

Der Einfluss von Anaerobie und von Glucose auf die Gasvesikelbildung in halophilen Archaea

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von
Dipl. Biol. Torsten Hechler
aus Bensheim

- 1. Berichterstatterin:** Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Mikrobiologie, TU Darmstadt
- 2. Berichterstatter:** PD. Dr. Arnulf Kletzin
Mikrobiologie, TU Darmstadt

Tag der Einreichung: 02. August 2007
Tag der mündlichen Prüfung: 19. Oktober 2007

Darmstadt 2007

D17

Danksagung

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer danke ich ganz besonders für die Bereitstellung eines sehr interessanten Themas, für die vielen fruchtbaren Diskussionen und Denkanstöße, für den Freiraum bei der Durchführung der Arbeit und vor allem für die gute Betreuung.

Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin danke ich für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge, die geduldige Hilfe bei der Lösung aller möglichen Probleme, sowie für das Beschaffen von diversen Materialien und Chemikalien.

Meinen Kolleginnen Dr. Simone Sartorius-Neef, Sandra Scheuch, Katharina Teufel und Sabrina Fröls sowie meinen Kollegen Dr. Peter Zimmermann, Dr. Tim Urich, und Fabian Müller danke ich sehr für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Bereitschaft zu fachlichen und persönlichen Gesprächen. Mein besonderer Dank gilt dabei Simone und Sabrina für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Johann Heider, Dr. Detlef Kramer und Dr. Michael Brecht bedanke ich mich für die fachlichen Ratschläge und die engagierten und stets konstruktiven Diskussionen.

Ein weiteres Dankeschön gilt Gaby Liebing, Renate Fröhlich, Karin Faist, Cordula Bernhard Nam-Suk Polin sowie Karin Papalau für das angenehme und kollegiale Arbeitsklima und für die gegenseitige Unterstützung.

Ole Rigbers, Vanessa Schmitz und Miriam Frech danke ich für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Forschungspraktika, besonders Miriam für die Fortführung eines Teils dieser Arbeit.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir immer wieder Mut gemacht hat, sowie meiner Freundin und Lebenspartnerin Friederike Kirchner und ihrer Familie, die mich unterstützt haben, wann und wo immer sie konnten.

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Halophile Archaea.....	3
2.1.1 Leben in hypersalinen Habitaten.....	4
2.1.2 Anpassungen in der Zelle.....	5
2.2 Halobakterien.....	6
2.2.1 Energiegewinnung in halophilen Archaea.....	7
2.3 Gasvesikel.....	8
2.3.1 Aufbau der Gasvesikel.....	10
2.3.2 Die Gene der Gasvesikelsynthese und ihre Expression.....	11
2.4 Transkriptionsregulation in Archaea.....	15
2.4.1 Die vac-Region als Modellsystem.....	17
2.4.2 Regulation der Gasvesikelbildung	17
2.5 Zielsetzung.....	18
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Materialien.....	20
3.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Materialien.....	20
3.1.2 Enzyme und Kits.....	22
3.1.3 Größenstandards.....	22
3.1.4 Mikroorganismen.....	22
3.1.5 Puffer und Lösungen.....	23
3.1.6 Plasmidvektoren.....	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Anzucht von <i>Haloferax volcanii</i> und <i>Haloferax mediterranei</i>	26
3.2.2 Anzucht von <i>Halobacterium salinarum</i>	27
3.2.3 Anzucht von <i>Halorubrum vacuolatum</i>	27
3.2.4 Sauerstoffkonzentrationsmessung.....	28

3.2.5 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	28
3.2.6 Transformation von <i>Haloferax volcanii</i>	28
3.2.7 Konstrukte für die Transformation von <i>Haloferax volcanii</i>	29
3.2.8 Bestimmung der BgaH-Aktivität mittels ONPG-Assay.....	30
3.2.9 Plasmidisolierung aus Halobakterien.....	31
3.2.10 Transformation von <i>E. coli</i>	31
3.3 Molekularbiologische Standardtechniken.....	32
3.3.1 Hydrolytische Spaltung und Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA....	32
3.3.2 DNA-Sequenzierung.....	32
3.3.3 Isolierung halobakterieller RNA	33
3.3.4 Northern-Analysen.....	34
3.3.5 Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analyse.....	36
3.3.6 Proteinbestimmung nach Bradford.....	37
3.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.3.8 Transmission-Elektronen-Mikroskopie (TEM)	38
3.3.9 Isolierung von Proteinen aus Halobakterien für Western-Analysen.....	38
3.3.10 Nachweis halobakterieller Proteine mittels Western-Analyse.....	38
4 Ergebnisse.....	40
4.1 Der Einfluss von anaeroben Bedingungen auf die Gasvesikelbildung in <i>Hfx.</i> <i>mediterranei</i> und <i>Hfx. volcanii</i> Transformanten.....	40
4.1.1 Anpassung von Medien für <i>Hfx. mediterranei</i> und die <i>Hfx. volcanii</i> mc-vac Transformante.....	40
4.1.2 Wachstum von <i>Hfx. mediterranei</i> und mc-vac-Transformanten unter aeroben und anaeroben Bedingungen.....	43
4.1.3 Der Einfluss von anaeroben Bedingungen auf die Transkription der mc-vac- Region.....	49
4.1.4 Der Einfluss von anaeroben Bedingungen auf die Proteine der mc-vac-Region.....	53
4.1.5 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie von <i>Hfx. mediterranei</i> und mc-vac- Transformanten.....	55
4.1.6 Der Einfluss von anaeroben Bedingungen auf die Gasvesikelbildung in der ΔD -	

Transformante.....	58
4.2 Der Einfluss von anaeroben Bedingungen auf die Gasvesikelbildung von <i>Halobacterium salinarum</i>.....	64
4.2.1 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie von <i>Hbt. salinarum</i>	66
4.2.2 Northern-Analysen der Transkripte der <i>gvpACNO</i> -Gengruppen.....	68
4.3 Der Einfluss von Glucose auf die Gasvesikelbildung in halophilen Archaea.....	70
4.3.1 Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Glucose.....	71
4.3.2 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie der mc-vac-Transformante.....	74
4.3.3 Der Einfluss von Glucose auf die Transkription der mc-vac-Region.....	75
4.3.4 Der Einfluss von weiteren Zuckern auf die Gasvesikelbildung in mc-vac- Transformanten.....	81
4.3.5 Der Einfluss von Glucose auf die Gasvesikelbildung in der ΔD -Transformante.....	86
5 Diskussion.....	92
5.1 Die Gasvesikelbildung in halophilen Archaea wird unter anaeroben Bedingungen inhibiert.....	93
5.1.1 <i>Halobacterium salinarum</i> PHH1 und PHH4.....	93
5.1.2 <i>Hfx. mediterranei</i> und <i>Hfx. volcanii</i> -Transformanten.....	96
5.1.3 Die ΔD -Transformante.....	98
5.1.4 Zusammenfassende Betrachtung der Gasvesikelbildung unter anaeroben Bedingungen.....	99
5.2 Glucose inhibiert die Gasvesikelbildung in <i>Hfx. mediterranei</i> und in der mc- vac-Transformante.....	100
5.2.1 <i>Hfx. mediterranei</i> und die mc-vac-Transformante.....	101
5.2.2 Zusammenfassende Betrachtung der Gasvesikelbildung unter dem Einfluss von Glucose.....	103
5.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick.....	104

6 Literatur.....	106
7 Abkürzungen.....	118
8 Anhang.....	120

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Gasvesikelbildung in halophilen Archaea zu untersuchen. Die Synthese der Gasvesikel erfordert die Expression der sogenannten *gvp*-Gene, die in der *vac*-Region lokalisiert sind. In dem extrem halophilen Gasvesikelproduzenten *Halobacterium (Hbt.) salinarum* findet man zwei dieser Regionen (*p-vac*- und *c-vac*-Region), in dem moderat halophilen Gasvesikelproduzenten *Haloferax (Hfx.) mediterranei* dagegen nur die *mc-vac*-Region. Die *gvp*-Gene sind dabei jeweils in zwei entgegengesetzt orientierten Gengruppen angeordnet und stehen unter der Kontrolle der beiden Hauptpromotoren P_A und P_D . An der Regulation der Expression der Gasvesikelgene sind der Transkriptionsaktivator GvpE und das repressorisch wirkende GvpD beteiligt. Es war bereits bekannt, dass *Hfx. mediterranei* Gasvesikel in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und von der Wachstumsphase bildet. *Hbt. salinarum* dagegen enthält unabhängig von der Salzkonzentration in jeder Wachstumsphase Gasvesikel. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Sauerstoff und von Glucose auf die Bildung von Gasvesikeln in *Hfx. mediterranei* und *Hbt. salinarum* untersucht. Dabei wurden zusätzlich Transformationsstudien mit dem gasvesikelfreien Stamm *Hfx. volcanii* durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl *Hfx. mediterranei* wie auch *Hbt. salinarum* unter anaeroben Bedingungen deutlich weniger Gasvesikel bilden als unter aeroben Bedingungen. Sowohl die Transkripte unter der Kontrolle des P_A -Promotors wie auch des P_D -Promotors waren in anaerob gewachsenen Zellen um den Faktor 10 im Vergleich zu aerob gewachsenen Zellen reduziert. Untersuchungen an *Hfx. mediterranei* ergaben, dass die Proteine GvpA, GvpD und GvpF unter anaeroben Bedingungen in deutlich geringeren Mengen vorhanden sind, als unter aeroben Bedingungen. In der ΔD -Transformante von *Hfx. volcanii* (enthält eine 918 bp großen Deletion im Gen *mc-gvpD* und damit kein funktionales GvpD Protein) war die Menge der Transkripte für die Strukturproteine der Gasvesikel sowie die GvpA-Menge unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen ebenfalls deutlich reduziert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Gasvesikelbildung unter anaeroben Bedingungen unabhängig von dem repressorischen Protein GvpD stattfindet, und auch die Assemblierung der Gasvesikel betrifft.

Neben dem Einfluss von Anaerobie wurde auch der Einfluss von Glucose und von einigen weiteren Zuckern (Hexosen, Pentosen und Disacchariden) auf die Gasvesikelbildung untersucht. Dies ergab sich aus der zufälligen Beobachtung, dass die Gasvesikelbildung in *Hfx. mediterranei* und mc-vac-Transformanten in Medien für anaerobes Wachstum inhibiert wurde, die neben Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor auch Glucose enthielten. In mc-vac-Transformanten wurde in Glucosemedien die Menge der Transkripte für die Strukturproteine der Gasvesikel und die GvpA-Menge im Vergleich zu zuckerfreien Medien reduziert. Mit dem BgaH-Reporter, das für ein halophiles Protein mit einer β -Galaktosidase-Aktivität kodiert, wurde der Einfluss von Glucose auf die Aktivität der Promotoren P_{mcA} und P_{mcD} quantifiziert. Die BgaH-Aktivitäten in den Transformanten in Glucosemedien waren im Vergleich zu zuckerfreiem Wachstumsmedium um den Faktor 10 reduziert. Die Anwesenheit des Transkriptionsaktivators GvpE führte in P_{mcA} -*bgaH*-Transformanten zu einer Abschwächung des inhibitorischen Effektes der Glucose. Mit der ΔD -Transformante konnte gezeigt werden, dass auch die glucose-induzierte Reduktion der Gasvesikelbildung unabhängig von GvpD stattfindet, und die Assemblierung der Gasvesikel betrifft.

Anaerobie führte in *Hbt. salinarum*, *Hfx. mediterranei* und *Hfx. volcanii*-Transformanten zu einer Reduktion, bzw. völligen Unterdrückung der Gasvesikelbildung. Glucose inhibierte die Gasvesikelbildung nur in *Hfx. mediterranei* und *Hfx. volcanii*-Transformanten. In beiden Fällen findet die Regulation wahrscheinlich nicht nur auf genetischer Ebene statt, zusätzlich ist möglicherweise auch ein Schritt in der Assemblierung der Gasvesikel betroffen.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Hechler, T., M. Frech and F. Pfeifer (2007) "Glucose inhibits the formation of gas vesicles in *Haloferax volcanii* transformants." *Environmental Microbiology*, in Druck

Pfeifer, F., T. Hechler, S. Scheuch and S. Sartorius-Neef (2007)

Transcriptional Regulation in Haloarchaea

In: "Archaea - Evolution, Physiology, and Molecular Biology" Edited by Hans-Peter Klenk and Roger A. Garrett, Blackwell Publishing Ltd.

2 Einleitung

2.1 Halophile Archaea

Halophile (salzliebende) Organismen findet man unter den Archaea, den Bakteria und den Eukarya, also in allen drei Domänen des Lebens. Sie bevölkern hypersaline Umgebungen, in denen Salzkonzentrationen bis zur Sättigung vorkommen, wie z.B. Salzseen, das Tote Meer oder auch die Verdunstungsbecken von Anlagen zur Gewinnung von Meersalz. Halophile Archaea brauchen, im Gegensatz zu den meist halotoleranten Arten der Eukarya und Bakteria, hohe Salzkonzentrationen zwingend zum Überleben, und stellen in Habitaten mit Salzkonzentrationen von über 2,5 M NaCl die dominierende Population dar (Grant & Larson, 1989). Hypersaline Habitate entstehen in der Regel durch die Verdunstung von Meerwasser und sind in heißen und sehr trockenen Regionen der Erde zu finden. Die Zusammensetzung der Salze entspricht meist der des Meerwassers, wobei die Konzentration der einzelnen Ionen variieren kann, da sie auch vom Gestein der Umgebung beeinflusst wird. Die dominierenden Kationen sind Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} , die dominierenden Anionen Cl^- , SO_4^{2-} und CO_3^{2-} (Rodriguez-Valera, 1993, Sehgal & Gibbons, 1960).

Die Domäne der Archaea wird aufgrund von 16S rRNA-Analysen in die Crenarchaeota (Hyperthermophile und Schwefelabhängige), die Euryarchaeota (Halophile, Methanogene und einige Thermophile), die Korarchaeota und die Nanoarchaeota unterteilt (Abb. 1) (Woese *et al.*, 1977 Barns *et al.*, 1996, Reysenbach *et al.*, 2000, Huber *et al.*, 2002). Die Euryarchaeota enthalten einige halophile Methanogene sowie eine ganze Familie, deren Vertreter allesamt halophil sind, und die Salzkonzentrationen von mindestens 1,5 M zum Überleben brauchen (Halobacteriaceae). Die Familie der Halobacteriaceae umfasst 18 verschiedene Gattungen, zu denen die Halobakterien *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halobaculum* und *Halococcus*, welche bei neutralem pH wachsen, sowie die Natronobakterien *Natronobacterium*, *Halorubrum*, *Natronomonas*, *Natrialba* und *Natronococcus*, die alkalische Bedingungen bevorzugen, gehören (Kamekura *et al.*, 1997). Die optimale Salzkonzentration für die meisten dieser Organismen liegt zwischen 3,5 M und 4,5 M NaCl, wobei sie aber auch in der Lage sind, in einer gesättigten Lösung mit 5,2 M NaCl zu wachsen (Grant & Larsen, 1989). Es ist sogar möglich solche halophilen Organismen aus Salzkristallen lebend zu isolieren und zu kultivieren (Grant *et al.*, 1998).

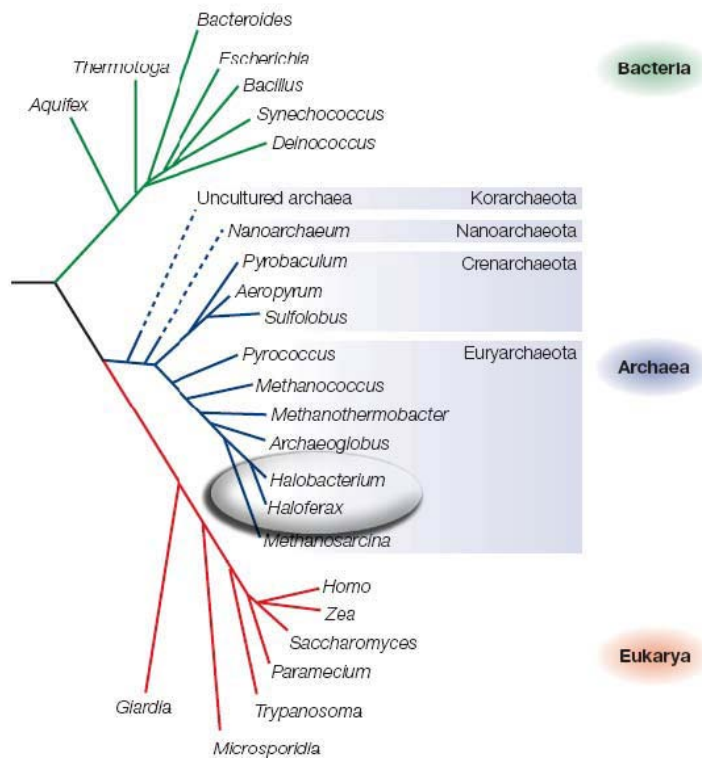


Abb. 1. Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S und 18S rRNA-Sequenzvergleichen nach C. Woese (Allers *et al.*, 2005). Die Abzweigungen der Nanoarchaeota und der Korarchaeota sind nur als gestrichelte Linie dargestellt, da ihre Abzweigungen im Stammbaum noch nicht final geklärt sind (Huber *et al.*, 2002, Allers & Mevarech, 2005). Die in dieser Arbeit untersuchten Halobakterien sind hervorgehoben.

2.1.1 Leben in hypersalinen Habitaten

Das grundsätzliche Problem für alle halotoleranten und halophilen Organismen ist, dass hypersaline Habitate physiologisch trockene Umgebungen sind. Durch die hohe Konzentration von NaCl entsteht ein sehr hoher osmotischer Druck, der den Zellen normalerweise Wasser entziehen würde, da biologische Membranen permeabel für Wasser sind. Ein einfaches Anheben der intrazellulären NaCl-Konzentration ist für die Organismen nicht möglich, da dies zur Dehydratisierung von Proteinen, und somit zu deren Zerstörung durch Aggregation aufgrund von hydrophoben Interaktionen führen würde. Des Weiteren stört NaCl elektrostatische Wechselwirkungen zwischen und innerhalb von Makromolekülen, und reduziert die Verfügbarkeit von Wasser für biologische Reaktionen. Das Leben in hypersalinen Umgebungen erfordert daher besondere Anpassungsstrategien, um dem osmotischen Stress entgegenzuwirken und ein Austrocknen der Zelle zu verhindern. In der Evolution entwickelten sich zwei grundsätzlich verschiedenen Strategien, um das Cytoplasma isoosmotisch zur Umgebung zu halten.

Bei der *compatible solutes* (auch: *kompatible Osmolyte*) Strategie werden kleine, osmotisch wirksame, organische Moleküle wie Polyole (Glycerin, Arabitol), Aminosäuren und deren Derivate (Glycinbetain, Ektoin) oder Zucker und ihre Derivate (Saccharose, Trehalose) im

Zellinneren angereichert (Madigan & Oren, 1999, Oren, 1999). Eine Anpassung der zellulären Bestandteile ist dabei nicht nötig, allerdings wird durch die Synthese der Substanzen sehr viel ATP verbraucht. Dadurch ist diese Strategie für nicht-autotrophe Organismen auf Dauer nicht praktikabel, und wird dementsprechend auch hauptsächlich von halotoleranten Arten praktiziert (Dennis & Shimmin, 1997, Oren, 1999).

Halophile Archaea der Familie Halobacteriaceae haben die weitaus effektivere *salt-in* (auch: *Einsalz-*) Strategie entwickelt. Dabei werden durch ein Angleichen der Ionenkonzentration im Cytoplasma an das umgebende Medium isoosmotische Bedingungen geschaffen (Madigan & Oren, 1999, Oren, 1999), wobei im Zellinneren nicht nur NaCl, sondern vorwiegend KCl angereichert wird (Dennis & Shimmin, 1997). Der Vorteil einer Anreicherung von Kalium ist, dass Kaliumionen aufgrund ihrer Größe eine geringere Ladungsdichte besitzen als die viel kleineren Natriumionen. Dadurch bildet Kalium eine kleinere Hydrathülle und bindet weniger Wassermoleküle als die gleiche Menge Natrium, und es stehen mehr Wassermoleküle für die Hydrathülle von Proteinen und für intrazelluläre Prozesse zur Verfügung.

Die Akkumulation von Kaliumionen in der Zelle wird durch einen elektrochemischen Protonengradienten über der Cytoplasmamembran ermöglicht, der die Energie für die Aufnahme von K^+ - und Cl^- -Ionen und die gleichzeitige Ausschleusung von Na^+ -Ionen liefert (Wagner *et al.*, 1978, Meury & Kohiyama, 1989, Rao & Argos, 1981). Der Aufbau dieses Gradienten erfolgt bei Halobakterien durch Prozesse der Atmungskette oder durch die Hydrolyse von ATP durch eine membrangebundene A-Typ-ATPase (Ihara & Mukohata, 1991, Mukohata *et al.*, 1992). *Hbt. salinarum* besitzt darüber hinaus das Retinalprotein Bakteriorhodopsin, welches als lichtgetriebene Protonenpumpe fungiert, und Protonen aus der Zelle pumpt, um damit einen elektrochemischen H^+ -Gradienten aufzubauen, der zur Energiegewinnung genutzt werden kann (Schobert & Lanyi 1982).

2.1.2 Anpassungen in der Zelle

Die erhöhte Salzkonzentration im Zellinneren macht eine Anpassung der Proteine erforderlich, um die metabolischen Prozesse der Zelle zu gewährleisten. Halophile Proteine weisen daher einige charakteristische Eigenschaften auf, die sie von anderen Proteinen unterscheiden. Eine Aggregation der Proteine aufgrund der Salzkonzentration (Aussalzeffekt) wird durch einen sehr geringen Anteil an hydrophoben Aminosäuren, einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren, und durch hydrophile Aminosäuren an der Proteinoberfläche verhindert (Lanyi, 1974, Eisenberg, 1992, Frolow *et al.*, 1996, Lanyi, 1974, Dennis & Shimmin, 1997, Oren, 1999). Im Inneren der

Proteine finden sich außerdem geladene Aminosäureseitenketten, die Salzbrücken ausbilden und die Proteinstruktur weiter verstärken (Dym *et al.*, 1995, Dennis & Shimmin, 1997, Rodriguez-Valera, 1993, Sehgal & Gibbons, 1960). Aufgrund dieser Veränderungen sind die meisten halophilen Proteine auf sehr hohe Salzkonzentrationen zur Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion angewiesen, und denaturieren sehr schnell in Umgebungen mit niedrigen Salzkonzentrationen.

2.2 Halobakterien

Halobakterien erreichen in hypersalinen Lebensräumen oft sehr hohe Populationsdichten von bis zu 10^8 Zellen pro ml, wobei die Zusammensetzung der Populationen aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsoptima der einzelnen Gattungen sehr stark variieren kann (Post, 1977). Typische Vertreter der moderat halophilen Arten sind die Spezies *Haloferax* (*Hfx.*) *mediterranei* und *Hfx. volcanii*. Sie wachsen optimal bei Konzentrationen von 2,5 - 3 M NaCl, können aber auch noch bis 4,5 M NaCl wachsen. Im Gegensatz dazu benötigen extrem Halophile wie *Halobacterium* Konzentrationen von 3,5 - 5,2 M NaCl zwingend zum Überleben (Rodriguez-Valera, 1983, Grant & Larson, 1989, Tindall, 1992).

Halobakterien weisen sehr unterschiedliche Zellformen, wie Stäbchen (*Halobacterium*), Kokken (*Halococcus*), dreieckige und quadratische Plättchen (*Haloarcula*, *Haloquadratum*) oder auf diskusförmige Zellen (*Haloferax*), auf. Viele Arten sind pleomorph und können abhängig von der Wachstumsphase verschiedene dieser Zellformen ausbilden (*Haloarcula*, *Haloferax*) (Grant & Larson, 1989, Tindall, 1992). Eine flexible Zellform kann der Optimierung der Sauerstoffaufnahme dienen, indem das Verhältnis von Zelloberfläche zu Zellvolumen verändert werden kann (Norton, 1992). Zum Schutz vor photooxidativen Schäden durch die starke Sonneneinstrahlung an den Oberflächen von wässrigen hypersalinen Habitaten können Halobakterien Carotinoide wie Lycopine (C_{40}) oder Bakterioruberine (C_{50}) produzieren, und sie in ihre Membranen einlagern (Grant & Larson, 1989, Oren, 2002). Die charakteristische rot-orange bis rosa Färbung von hypersalinen Habitaten (Abb. 2) ist unter anderem auf diese Pigmentierung zurückzuführen.

Limitierender Faktor für den halobakteriellen Stoffwechsel ist häufig der Sauerstoff. Dessen Konzentration ist in Hochsalzlösungen und bei Temperaturen um 40°C gering, da die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser mit steigender Salzkonzentration und steigender Temperatur abnimmt. In hypersalinen Gewässern verstärken sich diese Effekte gegenseitig, da

eine Erwärmung der Gewässer den Sauerstoffgehalt verringert, und die Salzkonzentration durch Verdunstung erhöht. Daher ist eine Energieproduktion unabhängig von der aeroben Atmungskette von Vorteil.

A**B**

Abb. 2. Hypersaline Habitats. A: Pink Lake Reserve, Südaustralien B: Salzsee auf Kangaroo Island. Die rötliche bzw. rosa Färbung ist auf die Pigmentierung der halophilen Organismen zurückzuführen (s. Text). Fotos: M. Dyll-Smith.

2.2.1 Energiegewinnung in halophilen Archaea

Halophile Archaea besitzen oft mehrere Mechanismen zur Energiegewinnung, wie aerobe und anaerobe Atmung, Photosynthese oder Fermentation. Die Mehrheit der halophilen Archaea ist zur oxidativen Atmung fähig, obwohl der enzymatische Aufbau der Atmungskette innerhalb der Archaea sehr unterschiedlich ist. So können halophile Archaea unter aeroben Bedingungen ein großes Spektrum an organischen Verbindungen über den TCA-Zyklus und die Atmungskette vollständig oxidieren (Oren, 2002).

Unter sauerstoff-limitierenden Bedingungen können einige Halobakterien mittels Bakteriorhodopsin Photophosphorylierung betreiben. Für die Retinal-Biosynthese ist jedoch eine sauerstoff-abhängige β -Carotin-Spaltung nötig, so dass diese lichtgetriebene Protonenpumpe unter strikt anaeroben Bedingungen nicht synthetisiert werden kann (Hartmann *et al.*, 1980). Für eine strikt anaerobe Atmung können jedoch viele halophile Archaea alternative Elektronenakzeptoren, wie Fumarat, Dimethylsulfoxid, Trimethylamin-N-Oxid oder Nitrat verwenden (Oren & Trüper, 1990, Yoshimatsu *et al.*, 2000, Lledo *et al.*, 2004, Müller & DasSarma, 2005, Martinez-Espinosa *et al.*, 2006).

Daneben findet man bei halophilen Archaea unter anaeroben Bedingungen auch verschiedene Formen der Fermentation, wobei organisches Material, wie Aminosäuren oder Zucker, über energieliefernde Stoffwechselprozesse abgebaut wird. *Hbt. salinarum* z.B. kann

anaerob Arginin fermentieren, das über das energiereiche Zwischenprodukt Carbamoylphosphat zu Ornithin und ATP umgesetzt wird (Dundas & Halvorson, 1966, Hartmann *et al.*, 1980). Andere halophile Archaea wie *Haloferax* können unterschiedliche Zucker fermentieren (Verhees *et al.*, 2003). Monosaccharide werden dabei über spezifische meist Na⁺-abhängige Transporter direkt aufgenommen, wogegen Polysaccharide zunächst extrazellulär hydrolysiert werden müssen. Die entstandenen Oligosaccharide werden durch spezifische Transporter aufgenommen und intrazellulär zu Hexosen (z.B. Glucose und Fructose) und Pentosen (z.B. Xylose und Arabinose) hydrolysiert (Verhees *et al.*, 2003). Der Abbau der Monosaccharide erfolgt über einen modifizierte Glykolyse- oder Entner-Doudoroff-Weg mit Pyruvat als Endprodukt. Dieses wiederum wird durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA oxidiert (Plaga *et al.*, 1992). In anaeroben, fermentativen Archaea wird Acetyl-CoA über die ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (ACD) zu Acetat abgebaut, wogegen in Nitrat- oder Schwefel-reduzierenden Archaea über den TCA-Zyklus CO₂ gebildet wird (Siebers & Schönheit, 2005).

2.3 Gasvesikel

Für Halobakterien ist es von Vorteil, möglichst nahe an der Oberfläche von hypersalinen Gewässern zu siedeln, da für sie die ideale Form der Energiegewinnung ein aerober Stoffwechsel darstellt, oder unter sauerstoff-limitierenden Bedingungen die Photophosphorylierung mittels Bakteriorhodopsin. Einige Halobakterien wie *Hbt. salinarum* bilden daher Flagellen aus, mit denen sie sich phototaktisch bewegen können (Marwan *et al.*, 1991, Hoff, *et al.*, 1997, Nutsch *et al.*, 2003, 2005). Zusätzlich können einige Arten, wie *Hbt. salinarum* und *Hfx. mediterranei*, Gasvesikel bilden, die den Auftrieb der Zellen erhöhen und so die Schwebhöhe stabilisieren (Walsby, 1994). Trotzdem sind *Hbt. salinarum* (anaerobe Atmung mit DMSO oder TMAO, Fermentation von Arginin) und *Hfx. mediterranei* (Nitratatmung) in der Lage unter anaeroben Bedingungen zu wachsen (Dundas & Halvorson, 1966, Oren & Trüper, 1990, Tindall, 1992).

Gasvesikel sind gasgefüllte, wasserundurchlässige Proteinstrukturen, die in den Zellen vieler aquatischer Mikroorganismen vorkommen. Man findet sie in gram-negativen Bakterien (*Ancylobacter aquaticus*), in Cyanobakterien (*Anabaena*, *Nostoc*), in methanogenen Archaea (*Methanosarcina barkeri*), sowie in einigen halophilen Archaea (*Hbt. salinarum*, *Hfx. mediterranei*, *Haloquadratum walsbyi*, *Halorubrum vacuolatum*) (Stoeckenius & Kunau, 1968, Englert *et al.*, 1990, Mwatha & Grant, 1993, Walsby, 1994). Die Gene für ihre Synthese finden sich allerdings auch in einigen nicht aquatischen Organismen (*Bacillus megaterium*, *Streptomyces coelicolor*, *Frankia*,

Rhodococcus) (Li *et al.*, 1998, van Keulen *et al.*, 2005).

Die Hauptfunktion der Gasvesikel besteht darin, den Zellen Auftrieb zu verleihen, um ihre Sedimentation zu verhindern (Walsby, 1994). Gut untersucht ist, wie sie in aquatischen Cyanobakterien zur Regulation der Schwebhöhe beitragen (Kashyap *et al.*, 1998). Bei Tagesbeginn werden mittels Photosynthese Kohlenwasserstoffe (z.B. Zucker) gebildet, und die Gasvesikelbildung wird gestoppt. Dadurch wird der Auftrieb geringer und die Bakterien beginnen zu sinken, um sich vor zu starker UV-Strahlung zu schützen. Nachts werden die Kohlenwasserstoffe verbraucht und neue Gasvesikel gebildet. Der Auftrieb wird wieder größer und die Bakterien steigen zur Oberfläche auf, um bei Tagesbeginn wieder Photosynthese betreiben zu können (Walsby, 1994, Kashyap *et al.*, 1998).

Eine weitere mögliche Funktion der Gasvesikel besteht darin, die Zelle vor photooxidativen Schäden durch Sonneneinstrahlung zu schützen (Shear & Walsby, 1975). Weiterhin könnten sie auch eine Rolle bei der Sauerstoffversorgung der Zellen unter sauerstofflimitierenden Bedingungen spielen, da durch die Bildung von Gasvesikeln ein günstigeres Verhältnis von Cytoplasmavolumen zu Zelloberfläche und somit eine Verkürzung der Diffusionswege erreicht wird (Walsby, 1994, Jung *et al.*, 2004).

Lichtmikroskopisch sind Gasvesikel im Phasenkontrast meist gut zu beobachten, da sie ab einer gewissen Größe, bzw. ab einer gewissen Menge, stark lichtbrechende Eigenschaften aufweisen, und als hell leuchtende Punkte in der Zelle erscheinen (Abb. 3) (Walsby, 1972). Auch das Erscheinungsbild von Laborkulturen ändert sich durch die Produktion von Gasvesikeln. So erscheinen die normalerweise rötlich gefärbten Halobakterien in der stationären Wachstumsphase sowohl als Flüssigkultur wie auch auf einer Agarplatte hellrosa bis weiß.

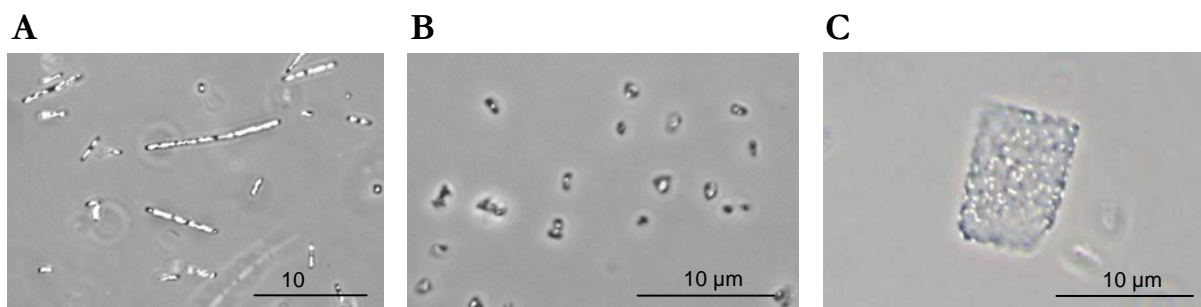


Abb. 3. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen mit Gasvesikeln. A: *Hbt. salinarum* PHH1 B: *Hfx. mediterranei* C: *Haloquadratum walsbyi*.

2.3.1 Aufbau der Gasvesikel

Größe und Form der Gasvesikel sind abhängig von der Organismenart und können auch innerhalb einer Spezies stark variieren. Halobakterien bilden zitronenförmige bis zylindrische Gasvesikel mit konischen Enden, die einen Durchmesser von 200 nm und eine Länge von 200 bis 250 nm (zitronenförmige), bzw. 600 bis 1500 nm (zylindrische) haben. Die Gasvesikel der Cyanobakterien sind dagegen durchweg zylindrisch mit konischen Enden, und haben einen Durchmesser von 45 bis 120 nm und eine Länge von 100 bis 800 nm (Stoeckenius & Kunau, 1968, Simon, 1981, Englert *et al.*, 1990, Walsby & Hayes, 1989, Walsby, 1994). Die Gasvesikel der Cyanobakterien sind also kleiner, dadurch aber auch druckstabiler als die Gasvesikel der Halobakterien.

Der Aufbau der Hülle der Gasvesikel ist wiederum in allen Organismen ähnlich. Sie besteht ausschließlich aus Proteinen und ist undurchlässig für Wasser, aber frei permeabel für alle im Cytoplasma gelösten Gase, die durch passive Diffusion in die Vesikel gelangen. An der äußeren (cytoplasmatischen) Oberfläche befinden sich hauptsächlich hydrophile Aminosäuren, wogegen an der inneren Oberfläche hydrophobe Aminosäuren vorherrschen (Walsby, 1972, Walsby & Hayes, 1989). Das Hauptstrukturprotein der Hülle ist das globuläre, 7 bis 8 kDa große, hydrophobe Gasvesikelprotein A (GvpA), das 95% des gesamten Proteingehalts der Gasvesikel ausmacht (Blaurock & Wober, 1976, Buchholz *et al.*, 1993). Auf Aminosäureebene ist GvpA bei Halobakterien sehr stark konserviert und man findet in der 75 bis 78 langen Aminosäuresequenz nur auf 3 bis 6 Positionen Unterschiede, was einer Sequenzähnlichkeit von 94% entspricht (Englert *et al.*, 1990). Die charakteristische Rippenstruktur der Gasvesikel (Abb. 4) entsteht, indem GvpA zu langen Ketten aggregiert, die wiederum helikal zur Gasvesikelhülle aufgewickelt sind. (Jost, 1966, Stoeckenius & Kunau, 1968, McMaster *et al.*, 1996, Walsby, 1994, Offner *et al.*, 1998).

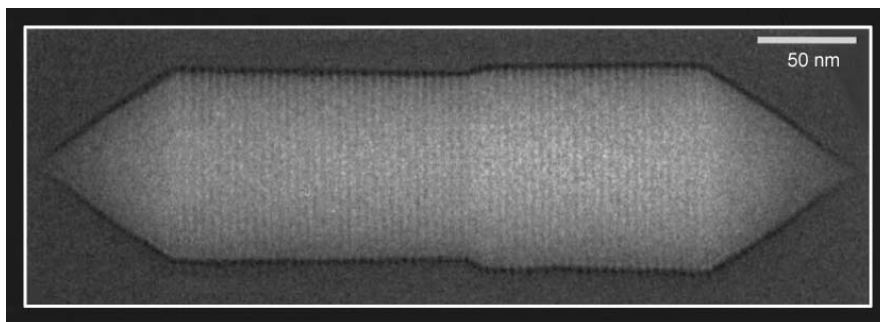


Abb. 4. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gasvesikels von *Hbt. salinarum* (Offner *et al.*, 1998, verändert). Ketten von GvpA bilden die senkrecht zur Zylinderlängsachse angeordneten 5 nm breiten Rippen.

Neben GvpA ist das 31 bis 42 kDa große, hydrophile GvpC der zweite Bestandteil der Gasvesikel. Dieses Protein ist bei Halobakterien mit der Oberfläche der Gasvesikel assoziiert und spielt für die Länge und Größe des zylindrischen Mittelteils, sowie für die Druckstabilität der Gasvesikel eine Rolle (Englert & Pfeifer, 1993, Walsby, 1994, Offner *et al.*, 1996). Innerhalb der Halobakterien ist GvpC weit weniger stark konserviert als GvpA, jedoch weisen alle GvpC-Proteine fünf bis sieben interne Sequenzwiederholungen von 25 bis 38 Aminosäuren auf. Vermutlich werden mehrere GvpA-Rippen durch diese Sequenzwiederholungen vernetzt, da jede dieser Sequenzwiederholung eine helikale Struktur ausbilden kann, die lang genug ist, um mit fünf GvpA-Molekülen einer Gasvesikel-Rippe zu interagieren (Walsby, 1994). Daher ist auch die Form der Gasvesikel zu einem großen Teil von GvpC, bzw. von dessen Sequenzwiederholungen, abhängig (Offner *et al.*, 1996, Best, 2000). Allerdings sind auch einige weitere *gvp*-Proteine und die Sequenz des Gasvesikelhauptproteins GvpA wichtig für Form und Stabilität der Gasvesikel (Offner, *et al.*, 2000, Beard *et al.*, 2002).

Ein großes Problem bei der Analyse der Gasvesikel und der Identifizierung weiterer assoziierter Proteine ist, dass die Hülle sehr resistent gegenüber vielen biochemischen Methoden ist. Mittlerweile nimmt man jedoch an, dass neben GvpC noch weitere Proteine mit den Gasvesikeln assoziiert sind. So weisen die Proteine GvpJ und GvpM eine Sequenzähnlichkeit von 42 bis 54% zu GvpA auf und sind wahrscheinlich in geringer Menge ebenfalls Strukturproteine (Englert *et al.*, 1992a, Shukla & DasSarma, 2004). Sehr geringe Menge von GvpF, GvpG und GvpL sind auch in Gasvesikeln aus *Hbt. salinarum* sp. NRC-1 zu finden (Shukla & DasSarma, 2004).

2.3.2 Die Gene der Gasvesikelsynthese und ihre Expression

Die Synthese der Gasvesikel erfordert die Expression der *gvp*-Gene (*gas vesicle protein coding genes*), die in der sogenannten vac-Region lokalisiert sind. Die Anordnung der Gene und die Größe dieser Genregion variieren zwar in den verschiedenen halophilen Gasvesikelproduzenten, der grundsätzliche Aufbau ist aber sehr ähnlich. In *Hbt. salinarum* und *Hfx. mediterranei* unterscheidet man drei verschiedene vac-Regionen (Abb. 5), in denen 14 *gvp*-Gene in zwei entgegengesetzt orientierten Gengruppen angeordnet sind (Horne *et al.*, 1988, 1991, Englert *et al.*, 1992a). Das extrem halophile Archaeon *Hbt. salinarum* PHH1 besitzt die plasmidkodierte p-vac-Region auf dem Plasmid pHH1, sowie die chromosomal kodierte c-vac-Region. Die Mutante *Hbt. salinarum* PHH4 dagegen weist eine Deletion im Plasmid pHH1 auf und besitzt nur die c-vac-Region (Pfeifer *et al.*, 1988, Horne *et al.*, 1988, 1991, Englert *et al.*, 1992a, Krüger & Pfeifer, 1996). Der

moderat halophile *Hfx. mediterranei* besitzt mit der chromosomal kodierten mc-vac-Region (*Hf. mediterranei* chromosomal) die größte vac-Region der halophilen Archaea, deren Gensequenz eine nahe Verwandtschaft zu den Genen der p-vac-Region aufweist (Horne *et al.*, 1991, Englert *et al.*, 1992a).

Daneben ist auch das haloalkaliphile Archaeon *Halorubrum vacuolatum* (früher *Natronobacterium vacuolatum*) in der Lage, Gasvesikel zu bilden. Hier sind nur 12 *gyp*-Gene in der sogenannten nv-vac-Region lokalisiert, der die beiden Gene *gypD* und *gypE* fehlen (Abb. 5) (Mayr & Pfeifer, 1997, Pfeifer *et al.*, 1997, Pfeifer, 2004).

vac-Regionen

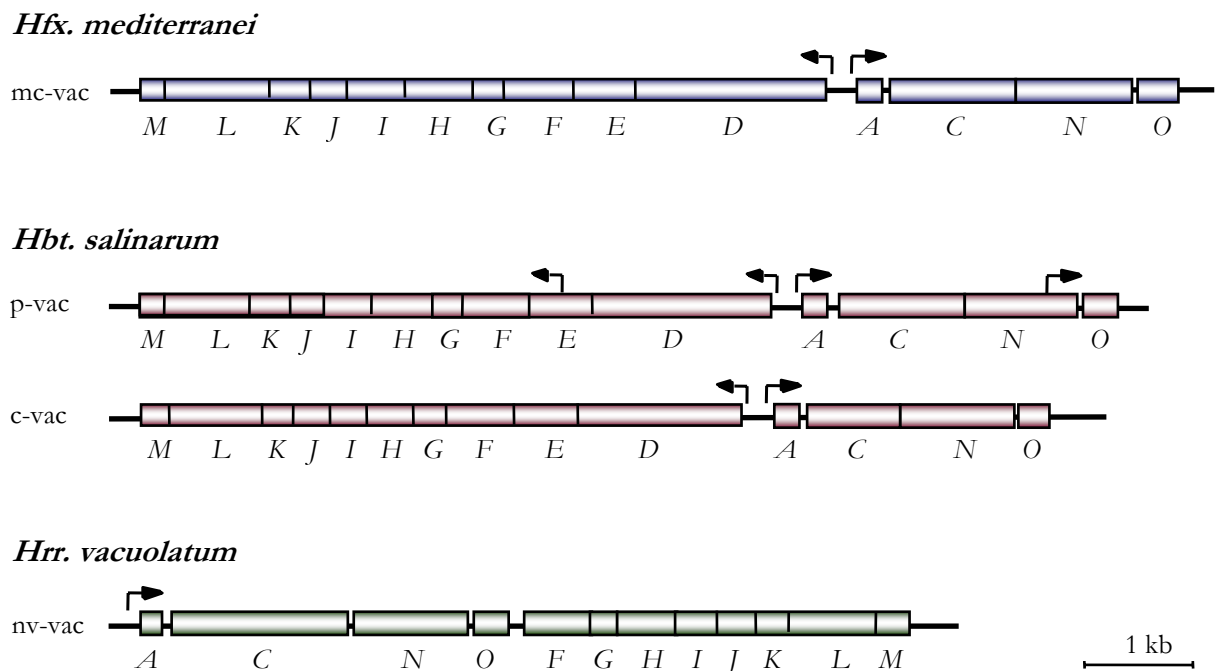


Abb. 5. Gasvesikel-kodierende Regionen von *Hbt. salinarum* (p-vac und c-vac), *Hfx. mediterranei* (mc-vac) und *Hrr. vacuolatum* (nv-vac). Die *gyp*-Gene sind als Kästen dargestellt und mit Großbuchstaben bezeichnet. Die Pfeile geben die Positionen der Promotoren an.

Trotz der großen Sequenz- und Topologieähnlichkeiten der vac-Regionen, unterscheiden sich die Gasvesikel, die durch p-vac, c-vac, mc-vac und nv-vac kodiert sind, in ihrer Form und in der Abhängigkeit ihrer Bildung von unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. *Hbt. salinarum* PHH1 bildet durch Expression der p-vac-Region während des gesamten Wachstums (konstitutiv) zitronenförmige Gasvesikel, während *Hbt. salinarum* PHH4 durch Expression der c-vac-Region nur in der stationären Wachstumsphase zylindrische Gasvesikel bildet (Horne *et al.*, 1988, Horne *et al.*, 1991, Englert *et al.*, 1992a). *Hfx. mediterranei* bildet nur in der stationären Phase und in

Medien mit mindestens 17% Gesamtsalz (w/v) zylindrische Gasvesikel (Rodriguez-Valera *et al.*, 1983, Englert *et al.*, 1990). *Hrr. vacuolatum* bildet in Medien mit mindestens 15% Gesamtsalz (w/v) während des gesamten Wachstums vorwiegend zylinderförmige Gasvesikel (Mayr & Pfeifer, 1997). Der Einfluss von weiteren Umweltfaktoren auf die Gasvesikelbildung wurde bislang noch nicht untersucht, aber es gab erste Hinweise, dass die Expression der Gene für die Synthese der Gasvesikel in *Hbt. salinarum* NRC-1 durch Sauerstoffmangel stimuliert wird (Müller & DasSarma, 2005). In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit untersuchten Halobakterien, die jeweilige vac-Region und die Abhängigkeit der Gasvesikelbildung von Salzkonzentration und Wachstumsphase dargestellt.

Tabelle 1. Gasvesikelbildung in halophilen Archaea

	vac-Region	exponentiell	stationär
extrem halophil			
<i>Hbt. salinarum</i> PHH1	p-vac*	GV	GV
<i>Hbt. salinarum</i> PHH4	c-vac	-	GV
moderat halophil			
<i>Hfx. mediterranei</i>	mc-vac		
15% Salz		-	-
≥ 17% Salz		-	GV
<i>Hfx. volcanii</i>	keine	-	-
haloalkaliphil			
<i>Hrr. vacuolatum</i>	nv-vac		
13% Salz		-	-
≥ 15% Salz		GV	GV

**Hbt. salinarum* PHH1 besitzt auch die c-vac-Region, verwendet aber nur die p-vac-Region zur Gasvesikelbildung. GV = Gasvesikelphänotyp

Die Transkription der vac-Regionen erfolgt ausgehend von den Hauptpromotoren P_A und P_D , die sich vor den Genen *gypA* und *gypD* befinden (Horne & Pfeifer, 1989, Englert *et al.*, 1990, Englert *et al.*, 1992a, Offner & Pfeifer, 1995, Krüger & Pfeifer, 1996, Offner *et al.*, 1996). Allerdings gibt es unterschiedliche Transkriptionsmuster für die Gene der vac-Regionen in den

verschiedenen Stämmen. So sind in *Hfx. mediterranei* in der exponentiellen Wachstumsphase die langen Transkripte ausgehend vom P_{mcD} -Promotor nur für kurze Zeit nachweisbar, und es werden keine Transkripte ausgehend vom P_{mcA} -Promotor gebildet (Abb. 6). Erst in der stationären Wachstumsphase wird auch der P_{mcA} -Promotor aktiv und führt zur Bildung sehr großer Mengen der *mc-gypA* mRNA und geringerer Mengen der längeren Transkripte (Abb. 6). Vom P_{mcD} -Promotor ausgehend sind hier nur noch relativ kurze Transkripte und große Mengen an abgebauter, oder durch frühzeitige Termination entstandene mRNA nachweisbar (Englert *et al.*, 1992a, Röder & Pfeifer, 1996, Jäger *et al.*, 2002). Die Transkription der *c-vac*-Region ist der Transkription der *mc-vac*-Region sehr ähnlich, da sie ausgehend von nur zwei Promotoren erfolgt, und auch hier nur stationär die *gypACNO*-Transkripte gebildet werden (Englert *et al.*, 1990, Krüger & Pfeifer, 1996). Im Unterschied dazu erfolgt die Transkription der *p-vac*-Region ausgehend von vier Promotoren und es werden während des gesamten Wachstums große Mengen *p-gypA*-mRNA sowie geringe Mengen des *p-gypACNO*-Transkripts gebildet (Horne & Pfeifer, 1989, Horne *et al.*, 1991, Offner & Pfeifer, 1995). Die Transkription der *nv-vac*-Region erfolgt ausgehend von nur einem Promotor während des gesamten Wachstums (Mayr & Pfeifer, 1997).

Hfx. mediterranei

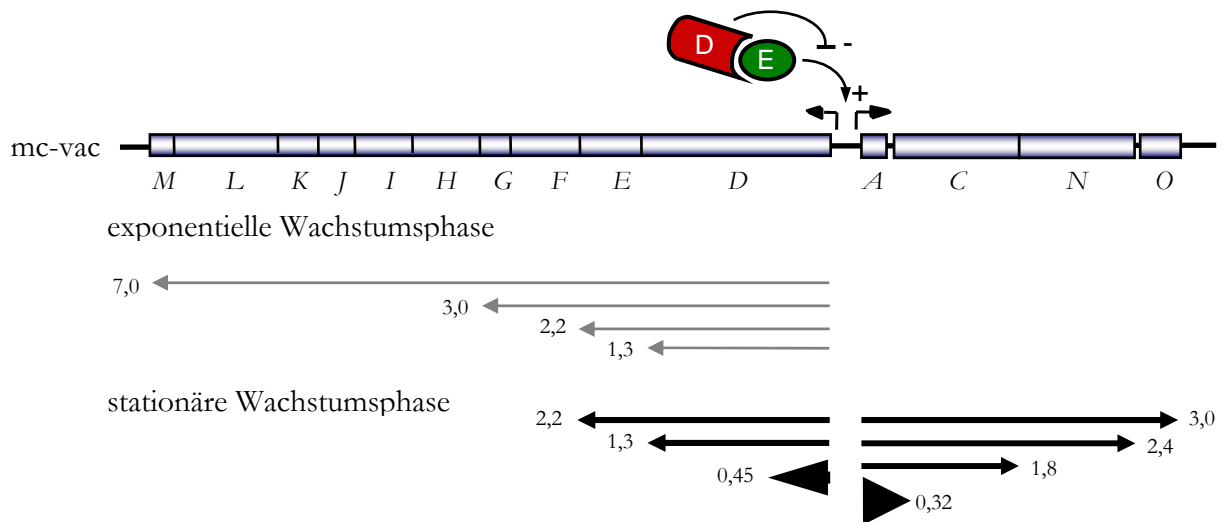


Abb. 6. Schematische Darstellung des Transkriptionsmusters der *mc-vac*-Region (Röder & Pfeifer, 1996). Unter der *mc-vac*-Region sind die von den Promotoren P_{mcD} und P_{mcA} ausgehend gebildeten Transkripte als Pfeile dargestellt, wobei die Stärke der Pfeile der Transkriptmenge entspricht. Die Reihenfolge von oben nach unten entspricht ihrem zeitlichen Auftauchen während des Wachstums von *Hfx. mediterranei*. Die Zahlen an den Spitzen der Pfeile geben die Länge der Transkripte in kb an. Die beiden regulatorischen Proteine GvpE („+“= Aktivator) und GvpD („-“= an der Repression beteiligt) sind schematisch dargestellt.

Die Funktion der einzelnen Genprodukte der *vac*-Region bei der Gasvesikelbildung ist noch nicht in allen Fällen geklärt, wobei nur acht der vierzehn Gene essentiell für die Bildung von Gasvesikeln sind (Offner *et al.*, 2000). Bekannt ist, dass GvpA und GvpC die Hauptstrukturproteine der Gasvesikel sind, und dass GvpD und GvpE an der Regulation der Gasvesikelbildung beteiligt sind (Englert *et al.*, 1992b, Krüger & Pfeifer, 1996, Röder & Pfeifer, 1996, Krüger *et al.*, 1998).

2.4 Transkriptionsregulation in Archaea

Die Transkription in Archaea weist größtenteils eukaryotische Merkmale auf, enthält aber auch einige Elemente bakteriellen Ursprungs. So stellt der basale Transkriptionsapparat, bestehend aus RNA-Polymerase-II und verschiedenen Initiationsfaktoren, eine vereinfachte Version des eukaryotischen Transkriptionsapparates dar. Andererseits weisen fast alle bisher charakterisierten archaealen Transkriptionsregulatoren Ähnlichkeiten mit bakteriellen Regulatoren auf (Zillig *et al.*, 1979, Langer *et al.*, 1995, Bult *et al.*, 1996, Klenk *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 1997, Ng *et al.*, 2000, Kawarabayasi *et al.*, 1998 und 2001, She *et al.*, 2001).

Der Promotorbereich der Archaea besteht meist aus einer TATA-Box an Position -28 relativ zum Transkriptionsstart und einem BRE-Element (*transcription factor B recognition element*) direkt stromauf der TATA-Box. Für die Transkription sind die Initiationsfaktoren TBP (TATA-Box-Bindeprotein) und TFB (Transkriptionsfaktor B) erforderlich, die den Zusammenbau des Präinitiationskomplexes steuern (Hausner *et al.*, 1996, Qureshi *et al.*, 1995, Thomm, 1996, Reeve *et al.*, 1997, Soppa & Link, 1997, Reiter *et al.*, 1990, Hain *et al.*, 1992 Lagrange *et al.*, 1998, Qureshi & Jackson, 1998, Bell *et al.*, 1999a, Soppa, 1999). An den Komplex aus DNA, TBP und TFB bindet die RNA-Polymerase, und initiiert die RNA-Synthese (Bell *et al.*, 1999a, Bell *et al.*, 1998, Bell & Jackson, 2000a). In einigen Halobakterien konnten jedoch mehrere *tbp*- und *tfb*-Gene nachgewiesen werden, obwohl die meisten Archaea und Eukaryonten jeweils nur ein einzelnes *tbp*- und *tfb*-Gen besitzen. So wurden in *Hbt. salinarum* sechs *tbp*- und sieben *tfb*-Gene (Reeve *et al.*, 1997, Ng *et al.*, 2000) und in *Hfx. volcanii* drei *tbp*- und vier *tfb*-Gene gefunden (Thompson *et al.*, 1999). Im Fall von *Hfx. volcanii* konnte bereits gezeigt werden, dass ein bestimmtes *tfb*-Gen spezifisch als Antwort auf Hitzeschock transkribiert wird (Thompson *et al.*, 1999).

Obwohl der basale Transkriptionsapparat der Archaea eukaryotischen Ursprungs ist, und wenig mit der Transkription in Bakterien gemein hat, weisen die bisher charakterisierten oder in archaealen Genomen annotierten Regulatoren Ähnlichkeiten zu bakteriellen Regulatoren auf

(Aravind & Koonin, 1999). Eine Besonderheit stellt in diesem Zusammenhang der Transkriptionsaktivator der *vac*-Region, GvpE, dar, da er als einziger bekannter archaealer Transkriptionsregulator keine Motive bakterieller Regulatoren enthält, sondern einem typisch eukaryotischen Genregulator (basisches Leucin-Zipper-Protein) ähnelt (Krüger *et al.*, 1998, Plößer & Pfeifer, 2002). Einige archaeale Regulatoren sind bereits charakterisiert:

- Der Repressor MDR1 (*metaldependent repressor 1*) ist abhängig von zweiwertigen Metallionen, und inhibiert seine eigenen Gene und die Gene für einen ABC-Transporter zur Aufnahme von zweiwertigen Metallionen (Bell *et al.*, 1999b, Bell & Jackson, 2001),
- Der LrpA-Repressor von *Pyrococcus furiosus* kann sowohl als Aktivator wie auch als Repressor bei der Expression von ca. 75 Genen des Aminosäurestoffwechsels fungieren (Calvo & Matthews, 1994), wobei Leucin die Aktivität erhöhen oder erniedrigen kann. Ein Homolog von LrpA, Lrs14, findet man auch in *Sulfolobus solfataricus* (Bell & Jackson 2000b, Charlier *et al.*, 1997, Enoru-Eta *et al.*, 2000, Leonard *et al.*, 2001, Brinkman *et al.*, 2000, 2002).
- Der *nifH*-Repressor von *Methanococcus maripaludis* reguliert die Stickstofffixierung in Abhängigkeit von Ammonium (Cohen-Kupiec *et al.*, 1997).
- Durch das DNA-Bindeprotein Tfx wird in *Methanobacterium thermoautotrophicum* die Bildung einer Molybdän-Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase abhängig von Wolframat reguliert (Hochheimer *et al.*, 1999).
- Ein weiteres LrpA-Homolog, *ptr2* von *Methanococcus jannaschii*, wirkt als Transkriptionsaktivator und reguliert die Bildung von Rubredoxin, indem es TBP zum Promotor rekrutiert (Ouhammouch & Geiduschek, 2001, 2005, Ouhammouch *et al.*, 2003).
- Der Transkriptionsregulator Bat aus *Hbt. salinarum* reguliert die Expression der *bop*-Gengruppe, die für die lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin kodiert, in Abhängigkeit von Licht und Sauerstoff. Er enthält eine lichtempfindliche cGMP-binde (GAF) Domäne, und ein bakterielles AraC-Typ helix–turn–helix DNA Bindemotiv. Eine PAS/PAC-Domäne des Bat-Proteins dient zur Redoxsensierung (Shand & Betlach, 1991, Baliga *et al.*, 2001).

Die meisten der bekannten archaealen Regulatoren regulieren ihre eigene Transkription und die Transkription der von ihnen kontrollierten Gene somit in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltfaktoren.

2.4.1 Die vac-Region als Modellsystem

Für das Studium archaealer Genregulation eignen sich die Gasvesikelgene von Halobakterien sehr gut als Modellsystem. Zum einen wird die Gasvesikelbildung auf der Ebene der Transkription sehr streng reguliert, wobei sowohl die Aktivierung als auch die Reprimierung von Gasvesikelgenen eine Rolle spielt. Zum anderen sind die Gasvesikelgene gentechnisch gut zugänglich, da es halobakterielle Plasmidvektoren und Reportergensysteme gibt (Lam & Doolittle, 1989, Pfeifer *et al.*, 1994, Holmes *et al.*, 1991, 1997, Holmes & Dyall-Smith, 2000). So stehen verschiedene Plasmidvektoren mit unterschiedlichen, kompatiblen Replikationsursprüngen und Resistenzgenen zur Verfügung, die die gleichzeitige Transformation von Halobakterien mit mehreren Plasmidkonstrukten ermöglichen (Cline *et al.*, 1987, Lam & Doolittle, 1989, Pfeifer *et al.*, 1994, Holmes *et al.*, 1991). Mit dem BgaH-System gibt es außerdem ein halobakterielles Reportergensystem für die Analyse halobakterieller Promotoren und ihrer Modulierung durch Transkriptionsregulatoren (Holmes & Dyall-Smith, 2000).

Bei der Analyse von Gasvesikelgenen und ihrer Expression mit Hilfe von Plasmidvektoren dient meist *Hfx. volcanii* als Rezipient, da er leicht zu kultivieren und zu transformieren ist. Er ist zudem sehr nahe verwandt mit *Hfx. mediterranei*, besitzt aber keine Gasvesikelgene und liefert somit einen sauberen genetischen Hintergrund für die Transformation mit Plasmidkonstrukten, die *gvp*-Gene enthalten (Englert *et al.*, 1992b, Pfeifer *et al.*, 1994). *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die gesamte mc-vac-Region auf einem Plasmid enthalten (mc-vac-Transformanten), zeigen außerdem eine sehr ähnliche salz- und wachstumsphasenabhängige Regulation der Gasvesikelbildung bzw. der mc-*gvpA*-mRNA-Bildung, wie *Hfx. mediterranei* (Englert *et al.*, 1992b). So konnten mit *Hfx. volcanii* bereits verschiedene Untersuchungen zur Regulation der Gasvesikelbildung durchgeführt werden (Pfeifer *et al.*, 2001, Gregor & Pfeifer, 2001, 2005).

2.4.2 Regulation der Gasvesikelbildung

An der Regulation der Gasvesikelbildung sind mindestens die beiden Proteine GvpE und GvpD beteiligt. Der Transkriptionsaktivator GvpE aktiviert die *gvp*-Promotoren P_A und P_D , wobei dafür keine weiteren Gvp-Proteine nötig sind. Im Fall der c-vac und der mc-vac-Region ist GvpE sogar essentiell für eine effiziente Transkription der P_A -Promotoren (Krüger & Pfeifer, 1996, Röder & Pfeifer, 1996, Gregor & Pfeifer, 2001, Zimmermann & Pfeifer, 2003, Hofacker *et al.*, 2004). Im P_A -Promotor konnte bereits stromauf des BRE-Elements eine DNA-Bindestelle für GvpE

identifiziert werden, was eine Interaktion von GvpE mit dem basalen Transkriptionsapparat vermuten lässt (Hofacker *et al.*, 2004, Gregor & Pfeifer, 2005). GvpE zeigt außerdem große Ähnlichkeit zu eukaryotischen Transkriptionsaktivatoren der Familie der basischen Leucinzipper-Proteine (bZIP), wie Analysen der Aminosäuresequenz des C-terminalen Endes und Mutationsstudien ergaben (Krüger *et al.*, 1998, Plößer & Pfeifer, 2002).

Das Protein GvpD ist im Gegensatz zu GvpE an der negativen Regulation der Gasvesikelbildung beteiligt. *Hfx. volcanii*-Transformanten, die eine 918 bp große Deletion im offenen Leserahmen von *mc-gvpD* der *mc-vac*-Region enthalten (ΔD -Konstrukt), zeigen eine starke Überproduktion von Gasvesikeln im Vergleich zu *Hfx. mediterranei* und zu Transformanten von *Hfx. volcanii* mit einer intakten *mc-vac*-Region (Englert *et al.*, 1992b). Die Expression von *mc-gvpD* auf einem zweiten Plasmidkonstrukt kann diese Überproduktion wieder rückgängig machen, und zeigt somit, dass GvpD an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt ist. Die Anwesenheit von GvpD reicht allerdings für eine Reprimierung der Transkription nicht aus, da es nur indirekt an der Repression der *gvpA*-mRNA-Bildung beteiligt ist (Röder & Pfeifer, 1996). Es wirkt auf Aktivatorebene, indem es durch Interaktion mit GvpE dessen Degradation induziert. Die Art und Weise der GvpD-GvpE Interaktion sind dabei noch nicht bekannt (Zimmermann & Pfeifer, 2003, Hofacker *et al.*, 2004, Scheuch & Pfeifer, 2007).

Somit ist die Regulation der Transkription der *vac*-Region zwar grundsätzlich bekannt und gut untersucht. Wie die Gasvesikelbildung in halophilen Archaea auf transkriptioneller Ebene von Umweltfaktoren beeinflusst wird, und wie dabei die Signaltransduktion funktioniert, ist dagegen noch nicht in allen Einzelheiten geklärt.

2.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Umweltbedingungen auf die Gasvesikelbildung in den halophilen Archaea *Hbt. salinarum* und *Hfx. mediterranei*. Die Frage zu Beginn dieser Arbeit war, welchen Einfluss die Verfügbarkeit von Sauerstoff auf die Gasvesikelbildung hat, da viele halophile Gasvesikelbildner in der Lage sind, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen, und es bislang nicht geklärt ist, inwiefern dies die Gasvesikelbildung beeinflusst.

Die Gasvesikelbildung unter anaeroben Bedingungen sollte daher in *Hbt. salinarum* und *Hfx. mediterranei* auf transkriptioneller und auf Proteinebene sowie mittels mikroskopischer Verfahren analysiert und mit der Gasvesikelbildung unter aeroben Bedingungen verglichen

werden. Dabei sollte untersucht werden, ob die Gasvesikelbildung auch unter anaeroben Bedingungen salzabhängig reguliert ist. Anhand von *Hfx. volcanii* Transformanten mit der mc-vac-Region oder dem ΔD -Konstrukt sollte herausgefunden werden, ob der Repressor GvpD bei der Regulation der Gasvesikelbildung in Abhängigkeit von Sauerstoff eine Rolle spielt. Die Aktivität der Promotoren P_{mcA} und P_{mcD} unter aeroben und anaeroben Bedingungen sollte quantitativ verglichen werden.

Eine weitere Fragestellung ergab sich im Verlauf dieser Arbeit. Bei Versuchen mit *Hfx. mediterranei* und *Hfx. volcanii* Transformanten in verschiedenen Wachstumsmedium stellte sich heraus, dass Glucose einen negativen Einfluss auf die Gasvesikelbildung hat. Daraufhin sollte auch der Einfluss von verschiedenen Zuckern auf die Gasvesikelbildung in mc-vac- und ΔD -Transformanten auf transkriptioneller Ebene, auf Proteinebene und mittels mikroskopischer Verfahren näher untersucht werden. Zusätzlich sollte die Aktivität der Promotoren P_{mcA} und P_{mcD} unter dem Einfluss von Glucose quantifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Materialien

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien und Chemikalien und ihre Quellen aufgeführt. Hier nicht aufgeführte Materialien und Chemikalien stammen von den Firmen AppliChem, Boehringer Ingelheim, Merck, Roche Diagnostics, Roth, Sigma und Serva oder sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.. Bestandteile für Nährmedien wurden von den Firmen Bacto, Difco und Oxoid bezogen.

β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
2-Desoxyglucose	Sigma, St. Louis, USA
10x PCR-Reaktionspuffer	Eurogentec, Seraing, Belgien
Acrylamid (30% w/v)/Bisacrylamid (0,8% w/v)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose (ME)	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Alkohol, reinst.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, St. Louis, USA
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan (BisTris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
EDTA	LS Labor Service, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Filterpapier (Whatman)	Macherey & Nagel, Düren
Formaldehyd (37%-ige Lösung)	LS Labor Service, Darmstadt
Formamid	LS Labor Service, Darmstadt
Gase: N ₂ (5.0)	Messer, Griesheim

Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco Laboratories, USA
Kaliumchlorid	LS Labor Service, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
L-Arginin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Long Ranger [®] gel solution	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Lovastatin (Mevinolin-Derivat)	Geschenk von MSD Merck Sharp & Dohme GmbH
Magnesiumsulfat Heptahydrat	LS Labor Service, Darmstadt
Methanol	LS Labor Service, Darmstadt
N ⁺ N ⁺ N ⁺ N ⁺ -Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	LS Labor Service, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran	Pall GmbH, Dreieich
Novobiocin	Sigma, St. Louis, USA
ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid)	Merck, Darmstadt
Pepton	Oxoid GmbH, Wesel
Polyethylenglykol PEG 600	Sigma, St. Louis, USA
Nylonmembran, Biotyne A	Pall Gelman GmbH, Dreieich
Propanol	LS Labor Service, Darmstadt
Rinderserum Albumin (BSA)	Böhringer, Mannheim Roche Diagnostics, Mannheim
Röntgenfilme	Kodak, Rochester
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde Gas, Pullach
Tricin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton (Bacto)	Difco Laboratories, USA
Tween-20	Serva, Heidelberg

3.1.2 Enzyme und Kits

alkalische Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Pfu-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DIG-DNA und DIG-RNA Labeling Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL-Detektionskit	Amersham Pharmacia, UK
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Schwalbach
RNase-Inhibitor (RNasin)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SequiTherm EXCEL Long-Read Sequencing Kit-LC	BIOzym
T3/T7 RNA-Transcription Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	Hybaid, Ashford GB
Zero Blunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA

3.1.3 Größenstandards

GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
0,24 - 9,5 Kb RNA Ladder Mix	Invitrogen, Carlsbad, USA
0,5-10 Kb RNA Ladder Mix	Invitrogen, Carlsbad, USA

3.1.4 Mikroorganismen

<i>Halobacterium salinarum</i> PHH1	Pfeifer <i>et al.</i> , 1981
<i>Halobacterium salinarum</i> PHH4	Pfeifer <i>et al.</i> , 1988
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM 1411	Rodriguez-Valera <i>et al.</i> 1980 und 1983
<i>Haloferax volcanii</i> WR340	Bitan-Banin <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i> Top10F [']	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> GM1674 (dam-)	Palmer & Marinus, 1994

3.1.5 Puffer und Lösungen

Basalsalzlösung	25% NaCl 2% MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,2% KCl
ONPG-Lösung	8 mg/ml ONPG 0,1 M Tris/HCl pH 7,2
ONPG-Testpuffer	2,5 M NaCl 10 µM MnCl ₂ 0,1% β-Mercaptoethanol 50 mM Tris-HCl pH 7,2
PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Ponceau-Rot-Lösung	0,2% (w/v) Ponceau-Rot S 3% (w/v) Trichloressigsäure 3% (w/v) Sulfosalicylsäure
Resuspendierungspuffer für Halobakterien	1 M NaCl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 50 mM Glucose

SDS-Auftragspuffer (3x)	4% SDS 25 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,2% Bromphenolblau 10% β -Mercaptoethanol 20% Glycerin
Sphäroplastierungslösung	15% Saccharose 1 M NaCl 27 mM KCl 50 mM Tris/HCl 0,5 M EDTA
SSC (20x):	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat pH 7,0
TAE-Puffer (1x) (Tris-Acetat-EDTA)	40 mM Tris-Acetat 2mM EDTA pH 7,5
TE-Puffer (Tris-EDTA)	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0
Western-Blockierungslösung	2% Magermilchpulver 0,05% Tween-20 in PBS-Puffer
Western-Transferpuffer	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 20% Methanol pH 8,3-8,6

3.1.6 Plasmidvektoren

pWL102 (Ampicillin, Mevinolin)	Lam & Doolittle, 1989
pJAS35 (Ampicillin, Novobiocin)	Pfeifer <i>et al.</i> , 1994; Soppa, nicht publiziert
pMDS20 (Ampicillin, Novobiocin)	Holmes <i>et al.</i> , 1991
pWL102 mc-vac (Ampicillin, Mevinolin)	Englert <i>et al.</i> , 1992a
pWL102 Δ D mc-vac	Englert & Pfeifer, 1996
pWL102 P_{mcA} - <i>bgaH</i> (Ampicillin, Mevinolin)	Pfeifer <i>et al.</i> , 2001
pWL102 P_{mcD} - <i>bgaH</i> (Ampicillin, Mevinolin)	Bauer, 2007
pWL102 P_{mcD} - A_{13} - <i>bgaH</i> (Ampicillin, Mevinolin)	Bauer, 2007
pJAS mcE^{ex} (Ampicillin, Novobiocin)	Gregor & Pfeifer, 2001
pBluescript II SK+/-, KS+/-	Stratagen, La Jolla
pCR [®] -Blunt II TOPO [®] (Kanamycin ^R , Zeocin ^R)	Invitrogen, Carlsbad, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht von *Haloferax volcanii* und *Haloferax mediterranei*

Das *Haloferax* Vollmedium (VM) enthielt 15%, 20%, 21% oder 25% Gesamtsalz bestehend aus:

Tabelle 2. Salzzusammensetzung der verschiedenen *Haloferax*-Medien*

	15% Salz	20% Salz	21% Salz	25% Salz
NaCl	121,5	162,04	175	202,55
MgSO ₄	25,7	34,26	37	42,82
KCl	2,57	3,43	3,7	4,28

* alle Angaben in g/l

Die NaCl Konzentration betrug 2,1 M (15% Salz), 2,8 M (20% Salz), 3M (21% Salz) oder 3,5 M (25% Salz). Zusätzlich enthielten die Medien:

- 10 nM MnCl₂
- 25 mM TrisHCl pH 7,2
- 0,05% (w/v) CaCl₂
- 0,5% (w/v) Trypton
- 0,3% (w/v) Hefeextrakt

In das Medium für *Haloferax volcanii* WR340 wurde aufgrund einer Histidinauxotrophie dieses Stammes außerdem 0,02% (w/v) Histidin zugegeben.

Flüssigkulturen wurden bei 37° C und 180 upm in Erlenmeyerkolben oder Serumflaschen angezogen, während Kolonien bei 42° C auf festem Medium angezogen wurden, das 1,8% (w/v) Agar enthielt. Für das Wachstum mit Glucose wurde Glucosemonohydrat in den Konzentrationen 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 100 oder 200 mM zugegeben. Für das Wachstum mit 2-Desoxyglucose, Lactose, Saccharose, Maltose, Arabinose oder Xylose wurde der jeweilige Zucker in einer Konzentration von 50 mM zugegeben. Pyruvat wurde in einer Konzentration von 100 mM zugegeben. Für die Wachstumsversuche mit cAMP wurde cAMP in den Konzentrationen 0,1, 1, 5 und 10 mM sowie 50 mM Glucose zugegeben. Die Medien für das Wachstum unter anaeroben Bedingungen enthielten 50 mM Natriumnitrat als terminalen Elektronenakzeptor (Wanner & Soppa, 1999). Das Medium wurde direkt in den Serumflaschen

mit *Haloferax*-Zellen beimpft und mit Stickstoff überschichtet (10 Zyklen in der Anaerobisierungsanlage).

Die Selektion von Transformanten mit Mevinolin- und/oder Novobiocin-Resistenz erfolgte mit 6 µg/ml Mevinolin und/oder 2 µg /ml Novobiocin.

3.2.2 Anzucht von *Halobacterium salinarum*

Das *Hbt. salinarum* Medium enthielt:

- 25% (w/v) NaCl
- 2% (w/v) MgSO₄-Heptahydrat
- 0,2% (w/v) KCl,
- 10 mM Tris HCl pH 7,5
- 1,5% (w/v) Pepton (Oxoid)

Flüssigkulturen wurden bei 37° C und 180 upm in Erlenmeyerkolben oder Serumflaschen angezogen, während Kolonien bei 42° C auf festem Medium angezogen wurden, das 1,8% (w/v) Agar enthielt. Für das Wachstum unter anaeroben Bedingungen wurden 0,5% (w/v) Arginin zugegeben (Ruepp *et al.*, 1995). Das Medium wurde direkt in den Serumflaschen mit *Hbt. salinarum* beimpft und mit Stickstoff überschichtet (10 Zyklen in der Anaerobisierungsanlage).

3.2.3 Anzucht von *Halorubrum vacuolatum*

Flüssigkulturen von *Hrr. vacuolatum* wurden bei 37° C und 180 upm in Erlenmeyerkolben angezogen. Das Medium enthielt:

- 20% (w/v) NaCl
- 5% (w/v) Na₂CO₃-Dekahydrat
- 0,1% (w/v) MgSO₄-Heptahydrat
- 0,2% (w/v) KCl
- 1% (w/v) Hefeextrakt
- 0,75% (w/v) Casaminosäuren
- 0,3% (w/v) Trinatrium-Citrat
- 1,81 µM MnCl₂-Tetrahydrat
- 0,18 mM FeSO₄- Heptahydrat

3.2.4 Sauerstoffkonzentrationsmessung

Um die Sauerstoffkonzentration im Medium unter anaeroben Bedingungen zu messen, wurde 25% Salzmedium in einem 2l-Fermenter (Biostat B, B. Braun Biotech International) mit *Hfx. mediterranei* Flüssigkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,04 angeimpft, luftdicht verschlossen und bei 37°C unter Rühren mit 100 upm inkubiert. Mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Oxi 2000, WTW) wurde der Sauerstoffpartialdruck (%) während des Zellwachstums verfolgt und alle 30 Minuten ein Wert aufgezeichnet. Vor den Messungen wurde eine Kalibrierung der Elektrode nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.5 Anzucht von *Escherichia coli*

E. coli wurde aerob bei 37° C in LB-Medium angezogen (Sambrook & Russel, 2001). Flüssigkulturen wurden bei 220 upm in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler inkubiert, während Kolonien auf festem LB Medium mit 1,8% Agar gezogen wurden. Zur Selektion auf Transformanten mit Ampicillin-Resistenz wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die Selektion auf Transformanten mit Kanamycin-Resistenz erfolgte mit 25 µg/ml Kanamycin.

3.2.6 Transformation von *Haloferax volcanii*

Die Transformation von *Haloferax* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Pfeifer & Ghahraman (1993). Die Modifikationen betrafen im Einzelnen: die Inkubationszeit in Sphäroplastierungslösung (5 - 15 min) richtete sich danach, ob bei einer lichtmikroskopischen Überprüfung Sphäroplasten zu erkennen waren. Die Regenerationszeit (3 - 24 h) richtete sich danach, ob bei einer lichtmikroskopischen Überprüfung keine Sphäroplasten mehr zu erkennen waren. Die PEG Konzentration betrug 30% oder 60%. Vor der Transformation wurden die verwendeten Plasmide durch den *E. coli* Stamm GM1674 (Palmer & Marinus, 1994) passagiert, um eine halobakterielle Restriktionsbarriere zu umgehen.

Die Plasmidkonstrukte lagen aus den Arbeiten von C. Englert (pWL102 mc-vac und pWL102 ΔD mc-vac), D. Gregor (pWL102 P_{mcA} -BgaH und pJAS mcE^{ex}) und M. Bauer (P_{mcD} -bgaH und P_{mcD} -A₁₅bgaH) vor, wurden aber zur Überprüfung vor der Verwendung sequenziert oder mittels Restriktionsanalyse überprüft. Nach der Transformation und am Ende jedes Versuchs

wurde die Anwesenheit der Plasmidkonstrukte durch Restriktionsanalyse und im Bedarfsfall zusätzlich durch Southern-Analyse überprüft.

3.2.7 Konstrukte für die Transformation von *Haloferax volcanii*

pWL102 mc-vac (Englert *et al.*, 1992a)

enthält ein 9487 bp *NheI*-*BglI*-Fragment mit der gesamten mc-vac-Region aus *Haloferax mediterranei* in pWL102.

pWL102 Δ Dmc-vac (Englert *et al.*, 1992b)

enthält die gesamte mc-vac-Region mit einer 918 bp Deletion im *gypD*-Leserahmen.

pWL102 P_{mcA} -BgaH (Pfeifer *et al.*, 2001)

enthält ein Fusionskonstrukt aus dem 127 bp *XbaI*-*NcoI*- P_{mcA} -Promotor-Fragment (PCR-Produkt von Position 4213-4093) und dem 2203 bp *NcoI*-*BamHI*-*bgaH*-Fragment (PCR-Produkt von Position 2356-4571) in pWL102 (Gregor & Pfeifer, 2001).

pWL102 P_{mcd} -*bgaH* (Bauer, 2007)

enthält ein Fusionskonstrukt aus dem P_{mcd} -Promotor ohne Leitsequenz und dem 2203 bp *NcoI*-*BamHI*-*bgaH*-Fragment (PCR-Produkt von Position 2356-4571) in pWL102 (Gregor & Pfeifer, 2001).

pWL102 P_{mcd} - A_{15} -*bgaH* (Bauer, 2007)

enthält ein Fusionskonstrukt aus dem P_{mcd} -Promotor ohne Leitsequenz mit fünfzehn zusätzlichen Nukleotiden des *p-gypA*-Leserahmens zur Steigerung der Translation und dem 2203 bp *NcoI*-*BamHI*-*bgaH*-Fragment (PCR-Produkt von Position 2356-4571) in pWL102 (Gregor & Pfeifer, 2001).

pJAS mcE^{ex} (Gregor & Pfeifer, 2001)

enthält den *gypE*-Leserahmen unter der Kontrolle des halobakteriellen Ferredoxin-Promotors

3.2.8 Bestimmung der BgaH-Aktivität mittels ONPG-Assay

Die BgaH-Aktivität von *Haloferax volcanii* Transformanten wurde mittels des ONPG-Test nach dem Protokoll von Holmes *et al.* (1997) bestimmt. ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid) ist ein Galactose-Strukturanalogon, das durch das halobakterielle Enzym BgaH aus *Haloferax alicantei* (Holmes *et al.*, 1997) abgebaut werden kann. Das BgaH-Protein gehört zur Familie 2 der Glycosylhydrolasen und katalysiert die Hydrolyse von β -glykosidischen Bindungen wie beispielsweise in Lactulose (β -D-Galaktopyranosyl- β -D-Fructofuranose), nicht aber in Lactose (β -D-Galaktopyranosyl-1-4- β -D-Glukopyranose) (Holmes *et al.*, 1997). Die Spaltung der β -glykosidischen Bindungen führt bei der Hydrolyse von ONPG zu dem Spaltprodukt ONP (ortho-Nitrophenolat), das photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm nachgewiesen werden kann. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ für das Produkt o-Nitrophenol aus der β -glykosidischen Spaltung von ONPG beträgt bei 405 nm $3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Eine Einheit (Unit) der BgaH-Aktivität ist definiert als die Menge Enzym, die die Hydrolyse von 1 μmol ONPG pro Minute katalysiert. Die spezifische BgaH-Aktivität [U/mg] ist definiert als der Quotient aus den Einheiten der BgaH-Aktivität pro mg Gesamtprotein.

Für die Enzymtests wurden 100 μl Kultur aus der stationären oder 1 ml aus der exponentiellen Wachstumsphase entnommen, sedimentiert und in 100 μl frischen Kulturmediums aufgenommen. Anschließend wurden 800 μl Testpuffer und 50 μl 2% TritonX-100 (zur Lyse der Zellen) zugegeben, und 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Die enzymatische Aktivität in den Transformanten wurde nach Zugabe von 50 μl ONPG-Lösung als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta A/\Delta t$) photometrisch bei 405 nm verfolgt. Die Volumenaktivität wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit in 1 ml berechnet.

Lambert-Beerschen Gesetz:

$$A = \epsilon * c * d \quad \rightarrow \quad c = \frac{A}{\epsilon * d}$$

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke der durchstrahlten Lösung (1 cm)

c = Konzentration

A = Absorption / Extinktion

3.2.9 Plasmidisolierung aus Halobakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Halobakterien-Stämmen erfolgte mit dem *Plasmid Miniprep System* von QIAGEN nach einem für Halobakterien leicht modifizierten Protokoll. 3 ml einer stationären Halobakterienkultur wurden sedimentiert und in 250 µl speziellem Resuspendierungspuffer für Halobakterien aufgenommen. Die weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

3.2.10 Transformation von *E. coli*

Der *E. coli* Stamm TOP10 F' wurde verwendet, um Plasmidkonstrukte zu amplifizieren, die anschließend für Sequenzierung, Restriktionsanalyse und Transformation von *E. coli* Stamm GM1674 verwendet wurden. Der *E. coli* Stamm GM1674 (Palmer & Marinus, 1994) wurde verwendet, um DNA ohne dam-Methylierung für die Transformation von *Haloferax* zu erhalten. Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan *et al.* (1991) mit kompetenten Zellen, die nach der Rubidiumchlorid Methode hergestellt wurden. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch Hitzeschock der Zellen nach der Methode von Hanahan *et al.* (1991).

Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit dem *Plasmid Miniprep System* von QIAGEN. Für die Plasmidpräparation wurden Übernachtkulturen in 5 ml des jeweiligen Selektivmediums angesetzt.

3.3 Molekularbiologische Standardtechniken

3.3.1 Hydrolytische Spaltung und Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA

Die hydrolytische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde unter den für das verwendete Enzym optimalen Bedingungen durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit 1% Agarosegelen in 1x TAE-Puffer. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurden die Gele in Ethidiumbromid (1 µg/ml) inkubiert und mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm angeregt (Sambrook & Russel, 2001). Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QLAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

Zur Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmidvektoren mittels T4-DNA-Ligase wurden hydrolysierte DNA-Fragmente und die mit kompatiblen Restriktionsendonukleasen hydrolysierte Plasmid-DNA im Verhältnis 1:1, 1:5 oder 1:10 an freien Enden zusammengegeben und 20 min bei 16° C inkubiert. Bei Bedarf wurden die endständigen Phosphate der Plasmidvektoren vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase entfernt, um eine Religation von unvollständig geschnittenen Vektormolekülen zu verhindern.

3.3.2 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung von DNA-Sequenzen von Plasmidkonstrukten erfolgte mit dem *SequiTherm Exel II DNA Sequencing Kit-LC* nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977). Die Sequenzreaktion erfolgte in einem *Robocycler Gradient 40* (Stratagene). Für die Sequenzierung von pBluescript-Konstrukten wurden die 5'-fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Oligonukleotide M13-Universal und M13-Reverse (MWG) verwendet, für die Sequenzierung von pWL102-Konstrukten mit DNA-Fragmenten mit dem *bgaH*-Leserahmen wurde der 5'-fluoreszenzmarkierte (IRD 800) Sequenzprimer *bgaH*_Sequenzp. (Sartorius-Neef, 2005) verwendet. Die Auftrennung der Fragmente auf einem Harnstoff-Polyacrylamidgel und die Ermittlung der Nukleotidsequenz erfolgten mit dem *LICOR DNA 4000* Sequencer bei 1200 V, 35 mA, 50° C und mit der dazugehörigen Image-Analyser Software.

Tabelle 3. Zusammensetzung des Harnstoff-Polyacrylamidgels.

Harnstoff	28 g
Long Ranger gel solution	5 ml
10 x TBE	5 ml
TEMED	35 ml
10% APS	250 µl
dd-H ₂ O	21 ml

Die Daten aus den Sequenzierungen wurden mit Hilfe des Programmpaketes GCG Wisconsin Package ausgewertet (<http://www.gcg.com>). Das Packet lief auf einer Sun Enterprise 250 Workstation mit Sun Solaris 5.8 Betriebssystem.

Tabelle 4. GCG- Programme zur Sequenzanalyse.

SEQED	WORDSEARCH
SEGMENTS	MAPSORT
MAP	FASTA
TFASTA	

3.3.3 Isolierung halobakterieller RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach dem Protokoll von Chomczynski & Sacchi (1987). Die Isolierung von RNA aus der exponentiellen Phase erfolgte mit 15 ml Kultur ($OD_{600} = 0,2 - 0,4$), die Isolierung von RNA aus der stationären Phase mit 8 ml Kultur ($OD_{600} \geq 2,0$). Zur Beurteilung der Qualität der RNA wurde 1 µl der RNA-Präparation auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit Toluidinblau (0,1% Toluidinblau, 20% (v/v) Ethanol in dd-H₂O) gefärbt und mit 20% Ethanol entfärbt, um die 5S, 16S und 23S rRNA sichtbar zu machen. Die Qualität der RNA wurde anhand der Schärfe der Banden beurteilt. Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA erfolgte UV-spektroskopisch durch Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm. Die Konzentration der RNA ergibt sich aus dem gemittelten Absorptionsmaximum der Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm und dem Lambert-Beerschen Gesetz. Eine Absorption von 1 entspricht demnach einer Konzentration von 33 µg/ml einzelsträngiger RNA. Die Reinheit der RNA-Präparation wurde

über den Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Dabei ergibt sich für reine RNA der Wert 2,0; niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Phenol und/oder Proteinen hin.

3.3.4 Northern-Analysen

Für Northern-Analysen wurden je nach Halobakterienstamm unterschiedliche Mengen an RNA eingesetzt (Tabelle 5) Die Gesamt-RNA wurde auf formaldehydhaltigen, denaturierenden 1,2% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert (Ausubel *et al.*, 1988). Als Transferpuffer wurde 20x SSC-Puffer eingesetzt. Anschließend wurde die RNA mittels UV-Crosslink (Stratagene UV-Crosslinker) kovalent auf der Membran fixiert und die Membran mit Methylblau (0,04% (w/v) Methylblau, 0,5 M Natriumacetat, pH 5,5) gefärbt, um Qualität und Quantität der aufgetrennten RNA anhand der Schärfe der Signale für 16S und 23S rRNA zu kontrollieren. Die Membran wurde zur Dokumentation eingescannt und anschließend mit dd-H₂O wieder entfärbt.

Die Hybridisierung erfolgte wie bei Ausubel *et al.* (1988) beschrieben, die Hybridisierungslösung enthielt jedoch zusätzlich 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS und 0,5% (w/v) Magermilchpulver. Die Vorhybridisierung erfolgte 2-4 h bei 42° C in 20 ml Vorhybridisierungspuffer anschließend wurden die DIG-markierten oder radioaktiven RNA-Sonden zugegeben.

Tabelle 5. RNA-Mengen, die für Northern-Analysen der einzelnen Halobakterienstämme verwendet wurden.

Stamm	Verwendete RNA Menge
<i>Haloferax volcanii</i> ΔD	0,05; 0,5 oder 5 µg
<i>Haloferax volcanii</i> mc-vac	1, 2 oder 5 µg
<i>Haloferax mediterranei</i>	1, 2 oder 5 µg
<i>Halobacterium salinarum</i> PHH1	5, 10 oder 20 µg
<i>Halobacterium salinarum</i> PHH4	2, 5, 10 oder 20 µg

3.3.4.1 Nachweis von RNA mit DIG-markierten RNA-Sonden

Die Herstellung von Digoxygenin-markierten strangspezifischen RNA Sonden für die Detektion von mRNA-Transkripten erfolgte mit dem *DIG-RNA Labelling Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim). Als Template für das T3/T7-Polymerase-System (Stratagene) dienten Konstrukte,

die bestimmte Sequenzen der p-vac- (*Hbt. salinarum* Sonden) oder mc-vac-Region (*Hfx. mediterranei* Sonden) im Vektorplasmid pBluescript II SK(+) bzw. KS(+) enthielten. Die DIG-markierten RNA-Sonden wurden 1:5000 verdünnt in 25 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und denaturiert (10 min, 65°C). Die Hybridisierung erfolgte bei 42° C über Nacht. Die Membran wurde mit 0,2x SSC, 0,1% SDS für 20 min bei 55° C und jeweils 30 min mit der gleichen Lösung bei 60° C und 65° C gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim).

3.3.4.2 Nachweis von RNA mit radioaktiv markierten RNA-Sonden

Für quantitative Northern-Analysen wurden RNA-Sonden mit [α -³²P]-ATP markiert. Die *in vitro*-Transkription wurde in 20 μ l Ansätzen mit 20 U T3-RNA-Polymerase, 100 ng linearisiertem Vektor, 1 mM GTP, CTP, UTP, 20 μ M ATP, und 100 μ Ci [α -³²P]-ATP (10 μ Ci/ μ l) sowie 40 U RNase-Inhibitor (RNasin) durchgeführt. Nach 2 h Inkubation bei 37° C wurden die Sonden mittels Phenolextraktion von den Proteinen getrennt und über Gelfiltrationssäulen gereinigt (Sephadex-G50 Fine), um nicht eingebautes [α -³²P]-ATP zu entfernen. Das Puffer-äquilibrierte Säulenmaterial wurde dazu in eine mit einer Glaskugel blockierte Pasteurpipette gefüllt und mit der Sonde beladen. Die niedermolekularen Verbindungen wurden im Ausschlussvolumen der Säule eluiert. Die Sonde wurde in Fraktionen zu je 200 μ l gesammelt, ein 2 μ l Aliquot jeder Fraktion mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und im Szintillationszähler vermessen (cpm = counts per minute).

Nach der Vorhybridisierung der Membran wurden 2×10^7 cpm der Sonde direkt zugegeben und über Nacht bei 42° C hybridisiert. Die Membran wurde mit 1x SSC, 1% SDS für 15 min bei Raumtemperatur und jeweils 15 min mit 0,5x SSC, 0,1% SDS bei 68° C gewaschen und auf einem Phosphoimager-Screener exponiert, um den radioaktiven Zerfall der Sonde zu detektieren. Die Signale wurden am Phosphoimager (Fuji-Film Fla 5000 Phosphoimager) visualisiert und quantifiziert. Die Auswertung der Rohdaten und die abschließende Quantifizierung der Transkriptmenge erfolgte mit der Software Image Gauge (Fuji Photo Film Co., Ltd.).

3.3.4.3 Herstellung strangspezifischer RNA-Sonden

mc-gvpA-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit mc-*gvpA*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit der T3 RNA-Polymerase an einem Konstrukt, das ein 367 bp-*EcoRI-XcmI*-Fragment mit mc-*gvpA* in pBluescript II KS(+) enthält (Röder & Pfeifer, 1996).

p-gvpA-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit der p-*gvpA*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit der T7 RNA-Polymerase an einem Konstrukt, das ein 362 bp *XbaI-EcoRI*-Fragment mit p-*gvpA* in pBluescript II SK(+) enthält (Sartorius-Neef, 2000).

mc-gvpDE-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit mc-*gvpDE*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit der T3 RNA-Polymerase an einem Konstrukt, das ein 580 bp-*NruI-KpnI*-Fragment mit einem Teil aus dem 3'-Bereich von mc-*gvpD* und den 356 bp langen 5'-Bereich von mc-*gvpE* in pBluescript II KS(+) enthält (Röder, 1997).

mc-gvpD-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit mc-*gvpD*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit der T7 RNA-Polymerase an einem Konstrukt, das ein 610 bp-*SalI-SacI*-Fragment mit einem Teil von mc-*gvpD* in pBluescript II SK(+) enthält (Röder, 1997).

mc-pvpN-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit mc-*gvpN*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit der T7 RNA-Polymerase an einem Konstrukt, das ein 849-bp-*EagI-NruI*-Fragment mit einem Teil von mc-*gvpN* in pBluescript II SK(+) enthält (Röder, 1997).

3.3.5 Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analyse

Die Detektion von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Methode von Southern (1975) mit DIG-markierten DNA-Fragmenten. Die nachzuweisenden Konstrukte wurden zunächst mit geeigneten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und auf 1% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran wurde das

Agarosegel 10 min in 0,25 M HCl (partielle Depurinierung), 30 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl (Denaturierung) und 30 min in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl pH 7,5 (Neutralisierung) geschwenkt. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte mittels Kapillarblot über Nacht mit 20x SSC als Transferpuffer (Southern, 1975; Sambrook & Russel, 2001). Anschließend wurde die DNA mittels UV-Crosslink (Stratagene UV-Crosslinker) kovalent auf der Membran fixiert.

Die Herstellung der DNA-Sonden erfolgte ausgehend von den Konstrukten *A-bgaH-SK(+)* und *mc-gypA-KS(+)* mit den Primern M13 Universe und M13 Reverse (Invitrogen), mit dem *DIG DNA Labelling Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim). Konstrukt *A-bgaH-SK(+)* enthält ein 125 bp *XbaI-NcoI P_A*-Promotor-Fragment (Position 21-145) und ein 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (PCR Produkt von Position 2356-4571) in pBluescript II SK(+) (Neef & Pfeifer, unveröffentlicht). Konstrukt *mc-gypA-KS(+)* enthält ein 367 bp-*EcoRI-XcmI*-Fragment mit *mc-gypA* in pBluescript II KS(+) (Röder & Pfeifer, 1996). Nach zweistündiger Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung wurde die Nylonmembran über Nacht bei 42° C mit den DIG-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Die Signaldetektion erfolgte mit dem „*DIG Luminescent Detection Kit*“ (Roche Diagnostics, Mannheim).

3.3.6 Proteinbestimmung nach Bradford

20 µl Proteinlösung wurden in 980 µl Bradfordreagenz (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 8,5% (v/v) Phosphorsäure, 4,75% (v/v) EtOH) gegeben und 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt und anhand einer Eichgeraden die Proteinkonzentration errechnet. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden 20 µl Rinderserumalbuminlösung der Konzentrationen 0, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 µg/ml eingesetzt.

3.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit 12% SDS-Polyacrylamidgelen nach Schagger & von Jagow (1987). 1 - 20 µg Gesamtprotein wurden mit 3x SDS-Auftragspuffer versetzt, denaturiert (30 - 120 sec, 95° C) und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung fand für 2 - 3 h bei 120 V statt.

3.3.8 Transmission-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Für die Elektronenmikroskopie wurden 2 ml Zellen aus der stationären Wachstumsphase entnommen, in einer Tischzentrifuge sedimentiert (1 h, 1400 g) und in einem geeigneten Volumen sterilfiltrierter Basalsalzlösung aufgenommen. Danach wurde im Phasenkontrast überprüft, ob die Gasvesikel noch intakt waren. Die Mikroskopie erfolgte auf 400 mesh Graphitbeschichteten Kupfernetzchen. Für die Beschichtung der Kupfernetzchen mit dem Kohlefilm wurde dieser zuerst auf eine Glimmroberfläche aufgedampft (2400 V, 90 mA). Der entstandene Film wurde in dd-H₂O Wasser abflotiert, mit den Kupfernetzchen von der Wasseroberfläche abgehoben und auf Filterpapier getrocknet.

Die Kupfernetze wurden für 1 min in Zellsuspension getaucht, um die Zellen zu binden. Überschüssige Zellsuspension wurde mit einem Filterpapier seitlich abgezogen. Das Kupfernetz wurde danach entweder direkt für die Mikroskopie benutzt, oder zur Negativkontrastierung für 1 min in 2% Uranylacetat mit 200 mM Maleat, pH = 6,0 getaucht. Maleat diente dabei als externer Osmoprotektor, um die Zellen vor osmotisch bedingtem Platzen zu schützen. Abschließend wurden die Kupfernetze kurz mit dd-H₂O abgespült. Bilder der Zellen wurden mit einer am Elektronenmikroskop (Zeiss EM109) fixierten TFP-Kamera auf einem 70 mm Film aufgenommen. Betrieben wurde das Mikroskop mit 80 kV Beschleunigungsspannung und 7.000-20.000 x Gesamtauflösung auf der Kamera.

3.3.9 Isolierung von Proteinen aus Halobakterien für Western-Analysen

Für Western-Analysen mit Gesamtprotein aus *Haloferax mediterranei*, *Haloferax volcanii* und *Halobacterium salinarum* wurden 6 ml einer exponentiellen Kultur oder 2 ml einer stationären Kultur entnommen, sedimentiert (5 min, 12.000 g) und in 400 µl TE-Puffer mit 1 µg/ml DNase I aufgenommen, um die Zellen zu lysieren. Der Zellaufschluss wurde über Nacht gegen 10 mM TrisHCl pH 7,2 bei 4° C dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.

3.3.10 Nachweis halobakterieller Proteine mittels Western-Analyse

Halobakterielle Proteine wurden auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Nassblot (*Midget Multiblott-System*, Pharmacia) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer erfolgte für 2 h bei 300 mW und 4° C in

Transferpuffer. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurden die Membranen anschließend mit Ponceau-Rot-Lösung gefärbt und eingescannt. Die Blockierung der Membran erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur in Blockierungslösung.

Die spezifischen Antisera für die halobakteriellen Proteine wurden in der Blockierungslösung 1:1.000 verdünnt und mit der Membran 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschlösung (= Blockierungslösung ohne Magermilch) entfernt. Als Zweitantikörper wurde ein gegen Kaninchen IgG gerichteter Antikörper aus Esel verwendet, an den eine Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte 1:5000 verdünnt in Blockierungslösung bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschlösung erfolgte die Detektion der Chemolumineszenzreaktion der spezifisch gebundenen Antikörper mit dem *ECL-Detection-System* (Amersham Pharmacia, UK). Die Exponierung des Röntgenfilms erfolgte je nach Bedarf 2 - 30 min bei Raumtemperatur.

Tabelle 8. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antisera*.

Antiserum	Detektion von	Referenz
Anti mc-Gasvesikel	mc-GvpA	Englert & Pfeifer, 1993
Anti mc-GvpC	mc-GvpC	Englert & Pfeifer, 1993
Anti mc-GvpD	mc-GvpD	Zimmermann & Pfeifer, 2003
Anti mc-GvpE	mc-GvpE	Zimmermann & Pfeifer, 2003
Anti mc-GvpF	mc-GvpF	Zimmermann & Pfeifer, 2003

*Alle verwendeten Antisera wurden in Kaninchen produziert.