TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT

ULB

Auswirkungen von Schwermetallionen auf Halobacterium salinarum R1: Vergleichende Analysen zellulärer und molekularer Stressreaktionen in planktonischen Zellen und Biofilmen

Völkel, Sabrina

(2020)

DOI (TUprints): https://doi.org/10.25534/tuprints-00011494

Lizenz:

CC-BY-SA 4.0 International - Creative Commons, Attribution Share-alike

Publikationstyp: Ph.D. Thesis

Fachbereich: 10 Department of Biology

Quelle des Originals: https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/11494

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT

Auswirkungen von Schwermetallionen auf *Halobacterium salinarum* R1

Vergleichende Analysen zellulärer und molekularer Stressreaktionen in planktonischen Zellen und Biofilmen

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

Dissertation
von Sabrina Völkel

Erstgutachterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Zweitgutachter: PD Dr. Arnulf Kletzin

Darmstadt 2020

Völkel, Sabrina: Auswirkungen von Schwermetallionen auf *Halobacterium salinarum* R1: Vergleichende Analysen zellulärer und molekularer Stressreaktionen in planktonischen Zellen und Biofilmen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2020
Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2020
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-114944

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig. Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 1

Kapitel I - Einleitung

1.1 Schwermetalle in der Umwelt und ihre Wirkung auf Mikroorganismen 4
1.2 *Halobacterium salinarum* R1 als Modellorganismus halophiler Archaea 6
1.3 Die sessile Lebensweise in Biofilmen 8
1.4 Biofilme vermitteln erhöhte Resistenzen 10
1.5 Ziele dieser Arbeit 12

Kapitel II - Material und Methoden

2.1 Material
2.1.1 Chemikalien 14
2.1.2 Mikroorganismen 15
2.1.3 Enzyme und Kits 15
2.1.4 Molekulare Größenstandards 15
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide 16
2.1.6 Puffer und Lösungen 17

2.2 Mikrobiologische Methoden
2.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli* 19
2.2.2 Kultivierung von *Halobacterium salinarum* 19
2.2.3 Fluoreszenz-basierte Quantifizierung adhärenter Zellen 19
2.2.4 Metallionen-Sensitivitätstest 20
2.2.5 Proteaseaktivitätstest 20

2.3 Molekularbiologische Methoden
2.3.1 Isolation von genomischer DNA 20
2.3.2 Agarosegelelektrophorese 20
2.3.3 Transformation von *Escherichia coli* 21
2.3.4 Transformation von *Halobacterium salinarum* 21
2.3.5 Generierung von *H. salinarum* Gendeletionsmutanten 21
2.3.6 Southern-Analyse 23
2.3.7 Erstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonden 23
2.3.8 Isolation von RNA 24
2.3.9 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) 25
2.3.10 Propidiummonoazid-basierte quantitative PCR (PMA-qPCR) 26

2.4 Biochemische Methoden
2.4.1 Vorbereitung von Proteinproben 27
2.4.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford 27
2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 28
2.4.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen 28
2.4.5 Quantitative Proteomanalyse mit SWATH-LC/MS/MS 29
2.4.6 SWATH-LC/MS/MS Datenprozessierung 30
2.4.7 SWATH-LC/MS/MS Statistische Datenanalyse 30
2.4.8 Isolierung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) 30
2.4.9 Bestimmung des Proteingehalts in EPS-Proben 31
2.4.10 Bestimmung des Kohlenhydratgehalts in EPS-Proben 31
2.4.11 Bestimmung des Uronsäuregehalts in EPS-Proben 31
2.4.12 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) 32

2.5 Mikroskopische Analysen
2.5.1 Phasenkontrastmikroskopie (PCM) 32
2.5.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) 32
2.5.3 Rasterelektronenmikroskopie (*Scanning electron microscopy*, SEM) 33

Kapitel III - *Halobacterium salinarum* R1 unter Einfluss von Metallionen

3.1 Einleitung 36

3.2 Ergebnisse
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung von *Halobacterium salinarum* R1 unter Standardbedingungen 37
3.2.2 Wachstum und Adhäsion in Gegenwart von Kupfer- und Nickelionen 39
3.2.3 Reaktion von planktonischen Zellen und Biofilmen auf die Zugabe von Kupfer- und Nickelionen 41
3.2.4 Untersuchung der Zellvitaliät nach Exposition mit Kupfer- und Nickelionen 47
3.2.5 Zusammensetzung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) nach Zugabe von Kupfer- und Nickelionen 48

3.3 Diskussion
3.3.1 Kupfer- und Nickelionen führen zu Metall-spezifischen Effekten in *H. salinarum* 56
3.3.2 Die Lebensform in Biofilmen erhöht die Überlebensrate in *H. salinarum* bei Metallionenstress 57
3.3.3 Extrazelluläre polymere Substanzen spielen eine wichtige Rolle im Umgang mit Schwermetallionen 58

Kapitel IV - Molekulare Analysen der Metallionen-induzierten Stressreaktion in *H. salinarum*

4.1 Einleitung 62

4.2 Ergebnisse
4.2.1 Untersuchung der Proteinmuster von planktonischen Zellen und Biofilmen nach Metallionenbehandlung 63
4.2.3 Proteinkategorien mit signifikanten Änderungen der relativen Häufigkeit 73
4.2.4 Transkriptionsanalysen von Zielgenen nach Einfluss von Metallionen 79

4.3 Diskussion
4.3.1 Planktonische Zellen zeigen in Gegenwart von Metallionen stärkere molekulare Veränderungen im Vergleich zu Biofilmzellen 83
4.3.2 Kupfer- und Nickelionen führen in planktonischen Zellen zu oxidativem Stress 84
4.3.3 Signifikante Verringerung von ABC-Transportsystemen planktonischer Zellen nach Kupfer- und Nickelionenbehandlung 86
4.3.4 Biofilme zeigen Metallionen-spezifische Stressreaktionen in Gegenwart von Kupfer- und Nickelionen 88

Kapitel V - Gendeletionen in *H. salinarum* R1

5.1 Einleitung 92

5.2 Ergebnisse
5.2.1 Zielgene für Deletionsstudien 92
5.2.2 Verifizierung der Gendeletionen 94
5.2.3 Charakterisierung von Wachstum und Adhäsion in den Deletionsmutanten 97
5.2.4 Einfluss von Kupfer- und Nickelionen auf Deletionsmutanten 99
5.2.5 Nachweis von Proteaseaktivität in Wildtyp und Deletionsmutanten 111
5.2.6 Charakterisierung von Deletionsmutanten im Überblick 115

5.3 Diskussion
5.3.1 Gendeletionen in *H. salinarum* R1 führen zu diversen Auswirkungen auf die zellulären Reaktionen im Umgang mit Metallionenstress 117
5.3.2 Transkriptionsregulatoren und universale Stressproteine beeinflussen die Expression bzw. Aktivität von Proteasen 117
5.3.3 Erhöhte intrazelluläre Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen beeinflussen die Metallhomöostase und stören zelluläre Stoffwechselwege 121
5.3.4 ABC-Transportsysteme und ATPasen spielen eine wichtige Rolle im Membrantransport von Metallionen 122

Kapitel VI - Schlussfolgerungen und Ausblick

Schlussfolgerungen und Ausblick 125

Literaturverzeichnis 128
Anhang 141
Abkürzungsverzeichnis 142
Beiträge anderer 145
Publikationen 146
Konferenzbeiträge 147
Curriculum vitae 148
Danksagung 149
Ehrenwörtliche Erklärung 150

Zusammenfassung

Halobacterium salinarum R1 ist ein extrem halophiles Archaeon, welches die Fähigkeit besitzt zu adhärieren und Biofilme zu bilden. In der Natur kommen Haloarchaea in besonders salzreichen Habitaten wie Salzseen oder Salinen vor, welche aufgrund von Industrialisierungsprozessen häufig mit Schwermetallen belastet sind. Die Auswirkungen von Schwermetallen auf betroffene Mikroorganismen, insbesondere auf Haloarchaea sind jedoch weitestgehend unbekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung von zellulären und molekularen Prozessen im Umgang mit den zwei bivalenten Metallionen Cu^{2+} und Ni^{2+} in *H. salinarum* R1 planktonischen Zellen und Biofilmen.

Um die Auswirkungen von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf zellulärer Ebene zu untersuchen, erfolgten Analysen des planktonischen Wachstums sowie der Adhäsion und Biofilmbildung in *H. salinarum* R1. In Gegenwart von subinhibitorischen Metallionen-Konzentrationen ergaben Fluoreszenz-basierte Adhäsionstests eine bis zu 70% verringerte Adhäsion im Fall von Cu^{2+}, während die Anwesenheit von Ni^{2+} die Zelladhäsion bis zu 30% erhöhte. Die Zugabe von Wachstums-inhibierenden Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Konzentrationen auf reife Biofilme resultierte im Fall von Cu^{2+} in einer Ablösung von bis zu 70% der sessilen Zellen, wobei mittels mikroskopischer Analysen eine vermehrte Aggregatbildung beobachtet wurde. Gegenteilige Effekte zeigte die Zugabe von Ni^{2+}, welche zu einer etwa 70% erhöhten Anzahl von Zellen im Biofilm und einer Verdichtung der Biofilmarchitektur führte. PMA-qPCR-basierte Untersuchungen der Zellvitalität nach Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Behandlung ergaben eine bis zu 80% erhöhte Resistenz in Biofilmen im Vergleich zu planktonischen Zellen. Quantitative Analysen der isolierten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) von unbehandelten sowie von Cu^{2+}-/Ni^{2+}-behandelten Biofilmen zeigten eine signifikante Erhöhung des EPS-Anteils nach Metallionenbehandlung sowie Cu^{2+}-/Ni^{2+}-spezifische Änderungen des Proteingehalts als Hauptbestandteil der EPS-Matrix in *H. salinarum*. Darüber hinaus ergaben spektrometrische Analysen der Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Konzentrationen, dass Biofilmzellen im Vergleich zu planktonischen Zellen bis zu 32-fach verringerten Konzentrationen ausgesetzt sind. Da der größte Anteil der Metalle im Biofilm mit 65% Cu^{2+} bzw. 83% Ni^{2+} in den isolierten EPS quantifiziert wurde, scheint die EPS-Matrix eine wichtige Funktion in der Biofilm-vermittelten Resistenz einzunehmen.

Zur Untersuchungen der Auswirkungen der Metallionen auf molekularer Ebene erfolgte eine quantitative Proteomanalyse von Cu^{2+}-/Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen mittels SWATH-LC/MS/MS. Diese ergab mit 1.180 quantifizierten Proteinen eine Proteomabdeckung von 46%, wobei 269 Proteine (23%) signifikant veränderte Abundanzen nach Metallionenbehandlung zeigten. Diese sind mit 19,8% größtenteils auf planktonische Zellen zurückzuführen, während in Biofilmzellen lediglich 4,4% der quantifizierten Proteine signifikante Änderungen in Folge von Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Stress aufwiesen. Vergleichende Analysen auf Transkriptebene mittels qRT-PCR bestätigten die unterschiedliche Auswirkung der Metallionen auf die zwei Lebensformen. Untersuchungen der Proteinverteilung zeigten, dass planktonische Zellen mit 47% gemeinsam auftretenden Proteinen mit einer ähnlichen Stressreaktion auf Cu^{2+} und Ni^{2+} reagierten, wobei hauptsächlich transkriptionsregulierende und ribosomale Proteine in erhöhten relativen Häufigkeiten auftraten. Dagegen zeigten viele ABC-Transportsysteme eine signifikante Verringerung in Anwesenheit von Cu^{2+} bzw. Ni^{2+}. In Biofilmen traten nur 3% der Proteine gemeinsam in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Zellen auf, was auf Metall-spezifische

Reaktionen schließen lässt und auf die Relevanz der Cu^{2+}-/Ni^{2+}-spezifischen Proteine in Bezug auf die starken Auswirkungen auf die Biofilmarchitektur hindeutet.

Zur Aufklärung der Funktion von Proteinen mit signifikant veränderten relativen Häufigkeiten nach Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Stress erfolgten Deletionen von insgesamt 13 Genen. Die entsprechenden Deletionsmutanten wurden auf ihre Reaktion mit Cu^{2+} bzw. Ni^{2+} hin untersucht, und zwar durch Analysen des Wachstums, der Adhäsion und Biofilmbildung sowie im Hinblick auf eine Proteaseaktivität. Alle wiesen mindestens eine Metall-bedingte Änderung im Vergleich zum *H. salinarum* Wildtyp auf. Besonders starke Effekte zeigte die Deletion der Cu^{2+}-exportierenden ATPase CopA, welche in Anwesenheit von Cu^{2+} in einer Inhibition des Wachstums und der Adhäsion der Zellen resultierte und demnach eine wichtige Funktion in der Cu^{2+}-Homöostase einzunehmen scheint. In Gegenwart von Ni^{2+} wurden bei der Gendeletion eines ABC-Transporter-Proteins bzw. eines uncharakterisierten Proteins starke Auswirkungen auf die Biofilmarchitektur beobachtet, was auf eine wichtige Rolle dieser Proteine in der Ni^{2+}-spezifischen Stressreaktion hindeutet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen umfassenden Einblick in die zellulären und molekularen Reaktionen von planktonischen Zellen und Biofilmen des Haloarchaeons *H. salinarum* R1 im Umgang mit Schwermetallionen und können als Basis für weitere Analysen der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen bzw. Stressreaktionen von Mikroorganismen in Schwermetall-belasteten Habitaten dienen.

Kapitel I

Einleitung

1.1 Schwermetalle in der Umwelt und ihre Wirkung auf Mikroorganismen

Schwermetalle werden als metallische Elemente mit einer Dichte von mehr als 5 g/cm^3 bezeichnet (Weast & Astle, 1984). Hierzu zählen beispielsweise Eisen, Kupfer, Zink, Chrom, Nickel, Cadmium, Blei oder Quecksilber. In der Natur kommen Schwermetalle hauptsächlich in Gesteinen der Erdkruste vor und sind in Form von Oxiden, Sulfiden und Carbonaten gebunden oder in Silikaten eingeschlossen (Masindi & Muedi, 2018). Dagegen sind die Mengen von Schwermetallen und deren Verbindungen in der Atmosphäre und Hydrosphäre gering, sodass sie im biologischen Kreislauf lediglich in sehr geringen Konzentrationen zu finden sind (Heintz & Reinhardt, 1990). Seit Beginn der Industrialisierung im 19. Jahrhundert und der Verbrennung von Schwermetall-enthaltender Steinkohle steigt die Schwermetallemission in der Umwelt jedoch stetig an. Heute werden Schwermetalle für eine Vielzahl industrieller und technischer Zwecke genutzt und kommen auch in der Landwirtschaft in Form von Düngemitteln, Fungiziden und Pestiziden zum Einsatz (He *et al.*, 2005, Ali *et al.*, 2019). Anthropogene Einflüsse führen somit zunehmend zu einer Freisetzung von erhöhten Schwermetallmengen in die Umwelt. Dort werden sie hauptsächlich in Böden und Sedimenten von Gewässern akkumuliert, da sie weder chemisch, noch biologisch abbaubar sind (Slaveykova & Cheloni, 2018). Besonders häufig kommen hohe Konzentrationen bioverfügbarer Schwermetalle salzgebunden vor, sodass salzreiche Regionen wie Küstengebiete, Salzwiesen oder solare Kristallisationsanlagen von einer erhöhten Metallbelastung betroffen sind (Tug & Duman, 2010, Srivastava & Kowshik, 2013, Lutts & Lefèvre, 2015). Die Metallkonzentrationen in diesen Habitaten liegen im millimolaren Bereich und sind stark von Änderungen des Klimas und des Wasserpegels abhängig (Kumar *et al.*, 2010, Pereira *et al.*, 2013). Durch die Aufnahme von Pflanzen und Mikroorganismen gelangen sie wiederum in die Biosphäre und nehmen am biologischen Kreislauf teil (Nagajyoti *et al.*, 2010).

Unter den Metallen unterscheidet man zwischen biologisch essentiellen und nicht essentiellen Metallen. Zu den essentiellen Metallen zählen unter anderen Eisen, Kupfer, Nickel, Mangan oder Zink, die in einem nano- bis mikromolaren Konzentrationsbereich als essentielle Cofaktoren dienen und Proteinen ein katalytisches Potenzial und Stabilität verleihen (Bruins *et al.*, 2000). So gehören schätzungsweise über die Hälfte aller Proteine in jedem Organismus zu Metalloproteinen (Degtyarenko, 2000), deren Funktionsfähigkeit von essentiellen Metallen abhängig ist. Da sie in verschiedenen Oxidationszuständen vorliegen können, werden Metallionen zudem als Elektronenträger bei Redoxreaktionen von Elektronentransportketten zur Erzeugung chemischer Energie genutzt (Bott, 1999). Dennoch haben Metallionen die Eigenschaft innerhalb eines sehr engen Konzentrationsbereichs von einer essentiellen Funktion zu einer toxischen Wirkung auf Zellen zu wechseln, indem sie die Integrität und Funktion von DNA, Proteinen und Membranen beeinträchtigen (Geesey & Jang, 1989). Nichtessentielle Metalle wie Cadmium, Blei oder Quecksilber sind nicht an biologischen Prozessen beteiligt und wirken bereits in geringen Konzentrationen toxisch (Perrin *et al.*, 2009), indem sie essentielle Metalle an ihren natürlichen Bindungsstellen ersetzen oder mit anderen spezifischen Liganden interagieren (Bruins *et al.*, 2000). Um die intrazelluläre Konzentration von Metallionen zu kontrollieren, werden Metallresistenzmechanismen aktiviert (Abb. 1). In Eukaryoten sowie bakteriellen und einigen archaealen Spezies spielt die Regulation von ATPasen, ABC-Transportern sowie von membrangebundenen Transportern der CDF- *(cation diffusion facilitator)* Familie eine wichtige Rolle in der Metallionenresistenz (Kim *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2010, Chien *et al.*, 2013a, Kolaj-Robin *et al.*, 2015). Zudem werden erhöhte Mengen

Cystein-reicher metallbindender Peptide wie Glutathion sowie Proteine mit Metallothioninen und Phytochelatinen gebildet (Glaeser *et al.*, 1991, Cobbett & Goldsbrough, 2002, Reddy *et al.*, 2014). Diese werden einerseits in die Umgebung abgegeben oder befinden sich an der Zellmembran, um Metallionen außerhalb der Zellen zu chelatieren. Zum anderen bilden sie auch intrazelluläre Chelate mit Metallionen, welche über Transporter nach außen befördert werden (Srivastava & Kowshik, 2013). Zu den Metallionen-chelatierenden Verbindungen gehören auch Siderophore, welche als niedermolekulare Eisen-chelatierende Verbindungen bekannt sind. Studien mit *Pseudomonas aeruginosa* zeigten, dass die zwei dominantesten Siderophore in der Lage waren neben Eisen insgesamt 16 verschiede Metalle zu chelatieren, wobei die Bindung von Eisen bevorzugt wurde (Braud *et al.*, 2009a, Braud *et al.*, 2009b). Zum Schutz der Zellen dienen außerdem metallreduzierende Enzyme wie Quecksilberreduktasen, die Elektronen auf Quecksilberionen übertragen und zu elementarem Quecksilber reduzieren, welches flüchtig ist und freigesetzt wird (Schelert *et al.*, 2004) Dps-Proteine, welche strukturelle Ähnlichkeiten zu Eisen-speichernden Ferritinen aufweisen, schützen Zellen vor oxidativem Stress. Sie werden bei erhöhten Eisenkonzentrationen gebildet, um überschüssiges Eisen (Fe^{2+}) zu binden und die Bildung von Fe^{2+}-katalysierten Hydroxylradikalen zu minimieren (Nair & Finkel, 2004). Neben der Bindung von Fe^{2+} können Dps-Proteine weitere bivalente Metallionen wie Zn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} oder Mn^{2+} binden und spielen somit eine wichtige Rolle in der Metallresistenz der Zellen (Haikarainen *et al.*, 2011).

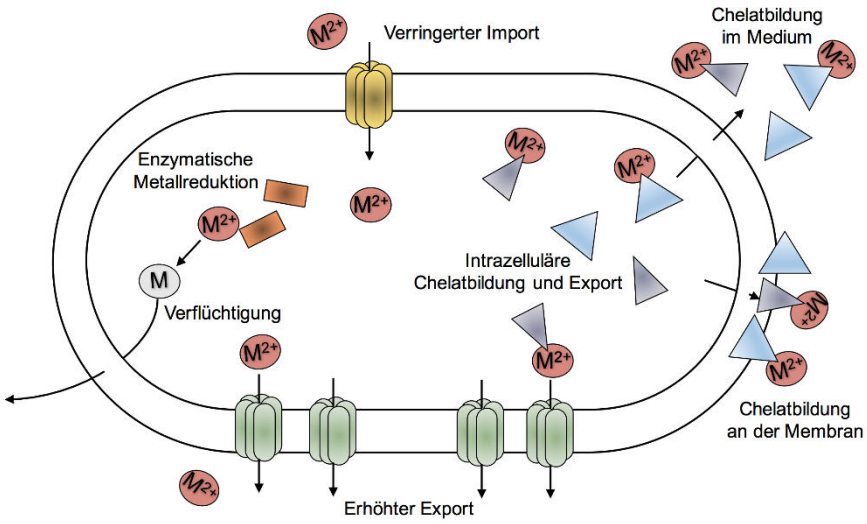


Abbildung 1. Schematische Darstellung der bakteriellen und archaealen Strategien im Umgang mit Schwermetallionen (M^{2+}). Diese umfassen eine verringerte Aufnahme und einen erhöhten Export von Metallionen über verschiedene Transportsysteme, eine enzymatische Reduktion und Verflüchtigung, die Produktion und Freisetzung von chelatbildenden Substanzen zur Chelatierung von Metallionen intrazellulär sowie an der Membran und im Medium. Verändert nach Srivastava & Kowshik (2013).

Während Untersuchungen von archaealen Resistenzmechanismen größtenteils auf thermo- und hyperthermophilen Crenarchaeota sowie methanogenen und thermophilen Euryarchaeota basieren (Coombs & Barkay, 2005, Bartolucci *et al.*, 2013), sind Metallresistenzen in halophilen Euryarchaeota bislang wenig erforscht. Aufgrund der erhöhten Schwermetallbelastung in salzreichen Regionen, welche ein natürliches Habitat halophiler Archaea darstellen, ist der Umgang dieser Organismen mit erhöhten Schwermetallkonzentrationen von besonderem Interesse. Innerhalb der halophilen Euryarchaeota stellt *Halobacterium salinarum* aufgrund einer verfügbaren Genomsequenz sowie zahlreichen Genom- und Proteom-basierten Studien

einen geeigneten Modellorganismus dar (Ng *et al.*, 2000, Klein *et al.*, 2005, Ha *et al.*, 2007, Pfeiffer *et al.*, 2008, Losensky *et al.*, 2017, Pfeiffer *et al.*, 2019).

1.2 *Halobacterium salinarum* R1 als Modellorganismus halophiler Archaea

Halobacterium salinarum R1 (DSM 671) ist ein stäbchenförmiges halophiles Archaeon aus dem Phylum der Euryarchaeota, welches erstmals 1919 als Verunreinigung auf der Oberfläche von gesalzenem Fisch isoliert wurde (Klebahn, 1919). Das Genom von *H. salinarum* R1 umfasst 2,67 Mbp, welche auf einem zirkulären Chromosom und vier Megaplasmiden (pHS1 bis pHS4) verteilt sind (Pfeiffer *et al.*, 2008). Das Chromosom umfasst 2 Mbp mit einem GC-Gehalt von 68%, wobei sogenannte AT-reiche Inseln mit einer Größe von 70 kb einen um 10% reduzierten GC-Gehalt aufweisen (Pfeifer & Betlach, 1985). Die vier Megaplasmide umfassen insgesamt 0,67 Mbp mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 59% (Pfeiffer *et al.*, 2008). Das Genom enthält 2.801 vorhergesagte Gene, von denen 2.652 Protein-kodierend sind (NCBI Datenbank, Stand 11/2019).

In der Natur kommen halophile Archaea in besonders salzreichen Habitaten wie Salzseen, Salzkristallisationsanlagen oder Salzwiesen vor (Abb. 2A), welche einen Salzgehalt bis zu einer Sättigung (5,2 M) aufweisen (Oren, 2008). *H. salinarum* gehört zu den extrem halophilen Archaea und benötigt für ein optimales Wachstum Salzgehalte von 3,5 bis 5 M NaCl (Abb. 2B)(Andrei *et al.*, 2012). Um einen isoosmotischen Ausgleich zwischen dem Cytoplasma und dem umgebenden Medium zu erreichen, werden von halophilen Mikroorganismen unterschiedliche Strategien angewandt. Eine sehr verbreitete Strategie unter halophilen Bakterien ist die Biosynthese und Akkumulation großer Mengen von organischen Verbindungen (*compatible solutes*) wie Zucker, Polyole, Aminosäuren sowie deren Derivate Glycinbetain oder Ectoin. Diese Verbindungen ermöglichen einen isoosmotischen Ausgleich der Zellen ohne dabei den pH-Wert im Cytoplasma zu beeinflussen (da Costa *et al.*, 1998). Einige Haloarchaea, darunter *H. salinarum*, nutzen für einen isoosmotischen Ausgleich die energetisch effektivere *salt-in*-Strategie, bei der im Cytoplasma Kalium- und Chloridionen akkumuliert werden (Dennis & Shimmin, 1997, Oren, 1999). Deren Proteine sind durch negative Oberflächenladungen an Hochsalzbedingungen adaptiert und denaturieren bei Salzkonzentrationen unter 0,5 bis 1 M. (Lanyi, 1974).

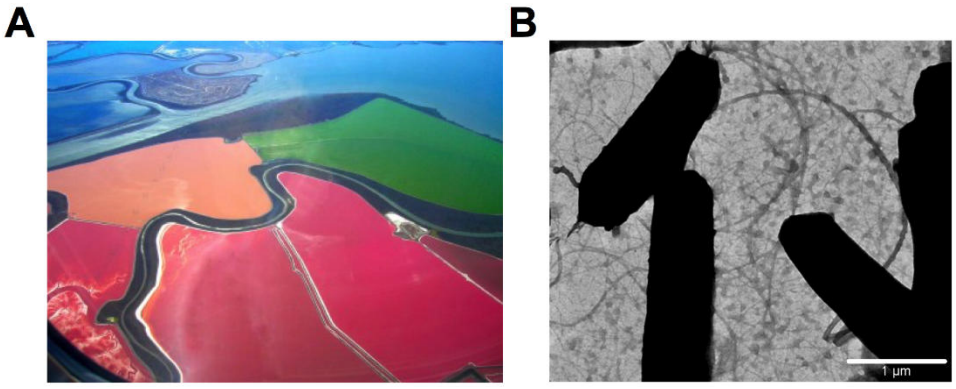


Abbildung 2. Natürliches Habitat halophiler Archaea und Morphologie von *Halobacterium salinarum*. **(A)** Salzteiche in der Bucht von San Francisco, welche durch darin lebende halophile Archaea rötlich erscheinen (Quelle: www.vaam.de). **(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von stäbchenförmigen *Halobacterium salinarum* R1 Zellen mit filamentösen Oberflächenstrukturen. Der Größenmaßstab beträgt 1 µm.

Im Allgemeinen führen Haloarchaea eine aerobe bis fakultativ anaerobe heterotrophe Lebensweise, bei der sie organische Verbindungen verwerten. In Bezug auf die Nährstoffansprüche sowie die Stoffwechselwege unterscheiden sie sich jedoch stark voneinander. So nutzen Vertreter der Gattungen *Haloferax*, *Haloarcula* oder *Halococcus* diverse Kohlenhydrate wie Hexosen, Pentosen, Sucrose oder Lactose, während *H. salinarum* nicht in der Lage ist Zucker zu verwerten und stattdessen Aminosäuren für den Stoffwechsel nutzt (Rawal *et al.*, 1988, Falb *et al.*, 2008). Zur Energieerzeugung betreibt *Halobacterium salinarum* unter aeroben Bedingungen eine oxidative Atmung unter Verwendung von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor. Bei Sauerstoffmangel werden alternative Elektronenakzeptoren wie DMSO oder TMAO zur Erzeugung eines Protonengradienten an der Membran und der Synthese von ATP genutzt (Müller & DasSarma, 2005). Eine weitere Möglichkeit der Energieerzeugung unter anaeroben Bedingungen ist die Fermentation von Arginin über den Arginin-Deiminaseweg. Hierbei wird Arginin in Ornithin und Carbamoylphosphat umgewandelt, welches weiter in Kohlendioxid und Ammoniak gespalten wird, wobei ATP entsteht (Hartmann *et al.*, 1980, Ruepp & Soppa, 1996). *H. salinarum* besitzt zudem das integrale Membranprotein Bakteriorhodopsin, welches unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen als lichtgetriebene Protonenpumpte fungiert und einen Protonengradienten an der Membran zur ATP-Synthese aufbaut (Oesterhelt, 1975). Bakteriorhodopsin macht bis zu 75% der Membrantrockenmasse aus und gehört neben Halorhodopsin und den Sensorrhodopsinen I und II zu den Retinalproteinen (Sigrist-Nelson, 1981). Hierbei fungiert Halorhodopsin als lichtgetriebene Chloridpumpe zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Salzkonzentration, während die Sensorrhodopsine I und II eine wichtige Rolle in der Lichtsensierung spielen und über Signaltransduktion die phototaktische Bewegung der Zellen beeinflussen (Krah *et al.*, 1994, Zhang *et al.*, 1996, Oesterhelt, 1998, Kolbe *et al.*, 2000).

Die Membran halophiler Archaea beinhaltet zudem Carotinoide, welche von den Zellen synthetisiert werden und ihnen ihre typisch orange-rote Färbung verleihen. In *H. salinarum* gehört das C_{50} α-Bakterioruberin mit 69% zu den dominanten Carotinoiden, welches den Zellen zusammen mit seinen Derivaten Schutz vor UV- und ionisierender Strahlung verleiht und als Radikalfänger zum Schutz vor oxidativem Stress fungiert (Shahmohammadi *et al.*, 1998, Rodrigo-Baños *et al.*, 2015). Neben der Pigmentierung als Schutz vor DNA-Schäden trägt das polyploide Genom mit einer bis zu 25-fachen Kopienzahl sowie der hohe GC-Gehalt zur erhöhten Resistenz halophiler Archaea bei (Breuert *et al.*, 2006, Jones & Baxter, 2017). Bei auftretenden DNA-Schäden sind Haloarchaea zudem in der Lage diese durch eine Vielzahl von DNA-Reparaturmechanismen wie eine Photoreaktivierung mittels Photolyasen, eine Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur oder eine homologe Rekombination zu reparieren (Woods & Dyall-Smith, 1997, DasSarma *et al.*, 2001, Baliga *et al.*, 2004, Capes *et al.*, 2011).

Zur Zellmotilität verfügt *H. salinarum* über Archaellen (archaeale Flagellen), welche unter ATP-Hydrolyse rotieren und eine schwimmende Fortbewegung im Habitat ermöglichen (Alam & Oesterhelt, 1984, Marwan *et al.*, 1991, Albers & Jarrell, 2015). Über Sensorproteine werden Licht und chemische Stimuli in der Umwelt sensiert und die Signale über gekoppelte Proteine zu den Archaellen weitergeleitet, sodass eine zielgerichtete Bewegung hin zu einer Nährstoffquelle oder orangenem Licht bzw. weg von schädlichem UV-Licht erfolgt (Marwan *et al.*, 1990, Marwan *et al.*, 1991). Bei einigen Spezies halophiler Archaea besteht zudem die Möglichkeit einer vertikalen Bewegung über die Synthese von Gasvesikeln. Diese sind proteinogene gasgefüllte Hohlstrukturen, welches sich im Cytoplasma der Zellen befinden und

den Zellauftrieb in der Wassersäule ermöglichen, um optimale Sauerstoff- und Lichtverhältnisse zu erreichen. *H. salinarum* R1 verfügt ebenfalls über die entsprechenden Gene zur Gasvesikelbildung, jedoch sind diese aufgrund eines ISH-Elements im Promotorbereich des Gens für das Hauptstrukturprotein nicht funktional (Pfeiffer *et al.*, 2008, Pfeifer, 2012). Neben der frei schwimmenden, planktonischen Lebensweise besitzen einige Haloarchaea, darunter auch *H. salinarum* R1, die Möglichkeit der Oberflächenadhäsion und Biofilmbildung, was eine sessile Lebensform in einer mikrobiellen Gemeinschaft darstellt (Fröls *et al.*, 2012).

1.3 Die sessile Lebensweise in Biofilmen

Biofilme sind mikrobielle Gemeinschaften aus homogenen oder heterogenen bakteriellen und archaealen Spezies, welche sich an Grenzflächen wie Gesteinen oder der Oberfläche von Pflanzen in aquatischen Habitaten bilden (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). In der Natur befinden sich schätzungsweise 40-80% der Zellen auf der Erde in Biofilmen. Sie stellen die Hauptform des aktiven bakteriellen und archaealen Lebens dar und sind der Antrieb aller biogeochemischer Prozesse (Flemming & Wuertz, 2019).

Die Biofilmbildung lässt sich im Allgemeinen in fünf Phasen einteilen (Abb. 3) (Sauer *et al.*, 2002, Stoodley *et al.*, 2002). In den ersten zwei Phasen erfolgt zunächst eine reversible Adhäsion auf der Oberfläche mittels adhäsiven Oberflächenstrukturen, welche in einen irreversiblen Zustand übergeht (Abb. 3). In Archaea wurden verschiedene filamentöse Oberflächenstrukturen identifiziert, welche in der Zelladhäsion involviert sind. Diese werden als Typ IV Pili und Typ IV Pili-ähnliche Strukturen bezeichnet, zu denen auch Archaellen (archaeale Flagellen) gehören (Jarrell & Albers, 2012). Die Adhäsion beruht nicht auf einem einheitlichen Prozess und unterscheidet sich unter den archaealen Spezies. So sind in *Methanococcus maripaludis* und *Sulfolobus solfactorius* sowohl Pili als auch Archaellen an der Adhäsion beteiligt, während die Adhäsion bei *Pyrococcus furiosus* ausschließlich von Archaellen vermittelt wird (Näther *et al.*, 2006, Zolghadr *et al.*, 2010, Jarrell *et al.*, 2011). Im Fall der halophilen Archaea zeigten Gendeletionsstudien mit *Haloferax volcanii* und *Halobacterium salinarum* R1, dass Typ IV Pili-ähnliche Strukturen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion spielen, während Archaellen nicht an der Adhäsion beteiligt sind (Tripepi *et al.*, 2010, Losensky *et al.*, 2015).

Die Phasen drei und vier der Biofilmbildung umfassen eine Aggregation der Zellen zu Mikrokolonien und das anschließende Wachstum und die Reifung des Biofilms (Abb. 3). In diesen Stadien produzieren Mikroorganismen eine extrazelluläre Matrix aus Biopolymeren wie Polysaccharide, Proteine, Glykoproteine, Lipide und Nukleinsäuren. Diese Bestandteile werden nach außen geschleust und bilden zusammen mit eingelagerten organischen und anorganischen Partikeln aus der Umgebung die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), welche die Zellen umgeben und sie von der Umwelt abschließen (Davey & O'Toole, 2000, Flemming & Wingender, 2010). Bezogen auf die Trockenmasse stellen die EPS mit einem Anteil von 85-95% den Hauptbestandteil des Biofilms dar und nehmen eine wichtige Funktion in dessen Stabilisierung sowie der dreidimensionalen Architektur ein (Flemming *et al.*, 1996, Flemming & Wingender, 2002). So zeigen Biofilme in Abhängigkeit von der mikrobiellen Spezies und der EPS-Zusammensetzung charakteristische Architekturen, welche unter anderem als eben, filamentös, pilzartig oder turmförmig beschrieben werden (Stewart *et al.*, 1993, Stoodley *et al.*, 2002, Flemming & Wingender, 2010, Harmsen *et al.*, 2010, Fröls *et al.*, 2012). In der fünften Phase erfolgt aufgrund von Nährstoffmangel oder verschlechterten

Umweltbedingungen ein Auflösen des Biofilms, wobei die Zellen sich von der Oberfläche ablösen und neue Habitate zur Besiedlung aufsuchen (Abb.3) (O'Toole *et al.*, 2000, Donlan, 2002, Gjermansen *et al.*, 2005).

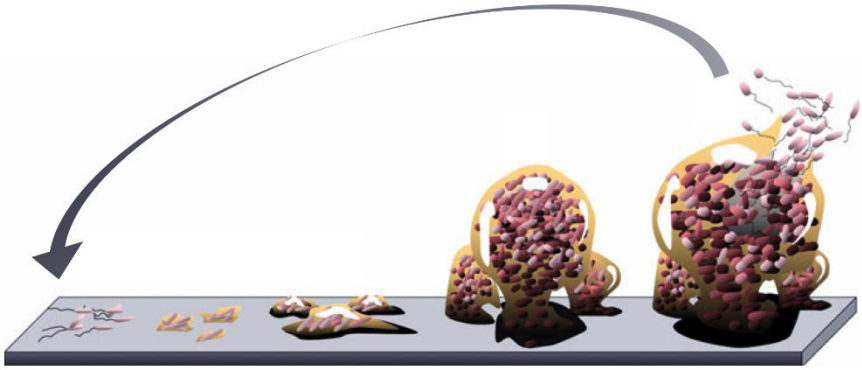


Abbildung 3. Entwicklungsphasen der Biofilmbildung. Phase 1: Reversible Adhäsion, Phase 2: Irreversible Adhäsion und Beginn der EPS-Produktion, Phase 3: EPS-Produktion und Zellproliferation, Phase 4: Bildung von Mikrokolonien und Biofilmreifung, Phase 5: Biofilmdispersion. Verändert nach Unosson (2015).

Während dieser Phasen spielt die mikrobielle Kommunikation über Quorum sensing eine wichtige Rolle, um die Zelldichte der Population zu messen. Hierbei werden kleine Signalmoleküle von den Mikroorganismen freigesetzt, wobei die Konzentration der Signalmoleküle in Abhängigkeit von der Zelldichte steigt. Die Mikroorganismen sensieren die Konzentration und reagieren ab einem gewissen Schwellenwert mit Veränderungen der Genexpression, welche eine Vielzahl von physiologischen Aktivitäten beeinflusst. So zeigten Untersuchungen der Biofilmbildung in *Pseudomonas aeruginosa* zwischen den fünf Phasen einen durchschnittlichen Unterschied von 35% in der nachweisbaren Proteinregulation, wobei die stärksten Unterschiede bei der Motilität, Alginatproduktion und Quorum sensing beobachtet wurden. Zwischen planktonischen Zellen und Biofilmzellen zeigten über 50% der Proteine eine mindestens sechsfache Veränderung der Abundanz, was darauf schließen lässt, dass die Biofilmbildung eine fundamentale Änderung der Lebensweise bedeutet (Sauer *et al.*, 2002). Dies wurde ebenfalls in einer quantitativen Proteomstudie mit *H. salinarum* R1 gezeigt, wobei 60,8% der quantifizierten Proteine (34,5% des Proteoms) signifikante Veränderungen der Abundanz zwischen planktonischen Zellen und Biofilmzellen aufwiesen (Losensky *et al.*, 2017). Hierbei wurden die stärksten Effekte bei Proteinen beobachtet, welche an der Energieumwandlung sowie dem Metabolismus von Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden beteiligt sind. Ebenso zeigten Proteine im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese und zellulären Prozessen wie Zellmotilität und Signaltransduktion starke Unterschiede zwischen den beiden Zuständen (Losensky *et al.*, 2017).

Im Vergleich zur planktonischen Lebensweise bietet die sessile Lebensform in Biofilmen den Mikroorganismen viele Vorteile. Da die Zellen durch die EPS von der Umwelt abgeschlossen sind, herrscht innerhalb des Biofilms ein Mikrohabitat, in dem durch die Anreicherung von Biopolymeren ein erhöhtes Angebot von Nährstoffen besteht sowie Wasser zum Schutz vor dem Austrocknen gespeichert wird (Donlan, 2002, Flemming *et al.*, 2007). Durch diverse Stoffwechselprozesse unterschiedlicher Spezies entsteht zudem eine Vielzahl von Abbauprodukten, welche als lokale Zellnischen für die Ansiedlung weiterer Organismen dienen, was zu einer Erweiterung der genetischen Variabilität innerhalb des Biofilms führt (Elias & Banin, 2012). Die hohe Populationsdichte von bis zu 10^{12} Zellen/mL bietet optimale

Bedingungen für einen horizontalen Gentransfer unter verschiedenen Spezies (Donlan, 2002). Dies geschieht über einen direkten Zell-Zell-Kontakt, einen Bakteriophagen-vermittelten DNA-Transfer oder über die Aufnahme von freier DNA in den EPS und kann zur Erlangung neuer Resistenzen führen (Madsen *et al.*, 2012). Zudem bietet die Lebensweise im Biofilm einen erhöhten Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen und vermittelt den Zellen erhöhte Resistenzen gegenüber der planktonischen Lebensweise.

1.4 Biofilme vermitteln erhöhte Resistenzen

Der Prozess der Biofilmbildung als Reaktion auf schädliche Umwelteinflüsse stellt einen wichtigen Resistenzmechanismus von Mikroorganismen dar, um in ihrem Habitat überleben zu können. Im Jahr 1988 wurde erstmals beobachtet, dass subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika zu einer erhöhten Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis* führten (Schadow *et al.*, 1988). Heute gibt es zahlreiche Studien, die eine induzierte Biofilmbildung als Reaktion auf Stressfaktoren beobachtet haben. Hierbei führten neben der Zugabe von Antibiotika auch weitere Agenzien wie Schwermetallionen, Chlor oder Natriumchlorid zu einer vermehrten Zellaggregation und Biofilmbildung in bakteriellen und archaealen Spezies (Lapaglia & Hartzell, 1997, Kaplan, 2011, Cusick *et al.*, 2017, Philips *et al.*, 2017)

Eine wichtige Rolle in der Biofilm-vermittelten Resistenz spielen die EPS, in welche die Zellen eingebettet sind (Abb. 4). Sie dienen als schützende Barriere, welche das Eindringen von schädlichen Substanzen verhindert oder verzögert. Die EPS weisen eine Vielzahl von chemischen Funktionsgruppen wie Carboxylat,- Phosphat, Amino- oder Hydroxylgruppen auf, welche als elektrostatische Bindungsstellen für Ionen oder polare Substanzen aus der Umwelt dienen. Da die Anzahl der Bindungsstellen in den EPS im Vergleich zur Zelloberfläche etwa 20- bis 30-fach erhöht ist, wird der Großteil schädlicher Substanzen bereits von der extrazellulären Matrix abgefangen (Liu & Fang, 2002)(Abb. 4). So zeigten Untersuchungen der Diffusionsrate von Kupferionen einen sechsfach erhöhten Verzögerungsfaktor in *E. coli* Biofilmen im Vergleich zu Zellsuspensionen (Hu *et al.*, 2007). Zudem wurde in *Enterobacter cloaceae* Biofilmen eine starke Chelatbildung der EPS mit Metallionen nachgewiesen, wodurch die Cadmium- und Kupferbelastung auf 65 bzw. 20% reduziert wurde (Iyer *et al.*, 2005). EPS-Moleküle dienen ebenfalls als Schutz vor einem Befall mit Bacteriophagen. So wurde im Fall von *E. coli* Biofilmen gezeigt, dass Curli-Fasern als Bestandteil der äußeren EPS-Schichten einerseits das Eindringen von T7-Phagen in den Biofilm verhindern. Zudem unterbinden sie die Anheftung an Einzelzellen, indem sie die Zelloberfläche mit einem dichten Fasernetzwerk beschichten und Phagenpartikel binden (Vidakovic *et al.*, 2018). Des Weiteren produzieren und exportieren Biofilmzellen diverse Biozid-abbauende Enzyme wie β-Lactamasen, welche in den EPS in hohen Mengen angereichert werden (Abb. 4). Dies wurde mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen gezeigt. Hierbei führte die Zugabe des Antibiotikums Ceftazidim ausschließlich in Biofilmzellen, welche in der Peripherie von Mikrokolonien lokalisiert waren, zu einer induzierten Promotoraktivität des β-Lactamasegens (Bagge *et al.*, 2004). Zudem zeigten Gendeletionsstudien mit *Klebsiella pneumoniae* eine geringe Penetration von Ampicillin in Wildtyp Biofilmen, während bei β-Lactamase-Deletionsmutanten ein schnelles Eindringen beobachtet wurde (Anderl *et al.*, 2000).

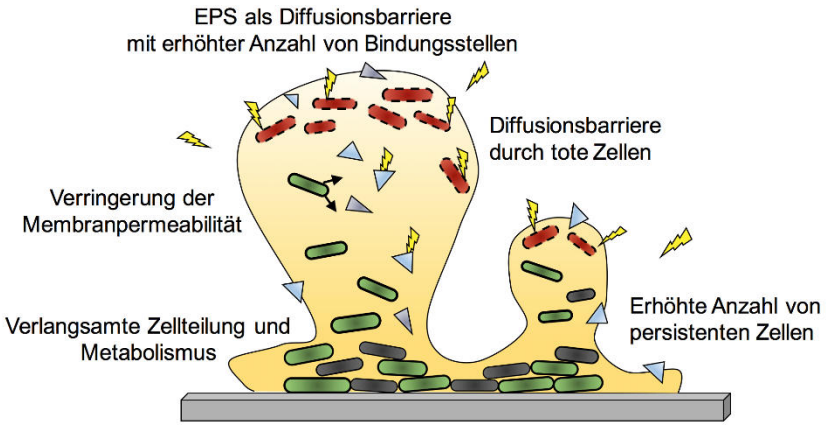


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Resistenzmechanismen in Biofilmen. Als Diffusionsbarriere dienen die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) sowie tote Zellen in der Peripherie von Mikrokolonien. Biofilmzellen produzieren und exportieren erhöhte Mengen detoxifizierender Substanzen und weisen eine verringerte Membranpermeabilität und eine Verlangsamung der Teilungsrate und des Metabolismus auf. Persistente Zellen sind hoch tolerant und sichern das Überleben der Biofilmpopulation bei Umweltstress.

Neben den EPS-Bestandteilen zum Schutz vor äußeren Einflüssen tragen die Zellen des Biofilms ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz bei (Abb. 4). Zum einen führt die hohe Zelldichte im Biofilm zu einem passiven Schutz, da Zellen in der Peripherie als Diffusionsbarriere dienen. Hierbei stellen tote Zellen eine chemisch reaktive Biomasse dar und bieten Bindestellen für Metallionen oder andere polare Substanzen, sodass die Zellen im inneren Kern des Biofilms geschützt sind (Harrison *et al.*, 2007). Darüber hinaus weisen Biofilmzellen unterschiedliche Resistenzmechanismen auf, welche durch Stressfaktoren induziert werden (Abb. 4). Hierzu zählt zum Beispiel eine veränderte Zusammensetzung der Membranproteine, um die Permeabilität der Membran zu verringern oder vermehrt schädliche Substanzen an der Oberfläche zu binden (Jaffe *et al.*, 1982, Langley & Beveridge, 1999). Des Weiteren bilden Biofilmzellen eine Vielzahl von Exportpumpen, welche diverse antimikrobielle Agenzien nach außen befördern und den Zellen somit eine multiresistente Eigenschaft verleihen (Matsumura *et al.*, 2011). Biofilmzellen weisen im Vergleich zu planktonischen Zellen zudem eine geringere Wachstumsrate und einen verlangsamten Stoffwechsel auf, wodurch sie weniger anfällig sind (Abb. 4). Zum Beispiel wirken Penicillin und Ampicillin nur bei sich teilenden Zellen letal, während die Wirkung von Cephalosporinen oder Aminoglykosiden auch bei nicht wachsenden Zellen zum Zelltod führt, wobei schnell teilende Zellen deutlich effektiver abgetötet werden (Evans *et al.*, 1991, Costerton *et al.*, 1999, Lewis, 2001). Darüber hinaus befinden sich im Biofilm etwa 0,1 bis 10% persistente Zellen, welche in einem reversibel stillgelegten Zustand verweilen und erhöhte Toleranzen aufweisen (Harrison *et al.*, 2005b)(Abb. 4). Im Vergleich zu exponentiell wachsenden Zellpopulationen werden im Biofilm 100 bis 10.000-mal mehr persistente Zellen gebildet, welche das Überleben der Biofilmpopulation unter Umweltstress ermöglichen (Spoering & Lewis, 2001). Neben zahlreichen Untersuchungen in Biofilmen bakterieller Spezies wurden persistente Zellen auch in archaealen Spezies nachgewiesen (Harrison *et al.*, 2005a, Lewis, 2007). So zeigten Untersuchungen von *Haloferax volcanii* Biofilmen die Bildung von persistenten Zellen als Reaktion auf oxidativen Stress und Nährstoffmangel, was einen ersten Einblick in die Biofilm-vermittelte Resistenz in Haloarchaea bietet (Megaw & Gilmore, 2017). Weitere Untersuchungen der Resistenz halophiler Archaea basieren ausschließlich auf Analysen planktonischer Zellen, während die Stressreaktion von Biofilmzellen bislang weitestgehend unbekannt ist (Wang *et al.*, 2004, Kaur *et al.*, 2006).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Um die physiologischen und molekularen Auswirkungen von Schwermetallionen auf halophile Archaea aufzuklären, sollten in dieser Arbeit umfassende Analysen auf zellulärer und molekularer Ebene am Beispiel von *Halobacterium salinarum* R1 erfolgen. Aufgrund der vorherrschenden Lebensform von Biofilmen in natürlichen Habitaten sollte ein besonderer Fokus auf die Biofilmbildung und die Reaktion von Biofilmen in Gegenwart von Metallionen gelegt werden. Vorangegangene Untersuchungen des Wachstums und der Adhäsion in Anwesenheit verschiedener Schwermetalle zeigten besonders signifikante Effekte in Gegenwart der zweiwertigen Kupfer- und Nickelionen, weshalb diese Metalle in der vorliegenden Arbeit zur Verursachung von Metallionenstress in *H. salinarum* R1 verwendet wurden (Völkel, 2013, Völkel, 2015).

Im ersten Teil dieser Arbeit **(Kapitel III)** sollten die physiologischen Auswirkungen von Kupfer- und Nickelionen auf planktonische Zellen und Biofilme untersucht werden. Zur Charakterisierung von *H. salinarum* R1 unter Standardbedingungen sollten zunächst mikroskopische Untersuchungen und Bestimmungen der Generationszeit in Zellsuspensionen und Biofilmen erfolgen. Um den Einfluss einer Metallionenexposition zu untersuchen, sollten Analysen des planktonischen Wachstums sowie quantitative Messungen der Zelladhäsion in Gegenwart von verschiedenen Kupfer- und Nickelkonzentrationen erfolgen und darüber hinaus der Einfluss einer temporären Behandlung mit wachstumsinhibierenden Metallionenkonzentration durch Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie untersucht werden. Zur Überprüfung der Zellschädigung durch Metallionen sollte die Zellvitalität in planktonischen Zellen und Biofilmen mittels PMA-qPCR analysiert werden. Um die Funktion der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bei Metallionenstress in Biofilmen zu untersuchen, sollten darüber hinaus Analysen der EPS-Zusammensetzung in unbehandelten sowie in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Biofilmen erfolgen, wofür zunächst eine geeignete Methode zur Isolierung der EPS in *H. salinarum* Biofilmen etabliert werden sollte. Für einen Vergleich der Metallionenbelastung von planktonischen Zellen und Biofilmzellen sollte zudem der zelluläre Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Gehalt mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit **(Kapitel IV)** sollten die beobachteten physiologischen Auswirkungen von Kupfer- und Nickelionenstress auf molekularer Ebene analysiert werden. Hierzu sollten zunächst die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinmuster von Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Zelllysaten mit denen von unbehandelten Zellen verglichen werden. Im nächsten Schritt sollte eine quantitative Proteomanalyse von Kupfer- und Nickelionen-behandelten Zellen im Vergleich zu jeweils unbehandelten Zellen erfolgen. Hierbei sollte sowohl das Proteom von planktonischen Zellen als auch von Biofilmen nach einer temporären Metallionenbehandlung untersucht werden. Zur Validierung der Proteomdaten sollten zusätzliche Untersuchungen der Genexpression mittels qRT-PCR erfolgen.

Im dritten Teil dieser Arbeit **(Kapitel V)** sollten basierend auf den Ergebnissen der Proteom- und Genexpressionsstudie Gendeletionsmutanten hergestellt werden. Diese sollten nachfolgend physiologisch im Hinblick auf die Funktion der Genprodukte unter Metallionenstress von planktonischen Zellen und Biofilmen untersucht werden, um erste Hinweise auf Stressmechanismen auf molekularer Ebene zu erhalten.

Kapitel II

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-Phenylphenol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-Galactosid (X-β-Gal)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt
Acridinorange	Merck KGaA, Darmstadt
Acrylamidlösung Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose ME	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
ε-Aminocapronsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BisTris	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid (-Dihydrat)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Concanavalin A Alexa Fluor™ 647 Konjugat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Roti Blue, kolloidal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
D-Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
D-Glucuronsäure Natriumsalz (-Monohydrat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumtetraborat (-Decahydrat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DNA-Exitus Plus IF	AppliChem, Darmstadt
Dodecylmaltosid (DDM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Entwicklerlösung, GBX Developer and Replenisher	Carestream Dental Germany GmbH, Stuttgart
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Fixierungslösung, GBX Fixer and Replenisher	Carestream Dental Germany GmbH, Stuttgart
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd (37%)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Formamid	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Glutaraldehyd (25%)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt, granuliert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Iodacetamid	AppliChem, Darmstadt
Isoproylalkohol (2-Propanol)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kupfersulfat (-Pentahydrat)	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Agar Festmedium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (-Hexahydrat)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Magnesiumsulfat (-Heptahydrat)	AppliChem, Darmstadt
Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mevinolin	Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA
Natriumacetat (-Trihydrat)	LS Labor-Service GmbH, Griesheim
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumtartrat (-Dihydrat)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat (-Pentahydrat)	Merck KGaA, Darmstadt
Nickelsulfat (-Hexahydrat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Oxoid™ Pepton	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Paraformaldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol (H_2O-gesättigt)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Polyethylenglykol 600	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Propidiumiodid	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Propidiummonoazid (PMA)	Biotium, Fremont, California, USA
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Salpetersäure	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure, rauchend (37%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schwefelsäure, (96%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sulfaminsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Uranylacetat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Wasser (HPLC-Grade)	VWR International GmbH, Darmstadt

2.1.2 Mikroorganismen

Halobacterium salinarum R1/ DSM 671	Pfeiffer *et al.* (2008)
Escherichia coli TOP10F'	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt

2.1.3 Enzyme und Kits

DIG DNA Labeling Mix (10x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase I (RNase-frei)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Dream*Taq*™ DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I	Omega Bio-tek, Norcross, Georgia, USA
GeneElute™ PCR-Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Phototope®-Star Detection Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Q5®High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
RevertAid™ Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
RNase A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (2x)	Bioline GmbH, Luckenwalde
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

2.1.4 Molekulare Größenstandards

EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
SERVA Native Marker Liquid Mix	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'-3')	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'-3')
Generierung von Gendeletionsmutanten			
US-OE2042F-FWD*	agtccatggcgtgctcacgcagtcgatgacg	US-OE4544R-FWD*	agtccatggcgtacatcaggtcgtcgagttc
US-OE2042F-REV*	ccacaccccggcactgaagactacggcatcccg	US-OE4544R-REV*	ggtagacgcgcatcgtgagtgtcaccatccctc
DS-OE2042F-FWD	agtcttcagtgccggggtgtggcggcgcgaa	DS-OE4544R-FWD	acactcacgatgcgcgtctacccggaggacgc
DS-OE2042F-REV	tgatctagagctgtgagagccgggagttctc	DS-OE4544R-REV	agttctagacgtcgttcagccggatcgccatc
US-OE2044F-FWD	agtccatggcgacaacgaacgcaccgcgcg	US-OE4612F-FWD*	tgaccatgggatcgtgatctcgtggtgcacc
US-OE2044F-REV	gactggcggccgcgaccggcgctactcgatcaa	US-OE4612F-REV*	cgtccggtcgacccactcgccaggacagtgtac
DS-OE2044F-FWD*	agcgccggtcgcggccgccagtcaccgtttgtgc	DS-OE4612F-FWD	tggcgagtgggtcgaccggacgcgattctgactg
DS-OE2044F-REV*	tgatctagacgcactcaccgaactcggtcag	DS-OE4612F-REV	agtaagcttggacccgagcagggtcttgccg
US-OE3050F-FWD	tgactgcagcgtcagcggggaccaattcagg	US-OE5146R-FWD	agtctgcagaacctcaccgaggggttcgttc
US-OE3050F-REV	gccaccatccgatgtcttggatccggtactagtttcg	US-OE5146R-REV	cacgtccgtcatcgaagttcctccatgtggcgttc
DS-OE3050F-FWD*	atccaagacatcggatggtggctgcgcggctc	DS-OE5146R-FWD*	aggaacttcgatgacggacgtgatcgtccagcc
DS-OE3050F-REV*	tgatctagatcgacttcatcccggatctcgtcg	DS-OE5146R-REV*	tgatctagaatggcggcgctgtcggtggaga
US-OE3125R-FWD*	agtccatggggtcggcggtcgtgtcgtcgtt	US-OE5245F-FWD*	agtccatggcgtcgaaatggtcgaaacgacc
US-OE3125R-REV*	gcgtggcgtgggcgttgccgtacgtgggcgatg	US-OE5245F-REV*	tgtggtcgccgagaccccacggtcggttcgtaa
DS-OE3125R-FWD	tacggcaacgcccacgccacgccggacagcccg	DS-OE5245F-FWD	ccgtggggtctcggcgaccacaccgtagttagt
DS-OE3125R-REV	tgatctagaccgaacgcttcccgttcgtgatcc	DS-OE5245F-REV	tgaaagcttcccactccacacgcttgttccg
US-OE3221F-FWD*	agtccatgggcccagccacgaggtccgcgag	US-OE5246R-FWD*	agtctgcaggatcacttgcccggagtcgctt
US-OE3221F-REV*	ttcgtggcaggggcgcgtcgacctccggcagcg	US-OE5246R-REV*	ccacaccgtagtacggtagtatacagcaatccatc
DS-OE3221F-FWD	gtcgacgcgcccctgccacgaactcgaagcactgc	DS-OE5246R-FWD	atactaccgtactacggtgtggtcgccgttacg
DS-OE3221F-REV	tgatctagacgccggcgttccgccagcgctc	DS-OE5246R-REV	tgatctagacgaaaggaatgcgccagcgcct
US-OE4427R-FWD	agtccatggcgacgatgtcggcgcctcgttc	US-OE6177F-FWD	agtctgcagccaacccacgtcaggatctattaa
US-OE4427R-REV	ttctcgccggcaacgattacacgttggaccgcc	US-OE6177F-REV	aaaccgggaagccgtctctttgccttctactgg
DS-OE4427R-FWD*	gtgtaatcgttgccggcgagaacccaccactgt	DS-OE6177F-FWD*	caaagagacggcttcccggttttcagcgatcag
DS-OE4427R-REV*	tgatctagacgttggtcgtgatgacgaccgtt	DS-OE6177F-REV*	tgatctagatggggtcgtctaccgcttgcag
Screening nach Gendeletionsmutanten			
SEQ-OE2042F-FWD	gatctggctggtgaacacgtgca	SEQ-OE4544R-FWD	ggctaaccaccgtgctcgatcg
SEQ-OE2042F-REV	ctcgatccggtcgacgaagaagc	SEQ-OE4544R-REV	ccgtcgactcctcgatcgcgta
SEQ-OE2044F-FWD	gcagtcgatgccttcgagaacgt	SEQ-OE4612F-FWD	ctcgaacgcagcgtggctgtgaccg
SEQ- OE2044F-REV	cgtcgttggtcgggaagaaatggc	SEQ-OE4612F-REV	cacggagaggcggcgcaggagc
SEQ-OE2816F-FWD	cggcctccacgacgacttagac	SEQ-OE5146R-FWD	tgaccgcgcaatcgaatcactgg
SEQ-OE2816F-REV	cggacccgattccgatcgtaatg	SEQ-OE5146R-REV	cgttgaaactgcgagcgacctgt
SEQ-OE3050F-FWD	ccacgaaggcatccgggagatg	SEQ-OE5245F-FWD	cgagatcgaacagatgatcgtcg
SEQ-OE3050F-REV	cagatcgtcttccccagcagtctg	SEQ-OE5245F-REV	cgtcccactccacacgcttgtt
SEQ-OE3125R-FWD	cggtcgagcgcgtccaagtg	SEQ-OE5246R-FWD	gatggttcccgtcgtcacgtcgatc
SEQ-OE3125R-REV	gcctctgtgagctggttgctgg	SEQ-OE5246R-REV	cgtcaatcttcgggctggatgtacg
SEQ-OE3221F-FWD	cgaatgaccgccgacgacatcac	SEQ-OE6177F-FWD	actgcgcagatgaccatcaggag
SEQ-OE3221-REV	gtggcgacatccacgacgaacg	SEQ-OE6177F-REV	cgcgagagctgattatccgcaac
SEQ-OE4427R-FWD	ggctagtcgcgtgagacgtg		
SEQ-OE4427R-REV	cctgtgcctcgtcgagcagag		
Sonden-PCR			
Sonde-OE2816F-FWD	cgattcctctcgacgacgtgcc		
Sonde-OE2816F-REV	cgcggtagccgagcttgagatc		
Sonde-OE6177F-FWD	actggattccagcgggacatct		
Sonde-OE6177F-REV	ttactcgctgaggtcgacgtac		
pMKK100 Sequenzierung			
pMKK100-Seq-FWD	gtctgagcaccgattgatatcc		
pMKK100-Seq-REV	cacctgtgggtcgcgtttatt		

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'-3')	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5'-3')
qRT-PCR			
OE4485R-qPCR-fwd	cggctcgctgattatttcgc	OE4552F-qPCR-fwd	gttctcgacgttcctggga
OE4485R-qPCR-rev	ctccatgactccctcgatgc	OE4552F-qPCR-rev	ccaacaggagcgtgtcaac
OE4555F-qPCR-fwd	cgacatcttcaagcgcacg	OE4576F-qPCR-fwd	gacctcgatccggacgtcta
OE4555F-qPCR-rev	ctgtagtacgccgcgatgat	OE4576F-qPCR-rev	cgttgggtgaggaagtcgat
OE5146R-qPCR-fwd	gaatgacaccacaccacgac	OE5245F-qPCR-fwd	ccgcgagcatatcacatacg
OE5146R-qPCR-rev	cgcaagggagatgtcttcga	OE5245F-qPCR-rev	cgcattcctttcgagtagcc
OE2042F-qPCR-fwd	gacaccttcctgttcgggg	OE2044F-qPCR-fwd	ttgtgagggctgtgaagaca
OE2042F-qPCR-rev	gttgctgagaaacgaccgc	OE2044F-qPCR-rev	ctccatccacggtcacagt
OE3453R-qPCR-fwd	tcggtttcacactccacgt	OE3668F-qPCR-fwd	gtacgacacgaccctggag
OE3453R-qPCR-rev	gagagacgtacgctgagagg	OE3668F-qPCR-rev	gctccccatcacgatcttgt
OE4544R-qPCR-fwd	tcggaggatttcgaccagatc	OE4427R-qPCR-fwd	ctacggggacatcatcgagg
OE4544R-qPCR-rev	gaggttcgggagttcaacaac	OE4427R-qPCR-rev	tccaggtagtgctcgatgtg
flaI-qPCR-fwd	acgtccaggagcgcatcct	OE4612F-qPCR-fwd	caactgctggtcgttctcct
flaI-qPCR-rev	acttgtcgtcggagatgcgaa	OE4612F-qPCR-rev	gtgttcgcgtagaggtcga
rpoB1-qPCR-fwd	gtcctacgaggggttcaaca	flgB1-qPCR-fwd	caaccgcatcaacatcgtct
rpoB1-qPCR-rev	ctcgtacgtgcggaagaaat	flgB1-qPCR-rev	gaggttgatgttgtcggctc
PMA-qPCR			
16S-PMA-qPCR-fwd	cgttgagtccaattaaaccgc		
16S-PMA-qPCR-rev	gcgcgaaacctttacactgt		

*Zusätzliche Verwendung zur Sondenherstellung bei der Southern-Analyse.

2.1.6 Puffer und Lösungen

Agarosegelelektrophorese

50x TAE-Puffer		**10x DNA-Auftragspuffer**	
Tris	2 M	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Essigsäure	1 M	Sucrose	50% (w/v)
EDTA	50 mM	EDTA	100 mM
	pH 8,0		pH 8,0

SDS-PAGE

10x Kathodenpuffer		**10x Anodenpuffer**	
Tris/HCl	1 M	Tris/HCl	2 M
Tricin	1 M		pH 8,9
SDS	1% (w/v)		
	pH 8,45		
3x SDS-Probenauftragspuffer		**3x Schägger Gelpuffer**	
Tris/HCl	125 mM	Tris/HCl	3 M
Glycerin	20% (w/v)	SDS	0,3% (w/v)
SDS	4% (w/v)		pH 8,45
Bromphenolblau	0,2% (w/v)		
β-Mercaptoethanol	10% (v/v)		
	pH 6,8		

Southern-Analyse

20x Kochsalz Natriumcitrat (SSC)-Puffer

Natriumchlorid	3 M
Natriumcitrat	0,3 M
	pH 7,0

DIG-Puffer 1

Maleinsäure	0,1 M
Natriumchlorid	0,15 M
	pH 7,5

Detektionslösung A

SDS	5% (w/v)
Natriumchlorid	125 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	17 mM
Natriumhydrogenphosphat	8 mM
	pH 7,2

Detektionslösung C

Tris/HCl	10 mM
Natriumchlorid	10 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
	pH 9,5

DIG-Puffer 2

Blockreagenz	1% (w/v) in DIG-Puffer 1

DIG-Waschpuffer

Tween 20	0,3% (w/v) in DIG-Puffer 1

DNA-Hybridisierungslösung

Formamid	50% (v/v)
SSC-Puffer	5x
Blockreagenz	2% (v/v)
Lauroylsarcosin	0,1% (w/v)
SDS	0,02% (w/v)

***Stripping*-Lösung**

Natriumhydroxid	0,2 M
SDS	0,1% (w/v)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* TOP10F'-Flüssigkulturen erfolgte aerob in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,2) bei 37°C und 180 rpm. Zur Selektion wurde dem Medium 100 μg/mL Ampicillin zugegeben. Die Kultivierung von *E. coli* Kolonien auf LB-Festmedium (LB-Medium mit 1,5% Agar [w/v]) erfolgte ebenfalls mit gleicher Ampicillinkonzentration bei 37°C.

2.2.2 Kultivierung von *Halobacterium salinarum*

Halobacterium salinarum R1 (DSM 671) wurde aerob in Komplexmedium (4,3 M NaCl, 81 mM $MgSO_4$, 27 mM KCl, 1,5% Oxoid Pepton, 50 mM Tris/HCl pH 7,5) bei 37°C kultiviert. Zur Inokulation von planktonischen und adhärenten Zellkulturen wurde eine Übernachtkultur mit einer optischen Dichte von 0,3 bei 600 nm (OD_{600}) verwendet. Die Anzucht planktonischer Zellen erfolgte schüttelnd (180 rpm) mit einer initialen OD_{600} von 0,02. Biofilme wurden stehend in Petrischalen (150/20 mm, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) mit einer initialen OD_{600} von 0,003 angezogen. Die Zugabe von Kupfer- bzw. Nickelionen erfolgte im Fall von planktonischen Zellen bei OD_{600} 0,3 (finale Konzentrationen: 5 mM Cu^{2+}, 15 mM Ni^{2+}) und bei Biofilmen nach 14 Tagen Kultivierung (finale Konzentrationen: 5 mM Cu^{2+}, 40 mM Ni^{2+}). Nach der Zugabe wurden die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Für das Ablösen von Biofilmen für weitere Analysen wurde das Medium vorsichtig entfernt, die Schalen wurden dreimal mit Basalsalzlösung (4,3 M NaCl, 81 mM $MgSO_4$, 27 mM KCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5) gewaschen und die Biofilme wurden mechanisch mit einem Spatel von der Oberfläche abgelöst.

2.2.3 Fluoreszenz-basierte Quantifizierung adhärenter Zellen

Die Untersuchung der Zelladhäsion unter Einfluss von Schwermetallionen erfolgte mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest in 24-Kavitäten-Mikrotiterplatten. Pro Kavität wurden 2 mL Komplexmedium mit 20 μL Zellkultur (OD_{600} 0,3) inokuliert und die Platten wurden stehend bei 37°C inkubiert. Zur Untersuchung der initialen Adhäsion in Gegenwart von Metallionen wurden die Zellen in Komplexmedium mit Kupfer- bzw. Nickelionen sowie in Komplexmedium ohne Metallionenzugabe für 13 Tage angezogen. Für die Untersuchung des Einflusses von Metallionen auf die Adhäsion reifer Biofilme wurden Kupfer- bzw. Nickelionen nach 14 Tagen Kultivierung in Komplexmedium zu den Kavitäten hinzugegeben und die Platten für weitere 24 h inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Färbung der Zellen mit dem Membran-permeablen und DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange (Merck KGaA, Darmstadt) in finaler Konzentration von 1 μg/mL für 15 min im Dunkeln. Zur Entfernung planktonischer Zellen wurde der Überstand in den Kavitäten abgegossen und die anhaftenden Zellen wurden jeweils dreimal mit Basalsalzlösung gewaschen. Die Messung des Fluoreszenzsignals adhärenter Zellen erfolgte mit einem FLA-5000 Phosphorimager (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japan) bei einer Wellenlänge von 473 nm und der Image Reader FLA-5.000 Software (Version 1.0). Zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten in *Light Absorbing Units* pro mm^2 (LAU/mm^2) wurde die Image Gauge Software (Version 4.23) verwendet.

2.2.4 Metallionen-Sensitivitätstest

Die Sensitivität von *H. salinarum* gegenüber Kupfer- und Nickelionen wurde mit einem Hemmhoftest auf Festmedien untersucht. Hierzu wurden 100 mL Weichmedium (Komplexmedium mit 1% [w/v] Agar) mit 1 mL *H. salinarum* R1 Übernachtkultur (OD_{600} 0,5) beimpft und auf Agarplatten mit Festmedium (Komplexmedium mit 1,5% [w/v] Agar) gegossen. Nach Aushärten des Weichagars wurden in Metallionen-Lösung (1 M Cu^{2+}; 2,5 M Ni^{2+}) getränkte Filterplättchen auf der Agaroberfläche platziert. Als Kontrolle dienten in Wasser getränkte Filterplättchen. Die Agarplatten wurden acht Tage bei 42°C inkubiert und die Ermittlung der Metallionen-Sensitivität erfolgte anschließend durch Messungen des Durchmessers der Wachstumsinhibition um die Filterplättchen.

2.2.5 Proteaseaktivitätstest

Die Aktivität von Proteasen in *H. salinarum* wurde auf Magermilch-Festmedien untersucht. Flüssigkulturen (OD_{600} 0,8-1) wurden auf Magermilch-Festmedien (Komplexmedium mit 1,5% [w/v] Agar, 1% [w/v] Magermilchpulver) balkenförmig ausgestrichen und die Agarplatten 20 Tage bei 42°C inkubiert. Die Aktivität von Proteasen wurde über das Aufklaren des Agars im Bereich des Balkenausstrichs detektiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurden 2 mL Zellkultur (OD_{600} 0,5-0,8) durch Zentrifugation bei 8.000 *g* für 3 min sedimentiert und das Zellsediment nach Entfernung des Überstandes in 0,1 mL Basalsalzlösung resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 0,9 mL TENST-Puffer (10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl [pH 8,0], 1,6% Lauroylsarcosin [w/v], 0,12% Triton X-100 [w/v]) lysiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]). Der Ansatz wurde für 20 s auf einem Vortex gemischt und bei 9.000 *g* für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) versetzt, gemischt und zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Extraktionsschritte mit jeweils einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1 [v/v]). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,1 mL 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 1 mL Isopropanol versetzt, vorsichtig invertiert und zur Fällung von DNA für 1 h bei -20°C gelagert. Präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 21.000 *g* für 30 min bei 4°C sedimentiert und durch Zugabe von 1 mL eiskaltem Ethanol (70% [v/v]) und erneuter Zentrifugation bei 21.000 *g* für 5 min gewaschen. Das Präzipitat wurde in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) getrocknet und in TE-Puffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Zur Entfernung von RNA erfolgte die Zugabe von RNase A in einer finalen Konzentration von 10 μg/mL. Der Ansatz wurde für 20 min bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mit 0,7 bis 1% [w/v] Agarosegelen in 1x TAE-Puffer. Als Laufpuffer diente 0,5x TAE-Puffer. DNA-Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen 10x DNA-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente der GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher

Scientific GmbH, Dreieich) mit Größenstandards von 100 bis 10.000 bp. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Die Visualisierung der DNA erfolgte nach Färbung des Gels in Ethidiumbromid-Lösung (1 μg/mL) mit einem Geldokumentationssystem (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen). Die Pufferzusammensetzungen für die Agarosegelelektrophorese sind unter 2.1.6 aufgelistet.

2.3.3 Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP10F' Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils 45 μL Zellen mit 5 μL Plasmid-DNA versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock der Zellen für 40 s bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend kurz auf Eis gekühlt, mit 0,75 mL LB-Medium versetzt und 20 min bei 37°C und 600 rpm auf einem Heizblock inkubiert. Transformierte Zellen wurden auf LB_{Amp}-Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.4 Transformation von *Halobacterium salinarum*

Die Transformation von *H. salinarum* Zellen erfolgte nach der Polyethylenglykol (PEG)-basierten Methode (Dyall-Smith, 2009). Hierzu wurden 2 mL *H. salinarum* Zellen (OD_{600} 0,8-1) durch Zentrifugation bei 8.000 *g* für 3 min sedimentiert und das Zellsediment in 0,2 mL Sphäroplastierungslösung 1 (2 M NaCl, 25 mM KCl, 15% Sucrose) resuspendiert. Zum Ablösen des archaealen S-Layer-Proteins wurden 10 μL Sphäroplastierungslösung 2 (0,5 M EDTA in Sphäroplastierungslösung 1) hinzugegeben und der Ansatz 10 min leicht schüttelnd bei RT inkubiert. Die Sphäroplastenbildung wurde lichtmikroskopisch überprüft. In einem neuen Reaktionsgefäß wurden 8 μg Plasmid mit den Zellen versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 0,22 mL PEG_{600} (60% [v/v]). Zur vollständigen Verteilung von PEG_{600} wurde der Ansatz auf einem Vortex gemischt und für 80 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1,6 mL Sphäroplasten-Verdünnungslösung (4,3 M NaCl, 10 mM Tris/Hcl pH 7,5, 15% Sucrose) und die Sedimentation der Zellen bei 8.000 *g* für 5 min. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellsediment in 0,8 mL Komplexmedium resuspendiert und zur Regeneration der Zellen für 24 h bei 37°C unter leichtem Schütteln (250 rpm) auf einem Heizblock inkubiert. Die Zellen wurden bei 8.000 *g* für 2 min sedimentiert, in 0,1 mL Komplexmedium resuspendiert und zur Blau-Rot-Selektion auf Festmedien mit Mevinolin (6 μg/mL) und X-Gal (40 μg/mL) ausplattiert.

2.3.5 Generierung von *H. salinarum* Gendeletionsmutanten

Die Konstruktion von Gendeletionsmutanten erfolgte mit der *pop-in/pop-out*-Methode mit Hilfe des Plasmids pMKK100 (Abb. 5), welches das Reportergen *bgaH* zur Kodierung der halophilen β-Galaktosidase trägt (Koch & Oesterhelt, 2005). Nachfolgende Polymerasekettenreaktionen (PCR) erfolgten mittels Q5 DNA-Polymerase (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.1.5 aufgelistet.

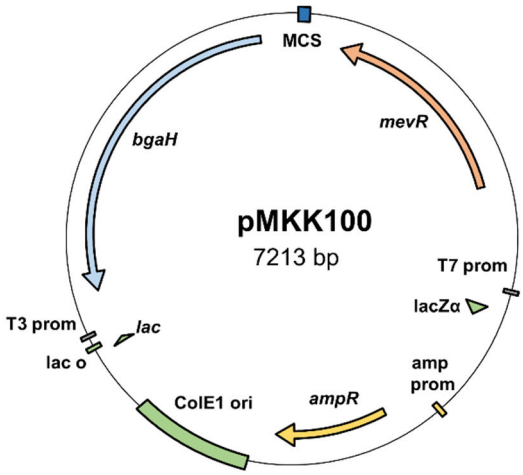


Abbildung 5. Plasmidkarte des Plasmids pMKK100, welches für die Generierung von Gendeletionsmutanten in *H. salinarum* verwendet wurde. Das Plasmid verfügt über einen *E. coli* Replikationsursprung (ColE1 ori) sowie ein Ampicillin- (*ampR*) und Mevinolin- (*mevR*) Resistenzgen. Zudem trägt das Plasmid das Reportergen *bgaH*, welches für eine halophile β-Galaktosidase kodiert und eine Blau-Rot-Selektion ermöglicht (Koch & Oesterhelt, 2005).

Ausgehend von isolierter genomischer DNA wurden etwa 500 bp große Regionen *upstream* (US) und *downstream* (DS) des Zielgens amplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem GeneElute™ PCR-Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurden diese in einer nachfolgenden PCR fusioniert, sodass das dazwischenliegende Zielgen fehlte. Das aufgereinigte Fusionsprodukt sowie das Plasmid pMKK100 wurden anschließend mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen bei 37°C für 4 h restringiert und durch Verwendung der T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers ligiert.

Zur Vervielfältigung des konstruierten Plasmids wurden *E. coli* TOP10F' Zellen mittels Hitzeschock mit dem Plasmid transformiert (s. 2.3.3) und auf Festmedium gewachsene Kolonien wurden in Flüssigkulturen über Nacht kultiviert. Die Plasmidisolation aus Flüssigkulturen erfolgte mit dem E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-tek, Norcross, Georgia, USA) nach Angaben des Herstellers.

Isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend für die Transformation von *H. salinarum* (s. 2.3.4) verwendet. Transformierte Zellen wurden auf Agarplatten mit Mevinolin und X-Gal ausplattiert, um eine Blau-Rot-Selektion der gewachsenen Kolonien durch Hydrolyse von X-Gal zu ermöglichen. Blaue Kolonien, welche das Plasmid über homologe Rekombination erfolgreich integriert hatten, wurden in Flüssigkulturen angezogen und mindestens dreimal in Komplexmedium ohne Mevinolin überimpft. Die Rekultivierung ohne selektiven Druck ermöglicht eine zweite Rekombination mit dem Verlust des Plasmids und einem Wachstum von roten Kolonien auf Festmedium mit X-Gal. Die Überprüfung der Deletion des Zielgens nach Rot-Blau-Selektion erfolgte mittels PCR unter Verwendung von US/DS-flankierenden Oligonukleotiden (s. 2.1.5). Erfolgreiche Gendeletionen wurden durch Sequenzierung (Eurofins Genomics, Ebersberg) und Southern-Analyse verifiziert.

2.3.6 Southern-Analyse

Zur Verifizierung von Gendeletionen in *H. salinarum* wurde eine Southern-Analyse (Southern, 1975) durchgeführt. Hierzu wurden 3 μg isolierte genomische DNA mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen in DNA-Fragmente hydrolysiert und auf einem 0,7% Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Vorbereitung für den Southern-Blot wurde das Gel zur partiellen Depurinierung der DNA-Fragmente zunächst für 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Nach Waschen des Gels in Wasser erfolgte die Denaturierung der DNA-Fragmente in 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH für 30 min, gefolgt von der Neutralisierung für 30 min in 1,5 M NaCl und 0,5 M Tris/HCl pH 7,5.

Die DNA-Fragmente wurden auf eine Roti® Nylon Membran mit einer Porengröße von 0,2 μM (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) durch Kapillarkräfte über Nacht geblottet. Die Membran wurde zur kovalenten Bindung der DNA anschließend mittels UV-Crosslinker (Stratalinker® UV Crosslinker 1800, Stratagene, Agilent Technologies GmbH, Waldbronn) bestrahlt und nach einer kurzen Inkubation in Wasser für mindestens 2 h in DNA-Hybridisierungslösung bei 42°C inkubiert. Es folgte die Hybridisierung der DNA mit Digoxigenin (DIG)-markieren Sonden (Sondenherstellung: s. 2.3.7) in DNA-Hybridisierungslösung über Nacht bei 42°C. Die Membran wurde anschließend jeweils zweimal für 15 min in Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1% SDS) bei RT und in Waschlösung 2 (0,2x SSC, 0,1% SDS) bei 60°C im Wasserbad gewaschen. Es folgte eine dreiminütige Inkubation in DIG-Waschpuffer und nach einem kurzen Schwenken in Wasser wurde die Membran für 30 min in DIG-Puffer 2 geblockt. Zur Detektion von DIG wurde die Membran anschließend für maximal 30 min in Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AP, Roche Diagnostics, Mannheim), 1:10.000 verdünnt in DIG-Puffer 2, inkubiert und nach jeweils zwei 15-minütigen Waschschritten in Detektionslösung A und C für 5 min in CDP-Starreagenz (Phototope®-Star Detection Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main) inkubiert.

Der Membran wurde für etwa 40 min ein ECL-Film aufgelegt und die Bindung der Sonde durch Inkubation des Films in Entwicklerlösung (1:4,5 in dH_2O verdünnt) sichtbar. Nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität wurde die Reaktion durch Überführung des Films in Stopplösung (2% [v/v] Essigsäure) beendet, der Film wurde 5 min in Fixierungslösung (1:10 in dH_2O verdünnt) inkubiert und an der Luft getrocknet.

Zur Entfernung der gebundenen, alkali-labilen DIG Sonde wurde die Membran anschließend zweimal 5 min in *Stripping*-Lösung bei 37°C im Wasserbad inkubiert und bis zur weiteren Verwendung in 2x SSC-Puffer gelagert. Die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen für die Southern-Analyse sind unter 2.1.6 aufgelistet.

2.3.7 Erstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonden

Die Erstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für die Southern Analyse erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Dream*Taq*™ DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) und dem DIG DNA Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1. Zusammensetzung der DIG-Sonden-Synthese.

Komponenten	Finale Konzentration
Genomische DNA	1 µg
Forward Oligonukleotid	0,4 µM
Reverse Oligonukleotid	0,4 µM
dNTPs	125 µM
DIG DNA Labeling Mix (10x konzentriert)	0,5x
Pfu-Puffer (10x konzentriert)	1x
Dream*Taq* DNA-Polymerase	5 U
ddH_2O	ad 50 µL

Das PCR-Produkt wurde anschließend 1:1.000 in DNA-Hybridisierungslösung verdünnt und als Sonde bei der Southern-Analyse eingesetzt.

2.3.8 Isolation von RNA

Zur relativen Quantifizierung der Transkription bestimmter Zielgene nach Metallionenbehandlung wurde die Gesamt-RNA in planktonischen- und Biofilmzellen isoliert. Hierzu wurden planktonische Zellen mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} und Biofilme mit 1 mM Cu^{2+} bzw. 5 mM Ni^{2+} für 24 h inkubiert. Die Konzentration der Metallionen im Biofilm wurde im Vergleich zur Vorbereitung von Proteinproben verringert, da höhere Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen die DNase I Hydrolyse der isolierten RNA inhibierten. Die Zellen wurden sedimentiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die RNA-Isolation der Zellen erfolgte mittels Säure-Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski & Sacchi, 2006). Hierzu wurden die Zellsedimente 5 min auf Eis aufgetaut und in 1 mL Lösung D (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 0,5% Lauroylsarcosin), frisch versetzt mit 0,1 M β-Mercaptoethanol, resuspendiert. Zur Extraktion von Proteinen, Lipiden und DNA wurde der Ansatz mit 0,1 mL 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 mL H_2O-gesättigtem Phenol und 0,21 mL Chloroform/Isoamylalkohol (49:1 [v/v]) versetzt, für 15 s auf einem Vortex gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Trennung von wässriger und organischer Phase erfolgte durch Zentrifugation bei 12.000 *g* für 20 min bei 4°C. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig invertiert und zur Fällung von RNA für 1 h bei -20°C gelagert. Präzipitierte RNA wurde bei 21.000 *g* für 20 min bei 4°C sedimentiert und nach Entfernung des Überstandes in 0,3 mL Lösung D mit 0,1 M β-Mercaptoethanol bei einer zweiminütigen Inkubation bei 65°C resuspendiert. Zur Extraktion restlicher organischer Bestandteile erfolgte die Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]). Der Ansatz wurde 15 s auf dem Vortex gemischt und die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation bei 21.000 *g* für 5 min bei 4°C. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte eine wiederholte Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. Die separierte wässrige Phase wurde zur Fällung von RNA mit 1 mL Isopropanol versetzt, vorsichtig invertiert und für 1 h bei -20°C gelagert. Präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation bei 21.000 *g* für 30 min bei 4°C sedimentiert und durch

Zugabe von 1 mL eiskaltem Ethanol (70% [v/v]) und erneuter Zentrifugation für 10 min bei 21.000 *g* gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde das RNA-Präzipitat in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) getrocknet und in TE-Puffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Zur Entfernung von genomischer DNA wurde der Ansatz mit RNase-freier DNase I (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) nach Herstellerangaben für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach DNase I-Hydrolyse erfolgte eine erneute Extraktion restlicher RNA-Kontaminanten. Hierzu wurde der Ansatz mit TE-Puffer auf 0,2 mL aufgefüllt und mit 20 µL 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) versetzt. Nach 15 s Mischen auf dem Vortex erfolgte die Phasentrennung bei 21.000 *g* für 5 min bei 4°C und die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein wiederholter Extraktionsschritt durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) sowie zwei Extraktionsschritte mit jeweils einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1 [v/v]). Die separierte wässrige Phase wurde anschießend zur Fällung von RNA mit 1 mL Isopropanol versetzt, vorsichtig invertiert und für 1 h bei -20°C gelagert. Das RNA-Präzipitat wurde bei 21.000 *g* für 15 min bei 4°C sedimentiert, durch Zugabe von 1 mL eiskaltem Ethanol (70% [v/v]) und erneuter Zentrifugation bei 21.000 *g* für 10 min gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in TE-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 37°C schüttelnd inkubiert.

2.3.9 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Für die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität bestimmter Zielgene wurde zunächst die gereinigte RNA durch Verwendung von Random Hexamer Oligonukleotiden (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich), RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) und RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) in einem Gesamtvolumen von 20 µL in komplementäre DNA (*c*DNA) transkribiert (Tabelle 2). Zur Kontrolle von DNA-Kontaminationen wurden zusätzlich Kontrollansätze gleicher RNA-Proben ohne Zugabe von reverser Transkriptase vorbereitet. Die reverse Transkription erfolgte mit einem Thermocycler (peqSTAR, VWR International GmbH, Darmstadt) mit folgendem PCR-Programm: 25°C, 10 min; 42°C, 60 min; 70°C, 10 min.

Für qRT-Analysen wurde das StepOnePlus™ Real-Time PCR System in Kombination mit der StepOnePlus™ Software Version 2.3 (Applied Biosystems, Waltham, USA) verwendet. Die Amplifikation der *c*DNA erfolgte mit dem SensiFast™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde) nach Angaben des Herstellers. Das verwendete qPCR-Programm inklusive einer Schmelzkurvenanalyse ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.1.5 aufgelistet. Jede Probe wurde in technischen Triplikaten gemessen. Zur Überprüfung einer spezifischen Produktbildung wurde für jedes Oligonukleotidpaar zusätzlich isolierte genomische DNA von *H. salinarum* R1 in einer Verdünnung von 1:2.000 anstelle von *c*DNA eingesetzt.

Tabelle 2. Zusammensetzung der *c*DNA Synthese.

Komponenten	Finale Konzentration
Gereinigte RNA	3 µg
5x RT-Puffer	1x
RevertAid™ Reverse Transcriptase	200 U
RiboLock RNase Inhibitor	20 U
Random Hexamer Primer	0,1 µg
10 mM dNTPs	1 mM
ddH_2O	ad 20 µL

Tabelle 3. Standard qPCR-Programm.

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	20 s	1
Denaturierung	95°C	3 s	40
Annealing und Elongation	60°C	3 s	
Denaturierung	95°C	15 s	1
Schmelzen der DNA	60°C	60 s	1
Denaturierung	95°C	15 s	1

Zur Analyse der relativen Transkription wurden die *cycle threshold* (C_T)-Werte der Zielgene zunächst auf das Haushaltsgen *rpoB1* (OE4741R) normiert und die erhaltenen ΔC_T-Werte von unbehandelten Zellen wurden von denen Metallionen-behandelter Zellen subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$-Methode).

2.3.10 Propidiummonoazid-basierte quantitative PCR (PMA-qPCR)

Die Quantifizierung von toten Zellen in planktonischen Kulturen und Biofilmen nach Metallionenbehandlung sowie nach der Isolierung von EPS aus Biofilmen erfolgte mittels PMA-qPCR. Für die Behandlung mit PMA wurden die Zellen zunächst sphäroplastiert. Hierfür wurden sedimentierte Zellen in 0,5 mL Sphäroplastierungslösung 1 (2 M NaCl, 25 mM KCl, 15% Sucrose) mit 5 μL (planktonische Zellen), bzw. 20 μL (Biofilmzellen) Sphäroplastierungslösung 2 (0,5 M EDTA in Sphäroplastierungslösung 1) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Die Sphäroplastierung der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft, jeweils 0,25 mL der Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 50 μM (planktonische Zellen) bzw. 100 μM (Biofilmzellen) PMA für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die restlichen 0,25 mL aus jedem Ansatz wurden nicht mit PMA behandelt. Anschließend wurden PMA-behandelte und unbehandelte Proben in eine 24-Kavitäten Mikrotiterplatte überführt und PMA wurde durch Lichtexposition der Proben mit blauwelligen licht-emittierenden Dioden (LED, 470 nm, 16 Candela) bei einem Abstand von 0,5 cm zur Lichtquelle für 40 min unter leichtem Schütteln photoaktiviert. Zur Vermeidung von Überhitzung der Zellen wurde die Mikrotiterplatte im Eisbad gekühlt. Die DNA-Extraktion erfolgte durch osmotische Lyse der Zellen. Hierzu wurden 5 μL Probe mit 45 μL Wasser versetzt und für 1 min auf einem Vortex gemischt. Für qPCR-

Analysen wurden jeweils 10 µL Ansätze, bestehend aus 5 µL SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde), 1 µL *H. salinarum* Zelllysat, 2 µL *forward* Oligonukleotid (2 µM) und 2 µL *reverse* Oligonukleotid (2 µM), vorbereitet. Die verwendeten Oligonukleotide amplifizieren ein 16S ribosomales DNA-Fragment einer Größe von 579 bp (s. 2.1.5). Das PCR-Programm ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4. PCR-Programm der PMA-qPCR.

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	
Annealing	57°C	45 s	40
Elongation	72°C	80 s	

Die Analysen wurden mit dem StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, von Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) und der Software StepOne™ (Version 2.0) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Berechnung der PMA-basierten Amplifikationsinhibition wurden die *cycle threshold* (C_T)-Werte unbehandelter DNA-Proben von den entsprechenden C_T-Werten PMA-behandelter Proben subtrahiert. Zur Quantifizierung toter Zellen wurde ein Standard mit ΔC_T-Werten von definierten Verhältnissen lebender und hitzebehandelter (70°C, 10 min), toter *H. salinarum* R1 Zellen erstellt.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Vorbereitung von Proteinproben

Zur Analyse von Proteinproben nach 24 h Metallionenzugabe wurden Ansätze von planktonischen Zellen und von Biofilmen vorbereitet. Als Kontrolle dienten jeweils Ansätze ohne Zugabe von Metallionen. Planktonische Zellen und von der Oberfläche abgelöste Biofilme wurden durch Zentrifugation bei 6.000 *g* für 15 min sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellsedimente durch Zugabe von 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und Mixen auf einem Vortex lysiert. Die Hydrolyse der DNA in den Zelllysaten erfolgte durch Inkubation mit DNase I (10 µg/mL) und $MgCl_2$ (3 mM) bei 37°C für 1 h. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit der Methode nach Bradford (s. 2.4.2) unter Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als Standard. Zur Vorbereitung identischer Proteinmengen wurde eine Trichloressigsäure (TCA)/Aceton-Fällung durchgeführt. Hierzu wurden Proteinproben in final 10% TCA für 1 h bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation bei 21.000 *g* für 20 min (4°C) sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Präzipitat zweimal durch Zugabe von 80% Aceton und erneuter Zentrifugation bei 21.000 *g* für 10 min gewaschen. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Präzipitate an der Luft getrocknet.

2.4.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Diese basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 auf 595 nm durch Komplexbildung von Proteinen und dem Farbstoff Coomasie Brilliant Blau G250. Für die

Messung wurden 20 μL Proteinlösung mit 980 μL Bradford-Reagenz versetzt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Es folgte die photometrische Messung bei 595 nm gegen den Reagenzienleerwert. Zur Erstellung eines Standards wurde Rinderserumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 1 mg/mL verwendet.

2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Verfahren der SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow dient der Auftrennung komplexer Proteingemische nach ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen (Schägger & von Jagow, 1987). Die Auftrennung der Zelllysate erfolgte mit einem 12% Polyacrylamid (PAA) Trenngel und einem 4% PAA Sammelgel (Tabelle 5). Als Laufpuffer dienten jeweils 1x Kathoden- und Anodenpuffer. *H. salinarum* Zelllysate wurden mit 3x SDS-Probenauftragspuffer versetzt und durch Erhitzung bei 95°C für 10 min denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert und auf das PAA-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einem Mini-Protean Tetra Cell System (Biorad Laboratories Inc., Hercules, USA) bei einer Spannung von 100 V. Als Größenstandard wurde der *prestained* Protein Marker (EZ-Run™ Prestained *Rec* Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) verwendet. Zur Visualisierung von Proteinbanden wurde das Gel über Nacht in kolloidaler Coomassie-Färbelösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) geschwenkt. Bei sehr schwachen Proteinbanden erfolgte anschließend zusätzlich eine Silberfärbung des Gels (s. 2.4.5). Die Puffer-Zusammensetzung für die SDS-PAGE sind unter 2.1.6 aufgelistet.

Tabelle 5. Standard SDS-Gel Zusammensetzung.

Komponenten	Sammelgel (5% PAA)	Trenngel (12% PAA)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	2 mL	10,8 mL
Schägger Gelpuffer (3x)	3,5 mL	9 mL
Glycerin (60%)	-	3 mL
ddH_2O	9 mL	4,2 mL
TEMED	0,04 mL	0,04 mL
APS (10%)	0,2 mL	0,2 mL

2.4.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen ist 100-mal sensitiver als die herkömmliche Färbung mit Coomassie-Färbelösung und eignet sich besonders zur Visualisierung von sehr geringen Proteinkonzentrationen (Switzer *et al.*, 1979). Für das Färbeverfahren wurden folgende Lösungen verwendet: Fixierungslösung (50% Ethanol, 12% Essigsäure, 0,05% Formaldehyd), Waschlösung (20% Ethanol), Sensibilisierungslösung (0,02% Natrium-thiosulfat), Silberfärbelösung (0,2% Silbernitrat, 0,076% Formaldehyd), Entwicklerlösung (6% Natriumcarbonat, 0,05% Formaldehyd, 0,0004% Natriumthionat), Stopplösung (12% Essigsäure). Die Inkubation in den jeweiligen Lösungen erfolgte unter leichtem Schütteln.

Zur Fixierung wurde das Gel über Nacht in Fixierungslösung geschwenkt und anschließend viermal für 5 min in Waschlösung gewaschen. Es folgte eine zweiminütige Inkubation in Sensibilisierungslösung. Das Gel wurde jeweils zweimal für 1 min in deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend für 20 min in kalter (4°C) Silberfärbelösung dunkel inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte mit deionisiertem Wasser für jeweils 1 min und die Zugabe von

Entwicklerlösung. Bei Erreichen der gewünschten Intensität der Proteinbanden wurde die Reaktion durch Zugabe von etwa 1/6 Volumen Stopplösung beendet.

2.4.5 Quantitative Proteomanalyse mit SWATH-LC/MS/MS

Quantitative Analysen des Proteoms von planktonischen Zellen und Biofilmen nach Exposition mit Metallionen erfolgten mittels SWATH (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Spectra*) Massenspektrometrie (Gillet *et al.*, 2012, Losensky *et al.*, 2017).

Die Probenvorbereitung der Proteinproben erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben. Pro Bedingung wurden jeweils drei biologische Replikate vorbereitet. Von jeder Probe wurden 50 μg Protein auf einem 4-12% NuPAGE Noves Bis-Tris Minigel (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen und 1,5 cm in das Gel einlaufen gelassen. Nach Coomassie-Färbung wurden die Proteinbereiche im Gel ausgeschnitten, in kleine Stücke zerteilt, mit Dithiothreitol reduziert und mit Iodacetamid alkyliert, bei anschließender Trypsinspaltung über Nacht. Die Peptide wurden anschließend aus dem Gel extrahiert, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20°C gelagert (Atanassov & Urlaub, 2013). Für die Erstellung einer sequenzannotierten Spektrenbibliothek wurden von jeder Probe gleiche Proteinmengen zu einer Gesamtmenge von 80 μg vereint und mittels einer *Reversed phase spin column* (Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) in acht Fraktionen separiert. Den Fraktionen sowie den zu quantifizierenden Einzelproben wurde zur Kalibrierung der Retentionszeit ein synthetischer Peptidstandard zugegeben (iRT Standard, Schlieren, Schweiz). Die Analyse der Peptidproben erfolgte mittels Nanofluss-Chromatographie (Eksigent nanoLC425), gekoppelt an ein hybrides Quadrupol-TOF Massenspektrometer (TripleTOF 5600+) mit einer Nanospray III Ionenquelle (Emitterspannung 2.400 V, Interface-Temperatur 150°C, Sheathgas-Einstellung: 12). Die Steuerung erfolgte über die Analyst TF 1.7.1 Software (Sciex). Proteinproben wurden in einer Konzentration von 0,3 $\mu g/\mu$L in Ladepuffer (2% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) gelöst und 1,5 μg auf einer Vorsäule (0,18 mm ID x 20 mm, Symmetry C18, 5 μM, Waters, Milford, USA) konzentriert. Mittels einer analytischen RP-C18-Säule (0,075 mm ID x 250 mm, HSS T3, 1,8 μm, Waters, Milford, USA) wurden die Fragmente getrennt. Für den linearen Gradienten des HPLC-Laufes wurde ein Gemisch aus 5-35% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure als mobile Phase bei einer Flussrate von 300 nL/min gewählt.

Qualitative LC/MS/MS Analysen erfolgten mit einer Top 25 Daten-abhängigen Erfassungsmethode (*data-dependent acquisition,* DDA). Die Detektion der Peptidprecursor erfolgte mittels MS für 350 ms in einem Bereich von 350-1.250 m/z. Die Masseauflösung betrug 30.000 *Full Width Half Maximum* (FWHM). Mittels *Collision Induced Dissociation* (CID) wurden bis zu 25 mehrfach geladene Vorläufer je Zyklus fragmentiert. Die Fragmente wurden für je 100 ms im Bereich 180-1.600 m/z bei einer Auflösung von 17.500 FWHM detektiert, wobei bereits fragmentierte Vorläufer für einen Zeitraum von 30 s ausgeschlossen wurden. Vorläufer mit Ladungszuständen von 2+, 3+ und 4+ wurden für die MS/MS-Analysen weiterverwendet. Pro RP-Fraktion wurden jeweils vier Replikate genutzt, um eine projektspezifische Spektralbibliothek zu erstellen.

MS/MS-Daten wurden mittels SWATH-MS erhoben, um die Spektralbibliothek zu quantifizieren. Hierfür wurden 65 Fenster variabler Größe (Zhang *et al.*, 2015) im Vorläuferbereich von 400-1.050 m/z erhoben und die Peptidfenster mittels *rolling conversion energy* CID für den Ladungszustand 2+ fragmentiert. Die Fragmente wurden in einem Bereich von 350-1.400 m/z für jeweils 40 ms pro Fenster bei einer Gesamtzykluszeit von 2,75 ms

erfasst, wobei drei technische Replikate je biologischer Probe gemessen wurden. Die MS-Proteomdaten wurden über die PRIDE (PRoteomics IDEntifications) Datenbank auf dem ProteomeXchange Server mit der Identifikationsnummer PXD015192 hinterlegt.

2.4.6 SWATH-LC/MS/MS Datenprozessierung

Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels der *ProteinPilot* Software Version 5.0, Ausgabe 4769 (Sciex). Insgesamt wurden 166.604 MS/MS Spektren aus den kombinierten qualitativen Analysen mit dem UniProtKB Referenzproteom *H. salinarum* R1 (Stand 12/2017, 2.570 Einträge), zuzüglich 52 bekannter Laborkontaminanten, bei einer tolerierten Falscherkennungsrate (*false discovery rate*, FDR) von 1% verglichen. Mit Hilfe der *Peak View* Software Version 2.1, Ausgabe 11041 (Sciex) und der SWATH-Quantifizierungs-microApp Version 2.0, Ausgabe 2003 wurde die Spektralbibliothek erstellt und erfolgte die SWATH-Peak-Extraktion. Die resultierenden identifizierten Proteine wurden mittels *Gene Ontology* und KEGG-Anpassung mit dem *DAVID Functional Annotation Tool* Version 6.8 ausgewertet.

2.4.7 SWATH-LC/MS/MS Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der Proteomdaten erfolgte mit dem Programm R, Version 3.4 (www.r-project.org). Rohdaten wurden zur Varianzstabilisierung $\log_2$-transformiert (Love *et al.*, 2014) und die Separierbarkeit der Datensätze wurde mittels Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) untersucht. Das *metabolic pathway mapping* erfolgte mit der *pathway*-Erweiterung im Programm R (Luo & Brouwer, 2013) basierend auf der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Datenbank. Die Einteilung der Proteine in funktionale Kategorien basierte auf der UniProtKB Proteinsequenz-Datenbank. Die Zuordnung erfolgte anhand des *Archaeal Clusters of Orthologous Genes* (arCOG) Browsers.

Die Datensätze Metallionen-behandelter Ansätze von planktonischen Zellen und Biofilmen wurden paarweise jeweils mit denen unbehandelter Ansätze in Bezug auf differentiell exprimierte Proteine verglichen und die Anpassung der *p-values* gegen eine Falscherkennungsrate (*false discovery rate*, FDR) von 5% erfolgte mittels Benjamini-Hochberg-Methode (Benjamini & Hochberg, 1995). Die Veränderung der Proteinmenge wurde für jedes Protein mit dem $\log_2$ *fold change* ($\log_2$FC) bestimmt und gegen den $-\log_{10}$(*p-value*) in einem *volcano plot* dargestellt. Eine signifikante Veränderung der Proteinmenge wurde bei einem $\log_2$FC >1 oder $\log_2$FC <-1 und einem angepassten *p-value* $<0{,}05$ angenommen.

2.4.8 Isolierung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS)

Zur Isolierung von EPS wurden Biofilme in großen Petrischalen (150/20 mm, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) für 15 Tage angezogen. Der Überstand in den Schalen wurde entfernt und die Biofilme zur Entfernung von planktonischen Zellen dreimal mit Basalsalzlösung gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Biofilme von der Oberfläche mit einem Spatel und die Biofilme wurden in Basalsalzlösung aufgenommen. Zum Auflösen von Zellaggregaten wurden die Biofilmsuspensionen 10 min mit Ultraschall in einem Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 103 H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) bei Stufe 100% in Eiswasser behandelt und anschließend auf einem Magnetrührer 2 h gerührt. Die Zellsuspension wurde in die Fraktionen Biofilm- und EPS/Zellen geteilt, wobei die Trennung von EPS und Zellen anschließend durch Ultrazentrifugation und Filtration des Überstandes (Porengröße 0,45 μm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) erfolgte. Das Filtrat (EPS-Fraktion) und die Biofilmfraktion wurden zur Entfernung von Salzen gegen deionisiertes Wasser zwei Tage bei

4°C dialysiert (Ausschlussgröße 3,5 kDa, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden die Fraktionen in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 2-4 LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) für fünf Tage bei -80°C getrocknet und das Trockengewicht der Lyophilisate mittels Feinwaage (Sartorius BP 110 S, Sartorius AG, Göttingen) bestimmt. Für biochemische Analysen wurden die Fraktionen anschließend in Pufferlösung (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8,0) gelöst.

2.4.9 Bestimmung des Proteingehalts in EPS-Proben

Zum quantitativen Nachweis von Proteinen in Biofilm- und isolierten EPS-Fraktionen wurde die Lowry-Methode (modifiziert nach Frølund *et al.* (1996)) durchgeführt, welche auf einer zwei-Schritt Reaktion beruht. Im ersten Schritt erfolgt die Bildung eines blauvioletten Komplexes zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion), welcher im zweiten Schritt das zugegebene gelbe Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Molybdatophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure) zu Molybdänblau reduziert. Zur Erstellung eines Standards wurde Rinderserumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 1 mg/mL verwendet.

Die Proben wurden mit SDS zu einer finalen Konzentration von 1% versetzt und anschließend wurden 0,5 mL Probe mit 0,7 mL Lowry-Arbeitsreagenz (Lösung A:B:C im Verhältnis 100:1:1; A: 143 mM Natriumhydroxid, 270 mM Natriumcarbonat; B: 57 mM Kupfersulfat Pentahydrat; C: 124 mM Natriumtartrat Dihydrat) versetzt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden 0,1 mL Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz hinzugegeben, der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Die Quantifizierung des gebildeten Molybdänblau erfolgte durch photometrische Messung der Proben bei 750 nm.

2.4.10 Bestimmung des Kohlenhydratgehalts in EPS-Proben

Die Quantifizierung von Kohlenhydraten erfolgte nach der Phenol-Schwefelsäure-Methode nach DuBois *et al.* (1956) unter Verwendung von D-Glucose als Standard (Konzentrationsbereich: 10-200 μg/mL). Durch Zugabe von Schwefelsäure werden die glykosidischen Bindungen der Oligo- und Polysaccharide mittels saurer Hydrolyse gespalten und die daraus entstandenen Furfuralderivate kondensieren mit Phenolmolekülen zu einem orange-roten Triarylmethanderivat, dessen Absorption bei 490 nm gemessen wird.

Zu 0,1 mL Probe wurden je 0,1 mL 5% Phenol [w/v] und 0,5 mL konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben und der Ansatz wurde gemischt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurde der Ansatz für 15 min bei 30°C und anschließend für 5 min bei RT inkubiert und die Absorption wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

2.4.11 Bestimmung des Uronsäuregehalts in EPS-Proben

Zur Quantifizierung von Uronsäuren wurde eine modifizierte Sulfamat/m-Hydroxydiphenyl-Methode nach Filisetti-Cozzi & Carpita (1991) durchgeführt, bei der D-Glucuronsäure als Standard verwendet wurde (Konzentrationsbereich: 10-200 μg/mL). Jeweils 0,2 mL Probe wurden mit 20 μL Lösung 1 (4 M Sulfaminsäure, pH 1,6) versetzt und gemischt. Es folgte die Zugabe von 1,2 mL Lösung 2 (75 mM Dinatriumtetraborat Decahydrat in konzentrierter Schwefelsäure). Der Ansatz wurde für 20 min bei 100°C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 40 μL Lösung 3 (0,15% 3-Phenylphenol in 0,5%

Natriumhydroxid) wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert und die Absorption der Probe bei 525 nm gemessen.

2.4.12 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Metallionen wurden in planktonischen Zellen und in Biofilmen mittels Atomabsorptionsspektrometrie quantifiziert. Hierfür wurden planktonische Zellen in Flüssigkulturen mit Komplexmedium und 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} inkubiert. Für die Messung wurde jeweils ein Ansatz der Flüssigkultur (Komplexmedium mit Metallionen und Zellen), sowie ein Ansatz Medium-freier planktonischer Zellen, welche in Basalsalzlösung gewaschen wurden, vorbereitet. Biofilme wurden in 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Biofilms mit Basalsalzlösung wurden der Biofilm mittels Spatel von der Oberfläche abgelöst und EPS- und Zellfraktionen durch Ultraschall-Behandlung und Zentrifugation separiert (s. 2.4.8). Zur Messung wurden jeweils Proben des Überstandes in den Kulturschalen, des abgelösten Biofilms, sowie von EPS- und Zellfraktionen vorbereitet. Zur Verringerung des Salzgehalts wurden die Proben vor der Messung entsprechend mit deionisiertem Wasser verdünnt. Die Quantifizierung von Kupfer- und Nickelionen in den Proben erfolgte mittels Atomabsorptionsspektrometrie (contrAA® 300 Continuum Source Atomabsorptionsspektrometer, Analytik Jena AG, Jena) unter Verwendung eines Standards bestehend aus Kupfer- und Nickelionen in 2% Salpetersäure (Messbereich 0 bis 3 mg/L).

2.5 Mikroskopische Analysen

2.5.1 Phasenkontrastmikroskopie (PCM)

Die Untersuchung von Zellform- und Größe erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopie (PCM) bei Verwendung des Axioskop 2 Mikroskops (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena). Zur Aufnahme von Mikroskopbildern wurde die AxioCam MRm Kamera in Kombination mit der AxioVision (Ausgabe 4.8) Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) verwendet.

Bestimmung der Zellzahl

Planktonische Zellen und von der Oberfläche abgelöste Biofilmzellen wurden mit Basalsalzlösung auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt und die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch mittels Zählkammer (Neubauer improved, 0,01 mm Tiefe, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen). Die Zellzahlen wurden aus Mittelwerten von mindestens 60 ausgezählten Quadraten (0,04 mm^2 Fläche) von jeweils zwei biologischen Replikaten bestimmt.

2.5.2 Konfokale *Laser Scanning* Mikroskopie (CLSM)

Die Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von *H. salinarum* Biofilmen sowie die Visualisierung von fluoreszenzmarkierten Zellen und EPS-Bestandteilen erfolgte mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie (CLSM). Planktonische Zellen wurden bei einer OD_{600} von 0,3 mit entsprechenden Cu^{2+}- oder Ni^{2+}-Konzentrationen versetzt und für 24 h inkubiert. Für die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Zellen bei 8.000 *g* für 3 min sedimentiert und in Basalsalzlösung resuspendiert.

Biofilme wurden in kleinen Kulturschalen (35/10 mm, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) auf Polyethylenterephthalat (PET)-Oberflächen mit einer initialen OD_{600} von 0,003 für 15 Tage in Komplexmedium angezogen. Zur Untersuchung des Einflusses von Metallionen wurden die

Zellen entweder zu Beginn in Komplexmedium mit Cu^{2+} oder Ni^{2+} in entsprechenden Konzentrationen angezogen oder es folgte die Zugabe von Cu^{2+} oder Ni^{2+} nach 14 Tagen Inkubation in Komplexmedium und eine Inkubation für 24 h. Zur Entfernung planktonischer Zellen wurden die Kulturschalen jeweils dreimal mit 1 mL Basalsalzlösung gewaschen und für die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen mit 2 mL Basalsalzlösung versetzt.

Die Färbung von Zellen erfolgte mit dem Membran-permeablen, DNA-interkalierenden Farbstoff Acridinorange (Merck KGaA, Darmstadt) in einer finalen Konzentration von 10 μg/mL für 15 min. Tote Zellen sowie extrazelluläre DNA in Biofilmen wurden mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) in einer finalen Konzentration von 30 μM für 10 min gefärbt. Die Färbung von glykosidischen (α-Mannopyranosyl- und α-Glucopyranosyl-) Resten in den EPS von Biofilmen erfolgte mit Concanavalin A Alexa Fluor™ 647 Konjugaten (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) in einer finalen Konzentration von 20 μg/mL für 15 min. Während der Fluoreszenzfärbungen wurden die Zellen im Dunkeln inkubiert.

Mikroskopische Analysen erfolgten mit dem Konfokal-Mikroskop Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) in Kombination mit der Leica Application Suite (LAS) Software. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/).

2.5.3 Rasterelektronenmikroskopie (*Scanning electron microscopy*, SEM)

Untersuchungen der dreidimensionalen Organisation von Biofilmen nach Einfluss von Metallionen erfolgten mittels Rasterelektronenmikroskopie. Hierzu wurden Biofilme auf Kohle-beschichteten Gold-Netzchen (# S162A5, Plano GmbH, Wetzlar) in kleinen Kulturschalen (35/10 mm, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) mit Komplexmedium bei einer initialen OD_{600} von 0,003 für 14 Tage angezogen und für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} oder 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Biofilme mitgeführt.

Die Schalen wurden zur Entfernung planktonischer Zellen dreimal mit 1 mL Basalsalzlösung gewaschen und die Biofilme wurden auf den Netzchen durch Zugabe von Fixierungslösung (2% Paraformaldehyd [w/v] und 1% Glutaraldehyd [v/v] gelöst in Basalsalzlösung) über Nacht bei 4°C fixiert. Nach Waschen der Biofilme durch Zugabe von 1 mL ddH_2O wurden die Netzchen zur Kontrastierung für 1 min in einem Tropfen 2% Uranylacetatlösung inkubiert und anschließend jeweils dreimal in einem Tropfen ddH_2O gewaschen. Die Netzchen wurden mit einem Filterpapier getrocknet und bis zur weiteren Verwendung in einem Exsikkator mit einem Kieselgel gelagert.

Zur Verbesserung der Auflösung und der Bildqualität wurden die Netzchen vor der mikroskopischen Analyse mit einer 70 nm Goldschicht beschichtet (Cressington Sputter Coater, Tescan GmbH, Dortmund). Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Raster-Elektronenmikroskop (FEI ESEM Quanta 200 FEG, Eindhoven, Niederlande). Zur Bestimmung der chemischen Elemente in der Probe wurde zudem eine energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) unter Verwendung eines Siliziumdriftdetektors (X-Max^N, Oxford Instruments, Abingdon, UK) durchgeführt. Die Untersuchung der Proben erfolgte unter Hochvakuum mit einer Beschleunigung von 12,5 kV, einer Spot-Größe von 4 und einem Arbeitsabstand von 10 nm.

Kapitel III

Halobacterium salinarum R1 unter Einfluss von Metallionen

Einblicke in zelluläre Reaktionen von planktonischen Zellen und Biofilmen in Gegenwart von bivalenten Kupfer- und Nickelionen

Natürliche Habitate von *Halobacterium salinarum* sind aufgrund von Industrialisierungsprozessen oft mit Schwermetallen kontaminiert, deren Auswirkungen auf betroffene Mikroorganismen sind bislang jedoch weitgehend unbekannt. In diesem Kapitel wird der Einfluss der bivalenten Kupfer- und Nickelionen auf planktonische Zellen sowie auf Biofilme des Modellorganismus *H. salinarum* R1 untersucht. Analysen des Wachstums und der Adhäsion in Gegenwart der Metallionen zeigten, dass Cu^{2+} die Adhäsion inhibierte, während der Einfluss von Ni^{2+} in einer verstärkten Adhäsion und Biofilmbildung resultierte. Untersuchungen der Zellvitalität in Gegenwart der Metallionen ergaben eine bis zu 80% erhöhte Resistenz in Biofilmen im Vergleich zu planktonischen Zellen. Quantitative Untersuchungen der EPS-Bestandteile zeigten eine signifikante Änderung der Proteinmenge mit einer Verringerung nach Cu^{2+}- und einer starken Erhöhung nach Ni^{2+}-Zugabe. Die Quantifizierung des Metallionengehalts in den Zellen zeigte eine bis zu 32-fach verringerte Konzentration in Biofilmzellen im Vergleich zu planktonischen Zellen. Zusätzliche Analysen der Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Konzentration in Biofilm-Fraktionen haben gezeigt, dass sich der größte Teil der Metalle, *i.e.* 65% Cu^{2+} bzw. 83% Ni^{2+}, in den EPS befindet und die EPS somit eine wichtige Rolle in der Biofilm-vermittelten Resistenz spielen.

3.1 Einleitung

Anthropogene Einflüsse wie Industrialisierungs- und Urbanisierungsprozesse haben zu einem stetigen Anstieg der Schwermetallbelastung der Umwelt beigetragen (Merian, 1984, Tabak *et al.*, 2005). In der Natur werden Schwermetalle in Böden und Sedimenten akkumuliert und gelangen durch die Aufnahme von Pflanzen oder Mikroorganismen in den biologischen Kreislauf (Ali *et al.*, 2019). Während Metallionen in geringen Konzentrationen essentiell für die Funktionsfähigkeit von Proteinen sind, wirken sie in hohen Konzentrationen toxisch auf Organismen (Bruins *et al.*, 2000, Spain, 2003). Zum Schutz vor zu hohen Metallionenkonzentrationen in der zellulären Umgebung stellt die Adhäsion und Biofilmbildung eine Überlebensstrategie von Mikroorganismen dar (de Araújo & de Oliveira, 2019). Durch die hohe Zelldichte und die Einbettung in den eigens produzierten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) werden die Zellen im Inneren des Biofilms geschützt und sichern das Überleben der Population (Koechler *et al.*, 2015). Zahlreiche Studien zeigten, dass die Exposition von Metallionenkonzentrationen unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) zu einer induzierten Adhäsion und Biofilmbildung geführt hat (McEldowney, 1994, Chien *et al.*, 2013b, Dey & Paul, 2018). So wurde in Gegenwart von Kupferionen unterhalb der MHK eine erhöhte Biofilmbildung von *Xylella fastidiosa* Zellen ermittelt, während die Zugabe von Konzentrationen oberhalb der MHK zu gebildeten Biofilmen in einer verringerten Biofilmmenge resultierte (Cobine *et al.*, 2013). Zudem wurde eine Induktion der Biofilmbildung in einigen *Escherichia coli* Stämmen in Gegenwart von subinhibitorischen Nickelionenkonzentrationen beobachtet, wobei das Zellwachstum im Biofilm unter einer hohen Metallbelastung im Vergleich zu planktonischen Zellen weniger beeinflusst wurde (Perrin *et al.*, 2009). Neben Studien über die bakterielle Biofilmbildung bei Metallionenstress gibt es nur wenige Beispiele in archaealen Spezies. Das hyperthermophile Euryarchaeon *Archaeoglobus fulgidus* zeigte in Anwesenheit von verschiedenen Umweltstressfaktoren, unter anderem hohe Konzentrationen von Metallionen, eine induzierte Biofilmbildung, wobei eingelagerte Schwermetallionen in den EPS nachgewiesen wurden (Lapaglia & Hartzell, 1997). Untersuchungen von Metallionenstress in *Halobacterium salinarum* basieren ausschließlich auf Zellen im planktonischen Zustand, während die Adhäsion und Biofilmbildung unter Metallionenstress weitestgehend unbekannt ist (Nieto *et al.*, 1987, Kaur *et al.*, 2006, Voica *et al.*, 2016). In ersten Untersuchungen der Auswirkung von verschiedenen Umweltstressfaktoren auf die Biofilmbildung in *H. salinarum* R1 wurde eine bis zu 40% erhöhte Adhäsion und Biofilmbildung in Gegenwart von subinhibitorischen Ni^{2+}-, Ag^{+}, Zn^{2+}- und Cd^{2+}-Konzentrationen beobachtet, während Cu^{2+} die Zelladhäsion inhibierte (Völkel, 2013). Mikroskopische Untersuchungen der Biofilme nach Metallionenexposition zeigten zudem starke Unterschiede der dreidimensionalen Biofilmarchitektur, welche sich Metallionen-spezifisch veränderte (Völkel, 2015). Da Kupfer- und Nickelionen in diesen Studien besonders signifikante Effekte zeigten, sollten die physiologischen und molekularen Auswirkungen dieser bivalenten Metallionen in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

In diesem Teil der Arbeit sollte zunächst der Einfluss von subinhibitorischen Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen auf die Adhäsion und Biofilmbildung in *H. salinarum* R1 untersucht und mit der Auswirkung auf das planktonische Wachstum verglichen werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss einer temporären Behandlung von planktonischen Zellen und reifen Biofilmen mit wachstumsinhibierenden Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen untersucht und das Wachstum in den zwei Lebensformen verglichen werden. Zur Überprüfung einer Biofilm-vermittelten Resistenz in *H. salinarum* sollte außerdem die Zellschädigung nach Metallionenexposition in beiden

Lebensformen ermittelt werden. Um die Rolle der EPS bei Metallionenstress in *H. salinarum* Biofilmen zu analysieren, sollten die EPS in unbehandelten sowie in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Biofilmen quantifiziert und die Zusammensetzung der EPS-Bestandteile analysiert werden. Darüber hinaus sollte die Metallionenbelastung in beiden Lebensformen quantifiziert und verglichen werden.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung von *Halobacterium salinarum* R1 unter Standardbedingungen

Um den Einfluss von Metallionen auf *Halobacterium salinarum* R1 zu untersuchen, sollte zunächst das Aussehen der Zellen sowie die Architektur von Biofilmen in Abwesenheit von Metallionen charakterisiert werden. Hierzu erfolgte eine Kultivierung unter Standardbedingungen in Komplexmedium. Planktonische Zellen wurden schüttelnd in Flüssigkulturen bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3) kultiviert, während die Anzucht von Biofilmen statisch in Kulturschalen über einen Zeitraum von 15 Tagen erfolgte. Zur Visualisierung der Zellen wurden diese mit dem membranpermeablen, DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange gefärbt.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen planktonischer Zellen zeigten eine stäbchenförmige Zellmorphologie einer Länge von durchschnittlich 3-5 μm und einer Breite von etwa 0,5 μm (Abb. 6A). Die dreidimensionale Visualisierung der Biofilmstruktur erfolgte fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung der z-*stack*-Aufnahme. Wie in Studien von Fröls *et al.* (2012) beschrieben, zeigten die Biofilme eine einlagige Zellschicht am Boden der Plastikoberfläche sowie unregelmäßig verteilte zelluläre Aggregate (Mikrokolonien) mit einer turmförmigen Struktur mit einer Höhe von etwa 20 μm (Abb. 6B) (Fröls *et al.*, 2012). Zur detaillierten Untersuchung der Morphologie von Zellen und Zellaggregaten in Biofilmen erfolgten elektronenmikroskopische Untersuchungen. Hierzu wurden Biofilme für 15 Tage auf Kohle-beschichteten Goldnetzchen angezogen. Es folgte die Fixierung der Biofilmzellen auf den Netzchen und eine Kontrastfärbung mit Uranylacetat. Zur Verbesserung der Auflösung und Bildqualität wurden die Netzchen zudem mit Gold beschichtet. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop. Biofilmzellen wiesen ebenfalls eine stäbchenförmige Zellmorphologie mit einer Länge von etwa 3-5 μm auf. Bei einigen Zellen wurden ausgehend von den Zellpolen zudem archaeale Flagellen (Archaellen) beobachtet, die sich spiralförmig über eine Länge von bis zu 10 μm erstreckten. Zwischen den einzelnen Zellen wurden vermehrt kleine Zellaggregate, bestehend aus fünf bis zehn Zellen, beobachtet. Untersuchungen der Zellaggregate zeigten in diesem Bereich ein vermehrtes Auftreten von diffusen Strukturen, welche die Zellen umhüllten (Abb. 6C).

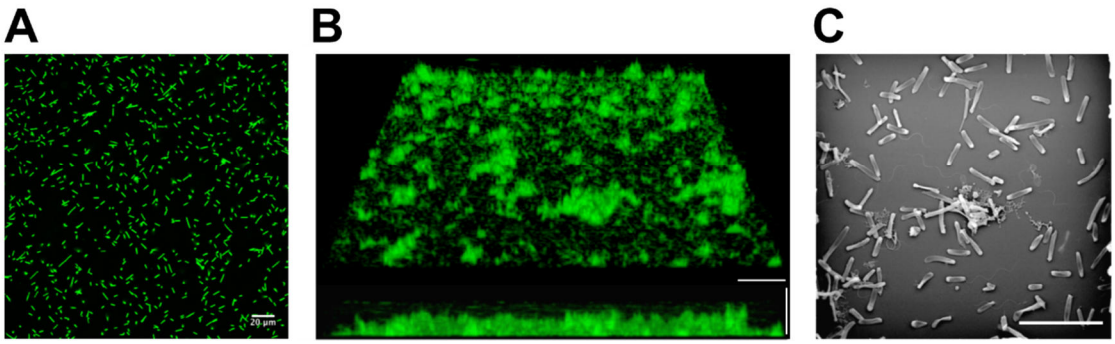


Abbildung 6. Mikroskopische Untersuchungen von *H. salinarum* R1. **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von planktonischen Zellen (OD_{600} 0,3) nach Färbung mit Acridinorange. Der Größenmaßstab beträgt 20 µm. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische z-*stack*-Aufnahme der dreidimensionalen Biofilmstruktur nach 15 Tagen Inkubation auf einer Plastikoberfläche. Die Zellen wurden mit Acridinorange gefärbt. Darstellung einer geneigten Ansicht (oben) und der entsprechenden Seitenansicht (unten). Der Größenmaßstab beträgt 25 µm. **(C)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Biofilmen nach 15 Tagen Inkubation auf einem Kohle-beschichteten Goldnetzchen. Der Größenmaßstab beträgt 10 µm.

Zur Bestimmung der Generationszeit und des Wachstumsverlaufs in unbehandelten Kulturen wurde das Wachstum in planktonischen Zellen und Biofilmen durch Messungen der optischen Dichte (OD_{600}) bzw. der Zellzahl verfolgt. Planktonische Zellen wurden mit einer initialen OD_{600} von 0,02 in Komplexmedium schüttelnd bei 37°C angezogen. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 100 h durch regelmäßige Messungen der OD_{600} verfolgt. Nach einer Latenzphase von 0 bis 5 h erfolgte ein exponentielles Wachstum mit einer Generationszeit von 8,4 h. Im Bereich von 32 bis 71 h folgte eine frühstationäre- und von 72 bis 100 h eine spätstationäre Wachstumsphase (Abb. 7A).

Im Fall von Biofilmen wurde die Generationszeit durch Zellzählungen ermittelt, da Messungen der optischen Dichte die Zellen innerhalb von Aggregaten nicht berücksichtigen. Die Anzucht von Biofilmen erfolgte mit einer initialen Zellzahl von 10^7 Zellen/mL stehend in Kulturschalen mit Komplexmedium bei 37°C. Über einen Zeitraum von 30 Tagen erfolgten regelmäßige Messungen der Zellzahl im Biofilm. Hierzu erfolgte zunächst die Entfernung von planktonischen Zellen durch Abgießen des Überstandes, gefolgt von einem vorsichtigen Waschen des Biofilms mit Basalsalzlösung. Adhärente Biofilmzellen wurden mit einem Spatel von der Oberfläche abgelöst, mit Basalsalzlösung versetzt und zur Auflösung von großen Zellaggregaten auf einem Vortex gemischt. Die Bestimmung der Zellzahl/mL erfolgte mikroskopisch unter Verwendung einer Zählkammer, wobei Einzelzellen sowie Zellen in kleinen Aggregaten gezählt wurden. In den ersten vier Tagen erfolgte ein exponentielles Wachstum mit Erreichen einer Zelldichte von 1,4 x 10^9 Zellen/mL an Tag vier und einer Generationszeit von 25,5 h. Anschließend stagnierte die Zellzahl bis Tag 21 bei etwa 2 x 10^9 Zellen/mL und verringerte sich nach 30 Tagen auf 7 x 10^8 Zellen/mL (Abb. 7B).

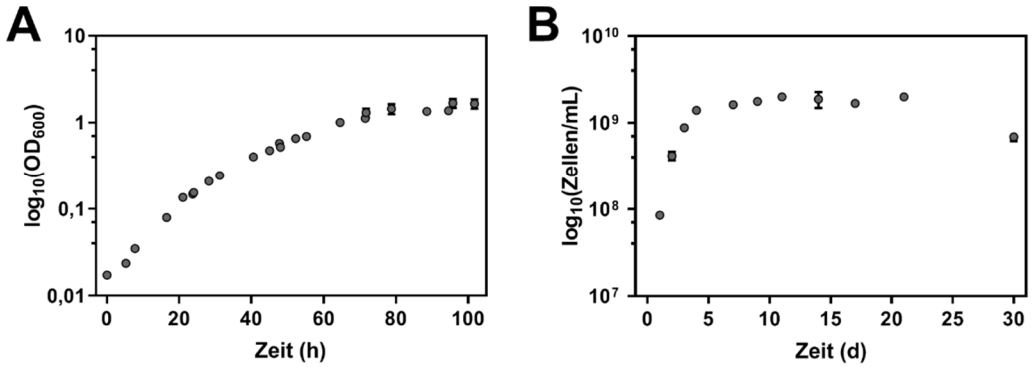


Abbildung 7. Wachstum von *H. salinarum* planktonischen Zellen und Biofilmzellen unter physiologischen Bedingungen. **(A)** Wachstumsverlauf von planktonischen Zellen in Schüttelkulturen bei 37°C über 100 h. Die Ermittlung des Wachstums erfolgte über photometrische Messungen der OD_{600}. **(B)** Wachstumsverlauf von Biofilmzellen in Kulturschalen bei 37°C über 30 Tage. Die Ermittlung des Wachstums erfolgte mikroskopisch durch Zellzählung mittels Zählkammer.

3.2.2 Wachstum und Adhäsion in Gegenwart von Kupfer- und Nickelionen

Da natürliche Habitate oft mit erhöhten Konzentrationen von Schwermetallen belastet sind, erfolgten in vorangegangen Studien bereits erste Untersuchungen der Auswirkung von Cadmium-, Cobalt-, Kupfer-, Nickel-, Silber- und Zinkionen auf das Wachstum und die Adhäsion in *H. salinarum* R1 (Völkel, 2013, Völkel, 2015). Da besonders die Gegenwart von Kuper- und Nickelionen signifikante Effekte zeigte, wurde im Folgenden der Einfluss dieser zweiwertigen Metallionen genauer analysiert. Dies erfolgte in Konzentrationen von 0,5 bis 7 mM Cu^{2+} bzw. 0,5 bis 15 mM Ni^{2+}, da dieser Konzentrationsbereich auch in natürlichen Habitaten vorkommt (Kumar *et al.*, 2010, Pereira *et al.*, 2013).

Zur Bestimmung der MHK von Cu^{2+} und Ni^{2+} erfolgten photometrische Messungen der OD_{600} nach 72 h schüttelnder Kultivierung in Gegenwart oben genannter Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Konzentrationen. Zur Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich in Komplexmedium ohne Metallionen kultiviert. Nach 72 h Kultivierung erreichte die Kontrollkultur eine OD_{600} von 1,1. In Gegenwart von bis zu 3 mM Cu^{2+} wurde kein Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur ermittelt, während das Wachstum bei 5 mM Cu^{2+} mit einer OD_{600} von 0,8 leicht inhibiert war. Bei 7 mM Cu^{2+} erfolgte eine vollständige Inhibition des Wachstums, sodass diese Konzentration als MHK definiert wurde (Abb. 8A). In Gegenwart von Nickelionen erfolgte bis 1 mM kein Einfluss auf das Wachstum, während höhere Konzentrationen zu einer signifikanten Inhibition führten. Bei 15 mM wurde kein Wachstum ermittelt, sodass diese Konzentration als MHK für Ni^{2+} definiert wurde (Abb. 8B). Die Untersuchung der Adhäsion und Biofilmbildung in Gegenwart von steigenden Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Konzentrationen erfolgte mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest. Hierzu wurden die Zellen für 13 Tage in den Kavitäten einer 24-Kavitäten Mikrotiterplatte angezogen. Für die Quantifizierung der Zelladhäsion am Boden der Kavitäten erfolgte eine Färbung mit Acridinorange und die Messung des Fluoreszenzsignals der gefärbten Zellen. Zur Analyse der Adhäsion in Gegenwart von Metallionen wurden die erhaltenen Werte auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der unbehandelten Kontrollprobe normiert (Abb. 8C, D). In Gegenwart von Cu^{2+} war die Adhäsion bis 3 mM auf ca. 30% verringert und bei 5 und 7 mM vollständig inhibiert (Abb. 8C). Verglichen mit dem Einfluss auf das planktonische Wachstum zeigten Kupferionen einen stärker inhibierenden Effekt auf die Adhäsion und Biofilmbildung.

Im Fall von Ni^{2+} wurde eine bis zu 30% erhöhte Adhäsion in Gegenwart von 0,5 und 1 mM beobachtet. Bei 3 und 5 mM Ni^{2+} erfolgte eine verringerte Adhäsion (55% bzw. 40%), während die Adhäsion bei 8 und 15 mM vollständig inhibiert war (Abb. 8D). Dies zeigt einen ähnlichen Effekt von Nickelionen auf das planktonische Wachstum und die Zelladhäsion.

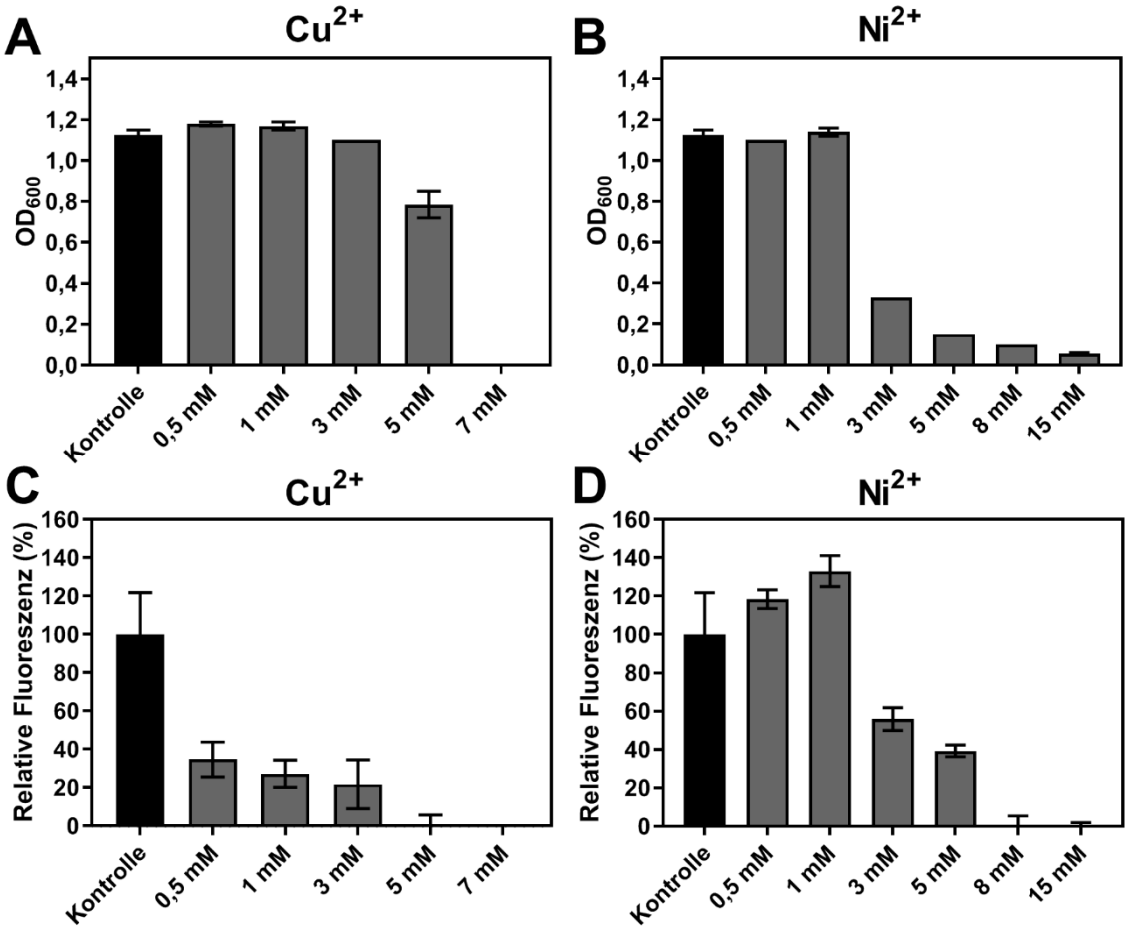


Abbildung 8. Einfluss der Gegenwart von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf das planktonische Wachstum und die Adhäsion von *H. salinarum* R1. Als Kontrolle wurden jeweils Zellen in Komplexmedium kultiviert. **(A-B)** OD_{600} nach 72 h Kultivierung von planktonischen Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen von Cu^{2+} **(A)** und Ni^{2+} **(B)**. Die Daten basieren jeweils auf drei biologischen Replikaten. **(C-D)** Quantifizierung der Adhäsion nach 13 Tagen Kultivierung in Gegenwart von Cu^{2+} **(C)** und Ni^{2+} **(D)**. Die Diagramme zeigen die relativen Fluoreszenzsignale adhärenter Zellen, welche auf die Messwerte der Kontrollproben normiert wurden. Die Daten basieren auf vier biologischen Replikaten, bestehend aus jeweils mindestens sechs technischen Replikaten.

Zusätzlich zur Quantifizierung der Adhäsion erfolgte eine phänotypische Untersuchung der Biofilmbildung in Gegenwart von Kupfer- und Nickelionen mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie (CLSM). Hierzu wurden Biofilme in kleinen Kulturschalen mit einer Plastikoberfläche in Komplexmedium mit 0,5 bis 5 mM Cu^{2+} bzw. Ni^{2+} für 13 Tage angezogen. Als Kontrolle wurden parallel Biofilme in Komplexmedium ohne Metallionen kultiviert. Es erfolgte eine Färbung mit den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen Acridinorange (AO) und Propidiumiodid (PI). AO (grünes Signal) ist membranpermeabel und färbt lebende und tote Zellen, während PI (rotes Signal) die Membran lebender Zellen nicht durchdringen kann und tote Zellen sowie extrazelluläre DNA (eDNA) färbt.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Biofilmen ohne den Einfluss von Metallionen zeigten eine Schicht von adhärenten Zellen sowie mehrere kleine Mikrokolonien. In Gegenwart von 0,5

und 1 mM Cu^{2+} wurde eine verringerte Menge adhärenter Zellen auf der Oberfläche beobachtet, während der Anteil von Mikrokolonien signifikant erhöht war. Verglichen mit den unbehandelten Biofilmen waren die Mikrokolonien zudem stark vergrößert und wiesen einen erhöhten Anteil von eDNA auf. Mit steigender Konzentration von Cu^{2+} auf 2,5 und 5 mM verringerte sich der Anteil von adhärenten Zellen, sodass bei 5 mM ausschließlich Mikrokolonien beobachtet wurden (Abb. 9). Im Fall von Nickelionen wurde in Gegenwart von 0,5 mM Ni^{2+} eine starke Zunahme von adhärenten Zellen, welche eine mehrlagige Schicht auf der Oberfläche gebildet haben, beobachtet. Auf der Zellschicht befand sich eine erhöhte Menge von netzartig verteilten Mikrokolonien mit einem geringen Anteil von eDNA. Höhere Ni^{2+}-Konzentrationen führten zu einer geringeren Zellmenge und Anzahl von Mikrokolonien. Jedoch war die Zellzahl und die Menge von Mikrokolonien auch bei der höchsten Konzentration (5 mM) nicht verringert im Vergleich zu den unbehandelten Biofilmen (Abb. 9).

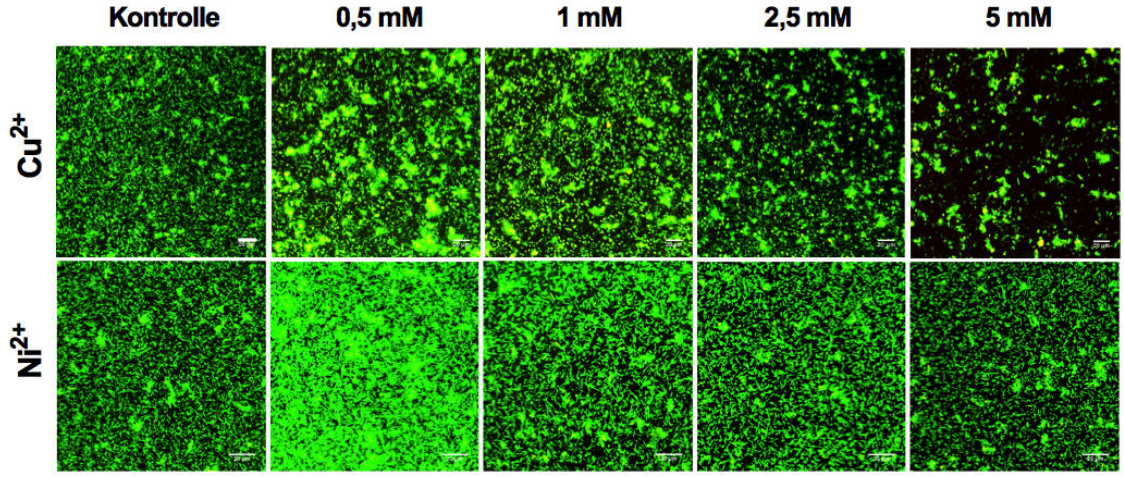


Abbildung 9. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *H. salinarum* R1 Biofilmen nach 13 Tagen Kultivierung in Gegenwart von 0,5 bis 5 mM Kupfer- bzw. Nickelionen. Als Kontrolle wurden Biofilme in Komplexmedium ohne Metallionen angezogen. Biofilme wurden mit AO zur Färbung von intra- und extrazellulärer DNA (grünes Signal) und PI zur Färbung von toten Zellen und eDNA (rotes Signal) gefärbt. Der Größenmaßstab beträgt 20 µm.

3.2.3 Reaktion von planktonischen Zellen und Biofilmen auf die Zugabe von Kupfer- und Nickelionen

Im Folgenden wurde der Einfluss einer temporären Metallionen-Exposition auf planktonische Zellen im exponentiellen Wachstum und auf reife Biofilme nach 14 Tagen Kultivierung untersucht. Dazu wurden planktonische Zellen von *H. salinarum* R1 in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600} von 0,3 jeweils für 6, 24 und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von Cu^{2+} (0,5 – 5 mM) und Ni^{2+} (5 – 40 mM) schüttelnd bei 37°C kultiviert und mit den Metallionen anschließend auf Festmedien ausplattiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich Flüssigkulturen ohne Zugabe von Metallionen mitgeführt. Nach zehn Tagen Inkubation der Agarplatten bei 42°C erfolgte die Auswertung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) auf den Platten (Tabelle 6, Abb. 10A-B).

Im Fall einer Exposition mit Kupferionen wurde bei 0,5 und 1 mM Cu^{2+} kein Einfluss auf die Kultivierbarkeit der Zellen beobachtet, während die Kultivierung in 2,5 und 5 mM Cu^{2+} bei den drei Expositionsdauern jeweils zu einer leichten Verringerung der KBE führte (Tabelle 6, Abb. 10A). Ebenso hatten Expositionsdauern von bis zu 96 h keinen signifikanten Einfluss auf die Kultivierbarkeit zur Folge (Daten nicht gezeigt). Die Kultivierung in Medium mit Nickelionen zeigte im Fall von 5 mM Ni^{2+} nach 6 h Exposition keinen Effekt auf die Kultivierbarkeit,

während nach 24 und 48 h eine signifikante Verringerung der KBE beobachtet wurde. In Gegenwart von 15 und 20 mM Ni^{2+} erfolgte mit steigender Expositionsdauer eine kontinuierliche Verringerung der KBE. Die Exposition in 40 mM Ni^{2+} führte bereits nach 6 h zu einer stark verringerten Kultivierbarkeit, während nach 24 und 48 h ein vollständiger Verlust der Kultivierbarkeit auf den Platten beobachtet wurde (Tabelle 6, Abb. 10B).

Aufgrund des signifikanten Einflusses auf die Kultivierbarkeit von *H. salinarum* Zellen nach 24 h in Anwesenheit von Ni^{2+} wurde diese Expositionsdauer für folgende Untersuchungen als Standard festgelegt. Da für Cu^{2+} unter identischen Bedingungen sogar nach 96 h kein signifikanter Effekt auf die Kultivierbarkeit beobachtet worden war, wurde zwecks der Vergleichbarkeit der beiden bivalenten Metallionen die gleiche Expositionsdauer für weitere Analysen gewählt.

Tabelle 6. Kultivierbarkeit von *H. salinarum* nach Exposition mit Cu^{2+} und Ni^{2+}.

	Cu^{2+}					**Ni^{2+}**				
	0 mM	0,5 mM	1 mM	2,5 mM	5 mM	0 mM	5 mM	15 mM	20 mM	40 mM
	x 10^8 KBE/mL					**x 10^7 KBE/mL**				
6 h	4,1	3,6	2,6	2,0	1,6	7,9	6,2	5,8	2,9	0,1
24 h	5,8	5,6	2,5	3,0	1,3	9,2	5,6	2,3	1,8	0
48 h	6,3	7,0	7,2	2,5	1,8	6,3	3,8	0,7	0,4	0

Um einen Einfluss von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf das Wachstum von planktonischen Zellen zu untersuchen, wurden den Flüssigkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3) Kupferionen (0,5 bis 5 mM) und Nickelionen (5 bis 40 mM) zugegeben und die Zellen wurden für 24 h schüttelnd kultiviert. Als Kontrolle wurden zusätzlich Kulturen ohne Metallionenzugabe inkubiert. Die Änderung der Zellmenge nach 24 h wurde durch photometrische Messungen der OD_{600} untersucht.

In den Kontrollkulturen ohne Zugabe von Metallionen wurde nach 24 h eine Erhöhung der OD_{600} auf 0,9-0,96 beobachtet. Die Zugabe von 0,5 mM Cu^{2+} führte zu einer leichten Förderung des Wachstums, während mit steigenden Cu^{2+}-Konzentrationen eine kontinuierliche Inhibition des Wachstums erfolgte, sodass bei 5 mM eine finale OD_{600} von 0,6 erreicht wurde (Abb. 10C). Die Zugabe von Nickelionen zeigte einen stark inhibierenden Effekt auf das Wachstum. Während bei 5 mM Ni^{2+} ein geringes Wachstum mit einer finalen OD_{600} von 0,5 beobachtet wurde, führten höhere Konzentrationen (15, 20 und 40 mM) zu einer vollständigen Inhibition des Wachstums (Abb. 10D).

Zur Untersuchung des Einflusses von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf die Adhäsion in reifen Biofilmen, erfolgte ein Fluoreszenz-basierter Adhäsionstest in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten. Hierzu wurden Biofilme für 14 Tage in Komplexmedium angezogen und für 24 h mit 0,25 bis 5 mM Cu^{2+} bzw. 2,5 bis 40 mM Ni^{2+} kultiviert. Als Kontrolle wurden zudem Kavitäten ohne Zugabe von Metallionen mitgeführt. Zur Quantifizierung der Adhäsion nach Metallionenzugabe wurden die Biofilme mit dem DNA-interkalierenden, membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff AO gefärbt und das Fluoreszenzsignal adhärenter Zellen gemessen. Zur Analyse der Adhäsion

nach Zugabe von Metallionen wurden die erhaltenen Werte auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der unbehandelten Kontrollprobe normiert.

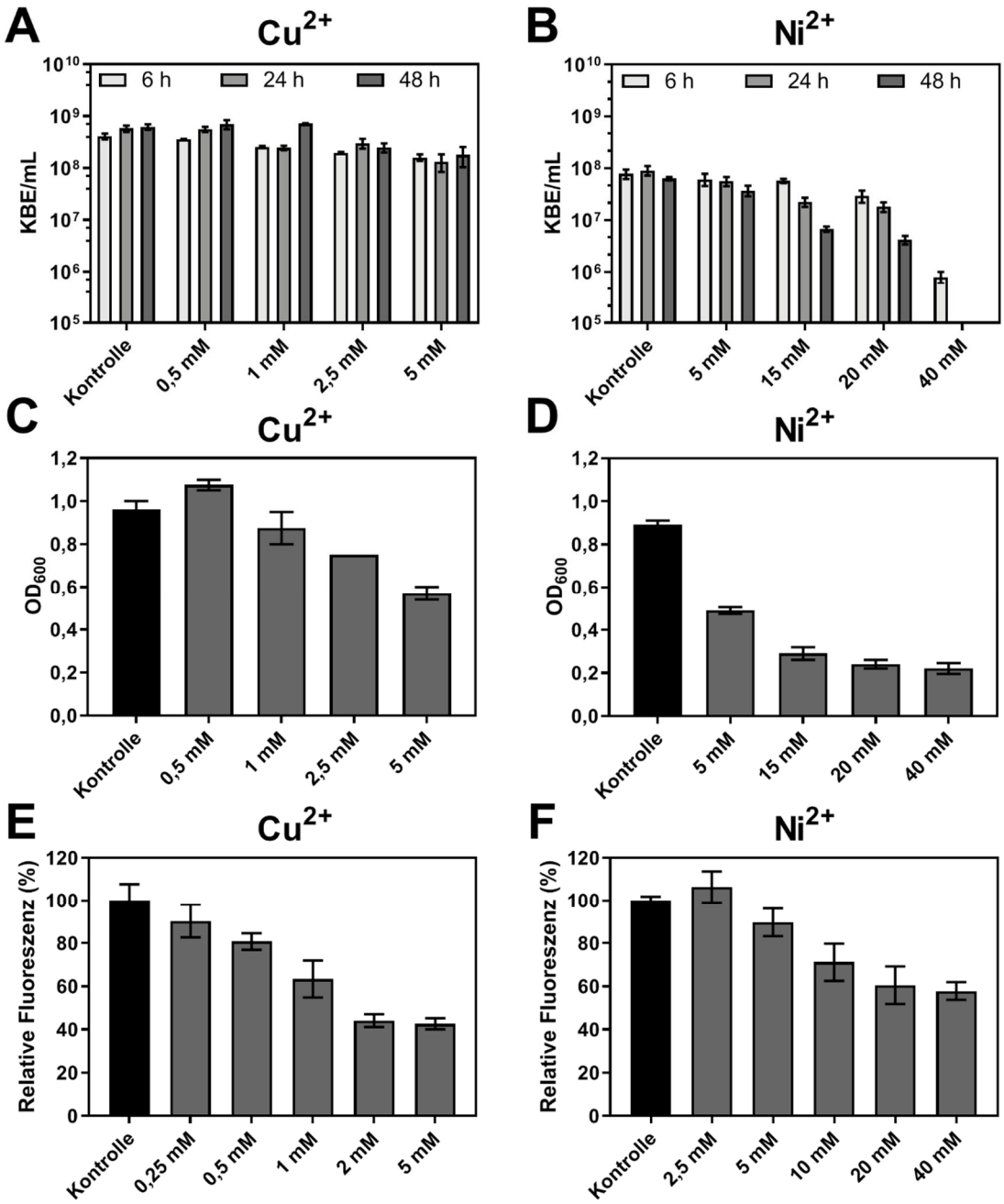


Abbildung 10. Einfluss einer temporären Exposition von Kupfer- und Nickelionen auf *H. salinarum* R1. **(A-B)** Kultivierbarkeit von *H. salinarum* auf Festmedien nach 6, 24 und 48 h Exposition mit Cu^{2+} **(A)** und Ni^{2+} **(B)**. Agarplatten wurden zehn Tage bei 42°C inkubiert und die KBE/mL ermittelt. **(C-D)** OD_{600} planktonischer Zellen nach 24 h Exposition mit Cu^{2+} **(C)** und Ni^{2+} **(D)**. Flüssigkulturen wurden bei OD_{600} 0,3 mit Metallionen versetzt und die OD_{600} wurde nach 24 h gemessen. **(E-F)** Quantifizierung der Adhäsion reifer Biofilme nach 24 h Exposition mit Cu^{2+} **(E)** und Ni^{2+} **(F)**. Biofilme wurden 14 Tage in Komplexmedium angezogen und für 24 h mit Metallionen inkubiert. Die Diagramme zeigen die relativen Fluoreszenzsignale adhärenter Zellen, welche auf die Messwerte der unbehandelten Kontrollproben normiert wurden.

Die 24 h Exposition mit Cu^{2+} führte mit steigender Konzentration zu einer kontinuierlichen Verringerung der Adhäsion. Während die Adhäsion bei 0,25 mM leicht verringert war, führte die Zugabe von 5 mM Cu^{2+} zu einer Verringerung auf 42% im Vergleich zur Kontrolle (Abb.

10E). Im Fall von Nickelionen führte die Zugabe von 2,5 mM zu einer leicht verstärkten Adhäsion, während höhere Ni^{2+}-Konzentration in einer kontinuierlichen Verringerung der Adhäsion auf final 60% bei 40 mM resultierten (Abb. 10F). Ein Vergleich des Effekts von Metallionen auf das planktonische Wachstum und die Adhäsion reifer Biofilme zeigte im Fall von Kupferionen einen stärker inhibierenden Effekt auf die Adhäsion, während die Zugabe von Nickelionen das planktonische Wachstum stärker inhibierte.

Nach Quantifizierung der Adhäsion von Biofilmen mit Metallionen wurde die dreidimensionale Biofilmarchitektur nach Zugabe der jeweils zwei höchsten Kupfer- und Nickelkonzentrationen untersucht. Hierzu wurden Biofilme in kleinen Kulturschalen für 14 Tage in Komplexmedium kultiviert und für 24 h mit 2,5 und 5 mM Cu^{2+}, bzw. 20 und 40 mM Ni^{2+} behandelt. Zudem wurden als Kontrolle unbehandelte Biofilme kultiviert. Es folgte die Entfernung planktonischer Zellen durch Waschen der Biofilme mit Basalsalzlösung und eine Fluoreszenzfärbung mit AO (grünes Signal) zur Zellfärbung, PI (rotes Signal) zur Färbung toter Zellen und eDNA und Concanavalin A (ConA, blaues Signal) zur Färbung von Glykosidbindungen in der extrazellulären Matrix in Mikrokolonien. Die dreidimensionale Visualisierung der Biofilmstruktur erfolgte mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie unter Verwendung der z-*stack*-Aufnahme.

Die Aufnahmen des unbehandelten Biofilms zeigten eine Schicht von adhärenten Zellen auf der Oberfläche und dazwischenliegende Mikrokolonien einer Höhe von bis zu 20 μm. Im Bereich der Mikrokolonien wurden vereinzelte Stellen mit Glykosidbindungen detektiert (Abb. 11). Eine 24 h Exposition mit Kupferionen resultierte in einem Ablösen der adhärenten Zellen auf der Oberfläche mit zunehmender Cu^{2+}-Konzentration. Bei 5 mM wurden nur noch vereinzelte kleine Mikrokolonien einer Höhe von etwa 10 μm beobachtet, in denen ein erhöhter Anteil von eDNA vorhanden war. Adhärente Zellen waren größtenteils abgelöst und bewegten sich zwischen den Mikrokolonien (Abb. 11, Seitenansicht). Die Zugabe von Nickelionen führte im Fall von 20 und 40 mM zu einer starken Zunahme von adhärenten Zellen, welche eine mehrlagige Zellschicht auf der Oberfläche bildeten. Zudem wurde eine vermehrte Bildung von größeren Mikrokolonien auf der Zellschicht beobachtet (Abb. 11).

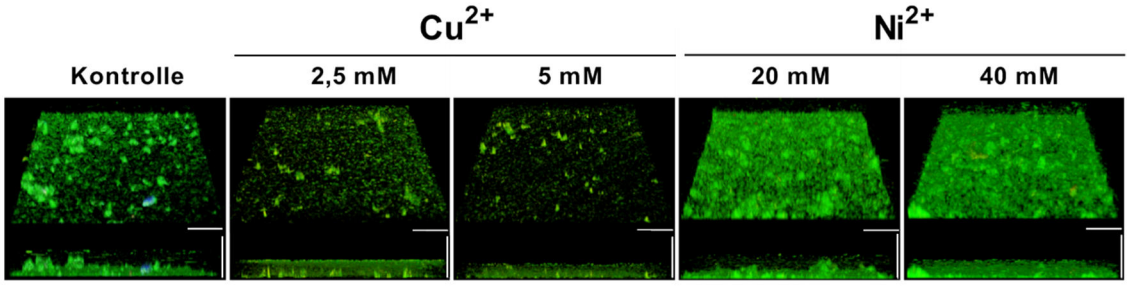


Abbildung 11. Fluoreszenzmikroskopische z-*stack*-Aufnahmen der Biofilmarchitektur nach 24 h Zugabe von Kupfer- bzw. Nickelionen auf reife Biofilme. Die Anzucht der Biofilme erfolgte in Komplexmedium für 14 Tage. Nach einer 24 h Exposition mit Cu^{2+} und Ni^{2+} wurden die Biofilme mit AO (grünes Signal, Färbung von Zellen), PI (rotes Signal, Färbung von toten Zellen und eDNA) und ConA (blaues Signal, Färbung von Glykosidbindungen) gefärbt. Darstellung einer geneigten Ansicht (oben) und der entsprechenden Seitenansicht (unten). Der Größenmaßstab beträgt 25 µm.

Für eine detailliertere Untersuchung der veränderten Biofilmarchitektur und der Zellmorphologie in Mikrokolonien nach 24 h Exposition mit Metallionen wurden elektronenmikroskopische Analysen von Biofilmen durchgeführt. Hierbei wurden jeweils die höchsten getesteten Konzentrationen für Cu^{2+} (5 mM) und Ni^{2+} (40 mM) zugegeben. Die

Anzucht von Biofilmen erfolgte auf Kohle-beschichteten Goldnetzchen in Komplexmedium für 14 Tage. Die gebildeten Biofilme wurden anschließend für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert und zur Entfernung von planktonischen Zellen mit Basalsalzlösung gewaschen. Für die elektronenmikroskopischen Analysen wurden die Biofilmzellen auf den Netzchen fixiert und mit Uranylacetat kontrastiert. Zudem erfolgte eine Beschichtung der Netzchen mit Gold zur Optimierung der Auflösung und Bildqualität. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop. Hierbei wurden zunächst Übersichtsaufnahmen der adhärenten Zellen auf den Gittern des Netzchens gemacht, gefolgt von vergrößerten Aufnahmen der Mikrokolonien zwischen den Gittern (Abb. 12). Bei den Biofilmen ohne Zugabe von Metallionen wurde auf den Gittern eine gleichmäßig verteile Schicht von einzelnen adhärenten Zellen sowie von kleinen Zellaggregaten beobachtet. Die vergrößerte Ansicht zeigte mehrere kleine Zellaggregate, welche von diffusen Strukturen umhüllt waren. Biofilme, die mit Kupferionen behandelt wurden, zeigten in der Übersicht eine vermehrte Bildung von großen und dichten Zellaggregaten, während nur wenige einzelne Zellen auf den Gittern vorhanden waren. Die Zellaggregate waren ebenfalls von diffusen Strukturen umhüllt und die Zellen damit verbunden (Abb. 12). Die Zugabe von Nickelionen führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl adhärenter Zellen, welche in dichten Zellschichten auf den Gittern des Netzchens angeordnet waren. Vergrößerte Aufnahmen zwischen den Gittern zeigten zwischen den mehrlagigen Zellschichten zudem dichte Zellaggregate, welche in die Höhe ragten und ebenfalls von diffusen Strukturen umgeben waren (Abb. 12).

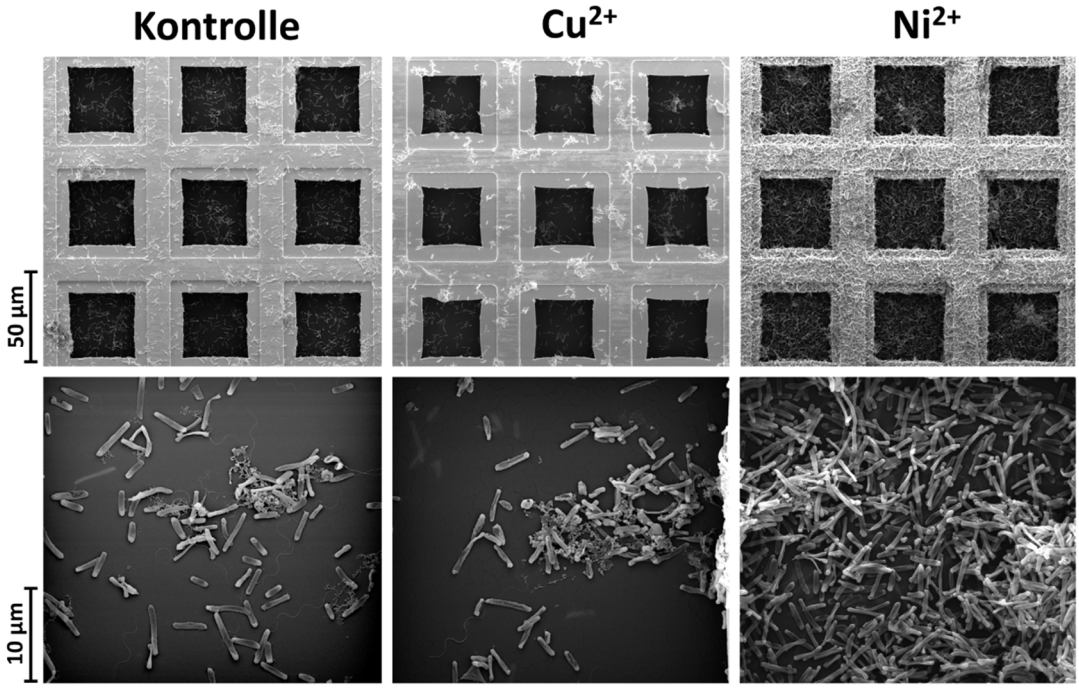


Abbildung 12. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen *von H. salinarum* Biofilmen nach 24 h Inkubation mit Cu^{2+} und Ni^{2+}. Biofilme wurden 14 Tage auf Kohle-beschichteten Goldnetzchen in Komplexmedium angezogen und für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Als Kontrolle wurden Biofilme ohne Zugabe von Metallionen kultiviert.

Bei den mikroskopischen Untersuchungen wurde eine Änderung der Zellzahl im Biofilm nach Zugabe von Kupfer- und Nickelionen beobachtet. Während die Exposition von Cu^{2+} in einer Verringerung von adhärenten Zellen resultierte, führte die Zugabe von Ni^{2+} auf reife Biofilme zu einer signifikant erhöhten Zellzahl. Um diese Beobachtungen zu quantifizieren, wurde die Zellzahl in Biofilmen nach Metallionenbehandlung bestimmt. Für einen Vergleich der Reaktion

von planktonischen Zellen und Biofilmen auf Metallionen erfolgte zudem eine Bestimmung der Zellzahlen in Flüssigkulturen nach 24 h Inkubation mit Metallionen.

Planktonische Zellen wurden in Komplexmedium angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3) mit den zuvor ermittelten MHKs für Cu^{2+} (5 mM) und Ni^{2+}(15 mM) versetzt. Die Zellen wurden für 24 h schüttelnd inkubiert. Als Kontrolle wurden zudem Flüssigkulturen ohne Zugabe von Metallionen kultiviert. Zur Ermittlung einer Änderung der Zellzahl nach 24 h wurde die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h sowie nach 24 h mikroskopisch mit einer Zählkammer bestimmt. Die ermittelten Zellzahlen wurden jeweils auf die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h normiert. Während die Zellzahl in den unbehandelten Kulturen nach 24 h auf 327% anstieg, erfolgte nach Cu^{2+}-Behandlung eine leichte Erhöhung auf 118% und nach Ni^{2+}-Behandlung eine Verringerung der Zellzahl auf 85% (Abb. 13).

Biofilme wurden 14 Tage in Kulturschalen mit Komplexmedium angezogen, mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} versetzt und für 24 h stehend inkubiert. Zudem wurden unbehandelte Biofilme als Kontrolle mitgeführt. Wie bei der Zellzahlbestimmung planktonischer Zellen wurde die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h sowie nach 24 h ermittelt. Zur Entfernung planktonischer Zellen wurde der Überstand in den Schalen entfernt und die Biofilme mit Basalsalzlösung gewaschen. Das Ablösen der Biofilmzellen von der Oberfläche erfolgte mit einem Spatel. Anschließend wurden die Zellen in Basalsalzlösung aufgenommen und die Zellzahl mikroskopisch mittels Zählkammer bestimmt. Die ermittelten Zellzahlen wurden jeweils auf die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h normiert. Während nach 24 h Inkubation bei der unbehandelten Kontrolle eine geringe Steigerung der Zellzahl auf 105% ermittelt wurde, führte die Inkubation mit Cu^{2+} zu einer starken Abnahme der Zellzahl auf 59% und mit Ni^{2+} zu einer signifikanten Zunahme auf 167% (Abb.13).

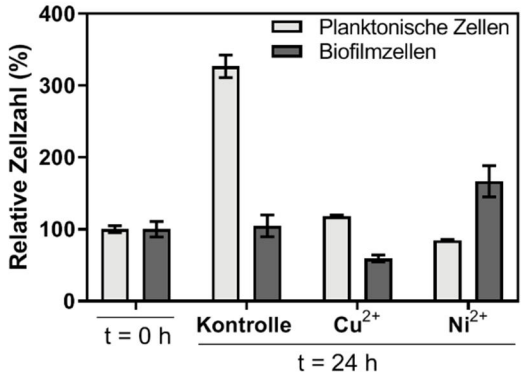


Abbildung 13. Änderung der Zellzahl in planktonischen Zellen und Biofilmen nach 24 h Inkubation mit Cu^{2+} bzw. Ni^{2+}. Die Behandlung von planktonischen Zellen erfolgte mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+}. Biofilme wurden mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} behandelt. Zusätzlich wurden Kontrollen ohne Metallionenzugabe mitgeführt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mikroskopisch mit einer Zählkammer zum Zeitpunkt 0 h sowie nach 24 h. Die ermittelte Zellzahl nach 24 h wurde jeweils auf die entsprechende Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h normiert.

Die Änderung der Zellzahl in planktonischen Zellen und Biofilmen zeigte, dass Metallionen einen unterschiedlichen Einfluss auf planktonische Zellen und Biofilme haben. Während 5 mM Cu^{2+} bei planktonischen Zellen zu einer geringen Vermehrung der Zellen führte, erfolgte bei gleicher Konzentration in Biofilmen eine starke Abnahme von adhärenten Zellen. Im Gegensatz hierzu führte die Zugabe von 15 mM Ni^{2+} bei planktonischen Zellen zu einer Abnahme der

Zellzahl, während die Zahl der adhärenten Zellen sogar bei einer Erhöhung auf 40 mM stark zugenommen hat.

3.2.4 Untersuchung der Zellvitaliät nach Exposition mit Kupfer- und Nickelionen

Um zu untersuchen welche Auswirkungen verschiedene Konzentrationen von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf die Zellvitalität in planktonischen Zellen und Biofilmen haben, wurde im Folgenden der Anteil von toten Zellen nach 24 h Inkubation mit Metallionen quantifiziert. Hierfür wurde eine molekulare Quantifizierungsmethode, welche auf einer Zellbehandlung mit dem Membran-impermeablen Farbstoff Propidiummonoazid (PMA) in Kombination mit qPCR (PMA-qPCR) basiert, für *H. salinarum* entwickelt (Völkel *et al.*, 2018). PMA ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher ausschließlich in die DNA von Membran-geschädigten, toten Zellen interkaliert. Eine Photoaktivierung von PMA führt zu einer kovalenten Bindung des Farbstoffs an die DNA, sodass eine nachfolgende Amplifikation inhibiert wird. Durch Erstellung eines Standards aus definierten Anteilen von toten Zellen und den mittels qPCR erhaltenen ΔC_T-Werten von PMA-behandelten und unbehandelten Ansätzen, wird eine Quantifizierung von toten Zellen in Flüssigkulturen und Biofilmen nach Metallionenbehandlung ermöglicht.

Zur Erstellung eines Standards wurden Ansätze mit einem steigenden Anteil (0, 25, 50, 75, 90, 99, 99,9, 100%) von hitzebehandelten, toten *H. salinarum* Zellen vorbereitet. Die Zellen wurden mit PMA behandelt und anschließend lysiert. Es folgte die Amplifikation eines 16S rDNA-Fragments mittels qPCR. Die erhaltenen C_T-Werte der Ansätze ohne PMA-Behandlung wurden von den C_T-Werten PMA-behandelter Ansätze subtrahiert und die resultierten ΔC_T-Werten wurden graphisch gegen den steigenden Anteil von toten Zellen aufgetragen (Abb. 14A). Die erhaltene Standardkurve zeigte im Bereich von 0 bis 75% toten Zellen einen flach verlaufenden linearen Zusammenhang, während dieser ab 90% toten Zellen signifikant anstieg (Abb. 14A).

Der Einfluss von Metallionen auf die Zellvitalität in *H. salinarum* wurde in Zellen aus Flüssigkulturen sowie aus Biofilmen untersucht. Im Fall von Kupferionen erfolgte eine Behandlung mit jeweils 5 mM (MHK) sowie mit 8 und 10 mM Cu^{2+}, während Nickelionen in finalen Konzentrationen von 15 mM (MHK) sowie von 20 und 40 mM Ni^{2+} (maximale Konzentration bei einem physiologischen pH-Wert) zugegeben wurden. Die Zellen wurden jeweils für 24 h mit den Metallionen inkubiert. Als Kontrolle wurden zudem Flüssigkulturen und Biofilme ohne Zugabe von Metallionen mitgeführt. Planktonische Zellen wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3) in Komplexmedium kultiviert und für 24 h mit den entsprechenden Konzentrationen von Cu^{2+} und Ni^{2+} inkubiert. Die Anzucht der Biofilme erfolgte für 13 Tage in Kulturschalen mit Komplexmedium, gefolgt von einer 24 h Inkubation mit Metallionen. Die Biofilme wurden anschließend mit Basalsalzlösung gewaschen und von der Oberfläche abgelöst. Es folgte die Behandlung der Zellen mit PMA und die Amplifikation der DNA mittels qPCR. Die erhaltenen ΔC_T-Werte wurden zur Auswertung des Anteils von toten Zellen mit denen der zuvor erstellten Standardkurve verglichen.

Der Anteil von toten Zellen in den unbehandelten Kontrollen war jeweils unter 25%. Die Behandlung mit 5 mM Cu^{2+} resultierte ebenfalls in einem Anteil von unter 25% toten Zellen in planktonischen Kulturen und Biofilmen, wobei der Anteil toter Zellen im Biofilm im Vergleich zur planktonischen Kultur leicht erhöht war. Eine Behandlung von 8 und 10 mM Cu^{2+} führte bei planktonischen Zellen zu einem Anteil von bis zu 90% bzw. 100% toten Zellen, während im Biofilm bis zu 25% bzw. 75% tote Zellen bei gleichen Konzentrationen ermittelt wurden (Abb. 14B). Bei Zugabe von 15, 20 und 40 mM Ni^{2+} wurde sowohl in planktonischen Kulturen als auch in Biofilmen ein maximaler Anteil von 25% toten Zellen nachgewiesen. Hierbei war jedoch die Menge von toten Zellen in planktonischen Kulturen im Vergleich zu Biofilmen leicht erhöht (Abb. 14B).

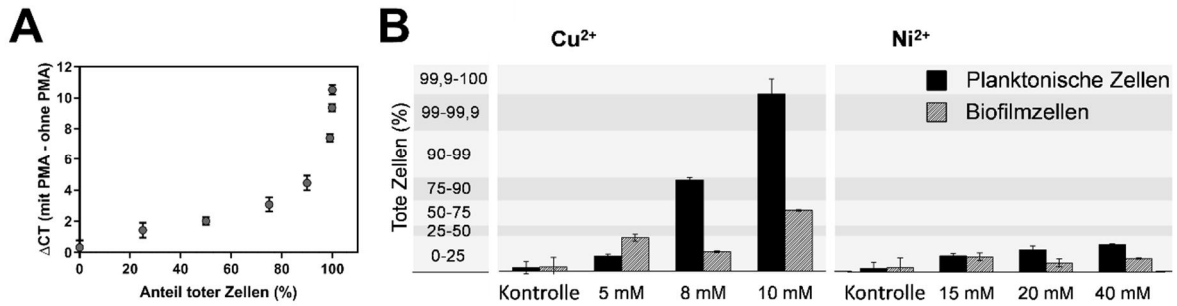


Abbildung 14. Quantifizierung von toten *H. salinarum* R1 Zellen mittels PMA-qPCR. **(A)** Erstellte Standardkurve aus ΔC_T-Werten bei definierten Anteilen von lebenden und toten *H. salinarum* Zellen. **(B)** Quantifizierung von toten Zellen in Flüssigkulturen und Biofilmen nach Behandlung mit Cu^{2+} bzw. Ni^{2+}. Planktonische Zellen (OD_{600} 0,3) und 13 Tage angezogene Biofilme wurden für 24 h mit wachstumsinhibierenden Konzentrationen von Cu^{2+} und Ni^{2+} behandelt. Der Anteil von toten Zellen wurde durch einen Vergleich der ΔC_T-Werte der Standardkurve bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Die Quantifizierung der Zellvitalität in planktonischen Zellen und Biofilmen zeigte, dass bei identischer Konzentration der Anteil von toten Zellen in planktonischen Kulturen gegenüber Biofilmen meist erhöht war. Dies lässt darauf schließen, dass Biofilme resistenter gegenüber letalen Konzentrationen von Metallionen sind. Um zu überprüfen ob die EPS, von denen die Zellen im Biofilm umgeben sind, zur erhöhten Toleranz beitragen, wurde im Folgenden die Zusammensetzung der EPS im Biofilm nach Metallionenbehandlung untersucht.

3.2.5 Zusammensetzung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) nach Zugabe von Kupfer- und Nickelionen

Zur Untersuchung der EPS in *H. salinarum* R1 Biofilmen nach Zugabe von Kupfer- bzw. Nickelionen wurde zunächst eine geeignete Methode zur Isolierung der EPS entwickelt. Basierend auf Studien zur Untersuchung der EPS in bakteriellen Biofilmen sowie in Biofilmen des thermoacidophilen Archaeons *Sulfolobus acidocaldarius* (Rode, 2004, Jachlewski *et al.*, 2015) wurden in dieser Arbeit verschiedene chemische und physikalische EPS-Isolierungsmethoden getestet.

Die Anzucht von *H. salinarum* R1 Biofilmen erfolgte in großen Kulturschalen in Komplexmedium für 15 Tage. Zur Entfernung von planktonischen Zellen wurde der Überstand entfernt und die Biofilme mit Basalsalzlösung gewaschen. Biofilme wurden mit einem Spatel von der Oberfläche abgelöst und in Basalsalzlösung aufgenommen. Zur Trennung von Zellen und EPS wurde die Biofilmsuspension mit unterschiedlichen Chemikalien behandelt: Es erfolgte jeweils die Zugabe von final 0,5 bzw. 1% EDTA sowie 0,4 M NaOH und eine Kombination aus

0,2% Formaldehyd und 0,4 M NaOH. Die Biofilmsuspensionen wurden nach Zugabe der Chemikalien jeweils für 3 h auf einem Magnetrührer gerührt. Die Untersuchung einer erfolgreichen Vereinzelung von Zellaggregaten und der Zellschädigung erfolgte mikroskopisch nach einer Lebend-/Tot-Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen AO und PI. Zur Kontrolle wurden zudem abgelöste, unbehandelte Biofilme mikroskopiert. In der Kontrolle wurden vorwiegend dichte Zellaggregate beobachtet, die von EPS zusammengehalten wurden und im Inneren Stellen mit eDNA aufwiesen (Abb. 15A). Bei den getesteten chemischen Isolierungsmethoden führte die Zugabe von 0,5 und 1% EDTA durch das Abrunden der Zellen zu einer Vereinzelung der Zellaggregate (Abb. 15B). Da hierbei jedoch ein Ablösen des archaealen Oberflächenproteins (*S-Layer*-Protein) von den Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte, eignete sich diese Methode nicht zur Trennung von EPS und Zellen. Die kombinierte Zugabe von Formaldehyd und NaOH sowie ausschließlich NaOH führte in beiden Fällen zu einer Zelllyse und eignete sich daher nicht als Isolierungsmethode (Abb. 15B).

Da für die Kultivierung von *H. salinarum* Hochsalzbedingungen obligat sind und der Organismus besonders sensitiv auf die Zugabe von Chemikalien reagierte, wurden auch verschiedene physikalische Methoden getestet. Im Einzelnen waren dies eine zehnminütige Behandlung im Ultraschallbad, ein zweistündiges Rühren der Biofilmsuspension auf einem Magnetrührer sowie eine Kombination der beiden Methoden. Mikroskopische Untersuchungen der Biofilmsuspension nach Ultraschall-Behandlung zeigten unbeschädigte, stäbchenförmige Zellen, welche größtenteils vereinzelt oder in Form von kleinen Zellaggregaten von etwa drei Zellen auftraten. Das Rühren auf dem Magnetrührer führte ebenfalls zu einer weitgehenden Vereinzelung der Zellen, jedoch wurden noch vereinzelte Zellaggregate mit eDNA-Bereichen beobachtet (Abb. 15C). Die Kombination einer Ultraschallbehandlung gefolgt von einem Rühren der Biofilmsuspension führte zur einem vollständigen Auflösen der Zellaggregate und zur Vereinzelung der Zellen (Abb. 15C). Da bei dieser Methode auch keine Zellschädigungen beobachtet wurden, eignete sie sich für nachfolgende Untersuchungen der EPS in *H. salinarum* Biofilmen.

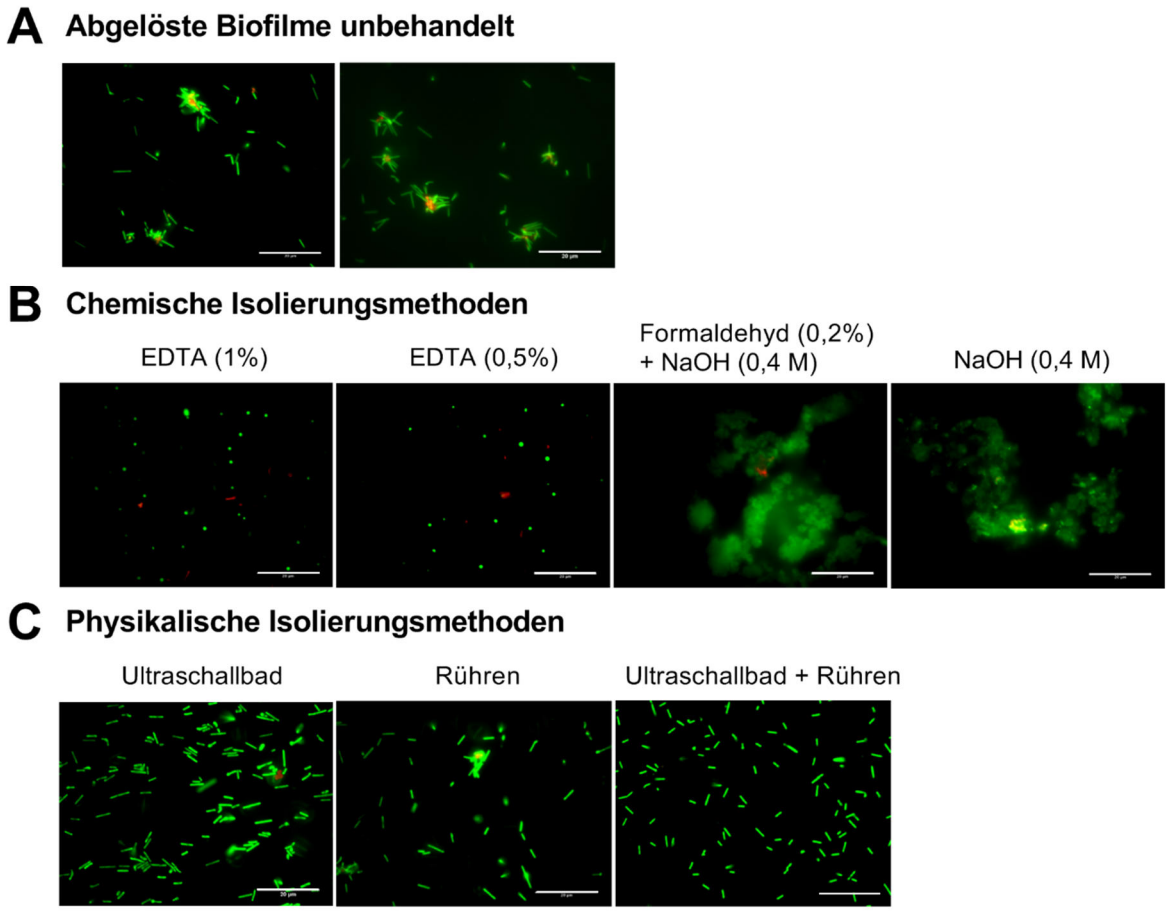


Abbildung 15. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Biofilmsuspensionen nach verschiedenen Behandlungen zur Isolierung von EPS und Zellen. **(A)** Abgelöste Biofilmsuspension vor Behandlung. **(B)** Chemische Methoden zur EPS-Isolierung. **(C)** Physikalische Methoden zur EPS-Isolierung. Kontrolle der Zellschädigung nach Behandlung durch eine Lebend-/Tot-Färbung der Zellen mit AO (grünes Signal) zur Färbung der Zellen und PI (rotes Signal) zur Färbung toter Zellen und eDNA. Der Größenmaßstab beträgt 20 µm.

Zur Separierung von Zellen und EPS erfolgte nach Behandlung im Ultraschallbad und Rühren der Biofilmsuspensionen eine Ultrazentrifugation der Ansätze, wobei die Zellen sedimentiert wurden. Die EPS-Fraktion im Überstand wurde zur Entfernung von Zellverunreinigungen zusätzlich mit einem Sterilfilter filtriert. Um eine Zellschädigung auszuschließen, wurde die Zellvitalität zusätzlich auf molekularer Ebene mit der PMA-basierten qPCR-Methode untersucht. Dies erfolgte mit Biofilmen, die 15 Tage in Komplexmedium kultiviert wurden sowie mit Biofilmen die nach 14 Tagen Kultivierung in Komplexmedium für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} behandelt wurden. Von den Ansätzen wurde jeweils eine Probe der abgelösten Biofilmsuspension vor Isolierungsbehandlung und eine Probe der sedimentierten Zellen nach Behandlung und Ultrazentrifugation für die Untersuchung der Zellschädigung vorbereitet. Als Positivkontrolle für den Nachweis von toten Zellen dienten hitzebehandelte, tote *H. salinarum* Zellen. Die Quantifizierung des Anteils toter Zellen basierte auf einem Vergleich der ermittelten ΔC_T-Werte mit den ΔC_T-Werten einer Standardkurve aus definierten Anteilen lebender und toter Zellen (s. Kap. 3.2.4, Abb. 14A).
Bei der Positivkontrolle mit den hitzebehandelten toten Zellen wurde ein Anteil von 99,9-100% toten Zellen ermittelt, während der Anteil von toten Zellen bei den unbehandelten sowie Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-behandelten Biofilmproben vor und nach der EPS-Isolierung jeweils bei unter 25% lag (Abb. 16). Da hiermit eine Schädigung der Zellen durch die verwendete EPS-

Isolierungsmethode ausgeschlossen wurde, erfolgte die nachfolgende Untersuchung der EPS nach Metallionenbehandlung.

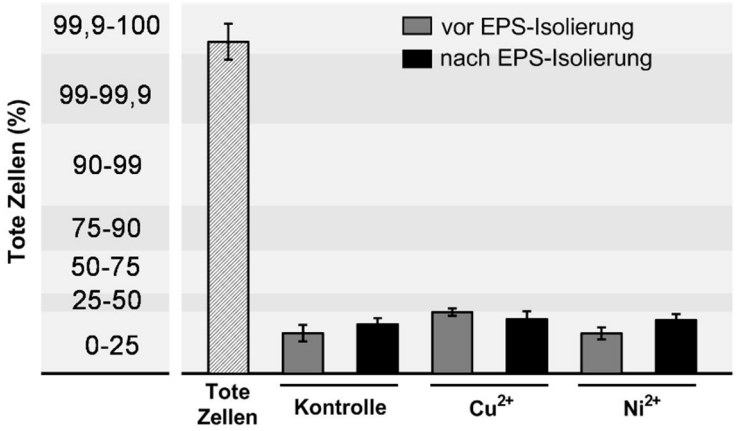


Abbildung 16. Molekularer Nachweis der Zellschädigung nach EPS-Isolierung mittels PMA-qPCR. Quantifizierung von toten Zellen in unbehandelten sowie in 5 mM Cu^{2+}- bzw. 40 mM Ni^{2+}-behandelten Biofilmen jeweils vor und nach EPS-Isolierung. Der Anteil von toten Zellen wurde durch einen Vergleich der ΔC_T-Werte einer Standardkurve mit definierten Anteilen lebender und toter Zellen (s. Abb. 14A) bestimmt. Als Positivkontrolle zum Nachweis der Zellschädigung dienten hitzebehandelte, tote Zellen.

Für die Untersuchung von isolierten EPS aus Biofilmen nach Behandlung mit Metallionen wurden in Komplexmedium angezogene Biofilme für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} behandelt. Zur Kontrolle wurden zudem unbehandelte Biofilme mitgeführt. Die Biofilme wurden mit Basalsalzlösung gewaschen und von der Oberfläche mittels Spatel abgelöst. Für einen Vergleich der Zusammensetzung der EPS und dem Gesamtbiofilm wurden die abgelösten Biofilmsuspensionen vor der EPS-Isolierung geteilt, wobei ein Teil (Biofilm-Fraktion) unbehandelt blieb und der andere Teil zur EPS-Isolierung verwendet wurde (EPS-Fraktion). Die beiden Fraktionen wurden zur Entfernung von Salzen gegen Wasser dialysiert und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage bei -80°C schonend getrocknet. Das erhaltene Lyophilisat der Biofilm-Fraktion war aufgrund des Bakteriorhodopsins und Carotinoiden in der Membran der Zellen leicht rosa gefärbt, während in der zellfreien EPS-Fraktion ein weißes Lyophilisat erhalten wurde (Abb. 17A).
Für die Quantifizierung der EPS-Fraktionen im Vergleich zur jeweiligen Biofilmfraktion wurde das Trockengewicht der Lyophilisate bestimmt. Bei den Biofilm-Fraktionen der unbehandelten und der Ni^{2+}-behandelten Probe wurde eine Trockenmasse von 0,26 g bzw. 0,24 g ermittelt, während die Trockenmasse der Cu^{2+}-behandelten Probe nur 0,13 g betrug. Die Trockenmasse in den entsprechenden EPS-Fraktionen betrug 0,06 g bei der Kontrolle, 0,07 g nach Cu^{2+}-Behandlung und 0,09 g nach Ni^{2+}-Behandlung (Abb. 17B). Daraus resultierte ein relativer Massenanteil von 24% EPS im Fall des unbehandelten Biofilms, während der EPS-Anteil nach Ni^{2+}-Behandlung auf 38% und nach Cu^{2+}-Behandlung auf 54% erhöht war.

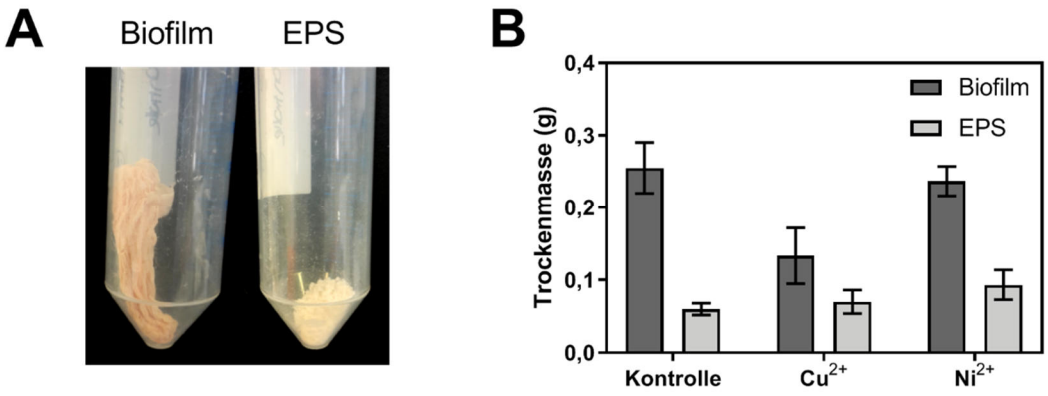


Abbildung 17. Lyophilisate von Biofilm- und isolierten EPS-Fraktionen aus Metallionen-behandelten Biofilmen. **(A)** Biofilm-Fraktion (links) und EPS-Fraktion (rechts) nach Trocknung in der Gefriertrocknungsanlage. **(B)** Bestimmung der Trockenmasse von Biofilm- und EPS-Fraktionen aus unbehandelten sowie 24 h behandelten Biofilmen mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+}.

Die quantitative Untersuchung der Biofilm- und EPS-Zusammensetzung erfolgte durch biochemische Analysen des Protein-, Kohlenhydrat- und Uronsäuregehalts. Zur Quantifizierung von Proteinen wurde eine modifizierte Lowry-Methode (Frølund *et al.*, 1996) durchgeführt, bei Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als Standard zur Erstellung einer Eichgerade (Abb. 18A). Der Gehalt von Kohlenhydraten wurde mit einer Phenol-Schwefelsäure-Methode (DuBois *et al.*, 1956) bestimmt, wobei Glucose als Standard diente (Abb. 18B). Der quantitative Nachweis von Uronsäuren erfolgte mit einer modifizierten Sulfamat/m-Hydroxydiphenyl-Methode (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991) unter Verwendung von Glucuronsäure als Standard (Abb. 18C).

Zur Kontrolle der Absorption von Biofilm- und EPS-Fraktionen wurde ein Absorptionsspektrum im Vergleich zum jeweiligen Standard aufgenommen (Abb. 18D-F). Hierzu wurden die Lyophilisate in Pufferlösung suspendiert und bei den entsprechenden Nachweismethoden eingesetzt. Die Messung der Absorption von Proteinen erfolgte bei 450 bis 900 nm. Das Absorptionsspektrum zeigte im Fall des Standardproteins BSA sowie bei den Biofilm- und EPS-Fraktionen ein Absorptionsmaximum bei 750 nm (Abb. 18D). Die Absorptionsmessung von Kohlenhydraten erfolgte bei 350 bis 800 nm. Hier wurde sowohl für Glucose, als auch für die Biofilm- und EPS-Fraktion ein Absorptionsmaximum bei 490 nm ermittelt (Abb. 18E). Im Fall der Uronsäuren erfolgte die Messung ebenfalls bei 350 bis 800 nm. Während Glucuronsäure sowie die EPS-Fraktion ein Absorptionsmaximum bei 525 nm aufwiesen, zeigte die Absorption der Biofilmfraktion ein Maximum bei 475 nm (Abb. 18F). Aufgrund des fehlenden charakteristischen Absorptionsmaximums von Uronsäuren konnte in den Biofilmfraktionen daher keine Quantifizierung erfolgen.

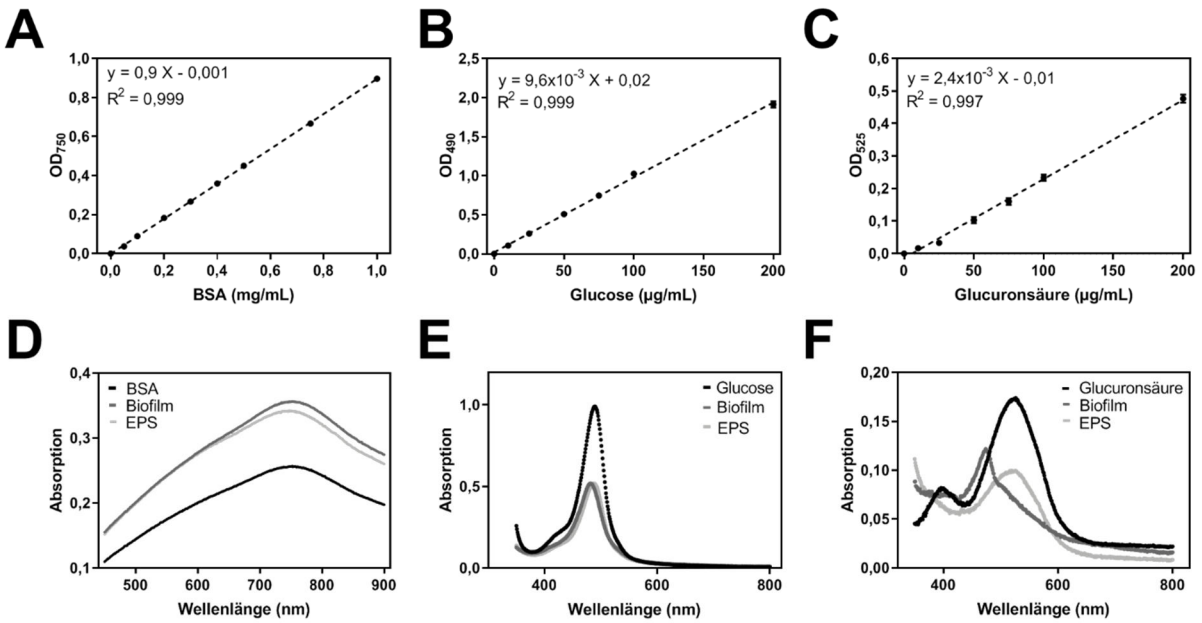


Abbildung 18. Photometrische Messungen von Proteinen, Kohlenhydraten und Uronsäuren. **(A-C)** Standardgeraden zur Quantifizierung von **(A)** Proteinen mittels BSA, **(B)** Kohlenhydraten mittels Glucose und **(C)** Uronsäuren mittels Glucuronsäure. **(D-F)** Absorptionsspektren von Biofilm- und EPS-Fraktion im Vergleich zu den jeweiligen Standards zum Nachweis von **(D)** Proteinen, **(E)** Kohlenhydraten und **(F)** Uronsäuren.

Für die quantitative Untersuchung der Bestandteile in Biofilmen und isolierten EPS wurden die Lyophilisate zunächst in Pufferlösung suspendiert. Bei den Biofilm-Fraktionen wurden bei den unbehandelten und Ni^{2+}-behandelten Biofilmen eine deutliche Rotfärbung der Suspension beobachtet, während die Suspension der Cu^{2+}-behandelten Biofilme eine hell orangene Farbe aufwies, was auf eine verringerte Zellmenge schließen lässt (Abb. 19A). Die Suspensionen der zellfreien EPS-Fraktionen waren hingegen farblos bis leicht gelblich im Fall der Ni^{2+}-behandelten Biofilme (Abb. 19B). Die Quantifizierung von Proteinen, Kohlenhydraten und Uronsäuren erfolgte photometrisch mit den entsprechenden biochemischen Nachweismethoden. Die gemessene Konzentration wurde anschließend auf die jeweilige Trockenmasse normiert (Tabelle 7, Abb. 19C-D).

Tabelle 7. Quantifizierung von Proteinen, Kohlenhydraten und Uronsäuren in Biofilm- und EPS-Fraktionen nach Behandlung mit Cu^{2+} bzw. Ni^{2+}.

	Biofilm			**EPS**		
	Kontrolle	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Kontrolle	Cu^{2+}	Ni^{2+}
	mg/g Trockenmasse			**mg/g Trockenmasse**		
Proteine	335,1	430,3	467,4	51,6	32,7	138,1
Kohlenhydrate	36,0	33,5	39,0	15,6	11,8	15,5
Uronsäuren	n.b.*	n.b.*	n.b.*	6,4	5,4	7,2

*n.b.= nicht bestimmt.

Ein Vergleich des Proteingehalts der Biofilm-Fraktionen zeigte bei der unbehandelten Probe einen Gehalt von 335 mg/g Trockenmasse, während bei Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Biofilmen 30-40% erhöhte Proteinmengen gemessen wurden. Der Gehalt an Kohlenhydraten war mit durchschnittlich 36 mg/g Trockenmasse relativ gering und zeigte keinen deutlichen

Unterschied zwischen unbehandelten und Metallionen-behandelten Biofilmen (Tabelle 7, Abb. 19C).

Im Fall der EPS-Fraktionen wurde in der Kontrolle ein Proteingehalt von 52 mg/g Trockenmasse gemessen, während Cu^{2+}-behandelte Biofilme in den EPS einen ca. 0,6-fach verringerten Proteingehalt aufwiesen. Im Vergleich hierzu führte die Behandlung mit Ni^{2+} zu einer 2,7-fach erhöhten Proteinmenge in den EPS. Der Kohlenhydratgehalt in den EPS-Fraktionen betrug 16 mg/g Trockenmasse in der Kontrolle und zeigte keine signifikante Veränderung nach Metallionenbehandlung. Der Gehalt an Uronsäuren in den EPS der Kontrolle war mit 6 mg/g Trockenmasse relativ gering und zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied nach Behandlung mit Cu^{2+} bzw. Ni^{2+} (Tabelle 7, Abb. 19D).

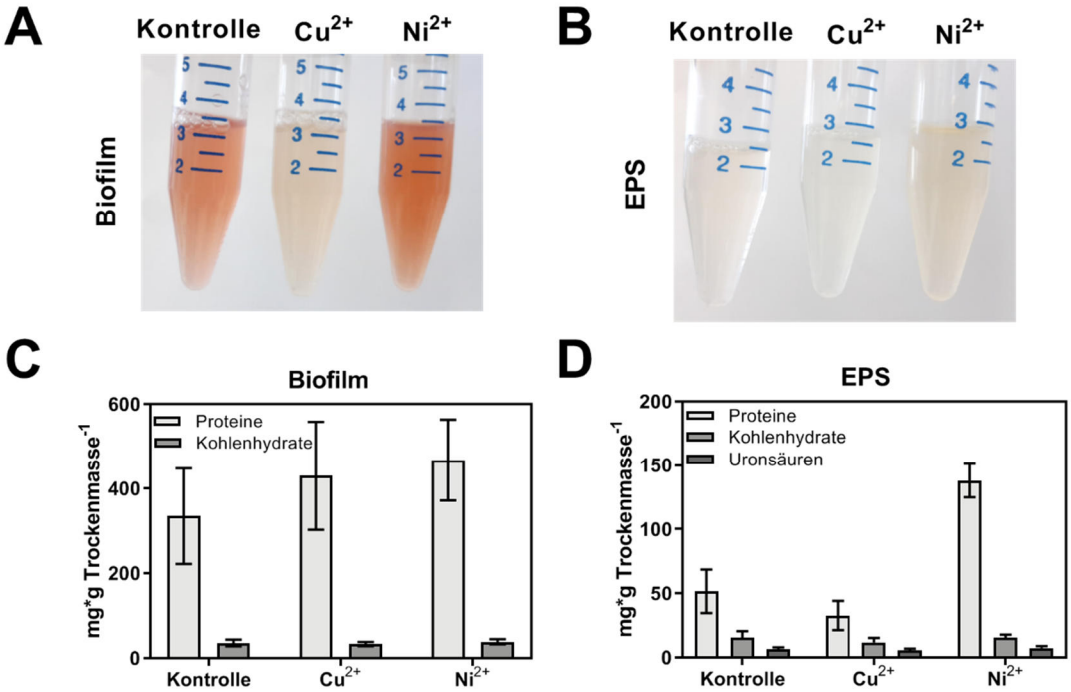


Abbildung 19. Biochemische Quantifizierung der Bestandteile in Biofilmen und isolierten EPS nach Behandlung mit Kupfer- und Nickelionen. **(A)** Biofilm- und **(B)** EPS-Suspensionen nach Resuspension der Lyophilisate in Pufferlösung. **(C)** Quantifizierung des Gehalts an Proteinen und Kohlenhydraten in Biofilmfraktionen. **(D)** Quantifizierung des Gehalts an Proteinen, Kohlenhydraten und Uronsäuren in EPS-Fraktionen. Die gemessenen Konzentrationen wurden auf die jeweilige Trockenmasse normiert.

Zusammengefasst zeigte die quantitative Untersuchung der Zusammensetzung von Biofilmen und EPS, dass Proteine einen dominanten Bestandteil ausmachen, während Kohlenhydrate und dazu gehörende Uronsäuren nur in geringen Mengen auftreten. Im Fall einer Behandlung des Biofilms mit Metallionen wurden in den Biofilmfraktionen keine signifikanten Unterschiede beobachtet. EPS-Fraktionen hingegen zeigten signifikante Änderungen der Proteinmenge mit einer 0,6-fachen Verringerung bei Cu^{2+}-Behandlung und einer 2,7-fachen Erhöhung bei Ni^{2+}-Behandlung. Der Gehalt an Kohlenhydraten und Uronsäuren war jedoch nahezu unverändert.

Zur Untersuchung der Lokalisation von Metallionen in Flüssigkulturen und in Biofilmen wurde die Konzentration von Cu^{2+} bzw. Ni^{2+} in planktonischen Zellen und Biofilmen quantifiziert. Planktonische Kulturen wurden bei einer OD_{600} von 0,3 mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} versetzt und 24 h schüttelnd inkubiert. Die Quantifizierung der Metallionenkonzentration erfolgte in Flüssigkulturen (Medium und Zellen) sowie in daraus isolierten und gewaschenen

Zellen. Biofilme wurden 14 Tage in Komplexmedium angezogen und für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Die Messung der Metallionenkonzentration erfolgte jeweils mit dem Überstand in den Kulturschalen, mit gewaschenen Biofilmen sowie mit isolierten EPS- und Zellfraktionen des Biofilms. Zur Verringerung der Salzkonzentration auf maximal 4,8% wurden die Proben jeweils mit deionisiertem Wasser verdünnt. Die anschließende Quantifizierung der Metallionen in mg/L erfolgte mit einem Atomabsorptionsspektrometer bei Verwendung eines Standards aus 0-3 mg/L Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Lösungen. Die gemessenen Massen-konzentrationen wurden anschließend in die entsprechende Stoffmengenkonzentration in μM umgerechnet.
Im Fall der planktonischen Zellen wurde in den Flüssigkulturen 4 mM Cu^{2+} bzw. 13,5 mM Ni^{2+} quantifiziert, während die gewaschenen Zellen eine Konzentration von 30 μM Cu^{2+} bzw. 95 μM Ni^{2+} aufwiesen (Abb. 20). Bei den Biofilmen wurde im Überstand der Kulturschalen eine Konzentration von 4,6 mM Cu^{2+} bzw. 32,7 mM Ni^{2+} gemessen. Die Konzentration in gewaschenen Biofilmen betrug 12,6 μM Cu^{2+} bzw. 92 μM Ni^{2+}. Nach der Auftrennung des Biofilms in die Fraktionen EPS und Zellen wurde in den EPS der größte Anteil der Metallionen mit 8,2 μM Cu^{2+} bzw. 76,6 μM Ni^{2+} gemessen, während in den isolierten Zellen lediglich 0,9 μM Cu^{2+} bzw. 10,2 μM Ni^{2+} quantifiziert wurden (Abb. 20). Die Konzentration von Cu^{2+} und Ni^{2+} in den entsprechenden unbehandelten Proben war unterhalb der spezifischen Nachweisgrenze von 0,02 mg/L bei Cu^{2+} bzw. 0,04 mg/L bei Ni^{2+}.

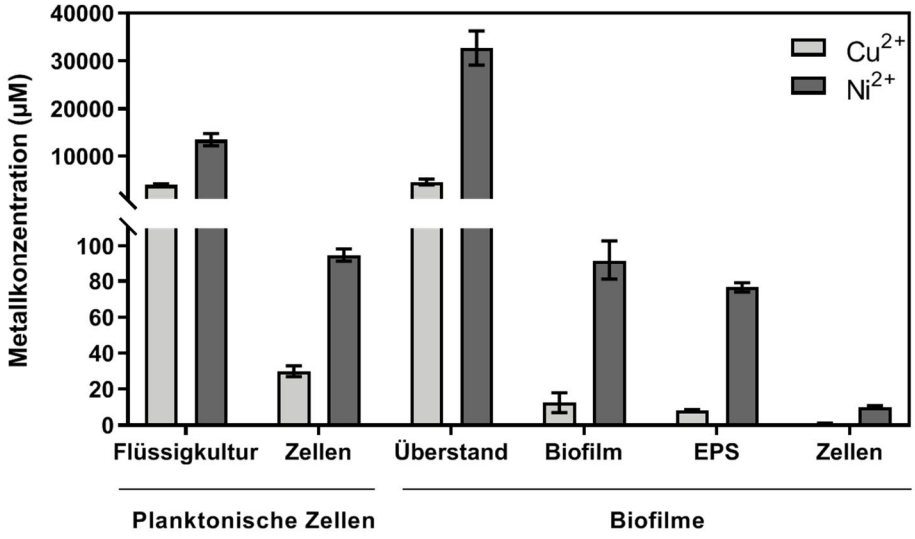


Abbildung 20. Quantifizierung von Metallionen in planktonischen Zellen und Biofilmen nach Zugabe von Cu^{2+} bzw. Ni^{2+}. Planktonische Zellen wurden bei einer OD_{600} von 0,3 mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} versetzt und für 24 h schüttelnd kultiviert. Die Quantifizierung von Metallionen erfolgte jeweils mit Flüssigkulturen (Medium und Zellen) sowie mit gewaschenen planktonischen Zellen. Biofilme wurden 14 Tage in Komplexmedium angezogen und 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Die Quantifizierung von Metallionen erfolgte jeweils mit dem Überstand, mit gewaschenen Biofilmen sowie mit den isolierten EPS- und Zellfraktionen. Die quantitative Messung von Cu^{2+} und Ni^{2+} erfolgte mittels Atomabsorptionsspektrometrie unter Verwendung eines Standards aus 0-3 mg/L Kupfer- und Nickellösungen in 2% Salpetersäure.

Ein Vergleich der gemessenen Metallkonzentrationen von Zellen in Flüssigkulturen und in Biofilmen zeigte, dass planktonische Zellen in Flüssigkulturen 32- bzw. 9-fach höheren Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen ausgesetzt waren. Bezogen auf die gemessene Konzentration im Gesamtbiofilm befanden sich 65% bzw. 83% Kupfer- und Nickelionen in den EPS, während der Anteil in den Zellen lediglich 7,5% bzw. 11% ausmachte.

3.3 Diskussion

3.3.1 Kupfer- und Nickelionen führen zu Metall-spezifischen Effekten in *H. salinarum*

Kupfer- und Nickelionen gehören zu den essentiellen Metallen, welche eine wichtige Rolle als Cofaktoren für die katalytische Funktion von Enzymen spielen. Bei einer Erhöhung der Konzentration außerhalb des Toleranzbereiches wirken diese Metalle jedoch toxisch und führen zum Zelltod (Geesey & Jang, 1989). Untersuchungen der MHK in planktonischen *H. salinarum* R1 Zellen ergaben im Fall von Cu^{2+} eine MHK von 7 mM, während Ni^{2+} das Wachstum erst ab 15 mM inhibierte. Vergleichende Untersuchungen der MHK in bakteriellen Spezies zeigten eine Wachstumshemmung bei deutlich geringeren Metallkonzentrationen. So wurde in *E. coli* basierend auf Untersuchungen des Koloniewachstums auf Festmedien für Cu^{2+} und Ni^{2+} jeweils eine MHK von 1 mM ermittelt (Spain, 2003). Weitere Untersuchungen der MHK verschiedener Metalle bei insgesamt 25 Bakterienstämmen zeigten eine maximale Konzentration von 1,8 mM Cu^{2+} im Fall eines *Providencia rettgeri* Stammes (Hassen *et al.*, 1998). Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass *H. salinarum* in der Lage ist bei deutlich höheren Metallionenkonzentrationen zu wachsen. Dies wurde auch in einer früheren Studie gezeigt, bei der die MHK von zehn Metallionen in 13 haloarchaealen Stämmen der Gattungen *Haloferax*, *Halobacterium*, *Halorubrum* und *Haloarcula* ermittelt wurde. Die Bestimmung der MHK erfolgte durch einen Nachweis des Koloniewachstums auf Metallionen-versetztem Agarmedium, wobei das Wachstum einiger Stämme auch bei der höchsten getesteten Konzentration von 2,5 mM im Fall von Kupfer- und Nickelionen nicht inhibiert wurde (Nieto *et al.*, 1987). Darüber hinaus wurde in dieser Studie beobachtet, dass die Toxizität von Schwermetallionen bei einer Verringerung der Salzkonzentration von 25% auf 15% (w/v) erhöht wird. Eine Ursache hierfür könnte die Komplexierungskapazität von Anionen aus Salzen mit Schwermetallen sein (Paalman *et al.*, 1994, Acosta *et al.*, 2011), was die Verfügbarkeit von Metallionen im Medium beeinträchtigt. Zudem wäre in diesem Zusammenhang eine erhöhte Aufnahme von Metallen in Verbindung mit Salzen denkbar, wobei die intrazelluläre Metallionenkonzentration steigt und zu Zellschädigungen führt.

Untersuchungen der Auswirkung von Schwermetallionen auf Haloarchaea wurden in vorangegangenen Studien nur auf planktonische Zellen bezogen (Sehgal & Gibbons, 1960, Kaur *et al.*, 2006, Popescu & Dumitru, 2009, Srivastava & Kowshik, 2013), während die Adhäsion und Biofilmbildung bislang nicht analysiert wurde. In dieser Arbeit wurde die Adhäsion in Gegenwart subinhibitorischer Kupfer- und Nickelkonzentrationen untersucht, wobei 5 mM im Fall von Cu^{2+} und 8 mM im Fall von Ni^{2+} zu einer vollständigen Inhibition der Adhäsion führten. Diese Konzentrationen liegen jeweils unterhalb der MHK von planktonischen Zellen, was auf einen starken Effekt der Metallionen auf die Zelladhäsion hindeutet. Ein Vergleich der gemessenen Adhäsionssignale bei deutlich geringeren Konzentrationen zeigte jedoch starke Unterschiede bei den beiden Metallionen. Während die Zelladhäsion im Fall von Cu^{2+} bei der geringsten Konzentration (0,5 mM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um etwa 65% verringert war, wurde bei Ni^{2+} bis 1 mM eine etwa 30% erhöhte Adhäsion ermittelt. Dies zeigten ebenfalls fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, wobei die Gegenwart von Cu^{2+} in einem verstärkten Ablösen von adhärenten Zellen und der Bildung von vergrößerten Zellaggregaten resultierte, während bei Ni^{2+} eine erhöhte Zellmenge beobachtet wurde. Die temporäre Zugabe von inhibierenden Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen auf planktonische Zellen und reife Biofilme führte ebenfalls zu starken Unterschieden in der Reaktion auf diese Metallionen. Während die

Zugabe von Cu^{2+} das Wachstum in Flüssigkulturen und die Kultivierbarkeit der Zellen auf Festmedium nur leicht inhibierte, führte Cu^{2+} in Biofilmen zu einer starken Verringerung der Biofilmmasse, wobei die Anzahl adhärenter Zellen um ca. 40% verringert war. Im Gegensatz hierzu führte die Zugabe von Ni^{2+} zu einer verstärkten Inhibition des planktonischen Wachstums sowie der Kultivierbarkeit der Zellen auf Festmedium, wobei die Zugabe von Nickelionen auf Biofilme in einer etwa 70% erhöhten Menge adhärenter Zellen sowie in einer veränderten Biofilmarchitektur resultierte. Diese Untersuchungen zeigen, dass Metallionen eine spezifische Wirkung auf die Physiologie der Zellen haben. Dies zeigten ebenfalls Studien mit *Xylella fastidiosa*, bei denen subinhibitorische Mangan- und Zinkkonzentrationen die Zell-Zell-Bindung beeinflussten, wobei Mangan die Biofilmbildung erhöhte, während Zink den Prozess der Biofilmbildung inhibierte (Cobine *et al.*, 2013). Im Fall von *Pseudomonas fluorescens* wurde eine erhöhte Zelladhäsion nach Behandlung mit Cadmium beobachtet, während eine Vorbehandlung der Zellen mit Zink keinen Einfluss auf die Adhäsion hatte (McEldowney, 1994). Diese Beobachtungen deuten auf Metallionen-spezifische Stressmechanismen bei den verschiedenen Spezies hin. So zeigten Genexpressionsstudien mit *Staphylococcus aureus* unter Einfluss von Kupferionen eine Repression von Genen, deren Produkte in der Biofilmbildung involviert sind (Baker *et al.*, 2010). Im Gegensatz hierzu wurde in *E. coli* Stämmen in Gegenwart subinhibitorischer Nickelkonzentrationen eine vermehrte Biofilmbildung in Verbindung mit einer erhöhten Transkription von Curli-Fimbrien, welche in der Zelladhäsion involviert sind, beobachtet (Perrin *et al.*, 2009). Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten gegensätzlichen Effekte von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf das Wachstum planktonischer Zellen und die Adhäsion und Biofilmbildung lassen auf Metallionen-spezifische molekulare Stressmechanismen in *H. salinarum* R1 schließen.

3.3.2 Die Lebensform in Biofilmen erhöht die Überlebensrate in *H. salinarum* bei Metallionenstress

Untersuchungen der Überlebensrate in *H. salinarum* nach Metallionenstress zeigten für Cu^{2+} und Ni^{2+} jeweils unterschiedliche Toleranzbereiche in planktonischen Zellen. Während im Fall von Kupferionen eine Erhöhung der Konzentration von 7 mM (MHK) auf 10 mM zu 100% toten Zellen führte, wurden in Gegenwart von Nickelionen bei einer 2,7-fach erhöhten MHK weniger als 25% tote Zellen beobachtet. Die Exposition bei höheren Konzentrationen als 40 mM Ni^{2+} war aufgrund einer Verschiebung in den sauren pH-Bereich nicht möglich. Ein Vergleich der ermittelten MHK mit den Ergebnissen der Zellvitalität nach Metallionenbehandlung zeigt, dass das Zellwachstum in Gegenwart der MHK inhibiert ist, wobei die Zellen lebensfähig sind und sich womöglich in einem stillgelegten Zustand befinden. In bakteriellen Spezies wurde dieser Ruhezustand als „lebend aber nicht kultivierbar“ (*viable but non-culturable*, VBNC) definiert und als Überlebensstrategie bei Einfluss von schädlichen Umweltbedingungen beschrieben (Oliver, 2005). Mit dem Übergang in diesen Zustand erfolgt eine Verlangsamung des Stoffwechsels sowie eine partielle Kondensation der Nukleinsäuren, wobei die Zellen weiterhin in der Lage sind zu atmen sowie Gentranskription und Proteinsynthese betreiben (Rahman *et al.*, 1994, Oliver *et al.*, 1995, del Mar Lleò *et al.*, 2000). Bei verbesserten Bedingungen in der Umgebung erlangen die Zellen ihre vollständige metabolische Aktivität wieder und erhöhen die Dichte der Population. Mehr als 30 Jahre nach der Entdeckung von VBNC-Zellen sind die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen zur Induktion des VBNC-Zustands sowie zur Rückführung in den metabolisch aktiven Zustand immer noch weitestgehend unbekannt (Pinto *et al.*, 2015). In Deletionsstudien mit *E. coli* und *Salmonella enterica* wurde eine wichtige Rolle von regulatorischen Proteinen bei der VBNC-Induktion ermittelt, was auf komplexe

Regulationsprozesse in der Induktion dieses Ruhezustands schließen lässt (Boaretti *et al.*, 2003, Darcan *et al.*, 2009, Gangaiah *et al.*, 2009, Kusumoto *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Koloniewachstum von *H. salinarum* nach einer temporären Behandlung mit Ni^{2+}-Konzentrationen oberhalb der MHK nachgewiesen, was auf eine Metallionen-induzierte Überführung der Zellen in den VBNC-Zustand schließen lässt. Hierbei scheint vor allem die Ni^{2+}-Konzentration sowie die Dauer der Exposition eine wichtige Rolle zu spielen, da das Koloniewachstum auf Festmedium bei einer Behandlung mit 40 mM Ni^{2+} für mehr als sechs Stunden vollständig inhibiert wurde.

Ein Vergleich der Zellvitalität nach Cu^{2+}-und Ni^{2+}-Behandlung in Flüssigkulturen und Biofilmen zeigte eine erhöhte Überlebensrate von Biofilmzellen. Während die 24-stündige Behandlung mit 8 und 10 mM Cu^{2+} bei planktonischen Zellen zu einem Anteil von bis zu 90% bzw. 100% toten Zellen führte, betrug der Anteil toter Zellen im Biofilm maximal 25 bzw. 75%. Im Fall von Ni^{2+} war der Anteil von toten Zellen in planktonischen Kulturen und Biofilmen unter den getesteten Konzentrationen jeweils unterhalb von 25%, wobei die Menge toter Zellen in planktonischen Kulturen im Vergleich zu Biofilmen leicht erhöht war. Diese Beobachtungen deuten auf eine erhöhte und/oder eine zeitabhängige Toleranz von *H. salinarum* Biofilmen. Hierbei könnte das verlangsamte Wachstum von Biofilmzellen sowie die reduzierte metabolische Aktivität eine wichtige Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde in *H. salinarum* Biofilmen im Vergleich zu Flüssigkulturen eine dreifach erhöhte Generationszeit ermittelt, was auf einen verlangsamten Metabolismus hindeutet. Da Biozide wie Metallionen hauptsächlich auf metabolisch aktive Zellen toxisch wirken, sind langsam wachsende Biofilmzellen im Allgemeinen weniger anfällig (Gilbert *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 2017).

Darüber hinaus werden bei einer hohen Populationsdichte wie in Zellkulturen in der stationären Phase oder in Biofilmen etwa 100 bis 10.000-mal mehr persistente Zellen gebildet, welche erhöhte Toleranzen aufweisen (Spoering & Lewis, 2001). Die Toleranz ist weder genetisch bedingt, noch vererbbar und resultiert aus einem reversibel stillgelegten Zustand der Zellen, welcher das Überleben der Population bei Stressbedingungen ermöglicht (Van den Bergh *et al.*, 2017). Da persistente Zellen auch in haloarchaealen Biofilmen nachgewiesen wurden (Megaw & Gilmore, 2017), wäre es denkbar, dass diese ebenfalls eine wichtige Rolle in der erhöhten Toleranz von *H. salinarum* Biofilmen bei Metallionenstress spielen. Ein weiterer Faktor, der zur erhöhten Toleranz von *H. salinarum* Biofilmen beitragen könnte, ist die Absorption von Metallionen durch die Membran von Biofilmzellen. Dies wurde im Fall von *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt, wobei Biofilmzellen im Vergleich zu planktonischen Zellen signifikant höhere Mengen von Eisen, Gold und Lanthan gebunden haben (Langley & Beveridge, 1999). Neben der Absorption durch die Zellmembran spielen die EPS eine wichtige Rolle bei Metallionenstress. Diese bieten aufgrund einer Vielzahl von funktionellen Gruppen eine erhöhte Anzahl von Bindungsstellen für Metallionen und dienen als Diffusionsbarriere, welche das Eindringen von Metallionen verhindert oder zumindest verzögert (Liu & Fang, 2002, van Hullebusch *et al.*, 2003).

3.3.3 Extrazelluläre polymere Substanzen spielen eine wichtige Rolle im Umgang mit Schwermetallionen

Neben der erhöhten Überlebensrate in Biofilmen wurden in dieser Arbeit auch signifikante Änderungen der Biofilmarchitektur in *H. salinarum* nach Cu^{2+}- und Ni^{2+}- Exposition beobachtet. So zeigten fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Biofilme nach Exposition mit Cu^{2+} ein verstärktes Ablösen des Biofilms und die Bildung von vergrößerten

Zellaggregaten, während die Zugabe von Ni^{2+} in einer dichten Biofilmstruktur mit einer signifikant erhöhten Anzahl von adhärenten Zellen resultierte. Da die EPS die dreidimensionale Architektur des Biofilms bestimmen, scheinen Kupfer- und Nickelionen einen starken Einfluss auf die EPS in *H. salinarum* zu haben. Dies wurde ebenfalls in Studien von bakteriellen Biofilmen beschrieben, bei denen die Zugabe von Metallionen zu einer dichteren und kompakten Biofilmarchitektur in *Bacillus subtilis* und *Rhizobium alamii* führte (Schue *et al.*, 2011, Grumbein *et al.*, 2014). Untersuchungen von *Xylella fastidiosa* Biofilmen unter Einfluss von Zink beobachteten neben der veränderten Biofilmarchitektur auch eine erhöhte Produktion der EPS (Navarrete & De La Fuente, 2014). Quantitative Analysen der Biofilm- und EPS-Trockenmasse von unbehandelten sowie von Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Biofilmen in der vorliegenden Arbeit zeigten ebenfalls einen erhöhten Anteil von EPS nach Metallionenbehandlung. Während der EPS-Anteil in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen im Vergleich zur Kontrolle 1,6-fach erhöht war, zeigten Biofilme nach Cu^{2+}-Behandlung eine 2,3-fache Erhöhung. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von *Thiomonas* sp. Biofilmen zeigten in Gegenwart von Arsen ebenfalls eine vermehrte EPS-Bildung, wobei das EPS-Volumen im Vergleich zum Zellvolumen bis zu 6,2-fach erhöht war. (Marchal *et al.*, 2011). Zudem zeigten Deletionsstudien mit *Sinorhizobium meliloti* eine erhöhte Metallsensitivität in Mutanten, welche keine EPS bildeten (Nocelli *et al.*, 2016).

Untersuchungen der Metallionenbelastung in *H. salinarum* Flüssigkulturen und Biofilmen in dieser Arbeit zeigten, dass planktonische Zellen im Vergleich zu Biofilmzellen neunmal bzw. 33-mal höheren Ni^{2+}- und Cu^{2+}-Konzentrationen ausgesetzt sind. Dies liegt vermutlich an der Absorption der Metallionen durch die EPS, da 65% des Cu^{2+}- bzw. 83% des Ni^{2+}-Gehalts im Biofilm in den isolierten EPS-Fraktionen nachgewiesen wurde. Diese Beobachtungen lassen auf eine wichtige Rolle der EPS bei der erhöhten Toleranz von Biofilmen schließen. Die EPS bestehen im Vergleich zur Zelloberfläche aus einer 20- bis 30-fach erhöhten Menge von elektrisch geladenen funktionellen Gruppen wie Carboxyl-, Phosphoryl-, Hydroxyl- und Aminogruppen, welche Verbindungen mit Metallionen eingehen können (Liu & Fang, 2002). Hierdurch werden toxische Metallionen in den EPS immobilisiert, präzipitiert oder abgesondert, was zu einer verringerten Bioverfügbarkeit sowie einer verlangsamten Diffusion der Metallionen führen kann. Somit verringert sich die Metallionenbelastung der Biofilmzellen, was demzufolge in einer erhöhten Überlebensrate von Biofilmen resultiert (Koechler *et al.*, 2015). Dies zeigten ebenfalls Untersuchungen von *Pseudomonas aeruginosa* in Gegenwart von Kupferionen, wobei Biofilme im Vergleich zu planktonischen Zellen eine bis zu 600-fach erhöhte Resistenz aufwiesen. Hierbei zeigten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen einen erhöhten Anteil von toten Zellen in der Peripherie des Biofilms, während die Zellen im Inneren Kern vor den Kupferionen geschützt waren und lebten (Teitzel & Parsek, 2003).

Um die Überlebensrate in Biofilmen zu steigern, ist folglich eine Erhöhung der Anzahl von Bindungspartnern für Metallionen in den EPS notwendig. Dies zeigten Untersuchungen der EPS von *Pseudomonas putida* Biofilmen, welche nach Behandlung mit Chrom erhöhte Mengen von extrazellulären Kohlenhydraten, Proteinen und DNA aufwiesen (Priester *et al.*, 2006). Analysen der EPS von Cu^{2+}-behandelten *Pseudomonas putida* Biofilmen zeigten im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen eine zehnfach erhöhte Menge von eDNA, welche wesentlich höher war, als die Menge an intrazellulärer DNA (iDNA) im Biofilm. Zudem zeigten eDNA-Analysen deutliche Unterschiede der eDNA-Zusammensetzung nach Cu^{2+}-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen, wobei spezifische eDNA-Banden unter Cu^{2+}-Stress beobachtet wurden (Lin *et al.*, 2018). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Biofilmzellen in

Gegenwart von Metallionen aktiv vermehrt EPS-Bestandteile produzieren und in ihre Umgebung ausschleusen, um ihr Überleben im Inneren des Biofilms zu sichern. So wurden in Metabolom-Analysen von *Pseudomonas fluorescens* Biofilmen als Reaktion auf Kupferionenstress Veränderungen des Exopolysaccharid-Stoffwechsels beobachtet, was auf einen aktiven Schutzmechanismus der Zellen deutet (Booth *et al.*, 2011). Einen passiven Schutz der Biofilmzellen bieten darüber hinaus lysierte Zellen, welche in den EPS zusammengehalten werden und somit die Anzahl der Bindungsstellen für Metallionen im Biofilm erhöhen. Die quantitative Untersuchung der EPS-Zusammensetzung in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass die EPS in *H. salinarum* Biofilmen mit 52 mg/g Trockenmasse von Proteinen dominiert werden, während die Menge an Kohlenhydraten und Uronsäuren (16 bzw. 6 mg/g Trockenmasse) vergleichsweise gering- und im Fall von eDNA nicht nachweisbar war. Dementgegen zeigten vorangegangene Studien der EPS-Zusammensetzung in bakteriellen und archaealen Spezies, dass Polysaccharide den Hauptbestandteil der EPS ausmachen (Rode, 2004, Jachlewski *et al.*, 2015). Da *H. salinarum* nicht in der Lage ist Zucker zu verwerten und stattdessen Aminosäuren für den Stoffwechsel nutzt, scheinen Polysaccharide keine wichtige Rolle bei der extrazellulären Nährstoffversorgung zu spielen, weshalb diese möglicherweise in den EPS unterrepräsentiert sind (Rawal *et al.*, 1988, Falb *et al.*, 2008). Die Zugabe von Cu^{2+} und Ni^{2+} zu reifen *H. salinarum* Biofilmen führte zu Veränderungen des Proteinanteils in den EPS. Während der Proteingehalt in Cu^{2+}-behandelten Biofilmen 0,6-fach verringert war, wiesen Ni^{2+}-behandelte Biofilme einen 2,7-fach erhöhten Anteil von Proteinen in den EPS auf. Die veränderte EPS-Zusammensetzung könnte möglicherweise eine wichtige Rolle in der veränderten Biofilmarchitektur sowie der erhöhten Überlebensrate der *H. salinarum* Biofilmzellen spielen. So wurde in Untersuchungen von *Pseudoalteromonas* sp. gezeigt, dass Biofilme eine erhöhte Toleranz gegenüber Quecksilber und Cadmium aufwiesen, wenn die EPS-Produktion zuvor stimuliert wurde (Caruso *et al.*, 2018). Die Autoren schlossen daraus, dass die erhöhte Toleranz auf das Vorhandensein von Uronsäuren und Sulfatgruppen in den EPS basiert, welche Metallionen in den EPS binden und immobilisieren. Im Fall von *H. salinarum* Biofilmen könnten Proteine mit ihren potenziell vielseitig funktionellen Gruppen zur vermehrten Bindung von Metallionen und somit zu einer Erhöhung der Überlebensrate von Biofilmzellen führen. Da der Anteil von toten Zellen in den Metallionen-behandelten Biofilmen unterhalb von 25% lag, scheint die erhöhte Proteinmenge vermutlich auf eine vermehrte Produktion von extrazellulären Proteinen zurückzuführen sein, anstatt auf einem erhöhten Anteil von lysierten Zellen zu basieren. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die EPS eine wichtige Rolle im Überleben von Biofilmzellen spielen und deren erhöhte Produktion einen Resistenzmechanismus in *H. salinarum* im Umgang mit Metallionen darstellt.

Kapitel IV

Molekulare Analysen der Metallionen-induzierten Stressreaktion in *H. salinarum*

Auswirkungen von Kupfer- und Nickelionen auf das Proteom und die Expression von Zielgenen in planktonischen Zellen und Biofilmen

Die Gegenwart von Kupfer- und Nickelionen zeigte starke Auswirkungen auf das Wachstum und die Biofilmbildung in *H. salinarum*. Um den Einfluss der Metallionen auf molekularer Ebene zu untersuchen, erfolgten quantitative Analysen des Proteoms sowie auf den Proteomdaten basierende Untersuchungen der Genexpression bei Metallionenstress. Quantitative Proteomanalysen mittels SWATH-LC/MS/MS ergaben mit 1.180 quantifizierten Proteinen eine 46%ige Abdeckung des Proteoms. In planktonischen Zellen zeigten 234 Proteine signifikant veränderte Mengen nach Metallionenbehandlung, wobei 47% davon sowohl in Cu^{2+}- als auch in Ni^{2+}-behandelten Zellen auftraten. Hierbei zeigten vorwiegend transkriptionsregulierende und auch ribosomale Proteine erhöhte relative Häufigkeiten, während eine signifikante Verringerung größtenteils für ABC-Transportsysteme ermittelt wurde. Im Fall von Biofilmzellen zeigten 52 Proteine eine signifikant veränderte Abundanz. Darunter traten nur 3% gemeinsam in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Zellen auf, was auf eine Metallionen-spezifische Reaktion in Biofilmzellen schließen lässt. Dennoch zeigten Biofilme die stärksten Unterschiede in den Proteinabundanzen, sodass diese Proteine möglicherweise eine wichtige Funktion in der Metallionen-spezifischen Biofilmarchitektur haben. Vergleichende qRT-PCR Analysen zeigten ebenfalls Effekte von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf der Transkriptebene und bestätigten eine stärkere Auswirkung dieser Ionen auf planktonische Zellen im Vergleich zu *H. salinarum* Biofilmen.

4.1 Einleitung

Untersuchungen der zellulären Reaktionen von *H. salinarum* R1 in Gegenwart von Kupfer- und Nickelionen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die beiden Metallionen zu spezifischen Reaktionen in den Zellen führen. So resultierte die Gegenwart von Cu^{2+} unterhalb der spezifischen MHK in einer Inhibition der Zelladhäsion in *H. salinarum*, während die Zugabe von Ni^{2+} die Adhäsion und Biofilmbildung unterhalb der MHK förderte. Mikroskopische Untersuchungen der Biofilme zeigten nach Zugabe der beiden Metallionen auf reife Biofilme zudem deutliche Effekte auf die Biofilmarchitektur, welche zu Metallionen-spezifischen Änderungen führten. Hierbei erfolgte nach Zugabe von Cu^{2+} ein vermehrtes Ablösen von adhärenten Zellen und die Bildung von dichten Zellaggregaten, während die Gegenwart von Ni^{2+}, sogar in 2,7-fach erhöhter Konzentration zur MHK, zu einer signifikant erhöhten Menge von adhärenten Zellen führte, welche kompakt in aufeinanderliegenden Zellschichten angeordnet waren. Darüber hinaus zeigten vergleichende Analysen der Zellvitalität in planktonischen Zellen und reifen Biofilmen nach Zugabe von Kupfer- und Nickelionen eine erhöhte Resistenz von Biofilmzellen. Quantitative Untersuchungen der extrazellulären Matrix im Biofilm wiesen zudem deutliche Unterschiede im Proteingehalt nach Metallionenbehandlung und einen hohen Anteil von Metallionen in den EPS auf. Diese Beobachtungen deuten auf eine spezifische Wirkungsweise der verwendeten Metallionen hin und lassen gleichzeitig auf einen unterschiedlichen Umgang von planktonischen Zellen und Biofilmzellen mit Metallionen schließen. Untersuchungen von Metallionenstress auf molekularer Ebene basieren bisher größtenteils auf Studien mit planktonischen Zellen oder mit Biofilmen (Kaur *et al.*, 2006, Booth *et al.*, 2013, Matilda *et al.*, 2019), während der Umgang mit Metallionen einer Spezies in beiden Lebensformen bislang weitestgehend unbekannt ist.

Zur Untersuchung des Einflusses von Kupfer- und Nickelionen auf molekularer Ebene sollte das Proteom von Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten sowie von jeweils unbehandelten planktonischen Zellen und Biofilmen untersucht und untereinander verglichen werden. Um einen Effekt der Metallionen auf das Proteom nachzuweisen, sollten die Proteinproben zunächst mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und die erhaltenen Proteinmuster verglichen werden. Für eine selektive Quantifizierung des Proteoms sollte im Anschluss eine globale quantitative Proteomanalyse der *H. salinarum* Zelllysate mittels *Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Spectra* (SWATH)-LC/MS/MS erfolgen. SWATH-LC/MS/MS ist eine markierungsfreie und datenunabhängige Methode in der Proteomik, welche eine reproduzierbare und präzise Quantifizierung von Proteomen mit einem tiefen Analysepotenzial ermöglicht (Gillet *et al.*, 2012, Collins *et al.*, 2017, Krasny *et al.*, 2018). Sie wurde bereits für globale Proteomstudien von Modellorganismen eingesetzt und führte beispielweise zu einer erfolgreichen Charakterisierung des Proteoms von *Saccharomyces cerevisia*e (Selevsek *et al.*, 2015). Darüber hinaus eignet sich SWATH-LC/MS/MS besonders für Projekte, welche eine große Anzahl von Proben umfassen und eine präzise und reproduzierbare Quantifizierung für eine möglichst große Schnittmenge des Proteoms aus jeder Probe erfordern. So wurden beispielsweise umfassende molekulare Veränderungen bei einem Übergang von der planktonischen Lebensweise zur Bildung von initialen und reifen Biofilmen in *H. salinarum* R1 verfolgt (Losensky *et al.*, 2017). Neben der molekularen Untersuchung von Metallionenstress auf Proteinebene sollten zusätzlich qRT-PCR-basierte Genexpressionsstudien von ausgewählten Genen in *H. salinarum* R1 erfolgen, um die Stressantwort in Gegenwart von Metallionen zusätzlich auf Transkriptebene zu überprüfen.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Untersuchung der Proteinmuster von planktonischen Zellen und Biofilmen nach Metallionenbehandlung

Um den Einfluss von Kupfer- und Nickelionen auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die Proteinmuster von planktonischen- und Biofilmzellen mit denen unbehandelter Zellen verglichen. Hierzu wurden planktonische Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3) und Biofilme nach 14 Tagen Kultivierung in Komplexmedium jeweils für 24 h mit Cu^{2+} bzw. Ni^{2+} inkubiert. Planktonische Zellen wurden mit den spezifischen MHKs von 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} behandelt. Die Behandlung von Biofilmen erfolgte mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+}, da bei diesen Konzentrationen signifikante Änderungen der Biofilmarchitektur bei einem maximalen Anteil von 25% toten Zellen ermittelt wurden. Es erfolgte eine Zelllyse und die Fällung der Proteine, welche anschließend mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die SDS-Gele in kolloidaler Coomassie-Färbelösung gefärbt.

Im Fall der planktonischen Zellen wurden deutliche Unterschiede der Proteinmuster zwischen unbehandelten sowie Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Proben beobachtet. So zeigten die Proteinproben Cu^{2+}-behandelter Zellen jeweils fehlende oder im Vergleich zur Kontrolle schwache Proteinbanden bei 55, unterhalb von 43 und unterhalb von 26 kDa (Abb. 21A). Die Proteinmuster von Ni^{2+}-behandelten Zellen zeigten hingegen zusätzliche Banden im Bereich zwischen 43 und 72 kDa (Abb. 21A). Bei den Biofilmzellen wurden im Allgemeinen weniger Unterschiede der Proteinmuster beobachtet. Hier zeigen Cu^{2+}-behandelte Zellen eine schwächere Proteinbande unterhalb von 43 kDa, während bei Ni^{2+}-Behandlung eine zusätzliche Bande bei etwa 55 kDa beobachtet wurde (Abb. 21B).

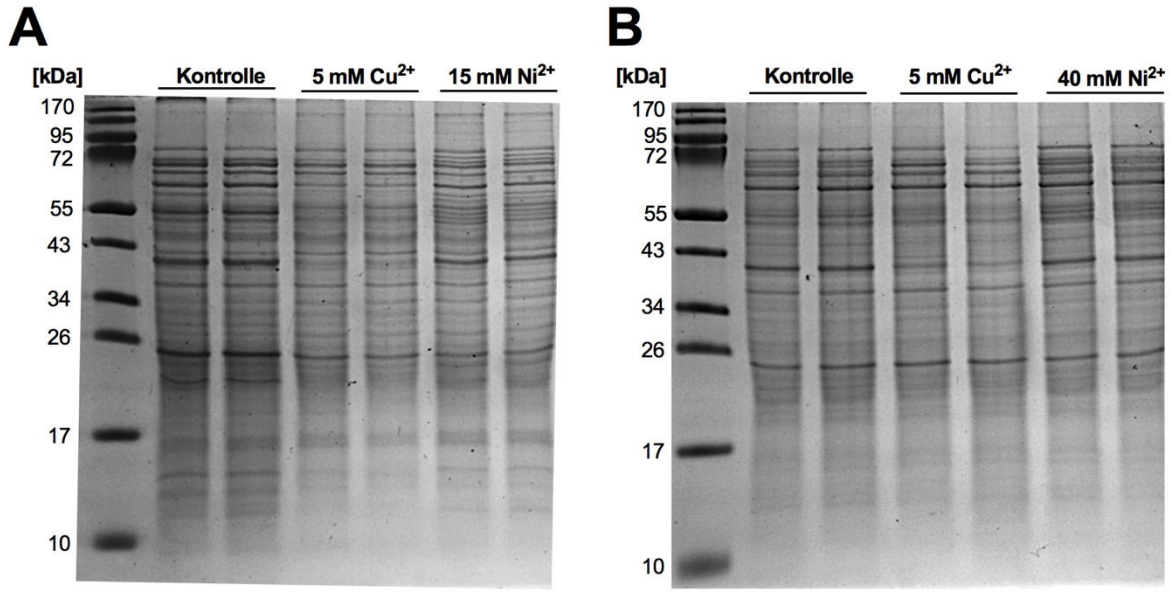


Abbildung 21. SDS-PAGE von Proteinproben aus *H. salinarum* Zelllysaten nach 24 h Inkubation mit Cu^{2+} und Ni^{2+}. **(A)** Vergleich der Proteinmuster von unbehandelten planktonischen Zellen (Kontrolle) mit 5 mM Cu^{2+}- bzw. 15 mM Ni^{2+}-behandelten Zellen. **(B)** Vergleich der Proteinmuster von unbehandelten Biofilmzellen (Kontrolle) mit 5 mM Cu^{2+}- bzw. 40 mM Ni^{2+}-behandelten Biofilmzellen. Pro Spur wurden jeweils 25 µg Protein aufgetragen. Das Proteingel wurde mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung gefärbt.

4.2.2 Quantitative Proteomanalyse mittels SWATH-LC/MS/MS

Zur molekularen Analyse der Auswirkung von Metallionen auf Proteinebene erfolgten quantitative Proteomanalysen von *H. salinarum* R1 planktonischen Zellen und Biofilmen mittels markierungsfreier *Sequencial Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Spectra* (SWATH)-LS/MS/MS.

Hierzu wurden planktonische Zellen für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} behandelt, während Biofilme nach 14 Tagen Anzucht für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert wurden. Als Kontrolle erfolgte parallel die Kultivierung von Zellen ohne Zugabe von Metallionen. Pro Bedingung wurden jeweils drei biologische Replikate für die Massenspektrometrie vorbereitet. Zur Erstellung einer projektspezifischen Spektralbibliothek erfolgte zunächst eine Identifizierung der gesamten vorhandenen Proteine in einem Pool aus allen biologischen Proben. Hierbei wurden insgesamt 1.378 Proteine bei einer tolerierten Falscherkennungsrate (FDR) von 1% identifiziert, was bei einer Gesamtheit von 2.570 annotierten Proteinen in *H. salinarum* R1 (UniProt Datenbank, Stand: 10, 2019) einer Proteomabdeckung von 54% entspricht. Basierend auf der erstellen Spektralbibliothek erfolgte mittels SWATH-LC/MS/MS eine Quantifizierung von insgesamt 1.180 Proteinen. Dies entspricht 86% der qualitativ nachgewiesenen Proteine und einer allgemeinen Proteomabdeckung von 46%.
Die quantitativ nachgewiesenen Proteine wurden mittels SignalP-5.0.Server (Almagro Armenteros *et al.*, 2019) auf archaeaspezifische Signalsequenzen sowie mittels TMHMM-Server (Krogh *et al.*, 2001) auf Transmembranhelices untersucht. Die Analysen zeigten, dass 82% der quantifizierten Proteine cytoplasmatisch und 12% membrangebunden sind. Außerdem verfügten 6% der Proteine über eine Signalsequenz für den Export in das Pseudoperiplasma, wobei 3% dieser Proteine zusätzliche Transmembranhelices besitzen (Abb. 22A).

Zur weiteren Analyse wurden die quantifizierten Proteine basierend auf ihrer KEGG-Annotation (Kanehisa & Sato, 2019) funktionellen Kategorien zugeordnet. Bei 693 Proteinen erfolgte aufgrund einer fehlenden KEGG-Annotation keine funktionelle Einteilung. Analysen der annotierten Proteine zeigten eine Beteiligung von 73% der Proteine in Stoffwechselwegen, wobei der Großteil mit 20 und 19% im Kohlenhydrat- bzw. Aminosäure-Metabolismus involviert war. Der Anteil von Proteinen in der genetischen Informationsverarbeitung betrug 18%. Darunter waren 9% der Proteine in der Translation, 5% in Replikations- und Reparaturprozessen involviert und jeweils 2% in Transkription sowie in Proteinfaltung, Sortierung und Abbau beteiligt. Proteine im Membrantransport machten einen Anteil von 3% aus, während 2% an der Signaltransduktion beteiligt waren. Der Anteil von Proteinen in zellulären Prozessen wie der zellulären Gemeinschaft oder der Zellmotilität betrug 4% (Abb. 22B).

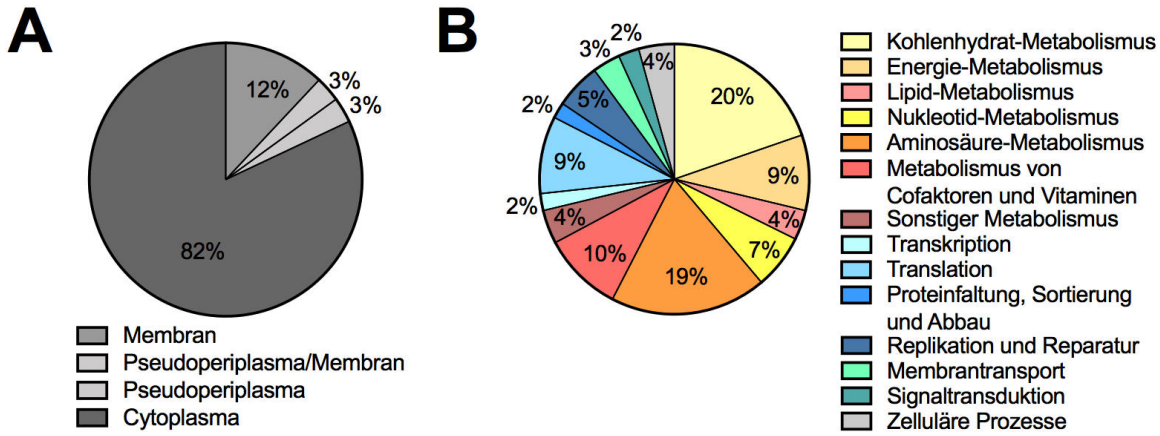


Abbildung 22. Statistische Analyse der Lokalisation und funktionellen Klassifizierung der quantifizierten Proteine. **(A)** Lokalisationsvorhersage basierend auf bioinformatischen Berechnungen mittels SignalP- und TMHMM-Server. **(B)** Globale Einteilung der Proteine in funktionelle Kategorien basierend auf ihrer KEGG-Annotation.

Zur Bestimmung des Variationsgrades zwischen Metallionen-behandelten und unbehandelten Proben sowie zwischen planktonischen- und Biofilmzellen wurde eine Hauptkomponenten-analyse (PCA) durchgeführt. Diese basiert auf den zwei größten Komponenten PC1 und PC2, welche zusammen 69,5% ergaben (Abb. 23).

Die Analyse zeigte, dass die biologischen Replikate der Proben sehr dicht gruppiert auftraten, was auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung und der Proteinquantifizierungsmethode hindeutet. Im Fall von planktonischen Zellen zeigte der Einfluss von Cu^{2+} und Ni^{2+} deutliche Unterschiede verglichen mit der Kontrolle, wobei zwischen Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung keine Differenzierungen beobachtet wurden. Die Biofilmproben unterschieden sich stark von den planktonischen Proben, wobei unbehandelte und Metallionen-behandelte Proben relativ dicht gruppiert auftraten. Innerhalb der Biofilmproben wurde jedoch eine größere Distanz der Cu^{2+}-behandelten Proben zur Kontrolle beobachtet (Abb. 23).

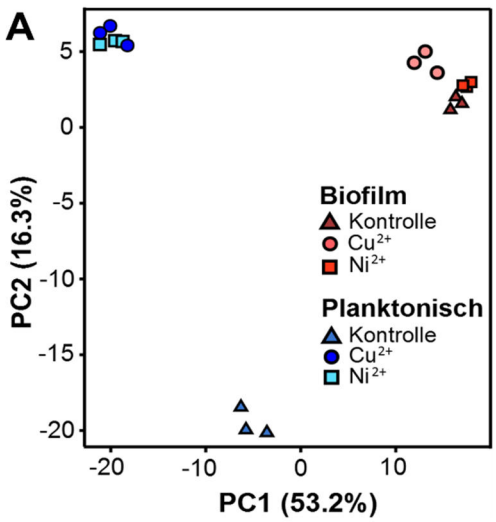


Abbildung 23. Hauptkomponentenanalyse der quantitativen Proteomdaten von planktonischen Zellen (blau) und Biofilmzellen (rot). Vergleich der Daten von unbehandelten (Dreiecke) sowie von Cu^{2+}- (Kreise) und Ni^{2+}-(Quadrate) behandelten Zellen. Planktonische Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3) für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} behandelt. Biofilme wurden 14 Tage angezogen und für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} behandelt. Zur Kontrolle wurden zudem jeweils Ansätze ohne Metallionenbehandlung vorbereitet. Die Messung der Proben basierte auf drei technischen Replikaten von jeweils drei biologischen Replikaten.

Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass Metallionen einen stärkeren Effekt auf planktonische Zellen haben, welcher unabhängig von dem jeweiligen Metallion zu einer globalen Reaktion in den Zellen führt. Die relativ dichte Gruppierung der Biofilmproben lässt darauf schließen, dass Biofilmzellen allgemein weniger von Metallionen beeinflusst werden und eine Metallionen-spezifische Reaktion zeigen.

Die quantitativen Proteomdaten wurden anschließend im Hinblick auf signifikante Veränderungen nach Metallionenbehandlung in planktonischen Zellen und Biofilmzellen analysiert. Dies erfolgte durch einen Vergleich der Proteinabundanzen von Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-behandelten Proben mit der jeweiligen unbehandelten Probe. Hierbei wurden Proteine mit einem *fold change* (FC) <0,5 und >2 sowie einem Signifikanzniveau (angepasster *p-value*) <0,05 im Weiteren als Proteine mit einer signifikant veränderten Abundanz bezeichnet.

Unter den planktonischen Proben wurden insgesamt 234 Proteine mit einer signifikant veränderten Abundanz nach Metallionenbehandlung ermittelt. Hierbei traten zwischen Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung 111 gemeinsame Proteine auf, während 48 Proteine ausschließlich in Cu^{2+}- und 75 Proteine ausschließlich in Ni^{2+}-behandelten Proben gefunden wurden (Abb. 24A). Bei den gemeinsam auftretenden Proteinen zeigte der größere Anteil (64%) eine im Vergleich zur Kontrolle verringerte Abundanz, während bei den Proteinen der mit Ni^{2+}-behandelten Proben eine erhöhte Abundanz mit 68% ermittelt wurde. In den mit Cu^{2+}-behandelten Proben war die Verteilung zwischen einer erhöhten und verringerten Proteinabundanz mit 44 bzw. 56% relativ ausgeglichen (Abb. 24A).

Im Fall der Biofilmproben wurden insgesamt nur 52 Proteine mit signifikanten Veränderungen der Abundanz gefunden. Von diesen traten nur drei Proteine gemeinsam in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Proben auf, während der Großteil der Proteine ausschließlich in Cu^{2+}- (29 Proteine) oder in Ni^{2+}-behandelten (20 Proteine) Proben gefunden wurde (Abb. 24B). Darunter zeigten 76 bzw. 55% im Fall von Cu^{2+} und Ni^{2+} eine erhöhte relative Häufigkeit. Unter den drei gemeinsam auftretenden Proteinen waren zwei Proteine in einer erhöhten und ein Protein in einer verringerten Menge vorhanden (Abb. 24B).

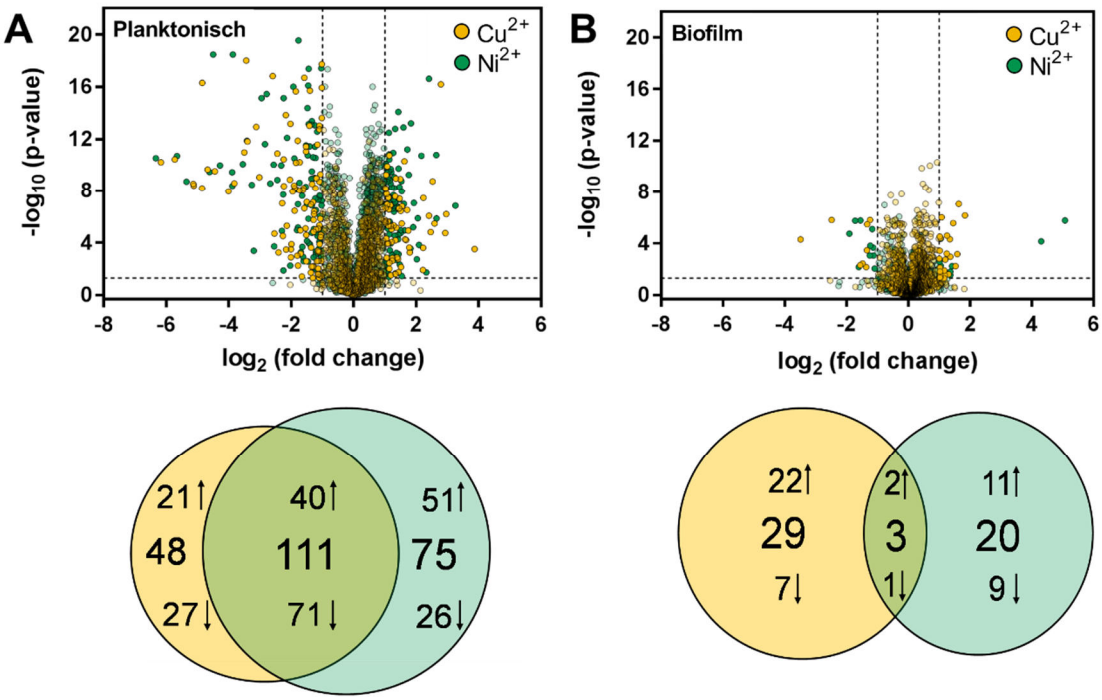


Abbildung 24. Graphische Darstellung der Proteinabundanz nach Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in **(A)** planktonischen- und **(B)** Biofilmzellen. *Volcano plots* (obere Reihe) zeigen die Verteilung der Proteine nach dem jeweiligen Signifikanzniveau (*p-value*) und der relativen Häufigkeit (*fold change,* FC) zwischen Cu^{2+}-/Ni^{2+}-behandelten Proben und der Kontrolle. Proteine mit einem FC ≤0,5 bzw. ≥2 und einem *p-value* <0,05 sind in Venn-Diagrammen (untere Reihe) dargestellt. Diese zeigen die Anzahl von Proteinen, welche gemeinsam in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Proben sowie ausschließlich in jeweils einer Probe auftreten. Pfeile nach oben weisen auf eine erhöhte- (FC >2) und Pfeile nach unten auf eine verringerte (FC <0,5) Proteinabundanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hin.

Ausgehend von den Proteinen mit einer signifikant veränderten Abundanz erfolgte zur weiteren Analyse eine funktionale Kategorisierung basierend auf der UniProtKB Datenbank und dem *Archaeal Cluster of Orthologous Genes* (arCOG) Browser (Makarova *et al.*, 2007, Makarova *et al.*, 2015). Hierbei wurden die Proteine in die vier Kategorien „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“, „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“, „Metabolismus“ und „Uncharakterisiert“ eingeteilt, wobei ein erhöhtes Vorkommen der Proteine ohne Muster und ein verringertes Vorkommen mit einem gestreiften Muster dargestellt wurde (Abb. 25). Innerhalb der vier Kategorien erfolgte jeweils eine weitere Einteilung basierend auf der Funktionsbeschreibung der Proteine, welche in Tabelle 8 aufgelistet ist. Pfeile nach oben bzw. unten markieren jeweils ein erhöhtes oder verringertes Vorkommen der Proteine.

Die Behandlung mit Metallionen führte bei planktonischen Zellen hauptsächlich zu einer Verringerung der Proteine im Metabolismus mit 26 und 24% im Fall von Cu^{2+}-bzw. Ni^{2+}-Behandlung, wobei der Großteil dieser Proteine dem Transport und Metabolismus anorganischer Ionen zugeordnet wurde. Hierzu zählen vor allem Membranproteine der Familie ABC Transporter (s. Anhang 1, Proteomdaten). In der Kategorie „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ zeigten die Proteine mit 16 und 14% vorwiegend eine erhöhte Abundanz nach Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Behandlung, wobei der Großteil der Proteine zur Unterkategorie „Translation, ribosomale Struktur und Biogenese“ gehörte (Abb. 25B). Darunter zählten vor allem ribosomale Untereinheiten, Transkriptionsregulatoren oder Transkriptionsfaktoren, was auf umfassende transkriptionelle Veränderungen nach Metallionenstress deutet (s. Anhang 1, Proteomdaten).

Im Fall von Biofilmzellen wurde bei Cu^{2+}-Behandlung mit 25% hauptsächlich ein erhöhtes Vorkommen von Proteinen der Kategorie „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ ermittelt, wobei Proteine der Transkription wie Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsregulatoren den größten Anteil ausmachten (Abb. 25C, Tabelle 8, s. Anhang 1, Proteomdaten). Bei den Ni^{2+}-behandelten Biofilmzellen gehörte der größte Teil der Proteine mit 43% zur Kategorie der uncharakterisierten Proteine, worunter allein 26% eine verringerte Abundanz zeigten. Die restlichen signifikant veränderten Proteine waren unter den drei weiteren Kategorien relativ gleichmäßig verteilt, wobei Proteine der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ größtenteils in einer erhöhten relativen Häufigkeit auftraten, während eine Verringerung der Proteinabundanz vorwiegend bei Proteinen des Metabolismus beobachtet wurde (Abb. 25D).

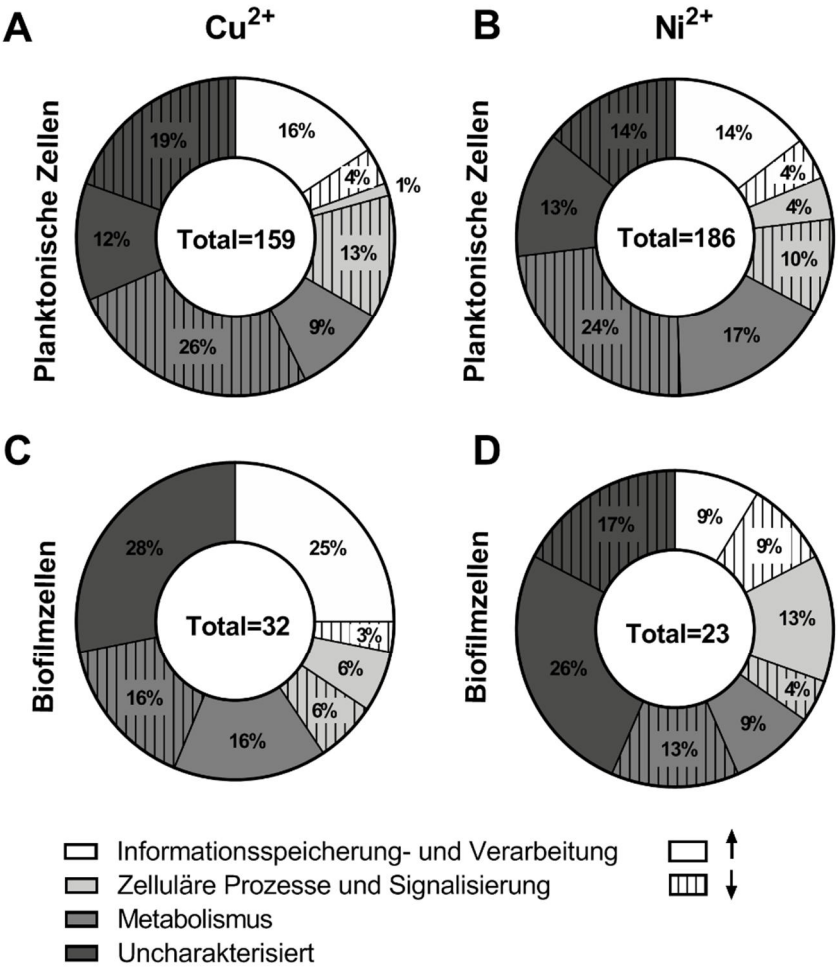


Abbildung 25. Funktionale Kategorisierung der Proteine mit einer signifikanten Veränderung ihrer relativen Häufigkeit in **(A-B)** planktonischen Zellen und **(C-D)** Biofilmzellen nach Behandlung mit **(A+C)** Kupfer- und **(B+D)** Nickelionen. Darstellung des prozentualen Anteils der Kategorien „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“, „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“, „Metabolismus“ und „Uncharakterisiert“. Ohne Muster: *fold change* >2, gestreiftes Muster: *fold change* <0,5 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die funktionale Kategorisierung basiert auf der UniprotKB Datenbank und dem *Archaeal Clusters of Orthologous Genes* (arCOG) Browser.

Tabelle 8. Kategorisierung von Proteinen mit signifikant veränderten Abundanzen nach Behandlung mit Kupfer- und Nickelionen.

Funktionale Kategorie[1]	Funktionsbeschreibung[1]	Planktonische Zellen				Biofilmzellen			
		Cu^{2+}		Ni^{2+}		Cu^{2+}		Ni^{2+}	
Informations-speicherung- und Verarbeitung	Translation, ribosomale Struktur und Biogenese	18	↑17 ↓1	17	↑16 ↓1	1	↑1 ↓0	1	↑1 ↓0
	Transkription	8	↑5 ↓3	11	↑6 ↓5	6	↑5 ↓1	3	↑1 ↓2
	Replikation, Rekombination und Reparatur	5	↑3 ↓2	7	↑5 ↓2	2	↑2 ↓0	0	
Zelluläre Prozesse und Signalisierung	Zellzykluskontrolle, Zellteilung, Chromosomenteilung	0		1	↑0 ↓1	0		0	
	Zellwand-/Membranbiogenese	6	↑1 ↓5	8	↑3 ↓5	1	↑0 ↓1	1	↑0 ↓1
	Zellmotilität	1	↑0 ↓1	1	↑0 ↓1	1	↑1 ↓0	0	
	Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperonen	5	↑0 ↓5	6	↑2 ↓4	1	↑0 ↓1	1	↑1 ↓0
	Signaltransduktions-mechanismen	5	↑0 ↓5	9	↑3 ↓6	1	↑1 ↓0	1	↑1 ↓0
	Intrazellulärer Transfer, Sekretion und Vesikeltransport	2	↑1 ↓1	0		0		0	
	Abwehrmechanismen	0	↑0 ↓3	1	↑0 ↓1	0		1	↑1 ↓0
Metabolismus	Energieerzeugung- und Umwandlung	6	↑3 ↓3	11	↑6 ↓5	1	↑1 ↓0	2	↑1 ↓1
	Aminosäuretransport- und Metabolismus	8	↑1 ↓7	12	↑5 ↓7	4	↑1 ↓3	0	
	Nukleotidtransport- und Metabolismus	9	↑5 ↓4	15	↑8 ↓7	1	↑0 ↓1	0	
	Kohlenhydrattransport- und Metabolismus	4	↑0 ↓4	4	↑1 ↓3	1	↑0 ↓1	0	
	Coenzymtransport- und Metabolismus	7	↑3 ↓4	6	↑4 ↓2	1	↑1 ↓0	1	↑0 ↓1
	Lipidtransport- und Metabolismus	8	↑0 ↓8	9	↑1 ↓8	1	↑1 ↓0	0	
	Transport und Metabolismus anorganischer Ionen	12	↑2 ↓10	16	↑4 ↓12	1	↑1 ↓0	1	↑1 ↓0
	Biosynthese, Transport und Abbau von sekundären Metaboliten	2	↑1 ↓1	2	↑2 ↓0	0		1	↑0 ↓1
Uncharakterisiert	Nur allgemeine Vorhersage der Funktion	18	↑6 ↓12	19	↑9 ↓10	1	↑1 ↓0	3	↑1 ↓2
	Funktion unbekannt	30	↑13 ↓17	28	↑15 ↓13	7	↑7 ↓0	7	↑5 ↓2
	Keine Vorhersage	2	↑0 ↓2	3	↑0 ↓3	1	↑1 ↓0	0	

[1]Die funktionale Kategorisierung basiert auf der UniprotKB Datenbank und dem *Archaeal Clusters of Orthologous Genes* (arCOG) Browser. ↑ Erhöhte Proteinabundanz (FC >2), ↓verringerte Proteinabundanz (FC <0,5) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Zur detaillierteren Analyse der Auswirkung von Metallionen auf das Proteom von planktonischen Zellen und Biofilmen wurden jeweils die zehn Proteine mit der höchsten bzw. geringsten relativen Häufigkeit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verglichen (Tabellen 9 und 10). Bei den planktonischen Zellen traten unter den erhöhten Proteinmengen fünf gleiche Proteine zwischen Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung auf. Darunter zählten Proteine im Metabolismus wie ein Plastocyanin und ein Thiamin-Biosynthese Protein sowie ein ribosomales Protein und zwei uncharakterisierte Proteine. Unter den zehn Proteinen mit den geringsten Abundanzen wurden zwischen Cu^{2+} und Ni^{2+} sogar sieben gemeinsame Proteine ermittelt. Hierzu zählten vor allem Untereinheiten von ABC-Transportsystemen für den Transport von Phosphaten (Pst) und Zuckern (Ugp) sowie eine alkalische Phosphatase und eine Serinprotease (Tabelle 9).

Im Fall der Biofilmzellen wurden bei den Proteinen mit erhöhten Abundanzen keine gemeinsamen Proteine zwischen Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung ermittelt. Während bei den Cu^{2+}-behandelten Zellen vorwiegend Transkriptionsfaktoren und Proteine im Metabolismus in erhöhten Mengen auftraten, wurde bei den Ni^{2+}-behandelten Zellen keine dominante Kategorie ermittelt. Hier wurden diverse Proteine der Proteinbiosynthese sowie der Proteinmodifikation und Signaltransduktion nachgewiesen. Des Weiteren traten vermehrt uncharakterisierte Proteine mit einer bis zu 34-fach erhöhten relativen Häufigkeit im Vergleich zur Kontrolle auf (Tabelle 10). Bei den Proteinen mit einer stark verringerten Abundanz wurden bei den Cu^{2+}-behandelten Zellen insgesamt nur acht Proteine mit einem *fold change* $<0{,}5$ bei einem *p-value* $<0{,}05$ ermittelt. Hierzu zählten hauptsächlich metabolische Proteine im Transport und Metabolismus von Aminosäuren wie Untereinheiten des ABC-Transportsystems Dpp oder eine Triosephoshatisomerase. Zudem wurde eine elffach verringerte Abundanz eines uncharakterisierten Proteins ermittelt. Das einzig gemeinsame Protein zwischen Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung war ein Transkriptionsfaktor, dessen Vorkommen in beiden Fällen signifikant verringert war. Im Fall der Ni^{2+}-behandelten Biofilmzellen wurden insgesamt zehn Proteine mit einer signifikant verringerten Abundanz ermittelt. Darunter zählten beispielsweise Proteine im Metabolismus von sekundären Metaboliten, Coenzymen oder in der Energieerzeugung. Bei den meisten Proteinen ist die Funktion bislang jedoch unbekannt (Tabelle 10).

Tabelle 9. Darstellung der Proteine planktonischer Zellen mit den jeweils zehn höchsten bzw. geringsten *fold changes* nach Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung.

		Cu^{2+}			Ni^{2+}
log_2(FC)[1]	**ID**	**Bezeichnung[2]**	**log_2(FC)[1]**	**ID**	**Bezeichnung[2]**
Erhöhte Proteinabundanz					
3,88	B0R339	Transcription initiation factor IIB (TFIIB), TfbF	3,26	B0R4Y4	50S ribosomal protein L13, Rpl13
2,96	B0R7R5	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase, NrdA1	2,65	B0R8W3	Uncharacterized protein
2,93	B0R4Y4	50S ribosomal protein L13, Rpl13	2,65	B0R2Z0	DUF5059 domain / halocyanin domain protein, HcpG
2,79	B0R400	Phosphomethylpyrimidine synthase, ThiC	2,41	B0R400	Phosphomethylpyrimidine synthase, ThiC
2,59	B0R8W3	Uncharacterized protein	2,32	B0R6Z6	Acyl-CoA synthetase, Acs5
2,53	B0R2Z0	DUF5059 domain / halocyanin domain protein, HcpG	2,17	B0R750	Small CPxCG-related zinc finger protein
2,47	B0R5J7	Uncharacterized protein	2,09	B0R5J7	Uncharacterized protein
2,41	B0R2M0	UCP015877 family protein	2,05	B0R3Z1	HMA domain protein
2,23	B0R5X9	DUF262/DUF1524 domain protein	2,03	B0R369	Uncharacterized protein
2,22	B0R521	Fe-coproporphyrin synthase, AhbC	1,93	B0R587	Uncharacterized protein
Verringerte Proteinabundanz					
-6,17	B0R7Z3	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (Probable substrate phosphate), PstS1	-6,33	B0R7Z3	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (Probable substrate phosphate), PstS1
-5,72	B0R9U4	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (Probable substrate glycerol-3-phosphate), UgpB	-5,66	B0R9U4	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (Probable substrate glycerol-3-phosphate), UgpB
-5,13	B0R9U7	ABC-type transport system ATP-binding protein (Probable substrate glycerol-3-phosphate), UgpC	-5,35	B0R6E4	Glutamine-rich alkaline protein
-5,12	B0R6E4	Glutamine-rich alkaline protein	-4,62	B0R9U7	ABC-type transport system ATP-binding protein (Probable substrate glycerol-3-phosphate), UgpC
-4,85	B0R6E6	Uncharacterized protein	-4,50	B0R7Z0	Phosphate import ATP-binding protein PstB (ABC phosphate transporter) (Phosphate-transporting ATPase), PstB1
-4,84	B0R7Z0	Phosphate import ATP-binding protein PstB (ABC phosphate transporter) (Phosphate-transporting ATPase), PstB1	-4,28	B0R9W3	Alkaline phosphatase, Aph
-4,67	B0R9W3	Alkaline phosphatase, Aph	-3,89	B0R3V4	Methylmalonyl-CoA mutase subunit A, MmcA1
-4,44	B0R8D9	Uncharacterized protein	-3,88	B0R859	Serine protease halolysin, Hly
-4,00	B0R859	Serine protease halolysin, Hly	-3,87	B0R428	Probable PrkA-type serine/threonine protein kinase, PrkA1
-3,82	B0R6N8	Lrp/AsnC family transcription regulator, Trh5	-3,55	B0R7Z1	Phosphate transport system permease protein PstA, PstA1

[1]Der log_2(FC) basiert auf einem Vergleich der Proteinabundanz von Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-behandelten Zellen mit der unbehandelten Kontrolle.

[2]Nach Angaben der UniProtKB Datenbank (https://www.uniprot.org/).

Tabelle 10. Darstellung der Proteine von Biofilmzellen mit den jeweils zehn höchsten bzw. geringsten *fold changes* nach Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung.

		Cu^{2+}			Ni^{2+}
log_2(FC)[1]	ID	Bezeichnung[2]	log_2(FC)[1]	ID	Bezeichnung[2]
Erhöhte Proteinabundanz					
1,84	B0R435	Transcription factor E (TFE) (TFIIE subunit alpha homolog) (Transcription initiation factor TFIIE)	5,07	B0R587	Uncharacterized protein
1,63	B0R7P9	UPF0148 protein OE_4320R	4,30	B0R859	Serine protease halolysin, Hly
1,58	B0R722	Threonine ammonia-lyase	1,42	B0R9Z2	ABC-type transport system ATP-binding protein
1,53	B0R4W4	Uncharacterized protein	1,36	B0R5J7	Uncharacterized protein
1,45	B0RA31	Uncharacterized protein	1,36	B0R7W1	Ferritin, DpsA
1,36	B0R339	Transcription initiation factor IIB (TFIIB)	1,28	B0R8D7	DNA-directed RNA polymerase subunit H, RpoH
1,35	B0R443	PhoU domain protein	1,10	B0R5L3	30S ribosomal protein S17e, Rps17e
1,31	B0R6Z6	Acyl-CoA synthetase	1,05	B0R756	V-type ATP synthase subunit F (V-ATPase subunit F), AtpF
1,25	B0R5W6	Cobalt-precorrin-8 methylmutase	1,05	B0R8V1	Uncharacterized protein
1,24	B0R3D4	Ferritin domain protein	1,05	B0R823	UspA domain protein
Verringerte Proteinabundanz					
-3,48	B0R8D9	Uncharacterized protein	-1,91	B0R521	Fe-coproporphyrin synthase, AhbC
-2,48	B0R896	Oxidoreductase (Homolog to zinc-containing alcohol dehydrogenase), Adh2	-1,72	B0R522	TIGR04031 family protein
-1,56	B0R5Q3	Cro/C1 family transcription regulator	-1,60	B0R5Q3	Cro/C1 family transcription regulator
-1,48	B0R4Q0	Triosephosphate isomerase (TIM) (TPI), TpiA	-1,55	B0R5X0	Cobyrinate a,c-diamide synthase, CbiA
-1,36	B0R7P7	ABC-type transport system ATP-binding protein (Probable substrate dipeptide/oligopeptide), DppD3	-1,25	B0R476	Homolog to NAD-dependent epimerase/dehydratase
-1,34	B0R2X4	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] subunit A, GuaAa	-1,23	B0R5I7	UPF0179 protein OE_3004R
-1,33	B0R733	Glutaredoxin, Grx1	-1,16	B0R7Z8	PHP domain protein
-1,24	B0R828	ABC-type transport system permease protein (Probable substrate dipeptide/oligopeptide), DppB2	-1,14	B0R6G7	Cold shock protein, CspA2
-	-	-	-1,13	B0R7M7	Uncharacterized protein
-	-	-	-1,09	B0R4G5	Monooxygenase (Homolog to alkanesulfonate monooxygenase)

[1]Der log_2(FC) basiert auf einem Vergleich der Proteinabundanz von Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-behandelten Zellen mit der unbehandelten Kontrolle.

[2]Nach Angaben der UniProtKB Datenbank (https://www.uniprot.org/).

Analysen im Hinblick auf Metallionen-spezifische Reaktionen zeigten unter den 1.180 signifikanten Proteinen eine Gesamtheit von zwölf Proteinen, die gemeinsam in planktonischen Zellen und Biofilmen nach Cu^{2+}-Behandlung auftraten. Darunter waren elf Proteine in planktonischen Zellen und Biofilmen gleichermaßen erhöht bzw. verringert, während ein Protein eine signifikante Erhöhung im Biofilm und eine Verringerung in planktonischen Zellen

zeigte. Hierzu zählten vor allem Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsregulatoren sowie einige bislang uncharakterisierte Proteine (s. Anhang 1, Proteomdaten). Bei den Ni^{2+}-behandelten Proben wurden insgesamt acht Proteine gemeinsam in planktonischen Zellen und Biofilmen ermittelt. Darunter zeigten vier uncharakterisierte Proteine eine gleiche Tendenz der relativen Häufigkeit (drei Proteine zeigten eine erhöhte- und ein Protein eine verringerte Abundanz), während vier Proteine eine gegensätzliche Tendenz aufwiesen: Hierzu zählte eine Serinprotease, eine ABC-Transporter Untereinheit und ein Ferritin-ähnliches Protein, welche jeweils in den planktonischen Zellen verringert und in den Biofilmzellen signifikant erhöht auftraten. Im Gegensatz hierzu zeigte ein putativer Transkriptionsfaktor eine erhöhte Abundanz in planktonischen Zellen, während eine starke Verringerung in Biofilmen ermittelt wurde (s. Anhang 1, Proteomdaten).
Zusammengefasst zeigten nur 1 und 0,7% der Proteine eine spezifische Reaktion ausschließlich auf Kupfer- bzw. Nickelionen, was darauf schließen lässt, planktonische Zellen und Biofilme sehr unterschiedlich auf die Gegenwart des gleichen Metallions reagieren.

4.2.3 Proteinkategorien mit signifikanten Änderungen der relativen Häufigkeit

Die Auswertung der quantitativen Proteomstudie resultierte in einer Gesamtheit von 261 Proteinen mit einer signifikant veränderten Abundanz nach Cu^{2+}-bzw. Ni^{2+}-Behandlung. Um einen Überblick über besonders häufig auftretende Proteinklassen zu erhalten, erfolgte eine Einteilung funktional ähnlicher Proteine in übergeordneten Gruppen. Hierbei wurde für jedes Protein die relative Abundanz von unbehandelten sowie von Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen mit einer Farbskalierung dargestellt.

Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsregulatoren

Unter den 261 Proteinen zeigten besonders Transkriptionsfaktoren und Transkriptions-regulatoren eine signifikant veränderte Abundanz in den Cu^{2+}- und Ni^{2+}- behandelten Zellen. Die Transkriptionsfaktoren Tfb und Tfe spielen eine wichtige Rolle in der archaealen Transkriptionsinitiation. In dieser Proteomstudie wurden von den insgesamt acht annotierten Tfbs in *H. salinarum* R1 drei Faktoren quantifiziert, wobei TfbF in Cu^{2+}-behandelten Zellen eine bis zu 15-fache Erhöhung aufwies, während TfbB und TfbG eine Verringerung nach Metallionenbehandlung zeigten. Im Fall des Transkriptionsfaktors TfeA wurde eine bis zu vierfache Erhöhung ausschließlich nach Behandlung mit Kupferionen ermittelt (Abb. 26).

Transkriptionsregulatoren spielen eine wichtige Rolle in der globalen Informationsverarbeitung und der Regulation von Stoffwechselprozessen als Reaktion auf äußere Einflüsse. In dieser Studie wurden auch bei den Transkriptionsregulatoren signifikante Unterschiede der Abundanz nach Metallionenstress beobachtet. Hierzu zählen Transkriptionsregulatoren der Familie PadR, welche auffällig erhöhte Proteinmengen nach Metallionenbehandlung zeigten. Von insgesamt vier quantifizierten PadR-Regulatoren zeigten zwei eine stark signifikante Erhöhung in sowohl Cu^{2+}-, als auch Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen, während ein Regulator eine erhöhte Abundanz ausschließlich in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen aufwies (Abb. 26). Von den insgesamt sechs quantifizierten Transkriptionsregulatoren der Lrp/AsnC Familie zeigten drei Regulatoren signifikante Änderungen der Abundanz nach Metallionenbehandlung, wobei ein Regulator eine bis zu 14-fach verringerte Abundanz in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen aufwies. Aus der Cro/C1 Familie wurden in dieser Studie insgesamt drei Transkriptionsregulatoren nachgewiesen, von denen zwei Regulatoren signifikante Änderungen der relativen Häufigkeit zeigten. Darunter wurde bei einem Regulator eine bis zu

dreifach verringerte Abundanz in Biofilmzellen nach Metallionenbehandlung ermittelt, während Ni^{2+}- behandelte planktonische Zellen eine dreifache Erhöhung aufwiesen (Abb. 26). Spezifische Änderungen bezüglich der Lebensform wurden bei einem SirR/DtxR Transkriptionsregulator nachgewiesen, welcher ausschließlich in Metallionen-behandelten Biofilmzellen eine signifikante Erhöhung der Abundanz aufwies. Dagegen zeigte ein Transkriptionsregulator der ArsR Familie, welcher in der Arsenresistenz involviert ist, ausschließlich in behandelten planktonischen Zellen eine bis zu dreifache Erhöhung der relativen Häufigkeit (Abb. 26).

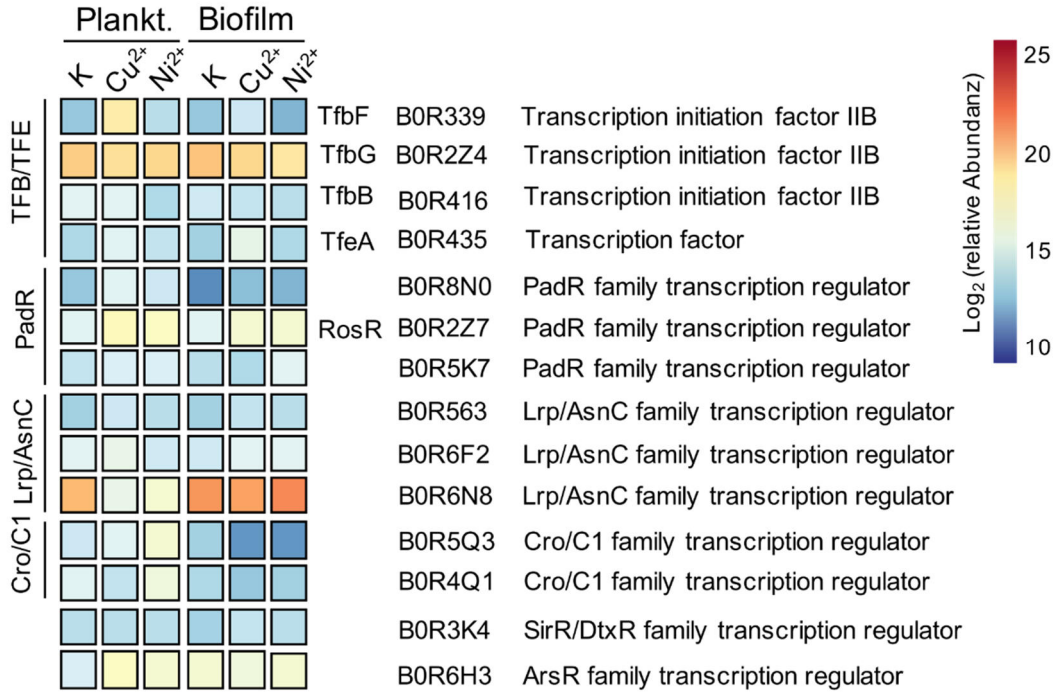


Abbildung 26. *Heat maps* der log_2-transformierten relativen Abundanzen von Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsregulatoren. Vergleich der Abundanz in der unbehandelten Kontrolle (K) mit den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen.

Ribosomale Proteine

Unter den quantifizierten Proteinen wurde eine Vielzahl von ribosomalen Proteinen der großen 50S- sowie der 30S Untereinheit des Ribosoms nachgewiesen. Diese zeigten häufig Unterschiede der Abundanz nach Behandlung mit Metallionen, wobei größtenteils erhöhte Mengen nach Behandlung planktonischer Zellen nachgewiesen wurden. So zeigten 25 von insgesamt 27 quantifizierten Proteinen der 50S-Untereinheit sowie 20 von 21 quantifizierten Proteinen der 30S-Untereinheit eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Menge in den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen. Dazu zählt zum Beispiel Rpl13 mit einer bis zu zehnfach bzw. Rps8e mit einer bis zu vierfach erhöhten Abundanz in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Zellen. Im Fall der Biofilmzellen wurden lediglich geringe Abweichungen der Abundanz bei acht Proteinen der 50S sowie bei fünf Proteinen der 30S Untereinheit ermittelt (Abb. 27).

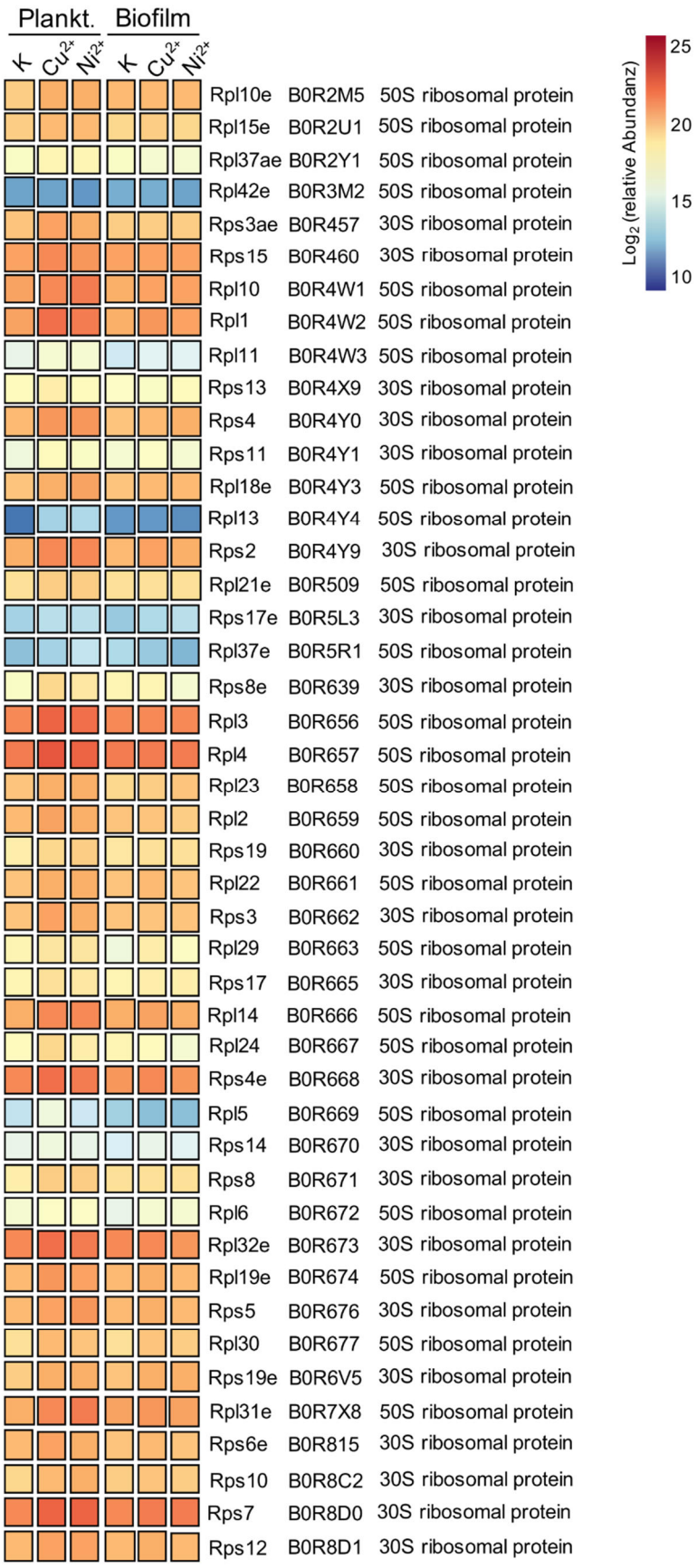


Abbildung 27. *Heat maps* der log_2-transformierten relativen Abundanzen von ribosomalen Proteinen. Vergleich der Abundanz in der unbehandelten Kontrolle (K) mit den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen.

ATP-bindende Kassette (ABC)-Transporter und Transport-ATPasen

ABC-Transporter bilden eine große Familie von Membrantransportern, welche eine Vielzahl von Substraten transportieren. In dieser Proteomstudie wurden verschiedene Untereinheiten aus diversen Unterfamilien der ABC-Transporter quantifiziert. Am stärksten vertreten waren hierbei Untereinheiten der Dipeptid-transportierenden Dpp ABC-Transporter. Von den insgesamt zwölf quantifizierten Proteinen zeigten acht Proteine eine signifikant verringerte Abundanz nach Metallionenbehandlung. Hierbei wurden vor allem bei den planktonischen Zellen starke Unterschiede mit einer bis zu achtfachen Verringerung im Fall von DppA3 nachgewiesen, wobei zwei Proteine zudem auch eine Verringerung in Cu^{2+}-behandelten Biofilmen zeigten (Abb. 28).

Eine weitere dominant vertretene Unterfamilie von ABC Transportern waren Proteine des Phosphat-Transportsystems (Pst). Die fünf in dieser Studie quantifizierten Proteine zeigten alle eine hoch signifikante Verringerung der Abundanz in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen. So wurde im Fall von PstB1 eine bis zu 29-fache und bei PstS1 sogar eine bis zu 79-fache Verringerung ermittelt. Zusätzlich zu den Pst-Proteinen zeigten die Phosphat Aufnahmeregulatoren PhoU3 und PhoU4 ebenfalls eine bis zu vierfache Verringerung in planktonischen Zellen (Abb. 28).

Untereinheiten des Glycerin-3-phosphat-spezifischen ABC Transporters Ugp (UgpB und UgpC) waren ebenfalls ausschließlich in planktonischen Zellen stark verringert.

Besonders auffällige Abundanzen zeigte das ABC-Transporterprotein B0R9Z2, welches in den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen bis zu sechsfach verringert war, während behandelte Biofilmzellen eine bis zu dreifache Erhöhung des Proteins aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigte das ABC-Transporterprotein B0R842 eine stark erhöhte Abundanz in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und eine verringerte Abundanz in Biofilmzellen nach Ni^{2+}-Behandlung. Eine Ni^{2+}-spezifische Reaktion wurde im Fall des Proteins ZnuC als Teil eines Zink-spezifischen ABC-Transporters mit einer zweifach erhöhten Abundanz in planktonischen Zellen und einer Verringerung in Biofilmen ermittelt (Abb. 28).

Neben der großen Familie der ABC-Transporter zeigten auch Transport-ATPasen Veränderungen der relativen Häufigkeit nach Metallionenbehandlung. Dazu zählte beispielsweise das Protein P-Typ-ATPase CopA, welches in Cu^{2+}-behandelten planktonischen Zellen vierfach erhöht war. Zudem zeigte das genomisch benachbarte HMA-Domäne Protein eine signifikant erhöhte Abundanz in planktonischen Zellen nach Ni^{2+}-Behandlung sowie eine leichte Erhöhung in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Biofilmen (Abb. 28).

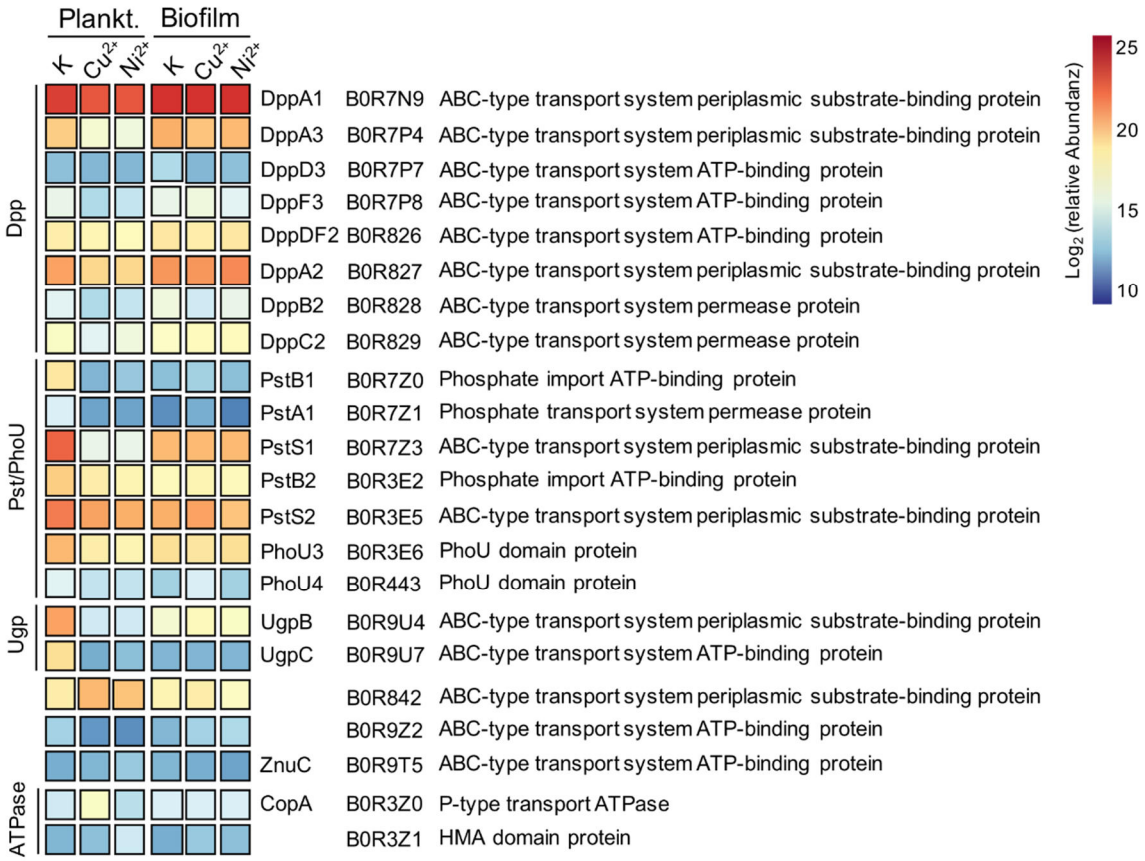


Abbildung 28. *Heat maps* der log_2-transformierten relativen Abundanzen von ABC-Transportern und ATPasen. Vergleich der Abundanz in der unbehandelten Kontrolle (K) mit den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen.

Universale Stressproteine (Usp)

Proteine mit der universalen Stressprotein Domäne werden vor allem bei veränderten Umweltbedingungen gebildet. In dieser Studie wurden von den insgesamt 15 annotierten UspA Proteinen in *H. salinarum* R1 elf Proteine quantifiziert, wobei im Fall von vier Proteinen eine signifikante Änderung der Abundanz nach Metallionenbehandlung ermittelt wurde. Darunter zeigten drei Proteine eine bis zu dreifache Erhöhung in Ni^{2+}-behandelten Zellen, während bei zwei Proteinen eine zweifach verringerte Abundanz in planktonischen Zellen nach Cu^{2+}-Behandlung ermittelt wurde (Abb. 29).

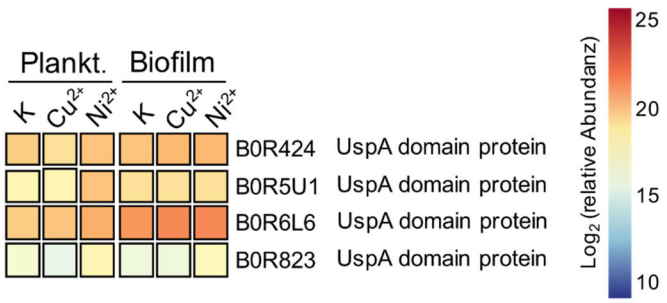


Abbildung 29. *Heat maps* der log_2-transformierten relativen Abundanzen von universalen Stressproteinen (Usp). Vergleich der Abundanz in der unbehandelten Kontrolle (K) mit den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen.

Flagellen- und Chemotaxis-Proteine

Analysen der Abundanz archaealer Flagellenproteine zeigten im Fall von Fla Proteinen eine bis zu zweifach erhöhte Abundanz in Biofilmzellen nach Cu^{2+}-Behandlung, während bei planktonischen Zellen eine signifikante Verringerung in Gegenwart von Cu^{2+} ermittelt wurde. Dies wurde ebenso im Fall der Flagelline FlgB1 und FlgB2 beobachtet, welche bei Cu^{2+}-behandelten planktonischen Zellen zweifach verringert waren, während FlgA1 eine leichte Verringerung in Gegenwart von Ni^{2+} zeigte (Abb. 30). Proteine des genomisch benachbarten Chemotaxis-Operons zeigten quantitative Veränderungen ausschließlich in Cu^{2+}-behandelten Proben. Hierbei wurde bei drei Proteinen jeweils eine signifikante Verringerung der Abundanz in planktonischen Zellen ermittelt, während zwei Proteine eine leicht erhöhte relative Häufigkeit in den Biofilmzellen zeigten (Abb. 30).

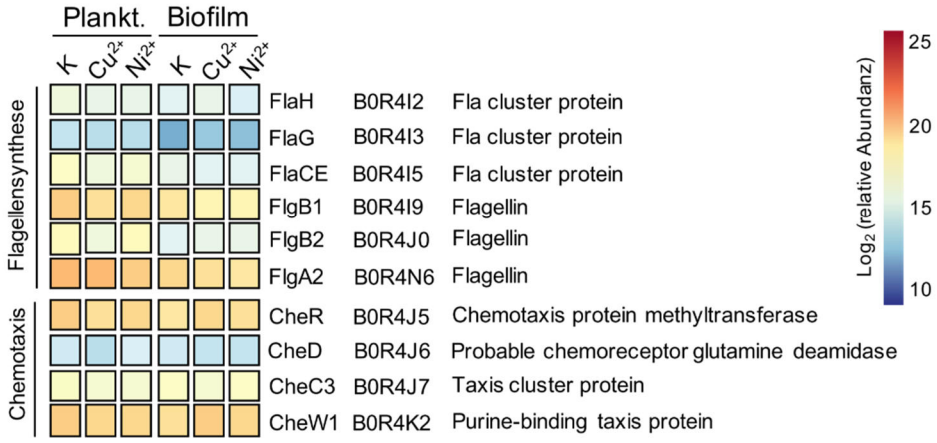


Abbildung 30. *Heat maps* der log_2-transformierten relativen Abundanzen von Flagellen- und Chemotaxis-Proteinen. Vergleich der Abundanz in der unbehandelten Kontrolle (K) mit den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen.

Sonstige Proteine mit Besonderheiten der Proteinabundanz

Unter den gesamten quantifizierten Proteinen wurde zudem eine Vielzahl von Proteinen ermittelt, die eine stark veränderte Abundanz nach Metallionenbehandlung zeigten, jedoch nicht in einer funktionalen Gruppe zusammengefasst werden konnten.

Hierzu gehört zum Beispiel die Serinprotease Halolysin (Hly), welche in den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen bis zu 17-fach verringert war, während Ni^{2+}-behandelte Biofilmzellen eine 20-fach erhöhte Abundanz zeigten. Unterschiede wurden auch im Fall des Eisen-speichernden Ferritin-ähnlichen Proteins DpsA nachgewiesen. DpsA zeigte eine signifikante Verringerung in den planktonischen Zellen, während Biofilme nach Ni^{2+}-Behandlung erhöhte Mengen von DpsA aufwiesen. Metallionen-spezifische Unterschiede zeigte beispielsweise das Enzym Sirohydrochlorin-Cobaltochelatase CbiX1, welches in planktonischen Zellen bei Einfluss von Cu^{2+} signifikant erhöht – und nach Ni^{2+}-Behandlung verringert war (Abb. 31).

Auch bei den Proteinen mit einer unbekannten Funktion wurden signifikante Veränderungen ermittelt. Das Protein B0R587 zeigte beispielweise nach Metallionenstress eine stark erhöhte Abundanz in sowohl Cu^{2+}- als auch Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen mit einer bis zu 34-fachen Erhöhung in Ni^{2+}-behandelten Biofilmzellen. Eine konstant erhöhte Proteinmenge nach Metallionenstress wurde ebenso im Fall des Proteins B0R5J7 ermittelt, welches in den planktonischen Zellen eine 5,5- bzw. 4,3-fach erhöhte Abundanz nach Cu^{2+}- und

Ni^{2+}-Behandlung aufwies. Zudem wurden Proteine ermittelt, welche speziell Veränderungen in planktonischen Zellen oder Biofilmen zeigten. Hierzu zählt zum Beispiel B0RA31, welches sowohl in Cu^{2+}- als auch Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen signifikant verringert vorkam, während in Biofilmen nach Cu^{2+}-Behandlung eine stark erhöhte relative Häufigkeit nachgewiesen wurde (Abb. 31).

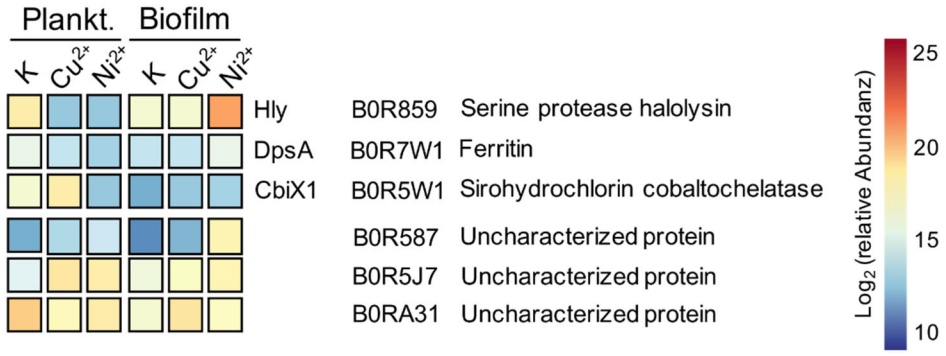


Abbildung 31. *Heat maps* der log_2-transformierten relativen Abundanzen von Proteinen mit Besonderheiten der relativen Häufigkeit. Vergleich der Abundanz in der unbehandelten Kontrolle (K) mit den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen.

Zusammengefasst zeigten die quantitativen Untersuchungen des *H. salinarum* R1 Proteoms nach Metallionenstress, dass Kupfer- und Nickelionen sowohl Zellen in Flüssigkulturen, als auch in Biofilmen auf molekularer Ebene stark beeinflussen.
Hierbei zeigten vor allem planktonische Zellen starke Veränderungen des Proteoms, welche sich nur in geringem Maße zwischen Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung unterschieden. Biofilmzellen zeigten deutlich weniger Veränderungen des Proteoms, unter denen nur wenige gemeinsame Proteine zwischen Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung auftraten.

Unter den quantifizierten Proteinen waren vor allem Proteine des zellulären Stoffwechsels an der Stressreaktion der Zellen beteiligt sowie eine Vielzahl von Proteinen mit unbekannter Funktion. Vergleichende Analysen der Proteinabundanzen zwischen Metallionen-behandelten Zellen und den entsprechenden unbehandelten Kontrollen zeigten, dass in planktonischen Zellen besonders transkriptionsregulierende sowie ribosomale Proteine in erhöhten Mengen auftreten, was auf globale Veränderungen des Zellmetabolismus schließen lässt. Parallel hierzu wurde zudem eine signifikante Verringerung einer Vielzahl von ABC-Transportern ermittelt. Im Fall von Biofilmzellen wurde hingegen keine einheitliche Stressreaktion beobachtet. Hier zeigten einzelne Proteine wie eine Serinprotease sowie Proteine mit unbekannter Funktion besonders signifikante Veränderungen der Abundanz nach Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung. Diese Proteine könnten eine wichtige Rolle in der Metallionen-spezifischen Biofilmarchitektur spielen.

4.2.4 Transkriptionsanalysen von Zielgenen nach Einfluss von Metallionen

Zur Untersuchung der Auswirkung von Kupfer- und Nickelionen auf molekularer Ebene wurden neben der quantitativen Proteomanalyse auch Genexpressionsstudien durchgeführt. Dies erfolgte mittels qRT-PCR-Analysen von Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen.
Die Behandlung planktonischer Zellen erfolgte identisch zur Vorbereitung von Proteinproben für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+}. Biofilme wurden nach 14 Tagen Kultivierung für

24 h mit 1 mM Cu^{2+} bzw. 5 mM Ni^{2+} behandelt. Die Metallionenkonzentration wurde hier im Vergleich zur Proteinisolation stark verringert, da höhere Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen zu Störungen der RNA-Isolation und *c*DNA-Synthese führten. Als Kontrolle wurden jeweils unbehandelte planktonische Zellen und Biofilme mitgeführt. Die Auswahl der Zielgene zur Untersuchung der relativen Expression basierte vorwiegend auf den Daten der Proteomstudie. Hierzu gehörten ABC- und Metall-Transporter kodierende Gene sowie Gene, die für Flagellenproteine und universale Stressproteine kodieren. Des Weiteren wurde ein Ferritin-kodierendes sowie ein Serinprotease-kodierendes Gen untersucht, welche beide in der Proteomstudie signifikante Veränderungen ihrer Abundanz gezeigt haben. Eine Übersicht der untersuchten Zielgene ist in Tabelle 11 gezeigt. Zur Quantifizierung wurden die erhaltenen C_T-Werte der Zielgene auf das Haushaltsgen *rpoB1* (DNA-abhängige RNA-Polymerase Untereinheit B') normiert und die Werte der Metallionen-behandelten Zellen wurden nach der $\Delta\Delta C_T$-Methode jeweils mit denen der unbehandelten Kontrolle verglichen (Abb. 32).

Im Fall von planktonischen Zellen nach Cu^{2+}-Behandlung zeigten die Transkripte der ABC-Transporter kodierenden Gene *pstS1*, *dppB2*, *dppC2*, *znuC* und OE5245F jeweils eine verringerte Abundanz mit einer bis zu 126-fachen Veränderung von *pstS1*, während OE4576F eine 22-fache Erhöhung aufwies. Im Vergleich hierzu führte die Behandlung mit Nickelionen nur bei *pstS1* und OE5245F zu einer verringerten Expression, während die Transkriptmenge der Gene *dppB2*, *dppC2* und OE4576F leicht erhöht – und im Fall von *znuC* sogar 38-fach erhöht war. Unter den Metall-Transporter kodierenden Genen wurde im Fall der Kupfer-transportierenden ATPase *copA* eine 15-fach erhöhte relative Expression bei Cu^{2+}-behandelten planktonischen Zellen ermittelt, während die Expression der zugehörigen HMA-Domäne nur leicht erhöht war. Die Expression des ZIP Familie Metalltransporters OE3453R war hingegen stark verringert. Ni^{2+}-behandelte planktonische Zellen zeigten im Vergleich hierzu bei allen Metall-Transporter kodierenden Genen eine erhöhte Expression (Tabelle 11, Abb. 32A). Die Genexpression der Assemblierungs-/Motor ATPase archaealer Flagellen (*flaI*) war im Fall von Cu^{2+}-behandelten Zellen leicht erhöht, während das Flagellin *flgB1* verringert war. Im Fall einer Ni^{2+}-Behandlung war die Expression dieser beiden Flagellen-Protein kodierenden Genen erhöht. Die Expression der zwei universalen Stressproteine war nach Cu^{2+}-Behandlung im Fall von OE3368F leicht verringert und bei OE4544R 3,5-fach erhöht, während Ni^{2+}-behandelte planktonische Zellen eine 12- bzw. 19-fach erhöhte Expression aufwiesen. Bei den Genen *dpsA* und *hly*, welche für das archaeale Ferritin DpsA, bzw. die Serinprotease Hly kodieren, wurde im Fall von Cu^{2+}-behandelten Zellen jeweils eine starke Verringerung der Expression ermittelt, während nach Ni^{2+}-Behandlung eine leichte Erhöhung von *dpsA* und eine leichte Verringerung von *hly* nachgewiesen wurde (Tabelle 11, Abb. 32A). Zusammenfassend zeigten planktonische Zellen nach Metallionenbehandlung starke Auswirkungen auf die Genexpression. Hierbei wurde bei Cu^{2+}-behandelten Zellen größtenteils eine Verringerung der Expression von ABC-Transporter-assoziierten Proteinen ermittelt, welche auf eine Kupferaufnahme der Transporter hindeutet. Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung mit Ni^{2+} im Großteil zu einer erhöhten Expression der untersuchten Gene. Hierbei war eine Erhöhung der Transkriptmenge von Metall-Transporter-assoziierten Proteinen besonders auffällig, welche eine wichtige Rolle im Export der Metallionen spielen könnten. Zudem wurde nur bei Ni^{2+}-behandelten Zellen eine stark erhöhte Genexpression von universalen Stressproteinen beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Gegenwart von Nickelionen zu starken Stressreaktionen in planktonischen führt.

Biofilmzellen zeigten im Vergleich zu planktonischen Zellen nach Behandlung mit Metallionen im Allgemeinen weniger starke Auswirkungen auf die Genexpression (Tabelle 11, Abb. 32B).

So zeigten Cu^{2+}-behandelte Biofilmzellen vorwiegend erhöhte Transkriptmengen von ABC-Transporter kodierenden Genen (*pstS1*, *dppB2*, *dppC2*, OE4576F, OE5245F) mit einer maximal 6,5-fachen Erhöhung im Fall von *dppC2*. Nur die Expression von *znuC* war im Vergleich zur Kontrolle fünffach verringert. Bei den Ni^{2+}-behandelten Biofilmzellen wurden nur sehr leichte Unterschiede der Genexpression von ABC-Transportern mit einer Verringerung von *pstS1* und *dppB2* und einer Erhöhung von *dppC2*, OE4576F und OE5245F ermittelt. Transkripte von Metall-Transporter kodierenden Genen waren im Fall von *copA* und OE2044F bei den Cu^{2+}- sowie Ni^{2+}-behandelten Zellen erhöht, während OE3453R eine leichte Verringerung zeigte (Tabelle 11, Abb. 32B). Bei den Flagellen-Protein kodierenden Genen zeigte *flaI* eine erhöhte - und *flgB1* jeweils eine verringerte Expression in Cu^{2+}- sowie in Ni^{2+}-behandelten Zellen. Die Expression der universalen Stressproteine war im Fall von OE3668R in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Zellen leicht verringert, während bei OE4544R keine Veränderung in den Cu^{2+}-behandelten - und eine dreifache Erhöhung in den Ni^{2+}-behandelten Biofilmzellen ermittelt wurde. Analysen der Expression von *dpsA* und *hly* zeigten sowohl in Cu^{2+}- als auch in Ni^{2+}-behandelten Biofilmzellen eine Verringerung mit einer bis zu 21-fachen Veränderung von *dpsA* im Fall von Cu^{2+}-behandelten Zellen (Tabelle 11, Abb. 32B).

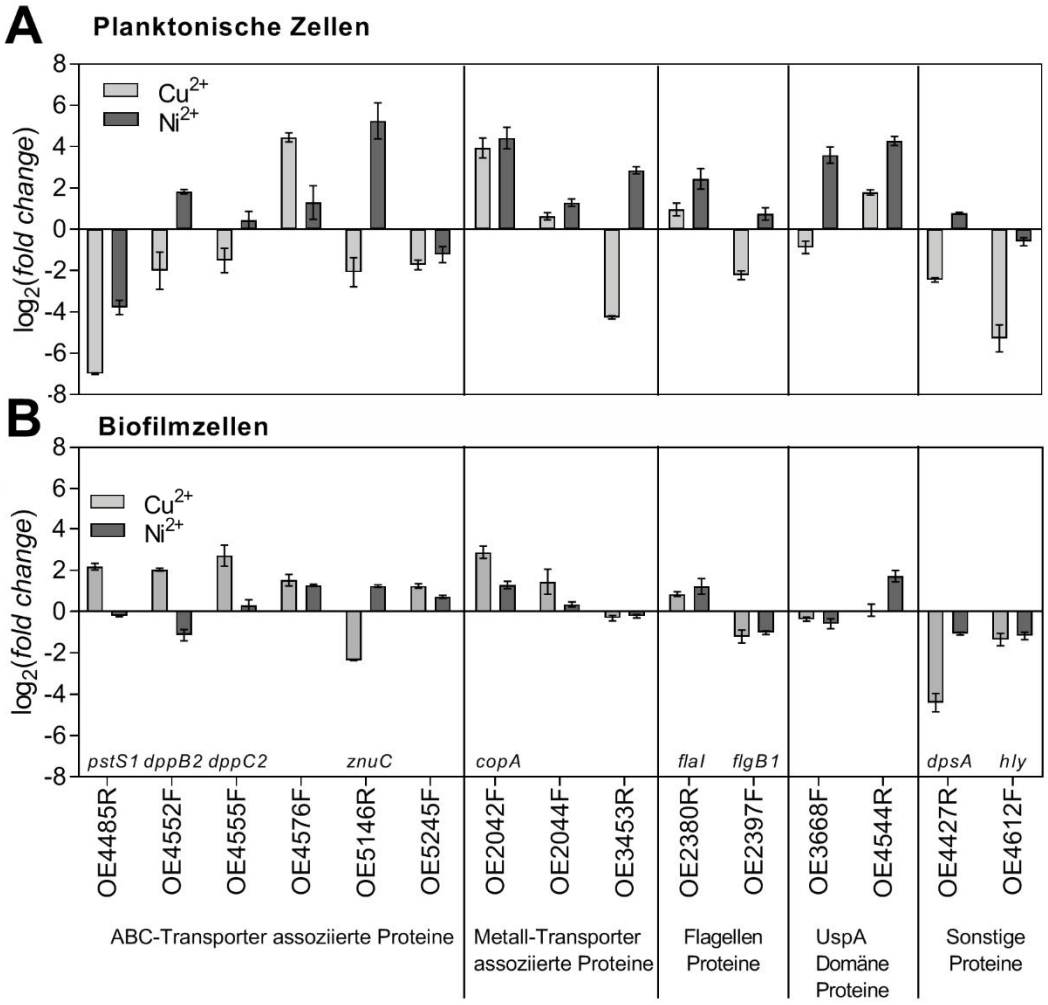


Abbildung 32. Vergleichende qRT-PCR Analysen von Metallionen-behandelten und unbehandelten *H. salinarum* R1 Zellen. Relative Quantifizierung der Genexpression von verschiedenen ABC-Transporter und Metall-Transporter kodierenden Genen sowie von Genen, welche für Flagellenproteine, universale Stressproteine sowie für ein Ferritin und eine Serinprotease kodieren. Die relative Quantifizierung erfolgte in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten **(A)** planktonischen Zellen und **(B)** Biofilmzellen im Vergleich zu jeweils unbehandelten Zellen. Die C_T-Werte der Zielgene wurden auf das Haushaltsgen *rpoB1* normalisiert.

Tabelle 11. Zielgene für Genexpressionsstudien in *H. salinarum* R1 nach Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Behandlung.

			FC der Genexpression[3]			
			Planktonisch		Biofilm	
Genname	**Genbeschreibung[1]**	**Proteinname[2]**	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Ni^{2+}
ABC-Transporter assoziierte Proteine						
OE4485R *pstS1*	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (Probable substrate phosphate)	-126,6	-13,7	4,5	-1,2
OE4552F *dppB2*	ABC transporter permease	ABC-type transport system permease protein (Probable substrate dipeptide/oligopeptide)	-4,1	3,5	4,1	-2,2
OE4555F *dppC2*	ABC transporter permease	ABC-type transport system permease protein (Probable substrate dipeptide/oligopeptide)	-2,8	1,4	6,5	1,2
OE4576F	ABC transporter substrate-binding protein	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	21,8	2,5	2,9	2,4
OE5146R *znuC*	Metal ABC transporter ATP-binding protein	ABC-type transport system ATP-binding protein (Probable substrate zinc)	-4,2	38	-5,1	2,4
OE5245F	ABC transporter ATP-binding protein	ABC-type transport system ATP-binding protein	-3,3	-2,3	2,4	1,6
Metall-Transporter assoziierte Proteine						
OE2042F *copA*	Copper-translocating P-type ATPase	P-type transport ATPase (Probable substrate copper/metal cation)	15,3	21,4	7,4	2,4
OE2044F	Heavy-metal-associated domain-containing protein	HMA domain protein	1,5	2,4	2,7	1,3
OE3453R	ZIP family metal transporter	Uncharacterized protein	-19,2	7,3	-1,2	-1,2
Flagellen Proteine						
OE2380R *flaI*	Type II/IV secretion system ATPase subunit	Flagellar motor/biogenesis protein FlaI	2,0	5,5	1,8	2,3
OE2397F *flgB1*	Flagellin	Flagellin	-4,7	1,7	-2,3	-2,0
UspA Domäne Proteine						
OE3668F	Universal stress protein	UspA domain protein	-1,8	12,1	-1,3	-1,5
OE4544R	Universal stress protein	UspA domain protein	3,4	19,5	1,0	3,3
Sonstige Proteine						
OE4427R *dpsA*	DNA starvation/ stationary phase protection protein	Ferritin DpsA	-5,5	1,7	-21,1	-2,1
OE4612F *hly*	S8 family serine peptidase	Serine protease halolysin	-38,6	-1,5	-2,5	-2,3

[1]nach Angaben der NCBI Datenbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).
[2]nach Angaben der UniProtKB Datenbank (https://www.uniprot.org/).
[3]*Fold change* (FC) im Vergleich zu jeweils unbehandelten planktonischen Zellen und Biofilmen.

Zusammengefasst zeigte die Analyse der Genexpression von Metallionen-behandelten Zellen allgemein starke Auswirkungen auf planktonische Zellen mit bis zu 126-fachen Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Biofilmzellen hingegen zeigten größtenteils nur leichte Unterschiede der Genexpression, was mit den Beobachtungen der Proteomstudie übereinstimmt und darauf schließen lässt, dass Metallionen einen geringeren Einfluss auf die Zellen im Biofilm haben.

Ein Vergleich der hier ermittelten relativen Genexpression mit der entsprechenden Proteinabundanz aus der quantitativen Proteomstudie zeigte einige Korrelationen. So wurde zum Beispiel bei den ABC-Transportern im Fall von PstS1 sowohl bei der Expression, als auch bei der Proteinabundanz eine starke Verringerung in den Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen ermittelt. Zudem zeigte OE5245F (Protein B0R9Z2) sowohl in den Cu^{2+}- als auch in den Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen eine starke Verringerung der Genexpression und Proteinabundanz, während Biofilme jeweils eine Erhöhung aufwiesen. Auch der Kupfer-Transporter CopA zeigte in Cu^{2+}-behandelten planktonischen Zellen jeweils eine signifikante Erhöhung der Genexpression sowie der Proteinabundanz. Die beobachtete Korrelation zwischen Transkript- und Proteinabundanz unter den Zielgenen bei Metallionenstress deutet auf eine vergleichsweise hohe Stabilität der Transkripte oder auf eine konstant hohe bzw. geringe Expression der entsprechenden Gene hin, sodass die relative Häufigkeit der entsprechenden Proteine sehr ähnlich ist.

Allgemein ist eine Korrelation der zwei Datensätze jedoch nicht zwangsläufig zu erwarten, da die Stabilität von RNA und Protein bei einem Vergleich der relativen Häufigkeiten nicht berücksichtigt wird (Vogel & Marcotte, 2012). So könnte zum gleichen Zeitpunkt beispielweise eine hohe Proteinmenge vorhanden sein, während die RNA zu diesem Zeitpunkt wieder abgebaut wurde. Im anderen Fall könnte eine erhöhte Transkriptmenge auftreten, während die relative Häufigkeit des Proteins zu diesem Zeitpunkt noch gering ist und erst zu einem späteren Zeitpunkt ansteigt. Daher können starke Unterschiede zwischen Transkript- und Proteinlevel von Zellen des gleichen Zustands auftreten.

4.3 Diskussion

4.3.1 Planktonische Zellen zeigen in Gegenwart von Metallionen stärkere molekulare Veränderungen im Vergleich zu Biofilmzellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Kupfer- und Nickelionen auf molekularer Ebene erfolgte eine globale Proteomstudie von unbehandelten sowie von Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen *H. salinarum* R1 Zellen und Biofilmen mittels SWATH-LC/MS/MS. Von den insgesamt 2.570 annotierten Proteinen des *H. salinarum* R1 Proteoms wurden in dieser Studie 1.180 Proteine in allen Proben quantifiziert, was einer Proteomabdeckung von 46% entspricht. Diese ist im Vergleich zu einer vorangegangenen Proteomstudie, welche auf der Untersuchung der Biofilmbildung in *H. salinarum* R1 basiert und eine Proteomabdeckung von 59% aufweist, leicht verringert (Losensky *et al.*, 2017). Ein Vergleich der quantifizierten Proteine in den beiden Studien zeigt eine Schnittmenge von insgesamt 1.082 Proteinen, während 98 Proteine ausschließlich in der vorliegenden Studie und 381 Proteine ausschließlich in der vorangegangenen Proteomstudie quantifiziert wurden. Dennoch ist die Verteilung von cytoplasmatischen, pseudoperiplasmatischen und Membran-assoziierten Proteinen in beiden Studien vergleichbar (Tabelle 12). Dies lässt darauf schließen, dass die geringere Quantifizierungsrate nicht auf methodische Abweichungen der Proteinisolation- und Reinigung

basiert, sondern vielmehr ein Resultat der höheren Anzahl der Proben und der daraus entstehenden geringeren Schnittmenge von Proteinen ist.

Tabelle 12. Vergleich der Proteinverteilung in *H. salinarum* R1 Proteomstudien.

	Diese Studie	**Losensky *et al.* (2017)**
Quantifizierte Proteine	1.180	1.463
Cytoplasmatische Proteine	970 (82,2%)	1.209 (82,6%)
Membran-assoziierte Proteine	140 (11,9%)	177 (12,1%)
Pseudoperiplasmatische Proteine	70 (5,9%)	77 (5,3%)

Ein Vergleich der Proteomdaten unbehandelter Proben mit den entsprechenden Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-behandelten Proben zeigte umfassende Änderungen der Proteinexpression als Reaktion auf Metallionenstress. Hierbei wiesen 23% der quantifizierten Proteine eine signifikante Veränderung der Proteinexpression als Reaktion auf Metallionen auf, was auf einen starken Einfluss von Cu^{2+} bzw. Ni^{2+} auf den Zellmetabolismus in *H. salinarum* R1 hindeutet. Untersuchungen der Auswirkung von Kupfer- und Nickelionen zeigten sowohl auf Protein-, als auch auf Transkriptebene deutlich stärkere Effekte auf planktonische Zellen im Vergleich zu Biofilmen. So wurden allein bei den planktonischen Zellen 234 Proteine mit einer signifikant veränderten Abundanz nach Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Exposition nachgewiesen, was einen Anteil von 87% unter allen in dieser Studie signifikanten Proteinen ausmacht. Interessanterweise traten signifikante Änderungen bei 47% dieser Proteine gemeinsam in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Proben auf, während 21 bzw. 32% der Proteine ausschließlich in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Proben gefunden wurden. Dementsprechend scheinen planktonische Zellen auf Metallionen vorranging mit einer universellen Stressantwort zu reagieren, während Metallionen-spezifische Änderungen nur einen geringen Teil des veränderten Proteoms ausmachen. Im Gegensatz hierzu zeigten Biofilme in Gegenwart von Cu^{2+} und Ni^{2+} eine weniger starke, jedoch Metallionen-spezifischere Reaktion. Eine vergleichende Metabolomstudie zwischen planktonischen Zellen und Biofilmen des Bakteriums *Pseudomonas fluorescencs* zeigte in Gegenwart von Kupferionen ebenfalls signifikante Unterschiede in der metabolischen Reaktion unter den zwei Lebensformen (Booth *et al.*, 2011). Hierbei besaßen Biofilme im Vergleich zu planktonischen Zellen jedoch deutlich stärkere Reaktionen auf Kupferionenstress. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtungen könnte die unterschiedliche Expositionsdauer sein. So wurden Biofilme im Vergleich zu planktonischen Kulturen einer sechsmal längeren Inkubationszeit mit Kupferionen ausgesetzt, während planktonische Zellen und Biofilme in der vorliegenden Proteomstudie jeweils 24 h mit Metallionen behandelt wurden. Untersuchungen des Metaboloms Cu^{2+}-gestresster *P. fluorescens* Zellen zeigten vorwiegend Veränderungen des Exopolysaccharid-Stoffwechsels in Biofilmzellen, während bei planktonischen Zellen größtenteils eine oxidative Stressreaktion beobachtet wurde (Booth *et al.*, 2011).

4.3.2 Kupfer- und Nickelionen führen in planktonischen Zellen zu oxidativem Stress

Die Exposition von planktonischen *H. salinarum* R1 Zellen mit Kupfer- bzw. Nickelionen führte zu starken Auswirkungen auf das Proteom sowie die Genexpression von Zielgenen. Hierbei traten vor allem Proteine der Translation und Transkription wie ribosomale Proteine oder

Transkriptionsfaktoren- und Regulatoren in einer signifikant erhöhten Menge auf. Diese spielen eine wichtige Rolle in der globalen Informationsverarbeitung und der Regulation von Stoffwechselprozessen bei exogenen Einflüssen. Eine erhöhte relative Häufigkeit dieser Proteine ist ein Indiz für den zellulären Umgang mit oxidativem Stress und hat einerseits den Austausch von beschädigten Transkripten und Proteinen sowie die Synthese neuer Proteine zur Folge. Bisher durchgeführte Transkriptomstudien mit dem eng verwandten *H. salinarum* NRC-1 zeigten in Gegenwart von verschiedenen Metallionen ebenfalls umfassende Änderungen der Transkription, welche 20% der Gene betreffen und allgemeine sowie Metallionen-spezifische Reaktionen der planktonischen Zellen hervorrufen (Kaur *et al.*, 2006). In dieser Studie führte die Metallionen-Exposition bei 2,9 bzw. 3,0% der Gesamtgene nach Behandlung mit Nickel- bzw. Kupferionen zu transkriptionellen Veränderungen, zu denen vor allem Gene gehörten, welche ebenfalls an Translations- und Regulationsprozessen beteiligt sind und auf oxidativen Stress schließen lassen (Kaur *et al.*, 2006). Metallionen können über verschiedene Wege reaktive Sauerstoffspezies in den Zellen generieren. So sind redoxaktive Metalle wie Kupfer, Eisen oder Chrom in der Lage reaktive Sauerstoffspezies wie Hydroxyl- ($OH^{\bullet}$) oder Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$) über die Haber-Weiss- oder-Fenton-Reaktion zu bilden (Halliwell & Gutteridge, 1984). Auch nicht-redoxaktive Metalle wie Nickel, Cadmium oder Blei können indirekt reaktive Sauerstoffspezies generieren, indem sie redoxaktive Metalle aus ihren Bindungszentren verdrängen oder den Gehalt von reduziertem Glutathion (GSH), einem wichtigen Antioxidans für die Zelle, durch Bindung an dessen Thiol-Gruppe verringern (Maryon *et al.*, 2013, Valko *et al.*, 2016). Erhöhte Mengen reaktiver Sauerstoffspezies können mit der DNA interagieren, was zu Modifikationen der Basen und einer Beeinträchtigung des DNA-Reparaturmechanismus führen kann (Eteshola *et al.*, 2020). Darüber hinaus können sie Lipide und Proteine oxidieren, was eine Schädigung der Membran bzw. eine Störung der Proteinfunktion zur Folge hat (Avery, 2001, Ercal *et al.*, 2001). Um der toxischen Wirkung reaktiver Sauerstoffradikale entgegenzuwirken, werden in den Zellen verschiedene Verteidigungsmechanismen aktiviert, welche über ein komplexes Netzwerk regulatorischer Proteine gesteuert werden (Pedone *et al.*, 2004). So zeigten DNA-Bindeanalysen in *H. salinarum* NRC-1, dass der Transkriptionsfaktor RosR eine wichtige Rolle in der Reaktion auf reaktive Sauerstoffspezies spielt und in komplexen Netzwerken in Kombination mit fünf TFIIB Proteinen die Expression von über 100 Zielgenen, darunter unter anderem auch Transkriptionsregulatoren der Familien Lrp oder ArsR, reguliert (Tonner *et al.*, 2015). Untersuchungen des Proteoms von *H. salinarum* R1 in der hier vorliegenden Arbeit zeigten in Metallionen-behandelten planktonischen Zellen eine bis zu 2,8-fach erhöhte Abundanz des Transkriptionsfaktors RosR (BOR2Z7) sowie eine bis zu 14,7-fache Erhöhung des TFIIB Proteins TfbF (B0R339). Zudem wurden signifikante Unterschiede der relativen Häufigkeiten bei Transkriptionsregulatoren der Familien Lrp/AsnC sowie ArsR beobachtet, was auf einen Metallionen-induzierten oxidativen Stress der Zellen hindeutet. Zur Aufrechterhaltung eines intrazellulären, reduzierenden Milieus und zur Abwehr bei oxidativem Stress enthalten viele Organismen im Cytoplasma millimolare Konzentrationen von niedermolekularen Thiolverbindungen (Fahey, 2001). Die darunter am häufigsten untersuchte Verbindung ist GSH, welche hauptsächlich in gramnegativen Bakterien und Eukaryoten, jedoch nicht in Archaea vorkommt (Newton *et al.*, 1996). Halophile Archaea verfügen anstelle von GSH im Cytoplasma über millimolare Konzentrationen von γ-Glutamylcystein (γ-GC), welches als Antioxidans dient (Sundquist & Fahey, 1989). Vorangegangene Studien mit *Haloferax volcanii* zeigten, dass das Glutamat-Cystein-Ligase-kodierende Gen *gshA* eine wichtige Rolle bei der

Synthese und der Akkumulation von γ-GC in den Zellen spielt (Malki *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde im Fall von Cu^{2+}-behandelten planktonischen Zellen eine leicht erhöhte Abundanz von GshA beobachtet, was auf eine vermehrte Synthese von γ-GC als Folge von oxidativem Stress hindeutet. Darüber hinaus zeigten die Untersuchungen des Proteoms sowie der Genexpression eine erhöhte Abundanz von universalen Stressproteinen (UspA) bzw. eine erhöhte Genexpression der kodierenden Gene. Die Superfamilie der universalen Stressproteine umfasst eine konservierte Gruppe von Proteinen, welche in Bakterien, Archaea und Eukaryoten vorkommen und deren Expression durch eine Vielzahl von Umwelteinflüssen induziert wird (Nyström & Neidhardt, 1992, Nachin *et al.*, 2005). Untersuchungen von *Escherichia coli* Zellen zeigten die Relevanz von UspA im Umgang mit oxidativem Stress zum Schutz der Zellen vor DNA-Schädigungen (Siegele, 2005). Da reaktive Sauerstoffradikale zu Zellschädigungen führen, werden Prozesse aktiviert, bei denen beschädigte Transkripte und Proteine ausgetauscht sowie neue Proteine synthetisiert werden. Ein Indiz hierfür ist eine Erhöhung der relativen Häufigkeit von Proteinen, welche in der Replikation sowie bei Transkriptions- und Translationsprozessen beteiligt sind. Im Rahmen der hier vorgestellten Proteomstudie wurden bei Cu^{2+}- und Ni^{2+}-gestressten Zellen stark erhöhte Abundanzen von sieben der zehn annotierten Proteine der RNA-Polymerase sowie von neun der 15 annotierten Proteine in Verbindung mit der DNA-Replikation nachgewiesen (s. Anhang 2, KEGG-Pathway ID: hsl03020, hsl03030). Zudem zeigten insgesamt 25 von 27 quantifizierten Proteinen der ribosomalen 50S-Untereinheit sowie 20 von 21 quantifizierten Proteinen der 30S-Untereinheit eine im Vergleich zu Kontrolle bis zu zehnfach erhöhte Abundanz in den Metallionen-behandelten Zellen. Diese Beobachtungen deuten auf einen Austausch bzw. eine Neusynthese von Proteinen hin und lassen auf Metallionen-induzierte Zellschädigungen in Folge von oxidativem Stress von planktonischen *H. salinarum* Zellen schließen.

4.3.3 Signifikante Verringerung von ABC-Transportsystemen planktonischer Zellen nach Kupfer- und Nickelionenbehandlung

Während Proteine in Informationsspeicherungs- und Verarbeitungsprozessen in planktonischen Zellen nach Metallionenstress in einer erhöhten relativen Häufigkeit auftraten, zeigten Proteine des Zellmetabolismus, insbesondere des Transports und Metabolismus von anorganischen Ionen, signifikant verringerte Abundanzen. So wurden unter den zehn Proteinen mit der stärksten Verringerung der Abundanz insgesamt sieben Untereinheiten von ABC-Transportern gemeinsam in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen identifiziert. ABC-Transporter bilden eine große Familie von Membrantransportern und sind in allen drei Domänen des Lebens ubiquitär vorhanden (van Veen & Konings, 1997). Sie transportieren eine Vielzahl von Molekülen über die Membran, wobei der Transport über die Hydrolyse von ATP angetrieben wird. Unter den ABC-Transportern unterscheidet man zwischen zwei Typen; Transporter für den Import von essentiellen Substraten, welche nur in Prokaryoten auftreten und Transporter für den Export von Molekülen außerhalb der Zellen, welche sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vorkommen (Beis, 2015). ABC-Transporter bestehen aus vier Domänen; zwei cytoplasmatische Nukleotid-bindende Domänen (ATP-bindende Kassette) und zwei Transmembrandomänen, deren Sequenz und Architektur substratspezifisch sind und welche während des Transports von Substraten eine Konformationsänderung aufweisen (Zolnerciks *et al.*, 2011). Proteomanalysen sowie Untersuchungen der Genexpression in dieser Arbeit zeigten stark verringerte Abundanzen von Proteinen bzw. Transkripten von Phosphat-spezifischen (Pst) und Glycerin-3-phosphat (Ugp) ABC-Transportsystemen. Hierbei zeigten zwei Ugp-Proteine

sowie alle fünf quantifizierten Pst-Proteine und zwei Phosphat-aufnahmeregulatoren eine bis zu 79-fache Verringerung der Abundanzen in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen. Im Fall von PstS1 wurde zusätzlich eine bis zu 127-fache Verringerung der Genexpression in Metallionen-behandelten planktonischen Zellen ermittelt. Vorangegangene Expressionsstudien von Phosphat- und Glycerin-3-phosphat-ABC-Trans-portern in *H. salinarum* R1 zeigten, dass vor allem das Pst1-Transportsystem eine wichtige Rolle in der Phosphat-Taxis spielt und die Expression dieses Transporters unter Phosphat-limitierenden Bedingungen stark induziert wird, um die Zellen mit dem essentiellen Makronährstoff Phosphor zu versorgen (Furtwängler, 2009). Bei einigen Mikroorganismen ist die Phosphataufnahme von der Anwesenheit bivalenter Kationen wie Mg^{2+}, Co^{2+} oder Mn^{2+} abhängig, wobei nahezu gleiche Mengen von Kationen und Phosphaten aufgenommen werden (Van Veen *et al.*, 1993, Bauer & Roske, 2001). Eine Mg^{2+}-abhängige Aufnahme und Akkumulation von Phosphaten wurde ebenfalls in *H. salinarum* nachgewiesen (Smirnov *et al.*, 2002a, Smirnov *et al.*, 2002b). Da Kupfer- und Nickelionen ebenfalls bivalente Kationen darstellen, könnten diese im Überschuss möglicherweise die Bindung von Magnesiumionen an Phosphate ersetzen und somit importiert werden. Aus diesem Grund könnte die beobachtete starke Verringerung von Phosphataufnahmesystemen einen Verteidigungsmechanismus der Zellen darstellen, um die Metallionenaufnahme über den Phosphatimport mittels ABC-Transportern zu reduzieren. Die verringerte Phosphataufnahme Metallionen-behandelter planktonischer Zellen und der damit einhergehende Mangel von Phosphat könnte zudem die stark verringerten Abundanzen von Proteinen des Zellmetabolismus in *H. salinarum* erklären.

Neben den Phosphataufnahmesystemen zeigten in der vorliegenden Proteomstudie außerdem acht von zwölf Proteinen des Dipeptid (Dpp) ABC-Transportsystems signifikant verringerte Abundanzen in Metallionen-behandelten planktonischen Zellen. Sequenzvergleiche dieser Proteine mit Proteinsequenzen der UniProtKB/SwissProt Datenbank zeigten Sequenz-identitäten von 32% mit Proteinen des Nickel-Import Systems NikABCDE in *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* Stämmen. NikABCDE in *E. coli* ist der am meisten untersuchte Nickel-Transporter, welcher aus einem periplasmatischen Ni^{2+}-bindenden Protein (NikA), zwei Transmembranproteinen (NikB und NikC) sowie aus zwei cytoplasmatischen ATPase-Untereinheiten (Nik D und NikE) aufgebaut ist und den Import von Nickelionen ermöglicht (Ma *et al.*, 2009). Da ABC-Transporter nachweislich mehrere Substratspezifitäten besitzen (Srivastava & Kowshik, 2013), wäre es denkbar, dass das Dpp-Transportsystem in *H. salinarum* R1 neben Ni^{2+} auch Cu^{2+} importiert. Demzufolge scheint die stark verringerte Abundanz dieses Transporters ein Resistenzmechanismus zur verringerten Metallionen-Aufnahme bei Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Stress darzustellen.

Obwohl der größte Anteil der in dieser Studie quantifizierten ABC-Transportsysteme eine starke Verringerung in Metallionen-behandelten planktonischen Zellen zeigte, wurde im Fall von B0R842, einem periplasmatischen Substrat-bindenden Protein eines ABC-Transportsystems, in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Zellen eine bis zu dreifach erhöhte relative Häufigkeit des Proteins beobachtet. Darüber hinaus zeigte die Untersuchung der Genexpression nach Cu^{2+}-Behandlung eine bis zu 22-fache Erhöhung des entsprechenden Transkripts. Die strukturelle Modellierung dieses Proteins mit dem Swiss-Modell-Server (Waterhouse *et al.*, 2018) ergab hauptsächlich bakterielle Eisenkomplextransportsysteme als *template.* Eines der Toptreffer entsprach einem Siderophorrezeptor (HtsA) aus *Staphylococcus aureus* mit einer Identität von 16,9% (Grigg *et al.*, 2010). Siderophore sind niedermolekulare Verbindungen, welche Eisen als essentielles Element für den Zellstoffwechsel binden und in Form von Eisen-Siderophor-Komplexen über

ABC-Transporter ins Cytoplasma transportieren (Schalk *et al.*, 2011, Ahmed & Holmström, 2014). Um die Homöostase zwischen Eisen und Kupfer bzw. Nickel in der Zelle aufrecht zu erhalten, wäre eine erhöhte Eisenaufnahme in Form von Siderophoren unter Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Stress denkbar. Insbesondere Kupfer besitzt eine hohe intrazelluläre Toxizität, indem es die Eigenschaft besitzt an aktive Zentren von Metalloenzymen, vor allem an solche mit Eisen-Schwefel-Clustern, zu binden und diese zu zerstören (Macomber & Imlay, 2009). Interessanterweise wurde jedoch auch gezeigt, dass Siderophore nicht ausschließlich auf die Bindung und den Transport von Eisen beschränkt sind, sondern mit anderen bivalenten Metallen interagieren können (Schalk *et al.*, 2011). So wurde beispielsweise für das Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 gezeigt, dass es seine Siderophore sowohl für die Eisen- als auch für die Kupferaufnahme nutzt (Nicolaisen *et al.*, 2010). Da in der vorliegenden Arbeit signifikant verringerte Abundanzen des Ferritin-ähnlichen Eisenspeicherproteins DpsA unter Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Stress ermittelt wurden, sind erhöhte cytoplasmatische Eisenkonzentrationen unwahrscheinlich. Expressionsstudien mit *H. salinarum* verdeutlichen, dass die Genexpression von *dpsA* stark von der intrazellulären Eisenkonzentration abhängig und unter Eisenmangel stark verringert bzw. bei einem Überschuss von Eisen erhöht ist (Reindel *et al.*, 2005). Somit wäre für *H. salinarum* denkbar, dass dessen Siderophore nicht Eisen-spezifisch sind, sondern bei hohen Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Konzentrationen ebenfalls solche bivalenten Kationen binden und über die Cytoplasmamembran transportieren. Die Toxizität der cytoplasmatischen Metalle ist durch die Komplexierung der Siderophore nicht zwangsläufig gegeben, dennoch deuten die hohe relative Häufigkeit der Cu^{2+}-exportierenden ATPase CopA in Cu^{2+}-behandelten planktonischen Zellen auf eine erhöhte Cu^{2+}-Freisetzung ins Cytoplasma hin.

4.3.4 Biofilme zeigen Metallionen-spezifische Stressreaktionen in Gegenwart von Kupfer- und Nickelionen

Vergleichende Untersuchungen des Umgangs von planktonischen Zellen und Biofilmen mit Cu^{2+} und Ni^{2+} zeigten sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptebene weniger starke Reaktionen in Biofilmen. Dies könnte auf einen größeren Schutz der Biofilmzellen vor Metallionen zurückzuführen sein. So wurde bereits in Untersuchungen dieser Arbeit eine höhere Überlebensrate von Biofilmzellen in Gegenwart von Metallionen beobachtet (s. Kapitel III). Zudem zeigten quantitative Untersuchungen der Metallkonzentrationen im Biofilm, dass sich bis zu 83% der Metalle im Biofilm in den EPS befinden. Dementsprechend sind Biofilmzellen zum einen wesentlich geringeren Metallionenkonzentrationen ausgesetzt, sodass eine weniger starke Reaktion der Zellen notwendig ist. Zum anderen haben Biofilmzellen durch die Absorption von Metallionen in den EPS mehr Zeit, um dem Stress mit einer Metallionen-spezifischen Reaktion entgegenzuwirken, da die entsprechenden bivalenten Kationen nur langsam die EPS-Matrix passieren und nur sukzessive die Biofilmzellen erreichen. Aufgrund der umfangreichen Änderungen der Biofilmarchitektur nach Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Stress, welche mittels SEM- und CLSM-Analysen beobachtet worden waren, ist die relativ geringe Anzahl von insgesamt 52 Proteinen mit einer signifikant veränderten Abundanz eher unerwartet. Unter ihnen zeigten nur drei Proteine eine gemeinsame Änderung in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten Zellen, während der Großteil der Proteine eine Metallionen-spezifische signifikante Änderung der relativen Häufigkeit aufwies.

Ein Vergleich der Verteilung der funktionalen Kategorien in Cu^{2+}-behandelten Biofilmzellen mit planktonischen Zellen zeigt, dass der Anteil von Proteinen mit erhöhten Abundanzen in der

Kategorie Informationsspeicherung- und Verarbeitung deutlich erhöht ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Anwesenheit von Cu^{2+} bei Biofilmzellen zu umfangreichen Änderungen der Transkriptions- und Translationsmaschinerie führt, was sich in einem Ablösen der Biofilmzellen und somit in einer Änderung der Lebensform von einem sessilen in einen planktonischen Zustand widerspiegelt. Da Kupferionen aufgrund ihrer redoxaktiven Eigenschaften in erhöhten Mengen stark toxisch wirken (Dupont *et al.*, 2011, Dennison *et al.*, 2018), ist ein vermehrtes Ablösen der Biofilmzellen unter Kupferionenstress denkbar, um den Biofilm aufzulösen und neue Habitate zu besiedeln. Erhöhte Abundanzen der archaealen Flagellenproteine in Cu^{2+}-behandelten Biofilmzellen bestätigten diese Hypothese, da die archaeale Flagelle eine schwimmende Fortbewegung im Habitat ermöglicht (Alam & Oesterhelt, 1984).

Während Kupferionen hauptsächlich zu einem Ablösen von Biofilmzellen führten, hatten Biofilme in Gegenwart von Nickelionen eine starke Zunahme von adhärenten Zellen zur Folge, welche sich in dichten Zellschichten anordneten. Dies lässt darauf schließen, dass Ni^{2+} im Vergleich zu Cu^{2+} weniger toxisch wirkt, sodass eine Änderung der Lebensweise nicht notwendig ist. Auch in der Verteilung der funktionalen Kategorien spiegelt sich dies wider, wobei der Anteil von Proteinen in Informationsspeicherungs- und Verarbeitungsprozessen in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen im Vergleich zur Cu^{2+}-Behandlung deutlich geringer ist. Entsprechend scheint die Überlebensstrategie in Gegenwart von Nickelionen ein verstärktes Aggregationsverhalten sowie eine vermehrte EPS-Produktion zum Schutz der Zellen darzustellen. Dies wurde ebenfalls in einer Studie mit *Escherichia coli* K-12 Stämmen beobachtet, wobei die Gegenwart von Nickelionen die Biofilmbildung induzierte (Pereira *et al.*, 2013). Untersuchungen der EPS im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten zudem einen 1,6-fach erhöhten EPS-Anteil sowie eine 2,7-fache Erhöhung des Proteingehalts in den EPS von Biofilmen nach Ni^{2+}-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Biofilmen. Ähnliche Ergebnisse waren bereits bei Untersuchungen von *Pseudomonas fluorescens* Biofilmen beobachtet worden, welche bei Metallionenstress Änderungen des Exopolysaccharid-Stoffwechsels aufwiesen (Booth *et al.*, 2011). Interessanterweise waren 43% der Proteine mit einer signifikant veränderten Abundanz in Biofilmen nach Ni^{2+}-Behandlung nicht charakterisiert. Aufgrund der starken morphologischen Änderungen Ni^{2+}-behandelter Biofilme könnten einige dieser bisher uncharakterisierten Proteine eine essentielle Rolle für die Ausbildung der Ni^{2+}-spezifischen Biofilmarchitektur einnehmen. So zeigte das bislang uncharakterisierte Protein B0R587 in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen eine 34-fach erhöhte Abundanz, was auf eine Schlüsselfunktion dieses Proteins im zellulären Umgang mit Nickelionen zurückzuführen sein könnte. Um die Funktion von diesem und weiteren besonders signifikanten Proteinen der vorliegenden Proteomstudie im Hinblick auf Metallionenstress zu untersuchen, sollten im Folgenden Gendeletionsstudien mit *H. salinarum* R1 erfolgen.

Kapitel V

Gendeletionen in *H. salinarum* R1

Generierung von Deletionsmutanten und Untersuchung des Einflusses von Kupfer- oder Nickelionen

Basierend auf den Daten der Proteomanalyse mit Metallionen-gestressten Zellen sowie den qRT-PCR-Analysen erfolgten Gendeletionen und Studien zu ihrer Funktion in *H. salinarum* R1. Insgesamt 13 Gene wurden deletiert, deren Genprodukte eine auffällig hohe oder geringe Abundanz nach Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Stress aufwiesen. Die Verifizierung der erfolgreichen Gendeletionen erfolgte mittels Sequenzierung und Southern-analysen. Zur Charakterisierung der insgesamt 13 Deletions-mutanten wurden Wachstum und Adhäsion der un-behandelten Zellen sowie ihre Sensitivität gegenüber Cu^{2+} bzw. Ni^{2+} analysiert. Des Weiteren wurden Änderungen der Adhäsion und Biofilmbildung in Gegenwart von Cu^{2+} und Ni^{2+} untersucht und die Aktivität von Proteasen als Abwehr-mechanismus der Zellen überprüft. Jeder der 13 Deletions-stämme zeigte verglichen mit dem Wildtyp mindestens eine signifikante Abweichung unter den untersuchten Eigen-schaften. So zeigte die Deletion einer Cu^{2+}-Transport ATPase starke Reaktionen auf Cu^{2+}, was sich in einer sechsfach vergrößerten Hemmzone sowie einem Abrunden der Zellen und einer 60% verringerten Adhäsion in Gegenwart von Cu^{2+} zeigte. Die Gendeletion eines ABC-Transporter Proteins und eines uncharakterisierten Proteins führte in Gegenwart von Ni^{2+} zu starken Auswirkungen auf die Biofilmarchitektur, was auf eine wichtige Rolle der beiden Proteine in der Ni^{2+}-spezifischen Stressreaktion hindeutet. Zudem wurde eine vollständige Inhibition der Proteaseaktivität bei Deletion einer Serinprotease nachgewiesen, was auf eine wichtige Funktion der Protease im Abwehrmechanismus von *H. salinarum* schließen lässt.

5.1 Einleitung

Untersuchungen der Auswirkung der bivalenten Metallionen Kupfer und Nickel auf *H. salinarum* R1 im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene umfassende Reaktionen in planktonischen Zellen und Biofilmen. In Proteomanalysen wurden starke Unterschiede der zwei Lebensformen im Umgang mit Metallionen ermittelt, wobei unter planktonischen Zellen 19,8% der quantifizierten Proteine eine signifikant veränderte Abundanz aufwiesen, während lediglich 4,4% der Proteine aus Biofilmzellen eine signifikante Änderung zeigten. So führte die Gegenwart von Cu^{2+} und Ni^{2+} bei planktonischen Zellen vorwiegend zu einer erhöhten relativen Häufigkeit von Proteinen in der Transkriptions- und Translationsmaschinerie, wohingegen eine starke Verringerung der Abundanz von Proteinen im Zellmetabolismus, insbesondere von ABC-Transporter Proteinen beobachtet wurde. Biofilmzellen zeigten hingegen eine Metallionen-spezifische Reaktion auf die Exposition mit Cu^{2+} und Ni^{2+}. So besaßen Cu^{2+}-behandelte Biofilme hauptsächlich erhöhte relative Häufigkeiten von Transkriptionsfaktoren- und Regulatoren, während bei Ni^{2+}-behandelten Biofilmen nur wenige Änderungen bei Proteinen in Informationsspeicherungs- und Verarbeitungsprozessen ermittelt wurden. Interessanterweise gehörte der größte Teil der Proteine mit einer signifikant veränderten Abundanz nach Ni^{2+}-Behandlung zu uncharakterisierten Proteinen, deren Funktion bislang unbekannt ist.
Um die Funktion von Proteinen mit besonders signifikanten Abundanzen im Hinblick auf Metallionenstress zu untersuchen, sollten im Folgenden Gendeletionen in *H. salinarum* R1 generiert und die erhaltenen Deletionsmutanten im Umgang mit Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Stress charakterisiert werden. Um einen möglichst umfangreichen Einblick in die Funktion von Genen bei Metallionenstress zu erhalten, sollten Deletionen von Genen aus verschiedenen funktionalen Kategorien erfolgen. Hierbei sollten Gene deletiert werden, deren Produkte eine signifikant erhöhte bzw. verringerte Abundanz in allen Metallionen-behandelten Proben aufwiesen sowie solche, welche signifikante Änderungen spezifisch bei einer Lebensform bzw. bei einem Metallion aufwiesen.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Zielgene für Deletionsstudien

Zur Untersuchung der Funktion bestimmter Gene bei Metallionenstress in *H. salinarum* R1 wurden Gendeletionsmutanten generiert und deren Reaktion in Gegenwart von Kupfer- und Nickelionen charakterisiert. Die Auswahl der Zielgene erfolgte basierend auf den Daten der Proteomstudie (s. Kapitel IV). Hierbei wurden Gene ausgewählt, deren Produkte in planktonischen- und/oder Biofilmzellen eine signifikant veränderte Abundanz nach Metallionenbehandlung zeigten. Unter den Zielgenen erfolgte eine Gruppierung basierend auf der funktionalen Zuordnung in die Kategorien „Metabolismus“, „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“, „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ sowie „Uncharakterisierte Proteine“ (Tabelle 13).

Zu den Zielgenen der Kategorie „Metabolismus“ zählten *copA*/OE2042F, OE2044F, *cbiX1*/OE3221F, *dpsA*/OE4427R und *znuC*/OE5146R (Tabelle 13). Die Kupfer-transportierende ATPase CopA zeigte in der Proteomstudie eine fünffach erhöhte Abundanz in Cu^{2+}-behandelten planktonischen Zellen, während das zugehörige HMA-Domäne Protein eine vierfache Erhöhung in Ni^{2+}-behandelten Zellen aufwies. CbiX1, eine Sirohydrochlorin-Cobaltochelatase war in planktonischen Zellen nach Cu^{2+}-Behandlung zweifach erhöht,

während Ni^{2+}-behandelte Zellen eine fünffache Verringerung aufwiesen. Das Ferritin DpsA zeigte in der Proteomstudie eine signifikante Verringerung in planktonischen Zellen, während es im Biofilm erhöht war. ZnuC, ein ATP-bindendes Protein eines Zink-spezifischen ABC-Transporters zeigte nach Ni^{2+}-Behandlung eine zweifache Erhöhung in planktonischen Zellen.

Zielgene in der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung" waren OE5245F, OE5246R, *hly*/OE4612F und OE4544R (Tabelle 13). OE5245F und OE5246R kodieren für ein ATP-bindendes- bzw. Permeaseprotein eines ABC-Transporters, welcher im Abwehrmechanismus beteiligt ist. In der Proteomstudie zeigte das ATP-bindende Protein eine fünf- bzw. sechsfache Verringerung in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen, während es in Biofilmen zwei- bzw. dreifach erhöht war. Die zugehörige Permease wurde in den Proteomdaten nicht quantifiziert. Zur Klärung der Relevanz einzelner Proteine dieses Transportsystems wurde zusätzlich die Auswirkung einer Deletion des Permeasegens untersucht. Die Serinprotease Hly zeigte eine 17- bzw. 14-fach verringerte Abundanz in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und eine 20-fache Erhöhung in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen. OE4544R kodiert für ein universales Stressprotein, welches neben drei weiteren UspA Proteinen in der Proteimstudie eine signifikante Änderung der relativen Häufigkeit aufwies und eine zweifache Erhöhung in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen zeigte.

Aus der Kategorie „Informationsspeicherung- und Verarbeitung" wurden die Transkriptionsregulator-kodierenden Gene OE3125R der Cro/C1 Familie sowie OE3050F und OE6177F der PadR Familie ausgewählt (Tabelle 13). Der Cro/C1 Transkriptionsregulator zeigte in der Proteomstudie signifikante Änderungen der Abundanz nach Metallionenbehandlung mit einer Erhöhung in Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und einer Verringerung in Biofilmzellen nach Zugabe von Cu^{2+} und Ni^{2+}. Unter den PadR Transkriptionsregulatoren wurde im Fall des OE3050F kodierten Proteins eine Erhöhung in Ni^{2+}-behandelten Biofilmzellen ermittelt, während für OE6177F in allen Proben eine signifikante Erhöhung des Proteins nach Metallionenbehandlung nachgewiesen wurde.

Zudem wurden drei weitere Gene ausgewählt, deren Funktion bislang unbekannt ist. Hierzu zählen OE2816F, OE3028F und OE5318F (Tabelle 13). Im Fall von OE2816F zeigte das kodierte Protein eine signifikant erhöhte Abundanz in sowohl Cu^{2+}- als auch Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen und Biofilmen mit einer bis zu 34-fachen Erhöhung in Biofilmen behandelt mit Ni^{2+}. Signifikant erhöhte Proteinmengen wurden zudem im Fall des kodierenden Gens OE3028R ermittelt, während das OE5318F kodierte Protein eine Verringerung in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen zeigte.

Die Generierung von Deletionsmutanten erfolgte über eine doppelt homologe Rekombination unter Verwendung des Plasmids pMKK100 (Koch & Oesterhelt, 2005). Das Plasmid verfügt über ein *bgaH* Reportergen, welche für die halophile β-Galaktosidase kodiert und in Kombination mit X-Gal eine Blau-Rot- bzw. Rot-Blau-Selektion der Kolonien ermöglicht. Eine erfolgreiche Gendeletion wurde durch PCR-Analysen überprüft und mittels Sequenzierung und Southern-Analyse verifiziert.
Für die nachfolgenden Analysen wurden die Deletionsmutanten auf Basis ihrer Proteinkategorie eingeteilt. Zur Untersuchung der Auswirkung der einzelnen Gendeletionen erfolgten Analysen des Wachstums und der Adhäsion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen sowie Analysen der Sensitivität gegenüber Kupfer- und Nickelionen mittels Hemmhoftest und Fluoreszenz-mikroskopie. Um die Auswirkung von Kupfer- und Nickelionen auf die Adhäsion und Biofilmbildung zu überprüfen, wurde ein fluoreszenzbasierter Adhäsionstest nach einer 14-

tägigen Inkubation mit Metallionen sowie nach einer 24 h Exposition durchgeführt. Untersuchungen des Einflusses von Kupfer- und Nickelionen auf die Biofilmarchitektur und die Zusammensetzung der EPS erfolgten mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie. Zur Untersuchung der Aktivität von Proteasen als Abwehrmechanismus der Zellen wurde die hydrolytische Funktion der Deletionsmutanten mit einem Test auf Magermilch-Agar überprüft.

5.2.2 Verifizierung der Gendeletionen

Zur Verifizierung der Gendeletionen wurde jeweils eine etwa 1.500 bp flankierende Region um das entsprechende Zielgen mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle erfolgte für jedes zu untersuchende Gen die Amplifikation der entsprechenden Genregion aus *H. salinarum* Wildtyp-DNA. Bei allen Deletionsmutanten der Proteinkategorien „Metabolismus“, „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ sowie „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ wurde eine DNA-Bande bei etwa 1.500 bp beobachtet, während die PCR-Produkte des Wildtyps jeweils eine genspezifisch größere DNA-Bande aufwiesen (Abb. 33A, C, E). Innerhalb der Gruppe der uncharakterisierten Proteine erfolgte ausschließlich bei OE2816F eine Gendeletion (Abb. 33A, Deletionsmutante ΔOE2816F zur Verfügung gestellt von Johannes Born). Im Fall von OE3028R und OE5318F wurde das Plasmid erfolgreich von den Zellen aufgenommen, was durch ein Wachstum von blauen Kolonien auf Selektionsmedium überprüft wurde. Mehrmaliges Überimpfen der Zellkulturen ohne Selektionsdruck resultierte jedoch nicht in einer Gendeletion, was auf eine essentielle Funktion der Gene hinweisen könnte. Zur Verifizierung der Gendeletionen erfolgten zudem Sequenzanalysen der PCR-Produkte, welche eine erfolgreiche Gendeletion der 13 generierten Deletionsmutanten bestätigten (s. Anhang 3, Sequenzanalysen Gendeletionen).
Zur Untersuchung der Gendeletion im Genom der Zellen wurden zusätzliche Southern-Analysen mit genspezifischen DNA-Hybridisierungssonden durchgeführt. Hierfür erfolgte zunächst die hydrolytische Spaltung und gelelektrophoretische Auftrennung der genomischen DNA aus *H. salinarum* Wildtyp und Deletionsmutanten. Zur Detektion des spezifischen Genbereichs wurden DNA-Sonden verwendet, welche in der 500 bp *upstream*- oder *downstream*-Region des jeweiligen Gens hybridisieren. Eine erfolgreiche Gendeletion der Zielgene wurde anschließend durch Hybridisierung der Sonde an DNA-Fragmente mit einer spezifischen Größe für Wildtyp und Deletionsmutante verifiziert (Abb. 33B, D, F). Da der Größenunterschied der detektierten Fragmente im Fall von OE6177F nicht deutlich erkennbar war, erfolgte für diese Deletionsmutante zusätzlich eine Hybridisierung mit einer gen-spezifischen Sonde. Da in diesem Fall keine Hybridisierung mit der DNA der Mutante erfolgte, konnte hier ebenfalls eine erfolgreiche Deletion verifiziert werden (Abb. 33F).

Tabelle 13. Zielgene für Deletionsstudien in *H. salinarum* auf Basis der Proteomdaten.

	Bezeichnung		***Fold change* der Proteinabundanz***			
			Planktonische Zellen		**Biofilme**	
	Gen-ID	**Protein-ID[1]**	**Cu^{2+}**	**Ni^{2+}**	**Cu^{2+}**	**Ni^{2+}**
Metabolismus	OE2042F *copA*	B0R3Z0 P-type transport ATPase	4,64	0,71	0,86	0,85
	OE2044F	B0R3Z1 HMA domain protein	1,11	4,15	1,71	1,50
	OE3221F *cbiX1*	B0R5W1 Sirohydrochlorin cobaltochelatase	2,33	0,16	1,21	1,32
	OE4427R *dpsA*	B0R7W1 Ferritin DpsA	0,40	0,21	1,21	2,56
	OE5146R *znuC*	B0R9T5 ABC-type transport system ATP-binding protein	1,16	2,09	0,78	0,58
Zelluläre Prozesse und Signalisierung	OE5245F	B0R9Z2 ABC-type transport system ATP-binding protein	0,22	0,17	2,09	2,67
	OE5246R	B0R9Z3 ABC-type transport system permease protein	-	-	-	-
	OE4612F *hly*	B0R859 Serine protease halolysin	0,06	0,07	0,99	19,65
	OE4544R	B0R823 UspA domain protein	0,59	1,63	1,25	2,07
Informationsspeicherung- und Verarbeitung	OE3125R	B0R5Q3 Cro/C1 family transcription regulator	1,57	2,56	0,34	0,33
	OE3050F	B0R5K7 PadR family transcription regulator	1,50	1,44	0,74	2,40
	OE6177F	B0R8N0 PadR family transcription regulator	3,44	2,43	2,27	2,17
Uncharakterisiert	OE2816F	B0R587 Uncharacterized protein	2,36	3,81	2,03	33,65
	OE3028R	B0R5J7 Uncharacterized protein	5,53	4,27	1,49	2,57
	OE5318F	B0RA31 Uncharacterized protein	0,3	0,40	2,74	1,34

**fold change* von Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Daten basieren auf der quantitativen Proteomstudie in dieser Arbeit.

[1]Bezeichnung nach der Proteindatenbank UniProtKB (https://www.uniprot.org/).

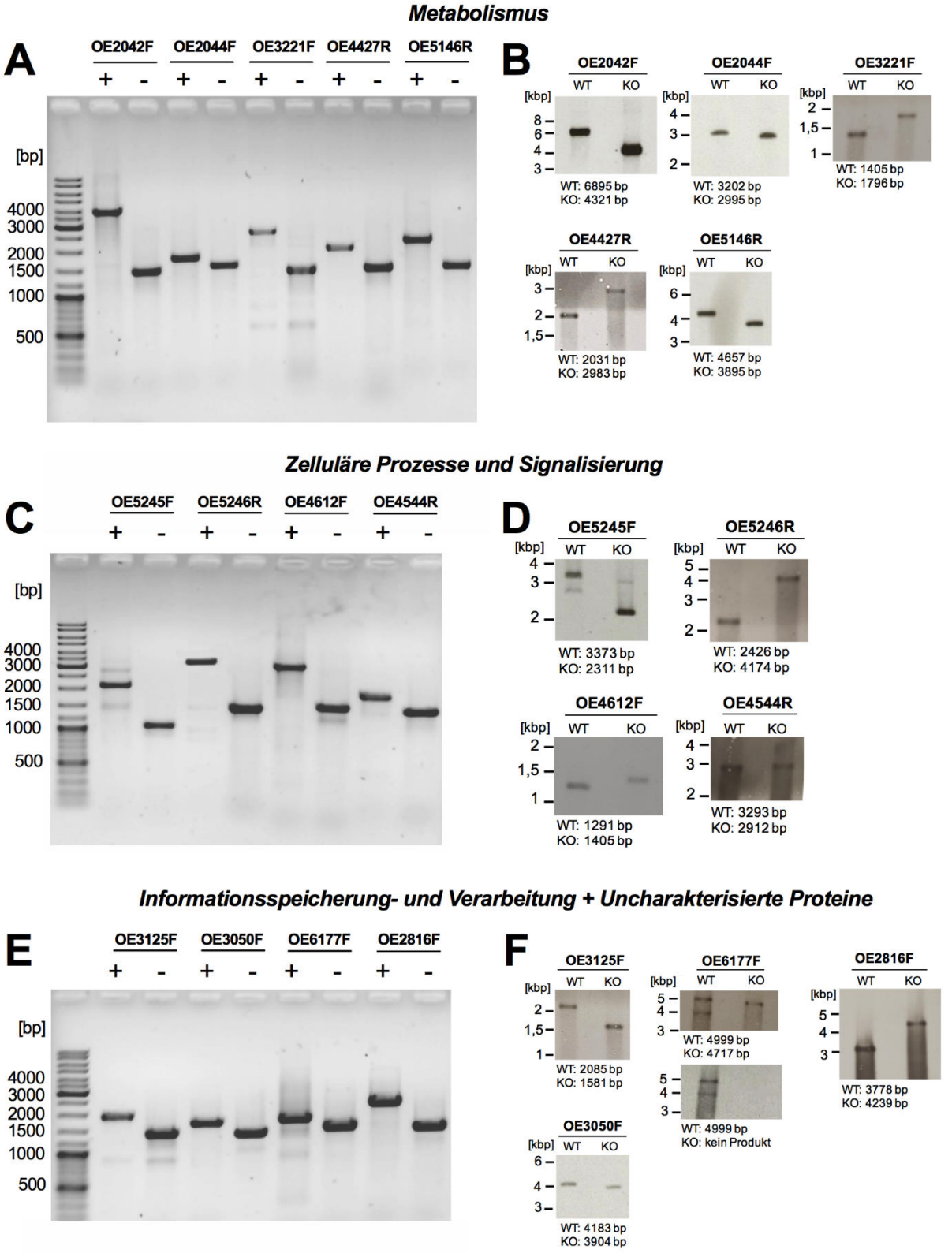


Abbildung 33. Verifizierung von Gendeletionen in den Proteinkategorien „Metabolismus“ **(A-B)**, „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ **(C-D)**, „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ und „Uncharakterisierte Proteine“ **(E-F)**. **(A,C,E)** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit Zielgen-flankierenden Oligonukleotiden. Die Zielgen-flankierende Region umfasst etwa 1.500 bp. (+) *H. salinarum* Wildtyp, (-) Gendeletionsmutante. **(B,D,F)** Southern-Analysen mit den erwarteten Fragmentgrößen von Wildtyp (WT) und Deletionsmutatante (KO). Im Fall von OE6177F erfolgte eine zusätzliche Kontrolle durch Verwendung einer gen-spezifischen Sonde.

5.2.3 Charakterisierung von Wachstum und Adhäsion in den Deletionsmutanten

Um den Einfluss der Gendeletionen auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, erfolgten photometrische Messungen der OD_{600} über einen Zeitraum von 97 h bei schüttelnder Kultivierung in Komplexmedium. Zu Beginn wurde in allen Kulturen eine OD_{600} von 0,02 eingestellt. Zur Kontrolle wurden parallel *H. salinarum* R1 Wildtypkulturen mitgeführt. In der Kategorie „Metabolismus“ zeigte der Vergleich des Wachstums von Deletionsmutanten und Wildtyp einen ähnlichen Verlauf der Kulturen, wobei ΔOE2042F, ΔOE2044F und ΔOE5146R im Vergleich zum Wildtyp jeweils leicht erhöhte optische Dichten aufwiesen, während bei ΔOE4427R geringere OD_{600}-Werte gemessen wurden (Abb. 34A, Tabelle 14).

Für einen Vergleich der Adhäsion von Wildtyp und Deletionsmutanten wurden die Stämme in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten in Komplexmedium für 15 Tage angezogen. Die Quantifizierung der Zelladhäsion am Boden der Mikrotiterplatten erfolgte mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest unter Verwendung des membran-permeablen Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in *Light Absorbing Units*/mm^2 (LAU/mm^2) wurden anschließend auf die Messwerte der Wildtypzellen normiert. Die Auswertung der „Metabolismus“-Deletionsmutanten ΔOE2042F, ΔOE2044F und ΔOE3221F zeigten im Vergleich zum Wildtyp jeweils eine deutlich erhöhte Adhäsion mit 151, 133 bzw. 146%, während die Adhäsion von ΔOE4427R und ΔOE5146R leicht erhöht war (Abb. 34B, Tabelle 14).

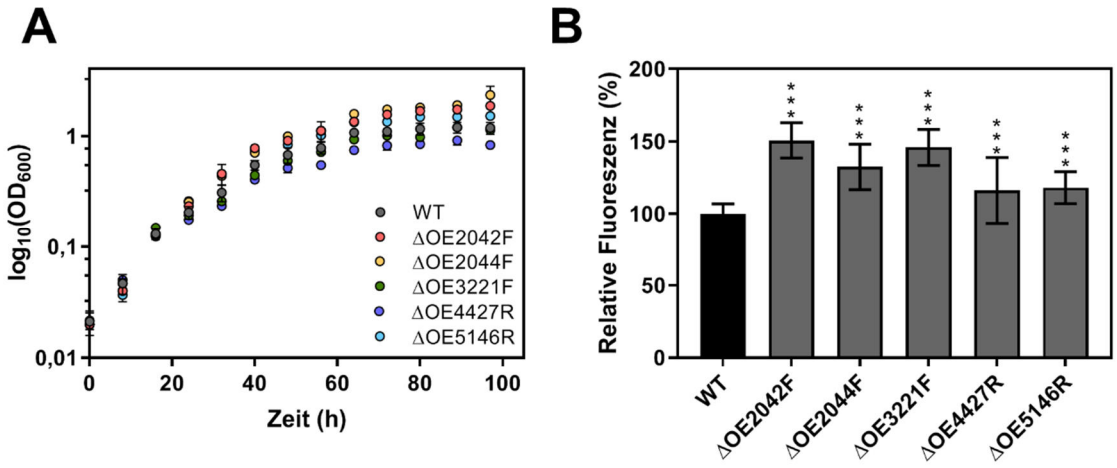


Abbildung 34. Wachstum und Adhäsion von *H. salinarum* Deletionsmutanten der Kategorie „Metabolismus“ im Vergleich zum Wildtyp. Die Kultivierung der Zellen erfolgte jeweils in Komplexmedium. **(A)** Untersuchung des planktonischen Wachstums über einen Zeitraum von 97 h durch photometrische Messungen der OD_{600}. **(B)** Quantifizierung der Adhäsion nach 15 Tagen stehender Kultivierung in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest. Die gemessenen Fluoreszenzsignale der Deletionsmutanten wurden jeweils auf den Wildtyp normiert. Das Signifikanzniveau der Adhäsion von Gendeletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde mit einem *t*-test bestimmt. (*** extrem signifikant = $p < 0{,}001$).

In der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ wurde im Fall der Deletionsmutanten ΔOE5245F und ΔOE4612F ein nahezu identisches Wachstum mit dem Wildtyp ermittelt, wohingegen das Wachstum von ΔOE4544R und ΔOE5246R leicht verlangsamt war (Abb. 35A, Tabelle 14). Untersuchungen der Adhäsion zeigten bei ΔOE5245F und ΔOE5246R eine leichte Erhöhung auf 112 bzw. 115%, während bei ΔOE4544R eine starke Erhöhung auf 167%

ermittelt wurde. Im Gegensatz hierzu zeigte ΔOE4612F eine Verringerung auf 89% (Abb. 35B, Tabelle 14).

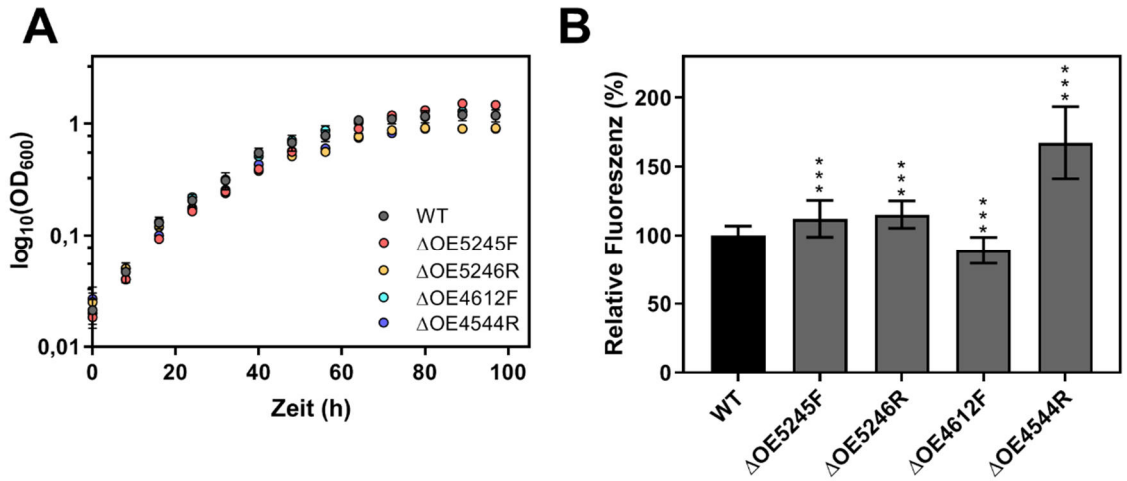


Abbildung 35. Wachstum und Adhäsion von *H. salinarum* Deletionsmutanten der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung" im Vergleich zum Wildtyp. Die Kultivierung der Zellen erfolgte jeweils in Komplexmedium. **(A)** Wachstumsverlauf planktonischer Zellen über einen Zeitraum von 97 h durch photometrische Messungen der OD_{600}) **(B)** Untersuchung der Adhäsion nach 15 Tagen stehender Kultivierung in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest. Die gemessenen Fluoreszenzsignale der Deletionsmutanten wurden jeweils auf den Wildtyp normiert (*** extrem signifikant = $p < 0{,}001$).

Untersuchungen der Deletionsmutanten für Transkriptionsregulatoren zeigten keinen Effekt auf das Wachstum planktonischer Zellen (Abb. 36A, Tabelle 14). Im Fall der Adhäsion wurde bei ΔOE3125R eine Erhöhung auf 141% ermittelt, während ΔOE3050F eine Verringerung der Adhäsion auf 81% aufwies und ΔOE6177F keine Veränderung zeigte (Abb. 36B, Tabelle 14). Bei ΔOE2816F aus der Kategorie der uncharakterisierten Proteine wurde ein leicht verlangsamtes Wachstum planktonischer Zellen beobachtet, während Untersuchungen der Adhäsion keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Abb. 36, Tabelle 14).

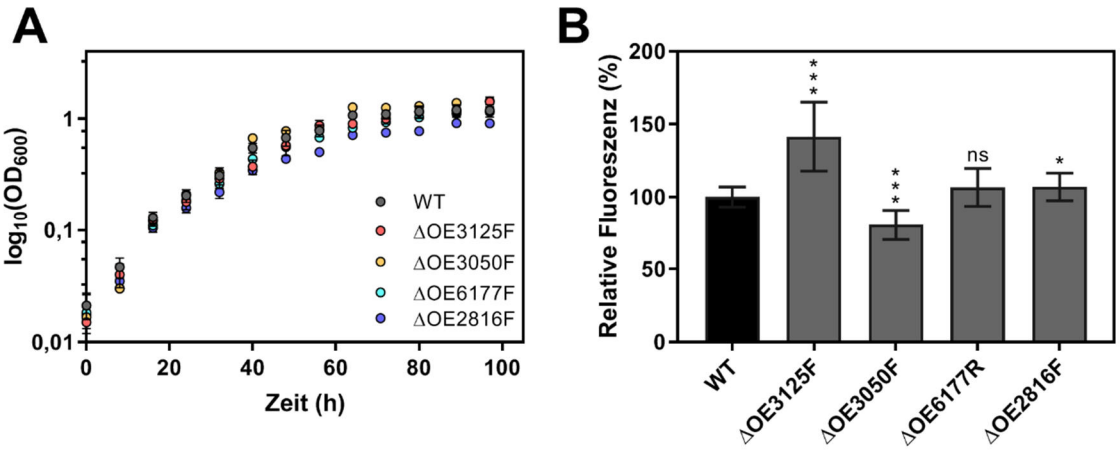


Abbildung 36. Wachstum und Adhäsion von *H. salinarum* Deletionsmutanten der Kategorien „Informationsspeicherung- und Verarbeitung" und „Uncharakterisierte Proteine" im Vergleich zum Wildtyp. Die Kultivierung der Zellen erfolgte jeweils in Komplexmedium. **(A)** Untersuchung des Wachstumsverlaufs über einen Zeitraum von 97 h durch photometrische Messungen bei OD_{600}. **(B)** Untersuchung der Adhäsion nach 15 Tagen stehender Kultivierung in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest. Die gemessenen Fluoreszenzsignale der Deletionsmutanten wurden jeweils auf den Wildtyp normiert (ns, nicht signifikant; *, signifikant = $p < 0{,}05$; ** hoch signifikant $p < 0{,}01$; *** extrem signifikant = $p < 0{,}001$).

Tabelle 14. Wachstum und Zelladhäsion der *H. salinarum* R1 Deletionsmutanten und Wildtyp.

		Bezeichnung	Wachstum OD_{600} final	Zelladhäsion (%)*
		Wildtyp	1,18	100,0
Funktionale Kategorisierung	Metabolismus	ΔOE2042F	1,87	150,8
		ΔOE2044F	2,33	132,5
		ΔOE3221F	1,13	145,9
		ΔOE4427R	0,83	116,2
		ΔOE5146R	1,52	118,1
	Zelluläre Prozesse und Signalisierung	ΔOE5245F	1,47	112,2
		ΔOE5246R	0,92	115,2
		ΔOE4612F	1,18	89,1
		ΔOE4544R	0,90	167,4
	Informationsspeicherung- und Verarbeitung	ΔOE3125R	1,42	141,4
		ΔOE3050F	1,43	80,5
		ΔOE6177F	1,15	106,6
	Uncharakterisiert	ΔOE2816F	0,91	106,9

*Zelladhäsion der Deletionsmutanten in LAU/mm^2 wurden auf den Wildtyp normiert.

5.2.4 Einfluss von Kupfer- und Nickelionen auf Deletionsmutanten

Untersuchung der Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Sensitivität

Um die Sensitivität der Deletionsmutanten gegenüber Kupfer- und Nickelionen zu untersuchen, erfolgte ein Hemmhoftest auf Agarplatten. Hierzu wurden die Deletionsmutanten jeweils in Weichagarmedium eingegossen und in Kulturschalen gefüllt. Nach Aushärten des Agars wurden in 1 M Kupfer- bzw. 2,5 M Nickellösung-getränkte Filterplättchen auf dem Weichagarmedium platziert, wobei zusätzliche Filterplättchen, getränkt in Wasser, als Kontrolle dienten. Die Auswertung der Sensitivität erfolgte nach einer achttägigen Inkubation der Platten durch Messungen des Durchmessers der Wachstumsinhibition um die Filterplättchen (Abb. 37-39, Tabelle 15). Im Fall des *H. salinarum* Wildtyps wurde bei den Cu^{2+}-getränkten Plättchen eine klare Hemmzone mit einem Durchmesser von etwa 1,3 cm ermittelt, während in Ni^{2+}-getränkte Plättchen einen Durchmesser von etwa 1,1 cm und keine scharfe Abgrenzung der Hemmzone aufwiesen. Die mit Wasser getränkten Filterplättchen erzeugten keine Wachstumsinhibition (Abb. 37A). Die gemessene Inhibitionszone der Deletionsmutanten wurde auf die Messwerte des Wildtyps normiert.

In der Proteinkategorie „Metabolismus“ wurde im Fall der Cu^{2+}-getränkten Plättchen eine starke Wachstumsinhibition bei ΔOE2042F beobachtet. Da der Durchmesser der Hemmzone die gesamte Kulturschale (Durchmesser 9,2 cm) erfasste, erfolgte in diesem Fall eine Wiederholung des Versuchs mit Kulturschalen eines Durchmessers von 15 cm. Hier wurde eine Hemmzone mit einem Durchmesser von etwa acht cm gemessen, was im Vergleich zum Wildtyp einer

Erhöhung auf 629% entspricht. Die Gegenwart von Ni^{2+} führte bei ΔOE3221F und ΔOE4427R zu einer vergrößerten Hemmzone auf 122 bzw. 120%, während bei den restlichen Deletionsmutanten in dieser Kategorie keine starken Änderungen beobachtet wurden (Abb. 37B, Tabelle 15).

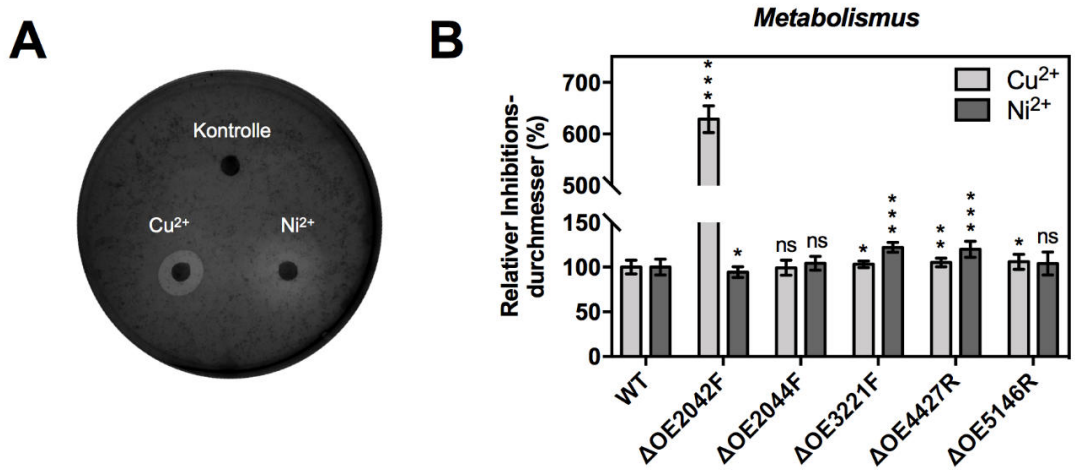


Abbildung 37. Metallionen-Sensitivitätstest von *H. salinarum* Deletionsmutanten der Kategorie „Metabolismus“ im Vergleich zum Wildtyp. **(A)** *H. salinarum* Wildtyp Agarplatte mit Inhibitionszonen um Filterplättchen getränkt in Kupfer- bzw. Nickellösung sowie zur Kontrolle mit Wasser getränkt. **(B)** Durchmesser der Inhibition von Cu^{2+}- und Ni^{2+}-getränkten Filterplättchen der Deletionsmutantanten. Die Inhibitionszonen der Deletionsmutanten wurden jeweils auf die Werte des Wildtyps normiert. Das Signifikanzniveau der Inhibitionszonen von Gendeletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde mit einem *t*-test bestimmt. (ns, nicht signifikant; *, signifikant = $p < 0,05$; ** hoch signifikant $p < 0,01$; *** extrem signifikant = $p < 0,001$).

Die Deletionsmutanten der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ zeigten in Gegenwart von Cu^{2+} keine starke Änderung der Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp. In Nickellösung-getränkte Filterplättchen führten zu einer stark vergrößerten Hemmzone bei ΔOE5245F und ΔOE4612F auf 182 bzw. 145%. ΔOE5246F zeigte in Gegenwart von Ni^{2+} eine leicht erhöhte Sensitivität auf 110%, während bei ΔOE4544R eine leichte Verringerung der Sensitivität auf 90% ermittelt wurde (Abb. 38A, Tabelle 15). Innerhalb der Kategorien „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ und „Uncharakterisierte Proteine“ wurde keine veränderte Sensitivität der Deletionsmutanten in Gegenwart von Cu^{2+} beobachtet, während ΔOE6177F und ΔOE2816F eine etwa 30% vergrößerte Hemmzone gegenüber Ni^{2+} aufwiesen (Abb. 38B, Tabelle 15).

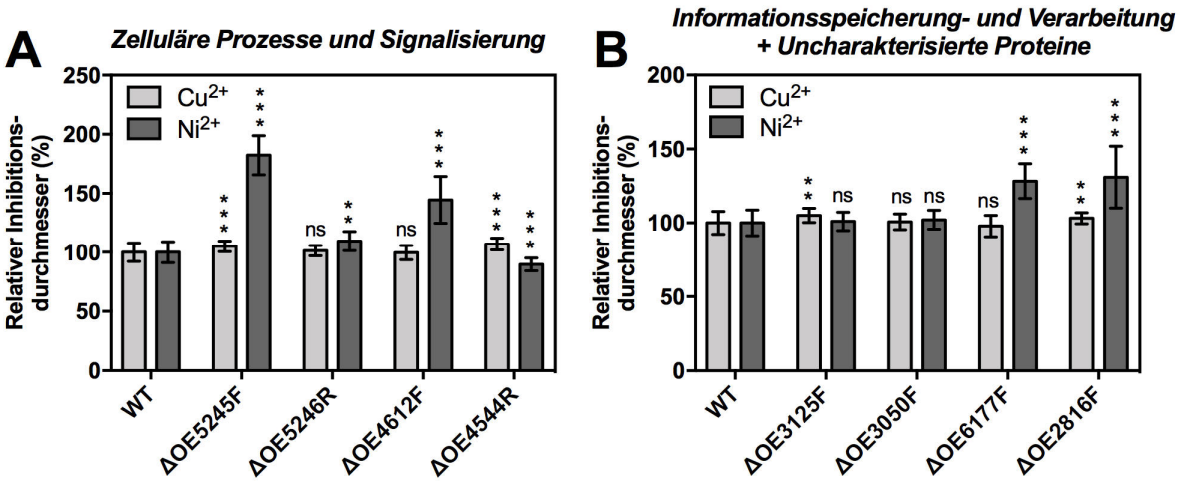


Abbildung 38. Sensitivität der *H. salinarum* Deletionsmutanten gegenüber Cu^{2+} und Ni^{2+} im Vergleich zum Wildtyp. Deletionsmutanten der Kategorien **(A)** „Zelluläre Prozesse und Signalisierung", **(B)** „Informationsspeicherung- und Verarbeitung" sowie „Uncharakterisierte Proteine". Messungen der Inhibitionszone um Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-getränkte Filterplättchen auf Weichagarplatten mit *H. salinarum*. Die gemessenen Durchmesser der Deletionsmutanten wurden jeweils auf die Werte des Wildtyps normiert. Das Signifikanzniveau der Inhibitionszonen von Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde mit einem *t*-test bestimmt (ns, nicht signifikant; *, signifikant = $p < 0{,}05$; ** hoch signifikant $p < 0{,}01$; *** extrem signifikant = $p < 0{,}001$).

Tabelle 15. Relativer Inhibitionsdurchmesser der Deletionsmutanten in Gegenwart von Kupfer- oder Nickelionen.

		Inhibitionsdurchmesser (%)*	
Funktionale Kategorie	**Bezeichnung**	**Cu^{2+}**	**Ni^{2+}**
Metabolismus	ΔOE2042F	628,7	94,4
	ΔOE2044F	99,3	104,3
	ΔOE3221F	103,2	122,1
	ΔOE4427R	105,1	119,9
	ΔOE5146R	105,9	104,0
Zelluläre Prozesse und Signalisierung	ΔOE5245F	105,1	182,3
	ΔOE5246R	101,3	109,5
	ΔOE4612F	99,8	144,6
	ΔOE4544R	107,1	89,7
Informationsspeicherung- und Verarbeitung	ΔOE3125R	105,2	101,0
	ΔOE3050F	100,7	102,1
	ΔOE6177F	97,8	128,3
Uncharakterisiert	ΔOE2816F	103,2	131,0

*Der gemessene Inhibitionsdurchmesser der Deletionsmutanten wurde auf den Wildtyp normiert, wobei 100% bei Cu^{2+} einem Durchmesser von 1,3 cm und 100% bei Ni^{2+} einem Durchmesser von 1,1 cm entsprechen.

Untersuchung der Zellmorphologie- und Vitalität

Nach den Analysen der Sensitivität gegenüber Cu^{2+} und Ni^{2+} wurde die Auswirkung auf Zellform- und Vitalität in Gegenwart gleicher Metallionen untersucht. Hierzu wurden *H. salinarum* Deletionsmutanten und Wildtyp in Flüssigkulturen angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3) mit der MHK von 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} für 24 h inkubiert. Als Kontrolle wurden zudem Zellen ohne Zugabe von Metallionen kultiviert. Es erfolgte eine Lebend-/Tot-Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Acridinorange (AO) und Propidiumiodid (PI) und die mikroskopische Untersuchung der Zellen. Als Positivkontrolle für tote Zellen wurden zudem hitzebehandelte, tote *H. salinarum* Zellen mikroskopiert. Diese wiesen eine runde Zellmorphologie auf und zeigten eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff PI, welcher ausschließlich die perforierte Membran von toten Zellen durchdringen kann. Durch die Überlagerung des grünen und roten Fluoreszenzsignals von AO und PI erschienen die Zellen gelb (Abb. 39).

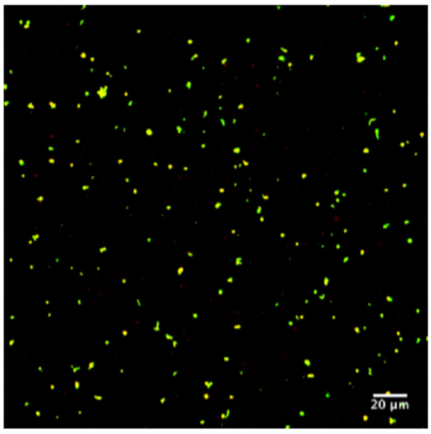


Abbildung 39. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von hitzebehandelten, toten *H. salinarum* Zellen. Die Zellen wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen AO (grünes Signal) und PI (rotes Signal) gefärbt. Die Aufnahme zeigt eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Der Größenmaßstab beträgt 20 µm.

Die mikroskopischen Untersuchungen der Wildtyp Zellen ohne Zugabe von Metallionen zeigten lebende, stäbchenförmige Zellen einer Länge von ca. 3-5 μm. Im Fall einer Behandlung mit Cu^{2+} wurden größtenteils längere Zellen von etwa 7-10 μm beobachtet, während nach Ni^{2+}-Behandlung größtenteils kurze stäbchenförmige Zellen einer Länge von 2-3 μm beobachtet wurden. Diese waren teilweise abgerundet, zeigten jedoch keine Färbung mit PI (Abb. 40-42).

Vergleichende Untersuchungen der Deletionsmutanten in der Kategorie „Metabolismus“ zeigten größtenteils keine Unterschiede der Zellmorphologie- und Vitalität im Vergleich zu den Zellen des Wildtyps. Nur Zellen des Stammes ΔOE2042F waren nach Cu^{2+}-Behandlung stark abgerundet und zum Großteil tot (Abb. 40, Tabelle 16).
In der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ zeigten die Deletionsmutanten ebenfalls größtenteils keine Unterschiede zu den Zellen des Wildtyps. Nur im Fall von Cu^{2+}-behandelten Zellen des Deletionsstammes ΔOE5246R wurden deutlich längere Zellen mit einer Gesamtlänge von bis zu 18 μm beobachtet, was nahezu der zweifachen Länge von Wildtypzellen entspricht (Abb. 41, Tabelle 16).

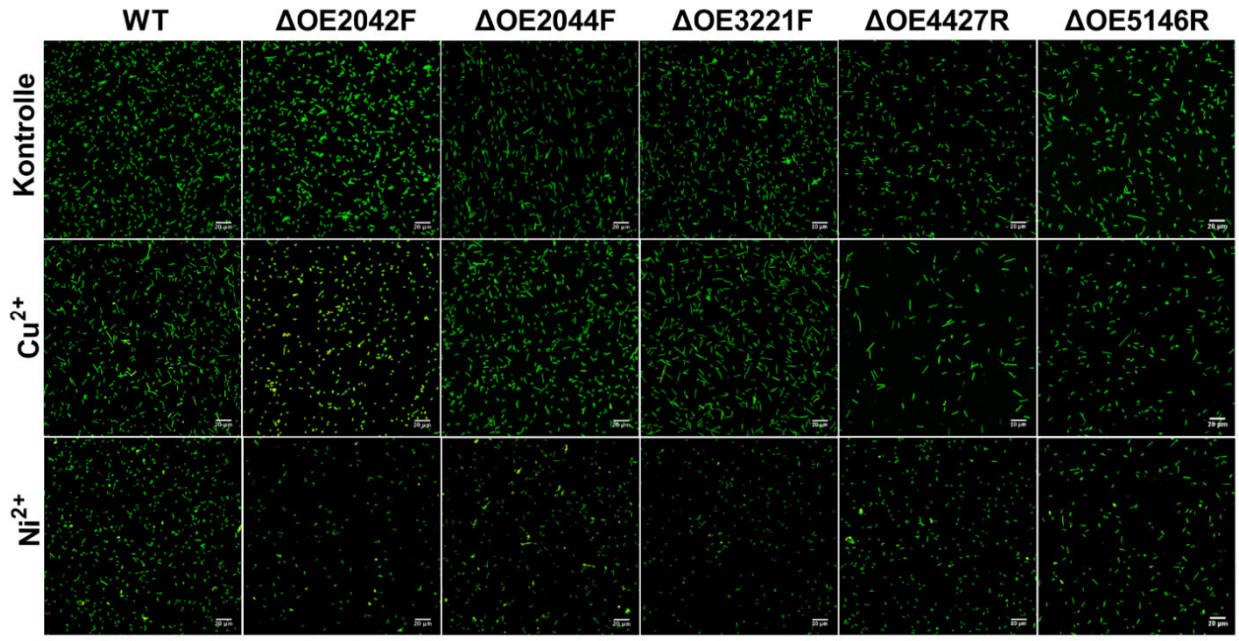


Abbildung 40. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *H. salinarum* R1 Deletionsmutanten der Kategorie „Metabolismus“ und Wildtyp-Zellen. Planktonische Zellen wurden für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Lebend-/Tot-Färbung der Zellen mit AO (grünes Signal) und PI (rotes Signal). Darstellung einer Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Der Größenmaßstab beträgt 20 µm.

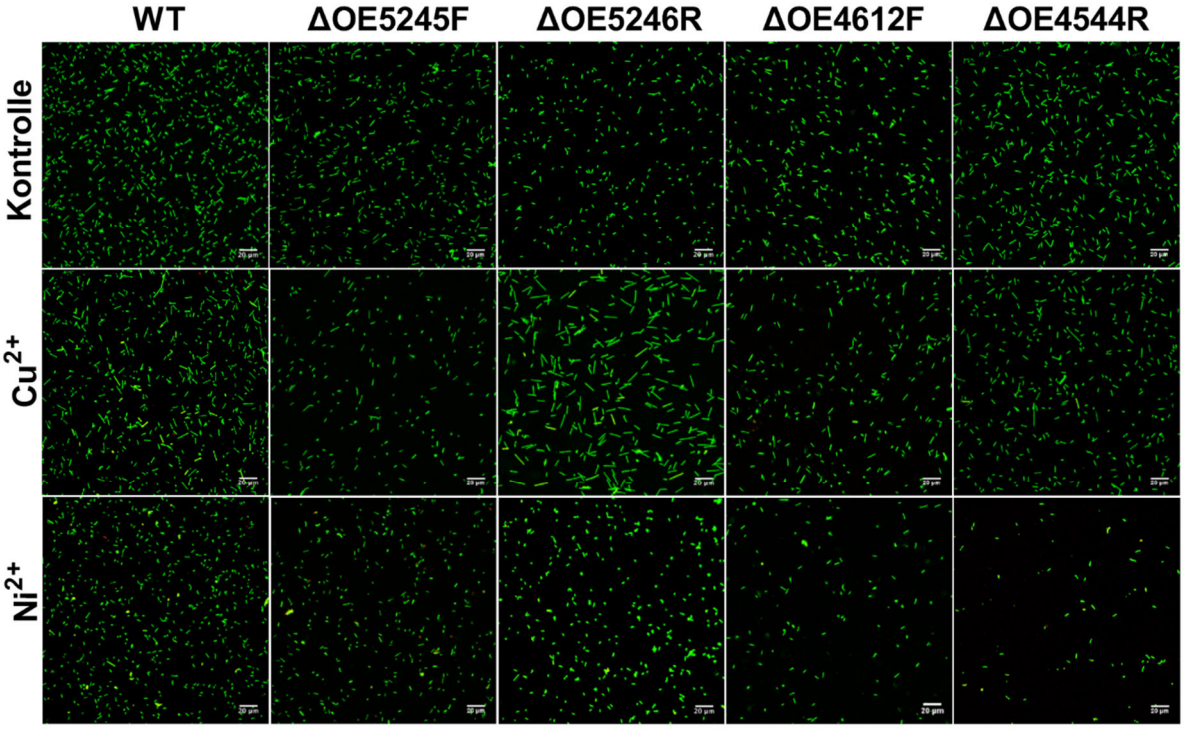


Abbildung 41. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *H. salinarum* R1 Deletionsmutanten der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ und Wildtyp-Zellen. Planktonische Zellen wurden für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Lebend-/Tot-Färbung der Zellen mit AO (grünes Signal) und PI (rotes Signal). Darstellung einer Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Der Größenmaßstab beträgt 20 µm.

Die mikroskopische Untersuchung der drei Deletionsmutanten für Transkriptionsregulatoren zeigte weder bei unbehandelten, noch bei Metallionen-behandelten Zellen signifikante

Unterschiede zu den Zellen des Wildtyps. Die Zellen des Deletionsstammes ΔOE2816F aus der Kategorie „Uncharakterisierte Proteine“ zeigten verglichen mit dem Wildtyp ebenfalls keine Unterschiede im unbehandelten Zustand sowie nach Ni^{2+}-Behandlung. Nach Exposition mit Cu^{2+} wurden jedoch besonders lange Zellen mit einer Länge von 15-18 μm beobachtet, welche etwa die zweifache Länge der Wildtypzellen aufwiesen (Abb. 42, Tabelle 16).

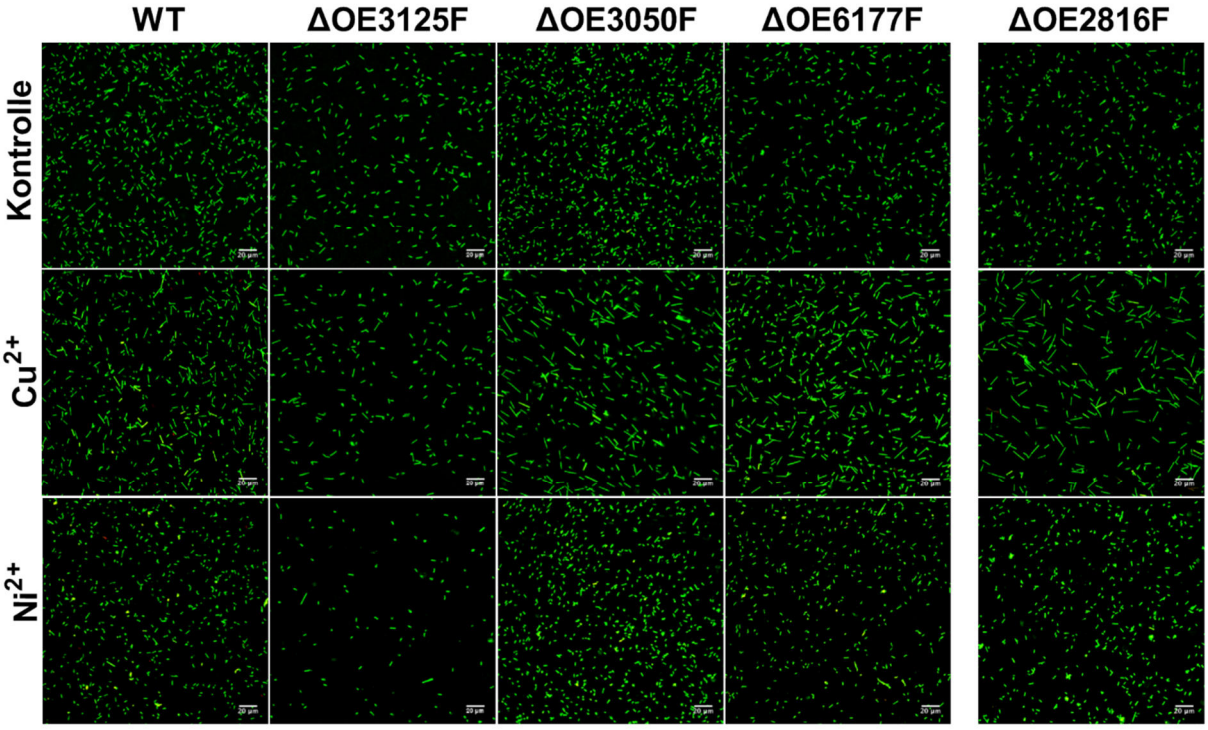


Abbildung 42. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *H. salinarum* R1 Deletionsmutanten der Kategorien „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ und „Uncharakterisierte Proteine“ sowie Wildtyp-Zellen. Planktonische Zellen wurden für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 15 mM Ni^{2+} behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Lebend-/Tot-Färbung der Zellen mit AO (grünes Signal) und PI (rotes Signal). Darstellung einer Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Der Größenmaßstab beträgt 20 µm.

Tabelle 16. Änderung der Zellmorphologie- und Vitalität der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Funktionale Kategorie	Bezeichnung	Unbehandelt	Cu^{2+}	Ni^{2+}
Metabolismus	ΔOE2042F	-	Zellen abgerundet, tot	-
	ΔOE2044F	-	-	-
	ΔOE3221F	-	-	-
	ΔOE4427R	-	-	-
	ΔOE5146R	-	-	-
Zelluläre Prozesse und Signalisierung	ΔOE5245F	-	-	-
	ΔOE5246R	-	Zelllänge vergrößert	-
	ΔOE4612F	-	-	-
	ΔOE4544R	-	-	-
Informationsspeicherung - und Verarbeitung	ΔOE3125R	-	-	-
	ΔOE3050F	-	-	-
	ΔOE6177F	-	-	-
Uncharakterisiert	ΔOE2816F	-	Zelllänge vergrößert	-

Untersuchung der Zelladhäsion und Biofilmarchitektur

Zur Untersuchung des Einflusses von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf die Adhäsion und Biofilmbildung der Deletionmutanten, erfolgte ein Fluoreszenz-basierter Adhäsionstest in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten. Hierbei wurde zum einen die Adhäsion nach 15 Tagen Inkubation in Gegenwart von jeweils 1 mM Cu^{2+} und Ni^{2+} (Konzentrationen, die das Wachstum nicht inhibieren) quantifiziert sowie zum anderen die Änderung der Adhäsion von reifen Biofilmen nach einer 24 h Inkubation mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} untersucht. Bei diesen Konzentrationen wurden zuvor starke Änderungen in *H. salinarum* Biofilmen ermittelt, wobei der Anteil toter Zellen unterhalb von 25% lag (s. Kapitel III, Abb. 14). Das gemessene Fluoreszenzsignal von adhärenten Zellen der Deletionsstämme wurde jeweils auf die gemessenen Werte der *H. salinarum* Wildtyp Zellen normiert (Abb. 43-45, Tabelle 17).

In der Kategorie „Metabolismus“ wurde in Gegenwart 1 mM Cu^{2+} bei ΔOE2042F eine signifikante Verringerung der Adhäsion auf 32% und bei ΔOE4427R auf 74% ermittelt, während ΔOE5146R eine Zunahme auf 122% zeigte. Die Adhäsion von ΔOE3221F und ΔOE2044F war im Vergleich zum Wildtyp nahezu unverändert. In Gegenwart von 1 mM Ni^{2+} wurde bei ΔOE4427R eine verringerte Adhäsion auf 76% ermittelt, während die anderen Deletionsstämme jeweils eine Erhöhung auf bis zu 138% im Fall von ΔOE2044F aufwiesen (Abb. 43A, Tabelle 17). Für die Untersuchung der Auswirkung von Metallionen auf reife Biofilme erfolgte eine Anzucht von Biofilmen für 14 Tage in Komplexmedium. Anschließend wurden jeweils 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} hinzugegeben und die Biofilme wurden für 24 h inkubiert. Es folgte die Quantifizierung der Adhäsion in den Kavitäten, wobei die Messungen der Deletionsmutanten jeweils auf den Wildtyp normiert wurden. Nach Cu^{2+}-Behandlung zeigte ΔOE3221F eine Erhöhung der Adhäsion auf 112%, während die Adhäsion bei ΔOE4427R auf 89% verringert war. Im Fall von ΔOE2042F, ΔOE2044F und ΔOE5146R wurden keine signifikanten Änderungen der Adhäsion im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Die Zugabe von Ni^{2+} führte bei ΔOE3221F zu einer starken Erhöhung der Adhäsion auf 132%, während die Adhäsion der restlichen Deletionsstämme nahezu unverändert war (Abb. 43B, Tabelle 17).

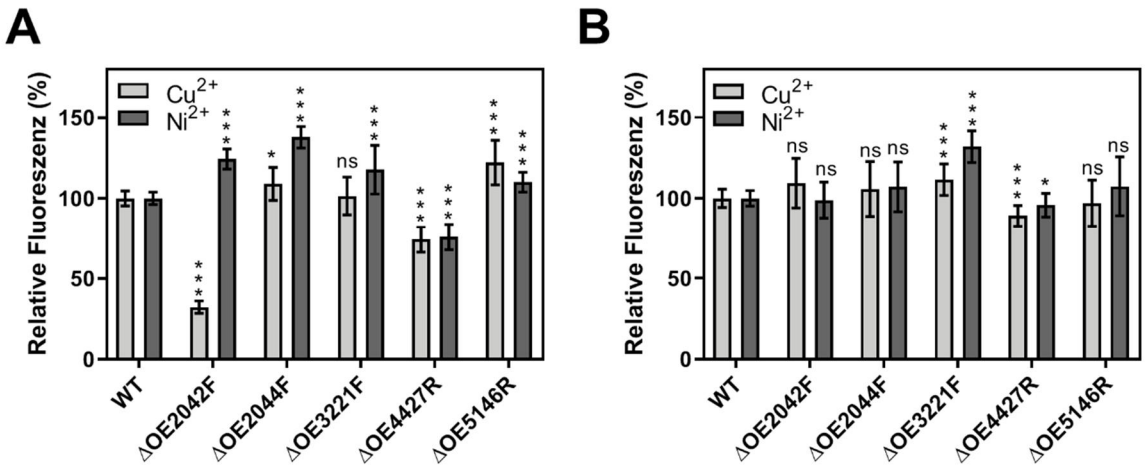


Abbildung 43. Quantifizierung der Adhäsion in *H. salinarum* Deletionsmutanten der Kategorie „Metabolismus“ und Wildtyp unter Einfluss von Kupfer- und Nickelionen. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten. **(A)** Adhäsion über einen Zeitraum von 15 Tagen in Gegenwart von jeweils 1 mM Cu^{2+} und Ni^{2+} **(B)** Adhäsion nach einer 24 h Inkubation von reifen Biofilmen mit 5 mM Cu^{2+} und 40 mM Ni^{2+}. Die gemessenen Fluoreszenzsignale der Deletionsmutanten wurden jeweils auf den Wildtyp normiert (ns, nicht signifikant; *, signifikant = $p < 0,05$; ** hoch signifikant $p < 0,01$; *** extrem signifikant = $p < 0,001$).

Vergleichende Untersuchungen der Deletionsstämme aus der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ zeigten nach einer 15-tägigen Inkubation in Gegenwart von 1 mM Cu^{2+} eine leicht erhöhte Adhäsion von ΔOE5245F und ΔOE5246R auf 111 bzw. 114%. Im Gegensatz hierzu wurde bei ΔOE4612F eine Verringerung auf 81% ermittelt, während ΔOE4544R keine Veränderung der Adhäsion zeigte. Die Gegenwart von 1 mM Ni^{2+} führte bei ΔOE5246R und ΔOE4544R zu einer starken Erhöhung der Adhäsion auf 138 bzw. 177%, während bei ΔOE5245F und ΔOE4612F keine starke Änderung beobachtet wurde (Abb. 44A, Tabelle 17). Untersuchungen der Adhäsion von reifen Biofilmen nach einer 24 h Inkubation mit 5 mM Cu^{2+} zeigten im Fall von ΔOE5245F eine Erhöhung auf 137%, während bei den anderen Deletionsstämmen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp ermittelt wurden. Die Zugabe von 40 mM Ni^{2+} führte bei ΔOE5246R und ΔOE4544R zu einer leicht erhöhten Adhäsion, während ΔOE5245F eine starke Erhöhung auf 133% aufwies. Die gemessene Adhäsion von ΔOE4612F zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Veränderung (Abb. 44B, Tabelle 17).

In den Kategorien „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ sowie „Uncharakterisierte Proteine“ wurde in Gegenwart von 1 mM Cu^{2+} im Fall von ΔOE3125R eine auf 80% verringerte Adhäsion ermittelt, während die anderen Deletionsstämme keine starken Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Abb. 45A Tabelle 17). Die Kultivierung in Gegenwart von 1 mM Ni^{2+} resultierte im Fall von ΔOE6177F und ΔOE2816F in einer stark erhöhten Adhäsion auf 131 bzw. 176%, während die Adhäsion bei ΔOE3050F auf 78% verringert war und bei ΔOE3125R keine Änderung zum Wildtyp zeigte. Die 24 h Inkubation von Biofilmen mit 5 mM Cu^{2+} führte bei OE3050F und ΔOE2816F zu einer leicht verringerten Adhäsion auf 92 bzw. 89%, während bei ΔOE6177F eine leichte Erhöhung auf 113% ermittelt wurde. Biofilme, welche mit 40 mM Ni^{2+} behandelt wurden, zeigten im Fall von ΔOE3125R eine leichte Erhöhung der Adhäsion auf 108%, während bei ΔOE2816F eine Verringerung auf 92% beobachtet wurde (Abb. 45B, Tabelle 17).

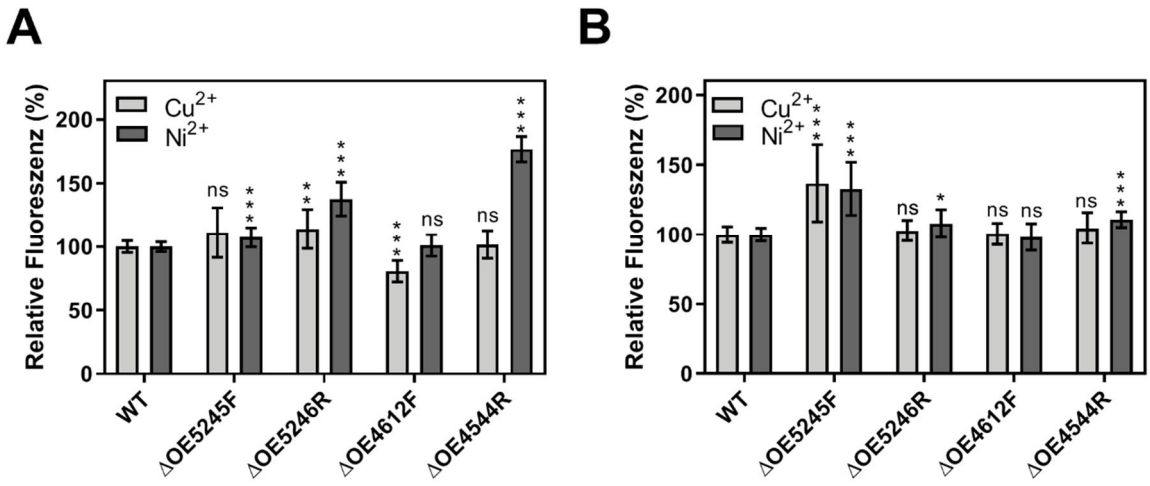


Abbildung 44. Quantifizierung der Adhäsion in *H. salinarum* Deletionsmutanten der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ und Wildtyp unter Einfluss von Kupfer- und Nickelionen. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten. **(A)** Adhäsion über einen Zeitraum von 15 Tagen in Gegenwart von jeweils 1 mM Cu^{2+} und Ni^{2+} **(B)** Adhäsion nach einer 24 h Inkubation von reifen Biofilmen mit 5 mM Cu^{2+} und 40 mM Ni^{2+}. Die gemessenen Fluoreszenzsignale der Deletionsmutanten wurden jeweils auf den Wildtyp normiert (ns, nicht signifikant; *, signifikant = $p < 0,05$; ** hoch signifikant $p < 0,01$; *** extrem signifikant = $p < 0,001$).

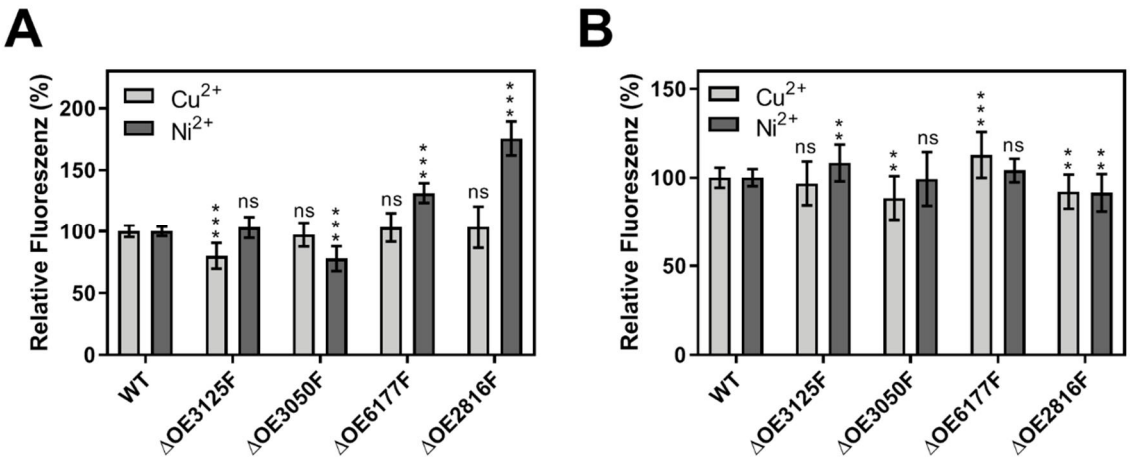


Abbildung 45. Quantifizierung der Adhäsion in *H. salinarum* Deletionsmutanten der Kategorien „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ sowie „Uncharakterisierte Proteine“ und Wildtyp unter Einfluss von Kupfer- und Nickelionen. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte mit einem Fluoreszenz-basierten Adhäsionstest in 24-Kavitäten Mikrotiterplatten. **(A)** Adhäsion über einen Zeitraum von 15 Tagen in Gegenwart von jeweils 1 mM Cu^{2+} und Ni^{2+} **(B)** Adhäsion nach einer 24 h Inkubation von reifen Biofilmen mit 5 mM Cu^{2+} und 40 mM Ni^{2+}. Die gemessenen Fluoreszenzsignale der Deletionsmutanten wurden jeweils auf den Wildtyp normiert (ns, nicht signifikant; *, signifikant = $p < 0,05$; ** hoch signifikant $p < 0,01$; *** extrem signifikant = $p < 0,001$).

Tabelle 17. Quantifizierung der Zelladhäsion in Gegenwart von Kupfer- oder Nickelionen.

		Adhäsion nach 15 d (%)*		Adhäsion nach 24 h (%)*	
Funktionale Kategorie	**Bezeichnung**	**Cu^{2+}**	**Ni^{2+}**	**Cu^{2+}**	**Ni^{2+}**
Metabolismus	ΔOE2042F	32,2	124,3	109,4	98,8
	ΔOE2044F	108,9	137,9	105,8	107,0
	ΔOE3221F	101,5	117,8	111,6	132,0
	ΔOE4427R	74,1	75,8	89,0	95,6
	ΔOE5146R	122,2	110,1	96,9	107,4
Zelluläre Prozesse und Signalisierung	ΔOE5245F	111,2	107,5	136,9	132,9
	ΔOE5246R	114,1	137,7	103,0	108,1
	ΔOE4612F	80,6	101,0	100,5	98,3
	ΔOE4544R	101,7	176,7	104,8	111,0
Informations-speicherung- und Verarbeitung	ΔOE3125R	79,9	103,1	96,8	108,3
	ΔOE3050F	97,3	77,7	88,6	99,4
	ΔOE6177F	103,2	131,3	112,9	104,2
Uncharakterisiert	ΔOE2816F	103,4	175,5	92,2	91,5

*Zelladhäsion der Deletionsmutanten in LAU/mm^2 wurden auf den Wildtyp normiert.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf die Biofilmarchitektur von reifen Biofilmen der Deletionsmutanten erfolgten dreidimensionale fluoreszenzmikroskopische Analysen. Hierzu wurden Biofilme der Deletionsmutanten und des Wildtyps für 14 Tage in kleinen Kulturschalen mit Komplexmedium angezogen und für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Zur Kontrolle wurden außerdem unbehandelte Biofilme mitgeführt. Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erfolgte eine Färbung der Biofilme mit den Fluoreszenzfarbstoffen AO zur Färbung der Zellen sowie mit Concanavalin A (ConA) zur Färbung von Glykosidbindungen in der extrazellulären Matrix. Zur Entfernung von planktonischen Zellen und Rückständen der Farbstoffe wurden die Biofilme zudem gewaschen. Bei den Biofilmen des unbehandelten Wildtyps wurde eine dünne Zellschicht von adhärenten Zellen sowie turmförmige Mikrokolonien einer Höhe von bis zu 20 μm beobachtet. Die Behandlung mit Cu^{2+} resultierte in einem Ablösen der adhärenten Zellen, wobei größtenteils Zellaggregate mit erhöhten Mengen von ConA-gefärbten Glykosidbindungen beobachtet wurden. Untersuchungen der Biofilmarchitektur des Wildtyps nach Ni^{2+}-Behandlung zeigten eine erhöhte Menge von adhärenten Zellen auf der Oberfläche sowie die Bildung von großen Mikrokolonien (Abb. 46-48).

Untersuchungen der Biofilmarchitektur von den Deletionsmutanten der Kategorie „Metabolismus“ zeigten im unbehandelten Zustand bei ΔOE2042F, ΔOE2044F und ΔOE5146R eine erhöhte Anzahl von voluminösen Mikrokolonien, während bei ΔOE3221F und ΔOE4427R keine Unterschiede zum Wildtyp beobachtet wurden (Abb. 46, Tabelle 18). Nach einer 24 h Behandlung mit Cu^{2+} wurden keine signifikanten Unterschiede der Biofilmarchitektur im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Untersuchungen der Biofilmarchitektur nach Ni^{2+}-Behandlung zeigten größtenteils keine signifikanten Veränderungen der Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp. Nur im Fall von ΔOE5146R führte die Ni^{2+}-Behandlung zu einer

auffällig dichten und flächigen Biofilmstruktur mit einer maximalen Höhe von 10 μm (Abb. 46, Tabelle 18).

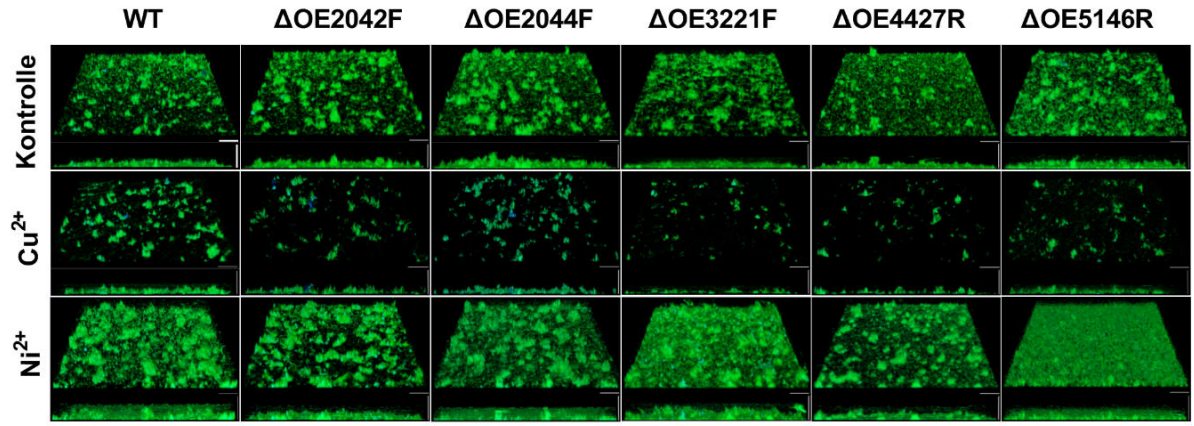


Abbildung 46. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der dreidimensionalen Biofilmstruktur von *H. salinarum* Wildtyp und Deletionsmutanten der Kategorie „Metabolismus“ nach Metallionenbehandlung. Biofilme wurden 14 Tage in Komplexmedium angezogen und für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Biofilme. Fluoreszenzfärbung der Biofilme mit den Fluoreszenzfarbstoffen AO (grünes Signal) zur Färbung von Zellen und ConA (blaues Signal) zur Färbung von Glykosidbindungen in den EPS. Darstellung einer geneigten Ansicht (oben) und der entsprechenden Seitenansicht (unten). Der Größenmaßstab beträgt 25 µm.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Deletionsstämmen der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ zeigten im unbehandelten Zustand nur bei ΔOE5245F eine veränderte Biofilmarchitektur. Hier wurde eine verstärkte Biofilmbildung mit großflächigen Zellaggregaten beobachtet, welche sich über die gesamte Oberfläche erstreckten (Abb. 47, Tabelle 18). Untersuchungen der Cu^{2+}-behandelten Biofilme zeigten keine Unterschiede zwischen den Deletionsstämmen und dem Wildtyp, während eine Behandlung mit Ni^{2+} bei ΔOE5245F zu einer extrem dichten Biofilmstruktur mit mehrlagigen Zellschichten und einer Vielzahl von großen Zellaggregaten führte (Abb. 47, Tabelle 18).

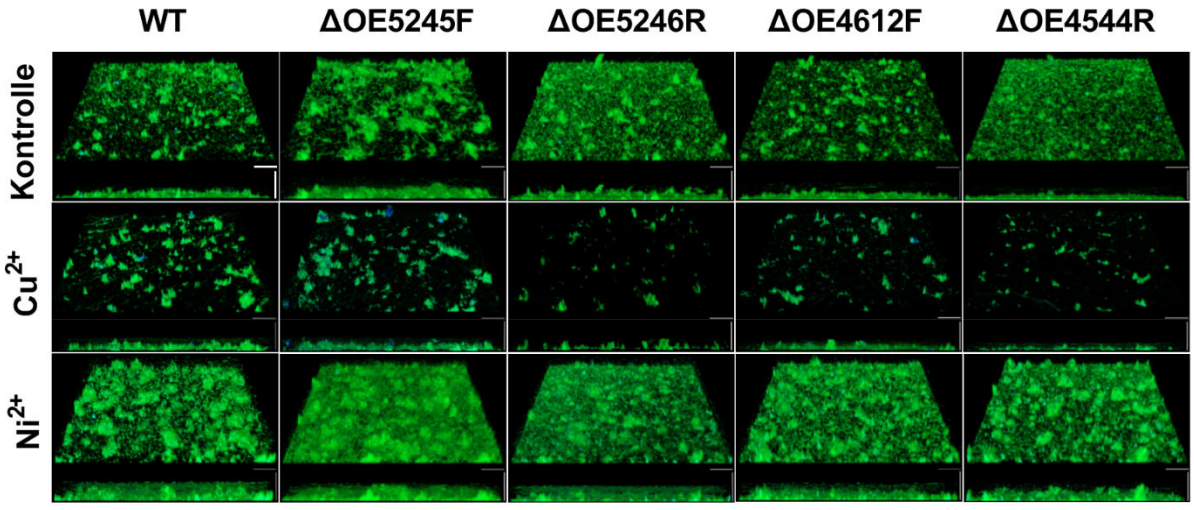


Abbildung 47. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der dreidimensionalen Biofilmstruktur von *H. salinarum* Wildtyp und Deletionsmutanten der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ nach Metallionenbehandlung. Biofilme wurden 14 Tage in Komplexmedium angezogen und für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Biofilme. Fluoreszenzfärbung der Biofilme mit den Fluoreszenzfarbstoffen AO (grünes Signal) zur Färbung von Zellen und ConA (blaues Signal) zur Färbung von Glykosidbindungen in den EPS. Darstellung einer geneigten Ansicht (oben) und der entsprechenden Seitenansicht (unten). Der Größenmaßstab beträgt 25 µm.

Vergleichende Analysen der Biofilmarchitektur von Deletionsmutanten der Kategorie „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ zeigten im unbehandelten Zustand im Fall von ΔOE3050F eine geringere Menge von adhärenten Zellen und Mikrokolonien während bei ΔOE6177F eine im Vergleich zum Wildtyp größere Menge von dichten Mikrokolonien beobachtet wurde (Abb. 48, Tabelle 18). ΔOE3125R und der Deletionsstamm ΔOE2816F aus der Kategorie der uncharakterisierten Proteine zeigten keine Unterschiede der Architektur von unbehandelten Biofilmen, jedoch führte die Behandlung mit Cu^{2+} nur bei diesen Deletionsstämmen zu einem im Vergleich zum Wildtyp verstärkten Ablösen von adhärenten Zellen und Zellaggregaten. In Gegenwart von Ni^{2+} zeigten die drei Deletionsmutanten für Transkriptionsregulatoren, ebenso wie der Wildtyp, eine starke Zunahme von adhärenten Zellen und vergrößerten Zellaggregaten. Nur die Deletion von OE2816F zeigte nach Ni^{2+}-Behandlung eine Verringerung der Biofilmmasse, was auf eine wichtige Rolle des Proteins bei der Bildung des Ni^{2+}-spezifischen Biofilmphänotyps schließen lässt (Abb. 48, Tabelle 18).

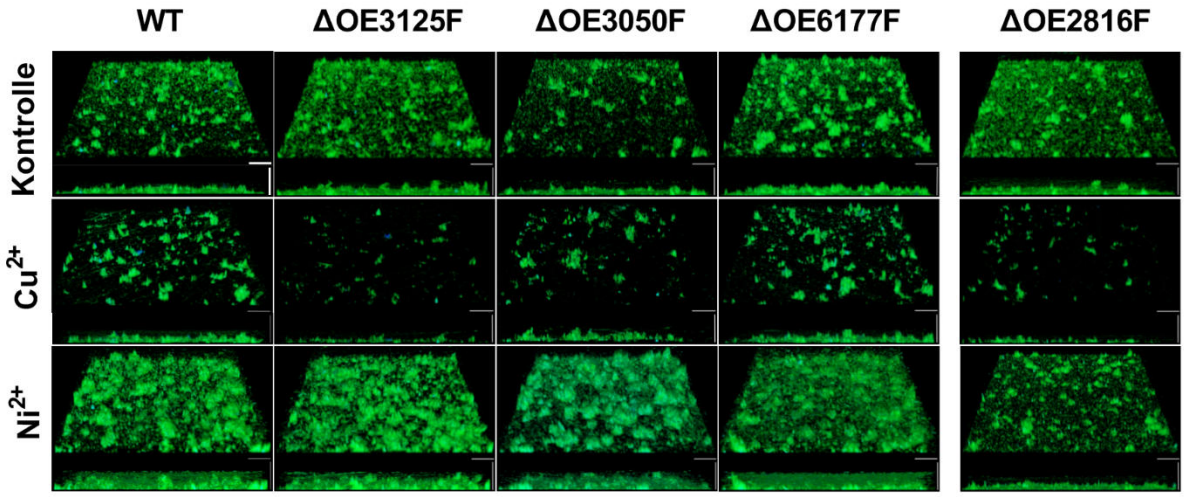


Abbildung 48. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der dreidimensionalen Biofilmstruktur von *H. salinarum* Wildtyp und Deletionsmutanten der Kategorien „Informtionsspeicherung- und Verarbeitung“ und „Uncharakterisierte Proteine“ nach Metallionenbehandlung. Biofilme wurden 14 Tage in Komplexmedium angezogen und für 24 h mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+} inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Biofilme. Fluoreszenzfärbung der Biofilme mit den Farbstoffen AO (grünes Signal) zur Färbung von Zellen und ConA (blaues Signal) zur Färbung von Glykosidbindungen in den EPS. Darstellung einer geneigten Ansicht (oben) und der entsprechenden Seitenansicht (unten). Der Größenmaßstab beträgt 25 µm.

Tabelle 18. Änderung der Biofilmarchitektur der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp*.

Funktionale Kategorie	Bezeichnung	Unbehandelt	Cu^{2+}	Ni^{2+}
Metabolismus	ΔOE2042F	↑	-	-
	ΔOE2044F	↑	-	-
	ΔOE3221F	-	-	-
	ΔOE4427R	-	-	-
	ΔOE5146R	↑	-	↑
Zelluläre Prozesse und Signalisierung	ΔOE5245F	↑	-	↑
	ΔOE5246R	-	-	-
	ΔOE4612F	-	-	-
	ΔOE4544R	-	-	-
Informationsspeicherung- und Verarbeitung	ΔOE3125R	-	↓	-
	ΔOE3050F	↓	-	-
	ΔOE6177F	↑	-	-
Uncharakterisiert	ΔOE2816F	-	↓	↓

*Untersuchung der Biofilmarchitektur durch fluoreszenzmikroskopische Analysen. (↑) Erhöhte Anzahl von Mikrokolonien/adhärenten Zellen im Vergleich zum Wildtyp, (↓) verringerte Anzahl von Mikrokolonien/adhärenten Zellen im Vergleich zum Wildtyp.

5.2.5 Nachweis von Proteaseaktivität in Wildtyp und Deletionsmutanten

Proteasen sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei Stressreaktionen und der Lebensfähigkeit bakterieller und achaealer Zellen (Giménez *et al.*, 2015, Culp & Wright, 2017). Zur Untersuchung der Aktivität von Proteasen in *H. salinarum* Wildtyp und den Deletionsmutanten wurden die Kulturen auf Festmedium mit Magermilch ausgestrichen und über einen Zeitraum von 20 Tagen inkubiert. Die Aktivität von Proteasen wurde durch den Abbau von Magermilchproteinen, welche eine Trübung des Agars verursachen, überprüft. Im Fall des *H. salinarum* Wildtyps wurde bereits nach einer zehntägigen Inkubation im Bereich der ausgestrichenen Zellen ein schwaches Aufklaren (= Abbau der zugesetzten Magermilch) beobachtet, welches nach 20 Tagen deutlicher wurde (Abb. 49-51).

Untersuchungen der Deletionsmutanten aus der Kategorie „Metabolismus“ zeigten bei ΔOE2042F und ΔOE5146R bereits nach zehn Tagen Inkubation einen Abbau deutlichen der Magermilchproteine im Bereich der ausgestrichenen Zellen, welches sich nach 20 Tagen stärker ausbreitete. Im Fall von ΔOE5146R war sogar fast der gesamte Agar aufgeklart. Im Gegensatz hierzu zeigten die Stämmen ΔOE2044F und ΔOE3221F weder nach zehn, noch nach 20 Tagen Inkubation eine sichtbare Aktivität von Proteasen. Untersuchungen des Deletionsstammes ΔOE4427R zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 49, Tabelle 19).

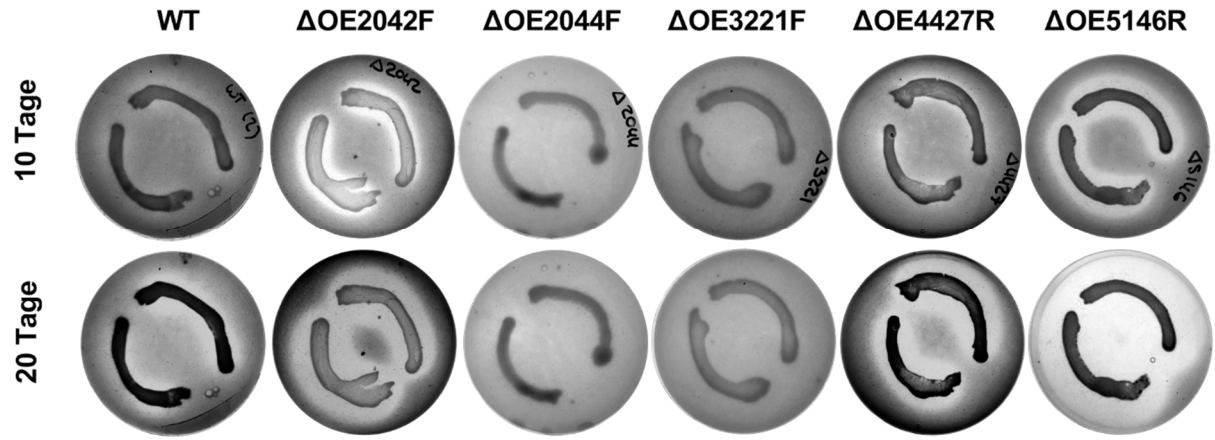


Abbildung 49. Nachweis der Proteaseaktivität in *H. salinarum* Wildtyp und Deletionsmutanten der Kategorie „Metabolismus“. Die Zellen wurden auf Festmedium mit 1% Magermilch ausgestrichen und für 20 Tage inkubiert. Zur Bestimmung von Proteaseaktivität wurde der Abbau der Magermilchproteine nach zehn und 20 Tagen Inkubation überprüft.

Vergleichende Untersuchungen in der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung“ zeigten, dass die Deletion von OE4544R bereits nach zehn Tagen zu einem Abbau der Magermilchproteine im Bereich der Zellen führte, sodass der Agar nach 20 Tagen komplett aufgeklart war. Im Gegensatz hierzu zeigten die Deletionsmutanten ΔOE5245F, ΔOE5246R und ΔOE4612F keine Proteaseaktivität (Abb. 50A). Im Weiteren wurde untersucht, ob die Gegenwart von Kupfer- bzw. Nickelionen die Aktivität von Proteasen beeinflusst. Hierzu wurden jeweils 0,1 mL einer 5 mM Kupfer- bzw. 40 mM Nickellösung auf Magermilchplatten ausplattiert und die Zellkulturen nach Trocknung der Platten darauf ausgestrichen. Im Vergleich zu den unbehandelten Platten zeigte der Wildtyp in Gegenwart von Cu^{2+} bereits nach zehn Tagen einen stärkeren Abbau der Magermilchproteine, welcher sich nach 20 Tagen weiter ausbreitete. Die Gegenwart von Ni^{2+} resultierte bereits nach zehn Tagen ebenfalls in einer stärkeren Proteaseaktivität, sodass nach 20 Tagen fast der komplette Agar aufgeklart war (Abb. 50B, Tabelle 19). Ähnliche Untersuchungen erfolgten mit Zellen der Deletionsmutante ΔOE4612F, um zu überprüfen, ob die OE4612F-kodierte Serinprotease an der Cu^{2+}- und Ni^{2+}-induzierten Proteaseaktivität beteiligt ist. Die Auswertung der Agarplatten zeigte weder in Gegenwart von Cu^{2+} noch von Ni^{2+} eine Aktivität von Proteasen, was darauf hindeutet, dass die OE4612F kodierte Serinprotease eine wichtige Rolle in der Cu^{2+}- und Ni^{2+}-induzierten Proteaseaktivität spielen könnte (Abb. 50B, Tabelle 19).

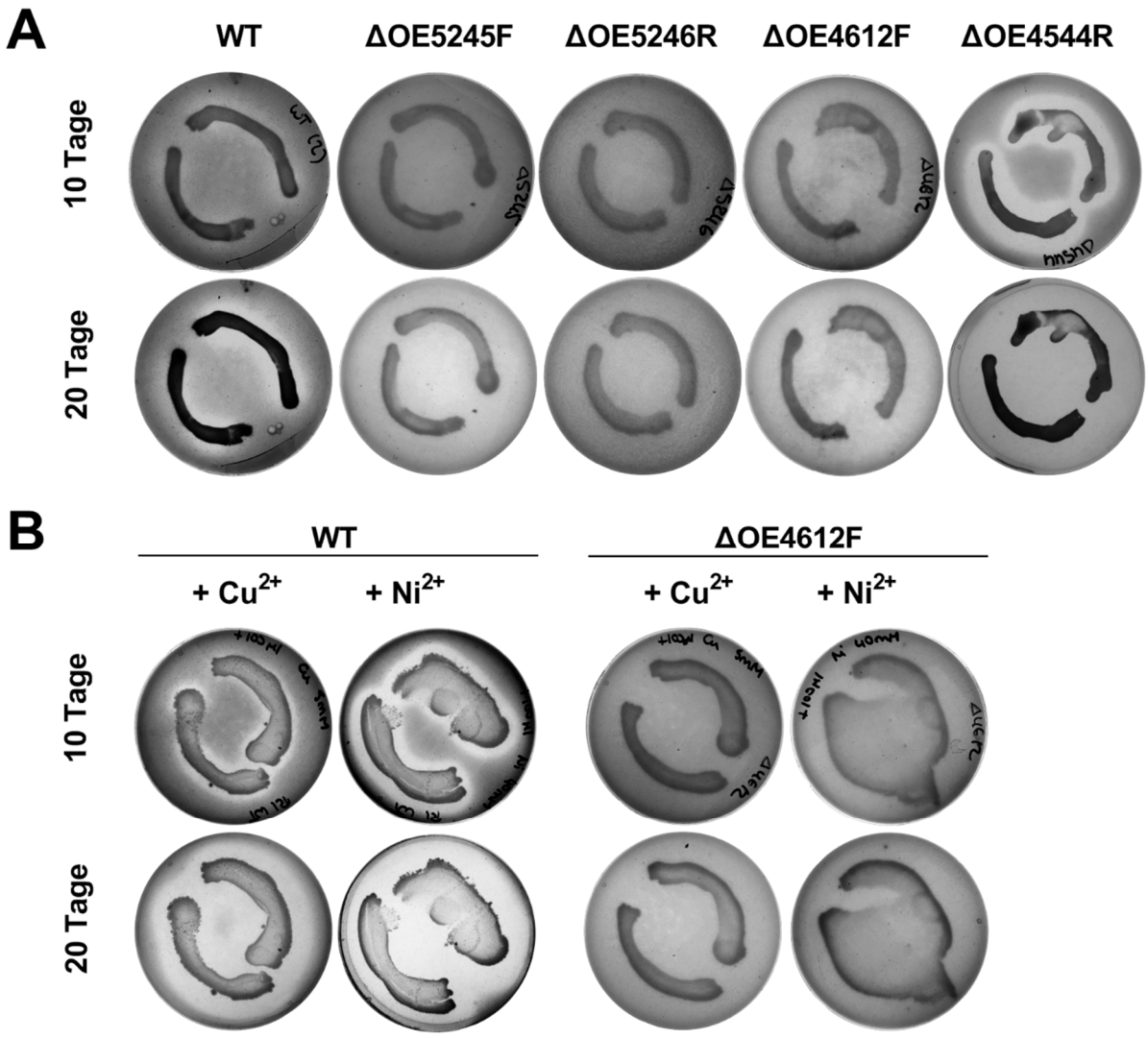


Abbildung 50. Nachweis der Proteaseaktivität in *H. salinarum* Wildtyp und Deletionsmutanten der Kategorie „Zelluläre Prozesse und Signalisierung". Die Zellen wurden auf Magermilchplatten ausplattiert und für 20 Tage inkubiert. **(A)** Magermilchplatten ohne Zugabe von Metallionen. **(B)** Magermilchplatten wurden mit 5 mM Kupfer- bzw. 40 mM Nickellösung versetzt. Zur Bestimmung von Proteaseaktivität wurde der Abbau der Magermilchproteine nach zehn und 20 Tagen Inkubation überprüft.

Untersuchungen der Proteaseaktivität bei den drei Deletionsmutanten für Transkriptionsregulatoren zeigten bereits nach zehn Tagen einen Abbau der Magermilchproteine, welcher nach 20 Tagen auf der gesamten Platten ausgebreitet war. Dementgegen wurde im Fall der Deletion von OE2816F aus der Kategorie der uncharakterisierten Proteine nach zehn und 20 Tagen nur ein schwaches Aufklaren in einem kleinen Bereich um die Zellen beobachtet (Abb. 451A, Tabelle 19). Um zu überprüfen, ob die Gegenwart von Cu^{2+} oder Ni^{2+} bei ΔOE2816F zu einer erhöhten Proteaseaktivität führt, wurden die Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen auf Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-beschichteten Agarplatten ausgestrichen. Ein Vergleich der Ausstriche zeigte nach zehn Tagen Inkubation bereits einen Abbau der Magermilchproteine um die Wildtyp-Zellen, während bei der Deletionsmutante weder nach zehn, noch nach 20 Tagen eine Proteaseaktivität nachgewiesen wurde (Abb. 51B, Tabelle 19).

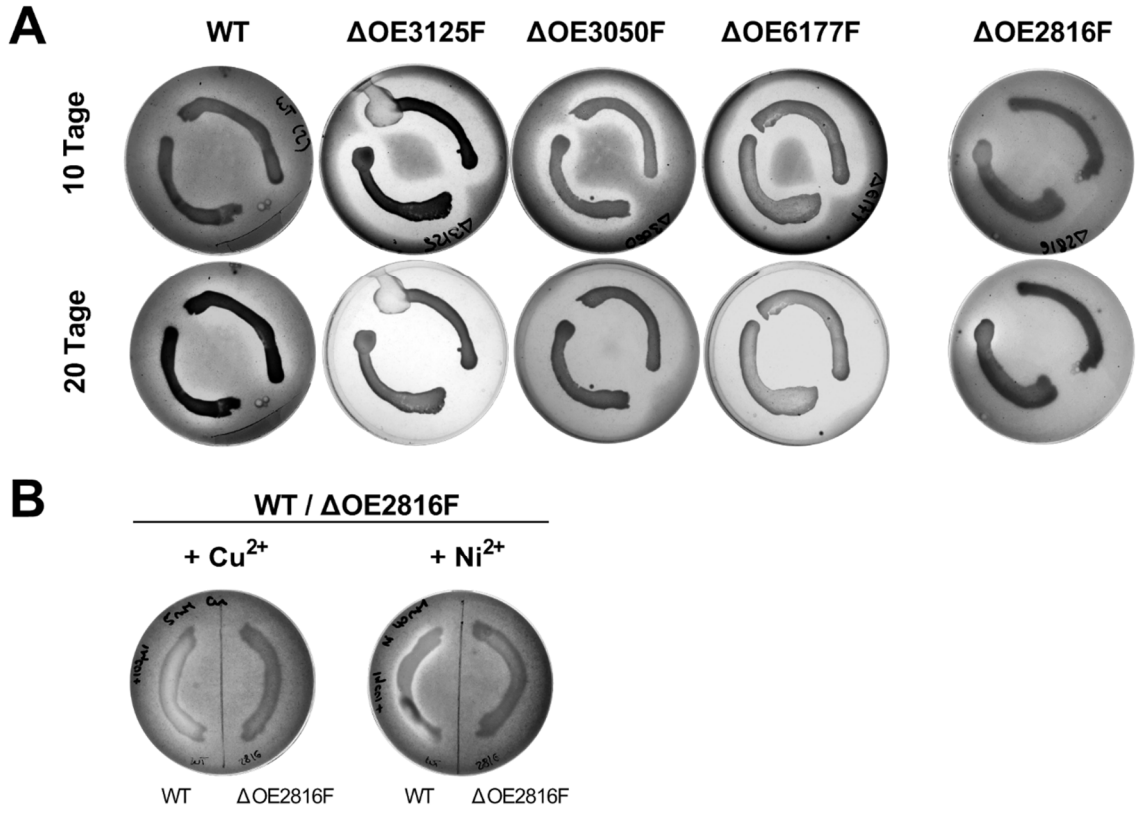


Abbildung 51. Nachweis der Proteaseaktivität in *H. salinarum* Wildtyp und Deletionsmutanten der Kategorien „Informationsspeicherung- und Verarbeitung“ und „Uncharakterisierte Proteine“. Die Zellen wurden auf Magermilchplatten ausplattiert und für 20 Tage inkubiert. **(A)** Magermilchplatten ohne Zugabe von Metallionen. Zur Bestimmung von Proteaseaktivität wurde der Abbau von Magermilchproteinen nach zehn und 20 Tagen Inkubation überprüft. **(B)** Magermilchplatten wurden mit 5 mM Kupfer- bzw. 40 mM Nickellösung versetzt. Überprüfung der Proteaseaktivität nach zehn Tagen Inkubation.

Tabelle 19. Proteaseaktivität der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Funktionale Kategorie	Bezeichnung	Proteaseaktivität	
Metabolismus	ΔOE2042F	Erhöht	
	ΔOE2044F	Keine	
	ΔOE3221F	Keine	
	ΔOE4427R	Unverändert	
	ΔOE5146R	Erhöht	
Zelluläre Prozesse und Signalisierung	ΔOE5245F	Keine	
	ΔOE5246R	Keine	
	ΔOE4612F	Keine	Cu^{2+}-/Ni^{2+}- Zugabe: Keine Aktivität
	ΔOE4544R	Erhöht	
Informationsspeicherung- und Verarbeitung	ΔOE3125R	Erhöht	
	ΔOE3050F	Erhöht	
	ΔOE6177F	Erhöht	
Uncharakterisiert	ΔOE2816F	Schwach	Cu^{2+}-/Ni^{2+}- Zugabe: Keine Aktivität

5.2.6 Charakterisierung von Deletionsmutanten im Überblick

Um die Funktion von bestimmten Genen bei der Metallionen-spezifischen Stressreaktion in *H. salinarum* zu analysieren, erfolgten Deletionen von insgesamt 13 Genen, welche mittels Sequenzierung und Southern-Analyse verifiziert wurden. Die Auswirkung der einzelnen Gendeletionen im Hinblick auf Metallionenstress wurde durch Untersuchungen des Wachstums, der Adhäsion und Biofilmbildung sowie der Aktivität von Proteasen überprüft. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 20 zusammengefasst und zeigen, dass bereits die Deletion eines Gens zu diversen Veränderungen der Zelleigenschaften im Vergleich zum Wildtyp führt. Dies wurde bei allen der hier untersuchten Deletionsmutanten gezeigt. Es wurden bereits Auswirkungen auf Wachstum, Adhäsion und Biofilmbildung auch ohne den Einfluss von Metallionen beobachtet. Untersuchungen der Sensitivität gegenüber Cu^{2+} und Ni^{2+} zeigten bei sechs Deletionsmutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Nickelionen, während in Gegenwart von Kupferionen eine leicht erhöhte Sensitivität bei ΔOE4544R und eine sehr stark erhöhte Sensitivität bei ΔOE2042F beobachtet wurde. Die Deletion von OE2042F, welches für eine Kupfer-transportierende ATPase kodiert, resultierte in Gegenwart von Cu^{2+} zudem in einem Abrunden planktonischer Zellen sowie in einer stark verringerten Zelladhäsion im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz hierzu wurden bei Zugabe von Cu^{2+} auf reife Biofilme keine Unterschiede der Adhäsion sowie der Biofilmarchitektur zwischen ΔOE2042F und dem Wildtyp beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Zellen des Biofilms durch die EPS besser geschützt sind. Im Allgemeinen wurden in Gegenwart von 1 mM Cu^{2+} und Ni^{2+} bei allen Deletionsmutanten signifikante Auswirkungen auf die Adhäsion beobachtet, während die Adhäsion von reifen Biofilmen nach einer 24 h Inkubation mit deutlich höheren Metallionenkonzentrationen nur bei sechs Deletionsmutanten verändert war, was darauf hindeutet, dass reife Biofilme vor Umwelteinflüssen geschützt sind und Metallionen nach außen abschirmen. Die stärksten Auswirkungen auf die Biofilmarchitektur im Vergleich zum Wildtyp wurden bei ΔOE5245F und ΔOE2816F nach Zugabe von Nickelionen beobachtet. Während bei ΔOE5245F eine im Vergleich zum Wildtyp stark erhöhte Biofilmmasse beobachtet wurde, zeigten ΔOE2816F Biofilme im Gegensatz zum Wildtyp keine Veränderungen der Biofilmarchitektur nach Ni^{2+}-Exposition, was darauf hindeutet, dass OE2816F an der Ni^{2+}-spezifisch veränderten Biofilmarchitektur beteiligt sein könnte (Tabelle 20). Untersuchungen der Proteaseaktivität zeigten eine schwache Aktivität von Wildtypzellen, welche durch die Gegenwart von Cu^{2+} oder Ni^{2+} stark erhöht wurde. Im Fall einer Deletion der Serinprotease Halolysin, Hly (Gen OE4612F) wurde ein Verlust der Proteaseaktivität beobachtet, welche auch bei Zugabe von Cu^{2+} oder Ni^{2+} nicht induziert wurde. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass diese Protease eine Schlüsselfunktion in der Cu^{2+}- und Ni^{2+}-induzierten Stressreaktion in *H. salinarum* einnimmt und eine wichtige Rolle im Abwehrmechanismus der Zellen spielt. Des Weiteren führte die Deletion der drei Transkriptionsregulatoren zu einer stark erhöhten Proteaseaktivität in unbehandelten Zellen, was darauf hindeutet, dass diese Proteine als Repressoren an der Transkriptionsregulation der Serinprotease beteiligt sein könnten.

Tabelle 20. Charakterisierung der Gendeletionsmutanten im Vergleich zum *H. salinarum* R1 Wildtyp[1].

	Deletionsmutante	Charakterisierung ohne Metallionen: Wachstum planktonisch	Charakterisierung ohne Metallionen: Adhäsion 15 d[2]	Charakterisierung ohne Metallionen: Biofilm	Sensitivität: Cu^{2+}	Sensitivität: Ni^{2+}	Zellform	Quantifizierung der Adhäsion 15 d[2]: Cu^{2+}	Quantifizierung der Adhäsion 15 d[2]: Ni^{2+}	Quantifizierung der Adhäsion 24 h[3]: Cu^{2+}	Quantifizierung der Adhäsion 24 h[3]: Ni^{2+}	Biofilmarchitektur[3]: Cu^{2+}	Biofilmarchitektur[3]: Ni^{2+}	Proteaseaktivität
Metabolismus	ΔOE2042F	+	++	+	+++	0	abgerundet (Cu^{2+})	---	+	0	0	0	0	+
	ΔOE2044F	+	+	+	0	0	0	0	++	0	0	0	0	-
	ΔOE3221F	0	+	0	0	+	0	0	+	+	++	0	0	-
	ΔOE4427R	-	0	0	0	+	0	-	-	-	0	0	0	0
	ΔOE5146R	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	++
Zelluläre Prozesse und Signalisierung	ΔOE5245F	0	0	++	0	+++	0	+	0	++	++	0	++	-
	ΔOE5246R	-	0	0	0	0	verlängert (Cu^{2+})	+	++	0	0	0	0	-
	ΔOE4612F	0	0	0	0	++	0	-	0	0	0	0	0	- (Cu^{2+}: -; Ni^{2+}: -)
	ΔOE4544R	0	++	0	+	0	0	0	+++	0	+	0	0	++
Informationsspeicherung- und Verarbeitung	ΔOE3125R	0	++	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	++
	ΔOE3050F	0	-	-	0	0	0	0	-	-	0	-	0	++
	ΔOE6177F	0	0	+	0	+	0	0	++	+	0	0	0	++
n. ch.	ΔOE2816F	-	0	0	0	+	verlängert (Cu^{2+})	0	+++	0	0	-	--	0 (Cu^{2+}: -; Ni^{2+}: -)

[1]Eigenschaften der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp wurden in folgende Kategorien unterteilt 0 = kein Effekt, +/- moderate Erhöhung/Verringerung, ++/-- starke Erhöhung/Verringerung, +++/--- sehr starke Erhöhung/Verringerung.
[2]Quantifizierung der Adhäsion nach 15 Tagen Kultivierung in Komplexmedium bzw. Komplexmedium mit 1 mM Cu^{2+}-/Ni^{2+}.
[3]Quantifizierug der Adhäsion von reifen Biofilmen nach einer 24 h Inkubation mit 5 mM Cu^{2+} bzw. 40 mM Ni^{2+}.

5.3 Diskussion

5.3.1 Gendeletionen in *H. salinarum* R1 führen zu diversen Auswirkungen auf die zellulären Reaktionen im Umgang mit Metallionenstress

Die Untersuchungen der Auswirkung der bivalenten Metallionen Cu^{2+} und Ni^{2+} auf *H. salinarum* R1 zeigten umfassende Reaktionen in planktonischen Zellen und Biofilmen, wobei Biofilme Metall-spezifisch reagierten. Entsprechend resultierte die Cu^{2+}-Zugabe in einem Ablösen sessiler Zellen, während die Anwesenheit erhöhter Ni^{2+}-Konzentrationen eine vermehrte Biofilmbildung zur Folge hatte. Quantitative Untersuchungen der EPS in dieser Arbeit zeigten, dass die EPS bis zu 83% der Metallionen im Biofilm absorbieren, sodass Biofilmzellen im Vergleich zu planktonischen Zellen bis zu 32-fach verringerten Metallionen-Konzentrationen ausgesetzt sind. Dies lässt auf eine wichtige Funktion der EPS in der Biofilm-vermittelten Metallionenresistenz schließen. Eine globale Proteomstudie von Metallionen-behandelten und unbehandelten planktonischen Zellen und Biofilmen in dieser Arbeit zeigte zudem umfassende molekulare Veränderungen nach Metallionenstress, was darauf hindeutet, dass neben den EPS weitere molekulare Resistenzmechanismen in *H. salinarum* existieren. Die Vielzahl von Proteinen mit signifikant veränderten Abundanzen aus verschiedenen funktionalen Kategorien nach Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Stress lässt auf eine komplexe Verschaltung von regulatorischen Netzwerken schließen, deren Zusammenwirken eine spezifische Stressreaktion der Zellen zur Folge hat. Um die Funktion einzelner Gene im Umgang mit Metallionen zu untersuchen, wurden Gendeletionsmutanten erstellt und deren Umgang mit Metallionen hinsichtlich des Wachstums, der Metall-Sensitivität, der Adhäsion und Biofilmbildung sowie der Proteaseaktivität charakterisiert. Hierbei zeigte jeder der Deletionsstämme mindestens einen Metallionen-bedingten Effekt im Vergleich zum Wildtyp, was darauf schließen lässt, dass diese Gene eine wichtige Rolle im Umgang mit Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Stress einnehmen. Die kombinierten Ergebnisse der Proteomstudie und der Charakterisierung der Deletionsstämme sollten dabei eine Vorstellung vermitteln, welche Funktion die entsprechenden Proteine auf molekularer Ebene einnehmen (Abb. 52).

5.3.2 Transkriptionsregulatoren und universale Stressproteine beeinflussen die Expression bzw. Aktivität von Proteasen

Untersuchungen des *H. salinarum* R1 Proteoms im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Exposition der Zellen mit Cu^{2+} und Ni^{2+} zu starken Änderungen der relativen Häufigkeiten von Transkriptionsregulatoren führte. Diese sind Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerks und spielen eine zentrale Rolle im Umgang mit Stress. Studien des nahe verwandten *H. salinarum* NRC-1 zeigten bereits eine wichtige Funktion eines PadR-Transkriptionsregulators in Verbindung mit oxidativem Stress, welcher in einem komplexen Netzwerk die Transkription von mehr als 100 Zielgenen reguliert (Sharma *et al.*, 2012, Tonner *et al.*, 2015). Neben Transkriptionsregulatoren besitzen universale Stressproteine (UspA) eine weitere regulatorische Rolle im Umgang mit Stress. So zeigten Studien mit *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* eine erhöhte Expression von *uspA* als Reaktion auf verschiedene Umwelteinflüsse sowie beim Übergang in einen Wachstumsarrest Zustand (Nyström & Neidhardt, 1994, Kvint *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2007).

Um die Funktion von Transkriptionsregulatoren und universalen Stressproteinen in *H. salinarum* R1 im Umgang mit Cu^{2+} und Ni^{2+} zu untersuchen, wurden die kodierenden Gene deletiert und die Auswirkungen der Deletion in Gegenwart von Cu^{2+} und Ni^{2+} analysiert. Zu den Zielgenen zählten OE3050F und OE6177F, welche PadR-Transkriptionsregulatoren

kodieren. Ersterer zeigte lediglich hohe Abundanzen nach Ni^{2+}-Exposition im Biofilm, wobei letzterer erhöhte Abundanzen in allen Metallionen-behandelten Proben aufwies. Deletionen der zwei Gene hatten unterschiedliche Effekte zur Folge, wobei ΔOE3050F in einer verringerten Adhäsion und Biofilmbildung resultierte und ΔOE6177F eine erhöhte Biofilmbildung zeigte. Ein dritter Transkriptionsregulator der Cro/C1 Familie wies eine erhöhte Abundanz in Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen auf, während er eine signifikante Verringerung in Metallionen-behandelten Biofilmen zeigte. Transkriptionsregulatoren der Familie Cro/C1 gehören zur Helix-*turn*-Helix (HTH) Proteinfamilie, welche hauptsächlich für DNA-Protein Interaktionen zuständig sind und größtenteils als Repressor fungieren (Aravind & Koonin, 1999). Die Deletion des entsprechenden Gens zeigte zwar keine signifikanten Auswirkungen im Hinblick auf Metallionenstress, jedoch wurde eine erhöhte Proteaseaktivität beobachtet, sodass dieser Repressor möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Expression von Proteasen besitzt. Interessanterweise hatte die Deletion der zwei PadR-Transkriptions-regulatoren eine gleichermaßen erhöhte Proteaseaktivität zur Folge, was darauf schließen lässt, dass diese ebenfalls in der Regulation von Proteasegenen involviert sind (Abb. 52). Ähnliche Effekte wurden auch bei einer Deletion des UspA-kodierenden Gens (OE4544R) beobachtet, was darauf hindeutet, dass UspA Metallionenstress in den Zellen sensiert und Transkriptionsregulatoren über verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Da UspA ausschließlich in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen in einer erhöhten Abundanz auftrat und die Deletion des kodierenden Gens außerdem zu einer erhöhten Adhäsion in Gegenwart von Ni^{2+} führte, scheint UspA zudem eine wichtige regulatorische Funktion in der Ni^{2+}-vermittelten Adhäsion einzunehmen (Tabelle 21, Abb. 52B).

Eine wichtige Rolle in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen scheint außerdem die Serinprotease Halolysin, Hly (Gen OE4612F) einzunehmen. Diese zeigte eine 19,7-fach erhöhte Abundanz in Biofilmen nach Ni^{2+}-Behandlung, während sie in Metallionen-behandelten planktonischen Zellen stark verringert war. Extrazelluläre Proteasen werden hauptsächlich bei hohen Zelldichten produziert und sekretiert, um unter nährstofflimitierenden Bedingungen Oligopeptide, Dipeptide und Aminosäureintermediate für den zentralen Zellstoffwechsel zur Verfügung zu stellen (De Castro *et al.*, 2006). So zeigten Untersuchungen der extrazellulären Serinprotease Halolysin SptA in *Natrinema* sp. J7-2 eine erhöhte Expression in der spätstationären Wachstumsphase, was in einem erhöhten Abbau von Proteinen in der Umgebung resultierte. Darüber hinaus scheint die Protease die Wachstumscharakteristika in Haloarchaea zu beeinflussen, indem sie Zelltod und Lyse beeinflusst (Li *et al.*, 2018). Untersuchungen von *Staphylococcus aureus* Biofilmen zeigten zudem, dass extrazelluläre Proteasen eine wichtige Funktion beim Abbau des Biofilms einnehmen, um die Zelldichte zu regulieren. (Mukherji *et al.*, 2015). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine 1,7-fach erhöhte Zellzahl in Biofilmen nach Ni^{2+}-Behandlung ermittelt wurde, könnte die erhöhte Abundanz der extrazellulären Protease auf eine Regulation der Zelldichte zurückzuführen sein, um den Biofilm abzubauen und die Nährstoffversorgung der Zellen zu verbessern (Abb. 52B). Die Expression der Protease scheint neben einer Zunahme der Zelldichte zudem über externe Umwelteinflüsse wie Cu^{2+} und Ni^{2+} erhöht zu werden. So zeigte der *H. salinarum* Wildtyp in Anwesenheit höherer Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen eine erhöhte Proteaseaktivität, welche im Deletionsstamm vollständig fehlte. Der gleiche Effekt wurde auch beim Deletionsstamm ΔOE2816F beobachtet. Das entsprechende Protein (B0R587) besaß in der Proteomstudie in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen mit einer 33,7-fachen Erhöhung die höchsten Abundanzen im Vergleich zu allen quantifizierten Proteinen. Es handelt sich hierbei um ein uncharakterisiertes

Protein, welches eine TAT-Sequenz für den Export besitzt. Vorangegangene Untersuchungen in diesem Labor legten nahe, dass das Protein Bestandteil der EPS-Matrix in *H. salinarum* ist (Wloch, 2016). Daher ist es nicht verwunderlich, dass dieses Protein im Rahmen einer Proteomstudie von *H. salinarum* im Membranproteom des Organismus identifiziert wurde (Bisle, 2006). Die Deletion des Gens im Rahmen der vorliegenden Arbeit führte zu einer Auflösung der Ni^{2+}-spezifischen Biofilmarchitektur, was die Vermutung nahelegt, dass es sich hierbei um ein extrazelluläres Metallbindeprotein handelt, welches direkt oder indirekt die Aktivität/Abundanz extrazellulärer Proteasen beeinflusst und womöglich eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst, welche die Zellen effektiv auf sich schnell ändernde Metallionenkonzentrationen reagieren lässt (Tabelle 21, Abb. 52).

Tabelle 21. Übersicht von Gen- und Proteinidentifikationsnummern inklusive Datenbank- und manueller Annotation.

Gen-ID	Protein-ID	Proteinbezeichnung (Datenbank-Annotation[1])	Proteinbezeichnung (Manuelle Annotation)
OE2042F *copA*	B0R3Z0 CopA	P-type transport ATPase (Probable substrate copper/metal cation)	-
OE2044F	B0R3Z1	HMA domain protein	Heavy metal chaperone (copper/nickel binding)
OE3221F *cbiX1*	B0R5W1 CbiX1	Sirohydrochlorin cobaltochelatase	-
OE4427R *dpsA*	B0R7W1 DpsA	Ferritin DpsA	-
OE5146R *znuC*	B0R9T5 ZnuC	ABC-type transport system ATP-binding protein (Probable substrate zinc)	ABC-type transport system ATP-binding protein (Probable substrate zinc/nickel)
OE5245F	B0R9Z2	ABC-type transport system ATP-binding protein	ABC-type transport system ATP-binding protein (Probable substrate nickel/copper)
OE5246R	B0R9Z3	ABC-type transport system permease protein	-
OE4612F *hly*	B0R859 Hly	Serine protease halolysin	-
OE4544R	B0R823	UspA domain protein	UspA domain protein (nickel sensitive)
OE3125R	B0R5Q3	Cro/C1 familiy transcription regulator	-
OE3050F	B0R5K7	PadR family transcription regulator	-
OE6177F	B0R8N0	PadR family transcription regulator	-
OE2816F	B0R587	Uncharacterized protein	Extracellular metal-binding sensor protein

[1]Bezeichnung nach der Proteindatenbank UniProtKB (https://www.uniprot.org/).

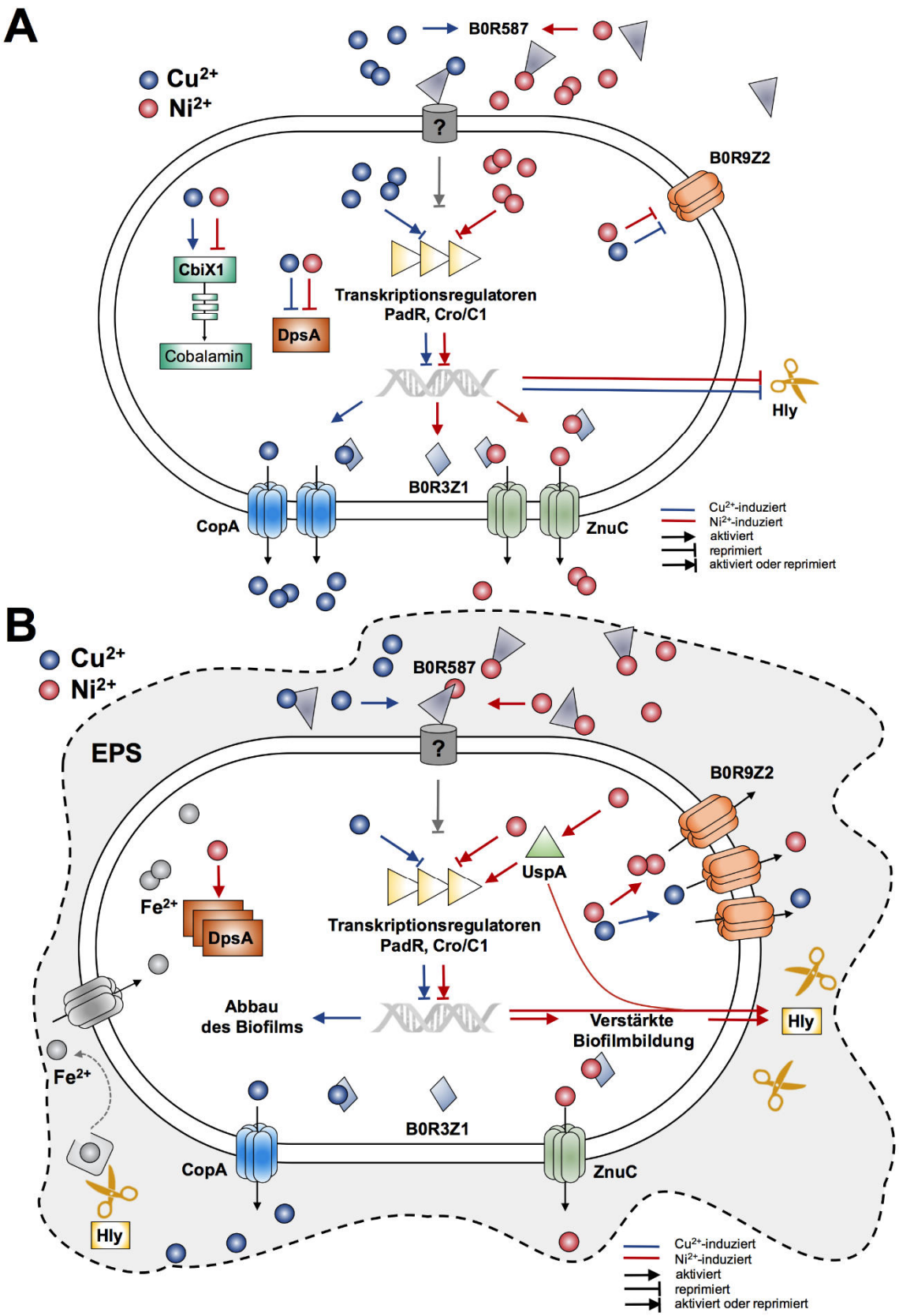


Abbildung 52. Hypothetische Darstellung der molekularen Mechanismen nach Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Stress in *H. salinarum* R1 basierend auf den *fold changes* der in dieser Arbeit durchgeführten Proteomstudie (s. Kapitel IV) in Kombination mit Charakterisierungen der entsprechenden Gendeletionsmutanten (s. Tabelle 13 und Tabellen 20-21 für Details). **(A)** Einfluss auf planktonische Zellen, **(B)** Einfluss auf Biofilme.

5.3.3 Erhöhte intrazelluläre Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen beeinflussen die Metallhomöostase und stören zelluläre Stoffwechselwege

Cu^{2+} und Ni^{2+} gehören zu den essentiellen Schwermetallen, welche an einer Vielzahl von biochemischen und physiologischen Funktionen im Organismus beteiligt sind (Bruins *et al.*, 2000). Dennoch resultieren erhöhte Konzentrationen dieser Metallionen in der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen und einer Schädigung der DNA oder der Zellmembran sowie einer Störung der Proteinfunktion und wirken somit toxisch auf die Zellen (Nies, 1999, Hobman & Crossman, 2015). Quantifizierungen der Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen von planktonischen Zellen nach Metallionenbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen in der vorliegenden Arbeit (s. Kapitel III) zeigten, dass die Zellen eine um mindestens 105-fach erhöhte Cu^{2+}- bzw. 140-fach erhöhte Ni^{2+}-Konzentration aufwiesen, was auf eine erhöhte intrazelluläre Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Konzentration hindeutet. Zudem zeigten Untersuchungen des Proteoms im Fall von Metallionen-behandelten planktonischen Zellen erhöhte Abundanzen von Proteinen in Verbindung mit oxidativem Stress (s. Kapitel IV). Die erhöhten intrazellulären Cu^{2+}-/Ni^{2+}-Konzentrationen scheinen zudem einen starken Einfluss auf die Eisenhomöostase in den Zellen zu haben, was sich im Fall von planktonischen Zellen in einer starken Verringerung der Abundanz des Eisen-speichernden Ferritins DpsA zeigte. Vorangegangene Studien mit *Helicobacter pylori* zeigten, dass ein Überschuss von kompetitiv wirkenden Metallionen die Synthese von Ferritin inhibiert, um die Konzentration von freiem Eisen im Cytoplasma zu erhöhen und damit die Funktion von Proteinen aufrecht zu erhalten (Bereswill *et al.*, 2000). Im Fall von Ni^{2+}-behandelten Biofilmen wurden hingegen erhöhte Abundanzen von DpsA ermittelt, was auf erhöhte Eisenkonzentrationen im Cytoplasma schließen lässt. Diese könnten eine Folge der erhöhten Proteaseaktivität in den EPS sein, wobei durch den hydrolytischen Abbau von Metalloproteinen die extrazelluläre Konzentration von freiem Eisen steigt, welches von den Zellen aufgenommen wird (Abb. 52B). Die Deletion von *dspA* resultierte in einem verlangsamten Wachstum der Zellen sowie in einer verringerten Adhäsion in Gegenwart von Cu^{2+} und Ni^{2+}, was auf einen verlangsamten Metabolismus aufgrund von Eisen-limitierenden Bedingungen schließen lässt. Aufgrund der essentiellen Funktion von Eisen-speichernden Proteinen und der beobachteten Wachstumsfähigkeit der *dpsA*-Deletionsmutante scheinen neben DpsA jedoch weitere Eisen-speichernde Proteine in *H. salinarum* zu existieren.

Neben der Beeinträchtigung der Eisenhomöostase scheint ein Überschuss von Cu^{2+} und Ni^{2+} in den Zellen zudem einen Einfluss auf diverse Stoffwechselwege zu haben. So wurden in planktonischen Zellen nach Cu^{2+}-Behandlung eine signifikant erhöhte Abundanz der Sirohydrochlorin-Cobaltochelatase CbiX1 nachgewiesen, während Ni^{2+}-behandelte Zellen eine starke Verringerung der Proteinmenge aufwiesen. CbiX1 ist in der Biosynthese von Cobalamin (Vitamin-B_{12}) beteiligt. Cobalamin ist ein Cobalt-haltiger Tetrapyrrol-Cofaktor, welcher essentiell für die Funktion vieler Enzyme ist und zugleich als Antioxidans bei oxidativem Stress wirkt (Birch *et al.*, 2009, Ferrer *et al.*, 2016). Die Biosynthese von Cobalamin in Bakterien und Archaea erfolgt über zwei Synthesewege, welche sich durch den Zeitpunkt der Cobaltinsertion und den Bedarf an molekularem Sauerstoff unterscheiden (Fang *et al.*, 2017). In *H. salinarum* R1 wurden zehn von zwölf Proteinen des anaeroben und sechs von zehn Proteinen des aeroben Synthesewegs annotiert, was darauf schließen lässt, dass beide Wege zur Synthese von Cobalamin genutzt werden. CbiX1 (Sirohydrochlorin-Cobaltochelatase) ist ein initiales Protein des anaeroben Synthesewegs, welches als Cobalt-Chelatase fungiert und die Insertion von Cobalt in Sirohydrochlorin katalysiert (Yin *et al.*, 2006). Interessanterweise zeigten Untersuchungen der Cobalaminsynthese in *Streptomyces olivaceus*, dass die Zugabe von Cu^{2+}

die Synthese erheblich förderte, während Ni^{2+} in allen getesteten Konzentrationen inhibierend wirkte (Maitra & Roy, 1960). Aufgrund dieser Metall-spezifischen Eigenschaften ist die gegensätzliche Abundanz von CbiX1 in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen in der vorliegenden Proteomstudie nicht verwunderlich (Abb. 52A). Dennoch ist die Wirkungsweise von Cu^{2+} und Ni^{2+} auf den Cobalamin-Syntheseweg bislang ungeklärt. Die Deletion des entsprechenden Gens OE3221F (*cbiX1*) zeigte keinen negativen Einfluss auf das Wachstum oder die Adhäsion in unbehandelten sowie in Metallionen-behandelten Zellen, sodass der Verlust des anaeroben Synthesewegs womöglich mit dem aeroben Weg kompensiert wird.

Diese Beobachtungen zeigen, dass erhöhte intrazelluläre Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Konzentrationen insbesondere in planktonischen Zellen die intrazelluläre Homöostase von Metallen beeinträchtigen, was sich in diversen Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel widerspiegelt.

5.3.4 ABC-Transportsysteme und ATPasen spielen eine wichtige Rolle im Membrantransport von Metallionen

Aufgrund der toxischen Wirkung von erhöhten Metallionen-Konzentrationen im Cytoplasma ist eine Regulation der intrazellulären Konzentration essentiell für das Überleben der Zellen. In diesem Zusammenhang nehmen Transportproteine eine wichtige Funktion ein, indem sie überschüssige Metallionen aus der Zelle transportieren (Ma *et al.*, 2009). Dazu zählen insbesondere P-Typ-ATPasen, welche aufgrund ihrer jeweils transportierenden Ionen in verschiedene Untergruppen aufgeteilt werden (Axelsen & Palmgren, 1998, Rensing *et al.*, 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in der Proteomstudie eine 4,6-fach erhöhte Abundanz der P-Typ ATPase CopA in planktonischen Zellen nach Cu^{2+}-Exposition ermittelt. Untersuchungen der entsprechenden Deletionsmutante ΔOE2042F zeigten in Anwesenheit erhöhter Cu^{2+}-Konzentrationen eine abgerundete Zellmorphologie sowie eine starke Hemmung des Wachstums und der Adhäsion. Expressionsstudien des nahe verwandten *H. salinarum* NRC-1 zeigten neben Cu^{2+} auch in Anwesenheit von Zn^{2+} eine erhöhte Expression des Gens, welches für das Protein YvgX kodiert und CopA entspricht (100% Sequenzidentität). Die Deletion des entsprechenden Gens resultierte jedoch ausschließlich in Anwesenheit von Cu^{2+} in einer Wachstumshemmung (Kaur *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass CopA ein Cu^{2+}-spezifischer-Exporter ist und eine Schlüsselfunktion in der Cu^{2+}-Resistenz der Zellen einnimmt (Tabelle 21, Abb. 52A). In *H. salinarum* NRC-1 führte die Zugabe von Cu^{2+} und Zn^{2+} zudem zu einer erhöhten Expression von zwei putativen Metallochaperonen (Kaur *et al.*, 2006). Die Autoren schlossen daraus, dass diese Proteine Metallionen binden und mit Transkriptionsregulatoren interagieren, um die Expression von ATPasen zu erhöhen. Ein homologes Protein der in dieser Studie beschriebenen putativen Metallochaperone wurde auch in der hier vorliegenden Proteomstudie quantifiziert (B0R3Z1) und zeigte eine vierfach erhöhte Abundanz in Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen. Das kodierende Gen OE2044F befindet sich im Genom in direkter Nähe zu OE2042F (*copA*), was wiederum auf eine Cu^{2+}-Spezifität hindeuten könnte. Dennoch zeigten Untersuchungen der Deletionsmutante ΔOE2044F neben einer vermehrten Adhäsion in Anwesenheit von 1 mM Ni^{2+} keine starken Auswirkungen auf die untersuchten Eigenschaften, was darauf hindeutet, dass dieses Protein womöglich eine stärkere Spezifität für die Bindung von Ni^{2+} besitzt. Neben der regulatorischen Funktion von Metallochaperonen, wie von Kaur *et al.* (2006) postuliert, wäre es zudem denkbar, dass diese im direkten Kontakt zu ATPasen oder ABC-Transportern stehen, um gebundene Metalle an Exportsysteme zu übertragen (Tabelle 21, Abb. 52). Eine Interaktion des Metallochaperons

CopZ mit der Metallbindedomäne von CopA wurde bereits in *Archaeoglobus fulgidus* nachgewiesen (González-Guerrero & Argüello, 2008). Da die Deletion von OE2044F jedoch keine starken Auswirkungen zur Folge hatte, scheinen weitere Metallochaperone an der Bindung und dem Transfer von Metallionen beteiligt zu sein, welche die Deletion eines Metallochaperon kodierenden Gens entsprechend kompensieren können.

In Bezug auf den Transport von Metallionen über die Cytoplasmamembran scheinen neben ATPasen auch ABC-Transporter eine wichtige Rolle zu spielen. Diese bilden eine große Familie von Membrantransportern, welche über die Hydrolyse von ATP eine Vielzahl von Substraten wie Zucker, Peptide, Oligonukleotide oder Ionen über die Membran transportieren und eine wichtige Funktion in der Nährstoffaufnahme sowie in der Signaltransduktion, Proteinsekretion und Resistenz besitzen (Schneider & Hunke, 1998). Im Rahmen der Proteomstudie in dieser Arbeit wurden besonders in Cu^{2+}- und Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen signifikant verringerte Abundanzen von ABC-Transportproteinen beobachtet. Eine stark verringerte Abundanz in Metallionen-behandelten planktonischen Zellen zeigte ebenfalls das Protein B0R9Z2, welches als ATP-bindendes Protein als Teil eines ABC-Transportsystems annotiert ist (Tabelle 21). Interessanterweise besaß dieses Protein zudem eine signifikant erhöhte Abundanz in Biofilmen nach Metallionenbehandlung. Die Deletion des kodierenden Gens (OE5245F) resultierte in einer verstärkten Biofilmbildung in unbehandelten Zellen sowie in einer auffälligen Reaktion in Gegenwart von Ni^{2+}, was sich mit einer erhöhten Ni^{2+}-Sensitivität und einer verstärkten Adhäsion und Biofilmbildung zeigte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass dieses Protein am Export von Cu^{2+} und Ni^{2+} beteiligt ist (Tabelle 21, Abb. 52). Die Deletion des kodierenden Gens könnte demzufolge in einer Erhöhung der intrazellulären Metallionenkonzentration resultieren, wobei Cu^{2+} in Anwesenheit der Cu^{2+}-exportierenden ATPase CopA weiterhin aus dem Cytoplasma transportiert werden kann, während höhere Ni^{2+}-Konzentrationen zurückbleiben. Dies würde die stärkere Sensitivität der Zellen gegenüber Ni^{2+} erklären. Darüber hinaus wäre in Folge der erhöhten intrazellulären Ni^{2+}-Konzentration eine Verstärkung der Adhäsion und Biofilmbildung denkbar. So zeigten diverse Studien bakterieller Spezies, dass in Gegenwart von Ni^{2+} die Zellaggregation und Biofilmbildung induziert wird (Perrin *et al.*, 2009, Tikhomirova *et al.*, 2015, Fakhar *et al.*, 2017). In diesem Zusammenhang könnte ebenfalls das ATP-bindende Protein ZnuC des ZnuABC-Transportsystems involviert sein. ZnuC zeigte in der vorliegenden Proteomstudie eine erhöhte Abundanz in Ni^{2+}-behandelten planktonischen Zellen. Die Deletion des kodierenden Gens OE5146R (*znuC*) resultierte ebenfalls in einer verstärkten Biofilmbildung in unbehandelten sowie in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen. Das ZnuABC-Transportsystem ist in bakteriellen Spezies als Zink-Aufnahmesystem beschrieben, welches eine essentielle Funktion in der intrazellulären Zink-Homöostase einnimmt (Patzer & Hantke, 1998, Ammendola *et al.*, 2007). Ein Vergleich der Proteinsequenz des *H. salinarum* R1 Proteins mit Proteinsequenzen der Proteindatenbank UniProtKB/SwissProt zeigte neben einer 43,5%igen Sequenzidentität zu Zinkaufnahmesystemen außerdem Sequenzidentitäten von 39,5% bzw. 38,7% zu Mangan- sowie universellen Metall-transportsystemen in verschieden bakteriellen Spezies. Dies lässt darauf schließen, dass dieses Transportsystem neben Zink auch weitere Metalle transportieren kann, wobei auch der Export von Ni^{2+} denkbar wäre (Tabelle 21, Abb. 52). Die Deletion des entsprechenden Gens hätte wie im Fall von ΔOE5245F eine erhöhte intrazelluläre Ni^{2+}-Konzentration zur Folge, was die beobachtete Verstärkung der Biofilmbildung erklären würde. Im Zuge dessen wäre ebenfalls die verstärkte Proteaseaktivität des ΔOE5146R-(Δ*znuC*)-Stammes zu erklären, durch deren Aktivität die erhöhte Zelldichte in Ni^{2+}-induzierten Biofilmen reguliert werden könnte. Da in

Folge der Deletion von OE5245F jedoch keine Proteaseaktivität beobachtet wurde, scheint das entsprechende Protein darüber hinaus womöglich an der Expressionsregulation von Proteasen beteiligt zu sein.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass erhöhte intrazelluläre Ni^{2+}-Konzentrationen die Biofilmbildung stimulieren und deren Architektur womöglich über Proteasen reguliert wird. Das extrazelluläre Protein B0R587 („uncharacterized protein“) scheint in diesem Zusammenhang ein Metallionen-Sensor zu sein und die Ni^{2+}-spezifische Biofilmbildung zu induzieren. Erhöhte Cu^{2+}-Konzentrationen führen dagegen zu einer Inhibition der Biofilmbildung, wobei die intrazelluläre Cu^{2+}-Homöostase strikt über die Cu^{2+}-exportierende ATPase CopA reguliert zu sein scheint.

Kapitel VI

Schlussfolgerungen und Ausblick

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit geben einen umfassenden Einblick in die zellulären und molekularen Auswirkungen von Schwermetallionen auf planktonische Zellen und Biofilme des halophilen Organismus *H. salinarum* R1. Im Fokus dieser Untersuchungen standen die Effekte der bivalenten Metallionen Cu^{2+} und Ni^{2+}, welche sich sowohl in den Konzentrationen der Wachstumshemmung als auch in der Wirkung auf die Adhäsion und Biofilmbildung deutlich voneinander unterscheiden. So wurde in Anwesenheit von Cu^{2+} unterhalb der MHK eine signifikante Inhibition der Adhäsion - und nach Zugabe von Cu^{2+} auf reife Biofilme ein Ablösen eines Großteils sessiler Zellen beobachtet. Ähnliche Ergebnisse zeigten bereits Transkriptionsstudien mit *Staphylococcus aureus*, bei denen die Gegenwart von Cu^{2+} eine globale Stressreaktion in den Zellen auslöste und die Biofilmbildung inhibierte (Baker *et al.*, 2010). Aufgrund des breiten Spektrums von antimikrobiellen Eigenschaften eignen sich besonders Cu^{2+}-beschichtete Oberflächenmaterialien zur Inhibition des mikrobiellen Wachstums, was besonders in der Nahrungsmittelindustrie und in Krankenhäusern zum Einsatz kommt (Noyce *et al.*, 2006, Casey *et al.*, 2010, Schmidt *et al.*, 2012). Gegenteilige Effekte wurden in dieser Arbeit in Gegenwart von Ni^{2+} beobachtet, wobei die Biofilmbildung in *H. salinarum* R1, sogar in einer 2,7-fach erhöhten Konzentration im Vergleich zur MHK, verstärkt wurde. Eine Ni^{2+}-induzierte Aggregation und Biofilmbildung wurde bereits in diversen bakteriellen Spezies beschrieben, was auf einen Ni^{2+}-spezifischen Resistenzmechanismus schließen lässt (Perrin *et al.*, 2009, Fakhar *et al.*, 2017). Mittels *time-lapse*-Mikroskopie sollte in folgenden Untersuchungen die Umgestaltung der Biofilmarchitektur mikroskopisch verfolgt und analysiert werden, um Rückschlüsse auf die Dynamik des Prozesses ziehen zu können.

Die vergleichende Untersuchung der Überlebensrate von planktonischen Zellen und Biofilmen, welche in dieser Arbeit vorgestellt wurde, zeigte eine bis zu 80% erhöhte Resistenz in Biofilmen in Gegenwart von Metallionen. In diesem Zusammenhang scheinen die EPS, welche die Zellen im Biofilm umgeben, eine wichtige Rolle in der Biofilm-vermittelten Resistenz zu spielen. So zeigten quantitative Untersuchungen der EPS-Matrix einen erhöhten EPS-Anteil in Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-behandelten Biofilmen sowie signifikante Unterschiede des Proteingehalts. Darüber hinaus befindet sich der größte Teil der Metallionen *i.e.* 65% Cu^{2+} bzw. 83% Ni^{2+} in der EPS-Matrix, sodass Biofilmzellen im Vergleich zu planktonischen Zellen bis zu 32-fach verringerten Metallionen-Konzentrationen ausgesetzt sind und demzufolge weniger Stressreaktionen nötig sind. Dies spiegelt sich auch in den vorgestellten Untersuchungen zu den molekularen Auswirkungen von Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-Stress wider. So zeigten die hier durchgeführte globale Proteomstudie sowie begleitende Genexpressionsanalysen von planktonischen Zellen und Biofilmen, dass Cu^{2+} und Ni^{2+} einen starken Einfluss auf molekulare Prozesse planktonischer Zellen haben, während bei Biofilmen deutlich weniger, jedoch größtenteils Metallionen-spezifische Auswirkungen beobachtet wurden. Da in der vorliegenden Studie jedoch lediglich molekulare Änderungen nach 24-stündiger Metallionen-Exposition analysiert wurden, sollten zukünftige Analysen zudem kürzere sowie längere Expositionsdauern berücksichtigen, um ebenfalls schnelle bzw. langsame Stressreaktionen in den Zellen zu identifizieren. Um die Funktion von Proteinen mit signifikant veränderten Abundanzen im Hinblick auf Metallionenstress zu untersuchen, erfolgten eine Deletion der entsprechenden Gene und eine Charakterisierung der Auswirkungen im Umgang mit Cu^{2+} bzw. Ni^{2+}. Jede der in dieser Arbeit charakterisierten Deletionsmutanten zeigte mindestens einen Metallionen-bedingten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp, was darauf hindeutet, dass diese Gene in der Cu^{2+}- bzw. Ni^{2+}-induzierten Stressantwort involviert sind. Aufgrund der essentiellen Rolle der EPS in der

Biofilm-vermittelten Resistenz und der starken Auswirkungen der Gendeletionen auf die Biofilmarchitektur in *H. salinarum*, sollte die Isolierung und Analyse der EPS-Matrix von Deletionsmutanten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um die Funktion der entsprechenden Proteine in Bildung, Aufrechterhaltung und Abbau von EPS zu ermitteln.

Um einen direkten oder indirekten Einfluss der Metallionen auf das entsprechende Protein auf molekularer Ebene weiter zu untersuchen, wären zukünftige Bindungsanalysen der heterolog/homolog überproduzierten Proteine in Gegenwart von Cu^{2+}-/Ni^{2+} von besonderem Interesse. Mittels der gereinigten Proteine sollten entsprechende spektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden, um die Bindungsaffinitäten der Metallionen, inklusive von Dissoziationskostanten, zu bestimmen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Funktion des uncharakterisierten Proteins B0R587, welches in Ni^{2+}-behandelten Biofilmen eine 33,7-fach erhöhte Abundanz aufwies und basierend auf den charakterisierten Eigenschaften in dieser Arbeit möglicherweise ein extrazelluläres Sensorprotein für Metallionen, insbesondere für Nickel, darstellt. Die Deletion des entsprechenden Gens führte zu einer Inhibition der Ni^{2+}-spezifischen Biofilmarchitektur, sodass mittels einer Überexpression *in vivo* die Rolle des Proteins im Zusammenhang mit der Biofilmbildung in *H. salinarum* R1 weiter charakterisiert werden sollte. Zusätzlich sollte die exakte Lokalisation des Proteins, auch im Hinblick auf verschiedene Wachstumsphasen und Metallionen-Konzentrationen, untersucht werden. Hierfür bieten sich Immunogoldfärbungen mit anschließender Transmissions-elektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten an.
Darüber hinaus zeigten drei Transportsysteme, darunter eine bereits gut charakterisierte ATPase (CopA), welche für den Kupfertransport verantwortlich ist, und zwei weitgehend uncharakterisierte ABC-Transporter Metallionen-spezifische Abundanzen. Neben Über-expressionen der beteiligten Komponenten der ABC-Transportsysteme/ATPasen und anschließenden Analysen der zellulären Antworten auf Metallionenstress, um deren Funktion in der Metallresistenz zu ermitteln, sollte im weiteren Verlauf die Proteinreinigung im Fokus stehen. Entsprechend könnten eine Charakterisierung der Metallionen-Spezifität und des Ionenflusses der Transporter erfolgen, beispielswiese mittels *patch clamp*-Techniken im artifiziellen System oder nach homologer Überexpression *in vivo*.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass verschiedene Metallionen unterschiedliche und spezifische zelluläre Stressmechanismen in *H. salinarum* R1 auslösen, die entweder in einer vermehrten Biofilmbildung oder im Ablösen sessiler Zellen resultieren. Die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellten hypothetischen Mechanismen der Metallionen-Reaktion sollten den Ausgangspunkt weiterer Analysen der zellulären bzw. molekularen Prozesse und Regulationsnetzwerke in halophilen Archaea und anderen Prokaryoten darstellen.

Literaturverzeichnis

Acosta J., Jansen B., Kalbitz K., Faz A. & Martínez-Martínez S. (**2011**) Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere,* **85**: (8), 1318-1324.

Ahmed E. & Holmström SJM. (**2014**) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol,* **7**: (3), 196-208.

Alam M. & Oesterhelt D. (**1984**) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J Mol Biol,* **176**: (4), 459-475.

Albers S-V. & Jarrell KF. (**2015**) The archaellum: how Archaea swim. *Front Microbiol,* **6**: (23).

Ali H., Khan E. & Ilahi I. (**2019**) Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *J Chem,* **2019**.

Almagro Armenteros JJ., Tsirigos KD., Sonderby CK., Petersen TN., Winther O., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H. (**2019**) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol,* **37**: (4), 420-423.

Ammendola S., Pasquali P., Pistoia C., Petrucci P., Petrarca P., Rotilio G. & Battistoni A. (**2007**) High-affinity Zn^{2+} uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun,* **75**: (12), 5867-5876.

Anderl JN., Franklin MJ. & Stewart PS. (**2000**) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother,* **44**: (7), 1818.

Andrei A-Ş., Banciu HL. & Oren A. (**2012**) Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol Lett,* **330**: (1), 1-9.

Aravind L. & Koonin EV. (**1999**) DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res,* **27**: (23), 4658-4670.

Atanassov I. & Urlaub H. (**2013**) Increased proteome coverage by combining PAGE and peptide isoelectric focusing: comparative study of gel-based separation approaches. *Proteomics,* **13**: (20), 2947-2955.

Avery S. (**2001**) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol,* **49**, 111-142.

Axelsen KB. & Palmgren MG. (**1998**) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol,* **46**: (1), 84-101.

Bagge N., Hentzer M., Andersen JB., Ciofu O., Givskov M. & Høiby N. (**2004**) Dynamics and spatial distribution of β-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother,* **48**: (4), 1168-1174.

Baker J., Sitthisak S., Sengupta M., Johnson M., Jayaswal RK. & Morrissey JA. (**2010**) Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol,* **76**: (1), 150-160.

Baliga NS., Bjork SJ., Bonneau R., Pan M., Iloanusi C., Kottemann MC., Hood L. & DiRuggiero J. (**2004**) Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1. *Genome Res,* **14**: (6), 1025-1035.

Bartolucci S., Contursi P., Fiorentino G., Limauro D. & Pedone E. (**2013**) Responding to toxic compounds: a genomic and functional overview of Archaea. *Front Biosci,* **18**, 165-189.

Bauer H. & Roske I. (**2001**) Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition polyphosphates granules. *Wat Res,* **35**: (13), 3190-3196.

Beis K. (**2015**) Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans,* **43**: (5), 889-893.

Benjamini Y. & Hochberg Y. (**1995**) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc,* **57**: (1), 289-300.

Bereswill S., Greiner S., van Vliet AH., Waidner B., Fassbinder F., Schiltz E., Kusters JG. & Kist M. (**2000**) Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol,* **182**: (21), 5948-5953.

Birch CS., Brasch NE., McCaddon A. & Williams JHH. (**2009**) A novel role for vitamin B(12): Cobalamins are intracellular antioxidants in vitro. *Free Radic Biol Med,* **47**: (2), 184-188.

Bisle B. (**2006**) Das Membranproteom halophiler Archaea Identifizierung und Quantifizierung. *Dissertation,* LMU München.

Boaretti M., del Mar Lleò M., Bonato B., Signoretto C. & Canepari P. (**2003**) Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environ Microbiol,* **5**: (10), 986-996.

Booth SC., Workentine ML., Wen J., Shaykhutdinov R., Vogel HJ., Ceri H., Turner RJ. & Weljie AM. (**2011**) Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. *J Proteome Res,* **10**: (7), 3190-3199.

Booth SC., George IFS., Zannoni D., Cappelletti M., Duggan GE., Ceri H. & Turner RJ. (**2013**) Effect of aluminium and copper on biofilm development of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 and *P. fluorescens* as a function of different media compositions. *Metallomics,* **5**: (6), 723-735.

Bott AW. (**1999**) Redox properties of electron transfer metalloproteins. *Curr Sep,* **18**: (2), 47-54.

Bradford MM. (**1976**) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem,* **72**, 248-254.

Braud A., Hannauer M., Mislin GLA. & Schalk IJ. (**2009a**) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J Bacteriol,* **191**: (11), 3517-3525.

Braud A., Hoegy F., Jezequel K., Lebeau T. & Schalk IJ. (**2009b**) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol,* **11**: (5), 1079-1091.

Breuert S., Allers T., Spohn G. & Soppa J. (**2006**) Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PloS one,* **1**: (1), e92.

Bruins MR., Kapil S. & Oehme FW. (**2000**) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf,* **45**: (3), 198-207.

Capes MD., Coker JA., Gessler R., Grinblat-Huse V., DasSarma SL., Jacob CG., Kim J-M., DasSarma P. & DasSarma S. (**2011**) The information transfer system of halophilic archaea. *Plasmid,* **65**: (2), 77-101.

Caruso C., Rizzo C., Mangano S., Poli A., Di Donato P., Nicolaus B., Di Marco G., Michaud L. & Lo Giudice A. (**2018**) Extracellular polymeric substances with metal adsorption capacity produced by *Pseudoalteromonas* sp. MER144 from Antarctic seawater. *Environ Sci Pollut Res Int,* **25**: (5), 4667-4677.

Casey A., Adams D., Karpanen T., Lambert P., Cookson B., Nightingale P., Miruszenko L., Shillam R., Christian P. & Elliott T. (**2010**) Role of copper in reducing hospital environment contamination. *J Hosp Infect,* **74**: (1), 72-77.

Chien C-C., Huang C-H. & Lin Y-W. (**2013a**) Characterization of a heavy metal translocating P-type ATPase gene from an environmental heavy metal resistance *Enterobacter* sp. isolate. *Appl Biochem Biotechnol,* **169**: (6), 1837-1846.

Chien C-C., Lin B-C. & Wu C-H. (**2013b**) Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochem Eng J,* **78**, 132-137.

Chomczynski P. & Sacchi N. (**2006**) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc,* **1**: (2), 581-585.

Cobbett C. & Goldsbrough P. (**2002**) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol,* **53**: (1), 159-182.

Cobine PA., Cruz LF., Navarrete F., Duncan D., Tygart M. & De La Fuente L. (**2013**) *Xylella fastidiosa* differentially accumulates mineral elements in biofilm and planktonic cells. *PLoS One,* **8**: (1), e54936.

Collins BC., Hunter CL., Liu Y., Schilling B., Rosenberger G., Bader SL., Chan DW., Gibson BW., Gingras A-C. & Held JM. (**2017**) Multi-laboratory assessment of reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. *Nat Commun,* **8**: (1), 291.

Coombs JM. & Barkay T. (**2005**) New findings on evolution of metal homeostasis genes: evidence from comparative genome analysis of bacteria and archaea. *Appl Environ Microbiol,* **71**: (11), 7083-7091.

Costerton JW., Stewart PS. & Greenberg EP. (**1999**) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, NY),* **284**: (5418), 1318-1322.

Culp E. & Wright GD. (**2017**) Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *J Antibiot,* **70**: (4), 366-377.

Cusick KD., Dale JR., Fitzgerald LA., Little BJ. & Biffinger JC. (**2017**) Adaptation to copper stress influences biofilm formation in *Alteromonas macleodii*. *Biofouling,* **33**: (6), 505-519.

da Costa MS., Santos H. & Galinski EA (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Biotechnology of Extremophiles,* (Antranikian G, ed.) 117-153. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Darcan C., Ozkanca R., Idil O. & Flint KP. (**2009**) Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water. *Pol J Microbiol,* **58**: (4), 307-317.

DasSarma S., Kennedy SP., Berquist B., Ng WV., Baliga NS., Spudich JL., Krebs MP., Eisen JA., Johnson CH. & Hood L. (**2001**) Genomic perspective on the photobiology of *Halobacterium* species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon. *Photosynth Res,* **70**: (1), 3-17.

Davey ME. & O'Toole GA. (**2000**) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev,* **64**: (4), 847-867.

de Araújo LCA. & de Oliveira MBM (2019) Effect of heavy metals on the biofilm formed by microorganisms from impacted aquatic environments. *Bacterial Biofilms,* IntechOpen.

De Castro RE., Maupin-Furlow JA., Giménez MI., Herrera Seitz MK. & Sánchez JJ. (**2006**) Haloarchaeal proteases and proteolytic systems. *FEMS Microbiol Rev,* **30**: (1), 17-35.

del Mar Lleò M., Pierobon S., Tafi MC., Signoretto C. & Canepari P. (**2000**) mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl Environ Microbiol,* **66**: (10), 4564-4567.

Dennis PP. & Shimmin LC. (**1997**) Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev,* **61**: (1), 90-104.

Dennison C., David S. & Lee J. (**2018**) Bacterial copper storage proteins. *J Biol Chem,* **293**: (13), 4616-4627.

Dey S. & Paul A. (**2018**) Influence of metal ions on biofilm formation by *Arthrobacter* sp. SUK 1205 and evaluation of their Cr (VI) removal efficacy. *Inter Biodeter Biodegr,* **132**, 122-131.

Donlan RM. (**2002**) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis,* **8**: (9), 881-890.

DuBois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA. & Smith F. (**1956**) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem,* **28**: (3), 350-356.

Dupont CL., Grass G. & Rensing C. (**2011**) Copper toxicity and the origin of bacterial resistance - new insights and applications. *Metallomics,* **3**: (11), 1109-1118.

Dyall-Smith M. (**2009**) The Halohandbook: protocols for haloarchaeal genetics. https://haloarchaea.com/wp-content/uploads/2018/10/Halohandbook_2009_v7.3mds.pdf

Elias S. & Banin E. (**2012**) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev,* **36**: (5), 990-1004.

Ercal N., Gurer-Orhan H. & Aykin-Burns N. (**2001**) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem,* **1**: (6), 529-539.

Eteshola EO., Haupt DA., Koos SI., Siemer LA. & Morris DL. (**2020**) The role of metal ion binding in the antioxidant mechanisms of reduced and oxidized glutathione in metal-mediated oxidative DNA damage. *Metallomics*, **12**:(1), 79-91.

Evans D., Allison D., Brown M. & Gilbert P. (**1991**) Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J Antimicrob Chemother,* **27**: (2), 177-184.

Fahey RC. (**2001**) Novel thiols of prokaryotes. *Ann Rev Microbiol,* **55**: (1), 333-356.

Fakhar M., Jabbar I. & Sabri AN. (**2017**) Effect of nickel on biofilm formation of halophilic bacteria isolated from *Achyranthus aspera* from salt range Pakistan. *Punjab Univ J Zool,* **32**: (1), 117-128.

Falb M., Müller K., Königsmaier L., Oberwinkler T., Horn P., von Gronau S., Gonzalez O., Pfeiffer F., Bornberg-Bauer E. & Oesterhelt D. (**2008**) Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles,* **12**: (2), 177-196.

Fang H., Kang J. & Zhang D. (**2017**) Microbial production of vitamin B 12: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact,* **16**: (1), 15.

Ferrer A., Rivera J., Zapata C., Norambuena J., Sandoval Á., Chávez R., Orellana O. & Levicán G. (**2016**) Cobalamin protection against oxidative stress in the acidophilic iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum* group II CF-1. *Front Microbiol,* **7**, 748.

Filisetti-Cozzi TM. & Carpita NC. (**1991**) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem,* **197**: (1), 157-162.

Flemming H-C., Schmitt J. & Marshall K (1996) Sorption properties of biofilms. *Sediments and toxic substances,* 115-157. Springer.

Flemming H-C., Neu TR. & Wozniak DJ. (**2007**) The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol,* **189**: (22), 7945-7947.

Flemming H-C. & Wuertz S. (**2019**) Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol,* **17**: (4), 247-260.

Flemming HC. & Wingender J. (**2002**) Was Biofilme zusammenhält: Proteine, Polysaccharide. *Chemie in unserer Zeit,* **36**: (1), 30-42.

Flemming HC. & Wingender J. (**2010**) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol,* **8**: (9), 623-633.

Fröls S., Dyall-Smith M. & Pfeifer F. (**2012**) Biofilm formation by haloarchaea. *Environ Microbiol,* **14**: (12), 3159-3174.

Frølund B., Palmgren R., Keiding K. & Nielsen PH. (**1996**) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res,* **30**: (8), 1749-1758.

Furtwängler KSL. (**2009**) Expression und Funktion der ABC-Transporter für anorganisches Phosphat und Glycerin-3-phosphat in *Halobacterium salinarum* R1. *Dissertation,* LMU.

Gangaiah D., Kassem II., Liu Z. & Rajashekara G. (**2009**) Importance of polyphosphate kinase 1 for *Campylobacter jejuni* viable-but-nonculturable cell formation, natural transformation, and antimicrobial resistance. *Appl Environ Microbiol,* **75**: (24), 7838-7849.

Geesey GG. & Jang LK (1989) Interactions between metal ions and capsular polymers. *Metal ions and bacteria,* 325-357. Wiley.

Gilbert P., Maira-Litran T., McBain AJ., Rickard AH. & Whyte FW. (**2002**) The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol,* **46**, 202-256.

Gillet LC., Navarro P., Tate S., Rost H., Selevsek N., Reiter L., Bonner R. & Aebersold R. (**2012**) Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics,* **11**: (6), O111.016717.

Giménez MI., Cerletti M. & De Castro RE. (**2015**) Archaeal membrane-associated proteases: insights on *Haloferax volcanii* and other haloarchaea. *Front Microbiol,* **6**, 39.

Gjermansen M., Ragas P., Sternberg C., Molin S. & Tolker-Nielsen T. (**2005**) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol,* **7**: (6), 894-904.

Glaeser H., Coblenz A., Kruczek R., Ruttke I., Ebert-Jung A. & Wolf K. (**1991**) Glutathione metabolism and heavy metal detoxification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet,* **19**: (3), 207-213.

González-Guerrero M. & Argüello JM. (**2008**) Mechanism of Cu^+-transporting ATPases: soluble Cu^+ chaperones directly transfer Cu^+ to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci USA,* **105**: (16), 5992-5997.

Grigg JC., Cooper JD., Cheung J., Heinrichs DE. & Murphy ME. (**2010**) The *Staphylococcus aureus* siderophore receptor HtsA undergoes localized conformational changes to enclose staphyloferrin A in an arginine-rich binding pocket. *J Biol Chem,* **285**: (15), 11162-11171.

Grumbein S., Opitz M. & Lieleg O. (**2014**) Selected metal ions protect *Bacillus subtilis* biofilms from erosion. *Metallomics,* **6**: (8), 1441-1450.

Ha D-J., Joo W-A., Han G-Y. & Kim C-W. (**2007**) Proteome analysis of *Halobacterium salinarum* and characterization of proteins related to the degradation of isopropyl alcohol. *Biochim Biophys Acta,* **1774**: (1), 44-50.

Haikarainen T., Thanassoulas A., Stavros P., Nounesis G., Haataja S. & Papageorgiou AC. (**2011**) Structural and thermodynamic characterization of metal ion binding in *Streptococcus suis* Dpr. *J Mol Biol,* **405**: (2), 448-460.

Hall-Stoodley L., Costerton JW. & Stoodley P. (**2004**) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol,* **2**: (2), 95-108.

Halliwell B. & Gutteridge JM. (**1984**) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J,* **219**: (1), 1-14.

Harmsen M., Yang L., Pamp SJ. & Tolker-Nielsen T. (**2010**) An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol,* **59**: (3), 253-268.

Harrison JJ., Ceri H., Roper NJ., Badry EA., Sproule KM. & Turner RJ. (**2005a**) Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology,* **151**: (10), 3181-3195.

Harrison JJ., Turner RJ. & Ceri H. (**2005b**) Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol,* **7**: (7), 981-994.

Harrison JJ., Ceri H. & Turner RJ. (**2007**) Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol,* **5**: (12), 928.

Hartmann R., Sickinger HD. & Oesterhelt D. (**1980**) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA,* **77**: (7), 3821-3825.

Hassen A., Saidi N., Cherif M. & Boudabous A. (**1998**) Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour Technol,* **64**: (1), 7-15.

He ZL., Yang XE. & Stoffella PJ. (**2005**) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Bio,* **19**: (2-3), 125-140.

Heintz A. & Reinhardt G (1990) Schwermetalle in der Umwelt. *Chemie und Umwelt: Ein Studienbuch für Chemiker, Physiker, Biologen und Geologen,* (Heintz A & Reinhardt G, eds.), 229-255. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden.

Hobman JL. & Crossman LC. (**2015**) Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J Med Microbiol,* **64**,

Hu Z., Jin J., Abruña HD., Houston PL., Hay AG., Ghiorse WC., Shuler ML., Hidalgo G. & Lion LW. (**2007**) Spatial distributions of copper in microbial biofilms by scanning electrochemical microscopy. *Environ Sci Technol,* **41**: (3), 936-941.

Iyer A., Mody K. & Jha B. (**2005**) Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Mar Pollut Bull,* **50**: (3), 340-343.

Jachlewski S., Jachlewski WD., Linne U., Brasen C., Wingender J. & Siebers B. (**2015**) Isolation of extracellular polymeric substances from biofilms of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Front Bioeng Biotechnol,* **3**, 123.

Jaffe A., Chabbert YA. & Semonin O. (**1982**) Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother,* **22**: (6), 942-948.

Jarrell KF., Stark M., Nair DB. & Chong JP. (**2011**) Flagella and pili are both necessary for efficient attachment of *Methanococcus maripaludis* to surfaces. *FEMS Microbiol Lett,* **319**: (1), 44-50.

Jarrell KF. & Albers S-V. (**2012**) The archaellum: an old motility structure with a new name. *Trends Microbiol,* **20**: (7), 307-312.

Jones DL. & Baxter BK. (**2017**) DNA repair and hhotoprotection: mechanisms of overcoming environmental ultraviolet radiation exposure in halophilic archaea. *Front Microbiol,* **8**: (1882),

Kanehisa M. & Sato Y. (**2019**) KEGG mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci*,

Kaplan JB. (**2011**) Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs,* **34**: (9), 737-751.

Kaur A., Pan M., Meislin M., Facciotti MT., El-Gewely R. & Baliga NS. (**2006**) A systems view of haloarchaeal strategies to withstand stress from transition metals. *Genome Res,* **16**: (7), 841-854.

Kim D-Y., Bovet L., Maeshima M., Martinoia E. & Lee Y. (**2007**) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J,* **50**: (2), 207-218.

Klebahn H. (**1919**) Die Schädlinge des Klippfisches. Ein Beitrag zur Kenntnis der salzliebenden Organismen. *Mitt Inst Allg Bot Hamb,* **4**, 11-69.

Klein C., Garcia-Rizo C., Bisle B., Scheffer B., Zischka H., Pfeiffer F., Siedler F. & Oesterhelt D. (**2005**) The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics,* **5**: (1), 180-197.

Koch MK. & Oesterhelt D. (**2005**) MpcT is the transducer for membrane potential changes in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol,* **55**: (6), 1681-1694.

Koechler S., Farasin J., Cleiss-Arnold J. & Arsene-Ploetze F. (**2015**) Toxic metal resistance in biofilms: diversity of microbial responses and their evolution. *Res Microbiol,* **166**: (10), 764-773.

Kolaj-Robin O., Russell D., Hayes KA., Pembroke JT. & Soulimane T. (**2015**) Cation diffusion facilitator family: structure and function. *FEBS Lett,* **589**: (12), 1283-1295.

Kolbe M., Besir H., Essen L-O. & Oesterhelt D. (**2000**) Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science (New York, NY),* **288**: (5470), 1390-1396.

Krah M., Marwan W., Vermeglio A. & Oesterhelt D. (**1994**) Phototaxis of *Halobacterium salinarium* requires a signalling complex of sensory rhodopsin I and its methyl-accepting transducer HtrI. *EMBO J,* **13**: (9), 2150-2155.

Krasny L., Bland P., Kogata N., Wai P., Howard BA., Natrajan RC. & Huang PH. (**2018**) SWATH mass spectrometry as a tool for quantitative profiling of the matrisome. *J Proteomics,* **189**, 11-22.

Krogh A., Larsson B., von Heijne G. & Sonnhammer EL. (**2001**) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol,* **305**: (3), 567-580.

Kumar R., Joseph MM., Gireesh Kumar TR., Renjith KR., Manju MN. & Chandramohanakumar N. (**2010**) Spatial variability and contamination of heavy metals in the inter-tidal systems of a tropical environment. *Int J Environ Res,* **4**: (4), 691-700.

Kusumoto A., Asakura H. & Kawamoto K. (**2012**) General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol,* **56**: (4), 228-237.

Kvint K., Nachin L., Diez A. & Nyström T. (**2003**) The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol,* **6**: (2), 140-145.

Langley S. & Beveridge T. (**1999**) Metal binding by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is influenced by growth of the cells as a biofilm. *Can J Microbiol,* **45**: (7), 616-622.

Lanyi JK. (**1974**) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev,* **38**: (3), 272-290.

Lapaglia C. & Hartzell PL. (**1997**) Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol,* **63**: (8), 3158-3163.

Lewis K. (**2001**) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother,* **45**: (4), 999.

Lewis K. (**2007**) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol,* **5**: (1), 48.

Li M., Yin J., Mei S., Wang X., Tang X-F. & Tang B. (**2018**) Halolysin SptA, a serine protease, contributes to growth-phase transition of haloarchaeon *Natrinema* sp. J7-2, and its expression involves cooperative action of multiple cis-regulatory elements. *Front Microbiol,* **9**, 1799.

Lin H., Wang C., Zhao H., Chen G. & Chen X. (**2018**) Interaction between copper and extracellular nucleic acids in the EPS of unsaturated *Pseudomonas putida* CZ1 biofilm. *Environ Sci Pollut Res* **25**: (24), 24172-24180.

Liu H. & Fang HH. (**2002**) Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol Bioeng,* **80**: (7), 806-811.

Liu W-T., Karavolos MH., Bulmer DM., Allaoui A., Hormaeche RDCE., Lee JJ. & Khan CA. (**2007**) Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence. *Microb Pathog,* **42**: (1), 2-10.

Losensky G., Vidakovic L., Klingl A., Pfeifer F. & Fröls S. (**2015**) Novel pili-like surface structures of *Halobacterium salinarum* strain R1 are crucial for surface adhesion. *Front Microbiol,* **5**: (755),

Losensky G., Jung K., Urlaub H., Pfeifer F., Fröls S. & Lenz C. (**2017**) Shedding light on biofilm formation of *Halobacterium salinarum* R1 by SWATH-LC/MS/MS analysis of planktonic and sessile cells. *Proteomics,* **17**: (7).

Love MI., Huber W. & Anders S. (**2014**) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol,* **15**: (12), 550.

Luo W. & Brouwer C. (**2013**) Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics (Oxford, England),* **29**: (14), 1830-1831.

Lutts S. & Lefèvre I. (**2015**) How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas? *Ann Bot,* **115**: (3), 509-528.

Ma Z., Jacobsen FE. & Giedroc DP. (**2009**) Metal transporters and metal sensors: how coordination chemistry controls bacterial metal homeostasis. *Chem Rev,* **109**: (10), 4644.

Macomber L. & Imlay JA. (**2009**) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA,* **106**: (20), 8344-8349.

Madsen JS., Burmølle M., Hansen LH. & Sørensen SJ. (**2012**) The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol,* **65**: (2), 183-195.

Maitra P. & Roy S. (**1960**) Trace elements and the synthesis of vitamin B12 by *Streptomyces olivaceus*. *Biochem J,* **75**: (3), 483.

Makarova KS., Sorokin AV., Novichkov PS., Wolf YI. & Koonin EV. (**2007**) Clusters of orthologous genes for 41 archaeal genomes and implications for evolutionary genomics of archaea. *Biology direct,* **2**, 33.

Makarova KS., Wolf YI. & Koonin EV. (**2015**) Archaeal clusters of orthologous genes (arCOGs): an update and application for analysis of shared features between *Thermococcales*, *Methanococcales*, and *Methanobacteriales*. *Life,* **5**: (1), 818-840.

Malki L., Yanku M., Borovok I., Cohen G., Mevarech M. & Aharonowitz Y. (**2009**) Identification and characterization of *gshA*, a gene encoding the glutamate-cysteine ligase in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol,* **191**: (16), 5196-5204.

Marchal M., Briandet R., Halter D., Koechler S., DuBow MS., Lett M-C. & Bertin PN. (**2011**) Subinhibitory arsenite concentrations lead to population dispersal in *Thiomonas* sp. *PLoS One,* **6**: (8), e23181.

Marwan W., Schäfer W. & Oesterhelt D. (**1990**) Signal transduction in *Halobacterium* depends on fumarate. *EMBO J,* **9**: (2), 355-362.

Marwan W., Alam M. & Oesterhelt D. (**1991**) Rotation and switching of the flagellar motor assembly in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol,* **173**: (6), 1971-1977.

Maryon EB., Molloy SA. & Kaplan JH. (**2013**) Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1. *Am J Physiol Cell Physiol,* **304**: (8), C768-C779.

Masindi V. & Muedi KL (2018) Environmental contamination by heavy metals. *Heavy Metals,* **19**, 115-133. Intech Open.

Matilda CS., Mannully ST., Viditha RP. & Shanthi C. (**2019**) Protein profiling of metal-resistant *Bacillus cereus* VITSH1. *J Appl Microbiol,* **127**: (1), 121-133.

Matsumura K., Furukawa S., Ogihara H. & Morinaga Y. (**2011**) Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. *Biocontrol Sci,* **16**: (2), 69-72.

McEldowney S. (**1994**) Effect of cadmium and zinc on attachment and detachment interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with glass. *Appl Environ Microbiol,* **60**: (8), 2759-2765.

Megaw J. & Gilmore BF. (**2017**) Archaeal persisters: persister cell formation as a stress response in *Haloferax volcanii*. *Front Microbiol,* **8**, 1589.

Merian E. (**1984**) Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt beryllium, arsenic, cadmium and selenium, and their derivatives. *Toxicol Environ Chem,* **8**: (1), 9-38.

Mukherji R., Patil A. & Prabhune A. (**2015**) Role of extracellular proteases in biofilm disruption of gram positive bacteria with special emphasis on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Enz Eng,* **4**: (1),

Müller JA. & DasSarma S. (**2005**) Genomic analysis of anaerobic respiration in the archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC-1: dimethyl sulfoxide and trimethylamine N-oxide as terminal electron acceptors. *J Bacteriol,* **187**: (5), 1659-1667.

Nachin L., Nannmark U. & Nyström T. (**2005**) Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol,* **187**: (18), 6265-6272.

Nagajyoti PC., Lee KD. & Sreekanth T. (**2010**) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett,* **8**: (3), 199-216.

Nair S. & Finkel SE. (**2004**) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol,* **186**: (13), 4192-4198.

Näther DJ., Rachel R., Wanner G. & Wirth R. (**2006**) Flagella of *Pyrococcus furiosus*: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts. *J Bacteriol,* **188**: (19), 6915-6923.

Navarrete F. & De La Fuente L. (**2014**) Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Appl Environ Microbiol,* **80**: (3), 1097-1107.

Newton GL., Arnold K., Price MS., Sherrill C., Delcardayre SB., Aharonowitz Y., Cohen G., Davies J., Fahey RC. & Davis C. (**1996**) Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J Bacteriol,* **178**: (7), 1990-1995.

Ng WV., Kennedy SP., Mahairas GG., Berquist B., Pan M., Shukla HD., Lasky SR., Baliga NS., Thorsson V. & Sbrogna J. (**2000**) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci USA,* **97**: (22), 12176-12181.

Nicolaisen K., Hahn A., Valdebenito M., Moslavac S., Samborski A., Maldener I., Wilken C., Valladares A., Flores E. & Hantke K. (**2010**) The interplay between siderophore secretion and coupled iron and copper transport in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochim Biophys Acta,* **1798**: (11), 2131-2140.

Nies DH. (**1999**) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol,* **51**: (6), 730-750.

Nieto JJ., Ventosa A. & Ruiz-Berraquero F. (**1987**) Susceptibility of halobacteria to heavy metals. *Appl Environ Microbiol,* **53**: (5), 1199-1202.

Nocelli N., Bogino PC., Banchio E. & Giordano W. (**2016**) Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of *Rhizobia*. *Materials,* **9**: (6),

Noyce J., Michels H. & Keevil C. (**2006**) Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* O157 cross-contamination during food processing. *Appl Environ Microbiol,* **72**: (6), 4239-4244.

Nyström T. & Neidhardt FC. (**1992**) Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol,* **6**: (21), 3187-3198.

Nyström T. & Neidhardt FC. (**1994**) Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol Microbiol,* **11**: (3), 537-544.

O'Toole G., Kaplan HB. & Kolter R. (**2000**) Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol,* **54**: (1), 49-79.

Oesterhelt D. (**1975**) The purple membrane of *Halobacterium halobium*: a new system for light energy conversion. *Ciba Found Symp,* (31), 147-167.

Oesterhelt D. (**1998**) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr Opin Struct Biol,* **8**: (4), 489-500.

Oliver JD., Hite F., McDougald D., Andon NL. & Simpson LM. (**1995**) Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol,* **61**: (7), 2624-2630.

Oliver JD. (**2005**) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol,* **43 Spec No**, 93-100.

Oren A. (**1999**) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev,* **63**: (2), 334-348.

Oren A. (**2008**) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems,* **4**, 2.

Paalman M., Van Der Weijden C. & Loch J. (**1994**) Sorption of cadmium on suspended matter under estuarine conditions; competition and complexation with major sea-water ions. *Wat Air Soil Pollut,* **73**: (1), 49-60.

Patzer SI. & Hantke K. (**1998**) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol,* **28**: (6), 1199-1210.

Pedone E., Bartolucci S. & Fiorentino G. (**2004**) Sensing and adapting to environmental stress: the archaeal tactic. *Front Biosci,* **9**, 2909-2926.

Pereira F., Kerkar S. & Krishnan KP. (**2013**) Bacterial response to dynamic metal concentrations in the surface sediments of a solar saltern (Goa, India). *Environ Monit Assess,* **185**: (5), 3625-3636.

Perrin C., Briandet R., Jubelin G., Lejeune P., Mandrand-Berthelot MA., Rodrigue A. & Dorel C. (**2009**) Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. *Appl Environ Microbiol,* **75**: (6), 1723-1733.

Pfeifer F. & Betlach M. (**1985**) Genome organization in *Halobacterium halobium*: a 70 kb island of more (AT) rich DNA in the chromosome. *Mol Gen Genet,* **198**: (3), 449-455.

Pfeifer F. (**2012**) Distribution, formation and regulation of gas vesicles. *Nat Rev Microbiol,* **10**: (10), 705.

Pfeiffer F., Schuster SC., Broicher A., Falb M., Palm P., Rodewald K., Ruepp A., Soppa J., Tittor J. & Oesterhelt D. (**2008**) Evolution in the laboratory: the genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1. *Genomics,* **91**: (4), 335-346.

Pfeiffer F., Marchfelder A., Habermann B. & Dyall-Smith ML. (**2019**) The genome sequence of the *Halobacterium salinarum* type strain is closely related to that of laboratory strains NRC-1 and R1. *Microbiol Resour Announc,* **8**: (28), e00429-00419.

Philips J., Rabaey K., Lovley DR. & Vargas M. (**2017**) Biofilm formation by *Clostridium ljungdahlii* is induced by sodium chloride stress: experimental evaluation and transcriptome analysis. *PloS one,* **12**: (1), e0170406-e0170406.

Pinto D., Santos MA. & Chambel L. (**2015**) Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. *Crit Rev Microbiol,* **41**: (1), 61-76.

Popescu G. & Dumitru L. (**2009**) Biosorption of some heavy metals from media with high salt concentrations by halophilic archaea. *Biotechnol Biotechnol Equip,* **23**: (sup1), 791-795.

Priester JH., Olson SG., Webb SM., Neu MP., Hersman LE. & Holden PA. (**2006**) Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol,* **72**: (3), 1988-1996.

Rahman I., Shahamat M., Kirchman P., Russek-Cohen E. & Colwell R. (**1994**) Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Appl Environ Microbiol,* **60**: (10), 3573-3578.

Rawal N., Kelkar SM. & Altekar W. (**1988**) Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaebacteria. *Indian J Biochem Bio,* **25**: (6), 674-686.

Reddy MS., Prasanna L., Marmeisse R. & Fraissinet-Tachet L. (**2014**) Differential expression of metallothioneins in response to heavy metals and their involvement in metal tolerance in the symbiotic basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Microbiology* **160**: (Pt 10), 2235-2242.

Reindel S., Schmidt CL., Anemüller S. & Matzanke BF. (**2005**) Expression and regulation pattern of ferritin-like DpsA in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *Biometals,* **18**: (4), 387-397.

Rensing C., Ghosh M. & Rosen BP. (**1999**) Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol,* **181**: (19), 5891-5897.

Rode A. (**2004**) Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen. *Dissertation,* Universität Duisburg-Essen.

Rodrigo-Baños M., Garbayo I., Vílchez C., Bonete MJ. & Martínez-Espinosa RM. (**2015**) Carotenoids from haloarchaea and their potential in biotechnology. *Mar Drugs,* **13**: (9), 5508-5532.

Ruepp A. & Soppa J. (**1996**) Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarium* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the arcRACB gene cluster. *J Bacteriol,* **178**: (16), 4942-4947.

Sauer K., Camper AK., Ehrlich GD., Costerton JW. & Davies DG. (**2002**) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol,* **184**: (4), 1140-1154.

Schadow KH., Simpson WA. & Christensen GD. (**1988**) Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *J Infect Dis,* **157**: (1), 71-77.

Schalk IJ., Hannauer M. & Braud A. (**2011**) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol,* **13**: (11), 2844-2854.

Schelert J., Dixit V., Hoang V., Simbahan J., Drozda M. & Blum P. (**2004**) Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *J Bacteriol,* **186**: (2), 427-437.

Schmidt MG., Attaway HH., Sharpe PA., John J., Sepkowitz KA., Morgan A., Fairey SE., Singh S., Steed LL. & Cantey JR. (**2012**) Sustained reduction of microbial burden on common hospital surfaces through introduction of copper. *J Clin Microbiol,* **50**: (7), 2217-2223.

Schneider E. & Hunke S. (**1998**) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev,* **22**: (1), 1-20.

Schue M., Fekete A., Ortet P., Brutesco C., Heulin T., Schmitt-Kopplin P., Achouak W. & Santaella C. (**2011**) Modulation of metabolism and switching to biofilm prevail over exopolysaccharide production in the response of *Rhizobium alamii* to cadmium. *PLoS One,* **6**: (11), e26771.

Sehgal S. & Gibbons N. (**1960**) Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Microbiol,* **6**: (2), 165-169.

Selevsek N., Chang C-Y., Gillet LC., Navarro P., Bernhardt OM., Reiter L., Cheng L-Y., Vitek O. & Aebersold R. (**2015**) Reproducible and consistent quantification of the *Saccharomyces cerevisiae* proteome by SWATH-mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics,* **14**: (3), 739-749.

Shahmohammadi HR., Asgarani E., Terato H., Saito T., Ohyama Y., Gekko K., Yamamoto O. & Ide H. (**1998**) Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA-damaging agents. *J Radiat Res,* **39**: (4), 251-262.

Sharma K., Gillum N., Boyd JL. & Schmid A. (**2012**) The RosR transcription factor is required for gene expression dynamics in response to extreme oxidative stress in a hypersaline-adapted archaeon. *BMC Genomics,* **13**: (1), 351.

Siegele DA. (**2005**) Universal stress proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol,* **187**: (18), 6253-6254.

Sigrist-Nelson K (1981) Investigations on the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Membrane Proteins: A Laboratory Manual,* (Azzi A, Brodbeck U. & Zahler P, eds.), 120-127. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Singh S., Singh SK., Chowdhury I. & Singh R. (**2017**) Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J,* **11**, 53.

Slaveykova V. & Cheloni G. (**2018**) Preface: special issue on environmental toxicology of trace metals. *Environments,* **5**: (138), 1-4.

Smirnov A., Kulakovskaya T. & Kulaev I. (**2002a**) Phosphate accumulation by an extremely halophilic archae *Halobacterium salinarium*. *Process Biochem,* **37**: (6), 643-649.

Smirnov A., Suzina N., Kulakovskaia T. & Kulaev I. (**2002b**) Magnesium orthophosphate, a new form of reserve phosphates in the halophilic archaeon *Halobacterium salinarium*. *Mikrobiologiia,* **71**: (6), 786-793.

Southern EM. (**1975**) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol,* **98**: (3), 503-517.

Spain A. (**2003**) Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev Undr Grad Res,* **2**, 1-6.

Spoering AL. & Lewis K. (**2001**) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol,* **183**: (23), 6746-6751.

Srivastava P. & Kowshik M. (**2013**) Mechanisms of metal resistance and homeostasis in haloarchaea. *Archaea,* **2013**, 732864.

Stewart PS., Peyton BM., Drury WJ. & Murga R. (**1993**) Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol,* **59**: (1), 327-329.

Stoodley P., Sauer K., Davies DG. & Costerton JW. (**2002**) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol,* **56**: (1), 187-209.

Sundquist A. & Fahey R. (**1989**) The function of gamma-glutamylcysteine and bis-gamma-glutamylcystine reductase in *Halobacterium halobium*. *J Biol Chem,* **264**: (2), 719-725.

Switzer RC, 3rd., Merril CR. & Shifrin S. (**1979**) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem,* **98**: (1), 231-237.

Tabak HH., Lens P., van Hullebusch ED. & Dejonghe W. (**2005**) Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides–1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Rev Environ Sci Bio,* **4**: (3), 115-156.

Teitzel GM. & Parsek MR. (**2003**) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol,* **69**: (4), 2313-2320.

Tikhomirova A., Jiang D. & Kidd SP. (**2015**) A new insight into the role of intracellular nickel levels for the stress response, surface properties and twitching motility by *Haemophilus influenzae*. *Metallomics,* **7**: (4), 650-661.

Tonner PD., Pittman AM., Gulli JG., Sharma K. & Schmid AK. (**2015**) A regulatory hierarchy controls the dynamic transcriptional response to extreme oxidative stress in archaea. *PLoS Genet,* **11**: (1), e1004912.

Tripepi M., Imam S. & Pohlschröder M. (**2010**) *Haloferax volcanii* flagella are required for motility but are not involved in PibD-dependent surface adhesion. *J Bacteriol,* **192**: (12), 3093-3102.

Tug G. & Duman F. (**2010**) Heavy metal accumulation in soils around a salt lake in Turkey. *Pak J Bot,* **42**: (4), 2327-2333.

Unosson E. (**2015**) Antibacterial strategies for titanium biomaterials. *Dissertation,* Acta Universitatis Upsaliensis.

Valko M., Jomova K., Rhodes CJ., Kuča K. & Musílek K. (**2016**) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol,* **90**: (1), 1-37.

Van den Bergh B., Fauvart M. & Michiels J. (**2017**) Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol Rev,* **41**: (3), 219-251.

van Hullebusch ED., Zandvoort MH. & Lens PN. (**2003**) Metal immobilisation by biofilms: mechanisms and analytical tools. *Rev Environ Sci Bio,* **2**: (1), 9-33.

Van Veen HW., Abee T., Kortstee G., Konings WN. & Zehnder A. (**1993**) Characterization of two phosphate transport systems in *Acinetobacter johnsonii* 210A. *J Bacteriol,* **175**: (1), 200-206.

van Veen HW. & Konings WN. (**1997**) Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. *Semin Cancer Biol,* **8**: (3), 183-191.

Vidakovic L., Singh PK., Hartmann R., Nadell CD. & Drescher K. (**2018**) Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection. *Nat Microbiol,* **3**: (1), 26.

Vogel C. & Marcotte EM. (**2012**) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet,* **13**: (4), 227-232.

Voica DM., Bartha L., Banciu HL. & Oren A. (**2016**) Heavy metal resistance in halophilic bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Lett,* **363**: (14).

Völkel S. (**2013**) Einfluss von Umweltfaktoren auf die Biofilmbildung in halophilen Archaea. *Bachelor-Thesis,* Technische Universität Darmstadt.

Völkel S. (**2015**) Einfluss von Schwermetallionen auf haloarchaeale Biofilme. *Master-Thesis,* Technische Universität Darmstadt.

Völkel S., Fröls S. & Pfeifer F. (**2018**) Heavy metal ion stress on *Halobacterium salinarum* R1 planktonic cells and biofilms. *Front Microbiol,* **9**: (3157).

Wang G., Kennedy SP., Fasiludeen S., Rensing C. & DasSarma S. (**2004**) Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. *J Bacteriol,* **186**: (10), 3187-3194.

Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer FT., de Beer TAP., Rempfer C. & Bordoli L. (**2018**) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res,* **46**: (W1), W296-W303.

Weast RC. & Astle MJ (1984) *CRC handbook of chemistry and physics, 64 edn.*

Wloch R. (**2016**) Isolierung und Charakterisierung von extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen von *Halobacterium salinarum* R1. *Master-Thesis,* Technische Universität Darmstadt.

Woods WG. & Dyall-Smith ML. (**1997**) Construction and analysis of a recombination-deficient (*radA*) mutant of *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol,* **23**: (4), 791-797.

Yin J., Xu LX., Cherney MM., Raux-Deery E., Bindley AA., Savchenko A., Walker JR., Cuff ME., Warren MJ. & James MN. (**2006**) Crystal structure of the vitamin B 12 biosynthetic cobaltochelatase, CbiX S, from *Archaeoglobus fulgidus*. *J Struct Funct Genomics,* **7**: (1), 37-50.

Zhang W., Brooun A., Mueller MM. & Alam M. (**1996**) The primary structures of the Archaeon *Halobacterium salinarium* blue light receptor sensory rhodopsin II and its transducer, a methyl-accepting protein. *Proc Natl Acad Sci USA,* **93**: (16), 8230-8235.

Zhang Y., Zhang Y., Sun T. & Chai T. (**2010**) Structure and function of heavy metal transporter P(1B)-ATPase in plant: a review. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao,* **26**: (6), 715-725.

Zolghadr B., Klingl A., Koerdt A., Driessen AJ., Rachel R. & Albers S-V. (**2010**) Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol,* **192**: (1), 104-110.

Zolnerciks JK., Andress EJ., Nicolaou M. & Linton KJ. (**2011**) Structure of ABC transporters. *Essays Biochem,* **50**: (1), 43-61.

Anhang

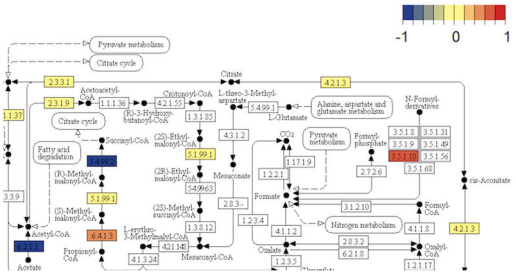
Ergänzende Daten sind auf einer beiliegenden CD-Rom zusammengefasst.

Anhang 1: Proteomdaten.xlsm

Accession Nr.	Protein Name	Gene name	fold change Cu/K	log2 (fold change)	p-value Cu/K	-log10(p-value)
B0R339	Transcription initiation factor IIB	tfb OE_1476R	14,68	3,88	3,05E-04	3,52
B0R7R5	Ribonucleoside-diphosphate reductase	nrdA1 OE_4348R	7,79	2,96	6,46E-07	6,19
B0R4Y4	50S ribosomal protein L13	rpl13 OE_2633F	7,64	2,93	1,76E-05	4,75
B0R400	Phosphomethylpyrimidine synthase	thiC OE_2057F	6,91	2,79	6,53E-17	16,19
B0R8W3	Uncharacterized protein	OE OE_7177F OE_8010E	6,03	2,59	3,40E-06	5,47
B0R2Z0	DUF5059 domain / haloarchaeal	hcgD OE_1391R	5,76	2,53	1,85E-09	8,73
B0R5J7	Uncharacterized protein	OE OE_3026R	5,53	2,47	1,49E-05	4,83
B0R2M0	UCP015877 family protein	OE_1156R	5,33	2,41	8,52E-07	6,07
B0R5X9	DUF262/DUF1524 domain	OE_3262R	4,70	2,23	3,57E-08	7,45
B0R521	Fe-coproporphyrin synthase	ahbC cmo2 pssE2 OE	4,66	2,22	2,44E-04	3,61
B0R3Z0	P-type transport ATPase (P	copA OE_2042F	4,64	2,21	1,21E-02	1,92
B0R505	Mechanosensitive channel	mscS1 OE_2872R	4,40	2,14	4,45E-01	0,35
B0R6Z6	Acyl-CoA synthetase	OS=H acsS OE_3891R	3,76	1,91	1,09E-01	0,96
B0R639	30S ribosomal protein S8e	rpsBe OE_3357R	3,48	1,80	5,41E-04	3,27
B0R8N0	PadR family transcription re	OE_6177F OE_7057F	3,44	1,78	2,37E-04	3,63
B0R7Y5	NMD3 family protein	OS=H OE_4467F	3,37	1,75	1,17E-05	4,93
B0R7P9	UPF0148 protein	OE_4320 OE_4320R	3,27	1,71	3,05E-07	6,52
B0R667	50S ribosomal protein L24	rplX4 OE_3404F	3,20	1,68	6,12E-05	4,21
B0R750	Small CPxCG-related zinc	OE_3977R	3,14	1,65	5,42E-05	4,27
B0R671	30S ribosomal protein S8	rpsB OE_3410F	3,09	1,63	5,24E-11	10,28
B0R9X6	Uncharacterized protein	OE OE_5211F	2,92	1,55	1,65E-07	6,78
B0R842	ABC-type transport system	OE_4576F	2,91	1,54	3,37E-06	5,47
B0R369	Uncharacterized protein	OE OE_1539F	2,86	1,52	7,24E-03	2,14
B0R6W4	Probable oxidoreductase	(F OE_3834R	2,85	1,51	3,59E-07	6,44
B0R2Z7	PadR family transcription re	rosR OE_1405R	2,81	1,49	1,17E-09	8,93
B0R5S5	Thymidine kinase	OS=Halo tdk OE_3159R	2,77	1,47	4,12E-08	7,38
B0R452	DHH/RecJ family phosphoe	OE_2141F	2,75	1,46	2,41E-07	6,62
B0R5M0	Dodecin	OS=Halobacterium OE_3073R	2,71	1,44	1,79E-02	1,75
B0R669	50S ribosomal protein L5	O rplS OE_3407F	2,69	1,43	1,72E-03	2,76
B0R6G8	Homolog to dipeptide epime	OE_3584R	2,64	1,40	1,70E-01	0,77
B0R676	Endonuclease NucS	OS=H nucS nucS2 OE_3783	2,62	1,39	1,38E-03	2,87
B0R679	Protein translocase subunit	secY OE_3418F	2,60	1,38	8,37E-02	1,08
B0R435	Transcription factor E	OS=H tfeA tfs OE_2118F	2,58	1,37	6,96E-06	5,16
B0R434	tRNA (cytidine(56)-2'-O)-m	OE_2117F	2,56	1,35	1,11E-09	8,96
B0R6P8	FO synthase subunit 1	OS= coFO OE_3722F	2,53	1,34	2,52E-02	1,60
B0R6H3	ArsR family transcription re	OE_3589F	2,52	1,33	6,56E-05	4,18
B0R8X8	Non-canonical purine NTP	ham1 OE_3863R	2,51	1,33	2,84E-08	7,55

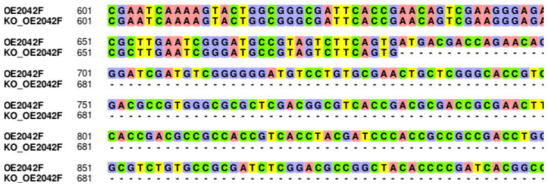
Prozessierte Rohdaten der Proteomstudie in *H. salinarum* R1 inklusive PDB-Blast, Transmembranhelix und Signalpeptidanalyse.

Anhang 2: KEGG-Pathways



Übersicht von Proteinabundanzen der Proteomstudie und Einordnung in die jeweiligen KEGG-Pathways (.png Format). Dargestellt sind die Vergleiche von Metallionen-behandelten Proben mit unbehandelten Proben aus planktonischen Zellen bzw. Biofilmen. Log_2 (*fold changes*) sind auf -1 und +1 normiert.

Anhang 3: Sequenzanalyse Gendeletionen



Darstellung von Sequenzierungen der Gendeletionsmutanten im Vergleich zum *H. salinarum* R1 Wildtyp (.pdf Format)

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen gängiger molekularbiologische Definitionen und SI-Einheiten sind gemäß den Vorgaben der *American Society for Microbiolog* (https://jb.asm.org/) nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
ABC-	ATP-bindende Kassette (ATP binding cassette)
Amp	Ampicillin
AO	Acridinorange
APS	Ammoniumpersulfat
Bis-Tris	Bisamino-trismethan
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, Bovines Serumalbumin
CbiX1	Sirohydrochlorin cobaltochelatase
CDF-	Kationen-Diffusionsförderer (*cation diffusion facilitator*)
*c*DNA	komplementäre DNA (*complementary DNA*)
CID	*Collision Induced Dissociation*
CLSM	konfokale *Laser Scanning* Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*)
Co^{2+}	Cobalt
ConA	Concanavalin A
CopA	Cu^{2+}-exportierende ATPase
C_T	*cycle threshold*
Cu^{2+}	Kupfer
DDA	*Data Dependent Aquisition*
ddH_2O	doppelt deionisiertes Wasser
dH_2O	einfach deionisiertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
Dpp	Dipeptid
DpsA	*DNA protection during starvation protein A* (Ferritin-ähnlich)
DS	*downstream*
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	enzymvermittelte Chemilumineszenzreaktion
*e*DNA	extrazelluläre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
et al.	*et alii* (und andere)
FC	*fold change*
FDR	Falscherkennungsrate (*false discovery rate*)
Fe^{2+}	Eisen
FWHM	*Full Width Half Maximum*
g	Gravitationsfeldstärke
GSH	Glutathion
H. salinarum	*Halobacterium salinarum*
HCl	Salzsäure
Hly	Halolysin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HTH	Helix-*turn*-Helix
*i*DNA	intrazelluläre DNA
ISH-	*In-situ*-Hybridisierung
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
KEGG	*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LAU	Lichtabsorbierende Einheiten (*light absorbing units*)
LB	*lysogeny broth*
LC	Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatopgraphy*)
LED	Leuchtdiode (*light-emitting diode*)
log_{10}	dekadischer Logarithmus
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
M^{2+}	Schwermetallion
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MHK	minimale Hemmkonzentration
Mn^{2+}	Mangan
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
n.ch.	nicht charakterisiert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
Ni^{2+}	Nickel
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PC	Hauptkomponente (*principal component*)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*)
PCM	Phasenkontrastmikroskopie
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat
pH	*potentia hydrogenii*
PI	Propidiumiodid
plankt.	planktonisch
PMA	Propidiummonoazid
Pst	Phosphat
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR (*real-time quantitative PCR*)
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (*reversed phase*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
rpoB1	DNA-abhängige RNA-Polymerase Untereinheit B
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Rasterelektronenmikroskopie (*Scanning electron microscopy*)
S-Layer	Oberflächenschicht (*surface layer*)
sp.	Spezies
SSC	*saline sodium citrate*
SWATH	*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Spectra*
t	Zeit (*time*)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMAO	Trimethylaminoxid
TOF	*time of flight*
U	*Unit*
Ugp	Glycerin-3-phosphat
UniProtKB	*UniProt Knowledgebase*
US	*upstream*
Usp	Universales Stressprotein

V	Volt
v/v	volume per volume
v/v/v	volume per volume per volume
VBNC	lebend aber nicht kultivierbar (*viable but non-culturable*)
w/v	weight per volume
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Zn^{2+}	Zink
ZnuC	*Zinc transport system ATP-binding protein C*

Beiträge anderer

Kapitel III

Die Probenpräparation und rasterelektronenmikroskopische Analysen wurden am Fachbereich Materialwissenschaften in Zusammenarbeit mit **Ulrike Kunz** (Physikalische Metallkunde) und **Dr. Nathalie Benker** (Institut für Angewandte Geowissenschaften, AG Kandler) durchgeführt.

Die Probenvorbereitung von Biofilm- und EPS-Proben erfolgte durch die Nutzung der Gefriertrocknungsanlage der AG Warzecha unter der Anleitung von **Dr. Jascha Volk**.

Atomabsorptionsspektrometrische Analysen erfolgten am Institut für Angewandte Geowissenschaften in Kooperation mit **Zahra Neumann** (AG Schüth).

Kapitel IV

Massenspektrometrische Analysen und technische Auswertungen wurden von **Dr. Christof Lenz** (Bioanalytische Massenspektrometrie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen; Bioanalytik, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen) durchgeführt.

Die statistischen Auswertungen der Proteomdaten erfolgten in Zusammenarbeit mit **Dr. Sascha Hein** (AG Simon).

Kapitel V

Die *H. salinarum* R1 Deletionsmutante ΔOE2816F wurde von **M.Sc. Johannes Born** erstellt.

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Völkel, S., Fröls, S. & Pfeifer, F. (2018). Heavy metal ion stress on *Halobacterium salinarum* R1 planktonic cells and biofilms. *Front Microbiol*, **9**:(3157), https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03157

Völkel S., Hein S., Benker N., Pfeifer F., Lenz C. & Losensky G. (2020) How to cope with heavy metal ions: cellular and proteome-level stress response to divalent copper and nickel in *Halobacterium salinarum* R1 planktonic and biofilm cells. *Front Microbiol*, 10:(3056), https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03056

Während dieser Arbeit wurde an folgender Publikation mitgewirkt:

Sethmann I., **Völkel S.,** Pfeifer F. & Kleebe H-J. (2018) Development of phosphatized calcium carbonate biominerals as bioactive bone graft substitute materials, part II: Functionalization with antibacterial silver ions. *J Funct Biomater,* **9**:(4), 67, https://doi.org/10.3390/jfb9040067

Konferenzbeiträge

Poster

- Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Würzburg, März 2017:

  Völkel, S., Fröls, S. & Pfeifer, F. "*Influence of heavy metal ions on haloarchaeal biofilms*."

- Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Wolfsburg, April 2018:

  Völkel, S., Lenz, C., Benker, N., Hein, S., Losensky, G. & Pfeifer, F. *„Hbt. salinarum under heavy metal stress: A proteomic comparison between planktonic cells and biofilms."*

- Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Mainz, März 2019:

  Völkel, S., Lenz, C., Benker, N., Hein, S., Losensky, G. & Pfeifer, F. "*Heavy metal stress on Halobacterium salinarum: Effects on EPS composition and the proteome of biofilm cells*."

Wissenschaftliche Vorträge

- 18th Frankfurt meeting on genome function and gene regulation in Archaea, Schmitten, September 2017:

  Völkel, S., Fröls, S. & Pfeifer, F. "*Influence of heavy metal ions on haloarchaeal biofilms."*

- 19th Frankfurt meeting on genome function and gene regulation in Archaea, Schmitten, Juli 2018:

  Völkel, S., Lenz, C., Benker, N., Hein, S., Losensky, G. & Pfeifer, F. "*Hbt. salinarum under heavy metal stress: A proteomic comparison between planktonic cells and biofilms*."

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Sabrina Völkel
Geburtsdatum	30.09.1990
Geburtsort	Langen

Ausbildung

Seit 11/2015	Dissertation, Technische Universität Darmstadt
10/2014 – 09/2015	Förderung durch das Deutschlandstipendium für begabte und leistungsstarke Studierende
10/2013 – 09/2015	Masterstudium (Master of Science) Technische Biologie, Technische Universität Darmstadt
	Master-Thesis: Einfluss von Schwermetallionen auf haloarchaeale Biofilme
10/2010 – 07/2013	Bachelorstudium (Bachelor of Science) Biologie, Technische Universität Darmstadt
	Bachelor-Thesis: Einfluss von Umweltfaktoren auf die Biofilmbildung in halophilen Archaea
08/2007 – 06/2010	Abitur, Dreieichschule (Gymnasium) Langen
	Leistungskurse: Biologie und Englisch

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, daher möchte ich mich an dieser Stelle bei all den Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung die Durchführung und Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle danke ich besonders Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer für die Möglichkeit an diesem Thema zu arbeiten und die sehr gute Betreuung während dieser Zeit. Danke, dass ich meine Arbeit sehr frei gestalten konnte und bei Fragen und Problemen stets hilfreiche Unterstützung erhalten habe.

Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit sowie für viele wertvolle Ratschläge und die Hilfe bei vielerlei wissenschaftlichen Fragestellungen.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Gerald Losensky, der zusammen mit Johannes Born für eine tolle Arbeitsatmosphäre in Labor und Büro gesorgt und mich bei jeglichen Fragen und Problemen jederzeit unterstützt und motiviert hat. An dieser Stelle möchte ich mich zudem bei Dr. Sabrina Sommerlad (geb. Fröls) bedanken, die mich zu Beginn meiner Bachelor-Thesis überhaupt zu diesem Thema gebracht und durch ihre gute Betreuung während Bachelor- und Master-Thesis die Basis für diese Arbeit geschaffen hat.

Außerdem danke ich allen Kooperationspartnern für die erfolgreiche Zusammenarbeit an diversen Projekten. Hierzu zählen Dr. Christof Lenz und Dr. Sascha Hein, die an der Durchführung der MS-Analysen bzw. der statistischen Auswertung der Proteomdaten beteiligt waren. Des Weiteren danke ich Dr. Nathalie Benker und Ulrike Kunz für die erfolgreiche Zusammenarbeit am Elektronenmikroskop sowie Zahra Neumann für die Durchführung der Metallkonzentrationsmessung und Dr. Jascha Volk für die Möglichkeit der Nutzung der Gefriertrocknungsanlage.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppen Pfeifer, Kletzin, Simon und Göringer für die hin und wieder geliehenen bzw. geteilten Geräte und Chemikalien bedanken. Durch das allgemein positive Arbeitsklima war der Arbeitsalltag stets angenehm und hat dafür gesorgt, dass ich jeden Tag mit Freude zur Arbeit gegangen bin.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem meinem Freund Patrick, der mich von Abitur über Studium bis zur Doktorarbeit durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat. Danke für deine unermüdliche Unterstützung und Motivation und dafür, dass du während dieser Zeit immer für mich da warst.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Opa bedanken, die mich während der letzten Jahre immer unterstützt haben und ein großer Rückhalt für mich waren.

Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Felicitas Pfeifer im Fachbereich Biologie, Fachgebiet Mikrobiologie und Archaea, der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von November 2015 bis März 2020 angefertigt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Darmstadt, den 17.03.2020

Sabrina Völkel

© Patrick Haas