Für die Herstellung der verschiedenen Gvp_{his}-Proteine wurde *Hfx. volcanii* mit den jeweiligen pJAS35-Plasmidkonstrukten transformiert. Verwendet wurden die Konstrukte mcD_{his}^{ex} und mcE_{his}^{ex} (Zimmermann unveröffentlicht, 2003) und cE_{his}^{ex} (Plößer, 1998). Die Produktion und Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie erfolgte wie in Kapitel 3.3.8.4 beschrieben.

Für Zellsedimente aus einem Kulturvolumen bis 500 ml (OD_{600} = 0,9 bis 1,3) wurde die Reinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie mittels *batch*-Verfahren durchgeführt. Der Reinigungserfolg wurde durch SDS-PAGE kontrolliert. Aus dem Zellsediment einer 500 ml Kultur (OD_{600} = 0,96) der mcD_{his}^{ex}-*Hfx. volcanii*-Transformanten konnte insgesamt 600 µg Protein erhalten werden. Anhand des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels wurde deutlich, dass in den Elutionsfraktionen der Reinigung von $mcGvpD_{his}$ (62 kDa) aus *Hfx. volcanii* WFD11 zwei Proteine mit einer ungefähren molaren Masse von 60 kDa vorhanden waren (Abb. 22A). Aus früheren Analysen war bereits bekannt, dass die Inkubation eines Zelllysates von *Hfx. volcanii* oder *Hfx. mediterranei* mit einer Ni-NTA-Agarosematrix immer zu einer simultanen Anreicherung eines ca. 60 kDa Proteins (Protein X) zusätzlich zum gewünschten Gvp_{his}-Protein führte (Plößer & Pfeifer, 2002; Zimmermann & Pfeifer, 2003). Eine unspezifische Detektion des Protein X durch die vorhandenen Gvp-Antiseren (mcGvpE, mcGvpD- und cGvpE-Antiserum) konnte ausgeschlossen werden (Plößer & Pfeifer, 2002; Zimmermann & Pfeifer, 2003). Zum spezifischen Nachweis des $mcGvpD_{his}$-Proteins wurde eine Western-Analyse mit mcGvpD-Antiserum durchgeführt, die bestätigte, dass es sich bei der oberen der zwei Banden um $mcGvpD_{his}$ handelt (Abb. 22B, C).

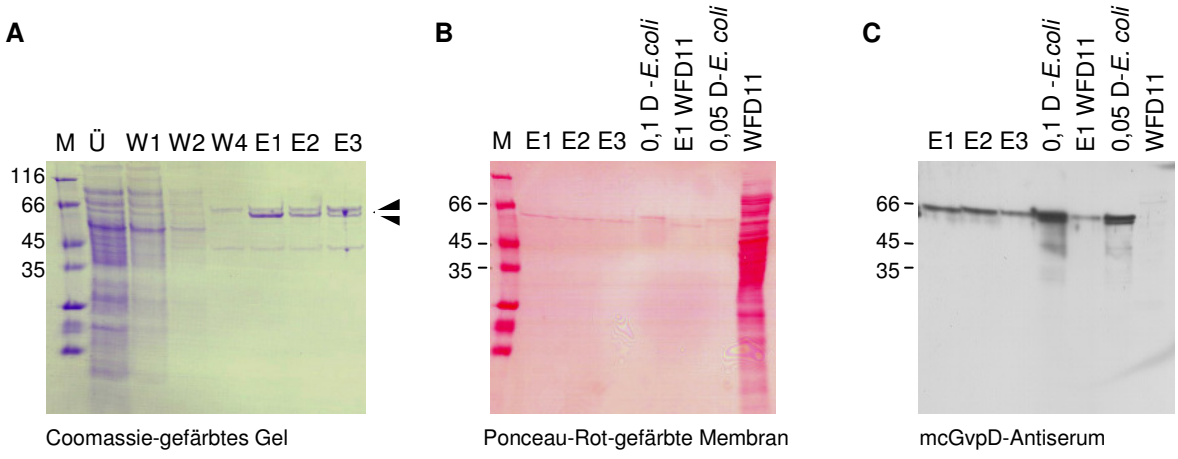


Abb. 22: Überprüfung der Reinigung von $mcGvpD_{his}$ aus *Hfx. volcanii* WFD11. **(A)** Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen wurden jeweils 13 µl des Überstandes (Ü), der Waschfraktionen 1, 2, 4 (W1, W2, W4) und der drei Elutionsfraktionen (E1, E2, E3). **(B, C)** Western-Analyse der Elutionsfraktionen der $mcGvpD_{his}$-Reinigung. Es wurden je 0,1 µg der drei Elutionsfraktionen (E1, E2, E3) oder 0,05 µg E1 (E1 WFD11) sowie 0,05 bzw. 0,1 µg $mcGvpD_{his}$ aus *E. coli* (D-*E. coli*) und 20 µg lösliches Gesamtprotein aus *Hfx. volcanii* (WFD11) auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran, die mit Ponceau-Rot gefärbt (B) und mit mcGvpD-Antiserum inkubiert wurde (C). Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards (M) sind jeweils links angegeben.

Um eine größere mcGvpD$_{his}$-Menge zu erhalten wurde eine FPLC-basierte Reinigung über eine 10 ml Ni-NTA-Agarose-Säule (Qiagen, Hilden) vorgenommen. Die Isolierung des mcGvpD$_{his}$-Proteins erfolgte aus dem Zellsediment einer mcD$_{his}^{ex}$-*Hfx. volcanii*-Transformante mit einem Kulturvolumen von 6 l (OD_{600} = 0,7) und wurde wie in Kapitel 3.3.8.4 beschrieben, durchgeführt. Die Elution des Proteins von der Säule erfolgte mit 30 ml Elutionspuffer und wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt (Abb. 23A). Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 23B). Auch hier war in den Elutionsfraktionen neben mcGvpD$_{his}$ das ca. 60 kDa Protein X in ähnlicher Menge vorhanden (Abb. 23B). Die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. In der Elutionsfraktion E3 wurde eine Proteinkonzentration von 1,45 mg/ml, in E4 von 4,85 mg/ml, in E5 von 1,364 mg/ml und in E5 von 0,272 mg/ml erzielt. Insgesamt wurden somit 16 mg Protein erhalten, wobei ungefähr die Hälfte davon durch Protein X repräsentiert wurde.

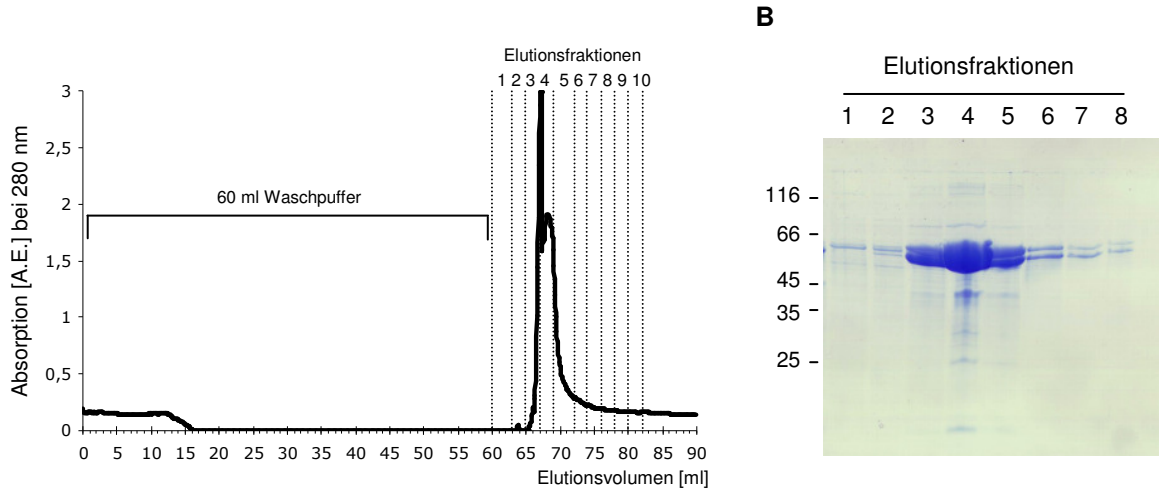


Abb. 23: Reinigung von mcGvpD$_{his}$ aus *Hfx. volcanii* WFD11 mittels Ni-NTA-Agarose-Säule und FPLC. **(A)** Elutionsprofil des Waschschrittes (60 ml) und der Elution (30 ml) einer zuvor mit dem Lysat einer mcD$_{his}^{ex}$-*Hfx. volcanii*-Transformanten beladenen Ni-NTA-Säule. **(B)** Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel der Elutionsfraktionen. Je 13 µl der Elutionsfraktionen wurden aufgetragen. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards sind links angegeben.

Die Reinigung der mcGvpE$_{his}$- und cGvpE$_{his}$-Proteine erfolgte aus Zellsedimenten von 250 ml Kultur (OD_{600} = 1,3 (mcGvpE$_{his}$) und 1,09 (cGvpE$_{his}$)) der entsprechenden *Hfx. volcanii*-Transformanten. Für mcGvpE$_{his}$ wurden 231 µg Protein und für cGvpE$_{his}$ 256 µg Protein erhalten, wobei mehr als die Hälfte dieser Proteinmenge durch das Protein X repräsentiert wurde (Abb. 24A). Um sicherzustellen, dass es sich bei den Proteinbanden im Bereich von 25-35 kDa um mcGvpE$_{his}$ bzw. cGvpE$_{his}$ handelte, wurden Western-Analysen mit mcGvpE- bzw. cGvpE-Antiserum durchgeführt (Abb. 24B, C). Im Fall von cGvpE$_{his}$ zeigte das aus *E. coli* isolierte Protein (N-terminaler His-*tag*) ein anderes Laufverhalten als das aus *Hfx. volcanii* isolierte Protein (C-terminaler His-*tag*). Zusätzlich zu der Monomerbande des

cGvpE$_{his}$-Proteins konnte eine weitere Bande mit einer ungefähren molaren Masse von 55 kDa mit dem cGvpE-Antiserum nachgewiesen werden, wobei es sich wahrscheinlich um das cGvpE-Dimer handelt (Plößer & Pfeifer, 2002).

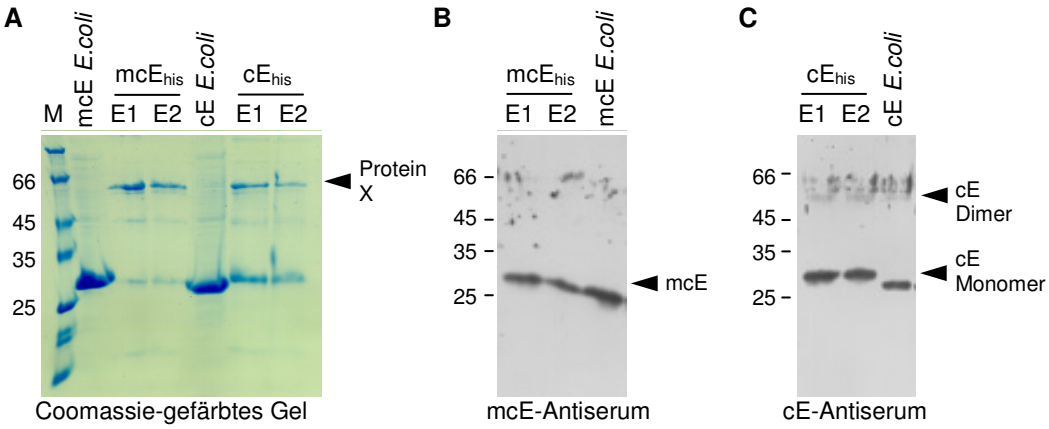


Abb. 24: Kontrolle der Reinigung von mcGvpE$_{his}$ und cGvpE$_{his}$ aus *Hfx. volcanii*. **(A)** Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel. Je 13 µl der Elutionsfraktionen (E1, E2) wurden aufgetragen. Zum Vergleich wurden mcGvpE$_{his}$ und cGvpE$_{his}$ gereinigt aus *E. coli* (mcE *E. coli*; cE *E. coli*) aufgetragen. **(B, C)** Western-Analysen der Elutionsfraktionen. Je 0,2 µg Protein aus *Hfx. volcanii* bzw. 0,1 µg Protein aus *E. coli* wurden mit einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit mcGvpE- (B) oder cGvpE- (C) Antiserum inkubiert. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards sind jeweils auf der linken Seite angegeben.

Da das aus *Hfx. volcanii* WFD11 gereinigte mcGvpD$_{his}$-Protein für Gelfiltrationsanalysen und native elektrophoretische Auftrennungen eingesetzt werden sollte, könnte die Verunreinigung der Proteinlösung mit einem Protein X ähnlicher molarer Masse zu Problemen bei der Auswertung von Testergebnissen führen. Deshalb wurde zunächst versucht, das Protein X durch Variationen der Reinigungsbedingungen zu entfernen.

Zur Optimierung der Reinigungseffizienz von Gvp$_{his}$-Proteinen aus *Hfx. volcanii* WFD11 wurden diverse Modifikationen der Pufferbedingungen getestet. So wurde die Imidazolkonzentration im Immobilisierungs- und Waschpuffer variiert (20 mM und 50 mM), die Glycerinkonzentration im Waschpuffer erhöht (25%), die Salzkonzentration auf 1 M KCl gesenkt. Es war jedoch nicht möglich, mcGvpD$_{his}$ von Protein X abzutrennen. Die größte mcGvpD$_{his}$-Menge im Verhältnis zu Protein X konnte bei einer Reinigung in 1 M KCl erzielt werden. Weiterhin wurden für die Metallchelat-Affinitätschromatographie andere Metallionen eingesetzt (Zn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}), was jedoch ebenfalls nicht zu einem verbesserten Reinigungserfolg führte. Es konnte entweder kein Protein mehr oder lediglich Protein X in den Elutionsfraktionen erhalten werden. Die Ausnutzung dieser Tatsache in Form einer stufenweise angelegten Reinigung führte allerdings auch nicht zur Trennung von mcGvpD$_{his}$ und Protein X.

4.3.2 Identifizierung eines ca. 60 kDa Proteins X aus *Hfx. volcanii* WFD11 als PitA

Um die Identität des ca. 60 kDa Proteins X aus *Hfx. volcanii* zu bestimmen, wurde es allein aus *Hfx. volcanii* gereinigt. Da im Rahmen vieler Reinigungs- und Interaktionsexperimente dieses Protein als unerwünschtes Nebenprodukt erhalten wurde (Plößer & Pfeifer, 2002; Zimmermann & Pfeifer, 2003), wäre es wünschenswert, dies in Zukunft zu vermeiden. Die Identifizierung des Proteins X sollte Hinweise dafür liefern.
Durch Inkubation eines Zelllysates von *Hfx. volcanii* WFD11 mit einer Ni-NTA-Matrix wurde das Protein X in ausreichender Menge und Reinheit für eine N-terminale Sequenzierung erhalten (Abb. 25).

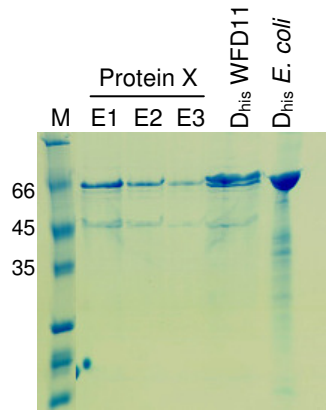


Abb. 25: Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel der Reinigung von Protein X aus *Hfx. volcanii* WFD11. Aufgetragen wurden je 13 µl der Elutionsfraktionen (E1, E2, E3), 13 µl der Proteinmischung aus mcGvpD$_{his}$ und Protein X (D_{his} WFD11) sowie mcGvpD$_{his}$ aus *E. coli* (D_{his} *E.coli*).

Die N-terminale Sequenzierung wurde von R. Mentele (AG Lottspeich, MPI Martinsried) durchgeführt und ergab folgende Aminosäuresequenz.

Protein X: **MVEAPQTDE**

Mit Hilfe einer tfast-Analyse der inzwischen bestimmten *Hfx. volcanii*-Genomsequenz konnte die komplette Aminosäuresequenz des Protein X ermittelt werden (A. Kletzin). Das Protein konnte als ein 56 kDa Protein identifiziert werden, welches eine interne Ansammlung von Histidin-Resten enthält, was die Bindung dieses Proteins an eine Ni-NTA-Matrix erklärt. Eine Literaturrecherche zeigte, dass der offene Leserahmen dieses Proteins bereits durch bioinformatische Studien identifiziert wurde und eine Reinigung des als PitA bezeichneten Proteins durch Co^{2+}-Chelat-Affinitätschromatographie schon erfolgt war (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Bioinformatische Studien (Sequenzhomologien und strukturelle Modellierung) führten hier zur Identifizierung von PitA in *Hfx. volcanii*, das ein einzigartiges Protein aus zwei Domänen darstellt (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Eine Pfam-Datenbankanalyse (Bateman *et al.*, 2004) sagte voraus, dass PitA eine Chloritdismutase-Domäne (PF06778) und eine Antibiotikum-Biosynthese-Monooxygenase (ABM)-verwandte Domäne (PF03992) besitzt, die durch eine Histidin-reiche Region miteinander verbunden sind (Bab-Dinitz *et al.*, 2006).

Chloritdismutasen katalysieren die Disproportionierung von Chlorit zu Chlorid und Sauerstoff über einen Häm-abhängigen Mechanismus. Den Mitgliedern der Chloritdismutase-Familie könnten aber auch andere Rollen als die der Chloritdegradation zukommen. Mitglieder der ABM-Familie sind in die Biosynthese von aromatischen Polyketidantibiotika involviert. Sie zeigen nur mäßige Sequenzhomologien auf und katalysieren verschiedene chemische Reaktionen. Allerdings weisen sie eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf. Bisher charakterisierte Mitglieder der Chloritdismutase-Familie bilden Homo-Tetramere oder Pentamere aus (van Ginkel *et al.*, 1996; Danielsson-Thorel *et al.*, 2002; Ebihara *et al.*,2005). Charakterisierte Mitglieder der ABM-Familie hingegen assemblieren zu Homo-Dimeren (PDB Codes 1LQ9,1R6Y, 1XBW, 1SQE; Bab-Dinitz *et al.*, 2006).

Diese Ergebnisse legen somit die Vermutung nahe, dass auch das PitA-Protein von *Hfx. volcanii* in einer multimeren Form vorliegen könnte. Falls dies wirklich der Fall ist, würde das PitA-Protein Untersuchungen zur Quartärstruktur von mcGvpD$_{his}$ erschweren, da die beiden Proteine möglicherweise Oligomere ähnlicher molarer Massen ausbilden könnten. In den später geschilderten Untersuchungen zur Quartärstruktur von mcGvpD$_{his}$ musste deshalb immer spezifisch zwischen den beiden Proteinen unterschieden werden. Allerdings konnten auch erste Ergebnisse über die mögliche Quartärstruktur von PitA erhalten werden.

Datenbankanalysen machten deutlich, dass auch in anderen halophilen Archaea ein offener Leserahmen, der sowohl für eine Chloritdismutase- als auch eine ABM-Domäne kodiert, gefunden werden kann. Wie PitA aus *Hfx. volcanii* besitzen auch die drei anderen Proteine aus halophilen Archaea (*Hbt. salinarum* NRC-1 Vng2021c, *Har. marismortui* RrnAC3100, *Nmn. pharaonis* NP2262A) eine ähnliche Domänen-Architektur aus zwei hochkonservierten Regionen: einer Chloritdismutase-ähnlichen N-teminalen und einer ABM-ähnlichen C-terminalen Domäne (Bab-Dinitz *et al.*, 2006).

Durch Ni^{2+}-Chelat-Affinitätschromatographie mit Zelllysaten von *Hbt. salinarum* R1 im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls ein ca. 60 kDa Protein gereinigt werden (Abb. 26), was das Vorhandensein des PitA-Proteins in einem Stamm von *Hbt. salinarum* bestätigt.

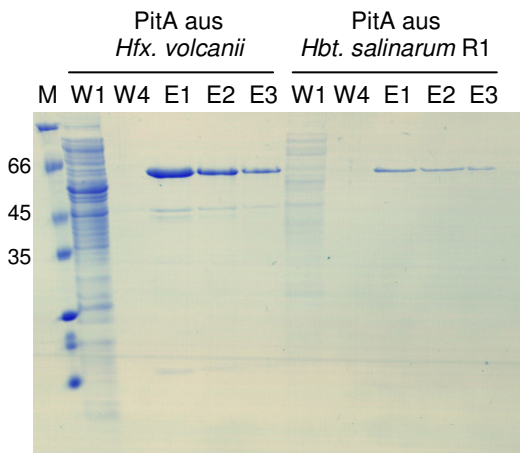


Abb. 26: Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel der Reinigung von PitA aus *Hfx. volcanii* WFD11 und *Hbt. salinarum* R1. Jeweils 13 µl der ersten (W1) und letzten (W4) Waschfraktion und der drei Elutionsfraktionen (E1-E3) wurden aufgetragen. Die molare Masse [kDa] des Protein-Größenstandards ist links angegeben.

Bei Psi-Blast Analysen konnten zwar viele Homologe zu jeweils einer der beiden Domänen von PitA, aber nur 3 Homologe für die komplette PitA-Sequenz gefunden werden. Diese Homologe wurde als hypothetische Proteine annotiert und werden alle drei in halophilen Archaea gefunden. Deshalb schlagen die Autoren eine funktionelle Verbindung zwischen den beiden vorhergesagten Enzymaktivitäten vor, die eine Anpassung an die Umweltbedingungen in hypersalinen Habitaten darstellen könnte (Bab-Dinitz *et al*., 2006).

4.3.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Analyse von Gvp_{his}-Proteinen

Um erste Hinweise über eine mögliche Oligomerisierung des mcGvpD-Proteins zu erhalten, wurde das Protein durch native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert. Mit Hilfe der nativen PAGE werden Proteine anhand ihrer Größe, Ladung und Form aufgetrennt. Der isolelektrische Punkt für das mcGvpD$_{his}$-Protein liegt bei einem pH-Wert von 4,69. Folglich sollte das Protein bei den pH-Werten der verwendeten Gelsysteme negativ geladen vorliegen. Zunächst wurde rekombinant in *E. coli* produziertes mcGvpD$_{his}$-Protein für die Analysen verwendet.

Anfänglich wurden die Untersuchungen mit Blue Native (BN)-PAGE (Schägger & von Jagow, 1991; Schägger *et al*., 1994; Schägger, 2000) und Colorless Native (CN)-PAGE (Schägger *et al*., 1994) durchgeführt. Mit Hilfe dieser beiden Systeme konnte allerdings keine Auftrennung erzielt werden. Das mcGvpD-Protein lag meist extrem fokussiert in der Lauffront vor.

Deshalb wurden in einem nächsten Schritt native Polyacrylamidgele verwendet, die in Gel- und Lauf-Pufferbedingungen den herkömmlich benutzten Polyacrylamidgelen nach Schägger & von Jagow, 1987 entsprachen, wobei lediglich auf die Zugabe von SDS verzichtet wurde. Außerdem bestanden diese Gele nur aus einem Trenngel. Der Auftragspuffer enthielt ebenfalls kein SDS und kein β-Mercaptoethanol.

Mit Hilfe eines 6%igen Polyacrylamidgels ohne SDS wurde denaturierend aus *E. coli* gereinigtes mcGvpD$_{his}$ in 8 M Harnstoff und in 2,5 M KCl (nach Dialyse) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle wurde außerdem das mcGvpD$_{his}$-Protein in 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 mit SDS-Probenpuffer aufgetragen.

Das Kontrollprotein BSA (ohne SDS-Probenpuffer) konnte im nativen Polyacrylamidgel als Monomer-, Dimer- und Trimerbande sichtbar gemacht werden (Abb. 27). Das mcGvpD$_{his}$-Protein in 8 M Harnstoff lief nur leicht in das native Polyacrylamidgel ein. Im Gegensatz dazu wurde das mcGvpD$_{his}$-Protein in 2,5 M KCl an der Geltasche retardiert und lief nicht ins Gel ein. Nur in Gegenwart des SDS-Probenpuffers lief das mcGvpD$_{his}$-Protein ins native

Polyacrylamidgel ein, was andeuten könnte, dass durch die Zugabe von SDS ein möglicher hochmolekularer Komplex von mcGvpD$_{his}$ zumindest teilweise aufgelöst wurde (Abb. 27).

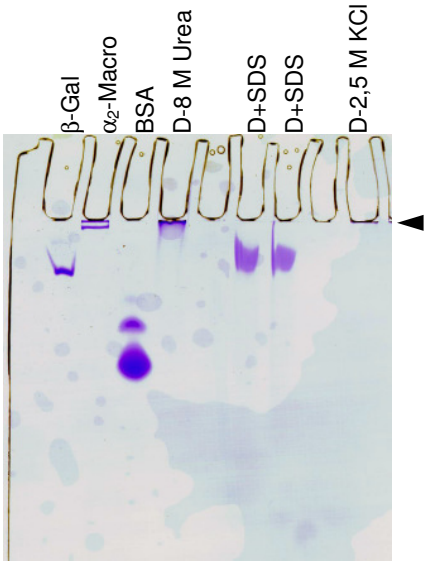


Abb. 27: Coomassie-gefärbtes 6%iges Polyacrylamidgel (Schägger & von Jagow, 1987) ohne SDS. Vom mcGvpD$_{his}$-Protein aus *E. coli* wurden 8,09 µg in 8 M Harnstoff (D-8 M Urea) und 5,15 µg nach Dialyse in 2,5 M KCl (D-2,5 M KCl) mit nativen Probenpuffer aufgetragen. Mit SDS-Probenpuffer wurden 6,81 µg mcGvpD$_{his}$ in 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 (D+SDS) aufgetragen. Als Kontrollproteine verwendet wurden 3 µg β-Galaktosidase (116 kDa), 3,6 µg α_2-Makroglobulin (340 kDa nicht reduziert, 170 kDa reduziert) und 20 µg BSA (66 kDa) mit nativem Probenpuffer.

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss verschiedener Detergenzien auf das Laufverhalten von mcGvpD$_{his}$ untersucht. Zu mcGvpD$_{his}$ aus *E. coli* in 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 oder in 2,5 M KCl wurde je 1% Tween20, Tween80, Triton X-100, β-Mercaptoethanol, SDS oder 1x SDS-Probenpuffer (1,33% SDS; 3,33% β-Mercaptoethanol) gegeben. Nach Inkubation mit den Detergenzien über Nacht, wurden die Proben mit einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Keines der untersuchten Detergenzien war in der Lage, den putativen mcGvpD-Komplex aufzulösen, lediglich durch die Zugabe von SDS konnte ein Einlaufen des Proteins in das native Polyacrylamidgel erzielt werden (Daten nicht gezeigt).
Anschließend sollte nativ aus *Hfx. volcanii* WFD11 gereinigtes mcGvpD$_{his}$-Protein mit Hilfe der nativen Elektrophorese untersucht werden. Die zunächst geringen Proteinmengen, die durch Reinigung im *batch*-Verfahren erzielt werden konnten, reichten allerdings nicht aus, um im nativen Gel nachgewiesen zu werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb konnte diese Untersuchung nur mit dem mcGvpD$_{his}$-Protein, das mittels FPLC-basierter Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt wurde, vorgenommen werden. Nur in den Elutionsfraktionen dieser Reinigung konnten ausreichend hohe Proteinmengen erreicht werden. Bei dem mcGvpD$_{his}$-Protein aus *Hfx. volcanii* muss allerdings die Tatsache berücksichtigt werden, dass es sich hier um ein Proteingemisch aus mcGvpD$_{his}$ und PitA in ungefähr gleichem Mengenverhältnis handelt. Der isoelektrische Punkt des PitA-Proteins liegt bei einem pH-Wert von 4,28. Für die native Gelelektrophorese wurden Thyroglobulin, β-Amylase und BSA als Kontrollproteine verwendet. Unterschiedliche Mengen des mcGvpD$_{his}$-Proteins in 1,5 M KCl wurden mit nativem Probenpuffer versetzt. Zu einer Probe des mcGvpD$_{his}$-Proteins in 1,5 M KCl wurde neben dem nativen Probenpuffer zusätzlich 4 M Harnstoff gegeben, und eine weitere Probe wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach

elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Abb. 28). In allen mcGvpD$_{his}$-Proben konnte eine diskrete Proteinbande in der Mitte des Gels angefärbt werden (Abb. 28). Ob es sich bei dieser Bande allerdings um mcGvpD$_{his}$ oder PitA handelte, musste durch Western-Analyse geklärt werden. Weiterhin konnte entlang der gesamten Laufstrecke bis zur Geltasche eine breite Bandenschar gezeigt werden. In der Probe mit SDS-Probenpuffer konnte im Bereich der Geltasche kein Protein durch Anfärben mit Coomassie sichtbar gemacht werden (Abb. 28). Allerdings wurde eine diffuse Bande im oberen Teil des Gels sichtbar, was darauf hindeutete, dass die Zugabe von SDS hier zumindest teilweise zum Einlaufen des Proteins in das native Polyacrylamidgel geführt hatte (Abb. 28). Die Zugabe von 4 M Harnstoff führte zu keiner wesentlichen Veränderung im Laufverhalten.

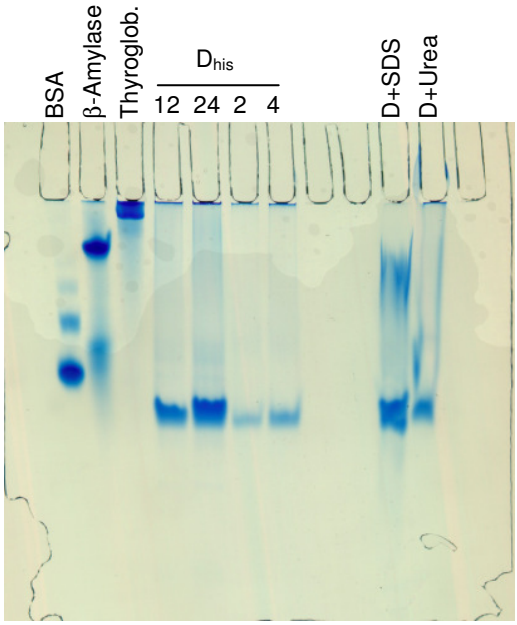


Abb. 28: Coomassie-gefärbtes 6%iges Polyacrylamidgel (Schägger & von Jagow, 1987) ohne SDS. Je 2, 4, 12 oder 24 µg des nativ aus *Hfx. volcanii* WFD11 gereinigten mcGvpD$_{his}$-Proteins (D$_{his}$) in 1,5 M KCl mit nativem Probenpuffer oder 24 µg mcGvpD$_{his}$ mit SDS-Probenpuffer (D+SDS) bzw. 12 µg mcGvpD$_{his}$ mit 4 M Harnstoff (D+Urea) wurden aufgetragen. Als Kontrollproteine verwendet wurden 20 µg BSA (66 kDa), 20 µg β-Amylase (200 kDa) und 20 µg Thyroglobulin (669 kDa) (Thyroglob.) mit nativem Probenpuffer.

Um spezifisch nachzuweisen, wo sich mcGvpD$_{his}$ im Gel befindet, wurden die Proben erneut mit einem 6%igen Polyacrylamidgel ohne SDS aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit mcGvpD-Antiserum inkubiert. Durch die Western-Analyse konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei der diskreten Proteinbande im unteren Bereich des Gels nicht um mcGvpD$_{his}$, sondern um PitA handelt (Abb. 29A, B). Das aus *Hfx. volcanii* WFD11 isolierte mcGvpD$_{his}$ konnte nur als breite Bandenschar nachgewiesen werden, wobei diese Bandenschar nicht über die komplette Laufstrecke verteilt war, sondern schon oberhalb der PitA-Bande endete (Abb. 29A, B). Wie schon anhand des Coomassie-gefärbten nativen Gels gezeigt (Abb. 28), scheint das nativ aus *Hfx. volcanii* isolierte mcGvpD$_{his}$-Protein sowohl am oberen Gelrand zu retardieren, als auch über einen größeren Bereich einzulaufen. Hierbei kann nur spekuliert werden, ob es sich dabei um verschiedene oligomere Zustände oder um Abbauprodukte von mcGvpD$_{his}$ handelt, oder ob dieses Laufverhalten einen Artefakt darstellt, der durch eine spezifische Eigenschaft des mcGvpD$_{his}$-Proteins verursacht wird.

Allerdings scheint dieses Laufverhalten im nativen Gel kein generelles Problem von halophilen Proteinen darzustellen, da im Gegensatz zu mcGvpD$_{his}$ das PitA-Protein als diskrete Bande im nativen Gel nachgewiesen werden konnte.

Durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer konnte die Laufstrecke des mcGvpD$_{his}$-Proteins im nativen Gel vergrößert werden. Weiterhin wurde verhindert, dass ein Teil des Proteins unmittelbar an der Geltasche retardierte (Abb. 29B). Keine Veränderung im Laufverhalten von mcGvpD$_{his}$ konnte durch die Zugabe von 4 M Harnstoff erzielt werden.

Als Kontrolle wurde mcGvpD$_{his}$ aus *E. coli* in 1,25 M KCl mit SDS-Probenpuffer aufgetragen. Im Gegensatz zu den vorherigen Analysen wurde hier allerdings keine diffuse Bande im oberen Bereich des Gels erhalten, sondern mit dem mcGvpD-Antiserum ebenfalls eine breite Bandenschar detektiert (Abb. 29B).

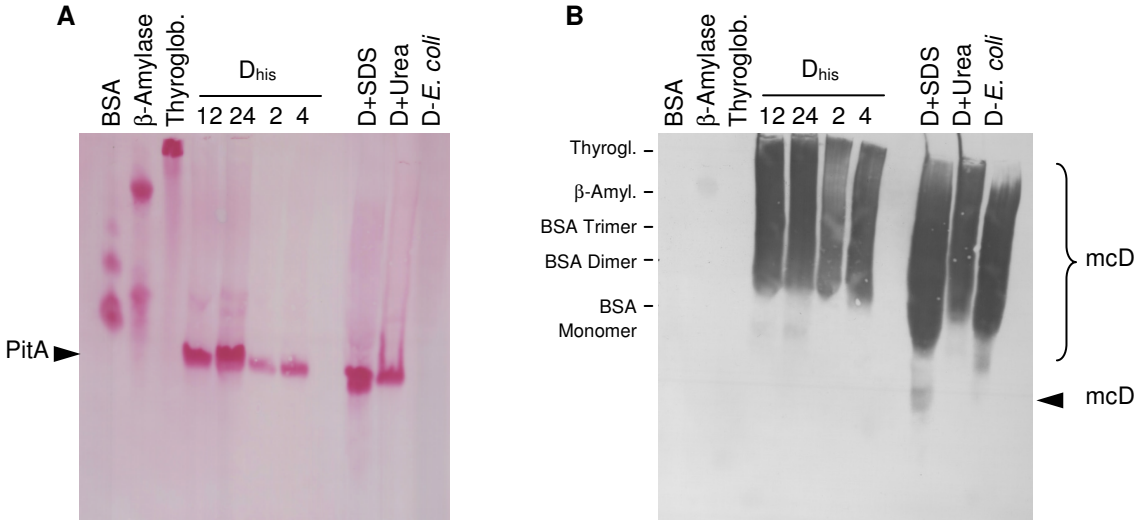


Abb. 29: Western-Analyse zum Nachweis des mcGvpD$_{his}$-Proteins im mcGvpD$_{his}$+PitA-Proteingemisch nach nativer PAGE. Je 2, 4, 12 oder 24 µg des nativ aus *Hfx. volcanii* WFD11 gereinigten mcGvpD$_{his}$-Proteins (D$_{his}$) in 1,5 M KCl mit nativem Probenpuffer, 12 µg mcGvpD$_{his}$ mit 4 M Harnstoff (D+Urea), 24 µg mcGvpD$_{his}$ aus *Hfx. volcanii* mit SDS-Probenpuffer (D+SDS) oder 3,5 µg mcGvpD$_{his}$ aus *E. coli* (D-*E.* coli) in 1,25 M KCl mit SDS-Probenpuffer wurden aufgetragen. Als Kontrollproteine verwendet wurden 20 µg BSA (66 kDa), 20 µg β-Amylase (200 kDa) und 20 µg Thyroglobulin (669 kDa) (Thyroglob.) mit nativem Probenpuffer. Die Proteine wurden mit einem 6%igen nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, mit Ponceau-Rot angefärbt **(A)** und mit mcGvpD-Antiserum inkubiert **(B)**.

Da die bisher mit mcGvpD$_{his}$ aus *E. coli* durchgeführten Analysen mit nativen Polyacrylamidgelen immer nur mit Coomassie gefärbt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben einer diskreten Bande am Geltaschenrand (ohne SDS) oder der diffusen Bande im Gel (mit SDS) auch eine Bandenschar des mcGvpD$_{his}$-Proteins vorhanden war, die aufgrund der geringen Menge durch die Färbung nicht sichtbar wurde. Um dies auszuschließen, wurde die native Polyacrylamidgelelektrophorese mit mcGvpD$_{his}$ aus *E. coli* wiederholt und mittels Western-Analyse überprüft.

Für die native Gelelektrophorese wurde rekombinant in *E. coli* produziertes mcGvpD$_{his}$ unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff), unter nativen Bedingungen nach Rückfaltung mittels Dialyse (2,5 M KCl oder 1,5 M KCl und 10% Glycerin) sowie unter Niedrigsalz-Bedingungen (10 mM Tris-HCl, pH 7,2) eingesetzt. Ebenfalls erneut verwendet wurde das aus *Hfx. volcanii* WFD11 isolierte mcGvpD$_{his}$-Protein, das in 1,5 M KCl, 10% Glycerin, 0,5 M Imidazol vorlag.

Anhand der Western-Analyse konnte gezeigt werden, dass sowohl das mcGvpD$_{his}$-Protein aus *Hfx. volcanii* WFD11 als auch das aus *E. coli* isolierte Protein in einem nativen 6%igen Polyacrylamidgel nicht als diskrete Bande nachgewiesen werden kann, sondern über eine gewisse Laufstrecke im Gel als breite Bandenschar vorhanden ist (Abb. 30B). Dieses Laufverhalten zeigte sich unabhängig davon ob sich das Protein in 8 M Harnstoff, 1,5 M KCl, 2,5 M KCl oder 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 befindet (Abb. 30B). Für die Proben in 8 M Harnstoff, 2,5 M KCl und 1,5 M KCl konnten im unteren Bereich der Bandenschar weiterhin zwei diskrete Proteinbanden durch die Inkubation mit dem mcGvpD-Antiserum nachgewiesen werden (Abb. 30B). Die Zugabe von SDS-Probenpuffer verhindert die Retardation des mcGvpD$_{his}$-Proteins am Geltaschenrand und führt zu einer Bandenschar, die im Vergleich zu den Proben ohne SDS-Probenpuffer eine größere Laufstrecke im Gel zurücklegt (Abb. 30B).

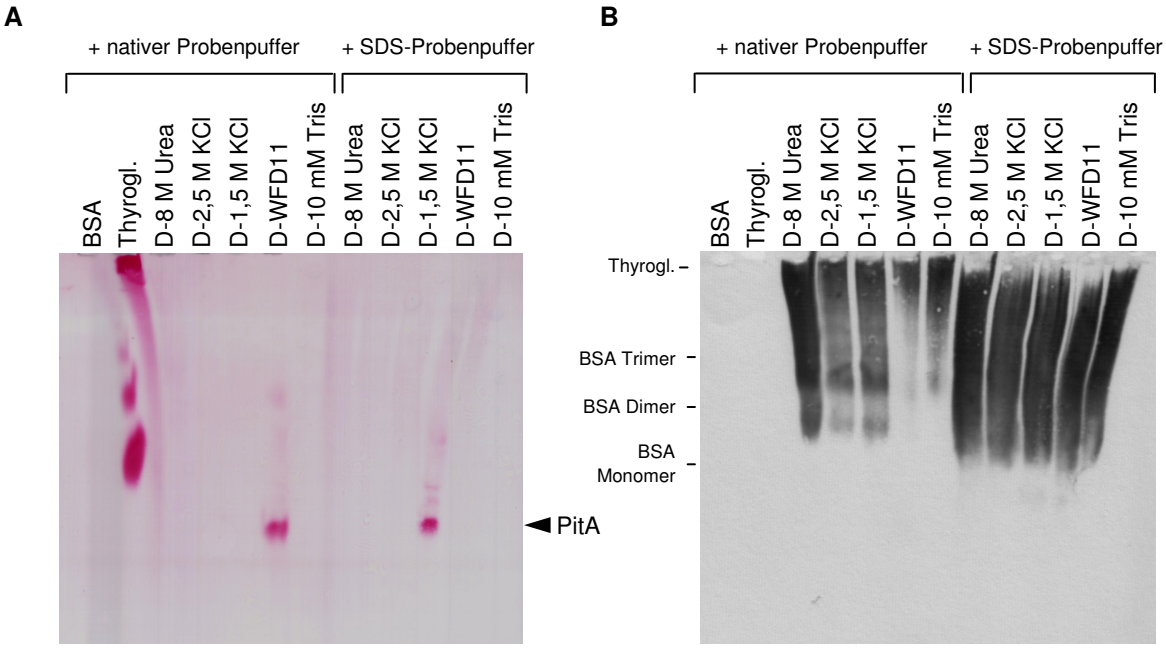


Abb. 30: Western-Analyse eines 6%igen nativen Polyacrylamidgels. Als Kontrollproteine aufgetragen wurden 20 µg BSA (66 kDa) und 20 µg Thyroglobulin (669 kDa) mit nativem Probenpuffer. Verwendet wurde 3 µg mcGvpD$_{his}$ in 8 M Harnstoff (D-8 M Urea), 3 µg mcGvpD$_{his}$ in 2,5 M KCl (D-2,5 M KCl), 3 µg mcGvpD$_{his}$ in 1,5 M KCl, 10% Glycerin (D-1,5 M KCl), sowie 3µg mcGvpD$_{his}$ in 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 (D-10 mM Tris) isoliert aus *E. coli* und 6 µg mcGvpD$_{his}$ in 1,5 M KCl, 10% Glycerin isoliert aus *Hfx. volcanii* WFD11 (D-WFD11). Die Proben wurden entweder mit nativem Probenpuffer und ohne Denaturierung (jeweils links) oder mit SDS-Probenpuffer und einer einminütigen Denaturierung bei 95°C (jeweils rechts) aufgetragen. Die Proteine wurden mittels nativer PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, mit Ponceau-Rot angefärbt **(A)** und mit mcGvpD-Antiserum inkubiert **(B).**

Festzuhalten ist, dass das mcGvpD$_{his}$-Protein (62 kDa) nicht als eine diskrete Proteinbande in einem 6%igen nativen Polyacrylamidgel nachgewiesen werden konnte, sondern lediglich als eine Schar von Banden in der oberen Hälfte des Gels. Vergleicht man dieses Laufverhalten mit dem Laufverhalten des PitA-Proteins, dass in seiner monomeren Form mit 56 kDa eine ähnliche Größe wie mcGvpD$_{his}$ aufweist, so könnte man mutmaßen, dass mcGvpD$_{his}$ hier nicht in einer monomeren Form vorliegt.

Zusätzlich zu mcGvpD$_{his}$ wurden auch mcGvpE$_{his}$ und cGvpE$_{his}$ elektrophoretisch mit einem nativen 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Western-Analyse mit cGvpE- und mcGvpE-spezifischem Antiserum nachgewiesen. Für mcGvpE$_{his}$ aus *E. coli* (isoliert in 8 M Harnstoff und rückgefaltet durch Dialyse in 2,5 M KCl), ließen sich durch die Western-Analyse diskrete Banden in einer breiten Bandenschar nachweisen, die sich über die komplette Laufstrecke des Gels verteilte (Abb. 31A). Die denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) oder die Zugabe von SDS-Probenpuffer vergrößerten die Laufweite des mcGvpE$_{his}$-Proteins im nativen Polyacrylamidgel. Das mcGvpE$_{his}$-Protein in 8 M Harnstoff (also vor der Rückfaltung mittels Dialyse) bildete eine Bandenschar über die komplette Laufstrecke, wobei sich jeweils am Ende derselben, eine diskrete Bande erahnen ließ (Abb. 31A). Durch Zugabe von SDS-Probenpuffer zum dialysierten Protein konnte im unteren Bereich des Gels eine verstärkte, diskrete Bande in einer diffusen Bandenschar nachgewiesen werden (Abb. 31A). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für das cGvpE$_{his}$-Protein erhalten werden (Abb. 31B).

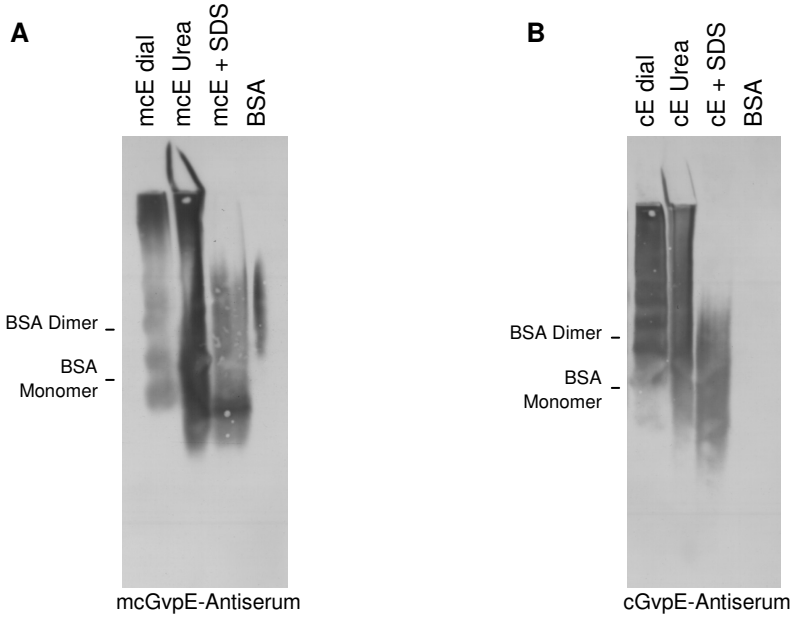


Abb. 31: Western-Analyse der Nativ-Gele von mcGvpE$_{his}$ **(A)** und cGvpE$_{his}$ **(B)** isoliert aus *E. coli*. Nach elektrophoretischer Auftrennung in 6%igen nativen Polyacrylamidgelen wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit mcGvpE- (A) oder cGvpE- (B) Antiserum inkubiert. **(A)** Aufgetragen wurden 20 µg BSA, 6,61 µg mcE$_{his}$ in 8 M Harnstoff (mcE Urea), 3,75 µg mcE$_{his}$ dialysiert in 2,5 M KCl (mcE dial) sowie 5,73 µg mcE$_{his}$ mit SDS-Probenpuffer (mcE + SDS). **(B)** Aufgetragen wurden 20 µg BSA, 5,28 µg cE$_{his}$ in 8 M Harnstoff (cE Urea), 4,89 µg cE$_{his}$ dialysiert in 2,5 M KCl (cE dial) sowie 4,24 µg cE$_{his}$ mit SDS-Probenpuffer (cE + SDS).

Im Vergleich zu den nativen Polyacrylamidgelelektrophoresen von mcGvpD$_{his}$ fällt auf, dass auch die beiden GvpE$_{his}$-Proteine aus *E. coli* über einen größeren Bereich des nativen Gels als eine Schar von Banden vorliegen. Im Gegensatz zum mcGvpD$_{his}$-Protein führt die Zugabe von SDS-Probenpuffer bei den GvpE$_{his}$-Proteinen allerdings zu einem weiten Einlaufen in das native Polyacrylamidgel.

4.3.4 Gelfiltration (Superose 6) von Gvp$_{his}$-Proteinen

Da mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese keine eindeutigen Ergebnisse über die mögliche oligomere Struktur von mcGvpD erhalten werden konnten, sollte die Quartärstruktur von mcGvpD durch Gelfiltration weiter untersucht werden.

Zur Bestimmung der molaren Masse des mcGvpD-Proteins wurde eine Superose 6 HR 10/30 Gelfltrations-Säule verwendet. Das Ausschlussvolumen der Säule (V_o) wurde mit Hilfe von Dextran-Blau bestimmt und betrug 8,9 ml. Das Gesamtvolumen der Säule betrug 22,6 ml. Die Säule wurde mit Hochsalzpuffer (1,5 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) äquilibriert. Auch die verwendeten Eichproteine wurden im Äquilibrierungspuffer der Säule aufgenommen und somit ihr Elutionsvolumen unter Hochsalzbedingungen ermittelt. Im Folgenden ist die Eichgerade für die verwendete Superose 6 HR 10/30 Gelfiltrationssäule dargestellt.

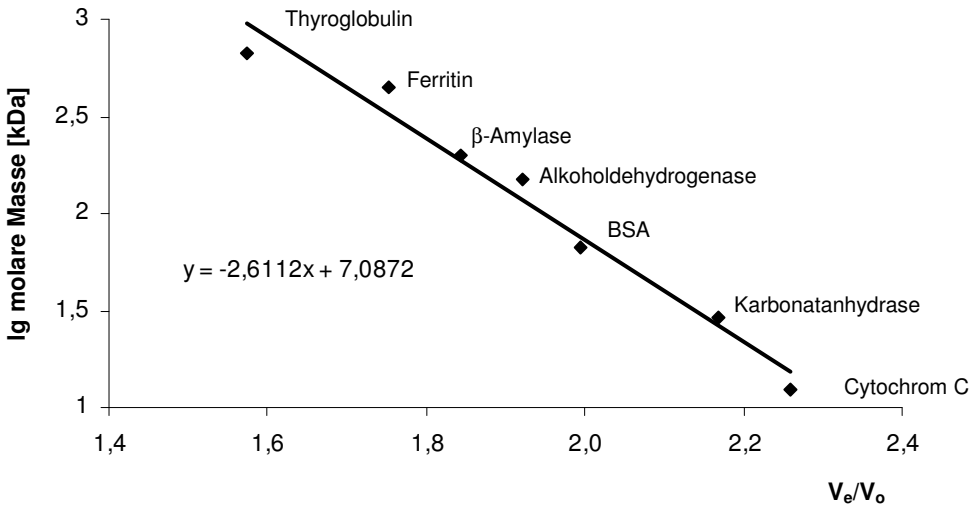


Abb. 32: Eichgerade der Superose 6 HR 10/30 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare). Die verschiedenen Standardproteine wurden in 1,5 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 auf die Säule gegeben.

Bei der Erstellung der Eichgeraden ist zu berücksichtigen, dass nicht-halophile Proteine in einem Hochsalzpuffer verwendet wurden. Bei K^+-Ionen handelt es sich im Bezug auf nicht-halophile Proteine um Kationen eines Salzes mit anti-chaotropem Effekt (Hofmeister-Serie). Die Ionen initiieren hydrophobe Wechselwirkungen und führen zu einer Präzipitation der Proteine. Ein Vergleich der erzielten Elutionsvolumina der Eichproteine unter Niedrigsalz- und Hochsalzbedingungen machte deutlich, dass für die meisten der verwendeten Proteine nur geringfügige Abweichungen ihres Elutionsvolumens im Hoch- und Niedrigsalz vorliegen. In jedem Fall war das erhaltene Elutionsvolumen der Eichproteine im Niedrigsalz minimal kleiner als im Hochsalz. Die Abweichungen sind allerdings geringfügig und außer bei der Alkoholdehydrogenase für alle Eichproteine vorhanden, so dass eine ungefähre Größenorientierung anhand der Eichgeraden im Hochsalz möglich ist. Eine exakte Bestimmung der molaren Masse kann allerdings nicht vorgenommen werden, da hier das Elutionsverhalten von nicht-halophilen mit halophilen Proteinen verglichen wird. Unter den verwendeten Hochsalzbedingungen könnten eventuell stattfindende Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial unterschiedlich stark bei halophilen und nicht-halophilen Proteinen ausgeprägt sein. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass halophile Proteine große Hydrathüllen binden (Frolow *et al*., 1996; Richard *et al*., 2000; Britton *et al*., 2006).

4.3.4.1 Gelfiltration (Superose 6) von mcGvpD$_{his}$ und PitA

Zunächst wurden 200 µl des mcGvpD$_{his}$-Proteins aus *E. coli* (isoliert in 8 M Harnstoff und anschließend mittels Dialyse in 2,5 M KCl rückgefaltet) auf die in Hochsalzpuffer äquilibrierte Superose 6 HR 10/30 Säule aufgetragen und chromatographisch aufgetrennt. Das ermittelte Elutionsvolumen dieses mcGvpD$_{his}$-Proteins betrug 8,9 ml (Abb. 33A) und lag somit oberhalb der Ausschlussgrenze des Trägermaterials. Dieses Ergebnis deutete an, dass mcGvpD$_{his}$ möglicherweise in einem riesigen Komplex vorlag, der aus mehr als 10 Untereinheiten bestehen müsste. Hierbei könnte es sich um die tatsächliche Quartärstruktur des Proteins oder aber auch nur um eine unspezifische Komplexierung handeln.

In einer weiteren Analyse wurde die Gelfiltrationssäule in Denaturierungspuffer (8 M Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) äquilibriert und das mcGvpD$_{his}$-Protein in 8 M Harnstoff mittels einer 200 µl Injektionsschleife auf die Säule appliziert. Das erhaltene Elutionsvolumen von 12 ml war etwas größer als das Elutionsvolumen für das rückgefaltete Protein (Abb. 33B). Allerdings entsprach dieses Elutionsvolumen nicht einmal annäherungsweise dem Elutionsvolumen, das man für ein mcGvpD$_{his}$-Monomer erwarten würde.

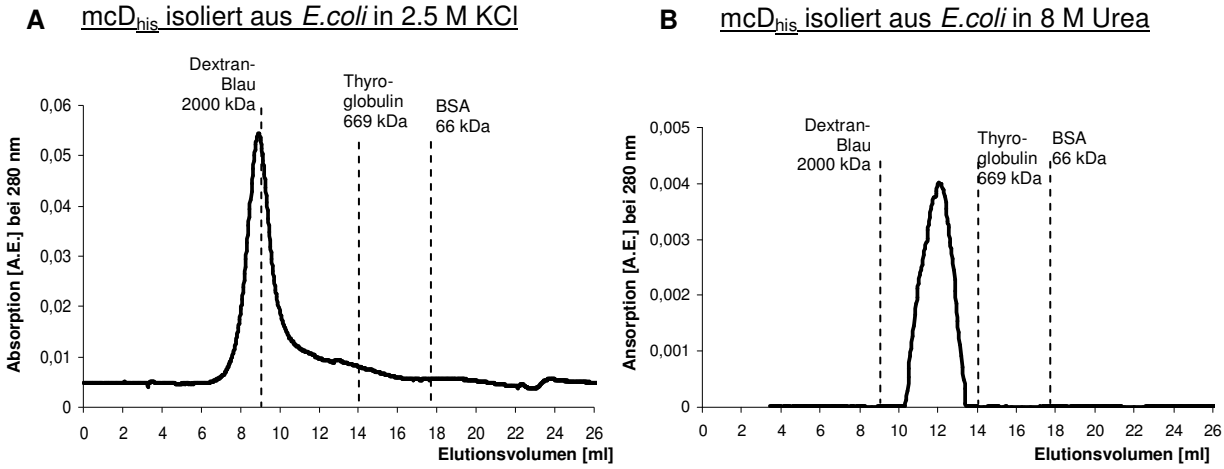


Abb. 33: Gelfiltrationen des mcGvpD$_{his}$-Proteins (mcD$_{his}$) aus *E. coli*. **(A)** Das mcGvpD$_{his}$-Protein (90 µg) wurde aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen isoliert und in 2,5 M KCl dialysiert. Die Gelfiltrationssäule war in 1,5 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 äquilibriert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. **(B)** Das mcGvpD$_{his}$-Protein (108 µg) wurde aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) isoliert. Die Säule war in 8 M Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, pH 7.2 äquilibriert. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Um auszuschließen, dass es sich hierbei um Artefakte handelte, die durch die rekombinante Produktion in *E. coli* und denaturierende Reinigung verursacht wurden, wurde die Gelfiltration auch mit mcGvpD$_{his}$ aus *Hfx. volcanii* WFD11 durchgeführt. Die Säule lag äquilibriert in Hochsalzpuffer vor und das mcGvpD$_{his}$-Protein wurde mit Hilfe einer 500 µl Injektionsschleife auf die Säule aufgetragen. Aufgrund der geringen verwendeten Proteinmenge und der Tatsache, dass in der Proteinlösung neben mcGvpD$_{his}$ auch das PitA-Protein enthalten war, wurden 1 ml Fraktionen während der chromatographischen Auftrennung durch Gelfiltration gesammelt, TCA gefällt, mit einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Analyse mit mcGvpD-Antiserum untersucht (Abb. 34A). Das mcGvpD$_{his}$-Protein aus *Hfx. volcanii* WFD11 konnte über einen breiten Elutionsbereich (9 bis 21 ml) in den gesammelten Fraktionen mittels Western-Analysen nachgewiesen werden. Ein Vergleich des Ponceau-Rot-gefärbten Proteins mit den Signalen des detektierten mcGvpD$_{his}$-Proteins machte deutlich, dass sich die Laufweiten der beiden Proteinbanden unterschieden. Durch Ponceau-Rot-Färbung konnte das 56 kDa PitA-Protein sichtbar gemacht werden, während das 62 kDa mcGvpD$_{his}$-Protein erst durch das mcGvpD-Antiserum detektiert werden konnte. Der Nachweis des mcGvpD$_{his}$-Proteins war in Elutionsfraktionen möglich, die der molaren Masse seiner monomeren Form entsprachen, aber auch in Elutionsfraktionen, die auf Proteinkomplexe mit einer größeren molaren Masse hindeuten könnten. Die Absorptionsspitze mit einem Elutionsvolumen von 25 ml wurde durch den Imidazol-haltigen Puffer verursacht, in dem die analysierten Proteine vorlagen.

Da in der Proteinlösung von mcGvpD$_{his}$ aus *Hfx. volcanii* auch das PitA-Protein in ungefähr gleicher Menge vorlag, wurde zum Vergleich auch PitA allein mittels Gelfiltration chromatographisch aufgetrennt (Abb. 34B). Der Auftrag und die chromatographische Auftrennung erfolgten analog wie für mcGvpD$_{his}$ beschrieben. Das Elutionsprofil der Gelfiltration von PitA weist zwei deutliche Absorptionsspitzen bei einem Elutionsvolumen von 13,9 ml und einem Elutionsvolumen von 17,5 ml auf (Abb. 34B). Unter Berücksichtigung der Elutionsvolumina der verschiedenen verwendeten Eichproteine könnte die Absorptionsspitze bei 17,5 ml der monomeren Form des PitA-Proteins entsprechen. Die erhaltene zweite Absorptionsspitze bei einem Elutionsvolumen von 13,9 ml entspricht in etwa dem Elutionsvolumen von Thyroglobulin (669 kDa) und könnte somit andeuten, dass das PitA-Protein eine oligomere Struktur ausbildet.

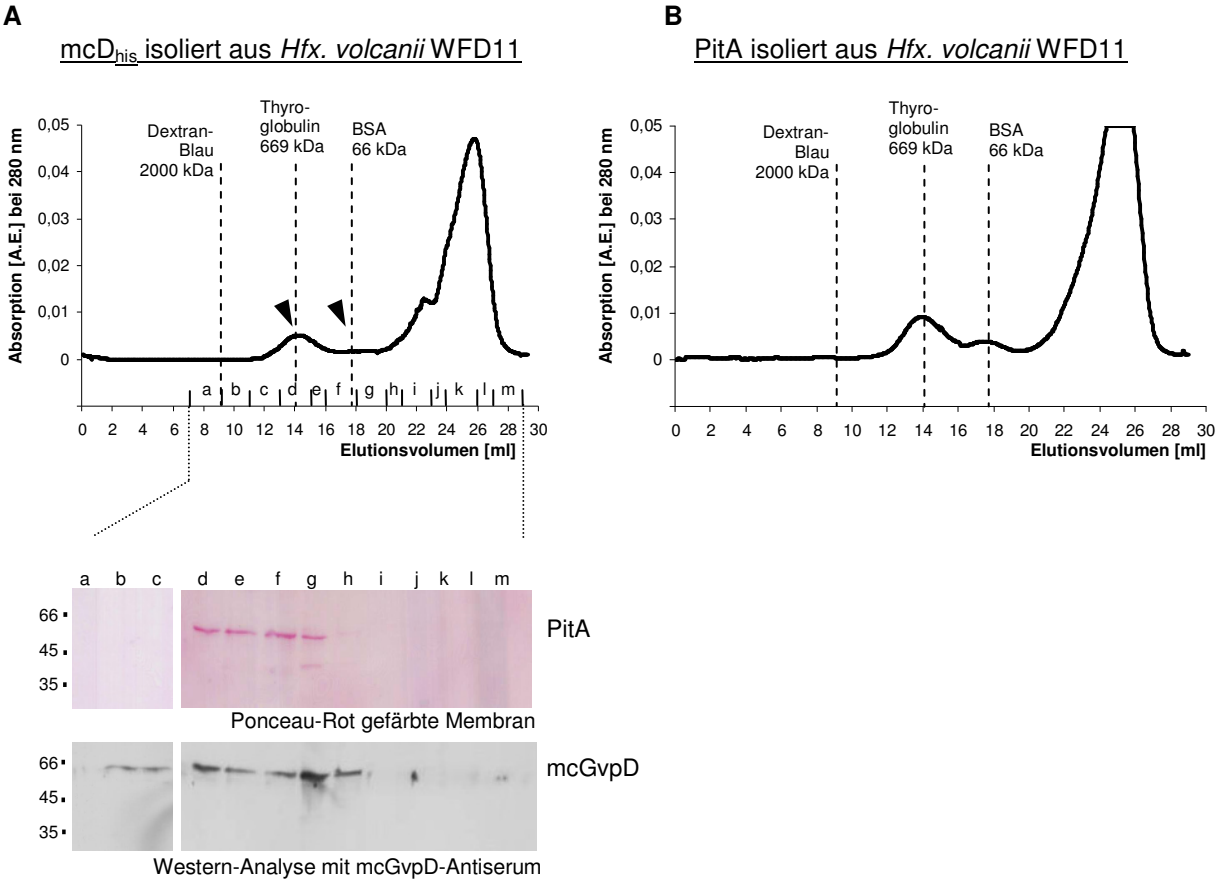


Abb. 34: Gelfiltrationen von mcGvpD$_{his}$ (mcD$_{his}$) und PitA aus *Hfx. volcanii*. **(A)** mcGvpD$_{his}$ (41 µg) wurde unter nativen Bedingungen aus *Hfx. volcanii* in 2,5 M KCl isoliert. Die Säule war in 1,5 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 äquilibriert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Während der Gelfiltration wurden Fraktionen gesammelt, mittels TCA-Fällung präzipitiert und durch Western-Analyse untersucht. Die Ponceau-Rot gefärbte Membran und die Western-Analyse nach Inkubation mit mcGvpD-Antiserum sind unten dargestellt. Die Elutionsvolumina der verschiedenen Eichproteine, sind als gestrichelte Linien angegeben. Pfeile markieren die Absorptionsmaxima von PitA. **(B)** PitA (42 µg) aus *Hfx. volcanii*. Isolierung und Gelfiltration fanden unter den gleichen Bedingungen wie bei mcGvpD$_{his}$ statt.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Behandlung mit EDTA einen Einfluss auf den Komplexierungszustand des mcGvpD$_{his}$-Proteins besitzt. Falls also für die Oligomerisierung zweiwertige Kationen eine Rolle spielen sollten, würde diese durch Zugabe von EDTA unterbunden werden. Die Inkubation des rückgefalteten mcGvpD$_{his}$-Proteins (in 2,5 M KCl) mit 1 mM EDTA führte zu keiner Auflösung des hochmolekularen Komplexes, was durch die chromatographische Auftrennung über eine in 1,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2, 1 mM EDTA äquilibrierte Säule gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das erhaltene Elutionschromatogramm glich dem des rückgefalteten Proteins ohne Inkubation mit EDTA, die Absorptionsspitze lag bei ca. 8,9 ml.

Außerdem wurde die Auswirkung von SDS auf den Komplexierungszustand des mcGvpD$_{his}$-Proteins untersucht. Ein Problem bei der Analyse war die Tatsache, dass SDS in Lösungen mit hohen Salzkonzentrationen präzipitiert. Somit konnte sowohl die Probe nicht in 1,5 M KCl vorliegen als auch die Äquilibrierung der Säule nicht mit 1,5 M KCl erfolgen. Das unter denaturierenden Bedingungen gereinigte mcGvpD$_{his}$-Protein aus *E. coli* wurde in 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 dialysiert und mit 1% SDS über Nacht inkubiert. Die Superose 6 HR 30/10 Säule wurde mit 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,1 % SDS äquilibriert. Für das so behandelte Protein ergaben sich eine ausgeprägte Absorptionsspitze bei 13 ml und eine kleinere Absorptionsspitze bei 15 ml (Daten nicht gezeigt). Somit konnten die mcGvpD$_{his}$-Komplexe nur teilweise aufgelöst werden.
Um auch während der chromatographischen Auftrennung eine SDS-Konzentration von 1% zu erzielen, erfolgte eine Äquilibrierung der Säule mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,2, 1% SDS. Das mcGvpD$_{his}$-Protein lag ebenfalls in 10 mM Tris-HCl, pH 7,2, 1% SDS vor. Die so durchgeführte Gelfiltration ergab keinerlei Absorptionsspitzen. Die geringe Ionenstärke im Puffer ließ scheinbar eine Wechselwirkung des Proteins mit der Säulenmatrix zu, so dass das Protein an der Säule zurückgehalten wurde. Beim anschließenden Waschen der Säule konnte anhand der Aufzeichnung der Absorption bei 280 nm gezeigt werden, dass das Protein erst hier von der Säule eluiert wurde (Daten nicht gezeigt).

4.3.4.2 Gelfiltration (Superose 6) von mcGvpE$_{his}$ und cGvpE$_{his}$

Zusätzlich zu mcGvpD$_{his}$ wurden auch mcGvpE$_{his}$ und cGvpE$_{his}$ als halophile Proteine mittels Gelfiltration chromatographisch aufgetrennt. Das cGvpE$_{his}$-Protein bildet in Lösung Dimere aus (Plößer & Pfeifer, 2002), was sich auch anhand des Elutionschromatogramms der Gelfiltration zeigen sollte. Für die beiden GvpE$_{his}$-Proteine wurde entsprechend wie für mcGvpD$_{his}$ verfahren. Sie wurden zum einen rekombinant in *E. coli* produziert, unter

denaturierenden Bedingungen gereinigt (8 M Harnstoff) und danach mittels Dialyse in 2,5 M KCl rückgefaltet. Zum anderen wurden die Proteine nativ in *Hfx. volcanii* produziert und in 2,5 M KCl isoliert.

Für die Gelfiltrationen der $GvpE_{his}$-Proteine in 2,5 M KCl wurde die Superose 6 HR 30/10 Säule in Hochsalzpuffer äquilibriert. Mit Hilfe einer 500 µl Injektionsschleife wurden die entsprechenden Proteine auf die Säule aufgetragen. Für die Analysen unter denaturierenden Bedingungen wurde die Säule mit Denaturierungspuffer äquilibriert und die Proteine, die ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff vorlagen, mit einer 500 µl Injektionsschleife auf die Säule aufgetragen. Während der Gelfiltrationen wurden die Elutionsfraktionen gesammelt, mit TCA präzipitiert, anschließend mit 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Ponceau-Rot angefärbt (Abb. 35).

Mit Hilfe der Gelfiltrationen unter Hochsalzbedingungen mit den rückgefalteten $GvpE_{his}$-Proteinen in 2,5 M KCl konnten für $mcGvpE_{his}$ Absorptionsspitzen bei 8,9 ml, 14,5 ml und 17,8 ml (Abb. 35A) sowie für $cGvpE_{his}$ bei 8,9 ml (kleine Absorptionssschulter) und 15,6 ml ermittelt werden (Abb. 35B). Die Untersuchung der gesammelten Fraktionen zeigte, dass $mcGvpE_{his}$ über einen Elutionsbereich von 9 bis 21 ml und $cGvpE_{his}$ von 12 bis 21 ml verteilt vorlag, wobei das $cGvpE_{his}$-Protein überwiegend im Elutionsbereich von 14 bis 19 ml zu finden war (Abb. 35A, B).

Die Gelfiltrationen unter Denaturierungsbedingungen ergaben für das $mcGvpE_{his}$- und $cGvpE_{his}$-Protein jeweils zwei Absorptionsspitzen bei einem Elutionsvolumen von 11,2 ml und 16 ml ($mcGvpE_{his}$) sowie 12,8 ml und 16 ml ($cGvpE_{his}$) (Abb. 35C, D). Die Absorptionsspitze bei einem Elutionsvolumen von 23 ml wurde durch das in der Proteinlösung enthaltene Imidazol verursacht. Durch die Analyse der gesammelten Fraktionen konnte gezeigt werden, dass die $GvpE_{his}$-Proteine über einen Elutionsbereich von 9 bis 21 ml verteilt vorlagen (Abb. 35C, D).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass $mcGvpE_{his}$ und $cGvpE_{his}$ isoliert aus *E. coli* sowohl unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) als auch unter Hochsalzbedingungen bei der chromatographischen Auftrennung durch Gelfiltration über einen breiten Elutionsbereich verteilt vorlagen, wobei die Proteine auch in Elutionsvolumina nachgewiesen werden konnten, die auf eine Komplexierung derselben hinweisen könnten.

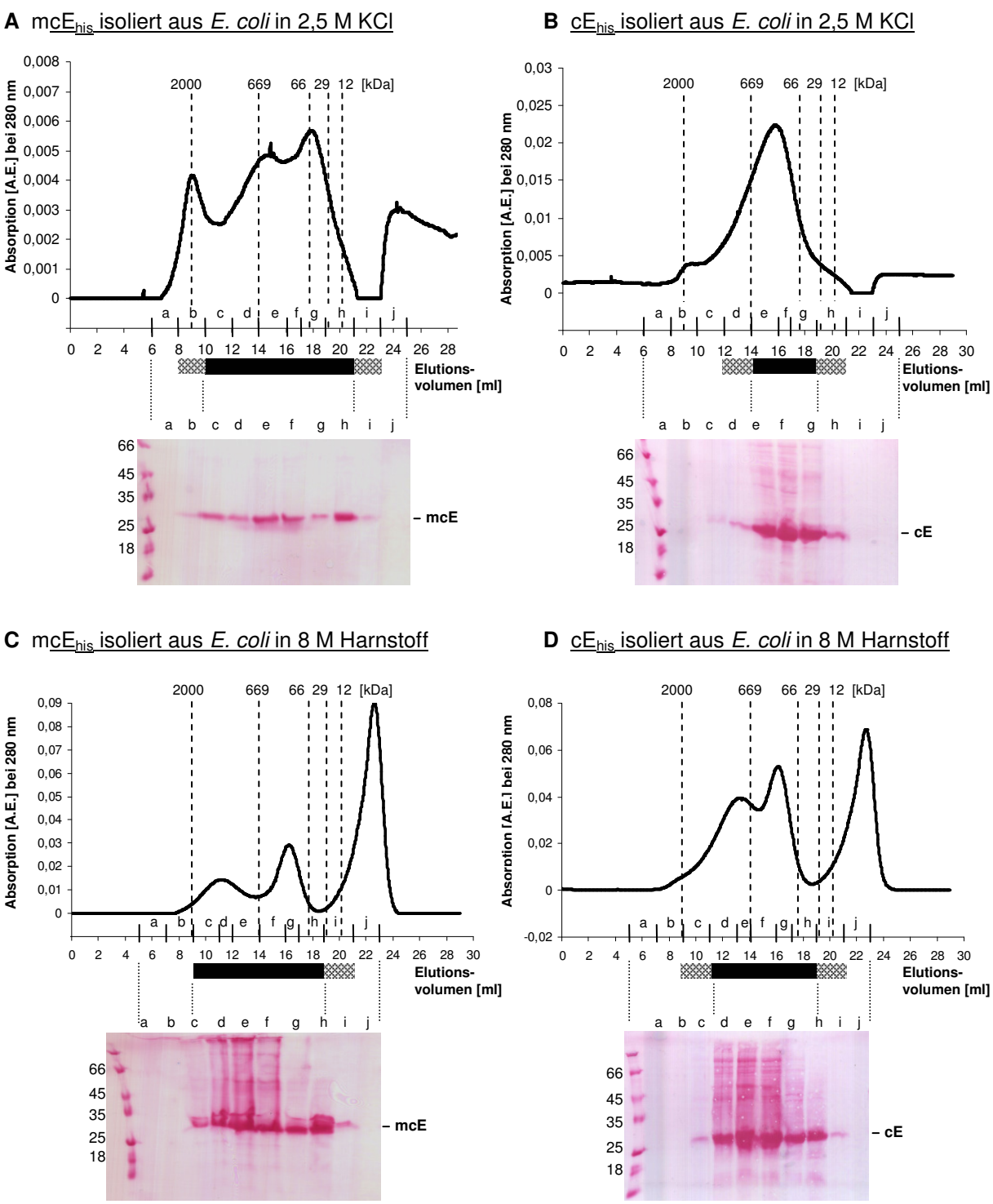


Abb. 35: Gelfiltrationen von mcGvpE$_{his}$ (mcE$_{his}$) und cGvpE$_{his}$ (cE$_{his}$) isoliert aus *E. coli*. **(A, B)** Das mcGvpE$_{his}$-Protein (125 µg) und das cGvpE$_{his}$-Protein (150 µg) wurden aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen isoliert und in 2,5 M KCl dialysiert. Die Säule war in 1,5 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 äquilibriert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. **(C, D)** Das mcGvpE$_{his}$-Protein (210 µg) und das cGvpE$_{his}$-Protein (650 µg) wurden aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) isoliert. Die Säule war in 8 M Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 äquilibriert. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Elutionsvolumina der Eichproteine mit bekannter molarer Masse sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels TCA-Fällung präzipitiert, in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Ponceau-Rot angefärbt. Die molare Masse [kDa] des Protein-Größenstandards ist links dargestellt.

Im Vergleich zu den $GvpE_{his}$-Proteinen aus *E. coli*, konnten $mcGvpE_{his}$ und $cGvpE_{his}$ aus *Hfx. volcanii* in einem wesentlich engeren Elutionsfenster nachgewiesen werden (Abb. 36A, B). Die Elutionsvolumina der Fraktionen, in denen die Proteine überwiegend nachgewiesen werden konnten, entsprachen den Elutionsvolumina der Eichproteine mit einer molaren Masse von 12 bis 66 kDa, so dass die $GvpE_{his}$-Proteine offensichtlich in ihrer monomeren und dimeren Form vorlagen (Abb. 36A, B).

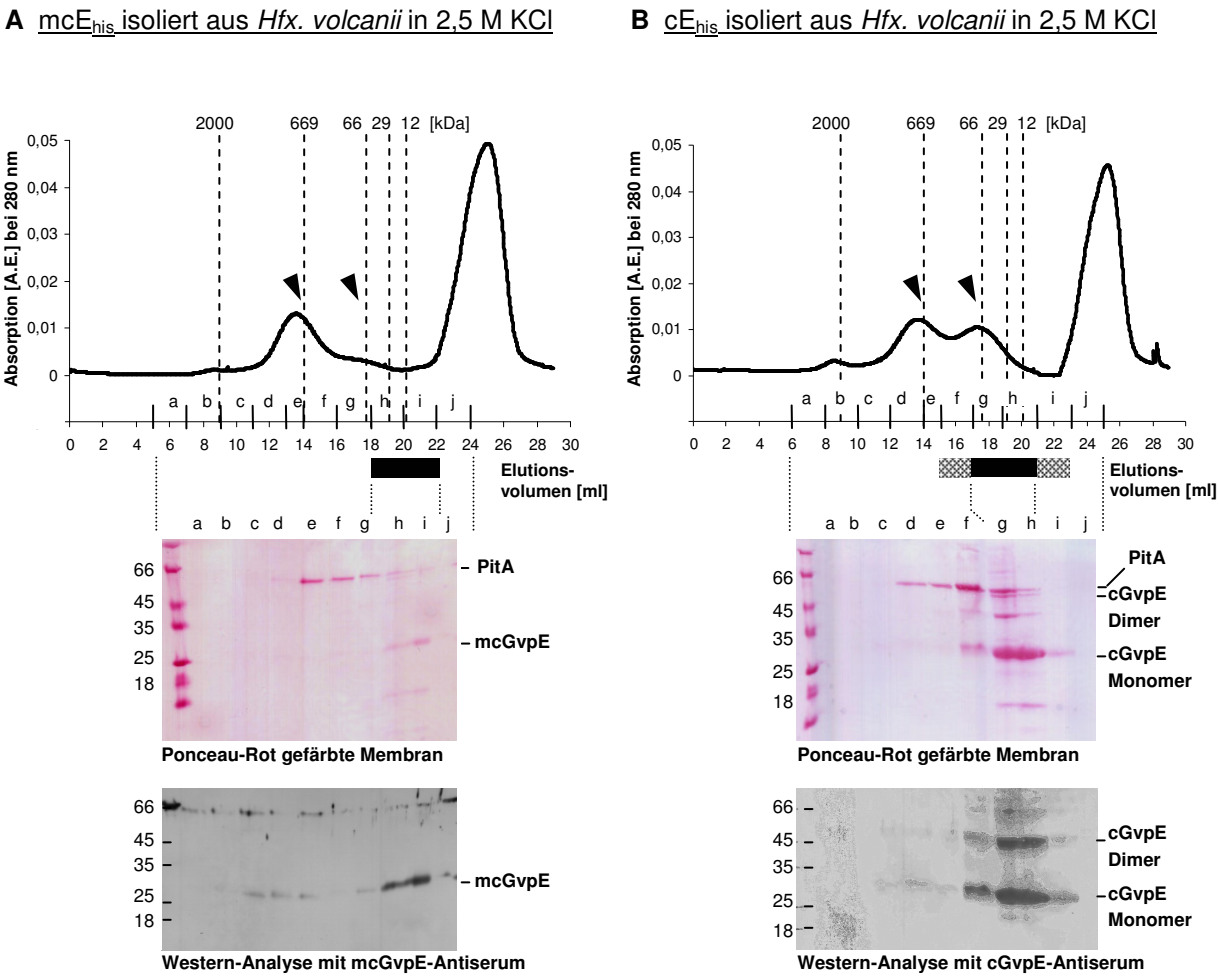


Abb. 36: Gelfiltrationen von $mcGvpE_{his}$ (mcE_{his}) und $cGvpE_{his}$ (cE_{his}) aus *Hfx. volcanii* isoliert unter nativen Bedingungen in 2,5 M KCl. Es wurden 65 µg $mcGvpE_{his}$ **(A)** und 75 µg $cGvpE_{his}$ **(B)** auf eine in 1,5 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 äquilibrierte Superose 6-Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1ml/min. Die Absorptionsmaxima (13,9 ml und 17,5 ml) des PitA-Proteins sind als Pfeile dargestellt. Die Elutionsvolumina der verschiedenen Eichproteine mit bekannter molarer Masse sind als gestrichelte Linien in den Elutionsdiagrammen gekennzeichnet. Während der Gelfiltration wurden Fraktionen gesammelt, mittels TCA-Fällung präzipitiert, in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Ponceau-Rot gefärbte Membran und die Western-Analyse nach Inkubation mit mcGvpE- (A) oder cGvpE- (B) Antiserum sind unten dargestellt.

Zusammenfassend lassen sich durch den Vergleich der für das mcGvpD$_{his}$-Protein und die GvpE$_{his}$-Proteine erzielten Ergebnisse folgende Aussagen treffen:
Zwar konnte anhand der Gelfiltrationen keine eindeutige Aussage über die molare Masse des oligomeren Komplexes von mcGvpD$_{his}$ getroffen werden. Unter Berücksichtigung aller erhaltenen Ergebnisse liegt allerdings die Vermutung nahe, dass mcGvpD$_{his}$ nicht nur als Monomer vorliegt, sondern zu hochmolekularen Komplexen assembliert. Dabei scheint mcGvpD$_{his}$ allerdings nicht als eine oligomere Struktur mit einer definierten molaren Masse vorzuliegen, sondern vielmehr aus einer heterogenen Mischung von oligomeren Strukturen mit unterschiedlicher molarer Masse zu bestehen.
Diese Schlussfolgerung wird vor allem durch die Ergebnisse der aus *Hfx. volcanii* WFD11 isolierten Proteine gestützt. Ein Großteil der mcGvpE$_{his}$- und cGvpE$_{his}$-Proteine isoliert aus *Hfx. volcanii* konnte bei den Gelfiltrationsanalysen in einem definierten Elutionsvolumen nachgewiesen werden, dass den molaren Massen eines GvpE$_{his}$-Monomers oder GvpE$_{his}$-Dimers entsprechen würde. Das mcGvpD$_{his}$-Protein isoliert aus *Hfx. volcanii* hingegen lag über einen breiten Elutionsbereich verteilt vor.
Die Elutionsprofile, die für die aus *E. coli* isolierten His-Gvp-Proteine erhalten wurden, könnten andeuten, dass durch die rekombinante Produktion und denaturierende Reinigung mit anschließender Dialyse zur Rückfaltung, nur ein Teil der Proteine in ihre native Konformation überführt werden konnten.

4.3.5 Sedimentation von mcGvpD$_{his}$ und PitA in einem Saccharose-Dichtegradienten

Das Sedimentationsverhalten von mcGvpD$_{his}$ in einem Saccharose-Dichtegradienten sollte weitere Hinweise über die Quartärstruktur des Proteins liefern sowie eine Möglichkeit darstellen das PitA-Protein von mcGvpD$_{his}$ zu trennen und somit weitere Analysen mit einer reinen mcGvpD$_{his}$ Lösung zu ermöglichen.
Für die Untersuchungen wurde mcGvpD$_{his}$ aus *Hfx. volcanii* WFD11 wie beschrieben (Kapitel 3.3.8.4) durch FPLC-basierte Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie erhalten. Die Elutionsfraktionen enthielten neben dem 62 kDa mcGvpD$_{his}$-Protein auch das PitA-Protein mit einer molaren Masse von 56 kDa als Kontamination (siehe Kapitel 4.3.1). Weiterhin waren noch andere verunreinigende Proteine in der Elutionsfraktionen vorhanden.
Die genaue Durchführung der Ultrazentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradienten ist im Kapitel 3.3.10.3 beschrieben. Nach der Zentrifugation wurde der Saccharose-Dichtegradient in 1 ml Fraktionen von oben nach unten aus dem Zentrifugenröhrchen fraktioniert. Hierbei bezeichnet 1 die oberste Fraktion und 12 die unterste Fraktion des

Gradienten. Der Boden des Röhrchens wurde mit 1 ml Saccharoselösung gespült (Fraktion 13).

Die Sedimentation sowohl von Thyroglobulin als auch mcGvpD$_{his}$ in einem Saccharose-Dichtegradienten von 10-25% (+ 1,5 M KCl, 10% Glycerin) ergab keine hinreichende Auftrennung. Durch Ermittlung der Proteinmengen in den Fraktionen konnte die Verteilung von Thyroglobulin hauptsächlich in den Fraktionen 5-9 gezeigt werden (Abb. 37A, oben). Bei der Sedimentation des mcGvpD$_{his}$-Gemisches aus WFD11 konnte anhand der Ermittlung der Proteinmenge in den Fraktionen eine Verteilung über den gesamten Saccharose-Dichtegradientenbereich nachgewiesen werden (Abb. 37A, unten). Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, dass sich die ermittelten Proteinmengen auf die Gesamtprotein-konzentration beziehen. Da neben mcGvpD$_{his}$ in der Proteinlösung weiterhin PitA in einer großen Menge sowie weitere verunreinigende Proteine vorhanden waren, kann die Interpretation hier nicht allein durch die Ermittlung der Proteinmengen erfolgen. Je 13 µl der gesammelten Fraktionen wurden zunächst mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt (Abb. 37B). Bei mcGvpD$_{his}$ handelt es sich um die Bande in Höhe des Protein-Größenstandards mit einer molaren Masse von 66 kDa, die in allen Fraktionen enthalten war (Abb. 37B). Dies wurde durch die Western-Analyse bestätigt (Abb. 37C). In den Fraktionen 8 bis 12 konnte weiterhin mit dem mcGvpD-spezifischen Antiserum eine Doppelbande im Bereich des Protein-Größenstandards von 116 kDa nachgewiesen werden (Abb. 37C). Hierbei könnte es sich möglicherweise um mcGvpD-Dimere handeln. In den Fraktionen 6 und 7 wurde ein ca. 60 kDa Protein angereichert, wobei es sich wahrscheinlich um das PitA-Protein handelt (Abb. 37B), welches auch in den Fraktionen 2 bis 10 vorhanden war. Weiterhin befand sich in den Fraktionen 2 und 3 ein verunreinigendes Protein mit einer molaren Masse von 45 kDa und in Fraktion 3 ein zusätzliches Protein mit einer molaren Masse von ca. 50 kDa (Abb. 37B). Das Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgel macht deutlich, dass sich das Verhältnis von PitA zu mcGvpD$_{his}$ mit steigender Saccharosekonzentration ändert (Abb. 37B). Dies kann durch Vergleich der Fraktionen 8 bis 12 gezeigt werden. In Fraktion 8 scheint das Verhältnis der beiden Proteine zueinander ungefähr gleich zu sein. In Fraktion 9 wird die Intensität der PitA-Bande schwächer während die Menge des mcGvpD$_{his}$-Proteins gleich bleibt. Die Abnahme der Intensität der PitA-Bande setzt sich in den Fraktionen 10 und 11 fort und in Fraktion 12 kann fast kein PitA-Protein mehr sichtbar gemacht werden (Abb. 37B).

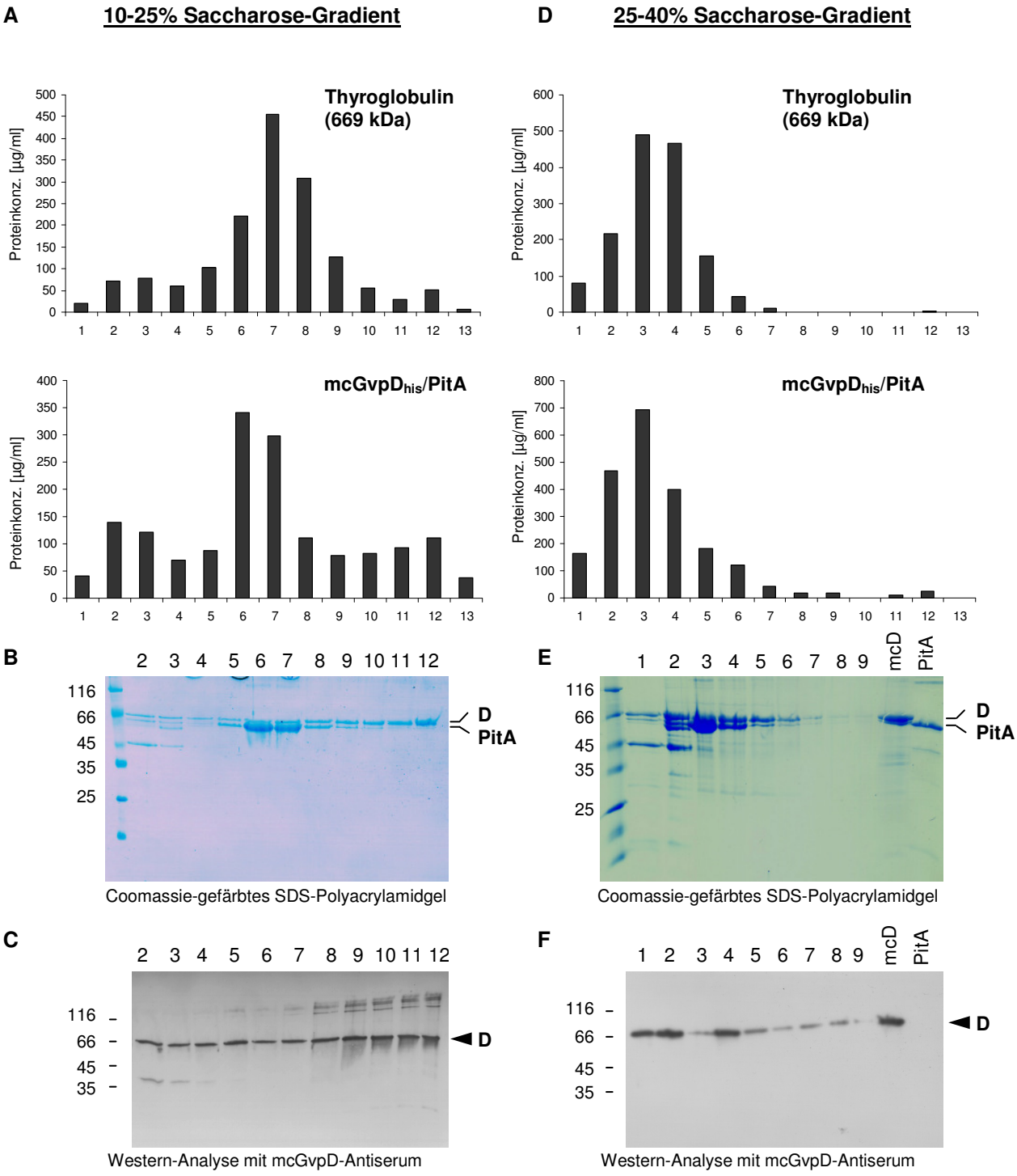


Abb. 37: Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von Thyroglobulin und mcGvpD$_{his}$ isoliert aus *Hfx. volcanii* WFD11 in einem Gradienten von 10-25% **(A-C)** oder 25-40% **(D-F)** Saccharose. Je 1 ml Fraktionen wurden von oben (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 12) abgenommen sowie der Röhrchenboden mit 1 ml Saccharoselösung gespült (Fraktion 13). **(A+D)** Verteilung der Proteinmengen in den unterschiedlichen Fraktionen. **(B+E)** Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele der verschiedenen Fraktionen. Aufgetragen wurden jeweils 13 µl der Fraktionen. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards sind links dargestellt. **(C+F)** Western-Analysen zum Nachweis von mcGvpD$_{his}$ in den einzelnen Fraktionen. Jeweils 0,15 µg Protein wurden elektrophoretisch mit 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und anschließend mit mcGvpD-Antiserum inkubiert. Das mcGvpD$_{his}$-Protein (mcD) und das PitA-Protein (PitA) wurden zur Kontrolle aufgetragen **(E, F)**.

Das Sedimentationsverhalten von Thyroglobulin in einem Saccharose-Dichtegradienten von 25-40% (+ 1,5 M KCl, 10% Glycerin) konnte anhand der Ermittlung der Proteinmengen in den einzelnen Fraktionen mittels Bradford-Methode gezeigt werden (Abb. 40D, oben). Nach Ultrazentrifugation in einem 25-40% Saccharose-Dichtegradienten war Thyroglobulin hauptsächlich in den Fraktionen 2-5 zu finden ist (Abb. 40D, oben). Vergleicht man dieses Ergebnis mit den für mcGvpD$_{his}$ ermittelten Werten im gleichen Saccharose-Dichtegradienten, so kann zunächst durch die Ermittlung der Proteinmengen gezeigt werden, dass mcGvpD$_{his}$ auch hauptsächlich in diesen Fraktionen gefunden werden kann (Abb. 40D, unten). Hierbei muss wiederum berücksichtigt werden, dass sich in der mcGvpD$_{his}$-Proteinlösung PitA in ungefähr gleicher Menge sowie andere verunreinigende Proteine befinden. Unter der Annahme, dass es sich bei der Proteinbande im Bereich von 66 kDa Bande um das mcGvpD$_{his}$-Protein handelt, wird anhand des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels deutlich, dass das mcGvpD$_{his}$-Protein in den Fraktionen 1 bis 8 enthalten war (Abb. 40E). Direkt unter der mcGvpD$_{his}$-Bande wurde eine zweite Proteinbande sichtbar, die wahrscheinlich das PitA-Protein repräsentierte und in Fraktion 3 zur dominanten Proteinbande wurde (Abb. 40E). In geringerem Maße konnten in den Fraktionen 1-4 weitere verunreinigende Proteine angefärbt werden. Ein Protein mit einer molaren Masse von 45 kDa konnte in den Fraktionen 1-3 und ein weiteres ca. 55 kDa Protein gezeigt werden (Abb. 40E). Um sicher festzustellen in welchen Fraktionen das mcGvpD$_{his}$-Protein vorhanden war, wurden die Fraktionen 1-9 mit Hilfe einer Western-Analyse mit mcGvpD-spezifischem Antiserum untersucht (Abb. 40F). Das mcGvpD$_{his}$-Protein konnte in den Fraktionen 1-8 nachgewiesen werden, wobei es in den Fraktionen 1,2 und 4 in größeren Mengen vorzuliegen schien. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die 0,15 µg Protein, die für die Western-Analyse eingesetzt wurden aus einem Proteingemisch bestanden. Da in Fraktion 3 ein anderes Protein in großer Menge vorhanden war (Abb. 40E), war mcGvpD$_{his}$ in den 0,15 µg Gesamtprotein unterrepräsentiert. Das mcGvpD$_{his}$-Protein scheint nach dieser Analyse hauptsächlich in den Fraktionen 1-4 vorzukommen.

Durch die Ultrazentrifugation in einem 25-40%igen Saccharose-Dichtegradienten konnten die bisher für mcGvpD$_{his}$ erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Das mcGvpD$_{his}$-Protein scheint offensichtlich oligomere Strukturen auszubilden, da es im Saccharose-Dichtegradienten in Fraktionen nachgewiesen werden konnte, in denen auch Thyroglobulin (669 kDa) sedimentiert. Weiterhin befand sich mcGvpD$_{his}$ auch in Bereichen des Saccharose-Dichtegradienten mit höherer Konzentration. Das Verhalten des mcGvpD$_{his}$-Proteins bei der Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradient bestätigt die Ergebnisse der Gelfiltration und der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese.

5. Diskussion

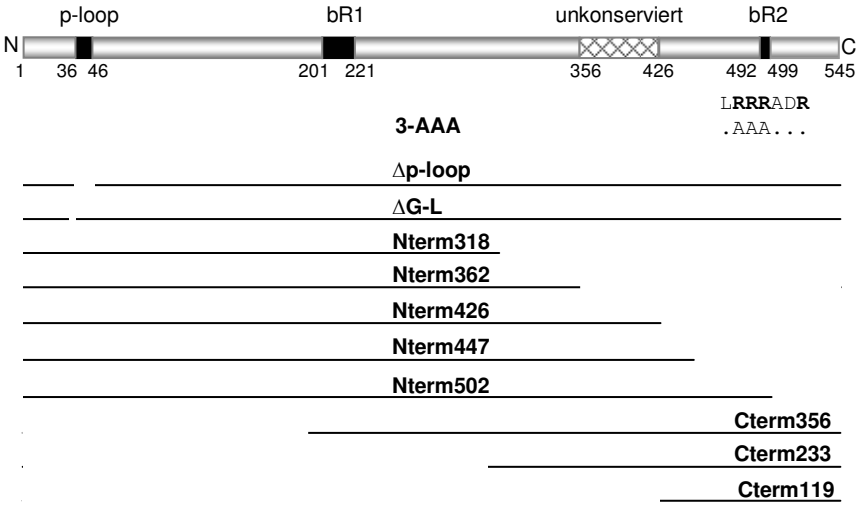
In dieser Arbeit wurde die GvpD-GvpE-vermittelte Regulation der Gasvesikelbildung in halophilen Archaea näher charakterisiert. Die Gasvesikelbildung stellt ein interessantes Modellsystem zur Untersuchung der Genregulation in halophilen Archaea dar, da sie durch viele äußere Faktoren wie Sauerstoff, Licht, Salzgehalt im Habitat und die Wachstumsphase der Mikroorganismen beeinflusst wird (Rodriguez-Valera *et al*., 1983; Englert *et al*., 1990; Walsby, 1994; Krüger & Pfeifer, 1996). In die Regulation der Transkription der Gasvesikel-kodierenden Region sind mindestens zwei Proteine involviert. Das GvpE-Protein ist ein Transkriptionsaktivator für die P_A- und P_D-Promotoren aller vac-Regionen, außer dem P_{cD}-Promotor, (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al*., 1998; Gregor & Pfeifer, 2001; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Hofacker *et al*., 2004) und das GvpD-Protein ist an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt (Englert *et al*., 1992b; Röder & Pfeifer, 1996; Pfeifer *et al*., 1994; Pfeifer *et al*., 2001; Zimmermann & Pfeifer, 2003). Die Aminosäuresequenz von GvpD enthält ein *p-loop*-Motiv nahe des N-Terminus und zwei basische Regionen (bR1 und bR2). Das *p-loop*-Motiv und die bR1 sind essenziell für die repressorische Funktion von GvpD, wohingegen Substitutionen in der bR2 nicht immer zu einem Funktionsverlust führen (Pfeifer *et al*., 2001). Das mcGvpD-Protein aus *Hfx. mediterranei* interagiert mit mcGvpE und bindet ATP (Zimmermann, 2003; Zimmermann & Pfeifer, 2003). Weiterhin konnte die Interaktion der Proteine cGvpD und cGvpE aus *Hbt. salinarum* sowie eine Interaktion der heterologen Interaktionspartner mcGvpD-cGvpE oder cGvpD-mcGvpE nachgewiesen werden (Scheuch, 2003). Zudem führt die gleichzeitige Expression der mc-*gvpDE*-Leserahmen in *Hfx. volcanii*-Transformanten zu einer starken Reduktion der mcGvpE-Menge als auch der mcGvpD-Menge (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Um die GvpD-GvpE-vermittelte Regulation der Gasvesikelbildung besser zu verstehen, wurden im Verlauf dieser Arbeit drei wesentliche Teilaspekte bearbeitet:

1. Untersuchung der Interaktionsfähigkeit verschiedener mcGvpD-Deletionsmutanten mit mcGvpE
2. *In vivo*-Studien zur Untersuchung der mcGvpD-induzierten Reduktion der GvpE-Proteinmenge
3. Untersuchung der Quartärstruktur von mcGvpD

5.1 Untersuchung der Interaktionsfähigkeit verschiedener mcGvpD-Deletionsmutanten mit mcGvpE

Aufgrund bereits durchgeführter heterologer Interaktionsexperimente mit den GvpD- und GvpE-Proteinen aus *Hfx. mediterranei* und *Hbt. salinarum* lag die Vermutung nahe, dass die Interaktionsregion von GvpD in einem konservierten Bereich des Proteins lokalisiert ist. Da alle bisher untersuchten mcGvpD-Mutanten mit Substitutionen in den für die Funktionalität wichtigen Bereichen (*p-loop*-Motiv, bR1 und bR2) (Pfeifer *et al.*, 2001) noch mit mcGvpE interagieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Deletionsmutanten von mcGvpD hergestellt. Diese mcGvpD-Deletionsmutanten wiesen unterschiedlich große Deletionen des N- oder C-Terminus auf. Außerdem wurden mcGvpD-Mutanten mit Deletionen im Bereich des *p-loop*-Motivs erzeugt, um die Bedeutung dieser Region für den Kontakt zu mcGvpE zu studieren. Die Ergebnisse sind in Ab. 38 nochmals zusammengefasst.



Repression GV-Bildung	Interaktion mit GvpE
++	++
-	+
-	+
-	-
-/+	-
-	+
-	+
-	-
-/+	+
instabil	
instabil	

Abb. 38: Schematische Darstellung des mcGvpD-Proteins und der mcGvpD-Mutanten mit Angabe ihrer repressorischen Funktion und Interaktionsfähigkeit mit mcGvpE. Das *p-loop*-Motiv, die basischen Regionen bR1 und bR2 sowie der unkonservierte Bereich sind mit Angabe ihrer Position in der Aminosäuresequenz von mcGvpD gekennzeichnet. Substitutionen in der Mutante 3-AAA sind aufgeführt (Pfeifer *et al.*, 2001) Die Linien unterhalb stellen die verschiedenen Deletionsmutanten von mcGvpD dar.

Die beiden C-terminalen mcGvpD-Varianten Cterm119 (Scheuch, 2003) und Cterm233 waren instabil in *Hfx. volcanii*-Transformanten und deshalb für die weiteren Analysen ungeeignet. Alle anderen Deletionsvarianten wurden in *Hfx. volcanii*-Transformanten in ausreichender Menge produziert. Sie hatten aber ihre repressorischen Funktion in $\Delta D+D_{Del}^{ex}$-Transformanten verloren. Die Mutanten Nterm362 und Cterm356 führten in $\Delta D+D_{Del}^{ex}$-Transformanten zwar auch zum Phänotyp eines Gasvesikel-Überproduzenten, die nur leicht verringerte Menge des mc-*gvpA*-Transkriptes zeigte jedoch, dass beide Mutanten ihre

repressorische Funktion nicht vollständig verloren hatten. Die verringerte repressorische Funktion von Cterm356 wird in Kapitel 5.2 näher erläutert. Für die Mutante Nterm362, die ihre mcGvpE-Interaktionsfähigkeit verloren hat, ist unklar wodurch diese geringe repressorische Funktion bedingt wurde.

Die verschiedenen mcGvpD-Deletionsmutanten wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit mcGvpE zu interagieren. Die Interaktionsfähigkeit wurde durch Affinitätschromatographie bestimmt. Dazu wurde $mcGvpE_{his}$, aus *E. coli* in 2,5 M KCl an einer Ni-NTA-Agarosematrix immobilisiert und mit Zelllysaten der *Hfx. volcanii*-Transformanten inkubiert, die die verschiedenen mcGvpD-Deletionsmutanten enthielten. Nach intensivem Waschen erfolgte die Elution des $mcGvpE_{his}$-Proteins und der eventuell gebundenen Interaktionspartner. Das mcGvpD-Protein wurde durch Western-Analysen nachgewiesen.
Für die beiden mcGvpD-Mutanten Δp-loop und ΔG-L (mit Deletionen im Bereich des *p-loop*-Motivs) konnte eine Interaktion mit mcGvpE gezeigt werden, so dass eine Beteiligung des *p-loop*-Motivs an der Interaktion mit mcGvpE ausgeschlossen werden konnte. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses kann auch die Mutante $D_{Cterm356}$ herangezogen werden, der die ersten 189 Aminosäuren inklusive des *p-loop*-Motivs fehlen. Auch dieses Protein interagiert noch mit mcGvpE. Somit wird der N-terminale Bereich des mcGvpD-Proteins (inklusive des *p-loop*-Motivs) nicht für die Interaktion mit mcGvpE benötigt.
Die fehlende Interaktionsfähigkeit von $D_{Nterm362}$ (enthält die ersten 362 AS bis zum unkonservierten Bereich) konnte ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (Scheuch, 2003) zeigen. Um dieses Ergebnis weiter zu bestätigen, wurde die Mutante $D_{Nterm318}$ (bestehend aus den ersten 318 AS) hergestellt, für die ebenfalls keine Interaktion mit mcGvpE nachgewiesen werden konnte. Im Zusammenhang mit der vorhandenen Interaktionsfähigkeit der Mutante $D_{Cterm356}$ lag die Vermutung nahe, dass die konservierte C-terminale Domäne des mcGvpD-Proteins an der Interaktion mit mcGvpE beteiligt sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei weitere mcGvpD-Deletionsvarianten hergestellt: $D_{Nterm426}$ (bestehend aus der N-terminalen Domäne + unkonservierter Bereich) und $D_{Nterm447}$ (21 AS verlängerte Version von $D_{Nterm426}$). Diesen Mutanten fehlt die C-terminale Domäne völlig ($D_{Nterm426}$) oder zum größten Teil ($D_{Nterm447}$), trotzdem konnte für beide Deletionsvarianten eine Interaktion mit mcGvpE gezeigt werden. Dieses Ergebnis widerlegte die Vermutung, dass die konservierte C-terminale Domäne von mcGvpD an der Interaktion mit mcGvpE beteiligt ist.
Die Deletonsvariante $D_{Nterm426}$ wurde, im Vergleich zur nicht interagierenden Deletionsmutante $D_{Nterm362}$ nur um den unkonservierten Bereich des Proteins verlängert. Da aufgrund der heterologen Interaktionsexperimente mit cGvpD (dem diese Region fehlt) eine Beteiligung des unkonservierten Bereiches an der Interaktion ausgeschlossen werden

konnte, ist wahrscheinlich eine zentrale Region in der Nähe des unkonservierten Bereichs an der Interaktion beteiligt, deren Faltung vielleicht durch das Entfernen des unkonservierten Bereiches negativ beeinflusst wurde.
Für die Deletionsmutante $D_{Nterm502}$ (Deletion nach basischer Region 2) konnte keine Interaktion mit mcGvpE gezeigt werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den bereits erläuterten Resultaten. Mit Hilfe der Mutanten $D_{Nterm426}$ und $D_{Nterm447}$ konnte eine Beteiligung des C-Terminus an der Interaktion ausgeschlossen werden, und $D_{Nterm502}$ stellt lediglich eine verlängerte Variante von $D_{Nterm447}$ dar. Somit kann die fehlende Interaktionsfähigkeit von $D_{Nterm502}$ nicht darauf zurückzuführen sein, dass der Interaktionsbereich hier nicht vorhanden ist. Es ist möglich, dass Faltungsprobleme von mcGvpD aufgrund der Wahl des Deletionsbereiches zu diesem Resultat führten. So könnte durch die Deletion am C-terminalen Ende dieses Proteins eine Faltung verursacht worden sein, die eine Interaktion mit mcGvpE verhindert. Die Deletion erfolgte unmittelbar nach der basischen Region 2, die eine besondere Rolle für die Funktionalität des GvpD-Proteins spielt.
Da weder der unmittelbare N-terminale Bereich (fehlt in $D_{Cterm356}$) noch der unmittelbare C-terminale Bereich (fehlt in $D_{Nterm426}$) an der Interaktion beteiligt ist, wird wahrscheinlich ein zentraler Bereich des mcGvpD-Proteins für die Interaktion mit mcGvpE herangezogen.

Durch Affinitätschromatographie konnte ebenfalls eine Interaktion von $mcGvpD_{his}$ und $mcGvpE_{strep}$ gezeigt werden, die beide aus *E. coli* gereinigt wurden. Dieses Ergebnis deutet an, dass für die Interaktion der beiden Proteine keine zusätzlichen Faktoren aus *Haloferax* benötigt werden und eröffnet die Möglichkeit Interaktionsexperimente in einer quantitativen Form durchzuführen. Diese Versuchsanordnung wurde verwendet, um die GvpD-GvpE-Interaktion mit Hilfe eines IAsys *Resonant Mirror* Biosensor zu untersuchen. Eine Interaktion der beiden Proteine konnte durch diese Methode allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Verwendung von Hochsalzpuffern führte zu einer starken Beeinflussung der Messungen und ergab Signalantworten ohne die Zugabe des Bindungspartners. Der IAsys *Resonant Mirror* Biosensor eignete sich somit nicht für die Analyse halophiler Proteine, weshalb diese Untersuchungen nicht weiter verfolgt wurden.

5.2 *In vivo*-Studien zur Untersuchung der mcGvpD-induzierten Reduktion der GvpE-Proteinmenge

Durch frühere Untersuchungen mit *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die mc-*gvpDE*-Leserahmen unter der gleichzeitigen Kontrolle des *fdx*-Promotors exprimierten (DE^{ex}), konnte

gezeigt werden, dass die Anwesenheit von mcGvpD zu einer starken Reduktion der mcGvpE-Menge führt (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Im Gegensatz dazu sind in ΔDE^{ex}- und E^{ex}-Transformanten große Mengen des mcGvpE-Proteins nachweisbar. In den DE^{ex}-Transformanten ist außerdem die Menge des 61 kDa mcGvpD-Proteins im Vergleich zu D^{ex}-Transformanten stark reduziert, das hier offensichtlich als kleineres Degradationsprodukt vorliegt (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die mcGvpD-induzierte GvpE-Reduktion auch beobachtet werden kann, wenn die beiden Leserahmen von zwei unterschiedlichen Plasmiden aus exprimiert werden. Hierzu wurde in den halobakteriellen Vektor pWL102 (Lam & Doolittle, 1989) ein *fdx*-Promotorfragment inseriert, um einen zweiten Expressionsvektor mit ähnlicher Promotorstärke zur Verfügung zu haben. Beide Vektoren enthielten nur die Leserahmen der Gene, ohne die Leitregion. *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten, die den mc-*gvpE*-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35 und den mc-*gvpD*-Leserahmen im modifizierten pWL_{fdx}-Vektor enthielten, zeigten ebenfalls eine mcGvpD-induzierte Reduktion der mcGvpE-Proteinmenge. Im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen mit DE^{ex}-Transformanten konnte hier allerdings das 61 kDa mcGvpD-Protein stabil nachgewiesen werden. Um Bereiche des mcGvpD-Proteins zu identifizieren, die für die GvpE-Reduktion wichtig sind, wurden verschiedene mcGvpD-Mutanten auf diese Fähigkeit hin überprüft. Dazu lagen der mc-*gvpE*-Leserahmen in pJAS35 und der mc-*gvpD*- oder mc-$gvpD_{Mut}$-Leserahmen in pWL_{fdx} in den *Hfx. volcanii*-Transformanten vor. Für den „Super-Repressor" $D_{3\text{-}AAA}$ konnte ebenfalls ein stark reduzierender Effekt auf die mcGvpE-Proteinmenge *in vivo* nachgewiesen werden, was für die *p-loop*-Mutante D_{Mut6} nicht der Fall war.

Weiterhin wurde untersucht, ob der reduzierende Effekt von mcGvpD auch beobachtet werden konnte, wenn in der *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten der c-*gvpE*-Leserahmen aus *Hbt. salinarum* exprimiert wurde. Auch für diese heterologe Versuchsanordnung konnte die mcGvpD-induzierte Reduktion der cGvpE-Proteinmenge gezeigt werden. In *Hfx. volcanii*-Transformanten, die den c-*gvpE*-Leserahmen in pWL_{fdx} und die diversen mc-$gvpD_{Mut}$-Leserahmen in pJAS35 enthielten, wurde der reduzierende Effekt der mcGvpD-Mutanten auf die cGvpE-Menge *in vivo* untersucht. Analysiert wurden mcGvpD-Mutanten mit Substitutionen im *p-loop*-Motiv (D_{Mut1}), in der basischen Region 1 (D_{AEAE}) und 2 ($D_{3\text{-}ADA}$), sowie die verschiedenen Deletionsmutanten ($D_{\Delta p\text{-}loop}$, $D_{\Delta G\text{-}L}$, $D_{Nterm318}$, $D_{Nterm362}$, $D_{Nterm426}$, $D_{Nterm447}$, $D_{Nterm502}$, $D_{Cterm356}$). Für keine der untersuchten mcGvpD-Mutanten konnte ein reduzierender Effekt auf die GvpE-Menge nachgewiesen werden. Da die mcGvpD-Mutanten $D_{Nterm318}$, $D_{Nterm362}$ und $D_{Nterm502}$ ihre GvpE-Interaktionsfähigkeit verloren haben, war durch sie auch kein Einfluss auf die GvpE-Menge zu erwarten.

Anhand der Analyse der *gvpE*-Transkriptmengen in den verschiedenen Transformanten konnte klar gezeigt werden, dass der reduzierende Effekt von mcGvpD auf die GvpE-Menge

nicht aus einer Reduktion der *gvpE*-Transkriptmenge resultiert, sondern vielmehr auf der Proteinebene stattzufinden scheint. Ein möglicher Einfluss auf die Translationseffizienz der *gvpE*-Transkripte kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.
Die durchgeführten *in vivo*-Analysen machten deutlich, dass für den reduzierenden Effekt von mcGvpD auf die GvpE-Menge sowohl ein funktionelles *p-loop*-Motiv als auch eine funktionelle basische Region 1 benötigt wird.
Für die Mutanten mit Veränderungen in der basischen Region 2 konnten unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden. Die Mutante $D_{3\text{-}ADA}$ führte zu keiner Reduktion der GvpE-Proteinmenge, wohingegen der „Super-Repressor" $D_{3\text{-}AAA}$ eine starke Reduktion der GvpE-Proteinmenge induzierte. Ein funktioneller Unterschied der beiden Mutanten konnte bereits aufgrund ihrer repressorischen Funktion bei der Gasvesikelbildung beobachtet werden. Während die Mutante $D_{3\text{-}ADA}$ ihre Fähigkeit zur Repression der Gasvesikelbildung verloren hat, stellt die Mutante $D_{3\text{-}AAA}$ eine Art „Super-Repressor" dar (Pfeifer *et al*., 2001). Die beiden Mutanten unterscheiden sich lediglich durch eine Aminosäure an Position 495 $D_{3\text{-}ADA}$ ($_{494}RRR_{496}$ zu $_{494}ADA_{496}$) und $D_{3\text{-}AAA}$ ($_{494}RRR_{496}$ zu $_{494}AAA_{496}$). Folglich scheint eine Aminosäure mit einer negativ geladenen Seitenkette an dieser Position die repressorische Funktion von mcGvpD zu zerstören. Dies könnte eventuell auf eine negative Beeinflussung der Proteinstruktur zurückzuführen sein. Die ursprünglich in der basischen Region 2 vorhandenen Arginine sind bei einem physiologischen pH-Wert positiv geladen und könnten somit an der Ausbildung von Salzbrücken mit Aminosäuren mit einer negativ geladenen Seitenkette beteiligt sein. Die Ausbildung eines umfangreichen Systems von Salzbrücken dient zur Stabilisierung der Proteinstruktur von halophilen Proteinen (Dym *et al*., 1995). Infolgedessen könnte eine negative Ladung an dieser Position zu einer Instabilisierung der Proteinstruktur führen.

Um den reduzierenden Effekt von mcGvpD auf die mcGvpE-Proteinmenge in einer quantitativeren Art und Weise zu untersuchen, wurden *bgaH*-Reportergenanalysen durchgeführt. Die Ermittlung der mcGvpE-Proteinmengen erfolgte hierbei indirekt durch die Ermittlung de P_{mcA}-Aktivität. Bei diesen Analysen wurde davon ausgegangen, dass zwischen der mcGvpE-Menge und der P_{mcA}-Aktivität ein linearer Zusammenhang besteht, inwieweit dies zutrifft, ist allerdings nicht bekannt. So könnte dies bei den mcGvpE-Mengen, die unter der nativen P_{mcD}-Promotorkontrolle produziert werden, wie bei dem hier verwendeten Plasmidkonstrukt, durchaus der Fall sein. Jedoch konnte gezeigt werden, dass schon geringe mcGvpE-Mengen ausreichen, um eine vollständige P_{mcA}-Promotoraktivität zu erzielen, die durch große mcGvpE-Mengen (Expression unter *fdx*-Promotorkontrolle) nicht mehr erhöht werden kann (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Für die Untersuchungen verwendet wurden *Hfx. volcanii*-Transformanten, die zum einen das mcA-*bgaH*-ΔDEF-

Plasmidkonstrukt (enthält das *bgaH*-Reportergen unter der Kontrolle des P_{mcA}-Promotors und die mc-*gvpΔDEF*-Gene unter der Kontrolle des P_{mcD}-Promotors) und zum anderen den jeweiligen mc-*gvpD*$_{Mut}$-Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 enthielten. Diese Versuchsanordnung konnte gewählt werden, da mcGvpD keinen direkten Einfluss auf den P_{mcA}-Promotor besitzt, wenn das Protein ausgehend vom *fdx*-Promotor in pJAS35 produziert wird (Zimmermann, 2003). Weiterhin hat die zusätzliche Anwesenheit des mc-*gvpF*-Leserahmens in einer mcA-*bgaH*-ΔDEF-Transformante keine negative Auswirkung auf die P_{mcA}-Promotoraktivität (Zimmermann, 2003). Die Analysen wurden nur für einige mcGvpD-Mutanten durchgeführt. Das native mcGvpD-Protein und die „Super-Repressor"-Mutante $D_{3\text{-}AAA}$ führten zu einer starken Reduktion der P_{mcA}-Aktivität. Für die verschiedenen anderen untersuchten mcGvpD-Mutanten konnten keine signifikanten Abweichungen der P_{mcA}-Aktivität in Folge ihrer Anwesenheit ermittelt werden. So dass mit Hilfe dieser Analyse lediglich, das mittels der Western-Analysen erhaltene Ergebnis bestätigt werden konnte. Allerdings konnte im Rahmen dieser Untersuchungen eine interessante Beobachtung für die Mutante $D_{Cterm356}$ gemacht werden. Diese Mutante hatte eine deutliche Reduktion der P_{mcA}-Aktivität zur Folge, obwohl die Proteinmenge der $D_{Cterm356}$-Mutante in den mcA-*bgaH*-ΔDEF-pWL102+$D_{Cterm356}^{ex}$-Transformanten sehr gering war. Im Vergleich zum nativen mcGvpD und den anderen untersuchten mcGvpD-Mutanten konnte das $D_{Cterm356}$-Protein mit Hilfe von Western-Analysen kaum nachgewiesen werden. Desto verwunderlicher war der starke Einfluss des Proteins auf die P_{mcA}-Promotoraktivität und somit auf die mcGvpE-Menge, vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, dass dieser Mutante die ersten 189 Aminosäuren inklusive des *p-loop*-Motivs fehlen, das für die repressorische Funktion von GvpD essentiell ist (Pfeifer *et al*., 2001).

Im Rahmen der Untersuchungen mittels Western-Analysen zum Einfluss der verschiedenen mcGvpD-Mutanten auf die GvpE-Menge, konnte für $D_{Cterm356}$ keine Reduktion der GvpE-Menge nachgewiesen werden. Da diese Untersuchungen mit Hilfe von Western-Analysen durchgeführt wurden, wäre es eventuell möglich, dass eine geringfügige Reduktion der GvpE-Menge durch diese wenig quantitative Analysetechnik nicht nachgewiesen werden konnte. Weiterhin bleibt zur $D_{Cterm356}$-Mutante anzumerken, dass sie bei ΔD+$D_{Cterm356}^{ex}$-Transformanten zwar zu einem Phänotyp führt, der dem eines Gasvesikel-Überproduzenten entspricht, was den Verlust der repressorischen Funktion der Mutante zeigt. Da die Gasvesikelüberproduktion auf eine mangelnde Repression der P_{mcA}-Aktivität zurückzuführen ist, kann die Analyse der repressorischen Funktion einer mcGvpD-Mutante auch durch die Untersuchung der mc-*gvpA*-Transkriptmenge erfolgen. Bei dem Verlust der repressorischen Funktion der mcGvpD-Mutante ist die mc-*gvpA*-Transkriptmenge vor allem in der stationären Wachstumsphase stark erhöht. Dies war für fast alle untersuchten mcGvpD-Mutanten der Fall. Die mc-*gvpA*-Transkriptmenge in der ΔD+$D_{Cterm356}^{ex}$-Transformante war im Vergleich zu

den anderen Transformanten aber reduziert. Im Kontext mit der nun ermittelten reduzierten P_{mcA}-Aktivität bei den *bgaH*-Reportergenanalysen, könnte man mutmaßen, dass die repressorische Funktion der Mutante $D_{Cterm356}$ nicht vollkommen verloren, sondern nur reduziert ist. Eine andere Erklärung besteht möglicherweise darin, dass Cterm356 zwar nicht den Abbau des mcGvpE-Proteins induziert, durch die Interaktion allerdings die Bindung des mcGvpE-Proteins an den P_{mcA}-Promotor behindern könnte und deshalb eine verminderte P_{mcA}-Aktivität bei den Reportergenanalysen beobachtet werden konnte.

Interessanterweise haben alle mcGvpD-Mutanten (außer Cterm356), die zu keiner Reduktion der GvpE-Menge führen, auch die Fähigkeit verloren, die GvpE-vermittelte Aktivierung des P_{mcA}-Promotors in $\Delta D+D_{Mut}^{ex}$-Transformanten zu unterbinden (Tabelle 8). Das Fehlen der GvpE-reduzierenden Funktion der „inaktiven“ mcGvpD-Mutanten scheint somit der Grund für die Überproduktion der Gasvesikel zu sein. Insofern scheint die GvpD-GvpE-Interaktion nicht zu einem modifizierten GvpE-Protein ohne aktivatorische Funktion zu führen oder gar die Bindung von GvpE an den Promotorbereich zu verhindern. Die Wirkung des GvpD-Proteins als Repressor besteht vielmehr darin, den Abbau des Transkriptionsaktivators zu induzieren.

Tabelle 8. Fähigkeit zur Reprimierung der Gasvesikelbildung und Induktion der mcGvpE-Degradation der mcGvpD-Mutanten.

Mutante	Substitution/ Deletion in	Repression der GV-Bildung	Gegenwart von GvpE in $D_{Mut}^{ex}+E^{ex}$ Transformanten
D Wildtyp	-	+	-
Mut1	*p-loop*	-	+
Mut6	*p-loop*	-	+
Δp-loop	*p-loop*	-	+
ΔG-L	*p-loop*	-	+
AEAE	bR1	-	+
3-ADA	bR2	-	+
3-AAA	bR2	++	-
Nterm318	C-Terminus	-	+
Nterm362	C-Terminus	-/+	+
Nterm447	C-Terminus	-	+
Nterm502	C-Terminus	-	+
Cterm356	N-Terminus	-/+	+

Das GvpD-Protein besitzt ein *p-loop*-Motiv, wie es in ATP/GTP-bindenden Proteinen gefunden wird (Saraste *et al*., 1990) und eine Bindung von ATP durch mcGvpD konnte

bereits gezeigt werden (Zimmermann, 2003). Weiterhin induziert mcGvpD eine Reduktion der mcGvpE-Menge (Zimmermann & Pfeifer, 2003; diese Arbeit). All diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der Kontakt mit GvpD eine Veränderung des GvpE-Proteins bedingt, die zu einer Instablilisierung führt. Diese Instabilisierung könnte möglicherweise durch eine Modifizierung in Form einer Phosphorylierung verursacht werden. Weiterhin denkbar wäre, dass das GvpD-Protein eine strukturelle Veränderung des GvpE-Proteins hervorruft, die zu einer schnelleren Degradation des Aktivators führt.
Eine mögliche Spekulation wäre, dass dem GvpD-Protein eine ähnliche Rolle wie den AAA+ Proteinen des 19S-Kappenkomplex der Proteasomen zukommt, die zu einer Entfaltung der Proteine führen, um sie für die Degradation im 20S-Kernkomplex zugänglich zu machen. Auf welche Art und Weise Proteine von archaealen Proteasomen zum Abbau erkannt werden, ist bisher nicht bekannt (Maupin-Furlow *et al.*, 2005). In Eukaryonten werden die meisten Proteine durch kovalente Verknüpfung mit Polyubiquitin-Ketten zum Proteasomen-vermittelten Abbau markiert (Ciechanover, A., 1994). Eine Kombination von Struktur- und Sequenzvergleichen hat mehrere Proteine mit Ubiquitin-ähnlichen Sequenzmotiven in allen drei Domänen vorhergesagt (Bienkowska *et al.*, 2003; Rudolph *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Es ist allerdings unbekannt, ob diese Proteine an der Proteasomen-vermittelten Proteolyse in Archaea beteiligt sind; jedoch ist es durchaus wahrscheinlich, dass posttranslationale Mechanismen, die die Proteinkonformation ändern, eine regulierte Proteolyse auslösen (Maupin-Furlow *et al.*, 2005).

Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Art der Modifikation des GvpE-Proteins gestalten sich schwierig. Bei der gleichzeitigen Produktion von GvpD und GvpE in *Hfx. volcanii* kann aufgrund der Degradation kein GvpE-Protein zur Analyse gewonnen werden. Deshalb ist man auf *in vitro*-Experimente angewiesen. Durch Mischen von Zelllysaten einer D^{ex}- und einer E^{ex}-*Hfx. volcanii*-Transformanten konnte bislang allerdings keine Degradation gezeigt werden (Scheuch, 2003). Auch die Inkubation der beiden gereinigten Proteine mit ATP und anschließende MALDI-TOF-Analyse ließ keinen Schluss über eine mögliche Phosphorylierung zu.

Außer der Wirkung verschiedener mcGvpD-Mutanten auf die GvpE-Menge, wurde auch die Stabilität diverser cGvpE-Mutanten mit Substitutionen konservierter Aspartatreste (Anderl, 2004) bei Anwesenheit von mcGvpD in cE_{Mut}^{ex}+mcD^{ex}-Transformanten untersucht. GvpE könnte wie ein Antwortregulator eines Zwei-Komponenten-Systems an einem konservierten Aspartatrest modifiziert werden (Anderl, 2004), was hier allerdings nicht in einer Signalweiterleitung, sondern möglicherweise in der Beeinflussung der Proteinstabilität resultiert. Sollte dies der Fall sein, so müsste eine cGvpE-Mutante, deren essentieller

Aspartatrest substituiert wurde, in cE_{Mut}^{ex}+D^{ex}-Transformanten stabil und mit Hilfe von Western-Analysen nachweisbar sein. Drei verschiedene cGvpE-Mutanten mit Alaninsubstitutionen der konservierten Aspartatreste (Anderl, 2004) wurden daraufhin untersucht. Keine der untersuchten cGvpE-Mutanten war in den cE_{Mut}^{ex}+D^{ex}-Transformanten stabil, so dass die analysierten konservierten Aspartate keine Bedeutung für die durch GvpD modulierte GvpE-Proteininstabilität besitzen.

5.3 Untersuchungen zur Quartärstruktur von mcGvpD

Um erste Hinweise über eine mögliche Oligomerisierung des mcGvpD-Proteins zu erhalten, wurden native Polyacrylamidgelelektrophoresen, Gelfiltrationsanalysen und eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Für die Analysen wurde das $mcGvpD_{his}$-Protein sowohl rekombinant in *E. coli* als auch unter nativen Bedingungen in *Hfx. volcanii* hergestellt. Bei der Reinigung des $mcGvpD_{his}$-Proteins aus *Hfx. volcanii* WFD11 mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie wurde zusätzlich zum $mcGvpD_{his}$-Protein ein zweites ~60 kDa Protein (Protein X) mitgereinigt, das schon in früheren Analysen als Kontamination im Zusammenhang mit Ni-NTA-Agarose aufgetaucht war (Plößer & Pfeifer, 2002; Zimmermann & Pfeifer, 2003). Da es durch diverse Modifikationen der Reinigungsbedingungen nicht möglich war, dieses Protein von $mcGvpD_{his}$ zu trennen, sollte das Protein X näher untersucht und identifiziert werden. Durch N-terminale Sequenzierung (Reinhard Mentele, AG Lottspeich, MPI Martinsried) wurden die ersten 8 Aminosäuren bestimmt und das Protein als PitA identifiziert. Der Leserahmen dieses Proteins wurde bereits durch bioinformatische Studien gefunden (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Das PitA-Protein besitzt eine Ansammlung von Histidinen in seiner Aminosäuresequenz, wodurch seine Bindung an eine Metallchelat-Affinitätschromatographiematrix erklärt werden kann. Pfam-Datenbankanalysen sagten voraus, dass das Protein aus einer Chloritdismutase-Domäne und einer Antibiotikum-Biosynthese-Monooxygenase (ABM)-verwandten Domäne besteht (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Bisher charakterisierte Mitglieder der Chloritdismutase-Familie bilden Homo-Tetramere oder Pentamere aus (van Ginkel *et al.*, 1996; Danielsson-Thorel *et al.*, 2002; Ebihara *et al.*, 2005), wohingegen die Mitglieder der ABM-Familie Homo-Dimere ausbilden (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass das PitA-Protein eventuell auch zu Oligomeren assemblieren könnte (Bab-Dinitz *et al.*, 2006).

Da es bei der Reinigung von $mcGvpD_{his}$ aus *Hfx. volcanii* immer zu einer simultanen Reinigung des PitA-Proteins kam und eine Separation der beiden Proteine nicht möglich war, mussten die Analysen jeweils mit einem $mcGvpD_{his}$-PitA-Proteingemisch durchgeführt werden.

5.3.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese von Gvp_{his}-Proteinen und PitA

Mit Hilfe der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese konnte für das mcGvpD$_{his}$-Protein keine diskrete Bande im Gel erhalten werden. Das Protein retardierte vielmehr zu einem Teil am Taschenrand und lief als eine Schar von Banden ins native Polyacrylamidgel ein. Diese Beobachtung für das mcGvpD$_{his}$-Protein konnte unabhängig davon gemacht werden, ob das Protein aus *E. coli* oder *Hfx. volcanii* isoliert wurde. Weiterhin zeigte das mcGvpD$_{his}$-Protein dieses Laufverhalten sowohl in 2,5 M KCl als auch in 8 M Harnstoff. Lediglich die Zugabe von SDS-Probenpuffer konnte ein Einlaufen des Proteins ins native Polyacrylamidgel bedingen, wobei in diesem Fall eine diffuse Bande im oberen Bereich des Gels sowie eine Bandenschar für das mcGvpD$_{his}$-Protein beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis könnte andeuten, dass mcGvpD$_{his}$ möglicherweise als hochmolekularer Komplex vorlag.
Eine weitere Erklärung für die breite Bandenschar von mcGvpD$_{his}$ wäre, dass die Bedingungen des gewählten Gelsystems nicht zur Auftrennung von halophilen Proteinen geeignet sind. Gegen diese Vermutung spricht jedoch das Laufverhalten des PitA-Proteins, das als diskrete Bande im nativen Polyacrylamidgel erhalten wurde. Somit scheint das verwendete Gelsystem nach Schägger & von Jagow (1987) auch ohne SDS für die Auftrennung halophiler Proteine geeignet zu sein. Die Laufweite des PitA-Proteins übersteigt sogar die des BSA-Monomers, was andeuten könnte, dass das PitA-Protein in seiner monomeren Form vorlag. Dieses Ergebnis widerspricht der auf bioinformatische Studien gestützten Vermutung, dass das PitA-Protein möglicherweise zu einem Oligomer assemblieren könnte (Bab-Dinitz *et al*., 2006). Eine Aussage über die wirkliche molare Masse ist anhand nur einer gelelektrophoretischen Auftrennung jedoch nicht möglich. Um die molare Masse des PitA-Proteins durch native PAGE bestimmen zu können, müsste ein Ferguson Plot (Ferguson, 1964) vorgenommen werden. Beim Ferguson plot wird die molare Masse eines Proteins durch die Bestimmung der relativen Laufstrecke des Proteins als Funktion der Acrylamidkonzentration ermittelt.
Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass das Laufverhalten eines Proteins in einem nativen Gel nicht nur von seiner Größe, sondern auch von seiner Form und seiner Ladung abhängt. Bei den als Kontrollproteinen für die native Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzten Proteinen handelt es sich um nicht-halophile Proteine. Halophile Proteine enthalten dagegen einen hohen Anteil von Aminosäuren mit sauren Seitenketten (Lanyi, 1974; Dennis & Shimmin, 1997; Oren 1999), sind bei physiologischem pH-Wert und somit auch bei dem verwendeten Gelsystem mit pH-Werten von pH 8,45 bis 8,9 (nach Schägger & von Jagow, 1987) negativ geladen. Ein Vergleich der isoelektrischen Punkte des BSA-Proteins (66 kDa, isoelektrischer Punkt bei pH 4,9) mit den untersuchten halophilen Proteinen mcGvpD$_{his}$ (62 kDa, isoelektrischer Punkt bei pH 4,69) und PitA (56 kDa,

isoelektrischer Punkt bei pH 4,28) macht allerdings deutlich, dass eine Größenorientierung anhand von BSA annähernd möglich sein sollte.
Unter Berücksichtigung des Laufverhaltens des PitA-Proteins im nativen Polyacrylamidgel könnte die für das mcGvpD$_{his}$-Protein erhaltene Bandenschar möglicherweise andeuten, dass die mcGvpD$_{his}$-Lösung aus einer heterogenen Mischung verschiedener Oligomere besteht.
Auch die mcGvpE$_{his}$- und cGvpE$_{his}$- Proteine aus *E. coli* konnten als eine breite Schar von Banden im nativen Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden, die sich von der Geltasche bis zur Mitte des Gels erstreckte. Für die rückgefalteten Proteine in 2,5 M KCl von mcGvpE$_{his}$ und cGvpE$_{his}$ konnte jeweils ein Protein-Leitermuster in der Bandenschar nachgewiesen werden, was für die GvpE$_{his}$-Proteine in 8 M Harnstoff nicht der Fall war. Das cGvpE-Protein bildet in Lösung Dimere aus (Plößer & Pfeifer, 2002). Da die hier verwendeten Proteine aus *E. coli* isoliert wurden, könnte man mutmaßen, dass durch die denaturierende Reinigung und anschließende Rückfaltung mittels Dialyse nur ein Teil der Proteine in ihrer nativen Konformation vorlagen.
Im Gegensatz zum mcGvpD$_{his}$-Protein wandern die GvpE$_{his}$-Proteine nach Zugabe von SDS-Probenpuffer weit ins native Polyacrylamidgel ein und können als diskrete Bande (im Fall von mcGvpE$_{his}$) sichtbar gemacht werden. Dies stellt einen weiteren Hinweis dafür dar, dass das Laufverhalten des mcGvpD$_{his}$-Proteins im nativen Polyacrylamidgel auf Proteinkomplexe mit verschiedenen molaren Massen zurückzuführen sein könnte, da selbst durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer keine diskrete Bande für mcGvpD$_{his}$ im nativen Gel erreicht werden konnte.

5.3.2 Gelfiltration von Gvp$_{his}$-Proteinen und PitA

Als weitere Analysemethode wurde die Gelfiltration verwendet, um Hinweise über die Quartärstruktur des mcGvpD-Proteins zu erhalten. Da die chromatographische Auftrennung der Proteine auch unter Hochsalzbedingungen erfolgte, wurden die nicht-halophilen Standardproteine zur Kalibrierung der Superose 6-Gelfiltrationssäule ebenfalls in einer Lösung mit 1,5 M KCl auf die Säule appliziert. Ein Vergleich der Elutionsvolumina der Standard-Proteine im Hoch- und Niedrigsalz zeigte, dass durch die Salzkonzentration ihr Elutionsvolumen nur vernachlässigbar beeinflusst wurde. Eine Aggregation der Proteine aufgrund der hohen Salzkonzentration fand also nicht statt.
Das mcGvpD$_{his}$-Protein aus *E. coli* wurde zum einen unter denaturierenden Bedingungen (in 8 M Harnstoff) und zum anderen unter nativen Bedingungen (nach Dialyse in 2,5 M KCl) mittels Gelfiltration chromatographisch aufgetrennt. Für das mcGvpD$_{his}$-Protein in 2,5 M KCl konnte nur eine Absorptionsspitze bei 9 ml erhalten werden, was andeutete, dass das

Protein in einem großen Komplex vorzuliegen schien, dessen molare Masse oberhalb der Ausschlussgrenze des Säulenmaterials lag. Für das Protein in 8 M Harnstoff konnte eine Absorptionsspitze bei einem Elutionsvolumen von 12 ml erhalten werden. Somit schienen die denaturierenden Bedingungen zumindest teilweise zu einer Auflösung des hochmolekularen Komplexes zu führen, jedoch das mcGvpD$_{his}$-Protein nicht in seine monomere Form zu überführen. Da für die Gelfiltrationen des rekombinant in *E. coli* hergestellten mcGvpD$_{his}$-Proteins sowohl unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen nur eine Absorptionsspitze erhalten wurde, wurden die Elutionsfraktionen nicht gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE oder Western-Analyse untersucht. Infolgedessen kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Proteinmengen auch über einen größeren Elutionsbereich verteilt vorlagen, aber aufgrund der minimalen Menge nicht nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse der Gelfiltration stehen im Gegensatz zu den mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese erzielten Resultaten. Durch native PAGE konnte für mcGvpD$_{his}$ aus *E. coli* (sowohl in 2,5 M KCl als auch in 8 M Harnstoff) eine breite Bandenschar und keine diskrete Bande, wie anhand der Gelfiltrationsanalysen zu vermuten wäre, nachgewiesen werden. Somit könnte es sein, dass ein Großteil des Proteins zwar als hochmolekularer Komplex vorlag, jedoch geringe Proteinmenge als eine heterogene Mischung verschiedener oligomerer Strukturen vorhanden war, die nur mittels der sehr sensitiven Methode der Western-Analyse detektiert werden konnten.

Auch das nativ aus *Hfx. volcanii* isolierte mcGvpD$_{his}$-Protein wurde chromatographisch mit einer Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Da hier allerdings ein Proteingemisch aus mcGvpD$_{his}$ und PitA verwendet wurde, war das Elutionsprofil nicht allein durch das mcGvpD$_{his}$-Protein geprägt. Vergleicht man die Extinktionskoeffizienten von mcGvpD$_{his}$ (45840 $M^{-1}*cm^{-1}$ bei 280 nm) und PitA (72310 $M^{-1}*cm^{-1}$ bei 280 nm) so wird deutlich, dass bei ungefähr gleichen Mengen der Proteine im Proteingemisch das Elutionschromatogramm stärker von PitA geprägt wird. Da relativ geringe Proteinmengen für die Analysen eingesetzt wurden, wurden die Fraktionen der Gelfiltration gesammelt und mittels Western-Analyse untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass das mcGvpD$_{his}$-Protein sowohl in Elutionsfraktionen nachgewiesen werden konnte, die einer monomeren Form entsprechen könnten, als auch in Fraktionen, die andeuten, dass das Protein als hochmolekularer Komplex vorlag. Die Ergebnisse der Gelfiltration deuteten für mcGvpD$_{his}$ aus *Hfx. volcanii* an, dass das Protein als eine heterogene Mischung verschiedener oligomerer Strukturen vorliegen könnte, was die durch native Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltenen Ergebnisse bestätigte.

Da in den Proteinlösungen, die aus *Hfx. volcanii* erhalten wurden, immer auch das PitA-Protein enthalten war, wurde PitA ebenfalls allein mittels Gelfiltration über eine Superose 6-

Säule chromatographisch aufgetrennt. Das Elutionsmuster des PitA-Proteins weist zwei Absorptionsspitzen bei Elutionsvolumina auf, die andeuteten, dass das Protein sowohl in seiner monomeren Form als auch in einer oligomeren Form mit einer ähnlichen molaren Masse wie Thyroglobulin (669 kDa) vorliegen könnte. Das PitA-Protein besteht aus zwei Domänen (Chloritdismutase- und ABM-verwandte-Domäne) und Strukturanalysen von Mitgliedern beider Proteinfamilien könnten auch für PitA eine oligomere Struktur andeuten (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Infolgedessen könnte das Ergebnis der Gelfiltrationsanalyse die Vermutung, dass auch das PitA-Protein oligomere Strukturen ausbildet (Bab-Dinitz *et al.*, 2006), bestätigen.

Die Ergebnisse der Gelfiltrationen von mcGvpE$_{his}$ und cGvpE$_{his}$ weisen auf Unterschiede im Komplexierungszustand der Proteine abhängig vom zur Produktion verwendeten Organismus hin. Mit Hilfe der in *Hfx. volcanii* hergestellten Proteine konnte sowohl für mcGvpE$_{his}$ als auch für cGvpE$_{his}$ ein Elutionsprofil erhalten werden, dass andeutete, dass die Proteine als Monomer und Dimer vorlagen. Das cGvpE-Protein bildet in Lösung Dimere aus (Plößer & Pfeifer, 2002). Somit konnte dieses Ergebnis mit Hilfe der Gelfiltration erneut bestätigt werden.
Die in *E. coli* produzierten GvpE$_{his}$-Proteine, konnten mit Hilfe der Gelfiltrationsanalysen über einen breiten Elutionsbereich nachgewiesen werden, sowohl unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff als auch unter nativen Bedingungen in 2,5 M KCl. Diese Ergebnisse zeigen, dass nur ein Teil der Proteine durch die Rückfaltung nach der denaturierenden Reinigung in ihre native Konformation überführt werden konnten. Die Gelfiltrationsanalysen bestätigen die Ergebnisse der nativen Polyacrylamidgel-elektrophorese, wobei die GvpE$_{his}$-Proteine als eine breite Schar von Banden nachgewiesen werden konnten. Berücksichtigt werden sollte hier allerdings, dass für die Gelfiltration mit den Proteinen aus *E. coli* wesentlich mehr Protein eingesetzt wurde. Außerdem waren in den Proteinlösungen noch verunreinigende Proteine aus *E. coli* enthalten.

5.3.3 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von mcGvpD$_{his}$ und PitA

Um den oligomeren Zustand des mcGvpD$_{his}$-Proteins weiter zu untersuchen, wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation mit nativ aus *Hfx. volcanii* gereinigtem mcGvpD$_{his}$ durchgeführt. Hierbei konnte das mcGvpD$_{his}$-Protein allerdings nicht in einem bestimmten Bereich des Saccharose-Dichtegradienten angereichert werden, sondern lag über einen großen Bereich des Dichtegradienten verteilt vor. Das mcGvpD$_{his}$-Protein schien folglich nicht als ein Proteinkomplex mit einer definierten molaren Masse vorzuliegen, sondern besteht vielmehr aus einer heterogenen Mischung diverser Oligomere mit unterschiedlichen molaren

Massen. Da in der für die Analysen verwendeten Proteinlösung ebenfalls das PitA-Protein enthalten war, konnte auch die Verteilung des PitA-Proteins im Saccharose-Dichtegradienten sichtbar gemacht werden. Das PitA-Protein konnte wie mcGvpD$_{his}$ im Saccharose-Dichtegradient in Fraktionen nachgewiesen werden, in denen Thyroglobulin (669 kDa) sedimentiert, was andeutet, dass auch dieses Protein als oligomerer Komplex vorliegen könnte. Die putativen PitA-Komplexe erreichten allerdings nicht die molare Masse der größten mcGvpD$_{his}$-Komplexe, was anhand ihres Sedimentationsverhaltens im Saccharose-Dichtegradienten deutlich wurde. Weiterhin konnte das PitA-Protein in einem bestimmten Bereich des Saccharose-Dichtegradienten angereichert werden, was für das mcGvpD$_{his}$-Protein nicht der Fall war. Beim Vergleich der Bandenstärke der beiden Proteine in den verschiedenen Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten konnte außerdem eine Trennung der beiden Proteine gezeigt werden. In den Fraktionen mit steigender Dichte nahm die Menge an PitA-Protein ab, wohingegen die Menge an mcGvpD$_{his}$ gleich blieb.
Eine mögliche Fehlerquelle bei der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation könnte die Art der Fraktionierung des Gradienten darstellen. Die Fraktionen wurden nicht durch Austropfen aus dem Zentrifugenröhrchen erhalten, sondern die einzelnen Fraktionen wurden von oben her mit einer Pipette abgenommen. Hierbei könnte es zu einem leichten Durchmischen des Gradienten oder einer Verschleppung geringer Proteinmengen am Rand des Zentrifugenröhrchens gekommen sein.

5.4 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Der GvpE-Interaktionsbereich in mcGvpD konnte durch die *in vitro* Interaktionsexperimente auf eine zentrale Region in der Nähe des unkonservierten Bereichs eingeschränkt werden. Zur definitiven Lokalisierung des Interaktionsbereiches von mcGvpD wäre die Untersuchung von mcGvpD-Mutanten interessant, die Mutationen oder interne Deletionen im zentralen Bereich nahe der unkonservierten Region von mcGvpD tragen. Zur Quantifizierung könnten die Interaktionsstudien jeweils mit einem Gvp$_{his}$- und einem Gvp$_{strep}$-Protein durchgeführt werden.

Für die mcGvpD-induzierte Reduktion der GvpE-Menge *in vivo* konnte gezeigt werden, dass ein funktionelles *p-loop*-Motiv sowie eine basische Region 1 für diese Funktion des mcGvpD-Proteins wichtig sind. Das *p-loop*-Motiv ist allerdings nicht an der Interaktion mit mcGvpE beteiligt, was auch für die basische Region 1 (Scheuch, 2003) gezeigt werden konnte. Alle mcGvpD-Mutanten, die die Fähigkeit zur Reprimierung der Gasvesikelbildung verloren haben (Pfeifer *et al*., 2001; diese Arbeit), besitzen ebenfalls nicht die Fähigkeit eine Reduktion der GvpE-Menge zu induzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass GvpD nicht als Gen-Repressor, sondern vielmehr auf der Ebene des Aktivators wirkt und dessen

Degradation induziert. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, eine Beteiligung der 20S Proteasomen am Abbau des GvpE-Proteins zu untersuchen. Dies könnte durch die Verwendung eines Proteasomen-spezifischen Inhibitors erfolgen. Bereits erfolgreich für Studien mit *Hfx. volcanii* eingesetzt wurde der Proteasomen-spezifische Inhibitor *clasto*-Lactacystin-β-Lacton, dessen Wirkung bei *in vivo*-Analysen allerdings nur unvollständig ist (Reuter & Maupin-Furlow, 2004).

Erste Untersuchungen zur Quartärstruktur des mcGvpD-Proteins legen die Vermutung nahe, dass das Protein nicht nur als Monomer, sondern als eine heterogene Mischung von oligomeren Komplexen mit unterschiedlichen molaren Massen vorliegen könnte, unabhängig davon ob das Protein aus *E. coli* oder aus *Hfx. volcanii* isoliert wird. Möglicherweise sind bei der aus *E. coli* isolierten Proteinmischung hochmolekulare $mcGvpD_{his}$-Komplexe dominierend. Anhand der Strukturdaten von RadA- und KaiC-Proteinen ist bekannt, dass die *p-loop*-Motive in den Oligomeren an den Kontaktflächen der Untereinheiten lokalisiert sind und die Bindung von ATP die Oligomerisierung induziert beziehungsweise stabilisiert. Infolgedessen wäre es aufschlussreich, mcGvpD-Mutanten mit einer Deletion des *p-loop*-Motivs auf die Ausbildung oligomerer Strukturen hin zu untersuchen. Durch Kristallisation des GvpD-Proteins und Röntgenstrukturanalysen könnte die Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins ermittelt werden. Dazu sollte die Reinigung des Proteins unter nativen Bedingungen aus *Hfx. volcanii* erfolgen. Weiterhin könnte die Ausbildung von oligomeren Strukturen auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht werden, wenn das mcGvpD-Protein in reiner Form erhalten werden könnte. Dazu ist die Reinigung mit Hilfe eines His-*tags* aufgrund des PitA-Proteins nicht ratsam. Für zukünftige Reinigungsversuche sollte auf die Verwendung eines anderen *tags* zurückgegriffen werden.

Für das PitA-Protein aus *Hfx. volcanii* konnten anhand der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation und der Gelfiltration erste Hinweise darüber erhalten werden, dass das Protein möglicherweise eine oligomere Struktur ausbilden könnte, was die durch bioinformatische Studien erhaltenen Vermutungen bestätigen würde (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Mit Hilfe der hier durchgeführten nativen Polyacrylamidgelelektrophorese konnten allerdings keine weiteren Hinweise für eine oligomere Struktur des PitA-Proteins erhalten werden.

6. Literaturverzeichnis

Aguilar, C.F., Sanderson, I., Moracci, M., Ciaramella, M., Nucci, R., Rossi, M., Pearl, L.H. (1997). Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability. J. Mol. Biol. 271(5): 789-802

Allers, T. & Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics - The third way. Nat. Rev. Genet. 6: 58-73

Anderl, F. (2004). Auswirkung von Mutationen in Aspartatresten auf die Funktion des Transkriptionsaktivators GvpE aus *Halobacterium salinarum*. Diplomarbeit, TU Darmstadt

Arakawa, T. & Tokunaga, M. (2004). Electrostatic and hydrophobic interactions play a major role in the stability and refolding of halophilic proteins. Protein Pept. Lett. 11(2):125-132.

Aravind, L. & Koonin, E.V. (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the Archaea. Nucleic Acids Res. 27: 4658-4670

Archer, D. B., & King, N.R. (1984). Isolation of gas vesicles from *Methanosarcina barkeri*. J. Gen. Microbiol. 130:167-172

Armbruster, V. (1997). Regulation der Gasvesikelsynthese des halophilen Archaeons *Halobacterium salinarum* PHH4: Gerichtete Mutagenese des Transkriptionsaktivators cGvpE. Diplomarbeit, TU Darmstadt

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1998). Current protocols in molecular biology, Green Publishing Associates an Wiley-Interscience, New York

Avron, M. (1986). The osmotic components of halotolerant algae. Trends Biochem. Sci. 11: 5-6

Bab-Dinitz, E., Shmuely, H., Maupin-Furlow, J., Eichler, J., Shaanan, B. (2006). *Haloferax volcanii* PitA: An example of functional interaction between Pfam chlorite dismutase and antibiotic biosynthesis monooxygenase families? Bioinformatics 22(6): 671-675

Baliga, N. S., Goo, Y. A.,Ng, W. V., Hood, L., Daniels, C. J., DasSarma,S. (2000). Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? Mol. Microbiol. 36 (5): 1184-1185

Baliga, N.S., Bonneau, R., Facciotti, M.T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E.W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R.S., Gan, R.R., Hung, P., Date, S.V., Marcotte, E., Hood, L., Ng, W.V. (2004). Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. Genome Res. 14(11):2221-34

Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollivh, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C., Eddy, S.R. (2004). The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 32: 138-141

Bauer, M., Reuff, M., Besche, V., Sartorius-Neef, S., Pfeifer, F. (2007). Overlapping activator sequences determined fort two oppositely oriented promoters in halophilic archaea. Eingereicht

Bayley, R.M. & Morton, R.A. (1978). Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 6: 151-205

Bell, S.D., Jaxel, C., Nadal, M., Kosa, P.F., Jackson, S.P. (1998). Temperature, template topology and factor requirements of archaeal transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15218-15222

Bell, S.D., Kosa, P.F., Sigler, P.B., Jackson, S.P. (1999a). Orientation of transcription preinitiation complex in Archaea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13662-13667

Bell, S.D., Cairns, S.S., Robson, R.L., Jackson, S.P. (1999b). Transcription regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*. Molecular Cell 4: 971-982

Bell SD & Jackson SP (2000b). Mechanism of Autoregulation by an Archaeal Transcriptional Repressor. J. Biol. Chem. 275: 31624-31629

Bell, S.D., Brinkmann, A.B., van der Oost, J., Jackson, S.P. (2001). The archaeal TFIIEα homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. EMBO reports 2: 133-138

Best, A. (2000). Molekulare Funktionsanalyse des gasvesikelassoziierten GvpC-Proteins aus *Halobacterium salinarum* PHH1. Wissenschaftliche Hausarbeit, TU Darmstadt

Bieger, B., Essen, L.O. and Oesterhelt, D. (2003). Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*. Structure 11: 375–385

Bienkowska, J.R., Hartman, H., Smith, T.F. (2003). A search method for homologs of small proteins. Ubiquitin-like proteins in prokaryotic cells? Protein Eng. 16: 897-904

Blaseio, U. & Pfeifer, F. (1990). Transformation of *Halobacterium halobium*: Development of vectors and investigation of gas vesicle synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6772-6776

Blecher, O., Goldman, S., Mevarech, M. (1993). High Expression in *Escherichia coli* of the gene coding for dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaebacterium *Haloferax volcanii*: reconstitution of the active enzyme and mutation studies. Eur. J. Biochem. 216: 199-203

Böhm, G. & Jaenicke, R. (1994). On the relevance of sequence statistics for the properties of extremophilic proteins. Int. J. Pept. Protein Res. 43: 97-106

Bonneté, F., Ebel, C., Zaccai, G., Eisenberg, H. (1993). A biophysical study of halophilic malate dehydrogenase in solution: revised subunit structure andsolventinteractions in native and recombinant enzyme. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 89: 2659-2666

Brenner, S.L., Zlotnick, A., Grifith, J.D. (1988). RecA protein self-assembly. Multiple discrete aggregation states. J. Mol. Biol. 204: 959-972

Brenner, S.L., Zlotnick, A., Stafford, W.F. (1990). RecA protein self-assembly. II. Analytical equilibrium ultracentrifugation studies of the entropy-driven self-association of RecA. J. Mol. Biol. 216: 949-964

Brinkmann, A.B., Dahlke, I., Tuiniga, J.E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J.H., Thomm, M., de Vos, W.M., van der Oost, J. (2000). An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. J. Biol. Chem. 275: 38160-38169

Britton, K.L., Stillman, T.J., Yip, K.S.P., Forterre, P., Engel, P.C., Rice, D.W. (1998). Insights into the molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. J. Biol. Chem. 273: 9023–9030

Britton, K.L., Baker, P.J., Fisher, M., Ruzheinikov, S., Gilmour, D.J., Bonete, M.J., Ferrer, J., Pire, C., Esclapez, J., Rice, D.W. (2006). Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (13): 4846-51.

Brown, A.D. (1990). Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK

Calmettes, P., Eisenberg, H., Zacchai, G. (1987). Structure of halophilic malate dehydrogenase in multimolar KCl solutions from neutron scattering and ultracentrifugation. Biophys. Chem. 26: 279-290

Cendrin, F., Chroboczek, J., Zaccai, G., Eisenberg, H., Mevarech, M. (1993). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaebacterium *Haloarcula marismortui*. Biochemistry 32: 4308-4313

Chartier, F., Laine, B., Belaïche, D., Touzel, J.P., Sautière, P. (1989). Primary structure of the chromosomal protein MC1 from the archaebacterium Methanosarcina sp. CHTI 55. Biochim. Biophys. Acta. 1008(3): 309-314

Chomczynski P. & Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem.162: 156-159

Cline, S.W. & Doolittle, W.F. (1987). Efficient transfection of the archaebacterium *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 169: 1341-1344

Cline, S.W., Schalkwyk, L., Doolittle, W.F. (1989). Transformation of the archaebacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. J. Bacteriol. 171: 4987-4991

Coulson, R.M., Touboul, N., Ouzounis, C.A. (2006). Lineage-specific partitions in archaeal transcription. Archaea 2: 117-25

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res. 16(22): 10881-10890

Dahlke, I. & Thomm, M. (2002). A *Pyrococcus* homologue of the Leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerise recruitment. Nucleic Acids Res. 30: 701-710

Danielsson Thorell, H., Karlsson, J., Portelius, E., Nilsson, T. (2002). Cloning, characterisation, and expression of a novel gene encoding chlorite dismutase from *Ideonella dechloratans*. Biochim. Biophys. Acta. 1577: 445–451

De Zutter, J. K. & Knight, K. L. (1999). The hRad51 and RecA proteins show significant differences in cooperative binding to single-stranded DNA. J. Mol. Biol. 293: 769-780

DeLange, R.J., Green, G.R., Searcy, D.G.(1981). A histone-like protein (HTa) from *Thermoplasma acidophilum*. I. Purification and properties. J. Biol. Chem. 256(2): 900-904

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

Deyrup, A., Krishnan, S., Cockburn, B.N., Schwatz, N.B. (1998). Deletion and site-directed mutagenesis of the ATP-binding motif (p-loop) in the bifunctional murine ATP-sulfurylase/adenosine 5´-phosphosulfate kinase enzyme. J. Bacteriol. 273: 9450-9456

DiCapua, E., Schnarr, M., Ruigrok, R. W., Lindner, P., Timmins, P. A. (1990). Complexes of RecA protein in solution. A study by small angle neutron scattering. J. Mol. Biol. 214: 557-570

Dill, K.A. (1990). Dominant forces in protein folding. Biochem. 29: 7133-7155

Dym. O., Mevarech, M., Sussman, J.L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeabacterium. Science 267: 1344-1346

Ebihara, A., Okamoto, A., Kousumi, Y., Yamamoto, H., Masui, R., Ueyama, N., Yokoyama, S., Kuramitsu, S. (2005). Structure-based functional identification ofa novel heme-binding protein from *Thermus thermophilus* HB8. J. Struct. Funct. Genomics 6: 21-32

Edmann, P. & Begg, G. (1967): A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1: 80 – 91.

Egelman, E.H., Yu, X., Wild, R., Hingorani, M.M., Patel, S.S. (1995). Bacteriophage T7 helicase/primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggest a general structure for hexameric helicases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92(9): 3869-3873

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

Eisenberg, H., Mevarech, M., Zacchai, G. (1992). Biochemical, structural and molecular genetic aspects of halophilism. Adv. Protein Chem. 43: 1-62

Englert, C., Horne, M., Pfeifer, F. (1990). Expression of the major gas vesicle protein in the halophilic archaebacterium *Haloferax mediterranei* is modulated by salt. Mol. Gen. Genet. 222: 225-232

Englert, C., Krüger, K., Offner, S., Pfeifer, F. (1992a). Three different but related gene cluster encoding gas vesicles in halophilic archaea. J. Mol. Biol. 227: 586-592

Englert, C., Wanner, G., Pfeifer, F. (1992b). Functional analysis of gas-vesicle gene cluster of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* defines the vac-region boundary and suggests a regulatory role for the *gvpD* gene or its product. Mol. Microbiol. 6: 3543-3550

Englert, C. & Pfeifer, F. (1993). Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloferax mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins. J. Biol. Chem. 5: 9329-9336

Enoru-Eta, J., Gigot, D., Thia-Toong, T.L., Glansdorf, N., Charlier, D. (2000). Purification and characterization of Sa-Lrp, a DNA-binding protein from the extreme thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* homologous to the bacterial global transcription regulator Lrp. J. Bacteriol. 182: 3661-3672

Ferguson, K.A. (1964). Starch-gel-electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. Metabolism 13(10): 985-1002

Flory, J. & Radding, C.M. (1982). Visualization of recA protein and its association with DNA: A priming effect of single-strand-binding protein. Cell 28: 747-756

Forget, A.L., Kudron, M.M., McGrew, D.A., Calmann, M.A., Schiffer, C.A., Knight, K.L. (2006). RecA dimmers as a functional unit for assembly of active nucleoprotein filaments. Biochemistry 45: 13537-13542

Frolow, F.,Harel, M., Sussman, J.L., Mevarech, M., Shoham, M. (1996). Insights into protein adaption to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. Nat. Struct. Biol. 3: 452-458

Fütterer, O,, Angelov, A., Liesegang, H., Gottschalk, G., Schleper, C., Schepers, B., Dock, C., Antranikian, G., Liebl, W. (2004). Genome sequence of Picrophilus torridus and its implications for life around pH 0. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(24): 9091-9096

Gomis-Ruth, F.X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F., Coll, M. (2001). The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. Nature 409(6820):637-41.

Grant, W., Kamekura, M., McGenity, T.J., and Ventosa, A. (2001). Class III. Halobacteria class nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Boone, D., Castenholz, R. and Garrity, G. (eds). New York: Springer-Verlag, pp. 294-334.

Grant, W.D. & Larsen, H. (1989). Extremely halophilic archaebacteria. Order Halo-bacteriales ord. nov., p. 2216-2233. In: N. Pfennig (ed.), Bergey´s manual of sytematic bacteriology: Williams and Wilkins, Baltimore

Gregor, D. & Pfeifer, F. (2001). Use of a halobacterial *bgaH* reporter gene to analyse the regulation of gene expression in halophilic archaea. Microbiology 147: 1745-1754

Gregor, D. (2002). Untersuchungen zur Regulation von Promotoren aus halophilen Archaea mit dem *bgaH*-Reportergen. Dissertation, TU Darmstadt

Gregor, D. & Pfeifer, F. (2005). *In vivo* analyses of constitutive and regulated promoters in halophilic archaea. Microbiology 151: 25-33

Halladay, J., Jones, J., Lin, F., MacDonald, B., DasSarma, S. (1993) The rightward gas-vesicle operon in Halobacterium plasmid pNRC100: Identification of the *gvpA* and *gvpC* gene products by use of antibody probes and genetic analysis of the region downstream of *gvpC*. J. Bacteriol.175: 684-692

Hanzelka, B.L., Darcy, T.J., Reeve, J.N.(2001). TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIEalpha. J. Bacteriol. 183(5): 1813-1818

Hausner, W. & Thomm, M. (1993). Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithothrophicus*. J. Biol. Chem. 268: 24047-24052

Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C., Thomm, M. (1996). Two transcription factors related with the eukaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promotor recognition by an archaeal RNA polymerase. J. Biol. Chem. 271(47): 30144-30148

Hayashi, F., Suzuki, H., Iwase, R., Uzumaki, T., Miyake, A., Shen, J.R., Imada, K., Furukawa, Y., Yonekura, K., Namba, K., Ishiura, M. (2003). ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. Genes Cells. 8(3): 287-296

Hayes, P.K., Buchholz, B., Walsby, A.E. (1992). Gas vesicles are strengthened by the outer-surface protein, GvpC. Arch. Microbiol. 157: 229-234

Hayes, P.K., Lazarus, C.M., Bees, A., Walker, J.E, Walsby, A.E. (1988). The protein encoded by *gvpC* is a mino component of gas vesicles, isolated from the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis sp.*. Mol. Microbiol. 2: 545-552

Hennig, M., **Darimont, B.**, **Sterner, R.**, **Kirschner, K.**, **Jansonius, J.N. (1995).** 2.0 A structure of indole-3-glycerol phosphate synthase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*: possible determinants of protein stability. Structure 3(12): 1295-306

Hethke, C., Geerling, A.C., Hausner, W., de Vos, W.M., Thomm, M. (1996). A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Nucleic Acids Res. 15: 2369-2376

Hochheimer, A., Hedderich, R., Thauer, R.K. (1999). The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA-binding properties and transcriptional regulation. Mol. Microbiol. 31(2): 641-650

Hofacker, A. (2002). Regulation der Gasvesikel-bildung bei Halobacterium salinarum PHH1. Dissertation, TU-Darmstadt

Hofacker, A., Schmitz, K.M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S., Pfeifer, F. (2004). GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. Microbiol. 150(Pt 6): 1829-1838

Holmes, M. L., Nuttall, S. D., Dyall-Smith, M. L. (1991). Construction and Use of Halobacterial Shuttle Vectors and Further Studies on *Haloferax* DNA Gyrase. J. Bacteriol. 173 (12): 3807-3813

Holmes, M.L. & Dyall-Smith, M.L. (2000). Sequence and expression of a halobacterial β-galactosidase gene. Mol. Microbiol. 36: 114-122

Holmes, M.L., Scopes, R.K., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Englert, C., Pfeifer, F., Dyall-Smith, M.L. (1997). Purification and analysis of an extremely halophilic β-galactosidase from *Haloferax alicantei*. Biochim Biophys Acta 1337: 276-386

Horne, M. & Pfeifer, F. (1989). Expression of two gas vacuole protein genes in *Halobacterium halobium* and related species. Mol. Gen. Genet. 218: 437-444

Horne, M., Englert, C., Pfeifer, F. (1988). Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. Mol. Gen. Genet. 213: 459-464

Horne, M., Englert, C., Wimmer, C., Pfeifer, F. (1991). A DNA region of 9 kbp contains all genes necessary for gas vesicle synthesis in halophilic archaebacteria. Mol. Microbiol. 5: 1159-1174

Hu, J.C., O´Shea, E.K., Kim, P.S., Sauer, R.T. (1990). Sequence requirement for coiled coil: analysis with lambda-repressor-GCN4 leucine zipper fusions. Science 250: 1400-1403

Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C.R., Tanabe, A., Golden, S.S., Johnson, C.H., Kondo, T. (1998). Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. Science. 281(5382): 1519-1523.

Iwasaki, H., Taniguchi, Y., Ishiura, M., Kondo, T. (1999). Physical interactions among circadian clock proteins KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. EMBO J. 18(5): 1137-1145.

Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V., Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. J. Struct. Biol. 146(1-2): 11-31

Jaenicke, R. (1981). Enzymes under extremes of physical conditions. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 10: 1-67

Jolley, K.A., Russell, R.J.M., Hough, D.H., Danson, M.J. (1997). Site-directed mutagenesis and halophilicity of dihydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. Eur. J. Biochem. 248: 362-368.

Jost, M. (1965). Die Ultrastruktur von *Oscillatoria rubescens*. D. C. Arch. Microbiol. 50: 211-245

Kameruka, M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. Extremophiles 2(3): 289-295

Kinsman, R., Walsby, A.E., Hayes, P.K. (1995). GvpCs with reduced numbers of repeating sequence elements binds to and strengthen cyanobacterial gas vesicles. Mol. Microbiol. 17: 147-154

Kowalczykowski, S.C. & Eggleston, A.K. (1994). Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. Annu. Rev. Biochem. 63:991-1043

Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D. , Rehrauer, W.M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiol Rev. 58: 401–465

Krantz, M.H. & Ballou, C.E. (1973). Analysis of *Halobacterium halobium* gas vesicles. J. Bacteriol. 3: 1058-1067

Krüger, K. (1996). Untersuchungen zur Regulation der Gasvesikelsynthese in dem halophilen Archaeon *Halobacterium salinarum* PHH4. Dissertation, LMU München

Krüger, K. & Pfeifer, F. (1996). Transcript analysis of the c-vac region and differential synthesis of two regulatory gas-vesicle proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarum* PHH4. J. Bacteriol. 178: 4012-4019

Krüger, K., Hermann, T., Armbruster, V., Pfeifer, F. (1998). The Transcriptional Activator GvpE for Halobacterial Gas Vesicle Genes Resembles a Basic Leucine-zipper Regulatory Protein. J. Mol. Biol. 279: 761-771

Kurenbach, B. (1999). Untersuchungen zur Regulation der Gasvesikelbildung bei dem halophilen Archaeon *Haloferax mediterranei*: gerichtete Mutagenese von mc-*gvpD*. Diplomarbeit, TU Darmstadt

Kushner, D.J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, In D.J. Kushner (ed), Microbial life in extreme environments. Academic Press Ltd., London. pp: 317-368

Kushner, D.J. (1985). The Halobacteriaceae, p. 171-214. In C.R. Woese and R.S. Wolfe (ed.), The bacteria. A treatise on structure and function, vol. VIII Archaeabacteria. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.

Kyhse-Andersen, J. (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple aparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. 10: 203-209

Kyte, J. & Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157: 105-132

Lagrange, T, Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., Ebright, R.H. (1998). New core promotor element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. Genes Dev. 12(1): 34-44

Lam, W.L. & Doolittle, W.F. (1989). Shuttle vectors for the archaebacterium *Halobacterium volcanii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5478-5482

Langner, D., Hain, J., Thuriaux, P., Zillig, W. (1995). Transcription in Archaea: similarity to that in eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(13): 5768-5772

Lanyi, J.K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. Bacteriol Rev. 38: 272-290

Larsen, H., Omang, S., Steensland, H. (1967). On the gas vacuoles of the halobacteria. Arch. Mikrobiol. 59: 97-203

Leipe, D.D., Aravind, L., Grishin, N.V., Koonin, E.V. (2000). The bacterial replicative helicase DnaB evolved from a RecA duplication. Genome Res. 10(1): 5-16

Leonard, P.M., Smiths, S.H., Sedelnikova, S.E., Brinkman, A.B., de Vos, W.M., van der Oost, J., Rice, D.W., Rafferty, J.B. (2001). Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. EMBO J. 20: 990-997

Lipps, G., Ibanez, P., Stroessenreuther, T., Hekimian, K., Krauss, G. (2001). The protein ORF80 from the acidophilic and thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* binds highly sitespecifically to double-stranded DNA and represents a novel type of basic leucine zipper protein. Nucleic AcidsRes. 29(24): 4973-4982

Lottspeich F & Zorbas H (1998). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg . Berlin

Madern, D., Pfister, C., Zaccai, G. (1995). A single amino acid mutation enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. Eur. J. Biochem. 249: 607-611

Madern, D., Ebel, C., Zacchai, G. (2000). Halophilic adaption of enzymes. Extremophiles 4: 91-98

Maupin-Furlow JA, Gil MA, Humbard MA, Kirkland PA, Li W, Reuter CJ, Wright AJ. (2005). Archaeal proteasomes and other regulatory proteases. Curr. Opin. Microbiol. 8(6): 720-728

McEntee, K., Weinstock, G. M., Lehman, I. R. (1981). Binding of the recA protein of *Escherichia coli* to single- and doublestranded DNA. J. Biol. Chem. 256: 8835-8844

Menetski, J. P., Kowalczykowski, S. C. (1985). Interaction of recA protein with single-stranded DNA. Quantitative aspects of binding affinity modulation by nucleotide cofactors. J. Mol. Biol.181: 281-295

Mevarech, M., Frolow, F., Gloss, L.M. (2000). Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. Biophys. Chem. 86(2-3): 155-64

Mori, T., Saveliev, S.V., Xu, Y., Stafford, W.F., Cox, M.M., Inman, R.B., Johnson, C.H. (2002). Circadian clock protein KaiC forms ATP-dependent hexameric rings and binds DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(26): 17203-17208

Mwatha, W. E. & Grant, W. D. (1993). *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from Lake Magadii, Kenya. Int. J. System. Bacteriol. 43: 401-404

Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Bergqvist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S.,Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B.,Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K. W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S. (2000). Genome sequence of *Halobacterium species* NRC-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (22): 12176-81

Nicholls, A., Sharp, K.A,. Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. Proteins. 11(4): 281-296

Nicholson, H., Anderson, D.E., Dao-pin, S., Matthews, B.W. (1991). Analysis of the interaction between charged side chains and the alpha-helix dipole using designed thermostable mutants of phage T4 lysozyme. Biochem. 30(41): 9816-9828

Novy, R. & Morris, B. (2001). Novations 13: 8-10

Offner, S. & Pfeifer, F. (1995). Complementation studies with the gas-vesicle-encoding p-vac region for *Halobacterium salinarum* PHH1 reveal a regulatory role for the p-*gvpDE* genes. Mol. Microbiol. 16: 9-19

Offner, S., Wanner, G., Pfeifer, F. (1996). Functional studies of the *gvpACNO* operon of *Halobacterium salinarum* PHH1 reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. J. Bacteriol. 178: 2071-2078

Offner, S., Ziese, U., Wanner, G., Typke, D., Pfeifer, F. (1998). Structural characteristics of halobacterial gas vesicles. Microbiology 144: 1331-1342

Ogawa, T., Wabiko, H., Tsurimoto, T., Horii, T., Masukata, H., Ogawa, H. (1979). Characteristics of purified recA protein and the regulation of its synthesis in vivo. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 (Part 2): 909-915

Oren, A. (1986). Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*. Can. J. Microbiol. 32: 4-9.

Oren, A. (1992). The genera *Haloanaerobium*, *Halobacteroides* and *Sporohalobacter*, p. 1893–1900. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.

Oren, A. (1993). Anaerobic heterotrophic bacteria growing at extremely high salt concentrations, p. 539–542. In Guerrero, R. & Pedro´s-Alio´, C. (ed.), Trends in microbial ecology. Spanish Society for Microbiology.

Oren, A., Heldal, M. & Norland, S. (1997). X-ray microanalysis of intracellularions in the anaerobic halophilic eubacterium *Haloanaerobium praevalens*. Can. J. Microbiol. 43: 588–592.

Oren, A. (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 334-348

Ouhammouch, M., Dewhurst, R.E., Hausner, W., Thomm, M., Geiduschek, E.P. (2003). Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(9): 5097-102

Ouhammouch, M. (2004). Transcriptional regulation in Archaea. Curr. Opin. Genet. 14(2):133-138

Ouhammouch, M., Langham, G.E., Hausner, W., Simpson, A.J., El-Sayed, N.M., Geiduschek, E.P. (2005). Promoter architecture and response to a positive regulator of archaeal transcription. Mol. Microbiol. 56(3): 625-637

Pabo, C.O. & Sauer, R.T (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. Annu. Rev. Biochem. 61: 1053-1095

Palmer, B. & Marinus, M. (1994). The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli* - a review. Gene 143: 1-12

Patenge, N., Haase, A., Bolhuis, H., Oesterhelt, D. (2000). The gene for halophilic β-galactosidase (*bgaH*) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promotor analyses in *Halobacterium salinarum*. Mol. Microbiol. 36: 105-113

Pattanayek R., Wang J., Mori T., Xu Y., Johnson C.H., Egli M. (2004). Visualizing a circadian clock protein: crystal structure of KaiC and functional insights. Mol. Cell. 15(3): 375-388

Pereira, S.L., Grayling, R.A., Lurz, R., Reeve, J.N. (1997). Archaeal nucleosomes. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 94: 12633-12637

Pfeifer, F. & Blaseio, U. (1989). Insertion element and deletion formation in a halophilic Archaebacterium. J. Bacteriol. 171: 5135-5140

Pfeifer, F. & Ghahraman, P. (1993). Plasmid pHH1 of *Halobacterium salinarium*: characterization of the replicon region, the gas vesicle gene cluster and insertion elements. Mol. Gen. Genet. 238: 193-200

Pfeifer, F., Griffig, J., Oesterhelt, D. (1993). The *fdx* gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*). Mol. Gen. Genet. 239: 66-71

Pfeifer, F., Offner, S., Krüger, K., Ghahraman, P., Englert, C. (1994). Transformation of halophilic archaea and investigation of gas-vesicle synthesis. Syst. Appl. Microbiol. 16: 569-577

Pfeifer, F., Krüger, K., Röder, R., Mayr, A., Ziesche, S., Offner, S. (1997). Gas vesicle formation in halophilic archaea. Arch. Microbiol. 167: 259-268

Pfeifer, F., Zotzel, J., Kurenbach, B., Röder, R., Zimmermann, P. (2001). A p-loop motif and two basic regions in the regulatory proten GvpD are important for the repression of gas vesicle formation in the archaeon *Haloferax mediterranei*. Microbiology 147: 63-73

Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M., Herberg, O. (1998). Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase

from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. Structure 6: 75-88

Pire, C., Esclapez, J., Ferrer, J., Bonete, M.J. (2001). Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. FEMS Letters 200: 221-227

Plößer, P. (2002). Der Transkriptionsaktivator cGvpE aus dem extrem halophilen Archaeon *Halobacterium salinarum* PHH4: ein basisches Leucinzipper-Protein. Dissertation, TU-Darmstadt

Plößer, P. & Pfeifer, F. (2002). A bZIP protein from halophilic archaea: structural features and dimer formation of cGvpE from *Halobacterium salinarum*. Mol. Microbiol. 45: 511-520

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature 258: 598-599

Pundak, S & Eisenberg, H. (1981). Structure and activity of malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacteria of the Dead Sea. 1. Eur. J. Biochem. 118: 463-470

Pusheva, M. A. & Detkova, E. N. (1996). Bioenergetic aspects of acetogenesis on various substrates by the extremely halophilic acetogenic bacterium *Acetohalobium arabaticum*. Microbiologiya 65:589–593. (In Russian; English translation, 65:516–520)

Qureshi, S.A., Bell, S.D., Jackson, S.P. (1997). Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. EMBO J. 16: 2927-2936

Qureshi, S.A. & Jackson, S.P. (1998). Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promotor strength. Mol. Cell. 1(3): 389-400

Radding, C.M. (1989). Helical RecA nucleoprotein filaments mediate homologous pairing and strand exchange. Biochim. Biophys. Acta. 1008(2): 131-145

Reddy, T.R. & Suryanarayana, T. (1989). Archaebacterial histone-like proteins. Purification and characterization of helix stabilizing DNA binding proteins from the acidothermophile *Sulfolobus acidocaldarius*. J. Biol. Chem. 264(29): 17298-17308.

Reiter, W.D., Hüdepohl, U., Zillig, W. (1990). Mutational analysis of an archaebacterial promotor: Essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9509-9513

Reuter, C.J. & Maupin-Furlow J.A. (2004). Analysis of proteasomedependent proteolysis in *Haloferax volcanii* cells using shortlived green fluorescent proteins. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7530-7538

Richard, S.B., Madern, D., Garcin, E., Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation: novel solvent-protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 A ˚ resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. Biochemistry 39: 992-1000.

Röder, R. & Pfeifer, F. (1996): Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of *Haloferax mediterranei* and identification of the endogenous transcriptional activator gene. Microbiology 142: 1715-1723

Röder, R. (1997). Untersuchungen zur genetischen Regulation der Gasvesikelbildung bei dem halophilen Archaeon *Haloferax mediterranei*. Dissertation, TU Darmstadt

Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1980). Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. J. Gen. Microbiol. 119: 535-538

Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. Microb. Ecol. 7: 235-243

Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D. (1983). *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. Sys. Appl. Microbiol. 4: 369-381

Rost, B. Yachdav, G., Liu, J. (2004). The PredictProtein Server. Nucleic Acids Research 32(Web Server issue): W321-W326

Rudolph, J. & Oesterhelt, D. (1995). Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the Archaeon *Halobacterium salinarum*. EMBO J. 14: 667-673

Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S.C., Oesterhelt, D. (1995). Phosphorylation in halobacterial signal transduction. EMBO J. 14(17): 4249-4257

Rudolph, M.J., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V., Schindelin, H. (2001). Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation. Nat. Struct. Biol. 8: 42-46.

Ruepp, A., Müller, H.N., Lottspeich, F., Soppa, J. (1995). Catabolic ornithine transcarbamylase of *Halobacterium halobium* (*salinarum*): purification, characterization, sequence determination, an evolution. J. Bacteriol. 177: 1129-1136

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-494

Sambrook & Russell (2001). Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL. Third Edition Cold Spring Harbor, New York

Sandman, K., Reeve, J.N. (2005). Archaeal chromatin proteins: different structures but common function? Curr. Opin. Microbiol. 8(6): 656-661.

Sanger, F., Nickeln, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467

Saraste, M., Sibbald, P.R., Wittinghofer, A. (1990). The p-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. Trends Biochem. Sci. 15: 430-434

Sartorius-Neef, S. (2000). Untersuchungen zur Translation von Gasvesikelgenen in halophilen Archaea. Diplomarbeit, TU Darmstadt

Sartorius-Neef, S. (2006). Untersuchungen zur Initiation der Translation in Archaea. Dissertation, TU Darmstadt

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368-379

Schägger, H. & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. Anal. Biochem. 199: 223-231

Schägger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular mass and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two dimensional native electrophoresis. Anal. Biochem. 217: 220-230

Schägger, H. (2000). Blue native gels to isolate protein complexes from mitochondria. In "Methods in Cell Biology". In press

Scheuch, S. (2003). Untersuchungen zur Interaktion der beiden regulatorischen Proteine GvpD und GvpE in halophilen Archaea. Diplomarbeit, TU Darmstadt

Seitz, E.M., Brockman, J.P., Sandler, S.J., Clark, A.J., Kowalczykowski, S.C. (1998). RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. Genes Dev. 12(9): 1248-53

Shear, H. & Walsby, A.E. (1975). An investigation into the possible light-shielding role of gas vacuoles in a planctonic blue-green algae. Br. Phycol. J. 10: 241-251

Shin D.S., Pellegrini, L., Daniels, D.S., Yelent, B., Craig, L., Bates, D., Yu, D.S., Shivji, M.K., Hitomi, C., Arvai, A.S., Volkmann, N., Tsuruta, H., Blundell, T.L., Venkitaraman, A.R., Tainer, J.A. (2003). Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. EMBO J. 22(17): 4566-4576

Shukla, H. D. & DasSarma, S. (2004). Complexity of gas vesicle biogenesis in *Halobacterium* sp. strain NRC-1: identification of five new proteins. J. Bacteriol. 186: 3182-3186.

Skovgaard, O., Oleson, K. & Wright, A. (1998). The central lysine n the p-loop motif of *Escherichia coli* DnaA protein is essential for initiating DNA replication from the chromosomal origin, *oriC*, and the F-factor origin, *oriS*, but is dispensable for initiation from the P1-plasmid origin, *oriR*. Plasmid 40: 91-99

Smith, C.A. & Rayment, I. (1996). Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other p-loop proteins. Biophys. J. 70(4): 1590-1602

Soppa, J. & Link, T.A. (1997). The TATA-box-binding protein (TBP) of *Halobacterium salinarum*. Cloning of the *tbp* gene, heterologous production of TBP and folding of TBP into a native conformation. Eur. J. Biochem. 249: 318-324

Soppa, J. (1999). Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promotor elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA-Box. Mol. Microbiol. 31: 1589-1592

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol 98: 503-517

Staley, J.T., Irgens, R.L., Herwig, R.P. (1989). Gas vacuolate bacteria from the sea ice of Antarctica. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1033-1036

Stoeckenius, W.& Kunau, W.H. (1968). Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. J. Cell Biol. 38: 337-357.

Story, R.M., Weber, I.T., Steitz, T.A. (1992). The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer. Nature. 355(6358): 318-325

Studier, F.W. & Moffat, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA Polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189(1): 113-130

Teufel, K. & Pfeifer, F. (2007). Multiple TBP and TFB proteins of *Halobacterium Salinarum* PHH1 and their possible interaction with GvpE. In Vorbereitung

Teufel, K. (2005). Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion des Transkriptionsaktivators GvpE mit den Transkriptionsfaktoren TBP und TFB in *Halobacterium salinarum* PHH1. Diplomarbeit, TU Darmstadt

Thomm, M. (1996). Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. FEMS Microbiol. Rev. 18 (2-3): 159-171

Thresher, R. J., Christiansen, G., Griffith, J. D. (1988). Assembly of presynaptic filaments. Factors affecting the assembly of RecA protein onto single-stranded DNA. J. Mol. Biol. 201:101-113.

Tombline, G., Heinen, C. D., Shim, K. S., Fishel, R. (2002). Biochemical characterization of the human RAD51 protein. III. Modulation of DNA binding by adenosine nucleotides. J. Biol. Chem. 277: 14434-14442

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354

van Ginkel, C.G., Rikken, G.B., Kroon, A.G., Kengen, S.W. (1996). Purification and characterization of chlorite dismutase: a novel oxygen-generating enzyme. Arch. Microbiol. 166: 321-326

VanLoock, M.S. Yu, X., Yang, S., Galkin, V.E., Huang, H., Rajan, S.S., Anderson, W.F., Stohl EA, Seifert, H.S., Egelman, E.H. (2003). Complexes of RecA with LexA and RecX differentiate between active and inactive RecA nucleoprotein filaments. J. Mol. Biol. 333(2): 345-54

Villeret, V., Clantin, B., Tricot, C., Legrain, C., Roovers, M., Stalon, V., Glansdorff, N., Van Beeumen, J. (1998). The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(6): 2801-2806

von Hippel, P. & Schleich, T. (1969). The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In: Timasheff, S.N. & Fasman, G.D. (eds) Structure of biological macromalecules. Dekker, I New York, pp. 417-575

Walsby, A.E. (1969). The permeability of blue-green algal gas vacuole membranes to gas. Proc. R. Soc. London Ser. B 173: 235-255

Walsby, A. E. (1981a). Cyanobacteria: planktonic gas-vacuolate forms, p. 224-235. In M. P. Starr, H. G. Stolp, H. Triiper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. Springer-Verlag, New York

Walsby, A. E. (1981b). Gas-vacuolate bacteria (apart from cyanobacteria), p. 441-447. In M. P. Starr, H. G. Stolp, H. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. Springer-Verlag, New York

Walsby, A.E. & Hayes, P. (1988). The minor cyanobacterial gas vesicle protein, GvpC, is attached to the outer surface of the gas vesicles. J. Gen. Microbiol. 130: 2709-2715

Walsby, A.E. & Hayes, P. (1989). Gas vesicle proteins. Biochem. J. 264: 313-322

Walsby, A.E. (1994). Gas vesicles. Microbiol. Rev. 58: 94-144

Wang, C., Xi, J., Begley, T.P., Nicholson, L.K. (2001). Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin. Nat. Struct. Biol. 8: 47-51

Wilson, D. H., and Benight, A. S. (1990). Kinetic analysis of the pre-equilibrium steps in the self-assembly of RecA protein from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265: 7351-7359

Woese, C.R. &George, E.F. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5088-5090

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271

Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria ans Eukarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4576-4579

Wu, Y., He, Y., Moya, I.A., Qian, X., Luo, Y. (2004). Crystal structure of archaeal recombinase RadA: a snapshot of its extended conformation. Mol. Cell 15: 423-435

Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., Tanaka, N. (2002). The 2.0 A ˚ crystal structure of catalase peroxidase from *Haloarcula marismortui*. Nat. Struct. Biol. 9: 691–695.

Yang,S. Yu, X. Seitz, E.M., Kowalczykowski, S.C., Egelman, E.H. (2001). Archaeal RadA protein binds DNA as both helical filaments and octameric rings. J. Mol. Biol. 314(5):1077-85

Zacchai, G., Cendrin, Y., Haik, N., Borokov, N., Eisenberg, H. (1989). Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. J. Mol. Biol. 208: 491-500

Zillig, W., Stetter, K.O., Janekovic, D. (1979). DNA-dependent RNA polymerase from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Eur. J. Biochem. 96: 597-604

Zimmermann, P. & Pfeifer, F. (2003). Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE. Mol. Mircobiol. 49(3): 783-794

Zotzel, J. (1998). Untersuchungen zur Regulation der Gasvesikelsynthese bei dem halophilen Archaeon *Haloferax mediterranei*: Gerichtete und zufällige Mutagenese des mutmaßlichen Transkriptionsrepressors mcGvpD. Diplomarbeit, TU Darmstadt

7. Anhang

7.1 Sekundärstrukturvorhersage für mcGvpD

Die Sekundärstrukturvorhersage für mcGvpD wurde mit PredictProtein (Rost *et al.*, 2004; http://www.predictprotein.org) erstellt.

AA: Aminosäuresequenz

PHD_sec: PHD vorhergesagte Sekundärstruktur: H = Helix, E = Faltblatt, Leerstelle = andere (Loop)
PHD = Profile network prediction Heidelberg

Rel_sec: Zuverlässigkeitsindex für die PHD_sec-Vorhersage (0 = niedrig; 9 = hoch)

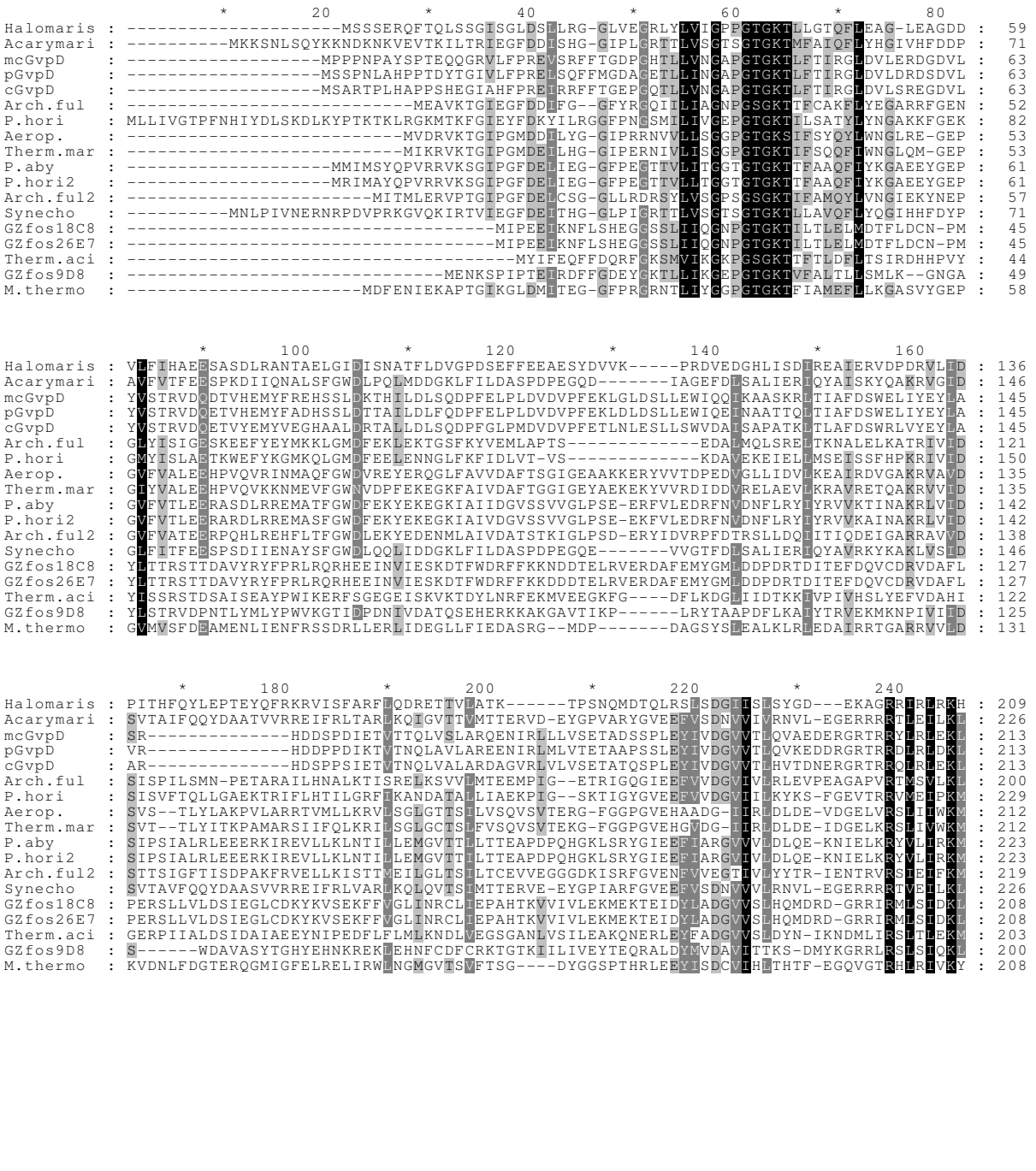
```
          ....,....1...,....2...,....3...,....4...,....5...,....6...,....7...,....8...,....9...,....1
AA        MPPPNPAYSPTEQQGRVLFPREVSRFFTGDPGHTLLVNGAPGTGKTLFTIRGLDVLERDGDVLYVSTRVDQDTVHEMYFREHSSLDKTHILDLSQDPFEL
PHD_sec                    HHHHHHH     EEEEEE     HHHHHHHHHHHHHHH   EEEEE    HHHHHHHHHHH
Rel_sec   999988888765565445540236540678882999965988714799999999974188579984578668999999984267653111214567434 4

          ....,....11...,....12...,....13...,....14...,....15...,....16...,....17...,....18...,....19...,....20
AA        PLDVDVPFEKLGLDSLLEWIQQIKAASKRLTIAFDSWELIYEYLASRHDDSPDIETVTTQLVSLARQENIRLLLVSETADSSPLEYIVDGVVTLQVAEDE
PHD_sec              HHHHHHHHHHHHH    EEEEEE HHHH          HHHHHHHHHHHHHHHHH   EEEEEEE      EEEE  EEEEEEE
Rel_sec   333212244454479999999999428973899833133223443467843249999999999997469649989724676322532116899973353 2

          ....,....21...,....22...,....23...,....24...,....25...,....26...,....27...,....28...,....29...,....30
AA        RGRTRRYLRLEKLRGVRIGNRLQPITLADGQFQAITPVELPTVRTGANNGTWEPRTNTKAKFSTGIGDLDPILSGGYNRGSVIHLDLGTDLSRDAWSVLT
PHD_sec      EEEEEEEEE         EEEEE    EEEE                                  HHHHHH       EEEEEEE      HHHHHHH
Rel_sec   788249999996138988851136898148726555875524555667788753212321224776302223214553233799982577762479999 9

          ....,....31...,....32...,....33...,....34...,....35...,....36...,....37...,....38...,....39...,....40
AA        LPTIRNFLANEMGVAVVPPREGSPGLLHNDLNSVLTPRVFDTYCHVFETYAGPSRNRGTYEEDGQVETPLDTSQTATPSDAESPVGTETELSEKVETELS
PHD_sec   HHHHHHHHHH    EEEEE      EEEE    EE           EE    EEE       EEEEE     EE                    EEEE
Rel_sec   999999987448724775124675235631121112557766553320136411221343342223432233112267657898877747745211111 6

          ....,....41...,....42...,....43...,....44...,....45...,....46...,....47...,....48...,....49...,....50
AA        EENPPAPGEVVDTERSTTIGKELESPVEGGQLDYEPYMEYVEEVRKQSDGPLLHVISMDTARTAFETRLGDFANYVALHNDLAILITKPGTELRRRADRV
PHD_sec                                HHHHHHHHHHHHH    EEEEE   HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH  EEEEEE   HHHHHHHHHH
Rel_sec   767898997447778887785568879788446448789999999716999689853636899999996688999976223179983687667887537 8

          ....,....51...,....52...,....53...,....54...,....55
AA        ADMHFRLERSGEAIMLYGENPLTPLLGIGIDRSQPIPEIILTEMV
PHD_sec   HHHHHHH     EEEEE       EEE  E       EEEEEEE
Rel_sec   877642222862699861799843321212267999236876649 9
```

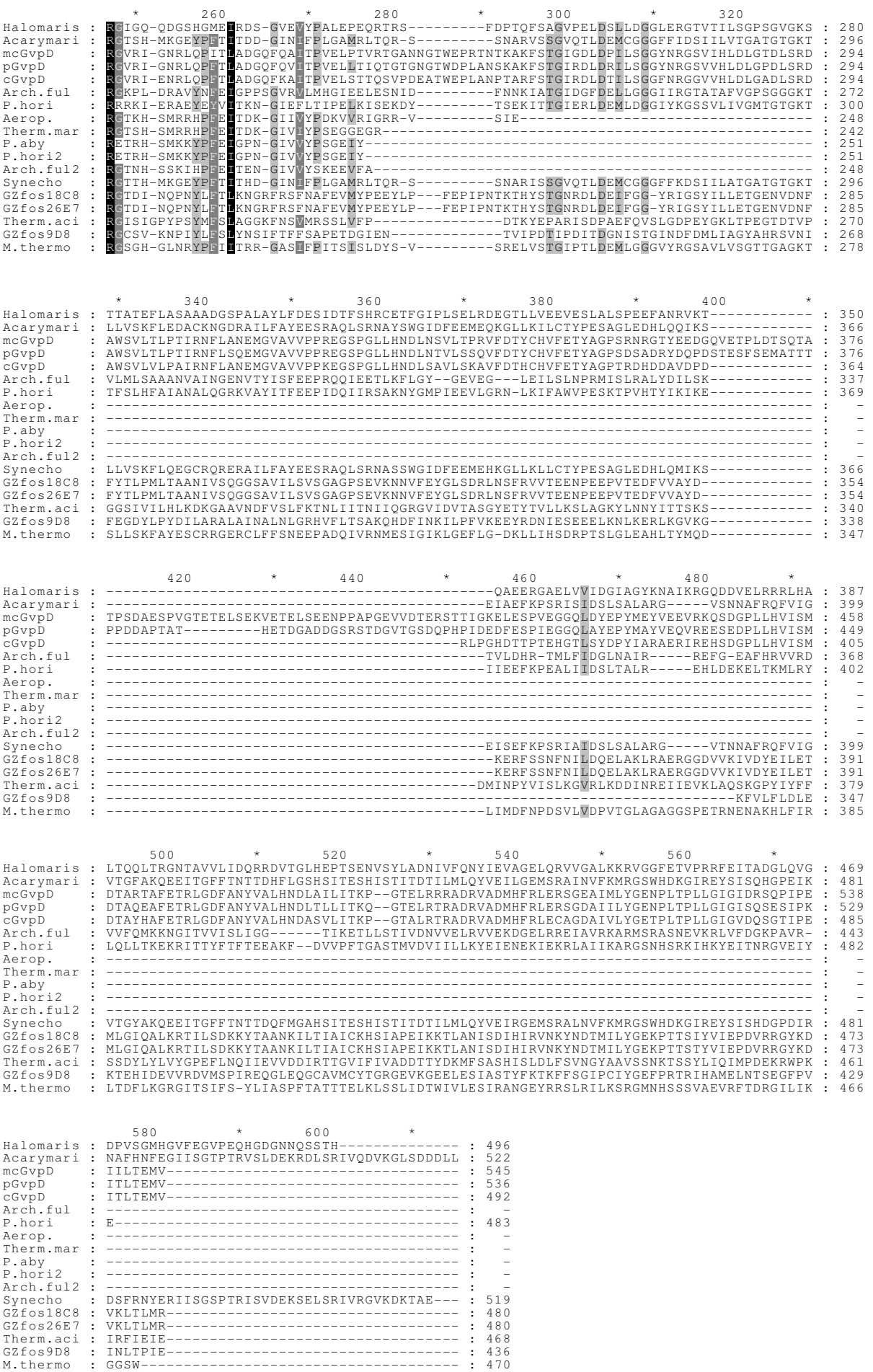
7.2 Multiple Alignierung von GvpD-, RadA- und KaiC-Aminosäuresequenzen

Die Alignierung der Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Programm ClustalW (http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html).

Folgende Alignierungsparameter wurden verwendet: Scoring matrix: Blosum62; Opening gap penalty: 10; End gap penalty: 10; Extending gap penalty: 0.05; Separation gap penalty: 0.05.

Die Alignierung wurde mit dem Programm GeneDoc (Nicholas, Karl B. & Nicholas Hugh B Jr., 1997) schattiert.

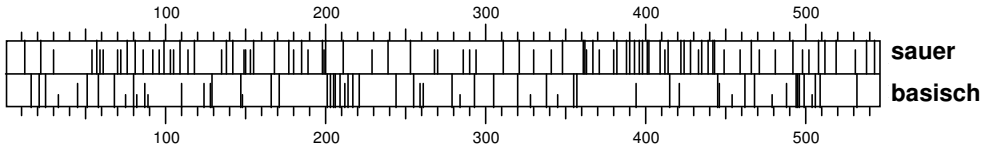



Halomaris
Acarymari
mcGvpD
pGvpD
cGvpD
Arch.ful
P.hori
Aerop.
Therm.mar
P.aby
P.hori2
Arch.ful2
Synecho
GZfos18C8
GZfos26E7
Therm.aci
GZfos9D8
M.thermo

Bezeichnung	Protein / Ähnlichkeit zu	Organismus	Accession number
Halomaris	RecA/helicase-like	*Haloarcula marismortui*	Q5V5J9
Acarymari	KaiC	*Acaryochloris marina*	Q6L8L1
mcGvpD	mcGvpD	*Haloferax mediterranei*	CAA45946
pGvpD	pGvpD	*Halobacterium salinarum*	CAA39171
cGvpD	cGvpD	*Halobacterium salinarum*	CAA63343
Arch.ful	RecA-like ATPase	*Archaeoglobus fulgidus*	O29797
P.hori	RecA-like ATPase	*Pyrococcus horikoshii*	O58563
Aerop.	RecA-like ATPase	*Aeropyrum pernix*	Q9YBU4
Therm.mar	RecA-like ATPase	*Thermotoga maritima*	Q9WYK4
P.aby	RecA-like ATPase	*Pyrococcus abyssi*	Q9V2A5
P.hori2	RecA-like ATPase	*Pyrococcus horikoshii*	O57925
Arch.ful2	RecA-like ATPase	*Archaeoglobus fulgidus*	O28829
Synecho	KaiC	*Synechocystis sp.*	P74646
GZfos18C8	RecA-like ATPase	unkultiviertes Archaeon GZfos18C8	Q64DG8
GZfos26E7	RecA-like ATPase	unkultiviertes Archaeon GZfos26E7	Q64BX8
Therm.aci	GvpD-ähnlich	*Thermoplasma acidophilum*	Q9HJL4
GZfos9D8	KaiC	unkultiviertes Archaeon GZfos9D8	Q647R5
M.thermo	RecA-like ATPase	*Methanobacterium thermoautotrophicum*	O27166

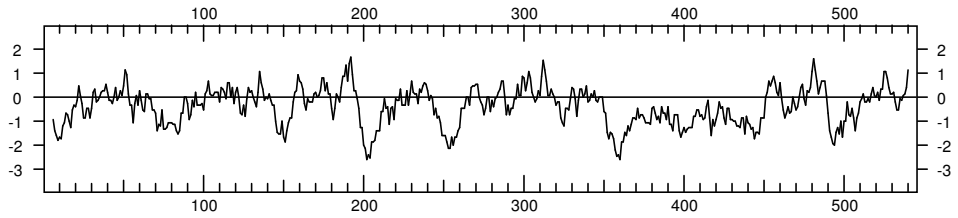
7.3 Verteilung saurer und basischer Aminosäuren im mcGvpD-Protein

(Graphik erstellt mit dem Programm DNA Strider)



7.4 Hydrophobizitätsplot von mcGvpD nach Kyte & Doolittle (1982)

(Graphik erstellt mit dem Programm DNA Strider)



7.5 Abkürzungen

A	Adenin in Nukleinsäuresequenzen, Alanin in Aminosäuresequenzen
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
bp	Basenpaare
bgaH	Gen für halobakterielle β-Galaktosidase
BRE	*transcription factor B recognition element*
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin in Nukleinsäuresequenzen, Cystein in Aminosäuresequenzen
C-Terminus	Ende eines Proteins oder Polypeptids mit einer freien Carboxylgruppe
°C	Grad Celsius
D	Asparaginsäure in Aminosäuresequenzen
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Glutaminsäure in Aminosäuresequenzen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ex	Expression unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35
fdx	Ferredoxin-Gen
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Gramm
G	Guanin in Nukleinsäuresequenzen, Glycin in Aminosäuresequenzen
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
gvp	*gas vesicle protein*-Gen
Gvp	*gas vesicle protein*
h	Stunde
Hbt.	*Halobacterium*
Hfx.	*Haloferax*
I	Isoleucin in Aminosäuresequenzen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
K	Lysin in Aminosäuresequenzen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Leucin in Aminosäuresequenzen
M	Molar, Methionin in Aminosäuresequenzen
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization - Time of flight
mM	Millimolar
min	Minuten
mRNA	Boten-RNA
µm	Mikrometer
Mut	gentechnisch verändertes Gen oder Protein
N	Asparagin in Aminosäuresequenzen
N-Terminus	Ende eines Proteins oder Polypeptids mit freier Aminogruppe
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid

P	Prolin in Aminosäuresequenzen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R	Arginin in Aminosäuresequenzen
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
T	Thymin in Nukleinsäuresequenzen, Threonin in Aminosäuresequenzen
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TEMED	N´N´N´N´-Tetramethylethylendiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit „Unit“
UAS	*upstream activator sequence*
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt, Valin in Aminosäuresequenzen
Vac	Gasvesikelphänotyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Y	Thyrosin in Aminosäuresequenzen
z. B.	zum Beispiel
ZT	Zimmertemperatur

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Sandra Scheuch
Geburtstag:	23.07.1978
Geburtsort:	Groß-Gerau

Schulausbildung

1984 - 1988	Grundschule Crumstadt
1988 - 1990	Johannes-Gutenberg-Schule Gernsheim
1990 - 1997	Gymnasium Gernsheim
1997	Abitur

Akademische Ausbildung

1998-2003	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
2003	Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt Titel: „Untersuchungen zur Interaktion der beiden regulatorischen Proteine GvpD und GvpE in halophilen Archaea“
2003	Abschluss des Studiums der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt als Diplom-Biologin
2004-2007	Promotionsarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt Titel: „Das Repressorprotein GvpD aus *Haloferax mediterranei*: Interaktion mit GvpE und Analyse der Quartärstruktur“

7.6 Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Februar 2004 bis August 2007 angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keinen Versuch unternommen habe, an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Darmstadt, den 07.08.2007

_____

(Sandra Scheuch)