

***Halopseudomonas* spp. – Etablierung  
molekularbiologischer Methoden und Untersuchung der  
Stresstoleranz einer neuen Bakteriengattung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Luzie Kruse**  
aus Oberhausen

Düsseldorf, Dezember 2023



aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Nick Wierckx

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2024



„Everyone wants to live on top of the mountain,  
but all the happiness and growth occurs while climbing it.“

(Andy Rooney)

mein kindliches Ich, dass dachte Wissenschaft sei sinnlos, weil wir schon alles wüssten



**Inhaltsverzeichnis**

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
VERÖFFENTLICHUNGEN.....	VII
KONFERENZBEITRÄGE.....	VII
Vorträge.....	VII
Posterbeiträge.....	VIII
ABSCHLUSSARBEITEN.....	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
ZUSAMMENFASSUNG.....	XIII
SUMMARY.....	XV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Anforderungen an Mikroorganismen in der Biotechnologie.....	2
1.2 Bakterielle Stressantworten am Beispiel <i>Pseudomonas</i> spp.....	5
1.2.1 Spezielle Anpassungen als Reaktion auf osmotischen Stress in Pseudomonaden.....	10
1.3 Genetische Werkzeuge zur Optimierung von mikrobiellen Produzenten.....	18
1.3.1 Plasmide als Vektoren für die bakterielle Biotechnologie.....	20
1.3.2 Werkzeuge für die heterologe Genexpression in <i>Pseudomonadaceae</i> .....	22
1.3.3 Ausgewählte Werkzeuge zur Genommodifikationen.....	25
1.4 Anwendung genetischer Werkzeuge zur Entwicklung robuster Organismen.....	28
1.5 Biotechnologisches Potenzial von <i>Halopseudomonas</i> spp.....	32
1.6 Zielsetzung.....	37
2 MATERIAL UND METHODEN.....	39
2.1 Technische, chemische und biologische Materialien.....	39
2.1.1 Technische Materialien.....	39
2.1.2 Chemische Materialien.....	41
2.1.3 Biologische Materialien.....	44
2.2 Mikro- und molekularbiologische Methoden.....	50
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	50
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	54
2.2.3 Spektroskopische Methoden.....	57
2.2.4 Analytische Methoden.....	57
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	61
3.1 Auswahl von vier Modellvertretern für die Gattung <i>Halopseudomonas</i> .....	61
3.2 Wachstum von <i>Halopseudomonas</i> spp. unter Laborbedingungen.....	65

---

3.3	Analyse potenzieller Toleranzen in <i>Halopseudomonas</i> spp. ....	73
3.3.1	Analyse der genomischen Ausstattung potenzieller Toleranzen in <i>Halopseudomonas</i> spp.....	73
3.3.2	Evaluation der Toleranz gegenüber Antibiotika und Alkanolen .....	77
3.3.3	Evaluation der Toleranz gegenüber aromatischen Säuren .....	79
3.4	Anwendungen genetischer Werkzeuge in <i>Halopseudomonas</i> spp. ....	83
3.4.1	Anwendungen verschiedener Promotorsysteme .....	85
3.4.2	Chromosomale Modifikationen .....	90
3.5	Physiologische Reaktion von <i>Halopseudomonas</i> spp. auf osmotischen Stress.....	95
3.5.1	Produktion der kompatiblen Solute Ectoin und 5-Hydroxyectoin.....	105
3.5.2	Systematische Untersuchung der Reaktion auf osmotischen Stress in <i>H. litoralis</i> .....	117
3.5.3	Eisenlimitierung als Konsequenz des osmotischen Stresses.....	124
4	AUSBLICK.....	127
4.1	Anwendung von <i>Halopseudomonas</i> spp. als Ganzzellfabrik .....	127
5	LITERATUR.....	135
6	ANHANG .....	169
6.1	Abbildungen.....	169
6.2	Tabellen.....	178
7	ANTEILSERKLÄRUNG AN PUBLIKATIONEN.....	209
	DANKSAGUNG.....	211

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Etablierung eines neuen biotechnologischen Modellorganismus. ....	4
Abb. 1.2: Natürliche Reaktionsmechanismen von Pseudomonaden auf chemische Stressoren. ....	6
Abb. 1.3: Schematische Übersicht der fünf Efflux-Transporter Superfamilien in Gram-negativen Bakterien. ....	8
Abb. 1.4: Übersicht der Reaktionen von Pseudomonaden auf osmotischen Stress. ....	11
Abb. 1.5: Biosynthese von Ectoin und 5-Hydroxyectoin. ....	15
Abb. 1.6: Mechanismen zur Aufnahme von Fremd-DNA in eine Bakterienzelle. ....	18
Abb. 1.7: Modifikationen von Pseudomonaden mit verbesserter Stresstoleranz. ....	29
Abb. 2.1: Kalibriergeraden zur Bestimmung der OD <sub>580 nm</sub> . ....	57
Abb. 2.2: Chromatogramme und Kalibriergeraden durch Korrelation der Signalflächen bei LC-UV-Detektion von Ectoin und 5-Hydroxyectoin mit der Probenkonzentration. ....	59
Abb. 3.1: Übersicht über die beschriebenen metabolisierbaren Kohlenstoffquellen der <i>Halopseudomonas</i> spp. ....	63
Abb. 3.2: Auszug aus dem zentralen Kohlenstoffwechsel der <i>Halopseudomonas</i> spp. ....	64
Abb. 3.3: Phänotypen der ausgewählten <i>Halopseudomonas</i> spp auf Agarplatten. ....	66
Abb. 3.4: Untersuchung des Einflusses verschiedener Kultivierungsgefäße auf das Bakterienwachstum. ....	66
Abb. 3.5: Wachstum von <i>H. aestusnigri</i> VGXO14, <i>H. bauzanensis</i> BZ93, <i>H. litoralis</i> 2SM5 und <i>H. oceani</i> KX20 in komplexen und Mineralsalz-Medienzusammensetzungen. ....	68
Abb. 3.6: Übersicht zur Anzahl und Kategorisierung potenzieller Efflux-Transportproteinen in <i>Halopseudomonas</i> spp mit Hilfe der UniProt Datenbank. ....	75
Abb. 3.7: Adaption der <i>Halopseudomonas</i> spp. an Antibiotikastress vermittelt durch Tetracyclinzugabe. ....	78
Abb. 3.8: Bestimmung der Toleranz von <i>Halopseudomonas</i> spp gegenüber 3-Methylbenzoat. ....	80
Abb. 3.9: Bestimmung der Toleranz von <i>Halopseudomonas</i> spp. gegenüber Salicylsäure. ....	81
Abb. 3.10: Bestimmung der heterologen Genexpression in <i>Halopseudomonas</i> -Stämmen unter Verwendung verschiedener Promotoren. ....	86
Abb. 3.11: Genintegration in die beiden <i>attTn7</i> -Stellen von <i>H. litoralis</i> 2SM5R durch <i>Tn7</i> -Transposition. ....	91
Abb. 3.12: Phänotypische Bestimmung der Osmotoleranz mit Hilfe des Phenotype Microarray™ PM9. ....	97
Abb. 3.13: Bestimmung der Toleranz von <i>Halopseudomonas</i> spp. gegenüber NaCl in HM-Medium. ....	100
Abb. 3.14 Bestimmung der Toleranz von <i>Halopseudomonas</i> spp gegenüber NaCl in LB <sub>Suc</sub> -Medium. ....	102
Abb. 3.15: Bestimmung des Osmotoleranz von <i>H. bauzanensis</i> BZ93R gegenüber verschiedener Solute. ....	103

Abb. 3.16: Schematische Darstellung der identifizierten Gene der Ectoinbiosynthese. ....	106
Abb. 3.17: Synthese von Ectoin- und 5-Hydroxyectoin als Antwort auf osmotischen Stress in <i>Halopseudomonas</i> spp. ....	107
Abb. 3.18: Phylogenetische Einordnung der potenziellen Ectoinhydroxylasen aus <i>H. aestusnigri</i> und <i>H. oceani</i> . ....	109
Abb. 3.19: Ectoin- und 5-Hydroxyectoin Synthese als Antwort auf osmotischen Stress in <i>Halopseudomonas</i> spp. ....	110
Abb. 3.20: Bestimmung der Osmotoleranz von <i>H. litoralis</i> bei zusätzlicher <i>ectD</i> -Expression. ....	113
Abb. 3.21: Osmolytkonzentrationen in Kulturen von <i>H. litoralis</i> unter osmotischem Stress und zusätzlicher <i>ectD</i> Expression. ....	115
Abb. 3.22: Transkriptomanalyse zur systematischen Untersuchung der Reaktion von <i>H. litoralis</i> auf osmotischen Stress. ....	118
Abb. 3.23: Funktionelle Gruppierung aller differentiell abundanten Gene aus <i>H. litoralis</i> 1 h und 4 h nach Stressinduktion. ....	120
Abb. 3.24: Schematische Übersicht der Reaktion auf osmotischen Stress 1 h und 4 h nach Salzzugabe in <i>H. litoralis</i> . Im Vergleich zu einer Kultur ohne osmotischen Stress. ....	123
Abb. 3.25: Wachstumseffekte bei osmotisch gestressten Kulturen von <i>H. litoralis</i> nach Eisensupplementierung. ....	124
Abb. 4.1: Sekundärstruktur und Strukturvergleich der Aspartatkinase LysC aus <i>C. glutamicum</i> und Ask_Ect aus <i>H. litoralis</i> . ....	131
Abb. 4.2: Analyse der Ectoin und Hydroxyectoinproduktion ausgehend von Sebacinsäure in <i>H. litoralis</i> 2SM5R. ....	133
Abb. A1: Übersicht des vorhergesagten zentralen Kohlenstoffwechsels in <i>H. aestusnigri</i> VGXO14. ....	169
Abb. A2: Übersicht des vorhergesagten zentralen Kohlenstoffwechsels in <i>H. bauzanensis</i> BZ93. ....	170
Abb. A3: Übersicht des vorhergesagten zentralen Kohlenstoffwechsels in <i>H. litoralis</i> 2SM5. ....	171
Abb. A4: Übersicht des vorhergesagten zentralen Kohlenstoffwechsels in <i>H. oceani</i> KX20. ....	172
Abb. A5: Mehrphasiges Wachstum der <i>Halopseudomonas</i> spp. in HM-Medium mit definierter Aminosäurezusammensetzung. ....	173
Abb. A6: Bestimmung des Einflusses des pH-Werts auf das Bakterienwachstum. ....	173
Abb. A7: Wachstumskurven von <i>H. aestusnigri</i> VGXO14, <i>H. bauzanensis</i> BZ93, <i>H. litoralis</i> 2SM5 und <i>H. oceani</i> KX20 in Komplex- und Minimalmedium versetzt mit verschiedenen Dicarbonsäuren. ....	174
Abb. A8: Isolation der Rif <sup>R</sup> Stämme. ....	175
Abb. A9: Horizontaler Gentransfer, Transposition und Plasmidisolierung von <i>H. litoralis</i> 2SM5R unter Verwendung des pMB1-Plasmids yTREX-Tn7-P <sub>em7</sub> -eYFP. ....	175
Abb. A10: Emissionsspektren und Wuchskurven von <i>H. litoralis</i> 2SM5R yTn7.1-P <sub>em7</sub> -sfgfp-P <sub>lac/lacI</sub> -mCherry nach Induktion der mcherry-Genexpression. ....	176
Abb. A11: Nachweis der Ectoin- und 5-Hydroxyectoinproduktion in <i>Halopseudomonas</i> spp. mittels LC-MS. ....	177

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Zuordnung verschiedener Replikationsursprünge nach ihren Mechanismen der DNA-Vervielfältigung sowie ihrer Kompatibilität.....	21
Tab. 1.2: Eine Auswahl induzierbarer Promotorsysteme und ihre Anwendungen in <i>E. coli</i> und <i>P. putida</i> .....	23
Tab. 1.3: Bakterienstämme der Familie <i>Halopseudomonas</i> spp.....	32
Tab. 2.1: Übersicht verwendeter Geräte.....	39
Tab. 2.2: Übersicht verwendeter Software, Datenbanken und Onlineprogramme.....	40
Tab. 2.3: Übersicht speziellerer Verbrauchsgüter.....	41
Tab. 2.4: Übersicht verwendeter Chemikalien.....	42
Tab. 2.5: Übersicht und Zusammenstellung verwendeter Puffer und Lösungen.....	43
Tab. 2.6: Molekularbiologische und Phänotypische Kits.....	44
Tab. 2.7: Übersicht verwendeter Bakterienstämme.....	45
Tab. 2.8: Übersicht verwendeter Oligonukleotide.....	45
Tab. 2.9: Übersicht der verwendeten Plasmide.....	47
Tab. 2.10: Übersicht verwendeter Nährmedien und ihrer Zusammensetzung.....	49
Tab. 2.11: Übersicht verwendeter Antibiotika.....	49
Tab. 3.1: Überblick über den Stoffwechsel verschiedener Dicarbonsäuren als zusätzliche oder einzige Kohlenstoffquelle durch <i>H. aestusnigri</i> VGXO14, <i>H. bauzanensis</i> BZ93, <i>H. litoralis</i> 2SM5 und <i>H. oceani</i> KX20.....	70
Tab. 3.2: Homologe Proteine zu Enzymen, die für den Abbau von Dicarbonsäuren in <i>A. baylyi</i> ADP1 beschrieben wurden.....	71
Tab. 3.3: Homologe zu resistenz-vermittelnden Exportern aus <i>Pseudomonas</i> spp. in <i>Halopseudomonas</i> spp.....	74
Tab. 3.4: Replizierbarkeit verschiedener Replikationsursprünge in ausgewählten <i>Halopseudomonas</i> -Stämmen.....	84
Tab. 3.5: Ectoin und 5-Hydroxyectoinmengen in <i>Halopseudomonas</i> spp.....	111
Tab. A1: Resistenz-vermittelnde Exporter aus Pseudomonaden.....	178
Tab. A2: Locus-Tags der homologen Efflux-Transportproteine in <i>Halopseudomonas</i> spp.....	179
Tab. A3: Transformationseffizienzbestimmung anhand der Anzahl koloniebildender Einheiten vor und nach der Elektroporation.....	180
Tab. A4: Übersicht der <i>wells</i> A1-F12 in der Mikrotiterplatte Phenotype Microarray™ PM9 gemäß der Herstellerangaben.....	180
Tab. A5: Sequenzvergleich der Proteine der Ectoinbiosynthese in ausgewählten <i>Halopseudomonas</i> spp mit <i>S. sutzeri</i> -Proteinen mittels BLASTp.....	180
Tab. A6: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von <i>H. litoralis</i> 1h nach Induktion des osmotischen Stresses als signifikant hoch abundant im Vergleich zur ungestressten Kontrolle identifiziert wurden.....	181

---

Tab. A7: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von <i>H. littoralis</i> 1h nach Induktion des osmotischen Stresses als signifikant niedrig abundant im Vergleich zur ungestressten Kontrolle identifiziert wurden .....	186
Tab. A8: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von <i>H. littoralis</i> 4h nach Induktion des osmotischen Stresses als signifikant hoch abundant im Vergleich zur ungestressten Kontrolle identifiziert wurden. ....	191
Tab. A9: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von <i>H. littoralis</i> 4h nach Induktion des osmotischen Stresses als signifikant niedrig abundant im Vergleich zur ungestressten Kontrolle identifiziert wurden .....	192
Tab. A10: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von <i>H. littoralis</i> 1h nach Induktion des osmotischen Stresses im Vergleich zur ungestressten Kontrolle als signifikant hoch abundant identifiziert wurden, gruppiert nach ihrer Funktionalität.....	194
Tab. A11: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von <i>H. littoralis</i> 1h nach Induktion des osmotischen Stresses im Vergleich zur ungestressten Kontrolle als signifikant niedrig abundant identifiziert wurden, gruppiert nach ihrer Funktionalität.....	200
Tab. A12: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von <i>H. littoralis</i> 4h nach Induktion des osmotischen Stresses im Vergleich zur ungestressten Kontrolle als signifikant hoch abundant identifiziert wurden, gruppiert nach ihrer Funktionalität.....	204
Tab. A13: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von <i>H. littoralis</i> 4h nach Induktion des osmotischen Stresses im Vergleich zur ungestressten Kontrolle als signifikant niedrig abundant identifiziert wurden, gruppiert nach ihrer Funktionalität.....	206

## Veröffentlichungen

Bitzenhofer, N.L.\*, **Kruse, L.\***, Thies, S., Wynands, B., Lechtenberg, T., Rönitz, J., Kozaeva, E., Wirth, N.T., Eberlein, C., Jaeger, K.-E., Nickel, P.I., Heipieper, H.J., Wierckx, N. & Loeschcke, A. (2021) Towards robust *Pseudomonas* cell factories to harbour novel biosynthetic pathways. *Essays Biochem* **65**: 319-336. doi: 10.1042/EBC20200173.

Hilgers, F.\*, Hogenkamp, F.\*, Klaus, O., **Kruse, L.**, Loeschcke, A., Bier, C., Binder, D., Jaeger, K.-E., Pietruszka, J. & Drepper, T. (2022). Light-mediated control of gene expression in the anoxygenic phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* using photocaged inducers. *Front Bioeng Biotechnol* **10**: 902059. doi: 10.3389/fbioe.2022.902059.

de Witt, J., Molitor, R., Gätgens, J., Ortman de Percin Northumberland, C., **Kruse, L.**, Polen, T., Wynands, B., van Gothem, K., Thies, S., Jaeger, K.-E. & Wierckx, N. (2023). Biodegradation of poly(ester-urethane) coatings by *Halopseudomonas formosensis*. *Microb Biotechnol* **17**: e14362. doi: 10.1111/1751-7915.14362.

**Kruse, L.**, Loeschcke, A., de Witt, J., Wierckx, N., Jaeger, K.-E. & Thies, S. (2023). *Halopseudomonas* species: Cultivation and molecular genetic tools. *Microb Biotechnol* **17**: e14369. doi: 10.1111/1751-7915.14369.

\*diese Personen haben gleichermaßen zu dieser Veröffentlichung beigetragen

## Konferenzbeiträge

### Vorträge

Bitzenhofer, N.L.\*, Höfel, C., **Kruse, L.**, Thies, S., Pietruszka, J., Jaeger, K.-E. & Loeschcke, A. (2022). Evolving *Pseudomonas putida* as robust production platform for the synthesis of bioactive natural products. Annual Conference 2022 on the association for general and applied microbiology (VAAM), Düsseldorf / Deutschland, Februar 2022.

**Kruse, L.\***, Loeschcke, A., de Witt, J., Wierckx, N., Jaeger, K.-E. & Thies, S. (2022). Towards the development of strains from the unexplored *Pseudomonas pertucinogena* lineage to robust chassis platforms. International biennial Conference Pseudomonas 2022, Atlanta, GA / USA, April 2022.

Zeisel, A.C.\*, Weiler, A.J., **Kruse, L.**, Paik, S.H. P., Knapp, F., Svensson, V., Wollenhaupt, B., Wiechert, J., Kohlheyer, D., Frunzke, J., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2023). Pyoverdine-

---

based interspecies interaction of *P. putida* and *R. capsulatus*. *Rhodobacter* workshop I, Wageningen / Niederlande, April 2023.

**Kruse, L.\***, Loeschcke, A., de Witt, J., Wierckx, N., Jaeger, K.-E. & Thies, S. (2023). Towards the development of non-model organisms from the unexplored *Halopseudomonas pertucinogena* lineage. Annual Conference 2023 on the association for general and applied microbiology (VAAM), Göttingen / Deutschland, September 2023

\* präsentierende:r Autor:in

## Posterbeiträge

**Kruse, L.\***, Bitzenhofer, N.L., Schmidgall, T., Eberlein, C., Loeschcke, A., Heipieper, H.J., Jaeger, K.-E. & Thies, S. (2022). From unexplored strains to robust *chassis* platforms – evolving novel stress-tolerant *Pseudomonas* species. Annual Conference 2022 on the association for general and applied microbiology (VAAM), Düsseldorf / Deutschland, Februar 2022

Zeisel, A.C.\* , Weiler, A.J., **Kruse, L.**, Hilgers, F., Svensson, V., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2022). Role of siderophores in public good-based interspecies communication within microbial communities. Annual Conference 2022 on the association for general and applied microbiology (VAAM), Düsseldorf / Deutschland, Februar 2022

Bitzenhofer, N.L.\* , **Kruse, L.**, Schatton, M., Reiter, A., Loeschcke, A., Thies, S., Oldiges, M., Wiechert, W., Pietruszka, J. & Jaeger, K.-E (2022). ARcyria: Biologically active indolocarbazoles – Advanced Recombinant production of Arcyriaflavins. BioSC Symposium 2022, Düsseldorf / Deutschland, Mai 2022

**Kruse, L.**, Bitzenhofer, N.L., Kubicki, S., Jaeger, K.-E., Loeschcke, A. & Thies, S.\* (2022). *Pseudomonas* whole-cell biocatalysts for complex biotransformation cascades, 10<sup>th</sup> international Congress on Biocatalysis, Hamburg / Deutschland, August 2022

Zeisel, A.C.\* , Weiler, A.J., **Kruse, L.**, Knapp, F., Svensson, V., Wollenhaupt, B., Wiechert, J., Kohlheyer, D., Frunzke, J., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2022). Role of siderophores in public good-based interspecies communication within microbial communities. Helmholtz federated IT services (HIFIS) and Helmholtz Events: PhD Workshop, Leipzig / Deutschland, November 2022

Zeisel, A.C.\* , Weiler, A.J., **Kruse, L.**, Paik, S.H., Knapp, F., Svensson, V., Wiechert, J., Kohlheyer, D., Frunzke, J., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2023). Interspecies interaction between *P. putida* and *R. capsulatus* based on the fluorescent siderophore pyoverdine.

Annual Conference 2023 on the association for general and applied microbiology (VAAM),  
Göttingen / Deutschland, September 2023

**Kruse, L.\***, Armbrorst, N., Busche, T., Kalinowski, J., Schmidgal, T., Eberlein, C., Heipieper, H.J., Loeschcke, A., Wierckx, N., Jaeger, K.-E. & Thies, S. (2023). Physiological response to osmotic stress in *H. littoralis* as a blueprint for exploring the novel genus *Halopseudomonas*. 6<sup>th</sup> meeting on Microbial Responses to Stress – Microbial Stress 2023, Wien / Österreich, September 2023

\*präsentierende:r Autor:in

### **Abschlussarbeiten**

Innerhalb dieser Arbeit werden Ergebnisse gezeigt, die von Studierenden im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten generiert wurden. Die Projekte wurden von der Autorin vorbereitet sowie die Studierenden angeleitet und betreut.

Kugel, Y.M. (2021) Bioinformatische Identifizierung putativer Effluxproteine der *Pseudomonas pertucinogena* Familie. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.  
Bachelorarbeit

Armbrorst, N. (2022) Einfluss der EctD-vermittelten Hydroxyectoinproduktion auf die Osmotoleranz von *Halopseudomonas bauzanensis*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.  
Bachelorarbeit

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-bindende Kasette (engl. <i>ATP-binding cassette</i> )	LB	Komplexes Nährmedium (engl.: <i>lysogeny-broth</i> ) (LB-Medium)
ADP	Adenosindiphosphat	LC	Flüssigchromatographie (engl.: <i>liquid chromatography</i> )
ALE	adaptierte Laborevolution (engl.: <i>adaptive laboratory evolution</i> )	LPS	Lipopolysaccharid
AMP	Adenosinmonophosphat	MATE	Multi-antimikrobielles Extrusionsprotein (engl.: <i>multidrug and toxic compound extrusion</i> )
Amp	Ampicillin	MFS	Major-Faciliator-Superfamilie
ATP	Adenosintriphosphat	MQ-H <sub>2</sub> O	MiliQ-H <sub>2</sub> O
BHR	breites Wirtsspektrum (engl.: <i>broad host range</i> )	mRNA	boten RNA (engl.: <i>messengerRNA</i> )
bp	Basenpaare	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Cas	CRISPR assoziiert	NBD	Nukleotidbindedomäne
cdw	Zelltrockengewicht (engl.: <i>cell dry weight</i> )	NTA	Nitrilo-3-Essigsäure
CFU	koloniebildende Einheit (engl.: <i>cell forming unit</i> )	N-y-ADABA	N-y-Acetyl- L-2,4-Diaminobutyrat
Cm	Chloramphenicol	OD <sub>580 nm</sub>	Optische Dichte bei x nm
CoA	Coenzym A	OE-PCR	engl.: <i>overlap-extension</i> PCR
COG	<i>clusters of orthologous groups</i>	OMV	äußere Membranvesikel (engl. <i>outer membrane vesicle</i> )
CRISPR	engl.: <i>clustered regulatory interspaced short palindromic repeats</i>	<i>oriT</i>	engl.: <i>origin of Transfer</i>
CRISPRi	CRISPR Interferenz (engl.: <i>interference</i> )	<i>oriV</i>	Replikationsursprung (engl.: <i>origin of replication</i> )
Cti	<i>cis-trans</i> -Isomerase	PBAT	Polyethylenadipat-Terephthalat
DABA	L-2,4-Diaminobutyrat	PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
DNA	Deoxyribonukleinsäure	PDA	Photodiodenzeile (engl.: <i>photodiode array detector</i> )
dsDNA	Doppelstängige DNA	PET	Polyethylenterephthalat
EDEMP	Entner-Doudoroff-EMP	PEU	Poly(ester)-urethan
EK	Erlenmeyerkolben	PHA	Polyhydroxylalkanoat
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas	pl	isoelektrischer Punkt
FA	Fettsäuren (engl.: <i>fatty acids</i> )	PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
FAME	Fettsäuremethylester	rDNA	ribosomale DNA
FP	FlowePlate®	RBS	Ribosombindestelle
g	Gramm	Rif	Rifampicin
Gm	Gentamicin	RNA	Ribonukleinsäure
GTA	Phagen-ähnlicher Gentransfer (engl.: <i>phage-like gene transfer agent</i> )	RND	engl.: <i>Resistance-Nodulation-Division</i>
h	Stunden (engl.: <i>hour</i> )	rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
HGT	Horizontaler Gentransfer	rRNA	ribosomale RNA
HM	Minimalmedium (Hartman-Medium)	RWP	Round Well Plate®
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> )	s	Sekunden
HR	homologe Region	SDS	Natriumdodecylsulfat
IMAC	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	SMR	engl.: <i>small multidrug resistance</i>
Irg	Irgasan	Spc	Spectinomycin
Km	Kanamycin	sRNA	engl.: <i>small RNA</i>
L	Liter	SSB	Einzelstrang-bindend (engl.: <i>single strand binding</i> )

ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: <i>single-stranded DNA</i> )
SV	Säulenvolumen
TALE	Toleranz-ALE
TB	Komplexes Nährmedium (engl.: <i>terrific broth</i> )
Tc	Tetracyclin
TMD	Transmembrandomäne
TREX	Transfer- und Expressionssystem
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRMR	engl.: <i>trackable multiplex recombineering</i>
UNCED	United Nations Konferenz für Umwelt und Nachhaltigkeit (engl.: <i>United Nations Conference on Environment and Development</i> )
yTREX	Hefe (engl.: <i>yeast</i> ) TREX



## Zusammenfassung

Die Gattung *Halopseudomonas* bildet eine einzigartige phylogenetische Gruppe im Stammbaum der *Pseudomonadaceae*, wovon die meisten Vertreter erst innerhalb des letzten Jahrzehnts isoliert wurden. Obwohl sie ein vergleichsweise kleines Genom haben, was auf eine limitierte metabolische Flexibilität hindeuten könnte, gelten sie als eurytherm und euryhalin. Zudem leben sie natürlicherweise in extremen Habitaten, wie der Tiefsee oder mit Öl-, bzw. Schwermetallen-kontaminierten Böden. Mehrere Vertreter der Gattung wurden bereits mit dem Abbau anthropogener Substanzen in der Umwelt in Verbindung gebracht. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen die *Halopseudomonas*-Arten vielversprechende Kandidaten für biotechnologische Anwendungen dar, für die in dieser Arbeit die Grundlagen für die Erforschung und Anwendung bereitgestellt wurden.

Um diese Gattung näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit stellvertretend vier Kandidatenstämme aus unterschiedlichen Habitaten (Öl- oder Schwermetall-kontaminierte Böden, Gezeitenzone oder Tiefsee) ausgewählt: *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20. Als Grundvoraussetzung der mikrobiologischen Zugänglichkeit wurden geeignete Kultivierungsmethoden in Komplex- und Minimalmedien identifiziert. Hierbei erwiesen sich kurz ( $C_4$ -) und auch langkettige ( $> C_6$ -) Dicarbonsäuren als besonders geeignete Kohlenstoffquellen. Ergänzend zu den Kultivierungsprotokollen wurden verschiedene gentechnische Werkzeuge verwendet. Hierzu zählten unter anderem unterschiedliche Transformationstechniken mit Plasmidsystemen, die divers kompatible Replikationsursprünge trugen. Außerdem ließen sich *via* Tn7-Transposition Geninsertionen in die zwei *attTn7*-Loci von *H. litoralis* realisieren. Zur Steuerung der heterologen Genexpression wurden darüber hinaus konstitutive und induzierbare Promotorsysteme evaluiert. Dabei konnte für das AraC/ $P_{BAD}$ -System gezeigt werden, dass die Induktion mit einer deutlich geringeren Induktorkonzentration als bei *P. putida* erfolgreich war.

Diese Arbeiten dienten als Grundlage, um die Osmotoleranz der *Halopseudomonas*-Arten nähergehend zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst die phänotypische Reaktion der Kulturen bei Zugabe verschiedener Salze getestet. In allen vier ausgewählten *Halopseudomonas* Stämmen konnte erstmals die Produktion von sowohl Ectoin als auch 5-Hydroxyectoin nachgewiesen werden, obwohl das Gen der Ectoinhydroxylase *ectD* nicht in allen Genomen konserviert war. Eine potenziell neue Gruppe von Ectoinhydroxylasen konnte in *H. aestusnigri* und *H. oceani* identifiziert werden, die diese Reaktion stattdessen katalysieren könnten. Mit Hilfe einer gesteigerten Expression von *ectD* konnten die Produktion von 5-Hydroxyectoin in Relation zu Ectoin erhöht und so die Rolle dieses Osmolyts in der Osmotoleranz untersucht werden. Zur Untersuchung der salzinduzierten

---

Stressantwort auf Transkriptebene wurden entsprechende Transkriptomstudien in *H. littoralis* durchgeführt., wobei eine zweiphasige Stressantwort beobachtet wurde. In der frühen Phase konnten typische Stressreaktionen, wie eine gesteigerte Expression von Chaperon- und Energiehomöostase-assoziierten Genen beobachtet werden. Darüber hinaus waren Transkripte zur Produktion von mechanosensitiven Kanälen und verschiedener kompatibler Solute hoch abundant, während Transkripte zur Biosynthese von Flagellen niedrige Transkriptlevel aufwiesen. In der späten Phase waren Transkripte hoch abundant, die im Zusammenhang mit der Eisenaufnahme stehen. Daraus folgend führte die externe Zugabe von Eisensulfat zu einer Regeneration des bakteriellen Wachstums unter osmotischem Stress.

Insgesamt gelang die Etablierung mikrobiologischer Kultivierungskonzepte und molekularbiologischer Methoden von vier ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten. Hierbei wurde erstmals die Produktion des biomedizinisch relevanten Ectoins und 5-Hydroxyectoins, sowie eine zweistufige Reaktion bei osmotischem Stress auf Transkriptebene für diese Bakterien nachgewiesen. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit der Grundstein gelegt, um die Gattung *Halopseudomonas* biotechnologisch nutzbar zu machen.

## Summary

The *Halopseudomonas* species form a unique phylogenetic group in the phylogenetic tree of *Pseudomonadaceae*, most of those representatives have only been isolated within the last decade. Although they have a comparatively small genome, which may indicate limited metabolic flexibility, they are considered eurythermic and euryhaline. In addition, they naturally live in extreme habitats such as the deep sea or soils contaminated with oil or heavy metals. Several representatives of this genus have already been associated with the degradation of anthropogenic substances in the environment. Due to these properties, *Halopseudomonas* spp. are promising candidates for biotechnological applications.

In order to investigate this genus in more detail, four candidate strains from different habitats (oil- or heavy metal-contaminated soil, intertidal zone or deep sea) were selected as representatives in this study: *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 and *H. oceani* KX20. Suitable cultivation methods in complex and minimal media were identified as a basic prerequisite for their microbiological accessibility. Short (C<sub>4</sub>) and long-chain (> C<sub>6</sub>) dicarboxylic acids proved to be particularly suitable carbon sources. In addition to the cultivation protocols, various genetic engineering tools were used. These included different transformation techniques with plasmid systems that carried diverse compatible origins of replication. Besides, gene insertions into the two *attTn7* loci of *H. litoralis* could be realised *via* Tn7 transposition. Constitutive and inducible promoter systems were also evaluated to control heterologous gene expression. It was further shown that the induction of the AraC/P<sub>BAD</sub> system required significantly lower inducer concentration compared to *P. putida*.

This work served as the basis for investigating the osmotolerance of *Halopseudomonas* spp. in more detail. To this end, the phenotypic reaction of the cultures was first elucidated when different salts were added. The production of both ectoine and 5-hydroxyectoine was detected in all four selected *Halopseudomonas* strains for the first time, although the ectoine hydroxylase *ectD* was not conserved in all genomes. A potentially new group of ectoine hydroxylases was identified in *H. aestusnigri* and *H. oceani* that could presumably catalyse this reaction instead. By increasing the expression of *ectD*, the production of 5-hydroxyectoine was increased in comparison to ectoine and thus the role of this osmolyte in osmotolerance could be investigated. To determine the salt-induced stress response at the transcript level, corresponding transcriptome studies were carried out in *H. litoralis*, whereby a two-phase stress response was observed. In the early phase, typical stress responses such as increased expression of chaperone- and energy homeostasis-associated genes were observed. In addition, transcripts to produce mechanosensitive channels and various compatible solutes were highly abundant, while transcripts for the biosynthesis of flagella showed low transcript levels. In the late phase, transcripts

---

associated with iron uptake were highly abundant. Subsequently, the external addition of ferrous sulphate led to a regeneration of bacterial growth under osmotic stress conditions.

Overall, establishing microbiological cultivation concepts and molecular biological methods for four selected *Halopseudomonas* species was successful. The production of the biomedically relevant ectoine and 5-hydroxyectoine as well as a two-stage reaction under osmotic stress at transcript level was demonstrated for the first time for these bacteria. In summary, this work has laid the foundation for the biotechnological utilisation of the genus *Halopseudomonas*.

## 1 Einleitung

Der Begriff der Biotechnologie wurde 1992, während der Konferenz der Vereinten Nationen für Umwelt und Nachhaltigkeit (UNCED) als „jede technische Anwendung, bei der biologische Systeme, lebende Organismen, oder ihre Derivate speziell genutzt werden, um daraus Produkte oder Prozesse zu generieren, oder zu verändern“ definiert (UN Department of Public Information, 1992). Im Allgemeinen zielt die Biotechnologie darauf ab, den stetig wachsenden Bedürfnissen der Menschheit effektiver und effizienter gerecht zu werden (Cameron *et al.*, 2014; Benner & Sismour, 2005; Endy, 2005; Gavrilescu & Chisti, 2005). Grob kann die Biotechnologie in zwei Hauptbereiche aufgeteilt werden: die traditionelle und die gentechnikbasierte Biotechnologie. Diese lassen sich vor allem durch die gerichtete oder ungerichtete Manipulation auf molekularer Ebene unterscheiden (Okafor, 2007). Durch ungerichtetes Einbringen von Mutationen oder Fremd-DNA werden an zufälligen Stellen des Genoms Veränderungen generiert, um das gewünschte Produkt zu erzeugen oder dessen Erzeugung zu verbessern. Schon seit Jahrhunderten wird die mikrobielle Biotechnologie traditionell zur Herstellung von Nahrungsmitteln wie Joghurt oder Bier genutzt. Das gezielte DNA-basierte (*metabolic*) *engineering* von Mikroorganismen hatte seinen Startpunkt hingegen in den 1960er Jahren und ist heute von wachsender Bedeutung (Cameron *et al.*, 2014). Es ermöglicht durch die gerichtete Veränderung des Genoms unter anderem ein besseres Verständnis biologischer Prozesse sowie die Erschließung und Modifikation von natürlichen Ressourcen.

Synthetische Biologie ist die Weiterentwicklung des gerichteten (*metabolic*) *engineerings*. Hierbei werden biologische Systeme modular verändert, um neue, wirtsfremde oder nicht-native Produkte mit spezifischen Eigenschaften zu erzeugen. Die Relevanz der synthetischen Biologie hat sich insbesondere in den letzten Jahren während der Coronapandemie gezeigt. Dank ihr konnten schnell Testnachweise und erstmalig Impfstoffe auf Basis von *messenger* RNA (mRNA) hergestellt werden (Kowalzik *et al.*, 2021). Die Impfstoffentwicklung war früher ein Prozess, der oft mehrere Jahrzehnte dauerte. Auch bei anderen gesellschaftlichen Problemen, wie der Umweltverschmutzung oder der Lebensmittelversorgung einer stetig wachsenden Weltbevölkerung bietet die synthetische Biologie nachhaltige Lösungsansätze und ist mittlerweile ein fester Bestandteil bei der Entwicklung neuer biotechnologischer Produktionsprozesse. Dabei wird sie beispielsweise zur Herstellung von neuartigen mikrobiellen Produktionschassis eingesetzt, die chemisch komplexe Moleküle aus nachhaltig nachwachsenden Rohstoffen wie Lignin produzieren (Vardon *et al.*, 2015; Voigt, 2012). Der Einsatz von gentechnisch veränderten Mikroorganismen stellt somit eine vielversprechende Alternative zu Produktionsmethoden mit herkömmlichen erzeugten Produktionsstämmen dar. Sie erzielen höhere Produktausbeuten und sind in der Lage z. B. industrielle Abfallströme als Ausgangsstoffe

für den Produktionsprozess zu nutzen. Für biotechnologische Anwendungen und die Erforschung verschiedener nützlicher Eigenschaften hat sich im Laufe der Jahre die Nutzung einiger Mikroorganismen etabliert. Zu diesen gehören unter anderem *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* sowie Pseudomonaden wie *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas taiwanensis* (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Yan & Fong, 2017). Ein häufig verwendeter und einfach zu handhabender Standardwirt für die Etablierung und Optimierung verschiedener biotechnologischer Anwendungen ist *E. coli* (McCarty & Ledesma-Amaro, 2019; Xu *et al.*, 2019; Idalia & Bernardo, 2017; Glebes *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2014; Tabor *et al.*, 2011). Pseudomonaden sind alternative Produktionswirte und bekannt für ihre natürliche, intrinsische Toleranz gegenüber verschiedenen Antibiotika, Xenobiotika und Lösungsmitteln sowie ihrer Fähigkeit zur Produktion von wirtsfremden Sekundärmetaboliten (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Loeschcke & Thies, 2015, 2020; Fernández *et al.*, 2009; Reva *et al.*, 2006). *B. subtilis* hingegen wird aufgrund seiner hohen Kapazität zur Proteinsekretion vor allem zur Produktion rekombinanter Proteine verwendet (van Dijl & Hecker, 2013).

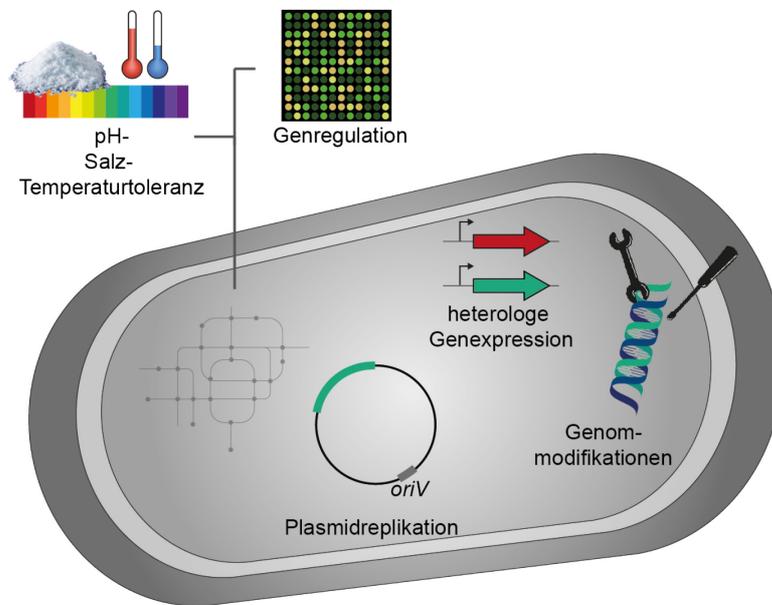
### 1.1 Anforderungen an Mikroorganismen in der Biotechnologie

Der Einsatz von Mikroorganismen in biotechnologischen Prozessen zur kosteneffizienten Herstellung neuer biochemischer Produkte stellt lebende Zellen vor spezifische Herausforderungen wie Produkt- oder Substrattoxizität, sowie extreme Produktionsbedingungen wie niedrige pH-Werte, hohe Temperaturen oder die Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln (Blombach *et al.*, 2022; Bitzenhofer *et al.*, 2021). Es ist erforderlich diese Herausforderungen, die einem Mikroorganismus zur effizienten Produktion unter industriellen Bedingungen begegnen, zu bewältigen. Verschiedene Ansatzpunkte eignen sich zur Optimierung von Mikroorganismen innerhalb von Produktionsprozessen (Cameron *et al.*, 2014; Voigt, 2012). Eine Möglichkeit ist, den metabolischen Fluss in Richtung der Bioproduktion zu ändern, um so eine Anreicherung toxischer Intermediate zu verringern, heterologe Biosynthesewege zu implementieren oder das Genom zu verkleinern. Alternativ können Gene implementiert werden, welche für Produkte zur Stressbewältigung kodieren wie beispielsweise Efflux-Transporter. So könnte die Konzentration des Stressors innerhalb der Zelle reduziert werden, um intrazelluläre Schäden zu vermindern. Außerdem kann ein Organismus durch adaptive Laborevolution schrittweise die Toleranz beispielsweise gegenüber toxischen Produkten oder Intermediaten, die innerhalb des Biosyntheseprozesses entstehen könnten, durch Anpassung steigern (Cárdenas Espinosa *et al.*, 2023; Kuepper *et al.*, 2020; Gießelmann *et al.*, 2019). Die gezielte Implementierung von Toleranzmechanismen kann allerdings eine

erneute Herausforderung darstellen, da eine Stressantwort viele verschiedene Faktoren beinhaltet und häufig ein komplexes Netzwerk darstellt (Czajka *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015).

Ein anderer Lösungsansatz, mit diesem Problem umzugehen, besteht darin, die Milliarden von Jahren natürlicher Evolution zu nutzen, um Nicht-Modellorganismen zu finden, die sich an solche Herausforderungen angepasst haben und diese komplexen Netzwerke natürlicherweise tragen (Blombach *et al.*, 2022; Fatma *et al.*, 2020). Die Anwendung solcher alternativer mikrobieller Modellorganismen kann dazu beitragen, bestehende Limitierungen in biotechnologischen Produktionsprozessen zu überwinden und die Nachhaltigkeit solcher Prozesse zu steigern (Fatma *et al.*, 2020; Charubin *et al.*, 2018; Yan & Fong, 2017). Hierbei stehen Mikroorganismen im Fokus, die vielversprechende natürliche Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise den Abbau von nachwachsenden Rohstoffen wie Lignocellulose. Zusätzlich kann die Nutzung von Abfallprodukten oder Sonnenlicht zur CO<sub>2</sub>-Fixierung eine ökologisch und ökonomisch attraktive Alternative darstellen (Riley & Guss, 2021). Somit lassen sich nicht nur die Treibhausgasemissionen, sondern auch die Produktionskosten im Allgemeinen senken und folglich eine umweltfreundlichere industrielle Produktion fördern (Riley & Guss, 2021). Außerdem reduziert der Abbau alternativer Kohlenstoffquellen den Verbrauch von Ausgangsstoffen der ersten Generation, wie Zucker oder Stärke, welche andernfalls in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden könnten (Riley & Guss, 2021; Sims *et al.*, 2008). Die Anwendung eines neuen biotechnologischen Modellorganismus, der vielversprechende Eigenschaften aufweist oder neue Naturstoffe produziert, bietet zudem den Vorteil, dass benötigte Transportmechanismen und Reaktionskaskaden bereits vorhanden sind, was eine Ansammlung toxischer Intermediate im Cytoplasma vermindert (Czajka *et al.*, 2017). Die Etablierung eines solchen Organismus stellt allerdings auch neue Herausforderungen dar. Die folgenden Kapitel sollen den aktuellen Kenntnisstand der mikro- und molekularbiologischen Anwendung von Mikroorganismen abbilden.

Zunächst einmal müssen geeignete Kultivierungsbedingungen identifiziert werden. Außerdem müssen für jeden neuen Modellorganismus Transformationsmethoden etabliert und ein Satz an gentechnischen Werkzeugen generiert werden (**Abb. 1.1**). Dieser beinhaltet unter anderem verschiedene replizierbare Plasmide, die Regulation der heterologer Genexpression über verschiedene Promotorsysteme sowie Modifikationen (Gendeletionen oder -insertionen) der chromosomalen DNA.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Etablierung eines neuen biotechnologischen Modellorganismus.**

Idealerweise sollten bestimmte Eigenschaften (pH-, Salz- oder Temperaturtoleranz) bereits natürlicherweise vorliegen. Für die gentechnische Verbesserung von Produktionsprozessen neuer Bakterien werden zudem replizierbare Plasmide benötigt, die regulierbare Promotoren zur heterologen Expression von Zielgenen aufweisen. Um gezielte Mutationen (z.B. Deletion und Insertionen) im Genom der Wirtszelle zu erzeugen, werden darüber hinaus beispielsweise integrative Plasmide benötigt.

Dank ihrer natürlichen Eigenschaften konnten bereits zahlreiche Organismen identifiziert und für (weitere) biotechnologische Anwendungen etabliert werden. *Corynebacterium glutamicum* wurde beispielsweise wegen einer hohen Produktion der Citratzyklus-basierten Biosynthese verschiedener Aminosäuren, unter anderem Glutaminsäure, zu einem mittlerweile im industriellen Maßstab angewendeten Produzent (Czajka *et al.*, 2017; Heider & Wendisch, 2015; Eggeling & Sahm, 2001). Die Hefe *Yarrowia lipolytica* kann 70 % ihres Zellrockengewichtes an Lipiden produzieren und einlagern, was sie zu einem interessanten alternativen Wirt für die Biosynthese dieser Substanzklasse und somit für Lipid-basierte chemische Produkte macht (Fatma *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2016). Auch andere Hefen konnten bislang für die Produktion von Lipiden und deren Derivaten etabliert werden. So konnte beispielsweise *Rhodospiridium turoloides* in einem Fed-Batch-Prozess mit 8,1 g/L einen um Faktor 1,4 höheren Produktionstiter von Fettkoholen erreichen als der modifizierte und sehr gut etablierte Modellorganismus *S. cerevisiae* (Fatma *et al.*, 2020; d’Espaux *et al.*, 2017; Fillet *et al.*, 2015).

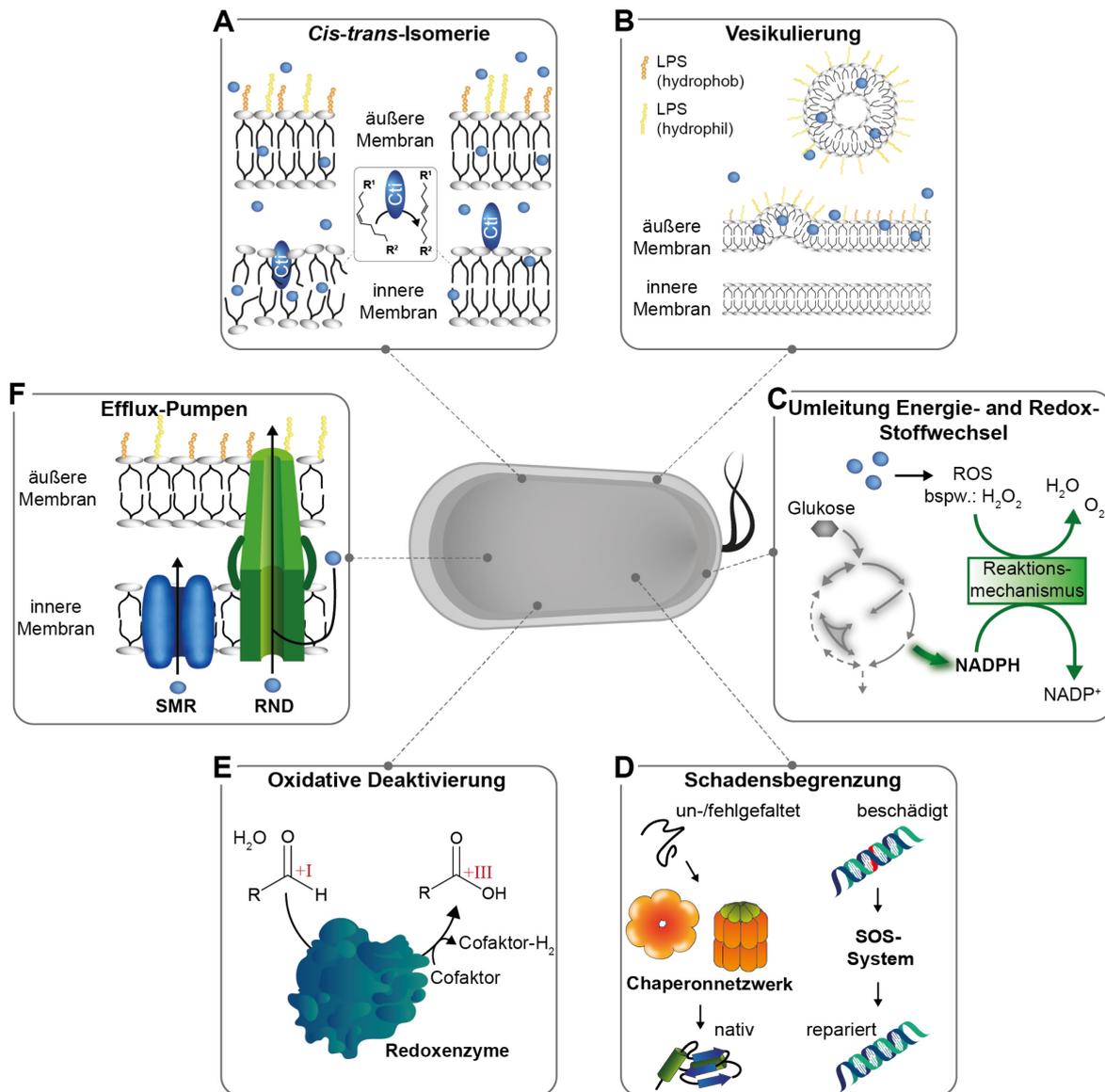
Um neue robuste mikrobielle Wirte zu isolieren, bieten natürliche Habitats, die sich durch harsche Umweltbedingungen auszeichnen, eine vielversprechende Möglichkeit. Damit ein Organismus unter extremen Bedingungen in solchen Habitats überleben kann, muss dieser intrinsische Toleranzen gegenüber verschiedene Stressoren aufweisen. Hierzu zählen unter anderem eine ausgeprägte pH-, Salz- oder Temperaturtoleranz. Diese Merkmale ermöglichen die Nutzung ungewöhnlicher Fermentationsprozesse (Fatma *et al.*, 2020). Beispielsweise können so unter hyperosmotischen Bedingungen eine verringerte

Kontamination gewährleistet oder von einer Reduktion der Titration zur pH Stabilisation profitiert werden (Riley & Guss, 2021).

## 1.2 Bakterielle Stressantworten am Beispiel *Pseudomonas* spp.

Auf der Erde gibt es verschiedene, extreme Lebensräume, die sich durch große Temperaturspannen, extreme pH-Werte, hohe Salzgehalte, radioaktive Strahlung oder unterschiedliche Nährstoff- oder Toxingehalte auszeichnen (Marles-Wright & Lewis, 2007). Bakterien, die in solchen außergewöhnlichen Habitaten leben, werden auch Extremophile genannt (Rampelotto, 2013). Neben diesen Nischen-adaptierten Organismen gibt es auch Bakterien, die gut darauf angepasst sind, wechselnde Stressbedingungen zu tolerieren. Hierfür finden sich viele Beispiele in der Familie der *Pseudomonadaceae*. Damit diese Organismen unter extremen oder sich rapide ändernden Bedingungen überleben können, haben sich im Laufe der Zeit unterschiedliche Strategien evolviert. Die erste und wohl einfachste davon ist Mobilität. Hier nutzen viele Bakterien Flagellen, um sich aus einer toxischen Umgebung zu entfernen oder in ein nährstoffreicheres Milieu zu gelangen (Marles-Wright & Lewis, 2007). Ebenso bietet die Zellmembran einen wirkungsvollen Schutz vor Toxinen (Hoe *et al.*, 2013; Nikaido, 2003). Dieser Schutz der Zellhülle kann des Weiteren aber durch Lösungsmittel und andere (hydrophobe) Chemikalien beeinflusst werden. Diese Stoffe können sich in der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien anreichern oder diese über Porine überwinden und so in die Cytoplasmamembran gelangen (Bitzenhofer *et al.*, 2021; de Bont, 1998). Dadurch können relevante Membranfunktionen, wie die Zellintegrität, die Enzymmatrix, die Diffusionsbarriere sowie elektrochemische Gradienten negativ beeinflusst werden (Bitzenhofer *et al.*, 2021). Pseudomonaden, die bekannt für ihre hohe Antibiotika- und Lösungsmitteltoleranz sind, haben zwei sehr schnelle und effiziente Mechanismen entwickelt, die die Integrität der Cytoplasmamembran beeinflussen (**Abb. 1.2A, B**) (Zhang & Rock, 2008; Heipieper *et al.*, 2007). Eine nahezu einzigartige und gleichzeitig charakteristische Stressantwort von Pseudomonaden auf Chemikalien bietet die Anpassung der Membranfluidität durch Isomerisierung der Fettsäuren von Membranlipiden (**Abb. 1.2A**). Hierbei wird die Konfiguration von *cis*-ungesättigten Fettsäuren hin zur *trans*-Konfiguration durch die periplasmatische *cis-trans*-Isomerase (Cti) umgewandelt (Eberlein *et al.*, 2018; Heipieper *et al.*, 1992). Das Enzym adressiert die Fettsäurereste Palmitoleinsäure (C16:1 $\Delta$ 9*cis*) und *cis*-Vaccensäure (C18:1 $\Delta$ 11*cis*) der Phospholipide der Cytoplasmamembran (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Heipieper *et al.*, 2003). Die Position der Doppelbindung bleibt unverändert, sodass ausschließlich durch Konfigurationsänderung die Fluidität der Membran verringert wird (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Heipieper *et al.*, 2007). Das für die Cti kodierende Gen (PP 2376 für *P. putida* KT2440) scheint stark konserviert zu sein, da es in allen bisher

aufgelisteten 52 *Pseudomonas*-Genomen der Pfam-Datenbank vorhanden ist (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF06934/Pseudomonas>).



**Abb. 1.2: Natürliche Reaktionsmechanismen von Pseudomonaden auf chemische Stressoren.**

Bakterien wie *Pseudomonas* spp. reagieren mit verschiedenen Abwehrmechanismen auf schädigende Umwelteinflüsse. In dieser Abbildung werden einige Reaktionen auf chemischen Stress gezeigt. **A:** Adaption der Fluidität der Membran durch die *cis-trans*-Isomerase (Cti). **B:** Erhöhung der Hydrophobizität der Zellmembran durch die Absonderung von äußeren Membranvesikeln, welche mit hydrophilen Lipopolysacchariden (LPS) beladen sind. **C:** Umleitung des Energie- und Redox-Stoffwechsels zur gesteigerten Produktion von Metaboliten der Energiehomöostase und zur Minderung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). **D:** Chaperonnetzwerke, die die native Konfiguration von un- oder fehlgefalteten Proteinen fördern. Schäden in der DNA können durch das SOS-System repariert werden. **E:** Redoxenzyme zur oxidativen Umwandlung von toxischen Aldehydverbindungen (angedeutet durch rote Oxidationszahlen). **F:** Efflux-Pumpen befördern toxische Intermediate oder Produkte aus der Zelle heraus. Die Abbildung wurde modifiziert nach Bitzenhofer *et al.*, 2021; veröffentlicht unter einer CC BY 4.0 Lizenz.

Eine weitere schnelle Möglichkeit zur Membranadaption bietet die Vesikulierung, welche einen generellen Abwehrmechanismus aller Gram-negativen Bakterien darstellt (**Abb. 1.2B**). Hierbei werden äußere Membranvesikel (OMV, engl. *outer membrane vesicle*) an den extrazellulären Raum abgegeben, was eine Änderung der Zusammensetzung der

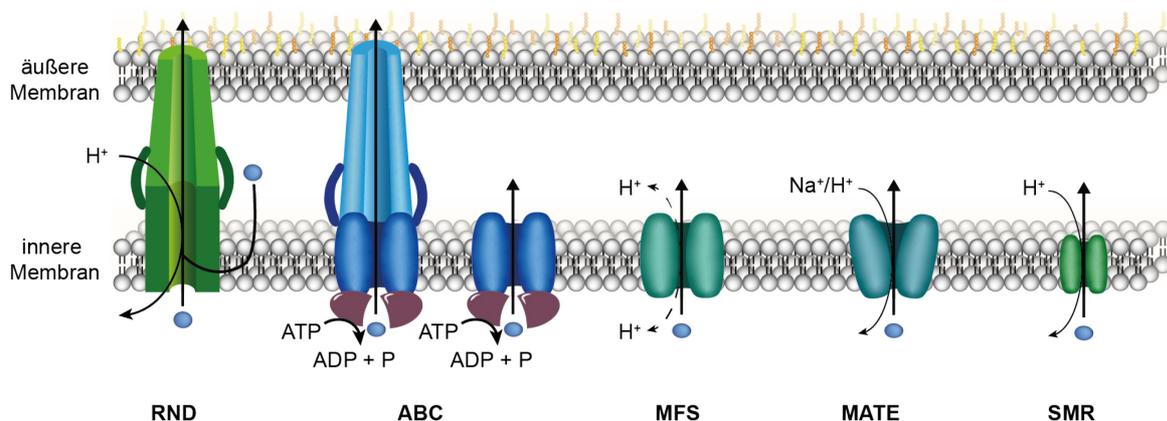
Lipopolysaccharid (LPS)-Schicht auf der äußeren Membran der Zelle bedingt (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Mozaheb & Mingeot-Leclercq, 2020; Eberlein *et al.*, 2018). OMV haben einen Durchmesser von 20 bis 500 nm, können sehr schnell gebildet werden und führen zu einer hydrophoberen bakteriellen Oberfläche, was wiederum die Biofilmbildung fördert (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Eberlein *et al.*, 2018; Baumgarten *et al.*, 2012). Diesen bilden einige Pseudomonaden, um sich über längere Zeit vor äußeren Stressoren schützen zu können (Nizer *et al.*, 2020). Das Leben in einem Biofilm oder einer Mikrokolonie führt zu einer höheren Toleranz gegenüber Antibiotika, Lösungsmitteln und anderen Formen von Umweltstress (Atashgahi *et al.*, 2018; Baumgarten *et al.*, 2012).

Neben ungerichteten Antworten können Pseudomonaden und andere Bakterien auf genetischer Ebene auf Stressoren reagieren. Dabei werden Gene hochreguliert und stärker exprimiert, deren Produkte einem spezifischen schädlichen Umweltfaktor entgegenwirken können (**Abb. 1.2C**). Ermöglicht wird diese Signaltransduktion durch sogenannte Zwei-Komponenten-Systeme. Hierbei wird eine Sensorkinase unter Stresseinwirkung phosphoryliert, was wiederum eine Interaktion mittels Phosphorylierung mit einem spezifischen Regulator ermöglicht, der an der Transkription beteiligt ist (Marles-Wright & Lewis, 2007). Außerdem kann Stress auf der RNA- und der Proteinebene entgegengewirkt werden. Nicht-kodierende RNA (sRNA (*small*RNA)) kann die mRNA binden und so deren Sekundärstruktur beeinflussen, was wiederum zu veränderter Translation führt (Hoe *et al.*, 2013). sRNAs können bei plötzlich auftretenden Temperatur- oder pH-Schwankungen, Eisenlimitierungen, Nährstoffmangel, oxidativem Stress oder Anpassungen der Proteine der äußeren Membran als wichtige Stressantwort dienen (Hoe *et al.*, 2013; Sonnleitner *et al.*, 2012; Sonnleitner & Haas, 2011).

Zu den Stressabwehrmechanismen gehört das SOS-System, durch das bereits entstandene DNA-Schäden repariert werden können (**Abb. 1.2D**), indem die DNA-Integrität und -Replikation aufrechterhalten werden (Maslowska *et al.*, 2019). Mutanten, bei denen DNA-Reparaturgene deletiert wurden, zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber reaktiven Verbindungen (Roca *et al.*, 2008). Auf Proteinebene sind Chaperone aus der Familie der Hitzeschockproteine (Bsp.: GroEL/ES, ClpB) ein wichtiger Baustein zum Überleben der Zelle (Hartl *et al.*, 2011; Bösl *et al.*, 2006). Chaperone sind allgemein als sogenannte Faltungshelfer bekannt. Sie binden an Proteine und fördern die richtige Konformation von fehlerhaft oder ungefalteten Proteinen oder schützen vor Denaturierung (Nizer *et al.*, 2020; Ron, 2006). Sie bieten eine noch schnellere Reaktion auf proteotoxischen Stress physikalischen oder chemischen Ursprungs als sRNAs (Nizer *et al.*, 2020). Pseudomonaden sind außerdem bekannt für ihre Fähigkeit reaktive Verbindungen durch Redoxenzyme zu deaktivieren (**Abb. 1.2E**). Dadurch können beispielsweise toxische Aldehyde schnell zu weniger schädlichen Alkohol- oder Säurederivaten oxidiert werden,

wodurch einige schädliche aromatische Verbindungen durch die Vielzahl an Redoxenzymen unschädlich gemacht werden (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Nogales *et al.*, 2017). Periplasmatische Alkoholdehydrogenasen verhindern dadurch eine Anreicherung und das Eindringen toxischer Substrate in das Cytoplasma (Bitzenhofer *et al.*, 2021).

In Gram-negativen Bakterien spielen Efflux-Pumpen eine außerordentlich wichtige Rolle bei der Überwindung von Stress (Ramos *et al.*, 1998). Durch den aktiven Export von Molekülen kann das Eindringen und die Akkumulation von schädlichen Chemikalien verhindert werden, die nicht vollständig durch Stressreaktionsmechanismen der Zellhülle abgehalten wurden (**Abb. 1.2F**) (Ramos *et al.*, 2015). Generell erfolgt die Differenzierung in Gram-negativen Bakterien zwischen der Sekretion von toxischen Verbindungen aus dem Cytosol in das Periplasma und dem Transport über beide Membranen in den extrazellulären Raum. Die hierfür relevanten Efflux-Transporter weisen strukturelle und mechanistische Unterschiede auf und können in fünf Superfamilien eingeteilt werden (**Abb. 1.3**) (Henderson *et al.*, 2021; Blanco *et al.*, 2016).



**Abb. 1.3: Schematische Übersicht der fünf Efflux-Transporter Superfamilien in Gram-negativen Bakterien.**

Pumpen, die chemische Moleküle extrudieren, gehören entweder der „Resistance-Nodulation-Division“ (RND)-, Adenosintriphosphat-bindende Kasette (ABC)-, Major-Faciliator (MFS), Multi-antibakterielles Extrusionsprotein (MATE)- oder „small multidrug resistance“ (SMR)-Superfamilie an. Substrate können über RND- und einige ABC-Transporter beide Membranen passieren, wohingegen MFS-, MATE- und SMR-Transporter diese lediglich über die innere Membran transportieren. Für diesen Prozess nutzen einige Transporter einen Ionengradienten (RND, MATE, und SMR), während ABC-Pumpen ATP hydrolysieren, um die benötigte Energie zu generieren. MFS sind entweder Uniporter, Symporter oder Antiporter, angedeutet durch die gestrichelte Linie. Modifiziert und adaptiert nach Ramos *et al.* (2015), veröffentlicht mit der Genehmigung von Oxford University Press unter der Lizenznummer 5684650928841.

Eine Superfamilie bilden die „Resistance-Nodulation-Division“-Transporter (RND), welche den wichtigsten Resistenz-vermittelnden Transportern in Pseudomonaden angehören. Ihnen konnten bereits Toleranzen gegenüber einem breiten Spektrum von Giftstoffen, wie Antibiotika, Bioziden, Schwermetallen, mono- und polyzyklische Aromaten, kurz- und langkettigen Alkoholen, (Cyklo-)Alkanen, Monoterpenoiden und Aldehyden assoziiert werden (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Schempp *et al.*, 2020). Für die Lösungsmitteltoleranz einiger *Pseudomonas*-Arten ist maßgeblich der Transportproteinkomplex TtgGHI dieser Superfamilie verantwortlich (Yao *et al.*, 2021).

Neben den RND-Transportern spielen auch zwei Typen von ATP-Binde-Kassette (ABC, engl. *ATP-binding cassette*)-Transportern eine wichtige Rolle bei der Extrusion chemischer Substrate, wie Antibiotika, Toluol, Schwermetalle, *p*-Cumarsäure oder *tert*-Butylhydroperoxid (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Du *et al.*, 2018). ABC-Transporter können sich im Grundaufbau unterscheiden, weshalb in der Literatur teilweise von sechs, anstelle von fünf Kategorien der Efflux-Transporter gesprochen wird (Du *et al.*, 2018). Transporter des SAV1866-Typs transportieren das Substrat in das Periplasma, wohingegen MacAB-ToIC-Typ Transporter über einen dreigliedrigen Komplex den Export des Substrats aus der Zelle heraus ermöglichen (Du *et al.*, 2018; Fitzpatrick *et al.*, 2017; Dawson & Locher, 2006).

Major-Faciator-Superfamilie (MFS)-Transporter bilden die dritte Kategorie und sind in der Cytoplasmamembran vorzufinden (Du *et al.*, 2018). Es konnte bereits gezeigt werden, dass MFS-Transporter unter anderem an Toleranzen gegenüber Toluol, Propionate, 4-Hydroxybenzoate oder Formaldehyd beteiligt sind (Bitzenhofer *et al.*, 2021; García *et al.*, 2010). TtgK vermittelt beispielsweise in *P. putida* DOT-T1E eine Toluoltoleranz (García *et al.*, 2010).

Die vierte Superfamilie der Efflux-Transportern bildet das multi-antimikrobielle Extrusionsprotein (MATE, engl.: *multidrug and toxic compound extrusion*), welches in verschiedenen Gram-negativen Bakterien wie *Pseudomonas* spp. identifiziert wurde (Mousa *et al.*, 2016; Tanaka *et al.*, 2013). NorM\_PS vermittelt beispielsweise eine Toleranz gegenüber 4',6-diamidino-2-phenylindol in *Stutzerimonas stutzeri* (vormals *P. stutzeri* (Rudra & Gupta, 2021)) (García *et al.*, 2010). MATE-Transporter bestehen aus Transmembranhelices in der inneren Membran, die einen V-förmigen, zum Periplasma geöffneten Kanal bilden (Du *et al.*, 2018; He *et al.*, 2010).

Die fünfte und letzte Superfamilie der Efflux-Transporter bilden die „*small multidrug resistance*“ (SMR)-Transporter (Du *et al.*, 2018; Bay *et al.*, 2008). Sie stellen mit 110 Aminosäuren die kleinsten Transporter dar und dienen dem Efflux verschiedener Alkaloide und Antibiotika (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Helmann *et al.*, 2019). Während des Transportprozesses ändert sich die Konformation dieser Pumpen, sodass sie entweder zum Zellinneren oder aber zum Periplasma hin geöffnet sind (Du *et al.*, 2018; Morrison *et al.*, 2012).

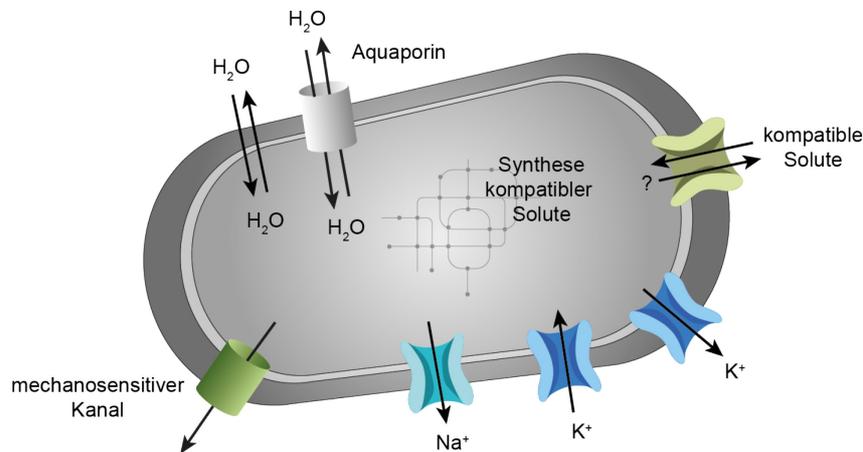
Die verschiedenen Transportproteine sowie die Integrität der Zellmembran spielen somit eine fundamentale Rolle in der Bewältigung von chemisch induziertem Stress. Neben dem chemischen Stress stellt der osmotische Stress einen wichtigen Faktor in der Welt der Mikroorganismen und der Biotechnologie dar.

### 1.2.1 Spezielle Anpassungen als Reaktion auf osmotischen Stress in Pseudomonaden

Das Cytoplasma eines Bakteriums ist von einer semipermeablen Membran umgeben, welche das Cytosol von der äußeren Umgebung abgrenzt. Das Zellinnere bietet Raum für biochemische Reaktionen, der Vervielfältigung der DNA und der Energiegewinnung, um so Wachstum zu ermöglichen (Czech *et al.*, 2018a; van den Berg *et al.*, 2017; Wood, 2011). Bei all diesen Prozessen sind Moleküle mit einem eigenen osmotischen Potential vorhanden (Wood, 2011).

Bakterien leben häufig in wässriger Umgebung, was zu einem passiven Wasserausgleich über die semipermeable Membran führt, um so Unterschiede zwischen dem Salzgehalt im extra- und intrazellulären Raum auszugleichen. Die Wassermenge innerhalb der Zelle übt dabei einen Druck auf die Membran aus, welcher Zellturgor genannt wird (Bremer & Krämer, 2019; Czech *et al.*, 2018a; Rojas & Huang, 2018). Der Turgor ist essenziell für das Wachstum vieler Bakterien und sollte innerhalb eines physiologischen Bereichs bleiben (Deng *et al.*, 2011). Ein aktiver Transport von Wasser ist nicht möglich, was unter hypoosmotischen Bedingungen zum Einstrom von Wasser über Aquaporine und schließlich zur Zellyse führen kann (Czech *et al.*, 2018a; Çetiner *et al.*, 2017; Calamita, 2000; Levina *et al.*, 1999). Eine hyperosmotische Umgebung würde hingegen über den passiven Ausstrom von Wasser die Zelle dehydrieren und ein Einstellen von physiologisch wichtigen Reaktionen bewirken (Czech *et al.*, 2018a; Wood, 2011). Hier ist somit, im Gegensatz zu Stress durch an sich toxische Substanzen, keine direkte Antwort auf den Stressor möglich. Deshalb haben Bakterien ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen evolviert, um auf den osmotischen Stress zu reagieren.

Einen Baustein stellt die gezielte Aufnahme oder Abgabe von bestimmten Ionen über spezifische Transporter dar, um der Zellyse oder dem Schrumpfen der Zellen entgegenzuwirken, wobei sich die Strategien im Zugang der Salze zu den im Cytosol befindlichen Teilchen unterscheidet (**Abb. 1.4**) (Iscla & Blount, 2012). In seltenen Fällen tritt auch eine Kombination beider Mechanismen auf (Czech *et al.*, 2018a; Vaidya *et al.*, 2018; Youssef *et al.*, 2014; Deole *et al.*, 2013; Kokoeva, 2002).



**Abb. 1.4: Übersicht der Reaktionen von Pseudomonaden auf osmotischen Stress.**

Pseudomonaden und andere Bakterien regulieren das osmotische Potential und den damit einhergehenden Wasserfluss über die Membran durch Aquaporine mit Hilfe diverser Mechanismen. Zum einen können unspezifische Ionen schnell über mechanosensitive Kanäle abgegeben werden oder aber durch Aufnahme von Natriumionen oder der Abgabe von Kaliumionen. Eine weitere Strategie besteht in der Aufnahme von Kaliumionen mit anschließender Supplementierung durch kompatible Solute. Adaptiert und modifiziert nach Bremer und Krämer (2019); Hermann et al. (2020); veröffentlicht unter einer *Creative Commons Attribution* (CC BY) Lizenz.

Eine erste, schnelle Reaktion auf plötzliche hypoosmotische Bedingungen stellt die unspezifische Abgabe von Salzen oder niedermolekularen organischen Substanzen über mechanosensitive Kanäle dar (Hermann *et al.*, 2020; Czech *et al.*, 2018a). Der Einstrom von Wasser erhöht den Zellturgor, welcher wiederum das Öffnen dieser Kanäle initiiert (Çetiner *et al.*, 2017; Calamita, 2000; Levina *et al.*, 1999). Nimmt der Zelldruck wieder ab, schließen sich die Kanäle (Bremer & Krämer, 2019). Dieser Mechanismus stellt somit die Vitalität der Zelle unter schwankenden osmotischen Bedingungen sicher (Hermann *et al.*, 2020; Bremer & Krämer, 2019; Czech *et al.*, 2018a). Im Gegensatz dazu ist die gezielte Salzaufnahme unter konstant hyperosmotischen Bedingungen von Vorteil (Czech *et al.*, 2018a; Oren, 2011; Roeßler & Müller, 2001; Kempf & Bremer, 1998; Galinski & Trüper, 1994). Hier werden im großen Maßstab Kalium- und Chloridionen aus der Umgebung aufgenommen, während gleichzeitig cytotoxische Natriumionen über einen Antiporter aus der Zelle heraustransportiert werden (Czech *et al.*, 2018a; Oren, 2011; Galinski & Trüper, 1994). Um die biochemischen Funktionen von Proteinen unter diesen konstant hohen intrazellulären Salzkonzentrationen beizubehalten und ein Denaturieren der Proteine zu verhindern, haben sich die Eigenschaften der Proteine solcher Organismen evolviert. Der isoelektrische Punkt vieler Enzyme ist in den sauren pH-Bereich verschoben und es konnten viele negativ geladene Aminosäuren auf den Proteinoberflächen identifiziert werden (Czech *et al.*, 2018a; Talon *et al.*, 2014; Coquelle *et al.*, 2010; Tadeo *et al.*, 2009). Wegen dieser evolutionären Anpassung müssen keine Stressbewältigungsprodukte produziert werden, was diese Strategie zum Schutz der Zellvitalität mit einem geringeren Energieaufwand verbindet (Oren, 2011, 1999). Die aktive Auslagerungsstrategie des Salzes eignet sich zur Reaktion auf Schwankungen im osmotischen Potential, benötigt

dafür aber mehr Energie. (Oren, 1999, 2011). Bei dieser, unter Mikroorganismen sehr weit verbreitete Strategie wird als eine erste Reaktion  $K^+$  aufgenommen, welches anschließend durch die Akkumulation bestimmter organischer Osmolyte supplementiert wird (Bremer & Krämer, 2019; Wood, 2011; Roeßler & Müller, 2001; Kempf & Bremer, 1998). Diese verhindern wiederum, dass die Salze mit den Zellbestandteilen interagieren können.

### 1.2.1.1 Kompatible Solute als Antwort auf osmotischen Stress

Sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten und Archaea wurden ähnliche niedermolekulare Substanzen identifiziert, die die Zelle unter hyperosmotischen Bedingungen schützen (Czech *et al.*, 2018a).

Diese werden als kompatible Solute oder auch Osmolyte bezeichnet, weil ein linearer Zusammenhang zwischen der intrazellulären Konzentration der Cytoprotektoren und der extrazellulären Salzkonzentration besteht (Czech *et al.*, 2018b; Calderón *et al.*, 2004; Kuhlmann & Bremer, 2002). Kompatible Solute können von den Zellen entsprechend in sehr hohen Konzentrationen aufgenommen oder produziert werden (Bremer & Krämer, 2019; Czech *et al.*, 2018a; Yancey, 2005; Yancey *et al.*, 1982; Brown, 1976)

Produzierte Osmolyte sind vor allem quartäre Ammoniumverbindungen, wie Betain-Glycin oder L-Carnitin, Aminosäuren und ihre Derivate (L-Prolin, L-Glutamat, Ectoin und 5-Hydroxyctoin) oder aber Zucker, wie beispielsweise Trehalose (Bremer & Krämer, 2019; Czech *et al.*, 2018a; Santos & Da Costa, 2002; Diamant *et al.*, 2001; Tatzelt *et al.*, 1996). Neben dem Schutz vor osmotisch induziertem Stress entgegenen diese Thermo- oder Piezolyte auch den Folgen von sehr hohen oder niedrigen Temperaturen, hydrostatischem Druck, dem Einfrieren, Austrocknen oder der Denaturierung von Makromolekülen hervorgerufen durch Ionen oder Harnstoff auf die Zellintegrität (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Burg & Ferraris, 2008; Roeßler & Müller, 2001; Kempf & Bremer, 1998; Le Rudulier *et al.*, 1984).

Kompatible Solute interagieren aber auch direkt mit dem Proteinrückgrat und verdrängen die umgebende Hydrathülle. Dieser Ausschluss der Hydrathülle stellt eine thermodynamisch ungünstige Bedingung dar, wodurch die Proteine gezwungen werden, einen kompakten und gefalteten Zustand zu halten, um so die Anzahl der Osmolyte auf der Proteinoberfläche zu minimieren (Czech *et al.*, 2018a; Auton *et al.*, 2011; Street *et al.*, 2006; Bolen & Baskakov, 2001; Arakawa & Timasheff, 1985). Aus diesem Grund werden kompatible Solute teilweise auch als chemische Chaperone bezeichnet (Bremer & Krämer, 2019; Czech *et al.*, 2018a; Diamant *et al.*, 2001; Tatzelt *et al.*, 1996). Da diese Moleküle auf diese Weise Interaktionen mit dem Proteinrückgrat eingehen, wurde genauer untersucht, wie die Erkennung und Aufnahme über Membranproteine funktionieren kann. Hier konnte für das Osmolyt Betain gezeigt werden, dass spezifische ABC-Transporter über drei aromatische Aminosäuren (Tryptophan oder Tyrosin) eine hoch affine Ligandenbindung

über Kationen- $\pi$ -Interaktionen mit der positivgeladenen Trimethylamoniumgruppe des Glycin-Betains eingehen (Czech *et al.*, 2018a). Dadurch können weitere negative Interaktionen mit dem Proteinerückgrat verhindert werden (Bremer & Krämer, 2019; Perez *et al.*, 2014; Capp *et al.*, 2009; Schiefner *et al.*, 2004a, 2004b). Die Aktivierung der Osmostress-gesteuerten Transporter steht im Zusammenhang mit dem cytosolischen  $K^+$ -Vorrat sowie dem Zellturgor (Bremer & Krämer, 2019; Gundlach *et al.*, 2017, 2019; Commichau *et al.*, 2018; Huynh *et al.*, 2016; Schuster *et al.*, 2016).

In Pseudomonaden konnten Osmolyte aus allen chemischen Klassen nachgewiesen werden. Als Zucker wurden vor allem Trehalose und Mannitol als Osmolyte nachgewiesen, die quartären Ammoniumverbindungen, wie Betain-Glycin oder L-Cholin, sowie das Aminosäurederivat *N*-Acetylglutaminyglutaminamid (Kurz *et al.*, 2010; Kets *et al.*, 1996). Einen besonderen Stellenwert nimmt dabei die Produktion der Tetrahydropyrimidine Ectoin und 5-Hydroxyectoin ein, welche allgemein bei Pseudomonaden nicht weit verbreitet ist, aber in marinen Pseudomonaden vertreten ist, weshalb diese im Folgenden genauer erklärt werden.

#### 1.2.1.2 Ectoin- und 5-Hydroxyectoinproduktion durch marine Pseudomonaden

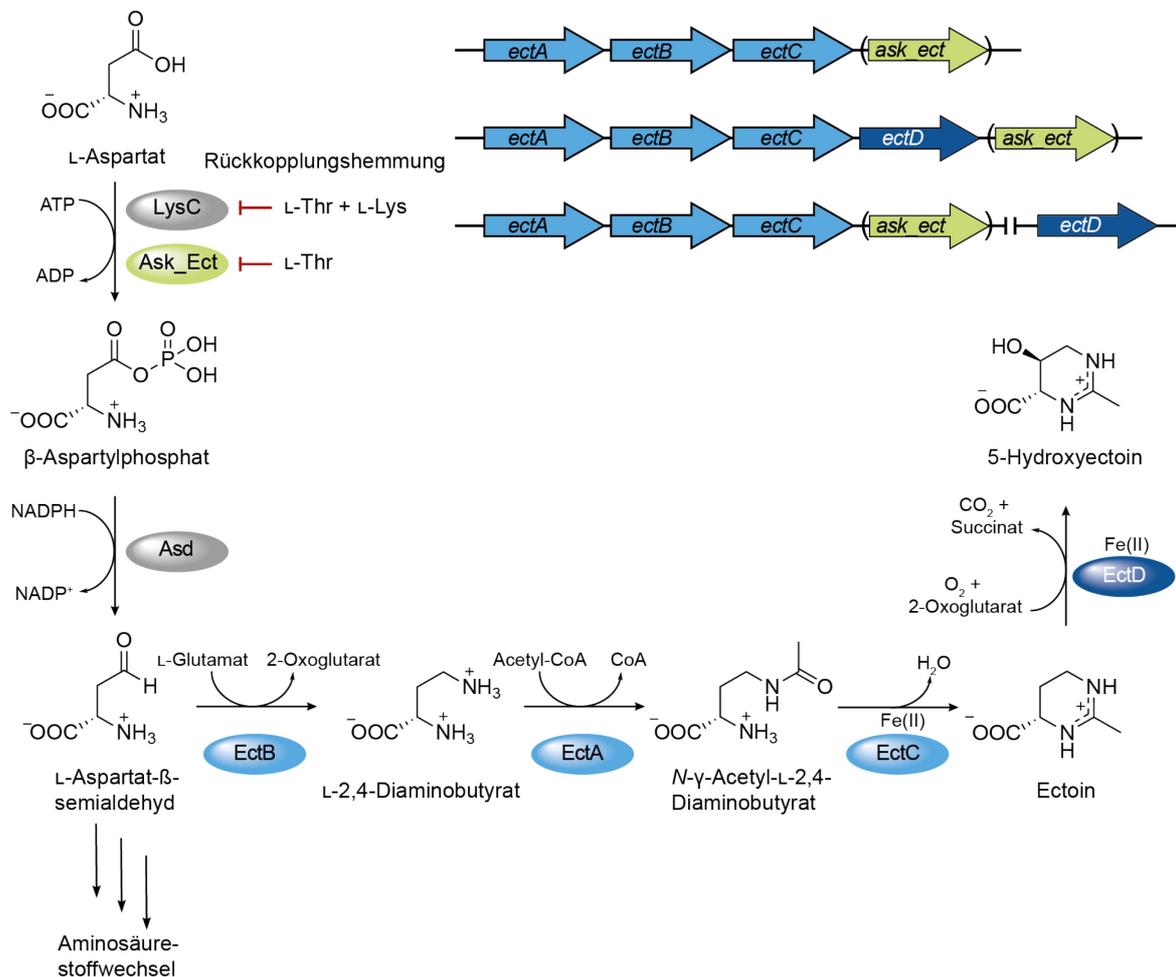
Das Tetrahydropyrimidin Ectoin [IUPAC: (4S)-2-Methyl-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carbonsäure] wurde erstmals 1985 in dem halophilen phototrophen Bakterium *Halorhodospira halochloris* (vormals: *Ectothiorhodospira halochloris*) identifiziert (Galinski *et al.*, 1985; Schuh *et al.*, 1985). Kurz darauf wurde das Derivat 5-Hydroxyectoin [IUPAC: (4S,5S)-2-Methyl-5-Hydroxy-1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-4-Carbonsäure] in dem Gram-positiven Bakterium *Streptomyces parvulus* erstmals beschrieben (Inbar & Lapidot, 1988). Zunächst galten diese Aminosäurederivate als rar. Später stellte sich jedoch heraus, dass sie unter Archaeen und Prokaryoten weit verbreitet sind (Czech *et al.*, 2018a; Galinski & Trüper, 1994). Bei Ectoin und 5-Hydroxyectoin handelt es sich um Zwitterionen, die mit bis zu 4 M bei 20 °C und sogar 6 M bei 4 °C eine sehr hohe Löslichkeit in Wasser besitzen (Zaccai *et al.*, 2016; Schuh *et al.*, 1985). Beide kompatiblen Solute können starke Bindungen mit den umgebenden Wassermolekülen eingehen und die Wasserstoffbrückenbindungen in wässrigen Lösungen verstärken (Hahn *et al.*, 2015; Smiatek, 2014). Dieser Effekt lässt sich auf die negativ geladene Carboxylgruppe in Kombination mit der delokalisierten positiven Ladung der Ringstruktur zurückführen (Czech *et al.*, 2018a; Smiatek, 2014). Der daraus resultierende Wechsel zwischen hydrophilen und hydrophoben Kräften trägt zu Wasser-Wasser und Wasser-Solut Interaktionen bei (Eiberweiser *et al.*, 2015; Smiatek, 2014; Smiatek *et al.*, 2013; Held *et al.*, 2010). So kann Ectoin sieben und sein hydroxyliertes Derivat sogar neun Wassermoleküle koordinieren (Smiatek *et al.*, 2013). Dadurch fungieren diese Osmolyte als Cytoprotektoren und sorgen für einen außerordentlichen Schutz des Cytosols.

Zudem erhöhen beide Moleküle die Zellvitalität bei extremen Temperaturen (Czech *et al.*, 2018a; Smiatek *et al.*, 2013; Kuhlmann *et al.*, 2008). Der dahinter liegende Mechanismus ist bislang noch nicht identifiziert, könnte aber ebenfalls auf die Interaktion mit dem Proteinrückgrat zurückzuführen sein (Hermann *et al.*, 2020; Czech *et al.*, 2018a).

Insbesondere 5-Hydroxyectoin bietet zudem einen herausragenden Schutz vor anhydrobiotisch induzierten Schäden in Bezug auf Biomoleküle oder ganze Zellen, sowie oxidativen Stress (Kurz, 2008; Manzanera *et al.*, 2004, 2002). Bei Ectoin konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Osmolyts die Schmelztemperatur der DNA herabsenkt, wohingegen sie bei 5-Hydroxyectoin steigt (Kurz, 2008). Außerdem kann Ectoin die DNA nicht nur vor Einzelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung, sondern auch durch UV-induzierten zellulären Stress schützen und als Radikalfänger dienen (Fontbonne *et al.*, 2023; Hahn *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2017; Schröter *et al.*, 2017; Buenger & Driller, 2004). Durch seine außerordentliche Rolle als Stressprotektor hat Ectoin große Bedeutung in der Medizin, Biotechnologie und Kosmetik erreicht (Czech *et al.*, 2018a; Bownik & Stępniewska, 2016; Jorge *et al.*, 2016). Das jährliche Produktionsvolumen lag bei ca. 15 000 t Ectoin pro Jahr (Stand 2017) (Czech *et al.*, 2018a). Die Produktion und Nachfrage nach diesem kostbaren Produkt steigen allerdings weiter, was sich in einem hohen Preis für Ectoin und 5-Hydroxyectoin mit 1 000 - 1 200 € je Kilogramm widerspiegelt (Stand 2021) (Cantera *et al.*, 2022).

### 1.2.1.3 Biosynthese von Ectoin und 5-Hydroxyectoin

Die *de novo* Biosynthese von Ectoin beginnt mit L-Aspartyl- $\beta$ -semialdehyd, einem Intermediat des Aminosäurestoffwechsels (Ono *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 1990). Katalysiert wird die Biosynthese von drei Enzymen, deren kodierende Gene in einem Operon (*ectABC*) vorliegen: die L-2,4-Diaminobutyrat-Transaminase (EctB; EC 2.6.1.76), die L-2,4-Diaminobutyrat-Acetyltransferase (EctA; EC 2.3.1.178) sowie die Ectoinsynthase (EctC; EC 4.2.1.108). Die stereo- und positionsspezifische Hydroxylierung zum 5-Hydroxyectoin in einigen nativen Ectoinproduzenten wird durch die Ectoinhydroxylase (EctD; EC 1.14.11.55) katalysiert (**Abb. 1.5**). Das kodierende Gen kann dabei entweder innerhalb des zuvor beschriebenen Operons oder an einer anderen Stelle im Genom vorliegen (Czech *et al.*, 2018a). Im Falle von *S. stutzeri* liegen alle Gene innerhalb eines Operons *ectABCD-ask\_ect* vor (Czech *et al.*, 2018a). Die Enzyme EctA, EctC und EctD sind sehr spezifisch innerhalb der Ectoinbiosynthese und können die Reaktionen nur in eine Richtung katalysieren. Aus diesem Grund benötigt der Katabolismus dieser Cytoprotektoren weitere spezifischere Enzyme (Hermann *et al.*, 2020; Czech *et al.*, 2018a).



**Abb. 1.5: Biosynthese von Ectoin und 5-Hydroxyectoin.**

Die für die Ectoinsynthese kodierenden Gene liegen innerhalb des Operons *ectABC* vor. Das Gen *ectD* liegt entweder innerhalb des Operons oder an einer anderen Stelle im Genom. Manche Ectoin/5-Hydroxyectoinproduzenten weisen zusätzlich *ask\_ect* auf, welches für eine Aspartatkinase kodiert und innerhalb des Operons zu finden ist. Alle bislang bekannten möglichen Varianten der Anordnung der Gene in verschiedenen Organismen sind schematisch dargestellt. Klammern ( ) symbolisieren, dass das Gen nur in wenigen Produzenten der Osmolyte identifiziert wurden.

Die Biosynthese des kompatiblen Solut geht aus dem Aminosäurestoffwechsel mit der Umsetzung von L-Aspartat zu L-Aspartatylphosphat hervor. Diese Reaktion unterliegt einer Rückkopplungshemmung durch L-Threonin (L-Thr) und L-Lysin (L-Lys) oder nur durch L-Threonin. Die Biosynthese wird spezifisch für Ectoin, indem L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd durch EctB, EctA und EctC hin zum Endprodukt katalysiert wird. Bei Produzenten des Derivats erfolgt eine positions- und stereospezifische Hydroxylierung. Adenosintriphosphat (ATP); Adenosindiphosphat (ADP); Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH), Coenzym A (CoA), Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), zweiwertiges Eisen (Fe(II)).

L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd als Ausgangsmetabolit der Biosynthese stellt nicht nur ein Vorstufenmolekül von Ectoin, sondern auch ein zentrales Molekül im Aminosäurestoffwechsel und weiterer verschiedenster Stoffwechselwege dar (Lo *et al.*, 2009). Normalerweise erfolgt die Umsetzung von L-Aspartat mit Hilfe einer ATP-abhängigen Phosphorylierung über die Aspartatkinase LysC [EC 2.7.2.4] und einer anschließenden NADPH-abhängigen Reduktion über die L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd-Dehydrogenase Asd [EC 1.2.1.11] (Hermann *et al.*, 2020; Lo *et al.*, 2009). Diese beiden enzymatischen Reaktionen produzieren somit ein energetisch hochwertiges Produkt (**Abb. 1.5**). Um einer Überproduktion entgegenzuwirken, unterliegt LysC einer Rückkopplungshemmung durch L-Threonin und L-Lysin (Lo *et al.*, 2009). Einige wenige

Ectoin/ 5-Hydroxyectoin-Produzenten weisen eine spezialisierte Aspartatkinase Ask\_Ect auf, welche zwar unter ähnlichen kinetischen Parametern die gleiche Reaktion wie LysC katalysiert, aber nur durch L-Threonin inhibiert wird (Czech *et al.*, 2018a; Stöveken *et al.*, 2011). Diese Inhibierung erfolgte außerdem mit einer geringeren Effektivität und konnte *in vitro* mit 650 mM KCl vollständig aufgehoben werden (Stöveken *et al.*, 2011).

Die Abzweigung des metabolischen Flusses vom Aminosäurestoffwechsel hin zum Cytoprotektor erfolgt durch das Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängige (PLP) und das K<sup>+</sup>-benötigende Enzym EctB und wurde erstmal in *Halomonas elongata* beschrieben (Czech *et al.*, 2018a; Oliveira *et al.*, 2011; Ono *et al.*, 1999). Die Transaminase überträgt die Aminogruppe von L-Glutamat als Co-Substrat auf die Aldehydgruppe des Substrats L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd, sodass unter der Freisetzung von 2-Oxoglutarat, L-2,4-Diaminobutyrat (DABA) entsteht (Hillier *et al.*, 2020). Dieser Schritt stellt dabei die Geschwindigkeitslimitierung der Reaktionskaskade dar (Hillier *et al.*, 2020; Gießelmann *et al.*, 2019).

Die weitere Umsetzung hin zu *N*- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobutyrat (*N*- $\gamma$ -ADABA) wird durch die Acetyl-CoA-abhängige Acetyltransferase EctA katalysiert (Czech *et al.*, 2018a). EctA ist als Homodimer aufgebaut, weist eine sehr hohe Regiospezifität auf und kann die Reaktion nur in eine Richtung hin ablaufen lassen (Hermann *et al.*, 2020; Richter *et al.*, 2020).

Während die Reaktionen, die durch EctA und EctB katalysiert werden, in manchen Organismen auch durch andere Enzyme erfolgen können, ist die Reaktion von *N*- $\gamma$ -ADABA hin zu Ectoin spezifisch für die Ectoin-Synthase EctC (Hermann *et al.*, 2020; Czech *et al.*, 2018a). Aus diesem Grund dient das *ectC* Gen zur eindeutigen Identifizierung eines Ectoin-produzierenden Stammes (León *et al.*, 2018; Widderich *et al.*, 2014b, 2014a). Das Fe<sup>2+</sup>-abhängige Enzym gehört zu den Carbon-Sauerstoff Hydrolyasen und katalysiert den Ringschluss durch einen nukleophilen Angriff des Carbonyl-Kohlenstoffs auf die  $\alpha$ -Aminogruppe unter Bildung einer intramolekularen Iminbindung und Ausschluss eines Wassermoleküls (Czech *et al.*, 2018a; Witt *et al.*, 2011). EctC gehört zu der Cupin-Superfamilie und bildet eine homodimere „Kopf-zu-Schwanz“-Konfiguration wobei jedes Dimer eine fassähnliche Struktur besitzt (Hermann *et al.*, 2020; Czech *et al.*, 2019; Widderich *et al.*, 2016). Innerhalb der fassähnlichen Struktur befindet sich das Fe<sup>2+</sup>-Ion, welches durch die Aminosäuren Glu-57, Tyr-84, und His-92 koordiniert wird (Hermann *et al.*, 2020).

Für die Umsetzung zum hydroxylierten Derivat wird die Fe<sup>2+</sup>-abhängige Ectoin-Hydroxylase EctD benötigt (Czech *et al.*, 2018a). Ebenso wie EctC gehört auch EctD zu der Cupin-Superfamilie und bildet durch antiparallele  $\beta$ -Faltblätter eine Sandwichstruktur aus (Hermann *et al.*, 2020; Höppner *et al.*, 2014). Die Ectoin-Hydroxylase katalysiert die stereo- und regiospezifische Hydroxylierung an Position 5 unter Umsetzung von molekularem

Sauerstoff und 2-Oxoglutarat hin zu Kohlenstoffdioxid und Succinat (Widderich *et al.*, 2014b). Evolutionär hoch konserviert ist eine 17 Aminosäure umfassende Sequenz, die für die Bindung von Eisen, dem Co-Substrat, sowie Ectoin verantwortlich ist: F-X-W-H-S-D-F-E-T-W-H-X-E-D-G-M/L-P (Hermann *et al.*, 2020; Höppner *et al.*, 2014). Diese Sequenz macht dieses Enzym einzigartig im Vergleich zu anderen nicht-Häm-bindenden-Fe(II)-abhängigen und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Mikroorganismen, die eine Ectoinhydroxylase aufwiesen, zeigten in Abhängigkeit des untersuchten Organismus sowie der Wachstumsphase unterschiedliche Verhältnisse der kompatiblen Solute Ectoin/5-Hydroxyectoin. *S. stutzeri* kann beide Tetrahydropyrimidine produzieren, allerdings wird nahezu ausschließlich 5-Hydroxyectoin hergestellt (Seip *et al.*, 2011; Stöveken *et al.*, 2011). In *Virgibacillus halodentrificans* und *S. stutzeri* konnte außerdem gezeigt werden, dass die Produktion des hydroxylierten Derivats erst in der stationären Wachstumsphase hochreguliert wurde (Ma *et al.*, 2017; Seip *et al.*, 2011). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass dieser Metabolit neben einer Osmostress-Antwort auch typische Stressfaktoren der stationären Wachstumsphase reduzieren kann (Czech *et al.*, 2018a; Klauck *et al.*, 2007; Hengge-Aronis, 1996). Um hier weitere Einblicke in die physiologischen Folgen der Osmolytverhältnisse zu bekommen, wurden verschiedene Mischverhältnisse extrazellulär zu Kulturen von *Streptomyces coelicolor* gegeben. Hierbei zeigte sich ein 1:1 Verhältnis von Ectoin zu 5-Hydroxyectoin am effektivsten als Osmoprotektion (Bursy *et al.*, 2008).

Insgesamt ist die Produktion dieser kompatiblen Solute energetisch sehr aufwendig. Ein einzelnes Molekül Ectoin benötigt die Energie von 40 ATP-Äquivalenten, wenn es in einem aerob, heterotroph kultivierten Organismus mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle sowie Ammonium als Stickstoffquelle produziert wird (Oren, 1999), weshalb die Produktion von Ectoin unter strikter Regulation steht. Die bakterielle Produktion dieser Osmolyte wird als Stressantwort auf einen plötzlich auftretenden hohen Salzgehalt initiiert (Czech *et al.*, 2018b). Für *Halobacillus halophilus* ist gezeigt, dass es zunächst L-Glutamat, dann L-Prolin nutzt, bevor es in der stationären Wachstumsphase zu Ectoin als kompatibles Solut wechselt (Saum and Müller, 2007, 2008). Ähnliche Osmolyt-Regime sind auch bei anderen Bakterien zu vermuten. Unter plötzlich auftretenden hypoosmotischen Bedingungen wird dieses kostbare Solut hingegen an die Umgebung abgegeben. Im Vergleich zu Trehalose mit 79 ATP-Äquivalenten unter gleichen Bedingungen benötigt die Ectoinsynthese allerdings immer noch weniger Energie (Oren, 1999).

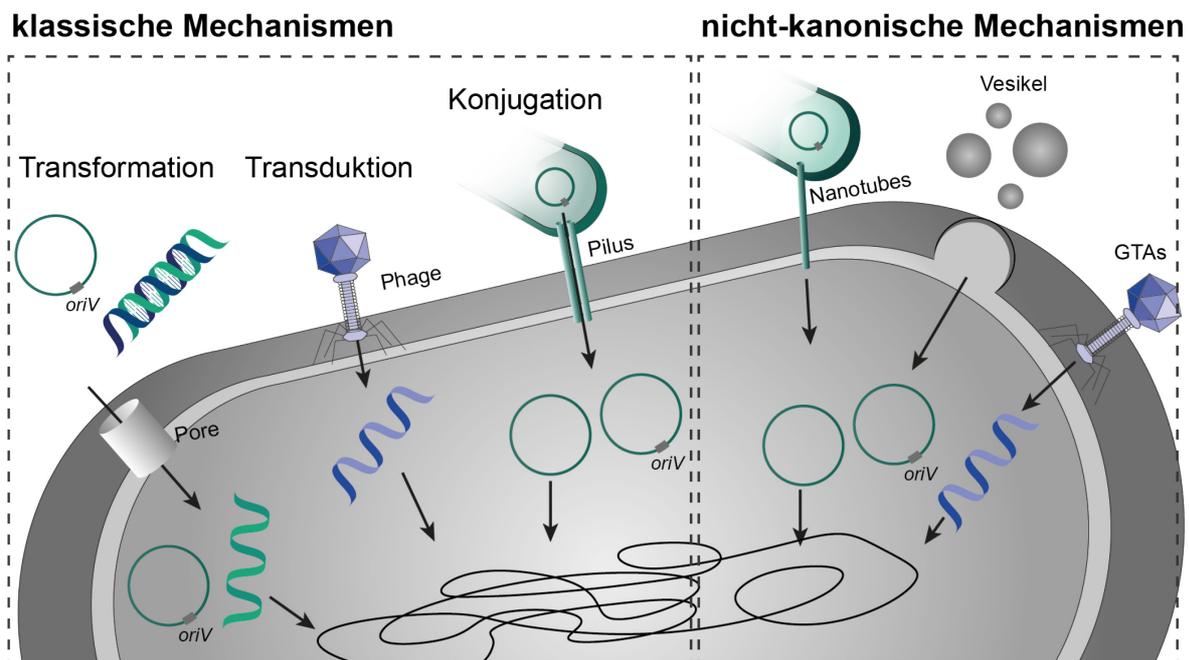
Wegen seiner vielversprechenden Eigenschaften könnten Ectoin und 5-Hydroxyectoin in besonderem Fokus stehen, wenn es um die biotechnologische Anwendung von Mikroorganismen unter herausfordernden Bedingungen geht.

### 1.3 Genetische Werkzeuge zur Optimierung von mikrobiellen Produzenten

Das Schlüsselement für das gerichtete (*metabolic*) *engineering* von Mikroorganismen ist ein Satz an gentechnischen Werkzeugen und Techniken, um einen mikrobiellen Wirt biotechnologisch Nutzen und den Fluss der Metabolite innerhalb vorhandener Stoffwechselwege zu optimieren oder zu neuen Produkten hin umlenken zu können. Das beinhaltet (i) verschiedene Techniken zur Übertragung und Etablierung von Fremd-DNA in den gewünschten Mikroorganismus, (ii) geeignete Vektoren, die als *shuttle* zum DNA-Transfer eingesetzt werden können sowie (iii) die Verarbeitung der auf der DNA enthaltenen Informationen. Die externe DNA kann Elemente enthalten, die einem Mikroorganismus helfen kann eine neue ökologische Nische zu besiedeln oder sich in einem kompetitiven Umfeld erfolgreich durchzusetzen (Brito, 2021).

Die Weitergabe von genetischem Material kann entweder innerhalb einer Spezies über den vertikalen Gentransfer oder zwischen verschiedenen Spezies per horizontalem Gentransfer (HGT) erfolgen (Smets & Barkay, 2005). Der HGT stellt evolutiv einen wichtigen Faktor dar, da er einem Empfängerorganismus eine schnelle Anpassung an neue äußere Bedingungen ermöglicht (Brito, 2021; Smets & Barkay, 2005).

Für die natürliche Aufnahme von Fremd-DNA gibt es drei klassische Mechanismen (Transformation, Transduktion und Konjugation) sowie weitere Mechanismen, die derzeit diskutiert werden, die sogenannten „nicht-kanonischen“ Mechanismen (Arnold *et al.*, 2022). Zu diesen gehören die Aufnahmen von Fremd-DNA über Membranvesikel, Nanotubes (kleine Pilus-ähnliche Strukturen) und der Phagen-ähnliche Gentransfer (GTA, engl.: *Phage-like gene transfer agent*) (Arnold *et al.*, 2022; Brito, 2021) (**Abb. 1.6**).



**Abb. 1.6: Mechanismen zur Aufnahme von Fremd-DNA in eine Bakterienzelle.**

Die klassischen Mechanismen zur Aufnahme von DNA sind Transformation, Transduktion und Konjugation. Bei der Transformation wird doppelsträngige DNA (dsDNA; grün, blau) aufgenommen und als einzelsträngige DNA (ssDNA; grün) im Cytosol der Zelle freigesetzt. Bei der Transformation im molekularbiologischen Sinn werden unverpackte Plasmide über die permeable Membran kompetenter Bakterien in die Zelle eingebracht. Bei der Transduktion wird Phagen DNA (lila) in die Zelle eingebracht. Bei der Konjugation werden Plasmide mit Hilfe eines Protein-haltigen Pilus von einem Donorbakterium (grün) in einen Rezipienten (grau) eingebracht. Nicht-kanonische Mechanismen beinhalten das Einbringen von DNA über Nanotubes, Vesikel oder Phagen-ähnlichen Gentransfer (GTAs). Einmal in der Zelle können Plasmide mit einem replizierbaren *oriV* als extrachromosomale DNA zur Verfügung stehen. Wenn dieses nicht repliziert werden kann oder als ssDNA vorliegt, kann die DNA ins Chromosom integriert oder abgebaut werden.

Freie Fremd-DNA als Substrat bei der Transformation kann beispielsweise von lysierten Zellen stammen. Damit die Fremd-DNA aufgenommen werden kann, muss der Empfängerorganismus kompetent sein und über DNA-Aufnahme-Mechanismen verfügen. Eine natürliche Kompetenz kann durch viele verschiedene Faktoren, wie sich ändernde Wuchsbedingungen, Nährstoffbeschaffenheit, die Zelldichte und damit verbundenem Quorum sensing oder einem Nährstoffmangel, beeinflusst werden (Thomas & Nielsen, 2005). Allerdings sind nicht alle Organismen über die natürliche Kompetenz unter Laborbedingungen transformierbar. Es konnte gezeigt werden, dass nur eine geringe Anzahl von ungefähr 80 Spezies über natürliche Kompetenz transformierbar sind (Arnold *et al.*, 2022; Johnston *et al.*, 2014).

In der molekularen Biologie werden deshalb gezielte Methoden, wie die Elektroporation oder hohe Konzentrationen zweiwertiger Ionen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Rb}^{2+}$  verwendet, um die Permeabilität der Zellmembran für DNA zu erhöhen (Tu *et al.*, 2016; Chen & Dubnau, 2004; Hanahan, 1983).

Die Transduktion stellt die Übertragung von DNA durch Phagen dar. Diese infizieren die Zelle durch das Einbringen ihrer DNA, wo sie repliziert wird, um neue Phagen zu produzieren (Chiang *et al.*, 2019). Somit ist das Fortbestehen von Phagen abhängig von der Wirtszelle. Bei der generalisierten Transduktion wird hingegen bakterielle DNA über Phagen in eine andere Bakterienzelle übertragen. Hierbei führen in der Natur auftretende „Fehler“ im lytischen Zyklus dazu, dass auch zufällige Teile der Wirts-DNA zusammen mit der Phagen-DNA in die Bakteriophagen verpackt wird (Chiang *et al.*, 2019). Dieser Prozess kann in der Gentechnologie dazu genutzt werden, um Phagenpartikel gezielt mit bakterieller DNA zu beladen und diese so in einen Rezipienten zu übertragen (Ibarra-Chávez *et al.*, 2021).

Bei der Konjugation handelt es sich um eine weit verbreitete Art des Austauschs an genetischen Informationen zwischen Bakterien gleicher und unterschiedlicher Spezies. Die Übertragung der genetischen Informationen erfolgt hierbei über einen unidirektionalen direkten Zell-Zell-Kontakt (Virolle *et al.*, 2020; Lederberg & Tatum, 1946).

Um die Konjugation initiieren zu können, muss der Donorstamm die Transfergene, welche zu einem Cluster in der *tra*-Region angeordnet sind, exprimieren (Ippen-Ihler *et al.*, 1972). Sie beinhaltet alle nötigen Informationen, die innerhalb des Donorstammes vor dem

Transfer notwendig sind, sowie die Proteinfaktoren zur Ausbildung des konjugativen Pilus (Bradley, 1982, 1983; Ippen-Ihler *et al.*, 1972).

Voraussetzung für die Übertragbarkeit eines DNA-Moleküls per Konjugation ist eine Sequenz, genannt *origin of Transfer (oriT)*. Hier wird die DNA Positions- und Strang-spezifisch aufgeschnitten (Silverman & Clarke, 2010; Willetts & Skurray, 1980). Anschließend wird einzelsträngige DNA (ssDNA), in diesem Fall auch als T-Strang bezeichnet, extrudiert und transferiert (Virolle *et al.*, 2020; Willetts & Skurray, 1980). Der leitende Strang verbleibt in der Donorzelle und wird repliziert. Der T-Strang wird im Rezipienten zunächst durch Einzelstrang-bindende Proteine (SSB; engl.: *single strand binding*) unspezifisch gebunden und so vor dem enzymatischen Abbau geschützt und anschließend zu doppelsträngiger DNA (dsDNA) vervollständigt. Für die gentechnische Anwendung der Konjugation sind geeignete Selektionsmethoden wichtig.

### 1.3.1 Plasmide als Vektoren für die bakterielle Biotechnologie

In der Biotechnologie wird für gewöhnlich Plasmid-DNA eingesetzt, um den Organismus zu modifizieren. Plasmide sind extrachromosomale, autonom replizierende und zirkuläre dsDNA-Moleküle. Auf dem Plasmidrückgrat sind alle Informationen enthalten, die sowohl für den weiteren vertikalen als auch ggf. für den horizontalen Gentransfer benötigt werden. Mit Hilfe von Plasmiden können beliebige Gene effizient in einen heterologen Wirt eingebracht werden. Ob ein Plasmid als extrachromosomales DNA-Element vom Wirtsbakterium repliziert werden kann, hängt in erster Linie von den Mechanismen des entsprechenden Replikons ab. Das Replikon beeinflusst die folgenden Eigenschaften eines Plasmids: (i) die Anzahl der Kopien pro Zellen (PCN; engl.: *plasmid copy number*); (ii) die Wirtsspezifität; (iii) Reaktionen auf verschiedene Umwelteinflüsse (Espinosa *et al.*, 2001). Im Replikon, bestehend aus einem Replikationsursprung (*oriV*; engl.: *origin of replication*; V steht für vegetativ(en) Gentransfer) und den *cop/inc* Genen, liegen alle notwendigen Informationen zur Plasmidreplikation vor. Die *cop/inc* Gene kodieren für Rep Proteine und dienen der Initiierung der Replikation (Lloyd & Thomas, 2023; Espinosa *et al.*, 2001). Die Replikationsfähigkeit eines Plasmids in einem bestimmten Wirt ist maßgeblich für den vertikalen Gentransfer, also die stabile Weitergabe des Vektors in der Bakterienpopulation. Die Replikationsmechanismen können in zwei Kategorien unterteilt werden, der *rolling-circle*- und Theta-Typ-Replikation (Lloyd & Thomas, 2023; Espinosa *et al.*, 2001). Die *rolling-circle*-Replikation ist, wie oben beschrieben, für die Konjugation essenziell und spielt unter anderem bei der Vervielfältigung von kleinen Plasmiden in Gram-negativen Bakterien eine Rolle.

Die Theta-Replikation kann darüber hinaus in weitere Subtypen (Theta-Typ A, B, C, D und Strang-Verdrängung) unterteilt werden, wobei eine uni- oder bidirektionale Vervielfältigung erfolgt (Lilly & Camps, 2015; Espinosa *et al.*, 2001; del Solar *et al.*, 1998). Typische

Plasmide für verschiedene Anwendungen in Pseudomonaden replizieren häufig nach Typ A, B oder der Strang-Verdrängung (**Tab. 1.1**).

**Tab. 1.1: Zuordnung verschiedener Replikationsursprünge nach ihren Mechanismen der DNA-Vervielfältigung sowie ihrer Kompatibilität.**

Plasmid-gruppe	Theta-Typ	<i>oriV</i>	Plasmid-initiations-faktor(en)	Wirts-faktor(en)	Kopien-zahl	BHR	Referenz
IncP	A	RK2	Rep (TrfA)	DnaA Replisom	niedrig*,#	ja	(Jahn <i>et al.</i> , 2016; Lilly & Camps, 2015; Arpino <i>et al.</i> , 2013; Jain & Srivastava, 2013)
pBBR1	A	pBBR1	Rep	DnaA Replisom	niedrig* / niedrig mittel#	ja –	(Cook <i>et al.</i> , 2018; Jahn <i>et al.</i> , 2016; Jain & Srivastava, 2013; Antoine & Loch, 1992)
pRO1600	A	RO1600	Rep	DnaA Replisom	n.b.#	ja	(Jahn <i>et al.</i> , 2016; Jansons <i>et al.</i> , 1994; Antoine & Loch, 1992)
R6K	A	R6K	-	DnaA Replisom, Rep ( $\pi$ -Protein)	niedrig*	nein	(Lilly & Camps, 2015; Arpino <i>et al.</i> , 2013)
ColE1	B	ColE1	-	RNAP, DNA Pol I, RNase H, PriA Replisom	mittel* hoch*	nein	(Jahn <i>et al.</i> , 2016; Lilly & Camps, 2015; Arpino <i>et al.</i> , 2013)
	B	pUC	-		hoch*	nein	(Jahn <i>et al.</i> , 2016; Lilly & Camps, 2015)
	B	pBR322 / pMB1	-		mittel*	nein	(Lilly & Camps, 2015; Arpino <i>et al.</i> , 2013)
ColE2	C	ColE2	Rep	Replisom	mittel*	nein	(Lilly & Camps, 2015; Arpino <i>et al.</i> , 2013; Espinosa <i>et al.</i> , 2001)
IncQ	Strang-Verdrängung	RSF1010	RepA, RepB, RepC	Replisom	niedrig*/hoch#	Ja	(Cook <i>et al.</i> , 2018; Jahn <i>et al.</i> , 2016; Arpino <i>et al.</i> , 2013)

Replikationsursprünge sind nach ihrer jeweiligen Plasmidgruppe und dem Replikationsmechanismus aufgeteilt. *oriVs* in gleicher Farbe sind zueinander inkompatibel. Zudem sind die Kopienzahlen sowie die Wirtsspezifitäten (BHR, engl.: *broad host range*) der jeweiligen *oriVs* angegeben. Die Kopienzahl der Plasmide kann stark durch den untersuchten Wirt variieren: \**E. coli*, #*P. putida*

Die Initiation der Replikation erfolgt, mit Ausnahme von Typ B, in allen Typen gleich (Lilly & Camps, 2015). Zunächst binden das oder die plasmidkodierte(n) Rep-Protein(e) an eine Erkennungssequenz, genannt Iteron, im *oriV* bestehend (Lilly & Camps, 2015; Espinosa *et al.*, 2001). Daraufhin wird das Primosom gebildet und die DNA repliziert (Jahn *et al.*, 2016; Lilly & Camps, 2015; Jain & Srivastava, 2013).

Zugehörig zur Typ A Replikation ist R6K, welcher allerdings eine Ausnahme bildet, weil hier der *ori*  $\gamma$  sowie das Rep-protein  $\pi$ , welches durch das heterologe, chromosomale *pir* Gen kodiert wird, benötigt wird (Lilly & Camps, 2015; Rakowski & Filutowicz, 2013). Folglich wird ein *pir* positiver Wirtsorganismus zur Replikation solcher Plasmide benötigt (Rakowski & Filutowicz, 2013).

Sollen in einem Organismus verschiedene Zielgene exprimiert werden, so müssen häufig mehrere Plasmide verwendet werden. Dabei kann es zu Inkompatibilitätsproblemen kommen, wenn Plasmide mit gleicher Replikationsmaschinerie oder dem gleichen Rep

Protein verwendet werden (**Tab. 1.1**) (Lloyd & Thomas, 2023; Thomas & Summers, 2020; del Solar et al., 1998). Bei Plasmiden mit den gleichen Erkennungssequenzen kann dies zu einer ungleichen Verteilung oder sogar zum Verlust eines Plasmid-Typs führen (Lloyd & Thomas, 2023)

Somit scheint die Nutzung und Vervielfältigung eines Plasmids eine Vielschichtige Herausforderung für den Wirtsorganismus zu sein. Darüber hinaus ist die präzise Kontrolle der Genexpression und damit die temporäre Verfügbarkeit von Proteinen ein wichtiger Faktor. Hierdurch liegt ein besonderes Augenmerk auf der Verwendung gut transferierbarer und regulierbarer Systeme zur heterologen Genexpression.

### 1.3.2 Werkzeuge für die heterologe Genexpression in *Pseudomonadaceae*

Zur Verarbeitung und Expression von Zielgenen und deren Regulation gibt es eine Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse. Die Faktoren zur Regulation der Genexpression sind zum einen der Promotor, die Ribosombindestelle (RBS), transkriptionelle Regulatoren, sowie die PCN (Martin-Pascual *et al.*, 2021; Freed *et al.*, 2018). Mit Hilfe dieser Regulationsstellen kann eine genaue und reproduzierbare heterologe Genexpression etabliert werden. Die meisten natürlichen konstitutiven Promotoren werden von dem  $\sigma^{70}$ -Faktor erkannt und bestehen aus zwei funktionellen Elementen, die 35 und 10 Basenpaare (bp) vor dem Transkriptionsstart liegen (Martin-Pascual *et al.*, 2021; Paget, 2015) und als Erkennungsmotiv der  $\sigma^{70}$ -abhängigen RNA-Polymerase dienen. Es konnte gezeigt werden, dass viele der  $\sigma^{70}$ -Promotoren aus *E. coli* auch in *P. putida* funktionell waren, was auf eine hochkonservierte Region zur Erkennung der -35 und -10 Region innerhalb der Polymerasen hindeutet (Elmore *et al.*, 2017; Zobel *et al.*, 2015). Die Promotorstärke kann aufgrund von unterschiedlichen Nukleotidsequenzen variieren, wodurch Bibliotheken mit unterschiedlich starken synthetischen Promotoren erzeugt wurden (Köbbing *et al.*, 2020; Elmore *et al.*, 2017; Zobel *et al.*, 2015).

Im Gegensatz zu den konstitutiven Promotoren können regulierbare Promotoren dazu eingesetzt werden, um die Transkription einzelner Gene oder ganzer Biosynthesewege als Antwort auf einen externen Stimulus zu steuern (Martin-Pascual *et al.*, 2021). So kann beispielsweise die Anwesenheit bestimmter chemischer Substanzen, Verfügbarkeit von Nährstoffen, eine Änderung der Sauerstoffverfügbarkeit, des pH-Wertes, der Temperatur oder Quorum sensing als Stimulus für die Kontrolle der heterologen Genexpression dienen (Browning & Busby, 2016; Ponomarova & Patil, 2015; Görke & Stülke, 2008; Beales, 2004; Miller & Bassler, 2001). Natürlich vorkommende, Stimuli regulierte Genexpression ermöglicht Bakterien eine schnelle und gezielte Anpassung an sich ändernde Bedingungen. Hierbei wird der regulative Effekt häufig durch Transkriptionsfaktor-Proteine realisiert, die nur bei bestimmten Bedingungen an die Ziel-DNA-Sequenz binden. Basierend auf den

Bindeeigenschaften wird dabei zwischen transkriptionellen Aktivatoren oder Repressoren unterschieden.

In der Biotechnologie können diese natürlichen Regulationssysteme genutzt werden, um die Expression von Zielgenen zu steuern. Ein für diese Anwendung als Repressor-basiertes verwendetes System stellt beispielsweise das *lac*-Operon dar (Jacob & Monod, 1961), das natürlicherweise in *E. coli* über den Repressor LacI die Expression der Gene *lacZ*, *lacY* und *lacA* reguliert (Lewis, 2005; Busby & Ebricht, 1999). Mit Hilfe natürlicher Induktoren, wie Allolaktose, Laktose-Intermediate, Galaktose oder synthetischer Induktoren, wie Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), konnte eine graduell ansteigende Expressionsstärke erreicht werden (Binder *et al.*, 2014, 2016; Lee *et al.*, 2011). Da bei einem solchem System stets eine ausreichende Anzahl an Repressorproteinen gebildet werden muss, um alle Zielpromotoren auf Plasmiden mit hoher Kopienzahl in Abwesenheit des Induktors zu reprimieren, zeigen diese Systeme oftmals eine hohe Basalexpression (Martin-Pascual *et al.*, 2021; Terpe, 2006). Umgekehrt kann der *lac*-Promotor ohne das entsprechende Repressorgen *lacI* zur konstitutiven Expression eines Zielgens eingesetzt werden. Da das LacI/*P<sub>lac</sub>*-System zunächst eine eher geringe Promotorstärke in *E. coli* aufwies und dadurch weniger zur Überexpression von Genen geeignet war, wurden im Laufe der Zeit zahlreiche verbesserte artifizielle Promotoren entwickelt, die der *lac*-Promotor-Familie zugehörig sind. Dazu zählen beispielsweise *P<sub>tac</sub>*, oder LacI<sup>q</sup>/*P<sub>lacUV5</sub>* (Siebenlist, 1980; Rosenberg & Court, 1979; Calos, 1978; Wanner *et al.*, 1977; Gronenborn, 1976; Polisky *et al.*, 1976). Grundsätzlich konnte dieses System zur regulierten heterologen Genexpression in den verschiedensten Wirten wie beispielsweise *P. putida*, *P. taiwanensis* oder auch *C. glutamicum*, *B. subtilis* und *Rhodobacter capsulatus* erfolgreich angewendet werden (Hilgers *et al.*, 2022; Hogenkamp *et al.*, 2021; Rytter *et al.*, 2014). Neben LacI/*P<sub>tac</sub>* stellt TetR/*P<sub>tetA</sub>* ein weiteres Promotorsystem aus *E. coli* dar, welches auf Basis eines Repressors funktioniert. Als Induktor dienen hier Tetracyclin bzw. Anhydrotetracyclin. (**Tab. 1.2**).

Tab. 1.2: Eine Auswahl induzierbarer Promotorsysteme und ihre Anwendungen in *E. coli* und *P. putida*.

Promotor-system	Regulation	Wirt	Induktor	Induktorkonzentration [mM]	Referenz
LacI <sup>q</sup> / <i>P<sub>lac</sub></i> , <i>P<sub>tac</sub></i> , <i>P<sub>trc</sub></i> *	-	<i>P. putida</i>	IPTG	0-10	(Martin-Pascual <i>et al.</i> , 2021; Calero <i>et al.</i> , 2016; Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981)
		<i>E. coli</i>	IPTG	0 – 0,05	(Binder <i>et al.</i> , 2014; Lee <i>et al.</i> , 2011)
AraC/ <i>P<sub>BAD</sub></i> *	+	<i>P. putida</i>	L-Ara	0 - 133	(Calero <i>et al.</i> , 2016)
		<i>E. coli</i>	L-Ara	0 - 0,133	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
NagR/ <i>P<sub>nagAa</sub></i> <sup>†</sup>	+	<i>P. putida</i>	Salicylsäure	0 - 5	(Weihmann <i>et al.</i> , 2023; Martin-Pascual <i>et al.</i> ,

Promotor-system	Regulation	Wirt	Induktor	Induktorkonzentration [mM]	Referenz
		<i>E. coli</i>	Salicylsäure	0 – 2,5	2021; Hüsken <i>et al.</i> , 2001) (Mitchell & Gu, 2005)
XylS/P <sub>m</sub> <sup>#</sup>	+	<i>P. putida</i>	3-MB	0,01 - 0,1	(Martin-Pascual <i>et al.</i> , 2021; Calero <i>et al.</i> , 2016)

Repressor-basiert (-); Aktivator-basiert (+); Es ist lediglich der Induktor, der zur Bestimmung der Induktorkonzentration genutzt wurde, gelistet. 3-Methylbenzoat (3-MB); L-Arabinose (L-Ara); \*nativ aus *E. coli*, #nativ aus *P. putida*; †nativ aus *Comamonas testosteroni*

Bei den Transkriptionsaktivatoren führt die Bindung des Induktors zur Bindung des Transkriptionsfaktors an die Ziel-DNA und ermöglicht so die Regulation der Genexpression. Ein solches Aktivator-basiertes System stellt beispielsweise das *araBAD* Operon aus *E. coli* dar, welches für die Enzyme zur Metabolisierung von Arabinose kodiert (Calero *et al.*, 2016; Guzman *et al.*, 1995). In Abwesenheit des Induktors dimerisiert das Aktivatorprotein AraC und bindet an zwei Positionen die DNA, wodurch eine sterische Hinderung vorliegt und die RNA-Polymerase nicht binden kann (Schleif, 2010). Wenn L-Arabinose an AraC bindet, löst sich eine der beiden Bindestellen zur DNA, wodurch sich die sterische Hinderung löst und das Enzym AraC an die Operatoren binden kann, was eine Aktivierung des P<sub>BAD</sub> bedingt (Schleif, 2010; Brautaset *et al.*, 2009). Bei der positiven Regulation der Genexpression führt ein Ungleichgewicht des Regulator/ Zielpromotor-Verhältnisses jedoch nicht zu einer erhöhten Basalexpression, sondern lediglich zu einer Verminderung der Induktion der Zielgenexpression (Martin-Pascual *et al.*, 2021). Das AraC/P<sub>BAD</sub> System wird ebenfalls in biotechnologischen Anwendungen genutzt (Marschall *et al.*, 2017; Rosano & Ceccarelli, 2014; Balzer *et al.*, 2013; Brautaset *et al.*, 2009; Terpe, 2006). Es konnte neben *E. coli* bereits in verschiedenen Wirten, wie Pseudomonaden, *C. glutamicum* oder *Glucanobacter oxydans* angewendet werden (Fricke *et al.*, 2020; Thompson *et al.*, 2019; Calero *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012). Weitere Aktivator-basierte Systeme stellen das NagR/P<sub>nagaA</sub> aus *Comamonas testosteroni* oder auch das Xyls/P<sub>m</sub> System aus *P. putida* dar. Beide werden durch die Zugabe bestimmter Aromaten aktiviert. NagR bindet Salicylsäure, 2-Nitrobenzoat oder 3-Methyl-Salicylat (Mitchell & Gu, 2005; Jones *et al.*, 2003). Das Xyls/P<sub>m</sub> System kann dagegen durch Zugabe von 3-Methylbenzoat und mit geringerer Affinität auch mit Acetylsalicylsäure oder Salicylsäure induziert werden (Gawin *et al.*, 2017; Balzer *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 1986). Beide Systeme zeichnen sich durch hohe Expressionsraten in der exponentiellen Wachstumsphase aus und konnten bereits zu heterologen Genexpression in Pseudomonaden angewendet werden (Martin-Pascual *et al.*, 2021).

Bei der Betrachtung verschiedener Promotor/Expressionssysteme wird in der Anwendung deutlich, dass sich die Basalexpression und die Expressionsstärke innerhalb verschiedener

Spezies unterscheiden können (**Tab. 1.2**). Weitere Faktoren können Unterschiede in der Erkennung der heterologen Promotoren durch den wirtseigenen Transkriptionsapparat, der effektiven Expression von heterologen Transkriptionsfaktoren, Aufnahme bzw. Export, Toxizität (insbesondere bei aromatischen Molekülen) und Metabolisierung von Induktormolekülen sein (Hanko *et al.*, 2017; Calero *et al.*, 2016; Schleif, 2010; Price *et al.*, 2000; Guzman *et al.*, 1995). Neben der Expressionsstärke spielt auch die Basalexpression eines Promotors in einem bestimmten System eine wichtige Rolle, welche bei einem nicht induzierten System möglichst gering sein sollte. Beeinflusst werden kann ein solches Systems auch durch das Wachstumsmedium, allgemeine genetische Expression des Wirtsorganismus oder beispielsweise der Wachstumsphase (Martin-Pascual *et al.*, 2021). Die Evaluierung verschiedener Promotoren eignet sich, um verschiedene Produktionsraten von Zielproteinen zu erzielen oder wenn in einem Organismus verschiedene Zielgene zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden sollen (Gießelmann *et al.*, 2019; Ankenbruck *et al.*, 2018). Somit ist es sinnvoll, eine Kollektion verschiedener Promotoren und Plasmide zur (heterologen) Genexpression für einen neuen Wirt mit unterschiedlichen geeigneten Systemen und Induktoren zu evaluieren.

### **1.3.3 Ausgewählte Werkzeuge zur Genommodifikationen**

Um den Einfluss der PCN zu umgehen und damit eine höhere Reproduzierbarkeit der Produktmengen und die benötigten Energie für die Replikation der Plasmide zu reduzieren, ist die genomische Integration der Ziel-DNA von großem Interesse (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2019; Jahn *et al.*, 2016). Zum anderen können Zielgene in das Genom integriert werden, um beispielsweise mit Hilfe nativer Promotoren exprimiert zu werden (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Domröse *et al.*, 2015). Ebenso kann die Deletion von wirtseigenen Genen eine wichtige Rolle einnehmen. Hierdurch können Funktionen eliminiert werden, die für die biotechnologische Anwendung störend oder nicht direkt relevant sind, aber viel Energie benötigen, wie beispielsweise der Fortbewegungsapparat (Wynands *et al.*, 2019).

Um das Genom zu modifizieren, können Transposons verwendet werden, deren DNA-Elemente zur Übertragung in den jeweiligen Wirt auf nicht replizierbaren Plasmiden lokalisiert sind (Virolle *et al.*, 2020; Gago-Córdoba *et al.*, 2019; Johnson & Grossman, 2015). Dabei werden Selektionsmarker und Zielgenen in das Transposon integriert, das heißt zwischen den beiden spezifischen flankierenden Bereichen, die durch die entsprechende Transposase erkannt werden. Die Transposase kann sich entweder auf dem gleichen Plasmid oder auf einem zweiten, sogenannten Helferplasmid befinden (Zobel *et al.*, 2015; Loeschcke *et al.*, 2013). Unterschieden werden kann dabei zwischen der randomisierten Transposition (z.B. durch das Transposon Tn5) und der ortsspezifischen Transposition (z.B. durch das Transposon Tn7). Da Transposons bereits seit geraumer Zeit sehr erfolgreich für das Einbringen von Fremdgenen in das Chromosom eingesetzt werden,

wurden die zugrundeliegenden Tn5- und Tn7-Transposon Vektoren stets weiterentwickelt (Martínez-García & Lorenzo, 2011). So wurde beispielsweise das yTREX-(Hefe (engl.: *yeast*) Transfer- und Expressions-) System entwickelt, welches die Integration von großen biosynthetischen Genclustern ermöglicht und einen modularen Aufbau, bestehend aus Selektionsmarkern, Promotor, Transkriptionsregulatoren, sowie den Zielgenen beinhaltet (Weihmann *et al.*, 2023; Loeschcke *et al.*, 2013). Die randomisierte Genintegration kann gleichzeitig eine funktionale Deletion von chromosomalen Genen bewirken. Darüber hinaus lassen sich mit Hilfe von Tn5-integrierten Barcode-ähnlichen DNA-Abschnitten Stammbibliotheken zur Untersuchung verschiedener essenzieller und nicht essenzieller Gene erzeugen (Hu *et al.*, 2022; Presley *et al.*, 2021; Remmele *et al.*, 2014). Eine randomisierte Integration dient allerdings weniger einer schnellen und unkomplizierten Erzeugung rekombinanter Produktionsstämme. Für solch eine Anwendung eignet sich die Tn7-Transposition (Weihmann *et al.*, 2023; Zobel *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2005). Hier erfolgt die Integration unidirektional zu dem Gen *glmS* in die *attTn7*-Seite, welche sich 27 bp vom Stopcodon des Gens entfernt, befindet (Mitra *et al.*, 2010; Peters & Craig, 2001). *GlmS* ist eine essenzielle Transaminase, die in der Biosynthese der Zellwand beteiligt ist und deshalb in Bakterien hochkonserviert vorliegt. *TnsD* erkennt, als Untereinheit der Tn7 Transposase, einen über Bakterienspezies hinweg konservierten Bereich der DNA innerhalb des Gens (DNA-Sequenz, die für PRNLAKSVTVE kodiert) und bindet daran, wodurch die Transposition initiiert wird (Mitra *et al.*, 2010; Peters & Craig, 2001). Um eine kalibrierte heterologe Genexpression in *P. putida* zu ermöglichen, wurde die pBG-Transposon-Serie entwickelt, die identische Tn7-Transposons mit einer Bibliothek an unterschiedlich starken synthetischen Promotoren darstellt (Zobel *et al.*, 2015). Neben der erwähnten Tn5 Variante des modularen yTREX-Systems wurde ein ebenfalls modulares System mit der Möglichkeit der Tn7-Transposition geschaffen (Weihmann *et al.*, 2023). Generell eignen sich die Transposon-basierten Systeme als universelle, schnelle und effiziente Werkzeuge zur genomischen Integration von Zielgenen. Gezielte Gendeletionen lassen sich damit allerdings nicht erzeugen.

Nicht im Wirt replizierende Plasmide eignen sich auch als Werkzeuge zur Übertragung sowie zur Deletion von Genen mittels homologer Rekombination oder Rekombinasen. Als Plasmidsysteme dienen sogenannte Suizidvektoren, beispielsweise pEMG und dessen Derivate pGNW und pSNW oder pK18mobSacB, die nur in *E. coli* und nahe verwandten Bakterien repliziert werden können (Martínez-García & Lorenzo, 2011; Schäfer *et al.*, 1994). Hiermit lassen sich anderen Wirtsorganismen, die diese Plasmide nicht replizieren können, in einem zwei-schrittigen Prozess sowohl Deletionen als auch Insertionen über homologe Rekombination erzeugen. Der Integrationsort kann dabei über die homologen DNA-Bereiche (ca. 500 – 800 bp) frei gewählt werden. Diese entsprechen der Sequenz, die

vor und hinter dem zu deletierenden Gen liegen werden innerhalb des Plasmids integriert. Im pEMG-Vektor sind diese Bereiche von zwei einzigartigen I-SceI Schnittstellen flankiert. So kann in einem ersten Schritt die homologe Rekombination mit einem der beiden homologen Bereiche erfolgen und es entsteht ein sogenannter *single-crossover*. Im zweiten Schritt wird das Helferplasmid pSW-1, welches das Gen für die I-SceI Endonuklease unter Kontrolle des XylS/P<sub>m</sub>-Systems trägt, in den Wirt eingebracht (Wirth et al., 2020; Martínez-García & Lorenzo, 2011). Durch die induzierte I-SceI Endonuklease-Produktion wird bei einem Stamm mit erfolgreichem *single-crossover* ein letaler Doppelstrangbruch des rekombinanten Chromosoms erzeugt. Auf diese Weise kann ein zweites homologes Rekombinationsereignis erzwungen werden, wodurch entweder wieder der Wildtyp oder aber ein rekombinanter Stamm mit einem *doppel-crossover* entstehen kann. Bei der Anwendung des Systems zur Insertion wird das gewünschte Gen zwischen die zum Insertionsort homologen Bereiche in das Plasmid eingebracht (Martin-Pascual et al., 2021; Wirth et al., 2020).

Die effektive Anwendung solcher Systeme konnte z. B. anhand von Genomreduktionsstudien mit *P. putida* gezeigt werden. Das größte hierbei deletierte Fragment betrug 69 kb und das Genom konnte durch mehrere Deletionen um 4,76 % reduziert werden (Volke et al., 2020; Martínez-García et al., 2014). pK18mobsacB beruht ebenfalls auf der homologen Rekombination und erzeugt auch einen *single-crossover*, benötigt allerdings kein zweites Plasmid zur Generierung des *double-crossovers* (Elmore et al., 2017). Stattdessen wird SacB aus *B. subtilis* zur Selektion auf das zweite Rekombinationsereignis verwendet. Dieses Enzym setzt Saccharose zu Levan um, was für Gram-negative Bakterien toxisch ist. Somit ist das Wachstum von Zellen auf Saccharose ein Indikator für den Verlust des Plasmids. Für *E. coli* reichten 5 % des Zuckers, wohingegen für *P. putida* wegen fehlender Aufnahmemechanismen 25 % notwendig sind (Bitzenhofer et al., 2021; Elmore et al., 2017).

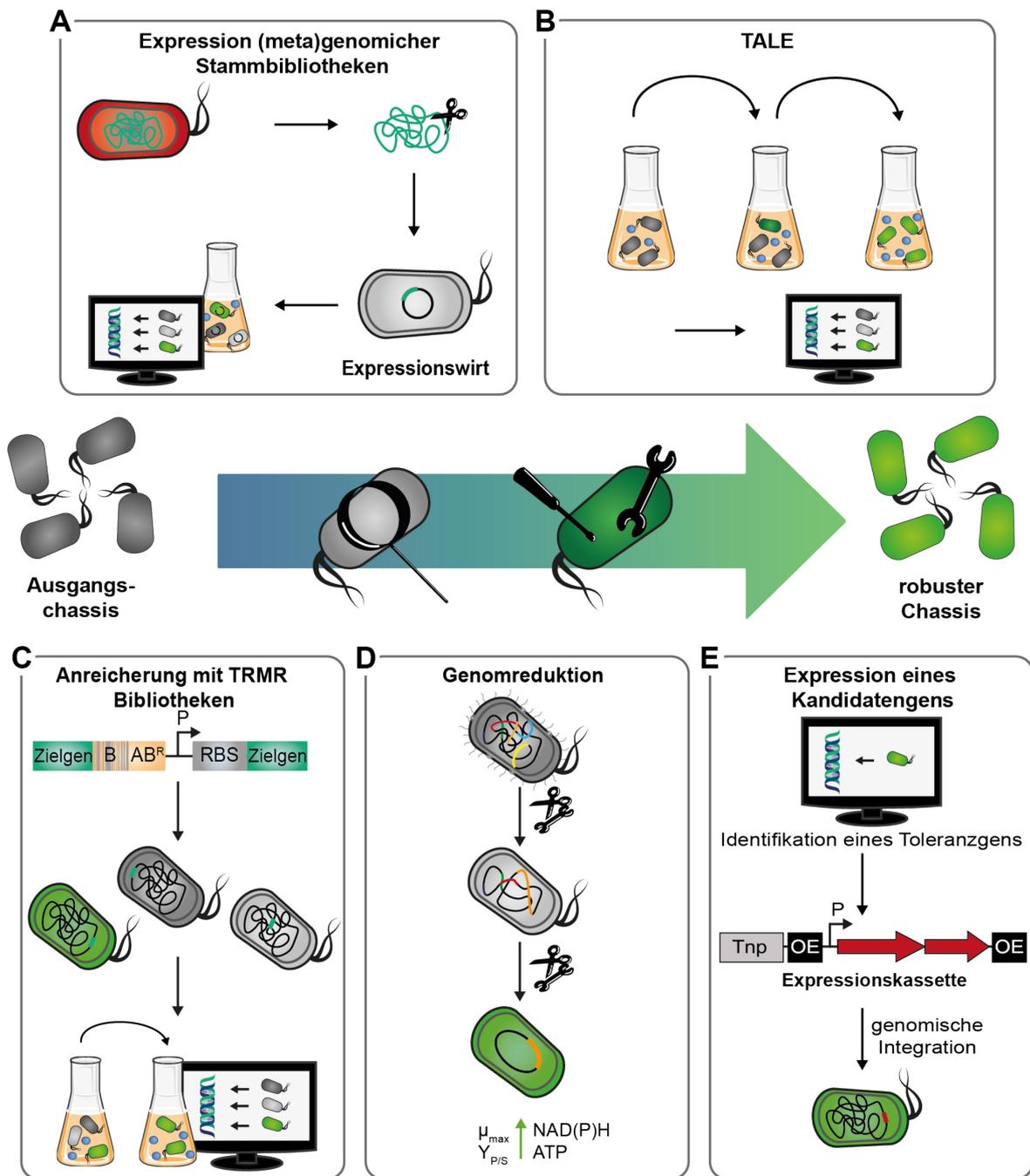
Das CRISPR-Cas9-System (engl.: *clustered regulatroy interspaced short palindromic repeats* (CRISPR); *CIRPSR associated* (Cas)) stellt eine weitere Möglichkeit zur Genommodifikation dar (Martin-Pascual et al., 2021; Schuster & Kahmann, 2019; Jaganathan et al., 2018; Altenbuchner, 2016). Hierbei werden lediglich die Endonuklease Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* und die sogenannte *small-guide* RNA (RNA) benötigt, was eine wirtsunabhängige Genommodifikation ermöglicht (Gisler et al., 2019; Jiang & Doudna, 2017). Die Cas9 Endonuklease kann dabei positionsspezifisch die DNA schneiden. Es bedarf lediglich einer 20 bp langen komplementären sgRNA, die an die Ziel-DNA bindet, sowie ein weiteres kurzes DNA-Fragment, die sogenannte PAM-Sequenz (engl.: *protospacer adjacent motive*) (Jiang & Doudna, 2017; Altenbuchner, 2016). Da an dieser Stelle analog zu den I-SceI-basierten Systemen meist ein letaler Doppelstrangbruch

entsteht, stellt das CRISPR-Cas9-System eine sehr effiziente Selektionsmöglichkeit für ein gewünschtes Mutations- oder Rekombinationsereignis dar (Martin-Pascual *et al.*, 2021; Wirth *et al.*, 2020).

CRISPR-Cas9-Systeme bieten neben der Erzeugung klassischer Deletionsmutanten auch die Möglichkeit der gezielten / vorübergehenden Stilllegung eines Gens durch Inaktivierung der Endonuklasenfunktion (Martin-Pascual *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2013). Hierbei bleibt die DNA-Bindung der dCas9 weiterhin möglich, wodurch die Transkription inhibiert oder gemindert wird. Dieses System heißt CRISPR*interference* (engl. Beeinträchtigung; CRISPRi) (Qi *et al.*, 2013). Eine induzierbare dCas9 vermeidet die Erzeugung von Deletionsmutanten und ermöglicht die Adressierung essenzieller Gene (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2019; Altenbuchner, 2016; Qi *et al.*, 2013).

#### **1.4 Anwendung genetischer Werkzeuge zur Entwicklung robuster Organismen**

Die oben aufgeführten Werkzeuge und Methoden können in der Stammentwicklung nicht nur eingesetzt werden, um Zielgene im Hinblick auf die Biosynthese bestimmter Produkte einzubringen oder gezielt auszuschalten, sondern auch um Eigenschaften, wie beispielsweise Stresstoleranzen zu adressieren (**Abb. 1.7**).



**Abb. 1.7: Modifikationen von Pseudomonaden mit verbesserter Stresstoleranz.**

Gezeigt sind fünf Ansätze zur Erzeugung eines robusten Chassis Stammes (grüne Zellen) mit Toleranz gegenüber chemischem Stress (blaue Kugeln). **A:** (Meta)genomische Bibliotheken von Stämmen, die beispielsweise aus herausfordernden natürlichen Habitaten stammen, sind vielversprechend, um mittels Expression unter stressvermittelnden Bedingungen nach Toleranzvermittelnden Genen zu suchen. **B:** Mit TALE (Toleranz adaptierte Laborevolution) werden adaptive Änderungen während einer langfristigen Selektion unter stressinduzierenden Bedingungen akkumuliert und können durch Sequenzierung des gesamten Genoms identifiziert werden. **C:** TRMR erleichtert die genomische Integration einer DNA-Kassette mit einem Sequenzbarcode zur Nachverfolgung (B), einem Antibiotikaresistenzgen (AB<sup>R</sup>), einem starken Promotor (P) und eine RBS stromaufwärts von praktisch jedem Gen. Unter Stressbedingungen sind die Stämme, die Gene überexprimieren, die eine erhöhte Toleranz verleihen, spezifisch in der Barcode-Bibliothek angereichert. **D:** Durch Verringerung energieintensiver Prozesse mittels Genomreduktion können Kapazitäten (in Form von NAD(P)H und ATP) freigesetzt werden, die wiederum zur Verbesserung der Stresstoleranz, oder zur Erzeugung von maximalen Wachstumsraten und Produktionserträgen erforderlich sind. **E:** Zuvor identifizierte resistenzassoziierte Kandidatengene werden mit Hilfe verschiedener genetischer Werkzeuge, z. B. einem Transposon (Tnp, Transposase kodierende Region; OE, äußeres Ende des Transposons), in das Genom eines Ausgangschassis integriert. Die Abbildung wurde modifiziert nach Bitzenhofer *et al.* (2021); veröffentlicht unter einer CC BY 4.0 Lizenz.

Eine Möglichkeit, um Gene zu identifizieren, die eine Stresstoleranz hervorbringen, besteht in der Generierung von Stammbibliotheken mit (meta)genomischer DNA toleranter Bakterien (Kapardar *et al.*, 2010; Louis & Galinski, 1997). Im Gegensatz dazu stehen die zuvor beschriebenen randomisiert erstellten Transposon Stammbibliotheken von stresstoleranten Organismen, welche über den Verlust der Toleranz auf das entsprechende Gen hinweisen (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Reva *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 1998). Beide Methoden eignen sich zur Identifizierung einzelner Gene, nicht jedoch für komplexer, interagierender Netzwerke (Bitzenhofer *et al.*, 2021). Um solche Netzwerke zu adressieren kann von der voranschreitenden Technologie profitiert werden, da vollständige Transkriptom- (z. B. microarray oder RNA-Seq) oder Proteomuntersuchungen einfacher und auch kostengünstiger geworden sind (Jayakody *et al.*, 2018; Verhoef *et al.*, 2010; Reva *et al.*, 2006). Dies ermöglicht das Erkennen solcher komplexen Antworten in Gegenwart von Stressfaktoren oder während der Biosynthese von toxischen Metaboliten. Darüber hinaus können vergleichende Analysen des Genoms nahe verwandter Organismen durchgeführt werden, um mittels Sequenzhomologie Gene zu identifizieren, die möglicherweise in Zusammenhang mit dem betrachteten Toleranz-Phänotyp stehen (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Abraham *et al.*, 2020; Hosseini *et al.*, 2017; Volmer *et al.*, 2014). Des Weiteren ermöglichten die Fortschritte in der Sequenzierungstechnik eine Weiterentwicklung der gerichteten Laborevolution (ALE; engl.: *adaptive laboratory evolution*) (Sandberg *et al.*, 2019). Bei diesem Ansatz wird ein Organismus in Gegenwart subletaler Konzentration des Stressors kultiviert, der in aufeinanderfolgenden Kultivierungsansätzen stetig erhöht wird (Kusumawardhani *et al.*, 2021; Sandberg *et al.*, 2019). Dies führt zu einer Anreicherung eines an den Stressor adaptierten Organismus, was dem Ansatz den Namen Toleranz-ALE (TALE) verlieh (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Mohamed *et al.*, 2020). Eine anschließende Sequenzierung des Genoms bietet Aufschlüsse über die Toleranz-assoziierten Gene. Dies stellt eine sehr einfache und ungerichtete, aber zeitaufwändige Methode dar (Bitzenhofer *et al.*, 2021).

Eine Kombination des ALE-Ansatzes bei dem jedes Gen mit einer Barcode-DNA-Sequenz adressiert wird, stellt TRMR (engl.: *trackable multiplex recombineering*) (Calero *et al.*, 2018) dar. So kann jedes Gen, welches zu einem toleranten Phänotyp innerhalb einer Mischkultur unter stressinduzierenden Bedingungen beiträgt, identifiziert werden. Die sich so ergebenden Anreicherungen verschiedener Mutationen lassen sich so analysieren (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Schempp *et al.*, 2020). Mit Hilfe dieser Methode konnten beispielsweise in *E. coli* einige Gene identifiziert werden, die eine Toleranz gegenüber Furfural, einem Grundbaustein diverser Arzneistoffe, bewirken (Glebes *et al.*, 2015). Nach aktuellem Stand wurde diese Methode noch nicht in Pseudomonaden angewandt.

Verschiedene Extrusionsproteine sowie die Integrität der Zellmembran spielen eine fundamentale Rolle in der Stressbewältigung (Kapitel 1.2). Die Produktion dieser komplexen Proteine benötigt allerdings viel Energie. Aus diesem Grund kann die Genomreduktion (Kapitel 1.3.3) eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, um das wertvolle ATP und NADPH nicht in der Produktion von weniger relevanten Funktionen zu verbrauchen. Schließlich konnte durch die Genomreduktion in *P. putida* nachweislich mehr NADPH und ATP zur Verfügung gestellt werden, wodurch sich das Wachstum verbesserte (Martínez-García *et al.*, 2014). Somit wird deutlich, dass die Entfernung überflüssiger energieintensiver zellulärer Prozesse in Kombination mit einer feinabgestimmten Genexpression des Toleranz-assoziierten Gens einen wichtigen Bestandteil darstellen, um eine biotechnologische Zellfabrik zu erstellen. Insbesondere bei Extrusionsproteinen stellt die Expressionsrate einen wichtigen Faktor dar, da zu viele Proteine die Membran destabilisieren können (Bitzenhofer *et al.*, 2021). Hierzu können die unter Kapitel 1.3.2 beschriebenen Methoden dienen. In *P. taiwanensis*, welcher als alternatives Chassis zu den als RG2 eingestuften lösemitteltoleranten *P. putida* Stämmen etabliert wurde, führte eine Reduktion des Genoms, sowie die Regulation eines Extrusionsproteins zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Phenol (Wynands *et al.*, 2019). Die konstitutive oder induzierbare Expression dieses Transporters wies zudem unterschiedliche Eigenschaften auf, was einen Chassis-à-la-carte Gedanken unterstützt. Diese Idee beruht auf der Grundlage, dass ein robusteres Chassis, welches mit jeglichem Stress umgehen kann wenig vielversprechend ist, weil viel Energie für Maßnahmen gegen Stressoren, die in der jeweiligen Anwendung nicht vorhanden sind, verschwendet wird. Stattdessen scheint es sinnvoller zu sein einen speziell auf den Stressor angepassten Organismus zu verwenden oder einen neuen Stamm zu entwickeln, der spezifische Eigenschaften aufweist (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Wynands *et al.*, 2019).

Da es sich bei Stressantworten generell aber um komplexe Vorgänge handelt, bei denen viele Faktoren in komplexen Netzwerken funktionell miteinander verbunden sind (Yan & Fong, 2017; Wu *et al.*, 2015), kann es sinnvoll sein ein Bakterium mit intrinsischen Stresstoleranzmerkmalen als Ausgangspunkt zu nehmen. So könnte es bei der Untersuchung eines neuen mikrobiellen Wirts hilfreich sein, durch Genomvergleiche diese Mechanismen und diverse Transporter aus artverwandten Organismen in anspruchsvollen Habitaten zu betrachten. Mit solch einer Untersuchung könnten gegebenenfalls Rückschlüsse über potenzielle Stresstoleranzmechanismen des zu untersuchenden Wirts gezogen werden.

### 1.5 Biotechnologisches Potenzial von *Halopseudomonas* spp.

Der Genus *Pseudomonas* spp. umfasst eine sehr artenreiche Gruppe von Mikroorganismen und beinhaltet Vertreter aus den verschiedensten Habitaten. In der Biotechnologie haben sich Arten dieser Gram-negativen  $\gamma$ -Proteobakterien nicht nur durch ihre Lösungsmitteltoleranz, sondern auch wegen ihrer mannigfaltigen Anwendungen zur heterologen Produktion von Naturstoffen etabliert (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Loeschcke & Thies, 2020). Innerhalb des phylogenetischen Stammbaums der Pseudomonaden gibt es unter anderem die phylogenetischen Linien um *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, und *S. stutzeri*. Einen einzigartigen Ast bildet hierbei die *P. pertucinogena* Gruppe (Peix *et al.*, 2018). Diese beinhaltet 26 Organismen, von denen viele an diversen harschen oder toxischen Habitaten, wie beispielsweise Rohöl-kontaminierte Böden, Wüstensand, Luftproben, aber auch in der Tiefsee isoliert wurden (**Tab. 1.3**). Die Organismen weisen mit 4 Mb ein deutlich kleineres Genom als die artverwandten *Pseudomonadaceae* auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Bakterien eine geringere metabolische Diversität aufgrund einer spezifischen Anpassung an ihre jeweilige ökologische Nische aufweisen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sie kaum Zucker verstoffwechseln, stattdessen aber organische Substanzen wie beispielweise Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Tween20 und Sebacinsäure (Wang & Sun, 2016; Sánchez *et al.*, 2014; Pascual *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Außerdem zeigten sie eine Toleranz gegenüber höheren Salz- und Temperaturschwankungen (Bollinger *et al.*, 2020b) Aufgrund dieser Unterschiede zu anderen Arten der Gattung *Pseudomonas* erfolgte schlussendlich eine Reklassifizierung als *Halopseudomonas* spp. (**Tab. 1.3**) (Rudra & Gupta, 2021).

**Tab. 1.3: Bakterienstämme der Familie *Halopseudomonas* spp.**

Stamm	GenBank / RefSeq*	Habitat <sup>#</sup>	Temperatur [°C] <sup>†</sup>	NaCl [%] <sup>‡</sup>	Referenz
<i>H. abyssi</i> MT5	<a href="#">GCF_002307495.1</a>	Tiefsee (5000 m); Mariannengraben [11.43° N, 142.36° O]	4-45	0-18	(Wei <i>et al.</i> , 2018)
<i>H. aestusnigri</i> GOM5	<a href="#">CP087705.1</a>	Asphalt-kontaminiertes Sediment aus dem Golf von Mexiko (350 m tiefe) (18.76 Breitengrad, -94.26 Längengrad]	n.b.	n.b.	(Rojas-Vargas <i>et al.</i> , 2022)
<i>H. aestusnigri</i> VGXO14	<a href="#">GCF_002197985.1</a>	Rohöl-kontaminierter Sand aus der Gezeitenzone; „Praia da Seda“ Strand, Gemeinde Lariño, Spanien [42°46'-	18-37	2-12,5	(Gomila <i>et al.</i> , 2017; Sánchez <i>et al.</i> , 2014)

Stamm	GenBank / RefSeq*	Habitat#	Temperatur [°C] †	NaCl [%] ‡	Referenz
<i>H. bauzanensis</i> BZ93	<a href="#">GCF_900111225.1</a>	29.27° N, 9°7'27.08" W] Chemiefabrik, Bozen, Südtirol, Italien	5-30	0-10	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<i>H. formosensis</i> CC-CY503	<a href="#">GCF_900115905.1</a>	Kompostieranlage, Taiwan	20-50	1-5	(Lin <i>et al.</i> , 2013)
<i>H. gallaeciensis</i> V113	<a href="#">GCF_003444685.1</a>	Rohöl-kontaminierter Sand aus der Gezeitenzone; „Boca do Rio“ Strand [42°50'11.52"N, 9°7'27.08"W]	6-37	2-13	(Mulet <i>et al.</i> , 2018)
<i>H. jilinensis</i> JS15-10A1	<a href="#">GCF_003586265.1</a>	Ölförderungswasser; Jilin Ölfeld, Songyuan, Jilin Provinz, China [45° 12'36"N, 124° 46'12" O]	4-45	1-10	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
<i>H. laoshanensis</i> Y22	<a href="#">GCF_008365385.1</a>	Bodenprobe Erdnussfeld; Laoshan Berg, China	4-40	0-6	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
<i>H. litoralis</i>	<a href="#">LT629748.1</a>	Mittelmeerküste bei Vinaroz, Castellón, Spanien [40° 27'24" N, 0° 31'36" O]	15-37	0-15	(Pascual <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. nanhaiensis</i> SCS 2-3	<a href="#">CP073751</a>	Tiefseesediment Südchinesisches Meer (1305 m) [20° 59.2010' N, 117° 56.6283' O]	4-50	0-10	(Pang <i>et al.</i> , 2021)
<i>H. neustonica</i> SSM26	<a href="#">GCF_003797945.1</a>	Oberflächenwasser aus dem Rossmeer, Antarktis	10-40	0,5-10	(Jang <i>et al.</i> , 2020)
<i>H. oceani</i>	<a href="#">GCF_002903165.1</a>	Tiefsee (1390 m); Okinawa-Graben; Nordwestpazifik	4-41	0-10	(Wang & Sun, 2016)
<i>H. pachastrellae</i> JCM12285	<a href="#">GCF_900114765.1</a>	Schwamm <i>Pachastrellae</i> ; Philippinensee (750 m)	7-41	0-10	(Romano <i>et al.</i> , 2005)
<i>H. pelagia</i> CL-AP6	<a href="#">GCF_000410875.1</a>	Cokultur mit antarktische Grünalge <i>Pyramimonas gelidicola</i>	4	0,5-8	(Koh <i>et al.</i> , 2013; Hwang <i>et al.</i> , 2009)
<i>H. pertucinogena</i> JCM 11590	<a href="#">GCF_014646575.1</a>	nicht beschrieben, hinterlegt bei ATCC	n.b.	n.b.	(Kawai & Yabuuchi, 1975)
<i>H. phragmitis</i> S-6-2	<a href="#">CP020100.1</a>	Petroleum-kontaminiertes Flusssediment, Huangdao, Shandong Provinz, China	10-41	0-10	(Li <i>et al.</i> , 2020)
<i>H. populi</i> KBL-4-9	<a href="#">1500966</a>	Im Stamm von <i>Populus euphratica</i>	4-45	1-3	(Anwar <i>et al.</i> , 2016)

Stamm	GenBank / RefSeq*	Habitat#	Temperatur [°C]†	NaCl [%]‡	Referenz
<i>H. profundus</i> M5	<a href="#">GCF_008638305.1</a>	Tiefsee (1000 m); Mariannengraben [11° 23.15" N, 142° 29.062' O], Westpazifik	4-40	0-10	(Sun <i>et al.</i> , 2018)
<i>H. sabulinigri</i>	<a href="#">LT629763.1</a>	Schwarzer Strand; Soesoggak, Jeju Insel, Korea	4-37	0-10	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
<i>H. salegens</i>	<a href="#">LT629787.1</a>	Wasserpflanzen salzhaltiges Feuchtgebiet; Gomishan Wetlands, Iran	4-35	0-10	(Amooze gar <i>et al.</i> , 2014)
<i>H. salina</i> XCD-X85	<a href="#">GCF_008641105.1</a>	Salzsee; Xiaochaidan See, Qinghai Provinz, China	4-35	0-12	(Zhong <i>et al.</i> , 2015)
<i>H. saliphila</i> 16W4-4-3	<a href="#">GCF_008638345.1</a>	Ölförderungswasser, Qinghai Ölfeld, China	4-35	0-11	(Zhang <i>et al.</i> , 2020)
<i>H. saudimassiliensis</i> 12M76_air	<a href="#">GCF_000939975.1</a>	Luftprobe aus der Stadt Makkah, Saudi-Adrabien	37	n.b.	(Azhar <i>et al.</i> , 2017)
<i>H. xiamenensis</i> C10-2	<a href="#">GCF_014219065.1</a>	Aktivschlamm; Qianpu Kläranlage, Xiamen, Fujian, China	10-45	0-8	(Lai & Shao, 2008)
<i>H. xinjiangensis</i>	<a href="#">LT629736.1</a>	Wüstensand	4-42	0-6	(Liu <i>et al.</i> , 2009)
<i>H. yangmingensis</i> DSM 24213	<a href="#">GCF_900114825.1</a>	heiße Quelle; Yang-Ming Berg, Taiwan	5-42	0-6	(Wong & Lee, 2014)

\*Accession-Nummer zur eindeutigen Identifizierung der Stämme; #Isolationsort; †Temperaturbereich, in dem Wachstum detektiert wurde; ‡Salztoleranz; n.b.: nicht bestimmt

Verschiedene *Halopseudomonas* spp. zeigen unter anderem bei extremen Temperaturen von 4 °C bis zu 50 °C, aber auch mit NaCl-Konzentrationen bis zu 15 % Wachstum. Diese Faktoren deuten bereits auf intrinsische Toleranzen der Bakterienfamilie gegenüber Osmo- und Temperaturstress hin. Des Weiteren könnte diese Anpassung an die natürlichen Habitate ein weiterer Indikator sein, dass einige dieser Organismen außerdem Toleranzen gegenüber chemischen Stressoren zeigen könnten. Vergleichende Analysen der Genome mit anderen etablierten Organismen zeigten zudem, dass die Genome Gene für vielversprechende Biokatalysatoren aufweisen, wie Esterasen, Halohydrin Dehalogenase und  $\omega$ -Transaminasen oder aber die Biosynthesewege zur Produktion von Ectoin, 5-Hydroxyectoine und Polyhydroxyalkanoaten (PHA) (Bollinger *et al.*, 2020b; Gomila *et al.*, 2017).

Bei PHAs handelt es sich um natürliche lineare Biopolyester, die neben Triacylglycerin oder Wachsestern in Bakterien, wie beispielsweise *P. putida* oder *Cupravidus necator* als Kohlenstoffspeicher dienen (Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003; Alvarez & Steinbüchel,

2002). Interessanterweise konnten die benötigten Gene zur Synthese von PHAs ausschließlich in marinen *Halopseudomonas* spp., nicht jedoch in solchen, die aus Bodenproben isoliert wurden, identifiziert werden (Bollinger *et al.*, 2020b). Darüber hinaus sind in den marinen Vertretern dieser Spezies auch homologe Gene zur Produktion von Triacylglycerin und Wachsestern annotiert, was darauf hindeutet, dass diese Bakterien den Stoffwechsel des Kohlenstoffspeichers adaptieren könnten (Bollinger *et al.*, 2020b). Dies dient vermutlich einer Anpassung an sich stetig ändernde Bedingungen in dem marinen Habitat. Biotechnologische Relevanz bekamen PHAs in der Anwendung als Alternative zu konventionellen Erdöl-basierten Polyestern (Wierckx *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu nicht-abbaubarem Plastik, was erhebliche Folgen für die Umwelt aufweist, können PHAs eine vielversprechende Alternative zur Generierung einer Kreislaufwirtschaft darstellen (Zhou *et al.*, 2023).

Zu biologisch nicht-abbaubarem Polyestern zählten lange Zeit beispielsweise Polyethylenterephthalate (PET), welche einen großen Teil des industriell produzierten Plastiks darstellen (Moharir & Kumar, 2019; Wierckx *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2016). Da dieser synthetische Polyester nicht vollständig recycelt wird, gelangen große Anteile in die Umwelt und schließlich in die Nahrungskette. Aus diesem Grund spielen Möglichkeiten zum Abbau dieser Produkte eine große Rolle in der heutigen Gesellschaft. Innerhalb der letzten Jahre wurden einige Mikroorganismen, wie *Ideonella sakaiensis* isoliert, die in der Lage sind PET abzubauen (Haernvall *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2016). Für *I. sakaiensis* konnte gezeigt werden, dass ein Cutinase-ähnliches Enzym diesen Abbau ermöglicht (Yoshida *et al.*, 2016). Das Enzym wird von den Bakterien in die Umgebung sekretiert, wo es dann mit dem Polyester interagieren kann. Homologe Enzyme zu dieser PETase aus *I. sakaiensis* scheinen ein gemeinsames Merkmal aller *Halopseudomonas* spp. zu sein (Bollinger *et al.*, 2020b).

Für ausgewählte *Halopseudomonas* spp. bzw. deren Enzyme konnte bereits eine Polyesteraseaktivität nachgewiesen werden (Avilan *et al.*, 2023; Bollinger *et al.*, 2020c; Molitor *et al.*, 2020; Haernvall *et al.*, 2017). Darüber hinaus konnte diesem Enzym auch eine Aktivität bei Poly(ester)-urethanen (PEU) nachgewiesen werden. Zu PEUs zählen beispielsweise das Beschichtungsmaterial Impranil DLN-SD, welches in der Textilbranche angewandt wird (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016; Howard *et al.*, 2001; Howard & Blake, 1998). Dieses erhöht die Langlebigkeit des Materials, erhöht aber gleichzeitig dessen Komplexität und erschwert dadurch den mechanischen und chemischen Recyclingprozess (Sullivan *et al.*, 2022). Somit spielen solche Enzyme und insbesondere die Organismen eine wichtige Rolle dabei, solche Produkte biologisch zu verwerten (Tiso *et al.*, 2022).

Darüber hinaus konnte aus *H. aestusnigri* VGXO14 eine lösungsmitteltolerante Carboxylesterhydrolase isoliert werden (Bollinger *et al.*, 2020a). Enzyme sind im

Allgemeinen stereo- und enantioselektiv, wodurch sie immer mehr Nutzen in kommerziellen Anwendungen, neben der reinen Biotechnologie finden (Singh *et al.*, 2016). So zum Beispiel in der Waschmittel-, Molkerei, und Backmittelindustrie, aber auch in der Feinchemie und Pharmazie (Patel, 2018; Sheldon & Woodley, 2018; Singh *et al.*, 2016; Reetz, 2013). Hier gibt es allerdings die Herausforderung, dass die Substrate und / oder Produkte in der Regel nicht wasserlöslich sind, was die Anwendung eines Enzyms in einem organischen Lösungsmittel erfordert, welches mit Wasser mischbar ist (Bollinger *et al.*, 2020a; Patel, 2018). Somit muss ein Enzym nicht nur artifizielle Substrate, sondern auch Toleranzen gegenüber pH, Salz und organische Lösungsmittel aufweisen. Zur Identifizierung solcher Enzyme zeigten sich bereits marine Rohöl-abbauende Organismen als vielversprechend, so auch *H. aestusnigri*, dessen Enzym sogar bei 80 % (vol/vol) Acetonitril, 1,4-Dioxan, Methanol und DMSO aktiv war (Bollinger *et al.*, 2020a). Beim letzten organischen Lösungsmittel zeigte die Carboxylesterhydrolase aus *H. aestusnigri* als einzige keine Verringerung der Enzymaktivität nach 24 h (Bollinger *et al.*, 2020a).

All diese Faktoren deuten auf ein hohes biotechnologisches Potential dieser speziellen Bakteriengattung aus der nahen Verwandtschaft der etablierten *Pseudomonas*-Spezies hin, wodurch sie vielversprechende Kandidaten zur weiteren Untersuchung für biotechnologischen Anwendungen darstellen könnten.

## 1.6 Zielsetzung

Die Gattung *Halopseudomonas* zeigt eine phylogenetische Nähe zu der biotechnologisch gut etablierten und vielfältig genutzten Gruppe der *Pseudomonadaceae*. Die *Halopseudomonas*-Arten weisen alle ein kleineres Genom auf als ihren nahen Verwandten und dadurch vermutlich einen limitierten Metabolismus. Dennoch zeichnen sie sich durch zahlreiche vielversprechende Eigenschaften aus. So wurden sie alle in extremen Habitaten isoliert, was ein Indikator für bestimmte Stresstoleranzen sein kann. Die *Halopseudomonas*-Arten können unter anderem weite Temperaturbereiche und einen hohen Salzgehalt tolerieren. Zusätzlich weisen sie Gene zur Produktion von wertvollen Produkten, wie beispielsweise Ectoin, 5-Hydroxyectoin oder Polyhydroxyalkanoaten auf (Bollinger *et al.*, 2020b). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass sie Plastikbestandteile wie Impranil® DLN abbauen können (Molitor *et al.*, 2020). All diese Eigenschaften zeigen, dass diese Gattung ein hohes Potenzial hat, um biotechnologisch angewendet zu werden. Bislang wurde diese Art noch nicht in der Biotechnologie eingesetzt, was an fehlenden molekulargenetischen Werkzeugen und Methoden liegen könnte. Schließlich könnten bereits etablierte Methoden für den Umgang mit *Pseudomonas* spp. möglicherweise nicht auf diese einzigartige Bakteriengattung übertragen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mikro- und molekularbiologische Methoden für diese bislang unbeschriebene Gattung zu etablieren. Hierzu sollten stellvertretend Organismen ausgewählt werden, die sich in Habitaten und Toleranzen unterscheiden, um so die Gattung möglichst gut widerspiegeln zu können. Um einen mikrobiologischen Zugang zu dieser Art zu bekommen, sollten Kultivierungsbedingungen identifiziert werden, die eine zuverlässige Kultivierung in Komplex- und Minimalmedium ermöglichen. Darüber hinaus sollten molekularbiologische Methoden etabliert werden. Zudem soll mit Hilfe geeigneter Methoden zum DNA-Transfer ermittelt werden, welche Plasmidsysteme sich für die Replikation, heterologe Genexpression oder zur Genintegration eignen. Basierend auf diesen Kenntnissen soll eine charakterisierte Sammlung verschiedener molekularbiologischer Werkzeuge bereitgestellt werden.

Darauf aufbauend soll die genetische Ausstattung hinsichtlich der Toleranz gegenüber chemischem Stress untersucht werden, ebenso wie eine Auswahl von Enzymen, die diese Toleranzen vermitteln. Namengebend war insbesondere die Fähigkeit dieser Bakteriengattung, Salzstress zu tolerieren. Aus diesem Grund sollte diese Toleranz nähergehend untersucht werden mit besonderem Fokus auf die Ectoinproduktion. Darüber hinaus sollen verschiedene, zuvor für *E. coli* und *Pseudomonas* etablierte molekulargenetischen Werkzeuge angewendet werden, um die Biosynthese von Ectoin und 5-Hydroxyectoin im Hinblick auf die Osmotoleranz zu untersuchen. Abschließend soll eine

## ZIELSETZUNG

---

systematische Untersuchung der Reaktion einer *Halopseudomonas* sp. auf osmotischen Stress erfolgen, um diesen komplexen Prozess besser zu verstehen.

## 2 Material und Methoden

Die Experimente zum Erstellen dieser Arbeit wurden alle entsprechend der Biostoff- und Gefahrstoffverordnung (BioStoffV, GefStoffV) durchgeführt. Die Arbeit mit gentechnisch Veränderten Organismen (GVO) wurde entsprechend des Gentechnikgesetzes (GenTG) und nach den in der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) angegebenen Sicherheitsmaßnahmen umgesetzt.

### 2.1 Technische, chemische und biologische Materialien

Die Lagerung und Entsorgung aller biologischen und chemischen Materialien erfolgte gemäß der Sicherheitsdatenblätter, die im Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität hinterlegt sind. Die erhobenen experimentellen Primär- und Sekundärdaten sind auf den jeweiligen Computern sowie auf dem internen Serversystems des Forschungszentrums Jülich hinterlegt.

#### 2.1.1 Technische Materialien

Technische Geräte sowie deren Hersteller, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind in **Tab. 2.1** gelistet.

**Tab. 2.1: Übersicht verwendeter Geräte.**

Gerät	Hersteller
7900HT Fast Real-Time PCR System BioLector I	Applied Biosystems, Waltham, USA m2p-labs, jetzt Beckman Coulter GmbH, Brea USA
Cell Growth Quantifier	Scientific Bioprocessinc Inc. (ehemals Aquila Biolabs GmbH), Pittsburgh, USA
Eagle Eye II-System, Geldokumentations-System	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
EPS-601 Electrophoresis Power Supply	GE Healthcare Technologies Inc., Illinois, USA
GENESYS™, UV-Vis Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
HeraSafe™ KS12 Typ II, Sterilwerkbank	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Infinite® M1000 pro, Fluoreszenzphotometer	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
LC-10Ai HPLC mit SPD-M20A D2&W PDA Detektor	Shimadzu, Kyōto, Japan
Mikro 200, Mikrozentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikro 200R, Mikrozentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Multitron Pro, Schüttelinkubator	Infors AG, Basel, Schweiz
Multitron Standard, Schüttelinkubator	Infors AG, Basel, Schweiz
NanoDrop 2000c, UV-Vis Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
PowerPac™ Basic, Stromversorgung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Rotina 380R, Zentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
SB2, Rotator	Bibby Scientific Ltd, Stone, Großbritannien
Sonoplus Generator HD20270 mit Ultraschallumwandler UW2070	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland
Sorvall® RC-6™ Plus, Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Systemc VX-55, Autoklav	Systemc GmbH, Linden, Deutschland

Gerät	Hersteller
Thermomixer® C, Schüttelinkubator	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ThermoStat Plus, Schüttelinkubator	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TiMix, MTP - Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Tprofessional Basis Gradient Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
VKS 75 Control, Vielkolbenschüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Wide Mini-Sub Cell GT, Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
XCell <i>SecureLock</i> <sup>TM</sup> Mini-Zelle	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

### 2.1.1.1 Software

Die zum Erstellen dieser Arbeit verwendete Software ist in **Tab. 2.2** aufgeführt.

**Tab. 2.2: Übersicht verwendeter Software, Datenbanken und Onlineprogramme.**

Bezeichnung	Bezugsquelle / URL	Referenzen
<b>Software</b>		
Adobe® Illustrator Verison 27.5	Adobe Inc, San Jose, USA	
BioLecton V 2.4.5	m2p-labs GmbH, jetzt Beckman Coulter GmbH, Brea, USA	
CellStream Analysis TM Analysis	Merck, jetzt Luminex Corporation, Austin, USA	
ChemOffice2016	PerkinElmer, Waltham, USA	
Clone-Manager 9.2	Scientific and Educational Software, Denver, USA	
LabSolution/LCSolution Version 5.57 SP1	Shimadzu, Kyōto, Japan	
Mendeley Reference Manager	Mendeley Ltd, London, Großbritannien	
Microsoft Office 2016, Office 365	Microsoft Corp., Redmond, USA	
PyMOL V 2.4.2	Schrödinger Inc, München, Deutschland	
Tecan Software i-control 2.0.10	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz	
<b>Datenbanken</b>		
FPbase	<a href="https://www.fpbase.org">https://www.fpbase.org</a>	(Lambert, 2019)
KEGG Mapper	<a href="https://www.kegg.jp">https://www.kegg.jp</a>	(Kanehisa & Sato, 2020)
Pseudomonas GenomeDB	<a href="https://pseudomonas.com">https://pseudomonas.com</a>	(Winsor <i>et al.</i> , 2016)
RCSB Proteindatenbank (PDB)	<a href="https://www.rcsb.org">https://www.rcsb.org</a>	(Berman, 2000)
<b>Onlineprogramme</b>		
antiSMASH 7.0 bacterial version	<a href="https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start">https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start</a>	(Blin <i>et al.</i> , 2023)
BLAST	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
BlastKOALA	<a href="https://www.kegg.jp/blastkoala/">https://www.kegg.jp/blastkoala/</a>	(Kanehisa <i>et al.</i> , 2016)
BRPOM	<a href="http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bpr om&amp;group=programs&amp;subgroup=gfindb">http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bpr om&amp;group=programs&amp;subgroup=gfindb</a>	Softberry, Inc. Mount Kisco, USA

Bezeichnung	Bezugsquelle / URL	Referenzen
Datenbank von COGs	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog/search/?query=RnfC#">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog/search/?query=RnfC#</a>	(Galperin <i>et al.</i> , 2021; Tatusov <i>et al.</i> , 1997)
CRISPy web	<a href="https://crispy.secondarymetabolites.org/#/input">https://crispy.secondarymetabolites.org/#/input</a>	(Blin <i>et al.</i> , 2016)
Proteom-pl 2.0: Proteome Isoelectric Point Database	<a href="https://isoelectricpointdb2.mimuw.edu.pl/index.html">https://isoelectricpointdb2.mimuw.edu.pl/index.html</a>	(Kozlowski, 2022)
RoseTTAFold	<a href="https://robetta.bakerlab.org">https://robetta.bakerlab.org</a>	(Baek <i>et al.</i> , 2021)
SwissDock	<a href="http://www.swissdock.ch">http://www.swissdock.ch</a>	(Grosdidier <i>et al.</i> , 2011)

### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die gängigen Verbrauchsmaterialien, wie beispielsweise Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und der gleichen wurden von VWR International (Darmstadt, Deutschland), BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland), Sarstedt AG (Nürnbrecht, Deutschland), Ratiolab GmbH (Dreieich, Deutschland) und Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen. Weitere, speziellere Verbrauchsmaterialien sind in **Tab. 2.3** aufgeführt.

**Tab. 2.3: Übersicht speziellerer Verbrauchsgüter.**

Verbrauchsgut	Hersteller
AeraSeal™ Sealing Films	Excel Scientific, Victorville, USA
CryoTubes™	Nalge Nun International, Rochester, USA
Elektroporationsküvette, 1 mm, lange Elektrode	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
FlowerPlate®	m2p-labs GmbH, jetzt Beckman Coulter GmbH, Brea, USA
HPLC 2 mL Vials	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Ni-NTA Superflow	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
NuPAGE™ 4 – 12 %, Bis-Tris, 1,0-1,5 mm, Mini-Protein-Gele	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Phenotype MicroArray™ PM 9	Biolog Inc., Hayward, USA
Round Well Plate®	m2p-labs GmbH, jetzt Beckman Coulter GmbH, Brea, USA
Rotilabo 100 µL Borosilikat Inlet	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spitzenvorsatzfilter (CHROMAFIL AO-20/3, 3 mm) 0,2 µm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Spitzenvorsatzfilter (steril), 0,2 µm	VWR international GmbH, Darmstadt, Germany

### 2.1.2 Chemische Materialien

Die Chemikalien (**Tab. 2.4**) wurden in der Reinheit verwendet, wie es für die Experimente notwendig war.

Tab. 2.4: Übersicht verwendeter Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
5-Hydroxyectoin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Adipinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agar-Agar Kobe	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aluminiumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumdihydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Azelainsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Bromophenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau G250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Dinatriumsuccinat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DNase	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
dNTP Mix (je 10 mM)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Eisensulfat	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gentamycin (Gm)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Glutarsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin (Km)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kupfer (II) nitrate trihydrat	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Chemikalien	Hersteller
L-Arabinose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>m</i> -Toluylsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Malonsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MIDORI green	NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriummolybdat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Oxalsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pepton	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pimelinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rifampicin (Rif)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salicylsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sebacinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Suberinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Terrific-Broth-Medium modified	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Thiamin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
visiomax Antiallergische Augentropfen	dm-drogeriemarkt GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zinksulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Die Puffer und Lösungen (**Tab. 2.5**) wurden mit demineralisiertem Wasser zubereitet und anschließend autoklaviert oder steril filtriert (Spitzenvorsatzfilter (**Tab. 2.3**)).

**Tab. 2.5: Übersicht und Zusammenstellung verwendeter Puffer und Lösungen.**

Puffer/Lösungen	Zusammenstellung		Anwendung
CaCl <sub>2</sub> Lösung	CaCl <sub>2</sub>	100 mM	chemisch kompetente Zellen ( <b>2.2.1.2</b> )
	Glycerol	15 % (v/v)	
DNA Probenpuffer (5x)	EDTA	100 mM	Agarose Gelelektrophorese ( <b>2.2.2.7</b> )
	Glycerine	40 % (w/v)	
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)	

Puffer/Lösungen	Zusammenstellung	Anwendung
MgCl <sub>2</sub> Lösung	MgCl <sub>2</sub> 100 mM	chemisch kompetente Zellen (2.2.1.2)
TBE-Puffer	TRIS 45 mM	Agarose Gelelektrophorese (2.2.2.7)
	Borsäure 45 mM	
	EDTA 1 mM	
TRIS Puffer	TRIS 50 mM	Absorptions- und Emissionsspektren (2.2.3.2)

## 2.1.3 Biologische Materialien

### 2.1.3.1 Enzyme

Die verwendeten Typ-II Restriktionsendonukleasen (hydrolytische Spaltung) und die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase wurden von ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

### 2.1.3.2 Biologische Kits

Zur Nukleinsäureisolation, -elution und -amplifikation wurden verschiedene molekularbiologische Kits angewendet. Zur phänotypischen Charakterisierung verschiedener Bakterienstämme wurde ein Microarray Kit verwendet.

Tab. 2.6: Molekularbiologische und Phänotypische Kits.

Biologisches Kit	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Agilent RNA Pico 6000 Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
In-Fusion® HD-Cloning Plus	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Phenotype Microarray™ PM9 Gram-negative Bakterien	Biolog, Inc., Hayward, USA
Quick RNA-Miniprep Plus Kit	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
riboPOOL für Bakterien	siTOOLS Biotech GmbH, Planegg, Deutschland
RNA Clean&Concentrator-5 Kit	Zymo Research, Freiburg, Deutschland

### 2.1.3.3 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Vektoren

Die verwendeten Bakterienstämme wurden aus der Stammsammlung des IMETs, HHU-Düsseldorf oder von Takara Bio Inc (Japan) bezogen.

Tab. 2.7: Übersicht verwendeter Bakterienstämme

Organismus	Eigenschaft	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F</i> <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 thi-1</i> <i>gyrA6 relA1 deoR</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> DH5α $\lambda$ pir	$\lambda$ pir phagen lysogen von DH5α	(Penfold & Pemberton, 1992)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>Ec294::</i> [RP4- 2(Tc <sup>R</sup> ::Mu)(Km <sup>R</sup> ::Tn7)] <i>recA, thi, pro,</i> <i>hsdR- hsdM<sup>+</sup> TP<sup>R</sup>, Sm<sup>R+</sup></i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>E. coli</i> S17-1 $\lambda$ pir	$\lambda$ pir phagen lysogen von S17-1	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
Stellar™ chemisch kompetente Zellen	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1,</i> <i>gyrA96, phoA, <math>\Phi</math>80d lacZ<math>\Delta</math> M15,</i> <i><math>\Delta</math>(lacZYA - argF) U169, <math>\Delta</math>(mrr - hsdRMS</i> <i>- mcrBC), <math>\Delta</math>mcrA, <math>\lambda</math>-</i>	Takara Bio Inc, Japan
<i>P. putida</i> KT2440	Wildtyp	(Nelson <i>et al.</i> , 2002; Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981)
<i>H. aestusnigri</i> VGXO14	Wildtyp	(Gomila <i>et al.</i> , 2017; Sánchez <i>et</i> <i>al.</i> , 2014)
<i>H. bauzanensis</i> BZ93	Wildtyp	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<i>H. litoralis</i> 2SM5	Wildtyp	(Pascual <i>et al.</i> , 2012)
<i>H. oceani</i> KX20	Wildtyp	(Wang & Sun, 2016)
<i>H. aestusnigri</i> VGXO14R	Wildtyp, Rif <sup>R</sup>	(Kruse <i>et al.</i> , 2023)
<i>H. bauzanensis</i> BZ93R	Wildtyp, Rif <sup>R</sup>	(Kruse <i>et al.</i> , 2023)
<i>H. litoralis</i> 2SM5R	Wildtyp, Rif <sup>R</sup>	(Kruse <i>et al.</i> , 2023)
<i>H. oceani</i> KX20R	Wildtyp, Rif <sup>R</sup>	(Kruse <i>et al.</i> , 2023)
<i>H. litoralis</i> Tn7-P <sub>em7</sub> - <i>msfgfp</i>	Rif <sup>R</sup> , Tn7: P <sub>em7</sub> , <i>msfgfp</i> , Gm <sup>R</sup>	(Kruse <i>et al.</i> , 2023)
<i>H. litoralis</i> Tn7-P <sub>em7</sub> - <i>eyfp</i>	Rif <sup>R</sup> , Tn7: P <sub>em7</sub> , <i>eyfp</i> , Gm <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>H. litoralis</i> Tn7.1-P <sub>tac/lac<sup>-</sup></sub> <i>mcherry</i>	Rif <sup>R</sup> , Tn7.1: <i>lacI</i> , P <sub>tac</sub> , <i>mcherry</i> , Km <sup>R</sup>	(Kruse <i>et al.</i> , 2023)
<i>H. litoralis</i> Tn7.2-P <sub>tac/lac<sup>-</sup></sub> <i>mcherry</i>	Rif <sup>R</sup> , Tn7.2: <i>lacI</i> , P <sub>tac</sub> , <i>mcherry</i> , Km <sup>R</sup>	(Kruse <i>et al.</i> , 2023)
<i>H. litoralis</i> Tn7.1-P <sub>tac/lac<sup>-</sup></sub> <i>mcherry</i> Tn7.2-P <sub>em7</sub> - <i>msfgfp</i>	Rif <sup>R</sup> , Tn7.1: <i>lacI</i> , P <sub>tac</sub> , <i>mcherry</i> , Km <sup>R</sup> ; Tn7.2: P <sub>em7</sub> , <i>msfgfp</i> , Gm <sup>R</sup>	(Kruse <i>et al.</i> , 2023)

Die Oligonukleotide wurden mit der Software Clonemanager 9.2 (Tab. 2.2) geplant und durch Eurofins Genomics synthetisiert. Sie wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 pmol/μl angesetzt.

Tab. 2.8: Übersicht verwendeter Oligonukleotide.

#	Name	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
<b>Oligonukleotide zur PCR</b>			
1	LK_IF_pVLT33-AB <sup>R</sup> _fw	GCGGGACTCTGGGGTT	pVLT33 Rückgrat
2	LK_IF_pVLT33-AB <sup>R</sup> _rv	GCGAAACGATCCTCATCCTGT	ohne Km <sup>R</sup>
3	LK_IF_GmR-pJT_fw	TGAGGATCGTTTTCGCATGTTAC	Gm <sup>R</sup> aus pJT <sup>R</sup> Tmcs, HR pVLT33 Rückgrat ohne Km <sup>R</sup>
4	LK_IF_GmR-pJT_rev	GCAGCAGCAACG ACCCCAGAGTCCCCGCTTAGGTG GCGGTACTIONGGT	
5	LK_IF_pBTBX_fw	GTTCTAGAAAATTCGTCAACGAA TTCAAGCT	pBTBX Rückgrat
6	LK_IF_pBTBX_rev	GCCCATGGGTATATCTCCTTCTT AAAG	

#	Name	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
7	LK_IF_sfGFP_pBTBX_fw	GATATACCCATGGGCATGAGCA AAGGAGAAGAACTTTTCACTG	Gen <i>sfgfp</i> , HR pBTBX Rückgrat
8	LK_IF_sfGFP_pBTBX_rv	TTCGTTGACGAATTTTCATTTGT AGAGCTCATCCATG	
9	LK_IF_ectD_pBTBX_fw	CGAATTTTCTAGAACTCACGGAT ACTGCTGAGGG	Gen <i>ectD</i> aus <i>H. littoralis</i> ; HR
10	LK_IF_ectD_pBTBX_rv	GATATACCCATGGGCGTGCAAG CTGACCTTTACCC	pBTBX Rückgrat
11	LK_Ask_ect_EcoRI_fw	CCGGAATTCTCAGGCAGCGACG ATAACGTC	Gen <i>ask_ect</i> aus <i>H. littoralis</i> ; für
12	LK_Ask_Ect_Ndel_rv	GGAATTCATATGCATACAGTAG AAAAAATCGGCCG	pBTBX, pVLT33G und pET28a
13	LK_IF_Ptac-pUC18R6K_fw	GCCTGCAAGGCCCTTCGCGAGGT ACCTCACTGCCCGCTTTCCAGT CGG	<i>lacI</i> P <sub>lac</sub> aus pVLT33; HR pUC18R6KT- miniTn7T-Km
14	LK_IF_Ptac-pUC18R6K_rv	CCTCGAGAAGCTTGGGCCCGGT ACCAATTGTTATCCGCTCACAAT TCCAC	
15	LK_IF-RBS- mCherry_mTn7-fw	ACCGGGCCCAAGCTTCTCGATT CACACAGGAAACAGGAGGTACC	RBS <i>mcherry</i> aus pJT <sup>mcs</sup> - <i>mcherry</i> ;
16	LK_IF-RBS- mCherry_mTn7-rv	GGGCTGCAGGAATTCCTCGATT ACTTGTACAGCTCGTCCATGCC G	HR pUC18R6KT- miniTn7T-Km
17	LK_attTn7_pBG13_fw	CCGATCCTGGTTGAACTGGATG	bindet in Gen <i>msfgfp</i>
18	LK_attTn7_pUC_fw	CAGGACATAGCGTTGGCTAC	bindet in <i>Km<sup>R</sup></i> Gen
19	pTn7R_fw	CACAGCATAACTGGACTGATTC	bindet in Tn7R Erkennung ssequenz
20	LK_2SM5_glmS1_rv	TCAAGCATGGGCCATTGGCG	bindet in <i>glmS1</i> in <i>H. littoralis</i>
21	LK_2SM5_glmS2_rv	AACATGGCCCTCTGGCACTG	bindet in <i>glmS1</i> in <i>H. littoralis</i>
<b>Oligonukleotide zur Sequenzierung</b>			
22	LK_Seq_pVLT33_mcs_fw	CGAATTGCAAGCTGATCCGGGCTTATCG	
23	LK_Seq_pVLT33_mcs_rv	GGGCTTTACTAAGCTGATCC	
24	LK_Seq_pVLT33_AB <sup>R</sup> _rv	GACGGATTTGCACTGCCGGTAG	
25	pBTBX-2_araBAD prom fw	CACGGCGTCACACTTTGCTATG	
26	pBTBX-2-ori_rv	GCTTGTCCAGCAGGGTTGTC	
27	Seq_pNPTS-lacZmcs_fw	CACAGGAAACAGCTATGAC	
28	Seq_pNPTS-lacZmcs_rev	GTTTTCCCAGTCACGACG	
29	SeqTn7L_fw	GGGAACTGGGTGTAGCGTC	
30	Seq_pUC18R6KT-mcs_rv	CCATTGCTGTTGACAAAGGGAAT	
31	T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	
32	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
33	M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC	
34	M13 uni (-43)	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT	

Überprüfung der Integration in  
 attTn7-site; #19-21 + #22 oder  
 #23 ein Paar

Zur InFusion-Klonierung oder bei einer *overlap-extension* (OE) PCR werden Oligonukleotide mit homologen Regionen (HR) zu dem entsprechenden linearisierten Plasmidrückgrat benötigt, diese Nukleotide sind grau markiert. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Die verwendeten Plasmide wurden größtenteils aus der Plasmidsammlung des IMETs, HHU-Düsseldorf oder von Kooperationspartnern aus dem IBG-1, FZ-Jülich bezogen. pUC18R6KT-miniTn7T-Km war ein Geschenk von Herbert Schweizer (Addgene Plasmid #

26068). Die Plasmide, die innerhalb dieser Arbeit generiert wurden, sind in der Plasmidsammlung des IMETs hinterlegt.

Tab. 2.9: Übersicht der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
<b>Leervektoren</b>		
pBTBX-2-CRISPRi	pBBR1, Km <sup>R</sup> , <i>araC</i> , P <sub>BAD</sub> , <i>dcas9</i> , P <sub>tac</sub> , <i>lacPOZ</i> , gRNA	(Bitzenhofer et al., 2023b)
pBTBX-2-mcs pET28a(+)	pBBR, Km <sup>R</sup> , <i>araC</i> , P <sub>araBAD</sub> mcs ColE1, f1 ori, Km <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , His <sub>6</sub> -Affinitätstag, <i>lacI</i> , <i>bla</i>	(Prior et al., 2010) Novagen
pJT <sup>+</sup> Tmcs	pBR322, pRO1600, pRO1600 <i>rep</i> , Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub> , mcs, nicht mobilisierbar	(Verhoef et al., 2010)
pNPTS-R6KT	R6K, oriT, Km <sup>R</sup> , P <sub>lac-lacZ</sub> , <i>sacB</i>	(Fried et al., 2012)
pSNW2	R6K, oriT, <i>traJ</i> , P <sub>14g(BCD2)</sub> - <i>msfgfp</i> , Km <sup>R</sup>	(Volke et al., 2020)
pUC18R6KT- miniTn7T-Km	pUC18R6KT-miniTn7T-Derivat, Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	(Choi et al., 2005)
pVLT33-RBSobt	RSF1010, <i>mob</i> , <i>repABC</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , Km <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub>	(de Lorenzo et al., 1993); Bitzenhofer, unveröffentlicht diese Arbeit
pVLT33G-RBSopt	RSF1010, <i>mob</i> , <i>repABC</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , Gm <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub> ,	
<b>Expressionsvektoren</b>		
pBNT- <i>mcherry</i>	pBBR1, Km <sup>R</sup> , <i>nagR</i> , P <sub>nagAa</sub> , <i>mcherry</i>	(Hogenkamp et al., 2021)
pBTBX-2- <i>ectD</i>	pBBR1, Km <sup>R</sup> , <i>araC</i> , P <sub>BAD</sub> , <i>ectD</i>	(Armborst, 2022)
pBTBX-2- <i>sfgfp</i>	pBBR1, Km <sup>R</sup> , <i>araC</i> , P <sub>BAD</sub> , <i>sfgfp</i>	(Kruse et al., 2023)
pHT01- <i>sfgfp</i>	pBR322, <i>repA</i> , Cm <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , P <sub>grac-sfgfp</sub>	(Hogenkamp et al., 2021)
pJT <sup>+</sup> Tmcs- <i>mcherry</i>	pBR322, pRO1600, pRO1600 <i>rep</i> , Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub> , <i>mcherry</i> , nicht mobilisierbar	(Burmeister et al., 2019)
pVLT33-GFPmut3	RSF1010, <i>mob</i> , <i>repABC</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , Km <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub> , <i>gfpmut3</i>	(Hogenkamp et al., 2021)
<b>Tn7-Vektoren</b>		
pBG13	Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , R6K, pBG-derived, P <sub>em7</sub>	(Zobel et al., 2015)
pUC18R6KT- miniTn7T-Km-P <sub>tac/lacI<sup>r</sup></sub> - <i>mcherry</i>	pUC18R6KT-miniTn7T-derivative, Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>lacI</i> , P <sub>tac-mcherry</sub>	(Kruse et al., 2023)
pYTNB06K-1G7	pYT-Derivat, Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , P <sub>em7</sub> , <i>eyfp</i>	(Sieberichs, 2023)
pYT-P <sub>nagAa</sub> - <i>mcherry</i>	pYT-Derivat, Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , <i>nagR</i> , P <sub>nagAa</sub> , <i>mcherry</i>	(Kruse et al., 2023)
pYTNB01K_1G7	pYT-Derivat, Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , <i>nagR</i> , P <sub>nagAa</sub> , <i>eyfp</i>	(Weihmann et al., 2023)
pYTSK56K_3G7	pYT-Derivat, Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , <i>mcherry</i>	(Weihmann et al., 2023)
<b>Deletionsvektoren</b>		
pSNW2- $\Delta$ <i>ectABCD-ask_ect</i>	Integrationsvektor mit homologen Bereichen vor und hinter <i>ectABCD-ask_ect</i> zur Deletion in <i>H. littoralis</i> 2SM5R; R6K, oriT, <i>traJ</i> , P <sub>14g(BCD2)</sub> - <i>msfgfp</i> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSNW2- $\Delta$ <i>ectABCD</i>	Integrationsvektor mit homologen Bereichen vor und hinter <i>ectABCD</i> zur Deletion in <i>H. littoralis</i> 2SM5R; R6K, oriT, <i>traJ</i> , P <sub>14g(BCD2)</sub> - <i>msfgfp</i> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSNW2- $\Delta$ <i>ectABC</i>	Integrationsvektor mit homologen Bereichen vor und hinter <i>ectABC</i> zur Deletion in	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pSNW2- $\Delta$ ask_ect	<i>H. littoralis</i> 2SM5R; R6K, oriT, <i>traJ</i> , <i>P</i> <sub>14g</sub> (BCD2)- <i>msfgfp</i> , Km <sup>R</sup> Integrationsvektor mit homologen Bereichen vor und hinter <i>ask_ect</i> zur Deletion in <i>H. littoralis</i>	diese Arbeit
pSNW2- $\Delta$ ectD	2SM5R; R6K, oriT, <i>traJ</i> , <i>P</i> <sub>14g</sub> (BCD2)- <i>msfgfp</i> , Km <sup>R</sup> Integrationsvektor mit homologen Bereichen vor und hinter <i>ectDt</i> zur Deletion in <i>H. littoralis</i>	diese Arbeit
pNPTS-R6KT- $\Delta$ ectD	Integrationsvektor mit homologen Bereichen vor und hinter <i>ectD</i> zur Deletion in <i>H. bauzanensis</i> BZ93R; R6K, oriT, Km <sup>R</sup> , <i>P</i> <sub>lac</sub> - <i>lacZ</i> , <i>sacB</i>	(Armborst, 2022)
Helferplasmide		
pQT8- <i>P</i> <sub>em7</sub> -SceI	pMB1, pRO1600, <i>SF(ts1)-rep</i> , oriT, Amp <sup>R</sup> , I-SceI. <i>P</i> <sub>em7</sub>	(de Witt <i>et al.</i> , 2023)
pQure6-high	RK2, <i>XylS/P</i> <sub>m</sub> - <i>trfA</i> , <i>XylS/P</i> <sub>m</sub> - <i>l-sceI</i> , <i>P</i> <sub>14g</sub> (BCD2)- <i>mrfp</i> , Gm <sup>R</sup>	(Volke <i>et al.</i> , 2020)
pTNS2	pUC18R6KT-derivative with EcoRI/ClaI inserted <i>P</i> <sub>lac</sub> - <i>tnasABCD</i>	(Choi <i>et al.</i> , 2005)

#### 2.1.3.4 Nährmedien und Zusätze

Für die Kultivierung von Bakterien wurden vorgemischte Lysogeny-Broth- (LB), Hartman-Medium (HM) (Hartmans *et al.*, 1989) und Terrific-Broth- (TB) (modifizierte) Medien verwendet (**Tab. 2.10**). Zur Herstellung von LB-Medium bzw. TB-Medium wurde die empfohlene Menge destilliertes Wasser zugegeben. Für die Kultivierung der *Halopseudomonas* spp. wurde 45 mM Succinat zum LB-Medium hinzugefügt. Um festes LB-Medium herzustellen, wurden 15 g/L Agar-Agar dem LB-Medium zugesetzt, im Folgenden LB-Agar genannt. Für die Kultivierung der *Halopseudomonas* spp. wurde dem LB-Agar weitere 2 % (w/v) NaCl zugesetzt (**Tab. 2.10**). Alle Kultivierungsmedien wurden vor der Verwendung für mindestens 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert (Sterilspritzenfilter, 0,2 µm aus PES) und anschließend den Medien zugesetzt. Sebacinsäure wurde in vollentsalztem Wasser gelöst und auf pH 10 eingestellt. Außerdem wurden Glycerin-, Glucose-, MgCl<sub>2</sub>-, MgSO<sub>4</sub>-, Mineralsalze (EDTA, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O und MnCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O)- und Ammoniumsulfat-Lösungen sowie Phosphatpuffer und Dicarbonsäuren separat autoklaviert und anschließend zugegeben.

Tab. 2.10: Übersicht verwendeter Nährmedien und ihrer Zusammensetzung.

Nährmedium	Komponenten	
LB-Medium (LB) (Fertigmischung)	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	10 g/L
LB <sub>Suc</sub> -Medium	LB	1 L
	Di-Natrium-succinat Hexahydrat	121,57 g
TB-Medium (TB) (Terrific-Broth-Medium, modifiziert)	Casein	12 g/L
	Hefeextrakt	24 g/L
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,4 g/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2 g/L
SOB-Medium	Pepton	20 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	0,5 g/L
	KCl	0,186 g/L
SOC-Medium	MgSO <sub>4</sub>	2,4 g/L
	SOB-Medium	1 L
Hartman-Medium (HM)	Glucose	3,603 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	388 g/L
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	163 g/L
	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	200 g/L
	EDTA	1 g/L
	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10 g/L
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,02 g/L
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,04 g/L	
MnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,1 g/L	
Sebacinsäure	36,41 g/L	

Darüber hinaus wurden den Kulturen Antibiotika zugesetzt, die dem verwendeten Expressionsvektor oder der spezifischen Stammresistenz entsprechen.

Tab. 2.11: Übersicht verwendeter Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/mL]	finale Konzentration [µg/mL]		
			<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>	<i>Halopseudomonas</i> spp.
Gentamicin (Gm)	H <sub>2</sub> O dest.	25	10	25	25
Irgasan (Irg)	70 % EtOH	25	-	25	-
Rifampicin (Rif)	100 % DMSO	25	-	-	25
Chloramphenicol (Cm)	70 % EtOH	50	50	25	-
Ampicillin (Amp)	H <sub>2</sub> O dest.	100	100	-	-
Kanamycin (Km)	H <sub>2</sub> O dest.	100	50	25	25
Spectinomycin (Spc)	H <sub>2</sub> O dest.	100	100	-	-
Streptomycin (Sm)	H <sub>2</sub> O dest.	200	50	50	-
Tetracyclin (Tc)	70 % EtOH	10	10	50	-

## 2.2 Mikro- und molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Flüssigkultivierung der Bakterienstämme erfolgte in 100 mL Erlenmeyerkolben mit 10 mL LB bei 130 Umdrehungen pro Minute (rpm; engl: *revolutions per minute*). *E. coli* wurde bei 37 °C kultiviert, *P. putida* bei 30 °C. Zur Inokulation von Vorkulturen wurde dem Medium ein einzelner Bakterienklon oder 10 µL einer Kyrkultur zugesetzt.

*E. coli* und *P. putida* wurden auf LB-Agar, versetzt mit einem geeigneten Antibiotikum, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bzw. 30 °C kultiviert und anschließend bei 4 °C gelagert. *H. aestusnigri* VGXO14 (Sánchez *et al.*, 2014), *H. bauzanensis* BZ93 (Zhang *et al.*, 2011), *H. litoralis* 2SM5 (Pascual *et al.*, 2012) und *H. oceani* KX20 (Wang & Sun, 2016) wurden auf LB-Agar supplementiert mit 3 % (w/v) NaCl und wenn benötigt einem Antibiotikum, bei 30 °C für 48 h kultiviert. Die erhöhte Salzkonzentration verhinderte ein Austrocknen der Zellen und ermöglichte eine Lagerung der Platten bis zu einem Monat bei 4 °C.

Die *Halopseudomonas* spp. wurden in LB mit einem Zusatz von 45 mM Succinat kultiviert. Als Minimalmedium wurde Hartman-Medium (HM) verwendet, welches 18 mM Sebacinsäure als einzige Kohlenstoffquelle beinhaltet (**Tab. 2.10**) (Hartmans *et al.*, 1989). Für die flüssige Kultivierung der R-Stämme (VGXO14R, BZ93R, 2SM5R und KX20R) wurden 25 µg/mL Rifampicin (Rif) zugesetzt. Zwei bis drei Kolonien wurden dem Kultivierungsmedium zur Inokulation der Vorkultur zugesetzt. Bakterienstämme, die ein vektorbasiertes Antibiotikaresistenzgen trugen, wurden unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (**Tab. 2.11**). Die Kultivierung erfolgte entweder in einem 100 mL Erlenmeyerkolben (10 % Füllvolumen) bei 130 rpm oder in einer 48-Well Round Well Plate® (1 mL Füllvolumen), welche mit „AeraSeal™ Sealing Films“ (**Tab. 2.3**) verschlossen wurde bei 1000 rpm im Mikrobioreaktor BioLector I (**Tab. 2.1**) für mindestens 24 h bei 30 °C, sofern nicht anders angegeben. Die Wachstumsrate in der logarithmischen Wachstumsphase wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet (Christian *et al.*, 1982):

**Gleichung 1:** 
$$r(t) = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{\Delta t}$$

r(t) Wachstumsrate [h<sup>-1</sup>]  
 N<sub>1</sub> Mittelwert eines biologischen Triplikats der Biomasse in der frühen logarithmischen Wuchsphase  
 N<sub>2</sub> Mittelwert eines biologischen Triplikats der Biomasse in der späten logarithmischen Wuchsphase

Für eine längere Lagerung der Bakterienzellen wurden Kryobestände hergestellt. Dazu wurden 1,8 mL der entsprechenden Kultur mit 138 µL DMSO versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde eine modifizierte Variante der Calciumchlorid/Magnesiumchlorid-basierten Methode angewandt (Hanahan, 1983). Dazu wurde eine 50 mL Hauptkultur aus einer 10 mL Vorkultur mit einer Zelldichte von  $OD_{580\text{ nm}} 0,05$  inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 130 rpm für 2 – 3 h kultiviert, bis eine  $OD_{580\text{ nm}}$  von 0,5 - 0,7 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm geerntet. Danach wurde das Pellet in 10 mL gekühltem  $MgCl_2$  (**Tab. 2.5**) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut geerntet (10 min, 4000 rpm, 4 °C) und in 8 mL gekühltem  $CaCl_2$  mit 15 % Glycerin (**Tab. 2.5**) resuspendiert. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ L-Aliquots bei -80 °C gelagert.

Um Kontaminationen der Zellen auszuschließen, wurde ein Antibiotogramm mit den zuvor erzeugten kompetenten Zellen durchgeführt. Dazu wurden 5 mL LB (**Tab. 2.10**), versetzt mit den gängigen Antibiotika (**Tab. 2.11**), mit 20  $\mu$ L der chemisch kompetenten Zellen inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.1.3 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

#### 2.2.1.3.1 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Hitzeschockmethode leicht modifiziert (Hanahan, 1983). Dazu wurden 1-2  $\mu$ L der Plasmid-DNA zu den 100  $\mu$ L Aliquots der chemisch kompetenten Zellen gegeben und zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s durchgeführt und 700  $\mu$ L SOC-Medium (**Tab. 2.10**) zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen im Rotationsrad für 90 min ( $Km^R$ ) bzw. 120 min ( $Gm^R$ ) ohne Selektionsdruck bei 37 °C kultiviert. Schließlich wurden 100  $\mu$ L der Zelllösung auf LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C unter entsprechendem Selektionsdruck inkubiert.

#### 2.2.1.3.2 Transformation von *Halopseudomonas* spp. mittels Elektroporation

Um *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 mit Plasmid-DNA zu transformieren, wurde eine leicht modifizierte Version des Raumtemperatur-Protokolls für die Elektroporation verwendet (Tu *et al.*, 2016; Datsenko & Wanner, 2000). Dazu wurde eine Vorkultur durch Zentrifugation (1 min, 21 000 x g) geerntet, anschließend gründlich mit 1 mL sterilem Wasser gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 1 min wurde das Zellpellet in 80  $\mu$ L sterilem Wasser resuspendiert und 1  $\mu$ L (~ 100 ng) der externen DNA hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 1 mm: Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) überführt. Die Elektroporation wurde mit dem Programm 'EC1' (25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 4,5-5 ms, 20 kV/cm) von MicroPulser (**Tab. 2.1**) durchgeführt.

Anschließend wurde die Zellsuspension mit 700  $\mu\text{L}$   $\text{LB}_{\text{Suc}}$ -Medium versetzt und für 2 h bei 30 °C in einem Rotatorrad kultiviert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  der Zellen auf LB-Agar mit 3% (w/v) NaCl mit Glasperlen ausplattiert und für 48 h bei 30 °C unter entsprechendem Selektionsdruck inkubiert.

### 2.2.1.3.3 Plasmidübertragung mittels Konjugation von *E. coli* zu *Halopseudomonas* spp.

Um Plasmide in *Halopseudomonas* spp. zu übertragen wurde die natürliche Konjugation mit Hilfe eines leicht modifizierten Protokolls durchgeführt (Elhai & Wolk, 1988). Hierzu wurde der Stamm *E. coli* S17-1 oder *E. coli* S17-1  $\lambda\text{pir}$  als Donorstamm verwendet und mit dem zu übertragenden Plasmid transformiert.

Anschließend wurden 500  $\mu\text{L}$  einer Vorkultur dieser *E. coli* Stämme sowie 500  $\mu\text{L}$  einer *H. littoralis* 2SM5R-Vorkultur vereinigt und vorsichtig gemischt. Nach der Zentrifugation (1 min, 21 000 x g) wurde das erhaltene Zellpellet in 100  $\mu\text{L}$   $\text{LB}_{\text{Suc}}$  resuspendiert und auf einen Membranfilter übertragen, der auf LB-Agar ohne jegliche Zusätze gelegt wurde. Nach einer Inkubation von mindestens 5 h bei 30 °C wurden die Zellen mit 1 mL  $\text{LB}_{\text{Suc}}$  vom Filter abgewaschen. Schließlich wurde die Zellsuspension 1 min lang bei 21 000 x g zentrifugiert und in 100  $\mu\text{L}$  des Überstandes resuspendiert. Die Suspension wurde mit Hilfe von Glasperlen auf LB-Agar (3 % (w/v) NaCl, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Rif) plattiert und zwei Tage bei 30 °C unter dem erforderlichen Selektionsdruck inkubiert und erneut auf Agarplatten kultiviert. Der schillernde Phänotyp der *Halopseudomonas*-Kolonien und ihre Polyesterhydrolase-Aktivität (Molitor *et al.*, 2020) wurden zur Bestätigung der Isolierung von transformierten *Halopseudomonas* spp. nach der Konjugation herangezogen.

### 2.2.1.4 Speziellere Kultivierungen

#### 2.2.1.4.1 Kultivierung rekombinanter *Halopseudomonas* spp. für Expressions- und Produktionsstudien

Hauptkulturen von *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. littoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 wurden mit einer optischen Dichte  $\text{OD}_{580\text{ nm}}$  von 0,1 inokuliert und in einer Round Well Plates® unter Verwendung des Mikrobioreaktors BioLector I (Tab. 2.1) kultiviert. Die Zelldichte wurde in Echtzeit über die Streulichtintensität bei 620 nm überwacht, und die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mit einem  $\text{EX}_{508\text{ nm}}/\text{EM}_{532\text{ nm}}$ -Filter gemessen, während die mCherry-Fluoreszenz mit einem  $\text{EX}_{580\text{ nm}}/\text{EM}_{610\text{ nm}}$ -Filter erfasst wurde. Die Messungen erfolgten dabei alle 20 Minuten über die gesamte Dauer der Kultivierung. Die Induktion der heterologen Genexpression erfolgte während der frühen logarithmischen Wachstumsphase (ca. 4,5 h nach der Inokulation) durch Zugabe des Induktionsmoleküls IPTG (Cas: 367-93-1), L-Arabinose (Cas: 5328-37-0) bzw. Salicylsäure (Cas: 69-72-7) (Tab. 2.4)). Die Stammlösungen wurden in 100-facher Konzentration in Wasser oder 70 %-igem Ethanol

hergestellt. Der dynamische Bereich eines Expressionssystems ist definiert als das Verhältnis zwischen der Fluoreszenzintensität des höchsten Signals und dem der nicht-induzierten Kontrolle (Chan *et al.*, 2023; Kruse *et al.*, 2023).

#### **2.2.1.4.2 Kultivierung rekombinanter *Halopseudomonas* spp. für Expressions- und Produktionsstudien zum Abbau von Impranil® DLN-SD**

Hauptkulturen von *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 wurden mit einer optischen Dichte  $OD_{580\text{ nm}}$  von 0,1 inokuliert und in einem 100 mL Erlenmeyerkolben, befüllt mit 10 mL  $LB_{\text{Suc}}$  (Tab. 2.10), welches mit 0,4 % (v/v) Impranil®-DLN-SD (Tab. 2.4) und dem entsprechenden Selektionsdruck (Tab. 2.11) versetzt wurde, kultiviert. Die Zellen wurden schließlich für 48 h bei 30 °C und 130 rpm inkubiert. Die Zelldichte wurde jede Minute in Echtzeit über die Streulichtintensität bei 521 nm mit Hilfe des „Cell Growth Quantifiers“ (Tab. 2.1) überwacht.

Zur Kultivierung auf Festmedium wurden 4 mL Impranil® DLN-SD zu 1 L LB-Agar mit 3 % (w/v) NaCl und wenn benötigt einem geeigneten Antibiotikum gegeben und gründlich vermischt (Molitor *et al.*, 2020). Die Kultivierung erfolgt dann unter Standardbedingungen (Kapitel 2.2.1.1).

#### **2.2.1.5 Induktion von Stress während der Kultivierung von *Halopseudomonas* spp.**

Hauptkulturen von *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 wurden mit einer optischen Dichte  $OD_{580\text{ nm}}$  von 0,1 inokuliert und in einer Round Well Plates® unter Verwendung des Mikrobioreaktors BioLector I (Tab. 2.1) kultiviert. Die Zelldichte wurde alle 20 Minuten in Echtzeit über die Streulichtintensität bei 620 nm überwacht. Die Stressinduktion erfolgte zu Beginn (ca. 4,5 h nach Inokulierung) oder gegen Ende (ca. 9 h nach Inokulierung) der logarithmischen Wachstumsphase durch die Hinzugabe des Stressors. Bei der Induktion von Osmostress wurden verschiedene Mengen eines Salzes eingewogen und direkt zur Kultur hinzugeben.

##### **2.2.1.5.1 Bestimmung der Osmotoleranz mittels Phenotyp MicroArray™**

Bei Phenotyp MicroArray™ (PM) (Tab. 2.3) handelt es sich um 96-well Platten, die bereits mit verschiedenen chemischen Komponenten befüllt sind. Hier wurden PM9 Platten (Tab. 2.3) zur Abschätzung der Osmotoleranz verwendet, welche verschiedene Salze in unterschiedlichen Konzentrationen beinhaltet. Um nun die Toleranzen eines Organismus zu bestimmen, wurden zunächst die *Halopseudomonas* spp. auf Agarplatten (s. Kapitel 2.2.1.1) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen durch eine sterile Impföse von der Agarplatte entfernt und in ein steriles 2 mL Reaktionsgefäß, gefüllt mit 1,6 mL HM (Tab. 2.10), überführt und resuspendiert. Anschließend wurde eine Durchlässigkeit im Photometer ( $\lambda = 590\text{ nm}$ ) von 42 % (0,169) eingestellt und 1,5 mL wurden zu 15 mL eines

Reaktionsgemischs (1,25 mL Redox-Dye A, 6,25 mL HM) hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Daraufhin wurden 15 µL dieser Mischung (82 % Durchlässigkeit) in ein steriles 15 mL Reaktionsgefäß, gefüllt mit 12 mL „IF-10+ dye“, gegeben. Abschließend wurde die PM9-Platte durch Hinzugabe von 100 µL/*well* des inokulierten IF-10+ Mediums befüllt und bei 30 °C für sieben Tage kultiviert. Die bakterielle Stoffwechselaktivität wurde regelmäßig über Absorption anhand der reduzierten Form des enthaltenen Tetrazolium-Farbstoffs mit dem Mikroplatten-Lesegerät "Infinite M1000 pro" (**Tab. 2.1**) bei 590 nm gemessen. Die Reduktion des Tetrazolium-Farbstoffs korreliert mit der Stoffwechselaktivität und somit dem bakteriellen Wachstum.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Manipulation von DNA

#### 2.2.2.1.1 Plasmidisolierung aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Sie erfolgte unter Anwendung des „innuPREP Plasmid Mini Kit“ (**Tab. 2.6**) nach den Anweisungen des Herstellers. Für die Elution wurde Nuklease-freies Wasser, welches auf 65 °C erwärmt wurde, verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.2.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die PCR durchgeführt (Saiki *et al.*, 1988; Mullis & Faloona, 1987). Hierzu wurde die Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity (ThermoFisher Scientific) oder die Q5<sup>®</sup> High-Fidelity (New England Biolabs) DNA-Polymerasenach Herstellerangaben verwendet. Die eingesetzten Oligonukleotide sind in **Tab. 2.8** gelistet. Als DNA-Matrize diente entweder Plasmid-DNA oder genomische DNA. Um die DNA eines bakteriellen Klons zu amplifizieren wurde dieser in 20 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und für 10 min bei 95 °C lysiert. Anschließend wurde 1 µL dieser Suspension als DNA-Matrize eingesetzt.

#### 2.2.2.3 DNA-Amplifikation mittels *overlap-extension*-PCR (OE-PCR)

Die OE-PCR wird verwendet, um entweder zwei oder mehr DNA-Fragmente zu einem größeren Polynukleotidfragment zusammenzufügen oder um spezifische Mutationen einzufügen (Bryksin & Matsumura, 2010). Zunächst wurden die einzelnen Fragmente durch PCR (s. Kapitel **2.2.2.2**) erzeugt. Die verwendeten Primer wurden mit einem Überhang am 5'-Ende konstruiert, welcher komplementär zum folgenden Fragment ist. Im nächsten Schritt wurde jedes DNA-Molekül um die neue komplementäre Sequenz erweitert, indem die PCR ohne zusätzliche Oligonukleotide durchgeführt wurde. Anschließend wurde eine

weitere PCR durchgeführt, bei der nur die Oligonukleotide der entfernten Enden verwendet wurden, sodass die vollständige fusionierte Sequenz amplifiziert wird.

#### **2.2.2.4 DNA-Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen**

Die hydrolytische Spaltung von DNA-Fragmenten durch Typ-II-Restriktionsendonukleasen wurde mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern und Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Restriktionsansätze enthielten 10 % (v/v) Enzymlösung, 10 % (v/v) des jeweiligen Restriktionspuffers und etwa 4 µL DNA bei einem Gesamtvolumen von 10 µL. Die Reaktionen wurden bei 30 °C oder 37 °C für 1 bis 2 Stunden inkubiert. Nach der hydrolytischen Spaltung wurde das Enzym gemäß den Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert.

#### **2.2.2.5 Rekombination von DNA-Fragmenten mittels Ligation**

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten durch Ligation wurde die T4 DNA-Ligase gemäß den Herstellerangaben bei 16 °C für 30 min durchgeführt (Weiss *et al.*, 1968). Die Reaktion wurde durch eine Inkubation bei 75 °C für 5 min gestoppt.

#### **2.2.2.6 InFusion® HD-Klonierung**

Die In-Fusion® HD-Klonierung (**Tab. 2.6**) ist eine Ligase-unabhängige Methode zum nahtlosen Einfügen von DNA-Fragmenten in ein linearisiertes oder PCR-amplifiziertes Plasmidrückgrat. Die Oligonukleotide wurden gemäß den Herstellerangaben zum Kit konstruiert und mit den Produkten der entsprechenden PCR die Reaktion durchgeführt.

#### **2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Daher wurden Agarosegele mit 1 % (w/v) Agarose und 5 µl "MidoriGreen Advanced DNA/RNA dye" (**Tab. 2.4**) gelöst in 400 mL 0,5x TBE-Puffer (**Tab. 2.5**) hergestellt. Die Proben wurden mit 5-fachem DNA-Probenpuffer (**Tab. 2.5**) gemischt und auf das vorbereitete Agarosegel geladen. Als DNA-Standard wurde der 'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder' (**Tab. 2.4**) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer (**Tab. 2.1**) bei einer Spannung von 100 V für 25 min bis 40 min durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit einem 'Blue/Green LED Transilluminator XL' (**Tab. 2.1**) nachgewiesen und dokumentiert. Die Detektion basiert auf DNA-gebundenem MidoriGreen, welches nach Lichtexposition (Ex = 480 nm bis 530 nm, Em = 530 nm) Fluoreszenz zeigt.

### 2.2.2.8 Isolation von DNA-Fragmenten von Agarosegelen

Für die Isolation und Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das "innuPREP DOUBLEpure Kit" (**Tab. 2.6**) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Elution der DNA wurden 20 µL auf 65 °C erwärmtes, Nuklease-freies Wasser verwendet.

### 2.2.2.9 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden verwendet, um alle generierten Plasmide, sowie genomische DNA-Sequenzen zu überprüfen. Hierzu wurde nach der modifizierten Methode von Sanger durch die Firma MWG Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) sequenziert (Sanger *et al.*, 1977).

### 2.2.2.10 Untersuchung des Transkriptom

Für die Transkriptomanalyse wurde *H. littoralis* wie in Kapitel **2.2.1.1** und **2.2.1.5** beschrieben kultiviert. Der Stress wurde zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase durch Zugabe von 4 % (w/v) NaCl induziert. Die Proben wurden 1 h und 4 h nach Stressinduktion geerntet (1 min, 21 000 x g), auf eine OD<sub>580 nm</sub> von 1 eingestellt und schockgefroren. Als Referenz diente eine *H. littoralis* Kultur, die keinem osmotischen Stress ausgesetzt war und zeitgleich mit der 4 h Probe geerntet wurde.

Die Probenaufbereitung und Analyse erfolgte innerhalb eines Kooperationsprojekts mit dem *Microbial Genomics and Biotechnology Center for Biotechnology* (CeBiTec) der Universität Bielefeld. Die RNA-Isolation von biologischen Triplikaten erfolgte mit Hilfe des „Quick-RNA Miniprep“ Kits. Anschließend wurden die Proben mit DNase behandelt und erneut wurde die RNA mittels „RNA Clean&Concentrator-5“ Kit isoliert (**Tab. 2.6**). Zum Entfernen der ribosomalen RNA (rRNA) wurde „riboPOOL für Bakterien“ angewandt (**Tab. 2.6**). Die Reinheit der RNA und die Abwesenheit der rRNA wurden schließlich mit dem „Agilent RNA Pico 6000“ Kit und dem „Agilent 2100 Bioanalyzer“ überprüft (**Tab. 2.6**). „TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation guide“ (Illumina, San Diego, USA) wurde daraufhin verwendet, um eine cDNA-Bibliothek zu generieren. Diese wurde dann mit Hilfe von „Illumina NextSeq500 High-Output-Modus paired end“ mit einer Länge von 75 bp sequenziert.

Die so generierten Daten wurden unter Verwendung von bowtie2 v2.2.7 (Langmead & Salzberg, 2012) und der Einstellung „paired end mapping“ gegen die Genomsequenz von *H. littoralis* (GenBank [LT629748.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT629748.1)) aufgetragen (Pascual *et al.*, 2012). Die so gewonnenen Daten wurden anschließend vom SAM-Format zum BAM-Format durch SAMtools v1.3 konvertiert und in die Software ReadXplorer v2.2 importiert (Hilker *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2009). Differenzielle Genexpressionsanalyse von biologischen Triplikaten wurde durch DESeq2 mit ReadXplorer v2.2 durchgeführt (Hilker *et al.*, 2016; Love *et al.*, 2014).

Bei der Auswertung von differentiell transkribierten Genen wurden nur Daten mit einem korrigierten p-Wert ≤0,01 berücksichtigt und solche mit einem Signalintensitätsverhältnis

(M-Wert) von  $\geq 1,5$  oder  $\leq -1,5$ , da hier von methodisch signifikanten Unterschieden auszugehen ist.

## 2.2.3 Spektroskopische Methoden

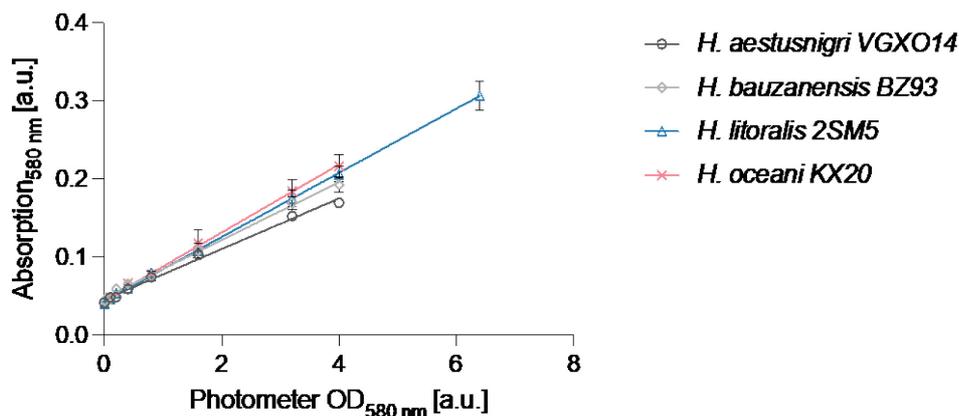
### 2.2.3.1 Messungen der Zelldichte

Die Zelldichte wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 580 nm unter Verwendung einer Küvette (Spaltbreite 1 cm) und einem Photometer (**Tab. 2.1**) bestimmt. Bei Verwendung des BioLector I wurde das Zellwachstum über die Streulichtintensität bei 620 nm bestimmt und wird folgend Biomasse genannt.

### 2.2.3.2 Absorptions- und Emissionsspektren von Fluoreszenzproteinen

Die Absorptions- und Emissionsspektren der *in vivo* Proben wurden mit einem Mikroplatten-Lesegerät "Infinite M1000 pro" (**Tab. 2.1**) gemessen. Hierzu wurden 20  $\mu\text{L}$  der Hauptkulturen entnommen und in 80  $\mu\text{L}$  50 mM Tris-Puffer verdünnt. Anschließend wurde mit dem Plattenphotometer die Absorption bei 580 nm bestimmt, sowie Emissionsspektren aufgenommen (mCherry:  $\lambda_{\text{Ex}} = 550 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 570 - 800 \text{ nm}$ ; eYFP:  $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 500 - 700 \text{ nm}$ ).

Die gemessenen Absorptionen wurden mit Hilfe geeigneter Kalibriergeraden auf  $\text{OD}_{580 \text{ nm}}$  (**Abb. 2.1**) umgerechnet, um schließlich die Zelldichte-normierte Fluoreszenz zu berechnen.



**Abb. 2.1:** Kalibriergeraden zur Bestimmung der  $\text{OD}_{580 \text{ nm}}$ .

*H. aestusnigri* VGXO14:  $y = 0,0324x + 0,045$ ,  $R^2 = 0,994$  (dunkelgrau); *H. bauzanensis* BZ93:  $y = 0,0371x + 0,0471$ ,  $R^2 = 0,996$  (hellgrau); *H. litoralis* 2SM5:  $y = 0,0435x + 0,0441$ ,  $R^2 = 0,998$  (rosa); *H. oceani* KX20:  $y = 0,0411x + 0,043$ ,  $R^2 = 0,9995$  (blau). Die gezeigten Daten stammen aus einer biologischen Dreifachbestimmung. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken dargestellt.

## 2.2.4 Analytische Methoden

### 2.2.4.1 Extraktion der kompatiblen Solute Ectoin und 5-Hydroxyectoin

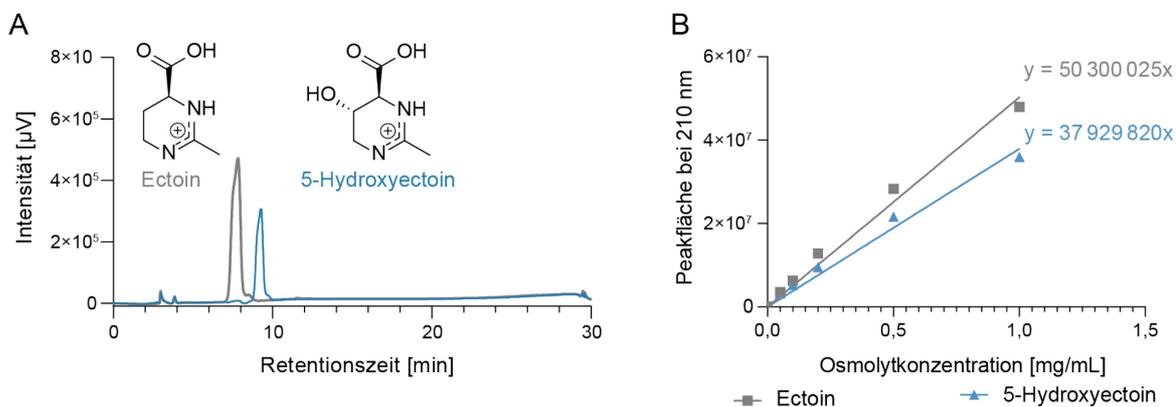
Zur Bestimmung der produzierten Menge an kompatiblen Solute, wurden diese zunächst isoliert. Hierzu wurde die Extraktion mittels Methanol, Chloroform und Wasser durchgeführt (Kunte et al., 1993). Die gesammelten Proben (s. Kapitel **2.2.1.5**) wurden zunächst auf

OD<sub>580 nm</sub> 0,333 eingestellt, was einem Zellrockengewicht von 1,0 mg ± 0,2 mg entsprechend ermittelt wurde und für 2 min bei 21 000 x g geerntet. Das resultierende Zellpellet wurde in 120 µL MiliQ-H<sub>2</sub>O (MQ-H<sub>2</sub>O) resuspendiert mit 300 µL Methanol und 120 µL Chloroform versetzt. Die Suspension wurde für 5 min bei 35 °C schüttelnd im Thermoblock (700 rpm, **Tab. 2.1**) inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils weitere 170 µL Chloroform und MQ-H<sub>2</sub>O hinzugegeben und erneut für 10 min bei 35 °C schüttelnd inkubiert. Durch Zentrifugation (2 min, 12 000 xg) erfolgte eine klare Phasentrennung und die obere wässrige Phase konnte in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt werden. Um übrige Zelltrümmer zu entfernen, wurde eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 21 000 xg durchgeführt.

#### **2.2.4.2 Bestimmung der Ectoin- und 5-Hydroxyectoinmenge mittels Flüssigchromatographie**

Zur Detektion und Bestimmung der relativen enthaltenen Mengen Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurde die HPLC-Analyse mit angeschlossener Photodiodenzeile (PDA) angewandt (**Tab. 2.1**). Die extrahierten Proben (s. Kapitel **2.2.4.1**) wurden zunächst durch Filtration (CHROMAFIL®, **Tab. 2.3**) weiter aufbereitet und anschließend 100 µL in HPLC-Gefäße mit passendem 100 µL Einsatz überführt (**Tab. 2.3**). Als Säule wurde eine SeQuant® ZIC®-pHILIC (**Tab. 2.1**) mit einer mobilen Phase bestehend aus Acetonitril (Lösungsmittel A) und 10 mM Ammoniumcarbonatpuffer pH 9.3 mit 5 % Acetonitril (Lösungsmittel B). Die Flussrate betrug 0,5 mL/min bei einer Temperatur des Säulenofens von 35 °C. Zur Analyse der beiden kompatiblen Solute wurden 20 µL der Proben injiziert und der folgende Chromatographie-Gradient durchgeführt:

Gestartet wurde mit 75% Acetonitril für 1 min, bis die Konzentration von Lösungsmittel B innerhalb von 19 min auf 75 % B gesteigert. Diese Konzentration wurde für 4 min gehalten bis sie innerhalb einer Minute wieder auf das Ursprungsverhältnis geändert und die Säule für 5 min für den nächsten Lauf äquilibriert wurde. Die Absorptionsspektren wurde mittels PDA über einen Wellenlängenbereich von 190 – 800 nm gemessen. Kommerzielle Referenzpräparationen von Ectoin und 5-Hydroxyectoin (**Tab. 2.4**) zeigten Retentionszeiten von ungefähr 8,2 min bzw. 9,5 min. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen dieser Standardsubstanzen konnten Kalibriergeraden zur Berechnung der intrazellulären Ectoin- und 5-Hydroxyectoinmenge aus den Peakflächen der entsprechenden Signale in den Chromatogrammen bei 210 nm erstellt werden (**Abb. 2.2**).



**Abb. 2.2: Chromatogramme und Kalibriergeraden durch Korrelation der Signalfächen bei LC-UV-Detektion von Ectoin und 5-Hydroxyectoin mit der Probenkonzentration.**

**A:** Die Signalintensitäten der Referenzproben Ectoin (grau, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) und 5-Hydroxyectoin (blau, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) bei 210 nm wurde gegen die Retentionszeit aufgetragen. **B:** Die Kalibriergeraden von Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurden erstellt, indem die Integrale unter den Signalen bei 210 nm in Chromatogrammen zu unterschiedlich verdünnten Referenzproben gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen wurden.

### 2.2.4.3 Identifizierung von Ectoin und 5-Hydroxyectoin durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS)

Für die Identifizierung der kompatiblen Solute Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurde eine LC-MS-Messung in Kooperation mit Frau Birgit Henßen aus dem Institut für Bioorganische Chemie (IBOC) der HHU Düsseldorf durchgeführt. Hierzu wurde die Anlage HP Series LC/MSD der Firma Agilent Analytical Instruments mit der SeQuant® ZIC®-pHILIC Säule verwendet (**Tab. 2.1**). Die Methode für die Flüssigchromatographie entsprach der aus Kapitel 2.2.4.2. Die Detektion erfolgte mit einem G1315A DA-Detektor bei 210 nm. Zudem erfolgte eine Analyse mittels G1946A Massenspektrometer (Quelle: API-ES, *positive ion mode*, Detektor: Single Quadrupol mit einem  $m/z$ -Bereich von 100-2000). Die MS-Daten wurden herangezogen, um die Signale der HPLC-Analyse eindeutig 5-Hydroxyectoin und Ectoin zuordnen zu können. Die Signale zur Retentionszeit lagen hier bei 7,6 min (Ectoin) und 8,8 min (5-Hydroxyectoin). Das erwarteten  $m/z$  Signale für Ectoin betrug 143 und für 5-Hydroxyectoin 159.



### 3 Ergebnisse und Diskussion

Viele Vertreter der Gattung *Halopseudomonas* wurden aus Lebensräumen isoliert, in denen schwierige Bedingungen herrschen wie z. B. Kontaminationen mit toxischen Substanzen, erhöhte bzw. ständig wechselnde Temperaturen oder hoher osmotischer Druck. Die meisten der derzeit 26 identifizierten Arten wurden innerhalb der letzten 20 Jahre zum ersten Mal beschrieben (**Tab. 1.3**). Zunächst wurden sie als *Pseudomonas pertucinogena*-Linie innerhalb der Pseudomonaden eingeordnet und bilden hier einen einzigartigen phylogenetischen Ast im Stammbaum (Peix *et al.*, 2018). Erhebliche molekulare und metabolische Unterschiede zu ihren Artverwandten erforderten allerdings eine kürzliche Neuklassifizierung als *Halopseudomonas* (syn. *Neopseudomonas*) innerhalb der *Pseudomonadaceae* (Rudra & Gupta, 2021).

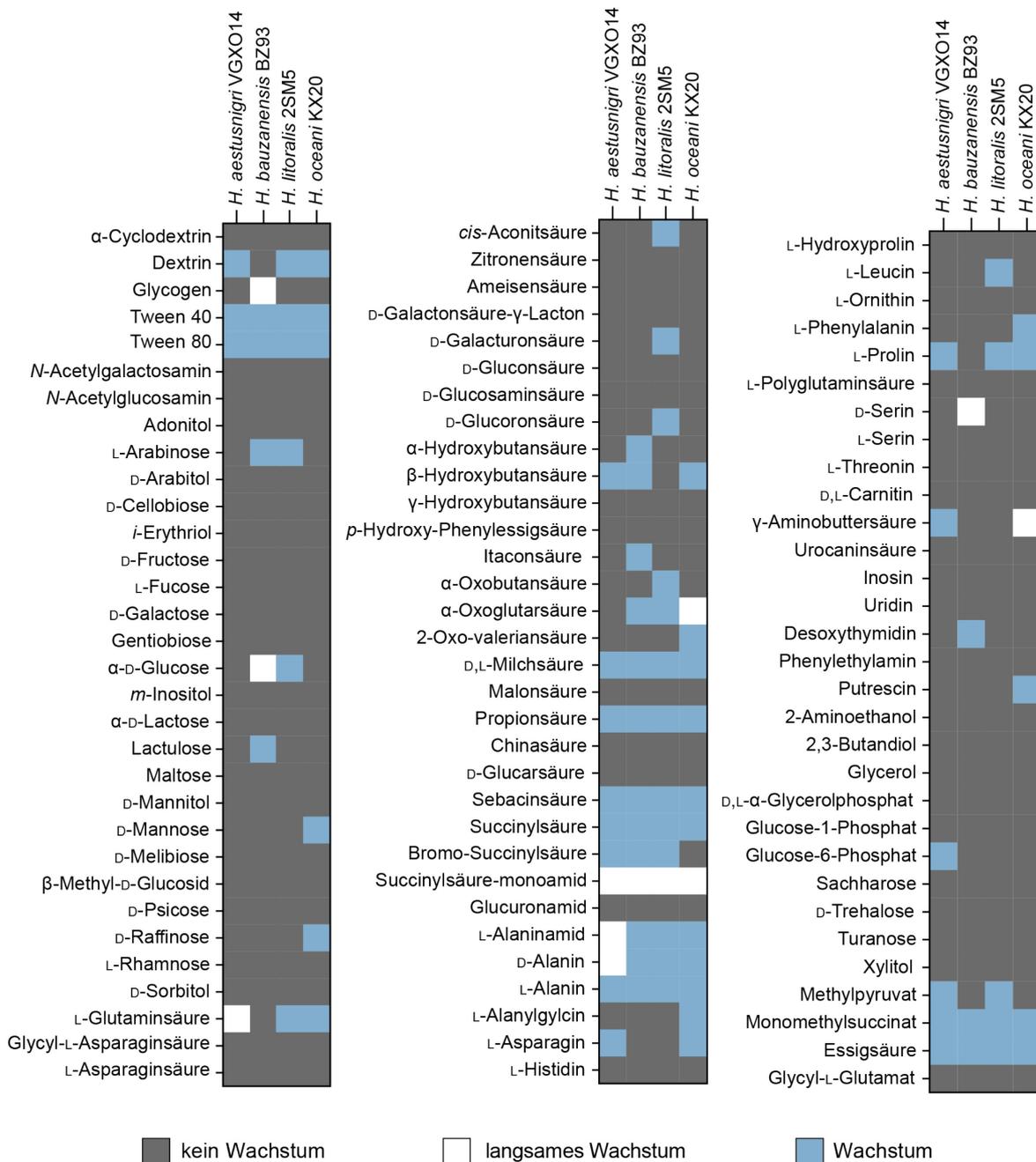
#### 3.1 Auswahl von vier Modellvertretern für die Gattung *Halopseudomonas*

Es konnte gezeigt werden, dass die Vertreter der *Halopseudomonas* spp. viele vielversprechende biotechnologische Eigenschaften aufweisen (s. Kapitel 1.5). Die bislang beschriebenen Eigenschaften lassen zum Beispiel auf ein hohes intrinsisches Potenzial dieser Arten schließen physikalische und chemische Belastungen zu tolerieren. Dennoch sind diese Organismen ökologisch und physiologisch bislang wenig erforscht. Die Ursache dafür mag an mangelnden Referenzgenomen, Stoffwechselmodellen und/ oder robusten molekularbiologischen Werkzeugen liegen. Um diese vielversprechenden Kandidaten für biotechnologische Anwendungen nähergehend zu untersuchen, wurden stellvertretend vier Organismen ausgewählt. Als Kriterien dienten unterschiedliche harsche Habitats, sowie die eurythermen und euryhalinen Eigenschaften.

*H. aestusnigri* VGXO14 wurde aus einer mit Rohöl-kontaminierten Sandprobe der Gezeitenzone isoliert (Sánchez *et al.*, 2014). Mit Hilfe von Datenbank Recherchen konnte gezeigt werden, dass dieses Bakterium eine nennenswerte Anzahl lipolytischer Enzyme aufweist, von denen einige eine erstaunliche Substratpromiskuität und Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln aufweisen (Bollinger *et al.*, 2020a; Coscolín *et al.*, 2019). Das Bodenbakterium *H. bauzanensis* BZ93 wurde aus dem Boden einer Chemiefabrik isoliert (Zhang *et al.*, 2011). Somit könnten beide Organismen vielversprechende Kandidaten für Chassis-Stämme mit potenzieller Chemikaliertoleranz sein und zum biologischen Abbau von Schadstoffen beitragen, die durch menschengemachte Verunreinigungen entstehen. In diesem Zusammenhang konnte bereits der Abbau von Poly(ethylenterephthalat) bei Raumtemperatur für Enzyme aus *H. aestusnigri* VGXO14 und *H. bauzanensis* BZ93 nachgewiesen werden (Avilan *et al.*, 2023; Bollinger *et al.*, 2020c). Der durchschnittliche isoelektrische Punkt (*pI*) des Proteoms von *H. bauzanensis* konnte mit Hilfe von Proteom-*pI* 2.0 (**Tab. 2.2**) bestimmt werden und

beträgt 6,07. Im Vergleich dazu liegen die Werte für artverwandte Pseudomonaden bei 6,5. Die Proteome der anderen *Halopseudomonas*-Arten waren nicht hinterlegt. Allerdings konnte für die Carboxylesterase CE13 aus *H. aestusnigri* mit 4,01 ein ebenfalls niedriger *pI* bestimmt werden, welcher durch auffällig viele negativ geladene Aminosäuren an der Proteinoberfläche bedingt ist (Bollinger, 2020). Da eine Strategie zur Anpassung an konstant hohe Salzkonzentration, eine Verschiebung des *pI*s des Proteoms und eine Akkumulation von negativgeladenen Aminosäuren an der Proteinoberfläche darstellt (s. Kapitel 1.2.1) (Czech *et al.*, 2018a), würde diese Beobachtung mit den Bedingungen in den natürlichen Habitaten übereinstimmen. Neben diesen beiden Arten wurden auch zwei Meerwasserisolate ausgewählt, nämlich *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20. *H. litoralis* wurde ebenfalls aus der Gezeitenzone isoliert und dürfte von Natur aus mit den sich ständig ändernden Bedingungen zurechtkommen. Er kann bis zu 15 % (w/v) NaCl tolerieren, was die höchste beschriebene Osmotoleranz unter *Halopseudomonas* spp. darstellt (Tab. 1.3) (Pascual *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu wurde der Tiefseeorganismus *H. oceani* aus einem Lebensraum mit hohem Druck und niedriger Temperatur isoliert, was sich in der Fähigkeit widerspiegelt, bei 4 °C zu wachsen, aber auch Temperaturen bis zu 42 °C zu tolerieren (Wang & Sun, 2016).

Um einen Überblick über metabolisierbare Kohlenstoffquellen der vier ausgewählten *Halopseudomonas* spp. zu erhalten, wurden die in den Stammbeschreibungen beschriebenen metabolischen Profile zusammengetragen (Abb. 3.1).

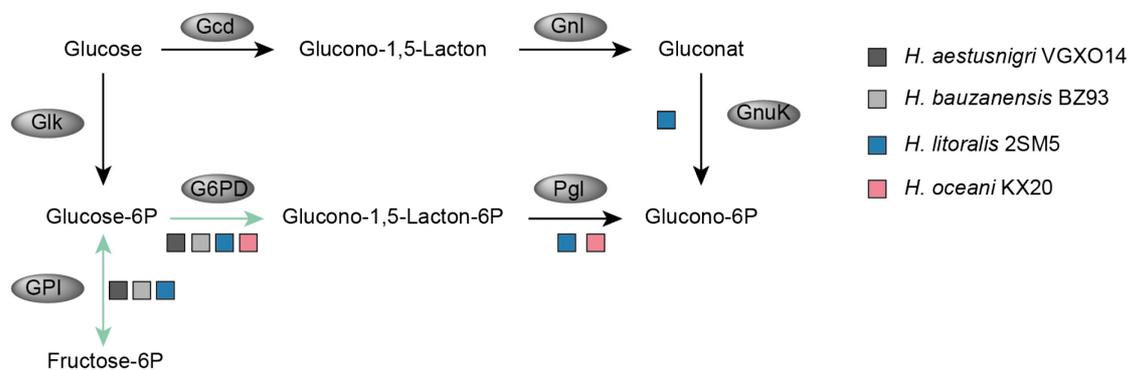


**Abb. 3.1: Übersicht über die beschriebenen metabolisierbaren Kohlenstoffquellen der *Halopseudomonas* spp.**

Die gezeigte Übersicht beruht auf den Stammbeschreibungen der untersuchten *Halopseudomonas* spp. (Sánchez *et al.*, 2014; Pascual *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Grau: kein Wachstum; weiß: langsames Wachstum; blau: Wachstum. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

Mit Hilfe dieser Recherche sollte vor allem evaluiert werden, ob es C-Quellen gibt, die von allen vier Vertretern metabolisiert werden können. Interessanterweise fällt zunächst auf, dass nicht viele C-Quellen metabolisiert werden können. Insbesondere können kaum Zucker verstoffwechselt werden, auch nicht in der Form von Glucose-6-Phosphat, was ein direktes Intermediat des klassischen Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) Stoffwechselwegs darstellt. Um zu evaluieren, ob nur einzelne Enzyme zur Aufnahme oder Metabolisierung fehlen, sollte der Metabolismus der *Halopseudomonas*-Arten bioinformatisch mit dem von

*P. putida* verglichen werden. In *P. putida* wird Glucose zu 90 % in Gluconat umgewandelt und tritt schließlich in Form von Gluconat-6-Phosphat in den zentralen Kohlestoffwechsel ein und nur 10 % werden ausgehend von Glucose direkt zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt (Nikel *et al.*, 2015). Von *P. putida* und *P. aeruginosa* ist bekannt, dass sie mit dem Entner-Doudoroff-EMP (EDEMP)-Zyklus einen weniger klassischen Stoffwechselweg zur Verstoffwechslung von Glucose aufweisen (Kohlstedt & Wittmann, 2019; Nickel *et al.*, 2015). *Halopseudomonas* spp. scheinen sowohl EMP-, als auch der *Pseudomonas*-typische EDEMP-Stoffwechselweg oder zumindest die Transporter zur Aufnahme der Zucker zu fehlen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde nach homologen Proteinen in *Halopseudomonas* spp. gesucht. Da keine Daten der *Halopseudomonas* spp. in der KEGG-Datenbank verfügbar waren, erfolgten die Untersuchungen der Genomsequenzen *via* BlastKOALA vermittelter Zuordnung von KEGG-Nummern (Kanehisa *et al.*, 2016) und anschließender Kartierung der Stoffwechselwege mit dem KEGG Mapper (Kanehisa & Sato, 2020) (**Abb. 3.2**).



**Abb. 3.2: Auszug aus dem zentralen Kohlenstoffwechsel der *Halopseudomonas* spp.**

Dargestellt ist der Stoffwechselweg zur Verstoffwechslung der Glucose. Enzyme zu denen Homologe in den verschiedenen *Halopseudomonas*-Arten mittels BlastKOALA und KEGG-Mapper identifiziert wurden sind durch quadratische Kästen gekennzeichnet: *H. aestusnigri* VGXO14 (dunkelgrau); *H. bauzanensis* BZ93 (hellgrau); *H. litoralis* 2SM5 (blau); *H. oceani* KX20 (rosa). Der vollständige Auszug zu der KEGG Darstellung des Metabolismus der jeweiligen *Halopseudomonas* spp sind in **Abb. A1**, **Abb. A2**, **Abb. A3** und **Abb. A4** gezeigt. Gcd: Glucose-1-dehydrogenase; Gnl: Gluconolactonase; GnuK: Gluconokinase; Glk: Glucokinase; G6PD: Glucose-6-Phosphat-1-dehydrogenase; Pgl: 6-Phosphogluconolactonase; GPI: Glucose-6-Phosphat-Isomerase; P: Phosphat.

Anhand der erhaltenen Daten wird deutlich, dass im Vergleich zu *P. putida* der Glucose-Stoffwechsel tatsächlich nicht im Genom konserviert ist und mit der Glucose-1-dehydrogenase Gcd und der Gluconokinase GnuK in *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis* und *H. oceani* zwei wichtige Enzyme fehlen, um Glucose über den Gluconat Stoffwechselweg zu metabolisieren. Auch die Umsetzung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat durch die Glucosekinase Glk erfolgt demnach in keiner der ausgewählten Bakterien. Auf dieser Grundlage bleibt unklar, wie die (langsame) Stoffwechselaktivität in den Beschreibungen zu *H. litoralis* und *H. bauzanensis* zustande kam (Pascual *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Diese Computer-basierte Recherche deutet

darauf hin, dass „klassische“ Glucose-haltige Nährmedien für die Anzucht von *Halopseudomonas* spp. ungeeignet scheinen.

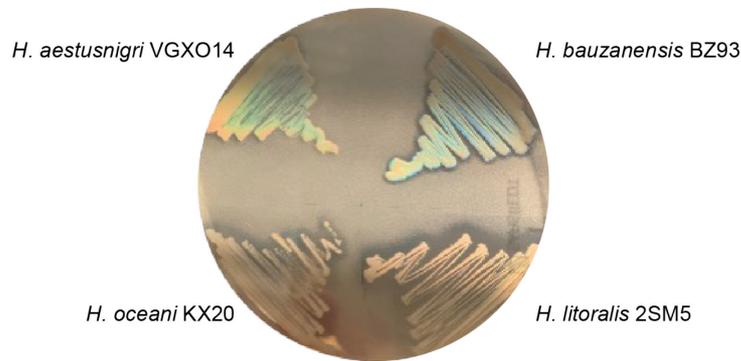
Um nun zu überprüfen, ob sich diese vielversprechenden Organismen für biotechnologische Anwendungen und damit für weitere Untersuchungen eignen, sollte in einem ersten Schritt untersucht werden, wie sie sich das Wachstum der vier ausgewählten Kandidatenstämme unter typischen Laborbedingungen verhält.

Um die Gattung *Halopseudomonas* näher zu untersuchen, wurden stellvertretend die vier Kandidatenstämme *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 ausgewählt.

Diese Organismen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen natürlichen harschen Habitate isoliert, wobei zwei marine und zwei terrestrische Isolate ausgewählt wurden. Darüber hinaus unterscheiden sich die Organismen in ihrer Toleranz gegenüber Salz und Temperatur. Somit wurde eine möglichst diverse Auswahl getroffen, um diese Spezies stellvertretend mikro- und molekularbiologisch zu etablieren.

### 3.2 Wachstum von *Halopseudomonas* spp. unter Laborbedingungen

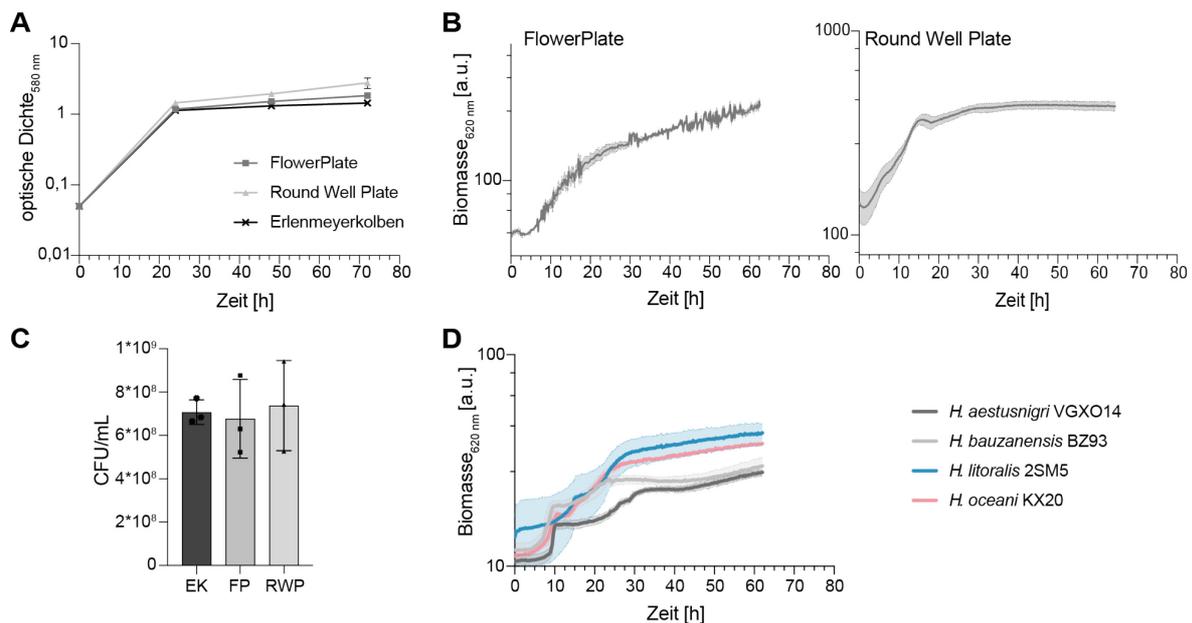
Basierend auf den Ergebnissen der oben gezeigten Recherche sollten im ersten Schritt Kultivierungsbedingungen für die ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten identifiziert werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben, bilden diese Stämme auf LB-Agar kleine beige, nicht pigmentierte Kolonien (Wang & Sun, 2016; Sánchez *et al.*, 2014; Pascual *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Bei Supplementierung des Agars mit Impranil® DLN (s. Kapitel 2.2.1.4.2) bilden sich Klärhöfe um die Kolonien, die auf eine Polyesterhydrolyseaktivität hinweisen (Molitor *et al.*, 2020). Bei der Kultivierung auf LB-Impranil® DLN-Agar zeigte *H. litoralis* den größten Klärhof, gefolgt von *H. oceani*, während der kleinste Klärhof um *H. aestusnigri*-Kolonien beobachtet wurde (**Abb. 3.3A**). Darüber hinaus zeigten dicht bewachsene Bereiche, wie Bakterienrasen, bei Durchleuchtung irisierende Lichtbrechungseigenschaften (**Abb. 3.3A**), die bislang nicht für *Halopseudomonas* spp. beschrieben wurden. Diese Beobachtung deutet auf eine koordinierte Bewegung und Organisation von Zellen in bestimmten Nanostrukturen innerhalb des Rasens oder auf die Produktion von Exopolysacchariden hin, was zu diesen Interferenzfarben führt (Mizuno *et al.*, 2022; Kientz *et al.*, 2012).



**Abb. 3.3: Phänotypen der ausgewählten *Halopseudomonas* spp. auf Agarplatten.**

Zellrasenausstrich der *Halopseudomonas*-Stämme auf LB-Impranil DLN-Agar. Zur Aufnahme des Fotos wurde die Agarplatte mit Tageslicht beleuchtet. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

Um einen molekularbiologischen Zugang zu dieser Bakterienspezies zu ermöglichen, mussten zunächst geeignete und zuverlässige Kultivierungsparameter in Flüssigkultivierungen, wie das Bioreaktorsystem und die Zusammensetzung des Mediums ermittelt werden. Die Stämme wurden zunächst in verschiedenen, mit LB-Komplexmedium gefüllten, Kultivierungsgefäßen kultiviert. Die Art und Füllung der Kultivierungsgefäße sind entscheidend für den Sauerstofftransfer, welcher durch das Oberflächen-Volumen-Verhältnis und Schüttelgeometrie und -frequenz sowie die Scherkräfte (z.B. bei Schikanen) beeinflusst wird. Hier wurde ein 100 mL Erlenmeyerkolben (10 % Füllvolumen) mit zwei für das BioLector I® System (**Tab. 2.1**) verfügbaren Mikrobioreaktorplatten verglichen, nämlich mit einer Round Well Plate® (RWP) (1 mL Füllvolumen; Sauerstofftransferrate unbekannt) und einer FlowerPlate® (FP) (1 mL Füllvolumen; Sauerstofftransferrate: 45 mmol/L/h (Herstellerangabe)) (**Abb. 3.4**).



**Abb. 3.4: Untersuchung des Einflusses verschiedener Kultivierungsgefäße auf das Bakterienwachstum.**

**A:** Am Beispiel von *H. bauzanensis* BZ93 wurde das Wachstum bei Kultivierung in LB-Medium im Erlenmeyerkolben (EK, schwarzes Kreuz), FlowerPlate® (FP, dunkelgraues Quadrat) und Round Well Plate® (RWP, hellgraues Dreieck) beobachtet. Von jeder Kultur wurden alle 24 h Proben entnommen und die OD<sub>580 nm</sub>

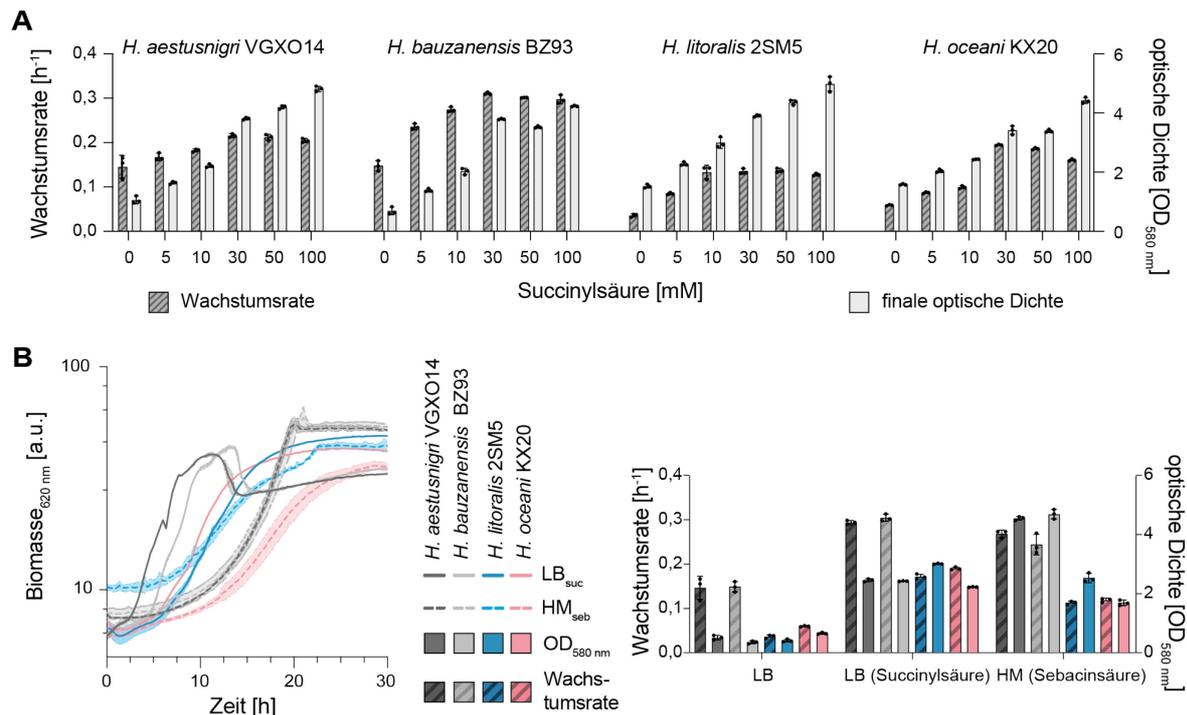
bestimmt. **B:** Wachstumskurven von *H. bauzanensis* BZ93 im BioLector I. Die Kulturen in FlowerPlates oder Round Well Plates wurden jeweils aus denselben Vorkulturen inokuliert. Das Wachstum wurde über die Lichtstreuung bei 620 nm verfolgt. Die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen beruht auf der Verwendung zweier unterschiedlicher BioLector I-Geräte. **C:** Nach 24 h Kultivierung wurden Proben entnommen und zur Zellzahlbestimmung (CFU) auf LB-Agar plattiert. **D:** Wachstum von *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 in Round Well Plates befüllt mit LB-Medium. Die dargestellten Daten stellen den Mittelwert von biologischen Triplikaten dar. Die berechneten Standardabweichungen sind entweder als Schatten oder als Fehlerbalken dargestellt. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

Bei der Kultivierung in FPs konnte eine starke Aggregatbildung innerhalb der Kulturen aller vier Arten beobachtet werden, wodurch die Aufzeichnung von Wachstumskurven mittels Lichtstreuung oder die Messung der optischen Dichte beeinträchtigt wurde (siehe linkes Diagramm (**Abb. 3.4B**)). Dies verursachte daher Probleme mit der Reproduzierbarkeit.

Die Bildung der Aggregate deutete darauf hin, dass die Zellen unter den gegebenen Bedingungen Stress erfahren haben, welcher möglicherweise durch Scherkräfte hervorgerufen wurde (Tsagkari *et al.*, 2022; Trunk *et al.*, 2018; Fakhrudin & Quilty, 2007). In Kolben als Kultivierungsgefäße wurde ein ähnliches Wachstumsverhalten wie in der RWP beobachtet. In beiden Kultivierungsgefäßen wurden außerdem weniger Aggregaten beobachtet als in der FP. Die final erreichte Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU; engl.: *cell forming unit*) pro mL lag bei allen drei Kultivierungsgefäßen in der gleichen Größenordnung (**Abb. 3.4C**). Resultierend aus diesen Experimenten wurden nachfolgend RWPs für alle weiteren Kultivierungsexperimente verwendet, um eine zuverlässige Überwachung und einen kleineren Maßstab zur besseren Parallelisierung der Kulturen im Vergleich zu Erlenmeyerkolben zu gewährleisten.

Die endgültige Zelldichte von einer  $OD_{580\text{ nm}}$  von etwa 1, die in Kolben und RWP nach 24 h erreicht wurde, war jedoch niedrig im Hinblick auf die Dichten, die mit Kulturen von *Pseudomonas* sp. oder *E. coli* sp. im selben Medium erreicht wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Nährstoffe im LB-Komplexmedium nicht ausgeschöpft wurden und das Medium für die vier getesteten *Halopseudomonas*-Stämme noch nicht optimal war. Die mehrphasige Wachstumskurve (**Abb. 3.4D**) deutet darauf hin, dass verschiedene Kohlenstoffquellen in relativ geringen Mengen Bestandteil des Komplexmediums waren (mutmaßlich verschiedene Aminosäuren (**Abb. A5**)) und nacheinander verbraucht wurden. Dies ließ die Vermutung zu, dass das komplexe LB-Medium keine ausreichende Konzentration der Kohlenstoffquellen enthält, die von *Halopseudomonas* spp. verstoffwechselt werden können. Aus diesem Grund sollten geeignete Zusatzstoffe für komplexe Medien identifiziert werden, die höhere optische Dichten ermöglichen. Alle ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten können C<sub>4</sub>- und C<sub>10</sub>-Dicarbonsäuren verstoffwechseln (**Abb. 3.1**). Daher wurden die Auswirkungen der Zufuhr von Succinylsäure (C<sub>4</sub>), als direktes Intermediat des Citratzyklus auf das Wachstum der Stämme untersucht. Zudem wurden langkettige Dicarbonsäuren betrachtet. Parallel dazu wurde ein geeignetes Mineralsalzmedium auf der Basis von HM-Medium (Hartmans *et al.*, 1989) entwickelt, das

für physiologische Studien unter kontrollierten Bedingungen geeignet ist und sich aufgrund der im Vergleich zu Komplexmedien geringeren Kosten für biotechnologische Anwendungen eignet. Infolgedessen wurde zusätzlich die Eignung als einzige Kohlenstoffquelle in HM-Medium untersucht (**Abb. 3.5**).



**Abb. 3.5: Wachstum von *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 in komplexen und Mineralsalz-Medienzusammensetzungen.**

**A:** Wachstum der ausgewählten *Halopseudomonas* spp. in LB-Medium, welches mit steigenden Konzentrationen an Succinylsäure ( $\text{C}_4$ -Dicarbonsäure) versetzt wurde. Dargestellt sind die Wachstumsrate (dunkelgrau, linke y-Achse) und die optische Dichte bei 580 nm nach 24 h (hellgrau, rechte y-Achse). **B:** Vergleich des Wachstums in LB-Medium mit 45 mM Succinylsäure (durchgezogene Linie) und HM-Medium mit 18 mM Sebacinsäure ( $\text{C}_{10}$ -Dicarbonsäure) als einzige Kohlenstoffquelle (gestrichelte Linie). Die Wachstumskurven, die durch Lichtstreuung bestimmt wurden, sind links dargestellt, und die Wachstumsraten (gestreifte Balken, linke y-Achse) und die optischen Dichten nach 24 h Kultivierung (einfarbige Balken, rechte y-Achse) sind rechts dargestellt. Die dargestellten Daten stellen den Mittelwert von biologischen Triplikaten dar. Die berechneten Standardabweichungen sind entweder als Schatten oder als Fehlerbalken dargestellt. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

Tatsächlich verbesserte die Zugabe von Succinylsäure zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (4,5 h nach Kultivierungsbeginn) zum LB-Medium das Wachstum aller vier *Halopseudomonas*-Stämme in den Batch-Kulturen (**Abb. 3.5A**). Dabei erreichten alle ausgewählten Stämme die höchsten Biomassedichten (bestimmt als finale  $\text{OD}_{580 \text{ nm}}$ ) bei den höchsten angewandten Konzentrationen von 50 mM und 100 mM Succinylsäure. Die Wachstumsverbesserung zwischen Kulturen, die mit 100 mM supplementiert wurden und solchen, die mit 50 mM supplementiert wurden, war nur geringfügig. Somit scheinen die zuvor beobachteten Limitierungen des Wachstums in LB-Komplexmedium durch einen Mangel geeigneter Kohlenstoffquellen bedingt zu sein. Maximale Wachstumsraten wurden bei der Zugabe von 30 mM Succinylsäure gemessen. Eine durch die Metabolisierung der Säure hervorgerufene pH-Verschiebung von pH 7 auf pH 10 konnte als Grund für das

veränderte Wachstum ausgeschlossen werden, da ein erhöhter pH-Wert *per se* das Wachstum von *Halopseudomonas* spp. nicht verbesserte (**Abb. A6**).

Succinylsäure stellt, wie erwähnt, ein Zwischenprodukt des Citratzyklus dar und ist als geeignete Kohlenstoffquelle für viele Bakterien etabliert, einschließlich verschiedener *Pseudomonas*-Arten (Dhamale *et al.*, 2022; Mendonca *et al.*, 2020; Collier *et al.*, 1996). *Halopseudomonas*-Spezies sollen allerdings auch in der Lage sein, seltener genutzte Dicarbonsäuren zu verstoffwechseln (**Abb. 3.1**). Deswegen wurde das Wachstum von *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 nach Ergänzung des LB- und HM-Mediums mit kurzkettigen (C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub>) und langkettigen (C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>) Dicarbonsäuren in C-äquimolaren Konzentrationen zu 45 mM Succinylsäure genauer untersucht (**Tab. 3.1; Abb. A7**). Im Allgemeinen führte die Zugabe von Dicarbonsäuren mit kürzerer Kettenlänge, wie Oxalsäure (C<sub>2</sub>-Dicarbonsäure), Malonsäure (C<sub>3</sub>-Dicarbonsäure) sowie Glutarsäure (C<sub>5</sub>-Dicarbonsäure) und Pimelinsäure (C<sub>7</sub>-Dicarbonsäure) zu geringen Wachstumsverbesserungen im Vergleich zu LB-Medium oder hemmte das Wachstum sogar. Der Stoffwechsel von kurzkettigen Dicarbonsäuren, wie Oxalsäure, ist nur von spezialisierten Bakterien bekannt, die die Enzyme Frc und Oxc besitzen (Hervé *et al.*, 2016). Gene, die für homologe Proteine kodieren, wurden in den vier *Halopseudomonas*-Arten nicht gefunden, was zu den fehlenden Wachstumsverbesserungen in den behandelten Kulturen passt. Außerdem sind negative Auswirkungen von Oxalsäure und Malonsäure zumindest in eukaryontischen Zellen bekannt, indem sie beispielsweise die Succinatdehydrogenase der Mitochondrien hemmen (Greene *et al.*, 1993), was sich in der beobachteten Inhibierung des Wachstums widerspiegeln könnte.

C<sub>6</sub>- und C<sub>8</sub>-Dicarbonsäuren, die als zusätzliche (LB) und als einzige Kohlenstoffquelle (HM) zugesetzt wurden, führten zu einer verlängerten Lag-Phase. Innerhalb der stationären Wachstumsphase erreichten die Kulturen allerdings vergleichbare Endbiomassen wie solche, die mit Succinylsäure (C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure) versetzt wurden. Insbesondere der Einsatz von den langkettigen Dicarbonsäuren Azelainsäure (C<sub>9</sub>-Dicarbonsäure) und Sebacinsäure (C<sub>10</sub>-Dicarbonsäure) als Kohlenstoffquelle in HM-Medium führte bei allen untersuchten Organismen zu vergleichbarem oder sogar besserem Wachstum, was sich in einer kürzeren Lag-Phase, einer höheren Wachstumsrate und/ oder höheren optischen Dichten zeigte (**Abb. A7**).

**Tab. 3.1: Überblick über den Stoffwechsel verschiedener Dicarbonsäuren als zusätzliche oder einzige Kohlenstoffquelle durch *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20.**

Dicarbonsäure	LB-Medium				HM-Medium			
	<i>H. aestusnigri</i>	<i>H. bauzanensis</i>	<i>H. litoralis</i>	<i>H. oceani</i>	<i>H. aestusnigri</i>	<i>H. bauzanensis</i>	<i>H. litoralis</i>	<i>H. oceani</i>
C <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
C <sub>3</sub>	-	++	++	+	-	-	-	-
C <sub>4</sub>	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++
C <sub>5</sub>	+	-	+	+	-	-	-	-
C <sub>6</sub>	+	-	++	+++	+	+	+++	+++
C <sub>7</sub>	+	-	+	+	+	-	-	-
C <sub>8</sub>	+++	+++	+++	+++	++	+	+	++
C <sub>9</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
C <sub>10</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Die C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Dicarbonsäuren wurden in C-äquimolaren Konzentrationen zu 45 mM Succinylsäure, entweder als zusätzliche Kohlenstoffquellen in LB-Medium oder als alleinige Kohlenstoffquellen in HM-Medium, getestet. Die Indikatoren korrelieren mit den relativen Biomassewerten nach 48 h. Die für LB-Medium mit Zusätzen ermittelten Werte wurden auf die Biomasse bezogen, die für den jeweiligen Stamm mit LB-Medium ohne Zusätze (100 %) erreicht wurde: - wachstumshemmend; + ein Bereich bis zu 150 %; ++ ein Bereich bis zu 180 %; +++ ein Bereich über 180 %. Die höchste Biomasse, die für den jeweiligen Stamm in HM mit einer entsprechenden Kohlenstoffquelle erreicht wurde, wurde auf 100 % festgelegt. - wachstumshemmend; + ein Bereich bis zu 50 %; ++ ein Bereich bis zu 80 %; +++ ein Bereich bis zu 100 %. Die jeweiligen Wachstumskurven sind in Abb. A7 dargestellt. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Tabelle ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

Im Vergleich der Stämme untereinander fiel auf, dass *H. aestusnigri* VGXO14 und *H. bauzanensis* BZ93 Kulturen in HM-Medium höhere finale Biomassen erreichten als in supplementiertem LB-Medium (**Abb. 3.5B**). Im Gegensatz dazu erreichten *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 eine höhere finale Biomasse, wenn das optimierte Komplexmedium verwendet wurde. *H. litoralis* und *H. oceani* verstoffwechselten ein größeres Spektrum an Dicarbonsäuren, welches vergleichbar ist mit dem von einer Kompostiranalge isolierten *H. formosensis* FZJ (de Witt *et al.*, 2023). Im Gegensatz dazu wurden *H. aestusnigri* und *H. bauzanensis* durch C<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>- und C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-Dicarbonsäuren inhibiert (**Tab. 3.1**).

Zusammenfassend wurden Succinylsäure und Sebacinensäure als die vorteilhafteste Ergänzung des LB-Mediums bewertet. Sie bewirkten die kürzeste Lag-Phase, die höchste Wachstumsrate und Endbiomasse bei allen getesteten Stämmen. Interessanterweise erwies sich die langkettigere Sebacinensäure bei Verwendung als einzige Kohlenstoffquelle als effektiver als Succinylsäure. Die maximalen Wachstumsraten, die für die vier Arten mit dem optimierten Minimalmedium (HM mit Sebacinensäure) erreicht wurden, betragen  $0,267 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,243 \pm 0,023 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,112 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$  und  $0,118 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$  für *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis*, *H. litoralis* bzw. *H. oceani*. Über die Wachstumsraten

anderer Bakterien auf Sebacinsäure wurde nur gelegentlich berichtet. Die in dieser Arbeit erzielten Raten scheinen mit denen für *C necator* berichteten Raten (Strittmatter *et al.*, 2022) vergleichbar zu sein, waren jedoch höher als die von *Pseudomonas nitroreducens* auf Sebacinsäure (Lang *et al.*, 2007; Janota-Bassalik & Bohdanowicz-Strucinska, 1974). Der bestuntersuchte Organismus im Hinblick auf den Stoffwechsel zum Abbau von langkettigen Dicarbonsäuren ist *Actinetobacter baylyi* ADP1 (Fischer *et al.*, 2008; Parke *et al.*, 2001). Dessen Wachstumsraten lagen bei Wachstum auf Sebacinsäure bei ungefähr  $0,27 \text{ h}^{-1}$  und auf Adipinsäure bei  $0,43 \text{ h}^{-1}$  (Sullivan *et al.*, 2022) und somit in derselben Größenordnung wie die von *H. aestusnigri* und *H. bauzanensis*. Die Wuchsrate des mit den *dca*-Genen aus *A. baylyi* modifizierten *P. putida* KT2440 lag bei  $0,35 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  auf Adipinsäure als Kohlenstoffquelle (Ackermann *et al.*, 2021).

Der Stoffwechsel von langkettigen Dicarbonsäuren ist unter Bakterien ebenfalls nicht weit verbreitet und erfordert eine Reihe spezialisierter Enzyme, die das jeweilige Analogon der Fettsäure- $\beta$ -Oxidation katalysieren (Sullivan *et al.*, 2022; Ackermann *et al.*, 2021). In *A. baylyi* ADP1 wird die Fettsäure- $\beta$ -Oxidation von Dicarbonsäuren durch die Proteine DcaAEFHJ katalysiert. Der erste Abbauschritt ist die Aktivierung zu Acyl-CoA durch DcaI, dem dann die Metabolisierung über  $\beta$ -Oxidation durch eine Acyl-CoA-Dehydrogenase (DcaA), eine Enoyl-CoA-Hydratase (DcaE), eine Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase (DcaH) und eine Thiolase (DcaF) folgt (Ackermann *et al.*, 2021; Parke *et al.*, 2001). Durch BLASTp-Homologiesuche konnten Homologe aller genannten Proteine in *H. litoralis* und *H. bauzanensis* (Tab. 3.2) identifiziert werden. In *H. aestusnigri* und *H. oceani* konnten keine homologe zu DcaI identifiziert werden. Das Fehlen dieser Proteine könnte allerdings auch darauf zurückzuführen sein, dass für diese Stämme keine vollständige Genomsequenz verfügbar ist.

Tab. 3.2: Homologe Proteine zu Enzymen, die für den Abbau von Dicarbonsäuren in *A. baylyi* ADP1 beschrieben wurden.

Protein	<i>H. aestusnigri</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. bauzanensis</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. litoralis</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. oceani</i> Locus-Tag	% ident
DcaK	<a href="#">B7O88_RS06080</a>	19	<a href="#">BMY02_RS03645*</a>	26	<a href="#">BLU11_RS07280*</a>	24		
DcaP			<a href="#">WP_218144722.1</a>	22	-*			
MucK	<a href="#">WP_200818422.1</a>	24	<a href="#">BMY02_RS03645*</a>	29	<a href="#">BLU11_RS07280*</a>	24	<a href="#">C1949_RS05600</a>	21
DcaI	<a href="#">B7O88_RS07895</a>	25	<a href="#">BMY02_RS10000</a>	47	<a href="#">BLU11_RS15730</a>	48		
DcaJ			<a href="#">BMY02_RS10005</a>	47	<a href="#">BLU11_RS15510</a>	47		
DcaA	<a href="#">B7O88_RS16455</a>	35	<a href="#">BMY02_RS10200</a>	79	<a href="#">BLU11_RS06175</a>	80	<a href="#">C1949_RS01775</a>	35
DcaE	<a href="#">B7O88_RS01040</a>	39	<a href="#">BMY02_RS13030</a>	44	<a href="#">BLU11_RS12290</a>	42	<a href="#">C1949_RS02560</a>	39
DcaH	<a href="#">B7O88_RS11070</a>	47	<a href="#">BMY02_RS16220</a>	48	<a href="#">BLU11_RS15865</a>	47	<a href="#">C1949_RS00785</a>	47
DcaF	<a href="#">B7O88_RS11065</a>	68	<a href="#">BMY02_RS16215</a>	66	<a href="#">BLU11_RS15870</a>	66	<a href="#">C1949_RS00790</a>	68

\*, \*\* identisches Protein. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Tabelle ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

In *A. baylyi* ADP1 werden die gesättigten Dicarbonsäuren über DcaKP aufgenommen (Parke *et al.*, 2001). BLASTp-Analysen ergaben, dass *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis* und *H. litoralis* Proteine mit einer geringen Ähnlichkeit von 19 - 15 % Identität zu DcaK aufweisen. Ein DcaP-Homolog wurde jedoch nur in *H. bauzanensis* identifiziert. Ein weiterer bekannter Transporter für die Aufnahme von Dicarbonsäuren ist MuckK (Parke *et al.*, 2001), dessen Homologe in allen untersuchten Stämmen vorhanden waren. Im Gegensatz zu *A. baylyi*, wo die *dca*-Gene in einem Cluster mit zwei Transkriptionseinheiten organisiert sind (Fischer *et al.*, 2008), scheinen die identifizierten Dca-Homologe in den Genomen der ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten auf mehr als zwei Operons verteilt zu sein, was auf Funktionen dieser Enzyme in anderen Stoffwechselwegen wie dem Abbau von Terpenen bzw. verzweigten Aminosäuren hinweisen könnte. Solche zusätzlichen Rollen der Dca-Homologe in verschiedenen Stoffwechselwegen könnten, wenn sie unterschiedlichen Regulationsprozessen unterliegen, die beobachteten Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen Kulturen erklären, die auf Dicarbonsäuren als Zusatz zum LB-Medium oder als einzige Kohlenstoffquelle in HM-Medium gewachsen sind. Es sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um die Rolle der Dca-Homologe und den Importmechanismus für den gezeigten Metabolismus langkettiger Dicarbonsäuren in *Halopseudomonas* spp. zu bestätigen.

Organismen, die von Natur aus in der Lage sind C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-Dicarbonsäuren effizient zu verwerten, sind im Zusammenhang mit dem Abbau von Kunststoffen und dem Upcycling synthetischer Polymere von Interesse, da diese Säuren Bausteine für Polyester wie Polyethylenadipat-Terephthalat (PBAT), Polyester-Polyurethan-Schaumstoffe (PEU) und -Beschichtungen, z.B. das erwähnte Impranil® DLN-SD und Nylon 6,6 sowie Bestandteile von verschiedenen Weichmachern sind (Sullivan *et al.*, 2022; Ackermann *et al.*, 2021; Howard *et al.*, 2012). Da bekannt ist, dass *Halopseudomonas* spp. Enzyme sekretiert, die Polyester depolymerisieren (Avilan *et al.*, 2023; de Witt *et al.*, 2023; Bollinger *et al.*, 2020c; Molitor *et al.*, 2020; Haernvall *et al.*, 2017) kann vermutet werden, dass auch die hier untersuchten *Halopseudomonas* spp. beim Abbau solcher Polymere in verschiedenen Lebensräumen eine Rolle spielen könnten. Für den artverwandten *H. formosensis* FZJ konnte gezeigt werden, dass dieser neben Impranil® DLN-SD auch ICO-THANE und ICO-FIXPEU als einzige Kohlenstoffquelle metabolisieren kann (de Witt *et al.*, 2023). Hierbei handelt es sich ebenfalls um PEU-Beschichtungen, die beispielsweise Fischernetze haltbarer machen sollen, wodurch gleichzeitig die Komplexität des biologischen Abbaus solcher Materialien erhöht werden.

Allgemein betrachtet sind die hier erzielten Wachstumsraten mit <1 Teilung/Stunde 2–6-mal niedriger als mit etablierten biotechnologischen Modellorganismen. Dennoch sind sie im Bereich der Raten, die für Batch-Kulturen der etablierten Modellorganismen *P. putida*

(0,57/h), *B. subtilis* (1,5/h), *E. coli* (1,1/h) oder *C. glutamicum* (0,75/h) unter für diese Organismen angewendeten Standardbedingungen auf Glucose erzielt wurden (Wittgens *et al.*, 2011; Blank *et al.*, 2008). Somit konnte hier eine Medienzusammensetzung etabliert werden, die im Hinblick auf das Wachstum biotechnologisch relevante Größenordnungen zeigte.

Zusammenfassend stellen die *Halopseudomonas*-Arten damit ein interessantes Ziel für die Etablierung biotechnologischer Recyclingstrategien als Alternative zu künstlich hergestellten und im Labor entwickelten Stämmen dar (Sullivan *et al.*, 2022; Ackermann *et al.*, 2021).

Zunächst wurde die Kultivierung unter Laborbedingungen untersucht und optimiert. Verschiedene Kultivierungsgefäße wurden getestet, wobei sich die Round Well Plate® als am besten geeignet erwies. Sie ermöglicht einen vergleichsweise hohen Probendurchsatz und die Streulichtmessung konnte aufgrund der verringerten Aggregatbildung zuverlässig genutzt werden. Als geeignete Nährmedien haben sich das komplexe LB-Medium mit 45 mM Succinylsäure und das Hartman-Medium mit 18 mM Sebacinsäure als Kohlenstoffquelle erwiesen.

### 3.3 Analyse potenzieller Toleranzen in *Halopseudomonas* spp.

#### 3.3.1 Analyse der genomischen Ausstattung potenzieller Toleranzen in *Halopseudomonas* spp

Wie bereits beschrieben weisen die Vertreter der Gattung *Halopseudomonas* ein vergleichsweise kleines Genom auf. Dieses spiegelte sich bei der Identifizierung geeigneter Kohlenstoffquellen bereits wider. Um zu evaluieren, inwiefern diese Limitierung möglicherweise die Toleranz der Stämme gegenüber chemischem Stress beeinflusst, wurde die genomische Ausstattung hinsichtlich der Efflux-Transporter innerhalb der *Halopseudomonas*-Arten untersucht. Efflux-Transporter nehmen eine wichtige Rolle in der Stressantwort von Pseudomonaden ein, indem sie beispielsweise toxische Produkte aus der Zelle heraustransportieren (s. Kapitel 1.2) (Bitzenhofer *et al.*, 2021). Im Rahmen einer mit dieser Dissertation assoziierten Bachelorarbeit wurden zwei Herangehensweisen zur Charakterisierung solcher Efflux-Transporter ausgewählt (Kugel, 2021). Im ersten Schritt wurde in den Genomen von *Halopseudomonas* spp. nach Homologen zu bekanntermaßen Stresstoleranz-assoziierten Transportsystemen der RND-, ABC-, MFS-, MATE- und SMR-Familie aus *Pseudomonas* spp. (Tab. A1) (Bitzenhofer *et al.*, 2021) gesucht (Tab. 3.3). Als Datenbank diente hier die nicht redundanten Proteinsequenzen (nr) Datenbank.

**Tab. 3.3: Homologe zu resistenz-vermittelnden Exportern aus *Pseudomonas* spp. in *Halopseudomonas* spp.**

Name	Superfamilie	in <i>Pseudomonas</i> sp. nachgewiesene Substrat(e)*	<i>H. aestusnigri</i> VGXO14	<i>H. bauzanensis</i> BZ93	<i>H. litoralis</i> 2SM5	<i>H. oceani</i> KX20
TtgABC, ArpABC, MexAB-OprM	RND	Antibiotika, Schwermetalle, mono- und polyzyklische Aromaten, kurz- und langkettige Alkohole, Polyphenole (bspw.: Naringenin, Quercetin, Phloretin), Monoterpene, Bipyridine	✓	✓	✓	✓
TtgDEF	RND	aromatische Lösungsmittel (bspw.: Toluol und Styrol), Monoterpene (bspw.: Geraniol), langkettige Alkohole	-	-	-	-
TtgGHI, SrpABC	RND	mono- and polyzyklische Aromaten (bspw.: Toluol und Styrol, Biphenyle), langkettige Alkohole	-	-	✓	-
MexCD-OprJ	RND	Antibiotika, Polyphenole (bspw.: Phloretin), Triclosan, Acriflavin, Alkaloide (bspw.: Berberin)	-	-	-	-
MexEF-OprN	RND	Antibiotika, Polyphenole (bspw.: Phloretin), Triclosan, Alkaloide (bspw.: Berberin), Formaldehyd <sup>§</sup> , Glykolaldehyde <sup>§</sup> , Vanillin <sup>§</sup> , 2,2-Bipyridin	✓	✓	✓	✓
MexHI-OpmD	RND	Phenazine (bspw.: 5-Methylphenazin-1-carboxylat), Antibiotika	-	-	-	-
ParXY-TtgC MexXY-OprM	RND	Antibiotika	-	✓	✓	-
Ttg2ABC	ABC	Antibiotika, Toluol, <i>p</i> -Coumarinsäure, Schwermetalle, <i>tert</i> -butyl Hydroperoxid	✓	✓	✓	✓
TtgK	MFS	Toluol	-	-	-	-
PP_1271-73 <sup>#</sup>	MFS	4-Hydroxybenzoat, Vanillin <sup>§</sup> , 3-Chlorbenzoat <sup>§</sup> , Propionat, Toluol <sup>§</sup>	-	-	-	-
PP_3349 <sup>#</sup>	MFS	Formaldehyd <sup>§</sup>	-	-	-	-
PP_3658 <sup>#</sup>	MFS	Formaldehyd <sup>§</sup>	-	✓	-	-
Psyr_0228 <sup>+</sup>	MFS	Antibiotika	✓	-	-	✓
NorM_PS	MATE	Antibiotika, 4',6-diamidino-2-phenylindol	✓	✓	✓	✓
Psyr_0541 <sup>+</sup>	SMR	Antibiotika, Alkaloide (bspw.: Berberin)	✓	✓	✓	✓
EmrE	SMR	Antibiotika	✓	✓	✓	✓

Mit Hilfe einer BLASTp Analyse wurden homologe Proteine zu den Efflux-Transportern der Superfamilien RND, ABC, MFS, MATE und SMR aus *Pseudomonas* spp. (Tab. A1) identifiziert. Bei einer Sequenzidentität von  $\geq 40\%$  wurden Proteine als homologe identifiziert und durch einen Haken gekennzeichnet. Die entsprechenden Proteine und ihre Sequenznummer können in Tab. A2 eingesehen werden.

\* Die gelisteten Substrate sind repräsentativ und können sich je nach Wirt unterscheiden. Viele Transporter haben außerdem ein breites Substratspektrum.

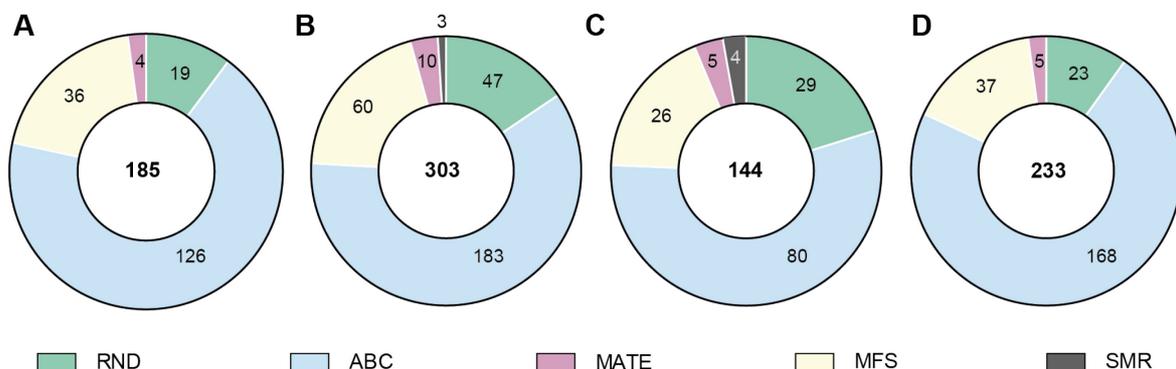
<sup>§</sup> vermutetes Substrat aufgrund von einer Reaktion auf die Überproduktion des Transporters. Eine Resistenz wurde nicht nachgewiesen.

<sup>#</sup> Transportername nicht verfügbar; Locus tag von *P. putida* KT2440 als Referenz Modifiziert und adaptiert nach Kugel (2021)

Im Rahmen der Bachelorarbeit wurden Transportkategorien jeder Superfamilie identifiziert. Die Sequenzidentitäten und Locus-Tags sind in Tab. A2 aufgeführt. Sofern die *Halopseudomonas*-Proteine Homologien zu unterschiedlichen *Pseudomonas*-Exportern ( $\geq 40\%$  Identität) aufwiesen, wurden sie als Homologe des Transporters mit der höchsten

Sequenzidentität markiert. Auffallend ist dennoch, dass in den untersuchten Stämmen kaum Homologe Transporter identifiziert wurden, die auf dem Megaplasmid von *Pseudomonas* kodiert sind und laut Literatur im Zusammenhang mit hydrophoben Lösungsmitteln wie Styrol oder Toluol stehen (Yao *et al.*, 2021; Wynands *et al.*, 2019; Rojas *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 1998). Besonders hervorzuheben ist der Transportproteinkomplex TtgGHI, den besonders die lösemitteltoleranten Stämme *P. putida* S12, *P. putida* DOT-T1E und *P. taiwanensis* VLB120 (**Tab. A1**) im Gegensatz zu *P. putida* KT2440 aufweisen und als Hauptursache ihrer Toleranz angesehen wird (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Volmer *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2001; Kieboom *et al.*, 1998). Stattdessen wurden insbesondere solche Transporter identifiziert, die Antibiotika transportieren können sollen.

Ergänzend wurden in einem zweiten Schritt die Genome der *Halopseudomonas*-Arten nach Proteinen durchsucht, die generell als Efflux-Transportproteine annotiert sind. Hierzu wurde im Rahmen der genannten Bachelorarbeit (Kugel, 2021) in der Uniprot Datenbank (**Tab. 2.2**) nach den Schlagwörtern „RND“, „ABC“, „MATE“, „MFS“ und „SMR“ gesucht (**Abb. 3.6**).



**Abb. 3.6: Übersicht zur Anzahl und Kategorisierung potenzieller Efflux-Transportproteinen in *Halopseudomonas* spp mit Hilfe der UniProt Datenbank.**

Die Transportproteine wurden mittels Schlagwortsuche in den Datenbankeinträgen von *H. aestusnigri* (A), *H. bauzanensis* (B), *H. litoralis* (C) und *H. oceani* (D) identifiziert. Die Summe aller identifizierten Efflux-Transportproteine ist in der Mitte gegeben, die Anzahl der Transporter der jeweiligen Superfamilie ist in dem entsprechenden Feld gezeigt. Grün: RND; blau: ABC, rosa: MATE, gelb: MFS; grau: SMR. Die Recherche erfolgte im Rahmen einer mit dieser Dissertation assoziierten Bachelorarbeit (Kugel, 2021). Die Abbildung wurde modifiziert.

Mit Hilfe dieser Schlagwortsuche konnten in *H. aestusnigri* 185 Efflux-Transportproteine identifiziert werden. In *H. bauzanensis* waren mit 303 die meisten Transporter annotiert, gefolgt von *H. oceani*. *H. litoralis* wies mit 144 die geringste Anzahl auf. Bei allen vier Organismen waren die ABC-Transporter am häufigsten vertreten. Ähnlich oft waren MFS- und RND-Transporter annotiert. MATE- und SMR-Transporter waren sehr selten oder gar nicht in der Uniprot Datenbank als solche hinterlegt. Im deutlich größeren Genom von *P. putida* KT2440 wurden zum Vergleich 350 potenzielle Membran-Transportproteine identifiziert (Nelson *et al.*, 2002). Da Efflux-Transporter eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Toleranzen spielen (s. Kapitel 1.2), könnte die ähnliche Anzahl der

annotierten Transporter ein Indikator für mögliche Toleranzen sein. Die Art der Toleranz kann sich allerdings deutlich unterscheiden.

Zu einigen Vertretern jeder Superfamilie wurden in anderen Organismen homologe Proteine identifiziert. Jedoch konnten für die Mehrzahl der identifizierten Proteine keine charakterisierten Exporter mit relevanter Homologie aus anderen Bakterien gefunden werden. Deshalb ist keine Aussage über die physiologische Funktion dieser Proteine in *Halopseudomonas* spp. möglich. Auffällig war bei den Transportern der RND-Superfamilie allerdings, die Identifizierung von homologen Proteinen zu SilAB aus *Salmonella enterica* und CusAB aus *E. coli* in allen vier *Halopseudomonas* spp. (Kugel, 2021). Bei beiden Transportern konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie am Efflux von Metallionen beteiligt sind und so beispielsweise Toleranzen gegenüber Kupfer und Silber vermitteln (Kim *et al.*, 2011). Im Genom von *H. bauzanensis* konnten zudem noch zahlreiche weitere potenzielle Transportproteine identifiziert werden, die in Verbindung mit dem Efflux von Metallionen stehen. Diese höhere Anzahl an Efflux-Transportproteinen spiegelt das natürliche Habitat des terrestrischen Mikroorganismus wider, der aus einer mit Schwermetallen kontaminierten Bodenprobe isoliert wurde (Zhang *et al.*, 2011).

Die identifizierten putativen Transportproteine aus anderen Transporterfamilien zeigten je nach phylogenetischer Nähe der *Halopseudomonas*-Arten eine unterschiedliche Verteilung der Proteine. So waren *H. aestusnigri* und *H. oceani* in Bezug auf die Ausstattung der Efflux-Transportproteine ähnlich, sowie *H. bauzanensis* und *H. litoralis* (Kugel, 2021). Dies spiegelt sich auch in der Nachbarschaft der entsprechenden phylogenetischen Äste wider (Rudra & Gupta, 2021). In allen hier untersuchten Organismen konnte eine Homologie zum MATE-Efflux-Transporter NorM identifiziert werden. Funktionelle Untersuchungen des Transporters in *Vibrio parahaemolyticus* und *E. coli* ergaben, dass dieser als Substrat die synthetischen Antibiotika Norfloxacin und Ciprofloxacin, den antiseptischen Farbstoff Acriflavin sowie Tetraphenylphosphoniumionen aus der Zelle transportiert (Morita *et al.*, 1998). Durch die Analyse der genetischen Ausstattung der Efflux-Transporter konnte jedoch keine direkte Verbindung zu einem stresstoleranten Phänotyp, wie beispielsweise Lösungsmitteltoleranz, festgestellt werden.

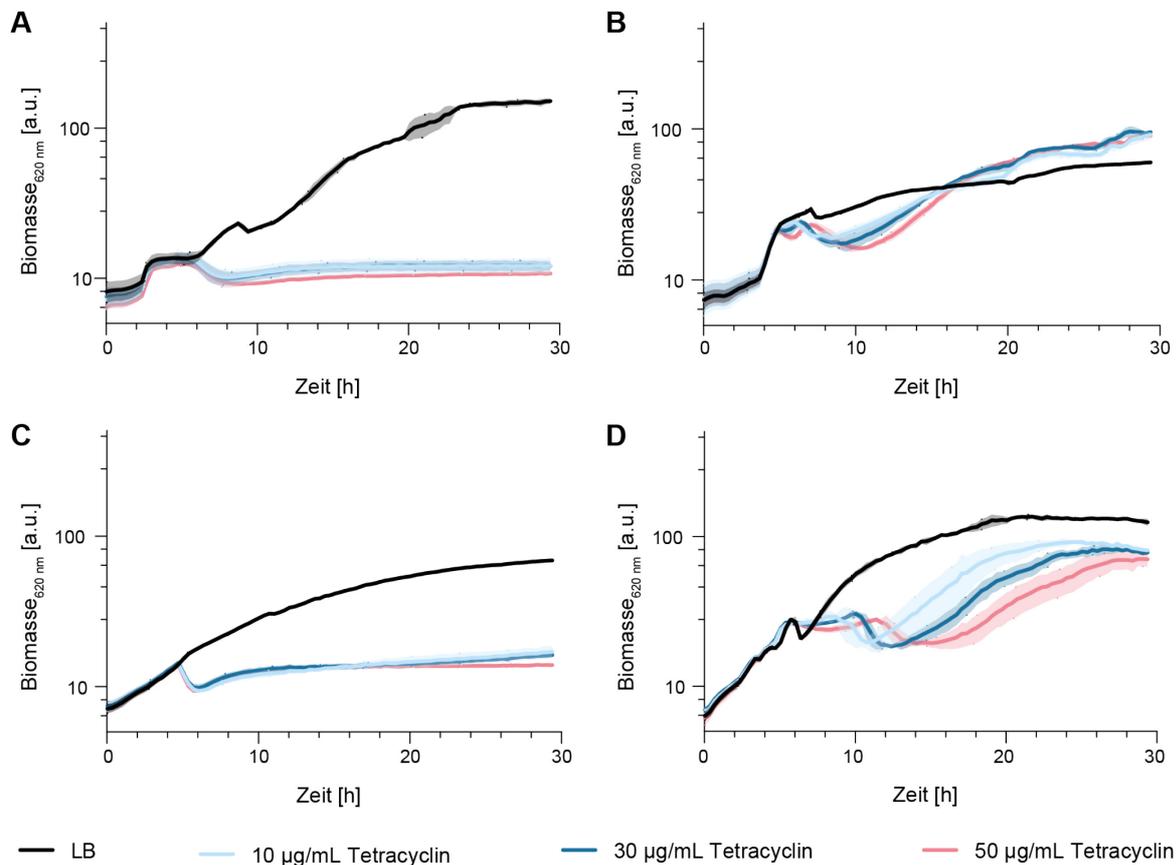
Abschließend können anhand der Recherche dennoch mehrere Schlüsse gezogen werden: (i) ein Vergleich der *Halopseudomonas* Genome mit denen von lösemitteltoleranten Pseudomonaden zeigte ein Fehlen der mit dieser Toleranz-assoziierten Transporter; (ii) die Unterschiede zwischen den *Pseudomonas* spp. und *Halopseudomonas* spp. wurden erneut verdeutlicht, was die Relevanz der Reklassifizierung dieser Art noch einmal veranschaulicht; (iii) es konnten sehr viele Transporter identifiziert werden, die im Zusammenhang mit dem Transport von Antibiotika stehen.

Neben dem Export der Stressoren verfügen *Pseudomonas* spp. über weitere Strategien zur Reaktion auf Membran-destabilisierende Substanzen. Ein Schlüsselfaktor ist die schnelle Adaption der inneren Membran, wobei die *cis*-ungesättigten Fettsäuren durch die *cis/trans*-Isomerase zu *trans*-ungesättigten Fettsäuren umgewandelt werden (s. Kapitel 1.2) (Bitzenhofer *et al.*, 2021). Interessanterweise konnte in den Genomen von *H. bauzanensis* und *H. litoralis* kein Homolog zur Cti aus *P. taiwanensis* VLB120 identifiziert werden. In den Genomen von *H. aestusnigri* ([WP\\_088275311.1](#) / 48% Identität; 63% Ähnlichkeit) und dem nah verwandten *H. oceani* ([WP\\_229744351.1](#) / 47% Identität; 61% Ähnlichkeit) war ein entsprechendes Protein jedoch kodiert.

### 3.3.2 Evaluation der Toleranz gegenüber Antibiotika und Alkanolen

Um die Datenbank-Recherche stichprobenartig experimentell zu überprüfen, wurden die Toleranzen der *Halopseudomonas*-Arten in Bezug auf Antibiotika am Beispiel von Tetracyclin und auf eine mögliche Lösungsmitteltoleranz untersucht. Die Ergebnisse zu der Antibiotikatoleranz wurden im Rahmen einer mit dieser Doktorarbeit assoziierten Bachelorarbeit erzielt (Kugel, 2021). Die Untersuchungen der Alkanoltoleranz erfolgten im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit dem Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UfZ) Leipzig (dos Santos Mattos, 2023).

Ein Tetracyclin-transportierender RND-Transporter ist MexAB-OprM (Li *et al.*, 1995). Dieser konnte in den Genomen der *Halopseudomonas*-Arten identifiziert werden (**Tab. 3.3**). Um zu überprüfen, ob die hier untersuchten Mikroorganismen in Anwesenheit von Tetracyclin wachsen können, erfolgte eine Kultivierung mit Supplementierung verschiedener Konzentrationen des Antibiotikums zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (**Abb. 3.7**).



**Abb. 3.7: Adaption der *Halopseudomonas* spp. an Antibiotikastress vermittelt durch Tetracyclinzugabe.** *H. aestusnigri* (A), *H. bauzanensis* (B), *H. litoralis* (C) und *H. oceani* (D) wurden in LB<sub>Suc</sub>-Medium kultiviert und zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase mit 10 µg/mL (hellblau), 30 µg/mL (blau) oder 50 µg/mL (rosa) Tetracyclin versetzt. Als Kontrolle diente eine Kultur, der 70 % Ethanol zugesetzt wurde (schwarz). Die dargestellten Daten stellen den Mittelwert von biologischen Triplikaten dar. Die berechneten Standardabweichungen sind als Schatten dargestellt. Die Daten wurden im Rahmen einer mit dieser Dissertation assoziierten Bachelorarbeit erhoben (Kugel, 2021). Die Abbildung wurde modifiziert.

Hierbei fiel auf, dass trotz Annotation des Transporters in allen Spezies unterschiedliche Reaktionen auf die Zugabe von Tetracyclin zu beobachten waren. Während in *H. aestusnigri* kein Wachstum mehr detektiert werden konnte, wurde in *H. litoralis* ein schwaches Wachstum bei 10 µg/mL und 30 µg/mL Tetracyclin nach einer 10 h Adaptionphase detektiert. Hingegen zeigten *H. oceani* und *H. bauzanensis* nach einer kurzen Adaptionphase eine Toleranz gegenüber allen getesteten Konzentrationen. Allerdings ist es bemerkenswert, dass *H. bauzanensis* nach der Zugabe des Antibiotikums sogar höhere Biomassewerte erreichte. Da es sich nur um eine Zugabe von 0,23 mM Kohlenstoffäquivalente (1,3 %) bei 100 µg/mL Tetracyclin handelte, ist es unwahrscheinlich, dass dieser Effekt auf eine Metabolisierung von Tetracyclin zurückzuführen ist. Ob hier eine andere physiologische Reaktion hervorgerufen wurde, konnte nicht näher bestimmt werden. Um jedoch eine präzise Verbindung zwischen Transportern und der beobachteten Antibiotikatoleranz herzustellen, könnten *in vitro* Untersuchungen mittels Nanodiscs zur Substrataffinität hilfreich sein (Denisov & Sligar, 2016; Ritchie *et al.*, 2011). Alternativ könnte die Funktionalität des

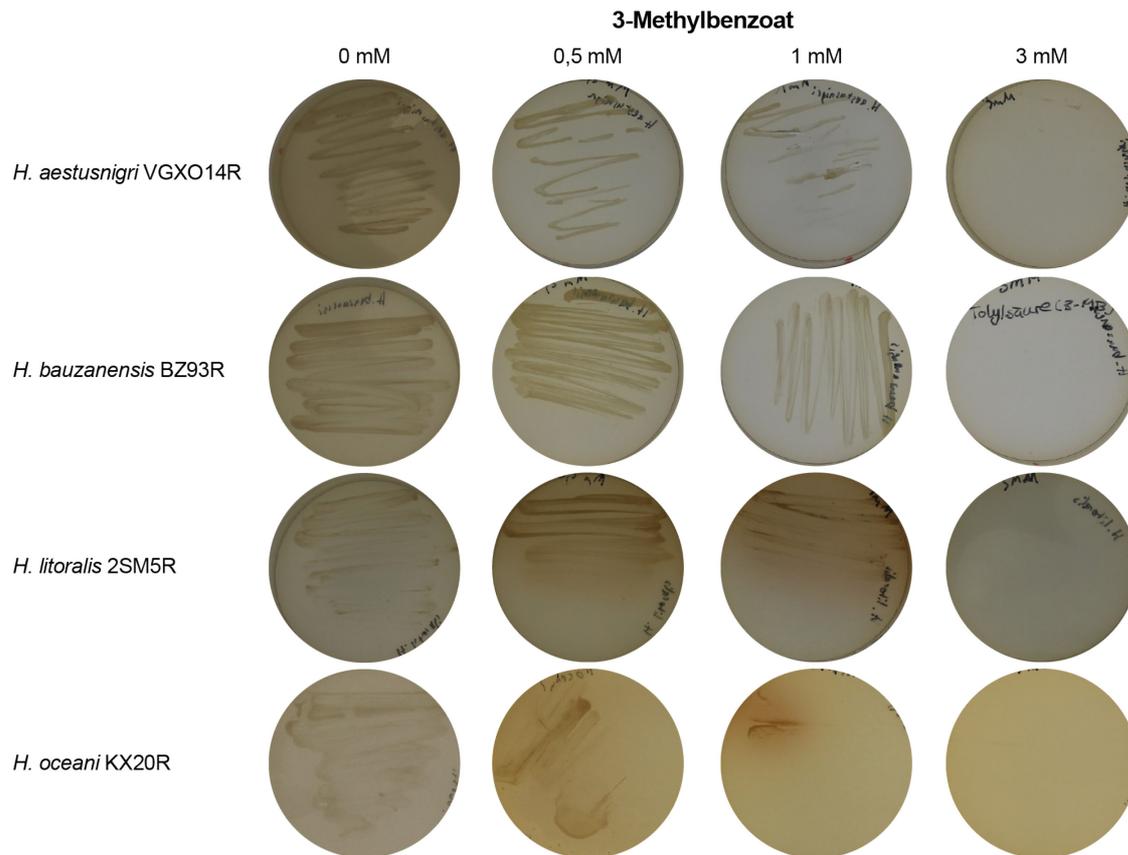
Transportproteinkomplexes *in vivo* mittels Deletionsmutanten oder heterologen Expressionsstudien untersucht werden (Li *et al.*, 2003).

Nach den Genom-basierten Analysen konnten bei den hier untersuchten *Halopseudomonas*-Arten kaum Transporter identifiziert werden, die mit einer Lösemitteltoleranz assoziiert sind. Gemäß der Datenbankanalyse, könnte einzig *H. littoralis* einen solchen Komplex aufweisen (**Tab. 3.3**). Im Gegensatz dazu konnte eine Cti nur in *H. aestusnigri* und *H. oceani* identifiziert werden. Vor diesem Hintergrund wurde in einem Kooperationsprojekt mit dem UfZ Leipzig die Toleranz gegenüber *n*-Alkanolen und die Aktivität der Cti in den ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten untersucht. Hierbei konnte initial für alle vier Arten keine nennenswerte Toleranz gegenüber den *n*-Alkanolen 1-Decanol und 1-Octanol festgestellt werden. Eine Cti-Aktivität konnte unter diesen Stressbedingungen nicht nachgewiesen werden (dos Santos Mattos, 2023), im Gegensatz zu *P. taiwanensis* VLB120 (Cárdenas Espinosa *et al.*, 2023). Darüber hinaus wurde die Cti-Aktivität nach Induktion verschiedener anderer Stressoren wie Salz oder Temperatur bestimmt. Auch hier konnte selbst bei *H. aestusnigri* und *H. oceani* kein Unterschied im *cis/trans*-Verhältnis zwischen den gestressten und den Kontrollproben detektiert werden (dos Santos Mattos, 2023). Es bleibt zu überprüfen, ob die beiden Proteine funktionell sind, z. B. durch Überexpression im homologen Wirt oder durch Komplementationsexperimente mit *cti*-defizienten *Pseudomonas*-Stämmen. Das Vorkommen des Gens nur im *H. aestusnigri* Ast des *Halopseudomonas*-Stammbaums könnte zusammen mit dem bekannten Vorkommen von *cti*-Genen außerhalb von *Pseudomonas sensu stricto* in *Alcanivorax* sp. und einigen offenbar mit dem Ölabbau-assoziierten *Vibrio*- und *Methylococcus*-Arten auf eine Rolle des Enzyms in Reaktion auf die Präsenz von linearen und aromatischen Alkanen hinweisen (Eberlein *et al.*, 2018; Heipieper *et al.*, 2018; Stephens *et al.*, 2013).

### 3.3.3 Evaluation der Toleranz gegenüber aromatischen Säuren

Neben der Eigenschaft unpolarer Aromaten als organische Lösungsmittel stellen diese Moleküle häufig Stressoren für Bakterien dar. *Pseudomonas* sp. sind hingegen in der Lage solche aromatischen Moleküle zu tolerieren oder zu metabolisieren (Nogales *et al.*, 2017). In Bezug auf *Halopseudomonas* spp. ist hingegen wenig bekannt, aber anhand von Genomanalysen wird zumindest für *H. aestusnigri* eine ähnliche Toleranz vermutet (Gomila *et al.*, 2017). Aufgrund der Abwesenheit der Toleranz gegenüber hydrophoben Lösungsmitteln, sollen im Folgenden die Toleranzen gegenüber aromatischen Benzoessäurederivaten evaluiert werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Benzoessäuren Salicylsäure und die petrochemische Substanz 3-Methylbenzoat (3-MB) verwendet, welche zu den natürlichen sekundären Pflanzenmetaboliten zählen und bakteriostatisch wirken (Mohanapriya *et al.*, 2016; Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011). Zur Untersuchung der

Toleranz der *Halopseudomonas*-Arten gegenüber dem an Position 3 methylierten Derivat der Benzoesäure, 3-MB, wurden die Bakterien auf LB-Agar kultiviert, welcher mit verschiedenen Konzentrationen (3-MB) versetzt war (**Abb. 3.8**).

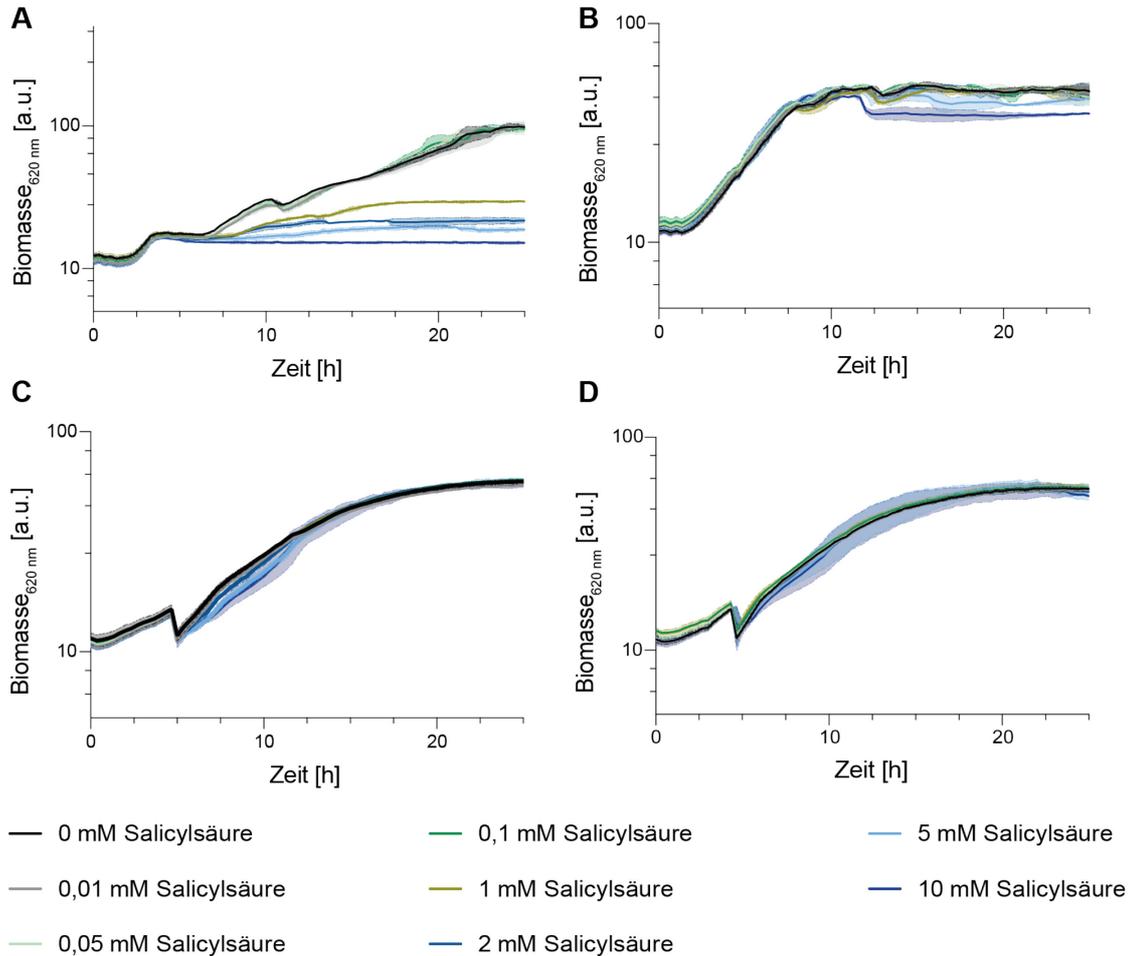


**Abb. 3.8: Bestimmung der Toleranz von *Halopseudomonas* spp gegenüber 3-Methylbenzoat.**

Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, welche unterschiedliche Konzentrationen 3-Methylbenzoat enthielten. In der linken Spalte sind die Kontrollen ohne 3-Methylbenzoat gezeigt. Die Konzentrationen nehmen nach rechts hin zu.

Zunächst einmal konnte beobachtet werden, dass alle *Halopseudomonas*-Arten 0,5 mM 3-MB tolerierten (**Abb. 3.8**). Jedoch konnte in *H. oceani* eine bräunliche Verfärbung im Agar beobachtet werden, was auf die Bildung von toxischen Polymeren hindeuten könnte, wie es z. B. für den Stoffwechselweg des Catechols bekannt ist (Kubicki, 2020; Dubey *et al.*, 1998). Bei 1 mM 3-MB konnte bei *H. oceani* kaum Wachstum detektiert werden, stattdessen ebenfalls eine bräunliche Verfärbung. Die anderen drei untersuchten Organismen zeigten hingegen eine Toleranz gegenüber 1 mM 3-MB und eine Sensitivität bei 3 mM 3-MB. In Flüssigkulturen von *P. putida* wurden Konzentrationen bis 1 mM 3-MB getestet. Hier konnte ein negativer Einfluss des Induktormoleküls anhand einer verringerten Wachstumsrate beobachtet werden (Calero *et al.*, 2016). Zur Induktion der Genexpression von I-Scel zur Selektion auf einen erfolgreichen *doppel-crossover* wurden hingegen 3 mM 3-MB im Selektionsagar verwendet, um *P. putida* Stämme zu selektieren (Wirth *et al.*, 2020).

Um die Toleranz von *Halopseudomonas* spp. gegenüber dem an Position 2 hydroxylierten Derivat der Benzoesäure genauer zu untersuchen, wurden Kulturen der vier ausgewählten Stämme in LB<sub>SUC</sub> kultiviert und mit verschiedenen Konzentrationen Salicylsäure versetzt (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9: Bestimmung der Toleranz von *Halopseudomonas* spp. gegenüber Salicylsäure.**

Nach 4,5 h Kultivierung wurden den Kulturen steigende Konzentrationen des Induktors Salicylsäure (0 – 10 mM) den Kulturen von *H. aestusnigri* (A), *H. bauzanensis* (B), *H. litoralis* (C) und *H. oceani* (D) zugesetzt. 0 mM Salicylsäure (schwarz); 0,01 mM Salicylsäure (grau); 0,05 mM Salicylsäure (blassgrün); 0,1 mM Salicylsäure (grün); 1 mM Salicylsäure (oliv); 2 mM Salicylsäure (blau); 5 mM Salicylsäure (hellblau); 10 mM Salicylsäure (dunkelblau). Die dargestellten Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar. Die Schatten zeigen die berechnete Standardabweichung. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

*H. aestusnigri* (Abb. 3.9A) zeigte ab der Zugabe von 1 mM Salicylsäure ein eingeschränktes Wachstum. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass dieser Organismus bis zu 5 mM dieser Säure tolerierte. *H. bauzanensis*, *H. litoralis* und *H. oceani* waren im Gegensatz dazu in der Lage 10 mM Salicylsäure ohne Wachstumseinschränkungen zu tolerieren (Abb. 3.9B-D). Studien mit *P. putida* KT2440 zeigten, dass dieser lediglich 5 mM Salicylsäure toleriert und eine maximale Proteinproduktion bei 2 mM erreichte (Weihmann *et al.*, 2023). Da kein positiver Effekt auf das Wachstum beobachtet werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass keine Metabolisierung der Salicylsäure erfolgte.

Neben der mikrobiellen Aktivität stellt Salicylsäure ein wichtiges Phytohormon zur Regulation des Pflanzenwachstums dar und steht im Zusammenhang mit der Toleranz der Pflanze gegenüber Salzstress (Yang *et al.*, 2023). Diese Toleranz wird häufig durch Salicylsäure-tolerierende Mikroorganismen aus der Umgebung vermittelt, welche wiederum Metabolite produzieren, die dem Schutz der Pflanze dienen (Yang *et al.*, 2023). Somit könnten die *Halopseudomonas*-Arten als osmotolerante und Salicylsäure-tolerierende Organismen vielversprechende Kandidaten für die Landwirtschaft darstellen.

Wie erwähnt, besitzen *Pseudomonas* spp. zahlreiche Abbauwege für aromatische Moleküle, welche bei Bedarf von entsprechenden Transkriptionsfaktoren gebunden und so die Gentranskription regulieren. Daraus wurden beispielsweise in der biotechnologischen Anwendung von *Pseudomonas* spp. vielfach eingesetzte induzierbare Expressionssysteme abgeleitet. Als Beispiele sind hier das XylS/P<sub>m</sub>-System aus *P. putida* und das NagR/P<sub>nagaA</sub>-System aus *C. testosteroni* zu nennen (Jones *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 1986) (s. Kapitel 1.3.2). Das XylS/P<sub>m</sub>-System wird durch 3-MB induziert und kommt unter anderem in Vektoren, die bei der Stammentwicklung verwendet werden wie dem pSNW2 /pQure-6-high-System, zum Einsatz. Es ermöglicht einerseits die Selektion von erfolgreichen genomischen Integrationen oder der Deletion von Ziel-DNA und reguliert andererseits die Replikation des Vektors, was ein anschließendes Plasmid-curing erleichtert (Wirth *et al.*, 2020). Neben 3-MB stellt Salicylsäure ein häufig verwendetes Induktormolekül in der Biotechnologie dar. NagR/P<sub>nagaA</sub> wird beispielsweise durch Salicylat induziert. Hier konnte gezeigt werden, dass die Induktormoleküle von *Halopseudomonas* spp. in ausreichenden Konzentrationen toleriert werden. Somit scheinen sie als Induktoren zur Steuerung molekularbiologischer Prozesse in *Halopseudomonas* spp. Anwendung finden zu können. Um abschließend klären zu können, ob die Induktormoleküle von der Zelle aufgenommen werden und die Promotorsysteme generell funktionieren, müssen zunächst noch weitere Faktoren evaluiert werden, die im Zusammenhang mit der gentechnischen Zugänglichkeit dieser Organismen stehen.

Die Toleranz gegenüber aromatischen Säuren, wie 3-Methylbenzoat und Salicylsäure konnte in allen vier ausgewählten Spezies gezeigt werden. Während *H. oceani* bis zu 0,5 mM 3-MB tolerierte, zeigten *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis* und *H. litoralis* bei bis zu 1 mM 3-MB Wachstum. Bei der Exposition von Salicylsäure konnte lediglich in *H. aestusnigri* ein negativer Effekt auf das Wachstum beobachtet werden. Dennoch konnten bis 5 mM Salicylsäure eingesetzt werden. 10 mM Salicylsäure zeigten keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum von *H. bauzanensis*, *H. litoralis* und *H. oceani*.

### 3.4 Anwendungen genetischer Werkzeuge in *Halopseudomonas* spp.

Um Einblicke in die Physiologie der vier *Halopseudomonas*-Stämme zu gewinnen und diese als biotechnologische Plattform nutzen zu können, sollten die Bakterien genetisch zugänglich sein. Das bedeutet, dass ein Stamm mit Plasmiden transformiert werden und die gewünschten heterologen Gene exprimieren kann. Protokolle, die für gut erforschte Pseudomonaden etabliert wurden, um einen horizontalen Gentransfer durchzuführen oder Bakterien mit Plasmid-DNA zu transformieren, konnten nicht ohne weiteres auf die *Halopseudomonas*-Arten übertragen werden, da sie unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen. So können die hier untersuchten *Halopseudomonas* spp. beispielsweise nicht auf dem üblichen *Pseudomonas*-Selektionsmedium Cetrimid-Agar (Goto & Enomoto, 1970) wachsen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich weisen die *Halopseudomonas* Spezies keine gemeinsame Antibiotikaresistenz auf, was die Entwicklung einer universellen Selektionsmethode zusätzlich einschränkt.

Um eine Gegenselektion zu ermöglichen, die in allen ausgewählten Stämmen angewendet werden kann, wurden durch Ausstrich mehrerer Kolonien jeder Art auf LB-Agar mit 25 µg/mL Rifampicin (Rif) spontan auftretende Rif-resistente Klone isoliert. Die daraus resultierenden Stämme wurden als *H. aestusnigri* VGXO14R, *H. bauzanensis* BZ93R, *H. litoralis* 2SM5R bzw. *H. oceani* KX20R bezeichnet. Die ausgeprägte Salztoleranz der *Halopseudomonas* spp. ermöglichte es zudem eventuell spontan auftretenden Rif-resistenten Zellen des *E. coli*-Donorstammes entgegenzuwirken, indem LB-Agarplatten mit Rif und 3 % (w/v) NaCl verwendet wurden, welches das Wachstum des Donorstammes beeinträchtigte (**Abb. A8**). Bemerkenswerterweise bildeten die Rif-resistenten Stämme in Flüssigkultur keinerlei Aggregate, wie sie bei den entsprechenden Wildtyp-Stämmen zu beobachten waren.

Zur Etablierung einer Elektroporationsmethode wurde das pJT'Tmcs-Plasmid verwendet, welches ein Gm<sup>R</sup> vermittelndes Gen trägt, mit pRO1600 als *oriV* ein breites Wirtsspektrum aufweist, aber keinen *oriT* enthält. Das Waschprotokoll und das Elektroporationsverfahren hatten keinen Einfluss auf die Vitalität der R-Stämme (**Tab. A3**). Für die vier ausgewählten Stämme wurde die Transformationseffizienz als Anzahl der Gm/Rif-resistenten CFU pro DNA-Masse bestimmt: *H. aestusnigri* VGXO14R -  $3 \cdot 10^7$  CFU/µg; *H. bauzanensis* BZ93R -  $3 \cdot 10^4$  CFU/µg; *H. litoralis* 2SM5R -  $7 \cdot 10^7$  CFU/µg und *H. oceani* KX20R -  $1 \cdot 10^8$  CFU/µg. Um zu überprüfen, welche Plasmidfamilien für die Anwendung in den *Halopseudomonas*-Arten geeignet sind, wurden zusätzlich Vektoren mit Replikationsursprüngen anderer Inkompatibilitätsgruppen als pJT'Tmcs getestet (**Tab. 3.4**).

**Tab. 3.4:** Replizierbarkeit verschiedener Replikationsursprünge in ausgewählten *Halopseudomonas*-Stämmen.

<i>oriV</i>	Plasmidrückgrat	<i>H. aestusnigri</i>	<i>H. bauzanensis</i>	<i>H. litoralis</i>	<i>H. oceani</i>
RO1600	pJT'Tmcs	+	+	+	+
pBBR1	pBTBX-2-mcs	+	+	+	+
RSF1010	pVLT33	+	+	+	+
pMB1	pYT	+	+	+	+
R6K	pUC18R6KT	-	-	-	-

Die Replizierbarkeit eines *oriVs* ist durch + gekennzeichnet. Nicht replizierbare *oriVs* sind durch - gekennzeichnet. Die Farben stehen für jeweils eine Inkompatibilitätsgruppe und entsprechen der Darstellung aus **Tab. 1.1**. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Tabelle ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

**Tab. 3.4** zeigt, dass alle Stämme die Replikation eines Satzes von Plasmiden mit breitem Wirtsspektrum ermöglichen, welcher auch für *Pseudomonas* spp. etabliert ist (Martin-Pascual *et al.*, 2021). Dieser Satz von Plasmiden beinhaltet neben pRO1600 auch die Ori-Vektoren pBBR1 und RSF1010 sowie die entsprechenden Rep-Proteine, mit Ausnahme der R6K-Vektoren. Interessanterweise schienen diese Stämme auch die für *E. coli* typischen Replikationsursprünge ColE1 / pMB1 / pBR322 zu replizieren, die bei *Pseudomonas* spp. nicht anwendbar sind (del Solar *et al.*, 1996; Kües & Stahl, 1989). Diese Beobachtung wurde durch die Prüfung der Antibiotikaresistenz der Klone nach der Transformation und der Isolierung der Plasmide aus den *Halopseudomonas*-Stämmen (**Abb. A9**) bestätigt. In *E. coli* scheinen insbesondere die DNA-Gyrase sowie die DNA Polymerase I aus *E. coli* für die Replizierbarkeit dieser Plasmide verantwortlich zu sein (s. Kapitel 1.3.1) (Lilly & Camps, 2015; Kües & Stahl, 1989). Auch wenn es homologe Proteine in anderen Spezies gibt, scheinen bestimmte Sequenzbereiche die Replikation zu beeinflussen (del Solar *et al.*, 1996), wobei die molekularen Hintergründe unklar sind. Da diese Replikationsursprünge von *Halopseudomonas*-Arten repliziert werden können ermöglicht auf der einen Seite die Anwendung vieler Plasmide, die sonst typischerweise für Expressionsstudien in *E. coli* angewendet werden. Andererseits schränkt es die Anwendung vieler Plasmide ein, die eigentlich als Suizid-Vektoren für die Erzeugung von Genommodifikationen in Pseudomonaden entwickelt wurden. Deshalb wurde am Beispiel von *H. litoralis* eine Methode entwickelt, um einen Plasmidverlust zu induzieren. Ein stressinduzierter Verlust solcher Plasmide konnte innerhalb der *Halopseudomonas* spp. erreicht werden, indem die Stämme in Flüssigkulturen bei 37 °C für 24 h kultiviert wurden (**Abb. A9**). Alternativ kann für eine solche Anwendung ein Vektor mit einem R6K Replikationsursprung verwendet werden. Dieser kann in *Halopseudomonas* nicht repliziert werden, da zur Replikationsinitiation das *pir*-Gen chromosomal benötigt wird.

Die zur Untersuchung ausgewählten Plasmide gehören unterschiedlichen Kompatibilitätsgruppen an (**Tab. 1.1**). Somit steht nun eine Auswahl miteinander

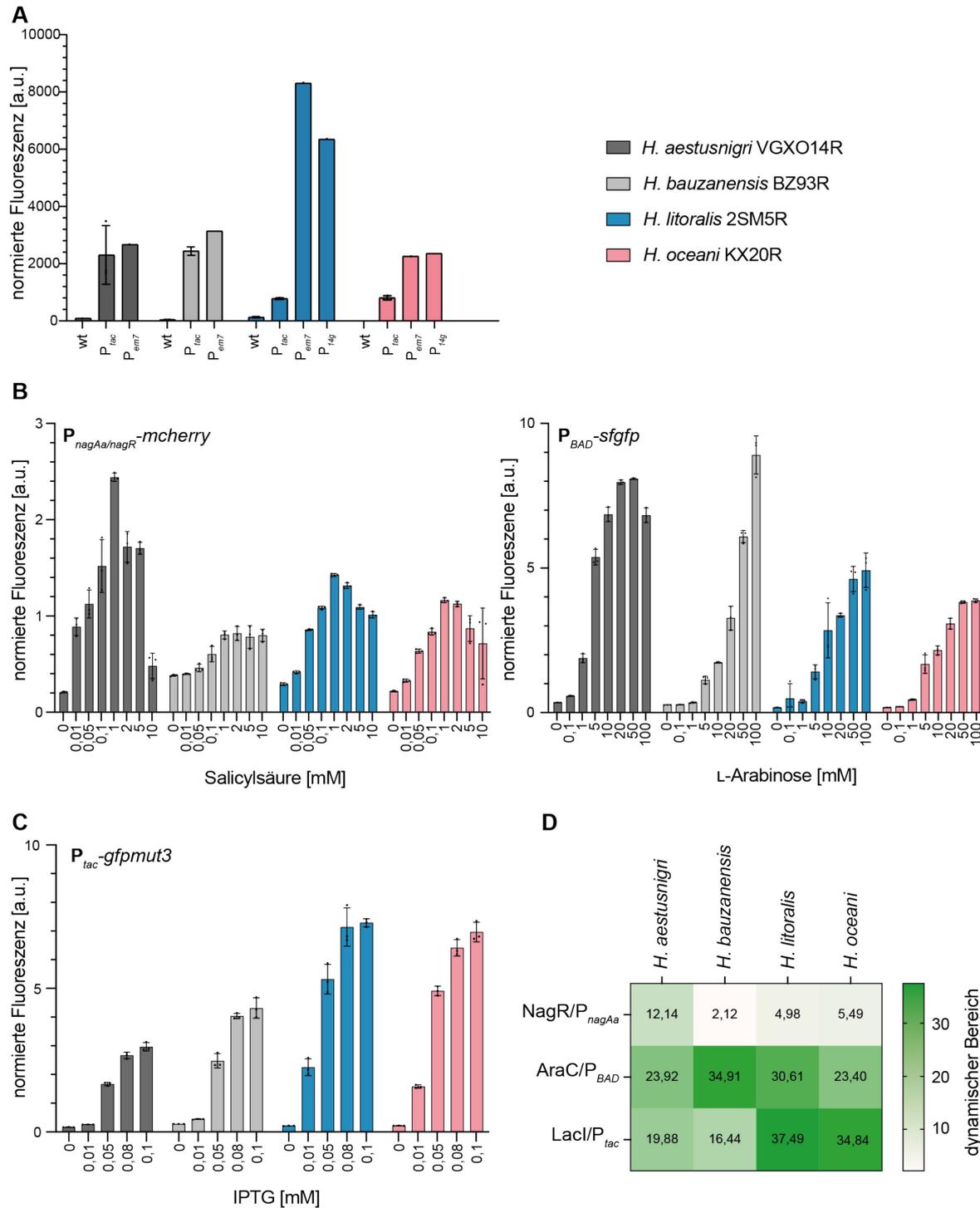
kombinierbarer Plasmide zur Verfügung, was auch die Anwendung mehrerer Plasmide innerhalb eines Organismus ermöglicht (Kvitko *et al.*, 2012).

Um die Plasmidreplikation zu untersuchen, wurden verschiedene Plasmidsysteme untersucht, deren Replikationsursprünge unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen angehören.

Plasmide, die repliziert werden konnten, trugen die *oriVs* pRO1600, RSF1010, pBBR1 und pMB1. Plasmide mit einem *oriV* R6K konnten hingegen erwartungsgemäß nicht vervielfältigt werden.

### 3.4.1 Anwendungen verschiedener Promotorsysteme

Im nächsten Schritt sollten verschiedene konstitutive und induzierbare Promotoren in *H. aestusnigri* VGXO14R, *H. bauzanensis* BZ93R, *H. litoralis* 2SM5R und *H. oceani* KX20R untersucht werden (**Abb. 3.10**). Hierzu wurden genetisch kodierte Fluoreszenzproteine verwendet. Anhand von Expressionsraten in unterschiedlichen Systemen, ggf. bei unterschiedlichen Induktionszeitpunkten soll eine Kollektion an genetischen Werkzeugen zur Anwendung in den *Halopseudomonas*-Arten zusammengestellt werden. Dafür wurden letztere mit Plasmiden transformiert, die für Reportergene unter Kontrolle der entsprechenden Expressionssysteme kodierten (**Tab. 2.9**).



**Abb. 3.10: Bestimmung der heterologen Genexpression in *Halopseudomonas*-Stämmen unter Verwendung verschiedener Promotoren.**

**A:** Gemessene auf Zelldichte normierte Fluoreszenzsignale der Reporterproteine, deren Produktion unter der Kontrolle von konstitutiven Promotoren ( $P_{tac}$ ,  $P_{em7}$ ,  $P_{14g}$ ) steht. Gezeigt sind die Daten einer Probe aus einem biologischen Triplikats ( $P_{em7}$ ,  $P_{14g}$ ) und der Mittelwert sowie die Standardabweichung eines biologischen Triplikats ( $P_{tac}$ ) nach 24 h Kultivierung. Induzierbare Promotorsysteme müssen entweder aktiviert (AraC/ $P_{BAD}$ ; NagR/ $P_{nagAa}$ ) (**B**) oder dereprimiert (LacI/ $P_{tac}$ ) (**C**) werden. Die Expression der Reportergene wurde durch L-Arabinose, Salicylsäure oder IPTG zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase nach 4,5 h Kultivierung induziert. Zellen, die mit 70%igem EtOH behandelt wurden, dienten als Negativkontrollen. Die Daten stellen die Mittelwerte von biologischen Triplikaten dar, und die Fehlerbalken zeigen die berechneten Standardabweichungen. **D:** Die jeweilige dynamische Spanne der Promotorsysteme ist als *heatmap* dargestellt, die von weiß mit zunehmender dynamischen Spanne nach dunkelgrün verläuft. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

Konstitutiv aktive Promotoren sind nützlich, um Proteine permanent zu produzieren und diese damit zu akkumulieren. Sie werden beispielsweise häufig verwendet, um die Selektionsmarker eines Plasmidsystems zu aktivieren oder um Proteine zu co-exprimieren (Bitzenhofer *et al.*, 2023a). Hier wurden die konstitutiven Systeme  $P_{em7}$  (pYTNB06K-1G7) und  $P_{tac}$  (pJT'Tmcs-*mcherry*) für die Expression von Genen in allen vier R-Stämmen (**Abb. 3.10A**) getestet, sowie  $P_{14g}$  (pQure-6-high) in *H. littoralis* und *H. oceani*. Alle ausgewählten Promotoren sind  $\sigma^{70}$ -abhängige Promotoren, die bereits vielfach in Pseudomonaden angewendet wurden (Bitzenhofer *et al.*, 2023a; Köbbing *et al.*, 2020; Zobel *et al.*, 2015).  $P_{em7}$  und  $P_{14g}$  unterscheiden sich lediglich im Abstand der -35 und -10-Region zum Transkriptionsstart, was in unterschiedlichen Promotorstärken resultiert (Köbbing *et al.*, 2020). Als Reporterproteine dienten mCherry bzw. sfGFP, der Wildtyp ohne Plasmid diente als Negativkontrolle. Besonders an dem für  $P_{14g}$  verwendeten Plasmid ist, dass das Rep-Protein unter Kontrolle eines XylS/ $P_m$ -Systems steht. In *H. aestusnigri* und *H. bauzanensis* konnten keine wachsenden Kulturen beobachtet werden. Als Ursache könnten Toxizität der Toluylsäure innerhalb der Flüssigkulturen oder aber generelle Probleme mit der Replikation eines solchen Plasmids mit dem Replikationsursprung RK2 vorliegen.

Die Expression von Reportergenen ausgehend vom Promotor  $P_{tac}$  in *H. aestusnigri* und *H. bauzanensis* führte zu ähnlichen Fluoreszenzausbeuten. *H. littoralis* und *H. oceani*, die ebenso mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden, zeigten nur geringe Fluoreszenzintensitäten. *H. littoralis* und *H. oceani* mit  $P_{14g}$  Expression erreichten Fluoreszenzintensitäten, die ähnlich hoch waren wie die Fluoreszenzsignale von *H. oceani*/pYTNB06K-1G7. Das höchste Fluoreszenzsignal wurde bei *H. littoralis* transformiert mit pYTNB06K-1G7 beobachtet. In *P. putida* KT2440 stellt  $P_{14g}$  einen Promoter mit einer sehr hohen Promotoraktivität dar, während  $P_{em7}$  ungefähr die Hälfte der Aktivität zeigte (Martin-Pascual *et al.*, 2021). Da hier Plasmidsysteme mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen verwendet wurden und damit sehr wahrscheinlich unterschiedliche Kopienzahlen pro Zelle vorlagen, kann keine vergleichende Aussage über die Promotorstärke in *Halopseudomonas* spp. getroffen werden. Ein aussagekräftiger Vergleich der Promotorstärken innerhalb von *Halopseudomonas* spp. bedarf einer genomischen Integration von Promotor und Reportergen, um Effekte der Kopienzahlen der Plasmide pro Zelle ausschließen zu können.

Zur Bewertung von induzierbaren Promotorsystemen wurden häufig verwendete Transkriptionsfaktor-/Promotorsysteme aus *Pseudomonas* spp. herangezogen, wie AraC/ $P_{BAD}$ , NagR/ $P_{nagAa}$ , LacI/ $P_{tac}$  oder XylS/ $P_m$  (Tab. 1.2). Zur Induktion der Genexpression werden verschiedene Induktormoleküle verwendet. Die hier benannten Systeme werden mit Zuckern oder Zuckerderivaten, wie IPTG (LacI/ $P_{tac}$ ), L-Arabinose (AraC/ $P_{BAD}$ ) oder wie bereits beschrieben, durch das aromatische Molekül 3-MB (XylS/ $P_m$ ) bzw. Salicylsäure

(NagR/ $P_{nagAa}$ ) induziert. Die Auswahl beinhaltete sowohl Promotoren, die über eine Aktivierung der Transkription funktionieren (AraC/ $P_{BAD}$  [pBTBX-*sfgfp*], NagR/ $P_{nagAa}$  [pBNT-*mcherry*]) (**Abb. 3.10B**) als auch solche, die eine Derepression (LacI/ $P_{tac}$  [pVLT33-*gfpmut3*]) (**Abb. 3.10C**) der Genexpression erfordern. Um solch ein System in einem rekombinanten Wirt anwenden zu können, muss die aktive Expression des Transkriptionsfaktors sowie eine effiziente Aufnahme der Induktormoleküle gewährleistet sein.

Hier wurde beobachtet, dass die drei getesteten Promotorsysteme in allen vier R-Stämmen ein graduelles Induktionsprofil ermöglichten. Dennoch konnten Unterschiede in den normierten Fluoreszenzintensitäten zwischen den verschiedenen Spezies festgestellt werden. *H. aestusnigri* VGXO14R zeigte beispielsweise bei Aktivierung der Genexpression die höchste Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den anderen R-Stämmen. Außerdem reichten bereits 20 mM L-Arabinose aus, um die maximale Fluoreszenzintensität zu erreichen. Im Gegensatz dazu waren bei *H. litoralis* 2SM5R und *H. oceani* KX20R 2,5-mal so viel und bei *H. bauzanensis* BZ93R sogar die fünffache Menge L-Arabinose notwendig. Dabei konnten in *H. litoralis* und *H. oceani* ähnliche Werte erhalten werden, die allerdings geringer waren als die maximale Fluoreszenzintensität in *H. aestusnigri* und *H. bauzanensis*. Bemerkenswert ist, dass *H. bauzanensis* und *H. litoralis* gemäß Literatur (**Abb. 3.1**) auf L-Arabinose wachsen können. Eine möglicherweise aktive Aufnahme spiegelt sich allerdings nicht in den Induktionsprofilen oder der zur Induktion benötigten Schwellenkonzentrationen für diese beiden Organismen im Vergleich zu *H. oceani* und *H. aestusnigri* wider (**Abb. 3.10B**). In *E. coli* waren bei einem aktiven Arabinoseimport nur 13,3 mM L-Arabinose notwendig, um die Genexpression vollständig zu induzieren, während in *P. putida* (ebenfalls ohne bekannten Importer und Arabinosestoffwechsel) 133 mM (2 % w/v) erforderlich waren (Cook *et al.*, 2018; Guzman *et al.*, 1995). Dies spricht für die Anwesenheit von Importmechanismen zur Aufnahme von Arabinose in allen *Halopseudomonas* spp. In *E. coli* K-12 wurden AraE und ein Komplex aus AraF und AraG zur Arabinoseaufnahme beschrieben (Kolodrubetz & Schleif, 1981). Zusammenfassend lassen die Ergebnisse vermuten, dass alle hier untersuchten *Halopseudomonas* spp. L-Arabinose aufnehmen können, auch wenn eine BLASTp-Analyse keine eindeutigen Kandidatenproteine für diese Funktion (z. B. Homologe zu AraRFG aus *E. coli* (Kolodrubetz & Schleif, 1981)) hervorbrachte. Die höchste dynamische Spanne des AraC/ $P_{BAD}$ -Systems wurde in *H. bauzanensis* BZ93R und *H. litoralis* 2SM5R erreicht (**Abb. 3.10D**) und entspricht dem zuvor für *P. putida* ermittelten Bereich (Chan *et al.*, 2023). Interessanterweise war die hier mit *H. aestusnigri* VGXO14R und *H. oceani* KX20R erreichte jeweilige dynamische Spanne höher als die zuvor für die Wildtyp-Stämme berichteten (Chan *et al.*, 2023). Eine mögliche Ursache könnten die optimierten

Kultivierungsbedingungen durch Supplementierung von Dicarbonsäuren in der vorliegenden Arbeit sein.

Bei der Verwendung des NagR/P<sub>nagAa</sub>-Systems wurde ein Maximum der normierten Fluoreszenzintensität nach Zugabe von 1 mM Salicylsäure erreicht. Zur Aktivierung der Genexpression in *H. aestusnigri* VGXO14R reichten bereits 10 µM Salicylsäure zur Induktion aus, während bei *H. litoralis* 2SM5R und *H. oceani* KX20R die fünffache Menge und bei *H. bauzanensis* BZ93R sogar die zehnfache Menge erforderlich war. Dies könnte auf effizientere Mechanismen hinweisen, um den Induktor aus der Zelle herauszuhalten, was der beobachteten höheren Toleranz dieser Stämme entspricht. Es wurde jedoch auch Fluoreszenz gemessen, wenn kein Induktionsmolekül hinzugefügt wurde, was auf eine hohe Basalexpression des Promotorsystems hinweist. Dies spiegelt sich ebenfalls in der, unter allen Promotoren verglichen, niedrigsten dynamischen Spanne für alle vier Stämme wider (**Abb. 3.10D**).

Bei der Derepression der Genexpression durch LacI bei Zugabe von IPTG hingegen zeigte *H. aestusnigri* VGXO14R die schwächste Fluoreszenzintensität. Im Gegensatz dazu konnten für *H. litoralis* 2SM5R und *H. oceani* KX20R die höchste Empfindlichkeit gegenüber IPTG beobachtet werden. Hier konnte die Depression der *gfpmut3*-Expression mit 10 µM IPTG erreicht werden, während bei *H. aestusnigri* VGXO14R und *H. bauzanensis* BZ93R 50 µM IPTG erforderlich waren. Da ein Maximum der GFPmut3-Fluoreszenz mit nur 80 – 100 µM IPTG erreicht wurde, benötigten die *Halopseudomonas* spp. nur ein Zehntel der IPTG-Menge für eine vollständige Induktion im Vergleich zu den üblicherweise verwendeten Konzentrationen in Pseudomonaden oder *B. subtilis* und eine etwas höhere Konzentration verglichen mit *E. coli* Tuner (DE3) (einem Stamm ohne Lacotse-Importer), was damit übereinstimmt, dass die dynamische Spanne des Expressionssystems in *E. coli* etwas größer war als in den *Halopseudomonas*-Stämmen (Hogenkamp *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2019; Binder *et al.*, 2014, 2016).

Alles in allem konnte eine Werkzeugbibliothek mit einer Reihe von anwendbaren episomalen Plasmidvektoren und charakterisierten Expressionssystemen für die ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten zur Verfügung gestellt werden, die für die weitere Forschung und Anwendung der vier *Halopseudomonas*-Arten genutzt werden können.

Spezies-spezifische Unterschiede können durch individuelle Induktor-Importeffizienz, Induktor-Toleranz, aber auch Kopienzahl-Unterschiede verursacht werden, wie unter anderem für *H. aestusnigri* und *H. oceani* berichtet wurde (Chan *et al.*, 2023).

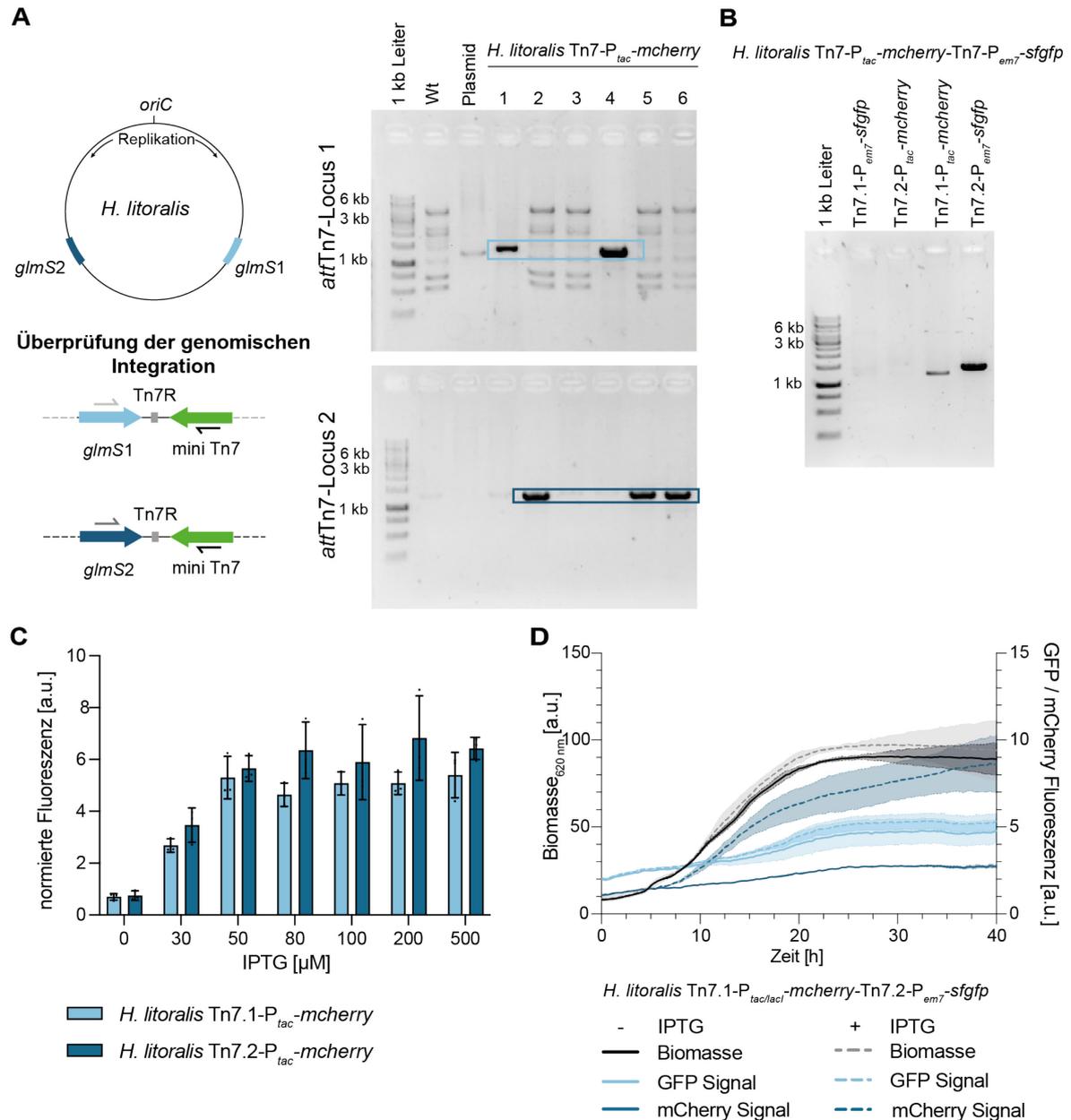
Um die Regulation der heterologen Expression zu untersuchen, wurde Gene, die für Fluoreszenzproteine kodieren unter die Kontrolle von konstitutiven und induzierbaren Promotorsystemen gebracht.

Die konstitutiven Promotor-Systeme  $P_{tac}$  und  $P_{em7}$  waren in allen vier Stämmen funktional.  $P_{14g}$  konnte lediglich in *H. littoralis* und *H. oceani* untersucht werden und zeigte eine konstitutive Expression. Die induzierbaren Promotorsysteme (LacI/ $P_{tac}$ , AraC/ $P_{BAD}$ , NagR/ $P_{nagAa}$ ) zeigten in allen vier R-Stämmen ein graduell steigendes Induktionsprofil. Unter der Regulation des NagR/ $P_{nagAa}$ -Systems konnte allerdings nur eine sehr geringe dynamische Spanne und eine erhöhte Basalexpression beobachtet werden. Die dynamische Spanne des LacI/ $P_{tac}$ -Systems war in den *Halopseudomonas*-Stämmen nur geringfügig kleiner als in *E. coli* Tuner (DE3).

### 3.4.2 Chromosomale Modifikationen

Es wird zunehmend üblich, die mit der Plasmidreplikation verbundene metabolische Belastung durch die ortsspezifische chromosomale Integration von Expressionskassetten zu vermeiden (Jahn *et al.*, 2016). Die chromosomale Integration eines Zielgens ist im Vergleich zu einer Plasmid-basierten Genexpression oft darüber hinaus vorteilhaft, da sie die Kultivierung ohne weitere Antibiotika ermöglicht. Sie gewährt zusätzlich eine höhere Reproduzierbarkeit der Experimente, da Faktoren wie der Plasmidverlust und die PCN keine Rolle spielen (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Jahn *et al.*, 2016). Die chromosomale Integration kann entweder an zufälligen Positionen erfolgen, z. B. durch Tn5-Transposition oder ortsspezifisch, durch homologe Rekombination oder Tn7-Transposition in den *attTn7*-Locus. Der *attTn7*-Locus befindet sich normalerweise in einer neutralen Region etwa 27 bp stromabwärts von *glmS* (Mitra *et al.*, 2010; Peters & Craig, 2001) (s. Kapitel 1.3.3). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit festgestellt, dass die hier untersuchten *Halopseudomonas* spp. zwei statt einer Kopie dieses essenziellen Gens besitzen. Daher bieten ihre Genome vermutlich zwei Stellen für die Tn7-Integration: *H. aestusnigri* VGXO14 ([WP 088273794.1](#), [WP 088276615.1](#)); *H. bauzanensis* BZ93 ([WP 074778335.1](#), [WP 036992462.1](#)); *H. littoralis* 2SM5 ([WP 090273138.1](#), [WP 090272410.1](#)); und *H. oceani* KX20 ([WP 104738233.1](#), [WP 104738216.1](#)). Obwohl die beiden Kopien dieser Gene in den einzelnen Stämmen nicht identisch sind, sind die TnsD-Erkennungssequenzen (Genteilsequenz, die der Aminosäuresequenz PRNLAKSVTVE (Mitra *et al.*, 2010) entspricht) hoch konserviert. Da *H. littoralis* 2SM5 der einzige Stamm ist, von dem die Daten eines geschlossenen Genoms zur Verfügung stehen, was eine genaue Lokalisierung der Loci ermöglicht, wurde dieser Stamm ausgewählt, um die Zugänglichkeit beider potenzieller Integrationsorte für die Tn7-Transposition weiter zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei Mini-Tn7-Vektoren verwendet, die sich durch Selektionsmarker und aufbauend auf

den oben beschriebenen Ergebnissen, in den Expressionssystemen für Fluoreszenzreporter unterscheiden: pUC18-R6KT-miniTn7T-Km-P<sub>tac/lacI</sub>-mcherry und pBG-13 (Zobel *et al.*, 2015), welches *sfgfp* unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors P<sub>em7</sub> enthält.



zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (4,5 h Kultivierung) induziert. **D:** Gleichzeitige Expression von zwei Zielgenen an verschiedenen *attTn7*-Integrationsorten. Das Biomasse-Signal (schwarz) von *H. littoralis* Tn7.1-*P<sub>em7</sub>-sfGFP*-Tn7.2-*P<sub>tac</sub>-mCherry* sowie die sfGFP-Fluoreszenz (hellblau, Tn7.1-Stelle) und die mCherry-Fluoreszenz (dunkelblau, Tn7.2-Locus) wurden mit einem Mikrobioreaktorsystem (BioLector I) gemessen. Die Kulturen wurden mit 50 µM IPTG induziert (+, gestrichelte Linie) oder mit gleichem Volumen mit 70 % EtOH als Negativkontrolle behandelt (-, durchgezogene Linie). Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar und die Fehlerbalken oder Schatten geben die berechnete Standardabweichung an. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

Die Tn7-Transposition wurde durch einen triparentalen horizontalen Gentransfer (s. Kapitel **2.2.1.3.3**) mit den Donorstämmen *E. coli* S17-1/pUC18R6KT-miniTn7T-Km-*P<sub>tac/lacI</sub>-mCherry* und *E. coli* S17-1/pTNS2 sowie dem Akzeptorstamm *H. littoralis* 2SM5R durchgeführt. Die Loci der Tn7-Integration wurden mit Hilfe einer analytischen PCR mit zwei ortsspezifischen Primern bestimmt, die entweder innerhalb der Sequenz von *glmS1* oder *glmS2* binden, sowie einem Primer, der in der Integrationskassette bindet. Auf diese Weise wurde nur dann ein PCR-Produkt erzeugt, wenn die Transposition erfolgreich war (**Abb. 3.11A**). Das PCR-Ergebnis wurde schließlich durch eine Sequenzanalyse bestätigt. Von 12 Klonen, die nach der Transposition von miniTn7T-Km-*P<sub>tac/lacI</sub>-mCherry* analysiert wurden, hatten fünf das Transposon stromabwärts von *glmS1* integriert und ebenfalls fünf trugen das Transposon stromabwärts von *glmS2*. Bei zwei Stämmen waren die PCR-Ergebnisse nicht eindeutig. Folglich waren beide Kopien von *glmS* tatsächlich für die Tn7-Transposition adressierbar. Hier scheint eine eher zufällige Verteilung der Integration in eine der beiden Tn7-Loci erfolgt zu sein, auch wenn die statistische Aussagekraft der kleinen Stichprobe begrenzt ist.

Nur für eine begrenzte Anzahl bakterieller Genome ist mehr als eine *glmS* Kopie (und damit mehrere *attTn7*-Loci stromabwärts der Gene) beschrieben; dazu gehören verschiedene *Burkholderia* spp.,  $\beta$ -Proteobakterien, welche allerdings normalerweise zwei Chromosomen aufweisen (Choi *et al.*, 2006). *Burkholderia mallei* besitzt zwei *glmS*-Kopien auf Chromosom 1 und wurde im Hinblick auf die Anwendung der Tn7-Transposition als genetisches Werkzeug genauer untersucht. Es konnte auch für dieses Bakterium gezeigt werden, dass die Tn7-Transposition an beiden Loci stattfand (Choi *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit *H. littoralis* erzielt wurden, wurde jedoch ein *attTn7*-Lokus eindeutig bevorzugt. 92 % der Klone wiesen das integrierte Transposon stromabwärts von *glmS1* auf (Choi *et al.*, 2006). In *B. mallei* befindet sich *glmS1* näher am vorhergesagten Replikationsursprung als die zweite Kopie des Gens. In *H. littoralis* hingegen weisen beide *glmS*-Gene ähnliche Abstände zu *oriC* auf (**Abb. 3.11A**), was möglicherweise die eher zufällig erscheinende Integration in *H. littoralis* erklären könnte.

Da die Lokalisierung eines Integrans im Chromosom oft die Expressionsstärke beeinflusst (Chaves *et al.*, 2020; Englaender *et al.*, 2017; Sauer *et al.*, 2016), wurde die Funktionalität und Expressionsstärke des *LacI/P<sub>tac</sub>*-Expressionssystems, welches jeweils in eine der beiden *attTn7*-Loci in das Genom von *H. littoralis* integriert wurde, anhand der mCherry-

Fluoreszenz 20 h nach Induktion der Genexpression überprüft. Bemerkenswerterweise wurden keine Unterschiede zwischen den Ergebnissen zu beiden Integrationsorten festgestellt (**Abb. 3.11C**). Diese Beobachtung passt zu früheren Berichten über die Korrelation der Proteinproduktion mit der Nähe des genomischen Integrationsortes zu *oriC*, unabhängig von der Strangpolarität (Chaves *et al.*, 2020; Sauer *et al.*, 2016).

Anschließend wurde die gleichzeitige Besetzung beider *attTn7*-Loci untersucht, indem ein Stamm, der Tn7-LacI/*P<sub>tac</sub>-mcherry* in *attTn7.1* trug, mit einem zweiten Tn7-Transposon transformiert wurde, das ein *sfgfp*-Gen hinter einem konstitutiv aktiven Promotor auf pBG-13 trägt (Zobel *et al.*, 2015). Um die zweite Integration zu überprüfen, wurde ein weiterer spezifischer Primer genutzt, der innerhalb der *sfgfp*-Sequenz bindet. So zeigte ein PCR-Produkt an, dass die Transposition in den jeweiligen Locus erfolgte (**Abb. 3.11B**). Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte, dass eine gleichzeitige Besetzung beider *attTn7*-Loci innerhalb eines Stammes tatsächlich möglich war. Während der Kultivierung unter Expressionsbedingungen für beide Zielgene konnte beobachtet werden, dass die Fluoreszenzreportergene beider Loci exprimiert wurden (**Abb. A10A**). Bemerkenswert ist, dass das mCherry-Signal in der Mehrzahl der Kulturen erwartungsgemäß unmittelbar nach der IPTG-Zugabe auftrat, während das sfGFP-Signal nicht mit dem Biomassesignal korrelierte, wie es von einem konstitutiven Promotorsystem erwartet werden würde (**Abb. 3.11D**). In vier von 45 Kulturen korrelierte hingegen das sfGFP-Signal mit dem Biomassesignal (**Abb. A10B**). Stattdessen trat das mCherry-Signal trotz des Induktionszeitpunkts nur in der stationären Wachstumsphase auf, was nicht bei den oben beschriebenen Experimenten mit Stämmen beobachtet wurde, in denen nur ein Locus das Transposon beinhaltete. Vor diesem Hintergrund kann eine Interferenz zwischen beiden Loci vermutet werden, die entweder auf Ebene der Expression oder auf die Stammstabilität einwirkt und zur Repression oder zum Verlust der Zielgene in Subpopulationen führt. Vorzustellen wären hier ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Regulation der Expression von ribosomaler DNA (rDNA), welche in hohen Kopienzahlen vorliegen, aber unterschiedlich stark exprimiert werden (Domröse *et al.*, 2019). Studien mit *Burkholderia pseudomallei* berichteten über eine unterschiedliche Aktivität der transponierten Zielgene, wenn sie in verschiedene *attTn7*-Loci integriert wurden (Bruckbauer *et al.*, 2015). Die gleichzeitige Integration des luxCDABE-Operons, das dort als Reporter in zwei *attTn7*-Loci verwendet wurde, schien zu einem verstärkten Signal zu führen, welches jedoch nicht quantifiziert wurde. In *Salmonella enterica* sp. wurden bis zu drei, allerdings künstlich eingebrachte, *attTn7*-Loci mit *gfp*-Genen besetzt. Hier wurde beobachtet, dass die GFP-Fluoreszenz proportional mit der Anzahl der integrierten *gfp*-Kopien korreliert (Roos *et al.*, 2015). Interferierende Effekte, wie hier im Experiment mit *H. litoralis*, wurden bei diesen künstlichen Studien also nicht direkt beobachtet.

Unabhängig von diesem noch nicht aufgeklärten Phänotyp konnte für *H. litoralis* als Beispiel für *Halopseudomonas* gezeigt werden, dass beide *attTn7*-Loci für die Integration von Expressionsmodulen für Zielgene geeignet sind, z. B. um weitere Kopien homologer Gene zu exprimieren, Mutanten zu komplementieren oder neue biokatalytische Funktionen oder Reportergene zu etablieren (Norris *et al.*, 2010; Choi & Schweizer, 2006; Choi *et al.*, 2006). Falls erforderlich, ermöglichen diese Bakterien die sequenzielle Integration von zwei verschiedenen Modulen unter Verwendung von unterschiedlichen Tn7-Transposons.

Neben dem Einbringen von Genen spielt die gezielte Deletion von Genen eine entscheidende Rolle in der genetischen Zugänglichkeit eines Organismus. Für Pseudomonaden gibt es hierzu eine Vielzahl an Methoden, die meist die Mechanismen für homologe Rekombination in Bakterien als ersten Schritt ausnutzen (s. Kapitel 1.3.3). Eines dieser Systeme stellt das I-SceI-basierte System dar, was auf der homologen Rekombination unter Verwendung von integrativen Plasmiden und anschließender Selektion auf Deletionsmutanten durch die auf dem replikativen pSW-1 Plasmid kodierte I-SceI Endonuklease beruht (de Witt *et al.*, 2023; Volke *et al.*, 2020; Wirth *et al.*, 2020). In den hier untersuchten *Halopseudomonas* spp. konnten mit Hilfe dieser Methode in dieser Arbeit keine Deletionsmutanten für putative Polyesterhydrolasen (Molitor *et al.*, 2020) bzw. Ectoinhydroxylase (s. Kapitel 1.2.1.3) als Beispielziele generiert werden. Die Selektion auf das zweite *crossing-over* erwies sich dabei als nicht erfolgreich. In parallelen Studien mit *H. formosensis* FZJ wurde beobachtet, dass dieser den RK2-Replikationsursprung des pSW-2 Plasmids nicht replizieren konnte, weshalb pQT8-*sce-I* als Expressionsvektor für die I-SceI konstruiert wurde. Dieses Plasmid trägt einen pRO1600 und ein konstitutiv exprimiertes *I-sceI*-Gen. Somit konnte schließlich eine Polyesterhydrolase-Deletionsmutante dieses Stammes etabliert werden (de Witt *et al.*, 2023), was sich allerdings auch mit dem optimierten System schwierig dargestellt hat und das System nicht mit der aus Arbeiten mit *Pseudomonas* spp. gewohnten Effizienz anwendbar war (J. de Witt, persönliche Kommunikation). Somit scheint grundsätzlich ein Werkzeug zur Deletion von Genen für *Halopseudomonas* zur Verfügung zu stehen, jedoch nicht als universell einsetzbares Werkzeug zum effizienten *metabolic engineering* von *Halopseudomonas* spp. Aus diesem Grund sollte zukünftig das universell anwendbare CRISPR-Cas9-System getestet und evaluiert werden. Schließlich konnte gezeigt werden, dass es bereits in vielen verschiedenen Organismen, wie beispielsweise *B. subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides* oder *P. putida* angewendet werden konnte (Schuster & Kahmann, 2019; Zheng *et al.*, 2019; Aparicio *et al.*, 2018; Altenbuchner, 2016). Darüber hinaus erwies sich das System schon in vielen anderen nicht etablierten Modellorganismen als erfolgreich (Volke *et al.*, 2023; Mendoza & Trinh, 2018). Eine Etablierung einer CRISPR-Cas9-basierten Werkzeugensammlung würde zudem die Möglichkeit eröffnen, die Expression von Zielgenen

mittels CRISPRi als Alternative zur Deletion gezielt zu verringern, was insbesondere bei essenziellen Genen von Vorteil sein kann.

Zusammenfassend können die hier untersuchten Organismen des Genus *Halopseudomonas* bereits für mikro- und molekularbiologische Anwendungen verwendet werden. Es wurden geeignete Kultivierungsbedingungen sowohl in einem komplexen als auch in einem Minimalmedium identifiziert. Mit den untersuchten Replikationsursprüngen verschiedener Inkompatibilitätsgruppen steht eine Auswahl an Plasmiden mit diversen Merkmalen wie Antibiotikaresistenz oder Promotorsystemen zur Verfügung.

Außerdem lassen sich durch die Anwendung eines nicht replizierbaren Replikationsursprungs Geninsertionen erzeugen. Dies konnte mit Hilfe der Tn7-Transposition in die zwei *attTn7*-Loci im Genom von *H. litoralis* gezeigt werden. Die heterologe Genexpression konnte anhand von konstitutiven und induzierbaren Promotorsystemen ebenfalls in den *Halopseudomonas*-Arten exemplarisch dargestellt werden. Alles in allem konnte ein breites Nutzungsprofil für die Anwendung der *Halopseudomonas* spp. in der Biotechnologie etabliert werden.

Die meisten Ergebnisse aus Kapitel 3.1 – 3.4 dieser Arbeit sind in der folgenden Publikation veröffentlicht:

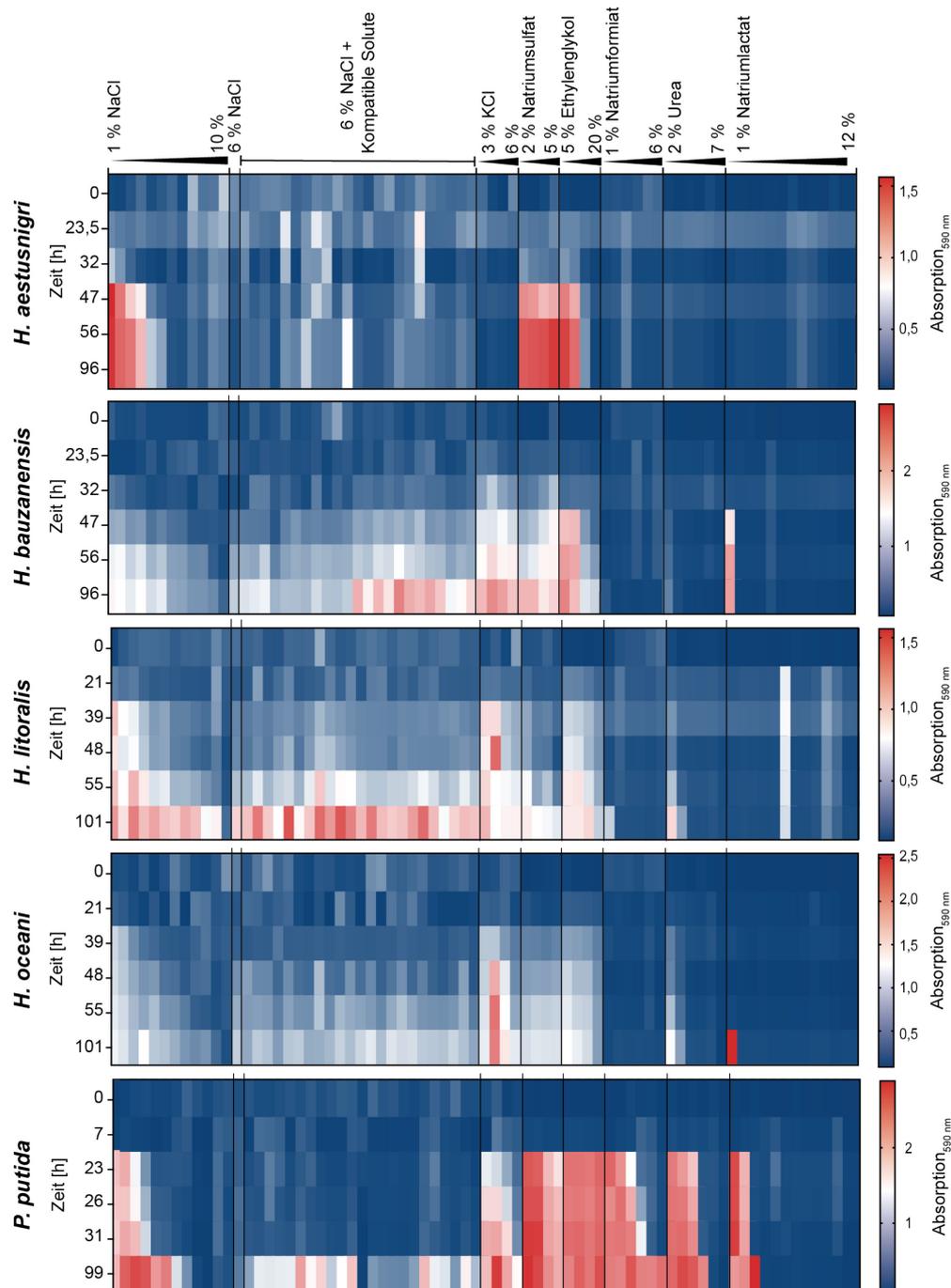
Kruse, L., Loeschcke, A., de Witt, J., Wierckx, N., Jaeger, K.-E. & Thies, S. (2023) *Halopseudomonas* species: Cultivation and molecular genetic tools. *Microb Biotechnol.* 00:1-14. doi: 10.1111/1751-7915.14369

### 3.5 Physiologische Reaktion von *Halopseudomonas* spp. auf osmotischen Stress

Die ausgewählten Vertreter der Gattung *Halopseudomonas* spp. weisen vielversprechende Eigenschaften auf, die für die biotechnologische Anwendung relevant sein können (s. Kapitel 1.5, 3.3). Hierzu zählen unter anderem die  $\omega$ -Transaminasen oder auch die Polyesterhydrolase (Bollinger *et al.*, 2020b). Namensgebend war allerdings die Osmotoleranz dieser Spezies, welche innerhalb von biotechnologischen Produktionsprozessen eine hilfreiche Eigenschaft darstellen kann. Einerseits kann ein hoher Salzgehalt innerhalb der bakteriellen Kultur als Selektionsdruck gegen nicht-halophile Spezies genutzt werden (Chen & Jiang, 2018). Andererseits entstehen innerhalb eines Produktionsprozesses von organischen Säuren, wie dem Ausgangsstoff für Biopolymere 2,5-Furandicarbonsäure oder Basen, hohe Salzgehalte, wenn der pH durch Titration von Säuren oder Basen stabil gehalten wird (Sayed *et al.*, 2019). Alkaliphile und

halophile Mikroorganismen, wie *Halomonas* spp., zeigten sich beispielsweise in der Produktion des Biopolymers PHA unter unsterilen und kontinuierlichen Bedingungen als vielversprechende Kandidaten (Chen & Jiang, 2018; Tan *et al.*, 2011).

Um zunächst einen allgemeinen Überblick über die Osmotoleranz der ausgewählten *Halopseudomonas*-Stämme zu bekommen, wurden die „Phenotype MicroArrays™ PM9“ (**Tab. 2.6**) verwendet. Hierbei handelt es sich um vorgefertigte 96-*well* Mikrotiterplatten, welche diverse Salze in verschiedenen Konzentrationen beinhalten (**Tab. A4**). In diesen wurde der jeweilige Organismus in einem vom Hersteller bereitgestellten Komplexmedium kultiviert (Kapitel **2.2.1.5.1**). Die Stoffwechselaktivität und somit das bakterielle Wachstum führen zu einer NADPH-Produktion, welche den beigefügten Tetrazolium-Farbstoff reduziert, was bei 590 nm quantifiziert werden kann. In **Abb. 3.12** ist die Zusammenfassung dieses Osmotoleranz-Screenings gezeigt.



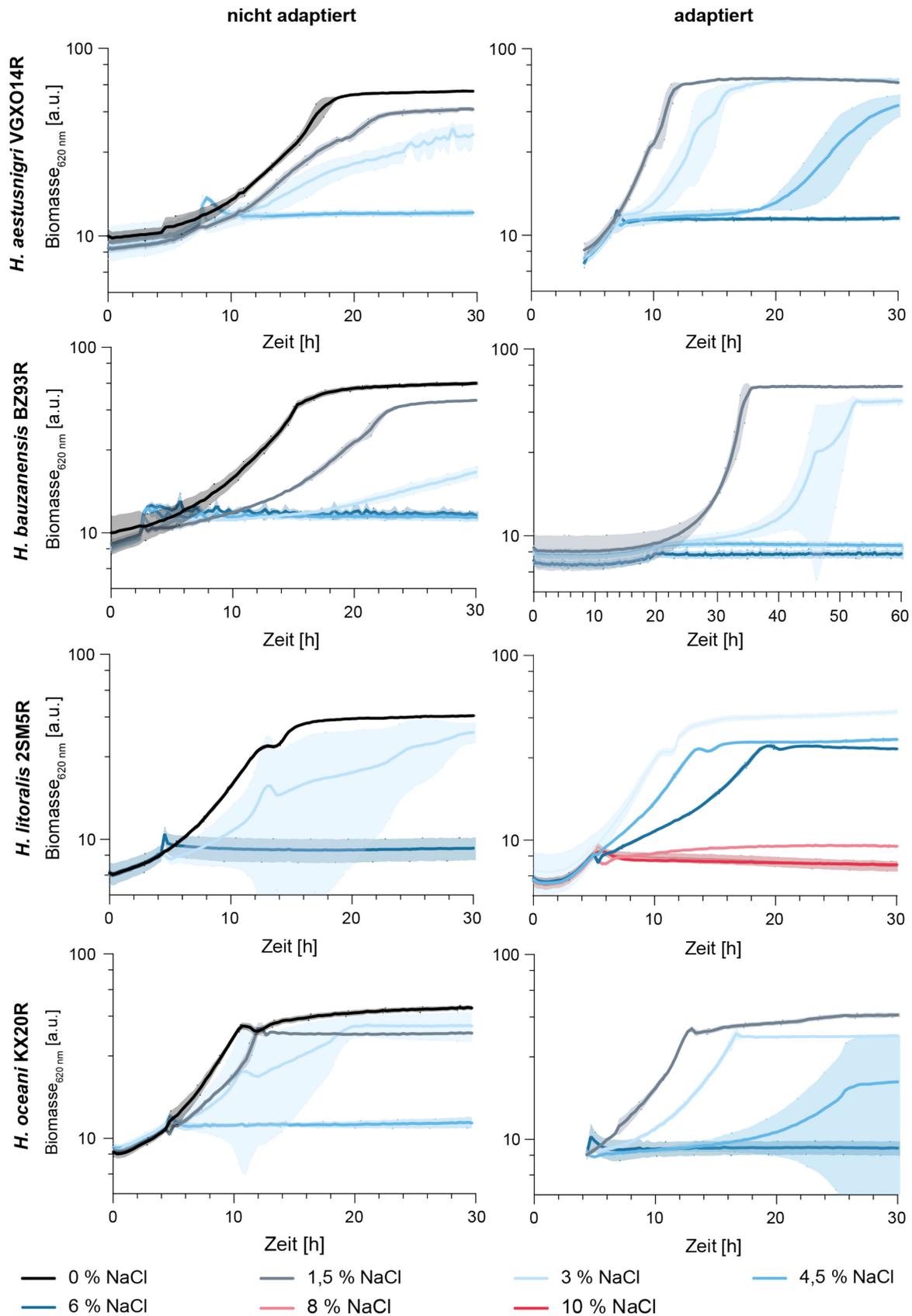
**Abb. 3.12: Phänotypische Bestimmung der Osmotoleranz mit Hilfe des Phenotype Microarray™ PM9.** *H. aestusnigri* VGXO14R, *H. bauzanensis* BZ93R, *H. litoralis* 2SM5R, *H. oceani* KX20R und *P. putida* KT2440, als nicht-halophiler Kontrollstamm, wurden in den vorgefertigten Platten mit unterschiedlichen Salzen und Osmolyten (Konzentration unbekannt) in jeweils mehreren Konzentrationen zur Bestimmung der Osmotoleranz für ca. 100 h kultiviert. Die Reihenfolge der gezeigten Daten entspricht den *wells* A1-F12 der jeweiligen Mikrotiterplatte PM9. Eine detaillierte Übersicht zu den *well*-Inhalten gemäß der Herstellerangaben ist in **Tab. A4** gegeben. Die Absorption des Redoxfarbstoffs Tetrazolium als Maß für metabolische Aktivität wurde bei 590 nm verfolgt und in Form einer *heatmap* von blau über weiß nach rot dargestellt. Die Daten stellen biologische Einfachbestimmungen dar.

Bei Betrachtung der Toleranz gegenüber NaCl zeigte *H. litoralis* 2SM5R bei bis zu 8 % NaCl die höchste Stoffwechselaktivität unter den vier *Halopseudomonas* spp. Diese Ergebnisse spiegeln die gleichen Tendenzen aus den Stammbeschreibungen wider, allerdings zeigten die Literaturdaten generell einen höheren Toleranzbereich mit bis zu 15 % NaCl für *H. litoralis* (Wang & Sun, 2016; Sánchez *et al.*, 2014; Pascual *et al.*, 2012;

Zhang *et al.*, 2011), was vermutlich auf unterschiedliche Kultivierungsbedingungen zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung können dennoch genutzt werden, um die Stämme untereinander zu vergleichen und verschaffen einen ersten Überblick über verschiedene Osmotoleranzen. Erwartungsgemäß führte der Zusatz von Osmolyten zu einer höheren Stoffwechselaktivität als bei einer Kultivierung ohne diese. Interessanterweise erhöhte sich die Stoffwechselaktivität von *H. bauzanensis* nur bei ausgewählten kompatiblen Soluten wie Trehalose, Betain, Trimethylamin oder Trigonellin. Ähnliche Beobachtung konnte auch für *H. aestusnigri* und *H. litoralis* gemacht werden. Die selektive Erhöhung der Stoffwechselaktivität in Gegenwart bestimmter kompatibler Solute könnte somit auf spezifische Transportmechanismen in *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis* und *H. litoralis* hindeuten. Im Gegensatz dazu zeigte *H. oceani* kaum eine Verbesserung der Stoffwechselaktivität in Relation zu der 6 % NaCl Vergleichsprobe. Der Zusatz des kompatiblen Soluts Ectoin führte im Vergleich mit der jeweiligen 6 % NaCl-Kontrolle in keiner der betrachteten *Halopseudomonas*-Arten zu einer erhöhten Stoffwechselaktivität, obwohl sie die konservierten Gene zur Produktion von Ectoin aufweisen (s. Kapitel 1.2.1.2). Dieses Osmolyt wurde womöglich bereits produziert, sodass eine noch höhere Konzentration keinen weiteren positiven Effekt auf die Stoffwechselaktivität zeigte. Darüber hinaus zeigten alle Stämme eine Toleranz gegenüber bis zu 20 % Ethylenglykol. Ethylenglykol stellt ein Monomer aus dem Abbau von PET dar (Tiso *et al.*, 2022), sodass dies ein weiteres Indiz für die biotechnologische Relevanz dieser Gattung darstellt. In Anwesenheit von KCl konnte nur in *H. aestusnigri* keine Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden. Die Aufnahme von KCl aus dem umgebenden Medium stellt allerdings eine weit verbreitete Reaktion auf osmotischen Stress dar (s. Kapitel 1.2.1) (Czech *et al.*, 2018a), weshalb hier weitere Untersuchungen nötig wären. In den anderen untersuchten *Halopseudomonas*-Arten führten 4 % KCl zur höchsten Stoffwechselaktivität. Der Zusatz von 2 % Harnstoff zeigte nur eine geringe Stoffwechselaktivität. *H. litoralis* und *H. oceani* tolerierten sogar bis zu 3 % Harnstoff. Natriumlactat vermittelte in den *H. aestusnigri* Kulturen eine inhibierende Wirkung. In *H. bauzanensis* konnten bei 1 % des Zusatzes eine leichte Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden und in *H. litoralis* bei 6 %. Da es sich bei diesen Experimenten um biologische einfach Bestimmungen handelt, müsste insbesondere bei diesen Beobachtungen eine Wiederholung durchgeführt werden, um zu evaluieren, ob es sich hier um Messartefakte handelt.

Verglichen mit *P. putida* KT2440 tolerierten die *Halopseudomonas*-Arten höhere Konzentrationen NaCl, jedoch zeigte der etablierte Organismus höhere Toleranzen gegenüber allen anderen getesteten Salzen. Dies verdeutlicht eine Nische, in der die hier untersuchten Spezies eine Anwendung finden könnten, was wiederum den Chassis-à-la-

*carte* Gedanken unterstützt (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Wynands *et al.*, 2019). Aus diesem Grund soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit NaCl als Stressor weiter evaluiert werden. Da für diese Methode mit IF-10+ (s. Kapitel **2.2.1.5.1**) ein Komplexmedium des Herstellers verwendet wurde, dessen Zusammensetzung nicht bekannt ist und darüber hinaus die Kultivierung stehend erfolgte, diente die phänotypische Charakterisierung als initiales Experiment. Die hieraus gewonnen Erkenntnisse wurden durch die Kultivierung in RWPs gefüllt mit HM-Medium validiert und überprüft, ob sich eine Präadaption an NaCl-Stress positiv auf die Osmotoleranz auswirkt (**Abb. 3.13**). Zur Präadaption wurde eine Konzentration gewählt, die bereits zu geringen Wachstumseinschränkungen führte. Da für *H. litoralis* eine höhere Toleranz gegenüber NaCl erwartet wurden, wurden für diesen Organismus weniger niedrige Konzentrationen getestet als in den anderen untersuchten *Halopseudomonas*-Arten



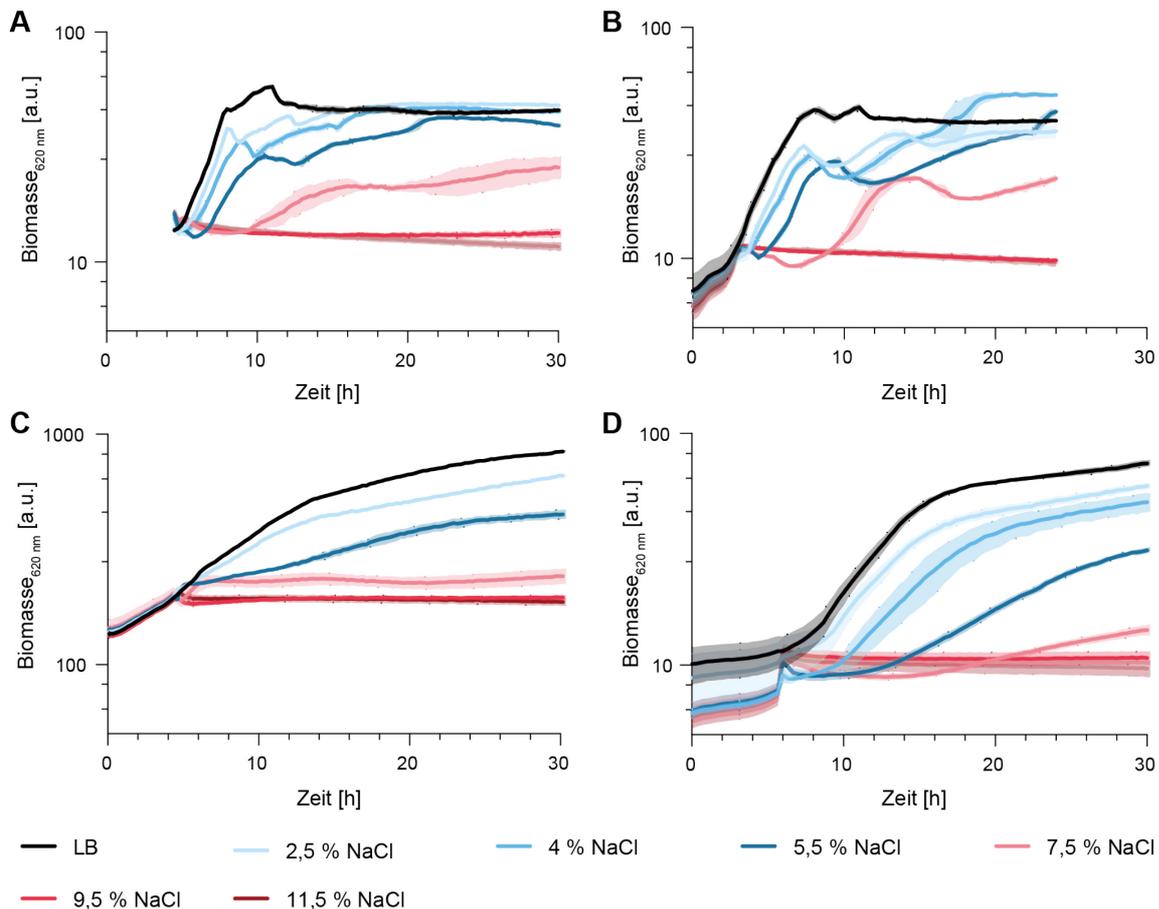
**Abb. 3.13: Bestimmung der Toleranz von *Halopseudomonas* spp. gegenüber NaCl in HM-Medium.** Die Stämme *H. aestusnigri* VGXO14R, *H. bauzanensis* BZ93R, *H. litoralis* 2SM5R und *H. oceani* KX20R wurden in HM-Medium kultiviert. Linke Seite: Wuchskurven von Kulturen angeimpft aus Vorkulturen in HM<sub>seb</sub>-Medium. Der Stress wurde durch Zugabe verschiedener NaCl-Konzentrationen (0 % NaCl: schwarz; 1,5 % (w/v) NaCl: grau; 3 % (w/v) NaCl: hellblau; 4,5 % (w/v) NaCl blau; 6 % (w/v) NaCl: dunkelblau; 8 % (w/v) NaCl: rosa; 10 % (w/v) NaCl: rot) induziert (nicht adaptiert). Rechte Seite: Wuchskurven von Kulturen aus Vorkulturen in HM<sub>seb</sub>-

Medium mit 1,5 % (w/v) NaCl bzw. 3 % (w/v) NaCl (*H. litoralis*). Die adaptierten Stämme wurden ebenfalls osmotischem Stress durch Zugabe von NaCl ausgesetzt. Die Wuchskurven sind bis zu der Konzentration abgebildet, die zu einer vollständigen Inhibierung der Kultur führte. Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar und die Schatten geben die berechnete Standardabweichung an.

Der Salzstress in Form eines hyperosmotischen Schocks wurde durch Hinzugabe verschiedener Mengen NaCl zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (nach ca. 4,5 h) induziert (s. Kapitel **2.2.1.5**). Alle vier *Halopseudomonas* spp. tolerierten bei der Kultivierung in einem Minimalmedium vergleichsweise geringe Mengen an NaCl (**Abb. 3.13**). Sogar die Zugabe von 1,5 % (w/v) NaCl induzierte eine Stressreaktion in *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis* und *H. oceani*, welche anhand einer verlängerten Adaptionsphase sowie einer langsameren exponentiellen Wachstumsphase deutlich wurde. Bei einem osmotischen Schock mit 4,5 % (w/v) NaCl oder mehr konnte in keiner Spezies ein Wachstum detektiert werden. Eine Präadaption von *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis* und *H. oceani* an das höhere osmotische Potential bei 1,5 % (w/v) NaCl bewirkte eine Verbesserung der tolerierten Konzentrationen von bis zu 3 % (w/v) NaCl und führte insgesamt zu einer kürzeren Lag-Phase nach Zugabe des Stressors, mit Ausnahme von *H. bauzanensis*. Die finalen Biomassen nach der Zugabe von 3 % (w/v) NaCl waren in allen Stämmen in einer ähnlichen Größenordnung wie bei Kulturen, die keinem Salzstress ausgesetzt waren. *H. litoralis* tolerierte nach einer Präadaption mit 3 % (w/v) NaCl sogar bis zu 10 % NaCl. Gemäß den Stammbeschreibungen kann *H. aestusnigri* als einziger der vier ausgewählten Stämme nicht ohne NaCl wachsen (Wang & Sun, 2016; Sánchez *et al.*, 2014; Pascual *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Die hier gemachten Beobachtungen zeigen allerdings, dass dieser Organismus auch bei 0 % NaCl wachsen konnte. Möglicherweise kompensierten Bestandteile des HM<sub>Seb</sub>-Mediums einen vorherrschenden Mangel in den Literaturexperimenten. Die Präadaption der halophilen Organismen zeigte eine Steigerung der Osmotoleranz in den untersuchten *Halopseudomonas* spp. Dies weist einen vielversprechenden Ansatz zur gesteigerten Osmotoleranz mittels ALE über mehrere Zyklen auf.

Der Unterschied in der Osmotoleranz im Vergleich zu den Vortests und den Stammbeschreibungen könnte auch darin begründet sein, dass sich Bakterien vor plötzlichen Änderungen im osmotischen Potenzial schützen, indem sie Kalium oder kompatible Solute, wie beispielsweise Prolin, oder auch Trehalose, Betain, Trimethylamin oder Trigonellin (s.o.) aus der Umgebung aufnehmen, was bei einem Mineralmedium nicht in dem Maße möglich ist (s. Kapitel **1.2.1**) (Hermann *et al.*, 2020; Czech *et al.*, 2018a). Um zu überprüfen, ob das ausgewählte HM<sub>Seb</sub>-Medium diesbezüglich eine Limitierung in der Nährstoffzusammensetzung aufweist, wurden *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis*, *H. litoralis* und *H. oceani* in dem Komplexmedium LB<sub>Suc</sub> kultiviert und durch Zugabe verschiedener Konzentrationen NaCl plötzlich auftretendem osmotischen Stress ausgesetzt (**Abb. 3.14**).

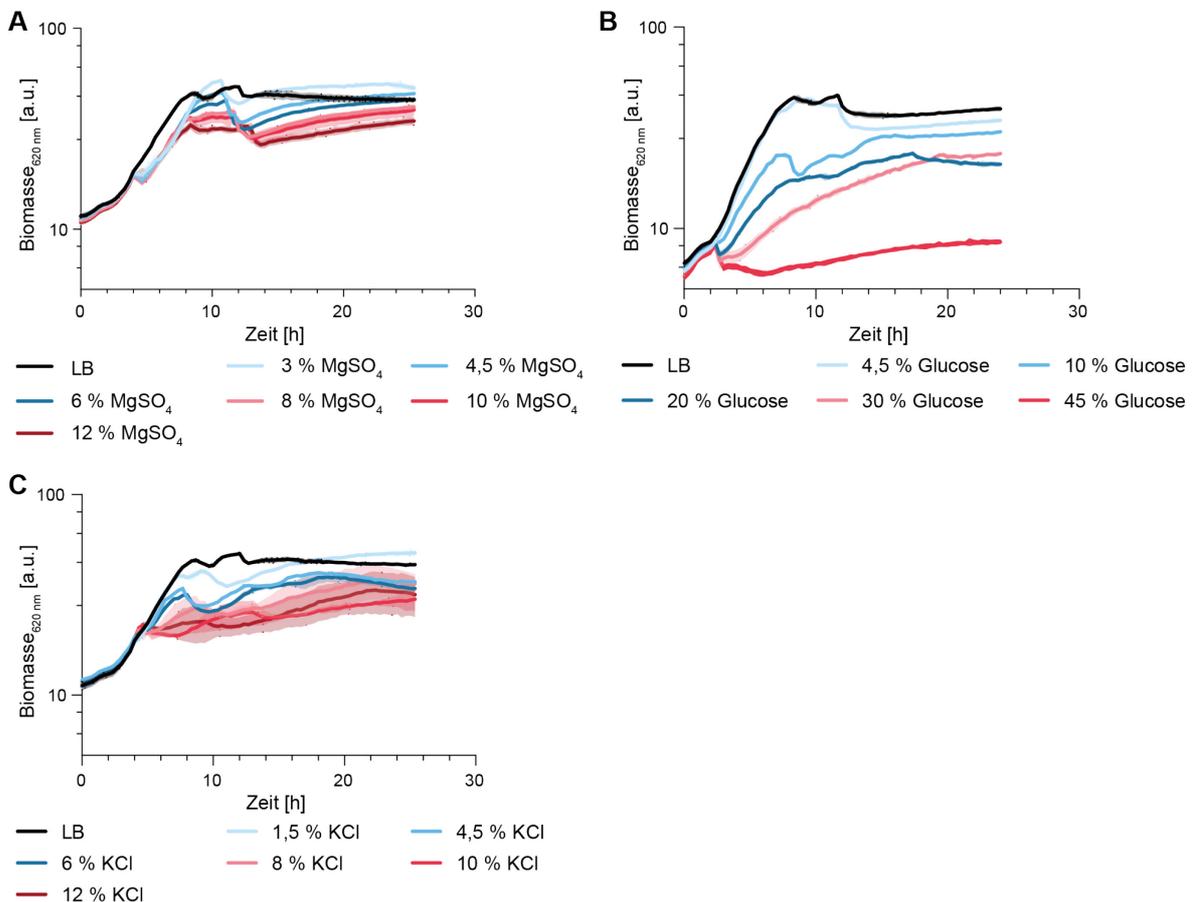
Die Messdaten bezüglich des osmotischen Stresses in *H. bauzanensis* wurden im Rahmen einer mit dieser Arbeit assoziierten Bachelorarbeit bestimmt (Armborst, 2022).



**Abb. 3.14 Bestimmung der Toleranz von *Halopseudomonas* spp gegenüber NaCl in  $LB_{Suc}$ -Medium.** Die Stämme *H. aestusnigri* VGXO14R (A, Messdaten ab Induktionszeitpunkt), *H. bauzanensis* BZ93R (modifiziert nach Armborst (2022)) (B), *H. litoralis* 2SM5R (C) und *H. oceani* KX20R (D) wurden in  $LB_{Suc}$ -Medium kultiviert und zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase verschiedenen Konzentrationen NaCl ausgesetzt. Schwarz:  $LB_{Suc}$ ; hellblau: 2,5 % (w/v) NaCl; blau: 4 % (w/v) NaCl; dunkelblau: 5,5 % (w/v) NaCl; rosa: 7,5 % (w/v) NaCl; rot: 9,5 % (w/v) NaCl; dunkelrot: 11,5 % (w/v) NaCl. Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar und die Schatten geben die berechnete Standardabweichung an.

In dem Komplexmedium  $LB_{Suc}$  tolerierten alle gemessenen Stämme höhere NaCl-Konzentrationen von bis zu 7,5 % (w/v) ohne eine vorherige Präadaption. Dies deutet darauf hin, dass das Medium tatsächlich eine wichtige Funktion in der Bereitstellung eines osmotischen Schutzes der Zelle bei einem osmotischen Schock darstellt. Dies kann entweder über die Aufnahme von Kalium oder kompatiblen Soluten oder aber durch, wie oben beschrieben, die Bereitstellung geeigneter Nährstoffe zur Synthese der Osmolyte geschehen. Interessanterweise tolerierte *H. litoralis* hier mit 7,5 % (w/v) NaCl nur rund die Hälfte der in der Literatur beschriebenen Konzentration (Pascual et al., 2012). Somit könnte sowohl die Versuchsdauer, die Medienzusammensetzung, die Kultivierungsart sowie die Art der Stressinduktion die beobachtete Osmotoleranz erheblich beeinflussen. In der Erstbeschreibung ist beispielsweise nicht der Zeitraum der Kultivierung angegeben (Pascual et al., 2012). Da hier im Allgemeinen beobachtet wurde, dass die

Medienzusammensetzung scheinbar eine erhebliche Rolle in der Osmotoleranz spielt, wurde das Komplexmedium für alle weiteren entsprechenden Experimente angewendet. Neben einer generellen Überprüfung der Osmotoleranz in verschiedenen Medien konnten Bedingungen identifiziert werden, unter denen ein Organismus gestresst ist. Als Indikatoren dienten hier eine verlängerte Anpassungsphase, ein langsamerer Wachstum, sowie eine verringerte Biomasse nach 24 h der Kultivierung. Hier wurden 4 % (w/v) NaCl für *H. aestusnigri* und *H. oceani* und 5,5 % (w/v) NaCl für *H. litoralis* und *H. bauzanensis* als Bedingungen ausgewählt, die den osmotischen Stress messbar induzieren. Ergänzend wurde im Rahmen einer mit dieser Arbeit assoziierten Bachelorarbeit untersucht, wie sich hohe Konzentrationen an Magnesiumsulfat, Glucose oder Kaliumchlorid auf *H. bauzanensis* auswirken, um so neben dem üblichen NaCl-Stress einen breiteren Einblick auf osmotischen Stress im Generellen zu bekommen (Abb. 3.15) (Armborst, 2022). Schließlich wird osmotischer Stress in biotechnologischen Prozessen nicht nur durch Gegendotation saurer oder basischer Produkte erzeugt, sondern auch durch hohe Substrat- und/oder Produktkonzentrationen (Chen *et al.*, 2021).



**Abb. 3.15: Bestimmung des Osmotoleranz von *H. bauzanensis* BZ93R gegenüber verschiedener Solute.** *H. bauzanensis* BZ93R wurde in LB<sub>Suc</sub>-Medium kultiviert und zu Beginn der exponentiellen Wuchsphase (ca. 4,5 h nach Kultivierungsbeginn) verschiedenen Konzentrationen (w/v) MgSO<sub>4</sub> (A), Glucose (B) und KCl (C) ausgesetzt. Kulturen, die keinem osmotischen Stress ausgesetzt wurden, dienten als Negativkontrolle. Die niedrigste Konzentration der Zusätze ist in hellblau und nimmt über dunkelblau, rosa bis hin zu dunkelblau zu. Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar und die Schatten geben die berechnete

Standardabweichung an. Die gezeigten Daten stammen aus der genannten Bachelorarbeit und wurden modifiziert (Armborst, 2022).

Bei  $\text{MgSO}_4$  (**Abb. 3.15A**) zeigten die Kulturen von *H. bauzanensis* BZ93R zunächst eine kurze Adaptionsphase auf die Stressinduktion. Anschließend zeigten alle Kulturen eine ähnliche Wachstumsrate, unterschieden sich aber leicht in den finalen Biomassewerten. Somit könnte *H. bauzanensis* BZ93R sogar höhere Konzentrationen als 12 % (w/v)  $\text{MgSO}_4$  (1 M) tolerieren. In *E. coli* Kulturen wurde bereits gezeigt, dass sich die erreichte Zelldichte in Präsenz von 1,25 M  $\text{MgSO}_4$  im Vergleich zu einer 2 mM Kultur halbierte (Nepal & Kumar, 2020). Eine so starke Inhibierung konnte in den an *H. bauzanensis* getesteten Salzmengen nicht beobachtet werden. Experimente mit höheren Konzentrationen wären wohl nötig, um eine Hemmung des Wachstums anhand der zuvor genannten Kriterien (Lag-Phase, exponentielle Wuchsphase und finaler Biomasse) zu erreichen. Abgesehen von der Fragestellung bezüglich der Osmotoleranz deuten die erreichten höheren Zelldichten bei geringer  $\text{MgSO}_4$ -Zugabe darauf hin, dass in dem  $\text{LB}_{\text{Suc}}$ -Medium möglicherweise eine Limitierung an Magnesium und /oder Sulfat vorlag, welche häufig Bestandteile bakterieller Nährmedien sind (Paliy & Gunasekera, 2007).

Neben Salzen können auch nicht-ionische Moleküle wie Zucker und andere Substrate für Wachstum oder Biotransformationen osmotischen Stress bedingen. Als Beispiel wurde hier Glucose (Rasouli, 2016) ausgewählt, welche von den untersuchten *Halopseudomonas*-Arten, nicht verstoffwechselt wird (**Abb. 3.1**, **Abb. 3.2**). Anhand der Wuchskurven konnte keine Wachstumsverbesserung und damit keine Metabolisierung der Glucose beobachtet werden (**Abb. 3.15B**). Stattdessen führten bereits 4,5 % (w/v) Glucose zu einem verlangsamten Wachstum, aber erst die zehnfache Menge (entspricht 2,5 M) Glucose zu einer vollständigen Inhibierung des Wachstums. Obwohl *E. coli* Glucose verstoffwechseln kann, wurde das Wachstum bereits bei 20 % des Zuckers vollständig inhibiert (Liu *et al.*, 2022). In der gleichen Studie wurden *S. cerevisiae* und *Glucanobacter oxydans* untersucht und zeigten ein gehemmtes Wachstum bei 20 % und 40 % (w/v) Glucose und kein Wachstum mehr bei 60 % (Liu *et al.*, 2022). Vergleichen mit diesen drei Organismen kann *H. bauzanensis* sehr hohe Mengen an Glucose tolerieren, ohne diese metabolisieren zu können.

KCl wird von Mikroorganismen unter anderem als erste Reaktion auf osmotischen Stress importiert, da hohe  $\text{K}^+$ -Konzentrationen im Cytoplasma weniger toxisch wirken als  $\text{Na}^+$ -Ionen (s. Kapitel 1.2.1). Entsprechend konnte beobachtet werden, dass die Zugabe weder eine Adaptionsphase noch eine Änderung in der Steigung der exponentiellen Wuchsphase bewirkte. Lediglich die Biomasse sank mit steigender Konzentration des Salzes, auch wenn keine vollständige Inhibierung des Wachstums induziert werden konnte (**Abb. 3.15C**). In der Lebensmittelindustrie wird KCl häufig verwendet, um NaCl einzusparen. Vergleiche zwischen einer NaCl und KCl Toleranz in *E. coli* zeigten, dass dieser bei gleichen

Konzentrationen, ebenso wie *H. bauzanensis*, ein besseres Wachstum in Anwesenheit von KCl als NaCl zeigte (Gandhi *et al.*, 2014).

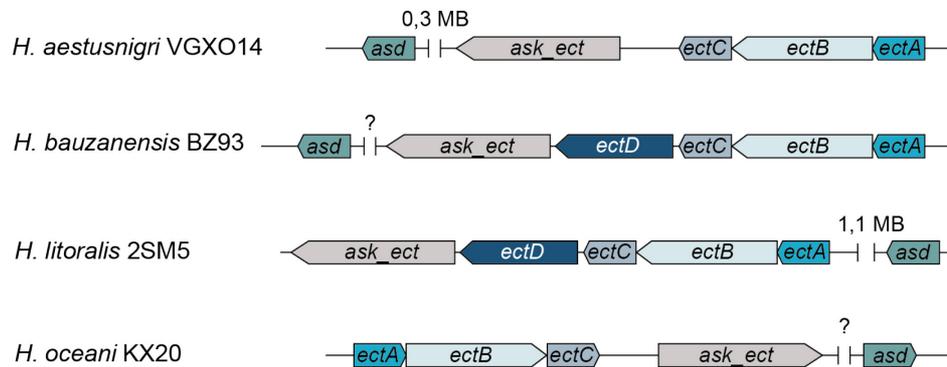
Neben der K<sup>+</sup>-Aufnahme ist die Aufnahme und/ oder Produktion von kompatiblen Soluten eine typische Reaktion auf osmotischen Stress. Anhand von Genomanalysen wurde die Biosynthese des kompatiblen Solut Ectoin für die hier untersuchten *Halopseudomonas*-Arten vorhergesagt (Bollinger *et al.*, 2020b). Deshalb soll im nächsten Schritt die stressinduzierte Produktion dieser Osmolyte hinsichtlich ihrer Rolle bei der Osmotoleranz untersucht werden.

Zusammenfassend konnte anhand der Bestimmung über den „Phenotype MicroArray PM9“ Test gezeigt werden, dass die *Halopseudomonas*-Arten vor allem eine Ethylenglykol-Toleranz aufweisen und höhere NaCl-Konzentrationen tolerierten als *P. putida*. Kultivierungsexperimente nach Zugabe der Stressoren während der exponentiellen Wachstumsphase zeigten eine Toleranz von bis zu 3 % (w/v) NaCl in dem Minimalmedium HM<sub>Seb</sub>, was durch eine Präadaption an das Salz weiter gesteigert werden konnte. In Komplexmedium konnten die *Halopseudomonas*-Arten bis zu 8 % (w/v) NaCl tolerieren. Ebenso wurde durch die Zugabe von MgSO<sub>4</sub> oder Glucose osmotischer Stress in *H. bauzanensis* BZ93 induziert, was im Rahmen einer Bachelorarbeit nachgewiesen wurde.

Im Falle von NaCl wurden die folgenden Konzentrationen für die Induktion eines osmotischen Schocks durch NaCl für alle weiteren Versuche ausgewählt: 4 % (w/v) für *H. aestusnigri* und *H. oceani* und 5,5 % (w/v) für *H. litoralis* und *H. bauzanensis*.

### 3.5.1 Produktion der kompatiblen Solute Ectoin und 5-Hydroxyectoin

Ein unter Mikroorganismen weit verbreitetes kompatibles Solut ist Ectoin. Dennoch ist dessen Synthese durch Pseudomonaden eher selten. Die hydroxylierte Variante 5-Hydroxyectoin wird zudem nicht von jedem Ectoinproduzenten synthetisiert (s. Kapitel 1.2.1.2). Die Architektur des *ectABC*-Genclusters von *Halopseudomonas* spp. wurde mit Hilfe des Online Programms antiSMASH (Tab. 2.2) untersucht und zusätzlich auf die Anwesenheit der Gene für die Ectoinhydroxylase EctD und die Aspartatkinase Ask\_Ect zur Anreicherung des Vorläufermetabolits überprüft (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Schematische Darstellung der identifizierten Gene der Ectoinbiosynthese.**

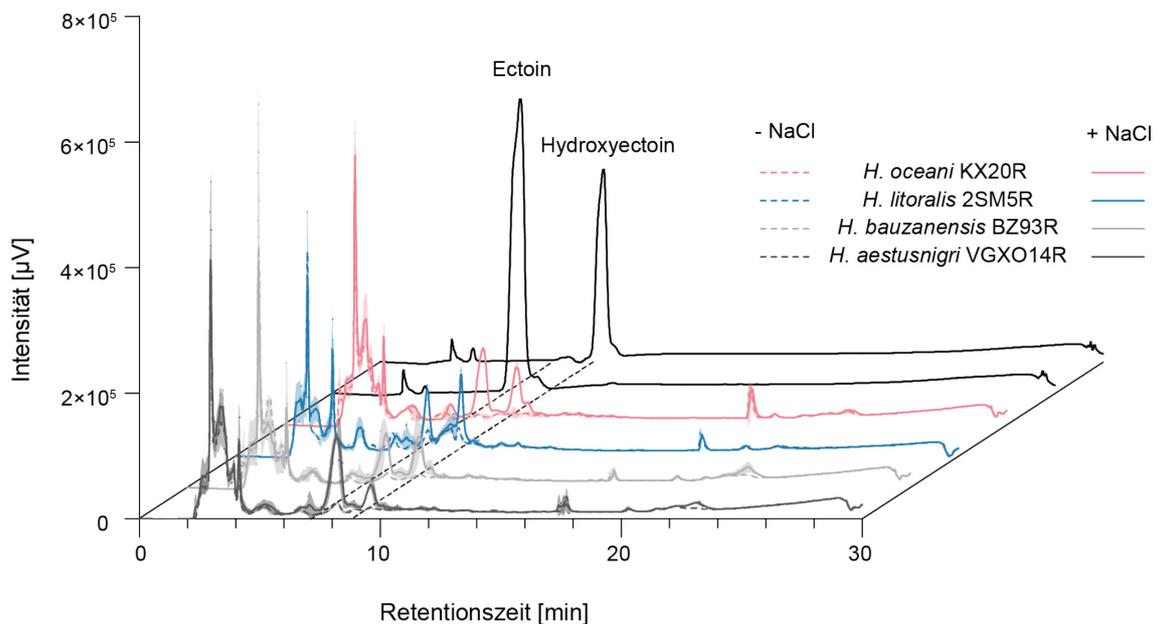
Hier dargestellt sind die Gene, die mittels antiSMASH-Analyse in den *Halopseudomonas* spp. identifiziert wurden. Die zugehörigen Locus-Tags sind in **Tab. A5** gelistet.

Wie zuvor beschrieben (Bollinger *et al.*, 2020b), konnte das Ectoin-Gencluster für alle vier *Halopseudomonas* spp. identifiziert werden. Das Gen *ectD* war hingegen nur im Genom von *H. bauzanensis* und *H. litoralis* konserviert. Gemäß der antiSMASH-Analyse weisen alle vier *Halopseudomonas*-Arten zudem das Gen *ask\_ect* auf. Die Aspartatkinase Ask\_Ect katalysiert die Reaktion von L-Aspartat hin zu  $\beta$ -Aspartylphosphat in einigen Ectoinproduzenten (Hermann *et al.*, 2020). Dies ist eine Reaktion aus dem Aminosäurestoffwechsel, die üblicherweise durch das Enzym Ask\_LysC katalysiert wird (s. Kapitel **1.2.1.3**) (Czech *et al.*, 2018a).

Mit Hilfe eines paarweisen Alignments aller putativ an der Ectoinbiosynthese beteiligten Enzyme (**Abb. 1.5**) mit den Aminosäuresequenzen der entsprechenden bereits beschriebenen Homologen aus *S. stutzeri* (Seip *et al.*, 2011; Stöveken *et al.*, 2011) mittels BLASTp (**Tab. A5**), konnten die Resultate der antiSMASH-Analyse bestätigt werden: Die vier Gene *ask\_ect*, *ectABC* konnten mit einer Sequenzidentität von mindestens 69 % in den Genomen aller vier untersuchten Stämmen identifiziert werden. Für die Bereitstellung der Vorstufenmoleküle zur Ectoinbiosynthese in *S. stutzeri* sind die Enzyme Ask\_Ect und L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd-Dehydrogenase (Asd) verantwortlich. Da in keinem der *Halopseudomonas*-Genome *asd* als Teil des *ect*-Operons identifiziert wurde, wurden die Genome mit Hilfe von BLASTp nach Homologen der *S. stutzeri* Asd durchsucht. Es wurden zwar nur Proteine mit geringer Übereinstimmung (33 %–39 %) in allen vier Genomen detektiert, diese waren aber zusätzlich als Aspartat-semialdehyd-Dehydrogenase annotiert. In Genomanalysen aus vielen anderen Ectoinproduzenten war *asd* ebenfalls kein Teil des *ect*-Genclusters (Czech *et al.*, 2018a). Des Weiteren konnte für *H. bauzanensis* und *H. oceani* aufgrund der unvollständigen Genomsequenzen keine genaue Aussage über die Position von Asd im Vergleich zum Gencluster getroffen werden, da das *ect*-Operon und *asd* auf unterschiedlichen *scaffolds* liegen. Auch mit der BLASTp-Suche mit der EctD-Aminosäuresequenz aus *S. stutzeri* konnten, wie schon bei der antiSMASH-Analyse, keine EctD-homologen Proteinsequenzen in *H. aestusnigri* und *H. oceani* identifiziert werden. Dies

legt nahe, dass nur zwei der ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten 5-Hydroxyectoin produzieren können.

Um zu verifizieren, dass die ausgewählten *Halopseudomonas* spp. tatsächlich die kompatiblen Solute Ectoin und gegebenenfalls 5-Hydroxyectoin als Antwort auf einen osmotischen Schock produzieren, wurden die Stämme unter osmotischem Stress kultiviert, welcher auf Basis der oben gezeigten Experimente durch Zugabe von 4 % bzw. 5,5 % (w/v) NaCl zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase induziert wurde. Die Zellen wurden am nächsten Tag, nach insgesamt 16 h Kultivierung geerntet und die kompatiblen Solute extrahiert (s. Kapitel 2.2.4.1) und mittels HPLC (s. Kapitel 2.2.4.2) analysiert (**Abb. 3.17**).



**Abb. 3.17: Synthese von Ectoin- und 5-Hydroxyectoin als Antwort auf osmotischen Stress in *Halopseudomonas* spp.**

HPLC-PDA-Chromatogramme bei 210 nm von *H. aestusnigri* VGXO14R (dunkelgrau), *H. bauzanensis* BZ93R (hellgrau), *H. litoralis* 2SM5R (blau) und *H. oceanii* KX20R (rosa) kultiviert in  $LB_{Suc}$ -Medium (gestrichelte Linie) und kultiviert unter osmotischem Stress durch Zugabe von 4,5 % bzw. 5,5 % (w/v) NaCl (durchgezogene Linie). Nach 16 h Kultivierung wurden die Zellen geerntet, die Osmolyte extrahiert und mittels HPLC-PDA analysiert. Die Referenzanalyten Ectoin und 5-Hydroxyectoin sind in schwarz dargestellt. Die schwarz gestrichelten Linien zeigen die Retentionszeiten von Ectoin und 5-Hydroxyectoin an. Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar, die Schatten geben die berechnete Standardabweichung an.

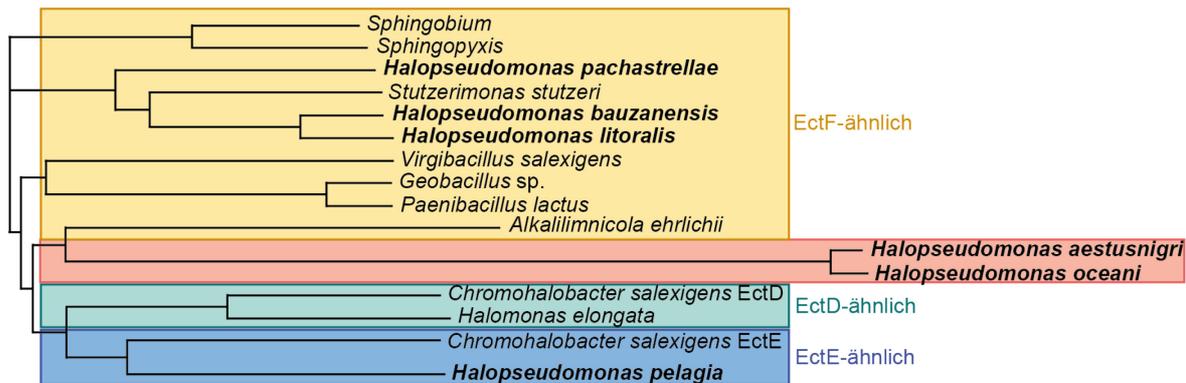
Mit Hilfe der HPLC-Analyse und dem Retentionszeiten-Vergleich mit geeigneten Standardsubstanzen (**Abb. 3.17A**) fiel auf, dass nicht nur Ectoin, sondern auch 5-Hydroxyectoin als Reaktion auf den osmotischen Stress in allen vier ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten gemessen wurde. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden die Proben von Frau Birgit Henßen (Institut für Bioorganische Chemie) (s. Kapitel 2.2.4.3) hinsichtlich ihrer spezifischer Masse-Ladungsverhältnisse untersucht (Ectoin m/z 143, 5-Hydroxyectoin m/z 159; **Abb. A11**). So konnte nicht nur für *H. bauzanensis* und *H. litoralis*, sondern auch für *H. aestusnigri* und *H. oceanii* das Produkt 5-Hydroxyectoin nachgewiesen werden, obwohl keine Homologe zu *ectD*-Genen in den vorliegenden Genomsequenzen identifiziert werden konnten. In der Literatur ist EctD als sehr

spezifisches Enzym beschrieben, dessen Reaktionen nicht von anderen Enzymen katalysiert werden kann (Czech *et al.*, 2018a). Grundsätzlich gibt es viele Organismen, bei denen *ectD* nicht innerhalb des Genclusters *ectABC* vorliegt (Hermann *et al.*, 2020; Czech *et al.*, 2018a), sondern an einer anderen Stelle im Genom. Allerdings konnte in den benannten Bakterienarten, wie oben erwähnt, auch abseits des *ectABC*-Operons kein *ectD* mittels Sequenzhomologievergleichen identifiziert werden.

In dem halophilen Bakterium *Chromohalobacter salexigens* konnte neben EctD eine weitere Ectoinhydroxylase EctE identifiziert werden, welche zwar eine geringe Identität, aber eine für EctD charakteristische Aminosäuresequenz teilen (Argandoña *et al.*, 2021). Auffällig ist außerdem, dass die dort untersuchten Ectoinhydroxylasen unterschiedliche phylogenetische Abstammungen aufweisen, wobei dort *H. pelagia*, *H. sabulunigri* und *H. pachastrellae* aufgeführt sind, welche verschiedenen phylogenetischen Gruppen zugeordnet wurden. *H. pelagia* wurde EctE-ähnlichen Ectoinhydroxylasen zugeordnet, wohingegen *H. pachastrellae* und *H. sabulunigri* einer dritten phylogenetischen Gruppe zugeordnet wurden, die nicht weiter benannt wurde. Innerhalb dieser Gruppe konnten zwar auch Organismen wie *S. stutzeri* identifiziert werden, deren Ectoinhydroxylase als EctD in anderen Studien bezeichnet wurde (Seip *et al.*, 2011), allerdings ist die phylogenetische Distanz zu der Gruppe der EctD-ähnlichen Proteine groß, unter denen auch der Modellorganismus *H. elongata* ist. Damit diese Gruppen innerhalb dieser Arbeit unterschieden werden können, werden die Enzyme aus *H. pachastrellae* und *H. sabulunigri* als EctF-ähnlich betitelt. Zum besseren Verständnis sollte daher eine allgemeingültige Reklassifizierung der verschiedenen Ectoinhydroxylasen erfolgen.

Um die Sequenzsuche innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten *Halopseudomonas*-Arten auf Proteine mit geringer Übereinstimmung auszuweiten, wurde ein PSI-BLAST durchgeführt. Hierfür wurde im ersten Schritt die EctE-ähnliche Ectoinhydroxylase aus *H. pelgia* mittels BLASTp ermittelt (Argandoña *et al.*, 2021). Als Vergleichssequenz diente die EctE-Sequenz aus *C. salexigens* (Argandoña *et al.*, 2021). Hierbei konnten zwei ähnliche, als Ectoinhydroxylasen annotierte Proteine identifiziert werden ([PCD00215.1](#) (60 % Identität) und [WP\\_022964389.1](#) (59 % Identität)). In einem zweiten Schritt wurden diese EctE-Sequenzen und die EctD-Sequenz aus *H. litoralis* für eine PSI-BLAST Suche in den Genomen von *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis*, *H. litoralis* und *H. oceani* ausgewählt. Hierbei konnten neben den bereits identifizierten Ectoinhydroxylasen aus *H. litoralis* und *H. bauzanensis* (s.o.) Proteinsequenzen in *H. aestusnigri* ([WP\\_088274180.1](#)) und *H. oceani* ([WP\\_104739246.1](#)) identifiziert werden, die mit jeweils 21 % eine geringe Identität im Vergleich zu den drei ausgewählten Proteinen aufweisen. Diese neu identifizierten Proteine sind teilweise als „*ectoine hydroxylase-related dioxygenase*“ annotiert und konnten nur in den hier untersuchten *Halopseudomonas*-Arten ohne *ectD*-

Gen gefunden werden, somit also nicht in *H. bauzanensis* und *H. litoralis*. Für eine phylogenetische Einordnung dieser neu identifizierten potenziellen Ectoinhydroxylasen wurde ein Alignment verschiedener EctD- und EctF-ähnlicher Proteine (Argandoña *et al.*, 2021) und den vier *Halopseudomonas*-Arten mittels UniProt Align gemacht (**Abb. 3.18**).

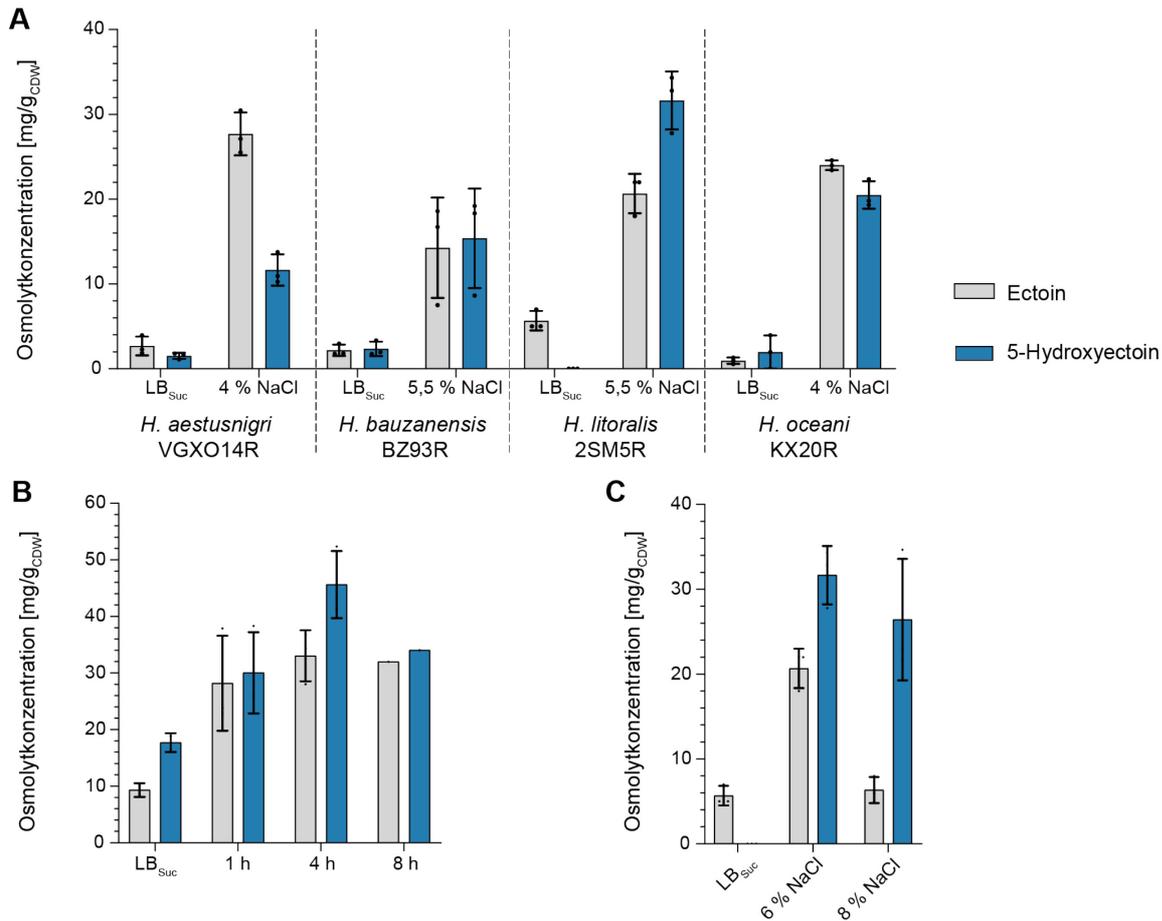


**Abb. 3.18: Phylogenetische Einordnung der potenziellen Ectoinhydroxylasen aus *H. aestusnigri* und *H. oceani*.**

Zur Erstellung des phylogenetischen Baums wurden 16 Aminosäuresequenzen verschiedener Ectoinhydroxylasen ausgewählt. Der phylogenetische Baum ist maßstabsgetreu abgebildet und wurde mit UniProt Align erstellt. Aminosäuresequenzen von EctF-(gelb), EctD- (grün) und EctF-ähnlichen (blau) Ectoinhydroxylasen (Argandoña *et al.*, 2021) wurden mit den Sequenzen der Ectoinhydroxylasen aus *H. litoralis* und *H. bauzanensis* sowie den potenziellen Ectoinhydroxylasen aus *H. aestusnigri* und *H. oceani* (rot) verglichen. Bakterien der Gattung *Halopseudomonas* sind fett gedruckt.

Anhand des phylogenetischen Stammbaumes wird deutlich, dass auch die als EctD identifizierten Proteine aus *H. litoralis* und *H. bauzanensis* zu den EctF-ähnlichen Proteinen gehören. Die potenziellen Ectoinhydroxylasen aus *H. aestusnigri* und *H. oceani* zeigten die größte phylogenetische Nähe zu *Alkalilimnicola ehrlichii*, dessen phylogenetischer Ast selbst unter den EctF-ähnlichen Enzymen relativ eigenständig war (Argandoña *et al.*, 2021). Dennoch zeigten die hier identifizierten Enzyme der beiden *Halopseudomonas*-Arten mit nur 19 % eine geringe Aminosäuresequenz-Identität zu diesem EctF-ähnlichen Enzym aus *A. ehrlichii*. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen fiel interessanterweise auch auf, dass die bisher für Ectoinhydroxylasen beschriebene hochkonservierte Aminosäuresequenz (s. Kapitel 1.2.1.3) in diesen beiden neu identifizierten Enzymen nicht vollständig vorlag. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass *ectD* nicht in den vorhandenen Genomsequenzen erfasst wurde, da weder für *H. aestusnigri*, noch für *H. oceani* geschlossene Genomsequenzen vorliegen. Wenn zuverlässige Werkzeuge zur Erzeugung von Deletionsmutanten vorliegen, müsste die Funktion der Hydroxylierung des Ectoins durch EctD oder die hier identifizierten potenziellen Ectoinhydroxylasen bewiesen werden. Dennoch geben die Annotation, das Vorkommen und der PSI-BLAST deutliche Hinweise darauf, dass dies die gesuchten Enzyme sein könnten. Dies würde bedeuten, dass hier eine vollkommen unbekannt neue Gruppe an Ectoinhydroxylasen gefunden wurde. Zudem würde dies bedeuten, dass Bakterien der Gattung *Halopseudomonas* mehrfach unabhängig voneinander Gene zur Hydroxylierung des Ectoins evolviert haben, was die Relevanz dieses Enzyms noch weiter verdeutlicht.

Da es sich bei den hier gezeigten Ergebnissen um erste Nachweise der tatsächlichen Produktion der kompatiblen Solute Ectoin und 5-Hydroxyectoin in den untersuchten *Halopseudomonas*-Arten handelt, wurde im Folgenden nur die intrazelluläre Ausbeute bestimmt (**Abb. 3.19**).



**Abb. 3.19: Ectoin- und 5-Hydroxyectoin Synthese als Antwort auf osmotischen Stress in *Halopseudomonas* spp.**

**A:** Ectoin- und 5-Hydroxyectoinmengen pro mg Zelltrockengewicht (CDW, engl.: *cell dry weight*), welche nach 16 h Kultivierung aus osmotisch gestressten *Halopseudomonas* spp. Zellen extrahiert wurden. **B:** Einfluss des Zeitpunkts osmotischem Schock auf die Osmolytakkumulation einer *H. litoralis* 2SM5R Kultur. Der osmotische Schock wurde in 1 h, 4 h und 8 h nach Kultivierungsbeginn durch Zugabe von 6 % (w/v) NaCl induziert. Die Extraktion von Ectoin und 5-Hydroxyectoin erfolgte nach 16 h der Kultivierung. **C:** Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen auf die Osmolytakkumulation einer *H. litoralis* 2SM5R Kultur. Der osmotische Schock wurde 4 h nach Kultivierungsbeginn durch Zugabe von 6 % oder 8 % (w/v) NaCl induziert. Die Extraktion von Ectoin und 5-Hydroxyectoin erfolgte nach 16 h der Kultivierung. Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar, die Fehlerbalken geben die berechnete Standardabweichung an.

Auffällig ist, dass in LB<sub>Suc</sub>-Medium ohne weitere Salzzugabe geringe Mengen an Ectoin und 5-Hydroxyectoin in den untersuchten *Halopseudomonas*-Arten produziert wurden (**Abb. 3.19A**). Da es sich um einen strikt regulierten, energetisch aufwendigen Biosyntheseweg handelt (Czech *et al.*, 2018a; Oren, 1999), könnte dies ein Indiz für leichten Stress der Zellen unter diesen Kultivierungsbedingungen sein.

Wurden die Kulturen osmotischem Stress ausgesetzt, so fiel auf, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme in *H. aestusnigri* VGXO14R und *H. coeani* KX20R mehr Ectoin als 5-Hydroxyectoin produziert wurde, wohingegen in *H. litoralis* 2SM5R verstärkt die

hydroxylierte Variante beobachtet werden konnte. *H. bauzanensis* BZ93R zeigte mit  $14,2 \pm 5,9$  mg/g<sub>CDW</sub> Ectoin und  $15,4 \pm 5,9$  mg/g<sub>CDW</sub> Hydroxyectoin ähnliche Titer beider Osmolyte. Die Probenentnahme erfolgte bei Übergang der Kulturen von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. In *Methylovibrio methylphilum* wurde in der stationären Wachstumsphase vermehrt die hydroxylierte Variante des Ectoins nachgewiesen (Pham et al., 2023). In einem modifizierten Stamm, dessen Ectoingencluster nicht mehr unter der Regulation von *ectR* stand, wurden in diesem Organismus nach 48 h Kultivierung mit Glucose, Xylose und Methan als Kohlenstoffquellen  $37,93$  mg/g<sub>CDW</sub> Ectoin und ungefähr  $16$  mg/g<sub>CDW</sub> 5-Hydroxyectoin produziert. Hier konnten die Produkte in einer ähnlichen Größenordnung isoliert werden (**Tab. 3.5**). Im Vergleich zu etablierten Ectoinproduzenten sind die hier erreichten Titer gering (Li et al., 2023; Zhang et al., 2023; Gieselmann et al., 2019).

**Tab. 3.5: Ectoin und 5-Hydroxyectoinmengen in *Halopseudomonas* spp.**

Organismus	Ectoin [mg/g <sub>CDW</sub> ]	5-Hydroxyectoin [mg/g <sub>CDW</sub> ]
<i>H. aestusnigri</i> VGXO14R	$27,7 \pm 2,5$	$11,6 \pm 1,9$
<i>H. bauzanensis</i> BZ93R	$14,2 \pm 5,9$	$15,4 \pm 5,9$
<i>H. litoralis</i> 2SM5R	$20,7 \pm 2,4$	$31,7 \pm 5,9$
<i>H. oceani</i> KX20R	$24,0 \pm 0,6$	$20,5 \pm 1,6$

Die bestimmten Produkttitel der kompatiblen Solute stellen die Zahlenwerte zu **Abb. 3.19** dar.

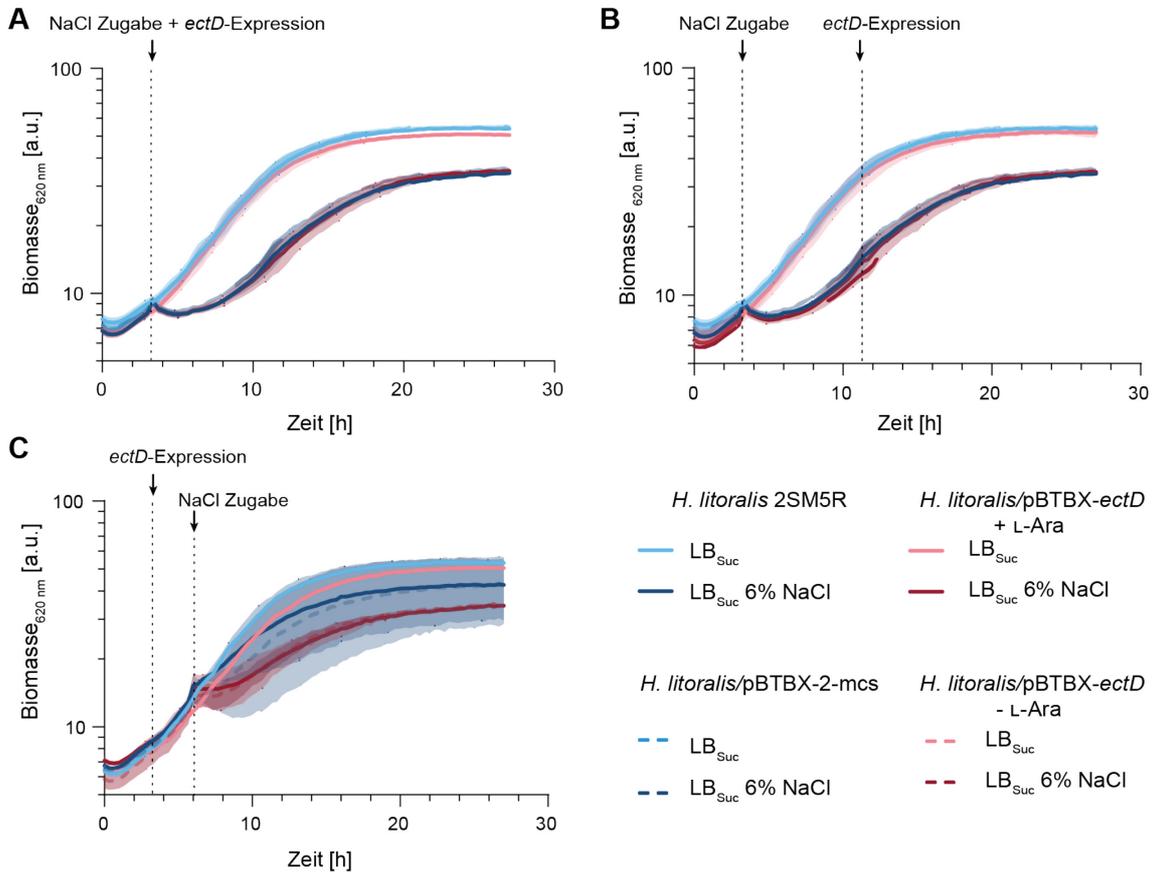
*H. litoralis* ist der Einzige der hier untersuchten Organismen, dessen Genomsequenz vollständig sequenziert ist. Darüber hinaus wurde hier in Summe die größte Menge an Ectoin und 5-Hydroxyectoin produziert, was bei gleichem osmotischem Stress bedeuten könnte, dass die anderen Organismen andere kompatible Solute in stärkerem Maße nutzen. Aus diesem Grund erfolgten die weiteren Untersuchungen der Osmotoleranz der *Halopseudomonas*-Arten am Beispiel von *H. litoralis*. Um die Reaktionen auf den osmotischen Stress weiter zu evaluieren, wurde der Zeitpunkt des osmotischen Schocks (**Abb. 3.19B**), sowie die zugegebene Menge an NaCl variiert (**Abb. 3.19C**). Hier zeigte sich, dass die Zugabe von 6 % (w/v) NaCl zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (4 h Kultivierung) am vielversprechendsten war. Eine Zugabe von 8 % (w/v) NaCl führte zu einem stark verlangsamten Wachstum (**Abb. 3.14C**) und einem deutlich höheren Anteil an 5-Hydroxyectoin im Vergleich zu Ectoin. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in vorausgegangenen Studien gezeigt werden, dass die Ectoinmenge proportional zur NaCl-Konzentration stieg (Czech et al., 2018a; Seip et al., 2011). Auch in anderen Studien wurde entweder die Genregulation von dem osmotischen Stress entkoppelt oder es wurden für den jeweiligen Stamm moderate osmotische Bedingungen gewählt, um die Stressreaktion weitergehend zu untersuchen (Faulkner et al., 2023; Li et al., 2023).

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass, entgegen den Genomsequenz-basierten Vorhersagen, alle vier ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten nicht nur Ectoin, sondern auch 5-Hydroxyectoin produzierten. Dass tatsächlich Hydroxyectoin vorlag konnte mit Hilfe einer LC-MS Analyse bestätigt werden. Als potenzielle neue Gruppe der Ectoinhydroxylasen konnten hier die Enzyme [WP\\_088274180.1](#) aus *H. aestusnigri* und [WP\\_104739246.1](#) aus *H. oceani* identifiziert werden.

Darüber hinaus wurden die Reaktion von *H. litoralis* 2SM5R auf unterschiedliche Stressinduktionszeitpunkte und zunehmende NaCl-Konzentrationen anhand der produzierten Ectoin- und Hydroxyectointiter evaluiert. Hierbei bewirkte eine Zugabe von 6 % (w/v) NaCl zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase die stärkste Antwort.

### **3.5.1.1 Ectoinhydroxylase EctD als potenzielle Stellschraube einer gesteigerten Osmotoleranz**

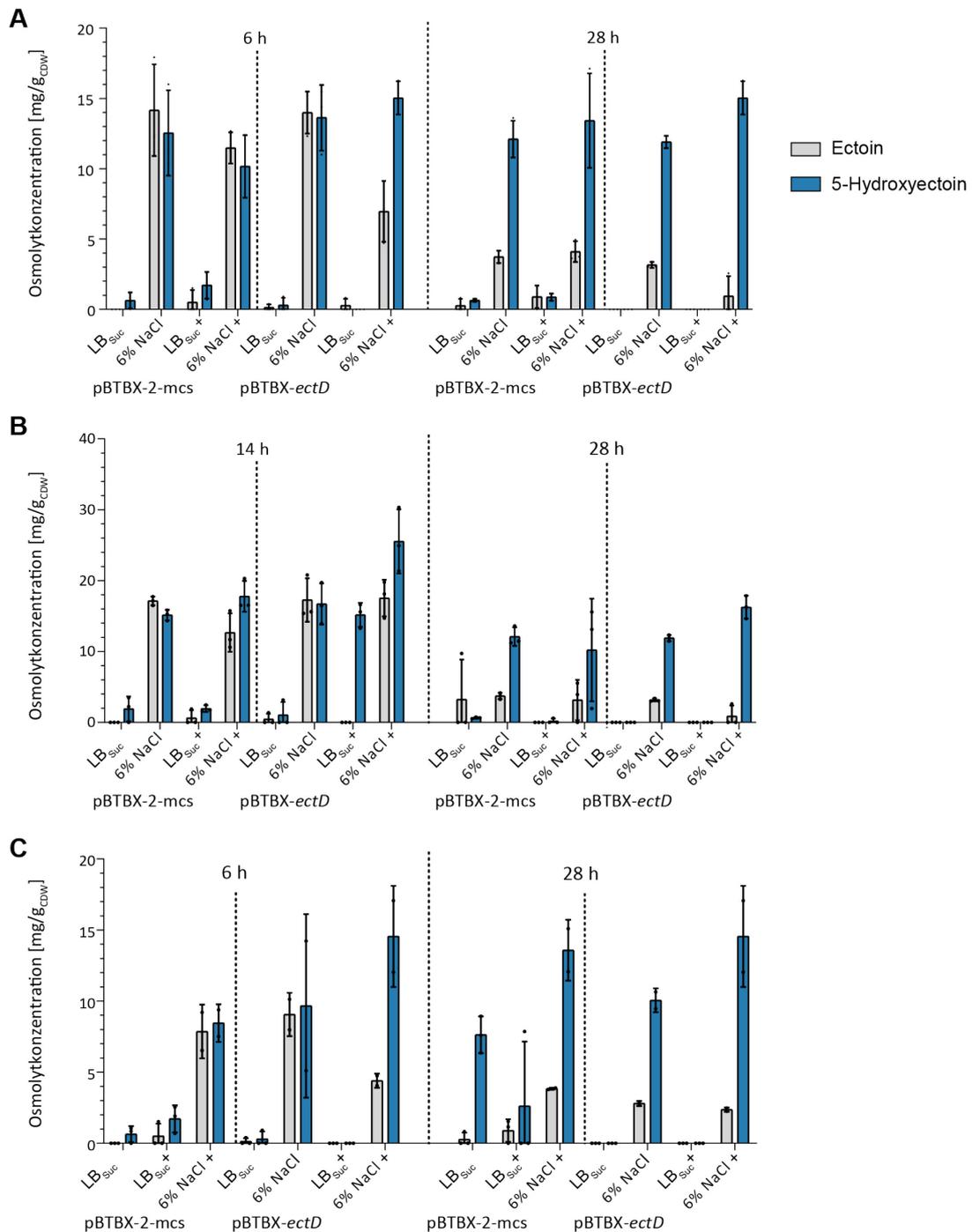
Das Kultivieren von Mikroorganismen unter salzhaltigen Bedingungen übt einen Selektionsdruck auf die Zellen aus, was Kontaminationen durch andere Mikroorganismen verhindern kann. Ectoin und sein hydroxyliertes Derivat unterscheiden sich dabei in der Kapazität der zu akkumulierenden Wassermoleküle. Während Ectoin sieben Wassermoleküle koordinieren kann, sind es bei 5-Hydroxyectoin neun Wassermoleküle (Czech *et al.*, 2018a). Aus diesem Grund soll evaluiert werden, ob eine höhere Produktion von 5-Hydroxyectoin auch eine höhere Osmotoleranz ermöglicht, wodurch *H. litoralis* 2SM5R schließlich ein optimiertes Wachstum unter höheren osmotischen Bedingungen zeigen könnte. Hierzu wurde das Gen *ectD* zusätzlich Plasmid-basiert unter der Kontrolle eines AraC/ $P_{BAD}$ -Systems eingebracht. Dadurch soll die NaCl-Zugabe Stress und damit die native Produktion von Ectoin und 5-Hydroxyectoin induzieren und durch die Zugabe von L-Arabinose soll die zusätzliche Expression der Plasmid-basierten Kopie von *ectD* erfolgen sollen. Dies soll das Verhältnis der Osmolyte zu 5-Hydroxyectoin verschieben. Anhand von Wachstumsexperimenten und der Bestimmung der Konzentrationen beider Osmolyte soll evaluiert werden, welchen Einfluss 5-Hydroxyectoin auf die Osmotoleranz hat (**Abb. 3.20**). Als Kontrollen dienten der Wildtyp, sowie *H. litoralis*/pBTBX-2-mcs und der Vergleich zwischen induzierten (+ L-Ara) nicht-induzierten (- L-Ara) Kulturen.



**Abb. 3.20: Bestimmung der Osmotoleranz von *H. littoralis* bei zusätzlicher *ectD*-Expression.** Kulturen von *H. littoralis* 2SM5R, *H. littoralis*/pBTBX-*ectD* und einer Leervektorkontrolle (*H. littoralis*/pBTBX-2-mcs) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten osmotischem Stress ausgesetzt. Zum einen erfolgte sowohl die Stressinduktion durch NaCl als auch die Induktion der *ectD*-Genexpression durch 50 mM L-Arabinose zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (A). Zum anderen erfolgte zunächst die Stressinduktion und die Induktion der Genexpression nach 11 h der Kultivierung (B). Außerdem wurde ein Effekt der Induktion der Genexpression und anschließender Induktion des osmotischen Stresses untersucht (C). Hellblau (LB<sub>Suc</sub>): Wildtyp (durchgezogene Linie), Leervektorkontrolle (gestrichelte Linie); dunkelblau (LB<sub>Suc</sub> mit 6 % NaCl): Wildtyp (durchgezogene Linie), Leervektorkontrolle (gestrichelte Linie); rosa (LB<sub>Suc</sub>): *H. littoralis* / pBTBX-*ectD* (induziert, durchgezogene Linie), *H. littoralis* / pBTBX-*ectD* (nicht induziert: gestrichelte Linie); dunkelrot (LB<sub>Suc</sub> mit 6 % NaCl): *H. littoralis* / pBTBX-*ectD* (induziert, durchgezogene Linie), *H. littoralis* / pBTBX-*ectD* (nicht induziert: gestrichelte Linie). Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar und die Schatten geben die berechnete Standardabweichung an.

Bei der Untersuchung des Effekts von 5-Hydroxyectoin auf die osmotische Toleranz wurde der Zeitpunkt der Induktion der Genexpression (L-Ara) und des osmotischen Stresses (NaCl) variiert. In keinem der Versuche konnte jedoch beobachtet werden, dass die *ectD*-Induktion einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten zeigte (Abb. 3.20A-C). Nachdem bei gleichzeitiger Zugabe beider Induktoren (L-Ara und NaCl) keine Änderung des Wachstums im Vergleich zur osmotisch gestressten Kontrollkultur (6 % NaCl) beobachtet werden konnte (Abb. 3.20A), lag die Vermutung nahe, dass die Zellen durch die Adaption an den osmotischen Stress bereits einem hohen metabolischen Druck ausgesetzt waren und somit kein Effekt beobachtet wurde. Daraufhin wurde die *ectD*-Genexpression am Ende der exponentiellen Wachstumsphase induziert, während NaCl weiterhin zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zugegeben wurde, was der natürlichen Expressionscharakteristik von *ectD* von z. B. *S. stutzeri* oder *M. alcaliphilum* entsprach

(Pham *et al.*, 2023; Czech *et al.*, 2018a; Seip *et al.*, 2011). Dies führte zu einer Entkopplung der Vektor-basierten *ectD*-Expression (L-Ara) -und der NaCl-induzierten Expression der *ect*-Gene, sodass die natürliche Adaption der Zelle an den Stress bereits erfolgen konnte (**Abb. 3.20B**). Auch eine *ectD*-Genexpression im Vorfeld der Induktion des osmotischen Stresses zeigte keine Hinweise auf eine Präadaption an den Stress, um besser auf den osmotischen Schock reagieren zu können (**Abb. 3.20C**), was insbesondere beim Vergleich der nicht-induzierten (rot, gestichelte Linie) und der mit L-Ara induzierten Kultur (rot, durgezogene Linie) auffällt. Um zu überprüfen, ob EctD funktional war, oder tatsächlich keinen Einfluss auf die Osmotoleranz zeigte, wurden jeweils zwei Stunden nach L-Arabinose-Zugabe und nach 28 h der Kultivierung Proben entnommen und die Produkte Ectoin und 5-Hydroxyectoin aus den Zellen extrahiert und mittels HPLC analysiert (**Abb. 3.21**).



**Abb. 3.21: Osmolytkonzentrationen in Kulturen von *H. litoralis* unter osmotischem Stress und zusätzlicher *ectD* Expression.**

Die gezeigten Proben wurden jeweils 2 h nach der Induktion der Genexpression und nach 28 h der Kultivierung entnommen. Die Wuchskurven der Kulturen sind in **Abb. 3.20A-C** gezeigt. **A:** Osmolytzusammensetzung in Kulturen nach simultaner Induktion des osmotischen Stresses und der *ectD*-Genexpression. **B:** Osmolytzusammensetzung in Kulturen nach Induktion des osmotischen Stresses zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, während die *ectD*-Genexpression am Ende der exponentiellen Wachstumsphase induziert wurde. **C:** Osmolytzusammensetzung in Kulturen nach Induktion der *ectD*-Genexpression zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, während der osmotische Stress zwei Stunden später (6 h Kultivierung) induziert wurde. Als Kontrolle diente der Wildtypstamm transformiert mit einem Leervektor sowie eine Induzierte (+) Probe und eine nicht induzierte Probe. Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar und die Fehlerbalken geben die berechnete Standardabweichung an. Die einzelnen Messdaten sind als Punkte gekennzeichnet.

In der exponentiellen Wachstumsphase zeigten alle drei Datensätze eine ähnliche Menge Ectoin und 5-Hydroxyectoin sowohl in der Leervektorkontrolle (pBTBX-2-mcs 6 % NaCl (+))

als auch in der nicht-induzierten Kontrolle (pBTBX-*ectD* 6 % NaCl) (**Abb. 3.20A-C**). Im Laufe der Kultivierung änderte sich das Verhältnis, sodass mehr 5-Hydroxyectoin als Ectoin in der stationären Wachstumsphase innerhalb der Zellen vorlag. Diese Beobachtung passt zu den Literaturangaben (Pham *et al.*, 2023; Hermann *et al.*, 2020; Seip *et al.*, 2011). Interessanterweise bleibt die 5-Hydroxyectoinmenge zwischen dem frühen und dem späten Probenentnahmezeitpunkt in der gleichen Größenordnung von ungefähr 15 mg/g<sub>CDW</sub>, während die Ectoinmenge sank. Dies könnte entweder an einem Export der kompatiblen Solute aus der Zelle heraus oder aber Metabolisierung dieser liegen. Bei einem Vergleich der mit L-Arabinose induzierten (pBTBX-*ectD* 6 % NaCl +) und nicht-induzierten Kulturen (pBTBX-*ectD* 6 % NaCl), die osmotischem Stress unterlagen, fiel auf, dass nach Induktion der Genexpression höhere 5-Hydroxyectointiter gemessen wurden, während die Kultur ohne L-Arabinose-Zugabe Titer im Bereich der Levektorkontrolle aufwies (**Abb. 3.21A, C**). Bei der Induktion der *ectD*-Genexpression zu Beginn der stationären Wachstumsphase (pBTBX-*ectD* 6 % NaCl, +, 28 h; **Abb. 3.21B**) ist zu erkennen, dass im Gegensatz zu allen anderen Proben nach 28 h kaum noch Ectoin detektiert wurde. Das deutet darauf hin, dass die Plasmid-basierte zusätzliche und gesteuerte Expression von *ectD* tatsächlich zu verstärkter Konversion zu 5-Hydroxyectoin führte. Somit ist die Regulation der *ectD*-Expression ein wichtiger Baustein der Einstellung des Ectoin- 5-Hydroxyectoinverhältnisses. Im Rahmen der oben genannten Bachelorarbeit konnten diese Beobachtungen auch für *H. bauzanensis* bestätigt werden (Armborst, 2022).

Somit kann hier die Schlussfolgerung gezogen werden, dass 5-Hydroxyectoin trotz der höheren Bindekapazität an Wassermolekülen keinen Effekt auf das bakterielle Wachstumsverhalten in osmotisch gestressten Kulturen zeigte.

5-Hydroxyectoin weist darüber hinaus einen hervorragenden Schutz der Zellen vor Austrocknung oder auch oxidativem Stress auf (Jungmann *et al.*, 2022; Czech *et al.*, 2018a). Somit könnten weitere Untersuchungen über die Wirkung von hohen 5-Hydroxyectointitern unter anderen Stressbedingungen, wie eine hohe Exposition von Eisen im Kulturmedium erfolgen, um Aufschluss über den Effekt hoher 5-Hydroxyectointiter auf das Wachstum zu bekommen.

Die hier gemachten Beobachtungen könnten zusätzlich auch von biotechnologischer Bedeutung sein. Die ausschließliche Produktion von 5-Hydroxyectoin konnte bislang noch nicht erreicht werden, wodurch eine aufwändige Isolation durchgeführt werden muss, um das reine hydroxylierte, für viele Anwendungen überlegene, Derivat des Osmolyts zu erhalten (Jungmann *et al.*, 2022). Mit Hilfe der hier erhaltenen Beobachtungen konnte zumindest gezeigt werden, dass eine verstärkte *ectD*-Expression hier ein nützliches Werkzeug sein könnte, wobei der Induktionszeitpunkt der Genexpression eine

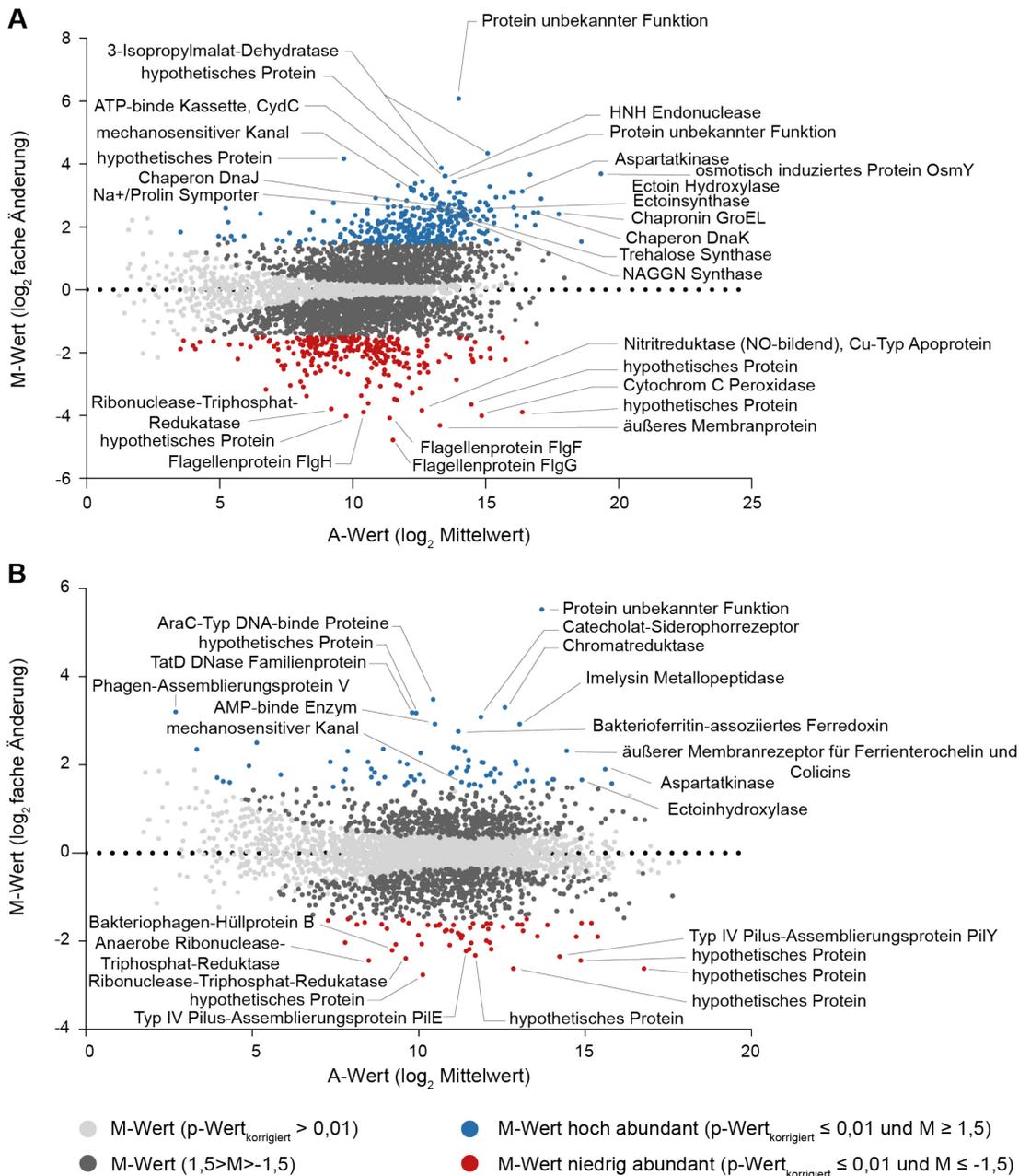
entscheidende Rolle zu spielen scheint und die Konversion über eine Anpassung des Induktionszeitpunktes weiter optimiert werden könnte.

In Kulturen von *H. littoralis* konnte gezeigt werden, dass eine Plasmid-basierte Expression von *ectD* unter osmotischem Stress zwar zu höheren 5-Hydroxyectointitern im Vergleich zu den Ectointitern führte, dieses allerdings keinen Einfluss auf das Wachstum von *H. littoralis* hatte. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass sich das Verhältnis beider Osmolyte von einem 1:1 Verhältnis während der exponentiellen Wachstumsphase hin zum 5-Hydroxyectoin während der stationären Wachstumsphase verschob.

### 3.5.2 Systematische Untersuchung der Reaktion auf osmotischen Stress in *H. littoralis*

Um ein umfassendes Bild der allgemeinen Reaktion von *H. littoralis* 2SM5R auf NaCl-Stress zu ermitteln, wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse durchgeführt. Eine möglichst vollständige Annotation des Genoms ist hierbei Voraussetzung, was bei *H. littoralis* mit dem vollständig geschlossenen Genom gegeben ist. Kulturen, die in LB<sub>Suc</sub>-Medium ohne die Zugabe von NaCl kultiviert wurden, dienten als Referenz. Darüber hinaus wurden Hauptkulturen zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von 6 % (w/v) NaCl osmotischem Stress ausgesetzt und nach 1 h und 4 h nach der Stressinduktion wurden Zellen entsprechend einer OD<sub>580 nm</sub> von 1 entnommen und für die Transkriptomanalyse verwendet (s. Kapitel 2.2.2.10).

Für die Auswertung der Daten wurden alle Gene berücksichtigt, die ein Signalintensitätsverhältnis (osmotisch gestresste Zellen/Wt Kontrolle, M-Wert) von  $\geq 1,5$  oder  $\leq -1,5$  zeigten. Für die Signifikanz von differentiell transkribierten Genen wurde Daten mit einem angepassten p-Wert  $\leq 0,01$  verwendet (**Abb. 3.22**).



**Abb. 3.22: Transkriptomanalyse zur systematischen Untersuchung der Reaktion von *H. litoralis* auf osmotischen Stress.**

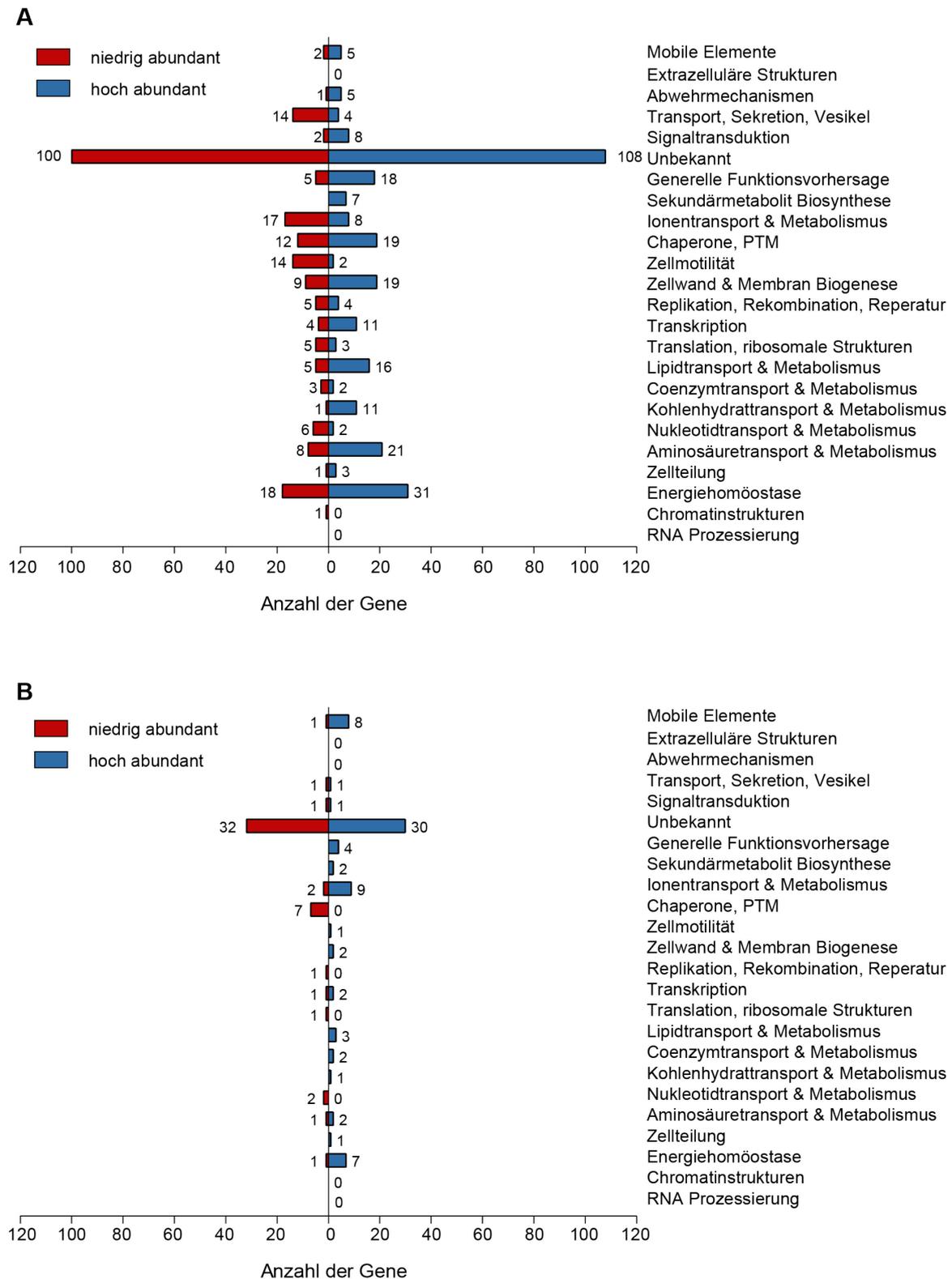
Für die Transkriptomanalyse von *H. litoralis* wurden 1 h (A) und 4 h (B) nach Stressinduktion Proben entnommen und mit einer Referenzprobe ohne osmotischen Stress verglichen. Aufgetragen ist der Log<sub>2</sub>-Wert der Änderung der Transkriptionsstärke zur Referenzprobe gegen den Log<sub>2</sub>-Wert der Transkriptionsstärke. Jeder Punkt markiert ein Gen, wobei hoch abundante Transkripte (korrigierter p-Wert ≤ 1 und M-Wert ≥ 1,5) blau und niedrig abundante Transkripte (korrigierter p-Wert ≤ 1 und M-Wert ≤ -1,5) rot markiert sind. Transkripte, die nicht berücksichtigt wurden, hatten entweder einen M-Wert zwischen -1,5 und 1,5 (dunkelgrau) oder keinen signifikanten Unterschied zur Referenzprobe (hellgrau). Die Identität der jeweils zehn stärksten hoch und zehn stärksten niedrig abundanten Transkripte sowie einige relevante Transkripte sind in der Abbildung angegeben. Die gezeigten Daten stellen den Mittelwert eines biologischen und technischen Triplikats dar.

Insgesamt wurden in den Proben Transkripte von 3717 Genen detektiert, was 97,3 % aller im Genom von *H. litoralis* annotierten Genen entspricht. Hierbei wurden 1 h nach Stressinduktion 326 Transkripte als hoch abundant und 244 Transkripte als niedrig abundant identifiziert im Vergleich zu der Referenzprobe ohne osmotischen Stress. In der Probe 4 h nach Stressinduktion wurden mit 77 hoch abundanten und 56 niedrig abundanten

Transkripten deutlich weniger differentiell exprimierte Gene detektiert. Dabei waren 31 der Transkripte zu beiden Zeitpunkten hoch abundant, während 44 Transkripte zu beiden Zeitpunkten niedrig abundant waren. Eine Auflistung aller signifikant hoch und niedrig abundanten Transkripte kann im Anhang eingesehen werden (**Tab. A6, Tab. A7, Tab. A8, Tab. A9**). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die vergleichenden Transkriptanalysen (1 h bzw. 4 h nach Stressinduktion im Vergleich zur Referenzprobe) nur noch als 1 h bzw. 4 h nach Stressinduktion betitelt.

Insgesamt fiel auf, dass 1 h nach Zugabe von NaCl deutlich mehr Transkripte unterschiedlich abundant waren als nach 4 h, was auf eine anfängliche Adaption an den Stressfaktor hindeutet. Zusätzlich kann die höhere Transkriptmenge dadurch begünstigt sein, dass die Zellen der 1 h-Probe in der Adaptionsphase waren, während die Zellen nach 4h ebenso wie die Zellen der Referenzprobe in der exponentiellen Wachstumsphase waren (**Abb. 3.14**). Dennoch konnte hier eine mehrphasige Reaktion auf osmotischen Stress beobachtet werden. Darüber hinaus war zu beiden Probeentnahmezeitpunkten das Transkript des gleichen hypothetischen Proteins am stärksten hoch abundant. Dies könnte auf eine wichtige Funktion, womöglich als Transkriptionsregulator hindeuten. In der Literatur konnten allerdings keine Hinweise über die Funktion gefunden werden. Wenn zuverlässige Werkzeuge zur Generierung von Deletionsmutanten zur Verfügung stünden, könnten hier womöglich genauere Aussagen getroffen werden.

Um die Transkripte nähergehend zu untersuchen, wurden alle Gene zunächst hinsichtlich ihrer Funktionen gruppiert. Hierzu wurde die Datenbank *clusters of orthologous groups* (COG) (**Tab. 2.2**) verwendet, wo die Proteine vieler Organismen, wie beispielsweise *P. aeruginosa* oder *P. putida* hinterlegt sind. *H. litoralis* ist in dieser Datenbank bislang nicht hinterlegt. Um die Gene zu gruppieren, wurde nach den jeweiligen Proteinamen (570 bei 1 h und 108 bei 4 h), gesucht und die entsprechende Kategorie ausgewählt (**Abb. 3.23**). Bei einer Mehrfachzuordnung wurden alle Zuordnungen berücksichtigt.



**Abb. 3.23: Funktionelle Gruppierung aller differentiell abundanten Gene aus *H. littoralis* 1 h und 4 h nach Stressinduktion.**

Die Gruppierung hinsichtlich der Funktionalität der Gene erfolgte mit Hilfe der COG-Datenbank (Tab. 2.2). Bei einer Mehrfachzuordnung wurden alle Funktionen berücksichtigt. **A:** Alle 570 unterschiedlich abundanten Gene 1 h nach Stressinduktion wurde nach ihren Funktionen gruppiert. Die Gene mit entsprechendem Locus-Tag sind in Tab. A10 und Tab. A11 gelistet. **B** Alle 108 unterschiedlich abundanten Gene 4 h nach Stressinduktion wurde nach ihren Funktionen gruppiert. Die Gene mit entsprechendem Locus-Tag sind in Tab. A12 und Tab. A13 und gelistet. PTM: Posttranslationale Modifikationen.

Nach der Gruppierung in die unterschiedlichen funktionellen Gruppen wurden 1 h nach Stressinduktion 31 hoch abundante Transkripte Proteinen der Energiehomöostase zugeordnet, 21 dem Aminosäuretransport und -metabolismus und 16 dem Kohlenhydrattransport und -metabolismus. Ebenso sind Gene stärker transkribiert worden als in der LB-Vergleichsprobe, die der Zellteilung und Zellmembranbiogenese zugeordnet werden konnten. Dies zeigt, dass *H. littoralis* vor allem verstärkt Gene exprimierte, die dem Zellwachstum dienen. Bei den 18 aufgeführten Transkripten, die niedrig abundant waren und der Energiehomöostase zugeordnet wurden, handelte es sich hauptsächlich um Gene, die mit der Funktion „F-type H<sup>+</sup>-transporting ATPase“ annotiert waren. In anderen Transkriptomstudien, die die Reaktion auf Hitzestress untersuchten, waren diese Transkripte ebenfalls niedrig abundant (Fan *et al.*, 2022). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Zellmotilitäts-assoziierte Transkripte niedrig abundant waren. Durch die verringerte Produktion von Flagellen, kann einerseits Energie eingespart werden und andererseits stellt dies die erste Stufe zur Biofilmbildung dar (Guttenplan & Kearns, 2013; Aspedon *et al.*, 2006). Die Bildung eines Biofilms ist eine Überlebensstrategie von Zellen, um auf einen externen Stimulus zu reagieren (Du *et al.*, 2020; Guttenplan & Kearns, 2013). In *Halomonas alkaliphila* wurden Transkriptomstudien unter moderatem und hohem osmotischem Stress durchgeführt. Auch dort führte erst hoher osmotischer Stress zu einer Reduktion der Zellmotilitäts-assoziierten Transkripte (Zhang *et al.*, 2022). Zudem konnte auch in *B. subtilis* beobachtet werden, dass eine NaCl-Exposition die Beweglichkeit der Zellen erheblich einschränkte (Kohler *et al.*, 2015).

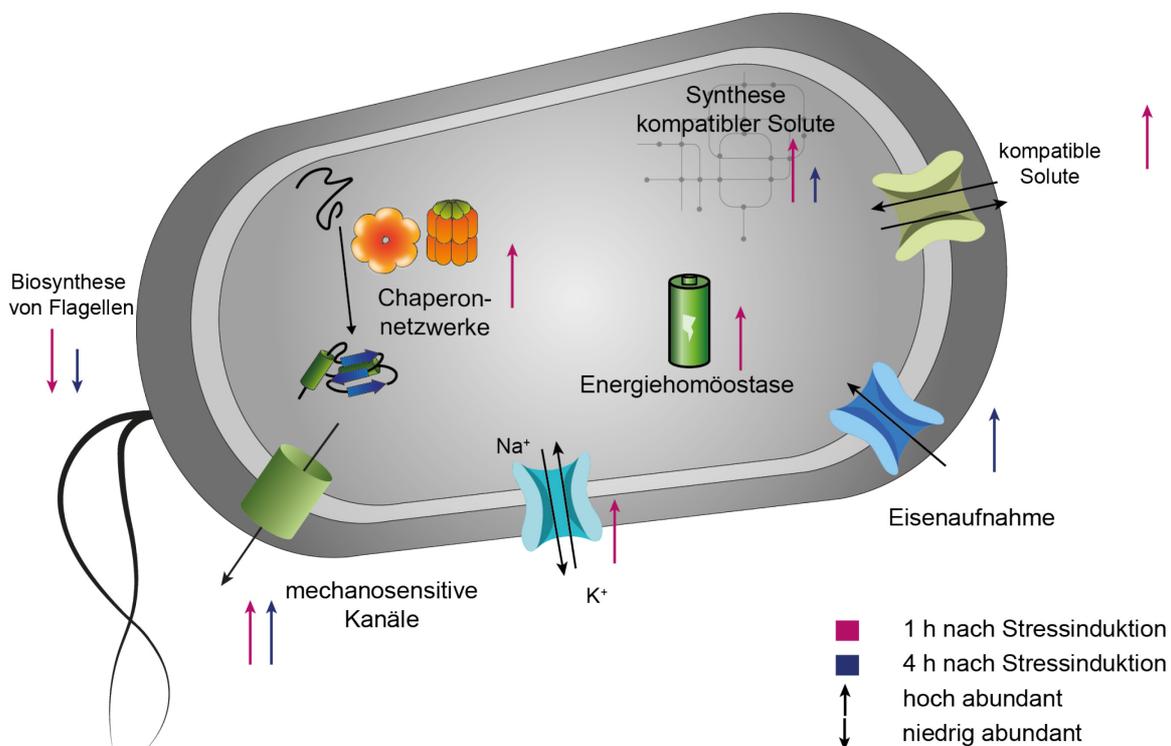
Chaperone stellen eine generelle Reaktion auf Stress dar. Sie dienen vor allem dazu fehlgefaltete Proteine richtig zu falten oder denaturierte Proteine wieder in ihre richtige Faltungskonformation zu bringen. (Nizer *et al.*, 2020; Hartl *et al.*, 2011). Die Chaperone GroEL (SAMN05216198\_2381), GroES (SAMN05216198\_2382) und ClpB (SAMN05216198\_2485) wurden verstärkt exprimiert (**Abb. 3.22A**). Ein molekulares Chaperon, welches aktiv in Reaktion auf hyperosmotische Bedingungen reagiert ist DnaJ (SAMN05216198\_0032), welches wiederum mit DnaK (SAMN05216198\_0031) und GrpE (SAMN05216198\_0030) interagiert. Durch Modifikation von Dank konnte in *Lactobacillus lactis* beispielsweise die Toleranz gegenüber NaCl erhöht werden (Gao *et al.*, 2023; Abdullah-Al-Mahin *et al.*, 2010). Darüber hinaus konnten in anderen Organismen, wie *E. coli* oder *P. putida*, zudem ein Einfluss auf die Toluol-, Säure- oder Temperaturtoleranz beobachtet werden (Gao *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2014).

Transkripte, die mit DNA-Reparatur-Proteinen assoziiert sind, konnten nicht identifiziert werden (**Abb. 3.23A**). Das hohe osmotische Potential bewirkte außerdem eine verminderte Expression der Ionen-transport-assoziierten Gene. Grundsätzlich ist dies zunächst wenig verwunderlich, da bereits hohe Konzentrationen an verschiedensten Ionen innerhalb der

Zelle zur Verfügung stehen. Wird allerdings eine klassische Reaktion auf osmotischen Stress beschrieben, so wird die Auf- und Abgabe verschiedener Ionen über mechanosensitive Kanäle beschrieben, ebenso wie die Aufnahme von  $K^+$ -Ionen (Czech *et al.*, 2018a; Wood, 2011; Le Rudulier *et al.*, 1984) (s. Kapitel 1.2.1). Eben diese Reaktionen konnten auch anhand der Transkriptomstudie beobachtet werden (**Abb. 3.22A**), indem beispielsweise die Transkripte eines mechanosensitiven Kanals (SAMN05216198\_2499), des osmotisch induzierten Proteins OsmY (SAMN05216198\_3460) und eines  $Na^+$ /Prolin-Symporters (SAMN05216198\_1772) hoch abundant waren. Der intrazelluläre Kaliumvorrat wird anschließend durch Aufnahme oder Synthese von kompatiblen Soluten ergänzt (s. Kapitel 1.2.1). So konnte beispielsweise beobachtet werden, dass, wie aus oben beschriebenen Experimenten zu erwarten, die Transkripte zur Produktion von Ectoin (SAMN05216198\_0804) und 5-Hydroxyectoin (SAMN05216198\_0803), aber auch Transkripte zur Synthese von Trehalose (SAMN05216198\_2232) und *N*-Acetylglutaminylglutamin (SAMN05216198\_3052) hoch abundant waren. Mit Ausnahme von Ectoin und 5-Hydroxyectoin wurden diese Gene auch in Studien von *P. aeruginosa* als Reaktion auf osmotischem Stress stärker exprimiert (Aspedon *et al.*, 2006). Eine Mischung verschiedener kompatibler Solute entspricht somit den Beobachtungen innerhalb der artverwandten *Pseudomonadaceae*.

Die an der Ectoin-Biosynthese beteiligten Gene (*ask\_ect*, *asd*, und *ectABCD*) zeigten 1 h nach Stressinduktion ein höheres Transkriptlevel, wohingegen 4 h nach Stressinduktion nur noch die Aspartatkinase *ask\_ect* und *ectD* bei einem M-Schwellenwert von 1,5 identifiziert wurden (**Abb. 3.22B**). Die anderen Gene zeigten einen M-Wert knapp unterhalb von 1,5. In *H. alkaliphila* waren hingegen lediglich *lysC* und *ectAB* hoch abundant, wohingegen in *H. elongata* zwar die direkt an der Ectoinbiosynthese beteiligten Transkripte von *ectABC* hoch abundant waren, nicht jedoch die Transkripte für Proteine, die an der Generierung des Vorstufenmolekül L-Asparat- $\beta$ -semialdehyd beteiligt sind (*LysC*, *asd*) (Zhang *et al.*, 2022; Kindzierski *et al.*, 2017). Dies könnte implizieren, dass in *H. litoralis* nicht nur Ectoin zum Zellschutz produziert wurde, sondern auch die Aminosäurebiosynthese generell verstärkt wurde (s.o.). Da die Ectoinproduktion aus dem Aminosäurestoffwechsel abgeleitet wird und auch über den Citratzyklus reguliert werden kann (Zhang *et al.*, 2022), bestand damit einhergehend eine hohe Nachfrage nach dem Vorstufenmolekül. Glutamat stellt in der Ectoinbiosynthese ebenfalls ein wichtiges Substrat dar, indem es als Stickstoffdonor dient. Darüber hinaus kann es außerdem selbst als kompatibles Solut fungieren (Kindzierski *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu *H. elongata* konnte in *H. litoralis* die Glutamatdehydrogenase als hoch-abundant identifiziert werden (Kindzierski *et al.*, 2017). 4 h nach Zugabe des Salzes ist nach Sortierung der Transkripte hinsichtlich ihrer Funktionalitätsgruppe (**Abb. 3.23B**) ein anderes Profil zu sehen als 1 h nach

Stressinduktion. Auffällig ist, dass nach 4 h die zuvor beschriebenen Stressreaktionen in diesem Ausmaß nicht mehr beobachtet werden konnten (**Abb. 3.22B**). Die Biosynthese der Flagellen, sowie die Gene, welche mit mechanosensitiven Kanälen assoziiert sind, waren weiterhin niedrig bzw. hoch abundant. Die Funktionalitätsgruppen, die die meisten hoch abundanten Transkripte beinhalteten, waren dem Ionentransport und der Energiehomöostase zugeordnet. Nennenswert ist, dass sich bei den Genen in der Kategorie Ionentransport um solche handelt, die entweder mit der direkten Aufnahme von Eisen oder mit Siderophorrezeptoren assoziiert sind (**Abb. 3.22B; Tab. A12**). In *B. subtilis* und *H. alkaliphila* konnte ebenfalls beobachtet werden, dass osmotischer Stress in Zusammenhang mit einer Limitierung in der Eisenversorgung steht (Zhang *et al.*, 2023; Hoffmann *et al.*, 2002). Eine zusammenfassende Darstellung der Reaktionen auf den osmotischen Stress 1 h und 4 h nach der Induktion mittels NaCl ist in **Abb. 3.24** gezeigt.



**Abb. 3.24: Schematische Übersicht der Reaktion auf osmotischen Stress 1 h und 4 h nach Salzzugabe in *H. litoralis*. Im Vergleich zu einer Kultur ohne osmotischen Stress.**

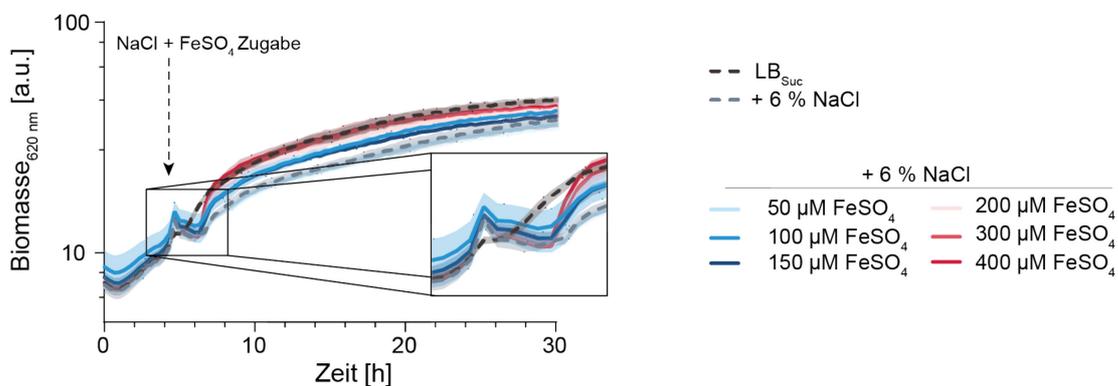
Dargestellt sind verschiedene beobachtete Stressreaktionen auf transkriptioneller Ebene. Wenn die beteiligten Gene 1 h (pink) bzw. 4 h (blau) nach Stressinduktion hoch abundant waren, wurden sie mit einem Pfeil nach oben markiert. Wenn die Gene niedrig abundant waren, wurden sie durch einen Pfeil nach unten markiert. Unterschiedliche Pfeillängen geben an, wie sich der M-Wert gegenüber der Referenz bei einem Vergleich zwischen 1 h und 4 h verändert hat.

Zusammenfassend konnte anhand der Transkriptomstudien von osmotisch gestressten *H. litoralis* im Vergleich zu einer nicht gestressten Kultur eine zweiphasige Reaktion auf den Stress beobachtet werden, obwohl das osmotische Potential unverändert war. Innerhalb der ersten Stressantwort, welche 1 h nach dem osmotischen Schock gemessen wurde, konnten hoch abundante Transkripte identifiziert werden, die mit der Biosynthese von

kompatiblen Soluten, Transportern zur Aufnahme dieser oder zur  $K^+$ -Aufnahme, Chaperonnetzwerken oder Energiebereitstellung assoziiert waren. Im Gegensatz dazu waren Transkripte zur Zellmotilität niedrig abundant. In der zweiten Stressantwort waren Transkripte zur Produktion mechanosensitiver Kanäle noch immer hoch abundant und solche die mit der Zellmotilität assoziiert sind, niedrig abundant. Die zuvor adaptierte Kultur näherte sich wieder einem Normalzustand an, was anhand der vergleichweisen geringen Zahl hoch bzw. niedrig abundanter Transkripte deutlich wurde. Interessanterweise waren insbesondere Eisenaufnahme-assoziierte Transkripte hoch abundant, was auf fehlende Ressourcen innerhalb der Zellen hindeuten könnte.

### 3.5.3 Eisenlimitierung als Konsequenz des osmotischen Stresses

Anhand der Transkriptomstudien in *H. litoralis* unter osmotischem Stress fiel insbesondere auf, dass nach 4 h ein hohes Transkriptlevel Eisenaufnahme-assoziiertes Proteine vorlag. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt untersucht werden, inwiefern eine Zugabe von Eisensulfat die Kultivierung nach einem osmotischen Schock beeinflusst (**Abb. 3.25**).



**Abb. 3.25: Wachstumseffekte bei osmotisch gestressten Kulturen von *H. litoralis* nach Eisensupplementierung**

*H. litoralis* 2SM5R wurde in  $LB_{Suc}$  Medium (schwarz gestrichelt) kultiviert. Einige Kulturen wurden durch Zugabe von 6 % NaCl zu Beginn der exponentiellen Wuchsphase einem osmotischen Schock ausgesetzt (grau, gestrichelt) und mit steigenden Konzentrationen  $FeSO_4$  versetzt. 50  $\mu M$   $FeSO_4$  (hellblau); 100  $\mu M$   $FeSO_4$  (blau); 150  $\mu M$   $FeSO_4$  (dunkelblau); 200  $\mu M$   $FeSO_4$  (rosa); 300  $\mu M$   $FeSO_4$  (rot); 400  $\mu M$   $FeSO_4$  (dunkelrot). Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar und die Schatten geben die berechnete Standardabweichung an.

Hierzu wurden die Kulturen zeitgleich mit dem osmotischen Schock mit 50 - 400  $\mu M$   $FeSO_4$  supplementiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zugabe des Eisens tatsächlich positiv auf die Erholung der Kultur unter Stressbedingungen nach dem Schock wirkte. Bei einem osmotischen Schock durch 6 % (w/v) NaCl und 300  $\mu M$   $FeSO_4$  konnte ein starker Anstieg in der exponentiellen Wuchsphase beobachtet werden, sodass sich die Wuchskurve in der stationären Wuchsphase der Wachstumskurve von *H. litoralis* ohne osmotischen Schock angleich. Das passt zu Beobachtungen, die mit *B. subtilis* gemacht wurden, welcher bei osmotischem Stress einen deutlich höheren Bedarf an Eisen zeigte als unter normalen Bedingungen und sogar solche Konzentrationen einen positiven Einfluss auf das Wachstum hatten, die zuvor in einem toxischen Bereich lagen (Hoffmann

et al., 2002). In *H. littoralis* konnten auch bei steigenden Konzentrationen keine wachstumsinhibierende Wirkung beobachtet werden. Um dies zu erreichen, müssten höhere Konzentrationen getestet werden. Allerdings war zu sehen, dass 400  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  Supplementierung zu dem gleichen Wuchsverhalten wie bei 300  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  führten, sodass hier keine weitere Steigerung des Wachstums durch eine höhere Eisenverfügbarkeit zu erwarten wäre.

In der Transkriptomstudie konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass in der zweiten Phase Transkripte für Siderophorrezeptoren hoch abundant waren. Siderophore komplexieren das unlösliche, aber unter aeroben Bedingungen hauptsächlich vorliegende  $\text{Fe}^{3+}$  und machen es der Zelle zugänglich (Kramer et al., 2020; Crosa & Walsh, 2002). Im Genom von *H. littoralis* konnten allerdings keine Gene zur Produktion möglicher Siderophore identifiziert werden und auch unter den hoch abundanten Transkripten aus dem Datensatz zu den Proben, die 4 h nach Stressinduktion genommen wurden, sind keine Gene zu finden, die augenscheinlich der Siderophorsynthese zugeordnet werden könnten. Es könnte vermutet werden, dass dieser Organismus in seinem natürlichen Habitat von anderen Organismen abhängig ist, die in der Lage sind Siderophore zu produzieren. Bei einer solchen Abhängigkeit innerhalb einer bakteriellen Gemeinschaft könnte *H. littoralis* einen sogenannten „cheater“ darstellen, indem er wertvolle Ressourcen eines anderen Produzenten verbraucht (Kramer et al., 2020). Da Siderophore vom Produzenten in die Umgebung abgegeben werden, haben sich zahlreiche verschiedene Varianten evolviert, um eine Privatisierung des kostbaren Eisens zu gewährleisten (Shao et al., 2023; Figueiredo et al., 2022; Bremer & Krämer, 2019). Um einen Effekt von Siderophoren als Reaktion auf osmotischen Stress also weitergehend zu untersuchen, müsste zunächst festgestellt werden, welche Siderophore *H. littoralis* aufnehmen kann.

Mit Hilfe der Transkriptomstudien von osmotisch gestressten *H. littoralis* konnte eine zweiphasige Reaktion beobachtet werden. Während in der ersten Phase zu erwartende Reaktionen wie beispielsweise die Transkripte zur Produktion oder zum Transport von kompatiblen Soluten, zur  $\text{K}^+$ -Aufnahme oder von Chaperonnetzwerken hoch abundant waren, waren Transkripte zur Zellmotilität niedrig abundant. In der zweiten Phase zeigten insbesondere Eisenaufnahme-assoziierte Transkripte hohe Transkriptionslevel.

Eine Kultivierung von *H. littoralis* unter osmotischem Stress und einer Eisensupplementierung bestätigte diese Eisenlimitierung in  $\text{LB}_{\text{SUC}}$ , indem nach der Supplementierung das Wachstum regeneriert werden konnte.



## 4 Ausblick

### 4.1 Anwendung von *Halopseudomonas* spp. als Ganzzellfabrik

Die industrielle Anwendung von Enzymen und Mikroorganismen zur Produktion einiger Chemikalien hat als umweltfreundlichere Alternative zur rein chemischen Synthese im Laufe der Zeit stetig zugenommen (Alcántara *et al.*, 2022; Betancor & López-Gallego, 2022; Pinto *et al.*, 2020). Darüber hinaus können in der Biotechnologie alternative Ressourcen aufgewendet werden, um so limitierte natürliche Ressourcen zu schonen. Mikroorganismen haben als Ganzzellkatalysatoren den Vorteil, dass sie Schwankungen im pH-Wert oder der Temperatur eher tolerieren als rein enzymatische Systeme, was sie somit in Produktionsprozessen unempfindlicher macht (Mulet *et al.*, 2023). Darüber hinaus müssen an den Reaktionen beteiligte Cofaktoren bei einer *in vitro* Produktion regeneriert werden, was *in vivo* in der Regel von der Zelle übernommen werden kann. Außerdem können Kaskadenreaktionen innerhalb eines Organismus einfach durchgeführt werden, da die benötigten Enzyme mit Hilfe des entsprechenden Genclusters produziert und innerhalb der Zelle coexistieren können. Dies ermöglicht einen ökonomischen und ökologischen Bioprozess (Mulet *et al.*, 2023).

*Halopseudomonas* spp. sind als salz- und temperaturtolerante Mikroorganismen vielversprechende Organismen für einen solchen Prozess. Die Halotoleranz dieser, zum Teil marinen Organismen könnte die Anwendung von Meerwasser innerhalb eines Produktionsprozesses ermöglichen (Liu *et al.*, 2021). Dies würde nicht nur die Produktionskosten senken, sondern auch ökologisch wertvoller sein, da das benötigte Wasser weniger aufbereitet werden muss (Faulkner *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2021). Die Toleranz gegenüber einem hohen Salzgehalt könnte darüber hinaus genutzt werden, um als Selektionsdruck zu dienen und damit einhergehend nicht-sterile Bedingungen ermöglichen, was wiederum eine nachträgliche Aufbereitung der Kulturbrühe weiter erleichtert und wiederum die Kosten senken könnte (Liu *et al.*, 2021). Noch vorteilhafter wäre allerdings ein weiterer Selektionsdruck aufgrund der gewählten Nährstoffgrundlage. Um dieses Wunschscenario umsetzen zu können, wurden in dieser Arbeit die ersten Grundlagen geschaffen. Es konnten zum einen, stellvertretend für die Gattung *Halopseudomonas*, in vier ausgewählten Organismen geeignete Kultivierungsmethoden etabliert werden. Hierbei wurden sowohl ein Komplexmedium als auch ein Minimalmedium bereitgestellt, welche eine zuverlässige und reproduzierbare Kultivierung innerhalb von 24 h ermöglichte (s. Kapitel 3.2). Auf Basis dieser Erkenntnisse könnte in einem nächsten Schritt eine Methode zur Etablierung eines Fed-Batch-Prozesses entwickelt werden. Hierbei könnte zudem über Zufütterungsexperimente die Medienzusammensetzung weiter optimiert werden, um in dieser Arbeit identifizierte, noch bestehende, Limitierungen zu

beheben. Dies könnte darüber hinaus die Biomasse und Wachstumsraten weiter erhöhen und die *Halopseudomonas*-Arten so auch unter Batch-Bedingungen näher an Wachstumsraten etablierter Modellorganismen heranbringen (Hewitt & Nienow, 2007). Außerdem ermöglicht eine Fed-Batch-Kultivierung vor allem höhere Produkttiter. In dieser Arbeit wurde insbesondere der Produkttiter von Ectoin und 5-Hydroxyectoin untersucht und erstmals in *Halopseudomonas* spp. nachgewiesen. In anderen Studien mit *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass eine Umstellung hin zu einem Fed-Batch-Prozess die Produktausbeute dieser kompatiblen Solute verbesserte (Liu *et al.*, 2021).

Neben einer optimierten Kultivierung stellt die Verbesserung des biosynthetischen Stoffwechsels einen wichtigen Parameter in der Biotechnologie dar. Hierzu sind verschieden mikrobiologische Werkzeuge notwendig, die zum einen die Genexpression regulieren oder eine Implementierung von heterologen oder homologen Genen in das Genom ermöglichen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit verschiedenen replizierbaren Plasmidsystemen (s. Kapitel 3.4), unterschiedlichen Promotorsystemen (s. Kapitel 3.4.1) und mehreren *attTn7*-Loci (s. Kapitel 3.4.2) eine breite Auswahl dieser Werkzeuge zur Verfügung stehen. Ein wichtiges Werkzeug der Optimierung stellt zudem die Gendeletion dar. So kann die Produktion ungewünschter oder energetisch aufwendiger Nebenprodukte vermieden werden (s. Kapitel 1.3.3) (Bitzenhofer *et al.*, 2021; Wynands *et al.*, 2019). Bislang war dieser Schritt in *H. formosensis* FZJ erfolgreich (de Witt *et al.*, 2023), nicht jedoch in den hier ausgewählten *Halopseudomonas*-Arten. Um diese Möglichkeit der Optimierung universell in *Halopseudomonas* spp. anzuwenden könnte das CRISPR-System ein vielversprechender Ansatz sein. Das CRISPR-Cas9-System konnte bereits wirtsunabhängig angewendet werden und stellt dadurch eine gute Alternative zu der in dieser Arbeit getesteten homologen Rekombination dar (Mulet *et al.*, 2023; Volke *et al.*, 2023; Aparicio *et al.*, 2018). Darüber hinaus wurden basierend auf dem CRISPR-System inzwischen zahlreiche weitere Varianten etabliert. Eine Anwendung einer Cas Nickase vermeidet beispielsweise die Implementierung eines letalen Doppelstrangbruches, während das gewünschte Zielgen modifiziert werden kann (Mulet *et al.*, 2023). Darüber hinaus wurde eine katalytisch inaktive Cas9 etabliert, die eine gesteuerte Reduktion der Genexpression ermöglicht (Zheng *et al.*, 2019). Somit kann nicht nur eine einfache Überprüfung zahlreicher Gene durchgeführt werden, sondern auch eine vorübergehende Stilllegung essenzieller Gene erfolgen (Miao *et al.*, 2023).

Ein Gendeletionswerkzeug würde darüber hinaus eine Optimierung der Ectoinbiosynthese in den *Halopseudomonas*-Arten und eine Überprüfung der hier identifizierten potenziellen neuen Gruppe der Ectoinhydroxylasen (s. Kapitel 3.5.1) ermöglichen. Zudem könnte beispielsweise die Produktion der Osmolyte von der Regulation über den osmotischen Stress entkoppelt werden. So könnte zum einen eine Nachbereitung der Kulturbrühe weiter

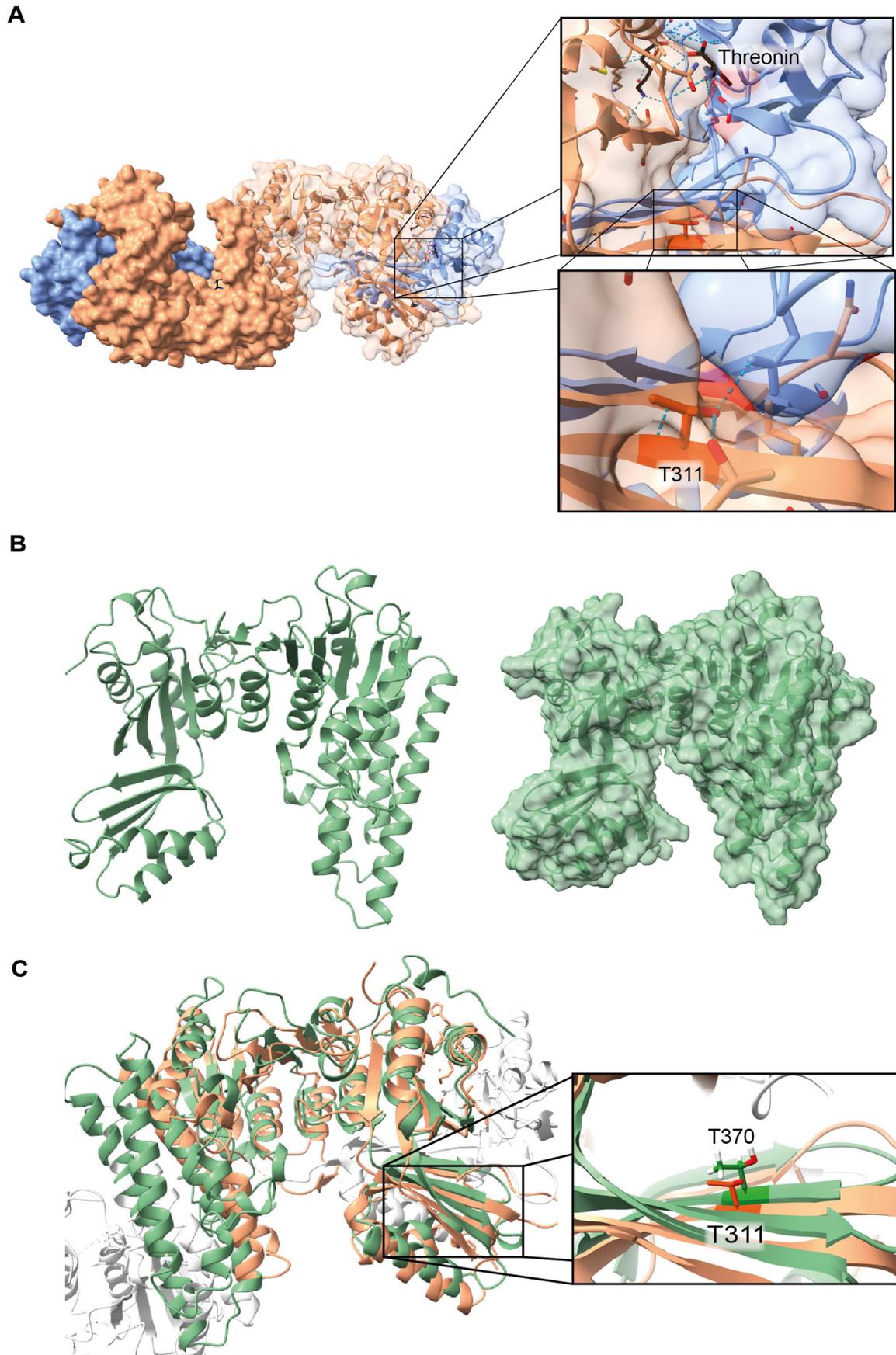
vereinfacht werden, da sie nicht so viel Salz enthält und es würde zudem die Bioreaktoren vor Korrosion durch den hohen Salzgehalt schützen (Faulkner *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2021). Außerdem könnte so die Genexpression einzelner Gene gezielt gesteuert werden, um gegebenenfalls die Toleranz der Zellen zu erhöhen und die Ausbeuten zu steigern.

Das kompatible Solut Ectoin bzw. 5-Hydroxyectoin schützt dabei nicht nur die Zelle, sondern stellt auch ein wertvolles Produkt in der Biotechnologie, Medizin und Kosmetik dar (Fontbonne *et al.*, 2023; Hermann *et al.*, 2020; Bownik & Stępniewska, 2016). In *C. glutamicum* konnte bereits gezeigt werden, dass ein bestimmtes Verhältnis der Expression von *ectB* zu *ectA* zu einer Steigerung der Ectoinproduktion führte, wobei eine höhere Transkription des Gens für das geschwindigkeitsbestimmende Enzym EctB vorteilhaft war (Gießelmann *et al.*, 2019). Darüber hinaus könnte mit Hilfe von Deletionsmutanten weiter untersucht werden, ob bestimmte Verhältnisse der Osmolyte Ectoin und 5-Hydroxyectoin zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten die Osmotoleranz weiter beeinflussen. 5-Hydroxyectoin zeigte gegenüber Ectoin eine höhere Wirksamkeit gegen Austrocknung und oxidativem Stress, welcher durch ein Überangebot von Eisen entsteht (Jungmann *et al.*, 2022; Czech *et al.*, 2018a; Manzanera *et al.*, 2004). Bislang stellt es allerdings ein Problem dar, ausschließlich 5-Hydroxyectoin zu produzieren (Liu *et al.*, 2021). Bei Induktion der zusätzlichen *ectD* Expression gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase konnte in *H. littoralis* gezeigt werden, dass nach 28 h Kultivierung kaum noch Ectoin, stattdessen aber 5-Hydroxyectoin intrazellulär vorlag (**Abb. 3.21B**). Möglicherweise könnte eine geringere Expression von *ectC* mittels CRISPRi in der stationären Wachstumsphase die Produktion von Ectoin weiter verringern, sodass der gesamte Ectoinvorrat zu 5-Hydroxyectoin umgesetzt werden könnte.

Neben der Steuerung der direkten Ectoinbiosynthesegene, könnte auch eine Modifikation in der Bereitstellung der Vorstufenmoleküle eine vielversprechende Möglichkeit zur Steigerung der Ectoinproduktion darstellen (Zhang *et al.*, 2023). So konnte gezeigt werden, dass der GlnR Regulator die Biosynthese von Ectoin negativ beeinflusst, indem der Gehalt an Glutamin, welches als Amindonor der Ectoinbiosynthese dient, innerhalb der Zelle konstant gehalten wird (Zhang *et al.*, 2023). Eine Deletion eines solchen Regulators könnte somit auch in *H. littoralis* eine vielversprechende Option einer erhöhten Ectoinproduktion darstellen.

L-Aspartat- $\beta$ -semialdehyd ist ein weiteres Molekül aus dem Aminosäurestoffwechsel und das Ausgangsmolekül für die Ectoinbiosynthese (**Abb. 1.5**). Es stellt es ein zentrales Intermediat des Aminosäurestoffwechsels, der Zellwand- und Antibiotikasyntese eines Mikroorganismus dar (Czech *et al.*, 2018a). In *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine erhöhte Verfügbarkeit dieses Vorstufenmoleküls die Ectoinproduktion gesteigert werden konnte (Bestvater *et al.*, 2008). Dafür wurde die Aspartatkinase LysC aus

*C. glutamicum* heterolog exprimiert und die Rückkopplungshemmung durch L-Lys und L-Thr mit Hilfe eines Aminosäureaustausches an Position T311I bzw. C932T dieses Enzyms aufgehoben (Becker *et al.*, 2011; Bestvater *et al.*, 2008). Die inhibierte Aspartatkinase LysC bildet ein Heterotetramer bestehend aus jeweils zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, wobei sich die  $\beta$ -Untereinheit aus den 160 Aminosäuren der C-Terminalen Region der  $\alpha$ -Untereinheit zusammensetzt (Yoshida *et al.*, 2007). Threonin wird dabei zwischen der Regulatorischen  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta$ -Untereinheit gebunden und stabilisiert dadurch das Dimer (Yoshida *et al.*, 2007). Die Position T311 ist hierbei nicht direkt an der Bindung von Threonin beteiligt, sondern an der Interaktion beider Untereinheiten in unmittelbarer Nähe zur Threonin-Bindestelle (**Abb. 4.1A**).



**Abb. 4.1: Sekundärstruktur und Strukturvergleich der Aspartatkinase LysC aus *C. glutamicum* und Ask\_Ect aus *H. littoralis*.**

**A:** LysC aus *C. glutamicum* (PDB: 3AAW) bildet bei Inhibierung durch L-Thr (schwarz) ein heterotetrameres Oligomer bestehend aus jeweils zwei  $\alpha$ - (orange) und  $\beta$ -Untereinheiten (blau). T311 (dunkelorange) stabilisiert

über Wasserstoffbrückenbindungen den Zusammenhalt beider Untereinheiten in unmittelbarer Nähe des gebundenen Threonins. **B:** Für eine Vorhersage der Sekundärstruktur der Ask\_ect (UniProt: 9GAMM) aus *H. litoralis* wurde auf Basis der Aminosäuresequenz wurde Robetta (**Tab. 2.2**) verwendet. Es wurde hierbei RoseTTAFold als optimale Eingrenzungen der Vorhersage ausgewählt. Die erhaltene Strukturvorhersage (Job-ID 338946) zeigte eine Zuverlässigkeit von 0,83. (**Abb. 4.1B**). **C:** Vergleich beider Sekundärstrukturen und der Position von T311 und T370.

Wie bereits in Kapitel **1.2.1.2** beschrieben, weisen einige Ectoinproduzenten eine zusätzliche Aspartatkinase auf, die die gleiche Reaktion wie LysC katalysiert, aber nur durch L-Thr inhibiert wird und die Produktion der Osmolyte verbesserte (Stöveken *et al.*, 2011). Somit könnte ein weiterer Ansatz zur Optimierung der Ectoinproduktion darin bestehen, die Rückkopplungshemmung der Aspartatkinase Ask\_Ect in *H. litoralis* aufzuheben. Bei dem Vergleich beider Sekundärstrukturen (**Abb. 4.1C**) wird deutlich, dass Ask\_Ect zwei  $\alpha$ -Helices an Aminosäureposition 72-125 des Proteins aufweist, die LysC nicht hat. Darüber hinaus sind sich beide Strukturen sehr ähnlich. Die Position T311 aus LysC dient der Stabilisierung beider Untereinheiten nach Bindung von L-Thr und kann in Ask\_Ect an Position T370 identifiziert werden. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten in der Struktur könnte eine Aufhebung der Rückkopplungshemmung durch einen Aminosäureaustausch von Threonin zu Isoleucin ein vielversprechender Ansatz sein, um die Biosynthese von Ectoin und 5-Hydroxyectoin zu steigern.

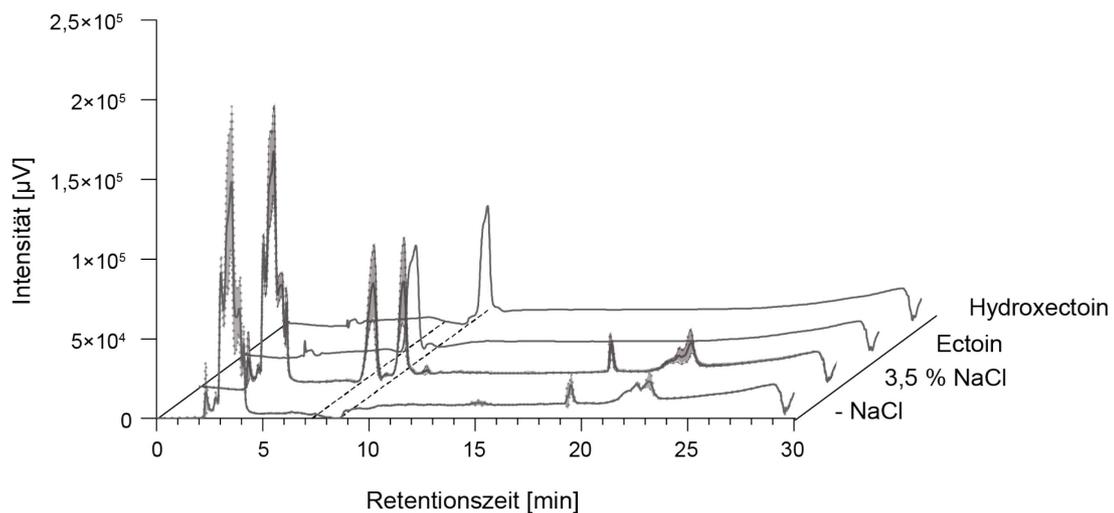
Im Vergleich zu dem in dieser Arbeit erhaltenen Produkttiter wurden in anderen natürlichen bereits etablierten Produktionsstämmen, wie *Halomonas* spp., der den Einsatz extremer Salzkonzentrationen erlaubt und in sehr hohen Konzentrationen der kompatiblen Solute resultiert, oder in umfangreichen Studien der heterologen Expression von (*askEct*)-*ectABC(D)* in modifizierten Modellorganismen, wie *E. coli* oder *C. glutamicum* mit bis zu 63,4 g/L Ectoin deutlich höhere Ausbeuten erhalten (Zhang *et al.*, 2023; Jungmann *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2021; Gießelmann *et al.*, 2019). Die etablierten Modellorganismen wurden hingegen hinsichtlich hoher Produktausbeuten modifiziert und innerhalb von Fermentationsprozessen kultiviert, was einen direkten Vergleich mit den *Halopseudomonas* spp. erschwert, daher können die dort berichteten Ectoin-Ausbeuten von neu etablierten Produktionssystemen nicht *ad hoc* erreicht werden.

Ein Aspekt bei der Etablierung neuer Arten für technologische Anwendungen ist allerdings die Produktion von hochwertigen Naturstoffen auf Basis alternativer Nährstoffquellen. Viele nicht-etablierte Mikroorganismen sind in der Lage, auf alternativen Kohlenstoffquellen zu wachsen, wodurch auch primäre Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Zucker, der Nahrungsmittelindustrie weiter vorbehalten wären (Riley & Guss, 2021). So erschienen kürzlich mehrere Studien zur Produktion von Ectoin auf Basis von C<sub>1</sub>-Kohlenstoffen, CO<sub>2</sub> oder Lignocellulose (Feng *et al.*, 2023; Pham *et al.*, 2023; Mustakhimov *et al.*, 2019; Tanimura *et al.*, 2013).

*Halopseudomonas* spp. können auf Beschichtungsmaterialien, wie PEU oder Impranil® DLN, aus der Plastikindustrie als einzige Kohlenstoffquelle wachsen (de Witt *et al.*, 2023).

Ebenso konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie langkettige Dicarbonsäuren verstoffwechseln, welche als Produkt des enzymatischen oder chemischen Plastikabbaus entstehen können (s. Kapitel 3.2). Ein Einsatz als Ganzzellbiokatalysatoren könnte beispielsweise in der Anwendung dieser Mikroorganismen zum Abbau von Plastikprodukten und anschließender Umsetzung zu wertvollen Produkten wie Ectoin oder PHA sein.

Als Konzeptnachweis wurde *H. litoralis* 2SM5R in  $HM_{Seb}$ -Medium kultiviert, osmotischem Stress ausgesetzt und gezeigt, dass Ectoin tatsächlich ausgehend von dieser Kohlenstoffquelle produziert werden kann (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2:** Analyse der Ectoin und Hydroxyectoinproduktion ausgehend von Sebacinsäure in *H. litoralis* 2SM5R.

*H. litoralis* 2SM5R wurde in  $HM_{Seb}$ -Medium kultiviert und zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von 3 % (w/v) NaCl osmotischem Stress ausgesetzt. Nach 16 h Kultivierung wurden die Zellen geerntet und mittels HPLC-PDA analysiert. Gezeigt sind die Chromatogramme bei 210 nm. Die gestrichelten Linien zeigen die Retentionszeiten von Ectoin und Hydroxyectoin an. Die Vergleichsanalyten Ectoin und Hydroxyectoin sind in schwarz dargestellt. Die Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar und die Schatten geben die berechnete Standardabweichung an.

Da langkettige Dicarbonsäuren ein Abbauprodukt von Plastik darstellen können (Sullivan *et al.*, 2022), ist dies ein erster Indikator für die Anwendung der *Halopseudomonas*-Arten als Ganzzellfabriken und damit einhergehend ihrer Funktion zur Etablierung einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die *Halopseudomonas*-Arten das Potenzial bieten, eine Ganzzellfabrik darzustellen, um so in Zukunft der Etablierung einer Kreislaufwirtschaft beizusteuern. So könnten sie womöglich tatsächlich tatsächlich menschengemachte Verschmutzungen als Nährstoffquelle nutzen. Diese Tatsache allein zeigt bereits die biotechnologische Relevanz dieser Organismen. Aufbauend darauf könnte mit *Halopseudomonas* spp. z. B. biologisch produziertes PHA angefertigt werden, woraus wiederum biologisch abbaubares Plastik hergestellt werden kann oder aber Ectoin produziert werden. Dieses hat bereits jetzt ein großes Anwendungsprofil in vielen verschiedenen biotechnologischen Bereichen, wie der Medizin oder Kosmetikindustrie.



---

## 5 Literatur

- Abdullah-Al-Mahin, Sugimoto, S., Higashi, C., Matsumoto, S., & Sonomoto, K. (2010) Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* *dnaK*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4277–4285. doi: 10.1128/AEM.02878-09.
- Abraham, W.P., Raghunandan, S., Gopinath, V., Suryaaletha, K., & Thomas, S. (2020) Deciphering the cold adaptive mechanisms in *Pseudomonas psychrophila* MTCC12324 isolated from the Arctic at 79° N. *Curr Microbiol* **77**: 2345–2355. doi: 10.1007/s00284-020-02006-2.
- Ackermann, Y.S., Li, W.J., Op de Hipt, L., Niehoff, P.J., Casey, W., Polen, T., *et al.* (2021) Engineering adipic acid metabolism in *Pseudomonas putida*. *Metab Eng* **67**: 29–40. doi: 10.1016/j.ymben.2021.05.001.
- Alcántara, A.R., Domínguez de María, P., Littlechild, J.A., Schürmann, M., Sheldon, R.A., & Wohlgemuth, R. (2022) Biocatalysis as key to sustainable industrial chemistry. *ChemSusChem* **15**: e202102709. doi: 10.1002/cssc.202102709.
- Altenbuchner, J. (2016) Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system. *Appl Environ Microbiol* **82**: 5421–5427. doi: 10.1128/AEM.01453-16.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Alvarez, H.M. & Steinbüchel, A. (2002) Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 367–376. doi: 10.1007/s00253-002-1135-0.
- Álvarez-Barragán, J., Domínguez-Malfavón, L., Vargas-Suárez, M., González-Hernández, R., Aguilar-Osorio, G., & Loza-Tavera, H. (2016) Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Appl Environ Microbiol* **82**: 5225–5235. doi: 10.1128/AEM.01344-16.
- Amoozegar, M.A., Shahinpei, A., Sepahy, A.A., Makhdoumi-Kakhki, A., Seyedmahdi, S.S., Schumann, P., & Ventosa, A. (2014) *Pseudomonas salegens* sp. nov., a halophilic member of the genus *Pseudomonas* isolated from a wetland. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 3565–3570. doi: 10.1099/ijls.0.062935-0.
- Ankenbruck, N., Courtney, T., Naro, Y., & Deiters, A. (2018) Optochemical control of biological processes in cells and animals. *Angew Chem Int Ed* **57**: 2768–2798. doi: 10.1002/anie.201700171.
- Antoine, R. & Locht, C. (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms. *Mol Microbiol* **6**: 1785–1799. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01351.x.
- Anwar, N., Abaydulla, G., Zayadan, B., Abdurahman, M., Hamood, B., Erkin, R., *et al.* (2016) *Pseudomonas populi* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Populus euphratica*. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 1419–1425. doi: 10.1099/ijsem.0.000896.
- Aparicio, T., de Lorenzo, V., & Martínez-García, E. (2018) CRISPR/Cas9-based counterselection boosts recombinering efficiency in *Pseudomonas putida*. *Biotechnol J* **13**: 1700161. doi: 10.1002/biot.201700161.

- 
- Arakawa, T. & Timasheff, S.N. (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**: 411–414. doi: 10.1016/S0006-3495(85)83932-1.
- Argandoña, M., Piubeli, F., Reina-Bueno, M., Nieto, J.J., & Vargas, C. (2021) New insights into hydroxyectoine synthesis and its transcriptional regulation in the broad-salt growing halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Microb Biotechnol* **14**: 1472–1493. doi: 10.1111/1751-7915.13799.
- Armborst, N. (2022) Einfluss der EctD-vermittelten Hydroxyectoinproduktion auf die Osmotoleranz von *Halopseudomonas bauzanensis*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Bachelorarbeit.
- Arnold, B.J., Huang, I.T., & Hanage, W.P. (2022) Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **20**: 206–218. doi: 10.1038/s41579-021-00650-4.
- Arpino, J.A.J., Hancock, E.J., Anderson, J., Barahona, M., Stan, G.B. V., Papachristodoulou, A., & Polizzi, K. (2013) Tuning the dials of synthetic biology. *Microbiology* **159**: 1236–1253. doi: 10.1099/mic.0.067975-0.
- Aspedon, A., Palmer, K., & Whiteley, M. (2006) Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 2721–2725. doi: 10.1128/JB.188.7.2721-2725.2006.
- Atashgahi, S., Sánchez-Andrea, I., Heipieper, H.J., van der Meer, J.R., Stams, A.J.M., & Smidt, H. (2018) Prospects for harnessing biocide resistance for bioremediation and detoxification. *Science* **360**: 743–746. doi: 10.1126/science.aar3778.
- Auton, M., Rösgen, J., Sinev, M., Holthauzen, L.M.F., & Bolen, D.W. (2011) Osmolyte effects on protein stability and solubility: A balancing act between backbone and side-chains. *Biophys Chem* **159**: 90–99. doi: 10.1016/j.bpc.2011.05.012.
- Avilan, L., Lichtenstein, B.R., König, G., Zahn, M., Allen, M.D., Oliveira, L., *et al.* (2023) Concentration-dependent inhibition of mesophilic PETases on poly(ethylene terephthalate) can be eliminated by enzyme engineering. *ChemSusChem* **16**: e202202277. doi: 10.1002/cssc.202202277.
- Azhar, E.I., Papadioti, A., Bibi, F., Ashshi, A.M., Raoult, D., & Angelakis, E. (2017) *Pseudomonas saudimassiliensis* sp. nov. a new bacterial species isolated from air samples in the urban environment of Makkah, Saudi Arabia. *New Microbes New Infect* **16**: 43–44. doi: 10.1016/j.nmni.2016.12.021.
- Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G.R., *et al.* (2021) Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* **373**: 871–876. doi: 10.1126/science.abj8754.
- Bagdasarian, M.M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J., & Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237–247. doi: 10.1016/0378-1119(81)90080-9.
- Balzer, S., Kucharova, V., Megerle, J., Lale, R., Brautaset, T., & Valla, S. (2013) A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **12**: 26. doi: 10.1186/1475-2859-12-26.

- Basler, G., Thompson, M., Tullman-Ercek, D., & Keasling, J. (2018) A *Pseudomonas putida* efflux pump acts on short-chain alcohols. *Biotechnol Biofuels* **11**: 136. doi: 10.1186/s13068-018-1133-9.
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L.Y., & Heipieper, H.J. (2012) Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **78**: 6217–6224. doi: 10.1128/AEM.01525-12.
- Bay, D.C., Rommens, K.L., & Turner, R.J. (2008) Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1778**: 1814–1838. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.015.
- Beales, N. (2004) Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *CRFSFS* **3**: 1–20. doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x.
- Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H., & Wittmann, C. (2011) From zero to hero-design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab Eng* **13**: 159–168. doi: 10.1016/j.ymben.2011.01.003.
- Benner, S.A. & Sismour, A.M. (2005) Synthetic biology. *Nat Rev Genet* **6**: 533–543. doi: 10.1038/nrg1637.
- van den Berg, J., Boersma, A.J., & Poolman, B. (2017) Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nat Rev Microbiol* **15**: 309–318. doi: 10.1038/nrmicro.2017.17.
- Berman, H.M. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res* **28**: 235–242. doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- Bestvater, T., Louis, P., & Galinski, E.A. (2008) Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: By-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Syst* **4**: 12. doi: 10.1186/1746-1448-4-12.
- Betancor, L. & López-Gallego, F. (2022) Cell–enzyme tandem systems for sustainable chemistry. *Curr Opin Green Sustain Chem* **34**: 100600. doi: 10.1016/j.cogsc.2022.100600.
- Binder, D., Grünberger, A., Loeschcke, A., Probst, C., Bier, C., Pietruszka, J., et al. (2014) Light-responsive control of bacterial gene expression: Precise triggering of the *lac* promoter activity using photocaged IPTG. *Integr Biol* **6**: 755–765. doi: 10.1039/c4ib00027g.
- Binder, D., Probst, C., Grünberger, A., Hilgers, F., Loeschcke, A., Jaeger, K.-E., et al. (2016) Comparative single-cell analysis of different *E. coli* expression systems during microfluidic cultivation. *PLoS One* **11**: e0160711. doi: 10.1371/journal.pone.0160711.
- Bitzenhofer, N.L., Classen, T., Jaeger, K.-E., & Loeschcke, A. (2023a) Biotransformation of L-tryptophan to produce arcylflavin A with *Pseudomonas putida* KT2440. *ChemBioChem* **24**: e202300576. doi: 10.1002/cbic.202300576.
- Bitzenhofer, N.L., Höfel, C., Thies, S., Weiler, A.J., Eberlein, C., Heipieper, H.J., et al. (2023b) Exploring engineered vesiculation by *Pseudomonas putida* KT2440 for natural product biosynthesis. *Microb Biotechnol* **17**: e14312. doi: 10.1111/1751-7915.14312.
- Bitzenhofer, N.L., Kruse, L., Thies, S., Wynands, B., Lechtenberg, T., Rönitz, J., et al. (2021) Towards robust *Pseudomonas* cell factories to harbour novel biosynthetic pathways. *Essays Biochem* **65**: 319–336. doi: 10.1042/EBC20200173.

- 
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J.A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., *et al.* (2016) Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* **4**: 14. doi: 10.3390/microorganisms4010014.
- Blank, L.M., Ionidis, G., Ebert, B.E., Bühler, B., & Schmid, A. (2008) Metabolic response of *Pseudomonas putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase. *FEBS J* **275**: 5173–5190. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06648.x.
- Blin, K., Pedersen, L.E., Weber, T., & Lee, S.Y. (2016) CRISPy-web: An online resource to design sgRNAs for CRISPR applications. *Synth Syst Biotechnol* **1**: 118–121. doi: 10.1016/j.synbio.2016.01.003.
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H.E., Reitz, Z.L., Biermann, F., Alanjary, M., *et al.* (2023) antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Res* **51**: 46–50. doi: 10.1093/nar/gkad344.
- Blombach, B., Grünberger, A., Centler, F., Wierckx, N., & Schmid, J. (2022) Exploiting unconventional prokaryotic hosts for industrial biotechnology. *Trends Biotechnol* **40**: 385–397. doi: 10.1016/j.tibtech.2021.08.003.
- Bolen, D.W. & Baskakov, I. V. (2001) The osmophobic effect: Natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**: 955–963. doi: 10.1006/jmbi.2001.4819.
- Bollinger, A. (2020) Novel carboxylic ester hydrolases from marine hydrocarbonoclastic bacteria - insights into organic solvent tolerance, substrate promiscuity and polyester hydrolysis. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Inaugural-Dissertation.
- Bollinger, A., Molitor, R., Thies, S., Koch, R., Coscolín, C., Ferrer, M., & Jaeger, K.-E. (2020a) Organic-solvent-tolerant carboxylic ester hydrolases for organic synthesis. *Appl Environ Microbiol* **86**: e00106-20. doi: 10.1128/AEM.00106-20.
- Bollinger, A., Thies, S., Katzke, N., & Jaeger, K.-E. (2020b) The biotechnological potential of marine bacteria in the novel lineage of *Pseudomonas pertucinogena*. *Microb Biotechnol* **13**: 19–31. doi: 10.1111/1751-7915.13288.
- Bollinger, A., Thies, S., Knieps-Grünhagen, E., Gertzen, C., Kobus, S., Höppner, A., *et al.* (2020c) A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – Structural and functional insights. *Front Microbiol* **11**: 114. doi: 10.3389/fmicb.2020.00114.
- de Bont, J. (1998) Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Trends Biotechnol* **16**: 493–499. doi: 10.1016/S0167-7799(98)01234-7.
- de Bont, J.A.M. & Kieboom, J. (2001) Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology* **147**: 43–51. doi: 10.1099/00221287-147-1-43.
- Bösl, B., Grimminger, V., & Walter, S. (2006) The molecular chaperone Hsp104 - A molecular machine for protein disaggregation. *J Struct Biol* **156**: 139–148. doi: 10.1016/j.jsb.2006.02.004.
- Bownik, A. & Stępniewska, Z. (2016) Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Arh Hig Rada Toksikol* **67**: 260–265. doi: 10.1515/aiht-2016-67-2837.
- Bradley, D.E. (1982) Derepressed plasmids of incompatibility group I<sub>1</sub> determine two different morphological forms of pilus. *Plasmid* **9**: 331–334. doi: 10.1016/0147-619X(83)90011-2.

- 
- Bradley, D.E. (1983) Specification of the conjugative pili and surface mating systems of *Pseudomonas* plasmids. *Microbiology* **129**: 2545–2556. doi: 10.1099/00221287-129-8-2545.
- Brautaset, T., Lale, R., & Valla, S. (2009) Positively regulated bacterial expression systems. *Microb Biotechnol* **2**: 15–30. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00048.x.
- Bremer, E. & Krämer, R. (2019) Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annu Rev Microbiol* **73**: 313–334. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115504.
- Brito, I.L. (2021) Examining horizontal gene transfer in microbial communities. *Nat Rev Microbiol* **19**: 442–453. doi: 10.1038/s41579-021-00534-7.
- Brown, A.D. (1976) Microbial Water Stress. *Bacteriol Rev* **40**: 803–846. doi: 10.112/Fbr.40.4.803-846.1976.
- Browning, D.F. & Busby, S.J.W. (2016) Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **14**: 638–650. doi: 10.1038/nrmicro.2016.103.
- Bruckbauer, S.T., Kvitko, B.H., Karkhoff-Schweizer, RoxAnn R, & Schweizer, H.P. (2015) Tn5/7-lux: a versatile tool for the identification and capture of promoters in Gram-negative bacteria. *BMC Microbiol* **15**: 17. doi: 10.1186/s12866-015-0354-3.
- Bryksin, A. V. & Matsumura, I. (2010) Overlap extension PCR cloning: A simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* **48**: 463–465. doi: 10.2144/000113418.
- Buenger, J. & Driller, H. (2004) Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* **17**: 232–237. doi: 10.1159/000080216.
- Burg, M.B. & Ferraris, J.D. (2008) Intracellular organic osmolytes: Function and regulation. *J Biol Chem* **283**: 7309–7313. doi: 10.1074/jbc.R700042200.
- Burmeister, A., Hilgers, F., Langner, A., Westerwalbesloh, C., Kerkhoff, Y., Tenhaef, N., et al. (2019) A microfluidic co-cultivation platform to investigate microbial interactions at defined microenvironments. *Lab Chip* **19**: 98–110. doi: 10.1039/c8lc00977e.
- Bursy, J., Kuhlmann, A.U., Pittelkow, M., Hartmann, H., Jebbar, M., Pierik, A.J., & Bremer, E. (2008) Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7286–7296. doi: 10.1128/AEM.00768-08.
- Busby, S. & Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199–213. doi: 10.1006/jmbi.1999.3161.
- Calamita, G. (2000) The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Mol Microbiol* **37**: 254–262. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02016.x.
- Calderón, M.I., Vargas, C., Rojo, F., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Ventosa, A., & Nieto, J.J. (2004) Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043<sup>T</sup>. *Microbiology* **150**: 3051–3063. doi: 10.1099/mic.0.27122-0.
- Calero, P., Jensen, S.I., Bojanovič, K., Lennen, R.M., Koza, A., & Nielsen, A.T. (2018) Genome-wide identification of tolerance mechanisms toward *p*-coumaric acid in *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng* **115**: 762–774. doi: 10.1002/bit.26495.
-

- 
- Calero, P., Jensen, S.I., & Nielsen, A.T. (2016) Broad-host-range ProUSER vectors enable fast characterization of inducible promoters and optimization of *p*-coumaric acid production in *Pseudomonas putida* KT2440. *ACS Synth Biol* **5**: 741–753. doi: 10.1021/acssynbio.6b00081.
- Calos, M.P. (1978) DNA sequence for a low-level promoter of the *lac* repressor gene and an 'up' promoter mutation. *Nature* **274**: 762–765. doi: 10.1038/274762a0.
- Cameron, D.E., Bashor, C.J., & Collins, J.J. (2014) A brief history of synthetic biology. *Nat Rev Microbiol* **12**: 381–390. doi: 10.1038/nrmicro3239.
- Cantera, S., Tamarit, D., Strong, P.J., Sánchez-Andrea, I., Ettema, T.J.G., & Sousa, D.Z. (2022) Prospective CO<sub>2</sub> and CO bioconversion into ectoines using novel microbial platforms. *Rev Environ Sci Biotechnol* **21**: 571–581. doi: 10.1007/s11157-022-09627-y.
- Capp, M.W., Pegram, L.M., Saecker, R.M., Kratz, M., Riccardi, D., Wendorff, T., *et al.* (2009) Interactions of the osmolyte glycine betaine with molecular surfaces in water: Thermodynamics, structural interpretation, and prediction of *m*-values. *Biochemistry* **48**: 10372–10379. doi: 10.1021/bi901273r.
- Cárdenas Espinosa, M.J., Schmidgall, T., Pohl, J., Wagner, G., Wynands, B., Wierckx, N., *et al.* (2023) Assessment of new and genome-reduced *Pseudomonas* strains regarding their robustness as chassis in biotechnological applications. *Microorganisms* **11**: 837. doi: 10.3390/microorganisms11040837.
- Çetiner, U., Rowe, I., Schams, A., Mayhew, C., Rubin, D., Anishkin, A., & Sukharev, S. (2017) Tension-activated channels in the mechanism of osmotic fitness in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Physiol* **149**: 595–609. doi: 10.1085/jgp.201611699.
- Chan, D.T.C., Baldwin, G.S., & Bernstein, H.C. (2023) Revealing the host-dependent nature of an engineered genetic inverter in concordance with physiology. *Biodes Res* **5**: 0016. doi: 10.34133/bdr.0016.
- Charubin, K., Bennett, R.K., Fast, A.G., & Papoutsakis, E.T. (2018) Engineering *Clostridium* organisms as microbial cell-factories: Challenges & opportunities. *Metab Eng* **50**: 173–191. doi: 10.1016/j.ymben.2018.07.012.
- Chaves, J.E., Wilton, R., Gao, Y., Munoz, N.M., Burnet, M.C., Schmitz, Z., *et al.* (2020) Evaluation of chromosomal insertion loci in the *Pseudomonas putida* KT2440 genome for predictable biosystems design. *Metab Eng Commun* **11**: e00139. doi: 10.1016/j.mec.2020.e00139.
- Chen, G.-Q. & Jiang, X.-R. (2018) Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **50**: 94–100. doi: 10.1016/j.copbio.2017.11.016.
- Chen, I. & Dubnau, D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 241–249. doi: 10.1038/nrmicro844.
- Chen, X., Li, C., & Liu, H. (2021) Enhanced recombinant protein production under special environmental stress. *Front Microbiol* **12**: 630814. doi: 10.3389/fmicb.2021.630814.
- Chiang, Y.N., Penadés, J.R., & Chen, J. (2019) Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog* **15**: doi: 10.1371/journal.ppat.1007878.
- Choi, K.H., DeShazer, D., & Schweizer, H.P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with multiple *glmS*-linked *attTn7* sites: Example *Burkholderia mallei* ATCC 23344. *Nat Protoc* **1**: 162–169. doi: 10.1038/nprot.2006.25.

- 
- Choi, K.H., Gaynor, J.B., White, K.G., Lopez, C., Bosio, C.M., Karkhoff-Schweizer, R.A.R., & Schweizer, H.P. (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* **2**: 443–448. doi: 10.1038/nmeth765.
- Choi, K.H. & Schweizer, H.P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: Example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* **1**: 153–161. doi: 10.1038/nprot.2006.24.
- Christian, R.R., Hanson, R.B., & Newell, S.Y. (1982) Comparison of methods for measurement of bacterial growth rates in mixed batch cultures. *Appl Environ Microbiol* **43**: 1160–1165. doi: 10.1128/aem.43.5.1160-1165.1982.
- Chuanchuen, R., Karkhoff-Schweizer, R.A.R., & Schweizer, H.P. (2003) High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. *Am J Infect Control* **31**: 124–127. doi: 10.1067/mic.2003.11.
- Collier, D.N., Hager, P.W., & Phibbs Jr., P.V. (1996) Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Res Microbiol* **147**: 551–561. doi: 10.1016/0923-2508(96)84011-3.
- Commichau, F.M., Gibhardt, J., Halbedel, S., Gundlach, J., & Stülke, J. (2018) A delicate connection: c-di-AMP affects cell integrity by controlling osmolyte transport. *Trends Microbiol* **26**: 175–185. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.003.
- Cook, T.B., Rand, J.M., Nurani, W., Courtney, D.K., Liu, S.A., & Pflieger, B.F. (2018) Genetic tools for reliable gene expression and recombineering in *Pseudomonas putida*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **45**: 517–527. doi: 10.1007/s10295-017-2001-5.
- Coquelle, N., Talon, R., Juers, D.H., Girard, É., Kahn, R., & Madern, D. (2010) Gradual adaptive changes of a protein facing high salt concentrations. *J Mol Biol* **404**: 493–505. doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.055.
- Coscolín, C., Bargiela, R., Martínez-Martínez, M., Alonso, S., Bollinger, A., Thies, S., et al. (2019) Hydrocarbon-Degrading Microbes as Sources of New Biocatalysts. In *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes - Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, pp. 353–373.
- Crosa, J.H. & Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 223–249. doi: 10.1128/MMBR.66.2.223-249.2002.
- Czajka, J., Wang, Q., Wang, Y., & Tang, Y.J. (2017) Synthetic biology for manufacturing chemicals: Constraints drive the use of non-conventional microbial platforms. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 7427–7434. doi: 10.1007/s00253-017-8489-9.
- Czech, L., Hermann, L., Stöveken, N., Richter, A.A., Höppner, A., Smits, S.H.J., et al. (2018a) Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: Genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis. *Genes* **9**: 177. doi: 10.3390/genes9040177.
- Czech, L., Höppner, A., Kobus, S., Seubert, A., Riclea, R., Dickschat, J.S., et al. (2019) Illuminating the catalytic core of ectoine synthase through structural and biochemical analysis. *Sci Rep* **9**: 364. doi: 10.1038/s41598-018-36247-w.
- Czech, L., Poehl, S., Hub, P., Stöveken, N., & Bremer, E. (2018b) Tinkering with osmotically controlled transcription allows enhanced production and excretion of ectoine and hydroxyectoine from a microbial cell factory. *Appl Environ Microbiol* **84**: e01772-17. doi: 10.1128/AEM.01772-17.

- 
- Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* **97**: 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297.
- Dawson, R.J.P. & Locher, K.P. (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**: 180–185. doi: 10.1038/nature05155.
- Deng, Y., Sun, M., & Shaevitz, J.W. (2011) Direct measurement of cell wall stress stiffening and turgor pressure in live bacterial cells. *Phys Rev Lett* **107**: 158101. doi: 10.1103/PhysRevLett.107.158101.
- Denisov, I.G. & Sligar, S.G. (2016) Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol* **23**: 481–486. doi: 10.1038/nsmb.3195.
- Deole, R., Challacombe, J., Raiford, D.W., & Hoff, W.D. (2013) An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content. *J Biol Chem* **288**: 581–588. doi: 10.1074/jbc.M112.420505.
- d'Espaux, L., Ghosh, A., Runguphan, W., Wehrs, M., Xu, F., Konzock, O., et al. (2017) Engineering high-level production of fatty alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* from lignocellulosic feedstocks. *Metab Eng* **42**: 115–125. doi: 10.1016/j.ymben.2017.06.004.
- de Witt, J., Molitor, R., Gätgens, J., Ortmann de Percin Northumberland, C., Kruse, L., Polen, T., et al. (2023) Biodegradation of poly(ester-urethane) coatings by *Halopseudomonas formosensis*. *Microb Biotechnol* **17**: e14362. doi: 10.1111/1751-7915.14362.
- Dhamale, T., Saha, B.K., Papade, S.E., Singh, S., & Phale, P.S. (2022) A unique global metabolic trait of *Pseudomonas bharatika* CSV86<sup>T</sup>: Metabolism of aromatics over simple carbon sources and co-metabolism with organic acids. *Microbiology* **168**: 001206. doi: 10.1099/mic.0.001206.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., & 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. doi: 10.1074/jbc.M103081200.
- van Dijl, J.M. & Hecker, M. (2013) *Bacillus subtilis*: From soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact* **12**: 3. doi: 10.1186/1475-2859-12-3.
- Domröse, A., Hage-Hülsmann, J., Thies, S., Weihmann, R., Kruse, L., Otto, M., et al. (2019) *Pseudomonas putida* rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes. *Sci Rep* **9**: 7038. doi: 10.1038/s41598-019-43405-1.
- Domröse, A., Klein, A.S., Hage-Hülsmann, J., Thies, S., Svensson, V., Classen, T., et al. (2015) Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*. *Front Microbiol* **6**: 972. doi: 10.3389/fmicb.2015.00972.
- Du, B., Gu, Y., Chen, G., Wang, G., & Liu, L. (2020) Flagellar motility mediates early-stage biofilm formation in oligotrophic aquatic environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **194**: 110340. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110340.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H.W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V., & Luisi, B.F. (2018) Multidrug efflux pumps: Structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* **16**: 523–539. doi: 10.1038/s41579-018-0048-6.
- Dubey, S., Singh, D., & Misra, R.A. (1998) Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol). *Enzyme Microb Technol* **23**: 432–437. doi: 10.1016/S0141-0229(98)00063-5.

- Eberlein, C., Baumgarten, T., Starke, S., & Heipieper, H.J. (2018) Immediate response mechanisms of Gram-negative solvent-tolerant bacteria to cope with environmental stress: *Cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids and outer membrane vesicle secretion. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 2583–2593. doi: 10.1007/s00253-018-8832-9.
- Eggeling, L. & Sahm, H. (2001) The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J Biosci Bioeng* **92**: 201–213. doi: 10.1016/S1389-1723(01)80251-6.
- Eiberweiser, A., Nazet, A., Kruchinin, S.E., Fedotova, M. V., & Buchner, R. (2015) Hydration and ion binding of the osmolyte ectoine. *J Phys Chem B* **119**: 15203–15211. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b09276.
- Elhai, J. & Wolk, C.P. (1988) Conjugal Transfer of DNA to *Cyanobacteria*. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 747–754.
- Elmore, J.R., Furches, A., Wolff, G.N., Gorday, K., & Guss, A.M. (2017) Development of a high efficiency integration system and promoter library for rapid modification of *Pseudomonas putida* KT2440. *Metab Eng Commun* **5**: 1–8. doi: 10.1016/j.meteno.2017.04.001.
- Endy, D. (2005) Foundations for engineering biology. *Nature* **438**: 449–453. doi: 10.1038/nature04342.
- Englaender, J.A., Jones, J.A., Cress, B.F., Kuhlman, T.E., Linhardt, R.J., & Koffas, M.A.G. (2017) Effect of genomic integration location on heterologous protein expression and metabolic engineering in *E. coli*. *ACS Synth Biol* **6**: 710–720. doi: 10.1021/acssynbio.6b00350.
- Espinosa, M., Cohen, S., Couturier, M., del Solar, G., Diaz-Orejas, R., Giraldo, R., *et al.* (2001) Plasmid Replication and Copy Number Control. In *The Horizontal Gene Pool - Bacterial Plasmids and Gene Spread*. CRC Press, pp. 1–51.
- Fakhrudin, A.N.M. & Quilty, B. (2007) Measurement of the growth of a floc forming bacterium *Pseudomonas putida* CP1. *Biodegradation* **18**: 189–197. doi: 10.1007/s10532-006-9054-x.
- Fan, M., Tang, X., Yang, Z., Wang, J., Zhang, X., Yan, X., *et al.* (2022) Integration of the transcriptome and proteome provides insights into the mechanism calcium regulated of *Ulva prolifera* in response to high-temperature stress. *Aquaculture* **557**: 738344. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738344.
- Fatma, Z., Schultz, J.C., & Zhao, H. (2020) Recent advances in domesticating non-model microorganisms. *Biotechnol Prog* **36**: e3008. doi: 10.1002/btpr.3008.
- Faulkner, M., Hoeven, R., Kelly, P.P., Sun, Y., Park, H., Liu, L.-N., *et al.* (2023) Chemoautotrophic production of gaseous hydrocarbons, bioplastics and osmolytes by a novel *Halomonas* species. *Biotechnol Biofuels Bioprod* **16**: 152. doi: 10.1186/s13068-023-02404-1.
- Feng, X., Kazama, D., He, S., Nakayama, H., Hayashi, T., Tokunaga, T., *et al.* (2023) Enrichment of halotolerant hydrogen-oxidizing bacteria and production of high-value-added chemical hydroxyectoine using a hybrid biological–inorganic system. *Front Microbiol* **14**: 1254451. doi: 10.3389/fmicb.2023.1254451.
- Fernández, M., Duque, E., Pizarro-Tobías, P., Van Dillewijn, P., Wittich, R.M., & Ramos, J.L. (2009) Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2,4,6-trinitrotoluene. *Microb Biotechnol* **2**: 287–294. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00085.x.

- 
- Figueiredo, A.R.T., Özkaya, Ö., Kümmerli, R., & Kramer, J. (2022) Siderophores drive invasion dynamics in bacterial communities through their dual role as public good versus public bad. *Ecol Lett* **25**: 138–150. doi: 10.1111/ele.13912.
- Fillet, S., Gibert, J., Suárez, B., Lara, A., Ronchel, C., & Adrio, J.L. (2015) Fatty alcohols production by oleaginous yeast. *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**: 1463–1472. doi: 10.1007/s10295-015-1674-x.
- Fischer, R., Bleichrodt, F.S., & Gerischer, U.C. (2008) Aromatic degradative pathways in *Acinetobacter baylyi* underlie carbon catabolite repression. *Microbiology* **154**: 3095–3103. doi: 10.1099/mic.0.2008/016907-0.
- Fitzpatrick, A.W.P., Llabrés, S., Neuberger, A., Blaza, J.N., Bai, X.C., Okada, U., et al. (2017) Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat Microbiol* **2**: 17070. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.70.
- Fontbonne, A., Teme, B., Abric, E., Lecerf, G., Callejon, S., Moga, A., et al. (2023) Positive and ecobiological contribution in skin photoprotection of ectoine and mannitol combined *in vivo* with UV filters. *J Cosmet Dermatol* **00**: 1–8. doi: 10.1111/jocd.15893.
- Freed, E., Fenster, J., Smolinski, S.L., Walker, J., Henard, C.A., Gill, R., & Eckert, C.A. (2018) Building a genome engineering toolbox in nonmodel prokaryotic microbes. *Biotechnol Bioeng* **115**: 2120–2138. doi: 10.1002/bit.26727.
- Fricke, P.M., Link, T., Gätgens, J., Sonntag, C., Otto, M., Bott, M., & Polen, T. (2020) A tunable L-arabinose-inducible expression plasmid for the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**: 9267–9282. doi: 10.1007/s00253-020-10905-4.
- Fried, L., Lassak, J., & Jung, K. (2012) A comprehensive toolbox for the rapid construction of *lacZ* fusion reporters. *J Microbiol Methods* **91**: 537–543. doi: 10.1016/j.mimet.2012.09.023.
- Gago-Córdoba, C., Val-Calvo, J., Miguel-Arribas, A., Serrano, E., Singh, P.K., Abia, D., et al. (2019) Surface exclusion revisited: Function related to differential expression of the surface exclusion system of *Bacillus subtilis* plasmid pLS20. *Front Microbiol* **10**: 1502. doi: 10.3389/fmicb.2019.01502.
- Galinski, E.A., Pfeiffer, H.-P., & Trüper, 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. doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08903.x.
- Galinski, E.A. & Trüper, H.G. (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 95–108. doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00128.x.
- Galperin, M.Y., Wolf, Y.I., Makarova, K.S., Vera Alvarez, R., Landsman, D., & Koonin, E. V (2021) COG database update: Focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic Acids Res* **49**: 274–281. doi: 10.1093/nar/gkaa1018.
- Gandhi, A., Cui, Y., Zhou, M., & Shah, N.P. (2014) Effect of KCl substitution on bacterial viability of *Escherichia coli* (ATCC 25922) and selected probiotics. *J Dairy Sci* **97**: 5939–5951. doi: 10.3168/jds.2013-7681.
- Gao, S., Liao, Y., He, H., Yang, H., Yang, X., Xu, S., et al. (2023) Advance of tolerance engineering on microbes for industrial production. *Synth Syst Biotechnol* **8**: 697–707. doi: 10.1016/j.synbio.2023.10.004.

- García, V., Godoy, P., Daniels, C., Hurtado, A., Ramos, J.L., & Segura, A. (2010) Functional analysis of new transporters involved in stress tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ Microbiol Rep* **2**: 389–395. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00093.x.
- Gavrilescu, M. & Chisti, Y. (2005) Biotechnology - A sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv* **23**: 471–499. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.03.004.
- Gawin, A., Valla, S., & Brautaset, T. (2017) The XylS/P<sub>m</sub> regulator/promoter system and its use in fundamental studies of bacterial gene expression, recombinant protein production and metabolic engineering. *Microb Biotechnol* **10**: 702–718. doi: 10.1111/1751-7915.12701.
- Gießelmann, G., Dietrich, D., Jungmann, L., Kohlstedt, M., Jeon, E.J., Yim, S.S., *et al.* (2019) Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level ectoine production: Design, combinatorial assembly, and implementation of a transcriptionally balanced heterologous ectoine pathway. *Biotechnol J* **14**: 1800417. doi: 10.1002/biot.201800417.
- Gisler, S., Gonçalves, J.P., Akhtar, W., de Jong, J., Pindyurin, A. V., Wessels, L.F.A., & van Lohuizen, M. (2019) Multiplexed Cas9 targeting reveals genomic location effects and gRNA-based staggered breaks influencing mutation efficiency. *Nat Commun* **10**: 1598. doi: 10.1038/s41467-019-09551-w.
- Glebes, T.Y., Sandoval, N.R., Gillis, J.H., & Gill, R.T. (2015) Comparison of genome-wide selection strategies to identify furfural tolerance genes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **112**: 129–140. doi: 10.1002/bit.25325.
- Gomila, M., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2017) Draft genome sequence of the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri* VGXO14<sup>T</sup>. *Genome Announc* **5**: e00765-17. doi: 10.1128/genomeA.00765-17.
- Görke, B. & Stülke, J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**: 613–624. doi: 10.1038/nrmicro1932.
- Goto, S. & Enomoto, S. (1970) Nalidixic acid cetrimide agar: A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Microbiol* **14**: 65–72. doi: 10.1111/j.1348-0421.1970.tb00492.x.
- Greene, J.G., Porter, R.H.P., Eller, R. V., & Greenamyre, J. (1993) Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an “excitotoxic” lesion in rat striatum. *J Neurochem* **61**: 1151–1154. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03634.x.
- Gronenborn, B. (1976) Overproduction of Phage Lambda repressor under control of the *lac* promoter of *Escherichia coli*. *MGG* **148**: 243–250. doi: 10.1007/BF00332898.
- Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res* **39**: 270–277. doi: 10.1093/nar/gkr366.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018) Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev* **42**: 353–375. doi: 10.1093/femsre/fuy009.
- Gundlach, J., Herzberg, C., Kaefer, V., Gunka, K., Hoffmann, T., Weiß, M., *et al.* (2017) Control of potassium homeostasis is an essential function of the second messenger cyclic di-AMP in *Bacillus subtilis*. *Sci Signal* **10**: eaal3011. doi: 10.1126/scisignal.aal3011.

- 
- Gundlach, J., Krüger, L., Herzberg, C., Turdiev, A., Poehlein, A., Tascón, I., *et al.* (2019) Sustained sensing in potassium homeostasis: Cyclic di-AMP controls potassium uptake by KimA at the levels of expression and activity. *J Biol Chem* **294**: 9605–9614. doi: 10.1074/jbc.RA119.008774.
- Guttenplan, S.B. & Kearns, D.B. (2013) Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 849–871. doi: 10.1111/1574-6976.12018.
- Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M.J., & Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> Promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121–4130. doi: 10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995.
- Haernvall, K., Zitzenbacher, S., Wallig, K., Yamamoto, M., Schick, M.B., Ribitsch, D., & Guebitz, G.M. (2017) Hydrolysis of ionic phthalic acid based polyesters by wastewater microorganisms and their enzymes. *Environ Sci Technol* **51**: 4596–4605. doi: 10.1021/acs.est.7b00062.
- Hahn, M.B., Meyer, S., Schröter, M.A., Kunte, H.J., Solomun, T., & Sturm, H. (2017) DNA protection by ectoine from ionizing radiation: Molecular mechanisms. *PCCP* **19**: 25717–25722. doi: 10.1039/c7cp02860a.
- Hahn, M.B., Solomun, T., Wellhausen, R., Hermann, S., Seitz, H., Meyer, S., *et al.* (2015) Influence of the compatible solute ectoine on the local water structure: Implications for the binding of the protein G5P to DNA. *J Phys Chem B* **119**: 15212–15220. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b09506.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- Hanko, E.K.R., Minton, N.P., & Malys, N. (2017) Characterisation of a 3-hydroxypropionic acid-inducible system from *Pseudomonas putida* for orthogonal gene expression control in *Escherichia coli* and *Cupriavidus necator*. *Sci Rep* **7**: 1724. doi: 10.1038/s41598-017-01850-w.
- Hartl, F.U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**: 324–332. doi: 10.1038/nature10317.
- Hartmans, S., Smits, J.P., Van Der Werf, M.J., Volkering, F., & De Bont, J.A.M. (1989) Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene-degrading *Xanthobacter* strain 124X. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2850–2855. doi: 10.1128/aem.55.11.2850-2855.1989.
- He, X., Szewczyk, P., Karyakin, A., Evin, M., Hong, W.X., Zhang, Q., & Chang, G. (2010) Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature* **467**: 991–994. doi: 10.1038/nature09408.
- Heider, S.A.E. & Wendisch, V.F. (2015) Engineering microbial cell factories: Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* with a focus on non-natural products. *Biotechnol J* **10**: 1170–1184. doi: 10.1002/biot.201400590.
- Heipieper, H.J., Diefenbach, R., & Keweloh, H. (1992) Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1847–1852. doi: 10.1128/aem.58.6.1847-1852.1992.
- Heipieper, H.J., Fischer, J., & Meinhardt, F. (2018) *Cis*–*trans* Isomerase of Unsaturated Fatty Acids: An Immediate Bacterial Adaptive Mechanism to Cope with Emerging Membrane Perturbation Caused by Toxic Hydrocarbons. In *Cellular Ecophysiology of Microbe - Hydrocarbon and Lipid Interactions*. Springer, pp. 385–395.

- 
- Heipieper, H.J., Meinhardt, F., & Segura, A. (2003) The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: Biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol Lett* **229**: 1–7. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00792-4.
- Heipieper, H.J., Neumann, G., Cornelissen, S., & Meinhardt, F. (2007) Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 961–973. doi: 10.1007/s00253-006-0833-4.
- Held, C., Neuhaus, T., & Sadowski, G. (2010) Compatible solutes: Thermodynamic properties and biological impact of ectoines and prolines. *Biophys Chem* **152**: 28–39. doi: 10.1016/j.bpc.2010.07.003.
- Helmann, T.C., Ongsarte, C.L., Lam, J., Deutschbauer, A.M., & Lindow, S.E. (2019) Genome-Wide transposon screen of a *Pseudomonas syringae mexB* mutant reveals the substrates of efflux transporters. *mBio* **10**: e02614-19. doi: 10.1128/mBio.02614-19.
- Henderson, P.J.F., Maher, C., Elbourne, L.D.H., Eijkelkamp, B.A., Paulsen, I.T., & Hassan, K.A. (2021) Physiological Functions of Bacterial “multidrug” Efflux Pumps. *Chem Rev* **121**: 5417–5478. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01226.
- 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. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.511405.x.
- Henríquez, T., Baldow, T., Lo, Y.K., Weydert, D., Brachmann, A., & Jung, H. (2020a) Involvement of MexS and MexEF-OprN in resistance to toxic ion chelators in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microorganisms* **8**: 1782. doi: 10.3390/microorganisms8111782.
- Henríquez, T., Stein, N.V., & Jung, H. (2020b) Resistance to bipyridyls mediated by the TtgABC efflux system in *Pseudomonas putida* KT2440. *Front Microbiol* **11**: 1974. doi: 10.3389/fmicb.2020.01974.
- Hermann, L., Mais, C.N., Czech, L., Smits, S.H.J., Bange, G., & Bremer, E. (2020) The ups and downs of ectoine: Structural enzymology of a major microbial stress protectant and versatile nutrient. *Biol Chem* **401**: 1443–1468. doi: 10.1515/hsz-2020-0223.
- Hervé, V., Junier, T., Bindschedler, S., Verrecchia, E., & Junier, P. (2016) Diversity and ecology of oxalotrophic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* **32**: 28. doi: 10.1007/s11274-015-1982-3.
- Hewitt, C.J. & Nienow, A.W. (2007) The Scale-Up of Microbial Batch and Fed-Batch Fermentation Processes. In *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Inc., pp. 105–135.
- Hilgers, F., Hogenkamp, F., Klaus, O., Kruse, L., Loeschcke, A., Bier, C., *et al.* (2022) Light-mediated control of gene expression in the anoxygenic phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* using photocaged inducers. *Front Bioeng Biotechnol* **10**: 902059. doi: 10.3389/fbioe.2022.902059.
- Hilker, R., Stadermann, K.B., Schwengers, O., Anisiforov, E., Jaenicke, S., Weisshaar, B., *et al.* (2016) ReadXplorer 2 - Detailed read mapping analysis and visualization from one single source. *Bioinformatics* **32**: 3702–3708. doi: 10.1093/bioinformatics/btw541.
- Hillier, H.T., Altermark, B., & Leiros, I. (2020) The crystal structure of the tetrameric DABA-aminotransferase EctB, a rate-limiting enzyme in the ectoine biosynthesis pathway. *FEBS J* **287**: 4641–4658. doi: 10.1111/febs.15265.
-

- 
- Hoe, C.H., Raabe, C.A., Rozhdestvensky, T.S., & Tang, T.H. (2013) Bacterial sRNAs: Regulation in stress. *Int J Med Microbiol* **303**: 217–229. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.04.002.
- Hoffmann, T., Schütz, A., Brosius, M., Völker, A., Völker, U., & Bremer, E. (2002) High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**: 718–727. doi: 10.1128/JB.184.3.718-727.2002.
- Hogenkamp, F., Hilgers, F., Knapp, A., Klaus, O., Bier, C., Binder, D., *et al.* (2021) Effect of photocaged isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside solubility on the light responsiveness of LacI-controlled expression systems in different bacteria. *ChemBioChem* **22**: 539–547. doi: 10.1002/cbic.202000377.
- Höppner, A., Widderich, N., Lenders, M., Bremer, E., & Smits, S.H.J. (2014) Crystal structure of the ectoine hydroxylase, a snapshot of the active site. *J Biol Chem* **289**: 29570–29583. doi: 10.1074/jbc.M114.576769.
- Hosseini, R., Kuepper, J., Koebbing, S., Blank, L.M., Wierckx, N., & de Winde, J.H. (2017) Regulation of solvent tolerance in *Pseudomonas putida* S12 mediated by mobile elements. *Microb Biotechnol* **10**: 1558–1568. doi: 10.1111/1751-7915.12495.
- Howard, G.T. & Blake, R.C. (1998) Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester–polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase–protease enzyme. *Int Biodeterior Biodegrad* **42**: 213–220. doi: 10.1016/S0964-8305(98)00051-1.
- Howard, G.T., Crother, B., & Vicknair, J. (2001) Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeterior Biodegrad* **47**: 141–149. doi: 10.1016/S0964-8305(01)00042-7.
- Howard, G.T., Norton, W.N., & Burks, T. (2012) Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation* **23**: 561–573. doi: 10.1007/s10532-011-9533-6.
- Hu, J., Gu, Y., Lu, H., Raheem, M.A., Yu, F., Niu, X., *et al.* (2022) Identification of novel biofilm genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by Tn5 transposon mutant library. *World J Microbiol Biotechnol* **38**: 130. doi: 10.1007/s11274-022-03314-4.
- Hüsken, L.E., Beeftink, R., De Bont, J.A.M., & Wery, J. (2001) High-rate 3-methylcatechol production in *Pseudomonas putida* strains by means of a novel expression system. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**: 571–577. doi: 10.1007/s002530000566.
- Huynh, T.A.N., Choi, P.H., Sureka, K., Ledvina, H.E., Campillo, J., Tong, L., & Woodward, J.J. (2016) Cyclic di-AMP targets the cystathionine beta-synthase domain of the osmolyte transporter OpuC. *Mol Microbiol* **102**: 233–243. doi: 10.1111/mmi.13456.
- Hwang, C.Y., Zhang, G.I., Kang, S.-H., Kim, H.J., & Cho, B.C. (2009) *Pseudomonas pelagia* sp. nov., isolated from a culture of the antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 3019–3024. doi: 10.1099/ijms.0.008102-0.
- Ibarra-Chávez, R., Hansen, M.F., Pinilla-Redondo, R., Seed, K.D., & Trivedi, U. (2021) Phage satellites and their emerging applications in biotechnology. *FEMS Microbiol Rev* **45**: fuab031. doi: 10.1093/femsre/fuab031.
- Idalia, V.-M.N. & Bernardo, F. (2017) *Escherichia coli* as a Model Organism and its Application in Biotechnology. In *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. InTech, pp. 253–274.

- Inbar, L. & Lapidot, A. (1988) The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-labeled L-glutamate and <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **263**: 16014–16022. doi: 10.1016/S0021-9258(18)37550-1.
- Ippen-Ihler, K., Achtman, M., & Willetts, N. (1972) Deletion map of the *Escherichia coli* K-12 sex factor F: The order of eleven transfer cistrons. *J Bacteriol* **110**: 857–863. doi: 10.1128/jb.110.3.857-863.1972.
- Iscla, I. & Blount, P. (2012) Sensing and responding to membrane tension: The bacterial MscL Channel as a model system. *Biophys J* **103**: 169–174. doi: 10.1016/j.bpj.2012.06.021.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**: 318–356. doi: 10.1016/S0022-2836(61)80072-7.
- Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., & Venkataraman, G. (2018) CRISPR for crop improvement: An update review. *Front Plant Sci* **9**: 985. doi: 10.3389/fpls.2018.00985.
- Jahn, M., Vorpahl, C., Hübschmann, T., Harms, H., & Müller, S. (2016) Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and droplet digital PCR. *Microb Cell Fact* **15**: 211. doi: 10.1186/s12934-016-0610-8.
- Jain, A. & Srivastava, P. (2013) Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **348**: 87–96. doi: 10.1111/1574-6968.12241.
- Jang, G. Il, Lee, I., Ha, T.T., Yoon, S.J., Hwang, Y.J., Yi, H., et al. (2020) *Pseudomonas neustonica* sp. nov., isolated from the sea surface microlayer of the Ross Sea (Antarctica). *Int J Syst Evol Microbiol* **70**: 3832–3838. doi: 10.1099/ijsem.0.004240.
- Jankowicz-Cieslak, J. & Till, B.J. (2016) Chemical mutagenesis of seed and vegetatively propagated plants using EMS. *Curr Protoc Plant Biol* **1**: 617–635. doi: 10.1002/cppb.20040.
- Janota-Bassalik, L. & Bohdanowicz-Strucinska, B. (1974) Growth of a wild strain and of a pimelic acid-utilizing mutant of *Pseudomonas azelaica* on aliphatic dicarboxylic acids. *J Gen Microbiol* **84**: 79–84. doi: 10.1099/00221287-84-1-79.
- Jansons, I., Touchie, G., Sharp, R., Almquist, K., Farinha, M.A., Lam, J.S., & Kropinski, A.M. (1994) Deletion and transposon mutagenesis and sequence analysis of the pRO1600 *oriR* region found in the broad-host-range plasmids of the pQF series. *Plasmid* **31**: 265–274. doi: 10.1006/plas.1994.1028.
- Jayakody, L.N., Johnson, C.W., Whitham, J.M., Giannone, R.J., Black, B.A., Cleveland, N.S., et al. (2018) Thermochemical wastewater valorization: Via enhanced microbial toxicity tolerance. *Energy Environ Sci* **11**: 1625–1638. doi: 10.1039/c8ee00460a.
- Jiang, F. & Doudna, J.A. (2017) CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys* **46**: 505–529. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- Johnson, C.M. & Grossman, A.D. (2015) Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What they do and how they work. *Annu Rev Genet* **49**: 577–601. doi: 10.1146/annurev-genet-112414-055018.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J.P. (2014) Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* **12**: 181–196. doi: 10.1038/nrmicro3199.

- 
- Jones, R.M., Britt-Compton, B., & Williams, P.A. (2003) The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Ralstonia* sp. strain U2 are an operon that is regulated by NagR, a LysR-type transcriptional regulator. *J Bacteriol* **185**: 5847–53. doi: 10.1128/JB.185.19.5847-5853.2003.
- Jörg Kunte, H., Galinski, E.A., & Trüper, H.G. (1993) A modified FMOC-method for the detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines). *J Microbiol Methods* **17**: 129–136. doi: 10.1016/0167-7012(93)90006-4.
- Jorge, C.D., Borges, N., Bagyan, I., Bilstein, A., & Santos, H. (2016) Potential applications of stress solutes from extremophiles in protein folding diseases and healthcare. *Extremophiles* **20**: 251–259. doi: 10.1007/s00792-016-0828-8.
- Jungmann, L., Hoffmann, S.L., Lang, C., De Agazio, R., Becker, J., Kohlstedt, M., & Wittmann, C. (2022) High-efficiency production of 5-hydroxyectoine using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* **21**: 274. doi: 10.1186/s12934-022-02003-z.
- Kanehisa, M. & Sato, Y. (2020) KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci* **29**: 28–35. doi: 10.1002/pro.3711.
- Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol* **428**: 726–731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006.
- Kapardar, R.K., Ranjan, R., Grover, A., Puri, M., & Sharma, R. (2010) Identification and characterization of genes conferring salt tolerance to *Escherichia coli* from pond water metagenome. *Bioresour Technol* **101**: 3917–3924. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.017.
- Kawai, Y. & Yabuuchi, E. (1975) *Pseudomonas pertucinogena* sp.nov., an organism previously misidentified as *Bordetella pertussis*. *Int J Syst Bacteriol* **25**: 317–323. doi: 10.1099/00207713-25-4-317.
- Kempf, B. & Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**: 319–330. doi: 10.1007/s002030050649.
- Kets, E.P., Galinski, E.A., de Wit, M., de Bont, J.A., & Heipieper, H.J. (1996) Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J Bacteriol* **178**: 6665–6670. doi: 10.1128/jb.178.23.6665-6670.1996.
- Kieboom, J., Dennis, J.J., de Bont, J.A.M., & Zylstra, G.J. (1998) Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J Biol Chem* **273**: 85–91. doi: 10.1074/jbc.273.1.85.
- Kientz, B., Vukusic, P., Luke, S., & Rosenfeld, E. (2012) Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors. *Appl Environ Microbiol* **78**: 2092–2099. doi: 10.1128/AEM.07339-11.
- Kim, E.-H., Nies, D.H., McEvoy, M.M., & Rensing, C. (2011) Switch or funnel: How RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol* **193**: 2381–2387. doi: 10.1128/JB.01323-10.
- Kim, K.-H., Roh, S.W., Chang, H.-W., Nam, Y.-D., Yoon, J.-H., Jeon, C.O., et al. (2009) *Pseudomonas sabulinigri* sp. nov., isolated from black beach sand. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 38–41. doi: 10.1099/ijs.0.65866-0.

- 
- Kindziński, V., Raschke, S., Knabe, N., Siedler, F., Scheffer, B., Pflüger-Grau, K., *et al.* (2017) Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: A case study for integrative systems biology. *PLoS One* **12**: e0168818. doi: 10.1371/journal.pone.0168818.
- Klauck, E., Typas, A., & Hengge, R. (2007) The  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Sci Prog* **90**: 103–127. doi: 10.3184/003685007X215922.
- Köbbing, S., Blank, L.M., & Wierckx, N. (2020) Characterization of context-dependent effects on synthetic promoters. *Front Bioeng Biotechnol* **8**: 551. doi: 10.3389/fbioe.2020.00551.
- Koh, H.Y., Jung, W., Do, H., Lee, S.G., Lee, J.H., & Kim, H.J. (2013) Draft genome sequence of *Pseudomonas pelagia* CL-AP6, a psychrotolerant bacterium isolated from culture of antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*. *Genome Announc* **1**: e00699-13. doi: 10.1128/genomeA.00699-13.
- Kohler, C., Lourenço, R.F., Bernhardt, J., Albrecht, D., Schüller, J., Hecker, M., & Gomes, S.L. (2015) A comprehensive genomic, transcriptomic and proteomic analysis of a hyperosmotic stress sensitive  $\alpha$ -proteobacterium. *BMC Microbiol* **15**: 71. doi: 10.1186/s12866-015-0404-x.
- Kohlstedt, M. & Wittmann, C. (2019) GC-MS-based  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis resolves the parallel and cyclic glucose metabolism of *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Metab Eng* **54**: 35–53. doi: 10.1016/j.ymben.2019.01.008.
- Kokoeva, M. V. (2002) A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids. *EMBO J* **21**: 2312–2322. doi: 10.1093/emboj/21.10.2312.
- Kolodrubetz, D. & Schleif, R. (1981) L-arabinose transport systems in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **148**: 472–479. doi: 10.1128/jb.148.2.472-479.1981.
- Kowalzik, F., Schreiner, D., Jensen, C., Teschner, D., Gehring, S., & Zepp, F. (2021) mRNA-Based vaccines. *Vaccines* **9**: 390. doi: 10.3390/vaccines9040390.
- Kozłowski, L.P. (2022) Proteome-*pl* 2.0: proteome isoelectric point database update. *Nucleic Acids Res* **50**: 1535–1540. doi: 10.1093/nar/gkab944.
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020) Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol* **18**: 152–163. doi: 10.1038/s41579-019-0284-4.
- Kruse, L., Loeschcke, A., de Witt, J., Wierckx, N., Jaeger, K.-E., & Thies, S. (2023) *Halopseudomonas* species: Cultivation and molecular genetic tools. *Microb Biotechnol* **17**: e14369. doi: 10.1111/1751-7915.14369.
- Kubicki, S. (2020) *Pseudomonas putida* als Zellfabrik zur Produktion von Rhamnolipiden. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Inaugural-Dissertation.
- Kuepper, J., Otto, M., Dickler, J., Behnken, S., Magnus, J., Jäger, G., *et al.* (2020) Adaptive laboratory evolution of *Pseudomonas putida* and *Corynebacterium glutamicum* to enhance anthranilate tolerance. *Microbiology* **166**: 1025–1037. doi: 10.1099/mic.0.000982.
- Kües, U. & Stahl, U. (1989) Replication of plasmids in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 491–516. doi: 10.1128/mr.53.4.491-516.1989.
-

- 
- Kugel, Y.M. (2021) Bioinformatische Identifizierung putativer Effluxproteine der *Pseudomonas pertucinogena* Familie. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Bachelorarbeit.
- Kuhlmann, A.U. & Bremer, E. (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **68**: 772–783. doi: 10.1128/AEM.68.2.772-783.2002.
- Kuhlmann, A.U., Bursy, J., Gimpel, S., Hoffmann, T., & Bremer, E. (2008) Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenicus* is triggered by high salinity and low growth temperature. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4560–4563. doi: 10.1128/AEM.00492-08.
- Kumar, M., Prasanna, R., Lone, S., Padaria, J.C., & Saxena, A.K. (2014) Cloning and expression of *dnaK* gene from *Bacillus pumilus* of hot water spring origin. *Appl Transl Genom* **3**: 14–20. doi: 10.1016/j.atg.2013.10.001.
- Kurz, M. (2008) Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. *Saline Syst* **4**: 6. doi: 10.1186/1746-1448-4-6.
- Kurz, M., Burch, A.Y., Seip, B., Lindow, S.E., & Gross, H. (2010) Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5452–5462. doi: 10.1128/AEM.00686-10.
- Kusumawardhani, H., Furtwängler, B., Blommestijn, M., Kaltentytè, A., van der Poel, J., Kolk, J., et al. (2021) Adaptive laboratory evolution restores solvent tolerance in plasmid-cured *Pseudomonas putida* S12: A molecular analysis. *Appl Environ Microbiol* **87**: e004121. doi: 10.1128/AEM.00041-21.
- Kvitko, B.H., Bruckbauer, S., Prucha, J., McMillan, I., Breland, E.J., Lehman, S., et al. (2012) A simple method for construction of *pir*<sup>+</sup> enterobacterial hosts for maintenance of R6K replicon plasmids. *BMC Res Notes* **5**: 157. doi: 10.1186/1756-0500-5-157.
- Lai, Q. & Shao, Z. (2008) *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1911–1915. doi: 10.1099/ij.s.0.65459-0.
- Lambert, T.J. (2019) FPbase: A community-editable fluorescent protein database. *Nat Methods* **16**: 277–278. doi: 10.1038/s41592-019-0352-8.
- Lang, E., Griese, B., Spröer, C., Schumann, P., Steffen, M., & Verborg, S. (2007) Characterization of “*Pseudomonas azelaica*” DSM 9128, leading to emended descriptions of *Pseudomonas citronellolis* Seibert 1960 (Approved Lists 1980) and *Pseudomonas nitroreducens* Iizuka and Komagata 1964 (Approved Lists 1980), including *Pseudomonas multiresinivorans* as its later heterotypic synonym. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 878–882. doi: 10.1099/ij.s.0.64849-0.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923.
- Lederberg, J. & Tatum, E.L. (1946) Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* **158**: 558–558. doi: 10.1038/158558a0.
- Lee, T.S., Krupa, R.A., Zhang, F., Hajimorad, M., Holtz, W.J., Prasad, N., et al. (2011) BglBrick vectors and datasheets: A synthetic biology platform for gene expression. *J Biol Eng* **5**: 12. doi: 10.1186/1754-1611-5-12.

- León, M.J., Hoffmann, T., Sánchez-Porro, C., Heider, J., Ventosa, A., & Bremer, E. (2018) Compatible solute synthesis and import by the moderate halophile *Spiribacter salinus*: Physiology and genomics. *Front Microbiol* **9**: 108. doi: 10.3389/fmicb.2018.00108.
- Levina, N., Töttemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A., & 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. doi: 10.1093/emboj/18.7.1730.
- Lewis, M. (2005) The *lac* repressor. *C R Biol* **328**: 521–548. doi: 10.1016/j.crv.2005.04.004.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., et al. (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Li, J., Wang, L., Xiang, F., Ding, W., Xi, L., Wang, M., et al. (2020) *Pseudomonas phragmitis* sp. nov., isolated from petroleum polluted river sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **70**: 364–372. doi: 10.1099/ijsem.0.003763.
- Li, L., Li, N., Wang, X., Gao, S., Zhang, J., Zhou, J., et al. (2023) Metabolic engineering combined with enzyme engineering for overproduction of ectoine in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol* **390**: 129862. doi: 10.1016/j.biortech.2023.129862.
- Li, W.J., Jayakody, L.N., Franden, M.A., Wehrmann, M., Daun, T., Hauer, B., et al. (2019) Laboratory evolution reveals the metabolic and regulatory basis of ethylene glycol metabolism by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **21**: 3669–3682. doi: 10.1111/1462-2920.14703.
- Li, X.Z., Nikaido, H., & Poole, K. (1995) Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1948–1953. doi: 10.1128/AAC.39.9.1948.
- Li, X.Z., Poole, K., & Nikaido, H. (2003) Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 27–33. doi: 10.1128/AAC.47.1.27-33.2003.
- Lilly, J. & Camps, M. (2015) Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiol Spectr* **3**: PLAS0029-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.plas-0029-2014.
- Lin, S.-Y., Hameed, A., Liu, Y.-C., Hsu, Y.-H., Lai, W.-A., & Young, C.-C. (2013) *Pseudomonas formosensis* sp. nov., a gamma-proteobacteria isolated from food-waste compost in Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 3168–3174. doi: 10.1099/ijms.0.049452-0.
- Liu, M., Liu, H., Shi, M., Jiang, M., Li, L., & Zheng, Y. (2021) Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. *Microb Cell Fact* **20**: 76. doi: 10.1186/s12934-021-01567-6.
- Liu, M., Luo, X., Zhang, L., Dai, J., Wang, Y., Tang, Y., et al. (2009) *Pseudomonas xinjiangensis* sp. nov., a moderately thermotolerant bacterium isolated from desert sand. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1286–1289. doi: 10.1099/ijms.0.001420-0.
- Liu, X., Wang, Z., Xiao, J., Zhou, X., & Xu, Y. (2022) Osmotic stress tolerance and transcriptome analysis of *Gluconobacter oxydans* to extra-high titers of glucose. *Front Microbiol* **13**: 977024. doi: 10.3389/fmicb.2022.977024.

- 
- Lloyd, G.S. & Thomas, C.M. (2023) Microbial Primer: The logic of bacterial plasmids. *Microbiology* **169**: 001336. doi: 10.1099/mic.0.001336.
- Lo, C.-C., Bonner, C.A., Xie, G., D'Souza, M., & Jensen, R.A. (2009) Cohesion group approach for evolutionary analysis of aspartokinase, an enzyme that Feeds a branched network of many biochemical pathways. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 594–651. doi: 10.1128/MMBR.00024-09.
- Loeschcke, A., Markert, A., Wilhelm, S., Wirtz, A., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., & Drepper, T. (2013) TREX: A universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. *ACS Synth Biol* **2**: 22–33. doi: 10.1021/sb3000657.
- Loeschcke, A. & Thies, S. (2020) Engineering of natural product biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Curr Opin Biotechnol* **65**: 213–224. doi: 10.1016/j.copbio.2020.03.007.
- Loeschcke, A. & Thies, S. (2015) *Pseudomonas putida* - A versatile host for the production of natural products. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 6197–6214. doi: 10.1007/s00253-015-6745-4.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B., & Timmis, K.N. (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using  $lacI^q/P_{trp-lac}$  plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17–24. doi: 10.1016/0378-1119(93)90533-9.
- Louis, P. & 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. doi: 10.1099/00221287-143-4-1141.
- Love, M.I., Huber, W., & Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Ma, C., Mu, Q., Xue, Yubin, Xue, Yanfen, Yu, B., & Ma, Y. (2021) One major facilitator superfamily transporter is responsible for propionic acid tolerance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Biotechnol* **14**: 386–391. doi: 10.1111/1751-7915.13597.
- Ma, Y., Wang, Q., Xu, W., Liu, X., Gao, X., & Zhang, Y. (2017) Stationary phase-dependent accumulation of ectoine is an efficient adaptation strategy in *Vibrio anguillarum* against cold stress. *Microbiol Res* **205**: 8–18. doi: 10.1016/j.micres.2017.08.005.
- Manzanera, M., García de Castro, A., Tøndervik, A., Rayner-Brandes, M., Strøm, A.R., & Tunnacliffe, A. (2002) Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4328–4333. doi: 10.1128/AEM.68.9.4328-4333.2002.
- Manzanera, M., Vilchez, S., & Tunnacliffe, A. (2004) High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol Lett* **233**: 347–352. doi: 10.1016/j.femsle.2004.03.005.
- Marles-Wright, J. & Lewis, R.J. (2007) Stress responses of bacteria. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 755–760. doi: 10.1016/j.sbi.2007.08.004.
- Marschall, L., Sagmeister, P., & Herwig, C. (2017) Tunable recombinant protein expression in *E. coli*: Promoter systems and genetic constraints. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 501–512. doi: 10.1007/s00253-016-8045-z.
- Martínez-García, E., Aparicio, T., de Lorenzo, V., & Nikel, P.I. (2014) New transposon tools tailored for metabolic engineering of Gram-negative microbial cell factories. *Front Bioeng Biotechnol* **2**: 46. doi: 10.3389/fbioe.2014.00046.

- Martínez-García, E. & Lorenzo, V. De (2011) Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. **13**: 2702–2716. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x.
- Martin-Pascual, M., Batiánis, C., Bruinsma, L., Asin-García, E., García-Morales, L., Weusthuis, R.A., et al. (2021) A navigation guide of synthetic biology tools for *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Adv* **49**: 107732. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107732.
- Maslowska, K.H., Makiela-Dzbenka, K., & Fijalkowska, I.J. (2019) The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ Mol Mutagen* **60**: 368–384. doi: 10.1002/em.22267.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000) Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2242–2246. doi: 10.1128/AAC.44.9.2242-2246.2000.
- McCarty, N.S. & Ledesma-Amaro, R. (2019) Synthetic biology tools to engineer microbial communities for biotechnology. *Trends Biotechnol* **37**: 181–197. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.11.002.
- Mendonça, C.M., Yoshitake, S., Wei, H., Werner, A., Sasnow, S.S., Thannhauser, T.W., & Aristilde, L. (2020) Hierarchical routing in carbon metabolism favors iron-scavenging strategy in iron-deficient soil *Pseudomonas* species. *PNAS* **117**: 32358–32369. doi: 10.1073/pnas.2016380117.
- Mendoza, B.J. & Trinh, C.T. (2018) Enhanced guide-RNA design and targeting analysis for precise CRISPR genome editing of single and consortia of industrially relevant and non-model organisms. *Bioinformatics* **34**: 16–23. doi: 10.1093/bioinformatics/btx564.
- Meyer, S., Schröter, M.A., Hahn, M.B., Solomun, T., Sturm, H., & Kunte, H.J. (2017) Ectoine can enhance structural changes in DNA *in vitro*. *Sci Rep* **7**: 7170. doi: 10.1038/s41598-017-07441-z.
- Miao, R., Jahn, M., Shabestary, K., Peltier, G., & Hudson, E.P. (2023) CRISPR interference screens reveal growth–robustness tradeoffs in *Synechocystis* sp. PCC 6803 across growth conditions. *Plant Cell* **35**: 3937–3956. doi: 10.1093/plcell/koad208.
- Miller, M.B. & Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165–199. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.
- Mitchell, R.J. & Gu, M.B. (2005) nagR-nagAa::lux fusion strain for biosensing 183 construction and evaluation of nagR-nagAa::lux fusion strains in Bbosensing for salicylic acid derivatives.
- Mitra, R., McKenzie, G.J., Yi, L., Lee, C.A., & Craig, N.L. (2010) Characterization of the TnsD-attTn7 complex that promotes site-specific insertion of Tn7. *Mob DNA* **1**: 18. doi: 10.1186/1759-8753-1-18.
- Mizuno, K., Maree, M., Nagamura, T., Koga, A., Hirayama, S., Furukawa, S., et al. (2022) Novel multicellular prokaryote discovered next to an underground stream. *Elife* **11**: e71920. doi: 10.7554/eLife.71920.
- Mohamed, E.T., Werner, A.Z., Salvachúa, D., Singer, C.A., Szostkiewicz, K., Rafael Jiménez-Díaz, M., et al. (2020) Adaptive laboratory evolution of *Pseudomonas putida* KT2440 improves *p*-coumaric and ferulic acid catabolism and tolerance. *Metab Eng Commun* **11**: e00143. doi: 10.1016/j.mec.2020.e00143.

- 
- Mohanapriya, S., Muthukumar, & Vairam, S. (2016) Synthesis, characterization, thermal behavior and antimicrobial activity of 3-methyl benzoate complexes of transition metal with hydrazine. *Bull Chem Soc Ethiop* **30**: 241–252. doi: 10.4314/bcse.v30i2.8.
- Molitor, R., Bollinger, A., Kubicki, S., Loeschcke, A., Jaeger, K.-E., & Thies, S. (2020) Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species. *Microb Biotechnol* **13**: 274–284. doi: 10.1111/1751-7915.13418.
- Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (1998) NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1778–1782. doi: 10.1128/AAC.42.7.1778.
- Morrison, E.A., Dekoster, G.T., Dutta, S., Vafabakhsh, R., Clarkson, M.W., Bahl, A., et al. (2012) Antiparallel EmrE exports drugs by exchanging between asymmetric structures. *Nature* **481**: 45–52. doi: 10.1038/nature10703.
- Mousa, J.J., Yang, Y., Tomkovich, S., Shima, A., Newsome, R.C., Tripathi, P., et al. (2016) MATE transport of the *E. coli*-derived genotoxin colibactin. *Nat Microbiol* **1**: 15009. doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.9.
- Mozaheb, N. & Mingeot-Leclercq, M.-P. (2020) Membrane vesicle production as a bacterial defense against stress. *Front Microbiol* **11**: 600221. doi: 10.3389/fmicb.2020.600221.
- Mulet, A.P., Ripoll, M., & Betancor, L. (2023) CRISPR tools in bacterial whole-cell biocatalysis. *ACS Sustain Chem Eng* **11**: 15765–15788. doi: 10.1021/acssuschemeng.3c05735.
- Mulet, M., Sánchez, D., Rodríguez, A.C., Nogales, B., Bosch, R., Busquets, A., et al. (2018) *Pseudomonas gallaeciensis* sp. nov., isolated from crude-oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Syst Appl Microbiol* **41**: 340–347. doi: 10.1016/j.syapm.2018.03.008.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987) Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. In *Methods in Enzymology - Recombinant DNA Part F*. Elsevier Inc., pp. 335–350.
- Mustakhimov, I.I., Reshetnikov, A.S., But, S.Y., Rozova, O.N., Khmelenina, V.N., & Trotsenko, Y.A. (2019) Engineering of hydroxyectoine production based on the *Methylomicrobium alcaliphilum*. *Appl Biochem Microbiol* **55**: 626–630. doi: 10.1134/S0003683819130015.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., et al. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799–808. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x.
- Nepal, S. & Kumar, P. (2020) Growth, cell division, and gene expression of *Escherichia coli* at elevated concentrations of magnesium sulfate: Implications for habitability of Europa and Mars. *Microorganisms* **8**: 637. doi: 10.3390/microorganisms8050637.
- Nie, L., Grell, E., Malviya, V.N., Xie, H., Wang, J., & Michel, H. (2016) Identification of the high-affinity substrate-binding site of the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family transporter from *Pseudomonas stutzeri*. *J Biol Chem* **291**: 15503–15514. doi: 10.1074/jbc.M116.728618.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593–656. doi: 10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003.

- Nikel, P.I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U., & De Lorenzo, V. (2015) *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and pentose phosphate pathways. *J Biol Chem* **290**: 25920–25932. doi: 10.1074/jbc.M115.687749.
- Nizer, W.S. da C., Inkovskiy, V., & Overhage, J. (2020) Surviving reactive chlorine stress: Responses of Gram-negative bacteria to hypochlorous acid. *Microorganisms* **8**: 1220. doi: 10.3390/microorganisms8081220.
- Nogales, J., García, J.L., & Díaz, E. (2017) Degradation of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*: A Systems Biology View. In *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids - Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, pp. 1–49.
- Norris, M.H., Kang, Y., Wilcox, B., & Hoang, T.T. (2010) Stable, site-specific fluorescent tagging constructs optimized for *Burkholderia* species. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7635–7640. doi: 10.1128/AEM.01188-10.
- Okafor, N. (2007) Scope of Biotechnology and Industrial Microbiology. In *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Science Publisher, pp. 3–13.
- Oladosu, Y., Rafii, M.Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H.A., et al. (2016) Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: A review. *Biotechnol Biotechnol Equip* **30**: 1–16. doi: 10.1080/13102818.2015.1087333.
- Oliveira, E.F., Cerqueira, N.M.F.S.A., Fernandes, P.A., & Ramos, M.J. (2011) Mechanism of formation of the internal aldimine in pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *JACS* **133**: 15496–15505. doi: 10.1021/ja204229m.
- Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., et al. (1999) Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **181**: 91–99. doi: 10.1128/JB.181.1.91-99.1999.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334–348. doi: 10.1128/MMBR.63.2.334-348.1999.
- Oren, A. (2011) Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol* **13**: 1908–1923. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02365.x.
- Paget, M. (2015) Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: Structure, function and distribution. *Biomolecules* **5**: 1245–1265. doi: 10.3390/biom5031245.
- Paliy, O. & Gunasekera, T.S. (2007) Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 1169–1172. doi: 10.1007/s00253-006-0554-8.
- Pang, Y., Zhang, Y., Chen, Mengru, Lu, W., Chen, Ming, Yan, Y., et al. (2021) *Pseudomonas nanhaiensis* sp. nov., a lipase-producing bacterium isolated from deep-sea sediment of the South China Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek* **114**: 1791–1804. doi: 10.1007/s10482-021-01639-y.
- Parke, D., Garcia, M.A., & Ornston, L.N. (2001) Cloning and genetic characterization of *dca* genes required for  $\beta$ -oxidation of straight-chain dicarboxylic acids in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4817–4827. doi: 10.1128/AEM.67.10.4817-4827.2001.

- 
- Pascual, J., Lucena, T., Ruvira, M.A., Giordano, A., Gambacorta, A., Garay, E., *et al.* (2012) *Pseudomonas litoralis* sp. nov., isolated from mediterranean seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 438–444. doi: 10.1099/ijs.0.029447-0.
- Patel, R.N. (2018) Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorg Med Chem* **26**: 1252–1274. doi: 10.1016/j.bmc.2017.05.023.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., & Velázquez, E. (2018) The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect, Genet Evol* **57**: 106–116. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.026.
- Penfold, R.J. & Pemberton, J.M. (1992) An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene* **118**: 145–146. doi: 10.1016/0378-1119(92)90263-O.
- Perez, C., Faust, B., Mehdipour, A.R., Francesconi, K.A., Forrest, L.R., & Ziegler, C. (2014) Substrate-bound outward-open state of the betaine transporter BetP provides insights into Na<sup>+</sup> coupling. *Nat Commun* **5**: 4231. doi: 10.1038/ncomms5231.
- Peters, J.E. & Craig, N.L. (2001) Tn7: Smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 806–814. doi: 10.1038/35099006.
- Peters, P., Galinski, E.A., & Trüper, H.G. (1990) The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 157–162. doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb03815.x.
- Pham, D.N., Nguyen, A.D., Mai, D.H.A., & Lee, E.Y. (2023) Development of a novel methanotrophic platform to produce ectoine from methane and lignocellulose-derived sugars. *Chem Eng J* **463**: 142361. doi: 10.1016/j.cej.2023.142361.
- Pinto, A., Contente, M.L., & Tamborini, L. (2020) Advances on whole-cell biocatalysis in flow. *Curr Opin Green Sustain Chem* **25**: 100343. doi: 10.1016/j.cogsc.2020.04.004.
- Polisky, B., Bishop, R.J., & Gelfand, D.H. (1976) A plasmid cloning vehicle allowing regulated expression of eukaryotic DNA in bacteria. *PNAS* **73**: 3900–3904. doi: 10.1073/pnas.73.11.3900.
- Ponomarova, O. & Patil, K.R. (2015) Metabolic interactions in microbial communities: Untangling the Gordian knot. *Curr Opin Microbiol* **27**: 37–44. doi: 10.1016/j.mib.2015.06.014.
- Presley, G.N., Werner, A.Z., Katahira, R., Garcia, D.C., Haugen, S.J., Ramirez, K.J., *et al.* (2021) Pathway discovery and engineering for cleavage of a  $\beta$ -1 lignin-derived biaryl compound. *Metab Eng* **65**: 1–10. doi: 10.1016/j.ymben.2021.02.003.
- Price, C.T.D., Lee, I.R., & Gustafson, J.E. (2000) The effects of salicylate on bacteria. *Int J Biochem Cell Biol* **32**: 1029–1043. doi: 10.1016/S1357-2725(00)00042-X.
- Prior, J.E., Lynch, M.D., & Gill, R.T. (2010) Broad-host-range vectors for protein expression across Gram negative hosts. *Biotechnol Bioeng* **106**: 326–332. doi: 10.1002/bit.22695.
- Puja, H., Comment, G., Chassagne, S., Plésiat, P., & Jeannot, K. (2020) Coordinate overexpression of two RND efflux systems, ParXY and TtgABC, is responsible for multidrug resistance in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **22**: 5222–5231. doi: 10.1111/1462-2920.15200.
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., & Lim, W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**: 1173–1183. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022.

- 
- Rakowski, S.A. & Filutowicz, M. (2013) Plasmid R6K replication control. *Plasmid* **69**: 231–242. doi: 10.1016/j.plasmid.2013.02.003.
- Ramos, J.L., Cuenca, M.S., Molina-Santiago, C., Segura, A., Duque, E., Gómez-García, M.R., *et al.* (2015) Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 555–566. doi: 10.1093/femsre/fuv006.
- Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P., & Segura, A. (1998) Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **180**: 3323–3329. doi: 10.1128/JB.180.13.3323-3329.1998.
- Ramos, J.L., Stolz, A., Reineke, W., & Timmis, K.N. (1986) Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xyIS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *PNAS* **83**: 8467–8471. doi: 10.1073/pnas.83.22.8467.
- Rampelotto, P.H. (2013) Extremophiles and extreme environments. *Life* **3**: 482–485. doi: 10.3390/life3030482.
- Rasouli, M. (2016) Basic concepts and practical equations on osmolality: Biochemical approach. *Clin Biochem* **49**: 936–941. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.06.001.
- Reetz, M.T. (2013) Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present, and future. *JACS* **135**: 12480–12496. doi: 10.1021/ja405051f.
- Remmele, C.W., Xian, Y., Albrecht, M., Faulstich, M., Fraunholz, M., Heinrichs, E., *et al.* (2014) Transcriptional landscape and essential genes of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nucleic Acids Res* **42**: 10579–10595. doi: 10.1093/nar/gku762.
- Reva, O.N., Weinel, C., Weinel, M., Böhm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J.D., & Tümmler, B. (2006) Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* **188**: 4079–4092. doi: 10.1128/JB.00101-06.
- Richter, A.A., Kobus, S., Czech, L., Hoepfner, A., Zarzycki, J., Erb, T.J., *et al.* (2020) The architecture of the diaminobutyrate acetyltransferase active site provides mechanistic insight into the biosynthesis of the chemical chaperone ectoine. *J Biol Chem* **295**: 2822–2838. doi: 10.1074/jbc.RA119.011277.
- Riley, L.A. & Guss, A.M. (2021) Approaches to genetic tool development for rapid domestication of non-model microorganisms. *Biotechnol Biofuels* **14**: 30. doi: 10.1186/s13068-020-01872-z.
- Ritchie, T.K., Kwon, H., & Atkins, W.M. (2011) Conformational analysis of human ATP-binding cassette transporter ABCB1 in lipid nanodiscs and inhibition by the antibodies MRK16 and UIC2. *J Biol Chem* **286**: 39489–39496. doi: 10.1074/jbc.M111.284554.
- Rivas-San Vicente, M. & Plasencia, J. (2011) Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *J Exp Bot* **62**: 3321–3338. doi: 10.1093/jxb/err031.
- Roca, A., Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., & Ramos, J.L. (2008) Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification. *Microb Biotechnol* **1**: 158–169. doi: 10.1111/j.1751-7915.2007.00014.x.
- Rodrigues, A.L., Becker, J., de Souza Lima, A.O., Porto, L.M., & Wittmann, C. (2014) Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for gram scale production of the antitumor drug deoxyviolacein from glycerol. *Biotechnol Bioeng* **111**: 2280–2289. doi: 10.1002/bit.25297.

- 
- Roeßler, M. & Müller, V. (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: Common principles and differences. *Environ Microbiol* **3**: 743–754. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00252.x.
- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J.L., & Segura, A. (2001) Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **183**: 3967–3973. doi: 10.1128/JB.183.13.3967-3973.2001.
- Rojas, A., Duque, E., Schmid, A., Hurtado, A., Ramos, J.-L., & Segura, A. (2004) Biotransformation in double-phase systems: Physiological responses of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a double phase made of aliphatic alcohols and biosynthesis of substituted catechols. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3637–3643. doi: 10.1128/AEM.70.6.3637-3643.2004.
- Rojas, E.R. & Huang, K.C. (2018) Regulation of microbial growth by turgor pressure. *Curr Opin Microbiol* **42**: 62–70. doi: 10.1016/j.mib.2017.10.015.
- Rojas-Vargas, J., González-Sánchez, R., Sánchez-Flores, A., Licea-Navarro, A.F., & Pardo-López, L. (2022) Complete genome sequence of *Halopseudomonas aestusnigri* strain GOM5, isolated from asphalt marine sediments of the Gulf of Mexico. *Microbiol Resour Announc* **11**: 1–3. doi: 10.1128/mra.01222-21.
- Romanenko, L.A., Uchino, M., Falsen, E., Frolova, G.M., Zhukova, N. V., & Mikhailov, V. V. (2005) *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 919–924. doi: 10.1099/ijs.0.63176-0.
- Ron, E.Z. (2006) Bacterial Stress Response. In *The Prokaryotes*. Springer, pp. 1012–1027.
- Roos, K., Werner, E., & Loessner, H. (2015) Multicopy integration of mini-Tn7 transposons into selected chromosomal sites of a *Salmonella* vaccine strain. *Microb Biotechnol* **8**: 177–187. doi: 10.1111/1751-7915.12187.
- Rosano, G.L. & Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol* **5**: 172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- Rosenberg, M. & Court, D. (1979) Regulatory sequences involved in the promotion of RNA transcription. *Annu Rev Genet* **13**: 319–353. doi: 10.1146/annurev.ge.13.120179.001535.
- Rudra, B. & Gupta, R.S. (2021) Phylogenomic and comparative genomic analyses of species of the family *Pseudomonadaceae*: Proposals for the genera *Halopseudomonas* gen. nov. and *Atopomonas* gen. nov., merger of the genus *Oblitimonas* with the genus *Thiopseudomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **71**: 005011. doi: 10.1099/ijsem.0.005011.
- Le Rudulier, D., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T., & Valentine, R.C. (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064–1068. doi: 10.1126/science.224.4653.1064.
- Rytter, J.V., Helmark, S., Chen, J., Lezyk, M.J., Solem, C., & Jensen, P.R. (2014) Synthetic promoter libraries for *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 2617–2623. doi: 10.1007/s00253-013-5481-x.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491. doi: 10.1126/science.2448875.
- Sakhtah, H., Koyama, L., Zhang, Y., Morales, D.K., Fields, B.L., Price-Whelan, A., et al. (2016) The *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump MexGHI-OpmD transports a natural phenazine that

- controls gene expression and biofilm development. *PNAS* **113**: E3538–E3547. doi: 10.1073/pnas.1600424113.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, D., Mulet, M., Rodríguez, A.C., David, Z., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2014) *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., isolated from crude oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Syst Appl Microbiol* **37**: 89–94. doi: 10.1016/j.syapm.2013.09.004.
- Sandberg, T.E., Salazar, M.J., Weng, L.L., Palsson, B.O., & Feist, A.M. (2019) The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metab Eng* **56**: 1–16. doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.004.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Santos, H. & Da Costa, M.S. (2002) Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ Microbiol* **4**: 501–509. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00335.x.
- dos Santos Mattos, P.D.M.A. (2023) Characterizing the new marine *Halopseudomonas* genus: Assessing robustness and investigating the Cti's role in environmental stress adaptation. Instituto Superior Técnico Lisboa. Masterarbeit.
- Sauer, C., Syvertsson, S., Bohorquez, L.C., Cruz, R., Harwood, C.R., Van Rij, T., & Hamoen, L.W. (2016) Effect of genome position on heterologous gene expression in *Bacillus subtilis*: An unbiased analysis. *ACS Synth Biol* **5**: 942–947. doi: 10.1021/acssynbio.6b00065.
- Saum, S.H. & Müller, V. (2008) Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: Chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline Syst* **4**: 4. doi: 10.1186/1746-1448-4-4.
- Saum, S.H. & Müller, V. (2007) Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: Glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol* **189**: 6968–6975. doi: 10.1128/JB.00775-07.
- Sayed, M., Pyo, S.-H., Rehnberg, N., & Hatti-Kaul, R. (2019) Selective oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid using *Gluconobacter oxydans*. *ACS Sustain Chem Eng* **7**: 4406–4413. doi: 10.1021/acssuschemeng.8b06327.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69–73. doi: 10.1016/0378-1119(94)90324-7.
- Schempp, F.M., Hofmann, K.E., Mi, J., Kirchner, F., Meffert, A., Schewe, H., et al. (2020) Investigation of monoterpene resistance mechanisms in *Pseudomonas putida* and their consequences for biotransformations. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**: 5519–5533. doi: 10.1007/s00253-020-10566-3.
- Schiefner, A., Breed, J., Bösser, L., Kneip, S., Gade, J., Holtmann, G., et al. (2004a) Cation- $\pi$  interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 5588–5596. doi: 10.1074/jbc.M309771200.

- 
- Schiefner, A., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W., & Bremer, E. (2004b) Structural basis for the binding of compatible solutes by ProX from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem* **279**: 48270–48281. doi: 10.1074/jbc.M403540200.
- Schleif, R. (2010) AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 779–796. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00226.x.
- Schröter, M.A., Meyer, S., Hahn, M.B., Solomun, T., Sturm, H., & Kunte, H.J. (2017) Ectoine protects DNA from damage by ionizing radiation. *Sci Rep* **7**: 15272. doi: 10.1038/s41598-017-15512-4.
- Schuh, W., Puff, H., Galinski, E.A., & Trüper, H.G. (1985) Die Kristallstruktur des Ectoin, einer neuen osmoregulatorisch wirksamen Aminosäure. *Z Naturforsch* **40**: 780–784.
- Schuster, C.F., Bellows, L.E., Tosi, T., Campeotto, I., Corrigan, R.M., Freemont, P., & Gründling, A. (2016) The second messenger c-di-AMP inhibits the osmolyte uptake system OpuC in *Staphylococcus aureus*. *Sci Signal* **9**: ra81. doi: 10.1126/scisignal.aaf7279.
- Schuster, M. & Kahmann, R. (2019) CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genet Biol* **130**: 43–53. doi: 10.1016/j.fgb.2019.04.016.
- Seip, B., Galinski, E.A., & Kurz, M. (2011) Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *Pseudomonas stutzeri* *ectABCD-ask* gene cluster. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1368–1374. doi: 10.1128/AEM.02124-10.
- Shao, J., Rong, N., Wu, Z., Gu, S., Liu, B., Shen, N., & Li, Z. (2023) Siderophore-mediated iron partition promotes dynamical coexistence between cooperators and cheaters. *iScience* **26**: 107396. doi: 10.1016/j.isci.2023.107396.
- Sheldon, R.A. & Woodley, J.M. (2018) Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem Rev* **118**: 801–838. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00203.
- Siebenlist, U. (1980) *E. coli* RNA polymerase interacts homologously with two different promoters. *Cell* **20**: 269–281. doi: 10.1016/0092-8674(80)90613-3.
- Sieberichs, A. (2023) Biocatalytic production of cycloprodiginines using heterologous cyclases in *Pseudomonas putida*. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf. Masterarbeit.
- Silverman, P.M. & Clarke, M.B. (2010) New insights into F-pilus structure, dynamics, and function. *Integr Biol* **2**: 25–31. doi: 10.1039/b917761b.
- Simon, O., Klaiber, I., Huber, A., & Pfannstiel, J. (2014) Comprehensive proteome analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the flavor compound vanillin. *J Proteomics* **109**: 212–227. doi: 10.1016/j.jprot.2014.07.006.
- Simon, R., Priefer, U., & Puhl, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat Biotechnol* **1**: 784–791.
- Sims, R., Taylor, M., Saddler, J., & Mabee, W. (2008) From 1<sup>st</sup>-To 2<sup>nd</sup>-Generation Biofuel Technologies: An overview of Current Industry and RD&D Activities. OEDC/IEA Bioenergy.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P.K. (2016) Microbial enzymes: Industrial progress in 21<sup>st</sup> century. *3 Biotech* **6**: 174. doi: 10.1007/s13205-016-0485-8.

- 
- Smets, B.F. & Barkay, T. (2005) Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nat Rev Microbiol* **3**: 675–678. doi: 10.1038/nrmicro1253.
- Smiatek, J. (2014) Osmolyte effects: Impact on the aqueous solution around charged and neutral spheres. *J Phys Chem B* **118**: 771–782. doi: 10.1021/jp410261k.
- Smiatek, J., Harishchandra, R.K., Galla, H.J., & Heuer, A. (2013) Low concentrated hydroxyectoine solutions in presence of DPPC lipid bilayers: A computer simulation study. *Biophys Chem* **180–181**: 102–109. doi: 10.1016/j.bpc.2013.07.001.
- del Solar, G., Alonso, J.C., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1996) Broad-host-range plasmid replication: An open question. *Mol Microbiol* **21**: 661–666. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.6611376.x.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M.J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 434–464. doi: 10.1128/MMBR.62.2.434-464.1998.
- Sonnleitner, E. & Haas, D. (2011) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 63–79. doi: 10.1007/s00253-011-3332-1.
- Sonnleitner, E., Romeo, A., & Bläsi, U. (2012) Small regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *RNA Biol* **9**: 364–371. doi: 10.4161/rna.19231.
- Steinbüchel, A. & Lütke-Eversloh, T. (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Eng J* **16**: 81–96. doi: 10.1016/S1369-703X(03)00036-6.
- Stephens, E.L., Molina, V., Cole, K.M., Laws, E., & Johnson, C.N. (2013) *In situ* and *in vitro* impacts of the Deepwater Horizon oil spill on *Vibrio parahaemolyticus*. *Mar Pollut Bull* **75**: 90–97. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.07.058.
- Stöveken, N., Pittelkow, M., Sinner, T., Jensen, R.A., Heider, J., & Bremer, E. (2011) A specialized aspartokinase enhances the biosynthesis of the osmoprotectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *J Bacteriol* **193**: 4456–4468. doi: 10.1128/JB.00345-11.
- Street, T.O., Bolen, D.W., & Rose, G.D. (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *PNAS* **103**: 13997–14002. doi: 10.1073/pnas.0606236103.
- Strittmatter, C.S., Eggers, J., Biesgen, V., Hengsbach, J.-N., Sakatoku, Akihiro, Albrecht, D., *et al.* (2022) Insights into the degradation of medium-chain-length dicarboxylic acids in *Cupriavidus necator* H16 reveal  $\beta$ -oxidation differences between dicarboxylic acids and fatty acids. *Appl Environ Microbiol* **88**: e01873-21. doi: 10.1128/AEM.01873-21.
- Sullivan, K.P., Werner, A.Z., Ramirez, K.J., Ellis, L.D., Bussard, J.R., Black, B.A., *et al.* (2022) Mixed plastics waste valorization through tandem chemical oxidation and biological funneling. *Science* **378**: 207–211. doi: 10.1126/science.abo4626.
- Sun, J., Wang, W., Ying, Y., Zhu, X., Liu, J., & Hao, J. (2018) *Pseudomonas profundus* sp. nov., isolated from deep-sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 1776–1780. doi: 10.1099/ijsem.0.002748.
- Tabor, J.J., Levskaya, A., & Voigt, C.A. (2011) Multichromatic control of gene expression in *Escherichia coli*. **405**: 315–324. doi: 10.1016/j.jmb.2010.10.038.

- 
- Tadeo, X., López-Méndez, B., Trigueros, T., Laín, A., Castaño, D., & Millet, O. (2009) Structural basis for the aminoacid composition of proteins from halophilic archea. *PLoS Biol* **7**: e1000257. doi: 10.1371/journal.pbio.1000257.
- Talon, R., Coquelle, N., Madern, D., & Girard, E. (2014) An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins. *Front Microbiol* **5**: 66. doi: 10.3389/fmicb.2014.00066.
- Tan, D., Xue, Y.S., Aibaidula, G., & Chen, G.Q. (2011) Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol* **102**: 8130–8136. doi: 10.1016/j.biortech.2011.05.068.
- Tanaka, Y., Hipolito, C.J., Maturana, A.D., Ito, K., Kuroda, T., Higuchi, T., *et al.* (2013) Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* **496**: 247–251. doi: 10.1038/nature12014.
- Tanimura, K., Nakayama, H., Tanaka, T., & Kondo, A. (2013) Ectoine production from lignocellulosic biomass-derived sugars by engineered *Halomonas elongata*. *Bioresour Technol* **142**: 523–529. doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.004.
- Tatusov, R.L., Koonin, E. V., & Lipman, D.J. (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**: 631–637. doi: 10.1126/science.278.5338.631.
- Tatzelt, J., Prusiner, S.B., & Welch, W.J. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J* **15**: 6363–6373. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb01027.x.
- Terán, W., Krell, T., Ramos, J.L., & Gallegos, M.T. (2006) Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression. *J Biol Chem* **281**: 7102–7109. doi: 10.1074/jbc.M511095200.
- Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 211–222. doi: 10.1007/s00253-006-0465-8.
- Thomas, C.M. & Nielsen, K.M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 711–721. doi: 10.1038/nrmicro1234.
- Thomas, C.M. & Summers, D. (2020) Bacterial Plasmids. In *eLS*. Wiley, pp. 240–250.
- Thompson, M.G., Valencia, L.E., Blake-Hedges, J.M., Cruz-Morales, P., Velasquez, A.E., Pearson, A.N., *et al.* (2019) Omics-driven identification and elimination of valerolactam catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440 for increased product titer. *Metab Eng Commun* **9**: e00098. doi: 10.1016/j.mec.2019.e00098.
- Tiso, T., Winter, B., Wei, R., Hee, J., de Witt, J., Wierckx, N., *et al.* (2022) The metabolic potential of plastics as biotechnological carbon sources – Review and targets for the future. *Metab Eng* **71**: 77–98. doi: 10.1016/j.ymben.2021.12.006.
- Trunk, T., S. Khalil, H., & C. Leo, J. (2018) Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol* **4**: 140–164. doi: 10.3934/microbiol.2018.1.140.
- Tsagkari, E., Connelly, S., Liu, Z., McBride, A., & Sloan, W.T. (2022) The role of shear dynamics in biofilm formation. *NPJ Biofilms Microbiomes* **8**: 33. doi: 10.1038/s41522-022-00300-4.

- Tu, Q., Yin, J., Fu, J., Herrmann, J., Li, Y., Yin, Y., *et al.* (2016) Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombinering efficiency. *Sci Rep* **6**: 24648. doi: 10.1038/srep24648.
- UN Department of Public Information (1992) United Nations Conference on Environment & Development. In *Agenda 21*. Brazil.
- Vaidya, S., Dev, K., & Sourirajan, A. (2018) Distinct osmoadaptation strategies in the strict halophilic and halotolerant bacteria isolated from Lunsu salt water body of North West Himalayas. *Curr Microbiol* **75**: 888–895. doi: 10.1007/s00284-018-1462-8.
- Vardon, D.R., Franden, M.A., Johnson, C.W., Karp, E.M., Guarnieri, M.T., Linger, J.G., *et al.* (2015) Adipic acid production from lignin. *Energy Environ Sci* **8**: 617–628. doi: 10.1039/c4ee03230f.
- Verhoef, S., Ballerstedt, H., Volkers, R.J.M., de Winde, J.H., & Ruijssenaars, H.J. (2010) Comparative transcriptomics and proteomics of *p*-hydroxybenzoate producing *Pseudomonas putida* S12: Novel responses and implications for strain improvement. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 679–690. doi: 10.1007/s00253-010-2626-z.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020) Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: From the cellular to the community level. *Genes* **11**: 1239. doi: 10.3390/genes11111239.
- Voigt, C.A. (2012) Synthetic biology. *ACS Synth Biol* **1**: 1–2. doi: 10.1021/sb300001c.
- Volke, D.C., Friis, L., Wirth, N.T., Turlin, J., & Nikel, P.I. (2020) Synthetic control of plasmid replication enables target- and self-curing of vectors and expedites genome engineering of *Pseudomonas putida*. *Metab Eng Commun* **10**: e00126. doi: 10.1016/j.mec.2020.e00126.
- Volke, D.C., Orsi, E., & Nikel, P.I. (2023) Emergent CRISPR–Cas-based technologies for engineering non-model bacteria. *Curr Opin Microbiol* **75**: doi: 10.1016/j.mib.2023.102353.
- Volkers, R.J.M., Ballerstedt, H., Ruijssenaars, H., De Bont, J.A.M., De Winde, J.H., & Wery, J. (2009) *Trgl*, toluene repressed gene I, a novel gene involved in toluene-tolerance in *Pseudomonas putida* S12. *Extremophiles* **13**: 283–297. doi: 10.1007/s00792-008-0216-0.
- Volmer, J., Neumann, C., Bühler, B., & Schmid, A. (2014) Engineering of *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 for constitutive solvent tolerance and increased specific styrene epoxidation activity. *Appl Environ Microbiol* **80**: 6539–6548. doi: 10.1128/AEM.01940-14.
- Wang, J.-W., Cai, M., Nie, Y., Hu, B., Yang, Y., & Wu, X.-L. (2020) *Pseudomonas jilinensis* sp. nov., isolated from oil production water of Jilin oilfield in China. *Curr Microbiol* **77**: 688–694. doi: 10.1007/s00284-019-01798-2.
- Wang, M.Q. & Sun, L. (2016) *Pseudomonas oceani* sp. nov., isolated from deep seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 4250–4255. doi: 10.1099/ijsem.0.001343.
- Wang, M.-Q., Zhang, C.-S., Yu, L.-N., Yang, W.-Q., Jiao, K., Gong, K.-J., *et al.* (2021) *Pseudomonas laoshanensis* sp. nov., isolated from peanut field soil. *Arch Microbiol* **203**: 829–834. doi: 10.1007/s00203-020-02067-8.
- Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N., & Fujii, T. (2011) A survey of the cellular responses in *Pseudomonas putida* KT2440 growing in sterilized soil by microarray analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **78**: 220–232. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01146.x.

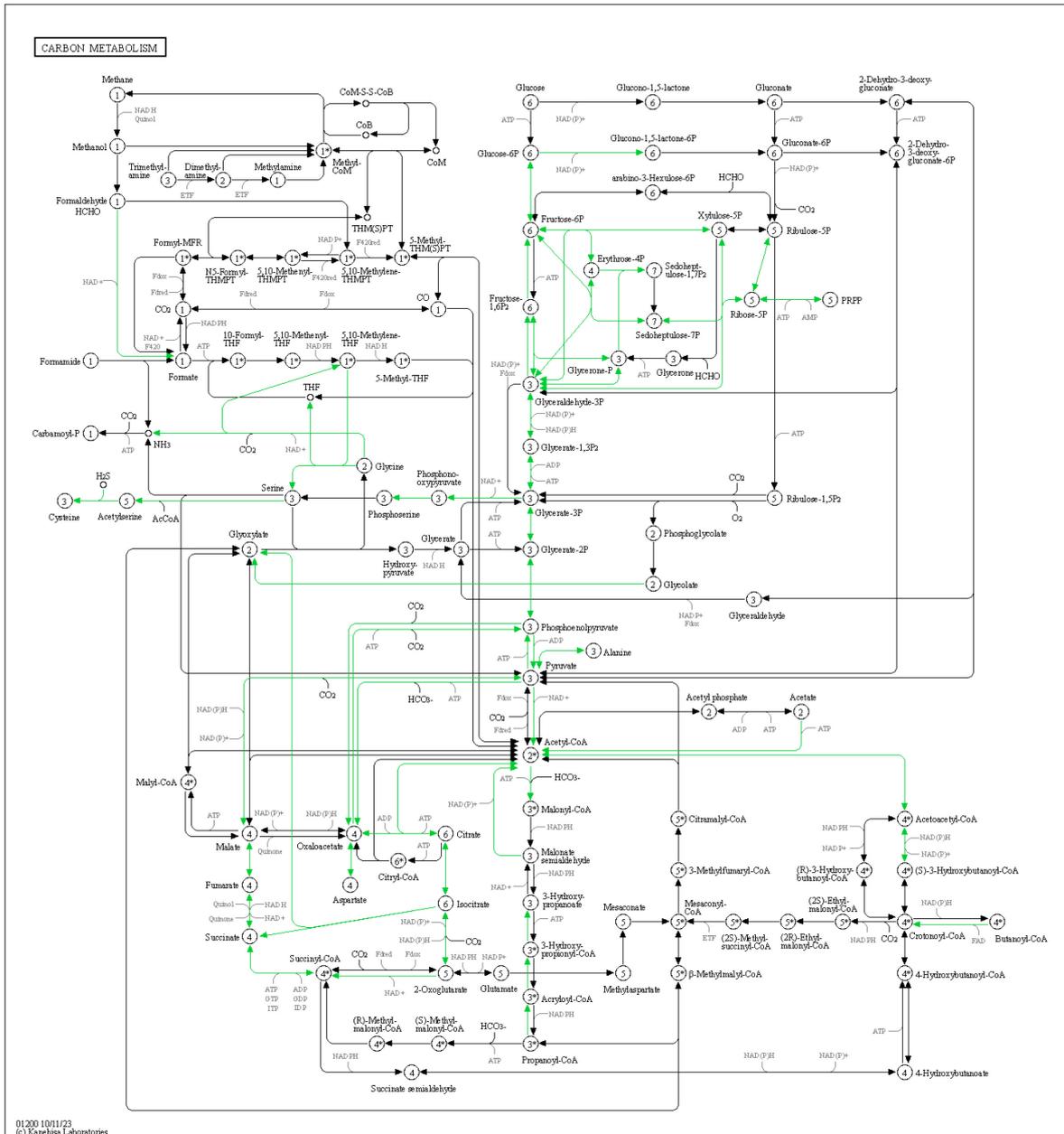
- 
- Wanner, B.L., Kodaira, R., & Neidhart, F.C. (1977) Physiological regulation of a decontrolled *lac* operon. *J Bacteriol* **130**: 212–222. doi: 10.1128/jb.130.1.212-222.1977.
- Wei, Y., Mao, H., Xu, Y., Zou, W., Fang, J., & Blom, J. (2018) *Pseudomonas abyssi* sp. nov., isolated from the abyssopelagic water of the Mariana Trench. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 2462–2467. doi: 10.1099/ijsem.0.002785.
- Weihmann, R., Kubicki, S., Bitzenhofer, N.L., Domröse, A., Bator, I., Kirschen, L.-M., et al. (2023) The modular pYT vector series employed for chromosomal gene integration and expression to produce carbazoles and glycolipids in *P. putida*. *FEMS Microbes* **4**: 1–17. doi: 10.1093/femsmc/xtac030.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., & Richardson, C.C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* **243**: 4543–4555. doi: 10.1016/S0021-9258(18)93227-8.
- Widderich, N., Höppner, A., Pittelkow, M., Heider, J., Smits, S.H.J., & Bremer, E. (2014a) Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS One* **9**: e93809. doi: 10.1371/journal.pone.0093809.
- Widderich, N., Kobus, S., Höppner, A., Riclea, R., Seubert, A., Dickschat, J.S., et al. (2016) Biochemistry and crystal structure of ectoine synthase: A metal-containing member of the cupin superfamily. *PLoS One* **11**: e0151285. doi: 10.1371/journal.pone.0151285.
- Widderich, N., Pittelkow, M., Höppner, A., Mulnaes, D., Buckel, W., Gohlke, H., et al. (2014b) Molecular dynamics simulations and structure-guided mutagenesis provide insight into the architecture of the catalytic core of the ectoine hydroxylase. *J Mol Biol* **426**: 586–600. doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.028.
- Wierckx, N., Narancic, T., Eberlein, C., Wei, R., Drzyzga, O., Magnin, A., et al. (2018) Plastic Biodegradation: Challenges and Opportunities. In *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids - Biodegradation and Bioremediation*. Springer, pp. 1–29.
- Willetts, N. & Skurray, R. (1980) The conjugation system of F-like plasmids. *Annu Rev Genet* **14**: 41–76. doi: 10.1146/annurev.ge.14.120180.000353.
- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., & Brinkman, F.S.L. (2016) Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* **44**: 646–653. doi: 10.1093/nar/gkv1227.
- Wirth, N.T., Kozaeva, E., & Nikel, P.I. (2020) Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-SceI—mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection. *Microb Biotechnol* **13**: 233–249. doi: 10.1111/1751-7915.13396.
- Witt, E.M.H.J., Davies, N.W., & Galinski, E.A. (2011) Unexpected property of ectoine synthase and its application for synthesis of the engineered compatible solute ADPC. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 113–122. doi: 10.1007/s00253-011-3211-9.
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T.T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., et al. (2011) Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Cell Fact* **10**: 80. doi: 10.1186/1475-2859-10-80.
- Wong, B.-T. & Lee, D.-J. (2014) *Pseudomonas yangmingensis* sp. nov., an alkaliphilic denitrifying species isolated from a hot spring. *J Biosci Bioeng* **117**: 71–74. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.006.

- Wood, J.M. (2011) Bacterial osmoregulation: A paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol* **65**: 215–238. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102815.
- Wu, S.G., He, L., Wang, Q., & Tang, Y.J. (2015) An ancient Chinese wisdom for metabolic engineering: Yin-Yang. *Microb Cell Fact* **14**: 1–9. doi: 10.1186/s12934-015-0219-3.
- Wynands, B., Otto, M., Runge, N., Preckel, S., Polen, T., Blank, L.M., & Wierckx, N. (2019) Streamlined *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 chassis strains with improved bioprocess features. *ACS Synth Biol* **8**: 2036–2050. doi: 10.1021/acssynbio.9b00108.
- Xu, G., Wu, A., Xiao, L., Han, R., & Ni, Y. (2019) Enhancing butanol tolerance of *Escherichia coli* reveals hydrophobic interaction of multi-tasking chaperone SecB. *Biotechnol Biofuels* **12**: 164. doi: 10.1186/s13068-019-1507-7.
- Xu, P., Qiao, K., Ahn, W.S., & Stephanopoulos, G. (2016) Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *PNAS* **113**: 10848–10853. doi: 10.1073/pnas.1607295113.
- Xu, X., Jiao, L., Feng, X., Ran, J., Liang, X., & Zhao, R. (2017) Heterogeneous expression of *dnaK* gene from *Alicyclobacillus acidoterrestris* improves the resistance of *Escherichia coli* against heat and acid stress. *AMB Express* **7**: 36. doi: 10.1186/s13568-017-0337-x.
- Yan, Q. & Fong, S.S. (2017) Challenges and advances for genetic engineering of non-model bacteria and uses in consolidated bioprocessing. *Front Microbiol* **8**: 2060. doi: 10.3389/fmicb.2017.02060.
- Yancey, P.H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**: 2819–2830. doi: 10.1242/jeb.01730.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., & Somero, G.N. (1982) Living with waterstress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214–1222. doi: 10.1126/science.7112124.
- Yang, W., Zhou, Z., & Chu, Z. (2023) Emerging roles of salicylic acid in plant saline stress tolerance. *Int J Mol Sci* **24**: 3388. doi: 10.3390/ijms24043388.
- Yao, X., Tao, F., Tang, H., Hu, H., Wang, W., & Xu, P. (2021) Unique regulator SrpR mediates crosstalk between efflux pumps TtgABC and SrpABC in *Pseudomonas putida* B6-2 (DSM 28064). *Mol Microbiol* **115**: 131–141. doi: 10.1111/mmi.14605.
- Yoshida, A., Tomita, T., Kurihara, T., Fushinobu, S., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2007) Structural insight into concerted inhibition of  $\alpha_2\beta_2$ -type aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Biol* **368**: 521–536. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.017.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., *et al.* (2016) A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* **351**: 1196–1199. doi: 10.1126/science.aad6359.
- Youssef, N.H., Savage-Ashlock, K.N., McCully, A.L., Luedtke, B., Shaw, E.I., Hoff, W.D., & Elshahed, M.S. (2014) Trehalose/2-sulfotrehalose biosynthesis and glycine-betaine uptake are widely spread mechanisms for osmoadaptation in the *Halobacteriales*. *ISME J* **8**: 636–649. doi: 10.1038/ismej.2013.165.
- Zaccai, G., Bagyan, I., Combet, J., Cuello, G.J., Demé, B., Fichou, Y., *et al.* (2016) Neutrons describe ectoine effects on water H-bonding and hydration around a soluble protein and a cell membrane. *Sci Rep* **6**: 31434. doi: 10.1038/srep31434.

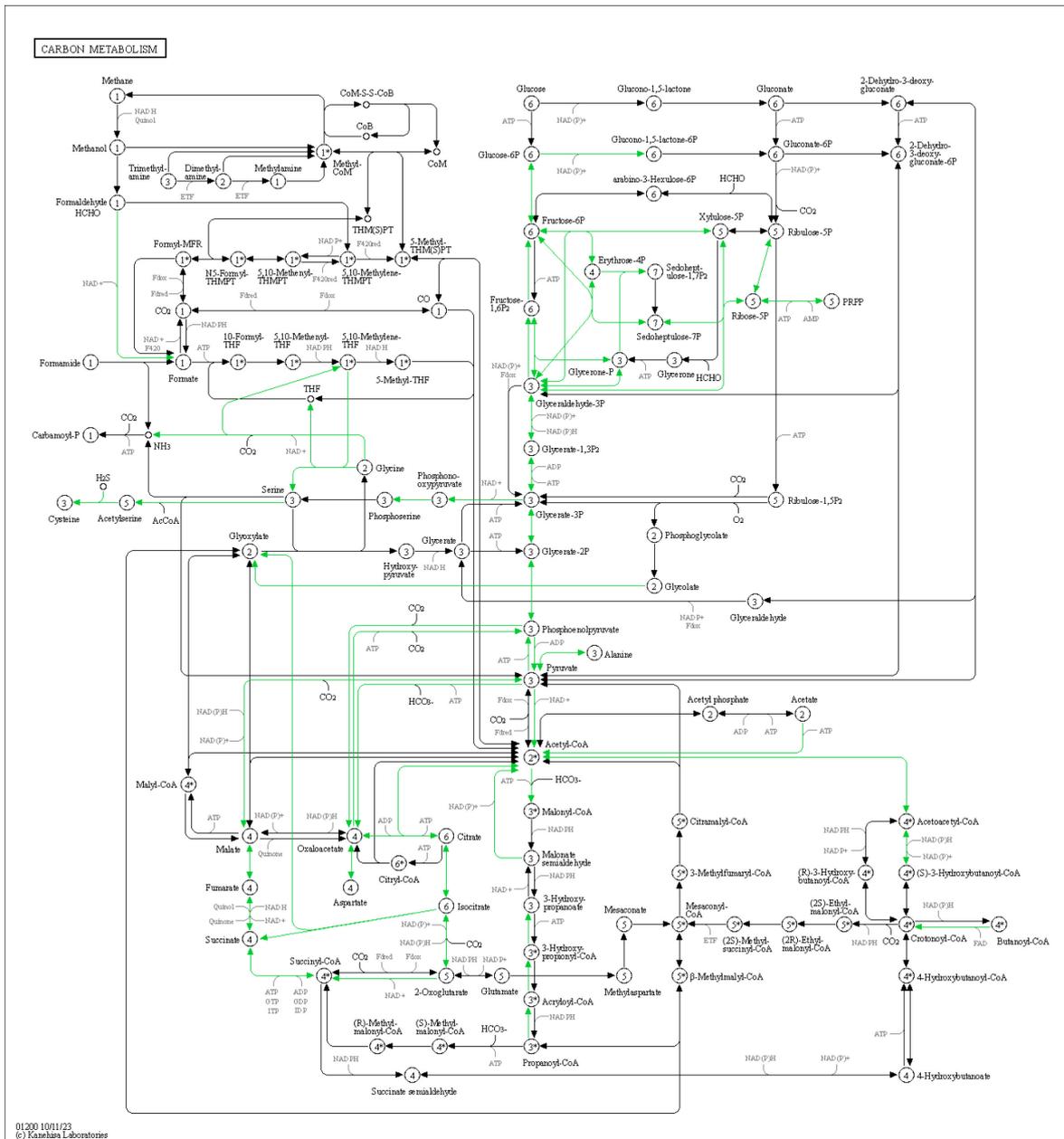
- 
- Zhang, D.C., Liu, H.C., Zhou, Y.G., Schinner, F., & Margesin, R. (2011) *Pseudomonas bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2333–2337. doi: 10.1099/ijs.0.026104-0.
- Zhang, T., Zhang, X., Li, Y., Yang, N., Qiao, L., Miao, Z., *et al.* (2022) Study of osmoadaptation mechanisms of halophilic *Halomonas alkaliphila* XH26 under salt stress by transcriptome and ectoine analysis. *Extremophiles* **26**: 14. doi: 10.1007/s00792-022-01256-1.
- Zhang, W., Liu, K., Kong, F., Ye, T., & Wang, T. (2023) Multiple functions of compatible solute ectoine and strategies for constructing overproducers for biobased production. *Mol Biotechnol* doi: 10.1007/s12033-023-00827-7.
- Zhang, X.-J., Liu, H.-C., Zhou, Y.-G., Wu, X.-L., Nie, Y., Li, Q.-R., *et al.* (2020) *Pseudomonas saliphila* sp. nov., a bacterium isolated from oil-well production water in Qinghai oilfield of China. *Curr Microbiol* **77**: 1924–1931. doi: 10.1007/s00284-020-01986-5.
- Zhang, Y., Shang, X., Lai, S., Zhang, G., Liang, Y., & Wen, T. (2012) Development and application of an arabinose-inducible expression system by facilitating inducer uptake in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5831–5838. doi: 10.1128/AEM.01147-12.
- Zhang, Y.M. & Rock, C.O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**: 222–233. doi: 10.1038/nrmicro1839.
- Zheng, Y., Su, T., & Qi, Q. (2019) Microbial CRISPRi and CRISPRa systems for metabolic engineering. *Biotechnol and Bioprocess Eng* **24**: 579–591. doi: 10.1007/s12257-019-0107-5.
- Zhong, Z.-P., Liu, Y., Hou, T.-T., Liu, H.-C., Zhou, Y.-G., Wang, F., & Liu, Z.-P. (2015) *Pseudomonas salina* sp. nov., isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 2846–2851. doi: 10.1099/ijs.0.000341.
- Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, D.I., Euverink, G.-J.W., & Krooneman, J. (2023) Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. *J Environ Manage* **341**: 118033. doi: 10.1016/j.jenvman.2023.118033.
- Zobel, S., Benedetti, I., Eisenbach, L., De Lorenzo, V., Wierckx, N., & Blank, L.M. (2015) Tn7-based device for calibrated heterologous gene expression in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth Biol* **4**: 1341–1351. doi: 10.1021/acssynbio.5b00058.

## 6 Anhang

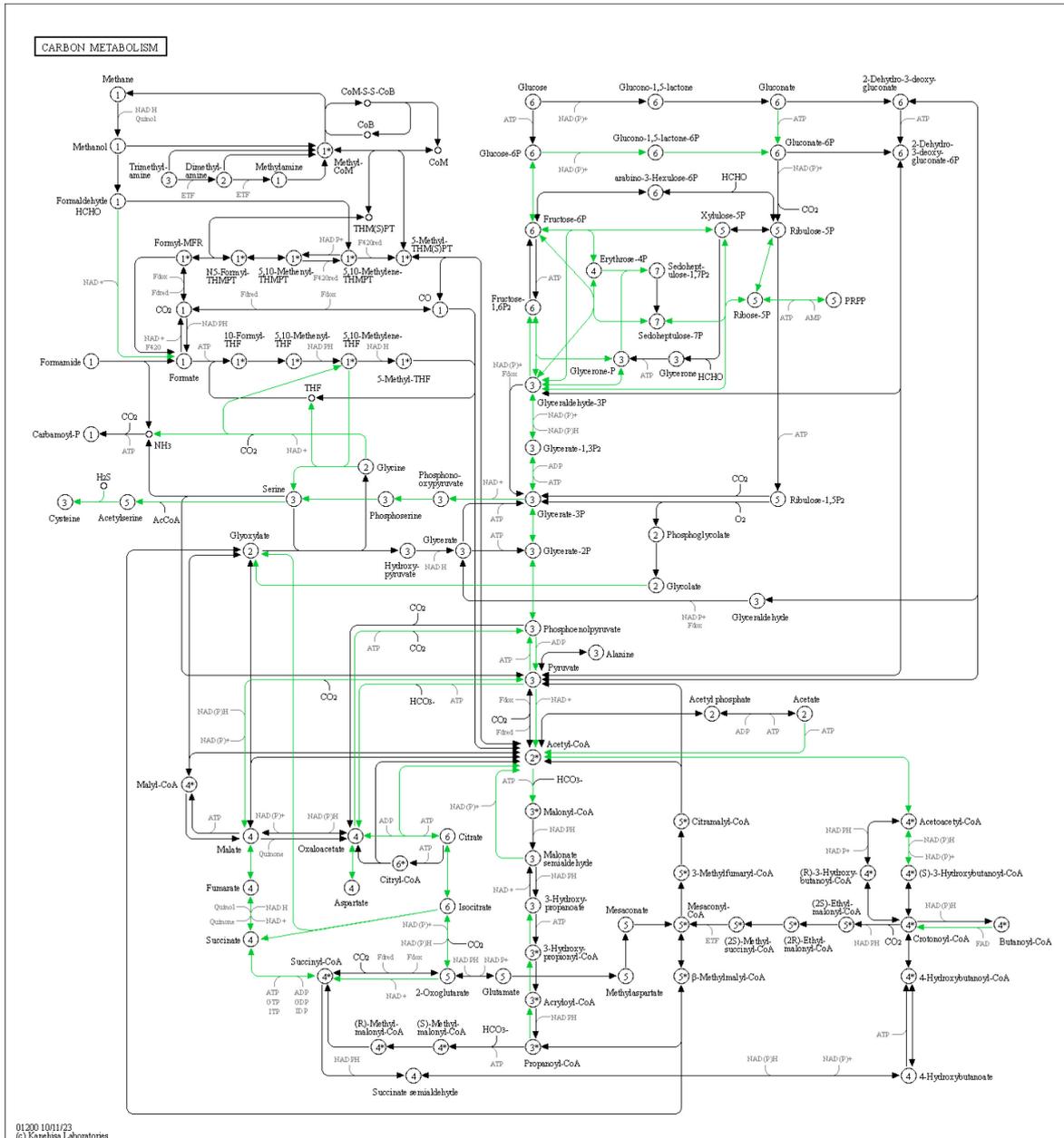
### 6.1 Abbildungen



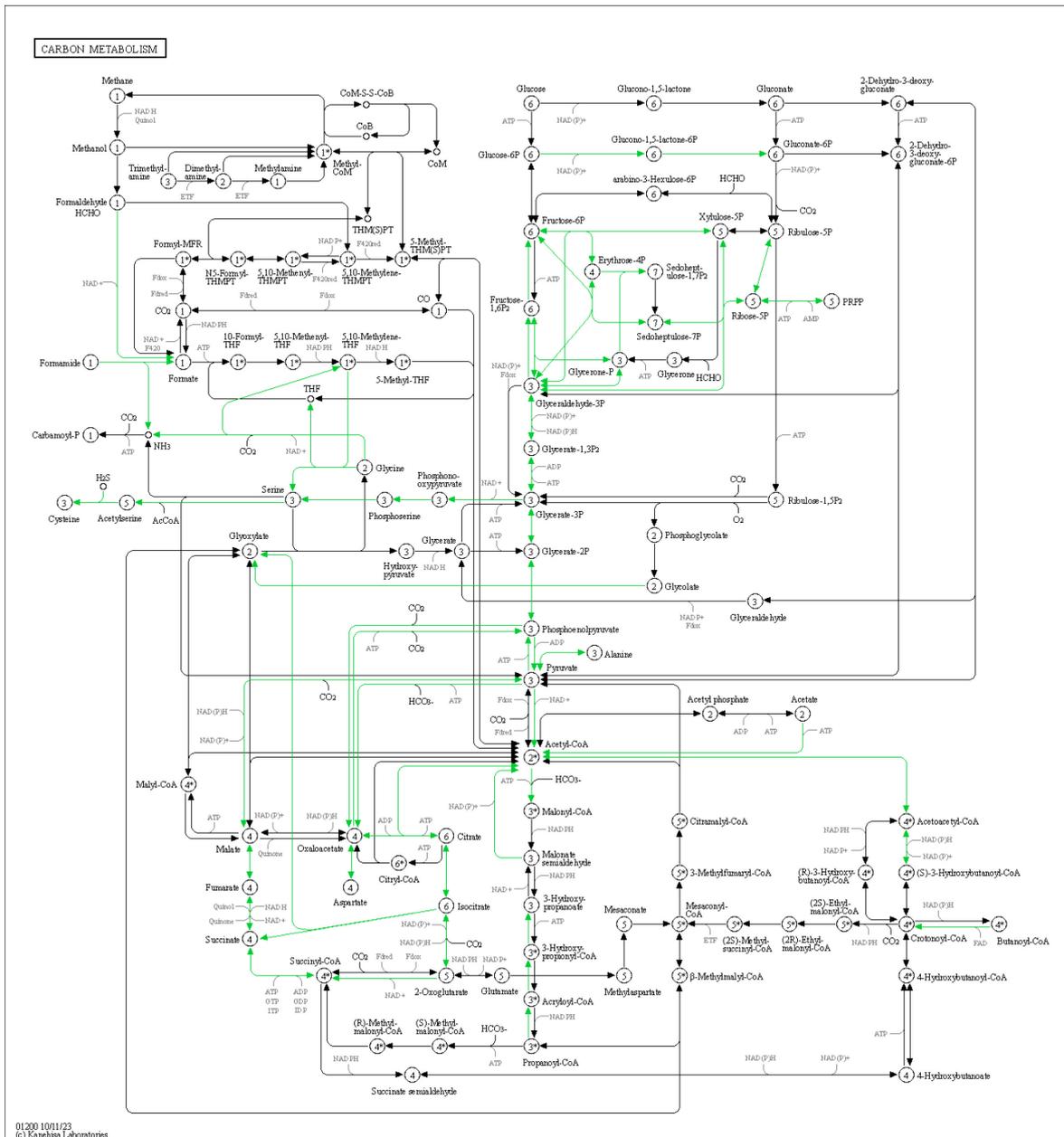
**Abb. A1: Übersicht des vorhergesagten zentralen Kohlenstoffwechsels in *H. aestusnigri* VGXO14.** Die Übersicht (Stand 10.2023) wurde mit Hilfe von BlastKOALA und dem KEGG Mapper erstellt (Kanehisa & Sato, 2020; Kanehisa *et al.*, 2016). Grün hinterlegte Pfeile implizieren, dass die Gene für das jeweilige Enzym im Genom annotiert waren.



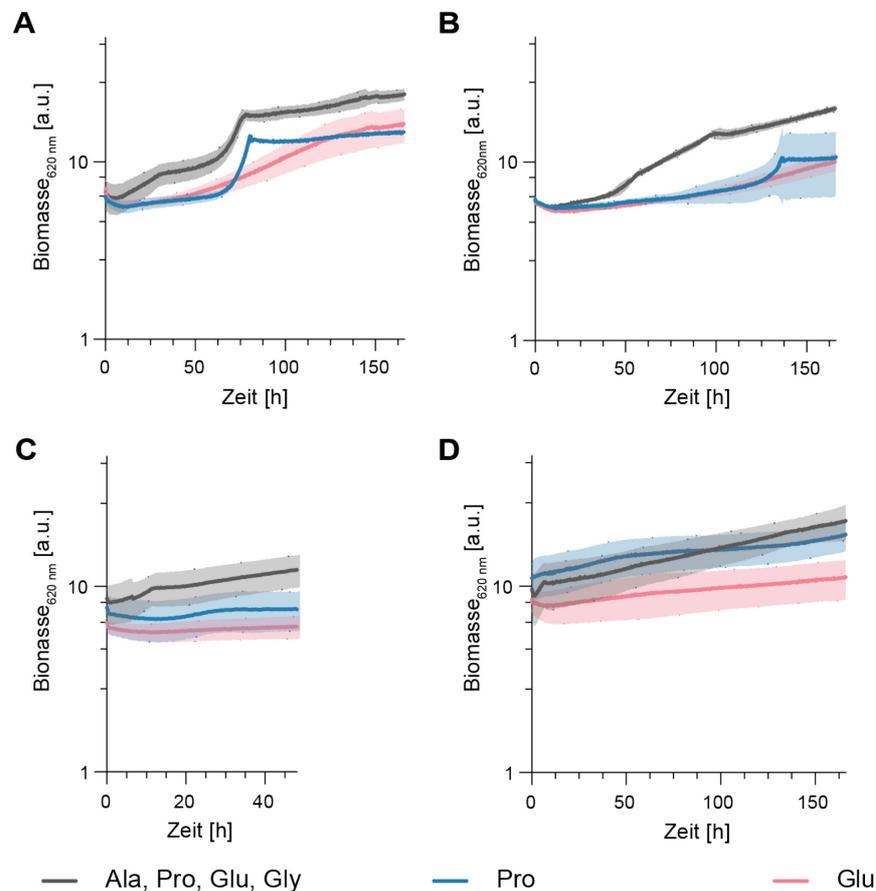
**Abb. A2: Übersicht des vorhergesagten zentralen Kohlenstoffwechsels in *H. bauzanensis* BZ93.** Die Übersicht (Stand 10.2023) wurde mit Hilfe von BlastKOALA und dem KEGG Mapper erstellt (Kanehisa & Sato, 2020; Kanehisa *et al.*, 2016). Grün hinterlegte Pfeile implizieren, dass die Gene für das jeweilige Enzym im Genom annotiert waren.



**Abb. A3: Übersicht des vorhergesagten zentralen Kohlenstoffwechsels in *H. littoralis* 2SM5.** Die Übersicht (Stand 10.2023) wurde mit Hilfe von BlastKOALA und dem KEGG Mapper erstellt (Kanehisa & Sato, 2020; Kanehisa *et al.*, 2016). Grün hinterlegte Pfeile implizieren, dass die Gene für das jeweilige Enzym im Genom annotiert waren.

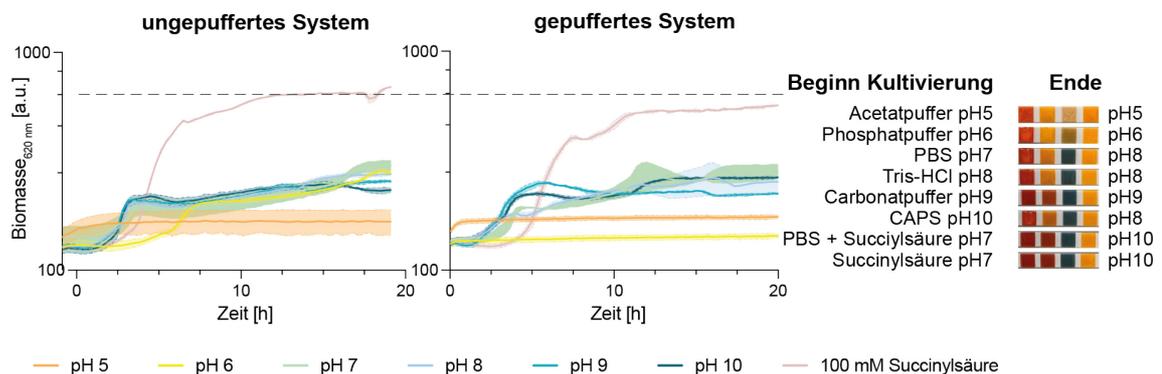


**Abb. A4: Übersicht des vorhergesagten zentralen Kohlenstoffwechsels in *H. oceanii* KX20.** Die Übersicht (Stand 10.2023) wurde mit Hilfe von BlastKOALA und dem KEGG Mapper erstellt (Kanehisa & Sato, 2020; Kanehisa *et al.*, 2016). Grün hinterlegte Pfeile implizieren, dass die Gene für das jeweilige Enzym im Genom annotiert waren.



**Abb. A5: Mehrphasiges Wachstum der *Halopseudomonas* spp. in HM-Medium mit definierter Aminosäurezusammensetzung.**

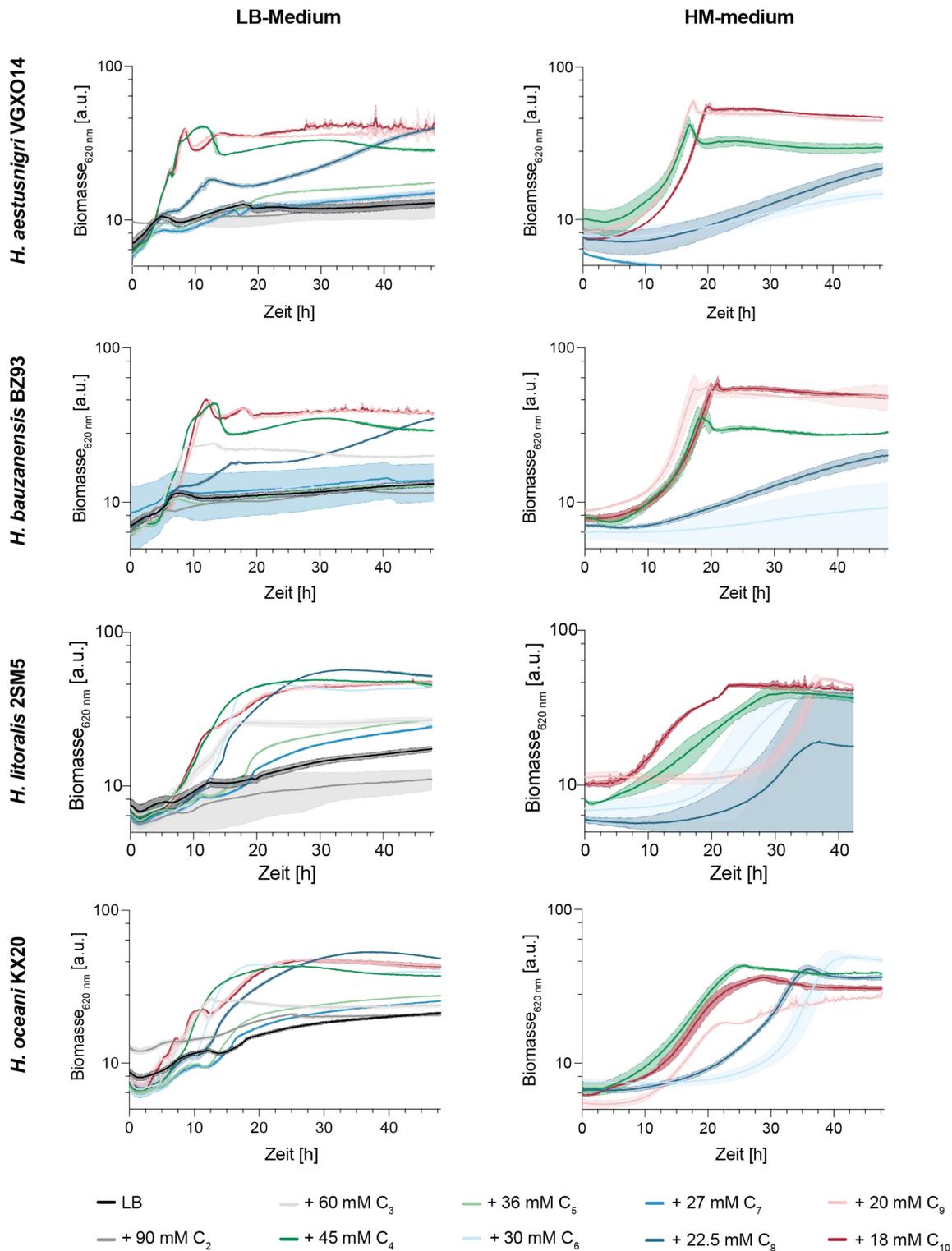
*H. aestusnigri* VGXO14R (A), *H. bauzanensis* BZ93R (B), *H. litoralis* 2SM5R (C), und *H. oceani* KX20R (D) aus in LB-Medium gezüchteten Vorkulturen wurden in Round Well Plates® in HM-Medium kultiviert. Als einzige Kohlenstoffquellen dienten eine Mischung der Aminosäuren D,L-Alanin, L-Prolin, L-Glutamin und Glycin (dunkelgrau), L-Prolin (blau) oder L-Glutamin (rot). Die dargestellten Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Duplikats oder Triplikats dar. Die Kultivierung wurde fortgesetzt, bis alle Kulturen einer Art die stationäre Phase erreicht hatten, d. h. maximal 160 h. Die berechneten Standardabweichungen sind durch Schatten dargestellt. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.



**Abb. A6: Bestimmung des Einflusses des pH-Werts auf das Bakterienwachstum.**

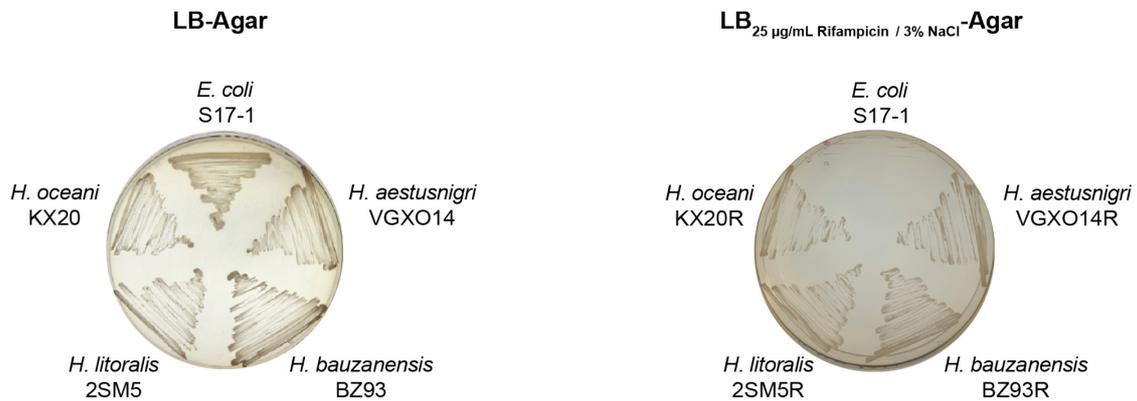
*H. litoralis* 2SM5 wurde in LB-Medium kultiviert, das auf pH-Werte von 5 - 10 eingestellt wurde. In einem Versuchsaufbau wurden ungepufferte Systeme (links) verwendet, in einem anderen gepufferte Systeme mit 100 mM (rechts) der jeweiligen Pufferkomponente: Acetatpuffer zur Einstellung von pH5, Phosphatpuffer für pH6, PBS für pH7, Tris-HCl für pH8, Carbonatpuffer für pH9 und CAPS für pH10. Zum Vergleich wurde in jedem Versuchsaufbau eine Kultur mit 100 mM-Succinylsäure in pH7 Medium getestet. Die dargestellten Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar. Die Schatten zeigen die berechnete Standardabweichung an. Die eingestellten pH-Werte vor und nach der Kultivierung sind auf der rechten Seite dargestellt. Modifiziert nach

Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.



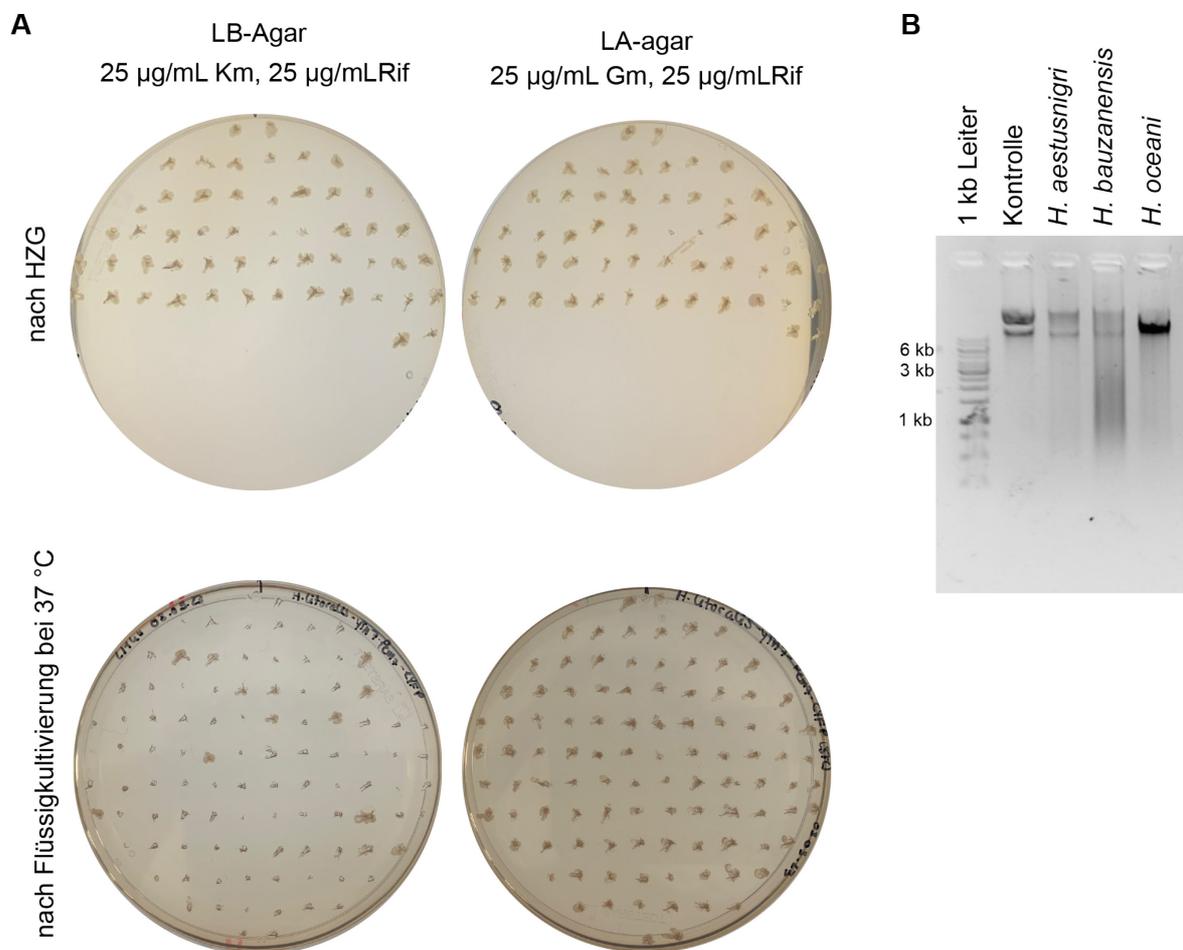
**Abb. A7:** Wachstumskurven von *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93, *H. litoralis* 2SM5 und *H. oceani* KX20 in Komplex- und Minimalmedium versetzt mit verschiedenen Dicarbonsäuren.

Die C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Dicarbonsäuren wurden in C-äquimolaren Konzentrationen zu 45 mM Succinylsäure getestet und als zusätzliche Kohlenstoffquelle in LB-Medium und als alleinige Kohlenstoffquelle in HM-Medium verwendet. Eine Zusammenfassung der Daten ist in **Tab. 3.1** gegeben. Die dargestellten Daten stellen den Mittelwert eines biologischen Triplikats dar. Die Schatten zeigen die berechnete Standardabweichung an. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.



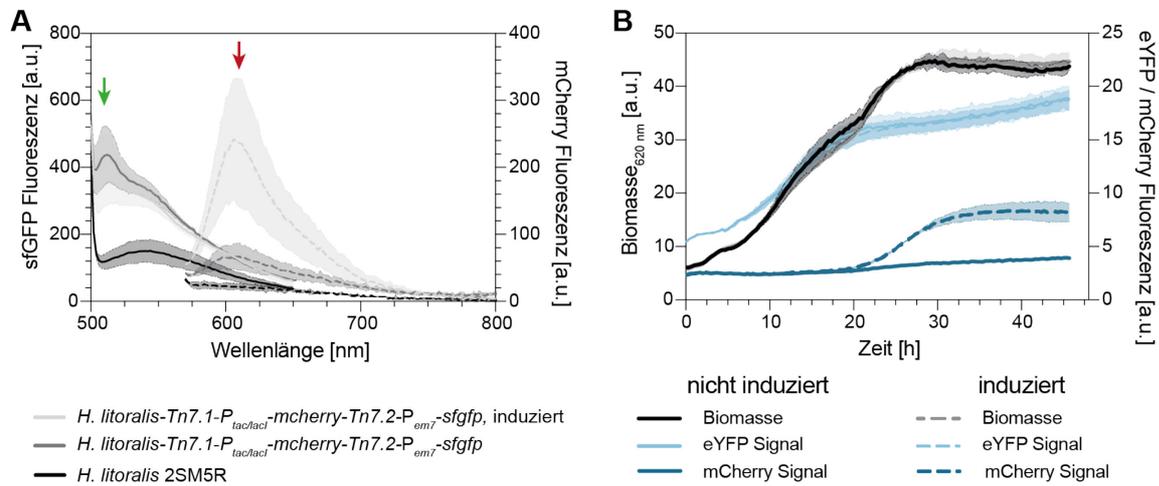
**Abb. A8: Isolation der Rif<sup>R</sup> Stämme.**

Wachstum *H. aestusnigri* VGXO14R, *H. bauzanensis* BZ93R, *H. litoralis* 2SM5R, *H. oceanii* KX20R und *E. coli* S17-1 auf LB-Agar und LB-Agar mit 25 µg/mL Rif and 3 % (w/v) NaCl. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023.) Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.



**Abb. A9: Horizontaler Gentransfer, Transposition und Plasmidisolation von *H. litoralis* 2SM5R unter Verwendung des pMB1-Plasmids yTREX-Tn7-P<sub>em7</sub>-eYFP.**

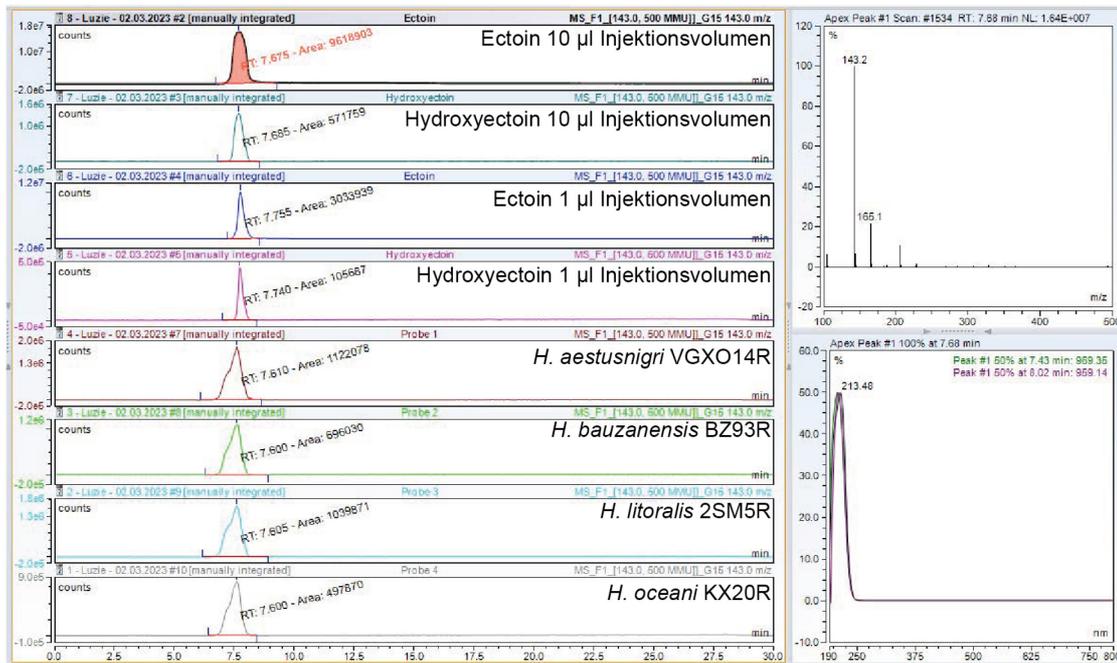
**A:** Die obere Reihe zeigt die Selektionsplatten für *H. litoralis* yTREX-Tn7-Pem7-eYFP auf LB-Agar, welcher die Antibiotika Rifampicin und Kanamycin (Vektor-Rückgrat-Marker) bzw. Rifampicin und Gentamycin (Transposon-Marker) enthält. Die zweite Reihe zeigt Kolonien, die auf denselben Selektionsplatten nach einer Hitzestressbehandlung bei 37 °C für 24 Stunden in Flüssigkultur gewachsen sind. **B:** Abgebildet sind die isolierten Plasmide von yTn7-Pem7-eYFP aus Kulturen von *H. aestusnigri*, *H. bauzanensis* und *H. litoralis*, die in Gegenwart von Kanamycin nach der Transformation mit dem jeweiligen Plasmid gewachsen sind. Kontrolle: yTn7-Pem7-eYFP isoliert aus *E. coli*. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.



**Abb. A10: Emissionsspektren und Wuchskurven von *H. littoralis* 2SM5R yTn7.1- $P_{em7}$ -*sfgfp*- $P_{tac/lacI}$ -*mCherry* nach Induktion der *mcherry*-Genexpression.**

**A:** sfGFP (durchgezogene Linie, grüner Pfeil) und mCherry (gepunktete Linie, roter Pfeil) Emissionsspektren von *H. littoralis* Tn7.1- $P_{em7}$ -*sfgfp*-Tn7.2- $P_{tac/lacI}$ -*mcherry* 20 h nach der Induktion mit IPTG (hellgrau), der Kontrolle (dunkelgrau) und Wildtyp als Kontrolle (schwarz). **B:** Die Biomasse von *H. littoralis* (schwarz, durchgezogene Linie) sowie *H. littoralis* Tn7.1- $P_{em7}$ -*sfgfp*-Tn7.2- $P_{tac/lacI}$ -*mcherry* (grau, gepunktete Linie), sowie die sfGFP-Fluoreszenz (hellblau, Tn7.1-Seite) und die mCherry-Fluoreszenz (dunkelblau, Tn7.2-Seite) wurden mit einem Mikrobioreaktorsystem (BioLector I) gemessen. Die Kulturen wurden mit 50  $\mu$ M IPTG (gestrichelte Linie) nach 4,5 h Kultivierung induziert. Die entsprechende gestrichelte Linie zeigt die Wildtyp-Kontrollen. Die Daten stellen den Mittelwert von biologischen Triplikaten dar, und die Fehlerbalken oder Schatten zeigen die berechnete Standardabweichung an. Modifiziert nach Kruse *et al.* (2023). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC 4.0) geschützt.

A



B

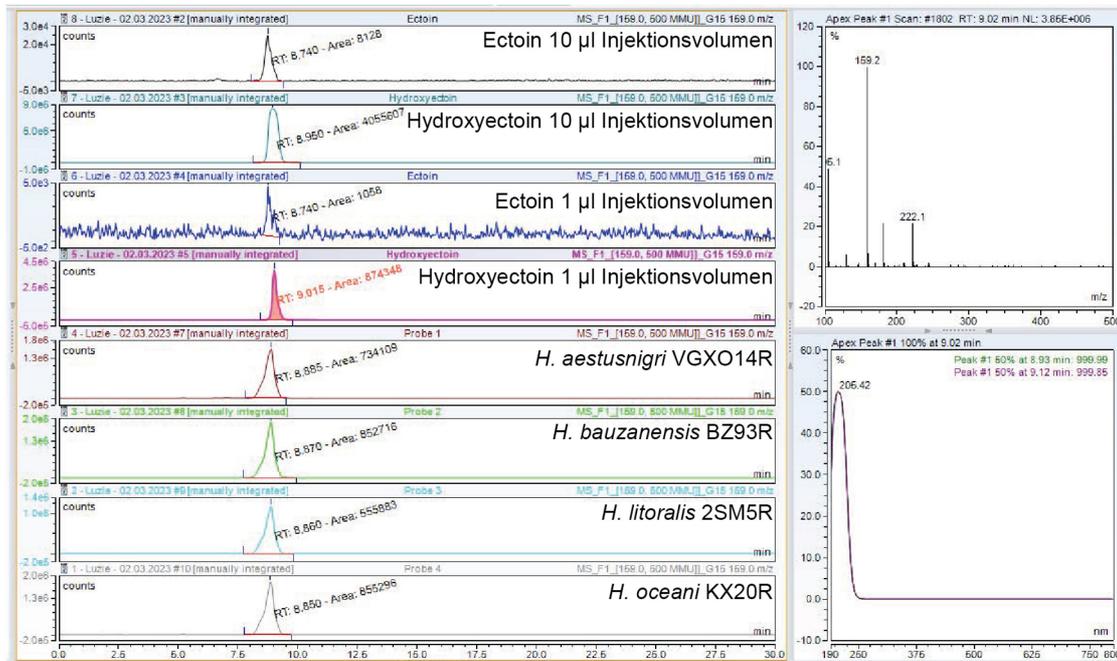


Abb. A11: Nachweis der Ectoin- und 5-Hydroxyectoinproduktion in *Halopseudomonas* spp. mittels LC-MS.

Gezeigt sind die Chromatogramme von *H. aestusnigri* VGXO14R, *H. bauzanensis* BZ93R, *H. litoralis* 2SM5R und *H. oceani* KX20R bei einer  $m/z$  143 (Ectoin) (A) und  $m/z$  159 (Hydroxyectoin) (B), welche durch Zugabe von 4 % bzw. 5,5 % (w/v) NaCl unter osmotischem Stress kultiviert und nach 16 h geerntet wurden.

## 6.2 Tabellen

Tab. A1: Resistenz-vermittelnde Exporter aus Pseudomonaden.

Name	Superfamilie	Substrat(e)	Repräsentative(r) Wirt(e)	Referenz
TtgABC, ArpABC, MexAB-OprM	RND	Antibiotika, Schwermetalle, mono- und polyzyklische Aromaten, kurz- und langkettige Alkohole, Polyphenole (bspw.: Naringenin, Quercetin, Phloretin), Monoterpene, Bipyridine	<i>P. putida</i> KT2440 <i>P. putida</i> DOT-T1E <i>P. putida</i> S12 <i>P. putida</i> GS1 <i>P. taiwanensis</i> VLB120 <i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>P. syringae</i> B728a	(Yao <i>et al.</i> , 2021; Henríquez <i>et al.</i> , 2020; Puja <i>et al.</i> , 2020; Schempp <i>et al.</i> , 2020; Basler <i>et al.</i> , 2018; Volmer <i>et al.</i> , 2014; Terán <i>et al.</i> , 2006; Rojas <i>et al.</i> , 2004; Chuanchuen <i>et al.</i> , 2003; de Bont & Kieboom, 2001)
TtgDEF	RND	aromatische Lösungsmittel (bspw.: Toluol und Styrol), Monoterpene (bspw.: Geraniol), langkettige Alkohole	<i>P. putida</i> DOT-T1E <i>P. putida</i> GS1	(Schempp <i>et al.</i> , 2020; Rojas <i>et al.</i> , 2004, 2001)
TtgGHI, SrpABC	RND	mono- and polyzyklische Aromaten (bspw.: Toluol und Styrol, Biphenyle), langkettige Alkohole	<i>P. putida</i> DOT-T1E <i>P. putida</i> S12 <i>P. taiwanensis</i> VLB120	(Yao <i>et al.</i> , 2021; Volmer <i>et al.</i> , 2014; Rojas <i>et al.</i> , 2001, 2004; Kieboom <i>et al.</i> , 1998)
MexCD-OprJ	RND	Antibiotika, Polyphenole (bspw.: Phloretin), Triclosan, Acriflavin, Alkaloide (bspw.: Berberin)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>P. syringae</i> B728a	(Helmann <i>et al.</i> , 2019; Chuanchuen <i>et al.</i> , 2003)
MexEF-OprN	RND	Antibiotika, Polyphenole (bspw.: Phloretin), Triclosan, Alkaloide (bspw.: Berberin), Formaldehyd <sup>§</sup> , Glykolaldehyde <sup>§</sup> , Vanillin <sup>§</sup> , 2,2-Bipyridin	<i>P. putida</i> KT2440 <i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>P. syringae</i> B728a	(Henríquez <i>et al.</i> , 2020; Helmann <i>et al.</i> , 2019; Jayakody <i>et al.</i> , 2018; Simon <i>et al.</i> , 2014; Roca <i>et al.</i> , 2008; Chuanchuen <i>et al.</i> , 2003)
MexHI-OpmD	RND	Phenazine (bspw.: 5-Methylphenazin-1-carboxylat), Antibiotika	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>P. aeruginosa</i> PA14	(Sakhtah <i>et al.</i> , 2016; Wang <i>et al.</i> , 2011)
ParXY-TtgC MexXY-OprM	RND	Antibiotika	<i>P. putida</i> KT2440 <i>P. aeruginosa</i> PAO1	(Puja <i>et al.</i> , 2020; Masuda <i>et al.</i> , 2000)
Ttg2ABC	ABC	Antibiotika, Toluol, <i>p</i> -Coumarinsäure, Schwermetalle, <i>tert</i> -butyl Hydroperoxid	<i>P. putida</i> KT2440 <i>P. putida</i> DOT-T1E	(Calero <i>et al.</i> , 2018; García <i>et al.</i> , 2010)
TtgK	MFS	Toluol	<i>P. putida</i> DOT-T1E	(García <i>et al.</i> , 2010)
PP_1271-73 <sup>#</sup>	MFS	4-Hydroxybenzoat, Vanillin <sup>§</sup> , 3-Chlorobenzoat <sup>§</sup> , Propionat, Toluol <sup>§</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 <i>P. putida</i> S12	(Ma <i>et al.</i> , 2021; Simon <i>et al.</i> , 2014; Wang <i>et al.</i> , 2011; Verhoef <i>et al.</i> , 2010; Volkers <i>et al.</i> , 2009)
PP_3349 <sup>#</sup>	MFS	Formaldehyd <sup>§</sup>	<i>P. putida</i> KT2440	(Roca <i>et al.</i> , 2008)
PP_3658 <sup>#</sup>	MFS	Formaldehyd <sup>§</sup>	<i>P. putida</i> KT2440	(Roca <i>et al.</i> , 2008)
Psyr_0228 <sup>+</sup>	MFS	Antibiotika	<i>P. syringae</i> B728a	(Helmann <i>et al.</i> , 2019)
NorM_PS	MATE	Antibiotika, 4',6-diamidino-2-phenylindol	<i>P. stutzeri</i> ATCC 14405	(Nie <i>et al.</i> , 2016)
Psyr_0541 <sup>+</sup>	SMR	Antibiotika, Alkaloide (bspw.: Berberin)	<i>P. syringae</i> B728a	(Helmann <i>et al.</i> , 2019)
EmrE	SMR	Antibiotika	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	(Li <i>et al.</i> , 2003)

Diese Tabelle beinhaltet die wichtigsten Extrusionstransporter, ihre Superfamilien, Substrate und Wirte, nicht aber eine vollständige Liste aller. RND: „Resistance-Nodulation Division“; ABC: ATP-bindende Kassette; MFS: Major-Faciator-Superfamilie; MATE: Multi-antibakterielles Extrusionsprotein; SMR: „small multidrug resistance“.

\* Die gelisteten Substrate sind repräsentativ und können sich je nach Wirt unterscheiden. Viele Transporter

haben außerdem ein breites Substratspektrum.

§ vermutetes Substrat aufgrund von einer Reaktion auf die Überproduktion des Transporters. Eine Resistenz wurde nicht nachgewiesen.

# Transportername nicht verfügbar; Locus tag von *P. putida* KT2440 als Referenz

\* Transportername nicht verfügbar; Locus tag von *P. syringae* B728a als Referenz.

Die Tabelle wurde nach Bitzenhofer *et al.* (2021) modifiziert; veröffentlicht unter der CC BY 4.0-Lizenz

**Tab. A2: Locus-Tags der homologen Efflux-Transportproteine in *Halopseudomonas* spp.**

Name	<i>H. aestusnigri</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. bauzanensis</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. litoralis</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. oceani</i> Locus-Tag	% ident
RND								
<a href="#">TtgABC</a>	WP_088276433.1	62	WP_036993090.1	64	WP_090271526.1	63	WP_104739348.1	63
<a href="#">MexAB-OprM</a>	WP_088276434.1	78	WP_036993088.1	74	WP_090271527.1	74	WP_104739349.1	78
	WP_088276435.1	59	WP_074779296.1	60	WP_090271528.1	61	WP_104739350.1	61
<a href="#">TtgDEF</a>	WP_088276433.1	60	WP_036993090.1	58	WP_090271526.1	71	WP_104739348.1	60
	WP_088276434.1	64	WP_036993088.1	62	WP_090275708.1	76	WP_104739349.1	63
	WP_088276435.1	50	WP_074779296	55	WP_090275707.1	63	WP_104739350.1	52
<a href="#">TtgGHI</a>	WP_088276433.1	60	WP_036993090.1	59	WP_157718711.1	73	WP_104739348.1	59
	WP_088276434.1	65	WP_036993088.1	63	WP_090275708.1	78	WP_104739349.1	64
	WP_088276435.1	52	WP_074779296	55	WP_090275707.1	64	WP_104739350.1	52
<a href="#">MexCE-OprJ</a>	WP_088276433.1	46	WP_036988690.1	57	-	-	WP_104739348.1	47
	WP_088276434.1	51	WP_07477990.1	71	WP_090275708.1	51	WP_104739349.1	51
	WP_088276435.1	43	-	-	-	-	-	-
<a href="#">MexEF-OprN</a>	WP_200818468.1	45	WP_036992865.1	46	WP_090271652.1	44	WP_211287161.1	45
	WP_088276892.1	56	WP_036992866.1	58	WP_090271651.1	58	WP_104739139.1	56
	WP_088276894.1	40	WP_051611365.1	40	WP_090271650.1	40	WP_104739138.1	41
<a href="#">MexHI-OpmD</a>	WP_088277898.1	29	WP_036988832.1	25	WP_090271526.1	25	WP_104736802.1	38
	WP_088276434.1	33	WP_036992866.1	34	WP_090271651.1	34	WP_104739349.1	33
	WP_088276435.1	32	WP_051611365.1	33	WP_090271650.1	33	WP_104739138.1	34
<a href="#">ParXY-TtgC</a>	WP_088275157.1	29	WP_074777988.1	44	WP_157718711.1	41	WP_104739348.1	39
	WP_088276434.1	52	WP_074777990.1	53	WP_090271527.1	50	WP_104739349.1	51
<a href="#">MexXY-OprM</a>	WP_088276435.1	59	WP_074779296.1	60	WP_090271528.1	61	WP_104739350.1	61
ABC								
<a href="#">Ttg2ABC</a>	WP_088273893.1	83	WP_036992789.1	81	WP_090271708.1	80	WP_104739746.1	82
	WP_088273245.1	89	WP_036992788.1	81	WP_090271709.1	81	WP_104739745.1	80
	WP_088273246.1	67	WP_036992786.1	67	WP_090271710.1	68	WP_104739744.1	67
MFS								
<a href="#">TtgK</a>	WP_088275281.1	31	WP_036989560.1	27	WP_090273103.1	28	WP_104737579.1	31
<a href="#">PP_1271-73</a>	WP_235005733.1	29	WP_074780630.1	30	WP_231702271.1	30	WP_229744423.1	30
	WP_088274103.1	40	WP_074780633.1	41	WP_090272271.1	39	WP_104738484.1	40
	WP_088276435.1	33	WP_074778131.1	37	WP_157718545.1	35	WP_104739350.1	34
<a href="#">PP_3658</a>	OWL89294.1	24	WP_074777994.1	78	WP_090272724.1	24	WP_104737497.1	23
<a href="#">PP_3349</a>	WP_172409654.1	26	WP_074777994.1	29	-	-	WP_104737497.1	26
<a href="#">Psyr_0228</a>	WP_088276258.1	60	WP_063608031.1	29	WP_090272417.1	29	WP_104739906.1	59
MATE								
<a href="#">NormM-PS</a>	WP_088273880.1	53	WP_074778748.1	52	WP_090273165.1	52	WP_104738571.1	53
SMR								
<a href="#">Psyr_0541</a>	WP_088276108.1	53	WP_036991265.1	59	WP_090271754.1	64	WP_104736476.1	55
<a href="#">EmrE</a>	WP_088276108.1	56	WP_036991265.1	54	WP_090271754.1	61	WP_104736476.1	56

Als Vergleichsequenz dienten die Aminosäuresequenzen der repräsentativen Wirte aus **Tab. A1**. Die Sequenzen sind als Link bei den Proteinnamen hinterlegt. Die gezeigten Treffer sind zugehörig zu der Auflistung aus **Tab. 3.3** (grün hinterlegt). Es sind lediglich die Treffer gezeigt, die eine Sequenzidentität  $\geq 40\%$  Sequenzidentität aufwiesen und in der „Non-redundant protein sequences (nr)“ Datenbank hinterlegt waren: *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93 (DSM22558), *H. litoralis* 2SM5 oder *H. oceani* KX20 (DSM100277).

**Tab. A3: Transformationseffizienzbestimmung anhand der Anzahl koloniebildender Einheiten vor und nach der Elektroporation.**

Stamm		CFU auf LB <sub>Rif</sub> -Agar	CFU auf LB <sub>Rif/Gm</sub> -Agar
<i>H. aestusnigri</i> VGXO14R	vor Elektroporation	4*10 <sup>8</sup>	-
	K (H <sub>2</sub> O)	-	-
	pJT <sup>+</sup> Tmcs	2*10 <sup>9</sup>	4*10 <sup>5</sup>
<i>H. bauzanensis</i> BZ93R	vor Elektroporation	3*10 <sup>10</sup>	-
	K (H <sub>2</sub> O)	3*10 <sup>8</sup>	-
	pJT <sup>+</sup> Tmcs	4*10 <sup>8</sup>	320
<i>H. litoralis</i> 2SM5R	vor Elektroporation	2*10 <sup>9</sup>	-
	K (H <sub>2</sub> O)	3*10 <sup>9</sup>	-
	pJT <sup>+</sup> Tmcs	1*10 <sup>9</sup>	7*10 <sup>5</sup>
<i>H. oceani</i> KX20R	vor Elektroporation	3*10 <sup>12</sup>	-
	K (H <sub>2</sub> O)	5*10 <sup>11</sup>	-
	pJT <sup>+</sup> Tmcs	3*10 <sup>12</sup>	2*10 <sup>6</sup>

Zur Transformation wurden 111 ng des Plasmids oder H<sub>2</sub>O als Kontrolle zu den Zellen gegeben.

**Tab. A4: Übersicht der wells A1-F12 in der Mikrotiterplatte Phenotype Microarray™ PM9 gemäß der Herstellerangaben.**

well	Inhalt	well	Inhalt	well	Inhalt
A1	1 % NaCl	B1	6 % NaCl	C1	6 % NaCl + KCl
A2	2 % NaCl	B2	6 % NaCl + Betain	C2	6 % NaCl + L-Prolin
A3	3 % NaCl	B3	6 % NaCl + <i>N-N</i> -Dimethylglycin	C3	6 % NaCl + <i>N</i> -Acetyl-L-glutamin
A4	4 % NaCl	B4	6 % NaCl + Sarkosin	C4	6 % NaCl + L-Glutamin
A5	5 % NaCl	B5	6 % NaCl + Dimethylsulfonylpropionat	C5	6 % NaCl + $\gamma$ -Amino- <i>N</i> -Buttersäure
A6	5,5 % NaCl	B6	6 % NaCl + MOPS	C6	6 % NaCl + Glutathion
A7	6 % NaCl	B7	6 % NaCl + Ectoin	C7	6 % NaCl + Glycerin
A8	6,5 % NaCl	B8	6 % NaCl + Cholin	C8	6 % NaCl + Trehalose
A9	7 % NaCl	B9	6 % NaCl + Phosphorylcholin	C9	6 % NaCl + Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
A10	8 % NaCl	B10	6 % NaCl + Kreatin	C10	6 % NaCl + Trimethylamin
A11	9 % NaCl	B11	6 % NaCl + Kreatinin	C11	6 % NaCl + Octopin
A12	10 % NaCl	B12	6 % NaCl + L-Carnitin	C12	6 % NaCl + Trigonellin
D1	3 % KCl	E1	1 % Natriumformiat	F1	1 % Natriumlaktat
D2	4 % KCl	E2	2 % Natriumformiat	F2	2 % Natriumlaktat
D3	5 % KCl	E3	3 % Natriumformiat	F3	3 % Natriumlaktat
D4	6 % KCl	E4	4 % Natriumformiat	F4	4 % Natriumlaktat
D5	2 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	E5	5 % Natriumformiat	F5	5 % Natriumlaktat
D6	3 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	E6	6 % Natriumformiat	F6	6 % Natriumlaktat
D7	4 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	E7	2 % Harnstoff	F7	7 % Natriumlaktat
D8	5 % Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	E8	3 % Harnstoff	F8	8 % Natriumlaktat
D9	5 % Ethylenglykol	E9	4 % Harnstoff	F9	9 % Natriumlaktat
D10	10 % Ethylenglykol	E10	5 % Harnstoff	F10	10 % Natriumlaktat
D11	15 % Ethylenglykol	E11	6 % Harnstoff	F11	11 % Natriumlaktat
D12	20 % Ethylenglykol	E12	7 % Harnstoff	F12	12 % Natriumlaktat

**Tab. A5: Sequenzvergleich der Proteine der Ectoinbiosynthese in ausgewählten *Halopseudomonas spp* mit *S. sutzeri*-Proteinen mittels BLASTp**

Protein	<i>H. aestusnigri</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. bauzanensis</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. litoralis</i> Locus-Tag	% ident	<i>H. oceani</i> Locus-Tag	% ident
<a href="#">Ask</a>	<a href="#">WP_088273584.1</a>	84	<a href="#">WP_074778119.1</a>	81	<a href="#">WP_090272138.1</a>	81	<a href="#">WP_104737915.1</a>	83
<a href="#">ect</a>								
<a href="#">Asd</a>	<a href="#">WP_088275190.1</a>	34	<a href="#">WP_036989590.1</a>	39	<a href="#">WP_157718642.1</a>	37	<a href="#">WP_170063008.1</a>	33
<a href="#">EctA</a>	<a href="#">WP_088273587.1</a>	72	<a href="#">WP_036988824.1</a>	70	<a href="#">WP_090272141.1</a>	69	<a href="#">WP_104737912.1</a>	71
<a href="#">EctB</a>	<a href="#">WP_088273586.1</a>	81	<a href="#">WP_074778123.1</a>	79	<a href="#">WP_090272140.1</a>	81	<a href="#">WP_104737913.1</a>	81
<a href="#">EctC</a>	<a href="#">WP_088273585.1</a>	78	<a href="#">WP_074778121.1</a>	80	<a href="#">WP_090272139.1</a>	83	<a href="#">WP_104737914.1</a>	79
<a href="#">EctD</a>			<a href="#">WP_177173374.1</a>	70	<a href="#">WP_172828667.1</a>	69		

Die Sequenzen sind als Link bei den Proteinennamen hinterlegt. Es sind lediglich die Treffer gezeigt, die eindeutig *H. aestusnigri* VGXO14, *H. bauzanensis* BZ93 (DSM22558), *H. litoralis* 2SM5 oder *H. oceani* KX20 (DSM100277) zugeordnet werden konnte.

**Tab. A6: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von *H. litoralis* 1h nach Induktion des osmotischen Stresses als signifikant hoch abundant im Vergleich zur ungestressten Kontrolle identifiziert wurden.**

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_0817	protein of unknown function	6,08
SAMN05216198_1892	3-isopropylmalate dehydratase, large subunit	4,34
SAMN05216198_3132	hypothetical protein	4,17
SAMN05216198_1891	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	3,87
SAMN05216198_3460	Osmotically-inducible protein OsmY, contains BON domain	3,69
SAMN05216198_3459	Uncharacterized membrane protein YtjA, UPF0391 family	3,66
SAMN05216198_2236	hypothetical protein	3,62
SAMN05216198_3458	HNH endonuclease	3,62
SAMN05216198_2861	ATP-binding cassette, subfamily C, CydC	3,45
SAMN05216198_2245	Protein of unknown function	3,43
SAMN05216198_2234	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	3,38
SAMN05216198_3457	Cytochrome b	3,31
SAMN05216198_0184	Cytochrome c, mono-and diheme variants	3,28
SAMN05216198_3133	hypothetical protein	3,24
SAMN05216198_2235	Rubryerythrin	3,20
SAMN05216198_2246	hypothetical protein	3,19
SAMN05216198_2349	chromate reductase	3,17
SAMN05216198_1091	Small-conductance mechanosensitive channel	3,14
SAMN05216198_0802	aspartate kinase	3,13
SAMN05216198_3166	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	3,11
SAMN05216198_3148	hypothetical protein	3,11
SAMN05216198_2689	hypothetical protein	3,10
SAMN05216198_3149	Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily protein	3,09
SAMN05216198_1890	3-isopropylmalate dehydrogenase	3,08
SAMN05216198_1113	Predicted arabinose efflux permease, MFS family	3,05
SAMN05216198_2244	Protein of unknown function	3,04
SAMN05216198_3165	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha subunit	3,02
SAMN05216198_0187	quinol:cytochrome c oxidoreductase pentaheme cytochrome subunit	3,00
SAMN05216198_2383	UPF0716 protein FxsA	3,00
SAMN05216198_0185	monoamine oxidase	2,94
SAMN05216198_0803	ectoine hydroxylase	2,94
SAMN05216198_3170	NADPH:quinone reductase	2,93
SAMN05216198_2862	ATP-binding cassette, subfamily C, CydD	2,92
SAMN05216198_0189	quinol:cytochrome c oxidoreductase quinone-binding subunit 1	2,92
SAMN05216198_2241	hypothetical protein	2,92
SAMN05216198_2690	hypothetical protein	2,89
SAMN05216198_1081	uncharacterized protein	2,88
SAMN05216198_2233	starch synthase (maltosyl-transferring)	2,87
SAMN05216198_0411	anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator	2,86
SAMN05216198_0352	HlyD family secretion protein	2,84
SAMN05216198_1704	hypothetical protein	2,81
SAMN05216198_0806	diaminobutyrate acetyltransferase	2,79
SAMN05216198_0188	quinol:cytochrome c oxidoreductase iron-sulfur protein precursor	2,78
SAMN05216198_0182	acetylornithine aminotransferase/4-aminobutyrate aminotransferase	2,77
SAMN05216198_0986	molecular chaperone HtpG	2,77
SAMN05216198_2658	TatD DNase family protein	2,75
SAMN05216198_2863	cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2 apoprotein	2,73
SAMN05216198_3164	methylglutaconyl-CoA hydratase	2,73
SAMN05216198_2243	Rho termination factor, N-terminal domain	2,71
SAMN05216198_2871	pyruvate dehydrogenase (quinone)	2,71
SAMN05216198_2485	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpB	2,69
SAMN05216198_1142	2,4-dienoyl-CoA reductase	2,65

TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_3137	Phytoene dehydrogenase-related protein	2,65
SAMN05216198_0186	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III	2,64
SAMN05216198_0805	diaminobutyrate aminotransferase apoenzyme	2,62
SAMN05216198_3519	TniB protein	2,62
SAMN05216198_3163	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit	2,61
SAMN05216198_0588	membrane protein	2,61
SAMN05216198_3053	hydrolase, peptidase M42 family	2,61
SAMN05216198_0174	Erythromycin esterase homolog	2,60
SAMN05216198_0348	Protein of unknown function, DUF488	2,59
SAMN05216198_0460	succinyldiaminopimelate desuccinylase	2,59
SAMN05216198_0671	hypothetical protein	2,59
SAMN05216198_0627	DNA topoisomerase-1	2,57
SAMN05216198_1863	ATP dependent PIM1 peptidase. Serine peptidase. MEROPS family S16	2,56
SAMN05216198_3601	oligopeptidase A Metallo peptidase. MEROPS family M03A	2,56
SAMN05216198_3520	putative transposase	2,56
SAMN05216198_0804	ectoine synthase	2,55
SAMN05216198_1772	Na <sup>+</sup> /proline symporter	2,55
SAMN05216198_2228	Metal-dependent hydrolase, endonuclease/exonuclease/phosphatase family	2,54
SAMN05216198_0032	molecular chaperone DnaJ	2,54
SAMN05216198_3052	GNAT-family acetyltransferase TIGR03103	2,54
SAMN05216198_2227	Uncharacterized conserved protein YecE, DUF72 family	2,53
SAMN05216198_3172	hypothetical protein	2,53
SAMN05216198_1082	putative membrane protein	2,52
SAMN05216198_2864	cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 apoprotein	2,52
SAMN05216198_2385	Protein of unknown function, DUF481	2,51
SAMN05216198_0062	hypothetical protein	2,50
SAMN05216198_2242	Alcohol dehydrogenase GroES-associated	2,50
SAMN05216198_0351	trimethylamine monooxygenase	2,50
SAMN05216198_0033	dihydrodipicolinate reductase	2,47
SAMN05216198_0987	hypothetical protein	2,46
SAMN05216198_1996	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase	2,45
SAMN05216198_0031	molecular chaperone DnaK	2,45
SAMN05216198_0626	conserved hypothetical protein	2,45
SAMN05216198_3576	ribonuclease J	2,44
SAMN05216198_2766	extracellular solute-binding protein, family 3	2,44
SAMN05216198_1263	transcriptional regulator, AsnC family	2,43
SAMN05216198_2229	cardiolipin synthase	2,43
SAMN05216198_3667	outer membrane protein, multidrug efflux system	2,43
SAMN05216198_2656	Multimeric flavodoxin WrbA	2,42
SAMN05216198_2382	chaperonin GroES	2,42
SAMN05216198_0949	type VI secretion system protein ImpB	2,42
SAMN05216198_0463	protein of unknown function	2,41
SAMN05216198_2691	hypothetical protein	2,40
SAMN05216198_2232	trehalose synthase	2,40
SAMN05216198_0034	2,4-dienoyl-CoA reductase	2,40
SAMN05216198_0064	hypothetical protein	2,39
SAMN05216198_0547	hypothetical protein	2,37
SAMN05216198_3399	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	2,37
SAMN05216198_3328	2-nitropropane dioxygenase precursor	2,37
SAMN05216198_1995	hypothetical protein	2,37
SAMN05216198_0404	hypothetical protein	2,37
SAMN05216198_3011	two component transcriptional regulator, LytTR family	2,36
SAMN05216198_2231	1,4-alpha-glucan branching enzyme	2,36
SAMN05216198_3518	TniQ protein	2,36
SAMN05216198_3138	Protein of unknown function	2,36
SAMN05216198_0819	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase	2,35
SAMN05216198_2701	Protein of unknown function	2,35
SAMN05216198_1856	protein of unknown function	2,35

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_1650	succinate-semialdehyde dehydrogenase / glutarate-semialdehyde dehydrogenase	2,34
SAMN05216198_3168	3-oxoacid CoA-transferase subunit B	2,34
SAMN05216198_2431	Membrane carboxypeptidase (penicillin-binding protein)	2,34
SAMN05216198_3704	ATP-dependent HslUV protease ATP-binding subunit HslU	2,34
SAMN05216198_1159	glutamate dehydrogenase (NAD)	2,33
SAMN05216198_1701	Iron-regulated ABC transporter membrane component SufB	2,33
SAMN05216198_3162	isovaleryl-CoA dehydrogenase	2,33
SAMN05216198_1927	transcriptional regulator, AraC family	2,32
SAMN05216198_3169	acetyl-CoA C-acetyltransferase	2,31
SAMN05216198_2798	cytochrome b561	2,31
SAMN05216198_1679	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	2,30
SAMN05216198_3051	asparagine synthase (glutamine-hydrolysing)	2,27
SAMN05216198_2184	Predicted arabinose efflux permease, MFS family	2,27
SAMN05216198_2151	fumarase, class II	2,26
SAMN05216198_0751	hypothetical protein	2,25
SAMN05216198_3703	DUF971 family protein	2,24
SAMN05216198_0030	molecular chaperone GrpE	2,24
SAMN05216198_2226	Threonine dehydrogenase	2,23
SAMN05216198_3362	Uncharacterized conserved protein	2,22
SAMN05216198_0181	Phosphoglycerate dehydrogenase	2,22
SAMN05216198_0281	dimethylhistidine N-methyltransferase	2,22
SAMN05216198_3167	3-oxoacid CoA-transferase subunit A	2,22
SAMN05216198_3577	Spore maturation protein SpmA	2,21
SAMN05216198_3598	cytochrome c oxidase subunit 2	2,20
SAMN05216198_0820	S-formylglutathione hydrolase	2,20
SAMN05216198_0983	uncharacterized domain 1-containing protein	2,20
SAMN05216198_0950	type VI secretion system protein VasJ	2,20
SAMN05216198_1089	Predicted outer membrane protein	2,19
SAMN05216198_1764	Uncharacterized conserved protein	2,19
SAMN05216198_1651	glucose-6-phosphate 1-epimerase	2,18
SAMN05216198_1124	Signal transduction histidine kinase	2,18
SAMN05216198_1990	zinc transporter, ZIP family	2,18
SAMN05216198_0349	Protein of unknown function	2,17
SAMN05216198_2014	two-component system, OmpR family, response regulator RstA	2,16
SAMN05216198_3517	Site-specific DNA recombinase	2,16
SAMN05216198_1123	DNA-binding response regulator, OmpR family, contains REC and winged-helix (wHTH) domain	2,15
SAMN05216198_3012	Sensory transduction protein kinase AlgZ	2,15
SAMN05216198_1365	integrating conjugative element protein, PFL_4701 family	2,15
SAMN05216198_1641	NADPH-glutathione reductase	2,13
SAMN05216198_0951	Tetratricopeptide repeat-containing protein	2,13
SAMN05216198_0875	uncharacterized protein involved in response to NO	2,13
SAMN05216198_3161	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	2,12
SAMN05216198_3121	methyl-accepting chemotaxis protein	2,12
SAMN05216198_1080	LemA protein	2,11
SAMN05216198_1889	aspartate semialdehyde dehydrogenase	2,09
SAMN05216198_1898	Phospholipase_D-nuclease N-terminal	2,09
SAMN05216198_3247	uncharacterized domain 1-containing protein	2,09
SAMN05216198_3136	Cytochrome P450	2,08
SAMN05216198_3277	Murein DD-endopeptidase MepM and murein hydrolase activator NlpD, contain LysM domain	2,08
SAMN05216198_2702	protease I	2,08
SAMN05216198_1197	Iron-containing redox enzyme	2,08
SAMN05216198_0883	fatty-acid peroxygenase	2,08
SAMN05216198_3227	hypothetical protein	2,07
SAMN05216198_0462	Outer membrane protein OmpA	2,07
SAMN05216198_1761	hypothetical protein	2,06
SAMN05216198_2289	Uncharacterized membrane protein YGL010W	2,06
SAMN05216198_2760	hypothetical protein	2,05
SAMN05216198_2381	chaperonin GroEL	2,05
SAMN05216198_2230	hypothetical protein	2,04

TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_2240	DNA end-binding protein Ku	2,04
SAMN05216198_2247	Predicted outer membrane protein	2,03
SAMN05216198_1702	transcriptional regulator, BadM/Rrf2 family	2,03
SAMN05216198_2789	Protein of unknown function	2,03
SAMN05216198_2786	L-lactate dehydrogenase (cytochrome)	2,03
SAMN05216198_1698	cysteine desulfurase / selenocysteine lyase	2,02
SAMN05216198_0461	Protein of unknown function	2,02
SAMN05216198_3251	transcriptional regulator, IclR family	2,02
SAMN05216198_3578	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	2,00
SAMN05216198_0173	ABC-2 type transport system permease protein	1,99
SAMN05216198_2253	hypothetical protein	1,99
SAMN05216198_2046	hypothetical protein	1,99
SAMN05216198_3124	Reductase C-terminal	1,99
SAMN05216198_2742	hypothetical protein	1,99
SAMN05216198_2785	D-lactate dehydrogenase	1,98
SAMN05216198_3363	superoxide dismutase, Cu-Zn family	1,98
SAMN05216198_1292	Exodeoxyribonuclease III	1,98
SAMN05216198_0403	cytochrome c oxidase subunit I+III	1,96
SAMN05216198_2239	ATP-dependent DNA ligase LigD phosphoesterase module /ATP-dependent DNA ligase LigD polymerase module	1,96
SAMN05216198_2557	cell division-specific peptidoglycan biosynthesis regulator FtsW	1,96
SAMN05216198_0405	Cytochrome c oxidase assembly factor CtaG	1,94
SAMN05216198_3122	Predicted arabinose efflux permease, MFS family	1,94
SAMN05216198_3224	Subtilase family protein	1,93
SAMN05216198_3666	lipid A 3-O-deacylase	1,93
SAMN05216198_1921	MFS transporter, DHA1 family, bicyclomycin/chloramphenicol resistance protein	1,92
SAMN05216198_2013	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase RstB	1,90
SAMN05216198_2821	acyl-phosphate glycerol-3-phosphate acyltransferase	1,90
SAMN05216198_1666	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS	1,89
SAMN05216198_1699	Iron-regulated ABC transporter permease protein SufD	1,88
SAMN05216198_3068	hypothetical protein	1,88
SAMN05216198_1888	aspartate semialdehyde dehydrogenase	1,88
SAMN05216198_1000	Phage integrase family protein	1,88
SAMN05216198_3123	ferredoxin, 2Fe-2S	1,88
SAMN05216198_2347	gluconate kinase, SKI family	1,87
SAMN05216198_3705	HslV component of HslUV peptidase. Threonine peptidase. MEROPS family T01B	1,87
SAMN05216198_0402	cytochrome c oxidase subunit 2	1,86
SAMN05216198_1759	protein of unknown function	1,86
SAMN05216198_0179	hypothetical protein/aminotransferase	1,86
SAMN05216198_3603	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	1,86
SAMN05216198_1140	hypothetical protein	1,86
SAMN05216198_3668	multidrug efflux pump	1,85
SAMN05216198_0921	hypothetical protein	1,85
SAMN05216198_2589	Glucoamylase (glucan-1,4-alpha-glucosidase), GH15 family	1,84
SAMN05216198_2256	sigma-54 specific transcriptional regulator, flagellar regulatory protein A	1,83
SAMN05216198_0190	quinol:cytochrome c oxidoreductase membrane protein	1,83
SAMN05216198_2056	hypothetical protein	1,83
SAMN05216198_0087	penicillin-binding protein 1B	1,82
SAMN05216198_1739	Murein L,D-transpeptidase YcbB/YkuD	1,81
SAMN05216198_3013	argininosuccinate lyase	1,81
SAMN05216198_3275	Uncharacterized membrane protein	1,81
SAMN05216198_0035	hypothetical protein	1,81
SAMN05216198_1088	PhnB protein	1,80
SAMN05216198_3139	Lysophospholipase, alpha-beta hydrolase superfamily	1,80
SAMN05216198_2561	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase	1,79
SAMN05216198_3360	nitric oxide reductase NorQ protein	1,79
SAMN05216198_0852	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	1,79
SAMN05216198_0400	Uncharacterized membrane protein	1,79
SAMN05216198_3587	2,4-dienoyl-CoA reductase	1,79

Gename	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_0984	uncharacterized domain 1-containing protein	1,79
SAMN05216198_3398	c-di-GMP-binding flagellar brake protein YcgR, contains PilZNR and PilZ domains	1,78
SAMN05216198_2484	UDP-glucose:(heptosyl)LPS alpha-1,3-glucosyltransferase	1,77
SAMN05216198_1506	RES domain-containing protein	1,77
SAMN05216198_0192	quinol:cytochrome c oxidoreductase quinone-binding subunit 2	1,76
SAMN05216198_1083	Uncharacterized conserved protein, DUF2147 family	1,75
SAMN05216198_2138	Signal transduction histidine kinase	1,75
SAMN05216198_0172	ABC-2 type transport system ATP-binding protein	1,74
SAMN05216198_1313	PAS domain S-box-containing protein/diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	1,74
SAMN05216198_2635	acetate kinase	1,73
SAMN05216198_2680	ADP-ribose diphosphatase	1,73
SAMN05216198_1649	hypothetical protein	1,73
SAMN05216198_0176	NADP-dependent 3-hydroxy acid dehydrogenase YdfG	1,72
SAMN05216198_2712	Glycine cleavage system regulatory protein	1,72
SAMN05216198_1937	Membrane protein involved in the export of O-antigen and teichoic acid	1,71
SAMN05216198_3615	outer membrane transport energization protein TonB	1,71
SAMN05216198_1862	oligopeptidase B Serine peptidase. MEROPS family S09A	1,70
SAMN05216198_2839	efflux transporter, outer membrane factor (OMF) lipoprotein, NodT family	1,70
SAMN05216198_2647	nitric oxide dioxygenase	1,70
SAMN05216198_1589	plasmid segregation oscillating ATPase ParF	1,70
SAMN05216198_1367	conjugative transfer region protein, TIGR03750 family	1,70
SAMN05216198_1897	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	1,69
SAMN05216198_2767	cation diffusion facilitator family transporter	1,69
SAMN05216198_3455	sulfate permease, SulP family	1,69
SAMN05216198_1507	hypothetical protein	1,69
SAMN05216198_0408	hypothetical protein	1,68
SAMN05216198_2559	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase	1,67
SAMN05216198_3357	hypothetical protein	1,67
SAMN05216198_0854	acyl-CoA dehydrogenase	1,67
SAMN05216198_2387	MFS transporter, PAT family, beta-lactamase induction signal transducer AmpG	1,67
SAMN05216198_0180	aspartyl-tRNA(Asn)/glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	1,66
SAMN05216198_3151	transcriptional regulator, TetR family	1,66
SAMN05216198_1771	hypothetical protein	1,66
SAMN05216198_0992	ABC-2 type transport system permease protein	1,66
SAMN05216198_1128	Uncharacterized conserved protein	1,65
SAMN05216198_2221	maltooligosyl trehalose hydrolase	1,65
SAMN05216198_1079	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	1,65
SAMN05216198_0807	arginine decarboxylase	1,64
SAMN05216198_2779	transcriptional regulator, ArsR family	1,64
SAMN05216198_2590	glucose 1-dehydrogenase	1,64
SAMN05216198_1640	Hemerythrin HHE cation binding domain-containing protein	1,64
SAMN05216198_2761	hypothetical protein	1,63
SAMN05216198_2238	Protein of unknown function	1,63
SAMN05216198_0617	Cell division and transport-associated protein TolA	1,63
SAMN05216198_0193	hypothetical protein	1,62
SAMN05216198_1369	integrating conjugative element protein, PFL_4704 family	1,62
SAMN05216198_1700	Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit SufC	1,61
SAMN05216198_3104	hypothetical protein	1,60
SAMN05216198_1603	hypothetical protein	1,60
SAMN05216198_2562	peptidoglycan synthetase FtsI	1,59
SAMN05216198_2740	Lysophospholipase, alpha-beta hydrolase superfamily	1,59
SAMN05216198_1977	polysaccharide export outer membrane protein	1,59
SAMN05216198_3597	cytochrome c oxidase subunit 1	1,59
SAMN05216198_0991	ABC-2 type transport system ATP-binding protein	1,59
SAMN05216198_0948	type VI secretion system protein ImpC	1,59
SAMN05216198_2837	Multidrug efflux pump subunit AcrB	1,58
SAMN05216198_0929	Predicted methyltransferase	1,58

## TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_2759	Glutaredoxin	1,58
SAMN05216198_1129	chromate transporter	1,58
SAMN05216198_0147	type IV pilus assembly protein PilX	1,58
SAMN05216198_1491	Uncharacterized conserved protein	1,57
SAMN05216198_3600	hypothetical protein	1,57
SAMN05216198_3067	hypothetical protein	1,56
SAMN05216198_1760	thioredoxin 1	1,56
SAMN05216198_2209	hypothetical protein	1,56
SAMN05216198_0615	Cell division and transport-associated protein TolQ	1,55
SAMN05216198_3047	Dicarboxylate transport	1,55
SAMN05216198_0248	protein of unknown function	1,55
SAMN05216198_2305	membrane-bound lytic murein transglycosylase B	1,55
SAMN05216198_0451	ABC-2 type transport system ATP-binding protein	1,54
SAMN05216198_0989	acyl-CoA dehydrogenase	1,54
SAMN05216198_3364	hypothetical protein	1,54
SAMN05216198_3864	Putative amidoligase enzyme	1,54
SAMN05216198_3173	hypothetical protein	1,54
SAMN05216198_3669	membrane fusion protein, multidrug efflux system	1,54
SAMN05216198_3811	FO synthase subunit 1	1,54
SAMN05216198_1160	Protein of unknown function	1,53
SAMN05216198_1678	OmpA-OmpF porin, OOP family	1,53
SAMN05216198_0191	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III	1,53
SAMN05216198_3135	hypothetical protein	1,53
SAMN05216198_2436	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein	1,53
SAMN05216198_3474	Protein of unknown function	1,53
SAMN05216198_1928	NDP-sugar epimerase, includes UDP-GlcNAc-inverting 4,6-dehydratase FlaA1 and capsular polysaccharide biosynthesis protein EpsC	1,52
SAMN05216198_2220	starch synthase	1,52
SAMN05216198_0420	short chain enoyl-CoA hydratase	1,52
SAMN05216198_1691	Uncharacterized membrane protein YqaE, homolog of Blt101, UPF0057 family	1,52
SAMN05216198_1919	transcriptional regulator, MerR family	1,52
SAMN05216198_2499	large conductance mechanosensitive channel	1,51
SAMN05216198_2218	hypothetical protein	1,51
SAMN05216198_2483	heptose I phosphotransferase	1,51
SAMN05216198_2208	septum site-determining protein MinC	1,51
SAMN05216198_3374	glycerate kinase	1,51
SAMN05216198_3317	hypothetical protein	1,51
SAMN05216198_3369	transcriptional regulator, LysR family	1,51
SAMN05216198_0409	membrane glycosyltransferase	1,50
SAMN05216198_1781	DNA-binding transcriptional response regulator, NtrC family, contains REC, AAA-type ATPase, and a Fis-type DNA-binding domains	1,50
SAMN05216198_0459	23S rRNA m(1)G-745 methyltransferase	1,50
SAMN05216198_3361	nitric oxide reductase NorD protein	1,50

**Tab. A7: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von *H. litoralis* 1h nach Induktion des osmotischen Stresses als signifikant niedrig abundant im Vergleich zur ungestressten Kontrolle identifiziert wurden**

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_2172	flagellar basal-body rod protein FlgG	-4,78
SAMN05216198_3782	outer membrane protein	-4,31
SAMN05216198_2173	flagellar basal-body rod protein FlgF	-4,08
SAMN05216198_1325	hypothetical protein	-4,02
SAMN05216198_0357	cytochrome c peroxidase	-4,01
SAMN05216198_1785	hypothetical protein	-3,90
SAMN05216198_2171	flagellar L-ring protein precursor FlgH	-3,89
SAMN05216198_0237	dissimilatory nitrite reductase (NO-forming), copper type apoprotein	-3,84

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_0576	ribonucleoside-triphosphate reductase class III catalytic subunit	-3,79
SAMN05216198_1786	hypothetical protein	-3,65
SAMN05216198_2170	flagellar P-ring protein precursor FlgI	-3,61
SAMN05216198_1782	hypothetical protein	-3,51
SAMN05216198_1783	hypothetical protein	-3,47
SAMN05216198_1492	hypothetical protein	-3,38
SAMN05216198_2169	flagellar protein FlgJ	-3,37
SAMN05216198_2174	flagellar hook protein FlgE	-3,29
SAMN05216198_1453	general secretion pathway protein G	-3,17
SAMN05216198_2202	hypothetical protein	-3,14
SAMN05216198_0575	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	-3,09
SAMN05216198_2447	type IV pilus assembly protein PilE	-3,06
SAMN05216198_2919	hypothetical protein	-3,06
SAMN05216198_3262	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	-3,05
SAMN05216198_2688	multisubunit potassium/proton antiporter, PhaG subunit	-3,04
SAMN05216198_1784	hypothetical protein	-3,02
SAMN05216198_2175	flagellar basal-body rod modification protein FlgD	-2,94
SAMN05216198_0238	hypothetical protein	-2,93
SAMN05216198_2446	type IV pilus assembly protein PilY1	-2,87
SAMN05216198_2445	Tfp pilus assembly protein PilX	-2,85
SAMN05216198_0871	coproporphyrinogen III oxidase, anaerobic	-2,80
SAMN05216198_2168	flagellar hook-associated protein 1 FlgK	-2,72
SAMN05216198_0322	hypothetical protein	-2,71
SAMN05216198_1265	Enamine deaminase RidA, house cleaning of reactive enamine intermediates, YjgF/YER057c/UK114 family	-2,68
SAMN05216198_3289	hypothetical protein	-2,68
SAMN05216198_0747	hypothetical protein	-2,65
SAMN05216198_1266	Uncharacterized membrane protein Ykvl	-2,64
SAMN05216198_1632	type IV pilus assembly protein PilA	-2,62
SAMN05216198_2176	flagellar basal-body rod protein FlgC	-2,61
SAMN05216198_1493	paraquat-inducible protein B	-2,58
SAMN05216198_1070	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase /endonuclease III	-2,58
SAMN05216198_2444	type IV pilus assembly protein PilW	-2,57
SAMN05216198_1180	phosphoadenylylsulfate reductase (thioredoxin)	-2,55
SAMN05216198_1452	hypothetical protein	-2,53
SAMN05216198_0748	outer membrane autotransporter barrel domain-containing protein	-2,50
SAMN05216198_2027	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit 3	-2,48
SAMN05216198_2479	hypothetical protein	-2,48
SAMN05216198_3480	outer membrane protein, cobalt-zinc-cadmium efflux system	-2,46
SAMN05216198_3401	ATP synthase F1 subcomplex epsilon subunit	-2,45
SAMN05216198_3206	imipenem/basic amino acid-specific outer membrane pore	-2,44
SAMN05216198_2687	multisubunit potassium/proton antiporter, PhaF subunit	-2,41
SAMN05216198_1041	hypothetical protein	-2,40
SAMN05216198_3884	hypothetical protein	-2,40
SAMN05216198_3407	ATP synthase F0 subcomplex C subunit	-2,39
SAMN05216198_3260	iron complex outermembrane receptor protein	-2,39
SAMN05216198_2918	TIR domain-containing protein	-2,37
SAMN05216198_3557	hypothetical protein	-2,37
SAMN05216198_3556	hypothetical protein	-2,35
SAMN05216198_0574	pyruvate formate lyase activating enzyme	-2,35
SAMN05216198_2025	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit 2	-2,33
SAMN05216198_3201	dimethylsulfide dehydrogenase subunit beta/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit beta	-2,33
SAMN05216198_1542	KilA-N domain-containing protein	-2,32
SAMN05216198_2754	Cu-processing system ATP-binding protein	-2,32
SAMN05216198_0307	adenylylsulfate kinase /sulfate adenylyltransferase subunit 1	-2,32
SAMN05216198_2757	sec-independent protein translocase protein Tata	-2,32
SAMN05216198_3402	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit beta	-2,29
SAMN05216198_3199	Cytochrome c553	-2,29
SAMN05216198_2471	hypothetical protein	-2,29
SAMN05216198_1543	hypothetical protein	-2,28

## TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_1069	hypothetical protein	-2,27
SAMN05216198_0582	vitamin B12 transporter	-2,26
SAMN05216198_1674	Predicted N-acyltransferase, GNAT family	-2,26
SAMN05216198_3203	dimethylsulfide dehydrogenase subunit gamma/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit gamma	-2,25
SAMN05216198_1925	Protein of unknown function	-2,22
SAMN05216198_3200	dimethylsulfide dehydrogenase subunit alpha/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit alpha	-2,21
SAMN05216198_3499	thiol:disulfide interchange protein DsbD	-2,21
SAMN05216198_0654	general secretion pathway protein G	-2,20
SAMN05216198_1397	hypothetical protein	-2,20
SAMN05216198_3261	Protein of unknown function	-2,19
SAMN05216198_0210	hypothetical protein	-2,19
SAMN05216198_2752	nitrous oxide reductase apoprotein	-2,18
SAMN05216198_2254	two-component system, response regulator FlrC	-2,17
SAMN05216198_3205	Uncharacterized protein	-2,16
SAMN05216198_0306	sulfate adenyltransferase subunit 2	-2,15
SAMN05216198_1162	ribosome modulation factor	-2,15
SAMN05216198_2251	ribosomal subunit interface protein	-2,14
SAMN05216198_2299	Apolipoprotein N-acyltransferase	-2,14
SAMN05216198_2472	dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase	-2,13
SAMN05216198_0578	ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase	-2,13
SAMN05216198_1787	hypothetical protein	-2,13
SAMN05216198_1166	Sec-independent protein translocase TatD	-2,12
SAMN05216198_0532	phosphoribosylamine-glycine ligase	-2,11
SAMN05216198_1208	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	-2,11
SAMN05216198_0474	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	-2,10
SAMN05216198_1451	hypothetical protein	-2,10
SAMN05216198_0129	LSU ribosomal protein L25P	-2,08
SAMN05216198_2026	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit 4	-2,08
SAMN05216198_0475	arsenate reductase	-2,07
SAMN05216198_2201	DTW domain-containing protein YfiP	-2,07
SAMN05216198_3403	ATP synthase F1 subcomplex gamma subunit	-2,06
SAMN05216198_1444	type II secretion system protein G (GspG)	-2,06
SAMN05216198_1450	hypothetical protein	-2,05
SAMN05216198_2756	copper chaperone NosL	-2,04
SAMN05216198_3771	D-methionine transport system substrate-binding protein	-2,03
SAMN05216198_1726	hypothetical protein	-2,03
SAMN05216198_0340	hypothetical protein	-2,03
SAMN05216198_1644	hypothetical protein	-2,02
SAMN05216198_1994	glutathione S-transferase	-2,01
SAMN05216198_1449	hypothetical protein	-2,01
SAMN05216198_1725	hypothetical protein	-2,01
SAMN05216198_0323	AAA ATPase domain-containing protein	-2,01
SAMN05216198_1330	hypothetical protein	-2,01
SAMN05216198_1645	hypothetical protein	-2,00
SAMN05216198_2989	Site-specific recombinase XerD	-1,99
SAMN05216198_1673	50S ribosomal protein L16 3-hydroxylase	-1,99
SAMN05216198_2024	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit 1	-1,98
SAMN05216198_2478	N-acylneuraminate cytidyltransferase/CMP-N,N'-diacetyllegionaminic acid synthase	-1,97
SAMN05216198_1446	type II secretion system protein G (GspG)	-1,97
SAMN05216198_2686	multisubunit potassium/proton antiporter, PhaE subunit	-1,97
SAMN05216198_2991	hypothetical protein	-1,97
SAMN05216198_0207	hypothetical protein	-1,96
SAMN05216198_0888	flagellar biosynthesis protein FlhF	-1,95
SAMN05216198_1447	general secretion pathway protein F	-1,94
SAMN05216198_0211	Protein of unknown function	-1,94
SAMN05216198_0662	Outer membrane protein assembly factor BamD, BamD/ComL family	-1,93
SAMN05216198_3202	DMSO reductase family type II enzyme chaperone	-1,93
SAMN05216198_1642	hypothetical protein	-1,92

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_1310	modulator of FtsH protease	-1,92
SAMN05216198_3456	Cytochrome c556	-1,91
SAMN05216198_2298	magnesium and cobalt transporter	-1,91
SAMN05216198_1326	hypothetical protein	-1,91
SAMN05216198_2474	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	-1,9
SAMN05216198_3395	Protein of unknown function	-1,9
SAMN05216198_2751	NosR/Nirl family transcriptional regulator, nitrous oxide reductase regulator	-1,89
SAMN05216198_1541	hypothetical protein	-1,89
SAMN05216198_2473	galactoside O-acetyltransferase/dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase	-1,89
SAMN05216198_0315	hypothetical protein	-1,89
SAMN05216198_2076	hypothetical protein	-1,89
SAMN05216198_1342	hypothetical protein	-1,89
SAMN05216198_2791	glutaryl-CoA dehydrogenase	-1,88
SAMN05216198_0641	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	-1,88
SAMN05216198_1473	putative spermidine/putrescine transport system substrate-binding protein	-1,88
SAMN05216198_1738	L,D-transpeptidase catalytic domain	-1,88
SAMN05216198_1443	general secretion pathway protein G	-1,88
SAMN05216198_2586	cholesterol transport system auxiliary component	-1,85
SAMN05216198_1386	hypothetical protein	-1,85
SAMN05216198_2177	flagellar basal-body rod protein FlgB	-1,84
SAMN05216198_3204	Chromosome partitioning ATPase, Mrp family, contains Fe-S cluster	-1,84
SAMN05216198_0392	acetyl-coenzyme A synthetase	-1,83
SAMN05216198_2867	Nucleoside-specific outer membrane channel protein Tsx	-1,83
SAMN05216198_1896	ferredoxin--NADP+ reductase	-1,82
SAMN05216198_2127	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	-1,82
SAMN05216198_0208	hypothetical protein	-1,82
SAMN05216198_2269	Acetyltransferase (GNAT) domain-containing protein	-1,82
SAMN05216198_1504	hypothetical protein	-1,81
SAMN05216198_3406	F-type H+-transporting ATPase subunit b	-1,79
SAMN05216198_1448	general secretion pathway protein E	-1,79
SAMN05216198_3539	Protein-disulfide isomerase	-1,78
SAMN05216198_1466	Transcriptional regulator GlxA family, contains an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain	-1,78
SAMN05216198_2463	hypothetical protein	-1,78
SAMN05216198_1623	hypothetical protein	-1,78
SAMN05216198_1264	D-amino acid dehydrogenase small subunit	-1,77
SAMN05216198_0791	Flagellar hook-length control protein FliK	-1,77
SAMN05216198_1717	hypothetical protein	-1,77
SAMN05216198_0581	iron complex transport system substrate-binding protein	-1,76
SAMN05216198_3501	Protein of unknown function	-1,76
SAMN05216198_0655	general secretion pathway protein H	-1,75
SAMN05216198_3479	membrane fusion protein, cobalt-zinc-cadmium efflux system	-1,75
SAMN05216198_3896	hypothetical protein	-1,75
SAMN05216198_2011	Chlorophyllase enzyme	-1,74
SAMN05216198_3512	mercuric ion binding protein	-1,74
SAMN05216198_3410	chromosome segregation DNA-binding protein	-1,73
SAMN05216198_1395	FecR family protein	-1,73
SAMN05216198_0533	"IMP cyclohydrolase	-1,73
SAMN05216198_2268	hypothetical protein	-1,73
SAMN05216198_3824	P-loop containing region of AAA domain-containing protein	-1,72
SAMN05216198_2755	Cu-processing system permease protein	-1,72
SAMN05216198_2443	type IV pilus assembly protein PilV	-1,72
SAMN05216198_1494	paraquat-inducible protein A	-1,71
SAMN05216198_0303	histidinol phosphate aminotransferase apoenzyme	-1,7
SAMN05216198_0321	hypothetical protein	-1,7
SAMN05216198_1385	hypothetical protein	-1,69
SAMN05216198_2995	hypothetical protein	-1,69
SAMN05216198_3732	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	-1,68
SAMN05216198_0002	nitrogen regulatory protein P-II family	-1,68

## TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_0324	Uncharacterized conserved protein YodC, DUF2158 family	-1,68
SAMN05216198_2028	cytochrome c oxidase accessory protein FixG	-1,67
SAMN05216198_2901	hypothetical protein	-1,67
SAMN05216198_3293	iron complex transport system substrate-binding protein	-1,67
SAMN05216198_3404	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit alpha	-1,66
SAMN05216198_0687	nitrogen regulatory protein P-II family	-1,66
SAMN05216198_0659	type II secretion system protein L (GspL)	-1,66
SAMN05216198_0141	Protein of unknown function	-1,66
SAMN05216198_1631	hypothetical protein	-1,66
SAMN05216198_0205	protein of unknown function	-1,65
SAMN05216198_1672	Adenylosuccinate lyase	-1,65
SAMN05216198_1766	cutinase	-1,65
SAMN05216198_0699	hypothetical protein	-1,65
SAMN05216198_0127	hypothetical protein	-1,64
SAMN05216198_1267	Acyl dehydratase	-1,64
SAMN05216198_1343	hypothetical protein	-1,64
SAMN05216198_2753	nitrous oxidase accessory protein	-1,63
SAMN05216198_2101	monothiol glutaredoxin	-1,63
SAMN05216198_2332	Tetratricopeptide repeat-containing protein	-1,63
SAMN05216198_2029	hypothetical protein	-1,62
SAMN05216198_1214	membrane-bound lytic murein transglycosylase D	-1,62
SAMN05216198_1584	transcriptional regulator, XRE family	-1,62
SAMN05216198_1192	methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase /5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	-1,62
SAMN05216198_0255	Uncharacterized membrane protein YckC, RDD family	-1,62
SAMN05216198_1422	hypothetical protein	-1,62
SAMN05216198_0864	nitric oxide reductase, NorC subunit apoprotein	-1,61
SAMN05216198_0489	periplasmic chaperone for outer membrane proteins Skp	-1,6
SAMN05216198_3453	zinc transport system substrate-binding protein	-1,6
SAMN05216198_2104	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD	-1,6
SAMN05216198_0653	general secretion pathway protein F	-1,6
SAMN05216198_3553	Transposase	-1,6
SAMN05216198_1457	hypothetical protein	-1,6
SAMN05216198_3632	protein of unknown function	-1,59
SAMN05216198_0656	general secretion pathway protein I	-1,59
SAMN05216198_0318	hypothetical protein	-1,58
SAMN05216198_0657	general secretion pathway protein J	-1,58
SAMN05216198_0872	DNA repair exonuclease SbcCD nuclease subunit	-1,57
SAMN05216198_3408	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit a	-1,57
SAMN05216198_1445	hypothetical protein	-1,57
SAMN05216198_3496	Uncharacterized copper-binding protein, cupredoxin-like subfamily	-1,56
SAMN05216198_0845	universal stress protein E	-1,55
SAMN05216198_1375	hypothetical protein	-1,54
SAMN05216198_0116	hypothetical protein	-1,54
SAMN05216198_2645	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	-1,54
SAMN05216198_2684	multisubunit potassium/proton antiporter, PhaC subunit	-1,54
SAMN05216198_1339	single-strand DNA-binding protein	-1,54
SAMN05216198_0974	succinate dehydrogenase subunit B	-1,53
SAMN05216198_1926	Protein of unknown function	-1,53
SAMN05216198_1851	hypothetical protein	-1,53
SAMN05216198_1495	paraquat-inducible protein A	-1,53
SAMN05216198_0320	hypothetical protein	-1,53
SAMN05216198_0106	hypothetical protein	-1,53
SAMN05216198_2180	flagella basal body P-ring formation protein FlgA	-1,53
SAMN05216198_3481	two-component system, OmpR family, heavy metal sensor histidine kinase CusS	-1,53
SAMN05216198_0873	DNA repair exonuclease SbcCD ATPase subunit	-1,52
SAMN05216198_1503	Pimeloyl-ACP methyl ester carboxylesterase	-1,52
SAMN05216198_1956	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	-1,52
SAMN05216198_0658	general secretion pathway protein K	-1,51

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_0735	hypothetical protein	-1,51
SAMN05216198_1074	electron transport complex protein RnfC	-1,5
SAMN05216198_0325	hypothetical protein	-1,5

**Tab. A8: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von *H. littoralis* 4h nach Induktion des osmotischen Stresses als signifikant hoch abundant im Vergleich zur ungestressten Kontrolle identifiziert wurden.**

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_0817	protein of unknown function	5,53
SAMN05216198_1238	AraC-type DNA-binding protein	3,49
SAMN05216198_2349	chromate reductase	3,30
SAMN05216198_2086	phage baseplate assembly protein V	3,20
SAMN05216198_1648	hypothetical protein	3,19
SAMN05216198_2658	TatD DNase family protein	3,18
SAMN05216198_1243	catecholate siderophore receptor	3,09
SAMN05216198_1647	imelysin. Metallo peptidase. MEROPS family M75	2,93
SAMN05216198_3294	AMP-binding enzyme	2,93
SAMN05216198_2111	bacterioferritin-associated ferredoxin	2,76
SAMN05216198_2834	hypothetical protein	2,50
SAMN05216198_1646	CxxC motif-containing protein, DUF1111 family	2,40
SAMN05216198_1645	hypothetical protein	2,38
SAMN05216198_1554	Putative phage holin	2,36
SAMN05216198_2083	phage tail protein, P2 protein I family	2,35
SAMN05216198_1685	outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	2,32
SAMN05216198_1644	hypothetical protein	2,31
SAMN05216198_1687	hypothetical protein	2,31
SAMN05216198_1686	outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	2,27
SAMN05216198_2234	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	2,11
SAMN05216198_2245	Protein of unknown function	2,08
SAMN05216198_1556	hypothetical protein	2,07
SAMN05216198_1555	Putative 3TM holin, Phage_holin_3	2,07
SAMN05216198_2835	Uncharacterized iron-regulated membrane protein	2,07
SAMN05216198_2798	cytochrome b561	2,06
SAMN05216198_0064	hypothetical protein	2,05
SAMN05216198_0182	acetylornithine aminotransferase/4-aminobutyrate aminotransferase	2,02
SAMN05216198_1689	Uncharacterized conserved protein, contains GH25 family domain	2,02
SAMN05216198_3571	Zn-binding Pro-Ala-Ala-Arg (PAAR) domain-containing protein, involved in TypeVI secretion	1,98
SAMN05216198_1142	2,4-dienoyl-CoA reductase	1,95
SAMN05216198_2795	iron complex transport system permease protein	1,94
SAMN05216198_3291	iron complex transport system permease protein	1,91
SAMN05216198_3222	outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	1,91
SAMN05216198_1557	Phage DNA packaging protein, Nu1 subunit of terminase	1,90
SAMN05216198_0802	aspartate kinase	1,90
SAMN05216198_2796	iron complex transport system substrate-binding protein	1,89
SAMN05216198_2246	hypothetical protein	1,87
SAMN05216198_0549	iron complex outermembrane receptor protein	1,84
SAMN05216198_1688	Hypothetical protein	1,83
SAMN05216198_2244	Protein of unknown function	1,82
SAMN05216198_2794	iron complex transport system permease protein	1,80
SAMN05216198_2233	starch synthase (maltosyl-transferring)	1,80
SAMN05216198_1239	ferric enterobactin receptor	1,79
SAMN05216198_2836	Protein of unknown function	1,78
SAMN05216198_2236	hypothetical protein	1,77
SAMN05216198_2235	Rubryerythrin	1,76
SAMN05216198_1242	PKHD-type hydroxylase	1,74
SAMN05216198_0587	iron complex outermembrane receptor protein	1,74

## TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_2831	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase QseC	1,72
SAMN05216198_3290	iron complex transport system permease protein	1,72
SAMN05216198_1559	hypothetical protein	1,71
SAMN05216198_0351	trimethylamine monooxygenase	1,67
SAMN05216198_0184	Cytochrome c, mono-and diheme variants	1,67
SAMN05216198_0548	Uncharacterized iron-regulated membrane protein	1,66
SAMN05216198_0803	ectoine hydroxylase	1,66
SAMN05216198_2099	Integrase	1,63
SAMN05216198_3783	Protein of unknown function	1,63
SAMN05216198_0188	quinol:cytochrome c oxidoreductase iron-sulfur protein precursor	1,63
SAMN05216198_2871	pyruvate dehydrogenase (quinone)	1,63
SAMN05216198_3132	hypothetical protein	1,63
SAMN05216198_1024	phage terminase, small subunit, putative, P27 family	1,63
SAMN05216198_1091	Small-conductance mechanosensitive channel	1,61
SAMN05216198_3298	outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	1,60
SAMN05216198_3616	Cell division and transport-associated protein TolR	1,60
SAMN05216198_3292	iron complex transport system ATP-binding protein	1,59
SAMN05216198_2647	nitric oxide dioxygenase	1,59
SAMN05216198_2232	trehalose synthase	1,59
SAMN05216198_0547	hypothetical protein	1,58
SAMN05216198_0187	quinol:cytochrome c oxidoreductase pentaheme cytochrome subunit	1,56
SAMN05216198_1937	Membrane protein involved in the export of O-antigen and teichoic acid	1,56
SAMN05216198_3293	iron complex transport system substrate-binding protein	1,54
SAMN05216198_0181	Phosphoglycerate dehydrogenase	1,53
SAMN05216198_3328	2-nitropropane dioxygenase precursor	1,53
SAMN05216198_1089	Predicted outer membrane protein	1,52
SAMN05216198_3118	methyl-accepting chemotaxis protein	1,50
SAMN05216198_2243	Rho termination factor, N-terminal domain	1,50

**Tab. A9: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von *H. litoralis* 4h nach Induktion des osmotischen Stresses als signifikant niedrig abundant im Vergleich zur ungestressten Kontrolle identifiziert wurden**

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_2202	hypothetical protein	-2,62
SAMN05216198_1785	hypothetical protein	-2,62
SAMN05216198_0575	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	-2,44
SAMN05216198_1786	hypothetical protein	-2,44
SAMN05216198_0576	ribonucleoside-triphosphate reductase class III catalytic subunit	-2,39
SAMN05216198_2446	type IV pilus assembly protein PilY1	-2,35
SAMN05216198_1380	hypothetical protein	-2,32
SAMN05216198_2447	type IV pilus assembly protein PilE	-2,22
SAMN05216198_0117	Bacteriophage coat protein B	-2,20
SAMN05216198_3262	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	-2,18
SAMN05216198_2444	type IV pilus assembly protein PilW	-2,18
SAMN05216198_2445	Tfp pilus assembly protein PilX	-2,09
SAMN05216198_2287	hypothetical protein	-2,07
SAMN05216198_0116	hypothetical protein	-2,06
SAMN05216198_1379	AAA domain-containing protein	-2,04
SAMN05216198_1782	hypothetical protein	-2,03
SAMN05216198_3884	hypothetical protein	-2,03
SAMN05216198_1576	exonuclease SbcC	-1,99

<b>Gename</b>	<b>Produkt</b>	<b>M-Wert (log<sub>2</sub> fache Änderung)</b>
SAMN05216198_2991	hypothetical protein	-1,93
SAMN05216198_2751	NosR/Nirl family transcriptional regulator, nitrous oxide reductase regulator	-1,90
SAMN05216198_0357	cytochrome c peroxidase	-1,90
SAMN05216198_3199	Cytochrome c553	-1,89
SAMN05216198_1577	hypothetical protein	-1,87
SAMN05216198_2545	hypothetical protein	-1,86
SAMN05216198_0207	hypothetical protein	-1,85
SAMN05216198_2286	Peptidase family M48	-1,81
SAMN05216198_2011	Chlorophyllase enzyme	-1,77
SAMN05216198_0237	dissimilatory nitrite reductase (NO-forming), copper type apoprotein	-1,76
SAMN05216198_2919	hypothetical protein	-1,76
SAMN05216198_1473	putative spermidine/putrescine transport system substrate-binding protein	-1,75
SAMN05216198_1783	hypothetical protein	-1,72
SAMN05216198_0747	hypothetical protein	-1,71
SAMN05216198_3539	Protein-disulfide isomerase	-1,70
SAMN05216198_0748	outer membrane autotransporter barrel domain-containing protein	-1,67
SAMN05216198_0205	protein of unknown function	-1,66
SAMN05216198_0208	hypothetical protein	-1,65
SAMN05216198_2443	type IV pilus assembly protein PilV	-1,64
SAMN05216198_3261	Protein of unknown function	-1,63
SAMN05216198_3782	outer membrane protein	-1,63
SAMN05216198_2990	hypothetical protein	-1,63
SAMN05216198_1266	Uncharacterized membrane protein Ykvl	-1,62
SAMN05216198_0340	hypothetical protein	-1,62
SAMN05216198_3201	dimethylsulfide dehydrogenase subunit beta/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit beta	-1,62
SAMN05216198_3770	catalase	-1,61
SAMN05216198_0210	hypothetical protein	-1,61
SAMN05216198_2918	TIR domain-containing protein	-1,60
SAMN05216198_3203	dimethylsulfide dehydrogenase subunit gamma/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit gamma	-1,60
SAMN05216198_0332	hypothetical protein	-1,60
SAMN05216198_3499	thiol:disulfide interchange protein DsbD	-1,59
SAMN05216198_2251	ribosomal subunit interface protein	-1,59
SAMN05216198_3200	dimethylsulfide dehydrogenase subunit alpha/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit alpha	-1,59
SAMN05216198_0574	pyruvate formate lyase activating enzyme	-1,57
SAMN05216198_1453	general secretion pathway protein G	-1,53
SAMN05216198_1418	hypothetical protein	-1,52
SAMN05216198_1452	hypothetical protein	-1,50
SAMN05216198_3260	iron complex outermembrane receptor protein	-1,50

**Tab. A10: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von *H. littoralis* 1h nach Induktion des osmotischen Stresses im Vergleich zur ungestressten Kontrolle als signifikant hoch abundant identifiziert wurden, gruppiert nach ihrer Funktionalität.**

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
<b>Energiehomöostase</b>		
SAMN05216198_0184	Cytochrome c, mono-and diheme variants	3,28
SAMN05216198_2235	Rubryerythrin	3,20
SAMN05216198_0187	quinol:cytochrome c oxidoreductase pentaheme cytochrome subunit	3,00
SAMN05216198_2233	starch synthase (maltosyl-transferring)	2,87
SAMN05216198_0188	quinol:cytochrome c oxidoreductase iron-sulfur protein precursor	2,78
SAMN05216198_2871	pyruvate dehydrogenase (quinone)	2,71
SAMN05216198_2798	cytochrome b561	2,31
SAMN05216198_3457	Cytochrome b	3,31
SAMN05216198_2863	cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2 apoprotein	2,73
SAMN05216198_3164	methylglutaconyl-CoA hydratase	2,73
SAMN05216198_0186	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III	2,64
SAMN05216198_2864	cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1 apoprotein	2,52
SAMN05216198_2656	Multimeric flavodoxin WrbA	2,42
SAMN05216198_0819	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase	2,35
SAMN05216198_1650	succinate-semialdehyde dehydrogenase / glutarate-semialdehyde dehydrogenase	2,34
SAMN05216198_3162	isovaleryl-CoA dehydrogenase	2,33
SAMN05216198_2151	fumarase, class II	2,26
SAMN05216198_3598	cytochrome c oxidase subunit 2	2,20
SAMN05216198_3161	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	2,12
SAMN05216198_2786	L-lactate dehydrogenase (cytochrome)	2,03
SAMN05216198_0403	cytochrome c oxidase subunit I+III	1,96
SAMN05216198_3123	ferredoxin, 2Fe-2S	1,88
SAMN05216198_0402	cytochrome c oxidase subunit 2	1,86
SAMN05216198_0190	quinol:cytochrome c oxidoreductase membrane protein	1,83
SAMN05216198_1088	PhnB protein	1,80
SAMN05216198_0192	quinol:cytochrome c oxidoreductase quinone-binding subunit 2	1,76
SAMN05216198_2635	acetate kinase	1,73
SAMN05216198_0176	NADP-dependent 3-hydroxy acid dehydrogenase YdfG	1,72
SAMN05216198_3597	cytochrome c oxidase subunit 1	1,59
SAMN05216198_0191	Cytochrome C oxidase, cbb3-type, subunit III	1,53
SAMN05216198_2220	starch synthase	1,52
SAMN05216198_2785	D-lactate dehydrogenase	1,98
SAMN05216198_3170	NADPH:quinone reductase	2,93
<b>Zellteilung</b>		
SAMN05216198_2557	cell division-specific peptidoglycan biosynthesis regulator FtsW	1,96
SAMN05216198_0617	Cell division and transport-associated protein TolA	1,63
SAMN05216198_2208	septum site-determining protein MinC	1,51
SAMN05216198_2562	peptidoglycan synthetase FtsI	1,59
SAMN05216198_1589	plasmid segregation oscillating ATPase ParF	1,70
SAMN05216198_0615	Cell division and transport-associated protein TolQ	1,55
<b>Aminosäuretransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_0802	aspartate kinase	3,13
SAMN05216198_0182	acetylornithine aminotransferase/4-aminobutyrate aminotransferase	2,77
SAMN05216198_1892	3-isopropylmalate dehydratase, large subunit	4,34
SAMN05216198_1891	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	3,87
SAMN05216198_1890	3-isopropylmalate dehydrogenase	3,08
SAMN05216198_0185	monoamine oxidase	2,94
SAMN05216198_0460	succinyldiaminopimelate desuccinylase	2,59
SAMN05216198_3601	oligopeptidase A Metallo peptidase. MEROPS family M03A	2,56
SAMN05216198_1772	Na <sup>+</sup> /proline symporter	2,55
SAMN05216198_0033	dihydrodipicolinate reductase	2,47
SAMN05216198_1159	glutamate dehydrogenase (NAD)	2,33
SAMN05216198_2226	Threonine dehydrogenase	2,23
SAMN05216198_0281	dimethylhistidine N-methyltransferase	2,22
SAMN05216198_1889	aspartate semialdehyde dehydrogenase	2,09

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_2702	protease I	2,08
SAMN05216198_1698	cysteine desulfurase / selenocysteine lyase	2,02
SAMN05216198_1888	aspartate semialdehyde dehydrogenase	1,88
SAMN05216198_3013	argininosuccinate lyase	1,81
SAMN05216198_2712	Glycine cleavage system regulatory protein	1,72
SAMN05216198_0807	arginine decarboxylase	1,64
SAMN05216198_1691	Uncharacterized membrane protein YqaE, homolog of Blt101, UPF0057 family	1,52
SAMN05216198_1921	MFS transporter, DHA1 family, bicyclomycin/chloramphenicol resistance protein	1,92
<b>Nukleotidtransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_3124	Reductase C-terminal	1,99
SAMN05216198_1292	Exodeoxyribonuclease III	1,98
<b>Kohlenhydrattransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_2232	trehalose synthase	2,40
SAMN05216198_1113	Predicted arabinose efflux permease, MFS family	3,05
SAMN05216198_2231	1,4-alpha-glucan branching enzyme	2,36
SAMN05216198_2184	Predicted arabinose efflux permease, MFS family	2,27
SAMN05216198_1651	glucose-6-phosphate 1-epimerase	2,18
SAMN05216198_3122	Predicted arabinose efflux permease, MFS family	1,94
SAMN05216198_2347	gluconate kinase, SKI family	1,87
SAMN05216198_2589	Glucoamylase (glucan-1,4-alpha-glucosidase), GH15 family	1,84
SAMN05216198_2221	maltooligosyl trehalose hydrolase	1,65
SAMN05216198_2590	glucose 1-dehydrogenase	1,64
SAMN05216198_3374	glycerate kinase	1,51
SAMN05216198_2387	MFS transporter, PAT family, beta-lactamase induction signal transducer AmpG	1,67
<b>Coenzymtransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_0351	trimethylamine monooxygenase	2,50
SAMN05216198_0181	Phosphoglycerate dehydrogenase	2,22
<b>Lipidtransport und Metabolismus</b>		
SAMN05216198_2245	Protein of unknown function	3,43
SAMN05216198_2234	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	3,38
SAMN05216198_1142	2,4-dienoyl-CoA reductase	2,65
SAMN05216198_3166	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	3,11
SAMN05216198_2229	cardiolipin synthase	2,43
SAMN05216198_3168	3-oxoacid CoA-transferase subunit B	2,34
SAMN05216198_3169	acetyl-CoA C-acetyltransferase	2,31
SAMN05216198_3167	3-oxoacid CoA-transferase subunit A	2,22
SAMN05216198_2821	acyl-phosphate glycerol-3-phosphate acyltransferase	1,90
SAMN05216198_3139	Lysophospholipase, alpha-beta hydrolase superfamily	1,80
SAMN05216198_3587	2,4-dienoyl-CoA reductase	1,79
SAMN05216198_1897	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	1,69
SAMN05216198_0854	acyl-CoA dehydrogenase	1,67
SAMN05216198_2740	Lysophospholipase, alpha-beta hydrolase superfamily	1,59
SAMN05216198_0989	acyl-CoA dehydrogenase	1,54
SAMN05216198_0420	short chain enoyl-CoA hydratase	1,52
<b>Translation, ribosomale Strukturen</b>		
SAMN05216198_3576	ribonuclease J	2,44
SAMN05216198_0180	aspartyl-tRNA(Asn)/glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	1,66
SAMN05216198_0459	23S rRNA m(1)G-745 methyltransferase	1,50
<b>Transkription</b>		
SAMN05216198_2243	Rho termination factor, N-terminal domain	2,71
SAMN05216198_1263	transcriptional regulator, AsnC family	2,43
SAMN05216198_3011	two component transcriptional regulator, LytTR family	2,36
SAMN05216198_1927	transcriptional regulator, AraC family	2,32
SAMN05216198_1679	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	2,30
SAMN05216198_1702	transcriptional regulator, BadM/Rrf2 family	2,03
SAMN05216198_3251	transcriptional regulator, lclR family	2,02
SAMN05216198_3151	transcriptional regulator, TetR family	1,66

TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_2779	transcriptional regulator, ArsR family	1,64
SAMN05216198_1919	transcriptional regulator, MerR family	1,52
SAMN05216198_3369	transcriptional regulator, LysR family	1,51
SAMN05216198_2014	two-component system, OmpR family, response regulator RstA	2,16
SAMN05216198_2013	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase RstB	1,90
<b>Replikation, Rekombination, Reparatur</b>		
SAMN05216198_0627	DNA topoisomerase-1	2,57
SAMN05216198_3517	Site-specific DNA recombinase	2,16
SAMN05216198_2240	DNA end-binding protein Ku	2,04
SAMN05216198_2239	ATP-dependent DNA ligase LigD phosphoesterase module /ATP-dependent DNA ligase LigD polymerase module	1,96
<b>Zellwand &amp; Membran Biogenese</b>		
SAMN05216198_1091	Small-conductance mechanosensitive channel	3,14
SAMN05216198_1937	Membrane protein involved in the export of O-antigen and teichoic acid	1,71
SAMN05216198_3460	Osmotically-inducible protein OsmY, contains BON domain	3,69
SAMN05216198_2431	Membrane carboxypeptidase (penicillin-binding protein)	2,34
SAMN05216198_1080	LemA protein	2,11
SAMN05216198_1898	Phospholipase_D-nuclease N-terminal	2,09
SAMN05216198_3277	Murein DD-endopeptidase MepM and murein hydrolase activator NlpD, contain LysM domain	2,08
SAMN05216198_0462	Outer membrane protein OmpA	2,07
SAMN05216198_3578	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	2,00
SAMN05216198_3666	lipid A 3-O-deacylase	1,93
SAMN05216198_0087	penicillin-binding protein 1B	1,82
SAMN05216198_1739	Murein L,D-transpeptidase YcbB/YkuD	1,81
SAMN05216198_2561	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase	1,79
SAMN05216198_2484	UDP-glucose:(heptosyl)LPS alpha-1,3-glucosyltransferase	1,77
SAMN05216198_3615	outer membrane transport energization protein TonB	1,71
SAMN05216198_1977	polysaccharide export outer membrane protein	1,59
SAMN05216198_2305	membrane-bound lytic murein transglycosylase B	1,55
SAMN05216198_1678	OmpA-OmpF porin, OOP family	1,53
SAMN05216198_2499	large conductance mechanosensitive channel	1,51
SAMN05216198_0409	membrane glycosyltransferase	1,50
SAMN05216198_1928	NDP-sugar epimerase, includes UDP-GlcNAc-inverting 4,6-dehydratase FlaA1 and capsular polysaccharide biosynthesis protein EpsC	1,52
<b>Zellmotilität</b>		
SAMN05216198_2658	TatD DNase family protein	2,75
SAMN05216198_3398	c-di-GMP-binding flagellar brake protein YcgR, contains PilZNR and PilZ domains	1,78
SAMN05216198_0147	type IV pilus assembly protein PilX	1,58
<b>Chaperone &amp; Posttranslationale Modifikationen</b>		
SAMN05216198_0986	molecular chaperone HtpG	2,77
SAMN05216198_2485	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpB	2,69
SAMN05216198_1863	ATP dependent PIM1 peptidase. Serine peptidase. MEROPS family S16	2,56
SAMN05216198_0032	molecular chaperone DnaJ	2,54
SAMN05216198_2242	Alcohol dehydrogenase GroES-associated	2,50
SAMN05216198_1996	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase	2,45
SAMN05216198_0031	molecular chaperone DnaK	2,45
SAMN05216198_2382	chaperonin GroES	2,42
SAMN05216198_3704	ATP-dependent HslUV protease ATP-binding subunit HslU	2,34
SAMN05216198_1701	Iron-regulated ABC transporter membrane component SufB	2,33
SAMN05216198_0030	molecular chaperone GrpE	2,24
SAMN05216198_2381	chaperonin GroEL	2,05
SAMN05216198_3224	Subtilase family protein	1,93
SAMN05216198_1666	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS	1,89
SAMN05216198_1699	Iron-regulated ABC transporter permease protein SufD	1,88
SAMN05216198_3705	HslV component of HslUV peptidase. Threonine peptidase. MEROPS family T01B	1,87
SAMN05216198_1862	oligopeptidase B Serine peptidase. MEROPS family S09A	1,70
SAMN05216198_1700	Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit SufC	1,61
SAMN05216198_2759	Glutaredoxin	1,58
SAMN05216198_0405	Cytochrome c oxidase assembly factor CtaG	1,94

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
<b>Ionentransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_0189	quinol:cytochrome c oxidoreductase quinone-binding subunit 1	2,92
SAMN05216198_1990	zinc transporter, ZIP family	2,18
SAMN05216198_3363	superoxide dismutase, Cu-Zn family	1,98
SAMN05216198_3360	nitric oxide reductase NorQ protein	1,79
SAMN05216198_2767	cation diffusion facilitator family transporter	1,69
SAMN05216198_3455	sulfate permease, SulP family	1,69
SAMN05216198_1129	chromate transporter	1,58
SAMN05216198_3361	nitric oxide reductase NorD protein	1,50
<b>Sekundärmetabolit Biosynthese</b>		
SAMN05216198_0803	ectoine hydroxylase	2,94
SAMN05216198_0803	ectoine hydroxylase	2,94
SAMN05216198_0806	diaminobutyrate acetyltransferase	2,79
SAMN05216198_3137	Phytoene dehydrogenase-related protein	2,65
SAMN05216198_0805	diaminobutyrate aminotransferase apoenzyme	2,62
SAMN05216198_0174	Erythromycin esterase homolog	2,60
SAMN05216198_0804	ectoine synthase	2,55
<b>Generelle Funktionsvorhersage</b>		
SAMN05216198_2349	chromate reductase	3,17
SAMN05216198_3328	2-nitropropane dioxygenase precursor	2,37
SAMN05216198_2383	UPF0716 protein FxsA	3,00
SAMN05216198_2228	Metal-dependent hydrolase, endonuclease/exonuclease/phosphatase family	2,54
SAMN05216198_2227	Uncharacterized conserved protein YecE, DUF72 family	2,53
SAMN05216198_2766	extracellular solute-binding protein, family 3	2,44
SAMN05216198_0034	2,4-dienoyl-CoA reductase	2,40
SAMN05216198_3399	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	2,37
SAMN05216198_3577	Spore maturation protein SprmA	2,21
SAMN05216198_0951	Tetratricopeptide repeat-containing protein	2,13
SAMN05216198_0173	ABC-2 type transport system permease protein	1,99
SAMN05216198_0172	ABC-2 type transport system ATP-binding protein	1,74
SAMN05216198_0992	ABC-2 type transport system permease protein	1,66
SAMN05216198_1079	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	1,65
SAMN05216198_1640	Hemerythrin HHE cation binding domain-containing protein	1,64
SAMN05216198_0991	ABC-2 type transport system ATP-binding protein	1,59
SAMN05216198_0929	Predicted methyltransferase	1,58
SAMN05216198_0451	ABC-2 type transport system ATP-binding protein	1,54
<b>Unbekannt</b>		
SAMN05216198_0817	protein of unknown function	6,08
SAMN05216198_3132	hypothetical protein	4,17
SAMN05216198_2236	hypothetical protein	3,62
SAMN05216198_2246	hypothetical protein	3,19
SAMN05216198_2244	Protein of unknown function	3,04
SAMN05216198_0064	hypothetical protein	2,39
SAMN05216198_0547	hypothetical protein	2,37
SAMN05216198_1089	Predicted outer membrane protein	2,19
SAMN05216198_2647	nitric oxide dioxygenase	1,70
SAMN05216198_3459	Uncharacterized membrane protein YtjA, UPF0391 family	3,66
SAMN05216198_2861	ATP-binding cassette, subfamily C, CydC	3,45
SAMN05216198_3133	hypothetical protein	3,24
SAMN05216198_3148	hypothetical protein	3,11
SAMN05216198_2689	hypothetical protein	3,10
SAMN05216198_3149	Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily protein	3,09
SAMN05216198_3165	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha subunit	3,02
SAMN05216198_2862	ATP-binding cassette, subfamily C, CydD	2,92
SAMN05216198_2241	hypothetical protein	2,92
SAMN05216198_2690	hypothetical protein	2,89
SAMN05216198_1081	uncharacterized protein	2,88
SAMN05216198_0411	anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator	2,86
SAMN05216198_1704	hypothetical protein	2,81

## TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_3519	TniB protein	2,62
SAMN05216198_3163	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit	2,61
SAMN05216198_0588	membrane protein	2,61
SAMN05216198_3053	hydrolase, peptidase M42 family	2,61
SAMN05216198_0348	Protein of unknown function, DUF488	2,59
SAMN05216198_0671	hypothetical protein	2,59
SAMN05216198_3520	putative transposase	2,56
SAMN05216198_3052	GNAT-family acetyltransferase TIGR03103	2,54
SAMN05216198_3172	hypothetical protein	2,53
SAMN05216198_1082	putative membrane protein	2,52
SAMN05216198_2385	Protein of unknown function, DUF481	2,51
SAMN05216198_0062	hypothetical protein	2,50
SAMN05216198_0987	hypothetical protein	2,46
SAMN05216198_0626	conserved hypothetical protein	2,45
SAMN05216198_0463	protein of unknown function	2,41
SAMN05216198_2691	hypothetical protein	2,40
SAMN05216198_1995	hypothetical protein	2,37
SAMN05216198_0404	hypothetical protein	2,37
SAMN05216198_3138	Protein of unknown function	2,36
SAMN05216198_2701	Protein of unknown function	2,35
SAMN05216198_1856	protein of unknown function	2,35
SAMN05216198_3051	asparagine synthase (glutamine-hydrolysing)	2,27
SAMN05216198_0751	hypothetical protein	2,25
SAMN05216198_3703	DUF971 family protein	2,24
SAMN05216198_3362	Uncharacterized conserved protein	2,22
SAMN05216198_0983	uncharacterized domain 1-containing protein	2,20
SAMN05216198_1764	Uncharacterized conserved protein	2,19
SAMN05216198_0349	Protein of unknown function	2,17
SAMN05216198_3012	Sensory transduction protein kinase AlgZ	2,15
SAMN05216198_3247	uncharacterized domain 1-containing protein	2,09
SAMN05216198_1197	Iron-containing redox enzyme	2,08
SAMN05216198_3227	hypothetical protein	2,07
SAMN05216198_1761	hypothetical protein	2,06
SAMN05216198_2289	Uncharacterized membrane protein YGL010W	2,06
SAMN05216198_2760	hypothetical protein	2,05
SAMN05216198_2230	hypothetical protein	2,04
SAMN05216198_2247	Predicted outer membrane protein	2,03
SAMN05216198_2789	Protein of unknown function	2,03
SAMN05216198_0461	Protein of unknown function	2,02
SAMN05216198_2253	hypothetical protein	1,99
SAMN05216198_2046	hypothetical protein	1,99
SAMN05216198_2742	hypothetical protein	1,99
SAMN05216198_3068	hypothetical protein	1,88
SAMN05216198_1759	protein of unknown function	1,86
SAMN05216198_0179	hypothetical protein/aminotransferase	1,86
SAMN05216198_1140	hypothetical protein	1,86
SAMN05216198_3668	multidrug efflux pump	1,85
SAMN05216198_0921	hypothetical protein	1,85
SAMN05216198_2056	hypothetical protein	1,83
SAMN05216198_3275	Uncharacterized membrane protein	1,81
SAMN05216198_0035	hypothetical protein	1,81
SAMN05216198_0400	Uncharacterized membrane protein	1,79
SAMN05216198_0984	uncharacterized domain 1-containing protein	1,79
SAMN05216198_1506	RES domain-containing protein	1,77
SAMN05216198_1083	Uncharacterized conserved protein, DUF2147 family	1,75
SAMN05216198_2680	ADP-ribose diphosphatase	1,73
SAMN05216198_1649	hypothetical protein	1,73
SAMN05216198_2839	efflux transporter, outer membrane factor (OMF) lipoprotein, NodT family	1,70
SAMN05216198_1367	conjugative transfer region protein, TIGR03750 family	1,70
SAMN05216198_1507	hypothetical protein	1,69

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_0408	hypothetical protein	1,68
SAMN05216198_2559	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase	1,67
SAMN05216198_3357	hypothetical protein	1,67
SAMN05216198_1771	hypothetical protein	1,66
SAMN05216198_1128	Uncharacterized conserved protein	1,65
SAMN05216198_2761	hypothetical protein	1,63
SAMN05216198_2238	Protein of unknown function	1,63
SAMN05216198_0193	hypothetical protein	1,62
SAMN05216198_3104	hypothetical protein	1,60
SAMN05216198_1603	hypothetical protein	1,60
SAMN05216198_1491	Uncharacterized conserved protein	1,57
SAMN05216198_3600	hypothetical protein	1,57
SAMN05216198_3067	hypothetical protein	1,56
SAMN05216198_2209	hypothetical protein	1,56
SAMN05216198_3047	Dicarboxylate transport	1,55
SAMN05216198_0248	protein of unknown function	1,55
SAMN05216198_3364	hypothetical protein	1,54
SAMN05216198_3864	Putative amidoligase enzyme	1,54
SAMN05216198_3173	hypothetical protein	1,54
SAMN05216198_3669	membrane fusion protein, multidrug efflux system	1,54
SAMN05216198_3811	FO synthase subunit 1	1,54
SAMN05216198_1160	Protein of unknown function	1,53
SAMN05216198_3135	hypothetical protein	1,53
SAMN05216198_2436	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein	1,53
SAMN05216198_3474	Protein of unknown function	1,53
SAMN05216198_2218	hypothetical protein	1,51
SAMN05216198_2483	heptose I phosphotransferase	1,51
SAMN05216198_3317	hypothetical protein	1,51
<b>Signaltransduktion</b>		
SAMN05216198_1124	Signal transduction histidine kinase	2,18
SAMN05216198_1641	NADPH-glutathione reductase	2,13
SAMN05216198_0875	uncharacterized protein involved in response to NO	2,13
SAMN05216198_3121	methyl-accepting chemotaxis protein	2,12
SAMN05216198_3603	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	1,86
SAMN05216198_2138	Signal transduction histidine kinase	1,75
SAMN05216198_1313	PAS domain S-box-containing protein/diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	1,74
SAMN05216198_1781	DNA-binding transcriptional response regulator, NtrC family, contains REC, AAA-type ATPase, and a Fis-type DNA-binding domains	1,50
SAMN05216198_2256	sigma-54 specific transcriptional regulator, flagellar regulatory protein A	1,83
<b>Transport, Sekretion, Vesikel</b>		
SAMN05216198_0352	HlyD family secretion protein	2,84
SAMN05216198_0949	type VI secretion system protein ImpB	2,42
SAMN05216198_0950	type VI secretion system protein VasJ	2,20
SAMN05216198_0948	type VI secretion system protein ImpC	1,59
<b>Abwehrmechanismen</b>		
SAMN05216198_3458	HNH endonuclease	3,62
SAMN05216198_3667	outer membrane protein, multidrug efflux system	2,43
SAMN05216198_0820	S-formylglutathione hydrolase	2,20
SAMN05216198_0852	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	1,79
SAMN05216198_2837	Multidrug efflux pump subunit AcrB	1,58
SAMN05216198_1760	thioredoxin 1	1,56
SAMN05216198_3136	Cytochrome P450	2,08
SAMN05216198_0883	fatty-acid peroxygenase	2,08
<b>Mobile Elemente</b>		
SAMN05216198_3518	TniQ protein	2,36
SAMN05216198_1123	DNA-binding response regulator, OmpR family, contains REC and winged-helix (wHTH) domain	2,15
SAMN05216198_1365	integrating conjugative element protein, PFL_4701 family	2,15
SAMN05216198_1000	Phage integrase family protein	1,88
SAMN05216198_1369	integrating conjugative element protein, PFL_4704 family	1,62

**Tab. A11: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von *H. litoralis* 1h nach Induktion des osmotischen Stresses im Vergleich zur ungestressten Kontrolle als signifikant niedrig abundant identifiziert wurden, gruppiert nach ihrer Funktionalität.**

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
<b>Chromatinstrukturen</b>		
SAMN05216198_3204	Chromosome partitioning ATPase, Mrp family, contains Fe-S cluster	-1,84
<b>Energiehomöostase</b>		
SAMN05216198_3199	Cytochrome c553	-2,29
SAMN05216198_2027	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit 3	-2,48
SAMN05216198_3401	ATP synthase F1 subcomplex epsilon subunit	-2,45
SAMN05216198_3407	ATP synthase F0 subcomplex C subunit	-2,39
SAMN05216198_2025	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit 2	-2,33
SAMN05216198_3402	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit beta	-2,29
SAMN05216198_2026	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit 4	-2,08
SAMN05216198_3403	ATP synthase F1 subcomplex gamma subunit	-2,06
SAMN05216198_2024	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit 1	-1,98
SAMN05216198_3456	Cytochrome c556	-1,91
SAMN05216198_0392	acetyl-coenzyme A synthetase	-1,83
SAMN05216198_1896	ferredoxin--NADP <sup>+</sup> reductase	-1,82
SAMN05216198_3406	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit b	-1,79
SAMN05216198_2028	cytochrome c oxidase accessory protein FixG	-1,67
SAMN05216198_3404	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit alpha	-1,66
SAMN05216198_3408	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit a	-1,57
SAMN05216198_0974	succinate dehydrogenase subunit B	-1,53
SAMN05216198_1074	electron transport complex protein RnfC	-1,5
<b>Zellteilung</b>		
SAMN05216198_3410	chromosome segregation DNA-binding protein	-1,73
<b>Aminosäuretransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_1473	putative spermidine/putrescine transport system substrate-binding protein	-1,88
SAMN05216198_3206	imipenem/basic amino acid-specific outer membrane pore	-2,44
SAMN05216198_0474	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	-2,10
SAMN05216198_3771	D-methionine transport system substrate-binding protein	-2,03
SAMN05216198_2269	Acetyltransferase (GNAT) domain-containing protein	-1,82
SAMN05216198_1264	D-amino acid dehydrogenase small subunit	-1,77
SAMN05216198_0303	histidinol phosphate aminotransferase apoenzyme	-1,7
SAMN05216198_1192	methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase /5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	-1,62
<b>Nukleotidtransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_0576	ribonucleoside-triphosphate reductase class III catalytic subunit	-3,79
SAMN05216198_0575	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	-3,09
SAMN05216198_0582	vitamin B12 transporter	-2,26
SAMN05216198_0532	phosphoribosylamine--glycine ligase	-2,11
SAMN05216198_0641	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	-1,88
SAMN05216198_1672	Adenylosuccinate lyase	-1,65
<b>Kohlenhydrattransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_2474	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	-1,9
<b>Coenzymtransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_0871	coproporphyrinogen III oxidase, anaerobic	-2,80
SAMN05216198_0578	ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase	-2,13
SAMN05216198_1503	Pimeloyl-ACP methyl ester carboxylesterase	-1,52
<b>Lipidtransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_1208	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	-2,11
SAMN05216198_2791	glutaryl-CoA dehydrogenase	-1,88
SAMN05216198_2127	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	-1,82
SAMN05216198_1267	Acyl dehydratase	-1,64
SAMN05216198_2645	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	-1,54
<b>Translation, ribosomale Strukturen</b>		
SAMN05216198_2251	ribosomal subunit interface protein	-2,14
SAMN05216198_1162	ribosome modulation factor	-2,15
SAMN05216198_0129	LSU ribosomal protein L25P	-2,08
SAMN05216198_2201	DTW domain-containing protein YfiP	-2,07

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_1673	50S ribosomal protein L16 3-hydroxylase	-1,99
<b>Transkription</b>		
SAMN05216198_2751	NosR/Nirl family transcriptional regulator, nitrous oxide reductase regulator	-1,89
SAMN05216198_1466	Transcriptional regulator GlxA family, contains an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain	-1,78
SAMN05216198_3732	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	-1,68
SAMN05216198_1584	transcriptional regulator, XRE family	-1,62
SAMN05216198_2254	two-component system, response regulator FlrC	-2,17
<b>Replikation &amp; Rekombination, Reparatur</b>		
SAMN05216198_1070	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase /endonuclease III	-2,58
SAMN05216198_2989	Site-specific recombinase XerD	-1,99
SAMN05216198_0872	DNA repair exonuclease SbcCD nuclease subunit	-1,57
SAMN05216198_1339	single-strand DNA-binding protein	-1,54
SAMN05216198_0873	DNA repair exonuclease SbcCD ATPase subunit	-1,52
<b>Zellwand &amp; Membran Biogenese</b>		
SAMN05216198_2299	Apolipoprotein N-acyltransferase	-2,14
SAMN05216198_2472	dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase	-2,13
SAMN05216198_2478	N-acylneuraminate cytidyltransferase/CMP-N,N'-diacetyllegionaminic acid synthase	-1,97
SAMN05216198_0662	Outer membrane protein assembly factor BamD, BamD/ComL family	-1,93
SAMN05216198_2473	galactoside O-acetyltransferase/dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase	-1,89
SAMN05216198_1738	L,D-transpeptidase catalytic domain	-1,88
SAMN05216198_2867	Nucleoside-specific outer membrane channel protein Tsx	-1,83
SAMN05216198_1214	membrane-bound lytic murein transglycosylase D	-1,62
SAMN05216198_1956	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	-1,52
SAMN05216198_0489	periplasmic chaperone for outer membrane proteins Skp	-1,6
<b>Zellmotilität</b>		
SAMN05216198_2172	flagellar basal-body rod protein FlgG	-4,78
SAMN05216198_2173	flagellar basal-body rod protein FlgF	-4,08
SAMN05216198_2171	flagellar L-ring protein precursor FlgH	-3,89
SAMN05216198_2170	flagellar P-ring protein precursor FlgI	-3,61
SAMN05216198_2169	flagellar protein FlgJ	-3,37
SAMN05216198_2174	flagellar hook protein FlgE	-3,29
SAMN05216198_2175	flagellar basal-body rod modification protein FlgD	-2,94
SAMN05216198_2168	flagellar hook-associated protein 1 FlgK	-2,72
SAMN05216198_1493	paraquat-inducible protein B	-2,58
SAMN05216198_1166	Sec-independent protein translocase TatD	-2,12
SAMN05216198_0888	flagellar biosynthesis protein FlhF	-1,95
SAMN05216198_2177	flagellar basal-body rod protein FlgB	-1,84
SAMN05216198_0791	Flagellar hook-length control protein FliK	-1,77
SAMN05216198_2180	flagella basal body P-ring formation protein FlgA	-1,53
SAMN05216198_2447	type IV pilus assembly protein PilE	-3,06
SAMN05216198_2446	type IV pilus assembly protein PilY1	-2,87
SAMN05216198_2445	Tfp pilus assembly protein PilX	-2,85
SAMN05216198_2444	type IV pilus assembly protein PilW	-2,57
SAMN05216198_2443	type IV pilus assembly protein PilV	-1,72
SAMN05216198_1632	type IV pilus assembly protein PilA	-2,62
SAMN05216198_2176	flagellar basal-body rod protein FlgC	-2,61
<b>Chaperone &amp; Posttranslationale Modifikationen</b>		
SAMN05216198_0357	cytochrome c peroxidase	-4,01
SAMN05216198_0574	pyruvate formate lyase activating enzyme	-2,35
SAMN05216198_3201	dimethylsulfide dehydrogenase subunit beta/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit beta	-2,33
SAMN05216198_3203	dimethylsulfide dehydrogenase subunit gamma/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit gamma	-2,25
SAMN05216198_3200	dimethylsulfide dehydrogenase subunit alpha/complex iron-sulfur molybdoenzyme family reductase subunit alpha	-2,21
SAMN05216198_3499	thiol:disulfide interchange protein DsbD	-2,21
SAMN05216198_3539	Protein-disulfide isomerase	-1,78
SAMN05216198_2756	copper chaperone NosL	-2,04
SAMN05216198_1994	glutathione S-transferase	-2,01

## TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_3202	DMSO reductase family type II enzyme chaperone	-1,93
SAMN05216198_2101	monothiol glutaredoxin	-1,63
SAMN05216198_2104	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD	-1,6
<b>Ionentransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_3260	iron complex outermembrane receptor protein	-2,39
SAMN05216198_2688	multisubunit potassium/proton antiporter, PhaG subunit	-3,04
SAMN05216198_1180	phosphoadenylylsulfate reductase (thioredoxin)	-2,55
SAMN05216198_3480	outer membrane protein, cobalt-zinc-cadmium efflux system	-2,46
SAMN05216198_2687	multisubunit potassium/proton antiporter, PhaF subunit	-2,41
SAMN05216198_0307	adenylylsulfate kinase /sulfate adenylyltransferase subunit 1	-2,32
SAMN05216198_2752	nitrous oxide reductase apoprotein	-2,18
SAMN05216198_0306	sulfate adenylyltransferase subunit 2	-2,15
SAMN05216198_0475	arsenate reductase	-2,07
SAMN05216198_2686	multisubunit potassium/proton antiporter, PhaE subunit	-1,97
SAMN05216198_2298	magnesium and cobalt transporter	-1,91
SAMN05216198_0581	iron complex transport system substrate-binding protein	-1,76
SAMN05216198_3479	membrane fusion protein, cobalt-zinc-cadmium efflux system	-1,75
SAMN05216198_3293	iron complex transport system substrate-binding protein	-1,67
SAMN05216198_0864	nitric oxide reductase, NorC subunit apoprotein	-1,61
SAMN05216198_3453	zinc transport system substrate-binding protein	-1,6
SAMN05216198_2684	multisubunit potassium/proton antiporter, PhaC subunit	-1,54
<b>Generelle Funktionsvorhersage</b>		
SAMN05216198_2754	Cu-processing system ATP-binding protein	-2,32
SAMN05216198_1674	Predicted N-acyltransferase, GNAT family	-2,26
SAMN05216198_0323	AAA ATPase domain-containing protein	-2,01
SAMN05216198_2332	Tetratricopeptide repeat-containing protein	-1,63
SAMN05216198_3496	Uncharacterized copper-binding protein, cupredoxin-like subfamily	-1,56
<b>Unbekannt</b>		
SAMN05216198_3782	outer membrane protein	-4,31
SAMN05216198_1785	hypothetical protein	-3,90
SAMN05216198_0237	dissimilatory nitrite reductase (NO-forming), copper type apoprotein	-3,84
SAMN05216198_1786	hypothetical protein	-3,65
SAMN05216198_1782	hypothetical protein	-3,51
SAMN05216198_1783	hypothetical protein	-3,47
SAMN05216198_2202	hypothetical protein	-3,14
SAMN05216198_2919	hypothetical protein	-3,06
SAMN05216198_0747	hypothetical protein	-2,65
SAMN05216198_1266	Uncharacterized membrane protein Ykvl	-2,64
SAMN05216198_1452	hypothetical protein	-2,53
SAMN05216198_0748	outer membrane autotransporter barrel domain-containing protein	-2,50
SAMN05216198_3884	hypothetical protein	-2,40
SAMN05216198_2918	TIR domain-containing protein	-2,37
SAMN05216198_3261	Protein of unknown function	-2,19
SAMN05216198_0210	hypothetical protein	-2,19
SAMN05216198_0340	hypothetical protein	-2,03
SAMN05216198_2991	hypothetical protein	-1,97
SAMN05216198_0207	hypothetical protein	-1,96
SAMN05216198_0208	hypothetical protein	-1,82
SAMN05216198_2011	Chlorophyllase enzyme	-1,74
SAMN05216198_0205	protein of unknown function	-1,65
SAMN05216198_0116	hypothetical protein	-1,54
SAMN05216198_1325	hypothetical protein	-4,02
SAMN05216198_1492	hypothetical protein	-3,38
SAMN05216198_1784	hypothetical protein	-3,02
SAMN05216198_0238	hypothetical protein	-2,93
SAMN05216198_0322	hypothetical protein	-2,71
SAMN05216198_3289	hypothetical protein	-2,68
SAMN05216198_2479	hypothetical protein	-2,48
SAMN05216198_1041	hypothetical protein	-2,40
SAMN05216198_3557	hypothetical protein	-2,37

<b>Genname</b>	<b>Produkt</b>	<b>M-Wert (log<sub>2</sub> fache Änderung)</b>
SAMN05216198_3556	hypothetical protein	-2,35
SAMN05216198_2471	hypothetical protein	-2,29
SAMN05216198_1543	hypothetical protein	-2,28
SAMN05216198_1069	hypothetical protein	-2,27
SAMN05216198_1925	Protein of unknown function	-2,22
SAMN05216198_1397	hypothetical protein	-2,20
SAMN05216198_3205	Uncharacterized protein	-2,16
SAMN05216198_1787	hypothetical protein	-2,13
SAMN05216198_1451	hypothetical protein	-2,10
SAMN05216198_1450	hypothetical protein	-2,05
SAMN05216198_1726	hypothetical protein	-2,03
SAMN05216198_1644	hypothetical protein	-2,02
SAMN05216198_1449	hypothetical protein	-2,01
SAMN05216198_1725	hypothetical protein	-2,01
SAMN05216198_1330	hypothetical protein	-2,01
SAMN05216198_1645	hypothetical protein	-2,00
SAMN05216198_0211	Protein of unknown function	-1,94
SAMN05216198_1642	hypothetical protein	-1,92
SAMN05216198_1310	modulator of FtsH protease	-1,92
SAMN05216198_1326	hypothetical protein	-1,91
SAMN05216198_3395	Protein of unknown function	-1,9
SAMN05216198_1541	hypothetical protein	-1,89
SAMN05216198_0315	hypothetical protein	-1,89
SAMN05216198_2076	hypothetical protein	-1,89
SAMN05216198_1342	hypothetical protein	-1,89
SAMN05216198_2586	cholesterol transport system auxiliary component	-1,85
SAMN05216198_1386	hypothetical protein	-1,85
SAMN05216198_1504	hypothetical protein	-1,81
SAMN05216198_2463	hypothetical protein	-1,78
SAMN05216198_1623	hypothetical protein	-1,78
SAMN05216198_1717	hypothetical protein	-1,77
SAMN05216198_3501	Protein of unknown function	-1,76
SAMN05216198_3896	hypothetical protein	-1,75
SAMN05216198_3512	mercuric ion binding protein	-1,74
SAMN05216198_1395	FecR family protein	-1,73
SAMN05216198_0533	"IMP cyclohydrolase	-1,73
SAMN05216198_2268	hypothetical protein	-1,73
SAMN05216198_3824	P-loop containing region of AAA domain-containing protein	-1,72
SAMN05216198_2755	Cu-processing system permease protein	-1,72
SAMN05216198_1494	paraquat-inducible protein A	-1,71
SAMN05216198_0321	hypothetical protein	-1,7
SAMN05216198_1385	hypothetical protein	-1,69
SAMN05216198_2995	hypothetical protein	-1,69
SAMN05216198_0324	Uncharacterized conserved protein YodC, DUF2158 family	-1,68
SAMN05216198_2901	hypothetical protein	-1,67
SAMN05216198_0141	Protein of unknown function	-1,66
SAMN05216198_1631	hypothetical protein	-1,66
SAMN05216198_1766	cutinase	-1,65
SAMN05216198_0699	hypothetical protein	-1,65
SAMN05216198_0127	hypothetical protein	-1,64
SAMN05216198_1343	hypothetical protein	-1,64
SAMN05216198_2753	nitrous oxidase accessory protein	-1,63
SAMN05216198_2029	hypothetical protein	-1,62
SAMN05216198_0255	Uncharacterized membrane protein YckC, RDD family	-1,62
SAMN05216198_1422	hypothetical protein	-1,62
SAMN05216198_1457	hypothetical protein	-1,6
SAMN05216198_3632	protein of unknown function	-1,59
SAMN05216198_0318	hypothetical protein	-1,58
SAMN05216198_1445	hypothetical protein	-1,57
SAMN05216198_0845	universal stress protein E	-1,55

TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_1375	hypothetical protein	-1,54
SAMN05216198_1926	Protein of unknown function	-1,53
SAMN05216198_1851	hypothetical protein	-1,53
SAMN05216198_1495	paraquat-inducible protein A	-1,53
SAMN05216198_0320	hypothetical protein	-1,53
SAMN05216198_0106	hypothetical protein	-1,53
SAMN05216198_0735	hypothetical protein	-1,51
SAMN05216198_0325	hypothetical protein	-1,5
<b>Signaltransduktion</b>		
SAMN05216198_3262	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	-3,05
SAMN05216198_3481	two-component system, OmpR family, heavy metal sensor histidine kinase CusS	-1,53
SAMN05216198_0002	nitrogen regulatory protein P-II family	-1,68
SAMN05216198_0687	nitrogen regulatory protein P-II family	-1,66
<b>Transport, Sekretion, Vesikel</b>		
SAMN05216198_1453	general secretion pathway protein G	-3,17
SAMN05216198_2757	sec-independent protein translocase protein TatA	-2,32
SAMN05216198_0654	general secretion pathway protein G	-2,20
SAMN05216198_1444	type II secretion system protein G (GspG)	-2,06
SAMN05216198_1446	type II secretion system protein G (GspG)	-1,97
SAMN05216198_1447	general secretion pathway protein F	-1,94
SAMN05216198_1443	general secretion pathway protein G	-1,88
SAMN05216198_1448	general secretion pathway protein E	-1,79
SAMN05216198_0655	general secretion pathway protein H	-1,75
SAMN05216198_0659	type II secretion system protein L (GspL)	-1,66
SAMN05216198_0653	general secretion pathway protein F	-1,6
SAMN05216198_0656	general secretion pathway protein I	-1,59
SAMN05216198_0657	general secretion pathway protein J	-1,58
SAMN05216198_0658	general secretion pathway protein K	-1,51
<b>Abwehrmechanismen</b>		
SAMN05216198_1265	Enamine deaminase RidA, house cleaning of reactive enamine intermediates, YjgF/YER057c/UK114 family	-2,68
<b>Mobile Elemente</b>		
SAMN05216198_1542	KilA-N domain-containing protein	-2,32
SAMN05216198_3553	Transposase	-1,6

**Tab. A12: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von *H. litoralis* 4h nach Induktion des osmotischen Stresses im Vergleich zur ungestressten Kontrolle als signifikant hoch abundant identifiziert wurden, gruppiert nach ihrer Funktionalität.**

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
<b>Energiehomöostase</b>		
SAMN05216198_2798	cytochrome b561	2,06
SAMN05216198_2233	starch synthase (maltosyl-transferring)	1,80
SAMN05216198_2235	Rubryerythrin	1,76
SAMN05216198_0184	Cytochrome c, mono-and diheme variants	1,67
SAMN05216198_0188	quinol:cytochrome c oxidoreductase iron-sulfur protein precursor	1,63
SAMN05216198_2871	pyruvate dehydrogenase (quinone)	1,63
SAMN05216198_0187	quinol:cytochrome c oxidoreductase pentaheme cytochrome subunit	1,56
<b>Zellteilung</b>		
SAMN05216198_3616	Cell division and transport-associated protein TolR	1,60
<b>Aminosäuretransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_0182	acetylornithine aminotransferase/4-aminobutyrate aminotransferase	2,02
SAMN05216198_0802	aspartate kinase	1,90
<b>Kohlenhydrattransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_2232	trehalose synthase	1,59
<b>Coenzymtransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_0351	trimethylamine monooxygenase	1,67
SAMN05216198_0181	Phosphoglycerate dehydrogenase	1,53

Gencode	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
<b>Lipidtransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_2234	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family	2,11
SAMN05216198_2245	Protein of unknown function	2,08
SAMN05216198_1142	2,4-dienoyl-CoA reductase	1,95
<b>Transkription</b>		
SAMN05216198_1238	AraC-type DNA-binding protein	3,49
SAMN05216198_2243	Rho termination factor, N-terminal domain	1,50
<b>Zellwand &amp; Membran Biogenese</b>		
SAMN05216198_1091	Small-conductance mechanosensitive channel	1,61
SAMN05216198_1937	Membrane protein involved in the export of O-antigen and teichoic acid	1,56
<b>Zellmotilität</b>		
SAMN05216198_2658	TatD DNase family protein	3,18
<b>Ionentransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_1243	catecholate siderophore receptor	3,09
SAMN05216198_2111	bacterioferritin-associated ferredoxin	2,76
SAMN05216198_1685	outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	2,32
SAMN05216198_1686	outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	2,27
SAMN05216198_3222	outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	1,91
SAMN05216198_0549	iron complex outermembrane receptor protein	1,84
SAMN05216198_1239	ferric enterobactin receptor	1,79
SAMN05216198_0587	iron complex outermembrane receptor protein	1,74
SAMN05216198_3298	outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	1,60
<b>Sekundärmetabolit Biosynthese</b>		
SAMN05216198_0803	ectoine hydroxylase	1,66
<b>Generelle Funktionsvorhersage</b>		
SAMN05216198_2349	chromate reductase	3,30
SAMN05216198_1646	CxxC motif-containing protein, DUF1111 family	2,40
SAMN05216198_1689	Uncharacterized conserved protein, contains GH25 family domain	2,02
SAMN05216198_3328	2-nitropropane dioxygenase precursor	1,53
<b>Unbekannt</b>		
SAMN05216198_0817	protein of unknown function	5,53
SAMN05216198_1648	hypothetical protein	3,19
SAMN05216198_3294	AMP-binding enzyme	2,93
SAMN05216198_1647	imelysin. Metallo peptidase. MEROPS family M75	2,93
SAMN05216198_2834	hypothetical protein	2,50
SAMN05216198_1645	hypothetical protein	2,38
SAMN05216198_1687	hypothetical protein	2,31
SAMN05216198_1644	hypothetical protein	2,31
SAMN05216198_2835	Uncharacterized iron-regulated membrane protein	2,07
SAMN05216198_1556	hypothetical protein	2,07
SAMN05216198_0064	hypothetical protein	2,05
SAMN05216198_2795	iron complex transport system permease protein	1,94
SAMN05216198_3291	iron complex transport system permease protein	1,91
SAMN05216198_2246	hypothetical protein	1,87
SAMN05216198_1688	Hypothetical protein	1,83
SAMN05216198_2244	Protein of unknown function	1,82
SAMN05216198_2794	iron complex transport system permease protein	1,80
SAMN05216198_2836	Protein of unknown function	1,78
SAMN05216198_2236	hypothetical protein	1,77
SAMN05216198_1242	PKHD-type hydroxylase	1,74
SAMN05216198_2831	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase QseC	1,72
SAMN05216198_3290	iron complex transport system permease protein	1,72
SAMN05216198_1559	hypothetical protein	1,71
SAMN05216198_0548	Uncharacterized iron-regulated membrane protein	1,66
SAMN05216198_3132	hypothetical protein	1,63
SAMN05216198_3783	Protein of unknown function	1,63
SAMN05216198_2647	nitric oxide dioxygenase	1,59
SAMN05216198_3292	iron complex transport system ATP-binding protein	1,59
SAMN05216198_0547	hypothetical protein	1,58
SAMN05216198_3293	iron complex transport system substrate-binding protein	1,54

## TABELLEN

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
SAMN05216198_1089	Predicted outer membrane protein	1,52
<b>Signaltransduktion</b>		
SAMN05216198_3118	methyl-accepting chemotaxis protein	1,50
<b>Transport, Sekretion, Vesikel</b>		
SAMN05216198_3571	Zn-binding Pro-Ala-Ala-Arg (PAAR) domain-containing protein, involved in TypeVI secretion	1,98
<b>Mobile Elemente</b>		
SAMN05216198_2086	phage baseplate assembly protein V	3,20
SAMN05216198_1554	Putative phage holin	2,36
SAMN05216198_2083	phage tail protein, P2 protein I family	2,35
SAMN05216198_1555	Putative 3TM holin, Phage_holin_3	2,07
SAMN05216198_1557	Phage DNA packaging protein, Nu1 subunit of terminase	1,90
SAMN05216198_2796	iron complex transport system substrate-binding protein	1,89
SAMN05216198_2099	Integrase	1,63
SAMN05216198_1024	phage terminase, small subunit, putative, P27 family	1,63

**Tab. A13: Alle Transkripte, die in der Transkriptomstudie von *H. litoralis* 4h nach Induktion des osmotischen Stresses im Vergleich zur ungestressten Kontrolle als signifikant niedrig abundant identifiziert wurden, gruppiert nach ihrer Funktionalität.**

Genname	Produkt	M-Wert (log <sub>2</sub> fache Änderung)
<b>Energiehomöostase</b>		
SAMN05216198_3199	Cytochrome c553	-2,29
<b>Aminosäuretransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_1473	putative spermidine/putrescine transport system substrate-binding protein	-1,88
<b>Nukleotidtransport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_0576	ribonucleoside-triphosphate reductase class III catalytic subunit	-3,79
SAMN05216198_0575	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	-3,09
<b>Translation, ribosomale Strukturen</b>		
SAMN05216198_2251	ribosomal subunit interface protein	-2,14
<b>Transkription</b>		
SAMN05216198_2751	NosR/Nirl family transcriptional regulator, nitrous oxide reductase regulator	-1,89
<b>Replikation, Rekombination, Reparatur</b>		
SAMN05216198_1576	exonuclease SbcC	-1,99
<b>Zellmotilität</b>		
SAMN05216198_2447	type IV pilus assembly protein PilE	-3,06
SAMN05216198_2446	type IV pilus assembly protein PilY1	-2,87
SAMN05216198_2445	Tfp pilus assembly protein PilX	-2,85
SAMN05216198_2444	type IV pilus assembly protein PilW	-2,57
SAMN05216198_2443	type IV pilus assembly protein PilV	-1,72
<b>Chaperone &amp; Posttranslationale Modifikationen</b>		
SAMN05216198_0357	cytochrome c peroxidase	-4,01
SAMN05216198_0574	pyruvate formate lyase activating enzyme	-2,35
SAMN05216198_3201	dimethylsulfide dehydrogenase subunit beta/complex iron-sulfur	-2,33
SAMN05216198_3203	molybdoenzyme family reductase subunit beta dimethylsulfide dehydrogenase subunit gamma/complex iron-sulfur	-2,25
SAMN05216198_3200	molybdoenzyme family reductase subunit gamma dimethylsulfide dehydrogenase subunit alpha/complex iron-sulfur	-2,21
SAMN05216198_3499	thiol:disulfide interchange protein DsbD	-2,21
SAMN05216198_3539	Protein-disulfide isomerase	-1,78
<b>Ionen transport &amp; Metabolismus</b>		
SAMN05216198_3260	iron complex outer membrane receptor protein	-2,39
SAMN05216198_3770	catalase	-1,61
<b>Unbekannt</b>		
SAMN05216198_3782	outer membrane protein	-4,31
SAMN05216198_1785	hypothetical protein	-3,90
SAMN05216198_0237	dissimilatory nitrite reductase (NO-forming), copper type apoprotein	-3,84
SAMN05216198_1786	hypothetical protein	-3,65

<b>Genname</b>	<b>Produkt</b>	<b>M-Wert (log<sub>2</sub> fache Änderung)</b>
SAMN05216198_1782	hypothetical protein	-3,51
SAMN05216198_1783	hypothetical protein	-3,47
SAMN05216198_2202	hypothetical protein	-3,14
SAMN05216198_2919	hypothetical protein	-3,06
SAMN05216198_0747	hypothetical protein	-2,65
SAMN05216198_1266	Uncharacterized membrane protein Ykvl	-2,64
SAMN05216198_1452	hypothetical protein	-2,53
SAMN05216198_0748	outer membrane autotransporter barrel domain-containing protein	-2,50
SAMN05216198_3884	hypothetical protein	-2,40
SAMN05216198_2918	TIR domain-containing protein	-2,37
SAMN05216198_3261	Protein of unknown function	-2,19
SAMN05216198_0210	hypothetical protein	-2,19
SAMN05216198_0340	hypothetical protein	-2,03
SAMN05216198_2991	hypothetical protein	-1,97
SAMN05216198_0207	hypothetical protein	-1,96
SAMN05216198_0208	hypothetical protein	-1,82
SAMN05216198_2011	Chlorophyllase enzyme	-1,74
SAMN05216198_0205	protein of unknown function	-1,65
SAMN05216198_0116	hypothetical protein	-1,54
SAMN05216198_1380	hypothetical protein	-2,32
SAMN05216198_2287	hypothetical protein	-2,07
SAMN05216198_1379	AAA domain-containing protein	-2,04
SAMN05216198_1577	hypothetical protein	-1,87
SAMN05216198_2545	hypothetical protein	-1,86
SAMN05216198_2286	Peptidase family M48	-1,81
SAMN05216198_2990	hypothetical protein	-1,63
SAMN05216198_0332	hypothetical protein	-1,60
SAMN05216198_1418	hypothetical protein	-1,52
<b>Signaltransduktion</b>		
SAMN05216198_3262	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	-3,05
<b>Transport, Sekretion, Vesikel</b>		
SAMN05216198_1453	general secretion pathway protein G	-3,17
<b>Mobile Elemente</b>		
SAMN05216198_0117	Bacteriophage coat protein B	-2,20



## 7 Anteilserklärung an Publikationen

In dieser Arbeit sind veröffentlichte Daten gezeigt. Hier wird aufgeführt welche Anteile die Doktorandin Luzie Kruse an den folgenden Veröffentlichungen übernommen hat:

Bitzenhofer, N.L.\* , **Kruse, L.\***, Thies, S., Wynands, B., Lechtenberg, T., Rönitz, J., Kozaeva, E., Wirth, N.T., Eberlein, C., Jaeger, K.-E., Nickel, P.I., Heipieper, H.J., Wierckx, N. & Loeschcke, A. (2021) Towards robust *Pseudomonas* cell factories to harbour novel biosynthetic pathways. *Essays Biochem.* **65**:319-336. doi: 10.1042/EBC20200173

Nora Lisa Bitzenhofer*	Anfertigung des Manuskripts, Konzeption und Erstellung der Abbildungen
<b>Luzie Kruse*</b>	Anfertigung des Manuskripts, Konzeption und Erstellung der Abbildungen
Stephan Thies	Konzeptentwurf, Anfertigung des Manuskripts
Benedikt Wynands	Anfertigung des Manuskripts
Thorsten Lechtenberg	Anfertigung des Manuskripts
Jakob Rönitz	Anfertigung des Manuskripts
Ekaterina Kozaeva	Anfertigung des Manuskripts, Konzeption und Erstellung der Abbildungen
Nicolas Tilo Wirth	Anfertigung des Manuskripts, Konzeption und Erstellung der Abbildungen
Christian Eberlein	Anfertigung des Manuskripts
Karl-Erich Jaeger	Überarbeitung des Manuskripts
Pablo Iván Nickel	Überarbeitung des Manuskripts
Hermann J. Heipieper	Überarbeitung des Manuskripts
Nick Wierckx	Konzeptentwurf, Überarbeitung des Manuskripts
Anita Loeschcke	Konzeptentwurf, Planung und Koordination der Manuskriptanfertigung, Überarbeitung des Manuskripts

\*diese Autorinnen haben gleichermaßen zu dieser Veröffentlichung beigetragen

**Kruse, L.**, Loeschcke, A., de Witt, J., Wierckx, N., Jaeger, K.-E. & Thies, S. (2023). *Halopseudomonas* species: Cultivation and molecular genetic tools. *Microb Biotechnol* **00**: 1-14. doi: 10.1111/1751-7915.14369

<b>Luzie Kruse</b>	Konzeptentwurf, Planung, Entwicklung der Methoden, Durchführung und Analyse der Experimente, Konzeption und Erstellung der Abbildungen, Anfertigung des Manuskripts
Anita Loeschcke	Konzeptentwurf, Projektadministration, Fördermittelakquise, Überarbeitung des Manuskripts
Jan de Witt	Unterstützung bei der Methodenentwicklung
Nick Wierckx	Konzeptentwurf, Projektadministration, Fördermittelakquise, Überarbeitung des Manuskripts
Karl-Erich Jaeger	Konzeptentwurf, Projektadministration, Fördermittelakquise, Überarbeitung des Manuskripts
Stephan Thies	Konzeptentwurf, Projektadministration, Fördermittelakquise, Überarbeitung des Manuskripts

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei meiner Doktorarbeit begleitet haben. Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Gelegenheit, dieses spannende Thema während meiner Dissertation am Institut für Molekulare Enzymtechnologie zu bearbeiten, sowie für Seine hilfreichen Anmerkungen bei Manuskripten oder wissenschaftlichen Vorträgen. Während meiner Promotion waren die ersten Jahre durch die Corona-Pandemie geprägt. Sie haben es dennoch geschafft mir ein sicheres Gefühl zu vermitteln und gleichzeitig die Möglichkeit geboten die Arbeiten im Labor den Umständen entsprechend fortzuführen.

Als nächstes bedanke ich mich bei Prof. Dr. Nick Wierckx für die Übernahme des Korreferats und die Koordination des No-Stress Projekts. Es waren jedes Mal sehr produktive und kooperative Treffen. Auch in Deiner Funktion als mein Mentor hast Du mich während der Promotion unterstützt. Dafür möchte ich Dir ganz besonders danken.

Für die Betreuung während meiner Promotion danke ich insbesondere Dr. Stephan Thies. Stephan, nach einem holprigen Start dieser Promotion habe ich es auch Dir zu verdanken, dass diese Arbeit doch noch so rund geworden ist. Du hast immer wieder neue Ideen gehabt, wie ich aus lauter negativen Ergebnissen dennoch etwas positives herausziehen konnte. Dein kontinuierliches Vertrauen in dieses Projekt und in meine Arbeit sowie Deine stetige Motivation haben mir geholfen, den Kopf nicht in den Sand zu stecken, sondern nach vorn zu blicken.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Anita Loeschcke. Du hast Dich mit deiner fröhlichen und motivierenden Art über jedes Ergebnis so sehr gefreut, dass es einfach nur auf mich überspringen konnte. Da diese Arbeit im Rahmen des BMBF-Projekts No-Stress entstanden ist, möchte ich mich auch bei allen Projektpartnern und Jan für die zahlreichen Meetings, hilfreichen Diskussion und erfolgreichen Kooperationen bedanken. Ohne Euer zutun wäre diese Arbeit nicht zu dem geworden, was sie jetzt ist.

Ich danke auch der gesamten AG Loeschcke / Thies und AG Drepper. Ihr habt mich von Beginn an begleitet und das IMET zu einem zweiten zu Hause gemacht. Es war immer eine wunderbare Arbeitsatmosphäre, die schließlich dazu geführt hat, dass ich die letzten sechs Jahre gerne hier war. Ganz besonders möchte ich Dr. Thomas Drepper danken. Tom, du hast immer ein offenes Ohr für alle, unterstützt jeden so gut Du kannst und stehst jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank dafür. Ich danke auch Vera Svensson und Esther Knieps-Grünhagen. Ihr habt mir immer hilfsbereit und motiviert zur Seite gestanden. Dr. Achim Heck, Dir danke ich für die ganze Organisation im Hintergrund.

Aus einer Fahrgemeinschaft nach Jülich hat sich im Laufe der Zeit die erweiterte Fahrgemeinschaft gebildet und aus Arbeitskollegen wurden Freunde. Fabi, Andreas, Oli,

Franzi, Nora, Alex, Andrea, Patrick und Robin. Ich bin Euch so unglaublich dankbar, dass es mir schwer fällt Worte zu finden, die dem gerecht werden. Ihr habt in jeden noch so stressigen Tag Leichtigkeit gebracht. Die unzähligen privaten Treffen und Aktionen sind wunderbare Erinnerungen, die immer in meinem Kopf bleiben werden. Vielen Dank für diese unvergessliche Zeit. Ich bin mir sicher, dass dieser Kontakt auch über Distanzen aufrecht erhalten bleibt. Ganz besonders möchte ich Nora und Fabi danken. Fabi, ich denke ohne deinen Zuspruch und deinen Input hätte mir zwischendurch deutlich mehr Gedanken gemacht, ob ich dieses Projekt weiterführen möchte. Nora, Du und Alex seit neben Arbeitskollegen auch die besten Nachbarn geworden. Du hast mit mir zusammen in einem Projekt gearbeitet und abends den Adventskranz gebunden. Auf meiner bislang größten Reise hast Du mich am intensivsten begleitet. Vielen, vielen Dank für alles!

Irma, mit dir habe ich mein Nutellabrot mit Butter geteilt und bin Dich zum Glück nie wieder losgeworden. Du bist seit dem Bachelor an meiner Seite. Durch deine hartnäckige, ehrliche und auch ein bisschen verrückte Art hast Du mich immer gepusht und bestärkt in dem, was ich tue. Kathi, in den letzten Jahren hast Du mir sehr oft wieder vor Augen geführt, wie gut mir der Ausgleich neben der Arbeit tut. Ich bin wirklich froh, über unser Gruppetto Floo und jede Ausfahrt, die für mich ständig ein über mich hinauswachsen war, ohne auf die Schnauze zu fliegen. Danke dafür!

Außerdem möchte ich mich bei meine Bachelorstudenten bedanken, die ich auf Ihren ersten Schritten auf dem Weg zu Wissenschaftlern anleiten und begleiten durfte. Yannick, Nadine, vielen Dank für Eure Motivation und Fleiß, Ihr wart mir eine große Hilfe dabei dieses Projekt erfolgreich abzuschließen. Es war mir eine große Freude Euch zu Betreuen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner Familie und Daniel für die stetige Unterstützung während der letzten Jahre bedanken. Ohne Eure Geduld und Euren Zuspruch wäre ich heute nicht an diesem Punkt. Vielen Dank, dass Ihr immer auf mich aufpasst und mich in dem bestärkt, was ich mache.

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Frau Luzie Kruse, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Luzie Kruse