
Interaktionen und Aggregationsverhalten von akzessorischen Gasvesikelproteinen bei der Gasvesikelbildung in Haloarchaea



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biologin Stella Christina Tavlaridou

aus Mainz

1. Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

2. Referent: PD Dr. Arnulf Kletzin

Tag der Einreichung: 26.09.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2013

Darmstadt 2014

D17

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer bedanken für die Bereitstellung des interessanten Themas, die gute Betreuung und ihre Unterstützung während der gesamten Arbeit. Durch die immer hilfreichen Diskussionen und die Möglichkeit Dinge selbst zu planen und auszuprobieren habe ich unglaublich viel dazugelernt.

Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin danke ich für ein immer offenes Ohr bei jeder Art von Problemen und für wertvolle wissenschaftliche Ratschläge.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Freunden und (ehemaligen) Arbeitskollegen Sabrina Fröls, Dennis Petrasch, Andreas Veith und Larissa Marschus. Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei jeder Art von fachlichen oder persönlichen Problemen war unersetzlich. Danke auch an Gerald Losensky, Ina Schmidt, Stephan Zindel sowie an Uwe Pöll, der versucht hat mich in die Geheimnisse der FPLC einzuweihen.

Ein großes Dankeschön geht an Karin Faist, Kerstin Weitzel, Renate Fröhlich, Gisela Schaffert und Gaby Liebig, die für ein perfekt organisiertes Labor gesorgt und eine nettes Arbeitsklima geschaffen haben. Ein spezieller Dank geht an Karin für die Hilfe bei den Elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie eine allgemein sehr gute Zusammenarbeit. Danke auch an Cordula Bernhard und Nam Suk Polin für ihre Hilfe im Labor.

Vielen Dank an die gesamte AG Simon für das Ausleihen von Laborgeräten und Materialien, für ihre Hilfsbereitschaft und immer nette Gespräche.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Meyer-Almes von der Hochschule Darmstadt danke ich für die Möglichkeit den Fluoreszenzreader zu benutzen.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Familie und meinen Freund Michael Forth. Mit ihrer Unterstützung, ihrem Verständnis und ihrer unendlichen Geduld haben sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. ZUSAMMENFASSUNG..... | 1 |
| 2. EINLEITUNG | 4 |
| 2.1. Halophile Archaea | 5 |
| 2.2. Halophile Proteine..... | 7 |
| 2.3. Gasvesikel..... | 8 |
| 2.3.1. Gasvesikel in der Biotechnologie..... | 11 |
| 2.4. Gasvesikel-kodierende Genregionen in Haloarchaea | 11 |
| 2.5. Der Modellorganismus <i>Haloferax volcanii</i> : Studium von haloarchaealen Genfunktionen und Proteinen..... | 13 |
| 2.6. Gasvesikelproteine..... | 15 |
| 2.6.1. GvpA und GvpC..... | 15 |
| 2.6.2. Die akzessorischen Gasvesikelproteine..... | 16 |
| 2.7. Ziel der Arbeit | 18 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 20 |
| 3.1. Materialien | 20 |
| 3.1.1. Chemikalien und Hilfsmittel | 20 |
| 3.1.2. Enzyme und Kits..... | 22 |
| 3.1.3. Größenstandards | 22 |
| 3.1.4. Synthetische Oligonukleotide..... | 23 |
| 3.1.5. Verwendete Mikroorganismen | 25 |
| 3.1.6. Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotikaresistenzen)..... | 25 |
| 3.2. Mikrobiologische Methoden..... | 25 |
| 3.2.1. Wachstumsbedingungen der Mikroorganismen..... | 25 |
| 3.2.2. Wachstumskurve von <i>Hfx. volcanii</i> - Transformanten..... | 26 |
| 3.2.3. Transformation von <i>E.coli</i> | 26 |
| 3.2.4. Konstrukte für die Transformation von <i>E.coli</i> BL-21 (DE3)..... | 27 |
| 3.2.5. Transformation von <i>Hfx. volcanii</i> WR340 | 27 |
| 3.2.6. Konstrukte für die Transformation von <i>Hfx. volcanii</i> WR340 | 28 |
| 3.3. Molekularbiologische Methoden | 33 |
| 3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 33 |
| 3.3.2. Ortsspezifische Mutagenese-PCR..... | 33 |
| 3.3.3. Molekularbiologische Standardtechniken..... | 35 |
| 3.3.4. Plasmidisolierung aus <i>Hfx. volcanii</i> WR340 | 36 |
| 3.3.5. Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analyse..... | 36 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.3.6. | Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden | 37 |
| 3.4. | Proteinchemische Methoden | 37 |
| 3.4.1. | Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode | 37 |
| 3.4.2. | Herstellung halobakterieller Proteinextrakte für Western-Analysen..... | 38 |
| 3.4.3. | Isolierung einzelner Proteine aus <i>Hfx. volcanii</i> für <i>in vitro</i> Studien | 39 |
| 3.4.4. | Natriumdodecylsulfat (SDS)- Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 39 |
| 3.4.5. | Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen | 39 |
| 3.4.6. | Herstellung von Antisera gegen halobakterielle Proteine..... | 40 |
| 3.4.7. | Nachweis von Proteinen mittels Western-Analyse | 40 |
| 3.4.8. | Rekombinante Expression und Reinigung von Gvp _{His} -Proteinen aus <i>E.coli</i> BL21 | 42 |
| 3.4.9. | Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen über Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp _{His} -Proteinen und halobakteriellen Lysaten | 43 |
| 3.5. | Quantifizierung der Fluoreszenzintensität..... | 44 |
| 3.5.1. | Zellvorbehandlung für Fluoreszenzmessungen..... | 44 |
| 3.5.2. | Quantifizierung der Fluoreszenz mittels Phosphor Imager | 44 |
| 3.6. | Mikroskopische Analysen..... | 44 |
| 3.6.1. | Zellfixierung | 44 |
| 3.6.2. | Phasenkontrastmikroskopie (PKM) | 45 |
| 3.6.3. | Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) | 45 |
| 3.6.4. | Fluoreszenzmikroskopie | 45 |
| 4. | ERGEBNISSE..... | 46 |
| 4.1. | Gasvesikelbildung bei Überexpression einzelner <i>gvp</i> -Gene..... | 46 |
| 4.1.1. | Analyse der Gasvesikelbildung in p-vac + pX ^{ex} -Transformanten..... | 46 |
| 4.1.2. | Nachweis der überproduzierten Proteine in p-vac + pX ^{ex} -Transformanten | 49 |
| 4.2. | Kompensation des inhibitorischen Effekts großer Mengen von GvpM..... | 51 |
| 4.2.1. | Analyse der Gasvesikelbildung bei p-vac + pXM ^{ex} -Transformanten..... | 51 |
| 4.2.2. | Nachweis überproduzierter Gasvesikelproteine in pXM ^{ex} -Transformanten..... | 53 |
| 4.3. | <i>In vitro</i> Interaktionsstudien von GvpM mit verschiedenen Gasvesikelproteinen | 54 |
| 4.4. | <i>In vivo</i> Analysen mit Gvp-GFP Fusionsproteinen | 58 |
| 4.4.1. | <i>In vivo</i> Analysen mit pXM _{gfp} ^{ex} - und pX _{gfp} M ^{ex} -Transformanten..... | 62 |
| 4.5. | Mutagenesestudien mit GvpM..... | 66 |
| 4.5.1. | Einführen von Mutationen in den <i>gvpM</i> -Leserahmen über ortsspezifische Mutagenese-PCR..... | 68 |
| 4.5.2. | Analyse der Gasvesikelbildung in pvacΔM + pM _{Mut} ^{ex} -Transformanten..... | 70 |

| | |
|---|-----------|
| 5. DISKUSSION | 73 |
| 5.1. Erhöhte Mengen von GvpG, GvpH oder GvpM inhibieren die Gasvesikelbildung | 73 |
| 5.2. GvpH, GvpJ und GvpL kompensieren den inhibitorischen Effekt großer GvpM-Mengen..... | 75 |
| 5.3. GvpM interagiert mit GvpH, GvpJ und GvpL..... | 76 |
| 5.4. Gvp-GFP Fusionen visualisieren <i>in vivo</i> Proteinaggregationen..... | 78 |
| 5.5. <i>In vivo</i> Nachweis der Interaktion von GvpM mit GvpH und GvpL | 79 |
| 5.6. Hydrophobe Aminosäuren im N-terminalen Bereich von GvpM sind für die Funktion des Proteins essentiell..... | 81 |
| 5.7. Fazit und Ausblick | 84 |
| 6. LITERATUR | 86 |
| 7. ANHANG | 95 |
| 7.1. Abkürzungen | 95 |
| 7.2. Publikationen | 98 |
| 7.3. Lebenslauf | 99 |
| 7.4. Ehrenwörtliche Erklärung | 100 |

1. Zusammenfassung

Die Gasvesikelbildung in *Hbt. salinarum* PHH1 wird durch die Expression der p-vac Region vermittelt. Sie besteht aus zwei entgegengesetzt orientierten Genclustern *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM*. Als Strukturproteine der Gasvesikel wurden GvpA und GvpC identifiziert. GvpA bildet über Multimerisierung die gaspermeable Hülle, die von GvpC an der Außenseite stabilisiert wird. GvpA, F, G, J, K, L, M und O sind für die Bildung von Gasvesikeln essentiell. Die Gene *gvpFGHIJKLM* werden in der frühen, exponentiellen Wachstumsphase und vor dem Sichtbarwerden von bikonischen Proteinaggregaten, den Vorläuferstrukturen der Gasvesikel, transkribiert. Daher geht man davon aus, dass die entsprechenden Genprodukte bei der Initiation der Gasvesikelbildung eine Rolle spielen. Die genaue Funktion dieser sogenannten akzessorischen Gasvesikelproteine ist jedoch noch unklar.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF, G, H, I, J, K, L und M bei der Gasvesikelbildung in *Hbt. salinarum* PHH1 untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Analyse der Protein-Protein-Interaktionen und des Aggregationsverhaltens der Gasvesikelproteine.

Zunächst wurde der Effekt einer Überproduktion eines einzelnen Gasvesikelproteins in p-vac-Transformanten analysiert. Zur Überproduktion wurde dabei der Expressionsvektor pJAS35 verwendet, der den inserierten *gvp*-Leserahmen unter Kontrolle des starken Ferredoxin-Promotors exprimiert. Die Überproduktion von GvpG, H oder M führte zu einer Inhibition der Gasvesikelbildung, während erhöhte Mengen von GvpF, I, J, K oder L keinen Effekt hatten. Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Gasvesikelbildung in p-vac +pG^{ex}-, +pH^{ex}- oder +pM^{ex}-Transformanten ist, dass die großen Mengen von GvpG, H oder M mit anderen, nur in geringer Menge vorhandenen, essentiellen Gasvesikelproteinen interagieren und diese dann nicht mehr für die Gasvesikelbildung zur Verfügung stehen. Die Überproduktion von mehreren akzessorischen Gasvesikelproteinen stört die Gasvesikelsynthese dagegen nicht, wie der Vac positive Phänotyp von p-vac +pGHIJKLM^{ex}-Transformanten zeigte. Offenbar muss die relative Menge bestimmter, akzessorischer Gasvesikelproteine zueinander in einem bestimmten Verhältnis stehen, um eine intakte Gasvesikelbildung zu gewährleisten.

Am Beispiel von GvpM wurde getestet, ob die gleichzeitige Produktion ähnlich großer Mengen eines weiteren einzelnen Gasvesikelproteins in der Lage ist, die inhibitorische Wirkung von GvpM zu kompensieren. Hierfür wurden p-vac +pGM^{ex}-, +pHM^{ex}-, +pJM^{ex}- und +pLM^{ex}-Transformanten hergestellt und bezüglich der Bildung von Gasvesikeln untersucht. Die inhibitorische Wirkung großer Mengen von GvpM auf die Gasvesikelbildung kann durch vergleichbar große Mengen von GvpH, GvpJ oder GvpL neutralisiert werden, jedoch nicht durch vergleichbar große Mengen von GvpG. Eine intakte Gasvesikelbildung setzt also ein

balanciertes Mengenverhältnis von GvpM zu GvpH, GvpJ oder GvpL voraus. Die Western-Analysen mit pHM^{ex} und pJM^{ex} zeigten bei Verwendung eines Antiserums gegen GvpH bzw. GvpJ neben dem Protein-Monomer zusätzlich größere Proteinbanden. Dies lässt eine Multimerisierung in Gegenwart von GvpM bzw. eine Interaktion mit GvpM vermuten. Mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie konnte eine Interaktion zwischen GvpH_{His} und GvpM, GvpL_{His} und GvpM sowie GvpM_{His} und GvpJ *in vitro* mit in Hochsalz rückgefalteten Gvp_{His}-Proteinen nachgewiesen werden, nicht jedoch zwischen GvpM_{His} und GvpG.

In dieser Arbeit wurden auch die Aggregationen von Gasvesikelproteinen *in vivo* durch Fusion mit einer speziell an Hochsalzbedingungen adaptierten GFP-Variante detektiert. Bei GvpM_{GFP} wurden fluoreszierende Punkte in der Zelle beobachtet, was die starke Aggregation von GvpM unterstreicht. Bei GvpH_{GFP} zeigte sich, dass dieses normalerweise lösliche Protein in Gegenwart der p-vac-Proteine in Aggregaten vorliegt.

Für GvpM-GvpH und GvpM-GvpL konnte die Interaktion dieser Proteinpaares mit den entsprechenden GFP-Varianten direkt *in vivo* nachgewiesen werden. Die Interaktion von GvpM und GvpH führt offenbar dazu, dass GvpM_{GFP} keine detektierbaren Aggregate mehr bildet. In Gegenwart von GvpL sind weiterhin GvpM-Aggregate vorhanden und GvpL ist in diese Aggregate integriert. Möglich wäre, dass diese Interaktionen zur Bildung eines Initiationskomplexes führen, der zur Gasvesikelbildung benötigt wird. Sowohl GvpH als auch GvpL kompensieren, vermutlich durch Interaktion mit GvpM, die inhibitorische Wirkung großer Mengen von GvpM auf die Gasvesikelbildung, jedoch durch unterschiedliche Mechanismen.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden GvpM-Mutanten und ihr Einfluss auf die Gasvesikelbildung untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass vor allem hydrophobe Aminosäuren im N-terminalen und mittleren Bereich des Proteins für dessen Funktion essentiell sind. Da keine der Mutationen die Morphologie der Gasvesikel veränderte, ist GvpM wahrscheinlich nicht an der Formgebung der Gasvesikel beteiligt, sondern spielt bei der Initiation der Gasvesikelbildung eine wichtige Rolle.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits publiziert:

Tavlaridou, S., Faist, K., Weitzel, K., Pfeifer, F. (2013).

Effect of an overexpression of accessory Gvp proteins on gas vesicle formation in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* **17**, 277-287.

2. Einleitung

Die Domäne der Archaea wurde nach ihrer Entdeckung anhand 16S rRNA-Analysen phylogenetisch in 2 Gruppen eingeteilt: die Euryarchaeota und die Crenarchaeota (Woese & Fox, 1977; Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990). Nach heutigem Kenntnisstand existiert jedoch mindestens noch ein drittes Phylum: die Thaumarchaeota (Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Spang *et al.*, 2010). Archaea sind ubiquitär verbreitet und machen mehr als 20% der Biomasse aus (DeLong & Pace, 2001). Bemerkenswert ist allerdings, dass viele ihrer Vertreter an besonders extremen Standorten zu finden sind, z.B. Habitate mit extremen Temperaturen, extremen pH-Werten oder mit hohem osmotischen Druck (bis zu 30% Salzgehalt im umgebenden Medium). Innerhalb der drei verschiedenen Phyla sind die Euryarchaeota bei den Archaea die diverseste Gruppe. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die Methanogenen sowie die halophilen Archaea (Haloarchaea). Die halophilen Vertreter besiedeln äußerst salzhaltige Umgebungen wie natürliche Salzseen oder künstlich angelegte Meersalzsalinen. Zu den Crenarchaeota gehören Organismen, die entweder an extreme Hitze oder extreme Kälte adaptiert sind. Viele Vertreter dieser Gruppe finden sich aber auch in marinen Systemen. Thaumarchaeota wurden bisher in nahezu jedem mesophilen Habitat nachgewiesen, inklusive im Boden und in aquatischen Systemen. Alle bisher näher charakterisierten Vertreter dieses Phylums sind autotrophe Nitrifizierer und übernehmen damit eine essentielle Rolle im Stickstoff- und Kohlenstoffkreislauf (Könneke *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2010).

Wesentliche phänotypische Unterscheidungsmerkmale gegenüber den Domänen Bacteria und Eukarya bestehen bei Archaea im Aufbau der Zellwand sowie der Zytoplasmamembran. Bei Bacteria ist die Zellwand aus Peptidoglykan, einem Heteropolymer aus Polysacchariden (NAG=N-Acetylglucosamin, NAM=N-Acetylmuraminsäure) und Peptiden aufgebaut. Die archaeale Zellwand ist dagegen, abhängig von der Spezies, sehr unterschiedlich aufgebaut und besteht entweder aus Pseudopeptidoglykan, Polysacchariden, Glykoproteinen oder Proteinen (Kandler & König, 1998). Bakterielle bzw. eukaryotische Membranen sind aus Fettsäureesterlipiden aufgebaut. Die Zellmembran der Archaea besteht dagegen aus Phytanyletherlipiden (Woese *et al.*, 1978).

Im Aufbau des Genoms sowie im zentralen Metabolismus ähneln Archaea den Bacteria (Rivera *et al.*, 1998). Auf der Ebene molekularbiologischer Prozesse wie Transkription und Translation sowie DNA-Replikation finden sich dagegen mehr Gemeinsamkeiten mit Eukarya als mit Bacteria (Huet *et al.*, 1983; Dennis, 1997; Bell & Jackson, 2001; Bell *et al.*, 2001; Grabowski & Kelman, 2003). Die archaeale Genexpression stellt sozusagen eine vereinfachte Version des eukaryotischen Transkriptionssystems dar (Bell *et al.*, 1999a, b; Geiduschek & Ouhammouch, 2005). Die RNA-Polymerase der Archaea ähnelt in ihrem Aufbau aus 12

Untereinheiten der eukaryotischen RNA-Polymerase II (Langer *et al.*, 1995; Bell & Jackson, 1998; Bell & Jackson, 2001; Armache *et al.*, 2003). Zur Erkennung unterschiedlicher Promotorstrukturen benötigen die archaeale und die eukaryotische RNA-Polymerase spezifische Transkriptionsfaktoren, während bei Bacteria Sigmafaktoren diese Aufgabe übernehmen. Bei Archaea existieren drei generelle Transkriptionsfaktoren: das TATA-Box-Bindeprotein (TBP), der Transkriptionsfaktor B (TFB) sowie der Transkriptionsfaktor E (TFE) (Hausner & Thomm, 1993; Bell & Jackson, 2001). Die meisten Archaea besitzen nur eine Kopie des *tbp*-Gens und mehrere Kopien des *tfb*-Gens. Haloarchaea besitzen jedoch mehrere Kopien beider Gene (Ng *et al.*, 2000; Pfeiffer *et al.*, 2008). So besitzt *Halobacterium salinarum* (im Folgenden: *Hbt. salinarum*) bis zu acht verschiedene *tfb*- und sechs verschiedene *tbp*-Gene, die an der Genregulation unter verschiedenen Wachstumsbedingungen beteiligt sind (Baliga *et al.*, 2000; Coker *et al.*, 2007; Facciotti *et al.*, 2007; Teufel *et al.*, 2008; Turkarlan *et al.*, 2011; Bleiholder *et al.*, 2012). Die archaeale Promotorstruktur ist homolog zu der eukaryotischen TATA-Box und wird von TBP erkannt und gebunden (Reiter *et al.*, 1990; Hausner *et al.*, 1991; Hain *et al.*, 1992; Palmer & Daniels, 1995; Danner & Soppa, 1996; Thomm, 1996; Soppa & Link, 1997). Ein weiteres für Archaea typisches Promotorelement ist das BRE-Element (*transcription factor B recognition element*), eine purinreiche Region, welche dem *TFIIB-response-element* der Eukarya entspricht (Langer *et al.*, 1995). Es wird von TFB gebunden und ist für die Transkriptionsrichtung und die Promotorstärke entscheidend (Lagrange *et al.*, 1998; Qureshi & Jackson, 1998; Bell *et al.*, 1999a, b).

2.1. Halophile Archaea

Als halophil werden Organismen bezeichnet, die in Umgebungen mit erhöhter Salzkonzentration leben. Man unterscheidet dabei zum einen die extrem halophilen Organismen, welche für ihr Wachstum eine Salzkonzentration von mindestens 1,5 M NaCl benötigen. Selbst in Salzlösungen nahe der Sättigungsgrenze (bis zu 5,2 M NaCl) sind diese Organismen noch lebens- und vermehrungsfähig. Zum anderen gibt es die moderat halophilen Vertreter, bei denen die für ein optimales Wachstum benötigte Salzkonzentration zwischen 2,5-3 M NaCl liegt. Halophile Organismen finden sich in allen drei Domänen. Bei Eukarya sind es die Grünalge *Dunaliella* (Elevi Bardavid *et al.*, 2008) (Wachstum bis 5 M NaCl), aber auch einige schwarze Hefen (Gunde-Cimermana *et al.*, 2000; Petrovic *et al.*, 2002). Bei den Bacteria sind einige Arten der γ -Gruppe der Proteobakterien, der Cyanobakterien, der Flavobakterien, der Actinomyceten sowie die Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* als

halotolerante Vertreter zu nennen. In der Domäne der Archaea existieren in der Familie der *Halobacteriaceae* ausschließlich, bei den Methanogenen (*Methanohalobium*, *Methanohalophilus*) jedoch nur einige halophile Organismen. Die *Halobacteriaceae* gehören zur Ordnung der Halobacteriales, welche wiederum dem Phylum der Euryarchaeota zugeordnet wird. Die einzelnen Gattungen der *Halobacteriaceae* werden nach physiologischen Gesichtspunkten, wie Salzkonzentration- und pH-Optimum eingeteilt.

Haloarchaea weisen, je nach Spezies, eine charakteristische rote bis orange Pigmentierung der Zellen auf, welche auf die Bildung von C₄₀- und C₅₀-Carotinoiden, wie Lycopine und Bacterioruberine zurückzuführen ist. Diese verleihen den Zellen bei erhöhter Sonneneinstrahlung einen Schutz vor photooxidativen Schäden. Eine violette Färbung verursacht das in die Membran eingelagerte Retinalprotein Bakteriorhodopsin. Dieses Protein wird bei geringem Sauerstoffpartialdruck gebildet und baut unter Lichteinfluss einen Protonengradienten auf, welcher zur ATP-Synthese genutzt wird (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971 und 1973; Henderson *et al.*, 1990).

Um den osmotisch bedingten Wasserverlust in der Zelle, verursacht durch die hohe Ionendichte im Außenmedium, zu vermeiden, haben halophile Organismen spezielle Anpassungsstrategien entwickelt (Oren, 1999). Bei der Anreicherung von *compatible solutes* werden kleine organische Moleküle wie Glycerin, Saccharose oder Zuckerderivate intrazellulär angereichert, was einen osmotischen Ausgleich bewirkt (Oren, 1999). Die Aktivität von Enzymen bzw. die Faltung von Proteinen wird dabei nicht beeinträchtigt (Brown, 1990). Ein Nachteil dieser Strategie ist, dass diese Moleküle nur unter großem Energieaufwand gebildet bzw. in die Zelle transportiert werden können. Eine weitere Möglichkeit zum osmotischen Ausgleich der hohen extrazellulären Ionenkonzentrationen wird z. B. bei aeroben, extrem halophilen Archaea (Halobacteriales) und bei anaeroben halophilen Bakterien (Haloanaerobiales) angewendet: die sogenannte *salt-in*-Strategie (Oren, 1999). Dabei wird Salz in isoosmolaren Konzentrationen im Vergleich zu außen in der Zelle angereichert, was den Wasserverlust in der Zelle verhindert (Madigan & Oren, 1999; Oren, 1999). Bevorzugt wird dabei KCl (bis zu 4M) im Cytoplasma akkumuliert, im Gegensatz zu einer hohen NaCl-Konzentration im Außenmedium (Christian & Waltho, 1962; Dennis & Shimmin, 1997). Na⁺-Ionen sind kleiner als K⁺-Ionen und bilden demnach eine dichtere Hydrathülle, was der Umgebung mehr Wasser entzieht (Dennis & Shimmin, 1997). Um das zu vermeiden, wird in der Zelle vermehrt KCl angereichert, damit mehr Wasser in der Zelle verfügbar ist.

2.2. Halophile Proteine

Hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen erfordern eine Anpassung aller Zellkomponenten um ihre Funktionalität sicherzustellen (Oren 1999). Das gilt auch für alle intrazellulären Proteine, da die hohen Ionenkonzentrationen deren Faltung und Stabilität beeinflussen. Bei Organismen, die die *compatible-solutes*-Strategie benutzen, ist eine solche Anpassung nicht notwendig, bei der *salt-in*-Strategie, die *Hbt. salinarum* anwendet und bei der intrazellulär hohe Salzmengen akkumuliert werden, jedoch schon. Im Allgemeinen destabilisieren diejenigen Salzkonzentrationen, welche die Löslichkeit von Proteinen fördern die Proteinstruktur und umgekehrt (von Hippel & Schleich, 1969). Halophile Proteine sind aufgrund spezieller Eigenschaften in der Lage in einer Umgebung mit hoher Ionenstärke gleichzeitig löslich und stabil zu sein (Madern *et al.*, 2000). So unterscheidet sich z.B. die Aminosäurezusammensetzung halophiler Proteine von denen ihrer nicht-halophilen Homologe. Bei halophilen Proteinen sind vermehrt Aminosäuren mit sauren Seitenketten zu finden, welche sich vor allem auf der Proteinoberfläche befinden (Lanyi, 1974; Dym *et al.*, 1995; Frolow *et al.*, 1996; Pieper *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2002; Bieger *et al.*, 2003). Diese sauren Seitenketten sind stärker hydriert als andere Aminosäuren, was die Ausbildung eines Salz-Ionen-Netzwerkes begünstigt (Eisenberg *et al.*, 1992; Zaccai *et al.*, 1989; Dym *et al.*, 1995; Frolow *et al.*, 1996). Außerdem können saure und basische Seitenketten Salzbrücken ausbilden, welche vor den Ionen des Lösungsmittels geschützt sind (Dym *et al.*, 1995). Das alles trägt zur Stabilisierung der Proteinstruktur bei. Weiterhin enthalten halophile Proteine wesentlich weniger Lysin, dafür vermehrt Aminosäuren mit kleinen hydrophoben Resten, wie Glycin, Alanin oder Valin (Madern *et al.*, 1995). Sie besitzen außerdem weniger von den stark hydrophoben Aminosäuren (Phenylalanin, Isoleucin, Valin, Leucin), aber mehr Aminosäuren mit hydrophilen Seitengruppen (Serin, Threonin), was die Löslichkeit des Proteins unterstützt (Lanyi, 1974). Die Reduktion von Leucin resultiert in einer signifikanten Erniedrigung des hydrophoben Charakters der Proteinoberfläche (Madern *et al.*, 1995; Britton *et al.*, 1998). Das wiederum führt zu einer schwachen Bindung im Inneren des Proteins, welche durch hohe Salzkonzentrationen stabilisiert werden kann (Arakawa & Tokunaga, 2004).

Bei vielen isolierten, halophilen Enzymen erniedrigt eine steigende Salzkonzentration die Enzymaktivität. Ausnahmen sind jedoch die β -Galactosidase aus *Hfx. alicantei* (Holmes *et al.*, 1997) sowie die Katalase-Peroxidase aus *Hbt. salinarum*. Die 2 Aktivitäten dieses Enzyms weisen sogar unterschiedliche Abhängigkeiten von NaCl auf (Brown-Peterson & Salin 1993). Weiterhin sind Enzymaktivitäten häufig auch abhängig von der Art des Salzes. Bei vielen ist die Aktivität in KCl größer als in NaCl, z. B. bei der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase aus *Haloferax volcanii* (Bischoff & Rodwell, 1996).

Die rekombinante Produktion halophiler Proteine in *Escherichia coli* (im Folgenden: *E. coli*) führt zu einer inaktiven Form der Proteine (Blecher *et al.*, 1993; Cendrin *et al.*, 1993). Durch denaturierende Isolierung aus *E. coli* in 8 M Harnstoff wird sichergestellt, dass die Proteine zunächst vollständig entfaltet werden. Anschließend werden sie in Lösungen mit steigender Salz (KCl)- und sinkender Harnstoffkonzentration überführt, was die Rückfaltung in ihre native Konformation bewirken soll. Die Verwendung von KCl liegt darin begründet, dass Halobakterien die sogenannte *salt-in*-Strategie benutzen, die dazu führt, dass im Cytoplasma isoosmolare Konzentrationen von KCl im Vergleich zum Außenmedium vorliegen (Dennis & Shimmin, 1997). Die meisten halobakteriellen Proteine benötigen für ihre Stabilität und Funktionalität hohe KCl-Konzentrationen (Lanyi, 1974; Eisenberg & Wachtel, 1987; Oren, 1999). Eine erfolgreiche Rückfaltung unter den oben genannten Bedingungen konnte bereits für die Glukosedehydrogenase aus *Haloferax mediterranei* anhand ihrer enzymatischen Aktivität (Pire *et al.*, 2001) und für das TBP-Protein aus *Hbt. salinarum* über CD-Spektroskopie (Soppa & Link, 1997) gezeigt werden.

2.3. Gasvesikel

Gasvesikel sind gaspermeable, intrazelluläre Hohlkörper. Diese Strukturen erniedrigen die Zelldichte und ermöglichen eine Positionierung innerhalb der Wassersäule, wo ein optimales Licht- bzw. Nähr- und Sauerstoffangebot herrscht. Bisher wurden Gasvesikel ausschließlich bei prokaryotischen Mikroorganismen, sowohl in Bacteria als auch in Archaea, gefunden. Bei Bacteria finden sich unter den Cyanobakterien, den heterotrophen Bakterien, sowie unter einigen anoxygenen, photosynthetischen Bakterien Gasvesikelproduzenten (Pfeifer, 2012; Walsby, 1994). In der Archaea-Domäne werden Gasvesikel von einigen Vertretern der Haloarchaea und der Methanogenen gebildet. Die Gasvesikel in den verschiedenen Organismen ähneln sich in ihrer Morphologie und werden von homologen Proteinen gebildet, jedoch bestehen Unterschiede in der Größe dieser intrazellulären Strukturen (Walsby, 1994). Die Form der Gasvesikel ist meist zylinder- oder spindelförmig (Abb. 1C). Während der Gasvesikelbildung entstehen durch Proteinaggregation zunächst kleine bikonische Strukturen, die zu dann zu einem "reifen" Gasvesikel heranwachsen. Gasvesikel in Archaea erreichen Längen von bis zu 1,5 μm und einen Durchmesser von 200-250 nm. In Bacteria erreichen die Gasvesikel dagegen nur einen Durchmesser von 33-75 nm, weisen aber ähnliche Längen auf (Larsen *et al.*, 1967; Englert *et al.*, 1990). Der variable Durchmesser der Gasvesikel bei Bacteria und Archaea könnte im Lebensraum dieser Organismen begründet liegen. Gasvesikel kollabieren bei hohem Druck und es hat sich gezeigt, dass der minimale Druck, der

aufgewendet werden muss, um Gasvesikel zu zerstören mit dem Durchmesser der Gasvesikel korreliert. Gasvesikel mit großem Durchmesser kollabieren bereits bei niedrigem Druck, während jene mit geringerem Durchmesser diesem Druck noch widerstehen können. Haloarchaea leben meist in einer aquatischen Umgebung, die nicht mehr als 1 m tief ist und sind durch die intrazelluläre Akkumulation von isoosmolaren Salzkonzentrationen im Vergleich zu außen kaum Turgordruck ausgesetzt. Die Gasvesikel dieser Organismen bleiben daher auch mit einem großen Durchmesser noch intakt. Bei Organismen, die in tieferen Gewässerregionen leben, hat man Gasvesikel mit geringeren Durchmessern gefunden (Bright & Walsby 1999; Beard *et al.*, 2000).

Die Gasvesikelhülle ist ausschließlich aus Proteinen aufgebaut und frei von Kohlenhydraten oder Lipiden. Die innere Gasvesikelwand ist hydrophob, während die dem Zytoplasma zugewandte Seite eher hydrophil ist. Sie ist 2 nm dick und wird hauptsächlich von dem 7-8 kDa großen Gasvesikelprotein A (GvpA) gebildet. An der äußeren Gasvesikelhülle adhäriert das GvpC, ein weiteres Gasvesikelstrukturprotein, welches zur Stabilität der Gasvesikelhülle beiträgt.

Gasvesikel werden abhängig von bestimmten Umweltfaktoren gebildet, wie Salzkonzentration, Lichtintensität und Sauerstoffkonzentration. Der Besitz von Gasvesikeln stellt eine Anpassung an den aquatischen Lebensraum der betreffenden Organismen dar. Durch den vermittelten Auftrieb können sie in Gewässerzonen mit höherer Lichteinstrahlung und gutem Nähr- und Sauerstoffangebot gelangen (Walsby, 1994). Weiterhin wird vermutet, dass die lichtbrechenden Eigenschaften der Gasvesikel den Zellen einen Schutz vor photooxidativen Schäden bieten (Shear & Walsby, 1975). Außerdem sorgen die Gasvesikel für eine Vergrößerung des Verhältnisses von Zelloberfläche zu Zytoplasmavolumen, wodurch eine verbesserte Sauerstoffaufnahme erreicht wird (Staley *et al.*, 1989).

Einige Cyanobakterien produzieren Gasvesikel in Abhängigkeit der Lichtintensität, der sie ausgesetzt sind. Bei hoher Lichtintensität werden wenige Gasvesikel gebildet, bei wenig Licht kommt es dagegen zu einer vermehrten Produktion von Gasvesikeln, um den Aufwärtstrieb der Zellen zur Wasseroberfläche zu unterstützen (Walsby, 1994). An der Wasseroberfläche sind die Zellen einer hohen UV-Strahlung ausgesetzt, was wiederum die Gasvesikelbildung vermindert. Durch photosynthetische Aktivität werden Kohlenhydrate gebildet, die für ein Absinken der Zellen sorgen können. Die Akkumulation von Kohlenhydraten auf der einen Seite und die Produktion von Gasvesikeln auf der anderen Seite, sorgt für eine Regulation des Auf- und Absinkens der Zellen während des Tages.

In einigen Haloarchaea ist die Gasvesikelbildung abhängig von der Sauerstoffkonzentration oder vom Salzgehalt des umgebenden Mediums. Das extrem halophile Archaeon *Hbt. salinarum* produziert Gasvesikel während des gesamten Wachstums bei 40°C unter aeroben

Bedingungen. Ist kein Sauerstoff vorhanden, so bilden Zellen, die stattdessen mittels Arginin-Fermentation wachsen, nur wenige und sehr kleine Gasvesikel. Bei Zellen, die Trimethylamin-N-oxid als alternativen Elektronenakzeptor nutzen sind größere Gasvesikel vorhanden (Hechler & Pfeifer, 2009). Beim moderat halophilen *Haloferax mediterranei* kommt es nur dann zur Gasvesikelproduktion, wenn der Salzgehalt des Mediums mindestens 17% beträgt (Englert *et al.*, 1990). Ähnlich verhält es sich beim haloalkaliphilen *Halorubrum vacuolatum* (Mayr & Pfeifer, 1997; Mwatha & Grant, 1993).

Bei der Betrachtung von gasvesikelbildenden Organismen im Phasenkontrastmikroskop sind Gasvakuolen, also ein Cluster von mehreren Gasvesikeln, intrazellulär als helle Zelleinschlüsse erkennbar (Abb. 1B). Bei halophilen Archaea ist die Anwesenheit von Gasvesikeln bereits durch einen veränderten Phänotyp der Zellen sichtbar. Die normalerweise rot pigmentierten Zellen, färben sich auf Festmedium und in stationären Flüssigkulturen durch das Vorhandensein von Gasvesikeln weißlich-rosa. Bei Flüssigkulturen, die länger ohne Bewegung bei Licht stehen gelassen werden, kann man nach einiger Zeit die Bildung eines weiß-rosa Films am Rand des Reagenzglases beobachten (Abb. 1A). Zellen mit Gasvesikel flotieren an die Oberfläche des Flüssigkeitsfilms, während Zellen ohne Gasvesikel auf den Boden sinken. Einige Zellen adhären dabei an der Glaswand und bilden Biofilme aus.

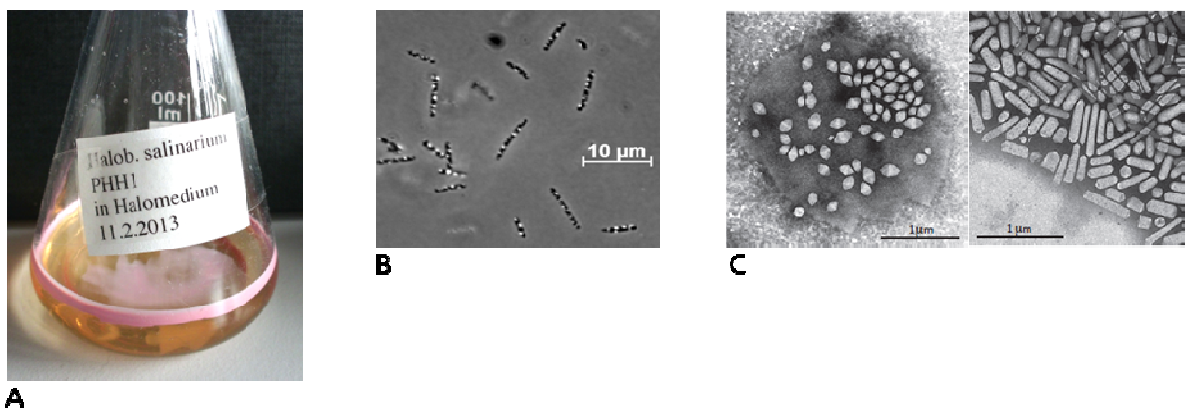


Abb. 1: Gasvesikelbildung in *Hbt. salinarum* PHH1. **(A)** Flüssigkultur, die für einige Wochen ohne Bewegung stehen gelassen wurde. Der rosafarbene Film wird von Zellen gebildet, die Gasvesikel enthalten und an die Oberfläche flotiert sind. **(B)** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von Zellen mit Gasvesikeln. Gasvakuolen bilden intrazelluläre, lichtbrechende Punkte. **(C)** Links: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer lysierten *Hbt. salinarum*-Zelle, die spindelförmige Gasvesikel enthält. Rechts: Isolierte, zylinderförmige Gasvesikel von *Hbt. salinarum* (Abb. 1C aus Pfeifer, 2012).

2.3.1. Gasvesikel in der Biotechnologie

Gasvesikel finden Anwendung als Hilfsmittel in der Biotechnologie. So ist es gelungen, rekombinante, haloarchaeale Gasvesikel zu produzieren und diese zur Antigen-Präsentation in Mäusen zu verwenden (Stuart *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2004; Sremac & Stuart, 2008; Sremac & Stuart, 2010). Dazu werden die verschiedenen Epitope in die Sequenz des GvpC-Proteins eingebaut und auf der Oberfläche der Gasvesikelhülle präsentiert. Dies ist eine kostengünstige und effektive Methode zum Screening verschiedener Peptide und ihrer möglichen pathogen-relevanten Eigenschaften.

Weiterhin können mit Sauerstoff gefüllte Gasvesikel dazu genutzt werden, um das Sauerstoffangebot in tierischen Zellkulturen zu verbessern, wobei die Gasvesikel zuvor mit Glutaraldehyd stabilisiert werden (Sundararajan & Ju, 2000; Sundararajan & Ju, 2006).

Die Struktur der Gasvesikelhülle hat ebenfalls medizinische Bedeutung. So ähneln die charakteristischen Rippen sogenannten Amyloid-Fibrillen, einer Zusammenlagerung von Proteinen über entgegengesetzt angeordnete β -Faltblatt-Stränge (Bayro *et al.*, 2012). Darüber bilden sich unlösliche Komplexe in Form mikroskopisch kleiner Fasern. Amyloid-Fibrillen stehen in Zusammenhang mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise die Alzheimer-Krankheit. Amyloide treten aber auch unabhängig von Erkrankungen auf und können sogar spezielle Funktionen, als sogenannte funktionale Amyloide, erfüllen (Dobson, 1999; Fowler *et al.*, 2007). Die funktionalen Amyloide ähneln der Struktur von pathologischen Amyloid-Fibrillen, müssen aber bestimmte Funktionen zum Auf- bzw. Abbau dieser Strukturen besitzen (Smith & Scheibel, 2010). Die Untersuchung dieser natürlich vorkommenden Amyloide-Systeme, wie die Gasvesikelhülle, könnte weitere Erkenntnisse zur Bekämpfung von pathologisch relevanten Amyloiden bringen.

Inzwischen ist es auch gelungen, Gasvesikel als Kontrastmittel bei Ultraschalluntersuchungen und als Reporter bei der Magnetresonanztomographie einzusetzen, wo sie aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften (geringe Größe, hohe Stabilität) eine verbesserte Auflösung dieser bildgebenden Verfahren ermöglichen (Mikhail Shapiro, unveröffentlicht).

2.4. Gasvesikel-kodierende Genregionen in Haloarchaea

Die Genregion, welche die Bildung von Gasvesikeln in Haloarchaea vermittelt, wird als vac-Region bezeichnet. Sie ist ca. 9 kbp groß und besteht aus 14 Genen, die in zwei entgegengesetzt orientierten Clustern angeordnet sind: *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a).

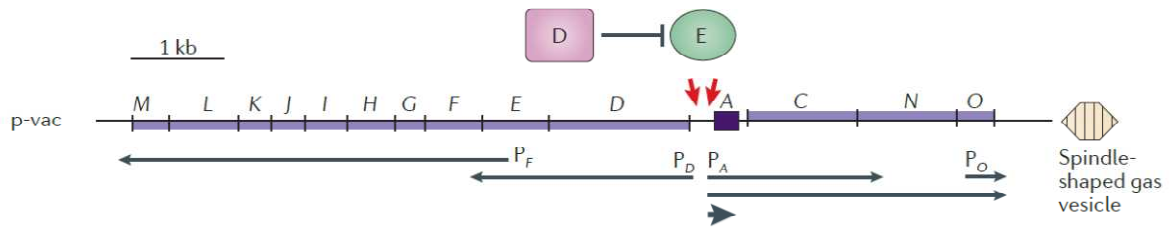


Abb. 2: Schematische Darstellung der für die Gasvesikelbildung kodierenden p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1. Die 14 *gvp*-Gene sind als Rechtecke dargestellt, die Buchstaben darüber geben die jeweiligen Gene an. Die Länge und Menge der einzelnen Transkripte wird durch die Länge und Stärke der schwarzen Pfeile angezeigt, ebenso wie die Lage der vier verschiedenen Promotoren. Die Promotoren P_D und P_A werden vom Transkriptionsaktivator GvpE aktiviert. GvpD ist an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt. Die Transkription der p-vac Region führt zu spindelförmigen Gasvesikeln in *Hbt. salinarum* PHH1 (nach Pfeifer, 2012).

Je nach Organismus sind eine oder zwei vac-Regionen vorhanden, die sich durch unterschiedliche Transkriptionszeitpunkte und in der Morphologie der resultierenden Gasvesikel unterscheiden. *Hbt. salinarum* PHH1 besitzt zwei vac-Regionen, eine plasmid-kodierte p-vac- und eine weitere c-vac-Region, deren Gene nur in der stationären Wachstumsphase transkribiert werden, was zur Synthese von zylinderförmigen Gasvesikeln führt (Horne & Pfeifer, 1989). Die p-vac Region wird während des gesamten Wachstums transkribiert und führt zur Bildung von spindelförmigen Gasvesikeln (Abb. 2) (Horne & Pfeifer, 1989). Sie besitzt vier Promotoren (P_A , P_O , P_D und P_F), die zur Synthese von unterschiedlichen Transkripten führen (Abb. 2) (Horne & Pfeifer, 1989; Offner & Pfeifer, 1995; Krüger & Pfeifer, 1996; Offner *et al.*, 1996). Die *gvpA*-mRNA wird in großen Mengen bis zur stationären Wachstumsphase gebildet, währenddessen werden nur geringe Mengen des *gvpA-O*-Transkripts gebildet (Abb. 2). Das *gvpDE*-Transkript wird hauptsächlich spät-exponentiell gebildet und kodiert für die regulatorischen Proteine der Gasvesikelbildung, wobei GvpE als Transkriptionsaktivator die divergenten Promotoren P_A und P_D aktiviert und dadurch die Bildung der *gvpA*-, *gvpACNO*- und der *gvpDE*-mRNA induziert (Abb. 2) (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Gregor & Pfeifer, 2001; Hofacker *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2008). GvpD ist dagegen an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt (Englert *et al.*, 1992b; Pfeifer *et al.*, 1994; Offner & Pfeifer, 1995; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Hofacker *et al.*, 2004; Scheuch *et al.*, 2008). Die Aktivität des P_F -Promotors führt zur Bildung des *gvpFGHIJKLM*-Transkripts in der exponentiellen Wachstumsphase, unabhängig von GvpE (Hofacker *et al.*, 2004; Marschall & Pfeifer, 2012). Dieses Transkript kodiert für die frühen, akzessorischen Gasvesikelproteine.

2.5. Der Modellorganismus *Haloferax volcanii*: Studium von haloarchaealen Genfunktionen und Proteinen

Die Gasvesikelbildung bei *Hbt. salinarum* kann mit Hilfe eines speziell für Haloarchaea entwickelten Transformationssystems untersucht werden (Cline & Doolittle, 1987; Cline *et al.*, 1989; Blaseio & Pfeifer, 1990). Als Rezipient für solche Transformationsstudien dient *Haloferax volcanii* (im Folgenden: *Hfx. volcanii*), ein fakulativ anaerober, chemoorganotropher Organismus, welcher zu den moderat halophilen Archaea gehört. Er ist leicht und schnell zu kultivieren (Generationszeit ca. 3-4 h) und zu transformieren und besitzt selbst keine Gasvesikel-kodierende Genregion, weshalb er einen klaren genetischen Hintergrund für solche Analysen liefert. Die Genomsequenz von *Hfx. volcanii* ist vollständig entschlüsselt und es stehen eine Reihe von genetischer Methoden zur chromosomalen Mutation zur Verfügung (Bitan-Batin *et al.*, 2003). Weiterhin wurden Transkriptom- und Proteom-Analysen etabliert (Zaigler *et al.*, 2003; Karadzic & Maupin-Furlow, 2005; Lange *et al.*, 2007).

Es stehen zahlreiche shuttle-Vektoren zur Verfügung, die sowohl für *Hfx. volcanii* als auch für *E.coli* einen Replikationsursprung besitzen (Lam & Doolittle, 1989; Holmes *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 1994; Danner & Soppa, 1996) und mit denen sich haloarchaeale Gene funktionell charakterisieren lassen. Mit Plasmiden, welche sich in ihren Replikationsursprüngen und Resistenzgenen unterscheiden, lässt sich *Hfx. volcanii* mit zwei verschiedenen Plasmidkonstrukten gleichzeitig transformieren (Cline & Doolittle, 1987; Lam & Doolittle, 1989; Blaseio & Pfeifer, 1990; Holmes & Dyall-Smith, 1990; Pfeifer *et al.*, 1994). Der Expressionsvektor pJAS35 exprimiert *gvp*-Gene unter Kontrolle des starken Ferredoxin-Promotors (P_{fdx}) von *Hbt. salinarum* (Pfeifer *et al.*, 1994). Das pWL102-Plasmid (Lam & Doolittle, 1989) exprimiert dagegen entsprechend inserierte *gvp*-Gene unter ihrer natürlichen Promotorkontrolle. Beide Plasmide weisen eine ähnliche Kopienzahl von 10-20 in der Zelle auf.

Hfx. volcanii-Wildtypzellen zeigen einen roten, transparenten Phänotyp. Werden sie jedoch mit der p-vac Region, inseriert in pWL102, aus *Hbt. salinarum* transformiert, wechselt der Phänotyp der Zellen zu milchig-rosa, was auf das Vorhandensein von Gasvesikeln schließen lässt (Abb. 3A). Aufgründessen lassen sich Zellen ohne Gasvesikelbildung (Vac negativ) von solchen mit Gasvesikeln (Vac positiv) bereits makroskopisch unterscheiden. Gasvesikelbildende Zellen von *Hfx. volcanii* können mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert werden (Abb. 3B). Die Form der Gasvesikel in *Hfx. volcanii* p-vac-Transformanten ist allerdings sehr viel heterogener als bei *Hbt. salinarum*.

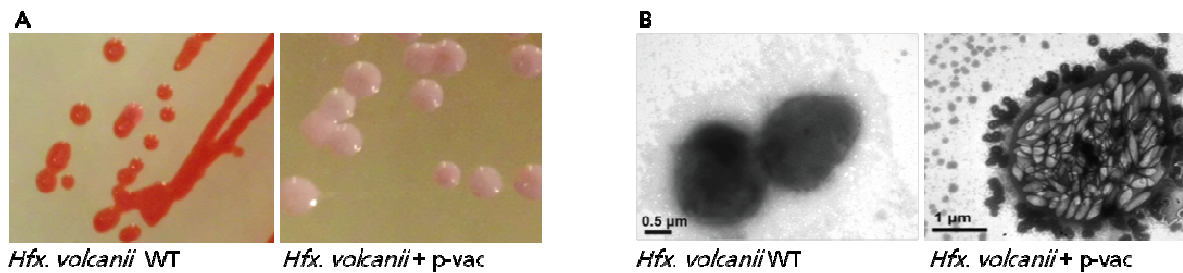


Abb. 3: *Hfx. volcanii*-Zellen vor und nach der Transformation mit der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1. **(A)** Auf Nährmedium gewachsene Zellkolonien. Links gezeigt sind *Hfx. volcanii*-Wildtypzellen (WT), die eine rote Färbung aufweisen. Rechts gezeigt sind *Hfx. volcanii*-Zellen, die mit der p-vac Region transformiert wurden. Die rosa-weiße Färbung zeigt das Vorhandensein von Gasvesikeln in den Zellen an. **(B)** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einzelner Zellen. Links gezeigt sind *Hfx. volcanii*-Wildtypzellen (WT) ohne Gasvesikel. Rechts gezeigt sind *Hfx. volcanii*-Zellen, die mit der p-vac Region transformiert wurden.

Zur Analyse der räumlichen und zeitlichen Verteilung von Proteinen in lebenden Zellen wird häufig das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Reportersystem verwendet. Für die Expression in extrem bzw. moderat halophilen Archaea wird ein speziell an die Hochsalzbedingungen angepasstes, modifiziertes GFP benötigt. Die Verwendung von GFP zur Analyse der Stabilität halophiler Proteine wurde erstmals von Nomura & Harada (1998) beschrieben. Dabei wurden zwei rekombinante GFP-Proteine mit dem Membranprotein Bakteriorhodopsin aus *Hbt. salinarum* fusioniert und die Emission der Fluoreszenz von isolierten Membranfraktionen bestimmt. Weiterhin konnte durch Verwendung von smRS-GFP der Proteinabbau durch Proteasomen *in vivo* in *Hfx. volcanii* untersucht werden (Reuter & Maupin-Furlow, 2004). Bei smRS-GFP handelt es sich um eine modifizierte Variante des GFP mit einem dreifachen, internen Aminosäureaustausch (Phe99Ser; M153Thr; Val163Ala). Diese Modifikation sorgt für eine bessere Faltungsstabilität des Proteins in hochionischer Umgebung, wie man sie im Cytoplasma halophiler Archaea vorfindet. Der zusätzliche Aminosäureaustausch von Serin nach Threonin an Position 65 bewirkt einen "red-shift" der Anregungswellenlänge und sorgt so für eine Minimierung der Autofluoreszenz der Wirtszelle (Reuter & Maupin-Furlow, 2004). Mit dieser GFP-Variante wurde auch der durch GvpD vermittelte GvpE-Abbau bei der Gasvesikelbildung von *Hbt. salinarum* analysiert und quantifiziert (Schmidt & Pfeifer, 2013). Mit smRS-GFP steht also ein Reportersystem zur *in vivo* Analyse halobakterieller Proteine in *Hfx. volcanii* zur Verfügung.

2.6. Gasvesikelproteine

Die Funktionen der einzelnen Proteine bei der Gasvesikelbildung in *Hbt. salinarum* sind bisher nur teilweise geklärt. Über Transformationsexperimente in *Hfx. volcanii*, bei denen einzelne Gene der p-vac Region deletiert und später wieder komplementiert wurden, hat man die essentielle Funktion von acht der 14 *gvp*-Gene bestimmt. Dazu gehören neben *gvpA* auch *gvpO*, *F*, *G*, *J*, *K*, *L* und *gvpM* (Englert *et al.*, 1992a, Offner *et al.*, 1996; Offner *et al.*, 2000). GvpA und GvpC sind Strukturproteine der Gasvesikelhülle und GvpE und GvpD sind regulatorische Proteine. Die Funktion der 10 restlichen Gasvesikelproteine ist bisher noch nicht aufgeklärt.

2.6.1. GvpA und GvpC

Die Gasvesikelhülle wird hauptsächlich aus dem 8 kDa großen GvpA gebildet. Es ist ein stark hydrophobes Protein (Walsby, 1994). Das GvpA bildet über Multimerisierung die charakteristischen Rippen, die senkrecht zur Zylinderachse der Gasvesikel angeordnet sind (Abb. 4A) (Stoeckenius & Kunau, 1968; Blaurock & Walsby, 1976; Blaurock & Wober, 1976; Walsby, 1994). Nach einem *in silico* erstellten, drei-dimensionalen Strukturmodell bildet das Protein zwei α -Helices, welche getrennt durch zwei antiparallel angeordnete β -Faltblätter vorliegen (Abb. 4B) (Strunk *et al.*, 2011). Letztere bilden vermutlich die innere, hydrophobe Oberfläche der Gasvesikelhülle. Die Multimerisierung von GvpA-Monomeren zur Bildung einer Rippe innerhalb der Gasvesikelwand erfolgt über die β -Faltblattbereiche (Sivertsen *et al.*, 2010). Kontaktflächen zu benachbarten GvpA-Rippen bilden vermutlich die α -Helix I und der β -turn zwischen den beiden β -Faltblättern (Strunk *et al.*, 2011). Mutationen in den genannten Regionen des Proteins führten zu Gasvesikel negativen Transformanten.

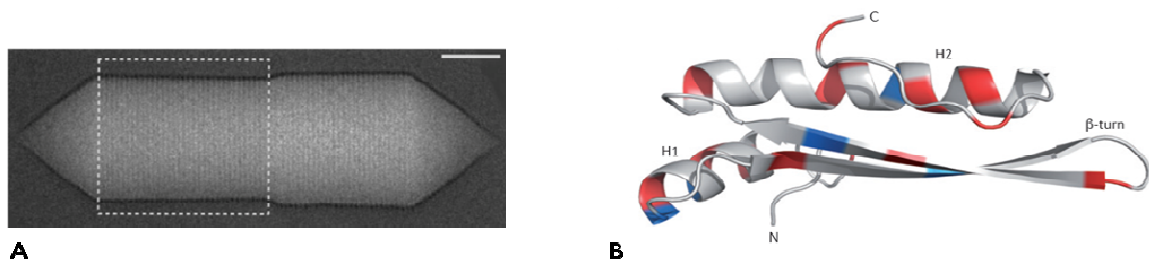


Abb. 4: Struktur des Gasvesikelproteins A. **(A)** Zylinderförmiges Gasvesikel, isoliert aus *Hbt. salinarum* PHH1 (aus Offner *et al.*, 1998). Die charakteristischen Rippen liegen senkrecht zur Zylinderachse. **(B)** Drei-dimensionales Strukturmodell, ermittelt durch *in silico*-Modellierung des mcGvpA aus *Hfx. mediterranei* (Strunk *et al.*, 2011). Saure Aminosäuren sind rot gekennzeichnet und basische Aminosäuren blau. Die 2 α -Helices H1 und H2 und der loop (β -turn) sind markiert. N: Amino-Terminus; C: Carboxyl-Terminus (aus Pfeifer, 2012).

Als zweites Strukturprotein wurde das 42 kDa große, hydrophile GvpC identifiziert. Es adhärert an der äußeren Hülle der Gasvesikelwand, sorgt so für Stabilität und ist mitverantwortlich für den hydrophilen Charakter der äußeren Gasvesikelhülle. Bei Halobakterien ist es weiterhin maßgeblich an der Formgebung der Gasvesikel beteiligt (Englert & Pfeifer, 1993; Offner *et al.*, 1996; Best, 2000). GvpC-negative Mutanten (ΔC) bilden unregelmäßig geformte Gasvesikel mit unterschiedlichen Durchmessern (Offner *et al.*, 1996). Durch Komplementation mit GvpC werden wieder Gasvesikel mit definierter Form und Durchmesser gebildet (Offner *et al.*, 1996). GvpC-Proteine weisen interne Aminosäure-Sequenzwiederholungen auf, die aus ca. 33 Aminosäuren bestehen und deren Anzahl in den verschiedenen Organismen variiert. Es wird vermutet, dass über diese Sequenzen die klammerartige Vernetzung der GvpA-Rippen erfolgt (Walsby, 1994). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Anzahl dieser Sequenzwiederholungen in GvpC mit der Breite der Gasvesikel korreliert. GvpC-Varianten mit wenigen Sequenzwiederholungen wurden bei Organismen aus tieferen Gewässerzonen mit schmalen Gasvesikeln gefunden, während größere GvpC-Proteine (viele Sequenzwiederholungen) bei Organismen mit breiten Gasvesikeln isoliert wurden (Beard *et al.*, 1999 und 2000).

2.6.2. Die akzessorischen Gasvesikelproteine

Während der Transkription der p-vac Region werden die mRNAs der *gvpF-M*-Gene und des *gvpO*-Gens in der frühen exponentiellen Wachstumsphase und damit vor der Bildung von sichtbaren Gasvesikelstrukturen gebildet (Englert *et al.*, 1992a; Offner & Pfeifer, 1995; Offner *et al.*, 1996). Die von diesen Genen kodierten Proteine könnten daher in einem frühen Stadium der Gasvesikelbildung eine Rolle spielen (Pfeifer *et al.*, 1997). Möglicherweise bilden mehrere Proteine Initiationskomplexe, wo die GvpA-Assemblierung zur Bildung der Gasvesikelstruktur beginnt. Dabei spielt vermutlich auch die relative Menge der Gasvesikelproteine zueinander eine Rolle (Offner & Pfeifer, 1995; Offner *et al.*, 2000).

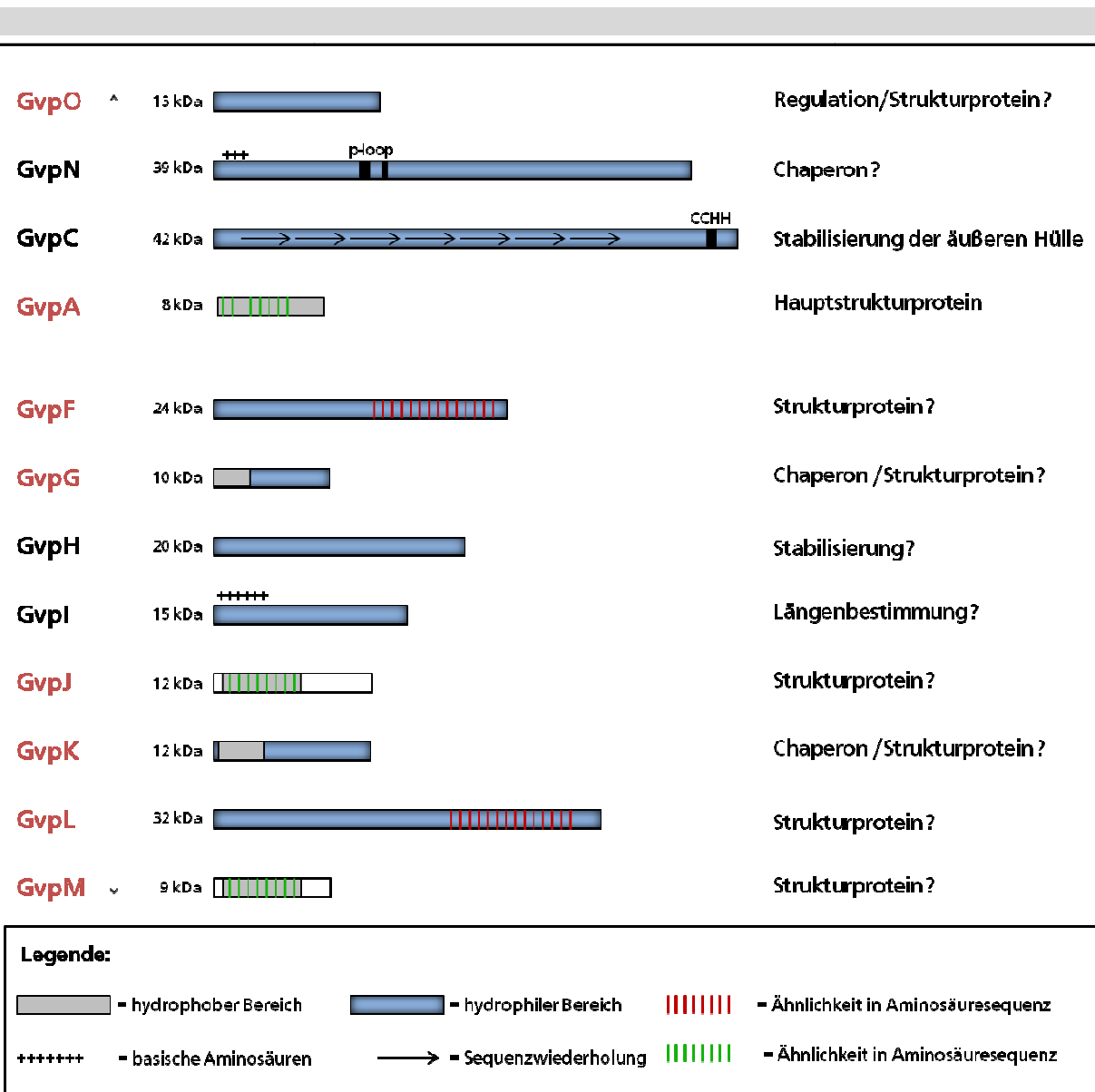


Abb. 5: Schematische Darstellung von Gasvesikelproteinen der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 und ihre bisher bekannten spezifischen Eigenschaften. Links angegeben sind die Bezeichnungen der Gasvesikelproteine, wobei die essentiellen Proteine in rot gekennzeichnet sind. Die Pfeile geben die Reihenfolge und Richtung an, in der die entsprechenden Gene der Gasvesikelproteine transkribiert werden. Jeder Balken symbolisiert das jeweilige Gasvesikelprotein. Links ist die Größe des Proteins angegeben und innerhalb bzw. oberhalb des Balkens sind spezifische Sequenzeigenschaften markiert (siehe Legende). Die Begriffe rechts benennen die (hypothetische) Funktion des Gasvesikelproteins.

Abgesehen von GvpH und GvpI haben alle Genprodukte des *gvpFGHIJKLM*-Transkripts eine essentielle Funktion für die Gasvesikelbildung (Offner *et al.*, 2000). Eine Deletion des *gvpI* resultiert in sehr langen, zylindrischen Gasvesikeln. Möglicherweise reguliert das GvpI-Protein den GvpA-Einbau an den einzelnen Gasvesikeln, ist also auch an der Ausbildung der Gasvesikel-Wildtypform beteiligt (Abb. 5). Das Protein besitzt viele basische Aminosäurereste (Abb. 5). ΔH -Transformanten produzieren Wildtyp-ähnliche Gasvesikel. Diese haben sich aber bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Gegensatz zu anderen Gasvesikel-

präparationen als sehr instabil erwiesen (Offner *et al.*, 2000). Daraus wird abgeleitet, dass GvpH eine stabilisierende Funktion hat (Abb. 5).

GvpM und GvpJ sind hydrophobe Proteine und weisen Ähnlichkeiten zur Aminosäuresequenz von GvpA auf (Abb. 5) (Englert *et al.*, 1992a; Skukla & DasSarma, 2004). Die Ähnlichkeit besteht auch in dem Bereich, der nach einem *in silico*-Strukturmodell von GvpA die Kontaktfläche zu benachbarten GvpA-Rippen bildet (Strunk *et al.*, 2011). GvpJ und GvpM wären daher zur Interaktion mit GvpA in bestimmten Bereichen der Gasvesikelhülle geeignet (Pfeifer, 2012). Man vermutet daher, dass es sich um weitere Strukturproteine handeln könnte, die z.B. den Start zur GvpA-Assemblierung initiieren.

Bei GvpF und GvpL wurden Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz festgestellt (Abb. 5) (Shukla & DasSarma, 2004). GvpG und GvpK sind Proteine mit amphiphilem Charakter. Beide Proteine weisen eine hydrophobe N- und eine hydrophile C-terminale Hälfte auf und es wird vermutet, dass sie entweder einen Teil der Struktur bilden oder als Chaperone die Löslichkeit der hydrophoben Gasvesikelstrukturproteine ermöglichen (Abb. 5) (Englert *et al.*, 1992a; Offner & Pfeifer, 1995). Mit Ausnahme von GvpK konnten alle Proteine des *gvpF-M*-Transkripts immunologisch oder über massenspektrometrische Analysen in geringen Mengen in Gasvesikelpräparationen nachgewiesen werden (Shukla & DasSarma, 2004; Chu *et al.*, 2011). Es ist aber weiterhin unklar, ob diese Proteine Teil der Struktur der Gasvesikelwand sind oder ob sie nur mit der Oberfläche der Gasvesikelhülle, z.B. während der Bildung der Gasvesikel, interagieren.

GvpN besitzt ein "p-loop"-Motiv, welches in ATP- bzw. GTP-bindenden Proteinen gefunden wird. Möglicherweise fungiert das Protein als Chaperon für die GvpA-Assemblierung während der Gasvesikelsynthese (Abb. 5) (Offner & Pfeifer, 1995). Δ N-Transformanten produzieren sehr kleine Gasvesikel (Offner *et al.*, 1996). Die Aufgabe von GvpO ist, abgesehen von der essentiellen Funktion für die Gasvesikelbildung, ungeklärt. Möglicherweise könnte es an der Transkriptionsregulation des *gvpACNO*-Genclusters beteiligt sein und bzw. oder eine strukturgebende Komponente der Gasvesikelhülle sein (Offner *et al.*, 1996; Englert *et al.*, 1992b; Chu *et al.*, 2011).

2.7. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF, G, H, I, J, K, L und GvpM der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 untersucht werden. Ziel war es die Funktion dieser Proteine bei der Gasvesikelbildung näher zu beleuchten.

Mögliche Interaktionen zwischen einzelnen Proteinen sollten sowohl biochemisch über Affinitätschromatographie als auch *in vivo* mit GFP nachgewiesen werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung des GvpM und der Identifizierung seiner Interaktionspartner während der Gasvesikelbildung.

Eine nähere Charakterisierung von Gasvesikelproteinen sollte über die Fusion mit GFP erreicht werden. Durch die *in vivo*-Analyse von Gvp-GFP Fusionsproteinen sollten mögliche Aggregationen von Gasvesikelproteinen detektiert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte der Effekt von Mutationen im GvpM auf die Bildung von Gasvesikeln analysiert werden. Dafür wurden GvpM-Mutanten hergestellt und in $pvac\Delta M + pM_{Mut}$ -Transformanten untersucht. Hier sollten wichtige und funktionelle Bereiche von GvpM bestimmt werden, um Rückschlüsse über die Funktion des Proteins bei der Gasvesikelbildung zu ziehen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien und Hilfsmittel

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Hilfsmittel und deren Hersteller aufgeführt. Hier nicht aufgelistete Chemikalien und Hilfsmittel wurden von den Firmen AppliChem, Boehringer Ingelheim, LS Labors, Merck, Roche Diagnostics, Roth, Sigma und Serva bezogen. Bestandteile für Nährmedien wurden von der Firma Bacto, Difco und Oxoid bezogen.

| Chemikalien | Hersteller |
|---|---|
| Acrylamid(30% w/v)/ Bisacrylamid(0,8% w/v) | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Agarose BiozymeME Agarose | Biozym, Oldendorf |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Ampicillin | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| BioTrace™ Nitrozellulosemembran | Pall Gelman GmbH, Dreieich |
| Biodyne A Nylonmembran | Pall Gelman GmbH, Dreieich |
| Blockierungsreagenz | Roche Diagnostics, Mannheim |
| BSA (Bovine Serum Albumin) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| CDP-Star® Reagent | New England Biolabs |
| Coomassie Brilliant Blue (G250, R250) | Serva Heidelberg |
| DIG DNA Labeling Mix | Roche Diagnostics, Mannheim |
| dNTPs | Roche Diagnostics, Mannheim Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| ε-Aminocaprinsäure | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| EDTA | LS Labor-Service, Darmstadt |
| Ethanol | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Biomol Feinchemikalien, Hamburg |
| Filterpapier, Whatman | Machery & Nagel, Düren |
| Formaldehyd (37%) | LS Labor-Service GmbH, Darmstadt |

| | |
|---|----------------------------------|
| Formamid | LS Labor-Service GmbH, Darmstadt |
| Glycerin | LS Labor Service, Darmstadt |
| Harnstoff | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Hyperfilm™ ECL | Amersham Biosciences, UK |
| Imidazol | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Isopropanol | LS Labor-Service GmbH, Darmstadt |
| Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) | GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg |
| Kaliumchlorid | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Kanamycin | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| L-Histidin | Serva, Heidelberg |
| Lovastatin (Mevinolin-Derivat) | Geschenk von MSD Sharp & Dohme |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | LS Labor-Service GmbH, Darmstadt |
| β-Mercaptoethanol | Serva, Heidelberg |
| Methanol | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Natriumchlorid | LS Labor-Service GmbH, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| di-Natriumhydrogenphosphat | LS Labor-Service GmbH, Darmstadt |
| Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) | Qiagen, Hilden |
| Novobiocin | Serva, Heidelberg |
| Polyethylenglycol (PEG) | Sigma, St. Louis, USA |
| Roti® Fluoro-PVDF-Membran | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Saccharose | Serva, Heidelberg |
| Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| TEMED (N'N'N'N'-Tetramethylethyldiamin) | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) | Carl Roth & Co., Karlsruhe |
| Tween-20 | Carl Roth & Co., Karlsruhe |

3.1.2. Enzyme und Kits

| | |
|--|--|
| DIG DNA Labeling Kit | Roche Diagnostics, Mannheim |
| E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I | Omega Bio-Tek , Inc., Norcross,USA |
| GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit | Sigma, St. Louis, USA |
| GenElute™ PCR Cleanup Kit | Sigma, St. Louis, USA |
| QIAEX II Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiaprep® Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| DNaseI (1U/μl, RNase-frei) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/μl) | Invitrogen, UK |
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase | MBI Fermentas, St.-Leon-Rot |
| <i>PfuUltra</i> -Polymerase,(2,5U/μl) #EPO579 | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
| Restriktionsendonukleasen | MBI Fermentas, St.Leon-Rot, New England Biolabs |
| T4-DNA-Ligase (400 U/μl) | New England Biolabs |
| T4-Phosphonukleotidkinase, (10 U/μl) | New England Biolabs |

3.1.3. Größenstandards

DNA

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM 0331 | MBI Fermentas, St.-Leon-Rot |
|-------------------------------------|-----------------------------|

Protein

| | |
|---|----------------------------|
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671 | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
|---|----------------------------|

3.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 1. Synthetische Oligonukleotide (Biomers), die in dieser Arbeit verwendet wurden

| Name | Oligonukleotidsequenz* (5'-3') | Position |
|------------------|---|------------------------|
| 5'pGvpG+PstI | GAGGCCGACTGCAG ATG TTCATCATAGAC | ^a 2895-2923 |
| 3'pGvpG+Acc651 | TTTCGTCGGGGTAC CTT ATTTCTTGACCTC | ^a 3175-3146 |
| 5'pGvpK+PstI | GGAGACCACTGCAG ATG GAACTAGCACTC | ^a 4463-4491 |
| 3'pGvpK+Acc651 | TGGGCCGGTGGTAC CTC ATACGTCATCA | ^a 4833-4806 |
| 5'GFP+NotI | AGATCGCGGCCG CAG CTGCA ATG AGTAAAGG | ^c 3872-3902 |
| 3'GFP+XbaI | CCAAGGGGTTATGCTAGTT TCT AGACACT TT ATTTGTATAG | ^c 4636-4597 |
| 5'pGvpH+SacI | TGGAGGTCAA GAGCTC ATGGTACC CGACG | ^a 3144-3172 |
| 3'pGvpH+NotI | TGTTGTTT GCGGCCG CTGTGGATTCCACC | ^a 3721-3694 |
| 5'pGvpL+SacI | GGAATCCC GAGCTC ATGACGTATGACTG | ^a 4794-4821 |
| 3'pGvpL+NotI | TTTGTGG GCGGCCG CTTTACCAATATC | ^a 5673-5646 |
| 5'pGvpJ+SacI | AGGACGAGG GAGCTC ATGAGTGACCCC | ^a 4116-4142 |
| 3'pGvpJ+NotI | TGCTAGTT GCGGCCG CTTTGGTCTCCTC | ^a 4488-4461 |
| 5'SacI+ GvpG | AGGCCG GAGCTC ATGTTTCATCATAGACGATCTC | ^a 2896-2929 |
| 3'NotI+GvpG | TCGGG GCGGCCG CTTTCTTGACCTC | ^a 3170-3146 |
| 5'SacI-GFP | CAAGGAGAT GAGCTC ATGAGTAAAGGAGAAGAAC | ^c 3877-3910 |
| 3'NotI-GFP | TATTG GCGGCCG CTTTGTATAGTTC | ^c 4618-4594 |
| 5'NotI-GvpM | GCGCC GCGGCCG CAGCTGCA ATG GAGCCAAC | ^a 5640-5670 |
| 3'XbaI-GvpM | GACACGACT TCTAGATC AGTCCTCTCGCCGATCGGCAG | ^a 5928-5891 |
| 5'NotI-GvpJ | CACTG GCGGCCG CAGCTGCA ATG AGTGACCCC | ^a 4111-4142 |
| 3'XbaI-GvpJ | AGTGCTAGT TCTAGATC ATTTGGTCTCCTCCGCTGACGTG | ^a 4490-4451 |
| GFP+Acc651 | AGTTCT GGTACCTT ATTTGTATAGTTCATCCATGC | ^b 728 |
| H-GFP+PstI | AAAGCTG CTGCAGATG GTGCCCGACGAAAAC | ^b 767 |
| L-GFP+PstI | AAAGCTG CTGCAGATG ACGTATGAC | ^b 767 |
| J-GFP+PstI | AAAGCTG CTGCAGATG AGTGACCC | ^b 767 |
| PstI+G-GFP | AAAGCTG CTGCAGATG TTCATCATAGAC | ^b 767 |
| 5'PstI+GFP-GvpM | AAAGCTG CTGCAGATG AGTAAAGGAG | ^b 767 |
| 3'Acc651GFP-GvpM | ACTAGT GGTACCTC AGTCCTCTCG | ^b 725 |
| 3'Acc651GFP-GvpJ | ACTAGT GGTACCTC ATTTGGTCTC | ^b 725 |

| | | |
|---------------|--|------------------------|
| 5'PstI+GvpJ | GACGAGG <i>CTGCAGATG</i> AGTGACCCC | ^a 4118-4142 |
| 3'NcoI+GvpJ | TGCTAGT <i>CCATGGTCAT</i> TTTGGTCTCCTC | ^a 4488-4461 |
| 5'PstI+GvpH | AGGTCAA <i>CTGCAGATG</i> GTACCCGAC | ^a 3147-3171 |
| 3'NcoI+GvpH | TGTTGTT <i>CCATGGTCAT</i> GTGGATTAC | ^a 3721-3695 |
| 3'NcoI+GvpG | TCGTCCG <i>CCATGGTTA</i> TTTCTTGAC | ^a 3173-3149 |
| 5'GFP-Gly-Ala | ATG AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAG | ^c 3892-3922 |
| 3'JGFP+Link1 | TGCTCCCGCTTTGGTCTCCTC | ^a 4461 |
| 3'GGFP+Link1 | TGCTCCCGCTTTCTTGACCCTC | ^a 3146 |
| 3'GFP+Link2 | TCCCGCACCTGCTCCCGCT | |
| 5'ΔNcoI+GFP | TACCTGTTCC <u>TT</u> GGCCAACAC | ^c 4049-4069 |
| 3'ΔNcoI+GFP | GTGTTGGCCA <u>AG</u> GAACAGGTA | ^c 4069-4049 |
| 5'NcoI+GvpM | CGGGG <i>CCATGG</i> AGCCAACAAAAG | ^b 718 |
| 3'GFP+NcoI | GAATTG <i>CCATGGTTA</i> TTTGTATAGTTCATCCATGCCATG | ^b 647 |
| 5'G22D | ACTGCGCGACG <u>AC</u> GCCGTGATTC | ^a 5713-5735 |
| 3'G22D | GAATCACGGG <u>CT</u> CGTCGCGCAGT | ^a 5735-5713 |
| 5'V24D | CGACGGAGCCG <u>AC</u> ATTCAAGCGG | ^a 5719-5741 |
| 3'V24D | CCGCTTGAAT <u>GT</u> CGGCTCCGTCG | ^a 5741-5719 |
| 5'A48D | GGCAGCGATTG <u>AT</u> TGGCATGACCA | ^a 5791-5813 |
| 3'A48D | TGGTCATGCCA <u>TC</u> AAATCGCTGCC | ^a 5813-5791 |
| 5'I36M | GTCGCCGACATG <u>CCC</u> CTGATC | ^a 5756-5776 |
| 3'I36M | GATCAGGGG <u>CA</u> TGTCGGCGAC | ^a 5776-5756 |
| 5'Y56A | ATGACGGAGG <u>CC</u> GCCCTGTTCCG | ^a 5816-5837 |
| 3'Y56A | CGAACAGGCCG <u>GC</u> CTCCGTCAT | ^a 5837-5816 |
| 5'A23D | GCGCGACGGAG <u>AC</u> GTGATTCAAG | ^a 5716-5738 |
| 3'A23D | CTTGAATCACG <u>TC</u> TCCGTCGCGC | ^a 5738-5716 |
| 5'R20A/D21A | GTGTTACTGG <u>CCG</u> CCGGAGCCG | ^a 5708-5729 |
| 3'R20A/D21A | CGGCTCCG <u>GCG</u> CCAGTAACAC | ^a 5729-5708 |
| 5'R20D/D21R | GTGTTACTGG <u>ACC</u> GCGGAGCCGTGATT | ^a 5708-5734 |
| 3'R20D/D21R | AATCACGGCTCCG <u>GGT</u> CCAGTAACAC | ^a 5734-5708 |
| 5'Δ5N | GACGAGACACACGCGATCGTTGAG | ^a 5675-5698 |
| 3'Δ5N | CAT <i>CTGCAG</i> CCCCGGGGGATC | ^a 5660 |

| | | |
|----------------|---|------------------------|
| 5'XbaI+gvpM | ATATTGG <i>TCTAGA</i> AATG GAGCCAAC | ^a 5647-5670 |
| 3'HindIII+gvpM | ACACGACAAG C TTT C AGTCCTCTCG | ^a 5927-5902 |

* Kursiv gekennzeichnete Stellen markieren Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Start- bzw. Stopcodons sind fett dargestellt. Positionen mit Basenaustausch sind unterstrichen.

^a Bindestelle innerhalb der p-*gvpD-M* Sequenz (Genbank accession number X55648)

^b Bindestelle innerhalb der pBSK+-Sequenz

^c Bindestelle innerhalb der pJAM1020-Sequenz

3.1.5. Verwendete Mikroorganismen

| | |
|--|--|
| <i>Escherichia coli</i> GM1674 <i>dam</i> ⁻ | Palmer & Marinus, 1994 |
| <i>Escherichia coli</i> TOP10F | Invitrogen, USA |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 C(+) | Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt |
| <i>Haloferax volcanii</i> WR340 | Bitan-Banin <i>et al.</i> , 2003 |

3.1.6. Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotikaresistenzen)

| | |
|---|--|
| pBlueskript II KS (+) (Ampicillin ^R) | Stratagene, La Jolla, USA |
| pBluescript II SK (+) (Ampicillin ^R) | Stratagene, La Jolla, USA |
| pET28a+ (Kanamycin ^R) | Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt |
| pJAS35 (Ampicillin ^R , Novobiocin ^R) | Pfeifer <i>et al.</i> , 1994 |
| pWL102 (Ampicillin ^R , Mevinolin ^R) | Lam & Doolittle, 1989 |

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Wachstumsbedingungen der Mikroorganismen

Verschiedene Stämme von *E. coli* wurden aerob in LB-Medium (Sambrook & Russel, 2001) über Nacht bei 37°C und 180 rpm (Flüssigkulturen) angezogen. Zur Selektion von Transformanten mit Antibiotika-Resistenz wurde dem Medium in Abhängigkeit der

vorhandenen Resistenzgene 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin und/oder 50 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol zugegeben.

Hfx. volcanii WR340 wurde in 3 M NaCl Vollmedium mit Histidin (3 M NaCl, 150 mM MgSO_4 , 40 mM KCl, 10 nM MnCl_2 , 25 mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,05% (w/v) CaCl_2 , 0,5% (w/v) Trypton, 0,3% (w/v) Hefeextrakt und 0,02% (w/v) Histidin) angezogen. Bei Festmedium wurde 1,8% (w/v) Agar hinzugegeben. Flüssigkulturen wurden aerob bei 180 rpm und 37°C und Kolonien auf Festmedium bei 42°C in feuchter Atmosphäre drei bis zehn Tage inkubiert. Zur Selektion von Transformanten mit Mevinolin- bzw. Novobiocin-Resistenz wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum mit einer Endkonzentration von 6 $\mu\text{g/ml}$ (Mevinolin) bzw. 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (Novobiocin) zugefügt.

3.2.2. Wachstumskurve von *Hfx. volcanii*- Transformanten

Zellen von *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten wurden wie unter 3.2.1 beschrieben kultiviert. 50-100 ml Hauptkulturen wurden zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ auf 0,02 angeimpft und bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Um das Wachstumsverhalten der Zellen zu überprüfen, wurde die optische Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) der Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, während des Wachstums gemessen (Wachstumskurve) und die Werte dokumentiert. In der spät-exponentiellen Wachstumsphase wurden Proben für Western-Analysen, zur Plasmidisolierung und für mikroskopische Analysen entnommen.

3.2.3. Transformation von *E.coli*

Die Transformation chemisch-kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach der Methode von Sambrook *et al.*, 1989 durch Hitzeschock. Der *E.coli*-Stamm TOP 10F wurde verwendet um Plasmide zu amplifizieren, die für Sequenzierung, Restriktionsanalyse und Transformation von *E.coli* GM1674 verwendet wurden. Der *E.coli*-Stamm GM1674 (Palmer & Marinus, 1994) wurde verwendet, um Plasmid-DNA ohne *dam*-Methylierung für die Transformation von *Hfx. volcanii* WR430 zu erhalten.

3.2.4. Konstrukte für die Transformation von *E.coli* BL-21 (DE3)

p-gvpL x pet28a enthält das 886 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des p-gvpL-Leserahmens inseriert in den His-tag-Expressionsvektor pet28a.

p-gvpH x pet28a enthält das 578 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des p-gvpH-Leserahmens inseriert in den His-tag-Expressionsvektor pet28a.

p-gvpM x pet28a enthält das 284 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des p-gvpM-Leserahmens inseriert in den His-tag-Expressionsvektor pet28a.

p-gvpJ x pet28a enthält das 375 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des p-gvpM-Leserahmens inseriert in den His-tag-Expressionsvektor pet28a.

3.2.5. Transformation von *Hfx. volcanii* WR340

Die Transformation von *Hfx. volcanii* WR340 erfolgte wie in Pfeifer und Ghahraman, 1993 beschrieben. Vor der Transformation wurde die Plasmid-DNA durch *E.coli* GM1674 *dam* passagiert, um Plasmid-DNA zu erhalten, deren Adeninreste in der Erkennungssequenz GATC nicht methyliert sind. Auf diese Weise wird eine halobakterielle Restriktionsbarriere umgangen, die entsprechend methylierte DNA fragmentiert. Dadurch wird eine höhere Transformationseffizienz bei *Hfx. volcanii* WR340 erreicht (Holmes *et al.*, 1991).

Für die Transformation von *Hfx. volcanii* wurden einige Tage zuvor 5 ml 3 M Vollmedium + Histidin mit *Hfx. volcanii* WR340 inokuliert und über Nacht bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0,2-0,7), wurden 1 ml Zellsuspension abgenommen, bei 13.000 rpm für 2 min abzentrifugiert und das Zellsediment in 100 µl 1 M Sphäroblastierungslösung resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl 1 M Sphäroblastierungslösung + 0,5 M EDTA erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Zimmertemperatur. Die Zellsuspension wurde anschließend aliquotiert und zu je 22 µl wurde 1 µl Plasmid-DNA gegeben. Jeder Transformationsansatz wurde langsam mit 2 µl 60% PEG in Sphäroblastierungslösung versetzt und vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Nach einer Inkubation von 20 min bei Zimmertemperatur wurden die Ansätze mit 3 M Vollmedium + Histidin mit 15% Sucrose (1,5 mg/ml) auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und zur Regeneration für 3-5 h bei 42°C stehend inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2 min bei 13.000 rpm sedimentiert, 900 µl des Überstandes verworfen und das Zellsediment in den verbleibenden 100 µl resuspendiert. Die Ausplattierung erfolgte auf 3 M Vollmedium + Histidin-Agarplatten mit entsprechender

Antibiotika-Supplementation (Novobiocin bei der Transformation mit pJAS35, Mevinolin bei der Transformation mit pWL102 bzw. mit beiden Antibiotika bei einer Doppeltransformation). Die Nährböden wurden für 3-5 Tage in feuchter Atmosphäre bei 42°C inkubiert, bis Kolonien erkennbar waren.

3.2.6. Konstrukte für die Transformation von *Hfx. volcanii* WR340

Die synthetischen Oligonukleotide, die für die Herstellung der Plasmidkonstrukte verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Konstrukte im Expressionsvektor pWL102

p-vac (M-O in pWL102) enthält das 9909 bp *MroI-SspI*-Fragment der gesamten p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 (Offner *et al.*, 2000).

pvac Δ M (L-O in pWL102) enthält das 9189 bp *SspI*-Fragment der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 ohne den *gvpM*-Leserahmen (Offner *et al.*, 2000).

gvp-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35

Der halobakterielle *shuttle*-Vektor pJAS35 besitzt einen Ferredoxin-Promotor (P_{fdx}) unter dessen Kontrolle die Expression des jeweiligen inserierten Leserahmens erfolgt (Pfeifer *et al.*, 1993; Pfeifer *et al.*, 1994). Als Selektionsgene trägt der pJAS35-Vektor das β -Lactamase-Gen für eine Ampicillin-Resistenz in *E.coli*-Transformanten und ein mutiertes GyraseB-Gen (*gyrB*) aus *Haloferax alicantei*, was zu einer Novobiocin-Resistenz in *Hfx. volcanii*-Transformanten führt (Holmes & Dyall Smith, 1991; Holmes *et al.*, 1991). In dieser Arbeit wurden die verschiedenen *gvp*-Leserahmen aus der p-vac Region sowohl über die Schnittstellen für *NcoI* und *Acc651* als auch über die Schnittstellen für *PstI* und *Acc651* inseriert. Die Expressionsstärke des jeweiligen *gvp*-Gens ist unabhängig von der Inserierungsstelle in *Hfx. volcanii*-Transformanten vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

pF^{ex} enthält das 641 bp *NcoI-Acc651*-Fragment des *gvpF*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Castorph, Diplomarbeit, 2003).

pG^{ex} enthält das 264 bp *PstI-Acc651*-Fragment des *gvpG*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35.

pH^{ex} enthält das 595 bp *NcoI-Acc651*-Fragment des *gvpH*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Hofacker, Dissertation, 2002).

pI^{ex} enthält das 454 bp *NcoI*-*Acc651*-Fragment des *gvpI*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Hofacker, Dissertation, 2002).

pJ^{ex} enthält das 344 bp *NcoI*-*Acc651*-Fragment des *gvpJ*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Castorph, Diplomarbeit, 2003).

pK^{ex} enthält das 354 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpK*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35.

pL^{ex} enthält das 845 bp *NcoI*-*Acc651*-Fragment des *gvpL*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Castorph, Diplomarbeit, 2003).

pM^{ex} enthält das 412 bp *NcoI*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Offner *et al.*, 2000).

pGHIJKLM^{ex} enthält das 3166 bp *NcoI*-Fragment des *gvpGHIKLM*-Leserahmens im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Offner *et al.*, 2000).

pGM^{ex} enthält das 521 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpG*- und *gvpM*-Leserahmens. Das *gvpG*-Fragment wurde über *PstI* (die erste Base der Schnittstelle liegt 6 Nukleotide stromaufwärts des *gvpG*-Startcodons) und *NcoI* (die erste Base der Schnittstelle folgt stromabwärts direkt nach dem *gvpG*-Stopcodon) in pJAS35 inseriert und das *gvpM*-Fragment über *NcoI* (die erste Base der Schnittstelle liegt 2 Nukleotide stromaufwärts des *gvpM*-Startcodons) und *Acc651*.

pHM^{ex} enthält das 818 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpH*- und *gvpM*-Leserahmens. Das *gvpH*-Fragment wurde über *PstI* (die erste Base der Schnittstelle liegt 6 Nukleotide stromaufwärts des *gvpH*-Startcodons) und *NcoI* (die erste Base der Schnittstelle folgt stromabwärts direkt nach dem *gvpH*-Stopcodon) in pJAS35 inseriert und das *gvpM*-Fragment über *NcoI* (die erste Base der Schnittstelle liegt 2 Nukleotide stromaufwärts des *gvpM*-Startcodons) und *Acc651*.

pJM^{ex} enthält das 614 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpJ*- und *gvpM*-Leserahmens. Das *gvpJ*-Fragment wurde über *PstI* (die erste Base der Schnittstelle liegt 6 Nukleotide stromaufwärts des *gvpJ*-Startcodons) und *NcoI* (die erste Base der Schnittstelle folgt stromabwärts direkt nach dem *gvpJ*-Stopcodon) in pJAS35 inseriert und das *gvpM*-Fragment über *NcoI* (die erste Base der Schnittstelle liegt 2 Nukleotide stromaufwärts des *gvpM*-Startcodons) und *Acc651*.

pLM^{ex} enthält das 1260 bp *NcoI*-Fragment des *gvpL*- und *gvpM*-Leserahmens (Offner *et al.*, 2000).

GFP^{ex} enthält das 729 bp *PstI-Acc651*-Fragment des *gfp*-Leserahmens aus pJAM1020 im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35.

pM_{gfp}^{ex} enthält das 996 bp *PstI-Acc651*-Fragment bestehend aus dem *gvpM*-Leserahmen, welcher am 3'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gvpM*-Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-Linker (15 Nukleotide mit der Basenfolge GCA) zwischen die beiden Leserahmen eingefügt (Sartorius-Neef & Pfeifer, unpubliziert).

pL_{gfp}^{ex} enthält das 1587 bp *PstI-Acc651*-Fragment bestehend aus dem *gvpL*-Leserahmen, welcher am 3'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gvpL*-Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-Linker (15 Nukleotide mit der Basenfolge GCG-GCC-GCA-GCT-GCA) zwischen die beiden Leserahmen eingefügt.

pH_{gfp}^{ex} enthält das 1290 bp *PstI-Acc651*-Fragment bestehend aus dem *gvpH*-Leserahmen, welcher am 3'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gvpH*-Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-Linker (15 Nukleotide mit der Basenfolge GCG-GCC-GCA-GCT-GCA) zwischen die beiden Leserahmen eingefügt.

pG_{gfp}^{ex} enthält das 993 bp *PstI-Acc651*-Fragment bestehend aus dem *gvpG*-Leserahmen, welcher am 3'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gvpG*-Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-Linker (15 Nukleotide mit der Basenfolge GCG-GCC-GCA-GCT-GCA) zwischen die beiden Leserahmen eingefügt.

pJ_{gfp}^{ex} enthält das 1086 bp *PstI-Acc651*-Fragment bestehend aus dem *gvpJ*-Leserahmen, welcher am 3'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gvpJ*-Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-Linker (15 Nukleotide mit der Basenfolge GCG-GCC-GCA-GCT-GCA) zwischen die beiden Leserahmen eingefügt.

p_{gfp}M^{ex} enthält das 996 bp *PstI-Acc651*-Fragment bestehend aus dem *gvpM*-Leserahmen, welcher am 5'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gfp*-Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-linker (15 Nukleotide mit der Basenfolge GCG-GCC-GCA-GCT-GCA) zwischen die beiden Leserahmen eingefügt.

p_{gfp}J^{ex} enthält das 1086 bp *PstI-Acc651*-Fragment bestehend aus dem *gvpJ*-Leserahmen, welcher am 5'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gfp*-Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-Linker (15 Nukleotide mit der Basenfolge GCG-GCC-GCA-GCT-GCA) zwischen die beiden Leserahmen eingefügt.

pG_{gfp}(Ala-Gly)^{ex} enthält das 996 bp *PstI-Acc651*-Fragment bestehend aus dem *gvpG*-Leserahmen, welcher am 3'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gvpG*-

Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-Glycin-Linker (18 Nukleotide mit der Basenfolge GCG-GGA-GCA-GGT-GCG-GGA) über Mutagenese-PCR zwischen die beiden Leserahmen eingefügt.

pJ_{gfp}(Ala-Gly)^{ex} enthält das 1089 bp *Pst*I-*Acc*651-Fragment bestehend aus dem *gvpL*-Leserahmen, welcher am 3'-Ende mit dem *gfp*-Leserahmen fusioniert wurde. Das *gvpL*-Stopcodon wurde deletiert und ein Alanin-Glycin-Linker (18 Nukleotide mit der Basenfolge GCG-GGA-GCA-GGT-GCG-GGA) über Mutagenese-PCR zwischen die beiden Leserahmen eingefügt.

pHM_{gfp}^{ex} enthält das 1547 bp *Pst*I-*Acc*651-Fragment des *gvpH*- und *gvpM-gfp*-Leserahmens. Das *gvpH*-Fragment wurde über *Pst*I (die erste Base der Schnittstelle liegt 6 Nukleotide stromaufwärts des *gvpH*-Startcodons) und *Nco*I (die erste Base der Schnittstelle folgt stromabwärts direkt nach dem *gvpH*-Stopcodon) und *Nco*I in pJAS35 inseriert und der *gvpM-gfp*-Leserahmen über *Nco*I (die erste Base der Schnittstelle liegt 2 Nukleotide stromaufwärts des *gvpM*-Startcodons) und *Acc*651.

pLM_{gfp}^{ex} enthält das 1844 bp *Pst*I-*Acc*651-Fragment des *gvpL*- und *gvpM-gfp*-Leserahmens. Das *gvpL*-Fragment wurde über *Pst*I (die erste Base der Schnittstelle liegt 6 Nukleotide stromaufwärts des *gvpL*-Startcodons) und *Nco*I (die erste Base der Schnittstelle folgt stromabwärts direkt nach dem *gvpL*-Stopcodon) und *Nco*I (die erste Base der Schnittstelle liegt 2 Nukleotide stromaufwärts des *gvpM*-Startcodons) in pJAS35 inseriert und der *gvpM-gfp*-Leserahmen über *Nco*I und *Acc*651.

pH_{gfp}M^{ex} enthält das 1547 bp *Pst*I-*Acc*651-Fragment des *gvpH-gfp* und *gvpM*-Leserahmens. Das *gvpH-gfp*-Fragment wurde über *Pst*I (die erste Base der Schnittstelle liegt 6 Nukleotide stromaufwärts des *gvpH*-Startcodons) und *Nco*I (die erste Base der Schnittstelle folgt stromabwärts direkt nach dem *gfp*-Stopcodon) und *Nco*I in pJAS35 inseriert und der *gvpM*-Leserahmen über *Nco*I (die erste Base der Schnittstelle liegt 2 Nukleotide stromaufwärts des *gvpM*-Startcodons) und *Acc*651.

pL_{gfp}M^{ex} enthält das 1844 bp *Pst*I-*Acc*651-Fragment des *gvpL-gfp* und *gvpM*-Leserahmens. Das *gvpL-gfp*-Fragment wurde über *Pst*I (die erste Base der Schnittstelle liegt 6 Nukleotide stromaufwärts des *gvpL*-Startcodons) und *Nco*I (die erste Base der Schnittstelle folgt stromabwärts direkt nach dem *gfp*-Stopcodon) und *Nco*I in pJAS35 inseriert und der *gvpM*-Leserahmen über *Nco*I (die erste Base der Schnittstelle liegt 2 Nukleotide stromaufwärts des *gvpM*-Startcodons) und *Acc*651.

Mutationen im *gvpM*-Leserahmen

pM_{R20A/D21A}^{ex} enthält das 267 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 58 und 59 und einer Substitution von 1 Nukleotid an Position 62 in pJAS35. Die Substitutionen führen zum Austausch von Arginin zu Alanin an Position 20 und Aspartat zu Alanin an Position 21 in GvpM.

pM_{R20D/D21R}^{ex} enthält das 267 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 58 und 59 und einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 61 und 62 in pJAS35. Die Substitutionen führen zum Austausch von Arginin zu Aspartat an Position 20 und Aspartat zu Arginin an Position 21 in GvpM.

pM_{G22D}^{ex} enthält das 267 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 65 und 66 in pJAS35. Die Substitution führt zu dem Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat an Position 22 in GvpM.

pM_{A23D}^{ex} enthält das 267 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Substitution von 1 Nukleotid an Position 68 in pJAS35. Die Substitution führt zu dem Aminosäureaustausch von Alanin zu Aspartat an Position 23 in GvpM.

pM_{V24D}^{ex} enthält das 267 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 71 und 72 in pJAS35. Die Substitution führt zu dem Aminosäureaustausch von Valin zu Aspartat an Position 24 in GvpM.

pM_{A48D}^{ex} enthält das 267 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Substitution von 1 Nukleotid an Position 143 in pJAS35. Die Substitution führt zu dem Aminosäureaustausch von Alanin zu Aspartat an Position 48 in GvpM.

pM_{I36M}^{ex} enthält das 267 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Substitution von 1 Nukleotid an Position 108 in pJAS35. Die Substitution führt zu dem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Methionin an Position 36 in GvpM.

pM_{Y56A}^{ex} enthält das 267 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 166 und 167 in pJAS35. Die Substitution führt zu dem Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Alanin an Position 56 in GvpM.

pM_{Δ5N}^{ex} enthält das 255 bp *PstI*-*Acc651*-Fragment des *gvpM*-Leserahmens mit einer Deletion von 4 Aminosäuren am N-Terminus des GvpM in pJAS35. Das Startcodon, welches für Methionin codiert wurde beibehalten, die Aminosäuren an den Positionen 2 bis 5 wurden deletiert.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.*, (1988) wurde angewendet, um spezifische DNA-Fragmente aus Plasmid-DNA zu amplifizieren. Hierbei wird die Einführung von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und/oder Mutationen in die Zielsequenz möglich. Die Reaktion erfolgte in einem rechnergesteuerten T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen). Zur Amplifizierung wurde ein Gemisch aus *Taq*-DNA-Polymerase und *Pfu*-DNA-Polymerase im Verhältnis von 20:1 verwendet. Der initiale Denaturierungsschritt der DNA-Matrize erfolgte für 5 min bei 95°C. Hierauf folgte die Anlagerung der synthetischen Oligonukleotide für 30 sec. Die Temperatur für die Anlagerung wurde in Abhängigkeit der Länge und des GC-Gehaltes der Oligonukleotide gewählt. Im dritten Schritt erfolgte die Elongation bei 72°C für einen Zeitraum von 1 min pro zu amplifizierenden kb DNA. Es folgten 34 identische Zyklen und ein abschließender Zyklus bei dem die Elongationszeit auf 7 min erhöht wurde, um alle Matrizenstränge nach Anlagerung der Oligonukleotide vollständig zu verlängern. Die Amplifikate wurde im Anschluss mittels 1 %igen Agarosegelen analysiert.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze:

| | |
|--|------------|
| Plamid-DNA | 25-50 ng |
| Reaktionspuffer (-MgCl ₂) | 1/10 vol |
| MgCl ₂ | 1-5 mM |
| dNTP-Mix (2 mM) | 5 µl |
| Primer | je 25 pmol |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase | 1,9 U |
| <i>Pfu</i> -DNA Polymerase | 0,05 U |
| doppelt deionisiertes H ₂ O | ad 50 µl |

3.3.2. Ortsspezifische Mutagenese-PCR

Mit der ortsspezifischen Mutagenese-PCR lassen sich gezielt Mutationen wie Substitutionen, Insertionen oder Deletionen in doppelsträngige Plasmid-DNA einführen. Hierbei wurde die *Pfu-Ultra*-Polymerase eingesetzt, die die Einführung von Mutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA *in vitro* ermöglicht. Dies erfolgt durch Amplifikation des gesamten Vektors inklusive Insert in einem Schritt. Eine anschließende Klonierung der Zielsequenz in einen

Vektor ist somit nicht erforderlich. Benötigt werden zwei synthetische Oligonukleotide, die jeweils zu einem Strang der Template-DNA komplementär sind und die gewünschten Mutationen enthalten. Die Sequenz der synthetischen Oligonukleotide richtet sich nach den einzuführenden Mutationen.

Für die Einführung von Deletionen in die Zielsequenz werden die synthetischen Oligonukleotide so gewählt, dass sie mit ihren 5' Enden direkt aneinander lagern, wobei die zu deletierende Sequenz ausgegrenzt wird. Die Oligonukleotide werden durch die *Pfu*-Ultra-DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung verlängert und es entsteht ein linearisiertes Vektor-Fragment mit glatten Enden (*blunt ends*). Vor der Transformation von *E.coli* TOP 10 F Zellen, müssen die 5'-Enden der amplifizierten Plasmid-DNA phosphoryliert und über Ligation die Enden zu einem zirkulären Plasmid verknüpft werden.

Bei der Einführung von Punktmutationen in die Zielsequenz wurden die synthetischen Oligonukleotide so gewählt, dass beide komplett überlappen und die gewünschte Mutation in der Mitte ihrer Sequenz tragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die mutationstragende Sequenz 5' und 3' von mindestens 10 zur Zielsequenz komplementären Nukleotiden flankiert wird. Die Oligonukleotide wurden wiederum durch die *Pfu*-Ultra-Polymerase verlängert und es entstand ein linearisiertes Vektor-Fragment mit versetzten Enden (*staggered nicks*). In diesem Fall erfolgte die Transformation von *E.coli* TOP 10 F Zellen direkt ohne vorherige Phosphorylierung und Ligation des PCR-Produktes.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 25 μ l in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze:

| | |
|--|---------------|
| Plasmid-DNA | 25 ng |
| Reaktionspuffer | 1/10 vol |
| dNTP-Mix (2 mM) | 2,5 μ l |
| Primer | je 125 ng |
| <i>Pfu</i> -Ultra-Polymerase | 2,5 U |
| doppelt deionisiertes H ₂ O | ad 25 μ l |

Temperaturprofil der Mutagenese-PCR:

| Temperatur | Dauer | Anzahl der Zyklen |
|---|-----------------|-------------------|
| 95°C | 30 sec | 1 |
| 95°C Schmelztemperatur der Primer minus 5°C | 30 sec 1 min | 18 |
| 68°C | 4 min | |

Im Anschluss an die PCR wurde der Ansatz mit 10 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* für 1 h bei 37°C hydrolysiert, welche spezifisch methylierte DNA erkennt und spaltet. Aus *E.coli* isolierte DNA ist *dam*⁺ methyliert und somit angreifbar für eine *DpnI*-Hydrolyse. Auf diese Weise wird die parentale DNA-Matrize fragmentiert und die neu synthetisierte DNA mit der Mutation selektiert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und falls erforderlich die 5'-Enden der amplifizierten Plasmid-DNA durch die T4-Phosphonukleotidkinase phosphoryliert. Hierfür wurden 18 µl des PCR-Produktes mit 2 µl T4-Ligase-Puffer und 10 U T4-Phosphonukleotidkinase versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz abgekühlt und mit 400 U T4-Ligase für 2 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Die folgende Transformation von *E.coli* TOP 10 F Zellen erfolgte mit dem kompletten Ligationsansatz. Wurden vollständig komplementäre Primer bei der Mutagenese-PCR verwendet, erfolgte die Transformation von *E.coli* TOP 10 F direkt mit 10 µl des aufgereinigten PCR-Ansatzes.

3.3.3. Molekularbiologische Standardtechniken

Die hydrolytische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Analyse und Präparation wurden DNA-Fragmente über 1%ige Agarosegele mittels Elektrophorese aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TAE-Puffer (Tris-Acetat/EDTA-Puffer, Sambrook & Russell, 2001) verwendet. Vor der Auftrennung wurden die DNA-Proben mit DNA-Auftragspuffer versetzt (0,25% Bromphenolblau, 50% Saccharose, 0,1 M EDTA). Anschließend wurden die Gele für 10-20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in dH₂O) gefärbt und für die gleiche Zeit in Wasser entfärbt. Durch Anregung mit UV-Licht wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel visualisiert (Sambrook & Russell, 2001).

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem GeneElute™ PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Angaben des Herstellers.

Für Ligationen wurden linearisierte Vektor- und Insert-DNA in einem Volumenverhältnis von 1:2,4 zusammen gegeben und für 90-120 min bei Raumtemperatur mit T4-DNA-Ligase (New England, Biolabs) inkubiert.

Vor der Transformation von *E.coli* TOP10F mit dem Ligationsansatz wurde das Enzym für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte mit dem E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA) oder dem GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma, St. Louis, USA), wobei jeweils nach den Angaben des Herstellers vorgegangen wurde.

Die DNA-Sequenzierungen wurden vom Sequencing Service des Biozentrums der LMU München durchgeführt.

3.3.4. Plasmidisolierung aus *Hfx. volcanii* WR340

Die Plasmidisolierung aus *Hfx.volcanii* WR340 erfolgte mit dem Quiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH) nach Angaben des Herstellers. Abweichend vom Protokoll wurde zur Lyse der Zellen ein für die Plasmidisolierung aus Halobakterien hergestellter Puffer P1 verwendet. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 erfolgte eine Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend wurde für 15-20 min und 4°C bei 13.000 rpm zentrifugiert. Um sicherzustellen, dass der gesamte Waschpuffer von der Membran entfernt und kein Ethanol verschleppt wird, wurde die Dauer des letzten Zentrifugationsschrittes auf 2 min erhöht. Die Plasmid-DNA wurde mit 30 µl ddH₂O eluiert.

3.3.5. Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analyse

Zur eindeutigen Identifizierung des *gvpM_{Mut}*-Gens in *Hfx. volcanii* p-vacΔM +pM_{Mut}^{ex}-Transformanten wurde eine Southern-Analyse mit einer *gvpM*-spezifischen Sonde durchgeführt.

Nach enzymatischer Hydrolyse der Plasmid-DNA wurden die Fragmente auf einem 1%igen-TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss 10 min mit 0,25 M HCl partiell depuriniert. Zur folgenden Denaturierung und Neutralisierung wurden das Gel

für je 15 min in 1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH bzw. 1,5 M NaCl + 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4 inkubiert. Der Transfer der DNA-Fragmente auf die Nylonmembran erfolgte nach der Methode von Southern (1975) und Sambrook & Russel (2001) durch Kapillarblot in 20x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) über Nacht. Die DNA wurde anschließend mittels UV-Crosslink (UV-Crosslinker, Stratagene) kovalent auf der Membran fixiert.

Zum Nachweis des *gvpM*-Fragments wurde eine Digoxigenin-markierte DNA-Sonde verwendet, die spezifisch an das *gvpM* bindet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für min 2 h mit Hybridisierungslösung (50% (v/v) Formamid, 2% (v/v) Blockierungsreagenz, 0,1% (v/v) Laurylsarcosin, 0,02% (v/v) SDS, 5x SSC) bei 42°C inkubiert. Die Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten *gvpM*-DNA-Sonde erfolgte über Nacht bei 42°C. Das Waschen der Membran erfolgte nach Sambrook & Russel (2001). Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem CDP-Star-Reagenz nach Angaben des Herstellers.

3.3.6. Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Die Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden erfolgte mit dem DIG DNA Labeling Mix (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurde die DNA-Sonde mittels PCR amplifiziert und dabei durch den Einbau von Digoxigenin-markierten dUTPs markiert. Die PCR wurde in einem Thermocycler (T3000, Biometra) durchgeführt und die Zyklusparameter entsprechend des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes gewählt. Anschließend wurde die DNA-Sonde mit dem PCR-Clean-up Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und für Southern-Analysen eingesetzt.

Die Herstellung der *gvpM*-Sonde erfolgte mittels des p-vac x pWL102-Konstrukts als Matrize und den Oligonukleotiden 5'XbaI+GvpM und 3'HindIII+GvpM (siehe Tabelle 1).

3.4. Proteinchemische Methoden

3.4.1. Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode

Die Bestimmung der Konzentration an Gesamtprotein in einem Zellysate erfolgte mittels der Bradford-Methode (Ausubel *et al.*, 1988).

Dazu wurden 980 μ l Bradford-Reagenz mit 20 μ l einer Proteinlösung vermischt und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Anhand

einer zuvor ermittelten Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) von 0,125-1 mg/ml wurde die Proteinkonzentration in der Lösung ermittelt.

3.4.2. Herstellung halobakterieller Proteinextrakte für Western-Analysen

Die Herstellung eines Zellysates und die Isolierung der löslichen Proteinfraktion ermöglicht mit Hilfe einer Western-Analyse den immunologischen Nachweis eines spezifischen Proteins.

Die Probenentnahme der Kulturen erfolgte in der spät-exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 1,5-2,0. Es wurden 6 ml (oder 50 ml) Kultur in sterile Reaktionsgefäße überführt und für 20 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde bei -20°C aufbewahrt oder gleich zur Herstellung des Zellysates weiterverarbeitet. Hierfür wurde das Zellsediment in 400 µl (oder 2 ml) TE-Puffer + 1 µg/ml DNase I resuspendiert und zur Zelllyse für 30 min stehend bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellysate für mind. 2 h bei Raumtemperatur gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 dialysiert um das Salz zu entfernen. Unlösliche Zellbestandteile und Zellmembranen wurden bei 13.000 rpm und 4°C für 20 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration für Western-Analysen eingesetzt.

Frühere Versuche haben gezeigt, dass bei der oben beschriebenen Herstellung der Zellysate der Nachweis des relativ hydrophoben GvpM-Proteins nur ein sehr schwaches oder gar kein Signal lieferte. Vermutlich ist das durch die starke Tendenz von GvpM zur Aggregation erklärbar. Größere GvpM-Aggregate landen bei der Zentrifugation nach der Dialyse im Sediment und werden verworfen, und in der löslichen Proteinfraktion ist GvpM dann nur sehr schwach oder gar nicht nachweisbar. Aus diesem Grund wurden zum Nachweis von GvpM oder anderer aggregierender Gasvesikelproteine jeweils 50-100 ml Zellen aus der spät-exponentiellen Wachstumsphase entnommen, bei 5000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert, das Zellsediment in 2-3 ml TE-Puffer + 1 µg/ml DNaseI resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dialyse zum Entsalzen der Proben wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Zellysate wurden anschließend für 20 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde fünfmal wiederholt. Der Überstand wurde dabei jedes Mal in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Zellsediment in 500 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 resuspendiert. Der Überstand nach dem letzten Zentrifugationsschritt (Fraktion 1) wurde zur weiteren Analyse verwendet und enthielt vor allem lösliche Proteine, während das Sediment (Fraktion 2) aggregierende und membrangebundene Proteine enthielt. Die Proteinkonzentration beider Fraktionen wurde durch den Bradford-Assay bestimmt und beide für Western-Analysen eingesetzt. Durch den Vergleich der beiden

Fractionen konnten außerdem Aussagen darüber getroffen werden, ob das Protein eine Tendenz zum Aggregieren zeigt oder ob es sich um ein lösliches Protein handelt.

3.4.3. Isolierung einzelner Proteine aus *Hfx. volcanii* für *in vitro* Studien

Für Interaktionsstudien wurden *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten, die verschiedene *gvp*-Gene unter Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 exprimierten, in 3 M Vollmedium + Histidin mit 0,2 µg/ml Novobiocin bei 37°C und 180 rpm angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 1,5-1,8 wurden jeweils 50 ml Zellen bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert und das Zellsediment in 5ml Lysepuffer (2,5M KCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% Glycerin, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über Ultraschall (3x 10 sec) mit einer Mikrospritze auf Eis. Membranbestandteile und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 20 min von der löslichen Proteinfraction abgetrennt. Das Zellysate wurde für Interaktionsstudien verwendet, nachdem die Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode bestimmt wurde.

3.4.4. Natriumdodecylsulfat (SDS)- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von Proteinen wurden halobakterielle Zellysate auf 12%igen SDS-Gelen nach Schagger (Schagger & von Jagow, 1987) aufgetrennt. Diese bestanden aus einem 4%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Zellysate mit 3x SDS-Probenauftragspuffer versetzt und für 1-2 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte für ca. 2 h bei 100 V.

3.4.5. Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine im Polyacrylamidgel durch Inkubation in kolloidalen Coomassie (20% (v/v) Roti[®]-Blue (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 20% (v/v) Methanol, 60% (v/v) deionisiertes Wasser) über Nacht gefärbt. Das Entfärben erfolgte am nächsten Tag durch mehrmaliges Waschen mit dH₂O.

3.4.6. Herstellung von Antiseren gegen halobakterielle Proteine

Zur Herstellung eines p-GvpJ-Antiserums wurde das GvpJ rekombinant mit einem N-terminalen 6xHis-tag in *E.coli* BL21 produziert. Hierfür wurde zunächst der p-*gvpJ*-Leserahmen in den His-tag- Expressionsvektor pET28a (+) inseriert. Die Produktion und anschließende Aufreinigung von GvpJ über eine Ni-NTA-Matrix erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.8 beschrieben. Das aufgereinigte GvpJ-His-Protein wurde zur Generierung eines spezifischen GvpJ-Antiserums in Kaninchen verwendet (SEQLAB Göttingen).

Weitere in dieser Arbeit verwendete Antiseren waren bereits vorhanden und wurden unter den gleichen Bedingungen hergestellt.

3.4.7. Nachweis von Proteinen mittels Western-Analyse

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden halobakterielle Gesamtproteinextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen, um bestimmte Proteine anschließend durch Anlagerung spezifischer Antiseren nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Varianten der Western-Analyse durchgeführt: Einmal die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran durch ein Nassblotverfahren mit anschließender Detektion der Proteine durch einen mit Merrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörper und zum anderen die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels semi-dry Blot und anschließender Detektion der Proteine durch einen Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper.

Der Transfer der Proteine durch das Nassblotverfahren erfolgte in einer mit 1x Western-Transferpuffer gefüllten Blotkammer (Biorad) für 1 h bei 100V und 4°C. Als Größenstandard wurde ein gefärbter Proteinmarker verwendet, der bei erfolgreicher Durchführung auf die Nitrocellulosemembran übertragen wurde. Die Membran wurde nach dem Blotten mit Ponceau-Rot gefärbt, um ein Auftragen gleicher Mengen Protein auf die Membran zu überprüfen. Nach Entfärben der Membran in 1x PBS, erfolgte die Blockierung in 2% Magermilch in PBS + 0,05% Tween 20 über Nacht bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindestellen der Membran abzusättigen. Für die nun folgende Immunodetektion wurden in Kaninchen generierte, gegen halobakterielle Proteine gerichtete Antiseren in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer mit der Membran für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließendes dreimaliges Waschen für je 10 min in PBS + 0,05% Tween 20 wurde unspezifisch gebundener Antikörper entfernt. Die Inkubation mit dem an Merrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte ebenfalls für 1 h in einer 1:5000 Verdünnung in Blockpuffer. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit Waschpuffer

erfolgte die Immunodetektion mit Hilfe des ECL-Detektion-Kit von Thermofisher Scientific nach Angaben des Herstellers.

Im anderen Fall erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Immobilon-FL-PVDF-Membran mittels semi-dry Blot für 1-1,5 h bei 0,08 mA/cm² Gel. Hier wurde ebenfalls der gefärbte Größenstandard verwendet. Die Membran wurde anschließend 3x 5min in TBS gewaschen und für 1 h oder über Nacht bei 20°C in Blockpuffer (Licor) inkubiert. Hierauf folgten 4 Waschschrte in TBS für jeweils 5 min, bevor die Membran mit dem entsprechenden Antiserum, verdünnt in TBS (1:1000 für GvpM, GvpG und GvpJ, 1:500 für GvpH und GvpL) inkubiert wurde. Dieser Inkubationsschritt erfolgte für 1h bei 20°C oder 4°C über Nacht. Die Membran wurde anschließend 4 x für 5 min in 1x PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye 800 CW, 1:25000 in Blockpuffer) inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran (4x für 5 min in PBS + 0,1% Tween20) erfolgte die Detektion der Proteine im Fluoreszenz-Reader (Licor).

In dieser Arbeit verwendete Antiseren:

| Antiserum | verwendet zur Detektion von | produziert in | Referenz |
|------------|-----------------------------|---------------|---------------------------------|
| Anti-pGvpM | pGvpM | Kaninchen | Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013 |
| Anti-pGvpJ | pGvpJ | Kaninchen | Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013 |
| Anti-pGvpG | pGvpG | Kaninchen | Offner & Pfeifer, 1995 |
| Anti-pGvpH | pGvpH | Kaninchen | Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004 |
| Anti-pGvpL | pGvpL | Kaninchen | Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013 |
| Anti-mcGV | pGvpA | Kaninchen | Englert & Pfeifer, 1993 |

3.4.8. Rekombinante Expression und Reinigung von Gvp_{his}-Proteinen aus *E.coli* BL21

Die rekombinante Expression und Reinigung von Hexahistidin-*tag* (6xHis-*tag*)-Fusionsproteinen aus *E.coli* wurde wie von Peter Zimmermann beschrieben durchgeführt (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Die Gasvesikelproteine pGvpM, pGvpL und pGvpH wurden rekombinant mit einem N-terminalen 6xHis-*tag* in *E.coli* BL21 produziert. Hierfür wurden die Leserahmen der entsprechenden Gene über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in den His-*tag*-Expressionsvektor pET28a(+) kloniert.

Der Expressionsvektor pET28a(+) (Novagene) enthält sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende seiner Klonierungsregion eine Sequenz, die für 6 Histidine kodiert. Die Inserierung eines Leserahmens über die Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III führt zur Fusionierung des Leserahmens mit einer 5'-gelegenen 6xHis-Sequenz. Eine hohe Expressionsrate des His-Fusionsproteins wird durch den T7-Promotor erzielt, der unter der Kontrolle einer lac-Operator-Sequenz steht. Das lac-Repressorprotein ist auf dem pET28a(+)-Vektor kodiert. Durch Zugabe von IPTG wird die Produktion des His-Fusionsproteins induziert.

Zur Produktion der 6xHis-*tag*-Fusionsproteine wurde *E.coli* BL21 mit den *gvpX*-pET28a-Konstrukten transformiert und in LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Supplementierung selektiert. Die Transformanten wurden in 5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) bei 37°C und 180 rpm über Nacht kultiviert, 1:10 in LB-Medium und Antibiotika verdünnt und bis zu einer OD₅₈₀ von ungefähr 0,5 bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Nach Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Kultur für weitere fünf Stunden schüttelnd inkubiert und anschließend bei 5000 rpm und 4°C für 20 min zum Sedimentieren der Zellen zentrifugiert.

Die 6xHis-*tag*-Proteine wurden über Metallchelate-Affinitätschromatographie mithilfe von Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) gereinigt. Das Zellsediment einer 100 ml Kultur wurde in 5 ml Lysepuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über eine Ultraschallbehandlung (3x 10 sec) auf Eis. Durch anschließende Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 20 min wurden Zellmembranen und unlösliche Zellbestandteile sedimentiert und von der löslichen Proteinfraction getrennt. Die Aufreinigung erfolgte im "batch"-Verfahren bei 20°C unter Verwendung der löslichen Proteinfraction. Jeweils 5 ml der löslichen Proteine wurden 20 min mit 2 ml Ni-NTA-Agarose inkubiert, welche zuvor mit 5 ml Lysepuffer äquilibriert wurde. Zur Sedimentation der Agarose wurde 3 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es folgten 4 Waschschrte zum Entfernen von ungebundenem Protein,

wobei die Matrix mit je 5 ml Waschpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 10% Glycerin, 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 6,0) für 10 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach jeder Inkubation wurde für 3 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Elution der His-*tag*-Fusionsproteine erfolgte durch Zugabe von 2 ml Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 500 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) und 30 minütiger Inkubation. Es folgten 2 weitere Elutionsschritte mit je 1 ml Elutionspuffer und 20 minütiger Inkubation. Die Qualität der Aufreinigung wurde über SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels überprüft. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Die aufgereinigten GvpH_{His}⁻, GvpL_{His}⁻ und GvpM_{His}⁻-Fusionsproteine wurden durch schrittweise Dialyse in ihre native Konformation überführt. Die Dialyse erfolgte bei Raumtemperatur für je 2 h in Puffern mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 sowie steigender Kalium- und sinkender Harnstoffkonzentration (Puffer 1: 4 M Harnstoff, 0,8 M KCl; Puffer 2: 2 M Harnstoff, 1,6 M KCl; Puffer 3: 2,5 M KCl). Die Proteine wurden anschließend für Interaktionsstudien verwendet.

3.4.9. Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen über Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp_{His}-Proteinen und halobakteriellen Lysaten

Die Affinitätschromatographie zum Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion wurde wie bereits von Peter Zimmermann beschrieben, mit einigen Modifikationen durchgeführt (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Die rekombinant in *E.coli* BL21 produzierten und durch Dialyse in 2,5 M KCl rückgefalteten Gvp-Proteine wurden für die Interaktionsexperimente verwendet. Zur Herstellung einer mit His-*tag*-Proteinen beladenen Affinitätschromatographiematrix wurden 200 µl Ni-NTA-Agarose mit 300 µl Dialysepuffer äquilibriert und mit 20 nmol rückgefaltetem His-*tag*-Protein beladen. Pufferwechsel erfolgten jeweils nach Zentrifugation für 3 min und 4°C bei 15.300 rpm und Entfernen des Überstandes. Nach 1-stündiger Inkubation mit dem His-*tag*-Protein erfolgten 2 Waschschrte mit 1 ml Waschpuffer 1 (2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2), um ungebundenes Protein zu entfernen. Die Gvp_{His}⁻-beladene Matrix wurde für 30 min mit 1,5-2,5 mg der löslichen Gesamtproteinfraktion einer *Hfx. volcanii*-Transformanten inkubiert, die den Leserahmen des putativen Interaktionspartners unter Kontrolle des Ferredoxin-Promotors in pJAS35 exprimiert. Hierauf wurde fünfmal mit je 1 ml Waschpuffer 2 (Waschpuffer 1 + 50 mM Imidazol) für 10 min gewaschen, wobei der letzte Waschschrte nur mit 100 µl Waschpuffer erfolgte. Die Zugabe von niedrig konzentriertem Imidazol zum Waschpuffer sollte eine unspezifische Bindung des putativen Interaktionspartners an die Säule verhindern. Es folgten 2 Elutionsschritte der Gvp_{His}⁻-Proteine

zusammen mit interagierenden Proteinen mit jeweils 100 μl Elutionspuffer (0,5 M Imidazol, 2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,2) für 20 min. Je 15 μl der letzten Waschfraktion und der beiden Elutionsfraktionen wurden für Western-Analysen eingesetzt.

3.5. Quantifizierung der Fluoreszenzintensität

3.5.1. Zellvorbehandlung für Fluoreszenzmessungen

Eine direkte Messung der Fluoreszenzintensität im Kulturmedium von lysierten Zellen war aufgrund der starken Hintergrundfluoreszenz des Mediums nicht möglich. Daher wurden die Zellen zuvor mit 3 M Basalsalzlösung gewaschen. Um eine vergleichbare Zellzahl zu erhalten wurden zunächst Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase entnommen und auf die gleiche OD_{600} von 1,4 eingestellt. Die Zellsuspensionen wurden für 3 min bei 8000 rpm sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 500 μl 3 M Basalsalzlösung (3 M NaCl, 150 mM MgSO_4 , 40 mM KCl, 10nM MnCl_2) resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, das Zellsediment jedoch in 1 ml TED-Puffer (TE-Puffer pH 8,0 + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNaseI) aufgenommen. Nach 1 h Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die Lysate am Phosphor Imager vermessen. Als Referenzwert wurde TE-Puffer verwendet.

3.5.2. Quantifizierung der Fluoreszenz mittels Phosphor Imager

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzstärke wurden Zelllysate transformierter *Hfx. volcanii*-Zellen mittels Phosphor Imager analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 473 nm. Zur Visualisierung und Auswertung der Signale wurde die Software Image Gauge 4.23 (FujiFilm) verwendet. Über die Pixelintensität der Probe wird die Fluoreszenzstärke berechnet, welche in LAU/mm^2 (Light absorbing units per mm^2) angegeben wird.

3.6. Mikroskopische Analysen

3.6.1. Zellfixierung

Zur Immobilisierung von Zellen auf Objektträgern wurde eine Salzwasser-Agaroselösung hergestellt. Hierzu wurden 0,1 g Agarose in 8 ml ddH_2O geschmolzen und mit 12 ml 3 M Basalsalzlösung versetzt. Um ein vorzeitiges Gelieren der Agarose zu verhindern, wurde das

Basalsalz vor der Zugabe erwärmt. Je 5 μl der Zellsuspension wurden auf Objektträger pipettiert und mit einem Tropfen der handwarmen Salzwasser-Agaroselösung vermischt.

3.6.2. Phasenkontrastmikroskopie (PKM)

Zur Bestimmung der Vac positiven Zellen bei *Hfx. volcanii*-Transformanten wurden die Zellen im Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Hierfür wurden Zellen auf Festmedium ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 42°C und feuchter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei Zimmertemperatur weiter inkubiert. Nach ca. 4 Wochen wurden die Kolonien zur Analyse auf dem Objektträger mit 5 μl 3 M Basalsalz vermischt, mit Salzwasser-Agarose fixiert und mikroskopiert.

3.6.3. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die auf Festmedium gewachsenen Zellen in Basalsalz resuspendiert und mit einem Zeiss EM109 Elektronenmikroskop bei 7000- bis 20000-facher Vergrößerung betrachtet. Fotografiert wurden die Zellen mit einer Gatan MultiScan 600 W Kamera.

3.6.4. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Detektion der Fluoreszenz und Lokalisierung des jeweiligen GFP-Fusionsproteins wurden die entsprechenden Transformanten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei handelte es sich um ein Axioskop von Zeiss. Die Aufnahmen erfolgten durch eine AxioCam MR-Kamera.

Auf Festmedium gewachsene Kolonien wurden auf dem Objektträger mit 5 μl 3 M Basalsalz vermischt, mit Salzwasser-Agarose fixiert und mikroskopiert. Zellen in Flüssigmedium wurden zunächst für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, mit Basalsalz gewaschen und nach erneutem zentrifugieren in Basalsalz resuspendiert, um die Hintergrundfluoreszenz des Mediums zu minimieren. Je 5 μl der Zellsuspension wurde mit Salzwasser-Agarose fixiert und mikroskopiert.

4. Ergebnisse

Die Gasvesikelbildung bei *Hbt. salinarum* PHH1 beruht auf der Expression der 14 *gvp*-Gene der p-vac Region. Die Gene sind in 2 entgegengesetzt orientierten Clustern angeordnet, *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* (Englert *et al.*, 1992b). Die Expression des *gvpFGHIJKLM*-Transkripts wird durch den P_F-Promotor gesteuert, der schon während der exponentiellen Wachstumsphase aktiv ist (Hofacker *et al.*, 2004). Dies führt zu einer geringen Produktion der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF, G, H, I, J, K, L und M. Da diese Proteine früher als die Hauptmenge des Strukturproteins GvpA gebildet werden, geht man davon aus, dass sie an der Initiation der Gasvesikelbildung beteiligt sind (Pfeifer *et al.*, 1994). Bekannt ist, dass neben GvpA und GvpO, die akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF, G, J, K, L und M für die Gasvesikelbildung essentiell sind (Offner *et al.*, 1996; Offner *et al.*, 2000). Genaue Kenntnisse über die Funktion der akzessorischen Proteine existieren aber bisher nicht.

In dieser Arbeit wurden die Gasvesikelproteine GvpF, G, H, I, J, K, L und M näher untersucht, um einen Einblick in deren Funktion bei der Gasvesikelbildung zu erhalten. Dafür sollte der Einfluss großer Mengen einzelner Gasvesikelproteine auf die Gasvesikelbildung analysiert werden. Weiterhin wurden verschiedene Gasvesikelproteine *in vivo* mit einer an Hochsalz adaptierten Variante des GFP untersucht, um Informationen über putative Aggregationen der Proteine zu erhalten. Außerdem sollten über *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien, aber auch *in vivo* mit GFP, Interaktionen des GvpM mit weiteren Gasvesikelproteinen identifiziert werden. Schließlich wurden über ortsspezifische Mutagenese einzelne Aminosäuren im GvpM substituiert bzw. deletiert und der Einfluss dieser Mutation auf die Gasvesikelbildung untersucht. Auf diese Weise sollten funktionelle Bereiche dieses Proteins bestimmt werden.

4.1. Gasvesikelbildung bei Überexpression einzelner *gvp*-Gene

4.1.1. Analyse der Gasvesikelbildung in p-vac +pX^{ex}-Transformanten

Zur Untersuchung der Überexpression einzelner *gvp*-Gene in Anwesenheit der p-vac Region wurden *Hfx. volcanii*-Transformanten hergestellt, die neben der p-vac Region (p-vac) den Leserahmen eines zusätzlichen *gvp*-Gens (pX^{ex}) exprimierten. Ausgewählt wurden hierfür die Leserahmen von *gvpF*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L* und *M*. Die *gvp*-Gene wurden dabei unter Kontrolle des starken Ferredoxin-Promotors (P_{fdx}) in pJAS35 exprimiert, während die p-vac Region unter ihrer natürlichen Promotorkontrolle in pWL102 exprimiert wurde. Als Kontrollen dienten Transformanten, welche zum einen nur die p-vac Region und zum anderen die p-vac Region

und den pJAS35-Vektor ohne *gvp*-Leserahmen exprimierten. Die pF^{ex}-, pH^{ex}-, pI^{ex}-, pJ^{ex}-, pL^{ex}- und pM^{ex}-Konstrukte waren zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden (Referenzen s. Abschnitt 3.2.6). Zur Herstellung des pG^{ex}-und des pK^{ex}-Konstrukts wurden die jeweiligen *gvp*-Leserahmen über PCR amplifiziert und dabei Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme für die Insertion in pJAS35 eingefügt. Das p-vac x pWL102-Konstrukt wurde hierbei als Matrize verwendet. Zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt in den Vektor pBSK+ inseriert. Nach Überprüfung der Sequenz folgte die Insertion des Leserahmens in pJAS35.

Die Anwesenheit der korrekten Plasmide in den jeweiligen Transformanten wurde über Plasmidisolierung und anschließende Restriktionsanalyse kontrolliert. Alle Transformanten enthielten die gewünschten Plasmide (Daten nicht gezeigt). Zellen der jeweiligen Transformanten wurden auf Nährböden ausplattiert und auf die Bildung von Gasvesikeln untersucht. Der Phänotyp von Zellen mit und ohne Gasvesikel lässt sich makroskopisch anhand der Farbe der Kolonien unterscheiden. Zellkolonien mit Gasvesikeln (Vac positiv) erscheinen weißlich-rosa und undurchsichtig, während Zellen ohne Gasvesikelbildung (Vac negativ) rot und transparent sind. Erste Vac positive Kolonien waren nach ca. 2 Wochen sichtbar, die finale Auswertung erfolgte aber erst nach vier Wochen Inkubation, um das Ergebnis bei Gasvesikel negativen Transformanten abzusichern. Transformanten mit p-vac +pG^{ex}, +pH^{ex} oder +pM^{ex} zeigten einen Vac negativen Phänotyp, dagegen zeigten p-vac +pF^{ex}, +pI^{ex}, +pJ^{ex}, +pK^{ex} oder +pL^{ex}-Transformanten einen Vac positiven Phänotyp, vergleichbar mit dem der Kontrollen p-vac und p-vac +pJAS35 (Abb. 6).

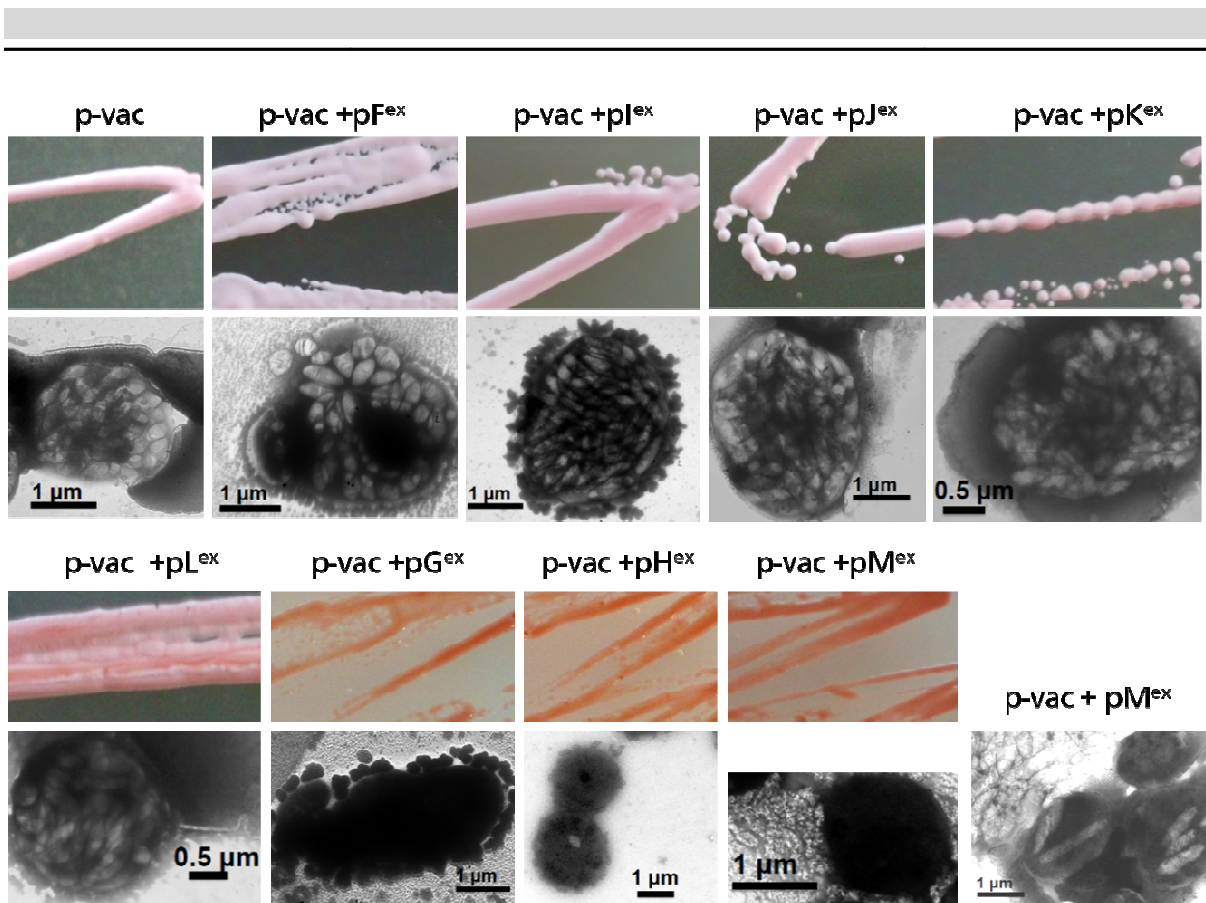


Abb. 6: Einfluss von überproduzierten Gasvesikelproteinen auf die Gasvesikelbildung in *Hfx. volcanii* - Transformanten. Oben gezeigt sind Kolonien, welche 4 Wochen auf Nährböden gewachsen sind. Unten gezeigt sind repräsentative TEM-Aufnahmen der Zellen. Als Kontrolle ist die *Hfx. volcanii* p-vac-Transformante gezeigt (nach Tavlaridou *et al.*, 2013).

Die Zellen der p-vac + pX^{ex}-Transformanten wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop (PKM) untersucht, um die relative Menge an Vac positiven Zellen zu ermitteln. Jeweils ca. 100 Zellen wurden mikroskopiert und der Besitz von Gasvakuolen (Gruppen von Gasvesikeln) dokumentiert (Tabelle 2). Etwa 80-90% der Zellen der p-vac-Transformante enthielten Gasvakuolen. Zusätzlich wurden einzelne Zellen der Transformanten mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert, um die Menge und die Morphologie der einzelnen Gasvesikel zu bestimmen. Vac positive Zellen der p-vac-Transformante enthielten 30-50 Gasvesikel pro Zelle, mit ähnlichen Größen und Formen wie beim Wildtyp von *Hbt. salinarum* PHH1 gezeigt werden konnte (bis zu 0,5 μm lang). Dagegen enthielten 90-95% der Zellen von p-vac + pG^{ex}, +pH^{ex} oder +pM^{ex} keine Gasvesikel (Tabelle 2). Dies impliziert, dass größere Mengen von GvpG, GvpH oder GvpM die Gasvesikelbildung reduzieren bzw. sogar inhibieren. Die wenigen Vac positiven Zellen der p-vac + pM^{ex}-Transformante, enthielten nur ca. 2-5 Gasvesikel pro Zelle und die Gasvesikel selbst wiesen eine Länge von bis zu 1,5 μm auf (Abb. 6). Einige Vac positive Zellen konnten auch bei p-vac + pH^{ex} beobachtet werden, jedoch waren die vorhandenen Gasvesikel nur sehr klein (Abb. 6).

Tabelle 2: Gasvesikel-Phänotyp der p-vac +pX^{ex}-Transformanten (nach Tavlaridou *et al.*, 2013)

| <i>Hfx. volcanii</i> WR340 Transformante | Phänotyp | Anteil an Vac positiven Zellen (%) | Gasvesikel im TEM |
|--|-------------|------------------------------------|---|
| p-vac (WT) | Vac positiv | 80-90 | mit GV gefüllt, 0,5 µm lang |
| p-vac +pJAS35 | Vac positiv | 80-90 | ähnlich wie Wildtyp |
| p-vac +pF ^{ex} | Vac positiv | 80-90 | ähnlich wie Wildtyp |
| p-vac +pG ^{ex} | Vac negativ | 5-10 | 90-95 % ohne Gasvesikel 5-10 % mit sehr kleinen GV |
| p-vac +pH ^{ex} | Vac negativ | 5-10 | keine Gasvesikel |
| p-vac +pI ^{ex} | Vac positiv | 80-90 | ähnlich wie Wildtyp |
| p-vac +pJ ^{ex} | Vac positiv | 80-90 | ähnlich wie Wildtyp |
| p-vac +pK ^{ex} | Vac positiv | 80-90 | ähnlich wie Wildtyp |
| p-vac +pL ^{ex} | Vac positiv | 80-90 | ähnlich wie Wildtyp |
| p-vac +pM ^{ex} | Vac negativ | 5-10 | 90 - 95 % ohne Gasvesikel 5 - 10 % mit großen GV |

4.1.2. Nachweis der überproduzierten Proteine in p-vac +pX^{ex}-Transformanten

Um nachzuweisen, dass die jeweiligen Gasvesikelproteine in p-vac +pX^{ex}-Transformanten in großen Mengen produziert werden, wurden Western-Analysen durchgeführt, wobei das jeweilige Gasvesikelprotein mit einem spezifischen Antikörper detektiert wurde. Des Weiteren wurde die Expression der p-vac Region über den Nachweis von GvpA in den Transformanten überprüft. Hierfür wurden Zellysate aus Zellen der spät-exponentiellen Wachstumsphase hergestellt und jeweils 20 µg Gesamtprotein für die Western-Analyse eingesetzt. Das GvpA Monomer und/oder dessen Aggregate konnte in allen Transformanten nachgewiesen werden (Abb. 7A).

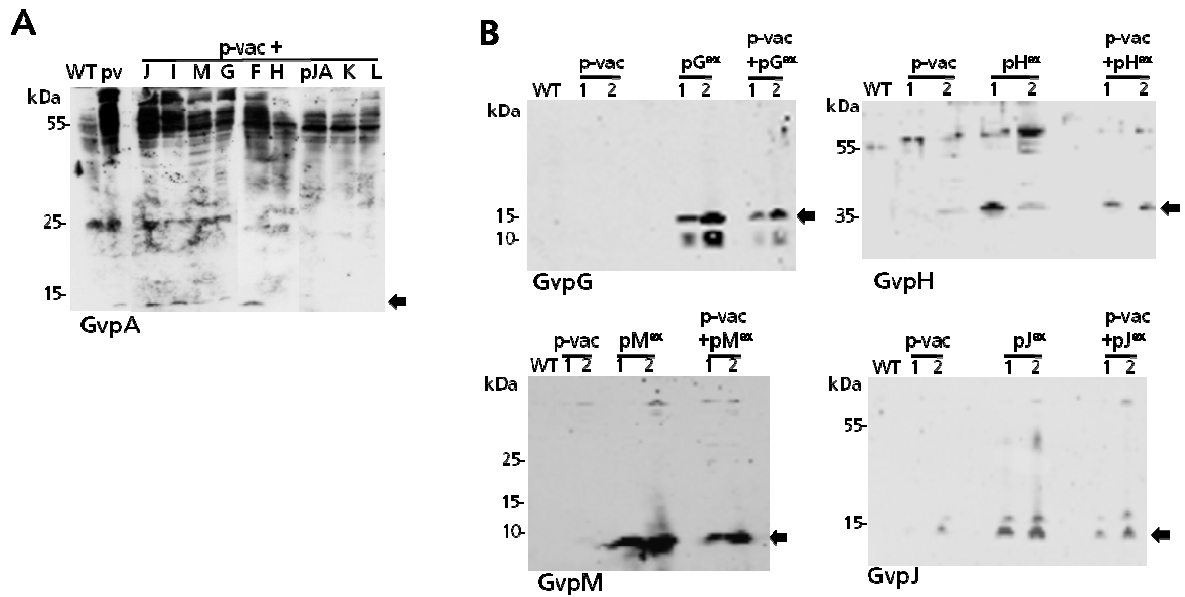


Abb. 7: Western Analyse zum Nachweis von Gasvesikelproteinen in *Hfx. volcanii*-Transformanten. Jeweils 20 μ g Gesamtprotein wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose- **(A)** oder PVDF-Membran **(B)** transferiert. Darunter ist jeweils der verwendete Antikörper angegeben. Links sind die Proteingrößen in kDa markiert. Der Pfeil markiert das jeweilige Gvp-Monomer. **(A)** Nachweis von GvpA in p-vac +pX^{ex}-Transformanten. Verwendet wurde das mcGV-Antiserum, welches spezifisch pGvpA erkennt (Englert *et al.*, 1992b). Zur Detektion wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. WT=*Hfx. volcanii* WR340; pv=p-vac; pJA=pJAS35; F-M + p-vac=p-vac +pX^{ex}-Transformanten. **(B)** Die Zellysate der Transformanten wurden in Fraktion 1 und Fraktion 2 aufgetrennt und mit dem unten angezeigten Antikörper inkubiert. Zur Detektion wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye 800 CE gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert. WT=Zellysat *Hfx. volcanii* WR340 (nach Tavlaridou *et al.*, 2013).

Die p-vac +pX^{ex}-Transformanten mit einem Gasvesikel negativen Phänotyp, sowie die p-vac +pJ^{ex}-Transformante wurden mittels Western Blot analysiert. GvpJ (12 kDa) und GvpM (9 kDa) sind kleine und hydrophobe Proteine, während GvpG (10 kDa) und GvpH (20 kDa) eher hydrophil sind. Neben p-vac +pX^{ex} wurden außerdem noch p-vac-Transformanten und pX^{ex}-Transformanten für Western-Analysen eingesetzt. Hierfür wurden Zellysate von Zellen aus der spät-exponentiellen Wachstumsphase hergestellt und diese durch mehrfaches Zentrifugieren in zwei Fraktionen aufgeteilt. Fraktion 1 enthielt hierbei vor allem lösliche Proteine, Fraktion 2 dagegen Proteinaggregate und membran-assoziierte Proteine. Die Western-Analysen wurden mit beiden Proteinfractionen durchgeführt (Abb. 7B). Dadurch sollte ein falsch negatives Ergebnis vermieden werden, falls das gewünschte Protein bei der auf die Dialyse folgenden Zentrifugation im Zellsediment landet, dass normalerweise verworfen wird (s. Abschnitt 3.3.2) Das GvpG-Monomer (und ein Abbauprodukt) konnte in beiden Fraktionen der pG^{ex}- und der p-vac +pG^{ex}-Transformante nachgewiesen werden, jedoch nicht in der p-vac-Transformante. Wahrscheinlich ist die über die p-vac Region produzierte GvpG-Menge so gering, dass sie unter der Nachweisgrenze liegt (Abb. 7B). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei

der Detektion von GvpM beobachtet. Auch hier wurde bei der p-vac-Transformante kein GvpM nachgewiesen, ein starkes Signal war jedoch in pM^{ex}- und p-vac + pM^{ex}-Transformanten zu beobachten (Abb. 7B). GvpH und GvpJ konnten in sehr geringen Mengen in p-vac-Transformanten nachgewiesen werden und in sehr großen Mengen in den entsprechenden pX^{ex}- und p-vac + pX^{ex}-Transformanten (Abb. 7B). Die zusätzliche ca. 60 kDa große Bande, die bei der Detektion von GvpH in allen Proben sichtbar ist, ist auf eine unspezifische Reaktion des Antikörpers zurückzuführen (PitA; Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Die hydrophoben Proteine GvpM und GvpJ zeigten vereinzelt zusätzliche größere Proteinbanden, was auf eine Multimerisierung oder Aggregation dieser Proteine schließen lässt. Insgesamt konnte durch die Western Analysen die Anwesenheit von großen Mengen der jeweiligen Gasvesikelproteine in den Transformanten bestätigt werden.

4.2. Kompensation des inhibitorischen Effekts großer Mengen von GvpM

4.2.1. Analyse der Gasvesikelbildung in p-vac + XM^{ex}-Transformanten

Die Aggregation von GvpM und die beobachtete Reduktion der Gasvesikelbildung in Anwesenheit großer Mengen von GvpM impliziert, dass GvpM möglicherweise mit anderen (essentiellen) Gasvesikelproteinen interagiert und so die Gasvesikelbildung zum Erliegen bringt. Um zu überprüfen, ob weitere akzessorische Gasvesikelproteine den hemmenden Einfluss von großen GvpM-Mengen aufheben, wurde eine Transformante hergestellt, die neben dem p-vac x pWL102-Konstrukt, ein pGHIJKLM^{ex}-Konstrukt exprimiert. Bei diesem Konstrukt werden die *gvpG-M*-Gene unter Kontrolle des Ferredoxin-Promotors in pJAS35 exprimiert. Die Produktion der entsprechenden Gasvesikelproteine in pGHIJKLM^{ex}-Transformanten wurde über Western-Analysen, am Beispiel von GvpG und GvpK bereits nachgewiesen (Offner & Pfeifer, 1995). Die p-vac + pGHIJKLM^{ex}-Transformante war Vac positiv und die Zellen enthielten Gasvesikel in vergleichbarer Menge und Größe wie in p-vac-Transformanten (Abb. 8). Das lässt den Schluss zu, dass für die Gasvesikelbildung die Menge einiger akzessorischer Proteine im Gleichgewicht sein muss. Deshalb wurde nach Gasvesikelproteinen gesucht, die in der Lage sind, den inhibitorischen Effekt großer Mengen von GvpM zu kompensieren. Dazu wurden Transformanten hergestellt, die neben der p-vac Region ein pGM^{ex}-, pHM^{ex}-, pJM^{ex}- oder pLM^{ex}-Konstrukt enthielten. Die gemeinsame Expression der beiden Leserahmen in pJAS35 sollte zeigen, welche der getesteten Gasvesikelproteine die hemmende Wirkung von GvpM aufheben kann. Zur Herstellung dieser Konstrukte wurden die *gvpG*-, *gvpH*- und *gvpJ*-Leserahmen mittels PCR amplifiziert (p-vac als Matrize) und gleichzeitig Schnittstellen für *Pst*I (5') und *Nco*I (3') eingefügt. Die PCR-

Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in das mit *Pst*I und *Nco*I linearisierte pM^{ex}-Konstrukt eingefügt. Das pLM^{ex}-Konstrukt war bereits vorhanden.

Die Transformanten wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von Gasvesikeln phänotypisch und mikroskopisch untersucht (Abb. 8).

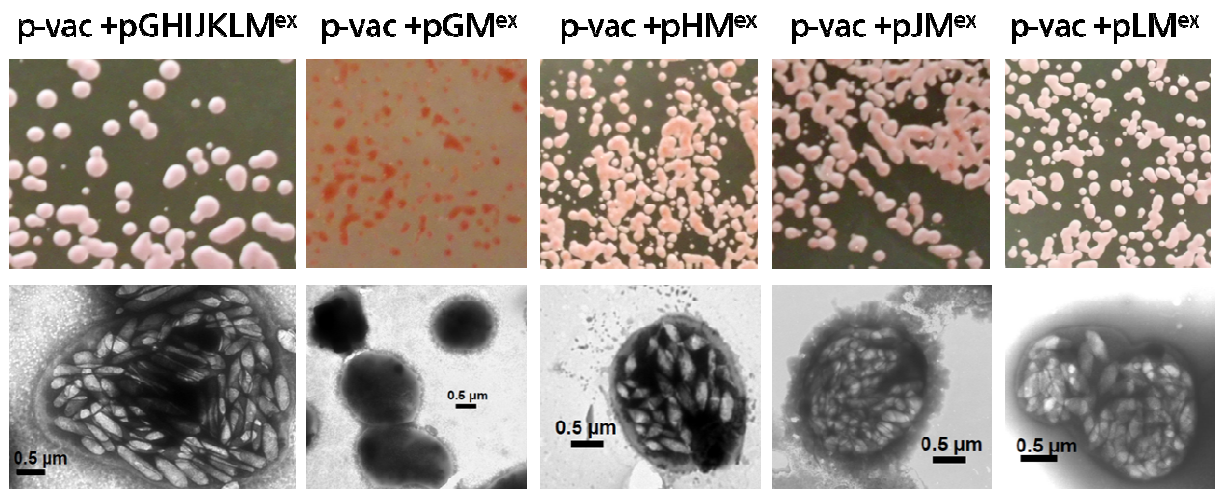


Abb. 8: Einfluss von überproduzierten Gasvesikelproteinen in p-vac + pGHIJKLM^{ex} und p-vac + pXM^{ex}-Transformanten. Oben gezeigt sind Kolonien nach vierwöchiger Inkubation auf Festmedium. Unten gezeigt sind repräsentative TEM-Aufnahmen der Zellen (nach Tavlaridou *et al.*, 2013).

Die p-vac + pGM^{ex}-Transformante zeigte einen Vac negativen Phänotyp und im TEM waren keine Gasvesikel-bildenden Zellen sichtbar (Abb. 8). Größere Mengen von GvpG können offenbar nicht den negativen Effekt von größeren Mengen von GvpM kompensieren und umgekehrt kann GvpM auch nicht den inhibitorischen Effekt großer GvpG-Mengen auf die Gasvesikelbildung kompensieren. Dagegen waren Transformanten mit p-vac + pHM^{ex}, +pJM^{ex} oder +pLM^{ex} Vac positiv und die Zellen enthielten Gasvesikel in vergleichbarer Menge und Größe wie in p-vac-Transformanten (Abb. 8). Die Proteine GvpH, GvpJ oder GvpL sind demnach in der Lage den inhibitorischen Effekt von größeren GvpM-Mengen zu kompensieren, wenn sie in vergleichbarer Menge vorhanden sind. Bemerkenswert ist, dass p-vac + pH^{ex}- und p-vac + pM^{ex}-Transformanten beide Vac negativ sind, während die p-vac + pHM^{ex}-Transformante Vac positiv ist. GvpH und GvpM scheinen ihren inhibitorischen Effekt gegenseitig kompensieren zu können.

4.2.2. Nachweis überproduzierter Gasvesikelproteine in pXM^{ex}-Transformanten

Über Western-Analysen wurde geprüft, ob die Proteine GvpG, GvpH, GvpJ, GvpL und GvpM in entsprechenden pXM^{ex} und p-vac + pXM^{ex}-Transformanten vorhanden sind. Hierfür wurden wiederum Zelllysate aus Zellen der spät-exponentiellen Wachstumsphase hergestellt und durch mehrfaches Zentrifugieren in 2 Fraktionen aufgeteilt. Fraktion 1 enthielt vor allem lösliche Proteine und Fraktion 2 Proteinaggregate, sowie membran-assoziierte Proteine. Die Western-Analysen wurden jeweils mit beiden Fraktionen durchgeführt, zeigten aber sehr ähnliche Resultate, weshalb in Abbildung 9, repräsentativ für alle Analysen, nur das Ergebnis mit Fraktion 2 der pXM^{ex}-Transformanten gezeigt ist. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Western-Analysen aller Transformanten aufgeführt.

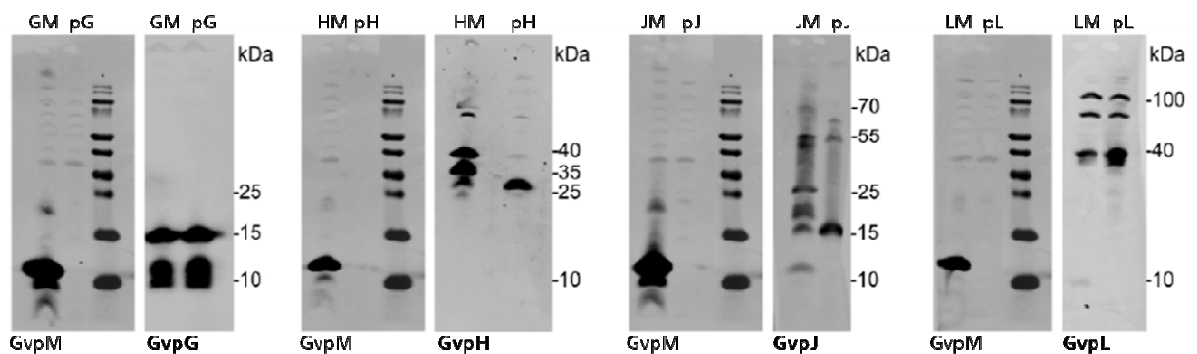


Abb. 9: Western Analyse zum Nachweis von Gasvesikelproteinen in pX^{ex}- (pX) und pXM^{ex} (XM)-Transformanten. X= GvpG, H, J or L. Jeweils 20 µg Gesamtprotein von Fraktion 2 wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Darunter ist der jeweils verwendete Antikörper angegeben. Zur Detektion wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye 800 CE gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert. Rechts markiert sind die Proteingrößen in kDa (nach Tavlaridou *et al.*, 2013).

In jeder pX^{ex}- und pXM^{ex}-Transformante konnte wie erwartet eine entsprechend große Menge von GvpG, H, J, L oder M detektiert werden (Abb. 9). Das Bandenmuster von GvpG in pGM^{ex} entsprach dem Muster in pG^{ex}. Ebenso verhielt es sich bei der pLM^{ex}- und der pL^{ex}-Transformante (Abb. 9). Die zusätzlichen Banden bei ca. 70 und 100 kDa zeigten sich auch im Zelllysate von untransformierten *Hfx. volcanii*-Zellen und sind demnach auf eine unspezifische Bindung des GvpL-Antiserums zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurden bei GvpH und GvpJ in Gegenwart von GvpM (pHM^{ex} und pJM^{ex}) zusätzliche Banden sichtbar, welche bei den pH^{ex} und den pJ^{ex}-Transformanten, die das jeweilige Protein einzeln produzieren, nicht detektiert werden konnten (Abb. 9). Dies deutet darauf hin, dass GvpH+GvpM und GvpJ+GvpM miteinander interagieren. Jedoch konnten diese zusätzlichen Banden bei Verwendung des GvpM-Antiserums nicht detektiert werden (Abb. 9). Zur

genaueren Analyse der Interaktion und Aggregation dieser Proteine sind deshalb weitere Versuche notwendig.

Tabelle 3: Western-Analysen der pXM^{ex}- und p-vac +pXM^{ex}-Transformanten

| Transformante | Western-Analyse | | | | Bemerkungen |
|--------------------------|-----------------|--------|------------|---------|---------------------------------------|
| | Fraktion 1 | | Fraktion 2 | | |
| pGM ^{ex} | GvpG:+ | GvpM:+ | GvpG:+ | GvpM:+ | - |
| pHM ^{ex} | GvpH:+ | GvpM:+ | GvpH:+ | GvpM:+ | zusätzliche Banden mit GvpH-Antiserum |
| pJM ^{ex} | GvpJ: + | GvpM:+ | GvpJ: + | GvpM: + | zusätzliche Banden mit GvpJ-Antiserum |
| pLM ^{ex} | GvpL: + | GvpM:+ | GvpL: + | GvpM:+ | - |
| p-vac +pGM ^{ex} | GvpG: + | GvpM:+ | GvpG: + | GvpM:+ | - |
| p-vac +pHM ^{ex} | GvpH: + | GvpM:+ | GvpH: + | GvpM:+ | zusätzliche Banden mit GvpH-Antiserum |
| p-vac +pJM ^{ex} | GvpJ: + | GvpM:+ | GvpJ: + | GvpM:+ | zusätzliche Banden mit GvpJ-Antiserum |
| p-vac +pLM ^{ex} | GvpL: + | GvpM:+ | GvpL: + | GvpM:+ | - |

+ = Protein detektierbar

4.3. *In vitro* Interaktionsstudien von GvpM mit verschiedenen Gasvesikelproteinen

In den bislang beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *gvpM* in p-vac-Transformanten zu einer Reduktion der Gasvesikelbildung führt (s. Abschnitt 4.1.1). Durch gleichzeitige Überexpression von *gvpH*, *gvpJ* oder *gvpL* mit *gvpM* gewinnen entsprechende Transformanten ihre Fähigkeit zur Gasvesikelbildung wieder (s. Abschnitt 4.2.1). Das lässt auf eine Interaktion dieser drei Proteine mit GvpM schließen, wodurch die negative Wirkung großer Mengen von GvpM aufgehoben wird. Durch vergleichende Western-Analysen mit pXM^{ex} und pX^{ex}-Transformanten konnten im Fall von GvpH und GvpJ zusätzliche Proteinbanden detektiert werden, was die Hypothese einer GvpH-GvpM- bzw. GvpJ-GvpM-Interaktion unterstützt (s. Abschnitt 4.2.2). Im folgenden Experiment wurde versucht die Interaktion dieser Proteine *in vitro* nachzuweisen. Zunächst wurde dies unter nativen Bedingungen mittels Gelpermeationschromatographie versucht. Zelllysate von pJM^{ex}- und pHM^{ex}-*Hfx. volcanii*-Transformanten wurden über eine Gelfiltrationssäule aufgetragen und der Zeitpunkt der Elution von GvpJ und GvpH mit einem Zelllysate von pH^{ex} bzw. pJ^{ex}-Transformanten verglichen. Dies scheiterte jedoch, da mit den pXM^{ex}-Konstrukten keine ausreichend hohen Proteinmengen erzielt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde der Interaktionsnachweis über Ni-NTA-Affinitätschromatographie *in vitro* durchgeführt. Hierfür wurde GvpM mit einem N-terminalen His-tag in *E. coli* BL21 produziert. Die Reinigung des rekombinant produzierten GvpM_{His}-Proteins erfolgte über Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff. Um das GvpM_{His} wieder in seine native, unter Hochsalzbedingungen vorliegende, Konformation zu überführen, wurde eine schrittweise Dialyse mit steigender KCl- und sinkender Harnstoffkonzentration durchgeführt. Hierbei wurde als Endkonzentration 2,5 M KCl verwendet (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Für die Herstellung von Affinitätsmatrices für Interaktionsstudien wurde das mittels Dialyse rückgefaltete GvpM_{His} an Ni-NTA-Agarose gebunden und mit den löslichen Proteinfractionen der Zellysate aus *Hfx. volcanii*-Transformanten inkubiert. Die Transformanten exprimierten die putativen Interaktionspartner GvpH, J, L oder GvpG unter Kontrolle von P_{fdx} in pJAS35. Nach mehrfachem Waschen der Matrices erfolgte die Elution des GvpM_{His} mit dem eventuell gebundenen Interaktionspartner. Die letzte Waschfraktion und die beiden Elutionsfraktionen wurden auf 12%-igen SDS-Gelen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem Antiserum des putativen Interaktionspartners inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine unbeladene Ni-NTA-Matrix mit dem jeweiligen Zellysat inkubiert (Abb. 10).

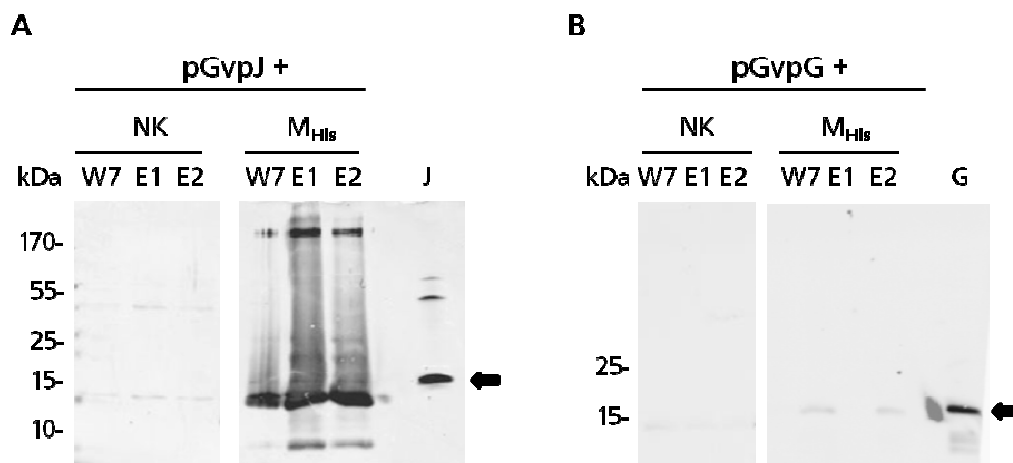


Abb. 10: Western-Analyse der Elutionsfraktionen von Affinitätschromatographien von **(A)** GvpJ und **(B)** GvpG mit GvpM_{His}-Matrices. Es wurden jeweils auch die entsprechenden Fraktionen der Negativkontrolle (Inkubation eines GvpJ- oder GvpG-Lysats mit einer unbeladenen Ni-NTA-Matrix, mit NK gekennzeichnet) aufgetragen. Es wurden jeweils 15 µl der Elutionsfraktionen (E1, E2) und der letzten Waschfraktion (W7) aufgetragen. Als Ladekontrolle (J oder G) wurden je 10 µg lösliches Protein der unterschiedlichen Zellysate aufgetragen. Die Proben wurden über ein 12%iges SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem jeweiligen Gvp-Antiserum inkubiert. Zur Detektion wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye 800 CE gekoppelter, sekundärer Antikörper verwendet. Pfeile markieren die Position des GvpJ- bzw. GvpG-Monomers. Die molaren Massen des Proteingrößenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert.

Für GvpJ konnte eine spezifische Interaktion mit GvpM nachgewiesen werden (Abb. 10A). In beiden Elutionsfraktionen, sowie in der Waschfraktion konnten zwei Banden in Höhe von ca. 200 kDa und 12 kDa (GvpJ-Monomer) detektiert werden. Außerdem war in E1 und E2 noch ein "Schmier" zwischen diesen Banden zu erkennen, sowie ein Signal bei ca. 9 kDa in Höhe des GvpM_{His}-Proteins (Abb. 10A). Dieses Signal könnte durch eine unspezifische Bindung des Antikörpers, aufgrund der großen Ähnlichkeit von GvpJ und GvpM oder aber der großen Proteinmenge an dieser Stelle (verursacht durch die Elution von GvpM_{His}, zustande gekommen sein. Eine Interaktion von GvpJ mit der unbeladenen Kontrollmatrix erfolgte nicht (Abb. 10A). Bei der Ladekontrolle (J) konnte nur das GvpJ-Monomer sowie eine schwache, ca. 45 kDa große Multimerbande detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass es bei der Interaktion von GvpJ und GvpM zu einer starken Aggregation von GvpJ kommt, welche auch durch die Zugabe von SDS nicht vollständig aufgelöst wird.

Für GvpG konnte keine spezifische Interaktion mit GvpM nachgewiesen werden (Abb. 10B). In allen untersuchten Fraktionen konnte kein GvpG-Signal detektiert werden. Eine Interaktion von GvpG mit der unbeladenen Kontrollmatrix erfolgte ebenfalls nicht.

Die Interaktion von GvpM_{His} mit GvpL und GvpH zeigte in beiden Fällen keine spezifische Interaktion der beiden Proteine mit GvpM (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis widersprach den Erwartungen, da bei der Analyse von p-vac +pHM^{ex}- und p-vac +pLM^{ex}-Transformanten der negative Effekt von GvpM auf die Gasvesikelbildung durch GvpH und GvpL kompensiert wird (s. Abschnitt 4.2.1), was eine Interaktion dieser Proteine mit GvpM impliziert. Weiterhin konnten in Western-Analysen bei der pHM^{ex}-Transformante zusätzliche GvpH-Banden detektiert werden (s. Abschnitt 4.2.2). Daher wurde das Interaktionsexperiment erneut durchgeführt, wobei in diesem Fall rekombinant produziertes und rückgefaltetes GvpH_{His} bzw. GvpL_{His} als His-*tag*-Protein an die Affinitätssäule gebunden und mit einem löslichen GvpM-Zellysate inkubiert wurde. Auch in diesem Fall wurden je 15 µl der letzten Waschfraktion und der beiden Elutionsfraktionen auf 12%igen SDS-Gelen aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem GvpM-Antiserum inkubiert (Abb. 11). Als Negativkontrolle wurde eine unbeladene Ni-NTA-Matrix mit dem GvpM-Zellysate inkubiert (NK).

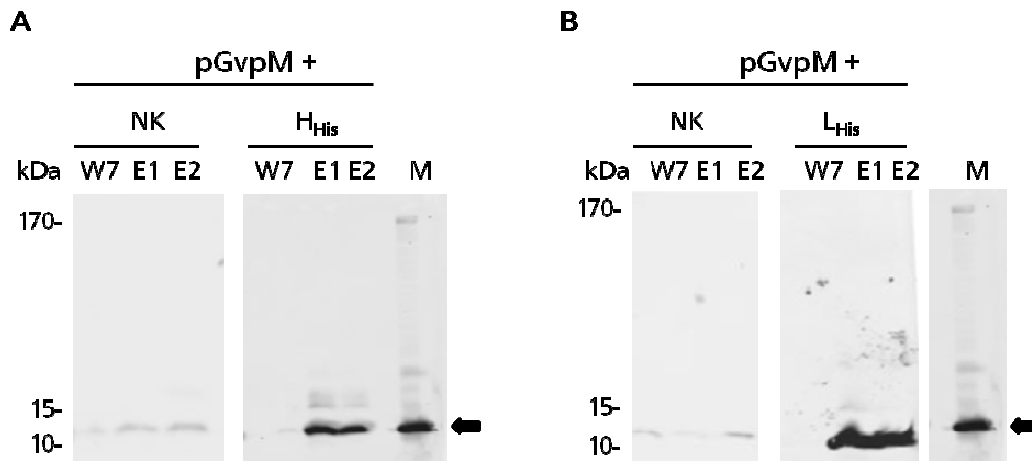


Abb. 11: Western-Analyse der Elutionsfraktionen von Affinitätschromatographien von GvpM mit **(A)** GvpH_{His}- bzw. **(B)** GvpL_{His}-Matrices. Es wurden jeweils auch die entsprechenden Fraktionen der Negativkontrolle (Inkubation eines GvpM-Lysats mit einer unbeladenen Ni-NTA-Matrix, mit NK gekennzeichnet) aufgetragen. Es wurden jeweils 15 μ l der Elutionsfraktionen (E1, E2) und der letzten Waschfraktion (W7) aufgetragen. Als Ladekontrolle (M) wurden je 10 μ g lösliches Protein des GvpM-Lysats aufgetragen. Die Proben wurden über ein 12%iges SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem GvpM-Antiserum inkubiert. Zur Detektion wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye 800 CE gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Pfeile markieren die Position des GvpM-Monomers. Die molaren Massen des Proteingrößenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert.

Für GvpM konnte eine spezifische Interaktion mit GvpH_{His} und GvpL_{His} nachgewiesen werden (Abb. 11). In den jeweiligen Elutionsfraktionen wurde ein Signal in Höhe des GvpM-Monomers detektiert (9 kDa). Auch bei der unbeladenen Säule konnte eine schwache Interaktion mit GvpM detektiert werden, jedoch war dieses Signal wesentlich weniger stark, als bei der mit dem His-*tag*-Protein beladenen Säule.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Interaktion von GvpM_{His} und GvpJ sowie GvpM mit an die Affinitätssäule gebundenem GvpH_{His} bzw. GvpL_{His} nachgewiesen werden konnte. Bindet man dagegen GvpM als His-*tag*-Protein an die Affinitätssäule, so ist eine Interaktion mit GvpH bzw. GvpL in beiden Fällen nicht nachweisbar.

4.4. *In vivo* Analysen mit Gvp-GFP Fusionsproteinen

Um verschiedene akzessorische Gasvesikelproteine *in vivo* zu lokalisieren und mögliche Proteinaggregationen zu detektieren, wurden GvpG, GvpH, GvpJ, GvpL und GvpM mit einer an Hochsalzbedingungen adaptierten Variante des GFP fusioniert (Reuter & Maupin-Furlow, 2004). Die Fusion erfolgte am C-Terminus des jeweiligen Gasvesikelproteins, getrennt durch einen 5x Alanin-Linker. Das pM_{gfp}^{ex} -Konstrukt lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor (Pfeifer & Satorius-Neef, nicht publiziert). Zur Herstellung der gvp_{gfp} -Konstrukte wurde zunächst der *gfp*-Leserahmen aus pJAM1020 (Maupin & Furlow, 2004) über PCR amplifiziert und dabei 2 Codons für Alanin, sowie eine *NotI*-Erkennungssequenz am 5'-Ende und eine *XbaI*-Erkennungssequenz am 3'-Ende eingefügt. Das PCR-Produkt wurde über diese Schnittstellen in pBSK+ inseriert. Der jeweilige *gvp*-Leserahmen wurde ebenfalls über PCR amplifiziert, wobei das p-vac-pWL102-Konstrukt (Offner *et al.*, 2000) als Matrize verwendet wurde. Mittels entsprechender Primer wurde dabei jeweils eine *SacI*-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *NotI*-Schnittstelle am 3'-Ende eingefügt sowie das Stopcodon entfernt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in den *gfp*-pBSK+-Vektor inseriert. Diese Inserierung führte zu einer Fusion mit dem *gfp*-Leserahmen, getrennt von einem aus 5 Alanin-Codons bestehenden Linker. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels DNA-Sequenzanalysen überprüft. In einer weiteren PCR wurde der jeweilige gvp_{gfp} -Leserahmen amplifiziert und dabei Schnittstellen für *PstI* (5'-Ende) und *Acc651* (3'-Ende) eingefügt. Über diese Schnittstellen erfolgte die Klonierung in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35.

Im Fall von GvpG_{GFP} und GvpJ_{GFP} konnte leider keine Fluoreszenz in entsprechenden Transformanten detektiert werden. Daher wurde hier auch eine N-terminale Fusion des GFP an GvpJ und GvpG (*gfp*-5x Ala-*gvp*) sowie eine C-terminale Fusion mit einem abgewandelten Linker (Ala-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly) getestet. Keine der Varianten erzeugte ein fluoreszierendes Gvp_{GFP}-Protein (Daten nicht gezeigt). Im Fall von GvpM wurde ebenfalls die N-terminale Fusion von GFP an GvpM getestet, um die Fluoreszenzstärke des Fusionsproteins zu erhöhen. Bei diesem _{GFP}GvpM-Protein konnte jedoch ebenfalls keine Fluoreszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die entsprechenden pX_{gfp}^{ex} -Konstrukte (pM_{gfp}^{ex} , pH_{gfp}^{ex} , pL_{gfp}^{ex}) wurden durch den *dam* *E.coli*-Stamm GM1674 passagiert und in *Hfx. volcanii* in An- und Abwesenheit der p-vac Region transformiert. Als Positivkontrolle wurde das GFP^{ex}-Konstrukt (Leserahmen des unfusionierten *gfp* aus pJAM1020) verwendet und als Negativkontrolle untransformierte *Hfx. volcanii*-Zellen. Die Anwesenheit der korrekten Plasmide wurde über Plasmidisolierung und anschließende Restriktionskontrolle mit *PstI* und *Acc651* kontrolliert. Das daraus resultierende

Fragmentmuster zeigte, dass jede Transformante die gewünschten Plasmide enthielt (Abb. 12).

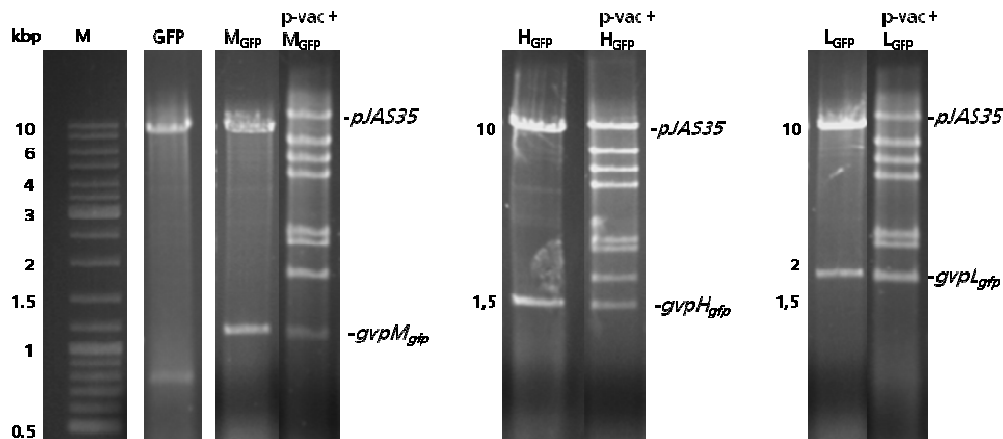


Abb. 12: Restriktionsanalyse mit isolierten Plasmiden aus den *Hfx. volcanii*-Transformanten. Die Plasmide wurden mit *Pst*I und *Acc*651 hydrolysiert und die entstandenen Fragmente auf 1%igen TAE-Agarosegelen aufgetrennt. Erwartet wurden Fragmentgrößen von 10 kbp (p/AS35-Vektor), sowie die jeweilige Bande des *gvpX_{gfp}* bzw. des *gfp*-Fragments (*gvpM_{gfp}*: 996 bp; *gvpH_{gfp}*: 1290 bp; *gvpL_{gfp}*: 1587 bp; *gfp*: 717 bp). Die zusätzlichen Fragmente bei p-vac +X_{GFP} kommen durch die Hydrolyse des p-vac x pWL102-Konstrukts zustande. Bei p-vac +L_{GFP} überlagern sich die L_{GFP}-Bande (1587 bp) und das kleinste Fragment des p-vac x pWL102-Konstrukts (1606 bp). M= Marker. Links angezeigt sind die Fragmentgrößen in kbp.

Alle Zellen wurden sowohl in Flüssigkultur als auch auf Festmedium kultiviert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bei Zellen mit GFP^{ex} (GFP) konnte ein starkes Fluoreszenzsignal detektiert werden, welches sich auf die gesamte Zelle erstreckte (Abb. 13).

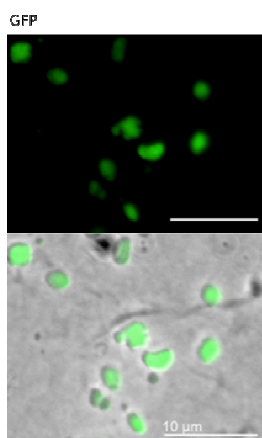


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Hfx. volcanii*-Zellen, die mit dem GFP^{ex}-Konstrukt transformiert wurden. Oben ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zu sehen und unten die Überlagerung der Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme.

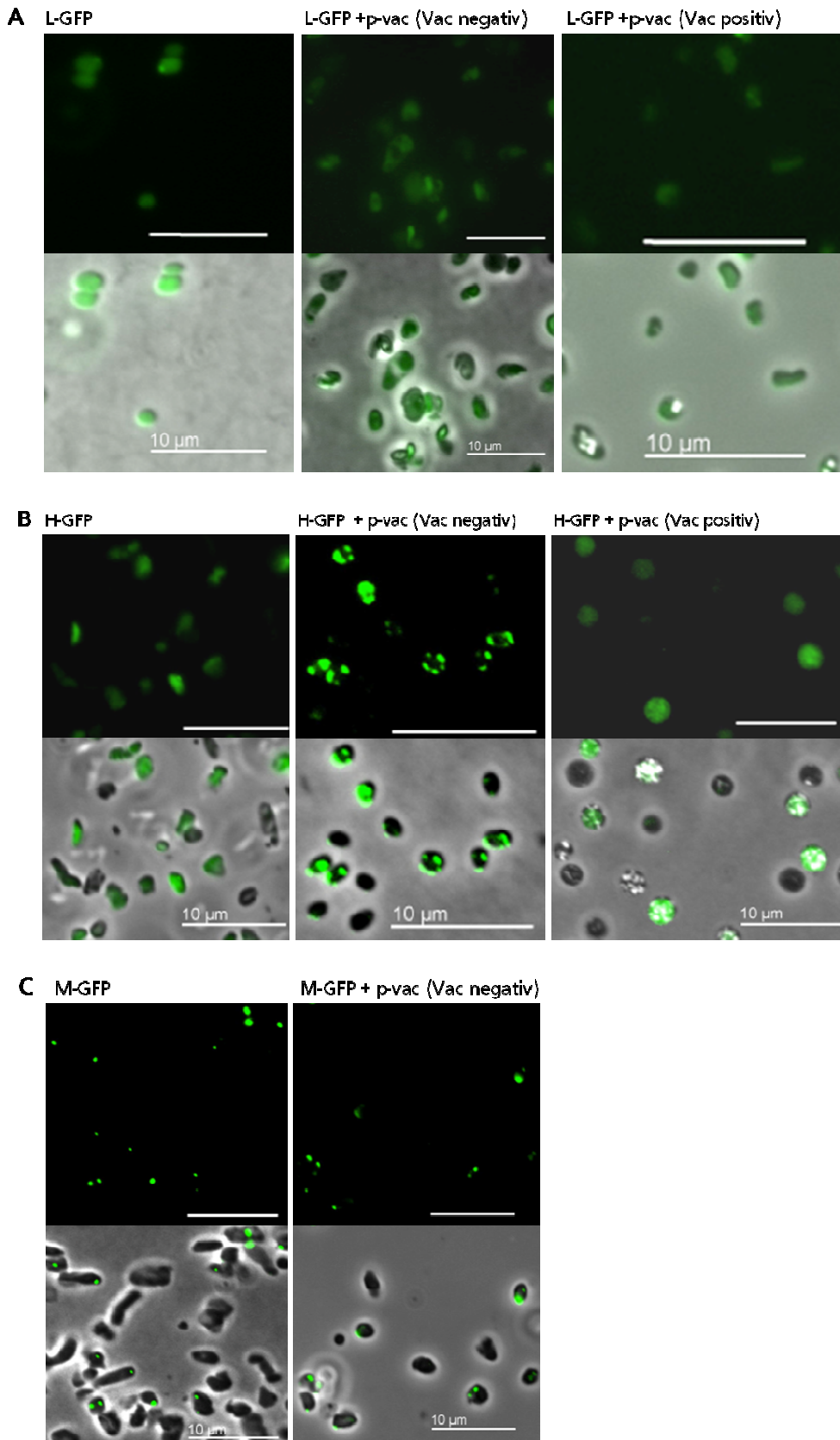


Abb. 14: Mikroskopische Bilder von *Hfx. volcanii*-Transformanten. Fluoreszenzaufnahmen sind oben und eine Überlagerung der Fluoreszenz- und der Durchlichtaufnahme ist unten gezeigt. **(A)** L-GFP-Transformanten (mit p-vac Mitte und rechts) **(B)** H-GFP-Transformanten (mit p-vac Mitte und rechts) **(C)** M-GFP-Transformanten (mit p-vac rechts). Bei L-GFP +p-vac und H-GFP +p-vac sind jeweils Vac negative (Mitte) und Vac positive (rechts) Zellen gezeigt, die aber denselben Genotyp aufweisen.

Bei pL_{gfp}^{ex} (L-GFP)-Transformanten fluoreszierte die gesamte Zelle (Abb. 14A links). Eine verteilte Fluoreszenz wurde auch in den wenigen Vac negativen Zellen von $p-vac + pL_{gfp}^{ex}$ -Transformanten beobachtet (Abb. 14A Mitte). In den Vac positiven Zellen dieser Transformante war das Fluoreszenzsignal nur sehr schwach und ebenfalls in der Zelle verteilt (Abb. 14A rechts).

Bei pH_{gfp}^{ex} (H-GFP)-Transformanten war das Fluoreszenzsignal auf die gesamte Zelle verteilt (Abb. 14B links). Entgegen den Erwartungen waren ca. 96% der Zellen der $p-vac + pH_{gfp}^{ex}$ -Transformante Vac positiv, im Gegensatz zur $p-vac + pH^{ex}$ -Transformante, wo ca. 80-90% der Zellen einen Vac negativen Phänotyp haben (Abschnitt 4.1.1). Die C-terminale Fusion von GvpH mit GFP scheint also den negativen Effekt großer Mengen von GvpH zu kompensieren. Bei den Zellen ohne Gasvesikel waren bei der $p-vac + pH_{gfp}^{ex}$ -Transformante intrazellulär fluoreszierende Punkte erkennbar, was eine Aggregation von $GvpH_{GFP}$ impliziert, obwohl GvpH ein lösliches Protein ist (Abb. 14B Mitte). In Vac positiven Zellen dieser Transformante war das Fluoreszenzsignal dagegen verteilt (Abb. 14B rechts). Eine Erklärung für die fluoreszierenden Punkte in den Vac-negativen Zellen von $p-vac + pH_{gfp}^{ex}$ könnte eine Interaktion von $GvpH_{GFP}$ mit anderen aggregierenden Gasvesikelproteinen sein, die durch Expression der $p-vac$ Region produziert werden. Diese Aggregation von GvpH mit anderen Gasvesikelproteinen könnte der Grund sein, dass in diesen Zellen keine Gasvesikel gebildet werden. Es wäre möglich, dass das C-terminale Ende von GvpH bei dieser Interaktion eine Rolle spielt, weshalb $p-vac + pH_{gfp}^{ex}$ -Transformanten einen Vac positiven und $p-vac + pH^{ex}$ -Transformanten einen Vac negativen Phänotyp aufweisen. Bei $p-vac + pH_{gfp}^{ex}$ - und $p-vac + pL_{gfp}^{ex}$ -Zellen mit Gasvesikeln war eine Lokalisierung des Fluoreszenzsignals am Gasvesikel nicht möglich, da hierfür keine ausreichend hohe Auflösung erzielt werden konnte.

Bei der Expression von pM_{gfp}^{ex} (M-GFP) waren fluoreszierende Punkte in den Zellen zu beobachten, was auf eine Aggregation von M_{GFP} in der Zelle hindeutet (Abb. 14C links). Die $p-vac + pM_{gfp}^{ex}$ -Transformanten waren Vac negativ und wiesen fluoreszierende Punkte in den Zellen auf, ähnlich wie bei der pM_{gfp}^{ex} -Transformante (Abb. 14C rechts). Diese waren, im Vergleich zu $p-vac + pH_{gfp}^{ex}$, jedoch kleiner. Die anscheinend hohe Tendenz von GvpM zur Aggregation wurde durch dieses Ergebnis nochmals bestätigt. Ebenfalls analysiert wurde die Fähigkeit von $GvpM_{GFP}$, $pvac\Delta M$ -Transformanten zu komplementieren ($p-vac\Delta M$ enthält alle Gasvesikelgene mit Ausnahme von *gvpM*; Offner *et al.*, 2000). Die $pvac\Delta M + pM_{gfp}^{ex}$ -Transformanten waren Vac negativ (Daten nicht gezeigt). Dagegen sind $pvac\Delta M + pM^{ex}$ -Transformanten Vac positiv (Offner *et al.*, 2000). Durch die Fusion mit GFP ist GvpM also nicht mehr in der Lage $pvac\Delta M$ -Transformanten zu komplementieren.

4.4.1. *In vivo* Analysen mit pXM_{gfp}^{ex}- und pX_{gfp}M^{ex}-Transformanten

Bei *in vivo* Analysen mit pM_{gfp}^{ex}- und p-vac +pM_{gfp}^{ex}-Transformanten wurde eine starke Aggregation von GvpM beobachtet (siehe Abschnitt 4.4). Diese Tendenz zur Aggregation könnte eine mögliche Erklärung für die inhibierte Gasvesikelbildung in p-vac +pM^{ex}-Transformanten sein (s. Abschnitt 4.1). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Proteine GvpJ, GvpH und GvpL der negative Effekt großer GvpM-Mengen auf die Gasvesikelbildung kompensiert wird, wenn diese in vergleichbar großer Menge produziert werden (s. Abschnitt 4.2). Möglicherweise sorgen GvpJ, GvpH und GvpL für eine Auflösung der GvpM-Aggregate, so dass monomerisches GvpM wieder zur Gasvesikelbildung genutzt werden kann. Am Beispiel von GvpH und GvpL sollte diese Hypothese überprüft werden, indem pHM^{ex} sowie pLM^{ex}-Transformanten *in vivo* mit GFP, als pXM_{gfp}^{ex}-Konstrukte, analysiert wurden. Zur Herstellung der benötigten Konstrukte wurde der *gvpM*-Leserahmen aus den pHM^{ex}-bzw. pLM^{ex}-Konstrukten mittels der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *Acc651* ausgeschnitten und der *gvpM_{gfp}*-Leserahmen über dieselben Schnittstellen eingefügt. Zuvor wurde über Mutagenese-PCR eine Deletion der *NcoI*-Schnittstelle im *gfp*-Leserahmen des pM_{gfp}-pBSK+-Konstrukts vorgenommen. Zum Vergleich wurde auch ein pX_{gfp}M^{ex}-Konstrukt hergestellt (X=H oder L). Hierfür wurde der *gvpH*-Leserahmen aus dem pHM^{ex}-Konstrukt über Hydrolyse mit *PstI* und *NcoI* ausgeschnitten und der *pH_{gfp}*- bzw. der *pL_{gfp}*-Leserahmen über diese Schnittstellen inseriert.

Die resultierenden pXM_{gfp}^{ex}- (X=H oder L) und pX_{gfp}M^{ex}- (X=H oder L) Konstrukte wurden in *Hfx. volcanii* in An- und Abwesenheit der p-vac-Region transformiert. Die p-vac +pXM_{gfp}^{ex}- und p-vac +pX_{gfp}M^{ex}-Transformanten wurden hinsichtlich ihrer Gasvesikelbildung untersucht. Dabei waren alle Transformanten Vac positiv (Daten nicht gezeigt). Die Fusion von GvpM mit GFP im pJAS35-Konstrukt scheint sich also nicht auf den Gasvesikelphänotyp der einzelnen Transformanten auszuwirken. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung erfolgte allerdings nur mit den pXM_{gfp}^{ex}- bzw. den pX_{gfp}M^{ex}-Transformanten, da bei diesen meistens ein stärkeres Fluoreszenzsignal als in Anwesenheit der p-vac Region detektiert werden konnte.

Um mögliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zu detektieren, wurden Zellysate der pXM_{gfp}^{ex}- bzw. der pX_{gfp}M^{ex}-Transformanten zunächst im Phosphor Imager vermessen, um so die Fluoreszenzintensität zu quantifizieren. Hierfür wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase auf eine OD₆₀₀ von 1,4 eingestellt. Die Zellyse erfolgte durch Inkubation in TED-Puffer für 1h. Als Kontrolle wurde das Zellysat der pM_{gfp}^{ex}-Transformante sowie von pH_{gfp}^{ex} bzw. pL_{gfp}^{ex} verwendet. Je 1 ml der Zellysate wurde in Mikrotiterplatten im Phosphor Imager vermessen und die Fluoreszenzemission mit dem Programm Image Gauge 4.23 (FujiFilm) visualisiert. Als Referenzwert wurde TE-Puffer verwendet. Die Fluoreszenz-

anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 473 nm. Zur Auswertung der Signale wurde ebenfalls die Software Image Gauge 4.23 verwendet. Über die Pixelintensität der jeweiligen Probe wird die Fluoreszenzintensität berechnet und in light absorbing units pro mm² (LAU/mm²) angegeben. Es wurden jeweils 3 Messungen durchgeführt. In Abb. 15 sind die aus den Messungen gebildeten Mittelwerte, sowie die dazugehörigen Standardabweichungen angegeben.

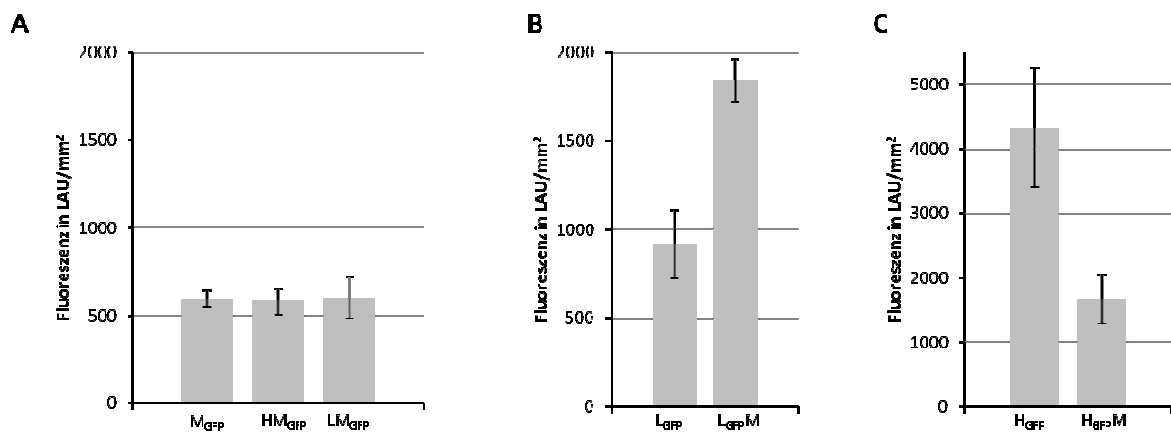


Abb. 15: Quantifizierung der GFP-Fluoreszenzstärke in pXM_{GFP} (A)- und pX_{GFP}M (B + C)-Transformanten. Die Fluoreszenz ist in "light absorbing units pro mm²" (LAU/mm²) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte (gebildet aus 3 Messungen von 3 verschiedenen Klonen) und die dazugehörige Standardabweichung.

Bei beiden pXM_{GFP}^{ex}-Transformanten wurden im Vergleich zur Kontrolle pM_{GFP}^{ex} ähnliche Fluoreszenzstärken gemessen (Abb. 15A). Dies deutet darauf hin, dass durch die zusätzliche Expression von GvpH oder GvpL die Fluoreszenzstärke von GvpM_{GFP} nicht beeinflusst wird. Die pL_{GFP}M^{ex}-Transformante zeigte dagegen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität als die Kontrolle pL_{GFP}^{ex} (Abb. 15B), die pH_{GFP}M^{ex}-Transformante dagegen eine deutlich niedrigere Fluoreszenzintensität als pH_{GFP}^{ex} (Abb. 15C). Beides deutet auf eine Interaktion zwischen GvpH_{GFP} und GvpM bzw. GvpL_{GFP} und GvpM hin, wodurch die Fluoreszenzstärke des jeweiligen Fusionsproteins beeinflusst wird.

Die genaue Analyse und Detektion möglicher Proteinaggregationen erfolgte über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transformanten (Abb. 16).

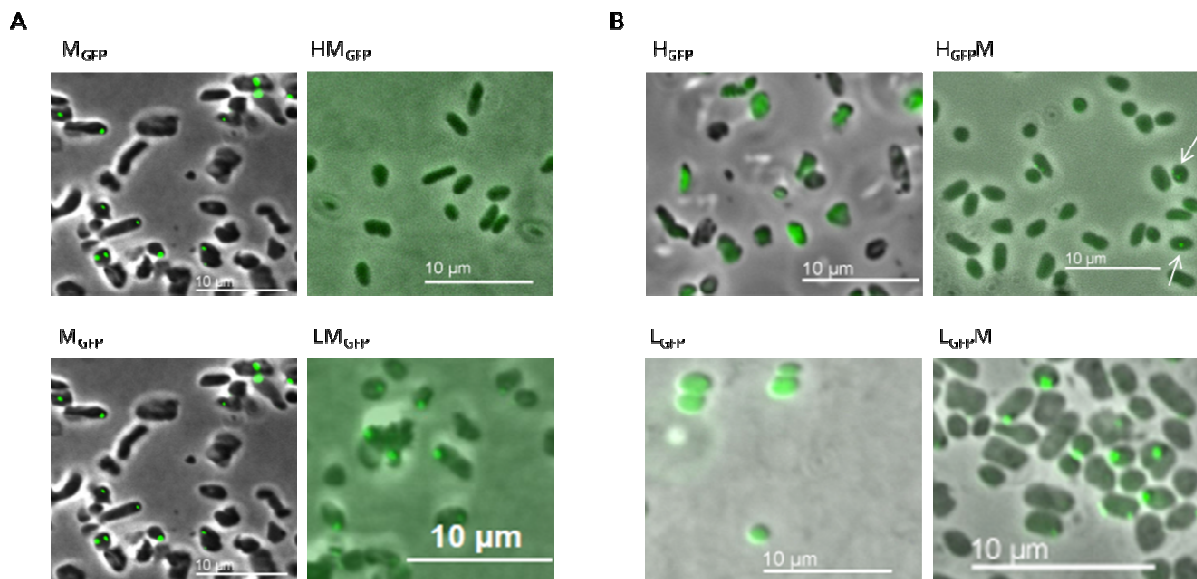


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Hfx. volcanii*-Transformanten. Zu sehen ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt der Überlagerung von Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme. **(A)** Rechts gezeigt ist die jeweilige pXM_{gfp}^{ex} -Transformante (XM_{GFP}). Als Vergleich ist links die pM_{gfp}^{ex} -Transformante (M_{GFP}) gezeigt. **(B)** Rechts gezeigt ist die jeweilige $pX_{gfp}M^{ex}$ -Transformante ($X_{GFP}M$). Als Vergleich ist links die pH_{gfp}^{ex} (H_{GFP})- bzw. die pL_{gfp}^{ex} (L_{GFP})-Transformante zu sehen. Die weißen Pfeile deuten auf fluoreszierende Punkte in $pH_{gfp}M^{ex}$ -Zellen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Analyse der pHM_{gfp}^{ex} - Transformante zeigte, dass bei gleichzeitiger Produktion von GvpH keine fluoreszierenden Punkte in den Zellen vorhanden sind. Die gesamte Zelle fluoresziert, jedoch war das Fluoreszenzsignal insgesamt sehr schwach (Abb. 16A oben). Dies deutet darauf hin, dass durch die Anwesenheit größerer Mengen an GvpH die Entstehung von GvpM_{GFP}-Aggregaten verhindert wird. Die vergleichende Analyse mit der $pH_{GFP}M^{ex}$ -Transformante konnte dieses Ergebnis bestätigen (Abb. 16B). Hier war das Fluoreszenzsignal ebenfalls in der Zelle verteilt, aber insgesamt sehr schwach, im Gegensatz zu pH_{gfp}^{ex} -Transformanten, bei denen ein starkes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. Die verringerte Fluoreszenzstärke deutet auf eine Interaktion von GvpH_{GFP} mit GvpM hin. In wenigen $pH_{gfp}M^{ex}$ -Zellen waren fluoreszierende Punkte zu sehen. Hierbei könnte es sich um GvpM-Aggregate handeln, an denen GvpH_{GFP} bindet. Möglicherweise kann GvpH durch die Fusion mit GFP die Entstehung von GvpM-Aggregaten weniger effektiv verhindern.

Die Zellen der pLM_{gfp}^{ex} -Transformante zeigten im gleichem Maße fluoreszierende Punkte, wie bei der Expression von pM_{gfp}^{ex} (Abb. 16A unten). Die M_{GFP} -Aggregate scheinen durch die Anwesenheit von GvpL also nicht aufgelöst zu werden und es scheint keine Interaktion zwischen GvpL und GvpM_{GFP} stattzufinden. Jedoch zeigten Zellen mit Expression von $pL_{gfp}M^{ex}$ ebenfalls fluoreszierende Punkte, was im Gegensatz zur Expression von pL_{gfp}^{ex} steht, da sich hier das Fluoreszenzsignal auf die gesamte Zelle verteilt. GvpL_{GFP} und GvpM scheinen also miteinander zu interagieren, was auch schon durch *in vitro* Interaktionsstudien mit

immobilisiertem GvpL_{His} mit einem GvpM-Zellysate nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 4.3). Allerdings scheinen bei dieser Interaktion die GvpM-Aggregate nicht aufgelöst zu werden.

4.5. Mutagenesestudien mit GvpM

Das 9 kDa große GvpM ist ein essentielles Protein bei der Gasvesikelbildung in *Hbt. salinarum* PHH1 (Offner *et al.*, 2000). Es wird in geringen Mengen, während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet, was vermuten lässt, dass es bei der Initiation der Gasvesikelbildung eine Rolle spielt. Die bisher in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen außerdem, dass große Mengen von GvpM zu einer starken Reduktion bzw. Inhibition der Gasvesikelbildung in p-vac-Transformanten führt (s. Abschnitt 4.1). Weiterhin wurde durch *in vivo* Analysen mit Gvp-GFP Fusionsproteinen bei GvpM eine starke Tendenz zur Aggregation festgestellt (s. Abschnitt 4.3). GvpM und GvpA, das Hauptstrukturprotein der Gasvesikelhülle, weisen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz auf. Zusammen mit GvpJ gehören sie zur GvpAJM-Gruppe homologer Gasvesikelproteine. Dabei ist die Sequenzähnlichkeit von GvpJ zu GvpA und GvpM aber größer als zwischen GvpM und GvpA. Es wird vermutet, dass es sich bei GvpM und auch GvpJ um weitere Gasvesikelstrukturproteine handelt, was bisher jedoch nicht eindeutig bestätigt werden konnte. Nach dem für GvpA ermittelten Strukturmodell bildet das Protein zwei α -Helices, welche getrennt durch zwei antiparallel angeordnete β -Faltblätter vorliegen (Strunk *et al.*, 2011). Die erste α -Helix wird nach diesem Modell von den Aminosäuren 9-19 gebildet und die zweite α -Helix von den Aminosäuren 48-67. Die dazwischen liegenden β -Faltblätter werden zum einen von den Aminosäuren 23-31 und zum anderen von den Aminosäuren 35-43 gebildet (Abb. 17 nach Strunk *et al.*, 2011). Für GvpM existiert bisher kein solches Strukturmodell, jedoch postulieren bioinformatisch ermittelte Sekundär-Strukturvorhersagen drei α -Helices, welche von den Aminosäuren 10-19, 41-56 und 63-73 gebildet werden (Abb. 17). Zwischen α -Helix I und α -Helix II werden β -Faltblattstrukturen vorausgesagt.

```
Model pA .....HHHHHHHHHHH...EEEEEEEE...EEEEEEEE...HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH.....
pA   MAQPSSLAELVDRVLDKGVVVDWRVSGIELLITERRVYASVTFHYEEIAKTEQALLAGAEAPEA
pJ   MSDEKPTRSOGDLAEMLEMLLDKGVVVDWRVSVGDTTELLGIELRAAIAAFETAEYGLFPTTDMERVESAAIISPQSDPASETQSETESTNPLSDDSTPTASTSAEETK
pM   M EPTKDEHAEVEFDVLLRDGAVLQADYVTVVDIPLGISLRAAIAGMTMTTEYGLFEEDWAAHRCSEAFITSPADRRD
Model pM .....HHHHHHHHHHH...EEEE...EEEE...EEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH.....
```

Abb. 17: Aminosäurealignment von pGvpA, pGvpJ und pGvpM und Vorhersagen über α -helicale- und β -Faltblatt-Bereiche bei pGvpA und pGvpM. Gelb markiert sind konservierte Aminosäuren in allen drei Sequenzen, grün markiert sind Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. Oben gezeigt ist ein Modell, welches die Sekundärstruktur für GvpA aufzeigt (nach Strunk *et al.*, 2011). Unten gezeigt ist ein Modell, welches die Sekundärstruktur für GvpM voraussagt (bioinformatisch ermittelt durch PSIPRED). H= α -Helix; E= β -Faltblatt

Im Folgenden sollten die Auswirkungen von Substitutionsmutanten und einer Deletionsmutante am akzessorischen Gasvesikelprotein GvpM auf die Bildung von Gasvesikeln untersucht werden. Dadurch sollten die funktionellen Bereiche des GvpM identifiziert werden. Außerdem könnte es möglich sein, Rückschlüsse über die Funktion des GvpM bei der Gasvesikelbildung zu ziehen.

In einer früheren Arbeit wurden bereits einige GvpM-Mutanten hergestellt und in $pvac\Delta M + pM_{Mut}$ -Transformanten untersucht (Bachelorarbeit Kerstin Winter, 2012). Dabei wurden gezielt Aminosäuren im Bereich der vorausgesagten α -Helix I, der α -Helix II sowie im Bereich zwischen α -Helix I und β -Faltblatt I substituiert. Hierbei wurden vor allem Aminosäuren gewählt, die im Vergleich zur GvpA-Sequenz konserviert sind, sowie Aminosäuren, die an der gleichen Position sitzen wie Aminosäuren in der GvpA-Sequenz und bei denen sich bei einer Substitution in GvpA ein starker Effekt auf die Gasvesikelbildung in entsprechenden Transformanten gezeigt hat. Außerdem wurden im N-terminalen Bereich des GvpM 10 bzw. 20 Aminosäuren und im C-terminalen Bereich 10 Aminosäuren deletiert.

Die Analysen zeigten, dass der N-terminale Bereich des GvpM wichtig für dessen Funktion ist. Die Deletion von 10 bzw. 20 Aminosäuren am N-Terminus führte zu Vac negativen Transformanten, während Transformanten mit einer Deletion von 10 Aminosäuren am C-Terminus des GvpM einen Vac positiven Phänotyp zeigten. Weiterhin inhibierte der Austausch einer hydrophoben Aminosäure zu einer geladenen Aminosäure an den Positionen 15 und 19, also in der vorhergesagten α -Helix I, die Gasvesikelbildung in entsprechenden Transformanten. Mutationen im Bereich der α -Helix II führten zu Transformanten mit stark reduzierter Gasvesikelbildung. Bei allen weiteren getesteten Mutationen zeigte sich kein Effekt auf die Gasvesikelbildung in entsprechenden Transformanten. Alle Mutationen hatten keine Veränderungen der Gasvesikelmorphologie zur Folge, was darauf hindeutet, dass GvpM nicht an der Formgebung der Gasvesikel beteiligt ist (Bachelorarbeit Winter, 2012).

In dieser Arbeit wurden weitere Mutationen im Bereich der α -Helix II (A48D, Y56A), dem β -Faltblatt I (A23D, V24D), in den dazwischen liegenden Bereichen (R20A/D21A, R20D/D21R, G22D, I36M) sowie am N-Terminus des Proteins ($\Delta 5N$) hergestellt und ihr Einfluss auf die Gasvesikelbildung in $pvac\Delta M + pM_{Mut}$ -Transformanten untersucht (Abb. 18).

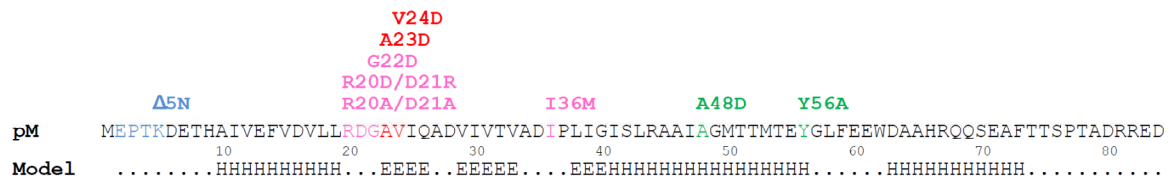


Abb. 18: Mutationen im GvpM, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Oben gezeigt ist die GvpM-Sequenz mit den farbig markierten Mutationen. blau= Deletion Δ5N; rot= Mutationen im β-Faltblatt I; violett= Mutationen zwischen α-Helix I und β-Faltblatt I bzw. zwischen β-Faltblatt II und III; grün= Mutationen in der α-Helix II. Unten gezeigt ist das Modell, welches die Sekundärstruktur für GvpM voraussagt (bioinformatisch ermittelt durch PSIPRED). H=α-Helix; E=β-Faltblatt

4.5.1. Einführen von Mutationen in den *gvpM*-Leserahmen über ortsspezifische Mutagenese-PCR

Die verschiedenen GvpM-Mutanten wurden über ortsspezifische Mutagenese hergestellt, wobei in der DNA-Sequenz gezielt einzelne Aminosäuren substituiert bzw. im Fall von Δ5N vier Aminosäuren deletiert wurden. Die hierfür verwendeten synthetischen Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgeführt. Als Matrize diente ein zuvor hergestelltes pM-WT-Konstrukt, welches über die Restriktionserkennungssequenzen *Pst*I und *Acc*651 inseriert in pBSK+ vorlag. Die so hergestellten Plasmide wurden alle durch DNA-Sequenzanalysen auf ihre Richtigkeit überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Klonierung der mutierten Sequenz in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 über *Pst*I und *Acc*651. Zur Analyse der Auswirkungen der einzelnen Mutationen in GvpM auf die Gasvesikelbildung wurde *Hfx. volcanii* WR340 mit dem pM_{Mut}^{ex}-Konstrukt und dem pvacΔM-pWL102-Konstrukt transformiert (Offner *et al.*, 2000). Als Negativkontrollen dienten sowohl untransformierte *Hfx. volcanii*-Zellen als auch Zellen, welche ausschließlich das pvacΔM-Konstrukt enthielten. Als Positivkontrolle wurde die Transformante pvacΔM + pM_{WT}^{ex} verwendet. Für den Nachweis der Plasmide und der Expression der gewünschten Gene wurden für Southern- bzw. Western-Analysen in der spät-exponentiellen Wachstumsphase Proben entnommen. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert, mit *Pst*I und *Acc*651 hydrolisiert und über eine Southern-Analyse mittels einer *gvpM*-spezifischen DIG-DNA-Sonde kontrolliert (Abb. 19).

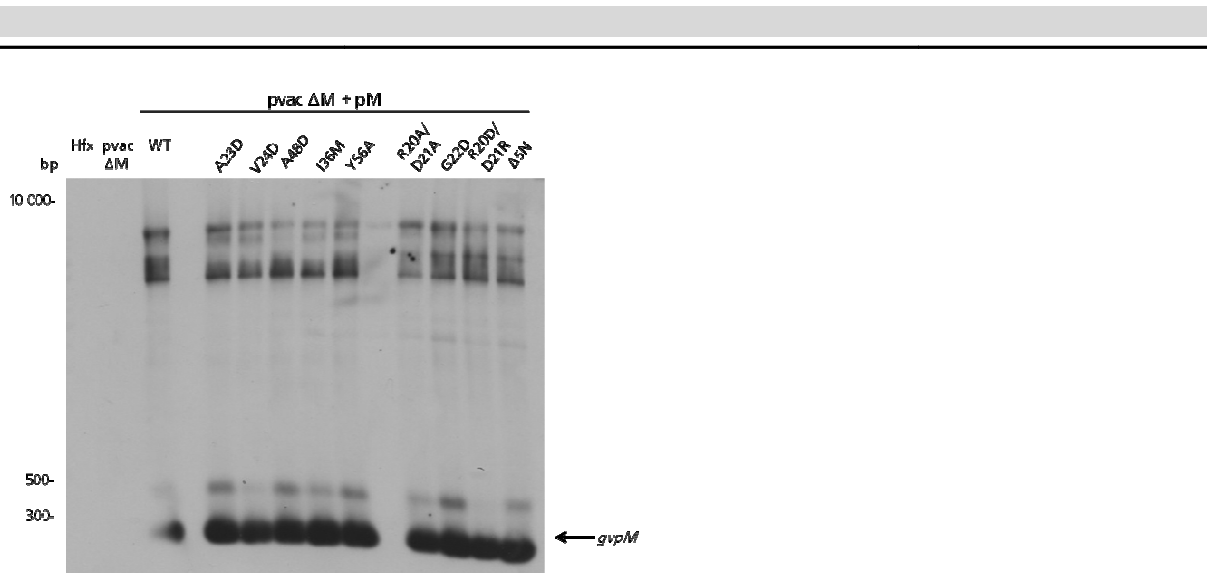


Abb. 19: Southern-Analyse zur Detektion des *gvpM*-Fragments in *pvacΔM + pM_{Mut}^{ex}*-Transformanten. Es wurden jeweils 500 ng Plasmid-DNA mit *PstI* und *Acc651* hydrolysiert, die Fragmente über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion des *gvpM*-Fragments erfolgte über eine gegen *gvpM* gerichtete DIG-DNA-Sonde. Der Film wurde 60 min exponiert. Hfx=untransformierte *Hfx. volcanii*-Zellen; WT=Wildtyp-*gvpM*

Bei allen *pvacΔM + pM_{Mut}^{ex}*-Transformanten konnte das *gvpM*-Fragment in der Größe von 265 bp nachgewiesen werden, ebenso bei der Positivkontrolle *pvacΔM + pM_{WT}^{ex}* (Abb. 19). Bei beiden Negativkontrollen wurde dieses Fragment wie erwartet nicht detektiert. Die Signale bei 10 kbp und 6 kbp sind auf eine unspezifische Bindung der Sonde zurückzuführen.

Über Western-Analysen sollte die Produktion des GvpM_{Mut} in den entsprechenden Transformanten überprüft werden. Hierfür wurden Zellysate aus je 50 ml Zellen aus der spät-exponentiellen Wachstumsphase hergestellt. Zur Detektion von GvpM wurde ein GvpM-spezifisches Antiserum verwendet (Abb. 20).

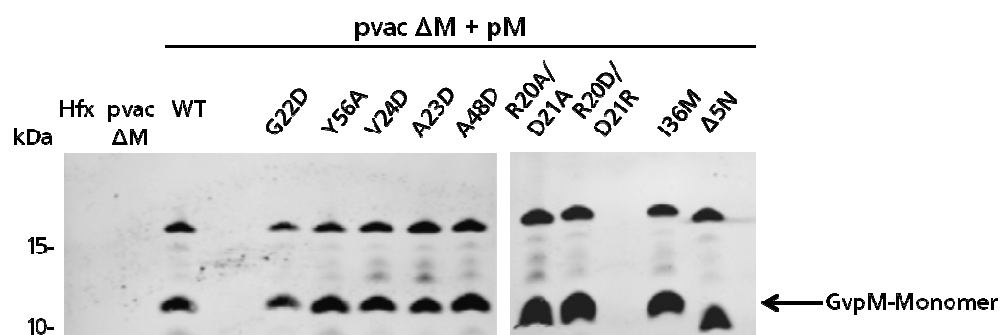


Abb. 20: Western-Analyse zum Nachweis des GvpM-Proteins in *Hfx. volcanii pvacΔM + pM_{Mut}^{ex}*-Transformanten. Jeweils 20 µg Gesamtprotein wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem GvpM-Antiserum. Zur Detektion wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye 800 CE gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert. Links angezeigt sind die Proteingrößen in kDa. Hfx=Zellysate von untransformierten *Hfx. volcanii*-Zellen; WT=Wildtyp-GvpM

Bei allen $pvac\Delta M + pM_{Mut}^{ex}$ -Transformanten und der Positivkontrolle konnte das GvpM-Monomer (9 kDa) detektiert werden sowie eine zweite Bande in Höhe von ca. 20 kDa (Abb. 20). Hierbei könnte es sich um das GvpM-Dimer handeln. In den beiden Negativkontrollen wurde wie erwartet keine GvpM-Bande detektiert. Durch die Western-Analyse konnte bestätigt werden, dass die verschiedenen Mutationen im GvpM keinen Einfluss auf die Produktion oder die Stabilität des Proteins haben.

4.5.2. Analyse der Gasvesikelbildung in $pvac\Delta M + pM_{Mut}^{ex}$ -Transformanten

Um den Einfluss der GvpM-Mutationen auf die Gasvesikelbildung in *Hfx. volcanii*-Transformanten zu ermitteln wurde zunächst der Phänotyp von Kolonien bestimmt. Anschließend wurden die Zellen im Phasenkontrastmikroskop (PKM) sowie durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht (Abb. 21). In Flüssigkultur gewachsene Transformanten, die auch für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens verwendet wurden (s. Abschnitt 4.5.1), wurden auf Nährböden ausgestrichen und bei 42°C in feuchter Atmosphäre für 3-5 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Nährböden bei Zimmertemperatur gelagert. Nach ca. 2 Wochen waren erste rosafarbene, gasvesikelbildene Kolonien erkennbar. Die finale Auswertung erfolgte aber erst nach vier Wochen Inkubation, um das Ergebnis bei Vac negativen Transformanten abzusichern (Abb. 21).

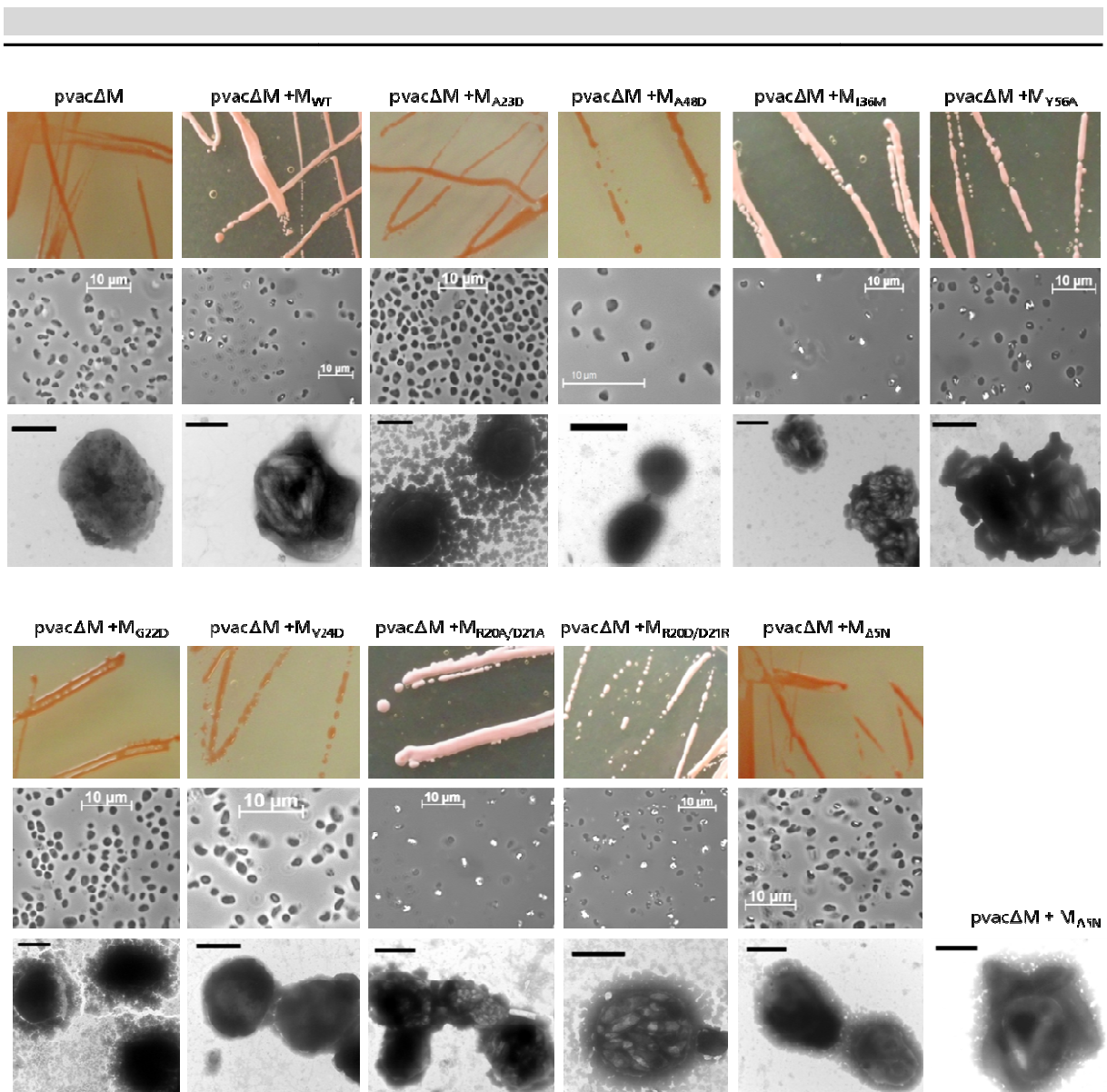


Abb. 21: Einfluss von Mutationen im GvpM auf die Gasvesikelbildung in *Hfx. volcanii*-Transformanten. Oben gezeigt sind Kolonien, welche 4 Wochen auf Nährböden gewachsen sind, in der Mitte phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Zellen und unten repräsentative TEM-Aufnahmen der Zellen. Als Negativkontrolle ist die *pvacΔM*- und als Positivkontrolle die *pvacΔM* + *pM_{WT}^{ex}*-Transformante gezeigt. Der Maßstabsbalken in den TEM-Aufnahmen entspricht 1 μm .

Die Zellen der Negativkontrolle *pvacΔM* waren wie erwartet rot und transparent, was auf das Fehlen von Gasvesikeln schließen lässt. Auch bei der mikroskopischen Analyse mittels PKM und TEM konnten keine Gasvesikel in den Zellen detektiert werden (Abb. 21 links oben). Zellen der Positivkontrolle *pvacΔM* + *pM_{WT}^{ex}* hatten einen Vac positiven Phänotyp, im PKM und im TEM konnten Zellen mit Gasvesikeln detektiert werden. Vac positive Zellen enthielten 30-50 Gasvesikel pro Zelle, mit ähnlichen Größen und Formen wie beim Wildtyp von *Hbt. salinarum* PHH1 gezeigt werden konnte (bis zu 0,5 μm lang). Die *p-vacΔM* + *pM_{Mut}^{ex}*-Transformanten mit den Mutationen I36M-, Y56A-, R20A/D21A- oder R20D/D21R in GvpM bildeten weißlich-rosa Kolonien, vergleichbar mit denen der Positivkontrolle (Abb. 21). Die

mikroskopische Analyse dieser Mutanten zeigte bei allen 80-90% gasvesikulierte Zellen, die in Form und Größe mit denen in der Positivkontrolle vergleichbar waren. Die jeweilige Substitution der Aminosäuren an dieser Position hat keine Auswirkung auf die Gasvesikelbildung. Die Transformanten mit den GvpM-Mutationen A23D, A48D, G22D, V24D und $\Delta 5N$ waren dagegen Vac negativ. Bei den Substitutionsmutanten wurden bei der mikroskopischen Analyse ausschließlich Zellen ohne Gasvesikel detektiert. Die Substitution der hydrophoben Aminosäuren zum negativ geladenen Aspartat an diesen Positionen, führt also zum Funktionsverlust von GvpM. Dagegen waren bei der $\Delta 5N$ -Mutante einige Zellen mit Gasvesikeln vorhanden. Die TEM-Analyse zeigte aber, dass diese Vac positiven Zellen nur ca. 2-3 Gasvesikel pro Zelle enthielten, welche bis zu 1,5 μm lang waren (Abb. 21). In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Analyse zur Gasvesikelbildung in $\text{pvac}\Delta\text{M} + \text{pM}_{\text{Mut}}^{\text{EX}}$ -Transformanten nochmals zusammengefasst.

Tabelle 4: Einfluss der verschiedenen Mutationen von GvpM auf die Gasvesikelbildung

| GvpM-Mutante | Sequenzbereich der Mutation* | Gasvesikelbildung (Phänotyp, PKM, TEM) |
|--------------|---|---|
| M-WT | - | Vac positiv, mit GV gefüllt, ca. 0,5 μm lang |
| I36M | zwischen β -Faltblatt I und II | Vac positiv, wie WT |
| Y56A | α -Helix II | Vac positiv, wie WT |
| R20A/D21A | zwischen α -Helix I und β -Faltblatt I | Vac positiv, wie WT |
| R20D/D21R | zwischen α -Helix I und β -Faltblatt I | Vac positiv, wie WT |
| A23D | β -Faltblatt I | Vac negativ, 100% ohne Gasvesikel |
| A48D | α -Helix II | Vac negativ, 100% ohne Gasvesikel |
| G22D | zwischen α -Helix I und β -Faltblatt I | Vac negativ, 100% ohne Gasvesikel |
| V24D | β -Faltblatt I | Vac negativ, 100% ohne Gasvesikel |
| $\Delta 5N$ | N-Terminus | Vac negativ, 10-15% der Zellen mit 2-3 Gasvesikeln, bis zu 1,5 μm lang |

* abgeleitet von Sekundärstrukturvorhersage, bioinformatisch ermittelt durch PSIPRED

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass vor allem hydrophobe Aminosäuren für die Funktion von GvpM entscheidend sind. Keine der getesteten Mutationen hatte eine Veränderung in der Gasvesikelmorphologie zur Folge, was darauf hindeutet, dass GvpM nicht an der Formgebung der Gasvesikel beteiligt ist.

5. Diskussion

Die Gasvesikelbildung in *Hbt. salinarum* PHH1 benötigt die Expression der Gene *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* (Englert *et al.*, 1992a). Die *gvpFGHIJKLM*-mRNA wird in der exponentiellen Wachstumsphase in geringen Mengen und vor dem Sichtbarwerden von Gasvesikelvorstrukturen transkribiert, was impliziert, dass alle bzw. viele dieser Genprodukte bei der Initiation der Gasvesikelbildung eine Rolle spielen (Englert *et al.*, 1992a). Von diesen akzessorischen Gasvesikelproteinen sind GvpF, G, J, K, L und M essentiell für die Gasvesikelbildung (Offner *et al.*, 2000). GvpJ und GvpM sind wie das Hauptstrukturprotein GvpA sehr hydrophobe Proteine und weisen Sequenzähnlichkeiten zu GvpA auf. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese Proteine ebenfalls einen Teil der Gasvesikelhülle bilden. Mit Ausnahme von GvpK konnten die GvpF-M-Proteine in geringen Mengen in isolierten Gasvesikeln nachgewiesen werden (Shukla & DasSarma, 2004; Chu *et al.*, 2011). Dennoch ist die genaue Funktion dieser Proteine bei der Gasvesikelbildung noch unklar.

In dieser Arbeit wurden die akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF-M der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 untersucht, um die Funktion dieser Proteine bei der Bildung der Gasvesikel näher zu beleuchten. Dazu wurde der Effekt einer Überproduktion eines einzelnen Gasvesikelproteins auf die Gasvesikelsynthese in p-vac +pX^{ex}-Transformanten getestet. Die Gasvesikelproteine wurden auch durch *in vivo* Analysen mittels Gvp-GFP Fusionsproteinen untersucht und die Interaktion verschiedener akzessorischer Gasvesikelproteine *in vitro* und *in vivo* getestet. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Effekt von Mutationen im GvpM auf die Bildung von Gasvesikeln analysiert, um Rückschlüsse über die Funktion von GvpM bei der Gasvesikelbildung ziehen zu können.

5.1. Erhöhte Mengen von GvpG, GvpH oder GvpM inhibieren die Gasvesikelbildung

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von GvpG, H oder M zu einer Inhibition der Gasvesikelbildung in p-vac +pX^{ex}-Transformanten führte, während erhöhte Mengen von GvpF, I, J, K oder L keinen Effekt hatten. Das Ungleichgewicht der GvpG-, GvpH- oder GvpM-Menge scheint die Bildung von Gasvesikeln, welche über die Expression der p-vac Region vermittelt wird, zu stören (Tabelle 5). Der Vac positive Phänotyp in der p-vac +pGHIJKLM^{ex}-Transformante unterstützt diese Vermutung. Ein geringer Anteil der p-vac +pM^{ex}-Zellen war Vac positiv, enthielt aber nur 2-5 extrem lange (bis 1,5 μm) Gasvesikel im Gegensatz zu p-vac-Transformanten, die 30-50 spindelförmige (bis 0,5 μm lange) Gasvesikel enthalten.

Auch die wenigen Vac positiven Zellen der p-vac +pH^{ex}-Transformante zeigten eine veränderte Gasvesikelmorphologie. Die Gasvesikel waren im Vergleich zu Wildtyp-Gasvesikeln

sehr klein und rundlich, was eine Störung des Gasvesikel-Wachstums vermuten lässt. Frühere Experimente haben gezeigt, dass die Deletion von GvpH zu instabilen Gasvesikeln führt, weshalb GvpH eine stabilisierende Funktion bei der Gasvesikelbildung zugesprochen wird (Offner *et al.*, 2000).

Bei p-vac +pG^{ex}, +pH^{ex} und +pM^{ex} wurde das GvpA-Protein und dessen Aggregate nachgewiesen. Die großen Mengen von GvpG, GvpH oder GvpM scheinen die GvpA-Synthese und die Multimerisierung oder Aggregation des Proteins also nicht zu verhindern.

Die Produktion der akzessorischen Gasvesikelproteine unter Kontrolle des Ferredoxin-Promotors in pJAS35 in pX^{ex}- und p-vac +pX^{ex}-Transformanten konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Dagegen werden die Proteine von der p-vac Region nur in geringer Menge gebildet. GvpG und GvpM zeigten kein Signal im Lysat von p-vac-Transformanten und GvpJ und GvpH nur ein sehr schwaches Signal. Wahrscheinlich ist, dass die durch die p-vac Region produzierte Menge dieser Proteine nur minimal ist und für GvpG und GvpM unter der Nachweisgrenze liegt. Möglich wäre aber auch, dass die Proteine zum Zeitpunkt der Probenentnahme schon weitgehend abgebaut waren oder in die Gasvesikelhülle eingebaut wurden.

Weiterhin wurde eine Multimerisierung bzw. Aggregation der hydrophoben Proteine GvpM und GvpJ beobachtet. Beide Proteine zeigen Sequenzähnlichkeiten zu GvpA. Western-Analysen zum Nachweis von GvpA zeigten eine starke Oligomerisierung dieses Proteins. Bei GvpJ und GvpM konnte ebenfalls eine Aggregation nachgewiesen werden, jedoch sehr viel schwächer als bei GvpA. Möglicherweise führt die Aggregation von großen Mengen GvpM mit sich selbst oder anderen, nur in geringer Menge vorhandenen, akzessorischen Gasvesikelproteinen zur Inhibition der Gasvesikelbildung in der p-vac +pM^{ex}-Transformante. Die wenigen, sehr großen Gasvesikel in einigen Zellen der p-vac +pM^{ex}-Transformante unterstützen diese Vermutung. Unter Umständen führen die großen GvpM-Mengen zu einer Multimerisierung mit anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen, wodurch diese zur Bildung von Gasvesikelvorläuferstrukturen nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies würde die Bildung von Initiationskomplexen zum Start der GvpA-Assemblierung stark verringern und die großen Mengen von GvpA würden in weniger Gasvesikel eingebaut werden.

Die Inhibition der Gasvesikelbildung in p-vac +pG^{ex}, +pH^{ex} und +pM^{ex} unterstützt die Vermutung, dass diese drei Proteine für die Initiation der Gasvesikelbildung essentiell sind und dabei nur in geringer Menge benötigt werden.

5.2. GvpH, GvpJ und GvpL kompensieren den inhibitorischen Effekt großer GvpM-Mengen

Die Inhibition der Gasvesikelbildung in Gegenwart großer Mengen von GvpM lässt vermuten, dass für eine intakte Gasvesikelbildung die Menge bestimmter akzessorischer Gasvesikelproteine in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen muss. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass p-vac +pGHIJKLM^{ex}-Transformanten einen Vac positiven Phänotyp aufweisen. Im Folgenden wurde daher getestet, ob auch durch einzelne Gasvesikelproteine die inhibitorische Wirkung von GvpM kompensiert werden kann, wenn diese in vergleichbarer Menge vorhanden sind.

Die Kompensation des inhibitorischen Effekts von GvpM wurde in p-vac +pXM^{ex}-Transformanten untersucht. Im Fall von p-vac +pHM^{ex}, +pJM^{ex} oder +pLM^{ex} waren die Transformanten Vac positiv, was vermuten lässt, dass GvpH, GvpJ und GvpL den inhibitorischen Effekt großer GvpM-Mengen auf die Gasvesikelbildung kompensieren können (Tabelle 5). Dagegen waren p-vac +pGM^{ex}-Transformanten Vac negativ, was darauf hindeutet das GvpG den inhibitorischen Effekt von GvpM nicht kompensieren kann (Tabelle 5). Daher ist es wahrscheinlich, dass GvpG und GvpM nicht interagieren oder das deren Wechselwirkung nicht zu einer Kompensation des inhibitorischen Effekts beider Proteine führt. GvpH, GvpJ und GvpL könnten dagegen potentielle Interaktionspartner von GvpM sein. Diese Vermutung konnte durch Western-Analysen mit Zellysaten der entsprechenden Transformanten untermauert werden. GvpG wurde ausschließlich als monomerisches Protein detektiert, sowohl in der pG^{ex}- als auch in der pGM^{ex}-Transformante. Bei GvpH und GvpJ konnten jedoch zusätzliche, größere Proteinbanden in der Anwesenheit von GvpM detektiert werden, was auf eine Interaktion der beiden Proteine schließen lässt. Bei pLM^{ex} wurden jedoch im Vergleich zu pL^{ex} keine zusätzlichen Proteinbanden detektiert. Bei beiden Zellysaten waren zwar neben der Monomerbande zwei größere Proteinbanden zu sehen, diese sind jedoch auf eine unspezifische Bindung des GvpL-Antiserums zurückzuführen.

Große Mengen von GvpH oder GvpM inhibierten die Gasvesikelbildung in p-vac +pH^{ex} und +pM^{ex}-Transformanten, während p-vac +pHM^{ex}-Transformanten Vac positiv sind. Vergleichbar große Mengen von GvpH und GvpM können sich offenbar gegenseitig neutralisieren und den inhibitorischen Effekt beider Proteine auf die Gasvesikelbildung aufheben. In p-vac +pJM^{ex}-und p-vac +pLM^{ex}-Transformanten wurden ebenfalls Gasvesikel, vergleichbar zu p-vac-Transformanten, gebildet, jedoch wirkten große Mengen von GvpJ oder GvpL nicht inhibitorisch auf die Gasvesikelbildung. Es ist wahrscheinlich, dass GvpJ, GvpH und auch GvpL mit GvpM interagieren und auf diese Weise die inhibitorische Wirkung der großen GvpM-Menge kompensieren.

5.3. GvpM interagiert mit GvpH, GvpJ und GvpL

Die bisherigen Ergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass zwischen GvpM und anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen eine Wechselwirkung stattfindet, die möglicherweise den Startpunkt zur GvpA-Assemblierung bildet. Potentielle Kandidaten für eine Interaktion mit GvpM waren GvpH, GvpJ und GvpL, da diese Proteine den inhibitorischen Effekt großer GvpM-Mengen auf die Gasvesikelbildung kompensierten, wenn sie in gleich großer Menge relativ zu GvpM vorhanden waren. Zwischen GvpG und GvpM fand dagegen unter diesen Bedingungen keine Kompensation des inhibitorischen Effekts beider Proteine statt.

Zur Klärung der Frage, ob zwischen GvpM und GvpH, GvpJ, GvpL und auch GvpG eine Wechselwirkung stattfindet, wurden *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsexperimente durchgeführt. Die Interaktionsfähigkeit wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie bestimmt. Die Gasvesikelproteine müssen hierfür rekombinant in *E. coli* produziert werden und liegen damit in einer inaktiven Form vor. Die Produktion von Gvp_{His}-Proteinen in *Hfx. volcanii* über pJAS35 liefert leider keine ausreichend hohen Proteinmengen. Für Interaktionsexperimente ist jedoch die Verwendung von nativ gefalteten Proteinen nötig. Um zunächst eine vollständige Entfaltung der Proteine zu gewährleisten, erfolgte die Aufreinigung der Gvp_{His}-Proteine aus *E. coli* unter stark denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff. Durch eine schrittweise Dialyse mit steigender KCl- und sinkender Harnstoffkonzentration sollten die Proteine anschließend in ihre native Konformation rückgefaltet werden. Die Verwendung von KCl ist dadurch begründet, dass *Hbt. salinarum* die *salt-in* Strategie verwendet, die dazu führt, dass im Cytoplasma isoosmolare Konzentrationen von KCl im Vergleich zum Außenmedium vorliegen (Dennis & Shimmin, 1997). Eine erfolgreiche Rückfaltung unter den oben genannten Bedingungen konnte bereits für die Glukosedehydrogenase aus *Hfx. mediterranei* (Pire *et al.*, 2001) und für das TBP-Protein aus *Hbt. salinarum* (Soppa & Link, 1997) gezeigt werden. Eine Möglichkeit das Problem der Rückfaltung zu umgehen, wäre die homologe und gezielte Überexpression von haloarchaealen Proteinen, wie sie 2007 von Large *et al.* beschrieben wurde. Hier könnten durch homologe Rekombination *gvp*-Leserahmen unter Kontrolle eines Tryptophan-induzierbaren Promotors in das Genom von *Hfx. volcanii* inseriert werden.

Für die Interaktionsexperimente wurden in dieser Arbeit die rückgefalteten Gvp_{His}-Proteine sowie Zellslysate der *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die entsprechenden Gvp-Proteine synthetisierten, verwendet.

Für GvpM_{His} konnte eine Interaktion mit GvpJ gezeigt werden (Tabelle 5). Neben dem GvpJ-Monomer wurden noch zusätzliche, größere Proteinbanden, sowie ein "Bandenschmier" detektiert, was auf eine starke Multimerisierung von GvpJ in Gegenwart von GvpM schließen

lässt. Die Kontrolle zeigte nur die GvpJ-Monomerbande, sowie eine zusätzliche Bande bei ca. 45 kDa. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits bei der Western-Analyse mit Zellysaten der pJM^{ex}- und der pJ^{ex}-Transformante erzielt. Auch hier zeigte das pJ^{ex}-Zellysat eine Monomerbande und eine weitere 45 kDa-Bande, während bei pJM^{ex} zusätzliche Proteinbanden sowie ein "Bandenschmier" detektiert wurde. Bei der Interaktion von GvpM und GvpJ kommt es also zur Bildung großer SDS-unlöslicher Proteinaggregate. In welchem Mengenverhältnis die beiden Proteine in diesen Komplexen vorhanden sind oder ob sie nur aus GvpJ bestehen ist jedoch unklar. Im pJM^{ex}-Zellysat konnten zusätzliche Proteinbanden nur mittels GvpJ-Antiserum nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass deutlich mehr GvpJ in diesen Aggregaten vorhanden ist als GvpM bzw. dass die Aggregate nur aus GvpJ bestehen.

Für GvpM_{His} und GvpG konnte *in vitro* keine Interaktion nachgewiesen werden (Tabelle 5). Für p-vac +pGM^{ex}-Transformanten konnte gezeigt werden, dass durch vergleichbar große Mengen von GvpG und GvpM keine Kompensation des inhibitorischen Effekts großer Mengen von GvpM oder GvpG stattfindet, da diese Transformanten nach wie vor Vac negativ sind. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die beiden Proteine nicht miteinander interagieren und daher der inhibitorische Effekt beider Proteine bestehen bleibt.

Für GvpM_{His} und GvpH sowie GvpM_{His} und GvpL konnte über Ni-NTA-Affinitätschromatographie allerdings ebenfalls keine Interaktion nachgewiesen werden. Daher wurde das Experiment *vice versa* wiederholt, wobei GvpH_{His} bzw. GvpL_{His} rekombinant in *E.coli* produziert wurden und nach Rückfaltung in ihre native Konformation und Bindung an eine Ni-NTA-Matrix, mit einem GvpM-Zellysat inkubiert wurden. Für beide Proteine konnte eine spezifische Interaktion mit GvpM nachgewiesen werden (Tabelle 5). Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind dadurch erklärbar, dass der C-terminale His-tag von GvpM_{His} möglicherweise die Bindung von GvpH und GvpL beeinträchtigt und deshalb eine Interaktion nicht nachweisbar ist. Beim Interaktionsnachweis von GvpH_{His} bzw. GvpL_{His} mit GvpM wurde ausschließlich das GvpM-Monomer nachgewiesen. Größere Proteinaggregate, wie bei der Interaktion von GvpM_{His} und GvpJ wurden dagegen nicht detektiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse die Interaktion von GvpM +GvpJ, +GvpH und +GvpL. Es ist wahrscheinlich, dass über diese Wechselwirkung die Gasvesikelbildung und die Kompensation der inhibierenden Wirkung großer Mengen von GvpM auf die Gasvesikelbildung erfolgt.

5.4. Gvp-GFP Fusionen visualisieren *in vivo* Proteinaggregationen

Eine salz- adaptierte Variante des GFP-Proteins (smRS-GFP) wurde zur Analyse von Gvp-GFP Fusionsproteinen verwendet, um bei den jeweiligen Fusionsproteinen *in vivo* putative Proteinaggregationen zu detektieren. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass in Anwesenheit der p-vac Region die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Fusionsproteins abnahm. Das spricht für eine generelle Interaktion von Gasvesikelproteinen untereinander. Eine eindeutige Lokalisierung der Proteine an der Gasvesikelhülle war leider nicht möglich, da hierfür keine ausreichend hohe Auflösung erzielt werden konnte. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von Gasvesikeln aus lysierten Zellen konnte kein sichtbares Fluoreszenzsignal detektiert werden. Das könnte zum einen daran liegen, dass die entsprechenden Gvp-GFP Fusionsproteine kein Teil der Gasvesikelhülle sind, zum anderen daran, dass das jeweilige Gvp-GFP-Protein in zu geringer Menge in der Gasvesikelhülle vorhanden ist, um ein sichtbares Fluoreszenzsignal zu liefern.

Die Methode ist jedoch dazu geeignet, um das starke Aggregationsverhalten einzelner Gasvesikelproteine *in vivo* zu studieren.

Transformanten mit Expression von pH_{gfp}^{ex} oder pL_{gfp}^{ex} zeigten eine verteilte Fluoreszenz in den Zellen, während bei Expression von pM_{gfp}^{ex} nur einzelne, fluoreszierende Punkte in den Zellen beobachtet wurden (Tabelle 5). Diese fluoreszierenden Punkte konnten auch in den Vac negativen p-vac + pM_{gfp}^{ex} -Transformanten detektiert werden, was auf eine starke Aggregation von GvpM_{GFP} hinweist. Die Menge der von der p-vac-Region produzierten akzessorischen Gvp-Proteine reicht hier nicht aus, um die starke Aggregation von GvpM_{GFP} aufzuheben und vermutlich ist diese GvpM-Aggregation für die Inhibition der Gasvesikelbildung in p-vac + pM^{ex} - bzw. + pM_{gfp}^{ex} - Transformanten verantwortlich, da andere Proteine wie GvpH und GvpL möglicherweise in diese Aggregate einbezogen werden. Wie im Abschnitt 4.2 gezeigt wurde, wird der inhibitorische Effekt von GvpM kompensiert, wenn vergleichbare Mengen an GvpH, GvpJ oder GvpL vorhanden sind.

Der Phänotyp von pvac Δ M + pM_{gfp}^{ex} -Transformanten war Vac negativ. Dagegen sind pvac Δ M + pM^{ex} -Transformanten Vac positiv (Offner *et al.*, 2000). Durch die Fusion mit GFP ist GvpM also nicht mehr in der Lage pvac Δ M-Transformanten zu komplementieren. Möglicherweise behindert die C-terminale Fusion von GFP die Funktion von GvpM und die notwendigen GvpM-Interaktionen werden verhindert oder die gebildeten GvpM_{GFP}-Aggregate sind für die Gasvesikelbildung nicht nutzbar.

Bei pH_{gfp}^{ex} -Transformanten fluoreszierte die gesamte Zelle, was eine gleichmäßige Verteilung dieses löslichen Proteins in der Zelle vermuten lässt. Jedoch zeigten sich in Anwesenheit der p-vac Region (also bei Anwesenheit geringer Mengen weiterer akzessorischer Gvp-Proteine)

zwei verschiedene Phänotypen, abhängig davon, ob die Zellen Gasvesikel enthielten oder nicht. Die meisten Zellen der p-vac +pH_{gfp}^{ex}-Transformante waren Vac positiv, im Gegensatz zu den Vac negativen p-vac +pH^{ex}-Transformanten. Offenbar inhibieren große Mengen von GvpH die Gasvesikelbildung, während eine ähnlich große Menge an GvpH_{GFP} diese nicht unterbindet. Offenbar ist der C-terminale Bereich von GvpH (an den GFP fusioniert ist) für die Wechselwirkung mit anderen Gasvesikelproteinen wichtig, was dann zu einer gestörten Gasvesikelbildung führt. Die Fusion mit GFP behindert vielleicht diesen Kontakt. Die Vac positiven Zellen von p-vac +pH_{gfp}^{ex} zeigten eine verteilte Fluoreszenz, während die Vac negativen Zellen mehrere fluoreszierende Punkte aufwiesen (Tabelle 5). Dies zeigt eine Aggregation von GvpH_{GFP} mit weiteren Gasvesikelproteinen, die aggregatorische Eigenschaften haben, wie GvpJ, GvpM oder auch GvpA. Die Aggregate führen aber nicht zur Bildung von Gasvesikeln. Die verteilte Fluoreszenz in Vac positiven Zellen von p-vac +pH_{gfp}^{ex} könnte wiederum darauf hindeuten, dass GvpH an der Gasvesikelhülle adhärert.

5.5. *In vivo* Nachweis der Interaktion von GvpM mit GvpH und GvpL

Mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie konnte eine Interaktion von GvpM mit GvpJ, GvpH und GvpL *in vitro* nachgewiesen werden (Abschnitt 5.3). Die Gvp_{His}-Proteine wurden nach der Produktion und Isolation aus *E. coli* durch Dialyse in steigenden KCl-Konzentrationen rückgefaltet. Mit dieser Methode lässt sich eine Fehlfaltung der Proteine allerdings nicht ausschließen, was zu falschen Ergebnissen führen könnte.

Um die Wechselwirkung von GvpM und GvpH sowie GvpM und GvpL direkt zu zeigen, wurde eines dieser Gasvesikelproteine mit einer salz-adaptierten Variante von GFP fusioniert und das Aggregationsverhalten *in vivo* analysiert. Dazu wurden pXM_{gfp}^{ex}-Transformanten hergestellt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Vorteil bei dieser Methode ist, dass die zu untersuchenden Gasvesikelproteine im Hochsalz vorliegen, was die korrekte Faltung der Proteine sicherstellt.

Die Zellen der pHM_{gfp}^{ex}-Transformanten fluoreszierten sehr schwach und es waren keine fluoreszierenden Punkte in den Zellen erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass bei Anwesenheit einer ähnlich großen Menge von GvpH, GvpM_{GFP} die Fähigkeit zur Aggregation verliert. Die Fluoreszenz der Zellen war insgesamt sehr schwach, jedoch zeigte die Quantifizierung der Fluoreszenzstärke im Phosphor Imager vergleichbare Werte zu M_{GFP}-Zellen. Bei der pM_{gfp}^{ex}-Transformante sind nur einzelne, kleine fluoreszierende Punkte zu sehen, die aber sehr stark fluoreszieren, während der Rest der Zelle keine Fluoreszenz zeigt. Bei Betrachtung der Gesamtfläche der Zelle ergibt sich also eine relativ schwache

Fluoreszenzstärke. Bei Anwesenheit von GvpH findet keine sichtbare Aggregation von GvpM_{GFP} statt und die GvpM_{GFP}-Moleküle verteilen sich auf die gesamte Zelle, was zu einer vergleichbar schwachen Fluoreszenzstärke führt.

In der pLM_{gfp}^{ex}-Transformante zeigten sich dagegen fluoreszierende Punkte in den Zellen, ähnlich wie in der pM_{gfp}^{ex}-Transformante. Durch die Anwesenheit von GvpL wird also die M_{GFP}-Aggregation nicht verhindert. Die Fluoreszenzstärke der Zellen war ebenfalls vergleichbar.

Um die Ergebnisse zu untermauern, wurden zusätzlich pL_{gfp}M^{ex}- und pH_{gfp}M^{ex}-Transformanten untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass das vormals lösliche GvpL_{GFP} durch die Anwesenheit von GvpM in Aggregate integriert wird. Das zeigt, dass GvpL und GvpM interagieren und gemeinsam ein GvpL_{GFP}-GvpM-Aggregat bilden (Tabelle 5).

Bei der pH_{gfp}M^{ex}-Transformante wurde nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert, was sich auf die gesamte Zelle erstreckte. Jedoch wurde in wenigen Zellen ein fluoreszierender Punkt beobachtet. Möglicherweise handelt es sich hierbei um GvpM-Aggregate an denen GvpH_{GFP} bindet. Die Auflösung der GvpM-Aggregate durch GvpH-GFP scheint daher weniger effektiv zu sein als mit GvpH.

Die Interaktion von GvpM mit GvpH und GvpL kann demnach *in vivo* über entsprechende GFP-Fusionen nachgewiesen werden (Tabelle 5). Beide Interaktionen sorgen wahrscheinlich dafür, dass der inhibitorische Effekt von großen GvpM-Mengen in p-vac-Transformanten verhindert wird. Bei der Wechselwirkung von GvpH und GvpM wurde die Bildung größerer Aggregate von GvpM verhindert und GvpM steht zur Anlage der Gasvesikel zur Verfügung. Bei der Wechselwirkung von GvpM und GvpL wird dagegen das lösliche GvpL in die GvpM-Aggregate integriert. Ein ähnlicher Komplex spielt möglicherweise auch bei der Gasvesikelbildung eine Rolle. Damit können sowohl GvpH als auch GvpL die inhibitorische Wirkung großer Mengen von GvpM kompensieren, jedoch geschieht dies offenbar durch zwei unterschiedliche Mechanismen.

Tabelle 5. Aggregationsverhalten und Interaktionen der Gasvesikelproteine GvpG, H, J, L und M

| Gvp | Überexpression in p-vac- Transformanten | Kompensation des inhibitorischen Effekts durch | Aggregation ohne p-vac | Aggregation mit p-vac | in vitro Interaktion mit GvpM | in vivo Interaktion mit GvpM |
|-------------|---|--|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| GvpG | Inhibition der Gasvesikelbildung | n. b. | n. b. | n.b. | nein (M _{His} +G) | n.b. |
| GvpH | Inhibition der Gasvesikelbildung | GvpM | nein | Vac negativ: ja Vac positiv: nein | ja (H _{His} +M) | ja (keine M-Aggregate sichtbar) |
| GvpJ | kein Effekt | - | n.b. | n.b. | ja (M _{His} +J) | n.b. |
| GvpL | kein Effekt | - | nein | nein | ja (L _{His} +M) | ja (Entstehung von L/M-Aggregaten) |
| GvpM | Inhibition der Gasvesikelbildung | GvpH, GvpJ, GvpL | ja | ja | (ja) | ja |

n.b. =nicht nachgewiesen

5.6. Hydrophobe Aminosäuren im N-terminalen Bereich von GvpM sind für die Funktion des Proteins essentiell

Das Gasvesikelprotein GvpM ist ein essentielles Protein bei der Gasvesikelbildung in *Hbt. salinarum* PHH1 und wird in geringen Mengen während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet (Offner *et al.*, 2000). Es wird daher angenommen, dass GvpM in frühen Stadien der Gasvesikelbildung eine Rolle spielt und (wahrscheinlich in Kombination mit GvpH und GvpL) den Start zur GvpA-Assemblierung initiieren könnte. Die Aminosäure-Sequenzähnlichkeit von GvpM zu GvpA und die Tatsache, dass GvpM eine starke Tendenz zur Multimerisierung zeigt, verstärkt die Vermutung, dass es sich bei GvpM um ein in geringer Menge notwendiges Strukturprotein der Gasvesikel handelt.

In dieser Arbeit wurden auch die Auswirkungen der Mutation einzelner Aminosäuren und kurzer Deletionen in der Aminosäuresequenz von GvpM auf die Gasvesikelbildung in p-vac Δ M +pM_{Mut}-Transformanten untersucht. Darüber können funktionelle Bereiche von GvpM definiert werden, welche als Basis für weitere Untersuchungen zur Funktion von GvpM bei der Gasvesikelbildung dienen. Durch gezielte Mutagenese wurden 8 verschiedene Substitutionsmutanten (R20A/D21A, R20D/D21R, G22D, A23D, V24D, I36M, A48D, Y56A) und eine Deletionsmutante (Δ 5N) von GvpM hergestellt (Abb. 22).

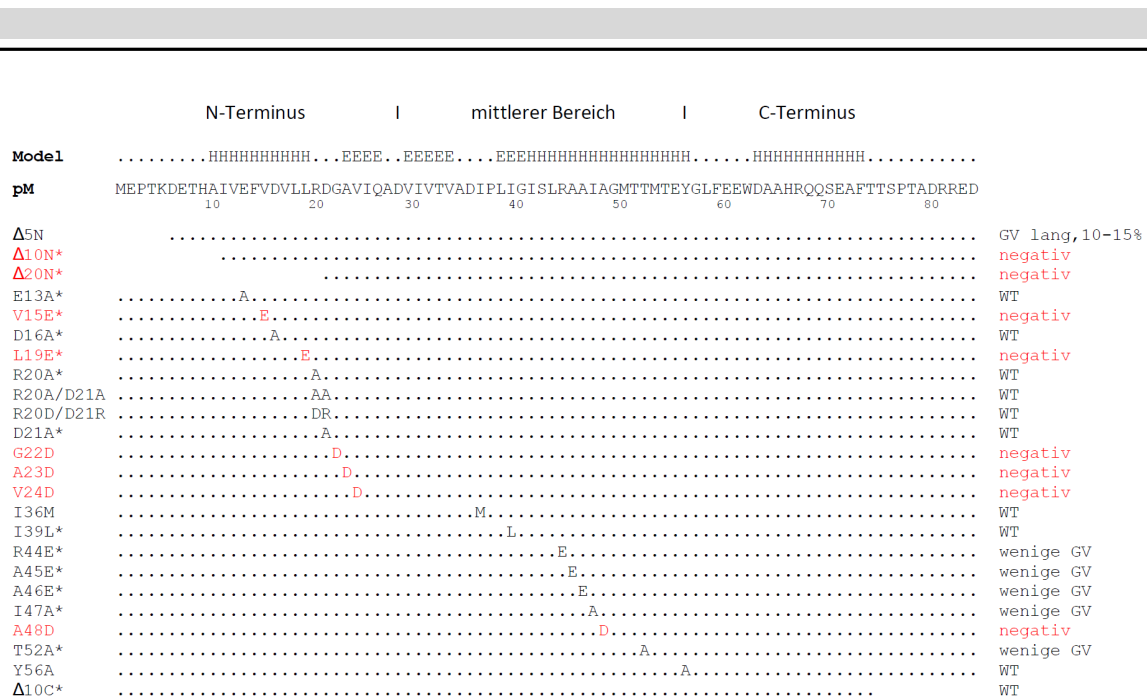


Abb. 22: Auswirkungen verschiedener Mutationen im GvpM auf die Gasvesikelbildung. Aufgeführt sind Mutationen, welche bereits in einer früheren Arbeit untersucht wurden (Bachelorarbeit Winter, 2012, mit * gekennzeichnet) und die Ergebnisse dieser Arbeit. Oben gezeigt ist die GvpM-Sequenz. Darüber ist die Vorhersage für die Sekundärstruktur des GvpM dargestellt (ermittelt durch PSIPRED). Rot gekennzeichnet sind Mutationen, welche in entsprechenden Transformanten zu einem Vac negativen Phänotyp führen.

In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Deletionen von 10 Aminosäuren am C-Terminus von GvpM keinen Einfluss auf die Gasvesikelbildung haben, während die Deletion von 10 oder 20 Aminosäuren am N-Terminus zu Vac negativen Transformanten führt (Abb. 22) (Bachelorarbeit Winter, 2012). Generell scheint der N-terminale Bereich von GvpM wichtig für die Funktion des Proteins zu sein, während der C-terminale Bereich weniger wichtig ist. In dieser Arbeit wurde die Deletion von fünf Aminosäuren am N-Terminus von GvpM untersucht und hierbei zeigte sich eine starke Reduktion der Gasvesikelbildung in den entsprechenden p-vacΔM +pM_{Δ5N}-Transformanten (Abb. 22). Nur ca. 10-15% der Zellen waren Vac positiv, enthielten jedoch nur 2-3 extrem lange Gasvesikel pro Zelle (bis zu 1,5 μm lang). Über diese Mutation konnte die Bedeutung des N-Terminus von GvpM nochmals bestätigt werden. Möglicherweise interagieren Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Proteins mit weiteren GvpM-Molekülen oder mit anderen Gasvesikelproteinen (z. B. GvpA, GvpH, GvpJ oder GvpL), was den Start zur GvpA-Assemblierung markiert. Es wäre aber auch denkbar, dass durch die Deletion der Aminosäuren, die Faltungstabilität des Proteins beeinträchtigt wird. Die Anwesenheit von wenigen, sehr langen Gasvesikeln in einigen Vac positiven Zellen zeigt, dass die GvpA-Assemblierung nicht gestört ist, sondern dass die Anzahl an "funktionellen" Initiationskomplexen zur Bildung eines Gasvesikels reduziert ist. Das

unterstützt nochmals die Vermutung, dass GvpM an der Initiation der Gasvesikelbildung beteiligt ist.

Generell konnte sowohl in der Bachelorarbeit von Kerstin Winter, als auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im N-terminalen Bereich von GvpM, der Austausch einer hydrophoben Aminosäure zu einer geladenen Aminosäure zu einem Vac negativen Phänotyp in entsprechenden Transformanten führt (Abb. 22) (V15E, L19E: Bachelorarbeit Winter, 2012; G22D, A23D, V24D: diese Arbeit). Dagegen hat der Austausch einer geladenen Aminosäure zu einer hydrophoben oder einer entgegengesetzt geladenen Aminosäure keinen Einfluss auf die Gasvesikelbildung in diesem Bereich (Abb. 22) (E13A, D16A, R20A, D21A: Bachelorarbeit Winter, 2012; R20A/D21A, R20D/D21R: diese Arbeit). Die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen scheint wichtig für die Funktion des Proteins zu sein. Ionische Wechselwirkungen über geladene Aminosäuren scheinen dagegen nur eine geringe Rolle bei GvpM zu spielen.

Bei entsprechenden Mutationen in GvpA wurde dagegen festgestellt, dass geladene Aminosäuren und damit ionische Wechselwirkungen im N-terminalen Bereich für die Funktion des Proteins essentiell sind (Abb. 23) (Strunk *et al.*, 2011 und AG Pfeifer, unveröffentlichte Ergebnisse). Das deutet darauf hin, dass zwischen GvpA und GvpM keine direkte Interaktion besteht, sondern eher ein weiteres Gasvesikelprotein (z. B. GvpJ oder GvpL) den Kontakt vermittelt. Ein weiteres Indiz dafür ist die Tatsache, dass zwischen GvpA und GvpJ eine größere Aminosäure-Sequenzähnlichkeit besteht, als zwischen GvpA und GvpM.

Mutationen in der vorhergesagten Helix II im mittleren Bereich der Aminosäuresequenz von GvpM hatten unterschiedliche Auswirkungen auf die Gasvesikelbildung. Der Austausch von Alanin gegen eine geladene Aminosäure (A45E, A46E: Bachelorarbeit Winter, 2012; A48D: diese Arbeit) hatte eine Inhibition bzw. stark reduzierte Gasvesikelbildung zur Folge (Abb. 22). Wiederum scheinen hydrophobe Wechselwirkungen in diesem Bereich des Proteins für dessen Funktion von Bedeutung zu sein. Möglicherweise könnte aufgrund dieser Mutationen die Interaktion mit anderen Gasvesikelproteinen gestört sein. Weiterhin zeigten Transformanten mit den Mutationen R44E, I47A und T52A eine stark reduzierte Gasvesikelbildung, während der Austausch von Tyrosin zu Alanin (Y56A) keinen Einfluss auf die Gasvesikelbildung zeigte (Abb. 22).

Insgesamt betrachtet hatte keine der getesteten Mutationen von GvpM einen Einfluss auf die Morphologie der Gasvesikel (Abb. 23). Bei GvpA dagegen lassen bestimmte Mutationen Formvarianten von Gasvesikeln, wie z.B. lange, dünne oder kleine, runde Gasvesikel, entstehen (Abb. 23 und Strunk *et al.*, 2011). Das unterstützt die Vermutung, dass GvpM nicht

an der Formgebung der Gasvesikel, sondern eher bei der Initiation der Gasvesikelbildung eine Rolle spielt.

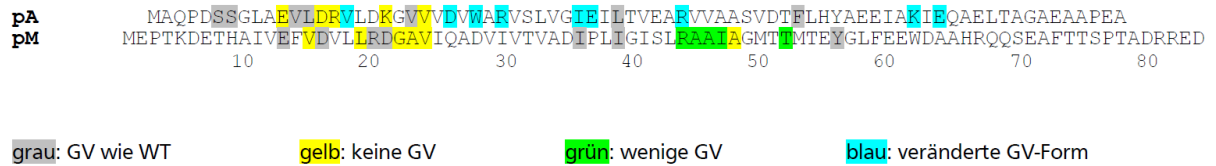


Abb.23: Aminosäurealignment von pGvpA und pGvpM und Kennzeichnung von mutierten Aminosäuren und deren Einfluss auf die Gasvesikelbildung. Mutierte Aminosäuren sind markiert und die unterschiedlichen Auswirkungen der Mutationen auf die Gasvesikelbildung farblich kodiert. Bei GvpA wurden alle markierten Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht (Ausnahmen: F51Y; K60L) (Strunk *et al.*, 2011 und AG Pfeifer, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Mutationen in GvpM sind in Abb. 22 aufgeführt.

5.7. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern, dass die relative Mengen der akzessorischen Gasvesikelproteine zueinander bei der Gasvesikelbildung eine bedeutende Rolle spielen. Die Gasvesikelproteine GvpG, GvpH und GvpM können die Gasvesikelbildung inhibieren, wenn sie in zu großer Menge vorhanden sind, da sie offenbar durch Interaktion mit anderen Gasvesikelproteinen für die Gasvesikelbildung notwendige Proteine "wegfangen". Durch kontrollierte Produktion definierter Mengen dieser Proteine in *Hfx. volcanii*-Transformanten wäre es vielleicht möglich, die absolute Menge von GvpG, GvpH und GvpM zu bestimmen, die für eine intakte Gasvesikelbildung benötigt wird, ebenso in welchem relativen Mengenverhältnis die Proteine zueinander stehen müssen.

Am Beispiel von GvpM konnte gezeigt werden, dass der negative Effekt einer größeren GvpM-Menge auf die Gasvesikelbildung durch die Anwesenheit ähnlich großer Mengen von GvpJ, GvpH oder GvpL aufgehoben werden kann. Da diese Proteine mit GvpM interagieren, liegt die Vermutung nahe, dass dies den negativen Effekt größerer Mengen an GvpM auf die Gasvesikelbildung aufhebt. Über GvpM-Mutanten könnten in zukünftigen Versuchen die (gleichen oder unterschiedlichen) Interaktionsstellen von GvpM für GvpJ, GvpH und GvpL identifiziert werden. GvpG und GvpM können ihre inhibitorische Wirkung dagegen nicht gegenseitig aufheben und es wurde *in vitro* auch keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt. Interessant wäre es auch für GvpG mögliche Interaktionspartner zu finden, die die inhibitorische Wirkung großer Mengen dieses Proteins auf die Gasvesikelbildung aufheben können.

Des Weiteren wurde bisher nicht untersucht, ob möglicherweise die Reihenfolge, in der die akzessorischen Gasvesikelproteine translatiert werden für die Gasvesikelbildung von Bedeutung ist. Hierfür könnte man die Reihenfolge der Leserahmen der *gvpF-M*-Gene in verschiedenen Konstrukten beliebig austauschen und deren Expression in *Hfx. volcanii*-Transformanten bezüglich der Bildung von Gasvesikeln untersuchen.

Wie zuvor schon bekannt war, weisen das Hauptstrukturprotein GvpA sowie die essentiellen Proteine GvpJ und GvpM große Sequenzähnlichkeit auf, weshalb ihnen eine ähnliche Funktion bei der Gasvesikelbildung zugeschrieben wird. Vermutet wird, dass diese Proteine mit GvpA, aber auch untereinander interagieren und so den Start zur Gasvesikelbildung induzieren. Die Proteine könnten damit, wenn auch nur in geringer Menge vorhanden, auch einen Teil der Gasvesikelhülle bilden. Die Interaktion von GvpM und GvpJ konnte in dieser Arbeit *in vitro* nachgewiesen werden, wobei offenbar eine starke Multimerisierung des GvpJ-Proteins stattfindet. Der Interaktionsnachweis von GvpJ und GvpM mit GvpA steht allerdings noch aus. Dieser ist zur Bestätigung der Hypothese absolut notwendig, bevorzugt auch mit Mutanten des GvpA-Proteins um die putativen Interaktionsbereiche mit GvpJ bzw. GvpM einzugrenzen.

Eine *in vivo* Charakterisierung von GvpJ mittels GFP ist noch nicht gelungen, da bisher kein fluoreszierendes GvpJ-GFP Fusionsprotein hergestellt werden konnte. Es könnten weitere Linker-Variationen getestet werden, um ein solches zu erhalten. Für *in vivo* Analysen bezüglich der Aggregation von GvpJ mit weiteren Gasvesikelproteinen könnten die GFP-Fusionen mit GvpH und GvpL dienen. Hier könnte überprüft werden, ob diese Fusionen mit GvpJ fluoreszierende Aggregate bilden.

Untersuchungen mit GvpM-Mutanten deuten darauf hin, dass der N-terminale sowie der mittlere Teil des Proteins den funktionellen Bereich des Proteins bilden. Weiterhin scheinen vor allem hydrophobe Wechselwirkungen für die Funktion des Proteins von Bedeutung zu sein. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass GvpM nicht an der Formgebung der Gasvesikel beteiligt ist. Um diese Aussagen zu unterstützen bzw. zu erweitern, müssen weitere GvpM-Mutanten analysiert und ein dreidimensionales Strukturmodell von GvpM erstellt werden. Vielleicht wäre es über diese Analysen auch möglich, die Interaktionsstellen von GvpM mit anderen Gasvesikelproteinen zu identifizieren.

6. Literatur

- Arakawa, T. & Tokunaga, M. (2004).** Electrostatic and hydrophobic interactions play a major role in the stability and refolding of halophilic proteins. *Protein and peptide letters* **11**, 125-132.
- Armache, K. J., Kettenberger, H. & Cramer, P. (2003).** Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6964-6968.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1988).** Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1. p. Wiley-Interscience., New York: Green Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Bab-Dinitz, E., Shmuely, H., Maupin-Furlow, J., Eichler, J., Shaanan, B. (2006).** *Haloferax volcanii* PitA: An example of functional interaction between Pfam chlorite dismutase and antibiotic biosynthesis monooxygenase families? *Bioinformatics* **22(6)**, 671-675.
- Baliga, N. S., Goo, Y. A., Ng, W. V., Hood, L., Daniels, C. J. & DasSarma, S. (2000).** Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Molecular microbiology* **36**, 1184-1185.
- Bauer, M., Marschall, L., Reuff, M., Besche, V., Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2008).** Overlapping activator sequences determined for two oppositely oriented promoters in halophilic Archaea. *Nucleic acids research* **36**, 598-606.
- Bayro, M. J., Daviso, E., Belenky, M., Griffin, R. G. & Herzfeld, J. (2012).** An amyloid organelle, solid-state NMR evidence for cross-beta assembly of gas vesicles. *The Journal of biological chemistry* **287**, 3479-3484.
- Beard, S. J., Handley, B. A., Hayes, P. K. & Walsby, A. E. (1999).** The diversity of gas vesicle genes in *Planktothrix rubescens* from Lake Zurich. *Microbiology* **145** (Pt 10), 2757-2768.
- Beard, S. J., Davis, P. A., Iglesias-Rodriguez, D., Skulberg, O. M. & Walsby, A. E. (2000).** Gas vesicle genes in *Planktothrix* spp. from Nordic lakes: strains with weak gas vesicles possess a longer variant of *gvpC*. *Microbiology* **146** (Pt 8), 2009-2018.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (1998).** Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in microbiology* **6**, 222-228.
- Bell, S. D., Cairns, S. S., Robson, R. L. & Jackson, S. P. (1999a).** Transcriptional regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*. *Molecular cell* **4**, 971-982.
- Bell, S. D., Kosa, P. L., Sigler, P. B. & Jackson, S. P. (1999b).** Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13662-13667.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (2001).** Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Current opinion in microbiology* **4**, 208-213.
- Bell, S. D., Magill, C. P. & Jackson, S. P. (2001).** Basal and regulated transcription in Archaea. *Biochemical Society transactions* **29**, 392-395.
- Best, A. (2000).** Molekulare Funktionsanalyse des gasvesikelassoziierten GvpC-Proteins aus *Halobacterium salinarum* PHH1. *Wissenschaftliche Hausarbeit, TU Darmstadt*.
- Bieger, B., Essen, L. O. & Oesterhelt, D. (2003).** Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*. *Structure* **11**, 375-385.

- Bischoff, K. M. & Rodwell, V. W. (1996).** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Haloferax volcanii*: purification, characterization, and expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **178**, 19-23.
- Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., Mevarech, M. (2003).** Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *Journal of bacteriology* **185**, 772-778.
- Blaseio, U. & Pfeifer, F. (1990).** Transformation of *Halobacterium halobium*: development of vectors and investigation of gas vesicle synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6772-6776.
- Blaurock, A. E. & Walsby, A. E. (1976).** Crystalline structure of the gas vesicle wall from *Anabaena flos-aquae*. *Journal of molecular biology* **105**, 183-199.
- Blaurock, A. E. & Wober, W. (1976).** Structure of the wall of *Halobacterium halobium* gas vesicles. *Journal of molecular biology* **106**, 871-878.
- Blecher, O., Goldman, S. & Mevarech, M. (1993).** High expression in *Escherichia coli* of the gene coding for dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii*. Reconstitution of the active enzyme and mutation studies. *European journal of biochemistry / FEBS* **216**, 199-203.
- Bleiholder, A., Frommherz, R., Teufel, K. & Pfeifer, F. (2012).** Expression of multiple *tfb* genes in different *Halobacterium salinarum* strains and interaction of TFB with transcriptional activator GvpE. *Archives of microbiology* **194**, 269-279.
- Bright, D. I. & Walsby, A. E. (1999).** The relationship between critical pressure and width of gas vesicles in isolates of *Planktothrix rubescens* from Lake Zürich. *Microbiology* **145** (Pt 10), 2769-2775.
- Britton, K. L., Stillman, T. J., Yip, K. S., Forterre, P., Engel, P. C. & Rice, D. W. (1998).** Insights into the molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 9023-9030.
- Brochier-Armanet, C., Bousseau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. (2008).** Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 245-252.
- Brown, A.D. (1990).** Microbial water stress physiologie. Principles and perspectives. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.
- Brown-Peterson, N. J. & Salin, M. L. (1993).** Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: characterization of some unique properties of the halophilic enzyme. *Journal of bacteriology* **175**, 4197-4202.
- Castorph, K. (2003).** Isolierung von Gvp-Proteinen und Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien zur Aufklärung möglicher Funktionen von Gasvesikelproteinen in *Hb. salinarum* PHH1. *Diplomarbeit, TU Darmstadt*.
- Cendrin, F., Chroboczek, J., Zaccai, G., Eisenberg, H. & Mevarech, M. (1993).** Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* **32**, 4308-4313.
- Christian, J. H. & Waltho, J. A. (1962).** Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **65**, 506-508.
- Chu, L. J., Chen, M. C., Setter, J. & other authors (2011).** New structural proteins of *Halobacterium salinarum* gas vesicle revealed by comparative proteomics analysis. *Journal of proteome research* **10**, 1170-1178.

- Cline, S. W. & Doolittle, W. F. (1987). Efficient transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *Journal of bacteriology* **169**, 1341-1344.
- Cline, S. W., Schalkwyk, L. C. & Doolittle, W. F. (1989). Transformation of the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *Journal of bacteriology* **171**, 4987-4991.
- Coker, J. A., DasSarma, P., Kumar, J., Muller, J. A. & DasSarma, S. (2007). Transcriptional profiling of the model Archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1: responses to changes in salinity and temperature. *Saline systems* **3**, 6.
- Danner, S. & Soppa, J. (1996). Characterization of the distal promoter element of halobacteria *in vivo* using saturation mutagenesis and selection. *Molecular microbiology* **19**, 1265-1276.
- DeLong, E. F. & Pace, N. R. (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic biology* **50**, 470-478.
- Dennis, P. P. (1997). Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**, 1007-1010.
- Dennis, P. P. & Shimmin, L. C. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **61**, 90-104.
- Dobson, C. M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in biochemical sciences* **24**, 329-332.
- Dym, O., Mevarech, M. & Sussman, J. L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeobacterium. *Science* **267**, 1344-1346.
- Eisenberg, H. & Wachtel, E. J. (1987). Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* **16**, 69-92.
- Eisenberg, H., Mevarech, M. & Zaccai, G. (1992). Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Advances in protein chemistry* **43**, 1-62.
- Elevi Bardavid, R., Khristo, P. & Oren, A. (2008). Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles : life under extreme conditions* **12**, 5-14.
- Englert, C., Horne, M. & Pfeifer, F. (1990). Expression of the major gas vesicle protein gene in the halophilic archaeobacterium *Haloferax mediterranei* is modulated by salt. *Molecular & general genetics : MGG* **222**, 225-232.
- Englert, C., Krüger, K., Offner, S. & Pfeifer, F. (1992a). Three different but related gene clusters encoding gas vesicles in halophilic archaea. *Journal of molecular biology* **227**, 586-592.
- Englert, C., Wanner, G. & Pfeifer, F. (1992b). Functional analysis of the gas vesicle gene cluster of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* defines the vac-region boundary and suggests a regulatory role for the *gvpD* gene or its product. *Molecular microbiology* **6**, 3543-3550.
- Englert, C. & Pfeifer, F. (1993). Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloferax mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins. *The Journal of biological chemistry* **268**, 9329-9336.
- Facciotti, M. T., Reiss, D. J., Pan, M. & other authors (2007). General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 4630-4635.
- Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E. & Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid-from bacteria to humans. *Trends in biochemical sciences* **32**, 217-224.
- Frolov, F., Harel, M., Sussman, J. L., Mevarech, M. & Shoham, M. (1996). Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nature structural biology* **3**, 452-458.

- Geiduschek, E. P. & Ouhammouch, M. (2005).** Archaeal transcription and its regulators. *Molecular microbiology* **56**, 1397-1407.
- Grabowski, B. & Kelman, Z. (2003).** Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annual review of microbiology* **57**, 487-516.
- Gregor, D. & Pfeifer, F. (2001).** Use of a halobacterial *bgaH* reporter gene to analyse the regulation of gene expression in halophilic archaea. *Microbiology* **147**, 1745-1754.
- Gunde-Cimermana, N., Zalarb, P., de Hoogc, S. & Plemenitasd, A. (2000).** Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS microbiology ecology* **32**, 235-240.
- Hain, J., Reiter, W. D., Hudepohl, U. & Zillig, W. (1992).** Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic acids research* **20**, 5423-5428.
- Hausner, W., Frey, G. & Thomm, M. (1991).** Control regions of an archaeal gene. A TATA box and an initiator element promote cell-free transcription of the tRNA(Val) gene of *Methanococcus vannielii*. *Journal of molecular biology* **222**, 495-508.
- Hausner, W. & Thomm, M. (1993).** Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*. *The Journal of biological chemistry* **268**, 24047-24052.
- Hechler, T. & Pfeifer, F. (2009).** Anaerobiosis inhibits gas vesicle formation in halophilic Archaea. *Molecular microbiology* **71**, 132-145.
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., Downing, K.H. (1990).** Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *Journal of molecular biology* **213**, 899-929.
- Hofacker, A. (2002).** Regulation der Gasvesikelbildung bei *Halobacterium salinarum* PHH1. Dissertation TU Darmstadt.
- Hofacker, A., Schmitz, K. M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2004).** GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the *p-gvp* genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* **150**, 1829-1838.
- Holmes, M. L. & Dyall-Smith, M. L. (1990).** A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaeobacteria. *Journal of bacteriology* **172**, 756-761.
- Holmes, M. L. & Dyall-Smith, M. L. (1991).** Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria. *Journal of bacteriology* **173**, 642-648.
- Holmes, M. L., Nuttall, S. D. & Dyall-Smith, M. L. (1991).** Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *Journal of bacteriology* **173**, 3807-3813.
- Holmes, M. L., Scopes, R. K., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Englert, C., Pfeifer, F. & Dyall-Smith, M. L. (1997).** Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochimica et biophysica acta* **1337**, 276-286.
- Horne, M., Englert, C. & Pfeifer, F. (1988).** Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. *Molecular & general genetics : MGG* **213**, 459-464.
- Horne, M. & Pfeifer, F. (1989).** Expression of two gas vacuole protein genes in *Halobacterium halobium* and other related species. *Molecular & general genetics : MGG* **218**, 437-444.
- Horne, M., Englert, C., Wimmer, C. & Pfeifer, F. (1991).** A DNA region of 9 kbp contains all genes necessary for gas vesicle synthesis in halophilic archaeobacteria. *Molecular microbiology* **5**, 1159-1174.

- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A. & Zillig, W. (1983). Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *The EMBO journal* **2**, 1291-1294.
- Kandler, O. & König, H. (1998). Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **54**, 305-308.
- Karadzic, I. M. & Maupin-Furlow, J. A. (2005). Improvement of two-dimensional gel electrophoresis proteome maps of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Proteomics* **5**, 354-359.
- Könneke, M. Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**, 543-546.
- Krüger, K. & Pfeifer, F. (1996). Transcript analysis of the c-vac region and differential synthesis of the two regulatory gas vesicle proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarium* PHH4. *Journal of bacteriology* **178**, 4012-4019.
- Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D. & Ebright, R. H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes & development* **12**, 34-44.
- Lam, W. L. & Doolittle, W. F. (1989). Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 5478-5482.
- Lange, C., Zaigler, A., Hammelmann, M., Twellmeyer, J., Raddatz, G., Schuster, S. C., Oesterhelt, D. & Soppa, J. (2007). Genome-wide analysis of growth phase-dependent translational and transcriptional regulation in halophilic archaea. *BMC genomics* **8**, 415.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. & Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5768-5772.
- Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological reviews* **38**, 272-290.
- Large, A., Stamme, C., Lange, C., Duan, Z., Allers, T., Soppa, J., Lund, P.A. (2007). Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene. *Molecular microbiology* **66**, 1092-1106.
- Larsen, H., Omang, S. & Steensland, H. (1967). On the gas vacuoles of the halobacteria. *Archiv für Mikrobiologie* **59**, 197-203.
- Madern, D., Pfister, C. & Zaccai, G. (1995). Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *European journal of biochemistry / FEBS* **230**, 1088-1095.
- Madern, D., Ebel, C. & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles : life under extreme conditions* **4**, 91-98.
- Madigan, M. T. & Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current opinion in microbiology* **2**, 265-269.
- Marschall, L. & Pfeifer, F. (2012). A dual promoter region with overlapping activator sequences drives the expression of gas vesicle protein genes in haloarchaea. *Microbiology* **158**, 2815-2825.
- Mayr, A. & Pfeifer, F. (1997). The characterization of the *nv-gvpACNOFGH* gene cluster involved in gas vesicle formation in *Natronobacterium vacuolatum*. *Archives of microbiology* **168**, 24-32.

- Mwatha, W.E. & Grant, W.D. (1993).** *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from Lake Magadi, Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**, 401-404.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G. & other authors (2000).** Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12176-12181.
- Nomura, S. & Harada, Y. (1998).** Functional expression of green fluorescent protein derivatives in *Halobacterium salinarum*. *FEMS microbiology letters* **167**, 287-293.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1971).** Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature: New biology* **233**, 149-152.
- Oesterhelt, D. & Stockenius, W. (1973).** Functions of a new photoreceptor membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 2853-2857.
- Offner, S. & Pfeifer, F. (1995).** Complementation studies with the gas vesicle-encoding p-vac region of *Halobacterium salinarium* PHH1 reveal a regulatory role for the p-*gvpDE* genes. *Molecular microbiology* **16**, 9-19.
- Offner, S., Wanner, G. & Pfeifer, F. (1996).** Functional studies of the *gvpACNO* operon of *Halobacterium salinarium* reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *Journal of bacteriology* **178**, 2071-2078.
- Offner, S., Hofacker, A., Wanner, G. & Pfeifer, F. (2000).** Eight of fourteen *gvp* genes are sufficient for formation of gas vesicles in halophilic archaea. *Journal of bacteriology* **182**, 4328-4336.
- Oren, A. (1999).** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **63**, 334-348.
- Palmer, B. R. & Marinus, M. G. (1994).** The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*-a review. *Gene* **143**, 1-12.
- Palmer, J. R. & Daniels, C. J. (1995).** *In vivo* definition of an archaeal promoter. *Journal of bacteriology* **177**, 1844-1849.
- Petrovic, U., Gunde-Cimerman, N. & Plemenitas, A. (2002).** Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molecular microbiology* **45**, 665-672.
- Pfeifer, F. & Ghahraman, P. (1993).** Plasmid pHH1 of *Halobacterium salinarium*: characterization of the replicon region, the gas vesicle gene cluster and insertion elements. *Molecular & general genetics : MGG* **238**, 193-200.
- Pfeifer, F., Griffig, J. & Oesterhelt, D. (1993).** The *fdx* gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarium* (*H. halobium*). *Molecular & general genetics : MGG* **239**, 66-71.
- Pfeifer, F., Offner, S., Krüger, K., Ghahraman P., Englert, C. (1994).** Transformation of halophilic archaea and investigation of gas-vesicle synthesis. *Systematic and applied microbiology* **16**, 569-577.
- Pfeifer, F., Krüger, K., Röder, R., Mayr, A., Ziesche, S., Offner, S. (1997).** Gas vesicle formation in halophilic Archaea. *Archives of microbiology* **167**, 259-268.
- Pfeifer, F. (2012).** Distribution, formation and regulation of gas vesicles. *Nature reviews Microbiology* **10**, 705-715.
- Pfeiffer, F., Schuster, S. C., Broicher, A. & other authors (2008).** Evolution in the laboratory: the genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1. *Genomics* **91**, 335-346.
- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M. & Herzberg, O. (1998).** Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure* **6**, 75-88.

- Pire, C., Esclapez, J., Ferrer, J., Bonete, M.J. (2001). Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS microbiology letters* **200**, 221-227.
- Qureshi, S. A. & Jackson, S. P. (1998). Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Molecular cell* **1**, 389-400.
- Reiter, W. D., Hudepohl, U. & Zillig, W. (1990). Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 9509-9513.
- Reuter, C. J. & Maupin-Furlow, J. A. (2004). Analysis of proteasome-dependent proteolysis in *Haloferax volcanii* cells, using short-lived green fluorescent proteins. *Applied and environmental microbiology* **70**, 7530-7538.
- Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E. & Lake, J. A. (1998). Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6239-6244.
- Roder, R. & Pfeifer, F. (1996). Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of *Haloferax mediterranei* and identification of the endogenous transcriptional activator gene. *Microbiology* **142** (Pt 7), 1715-1723.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook & Russell (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Third Edition, Cold Spring Harbor, New York.
- Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2004). *In vivo* studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Molecular microbiology* **51**, 579-588.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **166**, 368-379.
- Scheuch, S., Marschaus, L., Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2008). Regulation of *gvp* genes encoding gas vesicle proteins in halophilic Archaea. *Archives of microbiology* **190**, 333-339.
- Schmidt, I. & Pfeifer, F. (2013). Use of GFP-GvpE fusions to quantify the GvpD-mediated reduction of the transcriptional activator GvpE in haloarchaea. *Archives of microbiology* **195**, 403-412.
- Shear, H. & Walsby, A.E. (1975). An investigation into the possible light-shielding role of gas vacuoles in a planctonic blue-green algae. *British Phycological Journal* **10**, 241-251.
- Shukla, H. D. & DasSarma, S. (2004). Complexity of gas vesicle biogenesis in *Halobacterium* sp. strain NRC-1: identification of five new proteins. *Journal of bacteriology* **186**, 3182-3186.
- Sivertsen, A. C., Bayro, M. J., Belenky, M., Griffin, R. G. & Herzfeld, J. (2010). Solid-state NMR characterization of gas vesicle structure. *Biophysical journal* **99**, 1932-1939.
- Smith, A.M. & Scheibel, T. (2010). Functional amyloids used by organisms: a lesson in controlling assembly. *Macromolecular Chemistry and Physics* **211**, 127-135.

- Soppa, J. & Link, T. A. (1997).** The TATA-box-binding protein (TBP) of *Halobacterium salinarum*. Cloning of the *tbp* gene, heterologous production of TBP and folding of TBP into a native conformation. *European journal of biochemistry/FEBS* **249**, 318-324.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* **98**, 503-517.
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, T., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D.A., Wagner, M., Schleper, C. (2010).** Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends in Microbiology* **18(8)**, 331-340.
- Sremac, M. & Stuart, E. S. (2008).** Recombinant gas vesicles from *Halobacterium* sp. displaying SIV peptides demonstrate biotechnology potential as a pathogen peptide delivery vehicle. *BMC biotechnology* **8**, 9.
- Sremac, M. & Stuart, E. S. (2010).** SIVsm Tat, Rev, and Nef1: functional characteristics of r-GV internalization on isotypes, cytokines, and intracellular degradation. *BMC biotechnology* **10**, 54.
- Staley, J. T., Irgens, R. L. & Herwig, R. P. (1989).** Gas vacuolate bacteria from the sea ice of antarctica. *Applied and environmental microbiology* **55**, 1033-1036.
- Stoeckenius, W. & Kunau, W.H. (1968).** Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *The Journal of cell biology* **38**, 337-357.
- Strunk, T., Hamacher, K., Hoffgaard, F., Engelhardt, H., Zillig, M. D., Faist, K., Wenzel, W. & Pfeifer, F. (2011).** Structural model of the gas vesicle protein GvpA and analysis of GvpA mutants *in vivo*. *Molecular microbiology* **81**, 56-68.
- Stuart, E. S., Morshed, F., Sremac, M. & DasSarma, S. (2001).** Antigen presentation using novel particulate organelles from halophilic archaea. *Journal of biotechnology* **88**, 119-128.
- Stuart, E. S., Morshed, F., Sremac, M. & DasSarma, S. (2004).** Cassette-based presentation of SIV epitopes with recombinant gas vesicles from halophilic archaea. *Journal of biotechnology* **114**, 225-237.
- Sundararajan, A. & Ju, L. K. (2000).** Evaluation of oxygen permeability of gas vesicles from cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Journal of biotechnology* **77**, 151-156.
- Sundararajan, A. & Ju, L. K. (2006).** Use of cyanobacterial gas vesicles as oxygen carriers in cell culture. *Cytotechnology* **52**, 139-149.
- Tavlaridou, S., Faist, K., Weitzel, K. & Pfeifer, F. (2013).** Effect of an over-production of accessory Gvp proteins on gas vesicle formation in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles: life under extreme conditions* **17**, 277-287.
- Teufel, K., Bleiholder, A., Griesbach, T. & Pfeifer, F. (2008).** Variations in the multiple *tbp* genes in different *Halobacterium salinarum* strains and their expression during growth. *Archives of microbiology* **190**, 309-318.
- Thomm, M. (1996).** Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS microbiology reviews* **18**, 159-171.
- Turkarlan, S., Reiss, D. J., Gibbins, G., Su, W. L., Pan, M., Bare, J. C., Plaisier, C. L. & Baliga, N. S. (2011).** Niche adaptation by expansion and reprogramming of general transcription factors. *Molecular systems biology* **7**, 554.

-
- von Hippel, P. & Schleich, T. (1969).** The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In: Timasheff, S.N. & Fasman, G.D. (eds) *Structure of biological macromolecules*. Dekker, I New York, pp. 417-575.
- Walker, C.B. and other authors (2010).** *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine Crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 8818-8823.
- Walsby, A. E. (1994).** Gas vesicles. *Microbiological reviews* **58**, 94-144.
- Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**, 221-271.
- Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **74**, 5088-5090.
- Woese, C. R., Magrum, L. J. & Fox, G. E. (1978).** Archaeobacteria. *Journal of molecular evolution* **11**, 245-251.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4576-4579.
- Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. & Tanaka, N. (2002).** The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nature stru*
- Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., Borochoy, N. & Eisenberg, H. (1989).** Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *Journal of molecular biology* **208**, 491-500.
- Zaigler, A., Schuster, S. C. & Soppa, J. (2003).** Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Molecular microbiology* **48**, 1089-1105.
- Zimmermann, P. & Pfeifer, F. (2003).** Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE. *Molecular microbiology* **49**, 783-794.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

| | |
|--------------------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| Ak | Antikörper |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BRE | <i>transcription factor B recognition element</i> |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | Konzentration |
| C | Cytosin in Nukleinsäuresequenzen, Cystein in Aminosäuresequenzen |
| C-Terminus | Ende eines Proteins oder Polypeptids mit einer freien Carboxylgruppe |
| CTP | Cytosin-5'-triphosphat |
| °C | Grad Celsius |
| D | Asparaginsäure in Aminosäuresequenzen |
| Da | Dalton |
| ddH ₂ O | Doppelt deionisiertes Wasser |
| DIG | Digoxygenin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| E | Glutaminsäure in Aminosäuresequenzen |
| EDTA | Ethylen Diamin Tetra Essigsäure |
| ex | Expression unter der Kontrolle des <i>fdx</i> -Promotors in pJAS35 |
| <i>et al.</i> | und andere |
| <i>fdx</i> | Ferredoxin-Gen |
| g | Gramm |
| G | Guanin in Nukleinsäuresequenzen, Glycin in Aminosäuresequenzen |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| <i>gvp</i> | <i>gas vesicle protein</i> -Gen |

| | |
|-------------|---|
| Gvp | gas vesicle protein |
| h | Stunde |
| <i>Hbt.</i> | <i>Halobacterium</i> |
| <i>Hfx.</i> | <i>Haloferax</i> |
| I | Isoleucin in Aminosäuresequenzen |
| IPTG | Isopropyl-b-D-thiogalaktosid |
| K | Lysin in Aminosäuresequenzen |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| L | Leucin in Aminosäuresequenzen |
| m | mili |
| M | Molar, Methionin in Aminosäuresequenzen |
| μ | micro |
| mg | Miligramm |
| min | Minute |
| μ l | Mikroliter |
| mM | milimolar |
| μ m | Mikrometer |
| mRNA | Boten (messenger) Ribonukleinsäure |
| mU | mili Unit |
| Mut | gentechnisch verändertes Gen oder Protein |
| n | nano |
| N | Asparagin in Aminosäuresequenzen |
| N-Terminus | Ende eines Proteins oder Polypeptids mit freier Aminogruppe |
| NaCl | Natriumchlorid |
| nm | Nanometer |
| nt | Nukleotide |
| NTA | Nitrilotriessigsäure |
| OD | optische Dichte |
| P | Prolin in Aminosäuresequenzen |
| PAGE | Poly-Acrylamid Gel-Elektrophorese |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |

| | |
|-------|---|
| R | Arginin in Aminosäuresequenzen, Adenin oder Guanin in Nukleinsäuresequenzen |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rRNA | ribosomale Nukleinsäure |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| SSC | Sodium Saline Citrat |
| T | Thymin in Nukleinsäuresequenzen, Threonin in Aminosäuresequenzen |
| TBP | TATA-Box-Bindeprotein |
| TEMED | Tetra-methyl-ethylen-diamin |
| TFB | Transkriptionsfaktor B |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit |
| rpm | rounds per minute |
| V | Volt, Valin in Aminosäuresequenzen |
| Vac | Gasvesikelphänotyp |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| VM | Vollmedium |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| W | Adenin oder Thymin in Nukleinsäuresequenzen |
| WT | Wildtyp |
| Y | Thyrosin in Aminosäuresequenzen, Cytosin oder Thymin |
| z. B. | zum Beispiel |

7.2. Publikationen

Publikationen in wissenschaftlichen Journalen:

Tavlaridou, S., Faist, K., Weitzel, K., Pfeifer, F. (2013).

Effect of an overexpression of accessory Gvp proteins on gas vesicle formation in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* **17**, 277-287.

Publikationen auf wissenschaftlichen Kongressen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden regelmäßig auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

- Posterpräsentation auf der Tagung der "Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie" (VAAM) in Karlsruhe, 3.-6. April 2011
- Vortrag auf der Jahrestagung "Genomfunktion und Genregulation in Archaea" in Wiesbaden-Naurod, 21.-22. September 2011
- Posterpräsentation auf der Tagung der "Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie" (VAAM) in Tübingen, 18.-21. März 2012
- Posterpräsentation auf der Tagung der "Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie" (VAAM) in Bremen, 10.-13. März 2013

7.3. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer im Fachbereich Biologie, Fachgebiet Mikrobiologie und Archaea, der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von April 2010 bis September 2013 angefertigt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, 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 übernommene Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 26.09.2013

(Stella Tavlaridou)