i>	R E V H D E N C V Y - - - - A D L - - - - - D	133
EctC	<i>St. coelicolor</i>	R E D H D E N C V Y P L T E R V .	133
EctC	<i>Ch. salexigens</i>	R E V H R E D C S Y A P V D	130
EctC	<i>H. elongata</i>		66
FctC	<i>V. cholerae</i>	H E I H D A E G V Y - P L D K S E L I S Q C H K E K	138

Abb. 53 Aminosäuresequenzvergleich von EctC

Dargestellt ist ein Aminosäuresequenzvergleich des abgeleiteten EctC-Proteins von *S. pasteurii* mit den charakterisierten oder potentiellen L-2,4-Diaminobutyrat Acetyltransferasen (EctA) aus *B. halodurans* (Acc. no. AP001510), *M. halophilus* (Acc. no. O06059), *St. coelicolor* (Acc. no. AL591322), *Ch. salexigens* (Acc. no. AJ011103), *H. elongata* (Acc. no. AF031489) und *V. cholerae* (Acc. no. AE004410). Aminosäuren von EctC aus *S. pasteurii*, die in mindestens drei weiteren Proteinsequenzen konserviert sind, wurden schwarz unterlegt.

## 5 DNA-Sequenz von *ectT* aus *V. pantothenicus*

ATTAGGATCAAATAGTGTTTTTTTGTACGTTTTTCTTTACGTGTTTAAACATTATCCAAAACCTCCAACGTAAAAGTGCTATTACAATTA90  
AACGAATTTTTTCATTAGTTGGGCGCTTTTTTGACCTTTTGGGTGAGAACCAACTTCTATCATCCCAAAAAATATAGAATAATTTTTTA†80  
TTTATGGACATTTTTCTAAACAATAGAATGAAATTAGCAGTACGTCTCCAATATTTGGGCGCTTTTTTTGTTTAGAAATCATAACCACB70  
GATGCCCAATCTAATTGAAAATTGTATAGTGTGTGGTTTTGGATTCAATTTACTTGTAAATTTACAGATTATTAGCTGCAACAATATAGAAAB60  
TTCCGTTTGTCTCATAGTGGGAATATTGCGTTTAAATATTCTCTGATGTGGGTATACATAAAATAACCCCCAAGATAATAGGAAAATTGCT750  
GCCATCTGTGTTTCATACTTGATAACCATAGCTAGTCTGATTTCCTCCCTTACTCACTTTTTCATTTTGAATCAGCTTGAAACTAGAACAGB40  
**ectT**  
AAAGGAATTGTTATGAAACAAAAGTACATTGAATAACCCTGTGTTTTACGTTTTCTGCATTTGTTGTATTTTTACTAGTCATTATCGGAGC†E30  
<sub>rhs</sub> M N K S T L N N P V F Y V S A F V V F L L V I I G A  
ACTCTGCCAAATCGTTTTGGAGCAGTAGCAGAAAAATTGTTTCATTTTACAACGATTCATTTTGGCTGGTTTTATTTATTAGCTGTGTTV20  
GTTTTCGTTGTTTTCTCATCAGCTATCTTTAAGTAAGTTTGGTAAAATAAAGCTAGGAGCAACACTAACTAAACCCGAATATTCATTB10  
TTTACTTGGATTGGTATGCTTTTTTTCTGCTGGTTTTTGGTGCAGGCTTGTTTTTTTGGGGAGTAGCTGAACCTATGAGTCATTTTTTTAAAB00  
ACACCGTTTCTGCAGTGGAAAGCCATGAGTGAAGAAGCAGCAAGAGTTGCAATGGGATATGCGTTTTTTTCATTGGGGAGTTAGTCAGTG990  
T P F P A V E A M S E E A A R V A M G Y A F F H W G V S Q W  
TCTGTATTTGCTATTGTTGGCYTAGTTATTGCCTACYTGCAGTTTAGGAAAAACGACGAGGATTAATATCTACCTCCATTCAACCAATT080  
S V F A I V G L V I A Y L Q F R K K R R G L I S T S I Q P I  
ATCGGAAAAATAAAATTTATTGCTGATACGGTTCGATTCTTTAGCGGTTATAGCAACTGTGATGGGAGTGGCAACGTCTTTAGGGTTGGGAL70  
I G K N K F I A D T V D S L A V I A T V M G V A T S L G L G  
ATCCTACAGATGAACGGAGGATTAATCTGTTTTTGGTGTCCGACTTCGATTTGGGTACAAAATGGCGATTGCGGGAGTCATGCTCATT260  
I L Q M N G G L K S V F D V P T S I W V Q M A I A G V M L I  
ACATATTTAATTTTCATCAAGCACGGGATTAGATCGAGGAATTAATGGTTAAGCAATATTAATCTGGGGTCTTTGTTTATTATTATAGTG350  
T Y L I S S S T G L D R G I K W L S N I N L G S L F I I I V  
TTCTGCTTTATGGCTGGTCCGACTGTTTTTATATTAATAACATTTGTTTTAGGTTCTAGGTGATTATTTTTCTAATTTTATTGGATATAGT440  
F V F M A G P T V F I L N T F V L G L G D Y F S N F I G Y S  
CTTCGTTTAAACCCATACACAGGAGATACGTGGGTAAGAGAATGGACGATTTTCTATTGGGCATGGTCTACAGCCTGGTCTCCTTTTGT530  
L R L T P Y T G D T W V R E W T I F Y W A W S T A W S P F V  
GGTGGTTTTATAGCACGTGTGCCAGAGGAAGAAGTATTCGTCAATATGTATTAGGAGTACTAGTTGTTTCTCCGGCTATCGCTTGTATT620  
G A F I A R V S R G R S I R Q Y V L G V L V V S P A I A C I  
TGGATTGCAGCTTTTGGTGGTACAGCTGTATAACAATGATTTAATGAATGGAACCTTCTATAGCAGAAGCTGTGAATGCAGATATAGCAGTT710  
W I A A F G G T A V Y N D L M N G T S I A E A V N A D I A V  
GCTCTTTTTGAAACATATCAGCATTACCTATGACAACAATCCTTTCCATACTTTCTATCTTTTTAATCTTTACATTTCTAGTTACTTCT800  
A L F E T Y Q H L P M T T I L S I L S I F L I F T F L V T S  
GCAGACTCTGCAACTTATATCTTGGTGAATGACCTCAAGAGGAAGTTTAAACCTACATTAGTTACCAAAATTGCTCTGGGGACTTTTTA890  
A D S A T Y I L G V M T S R G S L N P T L V T K I V W G L L  
ATTACAGCTATAGCAGTGGTATTGCTGTTAGCTGGTGGTTTAGAAGCATTACAAACTGCTTCATTAATTTCTGCGCTCCATTTACAGTA980  
I T A I A V V L L L A G G L E A L Q T A S L I S A L P F T V  
ATACTATTGCTGATGATGGCTTCGTTTACAAGAATGTTATCAAAAGGTGAAAAAAGCGGAACAGGATAAAGAATAGCAGGAAGCAGT070  
I L L L M M A S F T R M L S K G E K K A E Q D K E .  
AGGTGAGATCACACTTTACTGCTTTTTCTTTCTTATTTATCTCGCATATAATATGCTACTAGACTCCCGTTTCAGCAGTTGGCTCATCTGE160  
TCTGCAACAAGTCTACGTGGGAGATACAGCACCTAAATGCTCTATTTTTGTAAGAGACCCTTTAGGTCATCCATTTTAACTCAGTGGGQ250  
ATGAGTGAAAATCCACGCTGATTTTCACTTTTTTATAGCTGACCCGAACCTCGGTGCTATTGTAATGATGATATGGAAGTATAGCAGGCTE340  
AGTTACCGTTATAGGATAATTTTATTAGGATGTCGATGATATGAAAGATGAATTCGTTCCGGTATAAGGGAAACGATTGCTTCAGACAATG430

AAAAGCGATATCAAAAAGCATAGGTAAGGAACTACGATTGTTGAAGCATTCTACTAGCGTTGCTTCGTA AAAATCCAATAACGGGTTGTA	2520
AATAAGGGTTAGAAATCACCAAAAAGTAGCGGATATACATAAAGAACTATTGAAACAAAAAGTGGATGTTTTGTTGCCAAAAGCCTTCCTTGT	2610
TCTGCGGGGAAGCCGGCAACCGAGCATCCTACAGGAAAGCTGTTTTTTGCTTCGCGCAGAAAGTTAAGGCCCTCCGCGTAAAAGGTACCTC	2700
CACTGCGGGCTCACAAAGCGATTATTATAAACCTTTCCCTTAATAAATTGCAAAGCTTAACTACATTCAACGCGGAAGGAACTCCTGTACATCC	2790
TTGACAGCTTCGAAATAAATGATGATTTAACAGTCCATATAAACGTAAGTATACTGTGGTTAGTTAAGATATTTTTAAATAATCATTTTCT	2880
AGGGTYCCGCAGATACAAGTAAGTAGCTATCTGGACTGGACCAAGAGAAAAATGCACGGTTTCATTACGTGTACACGGAGGGATAAAAAGCCC	2970
GGGAGGATATCTAGCAAAATATGATATCTTTCTGGGTTTTTTGTTTGCTTTTTTTAAGAGATAAGAAATCACTATGGCTCGCCAAGAGCGC	3060
AAGCCACCATCTATGATGAAAAACACTTAAAGACGGTTTTTYTCATAAAAAAGTATTAATTTTGTGCTTGGGATAAGAGAATAGCCACGT	3150
CCGGCGCAAGCACCCAGCAACTAGGCAACTTCACGAATCGCCCTACGACAAGTCACCATCTGTTGTAGCTAAGAGGAAGGCCGACTAAAT	3240
ACGGGCTTGCCGCTCAGGCGTCGACATAGCCCTGGTTGCAGGGGCATGGTTCCTAAATCTTTAGTTGATTGGTCCAGTTGCTACGTTGC	3330
TAAACGATCGCCTTGCCCTTTGTTTCACATGAAAGGTAATGAAGGAGTGGATTAGATAGTTTAGAGTATATAAAGTGAACCTTCAGGCAG	3420
TAGAGGATTCCTTAGCTAGCTAAAAAAAATAATGATTAAAAAAGGTGATGTTGATGAATAAAGACTGGAATACTGTATTTCTTGCTGGA	3510
TTGTTGAAATTGGCTGGGTAATTGGTTTTAAAACATGCAAACAGTTGGATGGATTGGATTCTGACGCTGATCCGCGATATTGGTAAGCAT	3600
AGCATTTACTTGTATCGCCTCACGCCGATTACCAGTAGGTTCAAGCTATGCAGTATTTGCAGGTATAGGAAAGTGCAGGAACAGTTATAG	3690
CAGAAATAGTGCTTTTTGGAGAGCTGGTACAACCGTTAAAAATAGTGCTAATTTCTACTATTAGTAACGGGAGTTATTGGTTTGAAGTTGG	3780
<b>orf2</b>	
TAACGCCGCAAAAAGAAAAGGAAGAGGTGTCGTATGGGATTGGATTATTCTTTTTGTAGCAGGGTTTACGGAAATAAATTGGCGTAACAGG	3870
rbs	M D W I I L F V A G F T E I I G V T G
TATTAATAAAGTGAATCAACGAGTGAATGCAATATCATTAATATGGTTTTCTAGGCGGATTTGGACTAAGTTATATTTTATTAGGCATTGC	3960
I N K V N Q R V N A I S L I W F L G G F G L S Y I L L G I A	
GATGAAAACAATTGCAATGAGTACTGCTTATGCTGTTTGGACAGGGATGGGAACGGTGGGAAGTGCCTCGCTGGTATGTTGTTCTTTCA	4050
M E T I A M S T A Y A V W T G M G T V G S A L A G M L F F H	
TGAGTCGAAGGATTGGAGGAGATTGCTTTTCATCGGTATGATTTTAAAGTGTGCAGTTGGTTTTAAAGCTTATTTTCATAGTCAATCAGCTA	4140
E S K D W R R L L F I G M I L S A A V G L K L I S .	
GAATGAAAAGGGAAACAATTCTTATGTTTATGATACATTCTAGCGGTTATACATTACTAAGAAGTAGATAGTATTGAAGGAGTGGAGTCT	4230
GGAAATGGATATAAACAAAGAACTAGAATATTTAGAATCAGTGGAAAAGGGAGGGCCAGATAAAGTATTTACAATGTACTTAAATACAGAC	4320
CCTTCCGACCCTGAACAGCAGGGCAGAGAATGGAAAATCCAATTTAAAAATGGGATC	4377

#### Abb. 54 Nukleotidsequenz der *ectT*-Region aus *V. pantothenicus*

Dargestellt ist die DNA Sequenz der *ectT*-Region und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine. Die potentiellen Startcodons sind markiert, sowie die Ribosomenbindestellen (rbs). Der Transkriptionsstartpunkt und der Promotor mit der potentiellen -35 und -10 Region sind ebenfalls markiert. Die DNA-Sequenz von *ectT* wurde unter der Zugriffsnummer AF421189 in GenBank hinterlegt.

## 6 Aminosäuresequenzvergleich von EctT mit anderen BCCT-Transportern

EctT	<i>V. parvithenticus</i>	- N N P V F Y V S A F W F L L V I I G A T L P N R F G A V A E K L F H E T T I 39
	<i>B. halodurans</i>	W K N P V F Y L S A S F I L L V L L G V T M P S R F G A A A S A L F D L T A I 40
OpuD	<i>B. subtilis</i>	- - S S V F W I V I A I T A A V L W G V I S P D S I Q N V S Q S A Q F I T D 38
BetP	<i>C. glutamicum</i>	- - - S V I V P A L V W L A T V V W G I G F K D S E T N F A S S A L S A V V D 37
EctP	<i>C. glutamicum</i>	- D P F F F S I S V G F I V V V I A T I A L G E K A R T T F S A I A G W L L K 9
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	- - T N V P W G S G F L W L T A W L F G A F I P E Q E E T F T N H I Q E L T S 38
EctT	<i>V. parvithenticus</i>	H F G M F Y L I A V F V F W V F L I T L S L S K F G K I K L G A T L T H P E Y S 79
	<i>B. halodurans</i>	N F G M F Y L F S V F I L I V F L L F L A V S K Y G L I R L G G E D E H P E F P 80
OpuD	<i>B. subtilis</i>	S F G M Y Y L L V W S L F V G F C L F L I F S P I G K I K L G K P D E H P E F G 78
BetP	<i>C. glutamicum</i>	N L G W A F I L F G T W F W F F I V V I A S K F G T T R L G R I D E A P E F R 77
EctP	<i>C. glutamicum</i>	N I G M Y Y T G G V S L V F F I M G I F A S R Y G R W L G D D D D I P F H T 79
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	N F G M Y Y L I V W A I I I I E C L F W V L S P I G S T R L G K P G E E P G Y S 78
EctT	<i>V. parvithenticus</i>	F F T W I G M L F S A F G A G L V F W G V A E M S H F F K T P P F A V E A M 115
	<i>B. halodurans</i>	F F T W I G M L F S A F G V G L V F W G V A E M S H F F T P P F O T V D G Q 120
OpuD	<i>B. subtilis</i>	L L S W F A M I F S A M G I G L V F Y G A A E P I S H Y - A I S S P S G E T E 117
BetP	<i>C. glutamicum</i>	T V S W T S M M F A A G M G I G L M F Y G T T E P L T - F Y R N G V P G H D - - 114
EctP	<i>C. glutamicum</i>	L I V W F C M L F A G V G A W L M F W G V A E I M H A E N V P M A N B E S M 115
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	N K S M F A M I F S A M G I G L V F W A A E P L S H Y - A V Q A P G G E V G 117
EctT	<i>V. parvithenticus</i>	S E E A A R V A M G Y A F F H W G V S Q W S V F A I V G I V I A W L Q F R K R 155
	<i>B. halodurans</i>	T E A A A R V A M G Y S F F H W G I S Q W S V F A I V G I V I A E L Q F R K N K 160
OpuD	<i>B. subtilis</i>	T P Q A F R D A L R Y T E F H W G L H A W A I Y A I V A L C I A Y F L F R R G A 157
BetP	<i>C. glutamicum</i>	- E H N V G V A M S T T M F H M T L H P M A I Y A T V G I A T A Y S T F E V G R 153
EctP	<i>C. glutamicum</i>	S E A A I V Q A F A Y T F Y H E G I H M W V I M A L P G L S L G Y F I Y K R K L 155
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	T Q A A M K D A L R Y S E F H W G I S A M S I Y A T W A I A L A Y F K F E R E N A 157
EctT	<i>V. parvithenticus</i>	R G L I S T S I Q P T I G E N K F - - T A D T V D S L A W I A T V M G W A T S 196
	<i>B. halodurans</i>	D G L V S T A L A P A V G Q R P A - - - V R H T D C L A T I A T V L G T A T S 197
OpuD	<i>B. subtilis</i>	P G L I S S T L S P T L G D K V N G P T G K A I D C T A V F A T V V G W S T S 196
BetP	<i>C. glutamicum</i>	K Q L L S S A F V P I G E K G A E G W L G K L D I L A I T A T W F G T A C S 193
EctP	<i>C. glutamicum</i>	P P R I S S V F S P I L G K H I Y S T - P G K L D V L A T V C T T F G T A V S 196
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	P G L I S A T L Y P T L G K H A K G P T G Q L I D I I A W F A T W I G V A T T 196
EctT	<i>V. parvithenticus</i>	L G L G I L Q M N G G L K S V F D V P T S I - W V Q M A I A G V M L I T Y L I S 235
	<i>B. halodurans</i>	L G L G I L Q V N G G I H A V F G W G N A T - M T Q M V I I G W I F V A Y M I S 236
OpuD	<i>B. subtilis</i>	L G L G A T Q I M G G I N Y L E G I E N A F - I V O L V I I I I V T V L F L S 235
BetP	<i>C. glutamicum</i>	L G L G A L Q I G A G M S A A N I I E D P S W T I V G I V S W L T L A F I S 233
EctP	<i>C. glutamicum</i>	Y G L G V L Q I M A G M N K L W S I P Q - V S M V Q L L I I L I I T A V A C S 237
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	L G L G A Q Q I M G G I T Y L E G V P N N F - I V O F T T I V I V T I L F M S 235
EctT	<i>V. parvithenticus</i>	S S T G L R G I K W L S M I M L G S L F I I I F V F M A G P T V F I L T F 275
	<i>B. halodurans</i>	S T T G L N K G I R Y L S M L M L G L A L L L L F W L F L G P T R E F I E S F 276
OpuD	<i>B. subtilis</i>	A W S G L G K G I K Y L S M T N M V L A G L L M F M L V V G P T V L I M N S F 275
BetP	<i>C. glutamicum</i>	A I S G V G K G I Q Y L S M A N M V L A A L L A F W F V V G P T W S I L M L L 273
EctP	<i>C. glutamicum</i>	V A S G L D K G I K L L S M I M I A M A V A L M F I L F T G P T L T L R F L 277
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	A M S G L K G T Q L L S M V M I Y V A G V L L V L T L I G P T L E T M M N F 275
EctT	<i>V. parvithenticus</i>	V L G I G D Y F S N F I G Y S L R L T - P Y T G D T - - W V R E W T I F Y W A I 312
	<i>B. halodurans</i>	T L A I G D Y I S N F I Q Y S L R M E - P Y V G G T - - W V R D W T I F Y W A I 313
OpuD	<i>B. subtilis</i>	T D S I G Q Y I Q N I V Q S F R L T - E N D P E K R W I N S W T I F Y W A I 314
BetP	<i>C. glutamicum</i>	P G S I G N Y L S M F Q M A Q T A M S A I G T A G E W L G S W T I F Y W A I 313
EctP	<i>C. glutamicum</i>	V E S F G I Y A S M M P N L M F W T D - - S F D N P G W G K U T V F Y W A I 315
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	T N S K G D W L Q M I T Q M S F Q T A - E D A P D A R K M I D S W T T F Y W A I 314
EctT	<i>V. parvithenticus</i>	S T A W S P F V Q A F I A R V S R G S I R Q Y V I G V I V S P A I A C W I 352
	<i>B. halodurans</i>	A I A W S P Y V G A F W A R V S R G T I R E F I V G V M T W P P L I A C W I 353
OpuD	<i>B. subtilis</i>	W I S W S P F V Q I F I A R I S R G T I R E F L I G V I L W P C I G L V T W F 354
BetP	<i>C. glutamicum</i>	W I S W S P F V Q M F L A R I S R G S T I R E F I L G V I L W P A G L V S T W F 353
EctP	<i>C. glutamicum</i>	T I Q ~ ~ ~ ~ ~ M ~ ~ ~ ~ ~ I ~ ~ ~ ~ ~ T ~ ~ ~ ~ ~ E F I ~ ~ ~ ~ ~ L P A I E G V ~ ~ F 355
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	W L S W S P F V Q F I A R I S R G T I R E F I L G V W V L P A L V S V ~ ~ 353

EctT	<i>V. pantothenicus</i>	AA FCGTAVYNDLMNGTSLAE -- AVNADIAVALFRTYQHLP 390
	<i>B. halodurans</i>	ATFCGTALWSDLNVAQAGIAD -- VWNEDLTLALFQTYEFLP 391
OpuD	<i>B. subtilis</i>	SIFCVSAMD LQQKGA FNWK -- LSTETM -- LFGTLDHVP 389
BetP	<i>C. glutamicum</i>	SIFCGTAVVFEONGESIWD -- CAARE -- LFGLLHALP 388
EctP	<i>C. glutamicum</i>	SIFCRAGIEVEMSNPCFLTQPTVVEGQVPAALFNVLQEPYP 395
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	AVFCGSAIFVREQHGNSGLSS -- LATEQV -- LFGVFNERP 389
EctT	<i>V. pantothenicus</i>	MTTLLSILSIFLIFTFLVTSADSATYILGVMTSRCSLMP 430
	<i>B. halodurans</i>	LTTVASIVSLFLIVTFLVTSADSATFILASMSSTFCRTNPP 431
OpuD	<i>B. subtilis</i>	LTMVTSILALILTAVFFITSADSATFVIGMOTS YCSLNPA 429
BetP	<i>C. glutamicum</i>	GGQIMGTIAMILLGTFFITSADSASTVMGTMSQHGRQTEAN 428
EctP	<i>C. glutamicum</i>	LTGTVSAFALVIVIFFITSITDSAAALVNDMFAATGARNDT 435
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	GGMMLSTVAMIITAVFFITSADSATFVIGMQTTGCSLNDP 429
EctT	<i>V. pantothenicus</i>	LVTRIVWGLLITATAVWLLLAGC -- LEALQTASLTSALP 467
	<i>B. halodurans</i>	RLAKMTWGVIMSATAAALLYAGC -- LDALQTASLVAAP 468
OpuD	<i>B. subtilis</i>	NSVRLS WGI IQSAMA AWLLYS GC -- LAALQNTAILAAP 466
BetP	<i>C. glutamicum</i>	KWVTAAWGVATATGLTLLLSGDNAMSNLQNVTLVAAATP 468
EctP	<i>C. glutamicum</i>	TSYBVWACTICAWAGSLLIITSSSGIA LQEVVIVVAFP 475
EctT	<i>V. pantothenicus</i>	NSVRLVTWGLLQAGTASVLLYAGC -- LTAALQNASITIAAFP 466
	<i>B. halodurans</i>	FTVILLIMWASFTRMLSKG 486
OpuD	<i>B. subtilis</i>	FTIILLILLYAIVKILRQE 487
BetP	<i>C. glutamicum</i>	FSIVILLMIA SLYQSLSKE 485
EctP	<i>C. glutamicum</i>	FLFVVIGIMFALVKDLSN 486
BetL	<i>L. monocytogenes</i>	FFLVQFMMFSLKGVSED 494
		RSIVILLMIVSLFVSNTR 485

**Abb. 55 Aminosäuresequenzvergleich von EctT**

Dargestellt ist ein Aminosäuresequenzvergleich des abgeleiteten EctT-Proteins aus *V. pantothenicus* mit den charakterisierten oder potentiellen BCCT-Transportern aus *B. halodurans* (Acc. no. AP001520), OpuD aus *B. subtilis* (Acc. no. P54417), BetP (Acc. no. P5482) und EctP (Acc. no. AJ001436) aus *C. glutamicum* und BetL aus *L. monocytogenes* (Acc. no. AF102174). Aminosäuren von EctT, die in mindestens drei weiteren Proteinsequenzen konserviert sind, wurden schwarz unterlegt. Die Transmembranbereiche von EctT sind markiert (→).

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Marburg/Lahn, Mai 2002

## Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Bremer für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung. Sein motivierendes Interesse an diesem Thema und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen haben die Entwicklung meiner Arbeit entscheidend beeinflusst.

Frau Dr. T. Hoffmann möchte ich für die hervorragende Unterstützung im Laboralltag durch viele gute Ratschläge und die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit danken. Auch den übrigen Mitgliedern der AG Bremer gilt mein Dank für zahlreiche technische Hilfestellungen, die kollegiale Zusammenarbeit und die schönen Cocktailabende.

Den Mitgliedern der AG Buckel und der AG Völker möchte ich ebenfalls für die theoretische und praktische Unterstützung meiner Arbeit danken.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. D. R. Arahal, Universität Valencia, für die Erstellung der phylogenetischen Analyse der untersuchten *Bacilli* und Herrn Dr. M. Jebbar, Universität Rennes, für die Synthese und Bereitstellung des radioaktiv markierten Ectoins bedanken.

Besonders dankbar bin ich meinen Eltern, meinen Freunden und Alexander Brinker für die fortdauernde Unterstützung und Motivation in allen Lebenslagen. Schließlich möchte ich Herrn Reinhard Brinker für die formale Korrektur dieser Arbeit herzlich danken.

## Lebenslauf

---

Zur Person                      Anne Uta Kuhlmann  
geboren am 10. 09.1973 in Bottrop  
ledig

### Schulbildung

---

1980-1984                      Grundschule Bottrop  
1984-1993                      Gymnasium Bottrop, Abschluss Abitur

### Studium und berufliche Tätigkeit

---

1993-1998                      Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg  
Okt. 1995                      Vordiplom  
Sept. – Dez. 1997              Auslandsaufenthalt im Rahmen eines Stipendiums der Europäischen Union an der Universität Oxford (Großbritannien) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Yudkin  
Titel der im Rahmen des Auslandsaufenthaltes entstandenen Publikation:  
  
Barilla, D., Lucet I., Kuhlmann A. und M. D. Yudkin. (1999). Genotype, Phenotype, and Protein structure in a Regulator of Sporulation: Effects of Mutations in the *spolIIA* Gene of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **181**:3860-3863  
  
Okt. 1998                      Diplom  
Schwerpunkte:  
Mikrobiologie, Genetik, Biochemie, Virologie  
  
Titel der Diplomarbeit:  
Biosynthese der osmotischen Schutzsubstanz Ectoin in *Bacillus* spp.  
  
seit Nov. 1998                      Promotion an der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Prof. Dr. E. Bremer  
Titel der Dissertation:  
Biosynthese und Transport des kompatiblen Solutes Ectoin in *Bacillus* spp.  
  
1998 - 2000                      Mitglied des Graduiertenkollegs „Enzymchemie“  
2000 - 2001                      Mitglied des Graduiertenkollegs „Proteinchemie auf atomarer Ebene“