

# Untersuchungen zur Regulation von Promotoren aus halophilen Archaea mit dem *bgaH*-Reportergen

vom Fachbereich Biologie der  
Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Dagmar Gregor  
aus Darmstadt

Berichterstatlerin:	Prof. Dr. Felicitas Pfeifer Mikrobiologie, TU Darmstadt
Mitberichterstatlerin:	Prof. Dr. Kathryn Nixdorff Mikrobiologie, TU Darmstadt
Tag der Einreichung:	19. September 2002
Tag der mündlichen Prüfung:	26. November 2002

Darmstadt 2002  
D17

# DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer für die Anregung zu dieser Arbeit, für die gute Betreuung, die Diskussionen und Denkanstöße.

Bei Herrn Prof. Dr. Jobst Gmeiner möchte ich mich bedanken, dass er immer als humorvoller „Feuerwehrmann“ zur Stelle war, sei es beim Beschaffen der Materialien oder bei irgendwelchen kleinen oder größeren Katastrophen

Meinen Freunden und Kollegen Annette Hofacker und Peter Zimmermann danke ich sehr für die vielen fruchtbaren Diskussionen, dafür, dass sie meine Freunde sind mit Tränen oder Lachen im Gesicht. Vor allem möchte ich mich für die große Unterstützung in den letzten Tagen bedanken.

Den beiden Diplomandinnen Kerstin Schmitz und Kerstin Castorph danke ich zum einen für großes Engagement im Rahmen ihres GPII, für ihre ansteckende Fröhlichkeit und ihre Freundschaft.

Bei HD Dr. Arnulf Kletzin möchte ich mich besonders bedanken, dass er bei jedem Problem im Labor oder am Computer zuhört und hilft. HD Dr. Christa Schleper danke ich für fachliche Tipps und Diskussionen.

Meinen Kollegen Simone Neef, Petra Plößer, Erika Martusewitsch, Melanie Jonuscheit, Torsten Ochsenreiter, Achim Quaiser, Alexander Treusch, Tim Urich und Karin Lauber für das äußerst angenehme und kollegiale Arbeitsklima danken.

Ein weiteres Dankeschön gilt den guten Seelen vom Labor Bettina Basso, Renate Fröhlich, Silvia Haase und Gaby Liebing, mit denen es immer ein sehr angenehmes Arbeiten war. Bei Gaby möchte ich mich besonders bedanken, dass sie mir in einer privaten schweren Zeit zur Seite gestanden hat. Den beiden Spülchefs Cordula Bernhard und Nam-Suk Polin sowie den Sekretärinnen Karin Papalau und Irmi Ose-Kopetzky danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die große Unterstützung. Die Grillfeste werden mir auch immer in Erinnerung bleiben.

Der Studentin Larissa Kerckhoff danke ich für engagierte Mitarbeit im Rahmen ihres GPII.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir immer wieder Mut gemacht hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Patrick Pankert bedanken. Seit wir uns kennen durchlebt er alle Hochs und Tiefs, sei es privat oder beruflich mit mir. Gewisse Launen erträgt er mit Fassung und versucht immer wieder mich aufzubauen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
Anpassung an hohe Salzkonzentrationen	5
Phylogenie und Vorkommen der Halobakterien	7
Physiologie	8
Gasvesikel	9
Gasvesikelkodierende Gene	10
Archaeale Transkription	13
Regulation der Transkription	18
Regulation der Gasvesikelbildung	19
Reportergene	21
Ziel dieser Arbeit	23
<b>MATERIAL und METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>Material</b>	<b>24</b>
Besondere Materialien	24
Synthetische Oligonukleotide	25
Verwendete Organismen	28
Verwendete Plasmide	28
<b>Methoden</b>	<b>29</b>
Wachstumsbedingungen	29
Transformation von <i>Haloferax volcanii</i> WFD11	29
Herstellung von DNA-Konstrukten zur Transformation von <i>Haloferax volcanii</i>	
WFD11	29
<i>gvpA</i> -Promotoren	30
<i>In-vitro</i> -Mutagenese-PCR	30
mutierte cA-Promotorsequenzen	32
chimäre pA-cA-Promotoren	32
cA-pA-BRE-/TATA-Promotormutanten	33
mutierte mcA-Promotorsequenzen	34
mcA-Promotor-Deletionsmutanten	34
mcA-Promotor-Substitutionsmutanten	34

<i><b>gvpE-Konstrukte</b></i>	35
<b>Isolierung halobakterieller RNA</b>	36
<b>Northern-Analysen</b>	36
<b>Hybridisierung strangspezifischer Sonden mit RNA auf Northern-Membran</b>	37
<b>DNA-Isolierung</b>	37
<b>Southern-Analysen</b>	38
<b>Sequenzanalyse</b>	38
<b>Molekularbiologische Standardmethoden</b>	39
<b>Herstellung von halobakteriellen Rohextrakten für Proteinuntersuchungen</b>	39
a) <b>Herstellung von Rohextrakten zur Bestimmung der Proteinkonzentration</b>	39
b) <b>Herstellung von Rohextrakten zur Western-Analyse</b>	39
<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	39
<b>Western-Analyse</b>	40
<b>Proteindetektion durch Chemilumineszenz</b>	40
<b>Proteinbestimmung nach Bradford</b>	41
<b>Analyse der <math>\beta</math>-Galaktosidase-Aktivität</b>	41
a) <b>X-Gal-Test</b>	41
b) <b>ONPG-Test</b>	41
<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>1) Untersuchungen der <i>gvpA</i>-Promotoren mit dem <i>bgaH</i>-Reportergen</b>	43
<b>Reportergenfusion in den drei verschiedenen <i>gvpA</i>-Leserahmen</b>	43
<b>Überprüfung der <math>\beta</math>-Galaktosidase Aktivität mit X-Gal</b>	44
<b>Quantifizierung der <math>\beta</math>-Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des ONPG-Tests</b>	46
a) <b>Analyse des <i>mcA</i>-Promotors</b>	46
b) <b>Analyse des <i>pA</i>-Promotors</b>	49
c) <b>Analyse des <i>cA</i>-Promotors</b>	52
d) <b>Analyse der <i>bgaH</i>-mRNA und der <math>\beta</math>-Galaktosidase-Aktivität über das gesamte Wachstum</b>	55
<b>2) Untersuchungen zur Stärke des <i>fdx</i>-Promotors</b>	58
<b>3) Untersuchungen an der TATA-Box und dem BRE-Element</b>	60
<b>4) Suche nach der GvpE-Bindestelle in der <i>gvpA</i>-Promotorsequenz</b>	65
a) <b>chimäre <i>pA-cA</i>-Promotoren</b>	65

b) Varianten des chimären pA-cA-Promotors	68
c) Mutationen in der palindromischen Sequenz des cA-Promotors	73
d) Mutationen in der palindromischen Sequenz des mcA-Promotors	77
e) Durchgängige Deletionsanalyse im mcA-Promotor	79
f) Substitutionsmutagenese im mcA-Promotor	83
5) Untersuchungen zur salzabhängigen Genregulation	88
<b>DISKUSSION</b>	<b>94</b>
1) Untersuchungen der A-Promotoren mit dem <i>bgaH</i> -Reportergen	95
2) Untersuchungen zur Stärke des <i>fdx</i> -Promotors	97
3) TATA-Box- und BRE-Element-Vergleich	98
4) Untersuchungen an TATA-Box und BRE-Element der A-Promotoren	99
5) Suche nach der GvpE-Bindestelle auf der DNA-Sequenz der A-Promotoren	100
a) Aktivität eines chimären pA-cA-Promotors	100
b) Mutationen in der palindromischen Sequenz des cA-Promotors	104
c) mcA-Promotormutanten	105
Mutationen in der palindromischen Sequenz	105
Durchgängige Deletionsanalyse im mcA-Promotor	107
Substitutionsmutagenese im mcA-Promotor	109
6) Untersuchungen zur Regulation durch die Salzkonzentration	111
7) Abschlussfazit	114
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>115</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>123</b>
<b>ANHANG</b>	<b>124</b>
Lebenslauf	124
Erklärung	125

## ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die Promotoren der Gene *p-gvpA*, *c-gvpA* und *fdx* aus *Halobacterium salinarum* und des *mc-gvpA*-Gens aus *Haloferax mediterranei* mit dem *bgaH*-Reportergensystem untersucht. Die *gvpA*-Promotoren stammen aus den entsprechenden *vac*-Regionen, die für die Bildung von Gasvesikeln notwendig sind. Innerhalb der *vac*-Regionen sind die Gene *gvpACNO*, mit *gvpA* für das Hauptstrukturprotein GvpA, in eine Richtung orientiert, während die Gene *gvpDEFGHIJKLM*, mit *gvpE* für den Aktivator GvpE, genauwärts von *gvpA* in entgegengesetzter Richtung liegen.

Der Promotor von *p-gvpA* (*pA*-Promotor) ist konstitutiv während der gesamten Wachstumsphase aktiv, wohingegen der Promotor von *c-gvpA* (*cA*-Promotor) und der von *mc-gvpA* (*mcA*-Promotor) nur während der stationären Wachstumsphase aktiv sind und für eine effiziente Transkription den Aktivator cGvpE bzw. mcGvpE benötigen. Die Stärke der *gvpA*-Promotoren aus den drei *vac*-Regionen wurde quantifiziert und die Regulation ihrer Transkription näher untersucht. Dazu wurden die Promotoren mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert und die basalen Aktivitäten der *gvpA*-Promotoren in *Haloferax volcanii*-Transformanten ermittelt. Es zeigte sich, dass der *pA*-Promotor konstitutiv aktiv war, der *mcA*-Promotor eine geringe Aktivität besaß und der *cA*-Promotor keine basale Aktivität hatte. Ebenso wurde die Aktivität der drei *gvpA*-Promotoren bei Anwesenheit des GvpE-Aktivatorproteins in *Hf. volcanii*-Transformanten bestimmt. Es wurde dabei die Wirkung aller drei verschiedenen GvpE-Aktivatorproteine auf alle drei verschiedenen *gvpA*-Promotoren untersucht. Sowohl der *mcA*-Promotor als auch der *pA*-Promotor waren durch die drei GvpE-Proteine pGvpE, mcGvpE und cGvpE aktivierbar. Der *cA*-Promotor war dagegen nur durch das homologe cGvpE aktivierbar. Im Vergleich der Promotoren war der *mcA*-Promotor am stärksten aktivierbar, wohingegen der *cA*-Promotor am schwächsten aktivierbar war.

Die basale Aktivität der *gvpA*-Promotoren wurde aber auch mit dem Ferredoxin-Promotor (*fdx*-Promotor) aus *Hb. salinarum* verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass vom konstitutiv aktiven *fdx*-Promotor eine sehr effiziente Transkription ausging, vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Aktivität des *fdx*-Promotors war fast 400-fach höher bzw. über 1000-fach höher als die basale Aktivität des *pA*- bzw. des *mcA*-Promotors. Wenn alle drei *gvpA*-Promotoren durch cGvpE induziert waren, war die *fdx*-Promotor-Aktivität noch höher. In der exponentiellen Wachstumsphase war die Aktivität des *fdx*-Promotors

beispielsweise etwa um das 7-fache höher als die des induzierten *mcA*-Promotors, in der spätstationären Wachstumsphase war sie dagegen nur noch ca. 1,5-fach höher.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität war über 400 h Wachstum stabiler als die *bgaH*-mRNA. Während in der exponentiellen und der frühen stationären Wachstumsphase (zwischen 24 und 155 h) große Mengen an *bgaH*-mRNA gebildet wurden, war in der spät stationären Wachstumsphase (ab 185 h) keine *bgaH*-mRNA mehr detektierbar. Im Vergleich dazu stieg die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität parallel mit der Zunahme an *bgaH*-mRNA-Menge in der exponentiellen Wachstumsphase an, blieb auf dem hohen Level und nahm nicht deutlich ab.

An den A-Promotoren wurden auch die konservierten Sequenzen des BRE-Elements und der TATA-Box verändert, um zu testen ob diese Veränderungen einen Einfluss auf die basale Aktivität der Promotoren haben. Dem *cA*-Promotor, der eine kaum konservierte TATA-Box besitzt, wurde durch Substitutionsmutation ein gut konservierte TATA-Box eingefügt, bzw. sie wurde durch die gut konservierte TATA-Box des *pA*-Promotors ersetzt. Dieser mutierte *cA*-Promotor hatte zwar keine basale Aktivität, war aber besser durch GvpE aktivierbar. Eine gut konservierte TATA-Box reichte also nicht aus, um dem *cA*-Promotor eine basale Aktivität zu vermitteln. Ähnlich verhielt es sich mit dem BRE-Element. Der *cA*-Promotor besitzt ein kaum sichtbares BRE-Element und der *pA*-Promotor ein gut konserviertes. Wurde das BRE-Element des *cA*-Promotors durch das entsprechende des *pA*-Promotors ersetzt, bzw. sowohl das BRE-Element als auch die TATA-Box im *cA*-Promotor gegen die entsprechenden Elemente des *pA*-Promotors ausgetauscht, zeigte der *cA*-Promotor nie basale Aktivität, war aber in beiden Fällen besser durch GvpE aktivierbar. Somit genügten weder eine gut konservierte TATA-Box, noch ein gut konserviertes BRE-Element, noch die Kombination aus beiden, damit der *cA*-Promotor eine basale Aktivität zeigt. Alle Varianten führten aber zu einer verbesserten Aktivierbarkeit durch GvpE.

Mit Hilfe von Mutationen innerhalb der *gvpA*-Promotoren wurde ein Bereich auf den *gvpA*-Promotoren identifiziert, der wichtig für die Aktivierung der Promotoren durch das GvpE-Protein ist. Es wurde ein chimärer *pA-cA*-Promotor, der die Sequenz des *cA*-Promotors, aber ein 21 nt langer DNA-Abschnitt strangauf der TATA-Box des *cA*-Promotors durch die entsprechende DNA-Sequenz des *pA*-Promotors ersetzt enthielt, konstruiert. In diesem 21 nt langen DNA-Abschnitt war auch das BRE-Element, das direkt stromauf des *pA*-Promotors liegt, enthalten. Mit diesem *pA-cA*-Promotor konnte gezeigt werden, dass diese 21 nt lange *pA*-Promotor-Sequenz ausreichend für eine Aktivierung durch GvpE war und damit auch die GvpE Bindestelle beinhaltete. Es konnte ebenfalls die Wichtigkeit eines gut konservierten BRE-Elements bei der Aktivierung durch GvpE verdeutlicht werden.

Der cA-Promotor enthält eine palindromische Sequenz strangauf der TATA-Box, die mutiert wurde, um den Wechselwirkungsbereich zwischen GvpE und Promotor näher zu untersuchen. Zum einen wurden drei Nukleotide zwischen den beiden Palindromhälften deletiert oder mehrere Nukleotide innerhalb der palindromischen Sequenz substituiert. Die Deletion bewirkte den Verlust der Aktivierbarkeit des cA-Promotors durch cGvpE. Bei den Substitutionsmutationen zeigte sich, dass bestimmte Nukleotide des Palindroms scheinbar unnötig für die Aktivierbarkeit waren, andere beeinflussten die Aktivierbarkeit.

Auch der mcA-Promotor wurde durch Deletionen und Substitutionen verändert sowie an einer palindromischen Sequenz mutiert. Eine Deletion von drei Nukleotiden zwischen den Palindromhälften resultierte in dem Verlust der Aktivierung durch mcGvpE, während die basale Aktivität des mcA-Promotors dagegen unverändert blieb. Der Austausch von mehreren Nukleotiden innerhalb des Palindroms hatte weder Einfluss auf die basale Aktivität des mcA-Promotors noch auf seine Aktivierbarkeit. Der mcA-Promotor wurde auch mit Hilfe eines 7 nt *deletionscanning* über eine 49 nt lange Sequenz strangauf der TATA-Box analysiert. Deletionen, die nahe der TATA-Box lagen, hatten eine drastische Auswirkung auf die Aktivierbarkeit, während die weiter stromauf gelegenen weniger bis keinen Verlust der Aktivierung durch cGvpE bedeuteten. Es wurden 28 nt stromauf der TATA-Box, die auch das BRE-Element enthielten, identifiziert, die besonders wichtig für die Aktivierung durch GvpE waren. Erneut konnte gezeigt werden, dass das BRE-Element wichtig für die Aktivierung durch das GvpE-Protein war. Auch ein Abtasten des Bereichs durch 4 nt lange Substitutionsmutationen über 34 nt strangauf des BRE-Elements konnte zeigen, dass ca. 20 nt angrenzend an das BRE-Element wichtig für die GvpE-Aktivierung waren. Damit wurden die Ergebnisse aus der Deletionsanalyse bestätigt.

Auch der Einfluss der Salzkonzentration auf den mcA-Promotor aus *Hf. mediterranei* sowie auf den pA-Promotor und den *fdx*-Promotor aus *Hb. salinarum* wurde analysiert. Es stellte sich heraus, dass sowohl die basale Aktivität, als auch die durch mcGvpE induzierte Aktivität des mcA-Promotors bei 25% Salz im Medium höher war als bei 20% Salz. Bei 15% Salz im Medium zeigte der mcA-Promotor dagegen keine Aktivität. Die basale Aktivität des pA-Promotors und die durch pGvpE induzierte waren dagegen bei 20 und 25% Salz im Medium in etwa gleich. Bei 15% Salz war ebenfalls keine Aktivität vorhanden. Der *fdx*-Promotor dagegen war bei allen drei Salzkonzentration aktiv. Eine Regulation durch die Salzkonzentration zeigte sich demnach sowohl beim mcA- als auch beim pA-Promotor.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

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

Pfeifer F, Gregor D, Hofacker A, Plößer P & Zimmermann P (2002). Regulation of gas vesicle formation in halophilic archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 175-181

## **EINLEITUNG**

Halophilie bedeutet direkt übersetzt Salzliebe. Halophile Organismen lieben das Salz, das heißt sie sind nicht nur an höhere Salzkonzentrationen angepasst, sondern benötigen das Salz, um zu überleben. Sie leben in hypersalinen Habitaten mit NaCl-Konzentrationen nahe der Sättigung wie in Salzseen oder Salinen. In allen drei Domänen des Lebens sind halophile Mikroorganismen zu finden. Vertreter der Eukaryonten sind verschiedene Spezies der Grünalge *Dunaliella*, die bei 5 M NaCl (30%) wachsen kann. Meerwasser hat im Vergleich dazu eine Konzentration von etwa 0,6 M (3,5%) NaCl (Avron, 1986). Mikrobielle Matten, die halophile Bakterien wie Cyanobakterien, Purpur-Schwefel-Bakterien und andere enthalten, kommen oft in Salzseen mit einem geringeren Salzgehalt bis zu 250 g/l vor. Andere Vertreter der Bakterien sind die anaeroben Halophilen der Ordnung Haloanaerobiales wie z.B. *Haloanaerobium praevalens* (Oren, 1999). Die halophilen Archaea der Ordnung Halobacteriales benötigen mindestens 1,5 M (9%) NaCl für ihr Wachstum; die meisten wachsen optimal bei NaCl-Konzentrationen zwischen 3,5 und 4,5 M (21 bis 27%), und sie wachsen auch noch gut im Sättigungsbereich von 5,2 M NaCl. Überall dort, wo solch hohe Konzentrationen an NaCl auftreten, findet man die Halobakterien. Man kann sogar sagen, dass sie die dominierende Population werden, sobald die Salzkonzentration eine Molarität von mindestens 2,5 erreicht (Norton, 1992; Grant & Larsen, 1989). Je höher die Salzkonzentration ist, desto dichter wird ihre Population.

### **Anpassung an hohe Salzkonzentrationen**

Die Anwesenheit von hohen Konzentrationen an löslichen Ionen zerstört normalerweise Proteine und Makromoleküle. Die Proteine aggregieren oder ihre Struktur kollabiert aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen. Die Ladungen stören die essentiellen elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb oder zwischen Makromolekülen. Die Verfügbarkeit von Wasser, das für biologische Prozesse notwendig ist, wird durch die Hydratisierung der Salzionen reduziert. (Dennis & Shimmin, 1997; Lanyi, 1974; Yancey et al., 1982). Da biologische Membranen wasserdurchlässig sind, würde dies für halophile Organismen bedeuten, dass ihre Zellen Wasser abgeben müssten. Die Organismen haben deshalb zwei unterschiedliche Strategien entwickelt, um sich an hohe Salzkonzentrationen im Außenmedium anzupassen.

Bei der sogenannten *compatible-solute* Strategie wird der osmotische Druck des Mediums durch organische *compatible solutes* ausgeglichen, und das intrazelluläre System muss sich nicht besonders an erhöhte Salzkonzentrationen anpassen. Die *compatible solutes* werden definiert als *solutes*, also lösliche Moleküle, die selbst bei hohen Konzentrationen die Enzymaktivität nicht beeinflussen und sozusagen mit dieser kompatibel sind. Es gibt eine ständig wachsende Liste an *compatible solutes*. Dazu zählen z.B. Polyole (Glycerol, Arabitol), Zucker, Zuckerderivate, Aminosäuren (Oren, 1999). Die Grünalge *Dunaliella* synthetisiert beispielsweise Glycerin als Osmoregulator (Avron, 1986). Einige bakterielle und eukaryotische Mikroorganismen verwenden diese *compatible solutes* in Kombination mit Ionenpumpen, um eine niedrige intrazelluläre *compatible solute*-Konzentration aufrecht zu halten, damit Proteine und Makromoleküle vor zu hoher Osmolarität geschützt sind. Diese Strategien sind allerdings nur effektiv in moderat halophiler Umgebungen mit Konzentrationen von bis zu 1,5 M Salz (Dennis & Shimmin, 1997).

Bei der *salt-in* Strategie werden dagegen im Zellinnern Salzkonzentrationen erreicht, die äquivalent zu denen im Außenmedium sind (Oren, 1999). Diese Strategie verfolgen die halophilen Archaea, die als einzige bis jetzt bekannte Mikroorganismen hypersaline Habitate besiedeln können, die eine Konzentration von 2 bis 5 M Salz haben (Oren, 1994). Im Gegensatz zum umgebenden Medium, das als Hauptsalz NaCl enthält, ist im Cytoplasma der Mikroorganismen hauptsächlich KCl vorhanden (Dennis & Shimmin, 1997). Das Cytoplasma des halophilen Archaeons *Halobacterium salinarum* enthält beispielsweise 4 M KCl und 1 M NaCl. Das meiste KCl liegt in freier Form vor (Grant & Larsen, 1989; Shporer & Civan, 1977). Die meisten halobakteriellen Proteine benötigen hohe KCl-Konzentrationen, um in der nativen Struktur vorzuliegen und ihre biologische Funktion zu erfüllen (Grant & Larsen, 1989; Kushner, 1985). Dabei kann aber meist KCl durch NaCl ersetzt werden. Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie die intrazellulären Systeme an die hohen Salzkonzentrationen angepasst sind. Bekannt ist aber, dass Proteine halophiler Organismen einen hohen Anteil an sauren und einen geringen Anteil an hydrophoben Aminosäureresten aufweisen. Da die sauren Aminosäurereste aufgrund der bei physiologischen pH-Wert negativ geladenen funktionellen Gruppe stärker hydratisiert sind als die anderer Aminosäurereste, vermutet man, dass sie so die Organisation des hydrierten Salzionen-Netzwerkes auf der Proteinoberfläche besser koordinieren können (Dennis & Shimmin, 1997, Frolow et al., 1996). Die Anwesenheit negativ geladener Seitenketten reduziert auch die Hydrophobizität und verhindert somit den strukturellen Kollaps oder die Aggregation (Aussalzen) der Proteine. Es ist auch möglich,

dass saure Aminosäurereste Salzbrücken ausbilden, die wichtig sind für die Stabilität und die dreidimensionale Struktur des Proteins (Dennis & Shimmin, 1997, Dym et al., 1995, Eisenberg, et al., 1992; Zaccai et al., 1989). Die Habitate halophiler Archaea enthalten  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  als dominierende Kationen und  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  als dominierende Anionen. Intrazellulär dominieren  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$ .  $\text{K}^+$ , obwohl größer als  $\text{Na}^+$ , bildet eine kleinere Hydrathülle als  $\text{Na}^+$  und wird wahrscheinlich deshalb bevorzugt. Vergleicht man die Gene, die für halophile archaeale Proteine codieren mit den äquivalenten bakteriellen Genen, so fällt auf, dass die Gene vieler halophiler Organismen 2 bis 3 x so viele nicht-synonyme Substitutionen wie die homologen bakteriellen Gene haben. Es wird vermutet, dass diese Substitutionen einen Einfluss auf die Hydratation und die Hydrophobizität der Proteinoberfläche haben. (Dennis & Shimmin, 1997, Rodriguez-Valera, 1993; Sehgal & Gibbons, 1960)

### **Phylogenie und Vorkommen der Halobakterien**

Die Ordnung Halobacteriales enthält nur eine Familie, die der *Halobacteriaceae*. Diese umfasst mindestens 17 Gattungen: *Haloalcalophilium*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosimplex*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas*, *Natronorubrum* und weitere, bislang nicht kultivierbare Halobacteriaceae (Grant & Larsen, 1989; Kameruka, 1998, Holt et al., 1994; Kamekura et al., 1997).

Halobakterien wurden aus verschiedenen natürlichen Habitaten isoliert wie z.B. aus dem Toten Meer (*Haloferax volcanii*), aus dem Lake Magadi in Kenya (*Halorubrum vacuolatum*, früher *Natronobacterium vacuolatum*; Kamekura et al., 1997) oder auch von gesalzenen Fischen (*Halobacterium salinarum*, früher *Hb. halobium*). Da sie dort oft in sehr hohen Dichten anzutreffen sind, kann man sie aufgrund ihrer roten Pigmentierung mit blosem Auge erkennen. Halobakterien können in Salzkristallen, die in gesättigten Salzlösungen entstehen, überleben. Es können  $10^5$  bis  $10^6$  Halobakterien enthalten sein. Wie sie in den Kristallen überleben, ist noch unbekannt. Sie konnten auch aus Berg- oder Minensalz kultiviert werden (Oren, 1994). Man hat Halobakterien auch schon in solchen exotischen Gebieten wie der Antarktis, in Afrika oder auch in Tibet gefunden (Norton, 1992). In Salzseen können  $10^7$  bis  $10^8$  Zellen pro ml vorkommen (Grant & Larsen, 1989).

Die Halobakterien zeichnen sich auch durch ihre Formenvielfalt aus. So gibt es Stäbchen (z.B. *Halobacterium*), Kokken (z.B. *Halococcus* und *Natronococcus*), dreieckige Plättchen

(z.B. *Haloarcula*), viereckige Plättchen (z.B. *Haloarcula*) und runde Scheiben (z.B. *Haloarcula* und *Haloferax*) (Grant & Larsen, 1989).

Man kann die *Halobacteriaceae* in zwei Gruppen unterteilen: Halophile, die bei neutralen pH-Werten vorkommen und in Haloalkaliphile. Erstgenannte leben bei einem pH-Optimum von 5 bis 8 und benötigen mindestens 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Die Haloalkaliphilen wachsen dagegen bei einem pH-Optimum von 8,5 bis 11 und benötigen sehr wenig  $\text{MgCl}_2$  ( $< 1$  mM) (Grant & Larsen, 1989).

Die halophilen Archaea lassen sich auch weiterhin unterteilen in moderat und extrem Halophile. Die moderat Halophilen, z.B. die Gattung *Haloferax*, benötigen sowohl 2 bis 3,5 M NaCl als auch 0,5 bis 2 M  $\text{Mg}^{2+}$  im Medium. Extrem Halophile benötigen dagegen mindestens 3,0 bis 5,2 M NaCl im Außenmedium wie z.B. *Halobacterium salinarum* (Grant & Larsen, 1989)

### Physiologie

Die meisten Halobakterien sind aerobe, chemoorganotrophe Mikroorganismen, die verschiedene Aminosäuren für ihr Wachstum benötigen. Beim Fehlen von Sauerstoff können manche aber auch Nitrat oder Fumarat als terminale Elektronenakzeptoren in ihrer Atmungskette nutzen. Sind keine Elektronenakzeptoren vorhanden, kann *Halobacterium salinarum* auch Arginin zu Citrullin fermentieren (Oren, 1994). Halobakterien, welche die Purpurmembraan besitzen, können Lichtenergie zum ATP-Gewinn nutzen.

Kolonien von Halobakterien auf Agarplatten sowie Flüssigkulturen erscheinen in verschiedenen Rotschattierungen. Dies ist auf die  $\text{C}_{40}$ - und  $\text{C}_{50}$ - Carotinoide wie Lycopine bzw. Bakterioruberine und das Bakteriorhodopsin zurückzuführen. Diese roten Pigmente schützen die Organismen vor photooxidativen Schäden durch Sonnenstrahlen. *Halobacterium salinarum* bildet bei niedrigem Sauerstoffgehalt purpurfarbene Bereiche in der Membran aus, die als Purpurmembraan bezeichnet wird. Das lichtabsorbierende Element im Bakteriorhodopsin ist Retinal, welches kovalent mit einem Lysin verknüpft ist. Dieses Chromophor gibt der Membran die violette Farbe. Bakteriorhodopsin agiert unter anaeroben Bedingungen als Licht-getriebene Protonenpumpe, wobei die Lichtenergie vom Pigment absorbiert wird. Der aufgebaute Protonengradient (*proton motive force*, PMF) wird zum ATP-Gewinn genutzt. Diese Halobakterien können deshalb anaerob mit Licht wachsen (Grant & Larsen, 1989). Das PMF kann auch genutzt werden, um  $\text{Na}^+$ -Ionen mit Hilfe eines  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport-Systems aus der Zelle zu schleusen. Der resultierende  $\text{Na}^+$ -Gradient sorgt für eine intrazelluläre Akkumulatierung an  $\text{K}^+$ -Ionen, die für die osmotische Stabilität benötigt

werden (Norton, 1992). Ein anderes Retinalprotein in *Halobacterium* ist das Halorhodopsin. Hierbei handelt es sich um eine Chloridpumpe, die eine ähnliche Struktur wie Bakteriorhodopsin hat (Lanyi, 1986). Diese Chloridpumpe ist besonders wichtig für Halobakterien, da Cl<sup>-</sup>-Ionen aufgrund ihrer negativen Ladung nicht über den passiven Transportweg wie K<sup>+</sup>-Ionen angehäuft werden können (Norton, 1992). Weitere Retinalproteine fungieren als Signalüberträger oder als Lichtsensoren in phototaktischen Prozessen wie z.B. SRI und SRII (Grant & Larsen, 1989; Stoeckenius & Bogomolni, 1982; Wolff et al., 1986).

Die Zellwand der Halobakterien besteht nicht aus Peptidoglykan wie bei den Bakterien sondern aus einem S-Layer, der hauptsächlich aus Proteinen und Glykoproteinen aufgebaut ist. Der S-Layer ist ein zweidimensionales Protein-Gitter, das in der Plasmamembran verankert ist (Kandler & König, 1998). Die Zellmembran ist wie bei allen Archaea aus Isoprenyl-Glycerin-Diether-Lipiden zusammengesetzt (Woese et al., 1990; Norton, 1992).

### **Gasvesikel**

Betrachtet man bestimmte Halobakterien wie die z. B. *Halobacterium salinarum* unter dem Phasenkontrastmikroskop, sind dort kleine lichtbrechende Zelleinschlüsse, die Gasvesikel zu erkennen. Da die Gasvesikel lichtbrechende Eigenschaften haben, erscheinen diese Organismen auf Agarplatten als undurchsichtige weiße bis hellrosa Kolonien und in Glaskolben als trübe, hellrote bis weiße Flüssigkultur. Gasvesikel freie Halobakterien bilden dagegen durchsichtige und rote Kolonien. Die Gasvesikel verschaffen den Zellen Auftrieb, um in Wasserschichten mit höherem Sauerstoffgehalt zu kommen (Walsby, 1994). Ihre lichtbrechende Eigenschaft könnte allerdings auch als Schutz vor photooxidativen Schäden dienen (Shear & Walsby, 1975). Nicht nur die halophilen Archaea *Halobacterium salinarum* und *Haloferax mediterranei* oder das haloalkaliphile Archaeon *Halorubrum vacuolatum* können Gasvesikel bilden, sondern auch eine ganze Reihe anderer Archaea und Bakterien (Stoeckenius & Kunau, 1968; Englert et al., 1990; Mwatha & Grant, 1993; Pfeifer et al., 1997). Einige Cyanobakterien wie das methanogene Archaeon *Methanosarcina barkeri* und auch das Gram-negative Bakterium *Ancylobacter aquaticus* sind fähig, Gasvesikel zu bilden (Walsby, 1994; Zhilana & Zavarin, 1979; Konopka et al., 1975). Betrachtet man isolierte Gasvesikel im Elektronenmikroskop, fällt auf, dass es zylindrische Gasvesikel mit konischen Enden und zitronenförmige Gasvesikel gibt (Jost, 1965; Simon, 1981; Englert et al. 1990). In Größe und Gestalt unterscheiden sich die Gasvesikel bei den verschiedenen Organismen. Die Gasvesikel der Halobakterien haben einen Durchmesser von ca. 200 nm. Die

zitronenförmigen Gasvesikel sind 200 bis 250 nm- und die zylindrischen Gasvesikel 600 bis 1500 nm lang (Stoeckenius & Kunau, 1968; Simon, 1981, Englert et al., 1990). Im Vergleich dazu sind die Gasvesikel der Cyanobakterien kleiner. Sie haben einen Durchmesser von 45 bis 120 nm und eine Länge von 100 bis 800 nm (Walsby & Hayes, 1989; Walsby, 1994). Die Gasvesikelhülle hat eine Rippenstruktur, wobei die Rippen senkrecht zur Querachse der Gasvesikel angeordnet sind (Jost, 1965; Stoeckenius & Kunau, 1968; McMaster et al., 1996). Die Gasvesikelhülle ist nur aus Proteinen aufgebaut (Krantz & Ballou, 1973). Die Oberfläche der Hüllenninnenseite besteht hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäureresten, wohingegen die Oberfläche der Außenseite überwiegend von hydrophilen Resten gebildet wird (Walsby, 1972; Walsby & Hayes, 1989). Durch diese Anordnung der Aminosäuren ist die Proteinhülle wasserundurchlässig, Gase können durch passive Diffusion in das Innere gelangen, wobei kein Gas selektiv angereichert wird (Walsby, 1969; Walsby & Hayes, 1989). Das Hauptstrukturprotein der Gasvesikelhülle ist das 7 bis 8 kDa große hydrophobe GvpA-Protein (Gvp = Gasvesikelprotein), das die Rippen bildet. Die Aminosäuresequenz des GvpA-Proteins ist stark konserviert, wobei innerhalb der Halobakterien eine Sequenzähnlichkeit von fast 95% besteht (Englert et al., 1990; Englert et al., 1992a). Ein zweites, größeres Strukturprotein ist das hydrophile, 20 bis 42 kDa große GvpC-Protein. GvpC befindet sich an der Außenseite der Gasvesikelhülle. Bei Cyanobakterien besteht die Funktion des GvpC-Proteins in der Stabilisierung der Gasvesikelstruktur (Hayes et al., 1992), wohingegen GvpC bei Halobakterien auch eine Rolle bei der Formgebung des Gasvesikels spielt (Offner et al., 1996; Best, 2000).

### **Gasvesikelkodierende Gene**

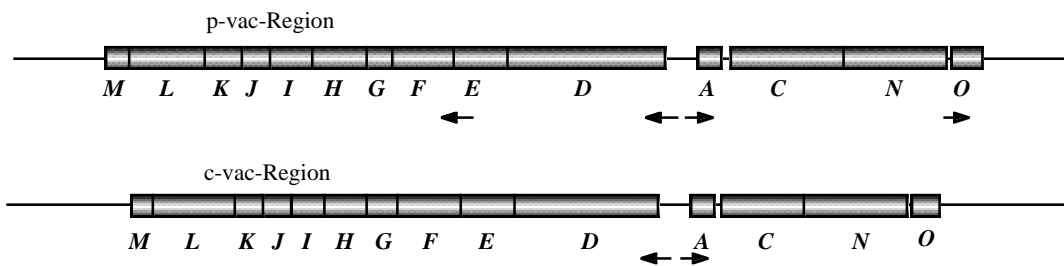
Die Gene, die für die Gasvesikelbildung verantwortlich sind, werden als *gvp*-Gene bezeichnet. Bei den halophilen Archaea sind 14 *gvp*-Gene in der ca. 9 kb großen *vac*-Region lokalisiert (Horne et al., 1988; Horne et al., 1991; Englert et al., 1992a, Englert et al., 1992b). *Halobacterium salinarum* PHH1 besitzt zwei verschiedene *vac*-Regionen, die *p-vac*-Region auf dem 150 kb großen Plasmid *pHH1* und die chromosomale *c-vac*-Region. Die *p-vac*-Deletionsmutante *Halobacterium salinarum* PHH4 enthält nur die *c-vac*-Region (Horne et al., 1988; Horne et al., 1991). *Haloferax mediterranei* besitzt nur die chromosomale *mc-vac*-Region (Englert et al., 1992a). Die Bestimmung der gesamten Genomsequenz der *Halobacterium* species NRC-1 zeigte, dass dieser Stamm zwei *gvp1* Gencluster enthält, die auf den beiden großen Plasmiden *pNRC100* (191 kb) und *pNRC200* (365 kb) lokalisiert sind. Diese sind nahezu identisch mit der *p-vac*-Region aus *Halobacterium salinarum* PHH1

(DasSarma et al., 1994; Ng et al., 1998; Ng et al., 2000). Ein zweites Gencluster, das *gvp2* Gencluster, ist ebenfalls auf dem Plasmid pNRC200 lokalisiert und ist nahezu identisch mit der *c-vac*-Region aus *Halobacterium salinarum* PHH1. In diesem *gvp2* Gencluster von *Halobacterium* species NRC-1 fehlt aber das *c-gvpM* Gen (Ng et al., 2000). Die Gasvesikel, die von den drei *vac*-Regionen *p-vac*-, *c-vac*- und *mc-vac* kodiert werden, unterscheiden sich in ihrer Form und werden zu unterschiedlichen Zeiten in der Wachstumsphase gebildet. Bei *Halobacterium salinarum* PHH1 wird die *p-vac*-Region konstitutiv exprimiert, was zur Bildung von zitronenförmigen Gasvesikeln führt. Die Expression der *c-vac*-Region von *Halobacterium salinarum* PHH4 führt nur während der stationären Wachstumsphase zur Bildung von zylinderförmigen Gasvesikeln (Horne & Pfeifer, 1989). Die Gasvesikel der *mc-vac*-Region sind ebenfalls zylinderförmig und werden auch nur während der stationären Wachstumsphase gebildet. Die Gasvesikelbildung bei *Haloferax mediterranei* ist aber zusätzlich noch von der Salzkonzentration abhängig. Dies bedeutet, dass Gasvesikel von *Haloferax mediterranei* nur dann gebildet werden, wenn mindestens 17% Salz im Medium vorhanden ist (Rodriguez-Valera, 1993, Englert et al., 1990). Auch das haloalkaliphile Archaeon *Halorubrum vacuolatum* bildet Gasvesikel in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. *Halorubrum vacuolatum* bildet während der kompletten Wachstumsphase Gasvesikel, aber nur wenn im Medium 15 bis 30% Salz enthalten ist. Zellen, die in Medium mit 13% Salz angezogen werden, sind Gasvesikel frei (Mayr & Pfeifer, 1997).

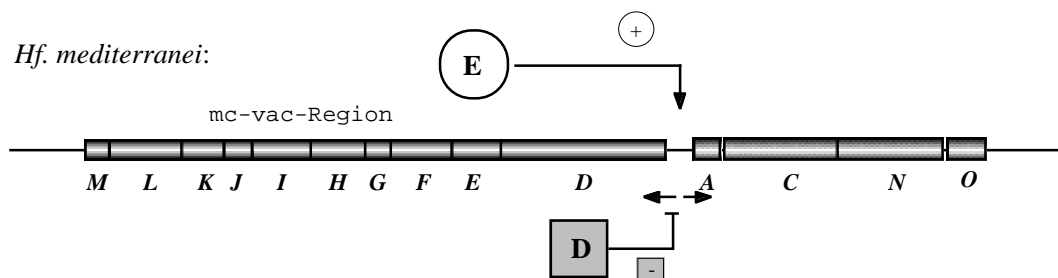
Die 14 *gvp*-Gene sind in den drei *vac*-Regionen *p-vac*, *c-vac* und *mc-vac* in zwei entgegengesetzt orientierten Genclustern angeordnet (siehe Abb. 1), wobei eine Gengruppe die Gene *gvpACNO* und die andere die Gene *gvpDEFGHIJKLM* umfasst. Die Gene der drei *vac*-Regionen sind zwar miteinander verwandt und auch gleich angeordnet, sie unterscheiden sich aber in ihrer Transkription. Die *p-vac*-Region wird von vier Promotoren, die vor den Genen *p-gvpA*, *p-gvpD*, *p-gvpF* und *p-gvpO* liegen, transkribiert. Dementsprechend erfolgt die Transkription der Gene in vier Gruppen: *p-gvpACNO*, *p-gvpO*, *p-gvpDE* und *p-gvpFGHIJKLM*. Während der gesamten Wachstumsphase werden große Mengen der *p-gvpA*-mRNA und kleinere Mengen der *p-gvpACNO*-mRNA gebildet (Horne & Pfeifer, 1989; Horne et al., 1991; Offner & Pfeifer, 1995). Transkripte der Gene *p-gvpO* sowie *p-gvpFGHIJKLM* werden nur während der exponentiellen Wachstumsphase und das *p-gvpDE*-Transkript während der stationären Wachstumsphase hergestellt (Jones et al., 1989; Horne et al., 1991; Offner et al., 1996; Offner & Pfeifer, 1995). Die *c-vac*-Region von *Halobacterium salinarum* PHH4 wird von zwei Promotoren, die sich vor dem *c-gvpA*- und *c-gvpD*-Gen befinden, aus transkribiert. Transkripte, die vom *c-gvpA*-Promotor aus gebildet werden, sind in der späten

exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase nachweisbar (Horne & Pfeifer, 1989; Krüger & Pfeifer, 1996). Die Transkription der Gene *c-gvpDEFGHIJKLM* erfolgt während der gesamten Wachstumsphase als relativ instabiles Transkript. In der stationären Wachstumsphase wird zusätzlich noch ein *c-gvpD*-Transkript gebildet (Krüger & Pfeifer, 1996). Die mc-vac-Region wird ähnlich wie die c-vac-Region von zwei Promotoren, die vor den Genen *mc-gvpA* und *mc-gvpD* liegen, transkribiert (Abb. 1). Transkripte, die vom *mc-gvpA*-Promotor ausgehen, werden erst ab der frühen stationären Wachstumsphase gebildet (Englert et al., 1990; Englert & Pfeifer, 1993; Röder & Pfeifer, 1996). Die Gene *mc-gvpD*, *mc-gvpDEF* und *mc-gvpDEFGHIJKLM* werden nur in kleineren Mengen in der exponentiellen Wachstumsphase transkribiert, während große Mengen an *mc-gvpD*-Transkript und an kleineren mRNAs in der stationären Wachstumsphase auftreten.

*Hb. salinarum* PHH1:



*Hf. mediterranei*:



**Abb. 1** Die p-vac- und c-vac-Regionen von *Hb. salinarum* PHH1 und die mc-vac-Region von *Hf. mediterranei*. Die 14 *gvp*-Gene *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* sind als Kästchen dargestellt und unterhalb der mc-vac-Region geben die Buchstaben das jeweilige Gen an. Die Pfeile repräsentieren die Promotoren bzw. die Richtung der Transkripte. Die beiden Regulatorproteine GvpE (Aktivator) und GvpD (beteiligt an der Repression des *mc-gvpA*-Promotors) sind an der mc-vac-Region dargestellt.

Die Gasvesikelgene werden als Modellsystem zur Untersuchung der archaealen Genregulation verwendet. Die Charakterisierung der einzelnen *gvp*-Gene und deren Produkte kann durch Transformationsexperimente durchgeführt werden. Dafür stehen einige *Shuttle-*

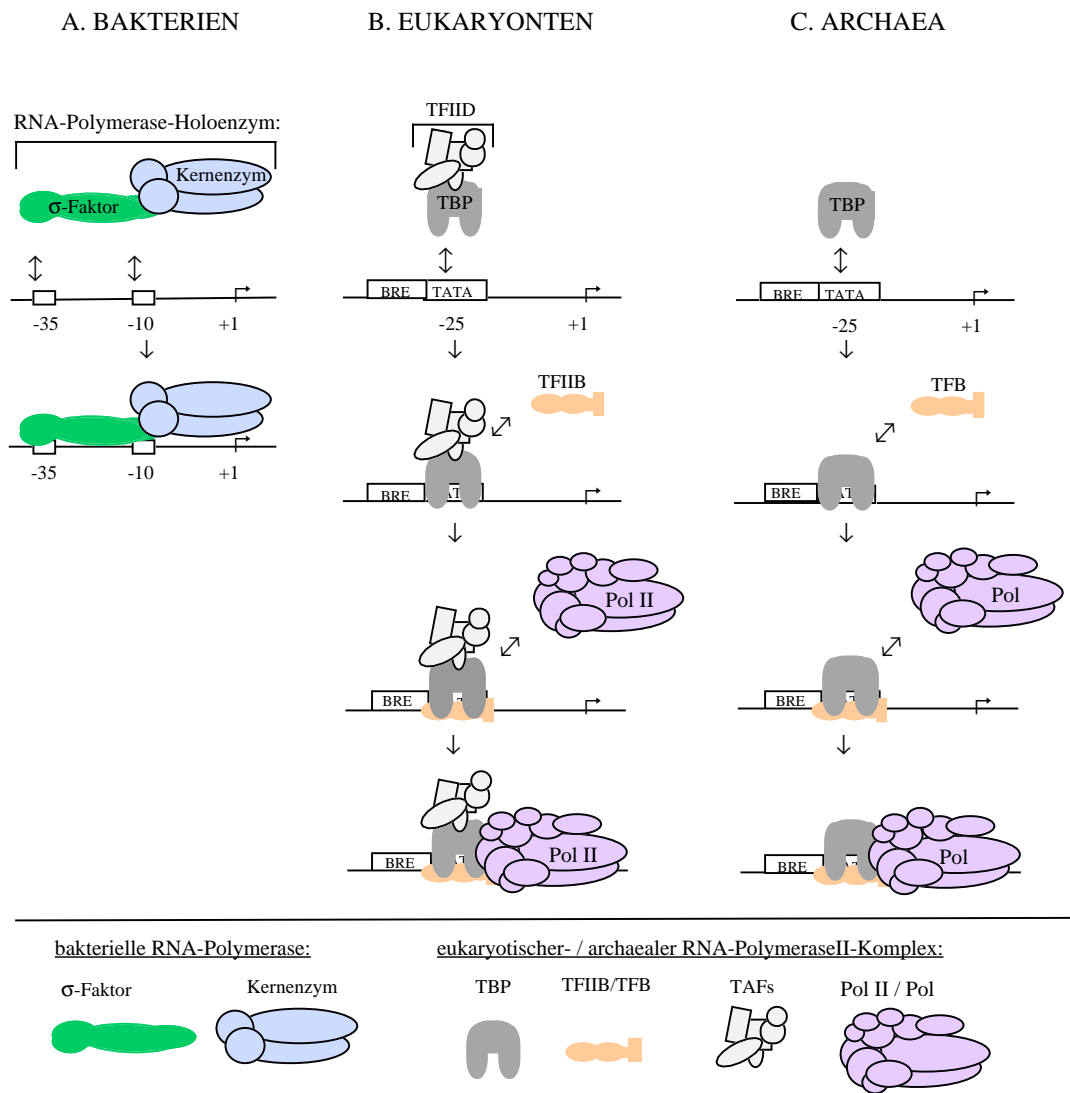
Vektoren, die Resistenzen gegen Mevinolin oder Novobiocin verleihen, zur Verfügung. Das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Antibiotika-Resistenzgene und die Verfügbarkeit von zwei verschiedenen Replikationsursprüngen in den Vektoren macht es möglich, Doppeltransformanten herzustellen. Als Rezipient für die Transformation dient *Haloferax volcanii* WFD11, der keine *gvp*-Gene besitzt und somit einen sauberen genetischen Hintergrund liefert (Cline & Doolittle, 1987; Lam & Doolittle, 1989; Blaseio & Pfeifer, 1990; Pfeifer et al., 1994). Mit Hilfe des Expressionsvektors pJAS35 können halobakterielle Leserahmen, die keinen eigenen Promotor besitzen, unter der Kontrolle des Ferredoxin-Promotors exprimiert werden (Pfeifer et al., 1994).

Mit Hilfe von Transformationsexperimenten konnte die minimale Anzahl der p-*gvp*-Gene bestimmt werden, die für die Gasvesikelbildung notwendig sind. Zum einen zeigte sich, dass die Deletion eines der sechs Gene p-*gvpC*, p-*gvpD*, p-*gvpE*, p-*gvpH*, p-*gvpI*, oder p-*gvpN* immer noch zur Gasvesikelbildung führte. Dies bedeutet, dass diese sechs Gene nicht essentiell sind. Zum anderen konnte mit den anderen acht Genen p-*gvpFGJKLMAO* eine minimal p-*vac*-Region konstruiert werden, die sogenannte min*vac*-Region, mit der *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten Gasvesikel bilden konnten (Offner et al., 2000)

### **Archaeale Transkription**

Der archaeale Transkriptionsapparat ist eine interessante Mischung mit eukaryotischen und bakteriellen Merkmalen. Der basale Transkriptionsapparat stellt eine vereinfachte Version des eukaryotischen dar. Die Regulation der Transkription ist zwar noch weitgehend ungeklärt, aber die meisten der bis jetzt bekannten archaealen Transkriptionsregulatoren ähneln den bakteriellen Regulatoren. Wenn man sich zunächst die RNA-Polymerasen (RNAP) betrachtet, fällt auf, dass die archaeale RNAP der eukaryotischen ähnlicher ist als der bakteriellen. Das Kernenzym der bakteriellen RNAP besteht aus vier Untereinheiten ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) mit einem (oder verschiedenen) assoziierten  $\sigma$ -Faktor (Abb. 2A). Weder Eukaryonten noch Archaea besitzen  $\sigma$ -Faktoren. Die meisten bakteriellen Promotoren besitzen zwei wichtige Sequenzabschnitte 35 bp und 10 bp stromauf des Transkriptionsstartes, die vom  $\sigma$ -Faktor erkannt werden, der eine Vermittlerrolle beim Binden der RNA-Polymerase an die DNA spielt (Eick et al., 1994; Busby & Ebright, 1994). Eukaryonten besitzen dagegen drei verschiedene RNA-Polymerasen, die für die Transkription verschiedener Promotorklassen zuständig sind. Die RNA-Polymerase I (RNAP I) ist zuständig für die Synthese von Vorläufern (*precursor*) der ribosomalen RNA (*pre-rRNA*), RNAP II katalysiert die Transkription aller Proteinkodierender Gene und RNAP III produziert stabile kleine RNA-Moleküle wie tRNAs und 5S

rRNA. Die Transkription der Protein-kodierenden Gene benötigt eine TATA-Box, die ca. 25 bp stromauf des Transkriptionsstartes lokalisiert ist, eine RNA-Polymerase mit 10 bis 15 Untereinheiten und fünf verschiedene Transkriptionsfaktoren (Abb. 2B). Archaea besitzen eine einzige DNA-abhängige RNA-Polymerase, die ein Multienzymkomplex mit scheinbar variabler Anzahl an Untereinheiten ist. Mit Hilfe von Genomanalysen wurde gezeigt, dass wahrscheinlich *Sulfolobus tokodaii* 10, *Archaeoglobus fulgidus* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* 11, *Methanococcus jannaschii* und *Halobacterium* species NRC-1 12 sowie *Sulfolobus solfataricus* P2 14 RNA-Polymeraseuntereinheiten besitzen (Bult et al., 1996; Klenk et al., 1997; Smith et al., 1997; Ng et al., 2000; Kawarabayasi et al., 2001; She et al., 2001). Bei den meisten Untereinheiten wurde gezeigt, dass sie Homologe zum Multienzymkomplex der eukaryotischen RNAP II sind. *In vitro*-Studien mit RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren von methanogenen bzw. hyperthermophilen Archaea haben gezeigt, dass für die archaeale Transkription Initiationsfaktoren benötigt werden (Hausner & Thomm, 1993; Qureshi *et al.*, 1997). Diese Transkriptionsfaktoren TBP und TFB (Abb. 2C) sind Homologe des eukaryotischen TATA-Box-Bindeproteins bzw. des Transkriptionsfaktors TFIIB (Qureshi et al., 1997).



**Abb. 2** Schematische Darstellung der basalen Transkription in Bakterien und in Archaea sowie der basalen Klasse II Transkription in Eukaryonten.

**A.** Die typische Promotorregion von Bakterien, die vom RNA-Polymerase-Holoenzym erkannt wird. Der Sigmafaktor ( $\sigma$ ) ist für die Promotorerkennung wichtig. Bevor der  $\sigma$ -Faktor an die DNA bindet, ist er schon an das RNA-Polymerase-Kernenzym, das aus vier Untereinheiten besteht ( $\alpha_2, \beta, \beta'$ ), assoziiert.

**B.** Transkription eines typischen Klasse II Promotors der Eukaryonten. Zunächst erkennt und bindet der Transkriptionsfaktor II D (TFIID) die TATA-Box. TFIID ist ein Proteinkomplex, der aus dem wichtigen TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und mehreren TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammengesetzt ist. Der Transkriptionsfaktor II B (TFIIB) wird danach rekrutiert, worauf die RNA-Polymerase II (Pol II), die aus ca. 15 Untereinheiten besteht, folgt. Zur Vereinfachung sind die weiteren Transkriptionsfaktoren weggelassen.

**C.** Typische Promotorregion der Archaea. Die Transkription ist vergleichbar mit der eukaryotischen in **B**. Die TATA-Box wird zunächst vom TBP erkannt und gebunden, worauf das Rekrutieren von Transkriptionsfaktor B (TFB) und danach von der RNA-Polymerase (Pol), die aus ca. 12 Untereinheiten besteht, folgt. Die weiteren bekannten Transkriptionsfaktoren TFE, TIP49 und TFS sind zur Vereinfachung weggelassen.

Bei den meisten bis jetzt sequenzierten archaealen Genomen konnte ein einzelnes *tbp*-Gen identifiziert werden. Normalerweise besitzen Archaea demnach auch nur ein TBP-Protein. Halobakterien und *Pyrococcus horikoshii* machen hier jedoch eine Ausnahme, da sie mehrere

*tbp*-Gene besitzen (Reeve et al., 1997). Bei *Haloferax volcanii* (Thompson et al., 1999) und bei *Halobacterium* NRC-1 konnten mehrere *tbp*-Gene gefunden werden. Auf dem 191 kb großen Plasmid pNRC100 von *Halobacterium* NRC-1 befinden sich alleine vier *tbp*-Gene (Ng et al., 1998). Das TFB-kodierende Gen (*tfb*) tritt normalerweise ebenfalls nur in einer Kopie in den archaealen Genomen auf. Auch hier sind die Halobakterien zusammen mit *Pyrococcus horikoshi*, der zwei *tfb*-Gene besitzt, die Ausnahme mit mehreren *tfb*-Genen (Reeve et al., 1997). *Haloferax volcanii* besitzt sechs verschiedene und *Halobacterium* sp. NRC-1 sieben *tfb*-Gene (Thompson et al., 1999; Ng et al., 1998). Da es demnach in Halobakterien verschiedene TFBs und TBPs gibt, ist es gut möglich, dass diese an der Genregulation beteiligt sind (Baliga et al., 2000). Es wird spekuliert, dass verschiedene TFBs in mehreren unterschiedlichen Kombinationen mit verschiedenen TBPs die Transkription der unterschiedlichen Promotoren steuern können, ähnlich wie die Sigmafaktoren in Bakterien. Die beiden archaealen Faktoren TBP und TFB sind beide aus zwei imperfekten direkten Wiederholungseinheiten (*direct repeats*) aus ca. 90 Aminosäuren aufgebaut. TFB besitzt zusätzlich noch eine N-terminale Domäne aus 100 bis 120 Aminosäuren die eine Zinkbandstruktur (*zinc ribbon*) bildet. (Bell et al., 2001a). Das TFB ist nicht nur wichtig für die Bindung des TBP-DNA-Komplexes. An Hand von Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich des TFB wichtig für das Rekrutieren der RNAP zum Promotor während der Transkriptionsinitiation ist (Bell & Jackson, 2000a). Die C-terminale Domäne dagegen ist wichtig für die Promotorerkennung.

Es konnte gezeigt werden, dass der minimale, *in vitro* noch funktionsfähige Transkriptionsapparat der Archaea aus den Proteinen TBP, TFB und der RNAP besteht (Hethke et al., 1996; Qureshi et al., 1997; Bell et al. 1998). Anders als bei Eukaryonten sind diese wenigen Proteine in der Lage, die Transkriptionsinitiation von archaealen Promotoren *in vitro* zu katalysieren. (Bell et al., 1998). Archaea besitzen auch TFE, das homolog zur  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryotischen generellen Transkriptionsfaktors TFIIE ist. TFE besitzt eine N-terminale Leuzin-reiche Region mit einem *helix-turn-helix*-Motiv und eine C-terminale Zinkbandstruktur (Aravind & Koonin, 1999). Eukaryonten besitzen noch eine zweite  $\beta$ -Untereinheit, die aber in Archaea nicht gefunden wurde. Obwohl TFE nicht essentiell für die *in vitro*-Transkription ist, kann TFE als schwacher Stimulator wirken, wenn die Promotorerkennung durch TBP nicht optimal ist (Hanzelka et al., 2001; Bell et al., 2001b). Es wird spekuliert, dass TFE *in vivo* wichtiger ist, um eventuell Chromatin-Proteine von der TATA-Box zu verdrängen oder dass TFE die Wechselwirkungen zwischen TBP und TATA-Box erleichtert oder stabilisiert (Bell et al., 2001b). In den Genomen von *Archaeoglobus*

*fulgidus* (Klenk et al., 1997) und *Pyrococcus horikoshii* (Kawarabayasi et al., 1998) konnte ein Gen gefunden werden, das Ähnlichkeiten zu einem eukaryotischen Gen hat, das für ein TBP-Bindeprotein kodiert (Soppa, 1999a). Dieses Protein wird TIP49 (*TBP interacting protein of 49 kDa*) genannt. Seine Funktion ist noch nicht geklärt, aber es besitzt ein *p-loop*-Motiv, das eine ATP-/GTP-Bindefunktion hat. In *Methanococcus thermolithotrophicum* (Smith et al., 1997) konnte das Protein TFS (*transcription factor S*) identifiziert werden, das Sequenzähnlichkeit sowohl zum eukaryotischen Transkriptionsfaktor II S (TFIIS) als auch zur kleinen Untereinheit von eukaryotischen RNA-Polymerasen hat. Es konnte gezeigt werden, dass das archaeale TFS nicht mit der RNA-Polymerase assoziiert ist. Aber wie TFIIS ist TFS in der Lage, eine Nukleaseaktivität in der RNAP zu induzieren, sodass vom 3'-Ende der RNA im Elongationskomplex Nukleotide abgespalten werden (Hausner et al., 2000). Weitere Eukaryonten-ähnliche Transkriptionsfaktoren wie TFIIA, TFIIF oder TFIIH konnten bis jetzt nicht in Archaea gefunden werden (Bult et al., 1996; Klenk et al., 1997; Smith et al., 1997; Kawarabayasi et al., 1998).

Der Aufbau des archaealen Transkriptions-Preinitiations-Komplexes wurde besser verstanden, als die dreidimensionale Kristallstruktur von TBP und einer C-terminalen Kern-Domäne zusammen auf einem archaealen Promotor co-kristallisiert wurden (Kosa et al., 1997; Littlefield et al., 1999). Mit diesen strukturellen Studien und mit Hilfe von funktionellen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Faktoren TBP und TFB zwei nebeneinander liegende Sequenzen im Promotor erkennen, die TATA-Box und das BRE-Element (Hausner et al., 1996; Qureshi & Jackson, 1998; Bell et al., 1999a). Die meisten archaealen Promotoren besitzen eine AT-reiche TATA-Box ca. 25 nt stromauf des Transkriptionsstartes mit der sechs Nukleotiden langen Konsensussequenz [T/C]TTA[T/A]A; wobei die TA-Sequenz in der Mitte am wichtigsten erscheint (Thomm & Wich, 1988; Reiter et al., 1990; Hain et al., 1992). Direkt stromauf der TATA-Box liegt das BRE-Element (*transcription factor B recognition element*).

Das Initiator-Element (INR) bestimmt den Transkriptionsstart  $-1/+1$ . Es besteht bei den Archaea aus einem Purin/Pyrimidin-Dinukleotidpaar und ist nur sehr schwach konserviert (Hain et al., 1992). Wie bei den Eukaryonten bindet während der Transkriptionsinitiation zunächst das TBP an die TATA-Box (Rowlands et al., 1994; Kosa et al., 1997), worauf das TFB und dann die RNA-Polymerase folgt. Die TATA-Box ist dabei wichtig, um die RNAP zum korrekten Transkriptionsstart zu dirigieren (Reiter et al., 1990; Hausner et al., 1991). Bei vielen archaealen Promotoren interagiert TFB mit dem BRE-Element, das unmittelbar stromauf der TATA-Box liegt (Qureshi & Jackson, 1998). Das BRE-Element ist das

wichtigste archaeale Promotorelement für den gerichteten Zusammenbau des Pre-Initiationskomplexes, seine archaeale Konsensussequenz ist RNWAAWN (R = Purin, W = A oder T; N = irgendeine Base) (Bell et al., 1999a). Ein DPE-Element (*downstream promotor element*) konnte bis jetzt bei Archaea noch nicht nachgewiesen werden (Soppa, 1999a).

Die Elongation der Transkription in Archaea ist noch nicht aufgeklärt. Es konnten in den archaealen Genomen Homologe zu bakteriellen Genen gefunden werden, die die Elongationsfaktoren NusA und NusG codieren. Es ist aber ungeklärt, welche Rolle sie bei den Archaea spielen (Bell & Jackson, 1998).

### **Regulation der Transkription**

Betrachtet man nun die Regulation der Transkription im Vergleich, so fällt auf, dass die bakterielle viel einfacher und ökonomischer funktioniert als die eukaryotische Genregulation. Die Gene des bakteriellen *lac*-Operons beispielsweise sind in einer einzigen Transkriptionseinheit organisiert. Ihre Expression wird von einem oder ein paar wenigen Aktivatoren und Repressoren reguliert. Die Eukaryonten haben dagegen eine große Anzahl an Regulatoren, die auf ein einziges Gen wirken können, und viele verschiedene Regulationsmechanismen. So haben sie beispielsweise geschätzte zehn TBP-assoziierte Faktoren (TAFs) und andere Co-Aktivatoren, die als Ziele für andere Aktivatoren dienen (Guarente, 1995). Für die Repressoren gilt eine ähnliche Vielfalt (Johnson, 1995). Die Transkription läuft bei den Bakterien sowie bei den Archaea in polycistronischen Operons ab. Wenn man von der prokaryontischen Natur und der relativ einfachen basalen Transkriptionsmaschinerie ausgeht, ist es nicht unerwartet, dass die Transkription bei Archaea in vergleichsweise einfachen polycistronischen Operons, ähnlich wie bei den Bakterien, abläuft. Im Gegensatz dazu ist es aber verwunderlich, dass sie Histone besitzen, die bei den Eukaryonten eine regulatorische Funktion haben (Reeve et al, 1997). Die regulatorischen Transkriptionsfaktoren der Eukaryonten besitzen meist verschiedene DNA-Bindedomänen, wie Homeodomänen, Zinkfinger, basische *helix-loop-helix*-Proteine und basische *leucine-zipper*-Proteine. Bei den Bakterien tritt dagegen in der Regel nur das *helix-turn-helix*-Motiv auf (Pabo & Sauer, 1992). Ein Vergleich der vier kompletten Genomsequenzen von *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996), *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith et al., 1997) und *Pyrococcus horikoshii* (Kawarabayasi et al., 1998) mit allen bekannten Sequenzen von Proteinen, die bei Bakterien und Eukaryoten an der Transkription beteiligt sind, erbrachte, dass insgesamt 280 Transkriptionsfaktoren und an der Transkription beteiligte Proteine in den Genomen

vorhergesagt werden. Von diesen sind 168 nur mit den Bakterien homolog, 51 nur mit den Eukaryoten homolog und 61 mit Bakterien und Eukaryoten homolog (Kyrpides & Ouzounis, 1999). Ein anderer Vergleich archaealer Genome brachte hervor, dass viele vorhergesagte Regulatorproteine ein für Bakterien typisches *helix-turn-helix*-Motiv (HTH) haben (Aravind & Koonin, 1999).

Der erste archaeale Genregulator, der beschrieben wurde, ist der T6-Repressor des *Hb. salinarum* Phagen  $\phi$ H. Er besitzt ein für Bakterien typisches *helix-turn-helix*-Motiv und bindet an ein *inverted repeat* auf der DNA als Dimer-Protein (Ken & Hackett, 1991). Es wurden autoregulatorische Repressoren bei Archaea gefunden wie zum Beispiel der Transkriptionsregulator MDR1 (*metal-dependent repressor 1*) aus *Archaeoglobus fulgidus*, der homolog zu dem bakteriellen Metall-abhängigen Repressor DtxR (*diphtheria toxin repressor*) ist (Bell et al., 1999b). Bei *Pyrococcus furiosus* konnte ebenfalls ein autoregulatorischer Repressor gefunden werden, das LrpA, welches ein Lrp-ähnliches Protein ist (Brinkmann et al., 2000). Das bakterielle Lrp (*leucine responsive regulatory protein*) ist ein globaler Regulator, der als Aktivator oder Repressor fungieren kann. Bei Genomanalysen wurde bei *Sulfolobus solfataricus* erneut ein Lrp-ähnlicher negativer Autoregulator gefunden, der als Lrs14 bezeichnet wurde und ein typisches *helix-turn-helix*-Motiv besitzt (Napoli et al., 1999; Bell & Jackson, 2000b). Ein weiteres Protein aus der Reihe der Lrp-ähnlichen Proteine ist LysM. Es konnte aus *Sulfolobus solfataricus* isoliert und charakterisiert werden und ist wiederum negativer Autoregulator (Brinkman et al., 2002).

### **Regulation der Gasvesikelbildung**

Die Gasvesikelbildung ist ein gutes Modellsystem, um archaeale Genregulation zu studieren, da Gasvesikelgene sowohl aktiviert als auch reprimiert werden können. Gasvesikelbildung findet zwar bei *Hb. salinarum* PHH1 während der gesamten Wachstumsphase statt, tritt bei *Hb. salinarum* PHH4 und *Hf. mediterranei* aber nur in der stationären Wachstumsphase auf. Da die verschiedenen Promotoren der *vac*-Regionen zu unterschiedlichen Zeiten des Wachstums aktiv sind, kann gezeigt werden, dass die Regulation der Gasvesikelbildung auf der Ebene der Transkription stattfindet (Pfeifer et al., 1997). Untersuchungen an der *mc-vac*-Region zeigen, dass das *mcGvpD*-Protein an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt ist (Englert et al., 1992b; Röder & Pfeifer, 1996). Die Beteiligung des *mc-gvpD*-Produktes an der Repression des *mc-gvpA*-Promotors wurde bei *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten, die die komplette *mc-vac*-Region mit einer internen Deletion im *mc-gvpD*-Genproduktes ( $\Delta$ D-Transformanten) enthielten, entdeckt. Diese  $\Delta$ D-Transformanten zeigen

eine Gasvesikelüberproduktion, die durch Komplementation mit dem *mc-gvpD*-Leserahmen unter der Kontrolle des Ferredoxin-Promotors auf einem zweiten Vektorkonstrukt aufgehoben wird (Pfeifer et al., 1994; Pfeifer et al., 2001). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des GvpD-Proteins zeigt drei interessante Regionen: Eine mögliche Nukleotid-Bindestelle (*p-loop*-Motiv) und zwei basische Regionen, (Pfeifer et al., 2001). Austausch der konservierten Aminosäuren im *p-loop*-Motiv und Mutationen in der basischen Region 1 verursachen, einen Verlust der repressorischen Funktion des GvpD-Proteins, wohingegen Mutationen in der basischen Region 2 keinen solchen Effekt zeigen (Pfeifer et al., 2001). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass das mcGvpD-Protein ATP binden könnte (P. Zimmermann, persönliche Mitteilung).

Wie schon erwähnt, findet die Transkription der *gvp*-Gene zu verschiedenen Zeiten des Wachstums statt. Dabei ist die Menge an Transkripten, die vom *gvpA*-Promotor aus gebildet werden, am größten. In *Hb. salinarum* PHH1 ist der *p-gvpA*-Promotor (*pA*-Promotor) das gesamte Wachstum über aktiv, während in *Hb. salinarum* PHH4 bzw. in *Hf. mediterranei* der *c-gvpA*- und der *mc-gvpA*-Promotor (*cA*- und *mcA*-Promotor) nur in der stationären Wachstumsphase aktiv sind (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996). Es konnte durch Studien am *mcA*- und am *cA*-Promotor gezeigt werden, dass diese Promotoren alleine ineffizient sind und offensichtlich nicht von dem halobakteriellen RNA-Polymerase-Komplex erkannt werden (Offner & Pfeifer, 1995; Krüger & Pfeifer, 1996). Die Sequenzen der Promotoren weisen Unterschiede zur Konsensus-Sequenz auf. Die TATA-Box des *pA*-Promotors stimmt komplett, die des *mcA*-Promotors nur mit vier und die des *cA*-Promotors nur mit drei Nukleotiden mit der Konsensussequenz der TATA-Box bei Archaea überein (Abb. 3).

	BRE	TATA	
	<u>RNWAAWN</u>	<u>YTTAWG</u>	+1
mcA	CGGTTGCTGAACCAAC <u>ACG</u> <u>AATG</u> <u>ATT</u> <u>TG</u> TTACTTGCCAACACGTTTTTCAGATGGGTATAACCCAGATCAATC <u>ATGG</u>		
cA	CGGGGGTTGAACTCA <u>CA</u> <u>AC</u> GGCGGTTTCCGGACACTCCCTGTAGTTGCGGGTGGGTACCACCCAGATCACT <u>TATGG</u>		
pA	CGACTGGTGAAACCAT <u>ACAC</u> <u>ATCC</u> <u>TTATG</u> TGATGCCCGAGTATAGTTAGAGATGGGTAAATCCCAGATCACCA <u>ATGG</u>		

**Abb. 3** Promotor Region der drei *gvpA* Gene. Der Transkriptionsstart (G) ist durch +1 gekennzeichnet, und das ATG-Startcodon ist in fett hervorgehoben. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements, als auch die der TATA-Box sind oben angegeben (R = A oder G; N = A, C, G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz der TATA-Box und des BRE-Elements sind in fett bzw. in blau hervorgehoben. Die palindromische Sequenz ist unterstrichelt.

Bei der Übereinstimmung mit der Konsensussequenz des BRE-Elements verhält es sich etwas anders. Bei der pA- und der mcA-Promotorsequenz stimmen sechs Nukleotide und bei der cA-Promotorsequenz stimmen drei Nukleotide mit den sieben Nukleotiden der Konsensussequenz des BRE-Elements überein (Abb. 3). Durch Studien mit *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Transkription am cA-Promotor von der Anwesenheit des c-gvpE-Genproduktes (cGvpE) abhängig ist (Krüger et al., 1998). In ähnlichen *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass auch das mcGvpE-Protein die Transkription vom mcA-Promotor aus aktiviert (Röder & Pfeifer, 1996). Dabei konnte sogar das c-gvpE-Genprodukt das mc-gvpE-Genprodukt ersetzen (Röder, 1997). Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins brachten hervor, dass die amphiphile Helix AH6 am C-terminalen Ende von cGvpE strukturelle Ähnlichkeiten mit eukaryotischen basischen *leucine-zipper*-Proteinen hat wie z.B. GCN4 aus Hefe (Krüger et al., 1998; Ellenberger et al., 1992). *Molecular Modeling*-Analysen zeigten, dass diese Region möglicherweise einen *leucine-zipper* darstellt, der für eine Dimerisierung des Proteins verantwortlich ist. Vor der amphiphilen Helix liegt ein Bereich mit vier basischen Aminosäuren, der eine DNA-Bindedomäne (DNAB) darstellen könnte (Krüger et al., 1998). Mutationen im DNAB-Motiv erzeugten cGvpE-Proteine, die nicht mehr in der Lage waren, den cA-Promotor zu aktivieren (Krüger et al., 1998). Andere Mutationen in der konservierten *leucine-zipper*-Region verhindern ebenfalls in den meisten Fällen eine Aktivierung des cA-Promotors und auch die Dimerisierung (Plößer & Pfeifer, 2002).

## Reportergene

Transkriptionsregulatoren und Promotorstärken lassen sich effizient und quantitativ mit Reportergenen untersuchen. Zu den bekanntesten Reportergenen zählt wohl das *lacZ*-Gen aus dem Bakterium *Escherichia coli*. Bei diesem Reportergensystem wird der Leserahmen des *lacZ*-Gens hinter den zu untersuchenden Promotor fusioniert. Das *lacZ*-Gen codiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, das die Hydrolyse von  $\beta$ -glykosidischen Bindungen wie beispielsweise in Laktose ( $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-1-4- $\beta$ -D-glukopyranose) katalysiert. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität kann in den Lysaten von entsprechenden Transformanten gemessen werden. Die  $\beta$ -Galaktosidase kann aber auch die Hydrolyse der  $\beta$ -glykosidischen Bindungen in nicht natürlichen Substraten wie in ONPG (ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) oder in X-Gal (5-Bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid) katalysieren. Die Hydrolyseprodukte von ONPG bzw. X-Gal sind Galaktose und ONP (ortho-Nitrophenolat) bzw. 5-Bromo-4-chloro-indigo. ONP absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm, was photometrisch gemessen werden kann und durch eine Gelbfärbung erkennbar ist. Über die Absorption pro Zeiteinheit sind Rückschlüsse auf die Anzahl an  $\beta$ -Galaktosidase-Einheiten und damit auf die

Expression des *lacZ*-Gens möglich. Mit diesen Angaben kann die Stärke verschiedener Promotoren verglichen werden. Das farblose X-Gal wird durch Hydrolyse in Galaktose und das blau erscheinende 5-Bromo-4-chloro-indigo umgesetzt. Damit wird zusätzlich ein *screening* nach unterschiedlich blauen Kolonien möglich. Dieses System ist auch in anderen Bakterien und in Eukaryonten etabliert. Die  $\beta$ -Galaktosidase aus *Escherichia coli* ist aber bei hoher Salzkonzentration nicht aktiv und damit für entsprechende Analysen mit Halobakterien ungeeignet. Als halobakterielles Reporter-gen wurde eine  $\beta$ -Galaktosidase aus dem halophilen Archaeon *Haloferax lucentensis* (früher *Haloferax alicantei*; Gutierrez et. al. Im Druck) gereinigt und analysiert (Holmes et al., 1997). Das Enzym stammt aus einer Überproduzentenmutante von *Haloferax lucentensis*, die durch UV-Mutagenese und *X-Gal-Screening* gewonnen wurde. Es hat eine molekulare Masse von ca. 180 kD und besteht in aktiver Form wahrscheinlich aus zwei Monomeren. Es ist ebenfalls gelungen, das *bgaH*-Gen, das für diese halobakterielle  $\beta$ -Galaktosidase codiert, zu klonieren (Holmes & Dyll-Smith, 2000). Das *bgaH*-Gen konnte bereits als Reporter-gen eingesetzt werden, um Promotorstudien bei *Hb. salinarum* durchzuführen (Patenge et al., 2000).

Weiterhin ist es gelungen, die Trehalase aus dem Bakterium *Bacillus subtilis* als Reporter-gen in dem moderat halophilen Archaeon *Methanococcus voltae* einzusetzen (Sniezko et al., 1998). Auch konnte das Dihydrofolat-Reduktase-Gen (*dhfr*) aus *Haloferax volcanii* unter der Kontrolle einer Promotorgenbank eingesetzt werden, um die TATA-Box der halophilen Archaea zu bestimmen (Danner & Soppa, 1996). Desweiteren war es gelungen, den *nifH*-Promotor aus dem *nif*-Regulon (für Stickstofffixierung) des Archaeons *Methanococcus maripaludis* und den konstitutiv aktiven Methylreduktase-Promotor aus dem Archaeon *Methanococcus voltae* vor den Leserahmen des *lacZ*-Gens aus *E. coli* zu fusionieren (Cohen-Kupiec et al., 1997). Die Transformanten wurden auf X-Gal-haltigen Agarplatten angezogen, wodurch ihre  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durch Blaufärbung der Kolonien detektiert wurde. Ihre  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität konnte durch Umsetzen von ONPG quantifiziert werden.

In einer vorangegangenen Arbeit wurden die drei verschiedenen *gvpA*-Promotoren pA, cA und mcA direkt am Startcodon des jeweiligen *gvpA*-Gens mit dem Startcodon des *bgaH*-Reporter-gens fusioniert (Gregor, 1998). Bei manchen der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den entsprechenden Reporter-genkonstrukten war keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachweisbar, obwohl mit Hilfe von Northern-Analysen die *bgaH*-mRNA nachweisbar war. Dies führte zu der Annahme, dass das Fehlen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in diesen Transformanten auf einem Problem bei der Translation der *bgaH*-mRNA beruhte. Bei der Fusion der drei *gvpA*-Promotoren, war die Restriktionsschnittstelle *NcoI* am 5'-Ende des jeweiligen Start-Codons eingefügt worden, wobei eine Punktmutation entstanden war, die möglicherweise die Translation verhinderte. Innerhalb dieser Arbeit sollten die *gvpA*-

Promotoren innerhalb ihres jeweiligen *gvpA*-Leserahmens an das ATG-Startcodon des *bgaH*-Leserahmens fusioniert, um die Punktmutation zu verhindern.

### **Ziel dieser Arbeit**

In dieser Arbeit standen das *bgaH*-Reporter-gen und die Promotoren der *gvpA*-Gene aus der p-vac-, der c-vac- und der mc-vac-Region im Mittelpunkt. Zunächst sollte das *bgaH*-Reportergensystem für *Hf. volcanii* etabliert werden, um dann mit diesem System halobakterielle Genregulation zu untersuchen. Dazu sollte die Stärke der *gvpA*-Promotoren aus den drei vac-Regionen quantifiziert werden und die Regulation ihrer Transkription näher untersucht werden. Mit Hilfe dieser Konstrukte sollten dann die basalen Aktivitäten der *gvpA*-Promotoren ermittelt und miteinander verglichen werden. An diesen Promotoren wurden auch die konservierten Sequenzen des BRE-Elements und der TATA-Box verändert, um zu testen ob diese Veränderungen einen Einfluss auf die basale Aktivität der Promotoren haben. Ein weiteres Ziel war es, die Aktivität der drei *gvpA*-Promotoren pA, cA und mcA bei Anwesenheit des GvpE-Aktivatorproteins zu bestimmen. Es sollte dabei die Wirkung aller drei verschiedener GvpE-Aktivatorproteine auf alle drei verschiedenen *gvpA*-Promotoren untersucht werden.

Da bisher keine DNA-Bindung von GvpE gezeigt werden konnte, die Transkription der *gvpA*-Promotoren aber bei Anwesenheit des GvpE-Aktivators erhöht wird, sollte der Wechselwirkungsbereich auf der *gvpA*-Promotoren mit den GvpE-Proteinen untersucht werden. Hierzu sollten verschiedene Mutanten der *gvpA*-Promotoren über *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt und vor den *bgaH*-Leserahmen fusioniert werden, um eventuelle Aktivitätsänderung im Vergleich zum Wildtyppromotor zu ermitteln.

Da die Gasvesikelbildung in *Haloferax mediterranei* (mc-vac) von der Salzkonzentration abhängig reguliert ist und es noch keine Studien zur Salzabhängigen Genregulation gibt, sollte untersucht werden, wie sich unterschiedliche Salzkonzentrationen im Medium auf die Aktivität verschiedener Promotoren von *Hf. mediterranei* und *Hb. salinarum* in *Hf. volcanii* WFD11-Transformaten auswirken.

## MATERIAL und METHODEN

### Material

#### Besondere Materialien

Agarose für kleine DNA-Fragmente (< 1 kb)	Biozym, Oldendorf
DAP <sub>Goldstar</sub> -Polymerase	Eurogentec, Seraing
Digoxigenin Kits (Markierung, Detektion)	Boehringer Ingelheim
ECL-Detektionskit	Amersham
Lovastatin (Derivat von Mevinolin)	Geschenk von MSD Sharp & Dohme
MERmaid Kit	Bio101, La Jolla
Novobiocin	Sigma, St. Louis
ONPG (Ortho-nitro-phenylgalaktosid)	Merck, Darmstadt
PEG (Polyethylenglykol) 600	Sigma, St. Louis
Röntgenfilme	Kodak, Rochester
<i>SequiTherm EXCEL</i> Long-Read Sequencing Kit-LC	BIOzym
Long ranger gel solution für Sequenzgel	FMC BioProducts, USA
T4 DNA Ligase	Pharmacia

Die nicht genannten Chemikalien und Hilfsmittel stammten von den Firmen AppliChem, Boehringer Ingelheim, Merck, Roth, Sigma und Serva. Die Bestandteile für die Nährmedien wurden von den Firmen Bacto, Difco und Oxoid bezogen. Die Restriktionsendonukleasen waren von den Firmen Boehringer Ingelheim, MBI Fermentas, Eurogentec, New England Biolabs, Stratagene und USB.

## Synthetische Oligonukleotide

### a) zum Sequenzieren

Name	Sequenz*	Position†	Mutation
reverse	CACACAGGAAACAGCTATGA	832-813 <sup>e</sup>	
universal	TTGTAAAACGACGGCCAGT	616-596 <sup>e</sup>	

Die Oligonukleotide waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff (IRD41) markiert.

### b) zur Amplifizierung bestimmter DNA-Fragmente mittels PCR

Name	Sequenz*	Position†	Mutation
<i>bgaH-NcoI</i>	CATTGTCCATGGCAGTTGGTGTCTG	2356-2380 <sup>a</sup>	<i>bgaH-NcoI</i>
<i>bgaH-BamHI</i>	GTGACGCGGATCCGCGTGTGTAC	4571-4549 <sup>a</sup>	<i>bgaH-BamHI</i>
<i>cA-XbaI</i>	CTTGTTCTAGATTTTGTACAAAT	6087-6109 <sup>b</sup>	<i>cA-XbaI</i>
<i>cA-NcoI</i>	GTTGCGCCATGGTGATCTGG	6216-6197 <sup>b</sup>	<i>cA-NcoI</i>
<i>pA-XbaI</i>	CTCCGTATCTAGAAGTACGAC	13-33 <sup>d</sup>	
<i>pA-NcoI</i>	GGTTGCGCCATGGGTGATCTG	135-115 <sup>d</sup>	
<i>mcA-XbaI</i>	CCAAACTATCTAGATGTTTGAC	4213-4192 <sup>c</sup>	
<i>mcA-NcoI</i>	TGAACCATGGTTGATCTGGG	4093-4112 <sup>c</sup>	
pE1	CGGAGATGGTGGATCCATGGACGACTTGC	1690-1708 <sup>e</sup>	
pE2	GATCTTCCTGTCTGCAGGTACCGTATGTGTATAGG	2309-2275 <sup>e</sup>	

**Tabelle 1.** Synthetische Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Sequenzen sind in Richtung 5' \_ 3' angegeben. Künstlich eingefügte Restriktionsschnittstellen sind in den Sequenzen unterstrichen oder kursiv dargestellt. Die Bindestelle der Oligonukleotide innerhalb der jeweiligen Sequenzen: † <sup>a</sup> *bgaH* Sequenz, <sup>b</sup> *c-vac* Sequenz, <sup>c</sup> *mc-vac* Sequenz, <sup>d</sup> *p-gvpACNO* Sequenz, <sup>e</sup> *p-gvpD-M* Sequenz, <sup>e</sup> Plasmid pBluescript II SK+ (Stratagene 1995). Diese Sequenzen sind unter folgenden „Accession numbers“ zugänglich: U70664 (*bgaH*), X94701 (*c-vac*), X64701 (*mc-vac*), X64729 (*p-gvpACNO*) und X55648 (*p-gvpDEFGHIJKLM*) (R=A+G; Y=A+G+C; S=G+C; K=G+T; W=A+T).

## c) zur gerichteten Mutagenese des cA-Promotors

Name	Sequenz*	Position†	Mutation
cA-Mut	CTTGTTCTAGATTTTGTACAAATCAGCGAACTATTAC GAGCGCCGAAACGGGGRYRACKYASWRSGGCGG	6087-6158 <sup>b</sup>	6040-6153 <sup>b</sup> GTTGAACT CACAAAC>R YYRRACK YASWRS
cA-Delta	CTTGTTCTAGATTTTGTACAAATCAGCGAACTATTAC GAGCGCCGAAACGGGGGTTGACACAACGGCGG	6087-6158 <sup>b</sup>	Δ: 6145- 6147 <sup>b</sup>
cA-TATA-0	TCCGGAACTCCCTGTAGTT	6162-6181 <sup>b</sup>	
cA-TATA-1	GTGTCCGGATAACCGCCGTTGTGAGTT	6144-6170 <sup>b</sup>	
pA-cA	CCGGAAAACGATGTGTATGGTTTCACCAGTCGTTTC GGC	6166-6158 <sup>b</sup> , 74-54 <sup>d</sup> , 6136-6128 <sup>b</sup>	
pA-cA-1	ACTGGTGAAACCATACACATCGTT	6158-6160 <sup>b</sup> , 54-74 <sup>d</sup>	
pA-cA-2	ATGGTTTCACCAGTCGTTACGGCGCTCGTAA	6131-6120 <sup>b</sup> , 53-49 <sup>d</sup>	
pA-cA-3	ATGGTTTCACCAGTCGTTATGTCTCTCGTAATAGTT	6126-6115 <sup>b</sup> , 53-44 <sup>d</sup>	
pA-cA-4	GTTTTCCGGAACTCCCTGTAGTT	6158-6181 <sup>b</sup>	
pA-cA-5	TGTCCGGAAAACGATGTGTATGGTTTCAACCCCGT TT	6169-6158 <sup>b</sup> , 74-59 <sup>d</sup> , 6141-6132 <sup>b</sup>	
pA-cA-6	TGTCCGGAAAACGATGTGTATGGTTTCAACCCCGT TT	6169-6158 <sup>b</sup> , 74-63 <sup>d</sup> , 6146-6132 <sup>b</sup>	
pA-cA-7	CGTTTCGGCGCTCGTAATAGTTCGCT	6136-6111 <sup>b</sup>	
pA-cA-8	AGCGCCGAAACGACTGGTGAAACCACAACGGCGGT TTTCCGGAACT	6125-6136 <sup>b</sup> , 54-64 <sup>d</sup> , 6148-6171 <sup>b</sup>	
pA-cA-9	AGCGCCGAAACGACTGGTGAAACCATAACGGCGGT TTTCCGGAACT	6125-6136 <sup>b</sup> , 64-59 <sup>d</sup> , 6153-6171 <sup>b</sup>	
BT-null	CGGAACTCCCTGTAGTT	6174-6181 <sup>b</sup>	
TATA	AGGGAGTGTCCGCATAAGCGCCGTTGTGA	6175-6164 <sup>b</sup> , 80-75 <sup>d</sup> , 6157-6147 <sup>b</sup>	
BRE	AGGGAGTGTCCGGAAAACGATGTGTGTGAGTTCAA	6175-6158 <sup>b</sup> , 74-66 <sup>d</sup> , 6150-6141 <sup>b</sup>	
BRETATA	AGGGAGTGTCCGCATAAGGATGTGTGTGAGTTCAA	6175-6164 <sup>b</sup> , 80-66 <sup>d</sup> , 6150-6141 <sup>b</sup>	

## d) zur ortsgerechten Mutagenese des mcA-Promotors

Name	Sequenz*	Position†	Mutation
mcA-Del-Pal	CCAAACTATCTAGATGTTTGACTCATTACGAGAGGT GAAACGGTTGCACCAACACGAATG	4213-4151 <sup>c</sup>	Δ4166-4164 <sup>c</sup>
mcA-Pal-Mut	CCAAACTATCTAGATGTTTGACTCATTACGAGAGGT GAAACGRYYRMTKRAYSWRSACGAATG	4213-4151 <sup>c</sup>	4181-4158 <sup>c</sup> GTTGCTGAAC CAAC>RYYRM TKRAYSWRS
mcA-Delta0	ATTTTGTTACTTGCCAACACGTT	4150-4128 <sup>c</sup>	
mcA-DeltaI	AAGTAACAAAATGTTGGTTCAGCAACCGTTTCA	4139-4178 <sup>c</sup>	Δ4151-4157 <sup>c</sup>
mcA-DeltaII	AAGTAACAAAATCATTTCGTGTCAGCAACCGTTTCACCT	4139-4181 <sup>c</sup>	Δ4158-4164 <sup>c</sup>
mcA-DeltaIII	AAGTAACAAAATCATTTCGTGTTGGTTCGTTTCACCT CTCGTAATGA	4139-4191 <sup>c</sup>	Δ4165-4171 <sup>c</sup>
mcA-DeltaIV	AAGTAACAAAATCATTTCGTGTTGGTTCAGCAACCCT CTCGTAATGAGTCAAA	4139-4197 <sup>c</sup>	Δ4172-4178 <sup>c</sup>
mcA-DeltaV	TGCCAAACTATCTAGATGTTTGACTCATTATGAAAC GGTTGCTGAA	4215-4263 <sup>c</sup>	Δ4185-4179 <sup>c</sup>
mcA-DeltaVI	TGCCAAACTATCTAGATGTTTGACGAGAGGTGAAAC GGTTGCTGAA	4215-4263 <sup>c</sup>	Δ4192-4186 <sup>c</sup>
mcA-DeltaVII	TGCCAAACTATCTAGACTCATTACGAGAGGTGAAA	4215-4273 <sup>c</sup>	Δ4199-4193 <sup>c</sup>
mcA-M0	ACGAATGATTTTGTTACTT	4157-4139 <sup>c</sup>	
mcA-M1	AAAATCATTTCGTCAATGTTTCAGCAA	4146-4170 <sup>c</sup>	4158-4161 <sup>c</sup> GTTG>CAAT
mcA-M2	AAAATCATTTCGTGTTTCAGCAGCAACCGTTTCA	4146-4178 <sup>c</sup>	4161-4164 <sup>c</sup> GGTT>TCAG
mcA-M3	AAAATCATTTCGTGTTGGTACTCAACCGTTTCACCT	4146-4181 <sup>c</sup>	4164-4167 <sup>c</sup> TCAG>GACT
mcA-M4	AAAATCATTTCGTGTTGGTTCATATTCCGTTTCACCT	4146-4181 <sup>c</sup>	4167-4170 <sup>c</sup> GCAA>TATT
mcA-M5	AAAATCATTTCGTGTTGGTTCAGCATGGTTTTTCACCTC T	4146-4183 <sup>c</sup>	4170-4173 <sup>c</sup> ACCG>TGGT
mcA-M6	AAAATCATTTCGTGTTGGTTCAGCAACCTGAGCACCT CTCGTA	4146-4187 <sup>c</sup>	4173-4176 <sup>c</sup> GTTT>TGAG
mcA-M7	TCTAGATGTTTGACTCATTACGAGAGTGTC AACGGT TGCTGA	4205-4164 <sup>c</sup>	4179-4176 <sup>c</sup> CACT>GACA
mcA-M8	TCTAGATGTTTGACTCATTACGACTCTTGAAACGGTT GCT	4205-4166 <sup>c</sup>	4182-4179 <sup>c</sup> CTCC>AGAG
mcA-M9	TCTAGATGTTTGACTCATTAAACCAGGTGAAACGGT TGCT	4205-4166 <sup>c</sup>	4185-4182 <sup>c</sup> TCTC>GGTT
mcA-M10	TCTAGATGTTTGACTCACAGAGAGAGGTGAAACGGT TGCT	4205-4166 <sup>c</sup>	4188-4182 <sup>c</sup> CTCT>TCTG
mcA-M11	TCTAGATGTTTGACGAGCTACGAGAGGTGAAA	4205-4188 <sup>c</sup>	4191-4188 <sup>c</sup> GCTC>GCTC

**Verwendete Organismen**

<i>Escherichia coli</i> Stämme	Herkunft
DH5a	Hanahan, 1983
X11-Blue	Bullock et al., 1987
Top10F <sup>+</sup>	Invitrogen, USA
GM1674 (dam <sup>-</sup> )	Palmer & Marinus, 1994
<i>Haloferax volcanii</i> WFD11	Cline et al., 1989

**Verwendete Plasmide (Antibiotika-Resistenzen)**

pBluescriptII SK <sup>+</sup> (Ampicillin)	Stratagene, La Jolla
pUC19 (Ampicillin)	Yanisch-Perron et al., 1985
pWL102 (Ampicillin, Mevinolin)	Lam & Doolittle, 1989
pJAS35 (Ampicillin, Novobiocin)	Pfeifer et al., 1994; Soppa, nicht publiziert
pMLH32 (Ampicillin, Novobiocin)	Holmes & Dyall-Smith, 2000

## Methoden

### Wachstumsbedingungen

*Escherichia coli* Stämme wurden aerob bei 37 °C in LB-Medium (Sambrook & Russell, 2001) angezogen. Flüssigkulturen wurden bei 220 upm auf einem Schüttler inkubiert. Zur Selektion auf Transformanten wurde 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

*Haloferax volcanii* WFD11 wurde in Vollmedium (VM) mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (12% VM: 79 g/l NaCl; 15% VM: 109 g/l NaCl; 20% VM: 175 g/l NaCl; 25% VM: 209 g/l NaCl) angezogen ( $1^{-1}$ ): 37 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , 3,7 g KCl, 5 g Trypton, 3 g Hefeextrakt, 25 ml 1 M Tris-HCl, (pH 7,2), 5 ml 10%  $CaCl_2 \times 2 H_2O$ , 100 µl 100 µM  $MnCl_2$ . Transformanten wurden auf Agarmedium mit 0,2 µg/ml Novobiocin und/oder 6 µg/ml Mevinolin angezogen. Flüssigkulturen wurden in 50 ml VM in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter Schütteln (180 bis 200 upm) angezogen. Feste Medien enthielten 18 g/l Bacto-Agar.

### Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11

Vor der Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11 wurde jedes Plasmidkonstrukt durch *E. coli* GM1674 (*dam*<sup>-</sup>) passagiert, um eine halobakterielle Restriktionsbarriere (Holmes et al., 1991) zu vermeiden. Die Transformation wurde nach bereits beschriebenem Protokoll (Pfeifer & Ghahraman, 1993) durchgeführt. Die Anwesenheit der verschiedenen Konstrukte wurde durch Restriktionsanalyse und falls erforderlich auch mit Southern-Analyse nachgewiesen.

### Herstellung von DNA-Konstrukten zur Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11

Der 2203 bp große ***bgaH*-Leserahmen** wurde mittels PCR amplifiziert unter Verwendung der Oligonukleotide *bgaH-NcoI* und *bgaH-BamHI* (Tabelle 1b) zusammen mit dem Plasmid pMLH32 (Holmes & Dyll-Smith, 2000) als Matrize. Die *NcoI*-Schnittstelle des Primers *bgaH-NcoI* umfasste das ATG-Startcodon des *bgaH*-Leserahmens. Der *bgaH-BamHI*-Primer dagegen war komplementär zu einer Sequenz 200 bp strangabwärts des *bgaH*-Stopcodons.

### ***gvpA*-Promotoren**

Alle *gvpA*-Promotoren wurden mittels PCR mit synthetischen Oligonukleotiden (Tabelle 1) amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende eine *Xba*I-Schnittstelle sowie am 3'-Ende eine *Nco*I-Schnittstelle eingefügt.

Die drei *gvpA*-Promotoren **pA**, **cA**, und **mcA** wurden mittels PCR mit den synthetischen Oligonukleotiden A-*Xba*I und A-*Nco*I (Tabelle 1b) amplifiziert. Die jeweiligen A-*Xba*I Primer waren komplementär zu einer Sequenz am Beginn der *gvpA*-Promotoren, wohingegen die A-*Nco*I Primer komplementär zu einer Sequenz strangabwärts des ATG-Startcodons der *gvpA* Gene waren. Als Matrizen wurden Subfragmente der drei verschiedenen *vac*-Regionen verwendet, die in *E.coli* Plasmide inseriert waren.

Mit den synthetischen Oligonukleotiden pA-*Xba*I und pA-*Nco*I wurde der 127 bp lange pA-Promotor, mit cA-*Xba*I und cA-*Nco*I der 137 bp lange cA-Promotor und mit mcA-*Xba*I und mcA-*Nco*I der 126 bp lange mcA-Promotor amplifiziert.

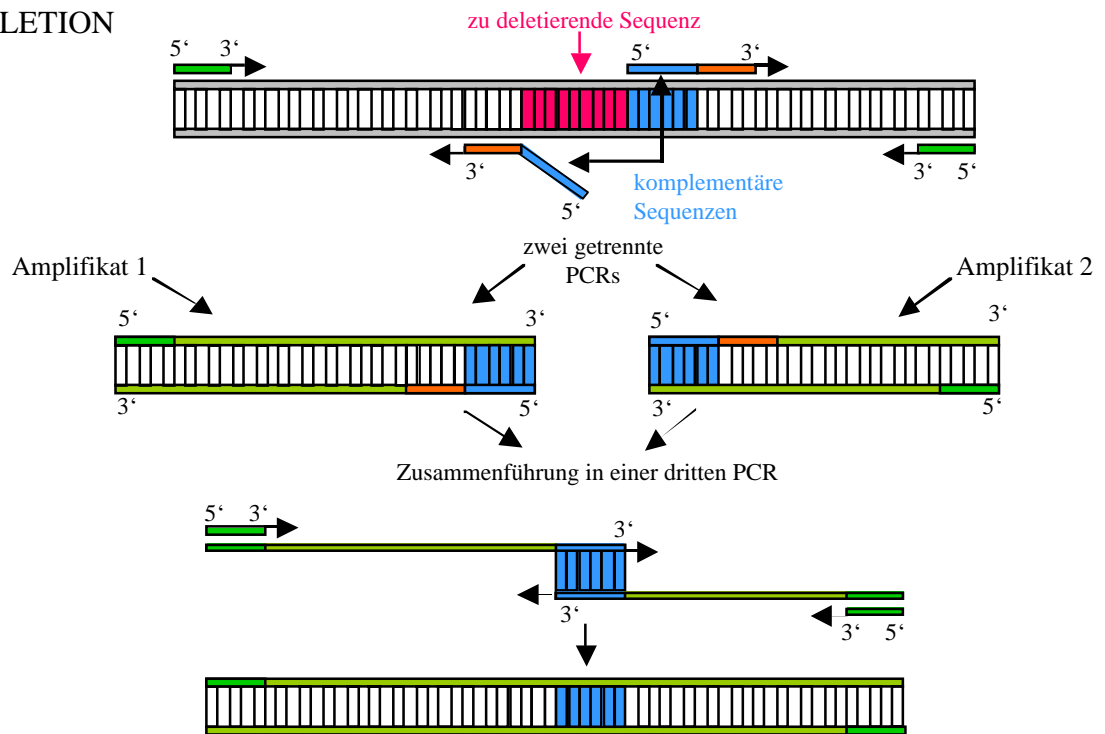
### ***In-vitro*-Mutagenese-PCR**

Die *in-vitro*-Mutagenese-PCR wurde nach Lottspeich & Zorbas (1998) durchgeführt. Mit dieser Methode wurden Substitutionen und Deletionen in die DNA-Sequenz eingeführt.

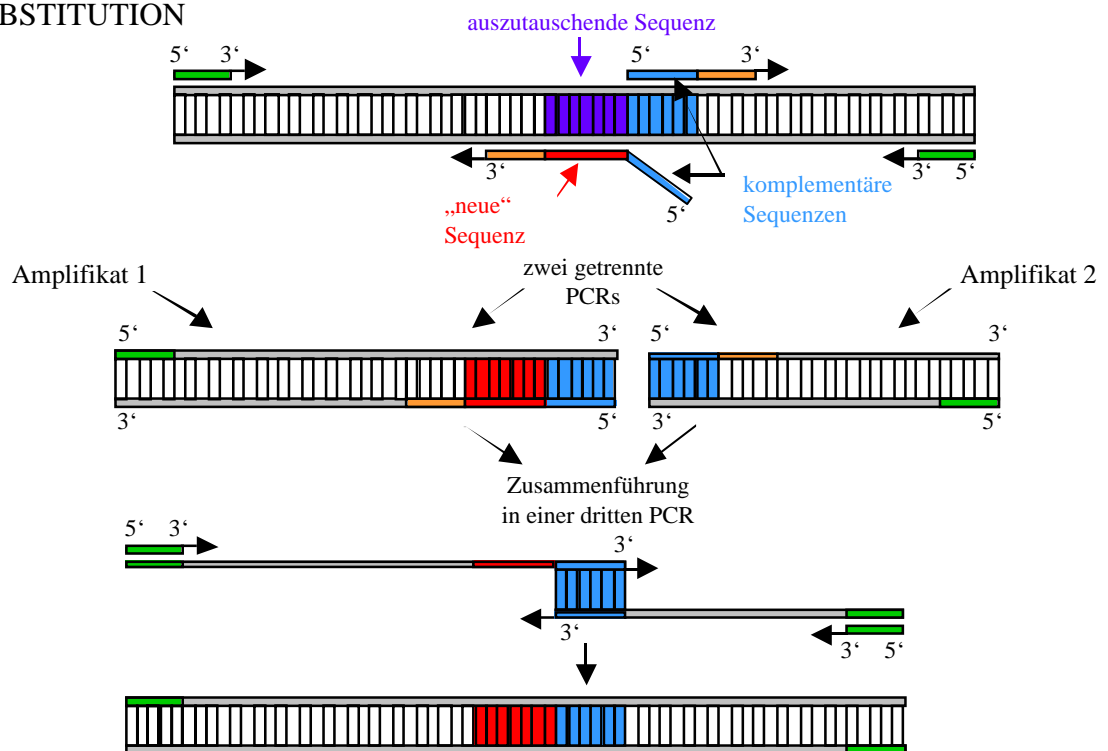
Zum Deletieren (Abb. 4a) von Nukleotidsequenzen innerhalb eines PCR-Produkts wird die Zielsequenz zunächst in zwei voneinander getrennten PCRs amplifiziert. Dabei verwendet man sogenannte Mutationsprimer, welche die zu deletierende Sequenz ausschließen. An ihrem 5'-Ende enthalten die Mutationsprimer eine zueinander komplementäre Sequenz. Die beiden PCR-Produkte, das 1. und das 2. Amplifikat, werden nun zusammen mit den beiden Randprimern in eine dritte PCR eingesetzt. Das 1. und das 2. Amplifikat lagern sich dabei an ihren komplementären Enden so aneinander, dass sie verlängert werden und die Zielsequenz mit Deletion entsteht.

Der Austausch von Nukleotidsequenzen (Abb. 4b) innerhalb des PCR-Produktes geschieht in ähnlicher Art und Weise. Die Mutationsprimer haben dabei ebenfalls an ihrem 5'-Ende eine zueinander komplementäre Sequenz. Sie binden so an die Zielsequenz, dass der nicht bindende Teil genauso lang ist, wie das 5'-Ende. Diese Sequenz enthält die zu substituierenden Nukleotide.

## a) DELETION



## b) SUBSTITUTION



**Abb. 4** *In-vitro*-Mutagenese-PCR a) Zur DELETION eines DNA-Abschnitts wird die Zielsequenz in zwei getrennten PCRs so amplifiziert, dass die zu deletierende Sequenz (in pink dargestellt) von der Amplifikation ausgeschlossen wird. Die inneren Primer sind an ihrem 5' Ende zueinander komplementär (in blau dargestellt). In einer dritten PCR lagern sich die komplementären Enden der PCR-Produkte aneinander und werden dann mit den äußeren Primern amplifiziert. b) Zur SUBSTITUTION eines DNA Abschnittes wird ähnlich vorgegangen. In den beiden getrennten PCRs zu Beginn, wird die Sequenz nur nicht von der Amplifikation ausgeschlossen, sondern ausgetauscht. (nach Lottspeich & Zorbas, 1998)

### mutierte cA-Promotorssequenzen

Für die Herstellung des mutierten Promotors cA- $\Delta$ ACT wurden die synthetischen Oligonukleotide cA-*NcoI* und cA-Delta zusammen mit c-*gvpA* als Matrize in die PCR eingesetzt. Der Primer cA-Delta enthält eine Deletion von drei Nukleotiden innerhalb einer Sequenz (Position 6145-6147<sup>b</sup>), die komplementär zu einer palindromischen Sequenz (GTTGAACTCACAAC) Position (6140-6153<sup>b</sup>) stromaufwärts der TATA-Box im cA-Promotor liegt. Der amplifizierte Promotor cA- $\Delta$ ACT enthielt somit die Deletion der drei Nukleotide ACT.

<sup>b</sup> c-vac Sequenz, die unter der *accession number* X94701 zugänglich ist.

Die mutierten cA-Promotoren **cA-Mut1 bis cA-Mut13** wurden mit den synthetischen Oligonukleotiden cA-*NcoI* und cA-Mut zusammen mit c-*gvpA* als Matrize amplifiziert. Der Primer cA-Mut enthält eine 14 Nukleotide lange degenerierte Sequenz, die komplementär der palindromischen Sequenz ist.

Der mutierte cA-Promotor **cA-TATA.A** wurde mit der *in-vitro*-Mutagenese PCR hergestellt. Hierzu wurden die Mutationsprimer cA-TATA1 und cA-TATA0 sowie die Randprimer cA-*XbaI* und cA-*NcoI* zusammen mit der Matrize c-*gvpA* eingesetzt. Der Mutationsprimer cA-TATA1 enthielt ein zur Zielsequenz unterschiedliches Nukleotid (T>A), was eine Substitution in der TATA-Box des c-*gvpA*-Promotors bewirkte.

### chimäre pA-cA-Promotoren

Um den chimären Promotor **pA-cA** herzustellen, wurde mit den Primern cA-*XbaI* und pA-cA zusammen mit der Matrize c-*gvpA* eine 60 Nukleotide lange DNA-Sequenz amplifiziert, die anschließend als Megaprimer eingesetzt wurde. Der resultierende Megaprimer enthielt 21 bp der p-*gvpA*-Promotorsequenz, die an die TATA-Box des c-*gvpA*-Promotors fusioniert war. In einer zweiten PCR wurde mit diesem Megaprimer und dem Primer cA-*NcoI* der chimäre Promotor cA-pA amplifiziert.

Der chimäre Promotor **pA-cA+5u** wurde mit der *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt. Der Mutationsprimer pA-cA-1 wurde zusammen mit dem Randprimer cA-*NcoI* und dem chimären Promotor pA-cA als Matrize in eine PCR eingesetzt, die das 1. Amplifikat lieferte. In einer weiteren PCR wurden der Mutationsprimer pA-cA-2 zusammen mit dem Randprimer cA-*XbaI* und dem Promotor pA-cA als Matrize eingesetzt, um das 2. Amplifikat herzustellen. In

der folgenden PCR wurde das 1. Amplifikat zusammen mit dem 2. Amplifikat und den Randprimern eingesetzt. Hierbei wurde der Promotor pA-cA+5u amplifiziert, der 26 bp der p-*gvpA*-Promotorsequenz enthielt.

Der chimäre Promotor **pA-cA+10u** wurde mit dem Mutationsprimer pA-cA-3 in der gleichen Art und Weise hergestellt. Der Promotor pA-cA+10u enthielt 31 bp der p-*gvpA*-Promotorsequenz.

Der chimäre Promotor **pA-cA-5u** wurde mit dem Mutationsprimer pA-cA-4 zusammen mit dem Randprimer *cA-NcoI* und *c-gvpA* als Matrize in eine PCR eingesetzt, um das 1. Amplifikat herzustellen. In einer zweiten PCR wurde der Mutationsprimer pA-cA-5 zusammen mit dem Randprimer *cA-XbaI* und *c-gvpA* als Matrize eingesetzt, um das 2. Amplifikat herzustellen. In der folgenden PCR wurde das 1. Amplifikat zusammen mit dem 2. Amplifikat und den Randprimern eingesetzt. Hierbei wurde der Promotor pA-cA-5u amplifiziert, der 16 bp der p-*gvpA*-Promotorsequenz enthielt.

Die Herstellung des chimären Promotors **pA-cA-10u**, der 11 bp der p-*gvpA*-Promotorsequenz enthielt, erfolgte nach dem selben Schema. Hier wurde der Mutationsprimer pA-cA-6 verwendet.

Die Herstellung des chimären Promotors **pA-cA-5d** erfolgte ebenfalls mit der *in-vitro*-Mutagenese-PCR. Der Mutationsprimer pA-cA-7 wurde zusammen mit dem Randprimer *cA-XbaI* und *c-gvpA* als Matrize in eine PCR eingesetzt, die das 1. Amplifikat lieferte. In einer weiteren PCR wurde der Mutationsprimer pA-cA-8 zusammen mit dem Randprimer *cA-NcoI* und *c-gvpA* als Matrize eingesetzt, um das 2. Amplifikat zu synthetisieren. In der folgenden PCR wurden das 1. und das 2. Amplifikat zusammen mit den Randprimern eingesetzt, um den Promotor pA-cA-5d zu amplifizieren, der 16 bp der p-*gvpA*-Promotorsequenz enthielt.

Der chimäre Promotor **pA-cA-10d**, der 11 bp der p-*gvpA*-Promotorsequenz enthielt, wurde wie der Promotor pA-cA-5d hergestellt. Anstelle des Mutationsprimers pA-cA-8 wurde der Mutationsprimer pA-cA-9 verwendet.

### **cA-pA-BRE-/TATA-Promotormutanten**

Auch der chimäre Promotor **cA-pA-TATA** wurde mit der *in-vitro*-Mutagenese PCR hergestellt. Der Mutationsprimer BT-null wurde zusammen mit dem Randprimer *cA-NcoI* und *c-gvpA* als Matrize in eine PCR eingesetzt, die das 1. Amplifikat lieferte. In einer weiteren PCR wurde der Mutationsprimer TATA zusammen mit dem Randprimer *cA-XbaI* und *c-gvpA* als Matrize eingesetzt, um das 2. Amplifikat herzustellen. In der folgenden PCR

wurden das 1. und das 2. Amplifikat zusammen den Randprimern eingesetzt, um den chimären Promotor pA-cA-TATA herzustellen.

Die beiden chimären Promotoren **cA-pA-BRE** und **cA-pA-BRETATA** wurden nach dem gleichen Schema hergestellt, wobei anstelle des Mutationsprimers TATA der Mutationsprimer BRE bzw. BRETATA eingesetzt wurde.

### **mutierte mcA-Promotorsequenzen**

Die mcA-Promotormutante **mcA-Delta** wurde mit den synthetischen Oligonukleotiden mcA-*NcoI* und mcA-Del-Pal zusammen mit mc-*gvpA* als Matrize amplifiziert. Der Primer mcA-Del-Pal kodiert für eine Deletion von 3 Nukleotiden (TGA) innerhalb einer Sequenz (Position 4166-4164<sup>c</sup>), die komplementär zu einer palindromischen Sequenz (GTTGCTGAACCAAC) (Position 4158-4171<sup>c</sup>) stromaufwärts der TATA-Box liegt.

<sup>c</sup> mc-vac Sequenz, die unter der *accession number* X64729 zugänglich ist.

Die mcA-Promotormutanten **mcA-Mut1** und **mcA-Mut2** wurden mit den synthetischen Oligonukleotiden mcA-*NcoI* und mcA-Pal-Mut zusammen mit mc-*gvpA* als Matrize amplifiziert. Der Primer mcA-Pal-Mut enthält eine 14 Nukleotide lange degenerierte Sequenz, die komplementär zur palindromischen Sequenz ist.

### **mcA-Promotor-Deletionsmutanten**

Die mcA-Promotor-Deletionsmutanten mcA-Delta I bis VII enthielten jeweils eine Deletion von 7 Nukleotiden stromauf der TATA-Box.

Der mutierte Promotor **mcA-DeltaI** wurde über *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt. Der Mutationsprimer mcA-Delta0 wurde zusammen mit dem Randprimer mcA-*NcoI* und mc-*gvpA* als Matrize in eine PCR eingesetzt, die das 1. Amplifikat lieferte. In einer weiteren PCR wurde der Mutationsprimer mcA-DeltaI zusammen mit dem Randprimer mcA-*XbaI* und mc-*gvpA* als Matrize eingesetzt, um die 2. Amplifikat herzustellen. In der nächsten PCR wurden das 1. und das 2. Amplifikat zusammen mit den Randprimern eingesetzt, um den Promotoren mcA-DeltaI zu amplifizieren.

Die mutierten Promotoren **mcA-DeltaII**, **mcA-DeltaIII** und **mcA-DeltaIV** wurden genauso hergestellt. Der Mutationsprimer mcA-DeltaI wurde jeweils ersetzt durch den Mutationsprimer mcA-DeltaII, mcA-DeltaIII bzw. mcA-DeltaIV.

Die mcA-Promotor-Deletionsmutanten **mcA-DeltaV**, **mcA-DeltaVI** und **mcA-DeltaVII** wurden mit den synthetischen Oligonukleotiden mcA-DeltaV bzw. mcA-DeltaVI bzw. mcA-DeltaVII und mcA-*NcoI* zusammen mit mc-*gvpA* als Matrize amplifiziert.

#### **mcA-Promotor-Substitutionsmutanten**

Die mcA-Promotormutanten mcA-M1 bis M11 enthielten jeweils eine Substitution von 4 Nukleotiden stromaufwärts der TATA-Box.

Die Promotormutante **mcA-M1** wurde auch über *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt. Der Mutationsprimer mcA-M 0 wurde zusammen mit dem Randprimer mcA-*NcoI* und mc-*gvpA* als Matrize in eine PCR eingesetzt, die das 1. Amplifikat lieferte. Der Mutationsprimer mcA-M1 wurde zusammen mit dem Randprimer mcA-*XbaI* und mc-*gvpA* als Matrize in eine weitere PCR eingesetzt, um das 2. Amplifikat herzustellen. In der folgenden PCR wurden das 1. und das 2. Amplifikat zusammen mit den Randprimern eingesetzt, um die Promotormutante mcA-M1 herzustellen.

In der gleichen Art wurden die Promotormutanten **mcA-M2**, **mcA-M3**, **mcA-M4**, **mcA-M5** und **mcA-M6** hergestellt, wobei der Mutationsprimer mcA-M1 jeweils durch den Mutationsprimer mcA-M2, mcA-M3, mcA-M4, mcA-M5 bzw. mcA-M6 ausgetauscht wurde.

Die mcA-Promotormutanten **mcA-M7**, **mcA-M8**, **mcA-M9**, **mcA-M10** und **mcA-M11** wurden mit den synthetischen Oligonukleotiden mcA-M7, mcA-M8, mcA-M9, mcA-M10 bzw. mcA-M11 und mcA-*NcoI* zusammen mit mc-*gvpA* als Matrize amplifiziert.

Alle Promotorfragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt, mit *NcoI* und *XbaI* hydrolytisch gespalten und zusammen mit dem *bgaH*-Leserahmen, der mit *NcoI* und *BamHI* geschnitten war, sowie dem Plasmid pBluescript II SK (+), das mit *XbaI* und *BamHI* restringiert war, in eine Ligation eingesetzt. Die exakte Sequenz wurde über DNA-Sequenzanalyse überprüft. Die *gvpA*-Promotor-*bgaH*-Fusionsgene wurden dann als *XbaI*-*BamHI*-Fragmente in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert.

#### ***gvpE*-Konstrukte**

Für die Expression von ***p-gvpE*** wurde der *p-gvpE*-Leserahmen mit den synthetischen Oligonukleotiden pE1 und pE2 und *p-gvpE* in einer PCR amplifiziert. Der Primer pE1 enthielt die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *NcoI*, wohingegen der Primer pE2 die Schnittstellen *PstI* und *Acc65I* enthielt. Das PCR Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt, mit *BamHI* und *PstI* geschnitten und mittels dieser Schnittstellen in das Plasmid pBluescript II SK (+) ligiert. Die korrekte Fusion wurde über DNA-Sequenzanalyse überprüft. Der p-

*gvpE* Leserahmen wurde als *NcoI*-*Acc65I* Fragment in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 ligiert, wobei er direkt über sein ATG-Startcodon an den *fdx*-(Ferredoxin)-Promotor fusioniert wurde.

Die Konstrukte **mc-*gvpE***-pJAS35 und **c-*gvpE***-pJAS35 lagen bereits vor (Krüger et al. 1998; Röder, 1997).

Für die Expression des ***bgaH***-Gens unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors wurde der *bgaH*-Leserahmen als *NcoI*-*Acc65I*-Fragment aus dem bereits beschriebenen Konstrukt mcA-*bgaH*\*SK II (+) herausgeschnitten. Hierzu war eine partielle Restriktion notwendig, da der *bgaH*-Leserahmen eine interne *Acc65I*-Restriktionsschnittstelle enthält. Der *bgaH*-Leserahmen wurde dann über sein ATG-Startcodon direkt an den *fdx*-Promotor fusioniert.

### **Isolierung halobakterieller RNA**

Halobakterielle RNA wurde mit der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) oder mit dem RNeasy Kit von Qiagen isoliert, wonach die RNA noch mit DNase I inkubiert wurde, um störende DNA zu entfernen. Für Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden 50 ml Kultur mit einer  $A_{600}$  von 0,2 bis 0,4 und für Proben aus der stationären Wachstumsphase wurden 4,5 bis 6 ml Kultur mit einer  $A_{600}$  von 1,8 bis 2,5 zentrifugiert.

Um die Qualität der RNA zu beurteilen, wurden 2  $\mu$ l der Probe mit 8  $\mu$ l denaturierendem RNA-Mix (s.u.) gemischt, 10 min bei 65 °C denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen, und schließlich mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Durch Färben mit Toluidinblau konnte die Laufweite der 16S- und 23S-rRNA sichtbar gemacht werden.

denaturierender RNA-Mix :

250  $\mu$ l Formamid

83  $\mu$ l 37%iger Formaldehyd

50  $\mu$ l 1 x MOPS-Gelpuffer pH 8

Toluidinblau-Färbelösung:

0,1% Toluidinblau

20% (v/v) Ethanol

### **Northern-Analysen**

Zur Transkriptionsanalyse wurden 5 oder 10 µg halobakterielle Gesamt-RNA über denaturierende, formaldehydhaltige 1,2%ige Agarosegele aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembranen transferiert (Ausubel et al., 1988). Die transferierte RNA wurde durch zweistündige Inkubation bei 80 °C auf der Nylonmembran fixiert. Danach wurde die rRNA durch Anfärben mit Methylblau sichtbar gemacht, um die Quantität und die Qualität der RNA beurteilen zu können. Zur Dokumentation wurde eine Photokopie der angefärbten Membran erstellt.

Methylblau-Färbelösung:

0,5 M Natriumacetat, pH 5,2

0,004% Methylblau

### **Hybridisierung strangspezifischer Sonden mit RNA auf Northern-Membranen**

Zunächst wurde die Membran für 1-2 h in 25 ml Hybridisierungslösung (s.u.) bei 42 °C vorhybridisiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung verworfen und die strangspezifische RNA-Sonde, die in 25 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und für 10 min bei 65 °C denaturiert war, zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C.

Hybridisierungslösung:

50% Formamid

1 x SSPE

10% Dextransulfat

0,5% Magermilchpulver

1% SDS

(Das Dextransulfat wurde nach und nach in eine Lösung mit allen Bestandteilen außer SDS und SSPE gegeben und unter ständigem Schütteln und Inkubieren bei 50 °C gelöst. Nach vollständigem Lösen wurde der Rest noch zugeben.)

Die strangspezifische *bgaH* RNA-Sonde wurde mit dem T3/T7 System über *in-vitro*-Transkription synthetisiert, wobei das 2,2 kb große *NcoI-BamHI* *bgaH*-Fragment, inseriert in pBluescript, als Matrize diente. Die Sonde wurde mit DIG (Digoxigenin) unter Verwendung des DIG RNA labelling Kit (Roche) synthetisiert.

### **DNA-Isolierung**

Die Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurde mit dem Kit CONCERT Rapid Plasmid Miniprep System (GIBCO BRL) isoliert. Für die Plasmid-Isolierung aus *Haloferax volcanii* WFD11 wurde das Protokoll etwas verändert:

Es wurden 3 ml stationäre Kultur abzentrifugiert und in 250 µl Halobakterien-Resuspendierungspuffer (s.u.) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl G2 Puffer (Gibco) und mehrmaligem Invertieren wurden die Proben für 5 min bei ZT inkubiert. Dann wurden 350 µl M3 Puffer (Gibco) zugegeben, mehrmals invertiert, 5 min auf Eis inkubiert, und schließlich wurden die Proben 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Halobakterien-Resuspendierungspuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM EDTA

50 mM Glucose

1 M NaCl

### **Southern-Analysen**

Die DNA wurde nach Auftrennen über Agarosegelelektrophorese für 10 min in 0,25 M HCl zur partiellen Depurinierung, dann zum Denaturieren für 30 min in 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl und zum Neutralisieren für 30 min in 1,5 M NaCl/ 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 geschwenkt. Das Gel wurde nach jedem Schritt in deionisiertem Wasser geschwenkt. Der anschließende Transfer erfolgte wie bei Southern (1975) und Sambrook & Russell (2001) beschrieben. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC (s.u.) eingesetzt. Nach dem Transfer wurde die DNA auf der Nylonmembran durch zweistündige Inkubation bei 80 °C fixiert. Für die Detektion bestimmter DNA-Fragmente wurden mit Digoxigenin markierte DNA-Fragmente verwendet. Die Markierung der DNA erfolgte mit dem DIG DNA Labelling Kit und die Detektion mit dem DIG Luminescent Detection Kit nach Angaben des Herstellers (Boehringer Ingelheim).

20 x SSC:

3 M NaCl

0,3 M NaCitrat, pH 7

### **Sequenzanalyse**

Zur Bestimmung der DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet (Sanger et al., 1977). Für die Sequenzbestimmung wurde ein fluoreszenzmarkiertes

(IRD41) Oligonukleotid (*reverse primer*) (MWG), das komplementär zur Polylinkersequenz des Vektors pBluescript II SK (+) ist, eingesetzt. Die Sequenzreaktion wurde mit dem *SequiTherm EXCEL II Long-Read Sequencing Kit-LC* (BIOzym) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktionen wurden auf harnstoffhaltigen Gelen, die mit der Long ranger gel solution von FMC BioProducts (USA) hergestellt wurden, aufgetrennt. Der Gellauf und die Detektion erfolgte auf einem Licor 4000 Sequenziergerät.

### **Molekularbiologische Standardmethoden**

Molekularbiologische Standardmethoden, die hier nicht beschrieben sind, wurden nach Sambrook & Russell (2001) durchgeführt.

### **Herstellung von halobakteriellen Rohextrakten für Proteinuntersuchungen**

#### **a) Herstellung von Rohextrakten zur Bestimmung der Proteinkonzentration**

Es wurden zu jedem Meßpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase 1 ml und in der stationären Wachstumsphase 0,1 ml *Haloferax volcanii* WFD11-Kultur abgenommen und für 2 min bei 13.000 rpm und ZT zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann in 100 bis 300 µl TED-Puffer (s.u.) resuspendiert und für mindestens 30 min bei ZT inkubiert. Danach konnten sie ca. 1 Woche bei 4 °C gelagert werden.

TED-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8

1 mM EDTA

1 µg / ml DNase

#### **b) Herstellung von Rohextrakten zur Western-Analyse**

Es wurden 12 ml einer exponentiellen und 5 ml einer stationären *Haloferax volcanii* WFD11-Kultur entnommen und 20 min bei 10.000 rpm und 4 °C bzw. 30 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 400 µl TE-Puffer (s.u.) mit 1 µl DNase (10 mg/ml) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C gegen 1 mM (pH 8) Tris-gepuffertes Wasser dialysiert. Die Zellmembranen und andere unlösliche Zellbestandteile wurden durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und ZT von den löslichen Bestandteilen abgetrennt.

TE-Puffer :

10 mM Tris-HCl, pH 8

1 mM EDTA

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteine wurden 16% Polyacrylamidgele nach Schägger (Schägger & Jagow, 1987) verwendet. 20 µg Protein wurden vor dem Gelauftrag 10 min in SDS Probenpuffer (s.u.) aufgekocht. Als Proteingrößenstandard wurde der Protein Molecular Weight Marker #SM0431 von MBI Fermentas eingesetzt.

SDS-Probenpuffer:

125 mM Tris-HCl, pH 6,8

20% Glycerin

4% SDS

2 mM EDTA

10% (v/v) β-Mercaptoethanol

0,02% (w/v) Bromphenolblau

### **Western-Analyse**

Gelelektrophoretisch (SDS-Polyacrylamidgel) aufgetrennte Proteine wurden nach dem von Towbin et al. (1979) beschriebenen Verfahren mittels Naßblot (Midget MultiBlot-System, Pharmacia) elektrophoretisch auf Nitrozellulose übertragen. Als Transferpuffer wurde wurde 25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3 – 8,6 eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 4 °C und 100 Volt für 1 h. Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Transfer mit Ponceaurot (s.u.) angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Banden des Größenstandards wurden mit Bleistift markiert und die Membran wurde zur Dokumentation photokopiert.

Ponceaurot-Färbelösung:

0,2% (w/v) Ponceaurot

3,0% (v/v) Trichloressigsäure

3,0% (v/v) Sulfosalicylsäure

### **Proteindetektion durch Chemilumineszenz**

Die Proteindetektion durch Chemolumineszenz erfolgte mit dem ECL-System von Amersham. Die Nitrozellulose wurde nach dem Transfer über Nacht bei ZT in Blockierungspuffer (s.u.) geschwenkt. Dann wurde das erste Antiserum aus Kaninchen (Anti-mcGvpE-Serum) in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierungspuffer zugegeben und für 1 h

bei ZT geschwenkt. Nach dreimal zehnmütigem Waschen mit Blockierungspuffer wurde das zweite Antiserum aus Esel (Anti-Kaninchen-Serum) in einer 1:5000 Verdünnung zugegeben und erneut für 1 h bei ZT geschwenkt. Darauf schloss sich erneut ein dreimal zehnmütiges Waschen mit Blockierungspuffer an. Die Nitrozellulose wurde dann 1 min mit Chemilumineszenzlösung inkubiert, auf Whatmanpapier getrocknet, in Folie eingeschweißt und dann mit einem Röntgenfilm bei ZT für 1 bis 60 min inkubiert.

Blockierungspuffer:

1 x PBS

1% Magermilchpulver

0,05% Tween 20

### **Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Konzentration der Proteine in halobakteriellen Rohextrakten wurde nach der Bradford-Methode durchgeführt. Nachdem 20 µl der Proteinlysate in eine Halbmikroküvette gegeben wurden, folgte die Zugabe von 980 µl Bradfordreagenz. Nach sorgfältigem Mischen und einer Inkubation von 5 min bei ZT, erfolgte die photometrische Bestimmung bei 595 nm. Als Eichreihe diente Rinderserumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 1,0 / 0,8 / 0,6 / 0,4 / 0,2 und 0,1 mg/ml.

Bradfordreagenz:

0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

4,75% (v/v) EtOH

8,5% (v/v) Phosphorsäure

### **Analyse der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität**

#### **a) X-Gal-Test**

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten, die auf Agarplatten ausgestrichen waren, konnte mit X-Gal (5-Bromo-4-chloro-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid) sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden die Platten mit X-Gal (10 mg/ml in Dimethylformamid) besprüht und 15 bis 30 min bei 42 °C inkubiert. Kolonien mit  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität färbten sich blau, die ohne nachweisbare Enzymaktivität blieben rot-orange.

**b) ONPG-Test**

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in *Haloferax volcanii* WFD11-Zellysaten wurde mit dem ONPG (ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid)-Test nach Angaben von Holmes et al. (1997) ermittelt. Hierzu wurden 100 bis 4000  $\mu$ l (je nach Wachstumsphase und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität) der jeweiligen *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten-Kultur entnommen und für 2 min bei 13.000 rpm und ZT zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 100  $\mu$ l des entsprechenden Mediums, in dem die Kultur gewachsen war, resuspendiert. Zur Lyse wurden 50  $\mu$ l 2% Triton X-100 und 800  $\mu$ l ONPG-Testpuffer (s.u.) zugegeben und gemischt. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l ONPG-Lösung (8 mg / ml ONPG in 0,1 M Tris-HCl pH 7,2), erneutem Mischen und einer Inkubation von 1 bis 5 min bei ZT, wurde die enzymatische Reaktion als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit ( $\Delta A / \Delta t$ ) photometrisch bei 405 nm (ZT) verfolgt.

ONPG-Testpuffer:

2,5 M NaCl

10  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>

0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol

50 mM Tris-HCl, pH 7,2

Ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz: ( $\Delta A / \Delta t = \epsilon \times d \times \Delta c / \Delta t$ ) kann die Volumenaktivität als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit ( $\Delta c / \Delta t$ ) in 1 ml berechnet werden. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  für ONP bei 405 nm beträgt  $3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und die Schichtdicke  $d$  der Küvette beträgt 1 cm. Eine Einheit (1 U) der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die die Hydrolyse von 1  $\mu$ mol ONPG / min katalysiert. Durch Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt (siehe oben) kann die spezifische Aktivität in Units pro mg Gesamtprotein [U/mg] berechnet werden.

## ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Arbeit war die basalen Aktivitäten und die Aktivierung der *gvpA*-Promotoren (A-Promotoren) durch die GvpE-Proteine mit dem *bgaH*-Reportergen zu bestimmen. Da bisher die Wechselwirkung zwischen den A-Promotoren und dem GvpE-Aktivator nicht gezeigt werden konnte, sollte der Wechselwirkungsbereich auf den A-Promotoren durch Mutagenese näher untersucht werden.

### 1) Untersuchungen der *gvpA*-Promotoren mit dem *bgaH*-Reportergen Reportergenfusion in den drei verschiedenen *gvpA*-Leserahmen

Die drei verschiedenen *gvpA*-Gene aus der p-vac-, c-vac- und mc-vac-Region von *Halobacterium salinarum* und von *Haloferax mediterranei* wurden für vergleichende Genexpressionsstudien verwendet. Sowohl die basale Aktivität als auch die GvpE-stimulierte Aktivität sollte bestimmt werden. Die drei *gvpA*-Gene werden als etwa 340 nt lange mRNAs mit einem nicht translatierten 19 bis 20 nt langen mRNA-*leader* transkribiert (Horne & Pfeifer, 1989; Englert et al., 1990). Um die Transkription der mRNA nicht zu verändern, wurden im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit die drei verschiedenen *gvpA*-Promotoren direkt am Startcodon des jeweiligen *gvpA*-Gens mit dem Startcodon des *bgaH*-Reportergens fusioniert und die *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten, die diese unterschiedlichen Reportergenfusionskonstrukte enthielten, dann auf ihre  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität überprüft. Dabei zeigte sich, dass bei vielen dieser Transformanten keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachweisbar war, obwohl die gewünschten *bgaH*-mRNAs nachweisbar waren (Gregor, 1998). Dies führte zu der Annahme, dass das Fehlen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in diesen Transformanten auf einem Problem bei der Translation der *bgaH*-mRNA beruhte. Für die Fusion der drei A-Promotoren war die Restriktionsschnittstelle *NcoI* am 5'-Ende des jeweiligen Startcodons eingefügt worden, wobei eine Punktmutation entstanden war (T oder A wurde zu C). Die Vermutung lag deshalb nahe, dass diese Punktmutation die Ursache dafür war, dass die gebildete *bgaH*-mRNA nicht translatiert wurde. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen sollten die pA-, cA-, und mcA-Promotoren in dieser Arbeit innerhalb des jeweiligen *gvpA*-Leserahmens mit dem ATG-Startcodon des *bgaH*-Leserahmens fusioniert werden. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Proteine, die bei Translation dieser Konstrukte in *Hf. volcanii*-Transformanten entstehen, enthalten deshalb am N-

Terminus zusätzlich fünf Aminosäuren des jeweiligen GvpA-Proteins: MAQPD von pGvpA und cGvpA und MVQPG von mcGvpA.

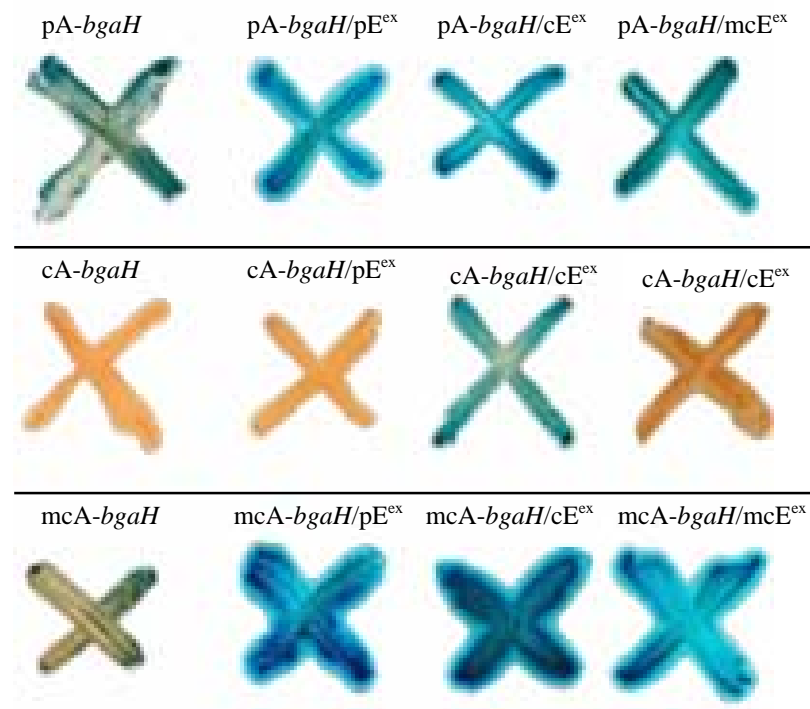
Für die Herstellung der Konstrukte *pA-bgaH*, *cA-bgaH* und *mcA-bgaH* wurden die jeweiligen A-Promotorregionen und der *bgaH*-Leserahmen mittels PCR amplifiziert. Die A-Promotoren wurden zusammen mit dem *bgaH*-Leserahmen zunächst in das *E. coli* Plasmid pBluescriptII SK+ inseriert. Die korrekte Fusion wurde mittels DNA-Sequenzanalyse überprüft. Die verschiedenen *A-bgaH*-Fusionsfragmente wurden anschließend in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert.

Da sowohl die basale Aktivität der Konstrukte *pA-bgaH* x pWL102 (*pA-bgaH*), *cA-bgaH* x pWL102 (*cA-bgaH*) und *mcA-bgaH* x pWL102 (*mcA-bgaH*) als auch deren Aktivierung durch pGvpE, cGvpE und mcGvpE untersucht werden sollte, wurde auch der *p-gvpE*-Leserahmen in den halobakteriellen Expressionsvektor (Soppa, unveröffentlicht; Pfeifer et al., 1994) inseriert. In dem Konstrukt *p-gvpE* x pJAS35 ( $pE^{ex}$ ) befindet sich *p-gvpE* unter der Kontrolle des Ferredoxinpromotors (Pfeifer et al., 1993). Die Konstrukte *c-gvpE* x pJAS35 ( $cE^{ex}$ ) und *mc-gvpE* x pJAS35 ( $mcE^{ex}$ ) waren dagegen bereits vorhanden (Krüger et al., 1998; Röder, 1997).

Die verschiedenen *A-bgaH*-Konstrukte wurden sowohl alleine, als auch zusammen mit einem der  $E^{ex}$ -Konstrukte zur Transformation von *Hf. volcanii* WFD11 eingesetzt. Die Plasmide aller Transformanten wurden isoliert und mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme und (falls nötig) auch mittels Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit überprüft.

### Überprüfung der $\beta$ -Galaktosidase Aktivität mit X-Gal

Zunächst wurden die *Hf. volcanii*-Transformanten kreuzförmig auf Agarplatten ausgestrichen und mit X-Gal besprüht, um die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität sichtbar zu machen. Die *pA-bgaH*-Transformante war hellblau gefärbt (Abb. 5, obere Reihe). Dies ist auf die basale Aktivität des *pA*-Promotors zurückzuführen, die auch schon in Transformanten mit dem *p-gvpA*-Gen nachgewiesen werden konnte (Krüger et al., 1998). Die Transformante *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>* war dunkelblau gefärbt. Dies bedeutet, dass der *pA*-Promotor durch den Aktivator pGvpE zusätzlich noch aktiviert wurde. Da die Transformanten *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und *pA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* ebenfalls dunkelblau wurden, lag die Vermutung nahe, dass der *pA*-Promotor auch durch die heterologen Aktivatoren cGvpE und mcGvpE aktiviert wurde.



**Abb. 5** Kolonien von *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten mit X-Gal besprüht. Die Transformanten wurden X-förmig auf Agarmedium ausgestrichen und mit 10 mg/ml X-Gal besprüht. Die Konstrukte, die jede Transformante enthält, stehen über den Kolonien. Die Bezeichnungen pE<sup>ex</sup>, cE<sup>ex</sup> und mcE<sup>ex</sup> stehen für die Konstrukte p-*gvpE* x pJAS35, c-*gvpE* x pJAS35 bzw. mc-*gvpE* x pJAS35. Die *A-bgaH*-Fusionsgene wurden in das Plasmid pWL102 inseriert. Die Abkürzungen pA, cA und mcA stehen für die Promotoren der Gene p-*gvpA*, c-*gvpA* und mc-*gvpA*. Die Kolonien stammen von unterschiedlichen Agarplatten, wodurch die unterschiedlichen Blautöne zustande kommen.

Die *cA-bgaH*-Transformante blieb dagegen orange, was auf den basal inaktiven cA-Promotor zurückzuführen war (Abb. 5, mittlere Reihe). Dies wurde bereits mit Hilfe von Northern-Analysen bei Transformanten gezeigt, die nur das c-*gvpA*-Gen enthielten (Krüger & Pfeifer, 1996). Die *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante war blau gefärbt, die Transformanten *cA-bgaH/pE<sup>ex</sup>* und *cA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* blieben dagegen orange. Dies ließ vermuten, dass der cA-Promotor nur durch den homologen Aktivator cGvpE, nicht aber durch pGvpE bzw. mcGvpE aktivierbar war.

Die *mcA-bgaH*-Transformante war nur wenig blau gefärbt (Abb. 5, untere Reihe). Dies ist in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Northern-Analysen, die zeigten, dass Transformanten mit dem mc-*gvpA*-Gen nur eine geringe basale mcA-Promotoraktivität aufwiesen (Röder & Pfeifer, 1996). Die Transformanten *mcA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*, *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* waren dunkelblau gefärbt, die *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante erschien am intensivsten blau. Dies zeigte, dass der mcA-Promotor durch den homologen Aktivator mcGvpE sowie durch pGvpE und cGvpE aktivierbar war.

### **Quantifizierung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des ONPG-Tests**

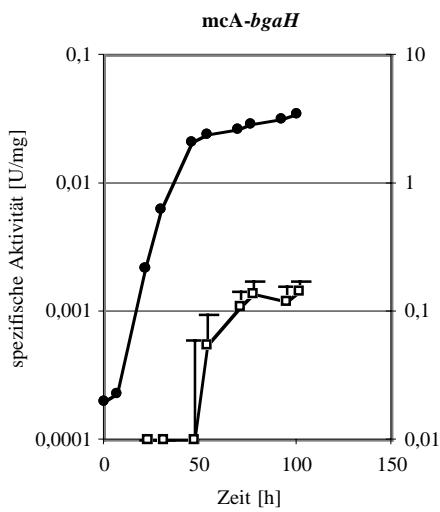
Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Transformanten wurde anschließend mit Hilfe des ONPG-Tests quantifiziert. Hierzu wurden die Transformanten als Schüttelkulturen in 50 bis 100 ml flüssigem 3 M Vollmedium angezogen, die  $A_{600}$  für ca. 120 h bestimmt und mehrere Proben entnommen, um den ONPG-Test durchzuführen.

#### **a) Analyse des mcA-Promotors**

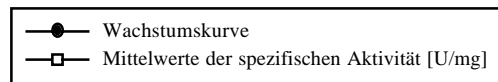
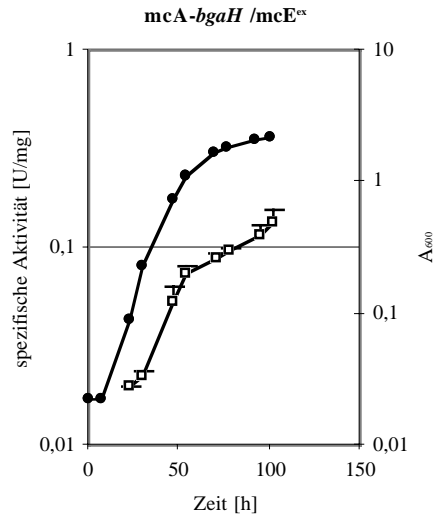
Von jeweils mehreren Transformanten wurden die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten über mehrere Tage hinweg ermittelt und miteinander verglichen.

Die Analyse von fünf mcA-*bgaH*-Transformanten ist in Abb. 6A dargestellt. Es ist der typische Verlauf der Wachstumskurve einer Transformante und die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität aller fünf mcA-*bgaH*-Transformanten, die bei vergleichbaren Zeitpunkten gebildet wurde, gezeigt. Auffällig ist, dass in der frühen exponentiellen Wachstumsphase (10 h bis 30 h) keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar war. Beim Übergang von der spät-exponentiellen in die frühe stationäre Wachstumsphase (35 h bis 55 h) war  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar, die bis in die spät-stationäre Phase erhalten blieb. Die niedrigsten Absorptionsänderungen pro Zeiteinheit im ONPG-Test lieferten spezifische Aktivitäten von ca. 0,0006 U/mg und die höchsten Absorptionsänderungen pro Zeiteinheit lieferten spezifische Aktivitäten von 0,0018 U/mg. Von den Mittelwerten der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden die Standardabweichungen berechnet. Auffällig ist, dass die Messwerte aus der späten exponentiellen / frühen stationären Wachstumsphase eine größere Standardabweichung als die aus der späten stationären Phase hatten.

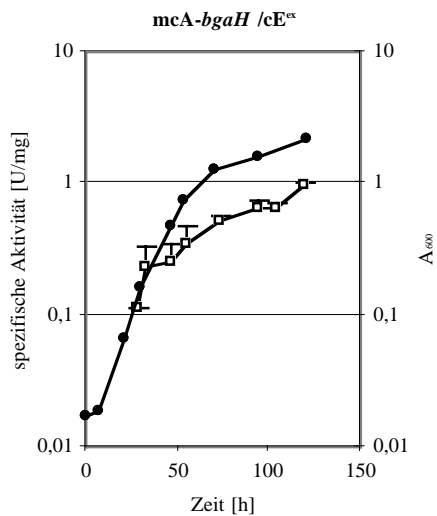
A.



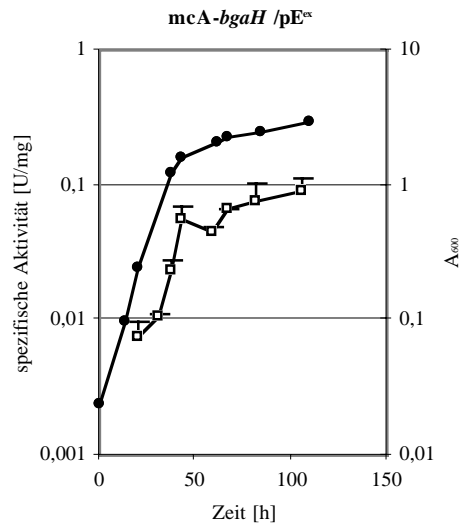
B.



D.



C.



**Abb. 6** Wachstumskurve und Mittelwerte aus Aktivitätskurven der Transformanten: **A.** *mcA-bgaH*, **B.** *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*, **C.** *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und **D.** *mcA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*. Es ist stellvertretend je eine Wachstumskurve gezeigt. Von drei bis fünf verschiedenen Transformanten wurde mit dem ONPG-Test die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt, die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet, die als Fehlerbalken eingezeichnet ist. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

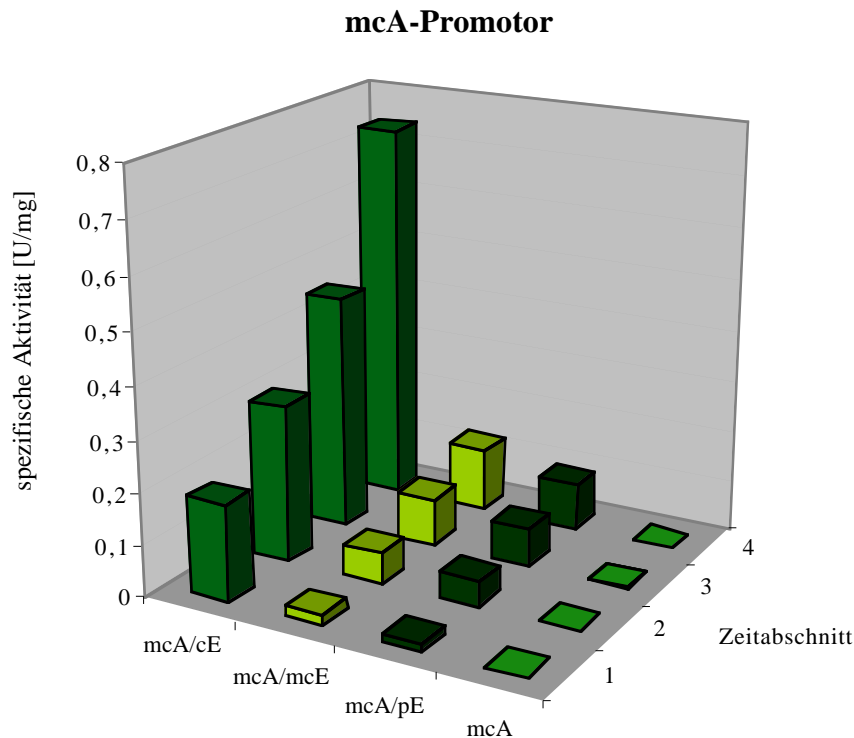
Des Weiteren wurde die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von fünf *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*-Transformanten mit *mcGvpE* als Aktivator zu verschiedenen Zeitpunkten des

Wachstums bestimmt, die in Abb. 6B dargestellt ist. Bei diesen Transformanten war die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität schon in der frühen exponentiellen Wachstumsphase (nach 20 h) mit einem Wert von ca. 0,02 U/mg zu messen. In der stationären Phase stieg der Wert auf bis zu ca. 0,17 U/mg an. Die Standardabweichung der gemittelten Aktivitätswerte variierte von 0,001 bis 0,025.

Die Analyse von drei *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* Transformanten (durch cGvpE-Aktivierung) ist in Abb. 6C dargestellt. Die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität war in der frühen exponentiellen Wachstumsphase (nach ca. 20 h) mit ca. 0,1 U/mg zu messen und stieg in der spät exponentiellen Phase auf bis zu ca. 1,0 U/mg an. Die Standardabweichung variierte von ca. 0,03 bis 0,1.

Die Mittelwerte der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von drei *mcA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*-Transformanten (mit pGvpE als Aktivator) sind in Abb. 6D dargestellt. Die niedrigsten messbaren spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in der frühen exponentiellen Wachstumsphase lagen bei ca. 0,05 U/mg und die höchsten in der späten stationären Wachstumsphase bei ca. 0,1 U/mg. Die Standardabweichungen variierten von 0,002 bis ca. 0,026.

Wenn man die Mittelwerte der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten über die vier verschiedenen Zeitabschnitte bildet: Zeitabschnitt 1 (20 h bis 40 h), Zeitabschnitt 2 (41 h bis 65h), Zeitabschnitt 3 (66 h bis 90 h) und Zeitabschnitt 4 (91 h bis 120 h) in der Wachstumsphase, lassen sich die *mcA-bgaH*-Aktivitäten mit und ohne Aktivatoren gut miteinander vergleichen (Abb. 7). Bei allen vier Transformanten stieg die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit der Zeit an. In den *mcA-bgaH*-Transformanten, die keinen GvpE-Aktivator besitzen, war nur eine geringe spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität während der gesamten Wachstumsphase messbar. Im Zeitabschnitt 1 ist keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, zwischen Zeitabschnitt 2 und 4 waren geringe Aktivitäten von 0,0008 U/mg bis 0,0013 U/mg messbar. Bei den *mcA-bgaH/E<sup>ex</sup>*-Transformanten war generell eine höhere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar als bei der *mcA-bgaH*-Transformante. Im Schnitt wurde die *mcA*-Promotor-Aktivität durch pGvpE um das 65-fache, durch mcGvpE um das 80-fache und durch cGvpE um das 450-fache erhöht. Das bedeutet, dass das heterologe cGvpE-Protein ein deutlich besserer Aktivator als das homologe mcGvpE-Protein war.



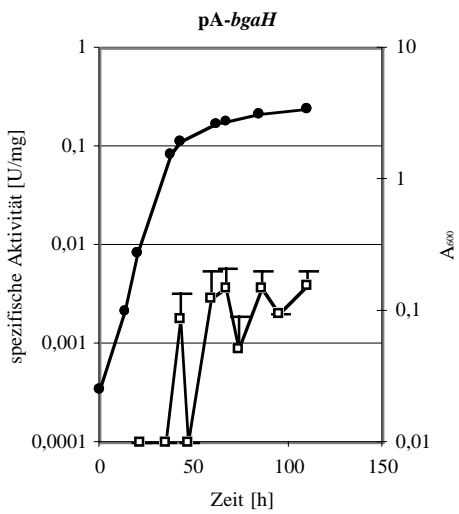
	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]			
Zeit [h]	mcA- <i>bgaH</i> /cE <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i> /mcE <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i> /pE <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i>
1 (20-40)	0,1883	0,0216	0,0128	0,0001
2 (41-65)	0,3062	0,0618	0,0498	0,0008
3 (66-90)	0,4555	0,0918	0,0734	0,0012
4 (91-120)	0,7389	0,1244	0,0913	0,0013

**Abb. 7** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten mcA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (mcA/cE), mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (mcA/mcE), mcA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> (mcA/pE) und mcA-*bgaH* (mcA). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Alle Transformanten besitzen alle das mcA-*bgaH*-Gen in pWL102, oder sie enthalten noch zusätzlich einen der drei *gvpE*-Leserahmen c-*gvpE* (cE<sup>ex</sup>), mc-*gvpE* (mcE<sup>ex</sup>) oder p-*gvpE* (pE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

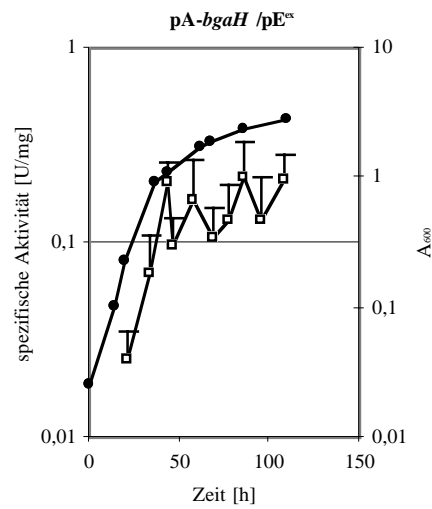
## b) Analyse des pA-Promotors

Auch der pA-Promotor wurde basal und mit jedem der drei verschiedenen GvpE-Proteine als Aktivator getestet. Die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von vier pA-*bgaH*-Transformanten ist in Abb. 8A dargestellt. Die messbare spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erschien zu unterschiedlichen Zeitpunkten von früh stationär (43 h) bis spät stationär (78 h), und auch die Stärke der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität schwankte um den Faktor fünf. Die berechneten Standardabweichungen variierten von 0,00002 bis 0,0025.

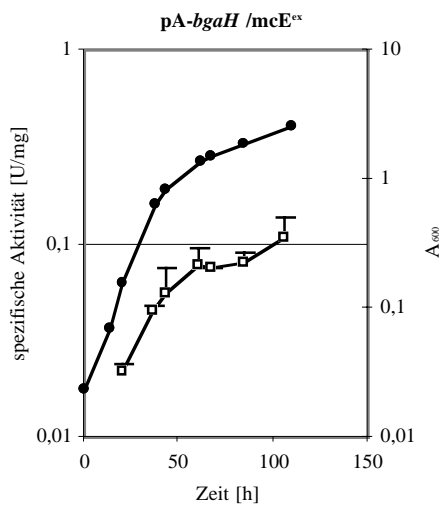
A.



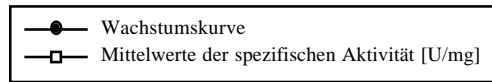
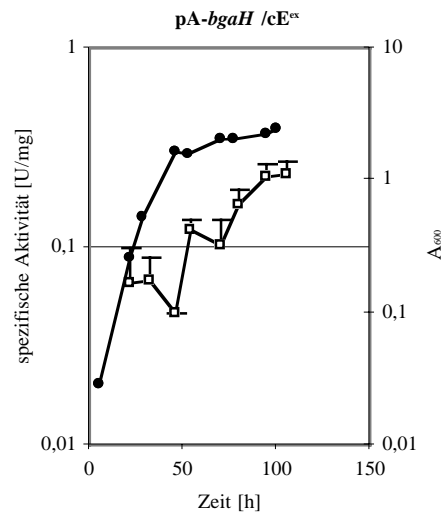
B.



D.



C.



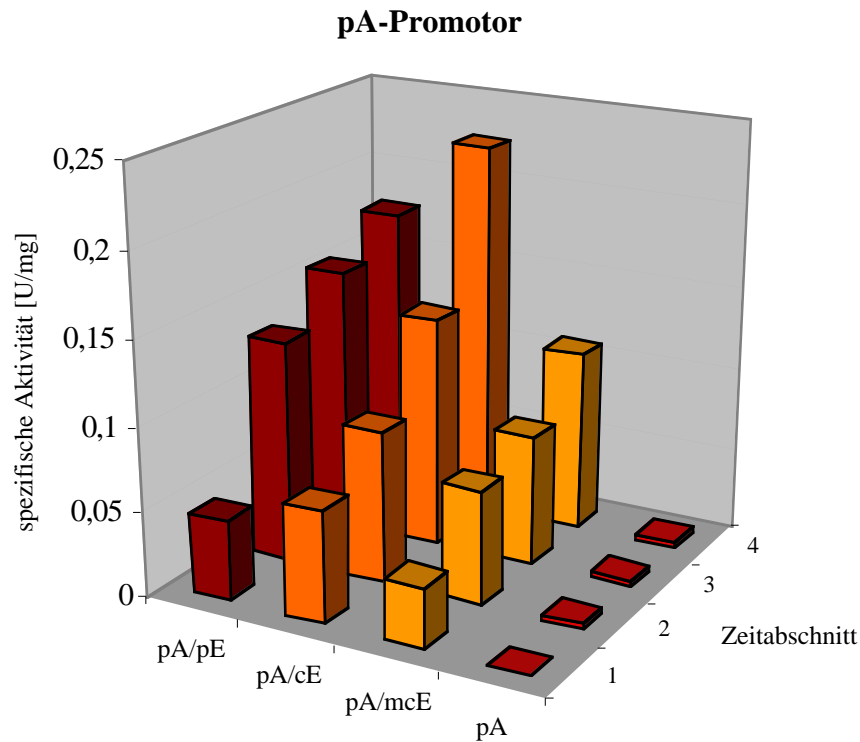
**Abb. 8** Wachstumskurve und Mittelwerte aus Aktivitätskurven der Transformanten: **A.** *pA-bgaH*-Transformanten, **B.** *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*-Transformanten, **C.** *pA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*-Transformanten und **D.** *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformanten. Es ist stellvertretend je eine Wachstumskurve gezeigt. Von drei bis fünf verschiedenen Transformanten wurde mit dem ONPG-Test die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt, die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet, die als Fehlerbalken eingezeichnet ist. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Von fünf *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*-Transformanten ist die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität dargestellt (Abb. 8B). Erste messbare spezifische Aktivitäten traten in der frühen exponentiellen Wachstumsphase nach ca. 20 h Wachstum auf. Die berechneten Standardabweichungen variierten von 0,01 bis 0,1.

Die Mittelwerte der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der drei *pA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*-Transformanten sind in Abb. 8C dargestellt. Der Aktivitätsverlauf war ähnlich wie bei den *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*-Transformanten (Abb. 8B). Die Messbarkeit begann nach ca. 20 h Wachstum und näherte sich einem stationären Wert von ca. 0,1 U/mg. Die ermittelten Standardabweichungen differierten von 0,002 bis 0,03 (Abb. 8C).

Bei drei *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformanten wurden die Mittelwerte der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten über deren Wachstumsperioden hinweg bestimmt (Abb. 8D). Die messbare  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität dieser Transformanten begann wie bei den zuvor beschriebenen Untersuchungen nach ca. 20 h. Die ermittelten Standardabweichungen reichten von 0,0005 bis 0,037.

In Abb. 9 ist ein Vergleich der Transformanten *pA-bgaH*, *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*, *pA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* und *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* zu sehen. Hierzu wurden wiederum über die vier Zeitabschnitte 1 (20 h bis 40 h), 2 (41 h bis 65 h), 3 (66 h bis 90 h) und 4 (91 h bis 120 h) die Mittelwerte der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten gebildet. Wie bei den verschiedenen *mcA-bgaH*-Transformanten (Abb. 7) stieg bei allen vier *pA-bgaH*-Transformanten die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit der Zeit an. Ohne den Aktivator GvpE war der *pA*-Promotor schwach aktiv, nur eine geringe spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität war messbar. In Zeitabschnitt 1 ist keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar, von Zeitabschnitt 2 bis zu Zeitabschnitt 4 stieg die Aktivität von 0,0030 U/mg, auf 0,0032 U/mg an. Frühere Studien haben gezeigt, dass diese Basalaktivität ausreichend mRNA zur Verfügung stellt, um - wenn auch wenige - Gasvesikel zu bilden. Bei allen *pA-bgaH/E<sup>ex</sup>*-Transformanten konnte eine 20- bis 70-fach höhere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden als bei der *pA-bgaH*-Transformante. Der *pA*-Promotor war demnach wie der *mcA*-Promotor (Abb. 7) durch alle drei GvpE-Proteine aktivierbar. Im Schnitt wurde die *pA*-Promotor-Aktivität durch *mcGvpE* um das 27-fache, durch *cGvpE* um das 47-fache und durch *pGvpE* um das 48-fache erhöht. Das bedeutet, dass das homologe *pGvpE* Protein und das heterologe *cGvpE*-Protein den *pA*-Promotor in etwa gleich stark aktivierten. Vergleicht man die Aktivierbarkeit von *pA*-Promotor und *mcA*-Promotor miteinander, so erreicht der *mcA*-Promotor viel höhere Aktivitäten (Abb. 7 und 9). Vor allem mit *cGvpE* als Aktivator ist der *mcA*-Promotor viel besser aktivierbar als der *pA*-Promotor.



	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]			
Zeit [h]	pA- <i>bgaH</i> /pE <sup>ex</sup>	pA- <i>bgaH</i> /cE <sup>ex</sup>	pA- <i>bgaH</i> /mcE <sup>ex</sup>	pA- <i>bgaH</i>
1 (20-40)	0,0474	0,0665	0,0356	0,0001
2 (41-65)	0,1323	0,0900	0,0679	0,0030
3 (66-90)	0,1569	0,1381	0,0779	0,0034
4 (91-120)	0,1773	0,2255	0,1087	0,0032

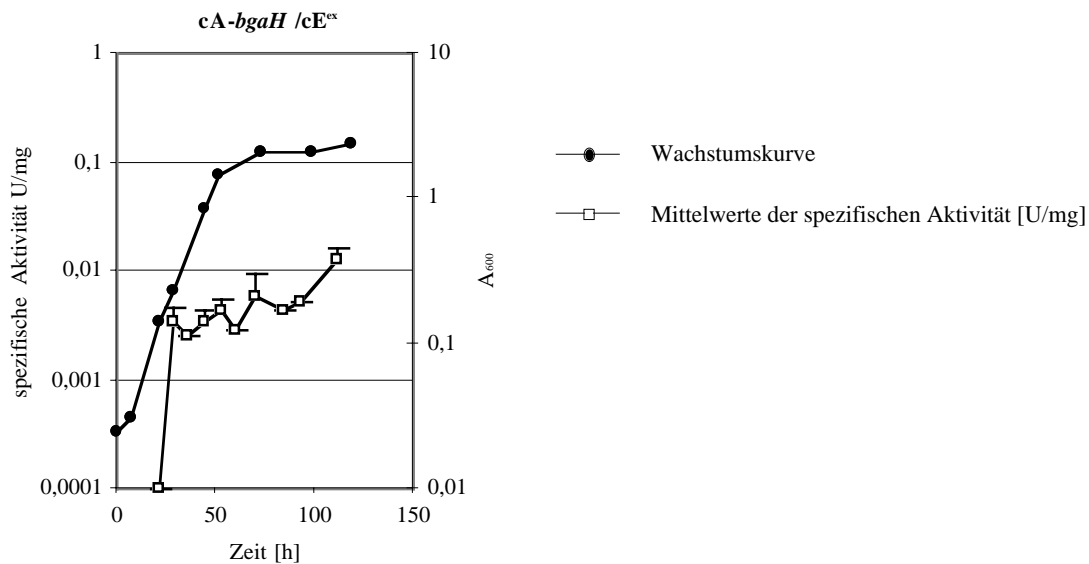
**Abb. 9** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten pA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> (pA/pE), pA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA/cE), pA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA/mcE) und pA-*bgaH* (pA). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Alle Transformanten besitzen das pA-*bgaH*-Gen in pWL102, oder sie enthalten noch zusätzlich einen der drei *gvpE*-Leserahmen c-*gvpE* (cE<sup>ex</sup>), mc-*gvpE* (mcE<sup>ex</sup>) oder p-*gvpE* (pE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

### c) Analyse des cA-Promotors

Auch die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der cA-*bgaH*-, cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-, cA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> und cA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup>-Transformanten wurden ermittelt.

Bei allen analysierten cA-*bgaH*-, cA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup>- und cA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup>-Transformanten war zu keinem Zeitpunkt in den Wachstumsphasen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar (keine Abbildung). Die Mittelwerte der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von drei cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformanten ist in Abb. 10 dargestellt. Die Aktivität war in der exponentiellen

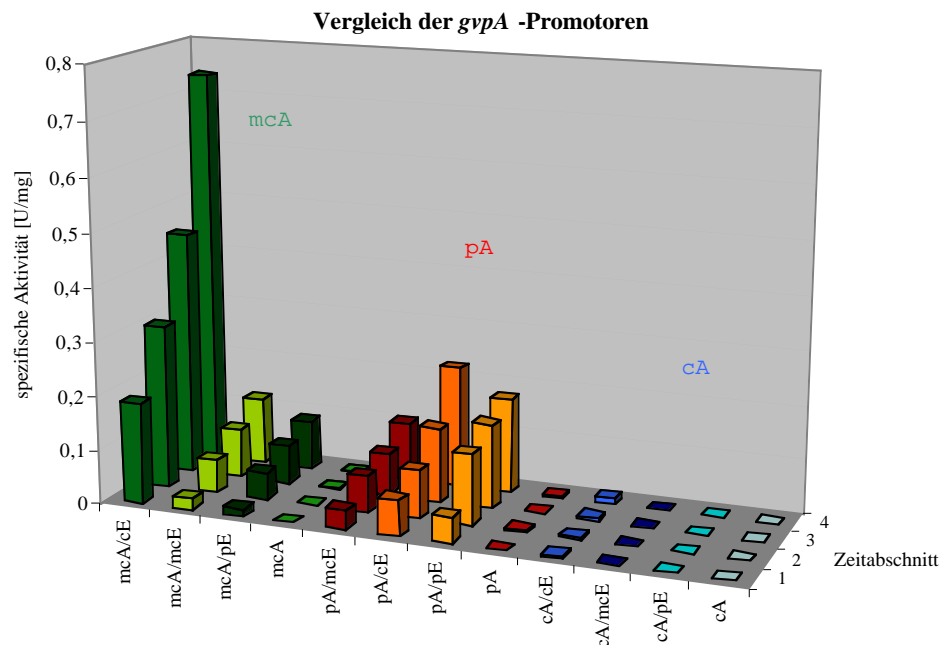
Wachstumsphase nach ca. 30 h zum ersten Mal messbar, stieg dann an und näherte sich einem stationären Wert von ca. 0,01 U/mg. Die ermittelten Standardabweichungen variierten von 0,0007 bis 0,0036. Dies bedeutet, dass der cA-Promotor alleine inaktiv und nur durch das homologe cGvpE aktiviert wurde.



**Abb. 10** Wachstumskurve und Mittelwerte aus Aktivitätskurven der *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformanten. Es ist stellvertretend eine Wachstumskurve gezeigt. Von drei verschiedenen Transformanten wurde mit dem ONPG-Test die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet, die als Fehlerbalken eingezeichnet ist. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Abb. 11 fasst die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten aller hier aufgeführten Transformanten zusammen. Bei allen Transformanten mit messbarer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stieg diese mit der Zeit an und zwar bei den Transformanten mit *mcA-bgaH* und *pA-bgaH* um 1,1- bis 1,5-fache und bei den Transformanten mit *E<sup>ex</sup>* um das 1,2- bis 3,9-fache. Die größten Anstiege waren immer zwischen Zeitabschnitt 1 und Zeitabschnitt 2 zu verzeichnen. Dies entsprach dem Übergang von der spät-exponentiellen in die früh stationäre Wachstumsphase. Vergleicht man die basalen Aktivitäten der drei A-Promotoren miteinander zeigt sich, dass der *pA*-Promotor im Schnitt 2,9-fach stärker war als der *mcA*-Promotor. Der *cA*-Promotor dagegen hatte keine messbare basale Aktivität.

Die drei A-Promotoren wurden durch die drei verschiedenen GvpE-Proteinen unterschiedlich stark aktiviert. Der mcA-Promotor liess sich am stärksten durch cGvpE aktivieren, nämlich 5,4-fach besser als durch mcGvpE und 7,4-fach besser als durch pGvpE. Der pA-Promotor wurde durch cGvpE und pGvpE fast gleich stark aktiviert, nämlich 1,8-fach stärker als durch mcGvpE. Der cA-Promotor dagegen liess sich nur durch das cGvpE-Protein aktivieren. Insgesamt gesehen zeigte die *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante die mit Abstand stärkste Induktion. Der pA-Promotor hatte die stärkste basale Aktivität, der cA-Promotor war dagegen basal völlig inaktiv und das cGvpE-Protein war in allen Fällen der stärkste Aktivator.



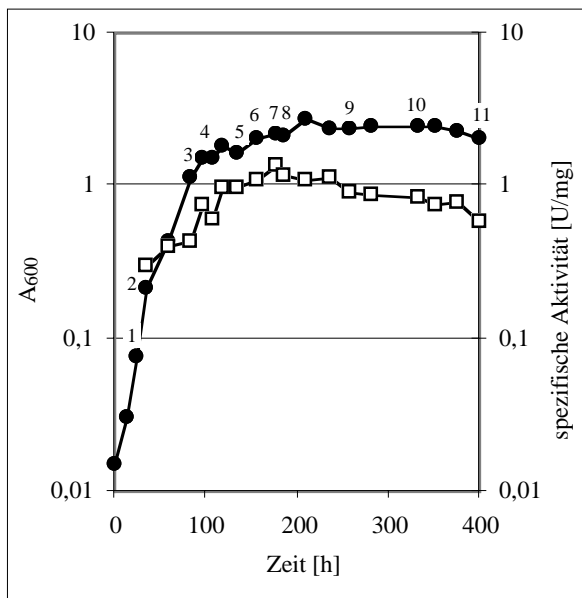
**Abb. 11** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (mcA/cE), *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (mcA/mcE), *mcA-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (mcA/pE), *mcA-bgaH* (mcA), *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (pA/pE), *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (pA/cE), *pA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (pA/mcE), *pA-bgaH* (pA), *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (cA/cE), *cA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (cA/mcE), *cA-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (cA/pE) und *cA-bgaH* (cA). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen das *mcA-bgaH*-Gen-, das *pA-bgaH*-Gen- oder das *cA-bgaH*-Gen in pWL102, oder sie enthalten noch zusätzlich einen der drei *gvpE*-Leserahmen *c-gvpE* (cE<sup>ex</sup>), *mc-gvpE* (mcE<sup>ex</sup>) oder *p-gvpE* (pE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt.

#### d) Analyse der *bgaH*-mRNA und der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität über das gesamte Wachstum

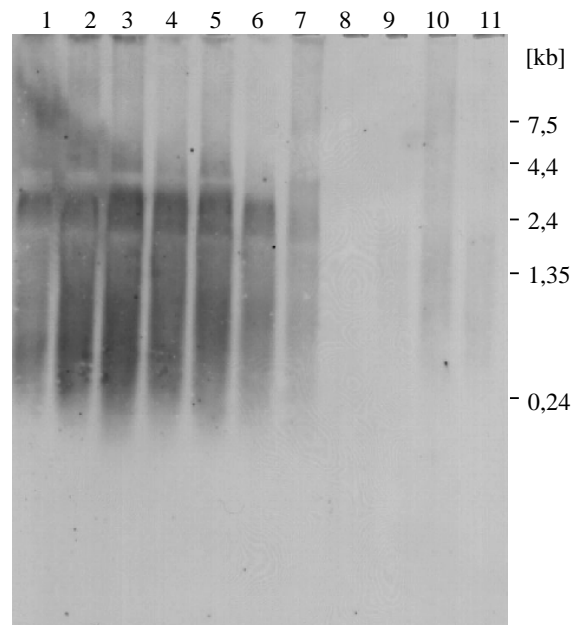
Um die Expression des *mcA-bgaH*-Fusionsgens auf mRNA-Ebene zu untersuchen und mit der gemessenen spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu vergleichen, wurden die gebildeten mRNA-Mengen in den verschiedenen Wachstumsphasen sowie die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität über 400 h Wachstum bei der *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante analysiert. Die Transformante wurde als Flüssigkultur in 3 M *Haloferox volcanii*-Vollmedium angezogen. Proben für die RNA-Isolierung und die Bestimmung der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden während der exponentiellen und während der stationären Wachstumsphase entnommen. Die 2,8 kb mRNA und vor allem die Abbauprodukte wurden durch eine *bgaH*-spezifische-RNA Sonde in einer Northern-Analyse detektiert.

*mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante:

**A.**



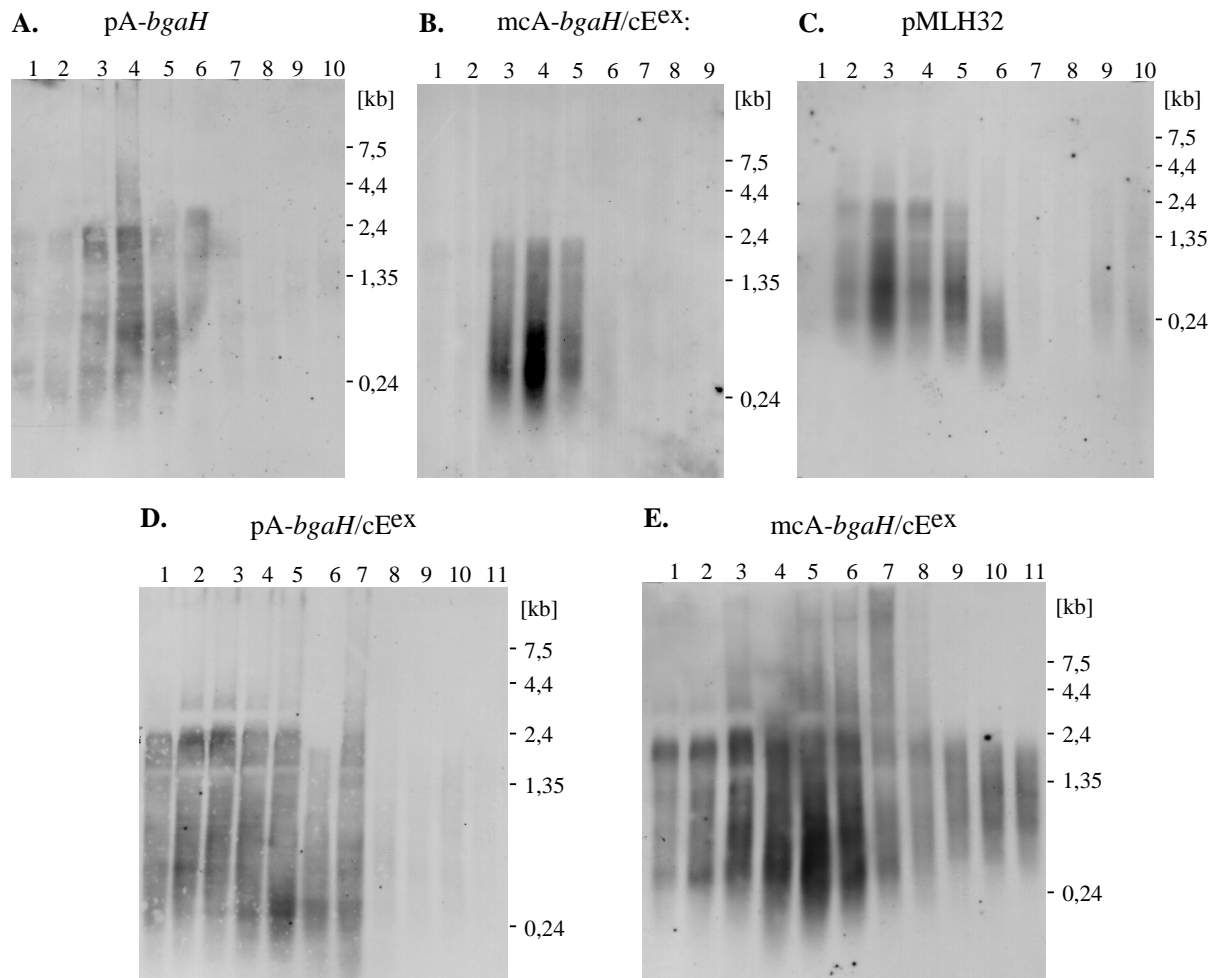
**B.**



**Abb.12 A.** Wachstumskurve und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten, sowie **B.** Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA in der Transformante *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*. **A.** Proben wurden während der Wachstumsphase (●) entnommen und die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (□) wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Zahlen über der Wachstumskurve kennzeichnen die Zeitpunkte der Proben, die für die Northern-Analyse verwendet wurden. **B.** Die RNA wurde aus den Proben 1-11 isoliert, über ein denaturierendes 1,2%iges Agarosegel aufgetrennt und mit einer Dig-markierten strangspezifischen *bgaH*-Sonde hybridisiert. Die RNA-Größenstandards sind auf der rechten Seite in kb angegeben.

Die Transformante *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* wurde exemplarisch verwendet, um die Menge der detektierten *bgaH*-mRNA mit der gemessenen spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu den jeweiligen Zeitpunkten zu vergleichen. Elf Proben wurden entnommen, die mRNA isoliert und in einer Northern-Analyse untersucht (Abb. 12). Die größte mRNA-Menge konnte in der exponentiellen und in der frühen stationären Wachstumsphase detektiert werden (Abb. 12B, Spuren 1 bis 7). In den Proben 8 bis 11 war dagegen kaum noch mRNA zu detektieren (Abb. 12B, Spuren 8 bis 11). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde ab der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Sie stieg bis in die frühe stationäre Wachstumsphase an (Abb. 12A) und lief damit fast parallel zur mRNA-Bildung. Zwischen 185 h und 400 h Wachstum (Proben 8 bis 11) nahm die mRNA Menge drastisch ab, während die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in diesen Proben nur geringfügig abnahm. Die  $\beta$ -Galaktosidase war offensichtlich stabiler als die mRNA.

Weitere fünf Transformanten *cA-bgaH*, *pA-bgaH*, *mcA-bgaH*, *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* sowie die Kontrollen *pMLH32* und *cE<sup>ex</sup>* wurden auf die mRNA-Expression der jeweiligen *A-bgaH*-Gene untersucht. Bei der Kontrolle *pMLH32* handelt es sich um eine Transformante, die nur das Plasmid *pMLH32* enthält. Dieses Plasmid ist ein halobakterieller *shuttle*-Vektor, der das *bgaH*-Gen mit seinem nativen Promotor enthält (Holmes & Dyall-Smith, 2000). Es wurden Proben entnommen, die mRNA isoliert und in Northern-Analysen untersucht (Abb. 13). Bei den beiden Transformanten *cA-bgaH* und *cE<sup>ex</sup>* konnte keine *bgaH*-mRNA detektiert werden (keine Abbildung). Bei Northern-Analysen der *pA-bgaH*-, *mcA-bgaH*-, *pMLH32*-, *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*- und der *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformanten wurde deutlich, dass auch hier die mRNA in der stationären Wachstumsphase (Proben 6 oder 8) kaum noch detektierbar war (Abb. 13). Allerdings war die mRNA bei den Transformanten *pA-bgaH* und *mcA-bgaH* erst in der Probe 3, d.h. in der stationären Wachstumsphase detektierbar (Abb. 13 A und B). Die Transformanten *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* bildeten dagegen ca. 70 h früher mRNA als die Transformanten ohne den Aktivator *cGvpE* (Abb. 13 D und E). Die relativ frühere Aktivität der Promotoren ist auf die frühere Expression des *c-gvpE*-Leserahmens unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors zurückzuführen (Pfeifer et al., 1993).

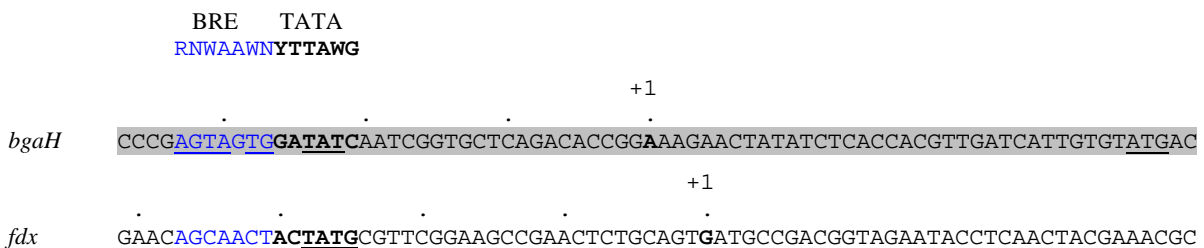


**Abb.13** Northern-Analysen, um die *bgaH*-mRNA in den Transformanten **A.** *pA-bgaH*, **B.** *mcA-bgaH*, **C.** *pMLH32*, **D.** *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und **E.** *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* zu detektieren. Die RNA wurde in der exponentiellen Wachstumsphase (Spuren 1 und 2), in der frühen stationären (Spuren 3 bis 7) und in der späten stationären (Spuren 8-9 oder 8-10 oder 8-11) Wachstumsphase entnommen. Die RNA wurde über 1,2%ige Agarosegele aufgetrennt und mit einer DIG-markierten strangspezifischen *bgaH*-Sonde hybridisiert. Die RNA-Größenstandards sind auf der rechten Seite (in kb) angegeben.

## 2) Untersuchungen zur Stärke des *fdx*-Promotors

Das *fdx*-Gen kodiert für ein Ferredoxin und wurde aus *Hb. salinarum* isoliert (Pfeifer et al., 1993). Der *fdx*-Promotor wurde verwendet, um den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 zu konstruieren (Pfeifer et al., 1994; Soppa, nicht publiziert). Da dieser Vektor in dieser und in anderen Arbeiten häufig verwendet wird, sollte die Stärke des *fdx*-Promotors im Vergleich zu den A-Promotoren mit dem *bgaH*-Reportergen getestet werden (Abb. 14A). Hierzu wurde der *bgaH*-Leserahmen so hinter den *fdx*-Promotor inseriert, dass noch zwei Aminosäuren vom Ferredoxin fusioniert waren (Abb. 14B). Zum Vergleich wurde auch das *bgaH*-Reportergen mit dem nativen Promotor im Plasmid pMLH32 untersucht (Abb. 14B) (Holmes & Dyall-Smith, 2000).

A.



B.

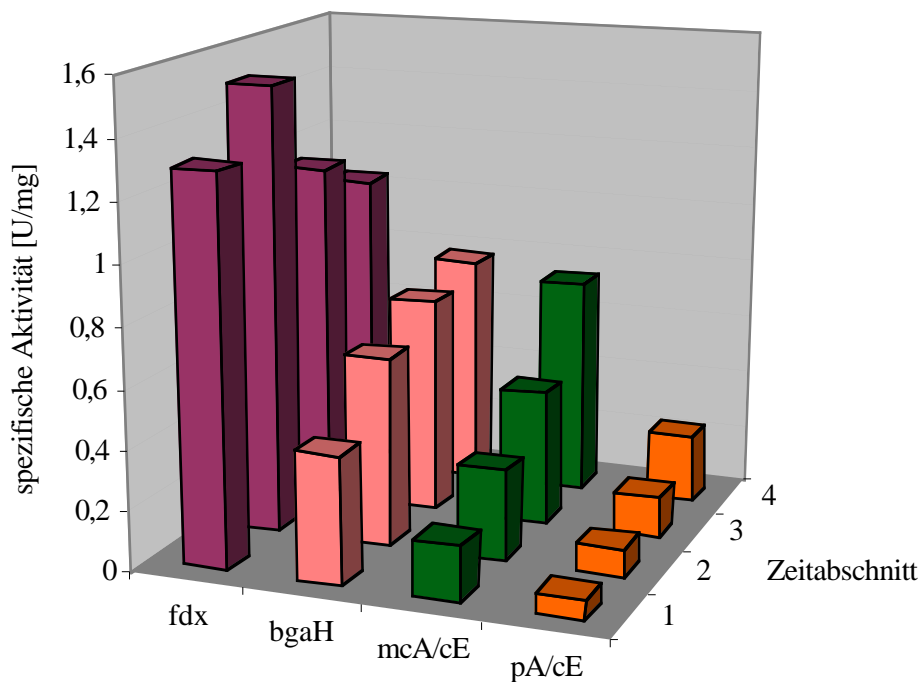


**Abb. 14 A.** Promotorregion des *bgaH*- und des *fdx*-Gens. **B.** *fdx-bgaH*-Fusion. Der Transkriptionsstart (A bzw. G) ist durch +1 gekennzeichnet, und das Start-Codon ist unterstrichen. Die *bgaH*-Sequenz ist grau unterlegt. Die TATA-Box in fett hervorgehoben, und das BRE-Element ist in blau dargestellt. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements, als auch die der TATA-Box sind oben angegeben (R = A oder G; N = A,C,G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz des BRE-Elements bzw. der TATA-Box sind unterstrichen.

Die Plasmide pMLH32 und *pdfx-bgaH* (*fdx-bgaH* x pJAS35) wurden zur Transformation von *Hf. volcanii* eingesetzt. Die Analyse der Transformanten pMLH32 und *fdx-bgaH* wurde mit dem ONPG-Test durchgeführt. Die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Abb. 15 dargestellt. Die Aktivität der Transformante *fdx-bgaH* erreichte ihr Maximum zwischen 41 und 65 h und fiel anschließend ab. Die Aktivität der Transformante pMLH32 dagegen stieg im Laufe des Wachstums kontinuierlich an. Insgesamt gesehen war die Aktivität der *fdx-bgaH*-Transformante im Durchschnitt um das 2-fache höher als die der pMLH32-Transformante. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Transformante *fdx-*

*bgaH* war vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase in Zeitabschnitt 1, und der frühen stationären Wachstumsphase, Zeitabschnitt 2, viel größer als die der Transformanten *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (6-fach) und *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (18-fach). Aber auch in den Zeitabschnitten 3 und 4 des Wachstums war die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Transformante *fdx-bgaH* noch um ein Vielfaches größer als die der Transformanten *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (Abb. 15). Der *fdx*-Promotor ist somit zum einen ein viel stärkerer Promotor als die verschiedenen A-Promotoren, zum andern hatte er als einziger Promotor schon früh in der Wachstumsphase sein Maximum an Aktivität erreicht, während die A-Promotoren ihre größten Aktivitäten in der stationären Wachstumsphase hatten.

*fdx*- , *bgaH* -, *mcA*- und *pA*-Promotor im Vergleich



	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]			
Zeit [h]	<i>fdx-bgaH</i>	pMLH32	<i>mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup></i>	<i>pA-bgaH/cE<sup>ex</sup></i>
1 (20-40)	1,2977	0,4296	0,1883	0,0665
2 (41-65)	1,5052	0,6347	0,3062	0,0900
3 (66-90)	1,1582	0,7310	0,4555	0,1381
4 (91-120)	1,0409	0,7805	0,7389	0,2255

**Abb. 15** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten: *fdx-bgaH* (*fdx*), pMLH32, *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*mcA/cE*) und *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*pA/cE*). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Alle Transformanten besitzen den *bgaH*-Leserahmen, unter der Kontrolle einer der vier verschiedenen Promotoren *fdx*-, *bgaH*-, *mcA*- und *pA*- in pWL102. Die Transformanten *mcA/cE* und *pA/cE* enthalten noch zusätzlich den *c-gvpE*-Leserahmen (*cE<sup>ex</sup>*) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben.

### 3) Untersuchungen an der TATA-Box und dem BRE-Element

Die Untersuchungen zur spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der drei *gvpA*-Promotoren zeigten, dass der *cA*-Promotor ohne *cGvpE* völlig inaktiv war. Bei der hier untersuchten Transformante *cA-bgaH* konnte auch keinerlei mRNA detektiert werden, was auch schon in vorangegangenen Studien mit einer *c-gvpA*-Transformante der Fall war (Krüger & Pfeifer, 1996). Der *pA*-Promotor dagegen hatte die höchste basale  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *A*-Promotoren. Auch mit Northern-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Transformanten *pA-bgaH* (Abb. 13 A) und *p-gvpA* (Offner & Pfeifer, 1995) die *bgaH*- bzw. *p-gvpA*-mRNA enthielten. Vergleicht man die Sequenzen der jeweiligen TATA-Boxen mit der Konsensussequenz **YTTAWG**, fällt auf, dass die *pA*-TATA-Box **CTTATG** komplett mit der Konsensussequenz übereinstimmt. Bei der *cA*-TATA-Box **GTTTTTC** stimmen dagegen nur 3 Nukleotide überein (Abb. 16). Vor allem enthält die *cA*-TATA-Box nicht das TA-Dinukleotid in der Mitte, das am wichtigsten für archaeale Promotoren zu sein scheint (Hain et al., 1992).

**A.**

	BRE TATA
	<u>RNWAAWN<b>YTTAWG</b></u>
<b>pA</b>	TACGACTCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAACCAT <u>ACACAT<b>CTTATG</b>T</u>
<b>cA</b>	AGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <u>AA<b>CGGC</b>G<b>TTTTTC</b></u>

**B.**

<b>cA<sub>TATA.A</sub></b>	AGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <u>AA<b>CGGC</b>G<b>TTa</b>T<b>TC</b></u>
<b>cA<sub>TATA.AG</sub></b>	AGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <u>AA<b>CGGC</b>G<b>TTa</b>T<b>g</b>C</u>

**C.**

<b>cA-pA<sub>TATA</sub></b>	AGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <u>AA<b>CGGC</b>c<b>TTa</b>T<b>g</b>C</u>
<b>cA-pA<sub>BRE</sub></b>	AGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <u>Acac<b>atc</b>G<b>TTTTTC</b></u>
<b>cA-pA<sub>BRETATA</sub></b>	AGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <u>Acac<b>atc</b>c<b>TTa</b>T<b>g</b>C</u>

**Abb. 16** Sequenzen des **A.** *pA*- und des *cA*-Promotors, der **B.** mutierten *cA*-Promotoren *cA<sub>TATA.A</sub>* und *cA<sub>TATA.AG</sub>*, sowie der **C.** chimären Promotoren *cA-pA<sub>TATA</sub>*, *cA-pA<sub>BRE</sub>* und *cA-pA<sub>BRETATA</sub>*. Die Bezeichnungen *pA* und *cA* stehen für die Sequenzen der Wildtypen, des *pA*- und des *cA*-Promotors. Bei den **B.** *cA*-Promotor-Mutanten ist ein Nukleotid bzw. sind zwei Nukleotide in der TATA-Box ausgetauscht. Bei den **C.** chimären Promotoren ist die TATA-Box, das BRE-Element oder beide in der *cA*-Sequenz gegen die entsprechenden der *pA*-Sequenz ausgetauscht. Die *pA*-Promotor-Sequenz ist grau unterlegt, und die Mutationen in der *cA*-Sequenz in **B.** und **C.** sind in kleinen Buchstaben geschrieben. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements, als auch die der TATA-Box sind oberhalb der Promotor-Sequenzen angegeben (R = A oder G; N = A,C,G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Die Nukleotide, die mit der Konsensussequenz der TATA-Box bzw. mit der Konsensussequenz des BRE-Elements übereinstimmen, sind in fett hervorgehoben bzw. blau geschrieben. Die palindromische Sequenz ist unterstrichen.

Die Promotoren unterscheiden sich auch in einem weiteren regulatorischen Element, das direkt stromauf der TATA-Box liegt, dem BRE-Element (*transcription factor B recognition element*). Das BRE-Element wird von dem Transkriptionsfaktor B (TFB) erkannt (Qureshi & Jackson, 1998). Für *Halobacterium* NRC-1 konnten sieben verschiedenen *tfb*-Gene gezeigt werden (Ng et al., 1998). Auch hier stimmt der p-*gvpA*-Promotor besser mit der Konsensussequenz überein als der c-*gvpA*-Promotor. Sechs Nukleotide des pA-BRE-Elements ACACATC bzw. drei des cA-BRE-Elements AACGGCG entsprechen der Konsensussequenz RNWAAWN.

Ausgehend von diesen Vergleichen sollte getestet werden, ob der cA-Promotor durch Mutation der TATA-Box so verbessert werden kann, dass er vom basalen Transkriptionsapparat erkannt wird. Dazu wurde zum einen das Thymin an vierter Position in der TATA-Box gegen ein Adenosin ausgetauscht, um das TA-Dinukleotid zu erhalten **GTTaTC** (Mutante c<sub>ATATA.A</sub>) (Abb. 16). Zum ändern wurde zusätzlich zu diesem Austausch noch das Cytosin an sechster Position gegen ein Guanosin ausgetauscht **GTTaTg** (Mutante c<sub>ATATA.AG</sub>) (Abb. 16).

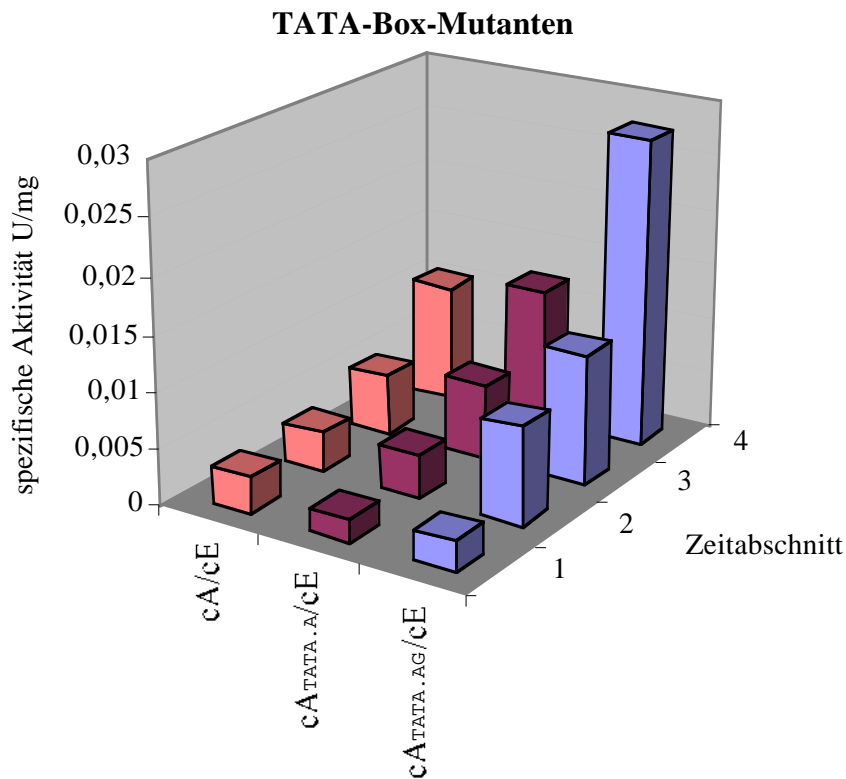
Die Promotormutanten c<sub>ATATA.A</sub> und c<sub>ATATA.AG</sub> wurden über *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt und mittels Sequenzanalyse überprüft. Die mutierten cA-Promotoren wurden als *bgaH*-Reporterfusion in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert und zur Transformation von *Hf. volcanii* eingesetzt.

Es wurde mit Hilfe des ONPG-Tests untersucht, ob die cA-Promotor-Mutanten durch die Veränderung eine basale Aktivität hatten und ob sie durch das cGvpE-Protein besser aktivierbar waren als das cA-*bgaH*-Gen.

Bei beiden Transformanten c<sub>ATATA.A</sub>-*bgaH* und c<sub>ATATA.AG</sub>-*bgaH* war keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar (keine Abbildung). Die veränderte TATA-Box, die besser mit der Konsensussequenz übereinstimmte als die des cA-Promotors, war also nicht ausreichend, um für die cA-Promotormutante eine basale Aktivität zu erhalten. Das TA-Dinukleotid scheint demnach nicht so wichtig für die basale Aktivität der A-Promotoren zu sein.

Die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten cGvpE-stimulierter cA-Promotoren in den Transformanten c<sub>ATATA.A</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und c<sub>ATATA.AG</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> sind in Abb. 17 aufgeführt. Bei der Transformante c<sub>ATATA.AG</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> war eine durchschnittlich 2-fach höhere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar als bei der Wildtyptransformante cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>, während die Transformante c<sub>ATATA.A</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> eine mit der Wildtyptransformante vergleichbare Aktivität hatte. Überraschenderweise bewirkt die

Substitution von zwei Nukleotiden, von Thymin zu Adenosin und von Cytosin zu Guanosin (**GTTaTg**), eine Verbesserung der Aktivierbarkeit des *cA*-Promotors. Da die TATA-Box vom dem basalen Faktor TBP (TATA-Box-Bindeprotein) erkannt wird, scheint der GvpE-Aktivator in einer ungeklärten Weise in den basalen Transkriptionsapparat einzugreifen und zu einer besseren Transkription zu führen.



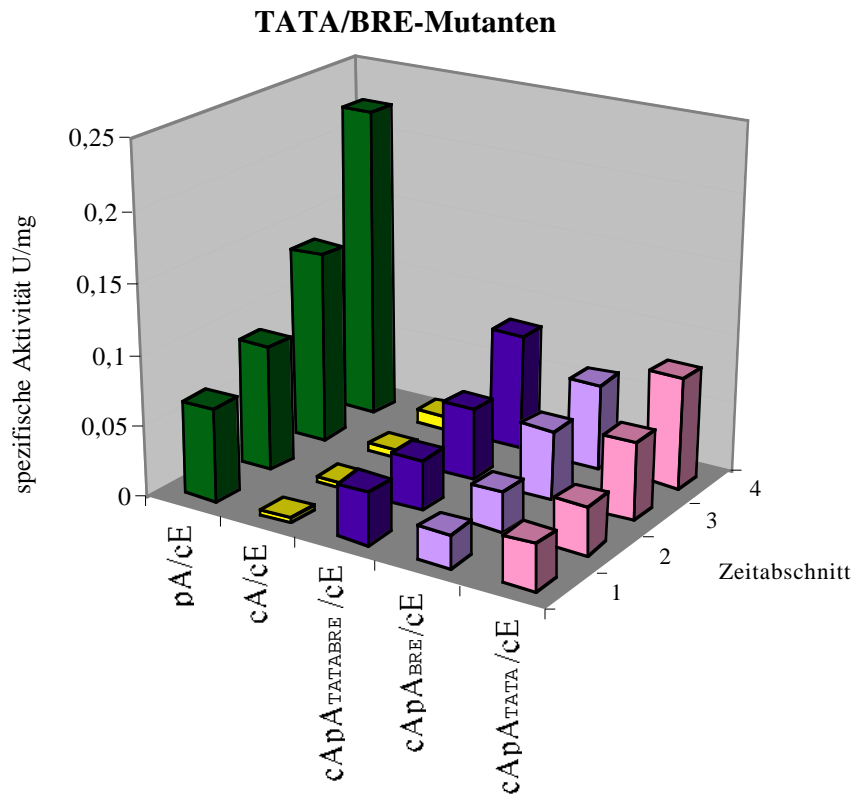
	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]		
Zeit [h]	<i>cA-bgaH/cE<sup>ex</sup></i>	<i>cATATA.A-bgaH/cE<sup>ex</sup></i>	<i>cATATA.AG-bgaH/cE<sup>ex</sup></i>
1 (20-40)	0,0032	0,0020	0,0027
2 (41-65)	0,0037	0,0040	0,0087
3 (66-90)	0,0055	0,0067	0,0116
4 (91-120)	0,0106	0,0123	0,0277

**Abb. 17** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten: *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*cA/cE*), *cATATA.A-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*cATATA.A/cE*) und *cATATA.AG-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*cATATA.AG/cE*). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen entweder den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle des *cA*-Promotors oder unter der Kontrolle der mutierten *cA*-Promotoren *cATATA.A* bzw. *cATATA.AG*. Zusätzlich enthalten sie den *c-gvpE*-Leserahmen (*cE<sup>ex</sup>*) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben.

Ausgehend von dem Vergleich der BRE-Elemente innerhalb der A-Promotoren wurden drei verschiedene Mutanten konstruiert, die in Abb. 16 C dargestellt sind. Die erste Mutante bestand aus der cA-Promotor-Sequenz, die anstelle der cA-TATA-Box die pA-TATA-Box enthielt (cA-pA<sub>TATA</sub>). Eine weitere Mutante bestand aus der cA-Promotor-Sequenz, bei der das cA-BRE-Element gegen das pA-BRE-Element ausgetauscht wurde (cA-pA<sub>BRE</sub>). Bei der dritten Mutante wurde sowohl das BRE-Element als auch die TATA-Box gegen die entsprechende pA-Sequenz ausgetauscht (cA-pA<sub>TATABRE</sub>). Die entsprechenden *Hf. volcanii*-Transformanten wurden hergestellt und mit dem ONPG-Test auf die basalen Aktivitäten der veränderten cA-Promotoren und auf die Aktivitäten bei Anwesenheit des Aktivators cGvpE untersucht.

Die Analyse zeigte, dass bei den Transformanten cA-pA<sub>TATA</sub>-*bgaH*, cA-pA<sub>BRE</sub>-*bgaH* und cA-pA<sub>BRETATA</sub>-*bgaH* keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar war (keine Abbildung). Die pA-TATA-Box und das pA-BRE-Element genügten also weder alleine noch zusammen, um aus dem cA-Promotor einen konstitutiv aktiven Promotor zu machen.

Die Transformanten cA-pA<sub>TATA</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>, cA-pA<sub>BRE</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und cA-pA<sub>BRETATA</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> mit cGvpE als Aktivator zeigten aber spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten, die im Durchschnitt 7 bis 9-fach größer waren als die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante (Abb. 18). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten waren aber durchschnittlich um das ca. 3-fache niedriger als die der pA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante.



	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]				
Zeit [h]	pA- <i>bgaH</i> /cE <sup>ex</sup>	cA- <i>bgaH</i> /cE <sup>ex</sup>	cA-p <sup>ABRETATA</sup> - <i>bgaH</i> /cE <sup>ex</sup>	cA-p <sup>ABRE</sup> - <i>bgaH</i> /cE <sup>ex</sup>	cA-p <sup>ATATA</sup> - <i>bgaH</i> /cE <sup>ex</sup>
1 (20-40)	0,0665	0,0032	0,0374	0,0233	0,0329
2 (41-65)	0,0900	0,0037	0,0362	0,0287	0,0342
3 (66-90)	0,1381	0,0055	0,0512	0,0494	0,0551
4 (91-120)	0,2255	0,0106	0,0844	0,0613	0,0800

**Abb. 18** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten: pA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA/cE), cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (cA/cE), cA-p<sup>ABRETATA</sup>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (cA-p<sup>ABRETATA</sup>/cE), cA-p<sup>ABRE</sup>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (cA<sup>ABRE</sup>/cE) und cA-p<sup>ATATA</sup>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (cA-p<sup>ATATA</sup>/cE). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Alle Transformanten besitzen den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle des pA-, des cA-Promotors oder der mutierten Promotoren cA-p<sup>ABRETATA</sup>, cA-p<sup>ABRE</sup> bzw. cA-p<sup>ATATA</sup>. Sie enthalten alle noch zusätzlich den *c-gvpE*-Leserahmen (cE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben.

Es scheint demnach, dass weder TATA-Box noch BRE-Element die ausreichend entscheidenden Elemente sind, die einen Promotor konstitutiv aktiv machen. Es konnte aber gezeigt werden, dass diese beiden Elemente wichtig für die GvpE-vermittelte Aktivierung sind. Es wäre demnach ein Zusammenspiel zwischen dem basalen Transkriptionsapparat und dem GvpE-Aktivator möglich.

#### 4) Suche nach der GvpE-Bindestelle in der *gvpA*-Promotorsequenz

Der Aktivator cGvpE wurde in Mutationsstudien und Computermodellierungstudien näher untersucht und beschrieben (Krüger et al., 1998 und Plößer & Pfeifer, 2002). Es handelt sich bei cGvpE um ein basisches *leucine-zipper*-Protein, das als Dimer auftritt und typischerweise an palindromische DNA-Sequenzen bindet. Sequenzuntersuchungen der drei *gvpA*-Promotoren erbrachten, dass der cA- und der mcA-Promotor eine fast identische palindromische Sequenz GTTGAACTCACAAC bzw. GTTGCTGAACCAAC stromauf der jeweiligen TATA-Box enthalten (Abb. 3). Der Abstand des Palindroms zur TATA-Box im cA-Promotor ist aber kürzer (4 nt) als der im mcA-Promotor (7 nt). Drei Nukleotide der palindromischen Sequenz im cA-Promotor überlappen mit dem BRE-Element, das direkt stromauf der TATA-Box liegt. Im mcA-Promotor dagegen liegen die palindromische Sequenz und das BRE-Element direkt nebeneinander. Der pA-Promotor hingegen besitzt keine solche Sequenz. Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei der palindromischen Sequenz der *gvpA*-Promotoren um die GvpE-Bindestelle handeln könne. Die Region stromauf der TATA-Box sollte mit Hilfe von Mutagenesestudien untersucht werden, um herauszufinden, ob es sich bei der palindromischen Sequenz oder bei benachbarten Regionen um die GvpE-Bindestelle handeln könne. Die Auswirkungen der Mutationen sollten durch die Expression des *bgaH*-Leserahmens in den entsprechenden *A-bgaH*-Transformanten studiert werden. Mit Hilfe des ONPG-Tests wurde die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt und mit den Aktivitäten der nicht mutierten *A-bgaH*-Fusionsgene verglichen. Wenn sich solche mutierten *gvpA*-Promotoren nicht mehr durch die GvpE-Proteine aktivieren lassen, könnte das ein Hinweis auf die GvpE-Bindestelle sein.

##### a) chimäre pA-cA-Promotoren

Der pA-Promotor kann wie der mcA-Promotor von den drei GvpE Proteinen pGvpE, cGvpE und pGvpE aktiviert werden, während der cA-Promotor nur durch das homologe cGvpE aktiviert wird. Es wurde ein chimärer pA-cA-Promotor konstruiert, bei dem aufwärts der cA-TATA-Box 21 nt gegen die entsprechende Sequenz des pA-Promotors ausgetauscht waren. Mit Hilfe dieser Konstrukte wurde untersucht, ob in diesem Bereich die GvpE-Bindestelle liegt. Der cA-Promotor wurde gewählt, da er keine messbare basale Aktivität hat. In Abb. 19 ist die Sequenz des chimären pA-cA-Promotors gezeigt. Sollte der pA-Anteil die Bindestelle für GvpE enthalten, wäre eine höhere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zur *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante zu erwarten. Die *pA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante hat nämlich im

Durchschnitt eine etwa 20-fach höhere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als die *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante (siehe Abb. 11).

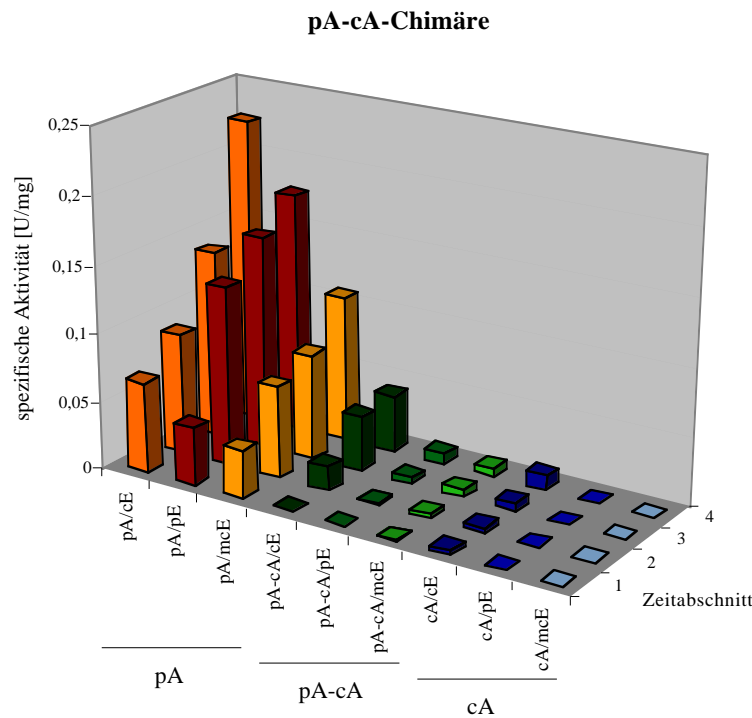
	BRE	TATA	+ cGvpE [U/mg]
	RNWAAWN	YTTAWG	
pA	ATTACAGGAGACATAACGACTGGTGA AACCAT	ACACATC	0,2255
cA	ATTACGAGCGCCGAAACGGGGTTGAACTCAC	AA_CGGCG	0,0106
pA-cA	ATTACGAGCGCCGAAACGactGgTGAAacCat	Acacatc	0,0421
pA-cA+10u	ATTACGAGaGaCataAACGactGgTGAAacCAT	Acacatc	0,0324
pA-cA+5u	ATTACGAGCGCCGtAACGactGgTGAAacCAT	Acacatc	0,0233
pA-cA-5u	ATTACGAGCGCCGAAACGGGGTTGAAacCAT	Acacatc	0,0227
pA-cA-10u	ATTACGAGCGCCGAAACGGGGTTGAAacCAT	Acacatc	0,0226
pA-cA-5d	ATTACGAGCGCCGAAACGactGgTGAAacCAT	Ac_CGGCG	0,0081
pA-cA-10d	ATTACGAGCGCCGAAACGactGgTGAAacCAC	AA_CGGCG	0,0087

**Abb. 19** Sequenzen des pA-, des cA- und der verschiedenen chimären pA-cA-Promotoren. Die Namen (Zahlen) der chimären pA-cA-Varianten beziehen sich auf den Austausch der Nukleotide in Bezug auf die pA-cA Sequenz. Ein + steht für zusätzliche pA- und ein – für weniger pA-Nukleotide. Die Position dieser Nukleotide im Verhältnis zur pA-cA Sequenz ist durch u für *upstream* und d für *downstream* angegeben. Die pA-Promotor Sequenz ist grau unterlegt, und alle Veränderungen in der cA-Sequenz der chimären Promotoren sind in kleinen Buchstaben gezeigt. Sowohl die Konsensus Sequenz des BRE-Elements, als auch die der TATA-Box sind oberhalb der Promotorsequenzen angegeben (R = A oder G; N = A,C,G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Die Nukleotide, die mit der Konsensussequenz der TATA-Box übereinstimmen, sind fett hervorgehoben. Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz des BRE-Elements sind in blau gezeigt. Rechts neben den Sequenzen sind die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Werte der entsprechenden Transformanten mit dem cGvpE-Aktivator aus Zeitabschnitt 4 in U/mg angegeben (siehe auch Abb. 20 und 21).

Die pA-cA-Mutante wurde über *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt. Die DNA-Sequenzanalyse zeigte, dass die Mutante die gewünschte Sequenz hatte. Der pA-cA-Promotor wurde mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert und in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert. Es wurden *Hf. volcanii*-Transformanten mit dem pA-cA-*bgaH*-Konstrukt hergestellt, um die basale Aktivität zu untersuchen. Auch wurden Transformanten hergestellt, die zusätzlich noch jeweils die Gene für cGvpE, pGvpE bzw. mcGvpE enthielten, um zu untersuchen, ob der pA-cA-Promotor durch die verschiedenen Aktivatoren cGvpE, pGvpE und mcGvpE aktivierbar ist.

Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des pA-cA-Promotors wurde mit Hilfe des ONPG-Tests bei allen Transformanten über die gesamten Wachstumsphasen hinweg bestimmt (Abb. 20). Die Analyse erbrachte, dass die Transformante pA-cA-*bgaH* keine messbare spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität hatte (keine Abbildung). Der pA-cA-Promotor zeigte also wie der

cA-Promotor keine basale Aktivität. Die 21 nt lange Sequenz stromauf der TATA-Box, die auch das BRE-Element des pA-Promotors enthält, veränderte nicht die basale Aktivität des cA-Promotors. Bei den Transformanten pA-cA-*bgaH*/E<sup>ex</sup> konnten dagegen spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen werden, die deutlich über der Aktivität, die bei der cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante ermittelt wurde, lagen, aber geringer als die Aktivitäten waren, die bei den pA-*bgaH*/E<sup>ex</sup>-Transformanten bestimmt wurden. Der pA-cA-Promotor ließ sich wie der pA-Promotor durch alle drei GvpE-Proteine aktivieren und nicht nur durch cGvpE wie der cA-Promotor.



Zeit [h]	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]								
	pA/cE	pA/pE	pA/mcE	pA-cA/cE	pA-cA/pE	pA-cA/mcE	cA/cE	cA/pE	cA/mcE
1 (20-40)	0,0665	0,0428	0,0356	0,0010	0,0001	0,0001	0,0032	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,0900	0,1323	0,0679	0,0180	0,0009	0,0031	0,0037	0,0001	0,0001
3 (66-90)	0,1381	0,1569	0,0779	0,0408	0,0044	0,0057	0,0055	0,0001	0,0001
4 (91-120)	0,2255	0,1773	0,1087	0,0421	0,0079	0,0063	0,0106	0,0001	0,0001

**Abb. 20** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten pA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA/cE), pA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> (pA/pE), pA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA/mcE), pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA-cA/cE), pA-cA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> (pA-cA/pE), pA-cA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA-cA/mcE), cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (cA/cE), cA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> (cA/pE) und cA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (cA/mcE). Die farbigen Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen alle den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle des pA-, des cA-Promotors oder des mutierten Promotors pA-cA. Sie enthalten noch zusätzlich einen der drei *gvpE*-Leserahmen *c-gvpE* (cE<sup>ex</sup>), *mc-gvpE* (mcE<sup>ex</sup>) oder *p-gvpE* (pE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

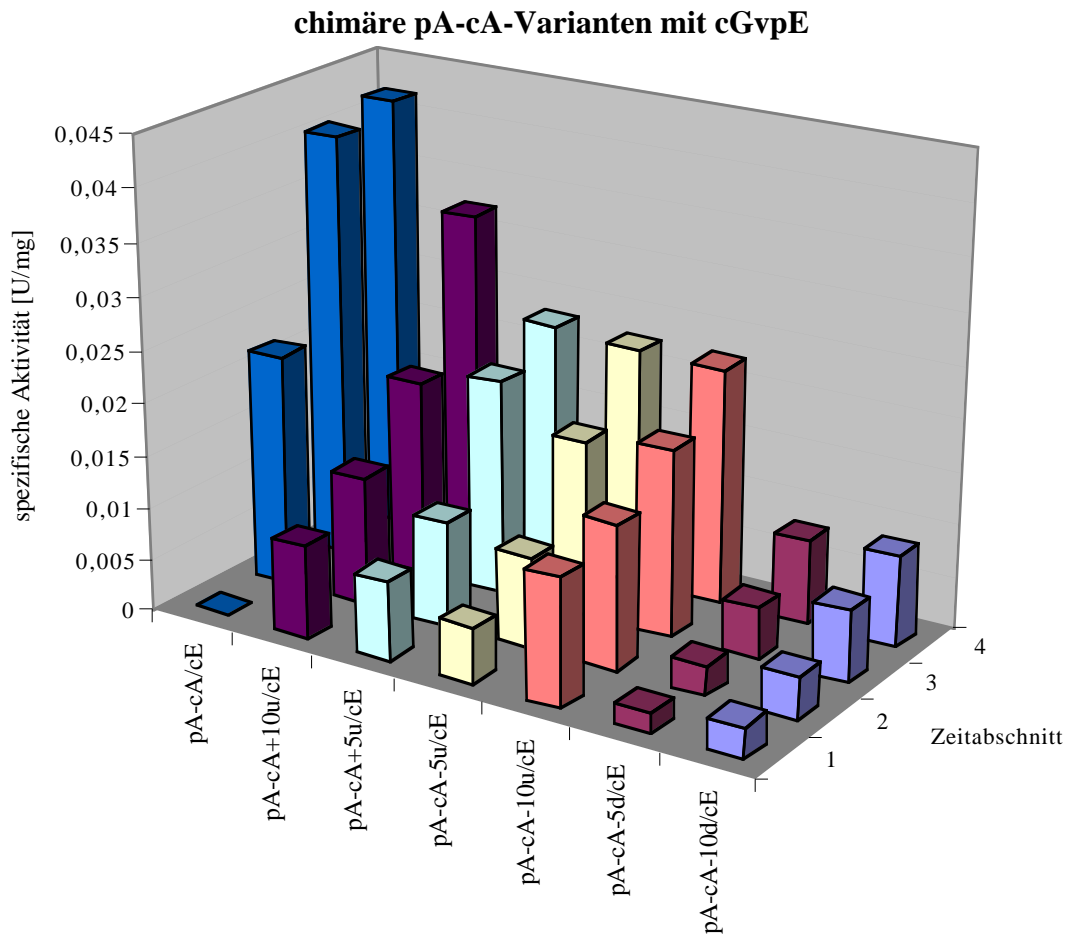
Die Aktivität der Transformante pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> war um ca. das 5-fache niedriger als die der Transformante pA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und um etwa das 4-fache höher als die der Transformante cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>. Der chimäre pA-cA-Promotor ließ sich am stärksten durch cGvpE aktivieren, die Aktivitäten mit pGvpE bzw. mcGvpE waren um das 20- bis 30-fache geringer. Diese Analyse lässt vermuten, dass eine pA-Promotor-Sequenz von 21 nt Länge neben der TATA-Box für eine bessere Aktivierung durch cGvpE sorgt und auch eine Aktivierung durch pGvpE und mcGvpE vermittelt. Diese 21-nt-Sequenz enthält damit zumindest einen Teil der Sequenz, der für die Wechselwirkung zwischen A-Promotor und GvpE-Protein notwendig ist.

### b) Varianten des chimären pA-cA-Promotors

Um diese 21 nt lange Sequenz weiter zu analysieren, wurde die Länge der pA-Sequenz im cA-Promotor variiert. Zum einen wurde die 21 nt lange Sequenz verlängert, d.h. 5 bzw. 10 weitere Nukleotide der cA-Sequenz durch Nukleotide der pA-Sequenz ersetzt (pA-cA<sub>+5u</sub> bzw. pA-cA<sub>+10u</sub> mit u für *upstream*) (Abb. 20). Zum anderen wurde die 21 nt lange Sequenz von beiden Seiten her jeweils verkürzt. Dazu wurden 5 bzw. 10 nt des pA-Promotors durch die entsprechenden nt des cA-Promotors ersetzt. Diese Mutanten wurden als pA-cA-5u und pA-cA-10u bzw. pA-cA-5d und pA-cA-10d mit d für *downstream* bezeichnet (Abb. 20).

Die sechs pA-cA-Varianten wurden über *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt, mittels DNA-Sequenzanalyse überprüft, mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert und in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert. Die entsprechenden *Hf. volcanii*-Transformanten mit und ohne den Genen für die GvpE-Proteine (cE, mcE und pE) wurden hergestellt und anschließend mit Hilfe des ONPG-Tests über die verschiedenen Wachstumsperioden hinweg untersucht.

Bei allen sechs Transformanten war keine basale Aktivität messbar (keine Abbildung). Die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der sechs Transformanten mit cGvpE sind in Abb. 21 aufgeführt. Alle Mutanten hatten etwas niedrigere Aktivitäten als die erneut untersuchte pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante. Die Transformanten mit der verlängerten pA-Sequenz pA-cA<sub>+5u</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und pA-cA<sub>+10u</sub>-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> hatten eine etwas geringere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als die pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante. Ebenso haben die verkürzten pA-cA-5u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und pA-cA-10u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> eine ähnlich erniedrigte Aktivität. Die stromab verkürzten pA-cA-5d-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und pA-cA-10d-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> dagegen hatten deutlich erniedrigte Aktivitäten (Abb. 21).

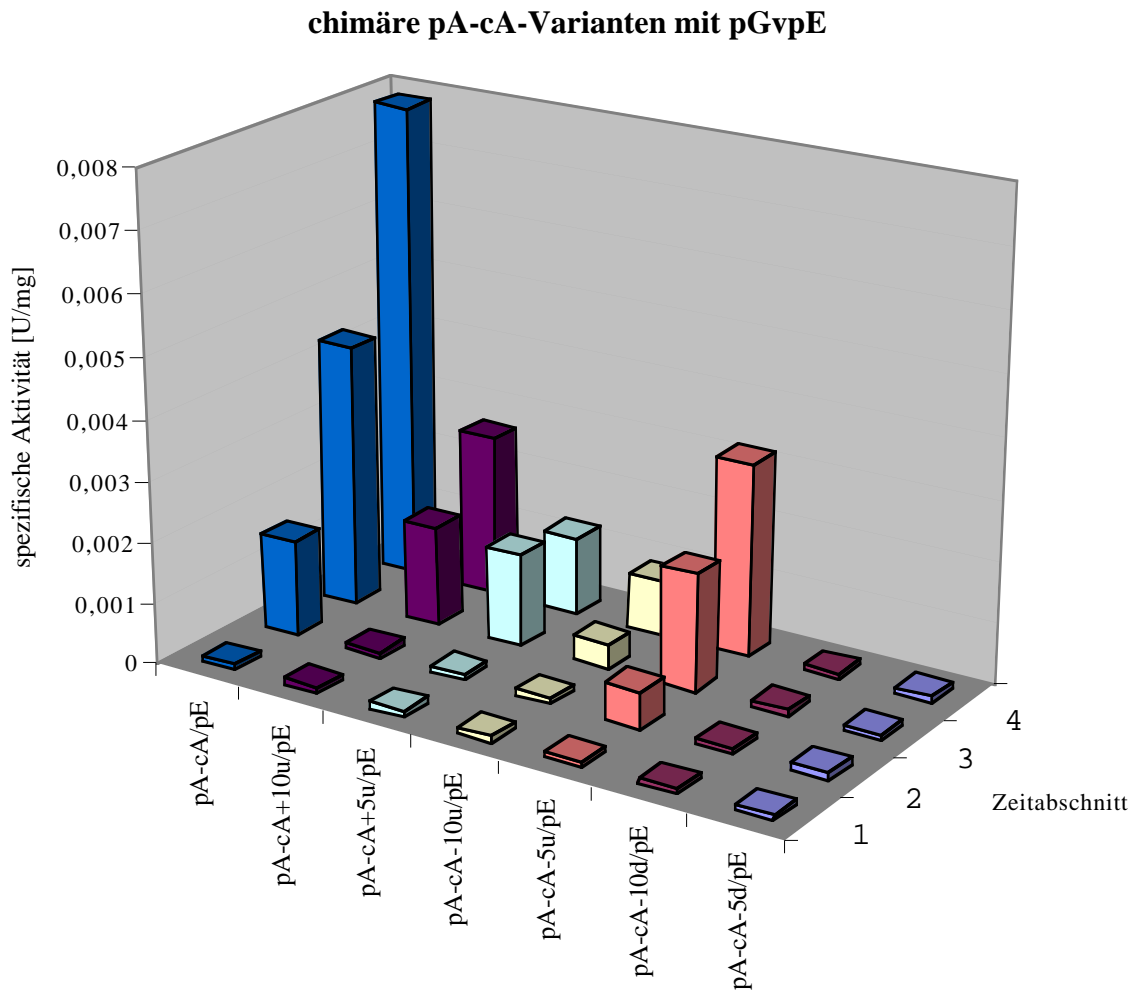


	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]						
Zeit [h]	pA-cA/cE	pA-cA+10u/cE	pA-cA+5u/cE	pA-cA-5u/cE	pA-cA-10u/cE	pA-cA-5d/cE	pA-cA-10d/cE
1 (20-40)	0,0010	0,0088	0,0076	0,0053	0,0123	0,0020	0,0030
2 (41-65)	0,0180	0,0123	0,0100	0,0087	0,0139	0,0028	0,0041
3 (66-90)	0,0408	0,0187	0,0206	0,0167	0,0178	0,0049	0,0068
4 (91-120)	0,0421	0,0324	0,0233	0,0227	0,0226	0,0081	0,0087

**Abb. 21** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA-cA/cE), pA-cA+10u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA-cA+10u/cE), pA-cA+5u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA-cA+5u/cE), pA-cA-5u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA-cA-5u/cE), pA-cA-10u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA-cA-10u/cE), pA-cA-5d-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA-cA-5d/cE) und pA-cA-10d-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> (pA-cA-10d/cE). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle der verschiedenen pA-cA-Promotoren (pA-cA, pA-cA+10u, pA-cA+5u, pA-cA-5u, pA-cA-10u, pA-cA-5d und pA-cA-10d), und sie enthalten noch zusätzlich den *c-gvpE*-Leserahmen (cE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben.

Die Ergebnisse der sechs pA-cA-Varianten mit pGvpE als Aktivator zeigten ähnliche Tendenzen (Abb. 22). Die beiden Transformanten mit der verlängerten pA-Sequenz pA-

*cA+5u-bgaH/pE<sup>ex</sup>* und *pA-cA+10u-bgaH/pE<sup>ex</sup>* hatten eine geringere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als die *pA-cA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*-Transformante.



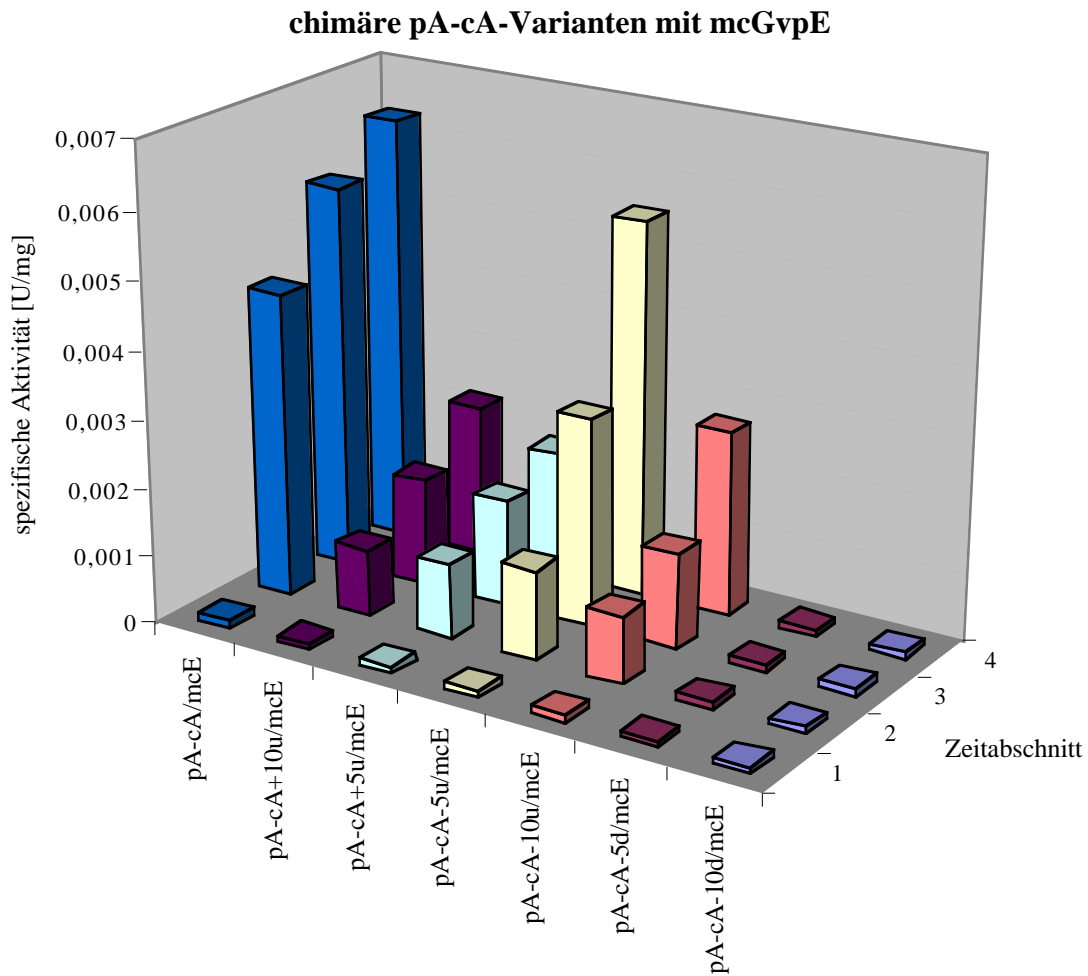
	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]						
Zeit [h]	pA-cA/pE	pA-cA+10u/pE	pA-cA+5u/pE	pA-cA-5u/pE	pA-cA-10u/pE	pA-cA-5d/pE	pA-cA-10d/pE
1 (20-40)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,0016	0,0001	0,0001	0,0006	0,0001	0,0001	0,0001
3 (66-90)	0,0044	0,0017	0,0015	0,0020	0,0004	0,0001	0,0001
4 (91-120)	0,0079	0,0027	0,0013	0,0032	0,0009	0,0001	0,0001

**Abb. 22** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *pA-cA-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (*pA-cA/pE*), *pA-cA+10u-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (*pA-cA+10u/pE*), *pA-cA+5u-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (*pA-cA+5u/pE*), *pA-cA-5u-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (*pA-cA-5u/pE*), *pA-cA-10u-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (*pA-cA-10u/pE*), *pA-cA-5d-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (*pA-cA-5d/pE*) und *pA-cA-10d-bgaH/pE<sup>ex</sup>* (*pA-cA-10d/pE*). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40h), 2 (41-65h), 3 (66-90h) und 4 (91-120h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen alle den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle der verschiedenen pA-cA-Promotoren, (pA-cA, pA-cA+10u, pA-cA+5u, pA-cA-5u, pA-cA-10u, pA-cA-5d und pA-cA-5d), und sie enthalten noch zusätzlich den *p-gvpE*-Leserahmen (*pE<sup>ex</sup>*) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Auch die stromauf verkürzten Transformanten pA-cA-5u-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> und pA-cA-10u-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> zeigten eine geringere Aktivität. Bei den beiden stromab verkürzten Transformanten pA-cA-5d-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> und pA-cA-10d-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> war dagegen gar keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar. Diese Resultate bestätigten die oben ausgeführten Ergebnisse der Doppeltransformanten mit cGvpE.

Die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der sechs Doppeltransformanten mit mcGvpE als Aktivator sind in den Abb. 23 aufgeführt. Auch hier wurde bei den Transformanten pA-cA+5u-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> und pA-cA+10u-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> eine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen, die geringer war als die Aktivität, welche bei der pA-cA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup>-Transformante bestimmt wurde. Ebenso hatten die pA-cA-5u-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> und pA-cA-10u-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> eine erniedrigte Aktivität. Die Transformanten pA-cA-5d-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> und pA-cA-10d-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> wiesen dagegen keine messbare  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf. Diese Resultate bestätigten die oben ausgeführten Ergebnisse der Doppeltransformanten mit cGvpE bzw. pGvpE.

Alle drei Aktivatoren cGvpE, pGvpE und mcGvpE konnten demnach die chimären Varianten mit der stromab verkürzten pA-Sequenz (pA-cA-5d und pA-cA-10d) am schlechtesten aktivieren. Die Sequenzen dieser beiden Promotoren enthielten beide das BRE-Element des cA-Promotors. Im Gegensatz dazu haben alle anderen chimären Promotoren das gut konservierte BRE-Element des pA-Promotors. Diese Ergebnisse bestätigten die Hinweise aus den vorangegangenen Versuchen, dass das BRE-Element an der Aktivierung der Promotoren durch GvpE beteiligt ist. Zusätzlich führte der Austausch der benachbarten Sequenz zu einer Erniedrigung der Aktivität.



Zeit [h]	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]						
	pA-cA/mcE	pA-cA+10u/mcE	pA-cA+5u/mcE	pA-cA-5u/mcE	pA-cA-10u/mcE	pA-cA-5d/mcE	pA-cA-10d/mcE
1 (20-40)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,0045	0,0010	0,0011	0,0013	0,0010	0,0001	0,0001
3 (66-90)	0,0057	0,0016	0,0016	0,0031	0,0014	0,0001	0,0001
4 (91-120)	0,0063	0,0022	0,0018	0,0055	0,0027	0,0001	0,0001

**Abb. 23** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten pA-cA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA-cA/mcE), pA-cA+10u-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA-cA+10u/mcE), pA-cA+5u-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA-cA+5u/mcE), pA-cA-5u-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA-cA-5u/mcE), pA-cA-10u-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA-cA-10u/mcE), pA-cA-5d-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA-cA-5d/mcE) und pA-cA-10d-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (pA-cA-10d/mcE). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle der verschiedenen pA-cA-Promotoren (pA-cA, pA-cA+10u, pA-cA+5u, pA-cA-5u, pA-cA-10u, pA-cA-5d und pA-cA-5d), und sie enthalten noch zusätzlich den mc-*gvpE*-Leserahmen (mcE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

### c) Mutationen in der palindromischen Sequenz des cA-Promotors

Zunächst wurde der Abstand der beiden Palindromhälften, der möglichen Binderegion, verkürzt. Dafür wurden die drei Nukleotide ACT aus der Sequenz GTTGA~~ACT~~CACAAC zwischen dem Palindrom deletiert (Abb. 24). Sollte die palindromische Sequenz die Bindestelle des cGvpE Proteins darstellen, müsste die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in einer entsprechenden cA- $\Delta$ ACT-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante deutlich sinken. Die Deletion der drei Nukleotide wurde mittels *in-vitro*-Mutagenese-PCR in den cA-Promotor eingeführt.

		BRE	TATA	
		RNWAAWN	YTTAWG	+ cGvpE
cA	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGA <u>ACTCAGAGG</u> GGCGGTTTTC			(++) = WT
cA- $\Delta$ ACT	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGA...CACAA <u>CGGCGG</u> TTTTC			(-)
cA-Mut1	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGG <u>ATTG</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(++) $\approx$ WT
cA-Mut2	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGTT <u>CG</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(+)
cA-Mut3	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGG <u>GcTc</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(+)
cA-Mut4	<u>G</u> ACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGG <u>GcTc</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(+)
cA-Mut5	GTACAAATCAGCGAA <u>CT</u> TATTACGAGCGCCGAAACGGGGTTGA <u>ACTCAG</u> GGCGGTTTTC			(+)
cA-Mut6	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGT <u>cG</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(-)
cA-Mut7	GTACAAAT <u>C</u> CGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGTT <u>G</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(-)
cA-Mut8	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCG <u>CG</u> AAACGGGGG <u>cTa</u> AACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(-)
cA-Mut9	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGG <u>GcTc</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(-)
cA-Mut10	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGG <u>GcTc</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(-)
cA-Mut11	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGTT <u>G</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(-)
cA-Mut12	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGG <u>GcTc</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(-)
cA-Mut13	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGG <u>GcTc</u> ACTCAGAGG <u>GGCGG</u> TTTTC			(-)

**Abb. 24** Sequenz des *c-gvpA*-Promotors und seiner Mutanten. Die Bezeichnung cA steht für die Sequenz des Wildtyp *c-gvpA* (cA)-Promotors. Die verschiedenen Mutanten sind  $\Delta$  für Deletion und Mut für Mutation gekennzeichnet. Deletierte Nukleotide sind als Punkte dargestellt und ausgetauschte Nukleotide sind kleingeschrieben. Zusätzliche, unerwünschte Mutationen sind grün hervorgehoben. Mutationen, die wahrscheinlich keine Auswirkung auf die GvpE-vermittelte Aktivierbarkeit des cA-Promotors haben sind in pink hervorgehoben. Mutationen, welche die Aktivierbarkeit herabzusetzen scheinen, sind in gelb hervorgehoben. Die TATA-Box ist in fett hervorgehoben, und das BRE-Element ist in blau geschrieben. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements als auch die der TATA-Box sind oben angegeben (R = A oder G; N = A,C,G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Die palindromische Sequenz ist unterstrichen. Rechts neben der jeweiligen Promotorsequenz ist die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der jeweiligen cA-Mut-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante angegeben. (++) entspricht dabei der Aktivität der Wildtyp-Transformante cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>, (+) steht für eine verminderte und (-) eine fehlende Aktivität im Vergleich zur Wildtyp-Transformante.

Der mutierte cA-Promotor mit der ACT-Deletion wurde zusammen mit dem *bgaH*-Reporter gen als Fusionskonstrukt in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert und die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten cA- $\Delta$ ACT-*bgaH* und cA- $\Delta$ ACT-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> mit Hilfe des ONPG-Tests ermittelt.

Bei beiden Transformanten war zu keiner Zeit des Wachstums  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar (keine Abbildung). Bei der Wildtyptransformante *cA-bgaH* war ebenfalls keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar, wohingegen bei der Transformante *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* Aktivität vorhanden war (Abb. 10). Dies bedeutet zum einen, dass die ACT-Deletion zu keiner Verbesserung der basalen Aktivität des *cA*-Promotors führte, und zum andern, dass das *cGvpE*-Protein den *cA*-Promotor mit der ACT-Deletion nicht mehr aktivieren konnte. Dieses Ergebnis zeigte, dass der mutierte Bereich in der palindromischen Sequenz oder der Abstand zwischen den Palindromhälften wichtig für die Aktivierung des *cA*-Promotors war.

Weitere Mutationen wurden an der palindromischen DNA-Sequenz durchgeführt. Geht man davon aus, dass der Aktivator spezifisch an die Sequenzen GTTG und CAAC bindet, sollten Nukleotid-Austausche in diesen Sequenzen die Bindung verschlechtern oder verhindern. Solche Mutanten sollten dann zu einer verminderten *cA*-Promotoraktivität führen und anhand der Produktanalyse studiert werden können.

Die Nukleotide der beiden Palindromhälften des *cA*-Promotors und drei der sechs Nukleotide dazwischen (*GTTGAACTCACAAC*) wurden mutiert. Ziel war dabei, möglichst viele verschiedene Mutationen zu erzeugen. Deshalb wurde ein synthetischer Megaprimer benutzt, der an der Zielsequenz degeneriert war. Die Zielsequenz *GTTGAACTCACAAC* sollte auf diese Weise durch die Sequenz *RYRRACKYASWRS* ersetzt werden (R=A+G; Y=A+G+C; S=G+C; K=G+T; W=A+T).

Die genaue Herstellung der *cA*-Mut-Promotoren ist im Methodenteil beschrieben. Die DNA-Sequenzanalyse erbrachte 13 verschiedene Sequenzen, die in Abb. 24 dargestellt sind. Alle Mutanten hatten ein oder zwei Nukleotide in der Region zwischen den Palindromhälften (nur die Mutante *cA*-Mut5 hat dort keine Mutation) und 3 oder 4 Nukleotide der zweiten Palindromhälfte ausgetauscht. Die vier Mutanten *cA*-Mut2, *cA*-Mut5, *cA*-Mut7 und *cA*-Mut11 hatten keine Mutation in der ersten Palindromhälfte. Die restlichen Mutanten hatten 1 bis 3 Nukleotide ausgetauscht. Den Mutanten *cA*-Mut7 und *cA*-Mut8 fehlte überraschenderweise jeweils das Nukleotid 29 bzw. 11 stromauf der Palindromsequenzen. Die Mutante *cA*-Mut4 hatte 37 Nukleotide stromauf des Palindroms einen zusätzlichen Nukleotidaustausch, während die Mutante *cA*-Mut5 ein Adenosin, 24 Nukleotide stromauf, zusätzlich hatte (Abb. 24). Diese zusätzlichen und unerwünschten Mutationen waren bei der PCR entstanden.

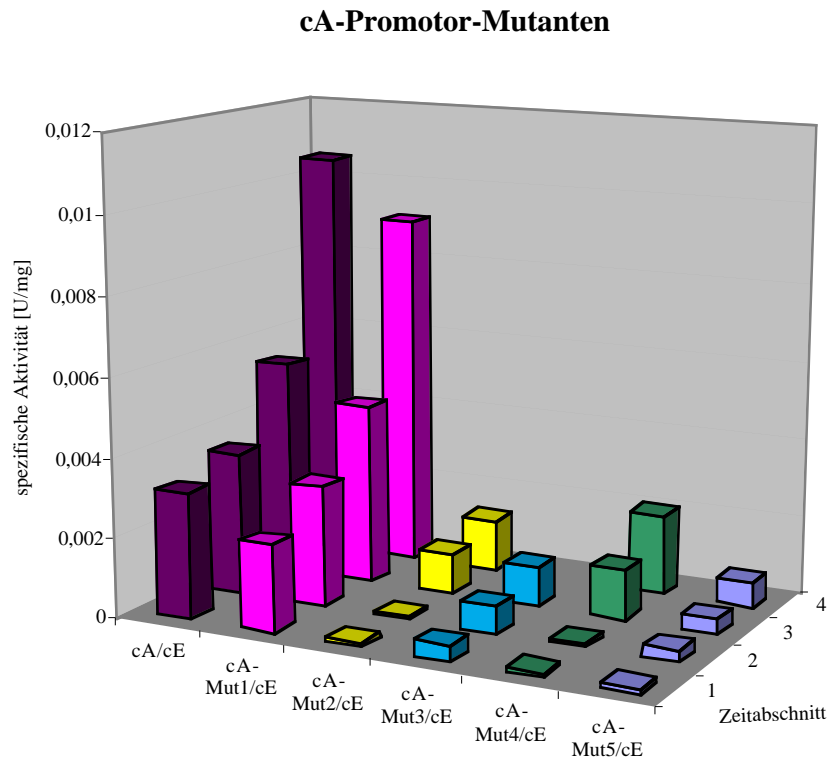
Die mutierten *cA*-Promotoren wurden an den *bgaH*-Leserahmen fusioniert und in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert. Entsprechende *Hf. volcanii*-Transformanten (*cA*-Mut-*bgaH* und *cA*-Mut-*bgaH/cE<sup>ex</sup>*) wurden hergestellt und überprüft, ob diese mutierten *cA*-Promotoren noch durch das cGvpE-Protein aktivierbar waren.

Die Analyse erbrachte, dass alle *cA*-Mut-*bgaH*-Transformanten zu keiner Zeit des Wachstums messbare  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten enthielten (keine Abbildung). Damit verhielten sich diese mutierten *cA*-Promotoren wie der Wildtyppromotor in der *cA-bgaH*-Transformante. Der *cA*-Promotor wurde also durch die Mutationen nicht verbessert.

Acht der Transformanten *cA*-Mut-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* mit den mutierten Promotoren *cA*-Mut6, *cA*-Mut7, *cA*-Mut8, *cA*-Mut9, *cA*-Mut10, *cA*-Mut11, *cA*-Mut12 und *cA*-Mut13 wiesen ebenfalls zu keiner Zeit messbare  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten auf (siehe Abb. 24).

Die fünf Transformanten *cA*-Mut1-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* bis *cA*-Mut5-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* zeigten dagegen spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. In Abb. 25 ist ein Vergleich der gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität dieser fünf Transformanten zu sehen. Die Mutante *cA*-Mut1-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* hatte eine ähnliche spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wie die Wildtyptransformante *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*. Die Aktivitäten der vier anderen Mutanten *cA*-Mut2-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* bis *cA*-Mut5-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* waren bis um das 16-fache geringer als die der Wildtyptransformante *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*. Diese Aktivitäten lagen allerdings an der unteren Grenze der Messbarkeit. Betrachtet man die *cA*-Promotorsequenz der Transformante *cA*-Mut1-*bgaH/cE<sup>ex</sup>*, deren spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ähnlich der Wildtyptransformante *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* war, fällt auf, dass sie fünf Nukleotidaustausche hat **aTTGgACTCAgAgg** (Abb. 24). Diese Mutationen hatten scheinbar keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des *cA*-Promotors und wurden deshalb als unwichtig bezeichnet. Sucht man nun in der Sequenz der vier Mutanten mit verminderter  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (*cA*-Mut2 bis *cA*-Mut5) nach Unterschieden zur Mutante *cA*-Mut1, findet man jeweils einen weiteren Nukleotidaustausch. Die Mutanten *cA*-Mut2 und *cA*-Mut3 enthielten an der gleichen Position ein Thymidin in der DNA-Sequenz zwischen den beiden Palindromhälften (GTTGgACTtAgAgg und aTcagACTtAgAgg). Die beiden anderen Mutanten *cA*-Mut4 und *cA*-Mut5 besaßen an der gleichen Position ein Thymidin in der zweiten Palindromhälfte (GcTagACTCAgtgC und GTTGAACTCAgtgg). Jede der restlichen acht Mutanten *cA*-Mut6 bis *cA*-Mut13 enthielt beide Thymidine in der DNA-Sequenz zwischen den beiden Palindromhälften und in der rechten Palindromhälfte (Abb. 24). Es wäre möglich, dass eines dieser Thymidine zu einer Verminderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität führte, beide Thymidine dagegen zum kompletten Verlust der Aktivität führten. Man darf bei der

Betrachtung aber nicht die zusätzlichen Mutationen vergessen, deren Auswirkungen auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nicht bekannt sind.



	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]					
Zeit [h]	cA/cE	cA-Mut1/cE	cA-Mut2/cE	cA-Mut3/cE	cA-Mut4/cE	cA-Mut5/cE
1 (20-40)	0,0032	0,0022	0,0001	0,0004	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,0037	0,0031	0,0001	0,0007	0,0001	0,0003
3 (66-90)	0,0055	0,0046	0,0010	0,0010	0,0013	0,0004
4 (91-120)	0,0106	0,0091	0,0013		0,0021	0,0007

**Abb. 25** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *cA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (cA/cE), *cA-Mut1-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (cA-Mut1/cE), *cA-Mut2-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (cA-Mut2/cE), *cA-Mut3-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (cA-Mut3/cE), *cA-Mut4-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (cA-Mut4/cE) und *cA-Mut5-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (cA-Mut5/cE). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40h), 2 (41-65h), 3 (66-90h) und 4 (91-120h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen alle den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle des cA-Promotors oder der mutierten cA-Promotoren (cA-Mut1, cA-Mut2, cA-Mut3, cA-Mut4 bzw. cA-Mut5), und sie enthalten noch zusätzlich den *c-gvpE*-Leserahmen (cE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

#### d) Mutationen in der palindromischen Sequenz des mcA-Promotors

Da die cA-Palindrom-Mutanten nur sehr geringe spezifische Aktivitäten aufwiesen, wurden auch Mutationen in der palindromischen Sequenz des mcA-Promotors eingeführt. Das bereits beschriebene mcA-*bgaH*-Konstrukt ist viel stärker aktivierbar als das cA-*bgaH*-Konstrukt (siehe auch Abb. 11). Somit könnten unterschiedliche mcA-Promotor-Mutanten vielleicht eher einen Hinweis auf wichtige Nukleotide in der GvpE-Bindestelle liefern als cA-Promotor-Mutanten. Wie beim cA-Promotor sollten sowohl der Abstand der beiden Palindromhälften durch Deletion von drei Nukleotiden verringert werden, als auch die Nukleotide in dieser Region mutiert werden. Zunächst wurden die drei Nukleotide TGA aus der Sequenz GTTGCTGAACCAAC mit Hilfe der Mutagenese-PCR deletiert. Des Weiteren wurde ein degenerierter Primer eingesetzt. Die Nukleotide GTTGCTGAACCAAC sollten so durch die Nukleotide RYYRMTKRAYSWRS ersetzt werden (R=A+G; Y=A+G+C; S=G+C; K=G+T; W=A+T). Die genaue Herstellung der mutierten mcA-Promotoren ist im Methodenteil beschrieben. Die DNA-Sequenzanalyse der erhaltenen Promotormutanten erbrachte drei verschiedene Sequenzen, die in Abb. 26 zu sehen sind. Der mutierte Promotor mcA-Del zeigte die eingeführte Deletion der drei Nukleotide TGA zwischen den Palindromhälften, während bei den Mutanten mcA-Mut1 und mcA-Mut2 vor allem die zweite Palindromhälfte mutiert wurde (Abb. 26).

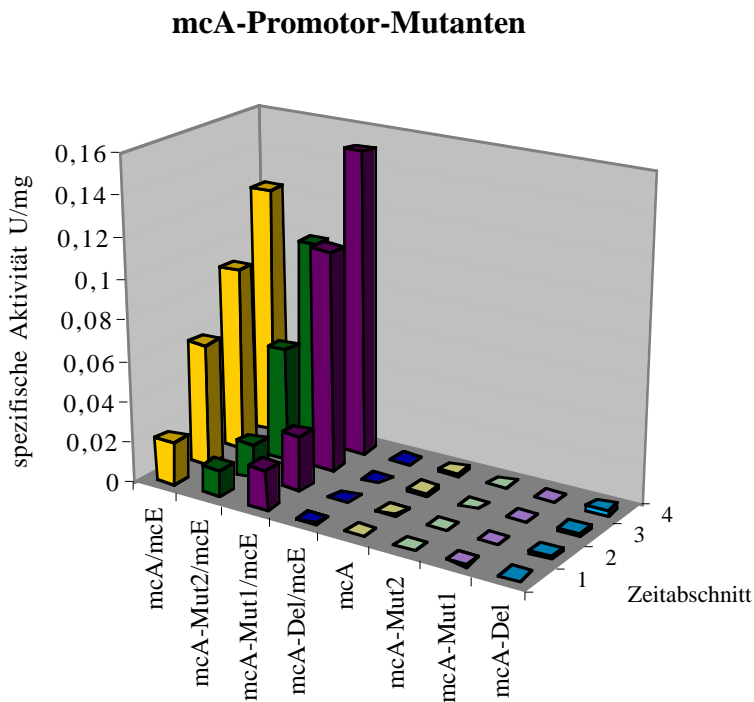
	BRE	TATA	
	RNWAAWNYTTAWG		+1
mcA	AAACGGTTGCTGAACCAAC	ACGAATGATTTTGTTACTTGCCAACACGTTTTTCAGATGG	+1
mcA-Del	AAACGGTTGC . . . ACCAAC	ACGAATGATTTTGTTACTTGCCAACACGTTTTTCAGATGG	
mcA-Mut1	AAACGgATTGCTGAACgTg	ACGAATGATTTTGTTACTTGCCAACACGTTTTTCAGATGG	
mcA-Mut2	AAACGGTTGCTGAAtgtgg	ACGAATGATTTTGTTACTTGCCAACACGTTTTTCAGATGG	

**Abb. 26** Sequenz des mcA-Promotors und Mutanten. Die Bezeichnung mcA steht für die Sequenz des mc-*gvpA*-Promotors. Die verschiedenen Mutanten sind mit mcA-Del, mcA-Mut1 und mcA-Mut2 bezeichnet. Die deletierten Nukleotide sind durch Punkte gekennzeichnet und die ausgetauschten Nukleotide sind als kleine Buchstaben gezeigt. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements als auch die der TATA-Box ist oben angegeben (R = A oder G; N = A, C, G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz des BRE-Elements sind in blau gezeigt, und Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz der TATA-Box sind fett hervorgehoben. Die palindromische Sequenz ist unterstrichen. Der Transkriptionsstart ist mit +1 gekennzeichnet.

Die mutierten mcA-Promotoren wurden mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert und in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert. Mit Hilfe der entsprechenden Transformanten wurde anschließend analysiert, ob sich die basalen Aktivitäten dieser

mutierten *mcA*-Promotoren verändert hatten und ob diese noch durch den homologen Aktivator *mcGvpE* aktivierbar waren.

Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde von allen Transformanten mit ONPG-Tests bestimmt. Die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Abb. 27 gezeigt. Die Analyse erbrachte, dass die drei Transformanten *mcA*-Mut1-*bgaH*, *mcA*-Mut2-*bgaH* und *mcA*-Del-*bgaH* eine mit der Wildtyptransformante *mcA*-*bgaH* vergleichbare  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität hatten. Damit hatten die Mutationen keine Veränderung der basalen Aktivität des *mcA*-Promotors hervorgerufen.



Zeit [h]	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]							
	mcA/mcE	mcA-Mut2/mcE	mcA-Mut1/mcE	mcA-Del/mcE	mcA	mcA-Mut1	mcA-Mut2	mcA-Del
1 (20-40)	0,0216	0,0134	0,0200	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,0618	0,0169	0,0271	0,0001	0,0008	0,0001	0,0001	0,0009
3 (66-90)	0,0918	0,0561	0,1100	0,0001	0,0012	0,0001	0,0001	0,0014
4 (91-120)	0,1244	0,1014	0,1515	0,0001	0,0013	0,0003	0,0003	0,0018

**Abb. 27** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *mcA*-*bgaH*/*mcE*<sup>ex</sup> (*mcA*/*mcE*), *mcA*-Mut1-*bgaH*/*mcE*<sup>ex</sup> (*mcA*-Mut1/*mcE*), *mcA*-Mut2-*bgaH*/*mcE*<sup>ex</sup> (*mcA*-Mut2/*mcE*), *mcA*-Del-*bgaH*/*mcE*<sup>ex</sup> (*mcA*-Del/*mcE*), *mcA*-*bgaH* (*mcA*), *mcA*-Mut1-*bgaH* (*mcA*-Mut1), *mcA*-Mut2-*bgaH* (*mcA*-Mut2) und *mcA*-Del-*bgaH* (*mcA*-Del). Die Säulen repräsentieren die gemittelte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen alle den *bgaH*-Leserahmen in *pWL102* unter der Kontrolle des *mcA*-Promotors oder der mutierten *mcA*-Promotoren (*mcA*-Mut1, *mcA*-Mut2 bzw. *mcA*-Del), oder sie enthalten noch zusätzlich den *mc-gvpE*-Leserahmen (*mcE*<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor *pJAS35*. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Die Transformante mcA-Del-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> hatte dagegen zu keinem Zeitpunkt der Wachstumsperiode messbare  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Deletion der drei Nukleotide im Bereich der palindromischen Sequenz im mcA-Promotor verhinderte damit die Aktivierung durch mcGvpE. Bei den Transformanten mcA-Mut1-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> und mcA-Mut2-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> waren dagegen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten messbar, die im Bereich der Wildtyptransformante mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> lagen. Die beiden Mutationen hatten demnach keine Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit.

### e) Durchgängige Deletionsanalyse im mcA-Promotor

Die Analyse der Mutanten mcA-Mut1 und mcA-Mut2 implizierte, dass die palindromische Sequenz nicht für die GvpE-Bindung wichtig war, während die Deletion von drei Nukleotiden zwischen den palindromischen Sequenzen deutlich die GvpE-vermittelte Aktivierung der *gvpA*-Promotoren verhinderte. Es wurde deshalb versucht, die für die GvpE-abhängige Aktivierung notwendige DNA-Region durch Deletionen näher einzuschränken. Mit dem *deletion walking* sollte überprüft werden, welche Nukleotide im Bereich vor den palindromischen Sequenzen Auswirkungen auf die Aktivierung durch GvpE haben. Es wurde deshalb stromauf der TATA-Box in sieben Schritten deletiert (Abb.28).

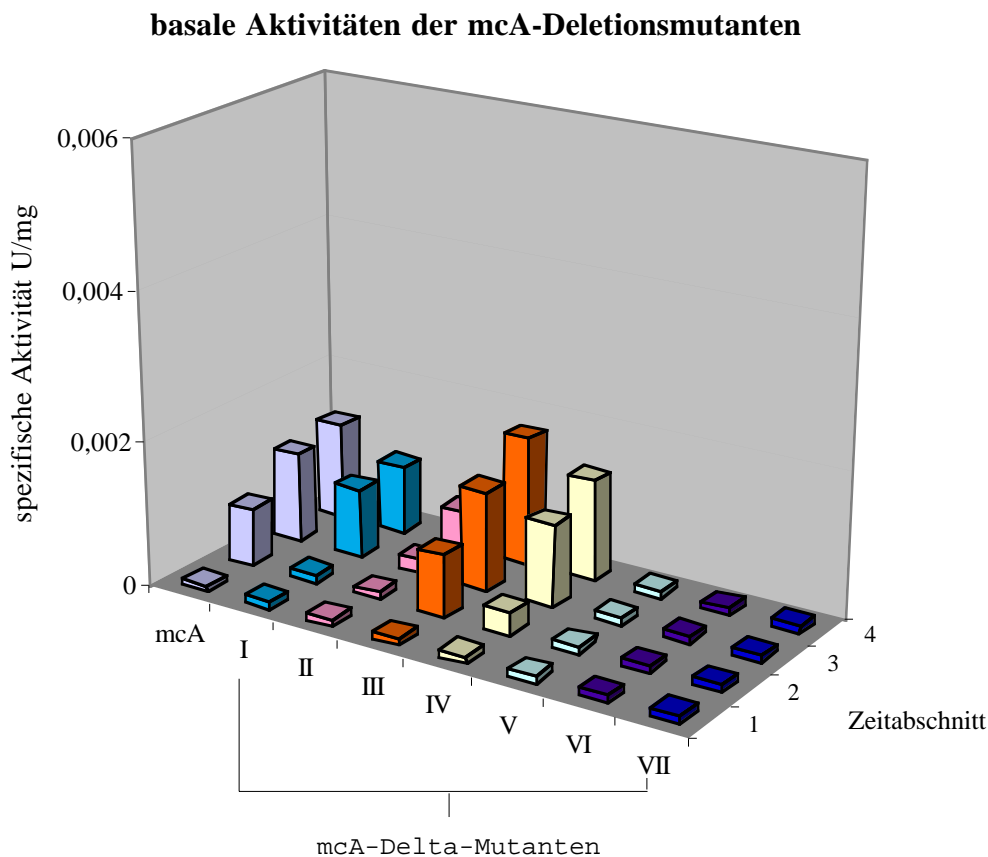
		BRE	TATA
			RNWAAWN <b>YTTAWG</b>
mcA	AGATGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAAC	<u>ACGAATG</u>	<b>GATTTTGT</b>
mcA-DeltaI	AGATGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAAC . . . . .		<b>ATTTTGT</b>
mcA-DeltaII	AGATGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTG . . . . .	<u>ACGAATG</u>	<b>GATTTTGT</b>
mcA-DeltaIII	AGATGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACG . . . . .	<u>AACCAAC</u>	<b>ACGAATGATTTTGT</b>
mcA-DeltaIV	AGATGTTTGACTCATTACGAGAGG . . . . .	<u>GTTGCTGAACCAAC</u>	<b>ACGAATGATTTTGT</b>
mcA-DeltaV	AGATGTTTGACTCATTA . . . . .	<u>TGAAACGGTTGCTGAACCAAC</u>	<b>ACGAATGATTTTGT</b>
mcA-DeltaVI	AGATGTTTGA . . . . .	<u>CGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAAC</u>	<b>ACGAATGATTTTGT</b>
mcA-DeltaVII	AGA . . . . .	<u>CTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAAC</u>	<b>ACGAATGATTTTGT</b>

**Abb. 28** Sequenz des mc-*gvpA*-Promotors und der mutierten Promotoren. Die Bezeichnung mcA steht für die Sequenz des mc-*gvpA*-Promotors. Die verschiedenen Mutanten sind mit mcA-DeltaI bis VII bezeichnet, wobei „Delta“ für Deletion steht. Die deletierten Nukleotide sind mit Punkten gekennzeichnet. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements, als auch die der TATA-Box sind oben angegeben (R = A oder G; N = A,C,G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz des BRE-Elements sind in blau gezeigt, und Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz der TATA-Box sind fett hervorgehoben. Die palindromische Sequenz ist unterstrichen.

Diese mcA-Deletionsmutanten wurden über *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt. Die DNA-Sequenzanalyse zeigte, dass die sieben Mutanten die gewünschten Sequenzen hatten. Diese mutierten mcA-Promotoren wurden mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert, in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert und die entsprechenden *Hf. volcanii*-Transformanten hergestellt.

Für die Analyse der Aktivierung des mcA-Promotors wurde das cGvpE-Protein eingesetzt, da cGvpE den mcA-Promotor ca. 5-fach stärker aktiviert als mcGvpE (siehe auch Abb. 7). Mit dem cGvpE sollte deshalb eine bessere Quantifizierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erreichbar sein. Eine erniedrigte Basalaktivität würde bedeuten, dass die Promotoraktivität durch die Mutation herabgesetzt ist und somit bei der entsprechenden Doppeltransformante mit einem GvpE-Protein nicht unbedingt Rückschlüsse auf die Bindestelle gezogen werden dürfen. Die Einzeltransformanten sind hier demnach als Negativkontrollen anzusehen.

Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden mit Hilfe des ONPG-Tests bestimmt, der über Wachstumsperioden hinweg durchgeführt wurde. Die Analyse erbrachte, dass bei den vier Transformanten mcA-DeltaI-*bgaH* bis mcA-DeltaIV-*bgaH* spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten messbar waren (Abb. 29). Beim Vergleich mit der Wildtyptransformante mcA-*bgaH* zeigen sich leichte Unterschiede. Während die Aktivität der Transformanten mcA-DeltaI-*bgaH* und mcA-DeltaII-*bgaH* etwas niedriger war als bei mcA-*bgaH*, war die Aktivität der Transformanten DeltaIII-*bgaH* und mcA-DeltaIV-*bgaH* leicht erhöht. Bei den drei Transformanten mcA-DeltaV-*bgaH* bis mcA-DeltaVII-*bgaH* war dagegen keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten messbar (Abb. 29). Diese drei mcA-Promotor-Mutanten sind demnach so stark verändert, dass eine eventuell ausbleibende Aktivierbarkeit durch ein GvpE-Protein nicht auf die GvpE-Bindestelle schließen lässt. Die basalen Aktivitäten der mcA-Deletionsmutanten mcA-DeltaI-*bgaH* bis mcA-DeltaIV-*bgaH* sind dagegen im Bereich des Wildtyps mcA-*bgaH*. Die Aktivierbarkeit dieser Mutanten (DeltaI bis DeltaIV) könnte einen Hinweis auf die GvpE-Bindestelle geben.



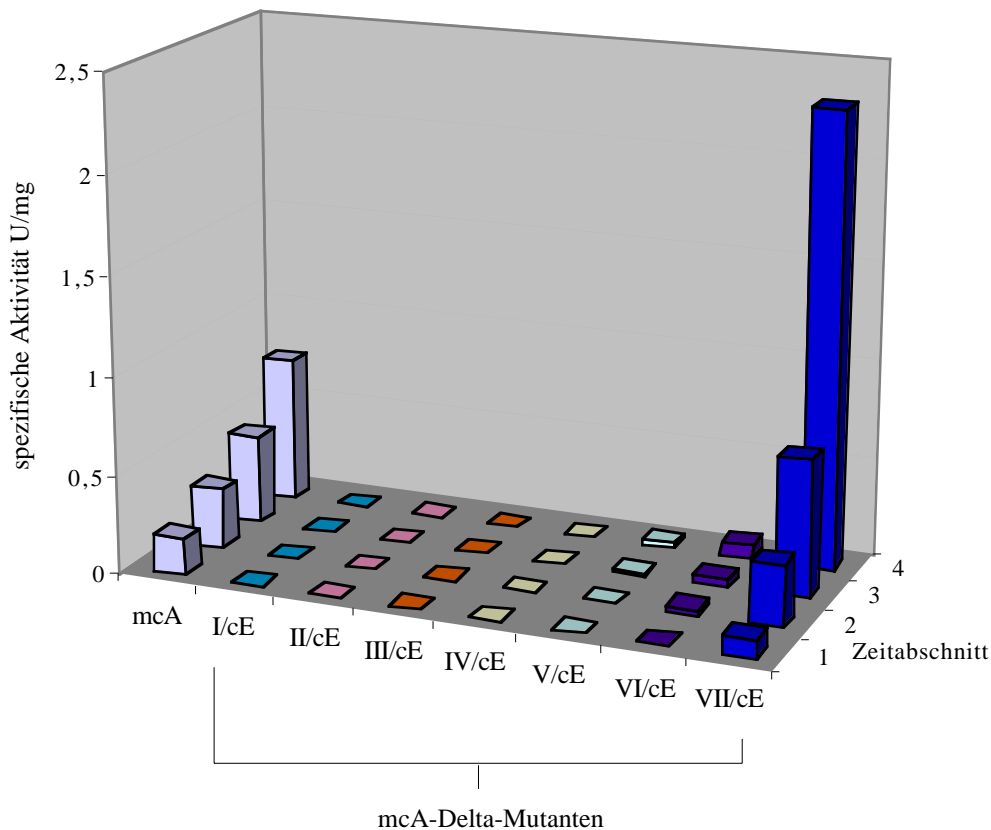
	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]							
Zeit [h]	mcA	DeltaI	DeltaII	DeltaIII	DeltaIV	DeltaV	DeltaVI	DeltaVII
1 (20-40)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,0008	0,0001	0,0001	0,0009	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001
3 (66-90)	0,0012	0,0009	0,0002	0,0014	0,0011	0,0001	0,0001	0,0001
4 (91-120)	0,0013	0,0009	0,0005	0,0018	0,0014	0,0001	0,0001	0,0001

**Abb. 29** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten mcA-*bgaH* (mcA), mcA-DeltaI-*bgaH* (DeltaI), mcA-DeltaII-*bgaH* (mcA-DeltaII), mcA-DeltaIII-*bgaH* (mcA-DeltaIII), mcA-DeltaIV-*bgaH* (mcA-DeltaIV), mcA-DeltaV-*bgaH* (mcA-DeltaV), mcA-DeltaVI-*bgaH* (mcA-DeltaVI) und mcA-DeltaVII-*bgaH* (mcA-DeltaVII). Die farbigen Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle des mcA-Promotors oder der mutierten mcA-Promotoren (mcA-DeltaI, mcA-DeltaII, mcA-DeltaIII, mcA-DeltaIV, mcA-DeltaV, mcA-DeltaVI bzw. mcA-DeltaVII). Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Bei den beiden Transformanten mcA-DeltaI-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und mcA-DeltaII-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> konnte keine spezifische Aktivität gemessen werden (Abb. 30). Die beiden Transformanten mcA-DeltaIII-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und mcA-DeltaIV-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> zeigten dagegen eine geringe spezifische  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität, die im Vergleich zu der Aktivität der Transformante mcA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> extrem vermindert war. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der beiden Transformanten mcA-DeltaV-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und mcA-DeltaVI-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> war im Vergleich zu der mcA-

*bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante um etwa das 20-Fache erniedrigt. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Transformante *mcA-DeltaVII-bgaH/cE<sup>ex</sup>* war während den Zeitabschnitten 1 bis 3 vergleichbar mit der Aktivität der *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante. Zu dem Zeitabschnitt 4 war dagegen die Aktivität der Transformante *mcA-DeltaVII-bgaH/cE<sup>ex</sup>* deutlich höher als die der Transformante *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (etwa 3-fach).

### Aktivitäten mit *cGvpE* der *mcA*-Deletionsmutanten



Zeit [h]	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]							
	mcA/cE	DeltaI/cE	DeltaII/cE	DeltaIII/cE	DeltaIV/cE	DeltaV/cE	DeltaVI/cE	DeltaVII/cE
1 (20-40)	0,1883	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0920
2 (41-65)	0,3062	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0034	0,0270	0,3119
3 (66-90)	0,4555	0,0001	0,0001	0,0008	0,0007	0,0116	0,0388	0,6959
4 (91-120)	0,7389	0,0001	0,0001	0,0009	0,0009	0,0270	0,0722	2,3054

**Abb. 30** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*mcA/cE*), *mcA-DeltaI-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*DeltaI/cE*), *mcA-DeltaII-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*mcA-DeltaII/cE*), *mcA-DeltaIII-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*mcA-DeltaIII/cE*), *mcA-DeltaIV-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*mcA-DeltaIV/cE*), *mcA-DeltaV-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*mcA-DeltaV/cE*), *mcA-DeltaVI-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*mcA-DeltaVI/cE*) und *mcA-DeltaVII-bgaH/cE<sup>ex</sup>* (*mcA-DeltaVII/cE*). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen den *bgaH*-Leserahmen in *pWL102* unter der Kontrolle des *mcA*-Promotors oder der mutierten *mcA*-Promotoren (*mcA-DeltaI*, *mcA-DeltaII*, *mcA-DeltaIII*, *mcA-DeltaIV*, *mcA-DeltaV*, *mcA-DeltaVI* bzw. *mcA-DeltaVII*), und sie enthalten noch zusätzlich den *c-gvpE*-Leserahmen (*cE<sup>ex</sup>*) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor *pJAS35*. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Ausgehend von den Transformanten ohne cGvpE können die Ergebnisse der Transformanten mcA-DeltaV-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>, mcA-DeltaVI-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und mcA-DeltaVII-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> nicht ausgewertet werden, da hier keine basalen Aktivitäten am mcA-Promotor vorlagen. Es ist aber auffällig, dass diese mutierten mcA-Promotoren DeltaV bis und DeltaVII durch cGvpE leicht aktivierbar waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierbarkeit der mcA-Promotoren mit den Mutationen DeltaI bis IV durch cGvpE extrem herabgesetzt war, die Aktivierbarkeit der mcA-Promotoren mit den Mutationen DeltaV und DeltaVI stark verringert war, und der mcA-Promotor mit der Mutation DeltaVII voll aktivierbar war. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die GvpE-Bindestelle im Bereich der 42 nt langen Sequenz von DeltaI bis DeltaVI liegt (Abb.28). Die 28 nt lange Sequenz von DeltaI bis DeltaIV scheint aber deutlich wichtiger zu sein. Je näher die Deletionen am BRE-Element liegen, desto schlechter wurde die Aktivierbarkeit des mcA-Promotors. Dies äußert sich insbesondere bei der Mutation DeltaI und DeltaII. Hier sind die sieben Nukleotide direkt vor dem BRE-Element deletiert (DeltaII) bzw. das BRE-Element selbst ist deletiert (DeltaI) (Abb.28). Wie schon die vorangegangenen Untersuchungen am cA-Promotor und an dem chimären pA-cA-Promotor zeigten, ist das BRE-Element wichtig für die GvpE-vermittelte Aktivierung der A-Promotoren.

#### **f) Substitutionsmutagenese im mcA-Promotor**

Als weitere Mutagenesemethode wurden innerhalb einer 34 nt langen Sequenz im mcA-Promotor Basen ausgetauscht (Abb. 31). Die Mutagenese wurde so durchgeführt, dass in der entsprechenden Position die Base so ausgetauscht wurde, dass nicht nur keine Übereinstimmung mit der mcA-Promotorsequenz, sondern auch keine Übereinstimmung mit den Sequenzen des pA- und des cA-Promotors entstand. Es wurde ebenfalls darauf geachtet, dass ein Purin durch ein Pyrimidin bzw. ein Pyrimidin durch ein Purin ersetzt wurde. Die Mutationen begannen stromauf des BRE-Elements am mc-*gvpA*-Promotor. Hierzu wurden zunächst die Sequenzen der drei Promotoren mcA, cA und pA untereinander geschrieben und dabei am Transkriptionsstart bzw. an der TATA-Box aliniert (Abb. 31). Die auszutauschenden Bereiche wurden in einem vierer Raster mutiert, wobei die Mutationen jeweils mit einem Nukleotid rechts und links überlappten.

**A.**

	BRE	TATA
		<u>RNWAAWN</u> <b>YTTAWG</b>
mcA	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAAC <u>CAAC</u> <b>ACGAATGATTTTGT</b>	
cA	TCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <u>ACGGCG</u> <b>GTTTTTCC</b>	
pA	AGTACGACTCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAACCAT <u>ACACATCC</u> <b>TTATGT</b>	

**B.**

mcA-M1	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAAC <u>attg</u> <b>ACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M2	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTG <u>ctga</u> <b>AAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M3	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTG <u>agtc</u> <b>ACCAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M4	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGG <u>gata</u> <b>TGAACCAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M5	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAA <u>acca</u> <b>TGCTGAACCAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M6	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTG <u>ctca</u> <b>GGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M7	TGTTTGACTCATTACGAGAG <u>gtca</u> <b>ACCGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M8	TGTTTGACTCATTACG <u>actct</u> <b>TGAAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M9	TGTTTGACTCATT <u>aacc</u> <b>AGGTGAAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M10	TGTTTGACTCA <u>caga</u> <b>GAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTGT</b>
mcA-M11	TGTTTGAC <u>gagc</u> <b>TACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTGT</b>

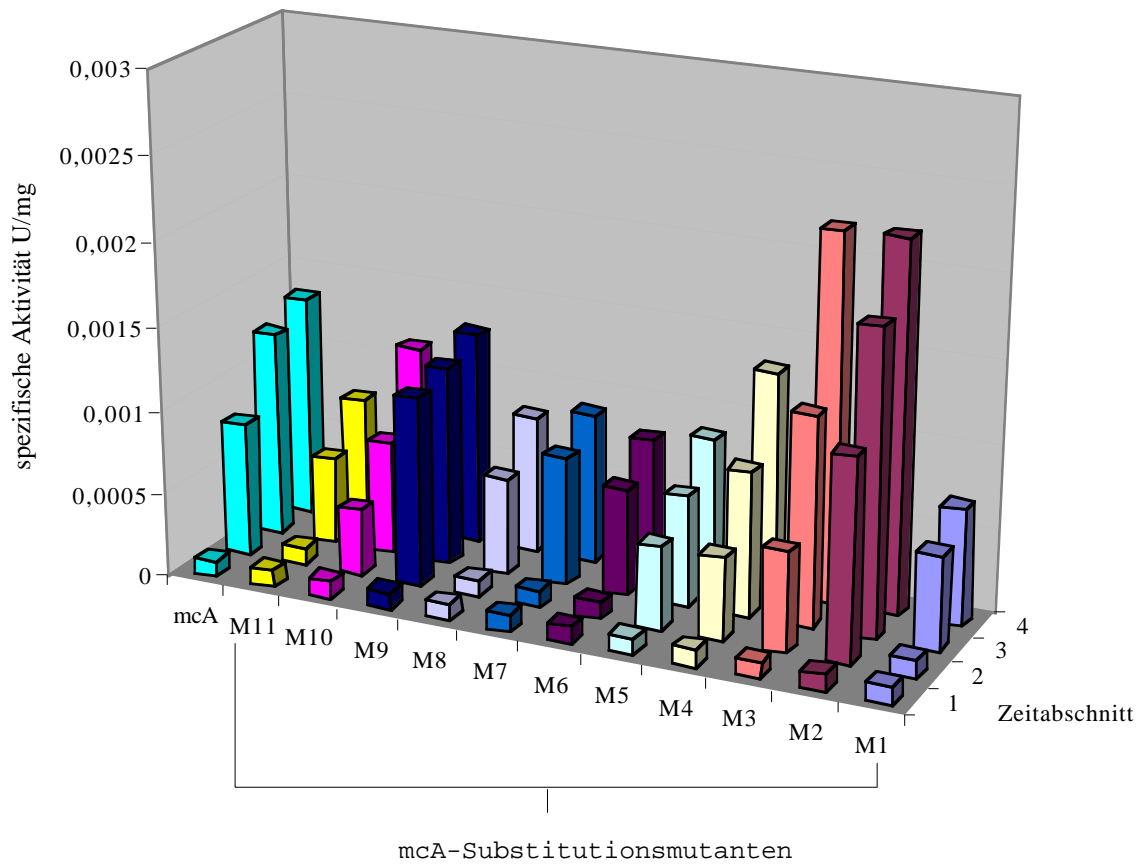
**Abb. 31 A.** Sequenzen der drei *gvpA*-Promotoren und **B.** die Sequenzen der mcA-Promotormutanten M1 bis M11. Die Bezeichnungen mcA, cA und pA stehen für die Sequenzen der Wildtyp-Promotoren. Die verschiedenen Mutanten sind mit mcA-M1 bis M11 bezeichnet. Die ausgetauschten Nukleotide sind in kleinen roten Buchstaben gekennzeichnet. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements, als auch die der TATA-Box sind oben angegeben (R = A oder G; N = A,C,G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz des BRE-Elements sind in blau gezeigt, und Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz der TATA-Box sind in fett hervorgehoben. Die palindromische Sequenz ist unterstrichen.

Diese mcA-Mutanten M1 bis M11 wurden über *in-vitro*-Mutagenese-PCR hergestellt. Die DNA-Sequenzanalyse zeigte, dass die Promotormutanten die gewünschten Sequenzen hatten. Die elf mutierten mcA-Promotoren wurden mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert, in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert, und *Hf. volcanii* wurde damit transformiert. Es wurden sowohl Transformanten mit den mcA-M(1 bis 11)-*bgaH*-Konstrukten als auch Transformanten, die zusätzlich noch das mcE<sup>ex</sup>-Konstrukt enthielten, hergestellt.

Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit Hilfe des ONPG-Tests bestimmt. Die Analyse erbrachte, dass sich die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der 11 Transformanten mit den Einzelkonstrukten mcA-M(1 bis 11)-*bgaH* kaum von der Aktivität der Wildtyptransformante mcA-*bgaH* unterschied (Abb. 32). Keine der Mutationen hatte demnach eine gravierende Auswirkung auf die basale Aktivität des mcA-Promotors. Dadurch

eigneten sich alle 11 mutierten *mcA*-Promotoren, um ihre Aktivierbarkeit durch *mcGvpE* zu untersuchen.

### basale Aktivität der *mcA*-Substitutionsmutanten

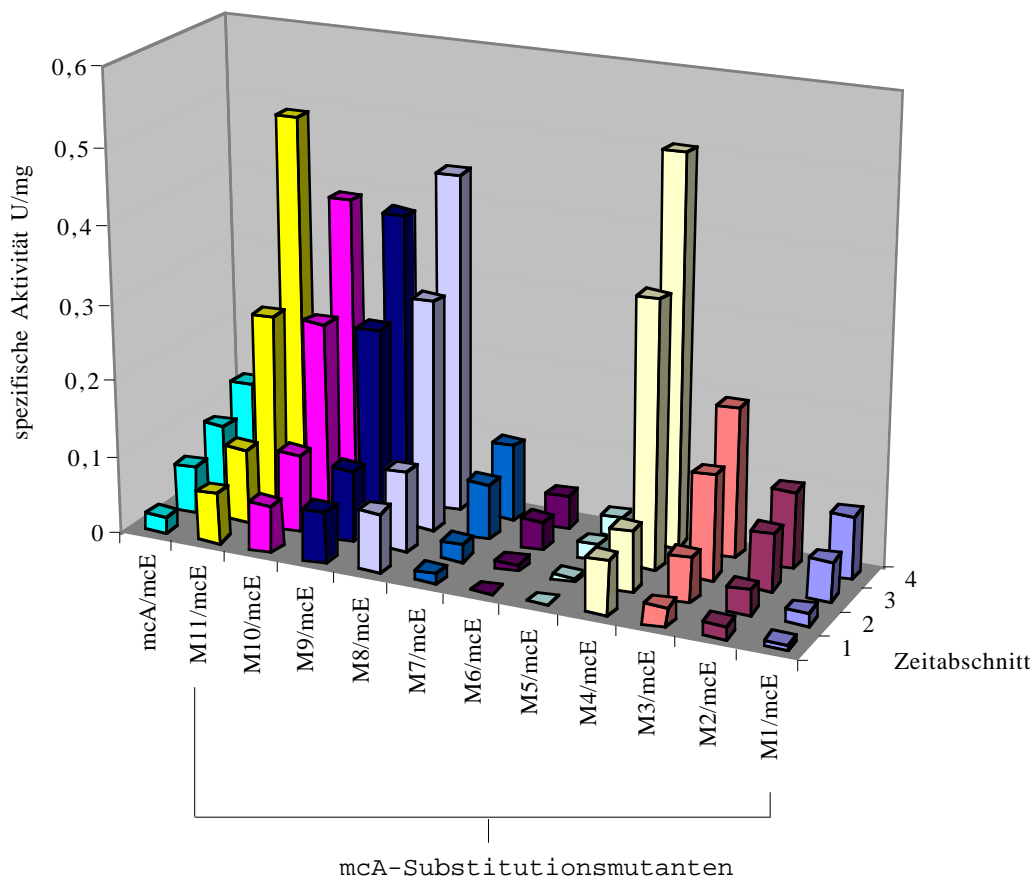


	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]											
Zeit [h]	mcA	M11	M10	M9	M8	M7	M6	M5	M4	M3	M2	M1
1 (20-40)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,0008	0,0001	0,0004	0,0011	0,0001	0,0001	0,0001	0,0005	0,0005	0,0006	0,0012	0,0001
3 (66-90)	0,0012	0,0005	0,0007	0,0012	0,0006	0,0008	0,0006	0,0007	0,0009	0,0013	0,0018	0,0006
4 (91-120)	0,0013	0,0008	0,0011	0,0013	0,0008	0,0009	0,0008	0,0009	0,0013	0,0022	0,0022	0,0007

**Abb. 32** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *mcA-bgaH* (*mcA*), *mcA-M1-bgaH* (*M1*), *mcA-M2-bgaH* (*M2*), *mcA-M3-bgaH* (*M3*), *mcA-M4-bgaH* (*M4*), *mcA-M5-bgaH* (*M5*), *mcA-M6-bgaH* (*M6*), *mcA-M7-bgaH* (*M7*), *mcA-M8-bgaH* (*M8*), *mcA-M9-bgaH* (*M9*), *mcA-M10-bgaH* (*M10*) und *mcA-M11-bgaH* (*M11*). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen den *bgaH*-Leserahmen in *pWL102* unter der Kontrolle des *mcA*-Promotors oder der mutierten *mcA*-Promotoren (*mcA-M1*, *mcA-M2*, *mcA-M3*, *mcA-M4*, *mcA-M5*, *mcA-M6*, *mcA-M7*, *mcA-M8*, *mcA-M9*, *mcA-M10* bzw. *mcA-M11*). Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Bei zwei der elf Transformanten mit beiden Konstrukten (*mcA-M5-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* und *mcA-M6-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*) war im Vergleich zu der Wildtyptransformante *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* eine deutliche Erniedrigung der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten zu erkennen (Abb. 33).

### Aktivität mit *mcGvpE* der *mcA*-Substitutionsmutanten



	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]											
Zeit [h]	mcA/ mcE	M11/ mcE	M10/ mcE	M9/ mcE	M8/ mcE	M7/ mcE	M6/ mcE	M5/ mcE	M4/ mcE	M3/ mcE	M2/ mcE	M1/ mcE
1 (20-40)	0,0216	0,0647	0,0616	0,0673	0,0782	0,0135	0,0001	0,0001	0,0708	0,0249	0,0161	0,0069
2 (41-65)	0,0618	0,0974	0,1026	0,0944	0,1038	0,0226	0,0098	0,0046	0,0799	0,0587	0,0319	0,0167
3 (66-90)	0,0918	0,2497	0,2515	0,2536	0,3023	0,0744	0,0374	0,0205	0,3481	0,1374	0,0743	0,0525
4 (91-120)	0,1244	0,4921	0,3917	0,3816	0,4433	0,0983	0,0434	0,0271	0,5089	0,1968	0,1006	0,0822

**Abb. 33** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*mcA/mcE*), *mcA-M1-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M1/mcE*), *mcA-M2-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M2/mcE*), *mcA-M3-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M3/mcE*), *mcA-M4-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M4/mcE*), *mcA-M5-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M5/mcE*), *mcA-M6-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M6/mcE*), *mcA-M7-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M7/mcE*), *mcA-M8-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M8/mcE*), *mcA-M9-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M9/mcE*), *mcA-M10-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M10/mcE*) und *mcA-M11-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (*M11/mcE*). Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen den *bgaH*-Leserahmen in pWL102 unter der Kontrolle des *mcA*-Promotors oder der mutierten *mcA*-Promotoren (*mcA-M1*, *mcA-M2*, *mcA-M3*, *mcA-M4*, *mcA-M5*, *mcA-M6*, *mcA-M7*, *mcA-M8*, *mcA-M9*, *mcA-M10* bzw. *mcA-M11*), und sie enthalten noch zusätzlich den *mc-gvpE*-Leserahmen (*mcE<sup>ex</sup>*) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Bei den drei Transformanten *mcA-M1-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*, *mcA-M2-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* und *mcA-M7-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* war im Vergleich zu der Wildtyptransformante *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* eine leichte Erniedrigung der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität festzustellen. Während die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformante *mcA-M3-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* vergleichbar mit der Aktivität *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*-Transformante waren, waren die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der restlichen fünf Transformanten (*mcA-M4-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*, *mcA-M8-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*, *mcA-M9-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*, *mcA-M10-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* und *mcA-M11-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*) deutlich erhöht.

Da die Aktivierbarkeit der beiden *mcA*-Promotormutanten *mcA-M5* und *mcA-M6* im Vergleich zum Wildtyp-Promotor deutlich erniedrigt war, könnten diese Sequenzen wichtig für die *mcGvpE*-Bindung sein. Auch die Tatsache, dass diese beiden Mutationen direkt nebeneinander liegen, sogar überlappen, sprach dafür, dass dieser Sequenzbereich besonders wichtig für die Aktivierung durch *GvpE* ist (Abb. 31). Dies muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass die *GvpE*-Bindestelle innerhalb dieser sieben Nukleotide liegt. Auch die Aktivitätserhöhung bei den fünf mutierten *mcA*-Promotoren (*M4*, *M8*, *M9*, *M10* und *M11*) bedeutet nicht automatisch, dass diese Mutanten eine bessere Bindestelle für *GvpE* haben.

Beim Betrachten der Resultate der Mutanten fiel auf, dass bei einigen Transformanten, die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität höher lag als bei der Wildtyptransformante *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*. Die Werte der Wildtyptransformante *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* wurden allerdings in einer anderen Versuchsreihe ermittelt. Diese Kontrolle hätte unter den Bedingungen dieser Versuchsreihe nochmals mitgemessen werden müssen. Betrachtet man die Ergebnisse der Substitutionsmutanten davon getrennt, fällt auf, dass bei den Transformanten *mcA-M1*, *M2*, *M3-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* mit Mutationen im Bereich der rechten Palindromhälfte, sowie bei den Transformanten *mcA-M5*, *M6*, *M7-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* mit Mutationen im Bereich stromauf der linken Palindromhälfte die Aktivierbarkeit durch *mcGvpE* reduziert war. Im Gegensatz dazu hatten die Nukleotidaustausche in der linken Palindromhälfte bei Transformante *mcA-M4-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* keine Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit durch *mcGvpE*. Die linke Palindromhälfte wäre demnach nicht so wichtig. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Sequenz der rechten Palindromhälfte, die ja direkt stromauf vom BRE-Element liegt, und die Sequenz zwischen den beiden Palindromhälften wichtig für die *GvpE*-vermittelte Aktivierung sein könnten. Dieser Bereich wurde auch schon durch die Deletionsanalysen als wichtig für die *GvpE*-Aktivierung eingestuft. Diese Mutationen, welche die Aktivierung durch *GvpE* beeinflussen, lagen alle in dem Bereich der 28 nt, die durch die Deletionsanalysen als wichtig für die *GvpE*-Aktivierung eingestuft wurden.

Die weiteren Transformanten mcA-M8-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> bis mcA-M11-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> mit Mutationen weiter genaufwärts zeigten dagegen keine Beeinflussung der Aktivierung durch GvpE.

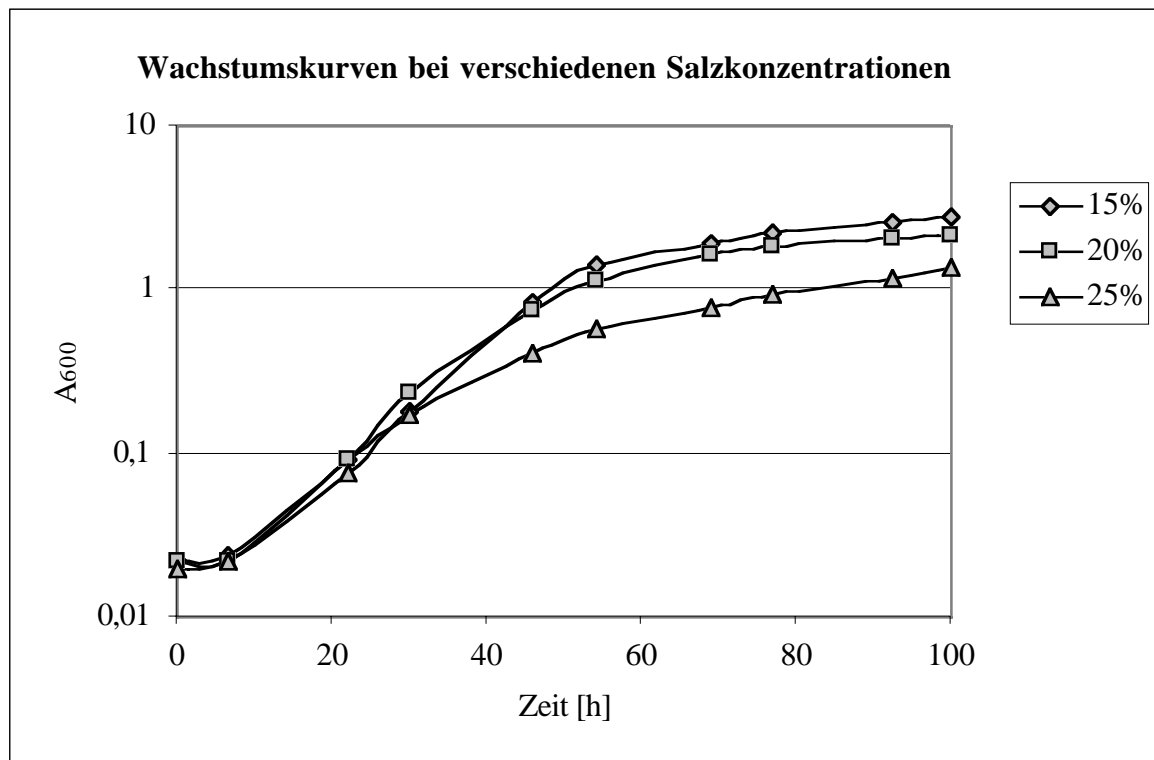
Zusammenfassend ist zu sagen, dass das BRE-Element sowie die 20 nt genaufwärts davon wichtig für Aktivierung durch GvpE sind.

## 5) Untersuchungen zur salzabhängigen Genregulation

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die Gasvesikelbildung bei *Haloferax mediterranei* durch die Salzkonzentration reguliert ist. Der moderat halophile *Hf. mediterranei* wächst bei einer Salzkonzentration von 12 bis 30%, bildet aber Gasvesikel erst ab einer Konzentration von 17% im Medium (Rodriguez-Valera, 1993, Englert et al., 1990). Die Salze setzen sich dabei aus ca. 66% NaCl, 31% KCl und 3% MgSO<sub>4</sub> zusammen. Das extrem halophile Archaeon *Halobacterium salinarum* wächst dagegen bei 20% bis 30% Salz (Grant & Larsen, 1989). Ob die Salzkonzentration bei *Halobacterium salinarum* einen Einfluss auf die Gasvesikelbildung hat war bis dato unbekannt.

In dieser Arbeit wurde deshalb mit Hilfe des *bgaH*-Reportergens untersucht, ob sich verschiedene NaCl-Konzentrationen im Medium auf die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in *Hf. volcanii*-Transformanten mit den *A-bgaH*-Konstrukten, welche den mcA- oder den pA-Promotor bzw. zusätzlich das mcGvpE- oder das pGvpE-Protein enthielten, auswirken. Die *A-bgaH*- bzw. *A-bgaH*/E<sup>ex</sup>-Transformanten wurden in *Haloferax volcanii*-Vollmedium angezogen, die 12%-, 15%-, 20%- oder 25%-Salz enthielten. In den Medien wurden nur die NaCl-Konzentration variiert.

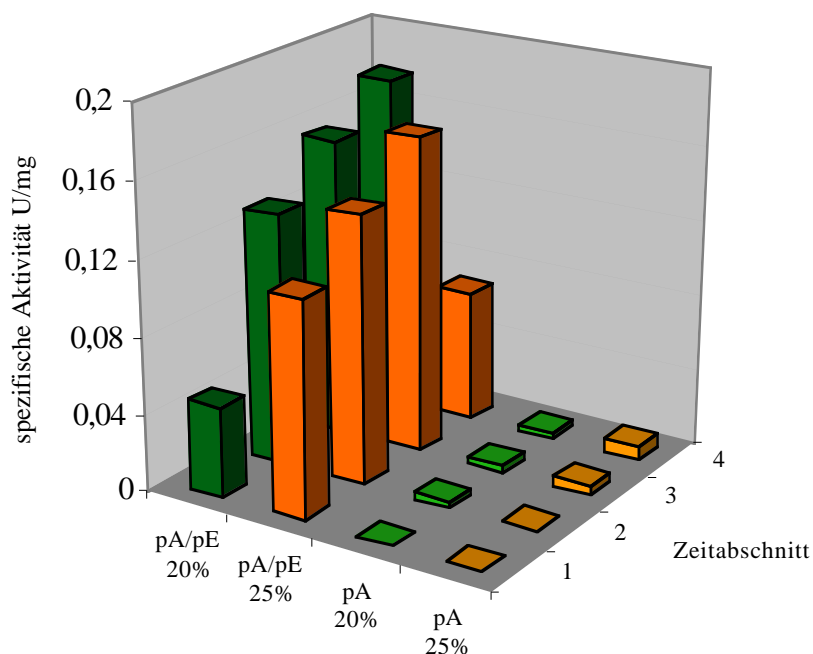
Bei 12% Salz im Medium zeigte keine der *Hf. volcanii*-Transformanten Wachstum (keine Abbildung). Dies zeigt dass diese Salzkonzentration für *Hf. volcanii* WFD11 zu niedrig ist, obwohl beschrieben wurde, dass *Hf. volcanii* in der Lage ist bei NaCl-Konzentration von 8% bis zur Sättigung zu wachsen (Mullakhanbhai & Larsen, 1975 ). Bei den anderen Salzkonzentrationen zeigten die *Hf. volcanii*-Transformanten mcA-*bgaH*, mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup>, pA-*bgaH* und pA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> einen normalen Wachstumsverlauf. In Abb.34 sind exemplarisch drei Wachstumskurven der mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup>-Transformanten in 15%-, 20%- bzw. 25%-Salzmedium gezeigt. Bei 25% Salz wuchsen die Transformanten etwas langsamer.



**Abb. 34** Wachstumskurven der *mcA-bgaH*-Transformanten in 15%-, 20%- bzw. 25% Salzmedium.

Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden mit Hilfe des ONPG-Tests bestimmt. Die Analyse erbrachte, dass bei den *pA-bgaH*- und *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*-Transformanten, die bei 15% Salz im Medium gewachsen waren, zu keiner Zeit  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar war (Abb.35). Abb.35 zeigt die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *pA-bgaH*- und *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>* bei den verschiedenen Salzkonzentrationen im Medium. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten, die bei den *pA-bgaH*-Transformanten mit 20 und 25% Salz im Medium gemessen wurden, unterschieden sich kaum voneinander. Bei 25% Salz war die Aktivität in der stationären Wachstumsphase etwas höher als bei 20% (Abb.35). Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *pA-bgaH/pE<sup>ex</sup>*-Transformanten waren bei 20 und 25% Salz ebenfalls miteinander vergleichbar. Hier war nur auffällig, dass die Aktivität bei 25% Salz schon in der exponentiellen Wachstumsphase höher ist als bei 20%, wohingegen es sich in der spät stationären Wachstumsphase umgekehrt verhält. Der *pA*-Promotor zeigte eine Abhängigkeit der Aktivität von der Salzkonzentration, bei welcher der Promotor bei 20 und 25% Salz aktiv war, bei 15% Salz jedoch keine Aktivität zeigte. Dabei scheint die Aktivität des Promotors von einer Mindestkonzentration an Salz abzuhängen, eine Feinregulation zwischen 20 und 25% Salz gab es nicht.

### Salzabhängigkeit pA-Promotor



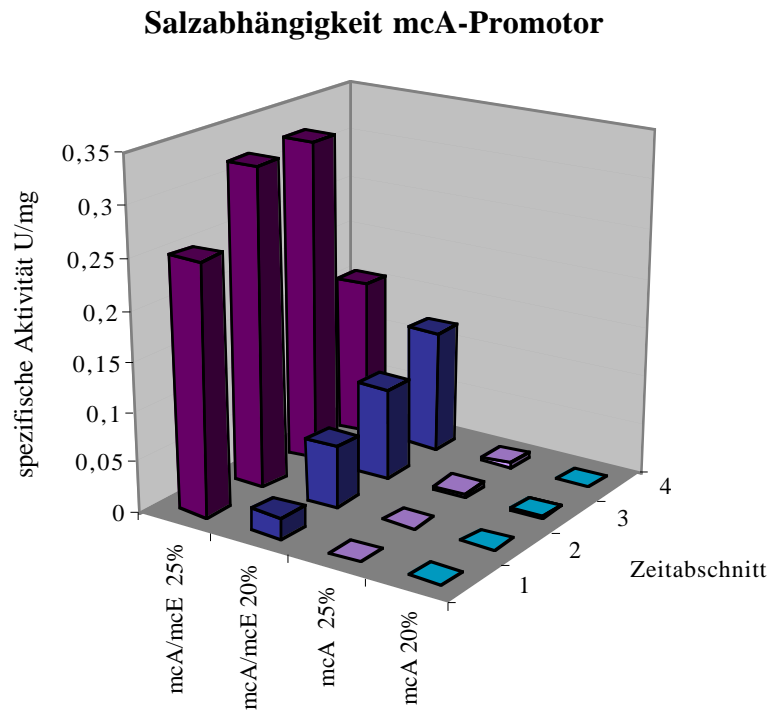
Zeit [h]	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]					
	pA- <i>bgaH</i> /pE <sup>ex</sup> 15%	pA- <i>bgaH</i> /pE <sup>ex</sup> 20%	pA- <i>bgaH</i> /pE <sup>ex</sup> 25%	pA- <i>bgaH</i> 15%	pA- <i>bgaH</i> 20%	pA- <i>bgaH</i> 25%
1 (20-40)	0,0001	0,0474	0,1136	0,0001	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,0001	0,1323	0,1412	0,0001	0,0030	0,0010
3 (66-90)	0,0001	0,1569	0,1669	0,0001	0,0034	0,0051
4 (91-120)	0,0001	0,1773	0,0700	0,0001	0,0032	0,0081

**Abb. 35** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten pA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> 15% (pA/pE 15%), pA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> 20% (pA/pE 20%), pA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> 25% (pA/pE 25%), pA-*bgaH* 15% (pA 15%) pA-*bgaH*, 20% (pA 20%) und pA-*bgaH* 25% (pA 25%). Die Transformanten wurden bei 15%, 20% bzw. bei 25% Salz angezogen. Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen das pA-*bgaH*-Gen in pWL102, oder sie enthalten noch zusätzlich den p-*gvpE*-Leserahmen (pE<sup>ex</sup>) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Bei den Transformanten mcA-*bgaH* und mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> war in der 15% Salzkultur ebenfalls keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar. (Abb. 36). Die gemittelten spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten mcA-*bgaH*-, mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> in Abb.36 aufgeführt. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die für die mcA-*bgaH*-Transformante aus 25%-Salzmedium ermittelt wurde, war etwa 3,5-fach höher als die, welche für die Transformante aus 20%-Salzmedium gemessen wurde. Allerdings zeigte die Transformante

*mcA-bgaH* bei 25%- erst in der stationären Wachstumsphase (Zeitabschnitte 3 und 4) eine höhere Aktivität als die gleiche Transformante bei 20%-Salzmedium.

Mit *mcGvpE* als Aktivator wurde bei der *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*-Transformante bei 25% eine ca. 3,5-fach höhere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen als bei dieser Transformante bei 20%-Salzmedium (Abb. 36).



	gemittelte spezifische Aktivität [U/mg]					
Zeit [h]	<i>mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup></i> 25%	<i>mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup></i> 20%	<i>mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup></i> 15%	<i>mcA-bgaH</i> 25%	<i>mcA-bgaH</i> 20%	<i>mcA-bgaH</i> 15%
1 (20-40)	0,2527	0,0216	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
2 (41-65)	0,3224	0,0618	0,0001	0,0001	0,0008	0,0001
3 (66-90)	0,3267	0,0918	0,0001	0,0037	0,0012	0,0001
4 (91-120)	0,1599	0,1244	0,0001	0,0047	0,0013	0,0001

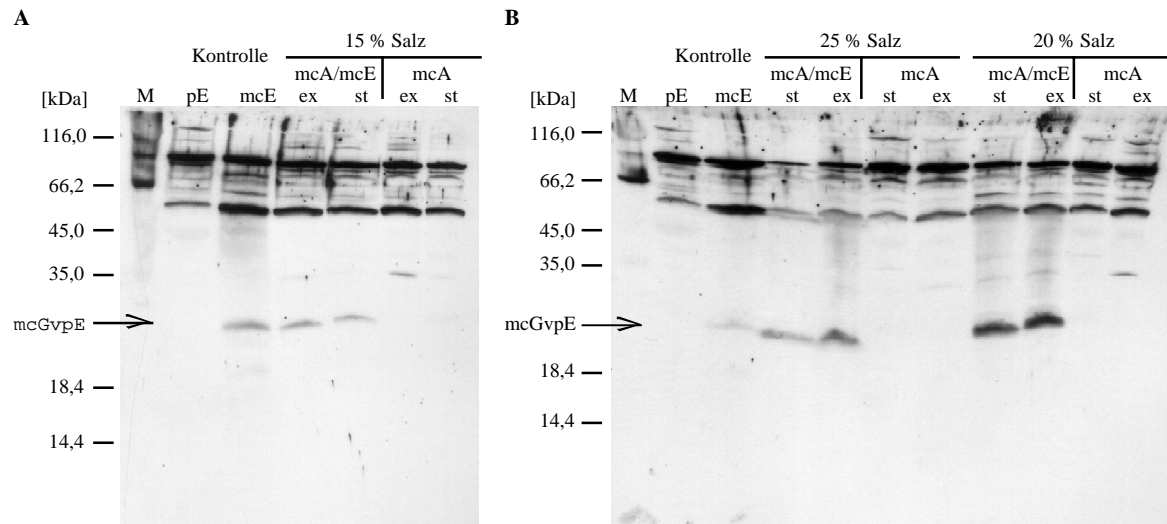
**Abb. 36** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* 25% (*mcA/mcE* 25%), *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* 20% (*mcA/mcE* 20%), *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* 15% (*mcA/mcE* 15%), *mcA-bgaH* 25% (*mcA* 25%), *mcA-bgaH* 20% (*mcA* 20%) und *mcA-bgaH* 15% (*mcA* 15%). Die Transformanten wurden bei 15%, 20% bzw. bei 25% Salz angezogen. Die Säulen repräsentieren die gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Transformanten in den Zeitabschnitten 1 (20-40 h), 2 (41-65 h), 3 (66-90 h) und 4 (91-120 h) in der Wachstumsphase. Die Transformanten besitzen das *mcA-bgaH*-Gen in *pWL102*, oder sie enthalten noch zusätzlich den *mc-gvpE*-Leserahmen (*mcE<sup>ex</sup>*) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor *pJAS35*. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde mit dem ONPG-Test bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben. Werte von 0,0001 entsprechen einer nicht messbaren Aktivität.

Insgesamt lässt sich sagen, dass bei 15% Salz keine Aktivität am mcA-Promotor ermittelt werden konnte. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Daten zur Expression der mc-vac-Region in *Hf. mediterranei* überein (Rodriguez-Valera, 1993, Englert et al., 1990). Es lässt sich ebenfalls feststellen, dass die Transformanten bei Wachstum in Medium mit 25% Salz höhere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten erreichten als in Medium mit 20% Salz. Hier war also nicht nur eine Mindestsalzkonzentration nötig, sondern auch eine Feinregulation des Promotors durch steigende Salzkonzentration messbar.

Um zu klären, ob die Salzkonzentration Auswirkungen auf die Bildung oder die Funktion von GvpE hat, und dadurch die fehlende mcA-Promotoraktivität bei 15%-Salzmedium erklärt werden kann, wurden Western-Analysen durchgeführt, um das mcGvpE in den Transformanten nachzuweisen. Diese Analyse ist für pGvpE nicht möglich, da bisher kein Antiserum gegen dieses Protein vorhanden ist und das Anti-mcGvpE-Serum nicht mit dem pGvpE-Protein reagiert. Dies wurde in der Westernanalyse ebenfalls bestätigt (pE in Abb.37). Abb. 37 zeigt das Ergebnis der Westernanalyse mit dem Anti-mcGvpE-Serum. Es wurden Proben aus der exponentiellen (ex) und der stationären (st) Wachstumsphase der Transformanten mcA-*bgaH* und mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> entnommen, die bei 15%, 20% bzw. 25% Salz angezogen wurden. Zellfreie Extrakte wurden hergestellt und zusammen mit den Kontrollen pE<sup>ex</sup> und mcE<sup>ex</sup> mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Kontrollen enthielten Rohextrakte von Transformanten, die p-*gvpE*- bzw. mc-*gvpE* überexprimierten.

Die Western-Analyse erbrachte, dass bei allen Negativkontrollen, die kein mc-*gvpE*-Gen enthielten, auch kein mcGvpE-Protein nachweisbar war (mcA15%, mcA20% und mcA25%) (Abb. 37). Bei allen Transformanten mit dem mcE<sup>ex</sup>-Konstrukt ist dagegen mcGvpE in etwa gleicher Menge als eine Bande bei 21,7 kD zu erkennen. Die Expression am *fdx*-Promotor scheint also sowohl in 15%- als auch bei 20%- und 25%-Salzmedium zur GvpE-Bildung in etwa gleicher Menge zu führen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der mcA- und pA-Promotor bei 15%-Salzmedium keine Aktivität zeigen, während der mcA-Promotor noch eine leichte Regulation bei Konzentrationsunterschieden von 20%- zu 25%-Salzmedium zeigt. Im Gegensatz dazu ist der *fdx*-Promotor bei allen drei untersuchten Salzkonzentrationen gleich aktiv.



**Abb. 37** Western-Analyse zum Nachweis des mcGvpE-Proteins in den *mcA-bgaH* (mcA)- und *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* (mcA/mcE)-Transformanten, die bei 15%, 20% bzw. 25% NaCl im Medium gewachsen waren. Zellfreie Extrakte aus der exponentiellen (ex) und der stationären (st) Wachstumsphase der Transformanten sowie zwei Kontrollen pE und mcE, bei denen das *p-gvpE*-Gen bzw. das *mc-gvpE*-Gen überexprimiert wurden, wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte mit Anti-mcGvpE-Serum.

## DISKUSSION

In dieser Arbeit sollte die Verwendung des halobakteriellen *bgaH*-Gens als Reportergen für weitere Untersuchungen von Promotoren halophiler Archaea etabliert werden. Mit Hilfe dieses Systems sollten die Aktivitäten der drei *gvpA*-Promotoren aus der p-vac- und c-vac-Region von *Halobacterium salinarum* und aus der mc-vac-Region von *Haloferax mediterranei* näher studiert werden. Der p-*gvpA*-Promotor (pA-Promotor) in *Hb. salinarum* PHH1 ist konstitutiv während der gesamten Wachstumsphase aktiv, wohingegen der c-*gvpA*-Promotor (cA-Promotor) in *Hb. salinarum* PHH4 und der mc-*gvpA*-Promotor (mcA-Promotor) in *Hf. mediterranei* für eine effiziente Transkription den Aktivator cGvpE bzw. mcGvpE benötigen und nur während der stationären Wachstumsphase aktiv sind (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996). Neben der Bestimmung der basalen Aktivität in *Hf. volcanii*-Transformanten sollte auch die Regulation studiert werden. Da sowohl der cA-Promotor als auch der mcA-Promotor reguliert sind und durch das jeweilige GvpE-Protein aktiviert werden, sollte versucht werden, mit Hilfe von Mutationen innerhalb der *gvpA*-Promotoren, die Bindestelle des Aktivators über *in-vivo*-Experimente zu ermitteln. Es existiert bisher kein *in-vitro*-Transkriptionssystem für Halobakterien, wie es beispielsweise für *Pyrococcus*, *Sulfolobus* oder *Methanococcus* vorhanden ist (Frey et al., 1990; Hüdepohl et al., 1990; Hethke et al., 1996; Darcy et al., 1999; Bell et al., 1998). Daher erfolgten bisher parallel zu den *in-vivo*-Studien keine entsprechenden Untersuchungen *in vitro*. Mit Hilfe des Transformationssystems für *Hf. volcanii* können Auswirkungen von Promotormutationen *in vivo* studiert werden. Außerdem stehen für die Transkriptionsanalysen die unterschiedlichen TBP- und TFB-Proteine in diesem *in-vivo*-System zur Verfügung und scheinen bei dem Rezipienten *Hf. volcanii* in analoger Weise wie in den Gasvesikel-bildenden Organismen *H. salinarum* und *Hf. mediterranei* zu funktionieren. Die Analysen der *gvpA*-Promotoren in *Hf. volcanii*-Transformanten mit dem *bgaH*-Reporter gen bestätigten nämlich die früheren Untersuchungen mit Northernanalysen zur Transkription an den *gvpA*-Promotoren in den Wildtypen *H. salinarum* und *Hf. mediterranei* (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Offner & Pfeifer, 1995; Offner et al., 1996). Neben der Aktivierung durch GvpE konnten auch die Motive TATA-Box und BRE-Element und ihr Beitrag zur basalen Aktivität studiert werden. Als Modellsystem dienten sowohl die A-Promotoren der vac-Region als auch der *fdx*-Promotor.

Ein weiterer Ansatzpunkt war die Untersuchung der salzabhängigen Regulation der *gvp*-Gene sowie des *fdx*-Gens.

### 1) Untersuchungen der A-Promotoren mit dem *bgaH*-Reportergen

Die drei verschiedenen *gvpA*-Promotoren pA-, cA- und mcA- wurden für vergleichende Promotorstudien verwendet. Die Fusion der A-Promotorfragmente, wurde 3 Codons innerhalb der Leserahmens durchgeführt, um Translationsprobleme zu vermeiden. Die gebildeten  $\beta$ -Galaktosidase-Proteine enthielten deshalb am N-Terminus zusätzlich fünf Aminosäuren des jeweiligen GvpA-Proteins: MAQPD von pGvpA und cGvpA und MVQPG von mcGvpA. Bei allen A-*bgaH*-Konstrukten konnten die erwarteten Mengen an mRNA nachgewiesen werden und die entsprechenden  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten waren messbar. Während bei den mcA-*bgaH*- und pA-*bgaH*-Transformanten mRNA gebildet wurde, war bei der cA-*bgaH*-Transformante dagegen keine mRNA detektierbar. Dies beweist wieder, dass der cA-Promotor keine basale Aktivität hat (Röder & Pfeifer, 1996; Krüger et al., 1998). Alle drei A-Promotoren konnten von dem homologen GvpE-Protein (mcGvpE, pGvpE und cGvpE) aktiviert werden, was bedeutet, dass sich die GvpE-Bindestelle im ca. 120 bp großen Promotorfragment der A-*bgaH*-Konstrukte befand. Die Aktivierung der verschiedenen A-*bgaH*-Konstrukte war unterschiedlich: Die basale Aktivität des mcA-*bgaH*-Konstrukt war zwar sehr gering, aber der mcA-Promotor war durch alle drei GvpE-Proteine aktivierbar. Von allen drei A-Promotoren war der mcA-Promotor am stärksten aktivierbar, nämlich bis zu etwa um das 440-fache. Im Schnitt wurde die mcA-Promotor-Aktivität durch pGvpE um das 60-fache, durch mcGvpE um das 80-fache und durch cGvpE um das 440-fache erhöht (Tabelle 2). Das bedeutet, dass das heterologe cGvpE-Protein ein 5-fach besserer Aktivator als das homologe mcGvpE-Protein war. Die basale Aktivität des pA-Promotors war unter den drei untersuchten die stärkste. Der pA-Promotor war im Schnitt 3-fach stärker als der mcA-Promotor und wurde durch alle drei GvpE-Proteine aktiviert, wobei im Schnitt die durch mcGvpE vermittelte Aktivität des pA-Promotors etwa um das 30-fache und durch cGvpE sowie durch pGvpE um das 50-fache erhöht wurde. Die Aktivierbarkeit am pA-Promotor durch cGvpE bzw. pGvpE war etwa gleich. Man sollte bei der Auswertung der Ergebnisse nicht vergessen, dass sich die  $\beta$ -Galaktosidase-Proteine, die bei der Translation dieser Konstrukte entstehen sollten, aufgrund der unterschiedlichen *gvpA*-Sequenzen durch eine Aminosäure am N-Terminus unterschieden (bei mcA-*bgaH*: MVQPD, bei pA- und cA-*bgaH*: MAQPG). Es wäre möglich, dass der Unterschied in einer Aminosäure die Enzymaktivität der

$\beta$ -Galaktosidase etwas veränderte. Die Ergebnisse der pA- und cA-*bgaH*-Konstrukte lassen sich aber miteinander vergleichen.

	<i>fdx-gvpE</i> -Konstrukt:		
A- <i>bgaH</i> -Konstrukt:	mcE <sup>ex</sup>	pE <sup>ex</sup>	cE <sup>ex</sup>
mcA	80	60	440
pA	30	50	50

**Tabelle 2.** Durchschnittliche Aktivierbarkeit der *gvpA*-Promotoren durch die GvpE-Proteine. Es wurden die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten mcA-*bgaH*, mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup>, mcA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup>, mcA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>, pA-*bgaH*, pA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup>, pA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> und pA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> bestimmt und die jeweiligen Mittelwerte gebildet. Die Aktivierbarkeit errechnet sich aus den Quotient der durch GvpE induzierten Aktivität zu der basalen Aktivität. Bei cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> ließ kein Quotient bilden, da der cA-Promotor keine basale Aktivität besitzt.

Bei dem cA-*bgaH*-Konstrukt konnte ähnlich wie bei dem c-*gvpA*-Gen keine basale Aktivität nachgewiesen werden. Der cA-Promotor konnte nur mit dem homologen cGvpE aktiviert werden, weder pGvpE noch mcGvpE wirkten als Aktivator in den entsprechenden *Hf. volcanii*-Transformanten. Die erhaltene spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität war allerdings im Vergleich zu den anderen aktivierten mcA- und pA-Promotoren sehr gering. Die fehlende Aktivierbarkeit des cA-Promotors durch die Proteine mcGvpE und pGvpE könnte auf mangelhafte Protein-DNA-Bindung zurückzuführen sein, die durch die unterschiedlichen DNA-Sequenzen oder aber durch die Unterschiede in der Aminosäuresequenz der GvpE-Proteine verursacht ist. Heterologe Komplementationsstudien mit den Genen p-*gvpDEFGHIJKLM* der p-vac-Region und den Genen c-*gvpACNO* der c-vac-Region in *Hf. volcanii*-Transformanten zeigen ebenfalls, dass mit pGvpE als Aktivator keine c-*gvpACNO*-Expression stattfindet (Offner et al., 1998). Dies könnte auch der Grund sein, warum *Halobacterium salinarum* PHH1 nur Gasvesikel mit Hilfe der p-vac-Region bildet, da pGvpE offensichtlich nicht in der Lage ist, die Expression des c-*gvpACNO*-Genclusters zu aktivieren. Das Fazit dieser Untersuchungen war, dass unter den GvpE-Proteinen, das cGvpE der stärkste Aktivator war. Von allen drei A-Promotoren hatte der pA-Promotor die höchste basale Aktivität, während der cA-Promotor basal inaktiv war. Die stärkste Aktivierung wurde am mcA-Promotor festgestellt, wohingegen der cA-Promotor die geringsten durch GvpE vermittelten Aktivitätswerte lieferte und nur durch das homologe cGvpE aktiviert wurde.

Die gebildete Menge an *bgaH*-mRNA einer mcA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante wurde mit der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität über die Wachstumsphase verglichen. Während in der exponentiellen und der frühen stationären Wachstumsphase große Mengen an *bgaH*-mRNA gebildet wurden, war in der späten stationären Wachstumsphase keine *bgaH*-mRNA mehr

detektierbar. Im Vergleich dazu stieg die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität parallel mit der Zunahme an *bgaH*-mRNA-Menge in der exponentiellen Wachstumsphase an, blieb auf dem hohen Niveau und nahm nicht deutlich ab. Dies ließ die Vermutung zu, dass die  $\beta$ -Galaktosidase ein relativ stabiles Protein ist, während die entsprechende mRNA schnell abgebaut wird. Das *bgaH*-Reportergensystem eignet sich deshalb gut, um die Aktivierbarkeit eines Promotors zu untersuchen, während eine Inaktivierung der Genexpression aufgrund der  $\beta$ -Galaktosidase-Stabilität wahrscheinlich kaum nachweisbar wäre.

## 2) Untersuchungen zur Stärke des *fdx*-Promotors

Das *fdx*-Gen kodiert für ein Ferredoxin und wurde aus *Halobacterium salinarum* isoliert (Pfeifer et al., 1993). Der jetzt schon häufig erwähnte *fdx*-Promotor wurde verwendet, um den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 zu konstruieren (Pfeifer et al., 1994; Soppa, nicht publiziert). Da dieser Vektor in dieser und in anderen Arbeiten häufig verwendet wird, sollte die Stärke des *fdx*-Promotors mit dem *bgaH*-Reportergen untersucht werden. Dazu diente auch das *bgaH*-Gen mit dem nativen Promotor (Holmes & Dyall-Smith, 2000) im Plasmid pMLH32 als Vergleich.

Bei der *fdx-bgaH*-Transformante wurde eine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit einem Maximum bei ca. 1,5 U/mg in der früh-stationären Wachstumsphase (zwischen 41 und 65 h) erreicht, die in der spät-stationären Wachstumsphase (zwischen 91 und 120 h) auf ca. 1,0 U/mg abfällt. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen zur mRNA, die zeigen, dass der *fdx*-Promotor früh in der Wachstumsphase am aktivsten ist (Pfeifer et al., 1993). Diese hier für *Hf. volcanii*-Transformanten erhaltenen Ergebnisse können nicht direkt mit Untersuchungen des *fdx*-Promotors in *Halobacterium salinarum* verglichen werden (Patenge et al., 2000). Hier wurden verschiedene Mutanten des *fdx*-Promotors mit dem *bgaH*-Reportergen untersucht, wobei der stärkste der *fdx*-Promotor-Mutanten die höchste spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der früh-exponentiellen Wachstumsphase mit einem Wert von ca. 0,02 U/mg aufwies, die in der spät-exponentiellen Wachstumsphase auf ca. 0,01 U/mg abfiel (Patenge et al., 2000). Diese Werte liegen eindeutig unter den Werten, die in dieser Arbeit mit den *fdx-bgaH-Hf. volcanii*-Transformanten gemessen wurden. Allerdings wurden unterschiedliche Wirtsstämme verwendet, die auch unterschiedliche Wachstumsbedingungen haben.

Vergleicht man die Stärke des *fdx*-Promotors in *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Stärken der *gvpA*-Promotoren in diesen Transformanten, so fällt auf, dass am *fdx*-Promotor eine

frühere und viel effizientere Transkription stattfindet. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die bei der *fdx-bgaH*-Transformante gemessen wurde, war etwa 400-fach höher bzw. über 1000-fach höher als die basale Aktivität des pA- bzw. des mcA-Promotors. Selbst die durch cGvpE induzierten Aktivitäten der A-Promotoren waren niedriger als die *fdx*-Promotoraktivität, wobei der mcA-Promotor durch den Aktivator cGvpE in der stationären Wachstumsphase fast die *fdx*-Promotoraktivität erreicht (nur 2-fach niedriger).

### 3) TATA-Box- und BRE-Element-Vergleich

Vergleicht man die Sequenzen der Promotoren mcA, cA, pA, *bgaH* und *fdx* miteinander fällt zunächst auf, dass nur die TATA-Box-Sequenz des pA-Promotors komplett mit der Konsensussequenz übereinstimmt (Abb. 38). Der *fdx*-Promotor hat eine Übereinstimmung von vier und der *bgaH*-Promotor von drei Nukleotiden. Die Konservierung der TATA-Box-Sequenz scheint also nicht allein ausschlaggebend für eine effektive Transkription zu sein. Die TATA-Box der drei konstitutiven Promotoren pA, *bgaH* und *fdx* enthält allerdings jeweils das Thymidin/Adenosin(TA)-Dinukleotid in der Mitte, das sehr wichtig für die Aktivität der archaealen Promotoren zu sein scheint (Hain et al., 1992). Den beiden regulierten Promotoren mcA und cA fehlt dagegen dieses TA-Dinukleotid. Betrachtet man die Konserviertheit des BRE-Elements (*transcription factor B recognition element*), welches von dem Transkriptionsfaktor B (TFB) erkannt wird, so fällt auf, dass das BRE-Element der Promotoren mcA, pA und *bgaH* bis auf ein Nukleotid mit der Konsensussequenz übereinstimmt, während dem *fdx*-Promotor zwei Nukleotide zur Konsensussequenz fehlen (Abb. 38). Hier scheint ähnlich wie bei der TATA-Box nicht die Konservierung alleine entscheidend für die Transkription zu sein.

	BRE    TATA
	<u>RNWAAWN</u> <b>YTTAWG</b>
mcA	CGGTGCTGAACCAAC <u>ACGAATGATTTT</u> <b>TGTTACTTGCCAACACGTTTT</b> CAGATGGGTATAACCCAGATCAATC <b>ATGG</b>
cA	CGGGGGTTGAACTCAC <u>AA</u> CGGC <b>GTTTT</b> CCGGACACTCCCTGTAGTTGCGGGTGGGTACCACCCAGATCACT <b>ATGG</b>
pA	CGACTGGTGAAACCATACACATC <b>CTTATG</b> TGATGCCCGAGTATAGTTAGAGATGGTTAATCCAGATCACCA <b>ATGG</b>
<i>bgaH</i>	CGTACGGGAGGACCCGAGTAGTGATATCAATCGGTGCTCAGACACCGGAAGAACTATATCTCACCACGTTGATCATTGTGT <b>ATGA</b>
<i>fdx</i>	GTACGCTGGCCCGAACAGCAACTACT <b>TATG</b> CGTTTCGGAAGCCGAACTCTGCAGT <b>GATGC</b>

**Abb. 38** Vergleich der Promotorregionen der Gene: *mc-gvpA* (mcA), *c-gvpA* (cA), *p-gvpA* (pA), *bgaH* und *fdx*. Der Transkriptionsstart (G oder A) ist in grün/fett bzw. durch einen grünen Pfeil und das ATG-Startcodon in rot/unterstrichen dargestellt. Die Konsensussequenzen von BRE-Element und TATA-Box sind oben angegeben (R = A oder G; N = A,C,G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Übereinstimmung mit der Konsensussequenz des BRE-Elements sind in blau dargestellt, Übereinstimmungen mit der TATA-Box in fett hervorgehoben. Die palindromische Sequenz ist unterstrichen.

Da es sich bei den Reporterkonstrukten um Fusionen mit dem *bgaH*-Leserahmen handelt, bei dem der *leader*-Bereich des *bgaH*-Gens unterschiedlich vorliegt, können auch Unterschiede in der Effizienz der Translation der entsprechenden mRNAs zu unterschiedlichen Aktivitäten führen. Eine beispielsweise höhere Effizienz der Translation des *fdx-bgaH*-Konstrukts würde dann ebenfalls zu höheren Aktivitäten beitragen. Hierbei könnten vor allem auch Shine-Dalgarno-Sequenzen eine Rolle spielen (Condò et al., 1999; Sartorius-Neef, 2000).

Da die verschiedenen Promotor-*bgaH*-Konstrukte in unterschiedlichen Plasmiden vorliegen und die Kopienzahl dieser Plasmide nicht bekannt ist, darf man nur Tendenzen aus diesen Ergebnissen herleiten.

#### 4) Untersuchungen an TATA-Box und BRE-Element der A-Promotoren

Die Untersuchungen zur spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der drei *gvpA*-Promotoren zeigten, wie schon aus vorangegangenen Studien bekannt war, dass der cA-Promotor keine basale Aktivität hatte, wohingegen der pA-Promotor eine gut messbare basale Aktivität besaß. Es wurde vermutet, dass die fehlende basale Aktivität des cA-Promotor auf die kaum konservierte TATA-Box und das ebenso wenig konservierte BRE-Element zurückzuführen ist (Abb. 38). Die basale Aktivität des pA-Promotor wäre demnach auf die gut konservierten Sequenzen TATA-Box und BRE-Element zurückzuführen.

Um die Ursachen für die fehlende basale Aktivität des cA-Promotors näher zu untersuchen, wurde versucht, herauszufinden, ob die TATA-Box und das BRE-Element dafür verantwortlich sind. Ein Nukleotidaustausch (GTTaTC) bzw. zwei Nukleotidaustausche

(GTTaTg) innerhalb der TATA-Box des cA-Promotors führten zu keiner messbaren basalen Aktivität des cA-Promotors. Allerdings war der cA-Promotor mit zwei Nukleotidaustauschen cA-TATA<sub>AG</sub> besser durch cGvpE aktivierbar als der cA-Promotor.

Des Weiteren wurde die TATA-Box und/oder das BRE-Element des cA-Promotors durch die entsprechenden Elemente des pA-Promotors ersetzt. Bei keiner der Transformanten cA-pA<sub>TATA</sub>-*bgaH*, cA-pA<sub>BRE</sub>-*bgaH* und cA-pA<sub>BRETATA</sub>-*bgaH* war aber eine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar. Das BRE-Element und die TATA-Box des pA-Promotors sind in der Umgebung des cA-Promotors demnach nicht ausreichend, um eine messbare basale Aktivität zu erreichen. Offenbar scheinen noch weitere Sequenzabschnitte dafür notwendig zu sein. Dies müsste durch gezielte Nukleotidaustausche weiter verfolgt werden. Interessanterweise waren auch die Promotorkonstrukte cA-pA<sub>TATA</sub>-*bgaH*, cA-pA<sub>BRE</sub>-*bgaH* und cA-pA<sub>BRETATA</sub>-*bgaH* besser durch cGvpE aktivierbar als das cA-*bgaH*-Konstrukt. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten dieser Transformanten waren im Durchschnitt 7- bis 9-fach höher als die Aktivität der cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Wildtyptransformante.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass das BRE-Element und die TATA-Box nicht alleine für die basale Transkription verantwortlich sondern auch an der GvpE-vermittelten Aktivierung beteiligt sind. Da das BRE-Element vom Transkriptionsfaktor B (TFB) erkannt wird, würde man eher vermuten, dass Veränderungen an der Sequenz des BRE-Elements auch die basale Transkription verändern und nicht die Aktivierung durch GvpE. Die Ergebnisse sprechen aber eindeutig für eine Verbindung zwischen dem BRE-Element und der Aktivierung durch GvpE.

## **5) Suche nach der GvpE-Bindestelle auf der DNA-Sequenz der A-Promotoren**

### **a) Aktivität eines chimären pA-cA-Promotors**

Um die DNA-Sequenzen in den *gvpA*-Promotoren zu detektieren, die für die Aktivierung durch GvpE notwendig sind, wurden die Promotoren mutiert. Es muss hier erwähnt werden, dass eine Protein-DNA-Wechselwirkung zwischen *gvpA*-Promotor und GvpE-Protein noch nicht gezeigt werden konnte. Zunächst wurde ein chimärer Promotor konstruiert, der aus folgenden Gründen aus dem pA- und dem cA-Promotor zusammengesetzt wurde: Der pA-Promotor bot sich als Untersuchungsobjekt an, da er konstitutiv aktiv ist und von den drei GvpE-Proteinen pGvpE, cGvpE und pGvpE aktiviert wird. Das bedeutet, dass es auch im pA-Promotor einen Bereich gibt, der wichtig für die GvpE-vermittelte Aktivierung ist. Der cA-

Promotor dagegen hat keine messbare basale Aktivität und eignet sich damit gut als „Nullkontrolle“. Mit Hilfe von chimären pA-cA-Konstrukten konnte deshalb untersucht werden, ob auf der Sequenz stromauf der TATA-Box die GvpE-Bindestelle liegt. Der zunächst konstruierte pA-cA-Promotor enthielt die Sequenz des cA-Promotors mit einem 21 nt langen DNA-Abschnitt stromauf der TATA-Box, der durch die entsprechende DNA-Sequenz des pA-Promotors ersetzt wurde (Abb. 39). In diesem 21 nt langen DNA-Abschnitt war das BRE-Element des pA-Promotors enthalten. Die Analyse erbrachte, dass bei der Transformante pA-cA-*bgaH* keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar war. Dies wurde erwartet, da die basale Aktivität eines Promotors vor allem von der TATA-Box abhängig ist und das Konstrukt die TATA-Box des cA-Promotors enthält. Bei den Transformanten pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>, pA-cA-*bgaH*/pE<sup>ex</sup> und pA-cA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> konnten dagegen spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen werden. Die Aktivität des chimären pA-cA-Promotors lag ziemlich genau zwischen der Aktivität des pA- und des cA-Promotors, bei Induktion durch jeweils das gleiche GvpE-Protein. Das pA-cA-*bgaH*-Konstrukt war damit nicht nur durch cGvpE, sondern auch durch mcGvpE und pGvpE aktivierbar. Damit ließ sich der pA-cA-Promotor ähnlich wie der pA-Promotor durch alle drei GvpE-Proteine aktivieren. Damit sollte die 21 nt lange pA-Promotor-Sequenz zumindest teilweise die GvpE Bindestelle enthalten.

		BRE TATA	
		RNWAAWNYTTAWG	
pA	ACTTAGAAGTACGACTCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAACCATACACATCCTTATG		
cA	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCACAAACGGCGGTTTTTC		(++)
pA-cA	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGactGgTGAaAcCAtAca <sup>c</sup> atcGTTTTTC		(+++)
pA-cA+5u	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGtAACGactGgTGAaAcCAtAca <sup>c</sup> atcGTTTTTC		(+++)
pA-cA+10u	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGaGaCaTAACGactGgTGAaAcCAtAca <sup>c</sup> atcGTTTTTC		(+++)
pA-cA-5u	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAAaAcCAtAca <sup>c</sup> atcGTTTTTC		(+++)
pA-cA-10u	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACcCAtAca <sup>c</sup> atcGTTTTTC		(+++)
pA-cA-5d	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGactGgTGAaAcCAtAc <sup>c</sup> CGGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(++)
pA-cA-10d	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGactGgTGAaAcCACAA <sup>c</sup> CGGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(++)
cA-TATA.A	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCACAA <sup>c</sup> CGGC <sup>c</sup> GTTaTc		(+)
cA-TATA.AG	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCACAA <sup>c</sup> CGGC <sup>c</sup> GTTaTg		(+)
cA-pA-TATA	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCACAA <sup>c</sup> CGGC <sup>c</sup> GTTaTg		(++)
cA-pA-BRE	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <sup>c</sup> Aca <sup>c</sup> atcGTTTTTC		(++)
cA-pA-BRETATA	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCAC <sup>c</sup> Aca <sup>c</sup> atc <sup>c</sup> TTaTg		(++)
cA-ΔACT	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGA...CACAA <sup>c</sup> CGGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)
cA-Mut1	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGaTTGgACTCa <sup>c</sup> Ag <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(++)
cA-Mut2	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGgACTtAg <sup>c</sup> Ag <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(+)
cA-Mut3	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGaTca <sup>c</sup> ACTtAg <sup>c</sup> Ag <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(+)
cA-Mut4	Ga <sup>c</sup> ACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGcTAg <sup>c</sup> ACTCa <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(+)
cA-Mut5	GTACAAATCAGCGAA <sup>c</sup> CTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGAACTCa <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(+)
cA-Mut6	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGtCg <sup>c</sup> ACTtAg <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)
cA-Mut7	GTACAAATC <sup>c</sup> GCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTGg <sup>c</sup> ACTtAg <sup>c</sup> Ag <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)
cA-Mut8	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCG <sup>c</sup> GAAACGGGGGcTaaACTtAg <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)
cA-Mut9	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGaTcG <sup>c</sup> ACgtAg <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)
cA-Mut10	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGcTg <sup>c</sup> ACTtAg <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)
cA-Mut11	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGTTG <sup>c</sup> ACTtAg <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)
cA-Mut12	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGcTg <sup>c</sup> ACTtAg <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)
cA-Mut13	GTACAAATCAGCGAACTATTACGAGCGCCGAAACGGGGGcTg <sup>c</sup> ACTtAg <sup>c</sup> g <sup>c</sup> GGC <sup>c</sup> GTTTTTC		(-)

**Abb. 39** Sequenzen der pA- und cA-Promotoren sowie ihrer Mutanten. Mutationen sind durch kleine Buchstaben hervorgehoben. Hinter den Sequenzen ist die Aktivierbarkeit immer im Bezug auf den Wildtyp angegeben, wobei (++) gut aktivierbar wie WT bedeutet; (+) schwach aktivierbar; (-) nicht aktivierbar; (+++) besser aktivierbar als cA-Promotor. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements, als auch die der TATA-Box sind oberhalb der Promotor-Sequenzen angegeben (R = A oder G, N = A, C, G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Sequenzen, die unwichtig für die Aktivierbarkeit erscheinen, sind in olivgrün und die vermutlich wichtigen in gelb unterlegt.

Die Aktivitäten des chimären pA-cA-Promotors unterstreichen die Ergebnisse der TATA-Box- und BRE-Mutanten. Auch hier konnte keine basale Aktivität des cA-Promotors durch Austausch seines BRE-Elements, seiner TATA-Box oder von beiden gegen die entsprechenden Sequenzen des pA-Promotors erreicht werden. Die Aktivierbarkeit der mutierten Promotoren durch cGvpE konnte allerdings ebenfalls durch die Substitutionen verbessert werden.

Es wurde weiterhin untersucht, ob die Aktivität des pA-cA-Promotors durch „Zufügen“ von pA-Nukleotiden erhöht- bzw. durch Ersatz mit cA-Nukleotiden erniedrigt wird. Zu diesem Zweck wurden einmal fünf und einmal 10 Nukleotide der c-gvpA-Sequenz durch Nukleotide der p-gvpA-Sequenz stromauf der 21 nt langen pA-Sequenz ersetzt. Zum anderen wurden 5

bzw. 10 Nukleotide des pA-Promotorbereichs in pA-cA wieder durch die entsprechenden Nukleotide des cA-Promotors ersetzt (Abb. 39). Die Untersuchung von Transformanten mit diesen Konstrukten zeigte, dass bei allen erwartungsgemäß keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar war, d.h. die verschiedenen Promotoren wiesen keine basale Aktivität auf. Die Analyse der Transformanten mit cGvpE erbrachte, dass diese alle niedrigere Aktivitäten als die pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante hatten. Die Transformanten mit der stromauf verlängerten pA-Sequenz pA-cA+5u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und pA-cA+10u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> hatten eine ca. 1,5-fach geringere spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als die pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante. Dies sind allerdings keine signifikanten Aktivitätsunterschiede. Beim Vergleich der Sequenzen fällt auf, dass sich die Promotorkonstrukte pA-cA+5u und pA-cA+10u aufgrund der Ähnlichkeit der pA- und cA-Sequenz nur in einem bzw. nur in vier Nukleotiden von dem pA-cA-Promotor unterschieden. Ebenso hatten die stromauf verkürzten pA-cA-5u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>- und pA-cA-10u-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante keine signifikant unterschiedliche Aktivität. Die Sequenzen dieser beiden Promotor-Mutanten, pA-cA-5u und pA-cA-10u, unterschieden sich um vier- bzw. fünf Nukleotide von der pA-cA-Promotor-Sequenz. Diese Ergebnisse zeigten, dass weder eine „Verlängerung“ noch eine „Verkürzung“ stromauf einen entscheidenden Einfluss auf die GvpE-vermittelte Aktivierung hatte.

Die Transformanten mit den stromab verkürzten pA-Promotorkonstrukten pA-cA-5d-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> und pA-cA-10d-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>, die das BRE-Element und aufwärtsgelegene Sequenz-Abschnitte des cA-Promotors enthielten, hatten dagegen um etwa 5-fache niedrigere Aktivitäten verglichen mit der pA-cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>-Transformante. Diese Aktivitäten stimmen in etwa mit denen der Wildtyptransformante cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> überein. Die Analyse der Doppeltransformanten mit den Proteinen pGvpE bzw. mcGvpE bestätigten die Ergebnisse mit dem cGvpE-Protein.

Diese Untersuchungen deuteten wiederum sehr stark darauf hin, dass das BRE-Element an der GvpE-vermittelten Aktivierung beteiligt ist. Sowohl die „Verlängerung“ als auch die „Verkürzung“ der pA-cA-Sequenz hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die GvpE-vermittelte Aktivierung. Dies bedeutet, dass diese Bereiche nicht entscheidend für die Aktivierung der A-Promotoren waren. Es gibt keine Erklärung, warum die Aktivitäten dieser stromauf veränderten pA-cA-Varianten alle etwas geringer waren als die des pA-cA-Promotors. Zum anderen verhielten sich die stromab „verkürzten“ pA-cA-*bgaH*-Mutanten, die das cA-BRE-Element enthielten, ähnlich wie der cA-*bgaH*-Wildtyp. Auch diese Ergebnisse sprechen wiederum für die Wichtigkeit eines konservierten BRE-Elements im Zusammenhang mit der Aktivierung durch GvpE.

## b) Mutationen in der palindromischen Sequenz des cA-Promotors

Da Dimere von *leucine-zipper*-Proteinen an palindromische DNA-Sequenzen binden, wurde eine palindromische DNA-Sequenz (GTTGAACTCACAAC) stromauf der TATA-Box im cA-Promotor mutiert (Abb. 39). Bei der Transformante cA- $\Delta$ ACT-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>, bei der die drei Nukleotide ACT zwischen den beiden Palindromhälften im Promotorbereich deletiert wurden und somit die beiden Hälften näher beieinander lagen, war keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die palindromische Sequenz wichtig für die Aktivierung des cA-Promotors durch das cGvpE-Protein ist. Es könnte aber auch sein, dass diese Nukleotide direkt mit dem cGvpE wechselwirken oder die Deletion bereits die basale Transkription stört.

Das Palindrom wurde auch durch mehrere zufällige Nukleotidaustausche mutiert. Bei fünf der dreizehn Palindrommutanten war spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar. Bei der Transformante cA-Mut1-*bgaH*/cE<sup>ex</sup> war eine ähnlich hohe Aktivität messbar wie bei der Wildtyptransformante cA-*bgaH*/cE<sup>ex</sup>. Aus diesem Grund kann man alle vier Nukleotide (**aTTGgACTCAgAgg**), die in dieser Mutante verändert wurden, als unwichtig einstufen (Abb. 39). Bei den vier weiteren Transformanten mit Mutationen im Palindrom war zwar  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität vorhanden, diese war aber sehr gering. Betrachtet man die Sequenz der beiden Promotormutanten cA-Mut2 und cA-Mut3, fällt auf, dass sie beide ein Cytidin gegen ein Thymidin in der Sequenz zwischen den beiden Palindromhälften (GTTGgACTtAgAgg bzw. aTcagACTtAgAgg) getauscht hatten (Abb. 39). Die zwei Promotormutanten cA-Mut4 und cA-Mut5 hatten ebenfalls einen gleichen Nukleotidaustausch, der sie von der Mutante cA-Mut1 unterschied (Abb. 39). Auch hier war es ein Thymidin, das aber in der rechten Palindromhälfte zu finden war bzw. im BRE-Element. (GcTagACTCAgtgC bzw. GTTGAACTCAgtg). Es wäre also möglich, dass diese beiden Mutationen verantwortlich dafür waren, dass die Aktivierbarkeit durch cGvpE bei diesen Mutanten viel geringer war. Vergleicht man nun die Sequenzen der restlichen acht Promotormutanten cA-Mut6 bis cA-Mut13, die nicht mehr durch cGvpE aktivierbar waren, fällt auf, dass alle sechs Mutanten beide Thymidine enthielten, die in den Mutanten cA-Mut2 bis cA-Mut5 jeweils nur einfach aufgetreten waren (Abb. 39). Es scheint so, als ob das Auftreten einer der beiden Mutationen genügte, um die Aktivierbarkeit des cA-Promotors durch cGvpE drastisch zu senken, aber die Kombination von beiden Mutationen eine Aktivierbarkeit völlig verhinderte. Diese beiden Nukleotide könnten deshalb wichtig für die Aktivierung durch GvpE sein. Interessanterweise führte der Nukleotidaustausch zum Thymidin im BRE-Element zu einer noch schlechteren Übereinstimmung mit der

Konsensussequenz. Erneut scheint das BRE-Element besonders wichtig für die GvpE-vermittelte Aktivierung zu sein. Es ist aber noch nicht klar, ob der Austausch der beiden Nukleotide durch ein Thymidin erfolgen muss, um die Aktivierbarkeit zu senken oder ob auch ein Austausch gegen ein anderes Nukleotid die gleiche Wirkung hätte. Es darf bei der Betrachtung aber nicht vergessen werden, dass in einigen Promotormutanten zusätzliche Mutationen auftreten, die bei der PCR entstanden sind. Diese Mutationen könnten ebenfalls der Grund für die verminderte oder fehlende Aktivierbarkeit sein. Um dies zu überprüfen, könnten gezielt nur die Positionen, die hier durch Thyminde ersetzt wurden, durch Substitutionsmutagenese verändert werden.

### c) **mcA-Promotormutanten**

#### **Mutationen in der palindromischen Sequenz**

Da der mcA-Promotor ebenfalls eine palindromische DNA-Sequenz (GTTGCTGAACCAAC) enthält, die fast mit dem Palindrom des cA-Promotors (GTTGAACTCACAAC) übereinstimmt, wurde auch der mcA-Promotor für Mutationsstudien herangezogen (Abb. 40). Besonders wichtig war dabei, dass der mcA-Promotor eine, wenn auch nur eine geringe, basale Aktivität besitzt. Damit konnte zwischen Mutationen, welche die basale Transkription stören und solchen, welche die GvpE-vermittelte Aktivierung beeinträchtigen, differenziert werden. Bei der Transformante mcA-Del-*bgaH*, bei der die drei Nukleotide TGA zwischen den beiden Palindromhälften im Promotorbereich deletiert waren, war die basale Aktivität des mcA-Promotors anhand der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nicht verändert. Bei der entsprechenden Transformante mit mcGvpE war dagegen überhaupt keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mehr detektierbar. Dies war sehr überraschend, da schon zu erwarten war, dass eine basale Aktivität vorlag. Aber es war ein erneuter Hinweis darauf, dass die palindromische Sequenz wichtig für die Aktivierung durch GvpE ist. Warum eine basale Transkription nur möglich war, wenn das mcGvpE nicht vorhanden war, lässt sich schwer erklären. Es wäre vielleicht möglich, dass durch die fehlenden drei Nukleotide die RNA-Polymerase, die Transkriptionsfaktoren und GvpE auf der verkürzten DNA-Sequenz nicht gleichzeitig binden können oder sich sterisch gegenseitig behindern und deshalb eine effektive Aktivierung verhindert wurde.

Einzelne Nukleotidaustausche in der palindromischen Sequenz des mcA-Promotorbereiches führten dagegen zu einer verminderten basalen Aktivität der mutierten Promotoren mcA-Mut1 und mcA-Mut2. Bei den entsprechenden Transformanten mit mcGvpE konnte auch kaum eine Veränderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden. Dabei fällt auf, dass

die Mutationen bei mcA-Mut1 und mcA-Mut2 vor allem die rechte Palindromhälfte veränderten (Abb. 40). Weitere Untersuchungen sollten klären, ob Mutationen in der linken Palindromhälfte ebenfalls keine Veränderung der GvpE-vermittelten Aktivierung bewirken würden.

	BRE	TATA	
		RNWAAWNYTTAWG	
mcA	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAAC	ACGAATGATTTTG	+GvpE (++)
mcA-Del	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGCAACCAAC	ACGAATGATTTTG	(-)
mcA-Mut1	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGgTTGCTGAACgtgCACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	(++)
mcA-Mut2	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACgttgCACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	(++)
mcA-DeltaI	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAAC	ATTTTG	(-)
mcA-DeltaII	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTG	ACGAATGATTTTG	(-)
mcA-DeltaIII	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACG	AACCAACACGAATGATTTTG	(+)
mcA-DeltaIV	TGTTTGACTCATTACGAGAGG	GTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	(+)
mcA-DeltaV	TGTTTGACTCATTACGAGAGG	TGAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	(+)
mcA-DeltaVI	TGTTTGACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAAC	ACGAATGATTTTG	(+)
mcA-DeltaVII	CTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAAC	ACGAATGATTTTG	(++)
mcA-M1	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAAC	attgACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M2	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGctgaAACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M3	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGTTGagtcACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M4	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAACGGaataTGAACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M5	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTGAAAaccatTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M6	TGTTTGACTCATTACGAGAGGTgctcaGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M7	TGTTTGACTCATTACGAGAGgtcAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M8	TGTTTGACTCATTACGactctTGAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M9	TGTTTGACTCATTAAaccAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M10	TGTTTGACTCAcagaGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*
mcA-M11	TGTTTGACgagcTACGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAACACGAATGATTTTG	ACGAATGATTTTG	[+]*

**Abb. 40** Sequenzen des mcA-Promotors und seiner Mutanten. Mutationen sind durch kleine Buchstaben hervorgehoben. Hinter den Sequenzen ist die Aktivierbarkeit immer im Bezug auf den Wildtyp angegeben, wobei (++) gut aktivierbar wie WT bedeutet; (+) schwach aktivierbar; (-) nicht aktivierbar. Die gute [++]\* und schlechte Aktivierbarkeit [+]\* beider Substitutionsmutationen wurde unabhängig vom WT ausgerechnet. Sowohl die Konsensussequenz des BRE-Elements, als auch die der TATA-Box sind oberhalb der Promotor-Sequenzen angegeben (R = A oder G; N = A, C, G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz des BRE-Elements sind in blau gezeigt, und Übereinstimmung mit der Konsensussequenz der TATA-Box sind in fett hervorgehoben. Die palindromische Sequenz ist unterstrichen. Sequenzen, die unwichtig für die Aktivierbarkeit erscheinen, sind in olivgrün und die vermutlich Wichtigen in gelb unterlegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die basale Transkription am mcA-Promotor durch eine Deletion von drei Nukleotiden innerhalb des Palindroms nicht beeinträchtigt wurde. Die Aktivierung durch GvpE war aber durch diese Deletion verhindert und zwar sowohl beim cA- als auch beim mcA-Promotor. Nukleotidaustausche in der palindromischen Region des mcA-Promotors hatten weder Auswirkungen auf die basale Aktivität, noch auf die GvpE-vermittelte Aktivierung. Beim cA-Promotor hatten Nukleotidaustausche aber Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit durch GvpE. Insgesamt gesehen konnte mit diesen *in-vivo*-Analysen

der Promotorbereich für die GvpE-vermittelte Aktivierung noch nicht eindeutig gezeigt werden. Es gab aber Hinweise, dass die palindromischen Sequenz wichtig für die GvpE-Bindung sein könnte.

### **Durchgängige Deletionsanalyse im mcA-Promotor**

Da die Deletion von drei Nukleotiden zwischen den palindromischen Sequenzen die GvpE-vermittelte Aktivierung der *gvpA*-Promotoren deutlich verhinderte, wurde mit einer Serie von sieben Nukleotiden (*deletion walking*) innerhalb des mcA-Promotors überprüft, ob auch Deletionen stromab und stromauf der palindromischen Sequenzen Auswirkungen auf die Aktivierung durch GvpE haben. In die 49 nt lange Sequenz stromauf der TATA-Box wurden fortlaufend sieben Nukleotide deletiert (Abb. 40). Die basalen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten DeltaI, DeltaII, DeltaIII und DeltaIV differierten nicht signifikant von der Aktivität der Wildtyptransformante, während bei den Transformanten DeltaV, DeltaVI und DeltaVII gar keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar war.

Bei der Transformante DeltaI mit cGvpE als Aktivator konnte keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden. Dies könnte auf jeden Fall ein Hinweis darauf sein, dass diese Deletionen einen Bereich getroffen haben, der für die GvpE-vermittelte Aktivierung wichtig ist. Hier war das komplette BRE-Element deletiert (Abb. 40). Man würde hier eher vermuten, dass die basale Transkription gestört wäre, zumal das BRE-Element des mc-*gvpA*-Promotors (ACGAATG) bis auf ein Nukleotid (G) mit der Konsensussequenz für Archaea (RNWAAWN) übereinstimmt (R = A oder G; N = A, C, G oder T; W = A oder T). Da aber die basale Aktivität der entsprechenden Einzeltransformante nicht beeinträchtigt war, und die Aktivierung des Promotors durch GvpE verhindert wurde, musste man eher vermuten, dass das GvpE-Protein entweder an das BRE-Element bindet oder zumindest mit dem TFB um die Bindestelle konkurriert. Diese Resultate der Promotormutante DeltaI bestätigen die Ergebnisse zur Untersuchungen der BRE-Elemente von cA- und pA-Promotor. Hier hatte eine bessere Konservierung des BRE-Elements (cA-pA<sub>BRE</sub>-Promotor oder pA-cA-Promotor) keinen Einfluss auf die basale Aktivität, während die GvpE-vermittelte Aktivierung verbessert wurde. Keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität konnte bei der Transformante DeltaII-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* gemessen werden. Bei dieser Promotormutante DeltaII war die rechte Hälfte des Palindroms, das direkt stromauf des BRE-Elements liegt, deletiert (Abb. 40). Es scheint demnach nicht nur das BRE-Element, sondern auch das Palindrom wichtig für die Aktivierung durch GvpE zu sein. Bei den Transformanten DeltaIII-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* und DeltaIV-*bgaH/cE<sup>ex</sup>* konnte eine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden, die im

Vergleich zu der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Wildtyptransformante *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>* drastisch und zwar um ca. das 700-Fache vermindert war. Bei der Promotormutante DeltaIII ist die linke Hälfte des Palindroms- und bei DeltaIV ist die 7 nt lange Sequenz direkt stromauf des Palindroms deletiert. Die Deletion der linken Palindromhälfte hatte also nicht so eine starke Auswirkung wie die Deletion der rechten. Andererseits ist eine ca. 700-Fach vermindert Aktivität auch ein klarer Hinweis darauf, dass diese Sequenz wichtig war. Es ist demnach möglich, dass die rechte Palindromhälfte wichtiger ist als die linke. Es wäre aber auch denkbar, dass gar nicht das Palindrom wichtig ist, sondern seine Lage. Es scheint nämlich ganz so, als ob die Sequenzen, die in der Nähe des BRE-Elements liegen, das ist im Fall des *mcA*-Promotors die rechte Palindromhälfte, ähnlich wichtig wie das BRE-Element für die GvpE-Aktivierung sind. Für diese These spricht auch, dass die Deletion der 7 nt stromauf der linken Palindromhälfte eine vergleichbare Auswirkung hat wie die Deletion der linken Palindromhälfte.

Obwohl die Ergebnisse der Transformanten *DeltaV-bgaH/cE<sup>ex</sup>*, *DeltaVI-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und *DeltaVII-bgaH/cE<sup>ex</sup>* aufgrund der bereits verminderten basalen Transkription in den entsprechenden Transformanten ohne cGvpE schwierig auszuwerten sind, sollen diese hier dennoch erwähnt werden. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten, die bei den Transformanten *DeltaV-bgaH/cE<sup>ex</sup>* und *DeltaVI-bgaH/cE<sup>ex</sup>* gemessen wurden, waren im Vergleich zu der *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante um das etwa 40- bzw. 10-Fache erniedrigt. Bei der *DeltaVII-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante waren die Aktivitäten etwa vergleichbar mit denen der *mcA-bgaH/cE<sup>ex</sup>*-Transformante. Je weiter die Deletionen vom BRE-Element (stromauf) entfernt sind, desto weniger Einfluss haben sie anscheinend auf die Aktivierung durch GvpE. Bei Berücksichtigung dieser Ergebnisse wäre das Fazit, dass alle 28 nt stromauf der TATA-Box (Bereich DeltaI bis DeltaIV) wichtig für Aktivierung durch GvpE sind. Man muss hier aber noch eine Abstufung in der Priorität machen. Die 14 nt (Bereich DeltaI bis DeltaII) direkt stromauf der TATA-Box erscheinen am wichtigsten und die 14 nt links davon (Bereich DeltaIII bis DeltaVI) auch noch wichtig zu sein. So scheint zumindest die Sequenz im *mcA*-Promotorbereich auf 28 nt reduziert zu sein. Wie bereits erwähnt sind diese Schlussfolgerungen nur unter Vorbehalt zu ziehen, da bereits die basale Aktivität vermindert wurde. Somit ist es schwer abzuschätzen, ob bei diesen Transformanten die Aktivierbarkeit durch GvpE aufgrund der Tatsache beeinträchtigt wurde, dass GvpE nicht mehr binden konnte oder ob der Promotor trotz gebundenem GvpE nicht aktiver werden konnte.

### Substitutionsmutagenese im mcA-Promotor

Mit dem beschriebenen *deletion walking* konnte eine 28 nt lange Sequenz identifiziert werden, die wichtig für die GvpE-Bindung sein könnte. Ein neuer Ansatz war, in dieser Sequenz gezielte Nukleotidaustausche durchzuführen. Die Mutationen starteten stromauf des BRE-Elements im mc-*gvpA*-Promotor, so dass eine 34 nt lange Sequenz in einer *substitution walking*-Analyse mutiert wurde. Für die Mutagenese wurden die Sequenzen der drei Promotoren, mcA, cA und pA am Transkriptionsstart bzw. an der TATA-Box aliniert und miteinander verglichen. Bei der Konstruktion der neuen mcA-Promotor-Mutanten wurde darauf geachtet, dass das „neue“ Nukleotid mit keinem Nukleotid der drei Promotoren übereinstimmte (Abb. 40). Es wurde ebenfalls darauf geachtet, dass ein Purin durch ein Pyrimidin bzw. ein Pyrimidin durch ein Purin ersetzt wurde. Schließlich wurden in dieser Substitutionsmutagenese immer 4 nt ausgetauscht, wobei die Mutationen jeweils mit einem Nukleotid stromauf und stromab überlappten. Insgesamt wurden die Promotormutanten mcA-M1 bis mcA-M11 hergestellt.

Die Untersuchungen zur Bestimmung der basalen Aktivitäten in den entsprechenden Transformanten führten zu dem Ergebnis, dass sich die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der elf Transformanten mcA-M1-*bgaH* bis mcA-M11-*bgaH* (M1-*bgaH* bis M11-*bgaH*) nur gering von der Aktivität der Wildtyptransformante mcA-*bgaH* unterschieden. Da also keine große Veränderung der basalen Aktivität des mcA-Promotors verursacht wurde, konnten alle Ergebnisse der entsprechenden Transformanten mit mcGvpE für die Suche der GvpE-Bindestelle in Betracht gezogen werden.

Die Analyse der entsprechenden Transformanten mit mcGvpE war etwas schwierig, da es sich bei den Werten der Wildtyptransformante mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> um Ergebnisse eines anderen Versuchsansatzes handelte. Beim Betrachten der Resultate der Mutanten fiel nämlich auf, dass bei einigen Transformanten, wie beispielsweise M4-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup>, bei der die linke Palindromhälfte mutiert war, die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten höher lagen als bei der Wildtyptransformante mcA-*bgaH*/mcE<sup>ex</sup> (Abb. 40). Diese Differenzen zeigen eindeutig die Grenzen des *bgaH*-Reportersystems. Es ist schwierig, unterschiedliche Versuchsreihen miteinander zu vergleichen, wenn man nicht immer eine Kontroll-Transformante mitführt, um die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in diesem Versuchsansatz zu standardisieren. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der Substitutionsmutationen ohne die Ergebnisse der Wildtyptransformante betrachtet und stattdessen die Mutanten mit den höchsten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten als Standard festgelegt. Die Mutationen in der rechten Palindromhälfte bei Promotormutante M1 bewirkten eine Verschlechterung der

Aktivierbarkeit durch mcGvpE. Das gleiche galt für die Mutationen zwischen den Palindromhälften bei den Mutanten M2 und M3. Im Gegensatz dazu hatten die Nukleotidaustausche in der linken Palindromhälfte keine Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit durch mcGvpE. Da die Mutationen M1 bis M3 die GvpE-vermittelte Aktivierung verschlechterten, könnte man daraus schließen, dass die direkt stromauf des BRE-Elements liegende rechte Palindromhälfte, und die daran angrenzende Sequenz wichtig für die GvpE-vermittelte Aktivierung sind. Die linke Palindromhälfte wäre demnach nicht so wichtig. Diese Ergebnisse unterstützen auch die Resultate aus den Deletionsanalysen mit den Promotormutanten DeltaI bis DeltaIV. Betrachtet man die Aktivitäten der Promotormutanten M1 bis M4 genauer, lässt sich eine Tendenz erkennen: je näher die Mutationen zum BRE-Element rückten (von M4 nach M1), desto größer schienen ihre Auswirkungen auf die Aktivierung durch mcGvpE zu sein.

Die Mutationen in der linken Palindromhälfte und weiter genaufwärts bewirkten dagegen eine drastische Herabsetzung der Aktivierbarkeit durch mcGvpE, ähnlich wie sechs weitere Nukleotidaustausche genaufwärts davon in den Mutanten M6 und M7 (Abb. 40). Offensichtlich ist dies ein weiterer wichtiger Bereich für die Aktivierbarkeit durch mcGvpE. Diese Mutationen liegen auch noch in dem Bereich der 28 nt, die durch die Deletionsanalysen für die GvpE-Aktivierung als wichtig eingestuft wurden (siehe auch Abb. 40). Alle weiteren Mutationen weiter genaufwärts hatten keine Auswirkungen mehr auf die Aktivierbarkeit durch GvpE. Damit wurde erneut gezeigt, dass das BRE-Element sowie die 20 nt links davon für die Aktivierung durch GvpE wichtig waren. Man darf aber nicht vergessen, dass bei der Analyse der Substitutionsmutanten die Wildtyptransformante vernachlässigt wurde.

Alle hier durchgeführten Mutationen an den drei A-Promotoren geben Hinweise auf die Wichtigkeit des BRE-Elements für die GvpE-vermittelte Aktivierung. Es wäre möglich, dass es sich bei der Sequenz strangauf der TATA-Box nicht um die Bindestelle für das TFB-Protein handelt, sondern um die GvpE-Bindestelle oder um eine Bindestelle, an der TFB und GvpE gemeinsam binden können. Bei Halobakterien wurde noch nicht gezeigt, an welche Sequenz die verschiedenen TFB-Proteine binden. Es wurde bis jetzt nur bei *Pyrococcus* und *Sulfolobus shibatae* gezeigt, dass das TFB-Protein an das BRE-Element bindet (Hausner et al., 1996; Qureshi & Jackson, 1998; Kosa et al., 1997; Bell et al., 1999a; Littlefield et al., 1999). Auch wurde nur bei Halobakterien noch keine Konsensussequenz für das BRE-Element bestimmt. Es konnte aber ein größerer Bereich von 28 nt stromauf der TATA-Box, der nicht nur das BRE-Element direkt stromauf der TATA-Box, sondern auch das Palindrom enthält, identifiziert werden, der entscheidend für die Aktivierung durch GvpE ist. Somit

könnte es auch sein, dass ein ganzer Komplex aus RNA-Polymerase, Transkriptionsfaktoren und GvpE zu einer effizienten Transkription führt. Da die Halobakterien die einzigen Archaea neben *Pyrococcus horikoshii* sind, die mehrere Kopien an unterschiedlichen *tfb*- und *tbp*-Genen besitzen, wäre es durchaus denkbar, dass bei ihnen die Transkription etwas anders abläuft als bei den anderen Archaea. Wenn man davon ausgeht, dass *Haloferax volcanii* sechs verschiedene *tfb*-Gene besitzt und *Halobacterium* sp. NRC-1 sieben (Thompson et al., 1999; Ng et al., 1998), wäre es möglich, dass die unterschiedlichen TFBs für unterschiedliche Wachstumsphasen oder unterschiedliche Wachstumsbedingungen eingesetzt werden. Ein ähnlicher Regulationsmechanismus, die Verwendung alternativer  $\sigma$ -Faktoren, ist bei Bakterien sehr gut bekannt. Denkbar wäre möglicherweise, dass eines der TFB-Proteine im Zusammenspiel mit GvpE an das BRE-Element bindet und ein anderes, wenn kein GvpE vorhanden ist. Man sollte auch noch bedenken, dass *Haloferax volcanii* der Empfängerstamm für alle hier durchgeführten Transformationsexperimente ist. Es wurden in *Haloferax volcanii* sowohl Promotoren aus *Haloferax mediterranei* als auch aus *Halobacterium salinarum* untersucht.

## 6) Untersuchungen zur Regulation durch die Salzkonzentration

Es wurden bereits mehrere Salz-regulierte Vorgänge bei Halobakterien beschrieben. So ist neben der Gasvesikelbildung auch die Synthese des Carotinoids Bakterioruberin bei *Hf. mediterranei* salzabhängig. Auf 15% salzhaltigem Medium erscheinen die *Hf. mediterranei*-Kolonien rot und mit 25% Salz weiss aufgrund des Fehlens von Bakterioruberin (D'Souza et al., 1997). Bei dem psychrotrophen Bakterium *Arthrobacter agilis*, der bei 0% bis 10% (w/v) NaCl im Medium wachsen kann, konnte ebenfalls festgestellt werden, dass Carotinoide, welche C-50 Bakterioruberin-Typen sind, in Abhängigkeit von Salz- oder Hitze-Stress akkumuliert werden (Fong et al., 2001). Bei einer Zunahme an Salz im Medium werden weniger Pigmente produziert. Möglicherweise stabilisieren die Pigmente die Zellmembran bei geringen Salzkonzentrationen, denn Carotinoide können die Fluidität der Zellmembran beeinflussen (Huang & Huang, 1974; Jagannadham et al., 1991). Auch verschiedene Proteinmuster und unterschiedliche DNA-Restriktionsmuster (im Genom) konnten bei *Hf. mediterranei*-Zellen festgestellt werden, die bei verschiedenen Salz-Konzentrationen im Medium gewachsen waren (Juez et al., 1990; Mojica et al., 1993; D'Souza et al., 1997). Auch bei *Hf. volcanii* konnte festgestellt werden, dass verschiedene Regionen im Genom bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen differentiell transkribiert werden (Ferrer et al. 1996).

Es wurde auch untersucht, ob sich verschiedene Salzkonzentrationen von 15, 20 und 25% im Medium auf die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Transformanten *mcA-bgaH* und *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* auswirkten. Der pA-Promotor von *Hb. salinarum* diente als Kontrolle (pA-*bgaH*). Bei Salzkonzentrationen von 15 bis 25% wuchsen die Transformanten, wobei die Transformanten, die bei 25% Salz angezogen wurden, etwas langsamer wuchsen als bei 15 bzw. 20% Salz. Bei den pA-*bgaH*- und pA-*bgaH/pE<sup>ex</sup>*-Transformanten, die bei 15% Salz im Medium gewachsen waren, war keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, bei 20 und 25% Salz im Medium war hingegen in etwa die gleiche spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar. Der pA-Promotor zeigte eine Abhängigkeit der Aktivität von der Salzkonzentration, bei welcher der Promotor bei 20 und 25% Salz aktiv war, bei 15% Salz jedoch keine Aktivität zeigte. Dabei scheint die Aktivität des Promotors von einer Mindestkonzentration an Salz abzuhängen, eine Feinregulation zwischen 20 und 25% Salz gibt es nicht. Da das extrem halophile Archaeon *Hb. salinarum* optimale Wachstumsbedingungen von 25 bis 30% Salz hat, lässt sich erklären, warum Variationen in der Salzkonzentration von 20 bis 25% keinen regulatorischen Einfluss auf den pA-Promotor haben.

Auch bei den *mcA-bgaH*- und *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*-Transformanten, die bei 15% Salz im Medium gewachsen waren, war keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar. Da der Wildtypstamm *Hf. mediterranei*, aus dem der *mcA*-Promotor stammt, keine Gasvesikel bei 15% Salz im Medium bildet, war dies nicht unerwartet. Bei 20 und 25% Salz im Medium war hingegen bei den Transformanten *mcA-bgaH* und *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität messbar. Die Transformanten *mcA-bgaH* und *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>* zeigten bei 25% Salz im Medium im Schnitt eine 3,5-fach höhere Aktivität als bei 20% Salz im Medium. Mit Hilfe von Western-Analysen war gezeigt worden, dass *mcGvpE* in allen Transformanten unabhängig von der Salzkonzentration gebildet wurde. Damit wurde ausgeschlossen, dass die fehlende *mcA*-Promotoraktivität bei der Transformante *mcA-bgaH/mcE<sup>ex</sup>*, die bei 15% Salz im Medium gewachsen war, nicht auf ein Fehlen des Aktivators *mcGvpE* zurückzuführen ist. Es konnte aber nicht geklärt werden, warum das *mcGvpE*-Protein, das bei 15% Salz gebildet wird, nicht in der Lage ist, den *mcA*-Promotor zu aktivieren. Es wäre denkbar, dass das *GvpE*-Protein bei niedrigen Salzkonzentrationen nicht richtig gefaltet ist oder aber andere Faktoren vorhanden sind, die bestimmte Gene salzabhängig regulieren. Es ist hier auf jeden Fall notwendig, zu überprüfen, ob *GvpE*-Protein im Wildtypstamm *Hf. mediterranei* bei 15% Salz im Medium gebildet wird. Diese Ergebnisse zeigten quantitativ, dass die Aktivität des *mcA*-Promotors salzabhängig reguliert wird. Eine Konzentration von 15% Salz im Medium reichte dabei noch nicht aus, um messbare *mcA*-

Promotoraktivitäten zu erhalten. In Medien mit 20% Salz waren mcA-Promotoraktivitäten messbar, die sich durch Anzucht bei 25% Salz sogar noch steigern ließen. Hier war also nicht nur eine Mindestsalzkonzentration nötig, sondern auch eine Feinregulation des Promotors durch steigende Salzkonzentration messbar.

Da *Hf. mediterranei* ein moderat halophiles Archaeon ist, das an Standorten mit variablen Salzkonzentrationen vorkommt, könnte sich möglicherweise die Genexpression des mcA-Promotors kontinuierlich an diese unterschiedlichen Salzkonzentrationen anpassen.

Da das mcGvpE-Protein in den *Hf. volcanii*-Transformanten in Abhängigkeit vom Ferredoxin-(*fdx*)-Promotor gebildet wurde, konnte man auch die Rückschlüsse ziehen, dass der *fdx*-Promotor, anders als der pA-Promotor, der auch aus dem extrem halophilen Archaeon *Hb. salinarum* stammt, unabhängig von der Salzkonzentration aktiv ist. Das gebildete Genprodukt mcGvpE konnte in diesem Fall aber nicht den mcA-Promotor aktivieren. Es ist unwahrscheinlich, dass bei den pA-*bgaH*- und mcA-*bgaH*-Transformanten mit 15% Salzmedium  $\beta$ -Galaktosidase-Proteine synthetisiert werden, die nicht funktionsfähig sind, denn es wurde gezeigt, dass die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität selbst bei 12% Salz noch 75% ihrer größten Aktivität zeigt (Holmes et al., 1997). Es wäre aber noch interessant, die Salzabhängigkeit des *fdx*-Promotors direkt mit dem *bgaH*-Reportersystem in *Hf. volcanii*-Transformanten zu untersuchen. Da der ONPG-Test immer mit der gleichen Salzkonzentration im Testpuffer durchgeführt wird, können mit dem *bgaH*-Reportergen Studien zur salzabhängigen Regulation durchgeführt werden, obwohl die *bgaH*-Aktivität abhängig von der Salzkonzentration ist. (Holmes et al., 1997). Die Veränderung der Salzkonzentration im Testassay, die durch die Verwendung von Kulturen, die bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen angezogen wurden, zustande kommt, beträgt maximal 1 % und ist daher vernachlässigbar. Da von Halobakterien bekannt ist, dass sie mehrere Kopien an *tfb*- und *tbp*-Genen besitzen, wäre es möglich, dass die entsprechenden verschiedenen Genprodukte unterschiedlich in die Regulation der Transkription eingreifen. Sie könnten in Zusammenhang gebracht werden mit wachstums-, salz-, nährstoff-, licht- oder auch sauerstoff-abhängiger Transkription. Da der moderat halophile *Hf. volcanii* sich beispielsweise mit sechs verschiedenen *tfb*-Genen von dem extrem halophilen Archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1 mit sieben verschiedenen *tfb*-Genen unterscheidet, wäre es möglich dass die unterschiedlichen TFBS oder TBPs im Zusammenhang mit dem Einfluss der Salzkonzentration stehen (Thompson et al., 1999; Ng et al., 1998). Bei den durchgeführten Untersuchungen sollte man auch nicht vergessen, dass *Hb. salinarum* und *Hf. mediterranei*-Promotoren in einer anderen Spezies, *Hf. volcanii*, untersucht wurden. Es wäre möglich, dass

TFBs aus einer anderen Spezies oder einer anderen Gattung die Transkription unterschiedlich regulieren.

Es wäre ebenfalls interessant zu untersuchen, ob höhere Salzkonzentrationen etwa im Bereich 25%, 30% und 35% regulatorischen Einfluss auf Promotoren wie z.B. den pA- oder den *fdx*-Promotor aus einem extrem halophilen Archaeon haben. Generell könnten die Auswirkungen von verschiedenen Salzkonzentrationen auf mehrere unterschiedliche Promotoren mit dem *bgaH*-Reportersystem untersucht werden. Mit mutierten wie z.B. chimären Promotoren, könnte analysiert werden, welcher Promotorabschnitt für die Salzregulation verantwortlich ist.

## 7) **Abschlussfazit**

Diese Analysen haben sowohl die Möglichkeiten als auch die Grenzen des *bgaH*-Reportersystems aufgezeigt. Um Promotor-Untersuchungen miteinander vergleichen zu können, sollte bei jeder Kultivierung eine Standardtransformante mit untersucht werden. Auch hat es sich als besonders wichtig erwiesen, darauf zu achten, dass die Transformanten immer möglichst in identischer Weise kultiviert werden. Das Animpfen sollte stets mit exponentiell wachsenden Vorkulturen erfolgen. Für jeden Promotor muss die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität über die gesamte Wachstumskurve bestimmt werden, um die Stärke individuell festzustellen und verschiedene Promotoren dann miteinander vergleichen zu können. Da es nur möglich war, die Bindestelle auf der Promotorsequenz für das GvpE sehr grob festzulegen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen Bindungsstudien zwischen Proteinen wie z. B. dem TFB, dem GvpE oder der RNA-Polymerase miteinbezogen werden, um mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen zu zeigen. Da Halobakterien mehrere *tfb*- und *tbp*-Gene besitzen, sollten hier mehrere Möglichkeiten getestet werden. *In-vitro*-Analysen mit *gvpA*-Promotor-DNA und halobakteriellem Zelllysate oder isoliertem GvpE-Protein sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Vielleicht könnte man so die Protein-Protein- oder auch die DNA-Protein-Wechselwirkung zeigen. Die hohen Salzkonzentrationen, an welche die Proteine der Halobakterien angepasst sind, erschweren viele der gängigen *in-vitro*-Methoden (Plößer & Pfeifer, 2002; Plößer 2002).

## LITERATURVERZEICHNIS

- Aravind L & Koonin EV (1999).** DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res* 27: 4658-4670
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1998).** Current protocols in molecular biology, Green Publishing Associates an Wiley-Interscience, New York
- Avron, M (1986).** The osmotic components of halotolerant algae. *TIBS* 11: 5-6
- Baliga NS & DasSarma S (2000).** Saturation mutagenesis of the haloarchaeal bop gene promoter: identification of DNA supercoiling sensitivity sites and absence of TFB recognition element and UAS enhancer activity. *Mol Microbiol* 36: 1175-1183
- Bell SD & Jackson SP (1998).** Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol* 6: 222-228
- Bell SD, Jaxel C, Nadal M, Kosa PF, Jackson SP (1998).** Temperature, template topology, and factor requirements of archaeal transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15218-15222
- Bell SD, Kosa PF, Sigler PB, Jackson SP (1999a).** Orientation of transcription preinitiation complex in Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13662-13667
- Bell SD, Cairns SS, Robson RL, Jackson SP (1999b).** Transcription Regulation of an Archaeal Operon In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell* 4: 971-982
- Bell SD & Jackson SP (2000a).** The Role of Transcription Factor B in Transcription Initiation and Promotor Clearance in the Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol Chem* 275: 12934-12940
- Bell SD & Jackson SP (2000b).** Mechanism of Autoregulation by an Archaeal Transcriptional Repressor. *J Biol Chem* 275: 31624-31629
- Bell SD, Brinkmann AB, van der Oost J, Jackson SP (2001).** The archaeal TFIIE $\alpha$  homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO reports* 2: 133-138
- Best A (2000).** Molekulare Funktionsanalyse des gasvesikelassoziierten GvpC-Proteins aus *Halobacterium salinarum* PHH1. Wissenschaftliche Hausarbeit, TU-Darmstadt
- Blaseio U & Pfeifer F (1990).** Transformation of *Halobacterium halobium*: Development of vectors and investigation of gas vesicle synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6772-6776
- Brinkman AB, Dahlke I, Tuiniga JE, Lammers T, Dumay V, de Heus E, Lebbink JH, Thomm M, de Vos WM, van der Oost J (2000).** An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J Biol Chem* 275: 38160-38169
- Brinkman AB, Bell SD, Lebbink RJ, de Vos WM, van der Oost J (2002).** The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. *J Biol Chem* 277: 29537-29549
- Bullock, WO, Fernandez JM, Cline SW, Doolittle WF (1987).** XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-379
- Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Venter JC (1996).** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-1073
- Busby S, Ebright RH (1994).** Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 2: 743-746

- Chomczynski P, Sacchi N (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Cline SW & Doolittle WF (1987).** Efficient Transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* 169: 1341-1344
- Cline SW, Schalkwyk L, Doolittle WF (1989).** Transformation of the archaeobacterium *Halobium volcanii* with genomic DNA. *J Bacteriol* 171: 4987-4991
- Cohen-Kupiec R, Blank C, Leigh JA (1997).** Transcriptional regulation in Archaea: *In vivo* demonstration of a repressor binding site in methanogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1316-1320
- Condo I, Ciammaruconi A, Benelli D, Ruggero D, Londei P (1999).** *Cis*-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 34: 377-384
- Danner S & Soppa J (1996).** Characterisation of the distal promoter element of halobacteria *in vivo* using saturation mutagenesis and selection. *Mol Microbiol* 19: 1265-1276
- Darcy TJ, Hausner W, Awery DE, Edwards AM, Thomm M, Reeve JN (1999).** *Methanobacterium thermoautotrophicum* RNA Polymerase and Transcription In Vitro. *J Bacteriol* 181: 4424-4429
- Dennis PP & Shimmin LC (1997).** Evolutionary Divergence and Salinity-Mediated Selection in Halophilic Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 90-104
- Dym O, Mevarech M, Sussman JL (1995).** Structural Features That Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an Archaeobacterium. *Science* 267: 1344-1346
- Ferrer C, Mojica FJ, Juez G, Rodriguez-Valera F (1996).** Differentially transcribed regions of *Haloferax volcanii* genome depending on the medium salinity. *J Bacteriol* 178: 309-313
- DasSarma S, Arora P, Lin F, Molinari E, Yin LR (1994).** Wild-type gas vesicle formation requires at least ten genes in the *gvp* gene cluster of *Halobacterium halobium* plasmid pNRC100. *J Bacteriol* 176: 7646-7652
- D'Souza SE, Altekhar W, D'Souza SF (1997).** Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (< 20%) in the growth medium. *Arch Microbiol* 168: 68-71
- Eick D, Wedel A, Heumann H (1994).** From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends Genet* 10: 292-296
- Ellenberger TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC (1992).** The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71: 1223-1237
- Englert C, Horne M, Pfeifer F (1990).** Expression of the major gas vesicle protein in the halophilic archaeobacterium *Haloferax mediterranei* is modulated by salt. *Mol Gen Genet* 222: 225-232
- Englert C, Krüger K, Offner S, Pfeifer F (1992a).** Three different but related gene cluster encoding gas vesicles in halophilic archaea. *J Mol Biol* 227: 586-592
- Englert C, Wanner G, Pfeifer F (1992b).** Functional analysis of 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. *Mol Microbiol* 6: 3543-3550
- Englert C, Pfeifer F (1993).** Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloferax mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins. *J Biol Chem* 268: 9329-9336
- Eisenberg H, Mevarech M, Zaccai G (1992).** Biochemical, Structural and Molecular Genetic Aspects of Halophilism. *Adv Protein Chem* 43: 1-62
- Fong NJ, Burgess ML, Barrow KD, Glenn DR (2001).** Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 750-756

- Frey G, Thomm M, Brudigam B, Gohl HP, and Hausner W (1990).** An archaeobacterial cell-free transcription system. The expression of tRNA genes from *Methanococcus vannielii* is mediated by a transcription factor. *Nucleic Acids Res* 18: 1361-1367
- Frolow F, Harel M, Sussman JL, Mevarech M, Shoham M (1996).** Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat Struct Biol* 3: 452-458
- Grant WD & Larsen H (1989).** Extremely halophilic archaeobacteria, order Halobacteriales ord. Nov., in Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG, Ed., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.3 Williams & Wilkins, Baltimore: 2216-2233
- Gregor D (1998).** Verwendung des *bgaH*-Reportergens aus *Haloferax alicantei* zur Analyse von Promotoren des Gasvesikeloperons. Diplomarbeit, TU-Darmstadt
- 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
- Guarente L (1995).** Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *TIBS* 20: 517-521
- Gutierrez MC, Kamekura M, Holmes ML, Dyll-Smith ML, Ventosa A in press\_2002).** "Taxonomic characterization of *Haloferax* sp. ("*H. alicantei*") strain Aa 2.2: description of *Haloferax lucentensis* sp. nov." *Extremophiles*
- Hain J, Reiter WD, Hüdepohl U, Zillig W (1992).** Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Research* 20: 5423-5428
- Hanahan D (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hanzelka BL, Darcy TJ, Reeve JN (2001).** TFE, an Archaeal Transcription Factor in *Methanobacterium thermonautotrophicum* Related to Eukaryal Transcription Factor TFIIE $\alpha$ . *J Bacteriol* 183: 1813-1818
- 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<sup>Val</sup> gene of *Methanococcus vannielii*. *J Biol Chem* 266: 495-508
- Hausner W, Thomm M (1993).** Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J Biol Chem* 268: 24047-24052
- Hausner W, Wettach J, Hethke C, Thomm M (1996).** Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* 271: 30144-30148
- Hausner W, Lange U, Musfeldt, (2000).** Transcription Factor S, a Cleavage Induction Factor of the Archaeal RNA Polymerase. *J Biol Chem* 275: 12393-12399
- Hayes PK, Buchholz B, Walsby AE (1992).** Gas vesicles are strengthened by the outer-surface protein, GvpC. *Arch Microbio* 157: 229-234
- Hethke C, Geerling AC, Hausner W, de Vos WM, Thomm M (1996).** A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* 15: 2369-2376
- Holmes ML, Nuttall SD, Dyll-Smith ML (1991).** Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *J Bacteriol* 173: 3807-3813
- Holmes ML, Scopes RK, Moritz RL, Simpson RJ, Englert C, Pfeifer F, Dyll-Smith ML (1997).** Purification and analysis of an extremely halophilic  $\beta$ -galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochim Biophys Acta* 1337: 276-386
- Holmes ML & Dyll-Smith ML (1990).** A Plasmid Vector with a Selectable Marker for Halophilic Archaeobacteria. *J Bacteriol* 172: 756-761
- Holmes ML & Dyll-Smith ML (2000).** Sequence and expression of a halobacterial  $\beta$ -galactosidase gene. *Mol Microbiol* 36: 114-122

- Horne M, Englert C, Pfeifer F (1988).** Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. *Mol Gen Genet* 213: 459-64
- Horne M & Pfeifer F (1989).** Expression of two gas vacuole protein genes in *Halobacterium halobium* and other related species. *Mol Gen Genet* 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. *Mol Microbiol* 5: 1159-1174
- Holt J, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994).** *Bergey's manual of determinative biology*. Williams and Wilkins.
- Huang L & Huang A (1974).** Regulation of membrane lipid fluidity in *Acholeplasma laidlawii*. Effect of carotenoid pigment content. *Biochem Biophys Acta* 352: 361-370
- Hüdepohl U, Reiter WD, Zillig W. (1990).** In vitro transcription of two rRNA genes of the archaeobacterium *Sulfolobus* sp. B12 indicates a factor requirement for specific initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5851-5855
- Jagannadham MV, Rao VJ, Shivaji S (1991).** The major carotenoid pigment of a psychrotrophic *Micrococcus roseus* strain: purification, structure, and interaction with synthetic membranes. *J Bacteriol* 173: 7911-7917
- Johnson AD (1995).** The price of repression. *Cell* 81: 655-658
- Jones JG, Hackett N, Haladay J, Scothorn D, Yang CNgW, DasSarms S (1989).** Analysis of insertion mutants reveals two genes in the gas vesicle gene cluster of *Halobacterium halobium*. *Nucleic Acids Res* 17: 7785-7793
- Jost M (1965).** Die Ultrastruktur von *Oscillatoria rubescens* D. C. *Arch Microbiol* 50: 211-245
- Juez G, Rodriguez-Valera F, Herrero N, Mojica FJ (1990).** Evidence for salt-associated restriction pattern modifications in the archaeobacterium *Haloferrax mediterranei*. *J Bacteriol* 172: 7278-7281
- Kamekura M, Dyal-Smith ML, Upasani V, Ventosa A, Kates M (1997).** Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 47: 853-857
- Kamekura M (1998).** Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* 2(3):289-95
- Kandler O, König H (1998).** Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* 54: 305-308
- Kawarabayasi Y, Sawada M, Horikawa H, Haikawa Y, Hino Y, Yamamoto S, Sekine M, Baba S, Kosugi H, Hosoyama A, Nagai Y, Sakai M, Ogura K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Ohfuku Y, Funahashi T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Kikuchi H (1998).** Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res* 5: 55-76
- Kawarabayasi Y, Hino Y, Horikawa H, Jin-no K, Takahashi M, Sekine M, Baba S, Ankai A, Kosugi H, Hosoyama A, Fukui S, Nagai Y, Nishijima K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Kato Y, Yoshizawa T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Masuda S, Yanagii M, Nishimura M, Yamagishi A, Oshima T, Kikuchi H (2001).** Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7. *DNA Res* 31: 123-40
- Ken R & Hackett N (1991).** *Halobacterium halobium* strains lysogenic for phage phi-H contain a protein resembling coliphage repressor. *J Bacteriol*. 173: 955-960
- Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA, Dodson RJ, Gwinn M, Hickey EK, Peterson JD, Richardson DL, Kerlavage AR, Graham DE,**

- Kyrpides NC, Fleischmann RD, Quackenbush J, Lee NH, Sutton GG, Gill S, Kirkness EF, Dougherty BA, McKenney K, Adams MD, Loftus B, Venter JC, et al. (1997).** The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390: 364-70
- Konopka AE, Staley JT, Lara JC (1975).** Gas vesicle assembly in *Microcycylus aquaticus*. *J Bacteriol* 122: 1301-1309
- Kosa PF, Gourishankar G, DeDecker BS, Sigler PB (1997).** The 2.1-Å crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein / transcription factor (II)B core / TATA-box. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6042-6047
- Krantz MJ, Ballou CE (1973).** Analysis of *Halobacterium halobium* gas vesicles. *J Bacteriol* 114: 1058-1067
- 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. *J Bacteriol* 178: 4012-4019
- Krüger K, Hermann T, Armbruster V, Pfeifer F (1998).** The Transcriptional Activator GvpE for the Halobacterial Gas Vesicle Genes Resembles a Basic Region Leucine-zipper Regulatory Protein. *J Mol Biol* 279: 761-771
- Kushner DJ (1995).** The Halobacteriaceae: 171-214. In Woese CR and Wolfe RS (ed.), the bacteria. A treatise on structure and function, vol. VIII. Archaeobacteria. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
- Kyrpides NC & Ouzounis CA (1995).** The eubacterial transcription activator Lrp is present in the Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *TIBS* 20: 140-141
- Lam W L & Doolittle W F (1989).** Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5478-5482
- Lanyi JK (1974).** Salt-Dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria *Bacteriol Rev* 38: 272-290
- Lanyi JK (1986).** Halorhodopsin: a light-driven chloride ion pump. *Annu Rev Biophys Chem* 15:11-28
- Littlefield O, Korkhin Y, Sigler PB (1999).** The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13668-13673
- Lottspeich F & Zorbas H (1998).** Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin
- Mayr A & Pfeifer F (1997).** The characterization of the *nv-gvpACNOFGH* gene cluster involved in gas vesicle synthesis in *Natronobacterium vacuolatum*. *Arch Microbiol* 168: 24-32
- McMaster TJ, Miles MJ, Walsby AE (1996).** Direct observation of protein secondary structure in gas vesicles by atomic force microscopy. *Biophys J* 70: 2432-2436
- Mojica FJ, Juez G, Rodriguez-Valera F (1993).** Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol* 9: 613-621
- Mullakhanbhai MF, Larsen H (1975).** *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea *halobacterium* with a moderate salt requirement. *Arch Microbiol* 104: 207-214
- Mwatha WE & Grant WD (1993).** *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from Lake Magadii, Kenya. *Int J System Bacteriol* 43: 401-404
- Napoli A, van der Oost J, Sensen CW, Charlebois RL, Rossi M, Ciaramella M (1999).** An Lrp-Like Protein of the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Which Binds to Its Own Promotor *J Bacteriol* 181: 1474-1480
- Ng WV, Ciufu S, Smith T, Bumgarner E, Baskin D, Faust J, Dall B, Loretz C, Seto J, Slagel J, Hood L, DasSarma S (1998).** Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic archaeon: Megaplasmid or minichromosome? *Genome Res* 8: 1131-1141

- Ng WV, Kennedy SP, Mahairas GG, Berquist B, Pan M, Shukla HD, Lasky SR, Baliga NS, Thorsson V, Sbrogna J, Swartzell S, Weir D, Hall J, Dahl TA, Welti R, Goo YA, Leithauser B, Keller K, Cruz R, Danson MJ, Hough DW, Maddocks DG, Jablonski PE, Krebs MP, Angevine CM, Dale H, Isenbarger TA, Peck RF, Pohlschroder M, Spudich JL, Jung KW, Alam M, Freitas T, Hou S, Daniels CJ, Dennis PP, Omer AD, Ehardt H, Lowe TM, Liang P, Riley M, Hood L, DasSarma S (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 24: 12176-12181
- Norton CF (1992). Rediscovering the Ecology of Halobacteria. *ASM News* 58: 363-367
- 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. *Mol Microbiol* 16: 9-19
- Offner S, Wanner G, Pfeifer F (1996). Functional studies of the gvpACNO operon of *Halobacterium salinarium* PHH1 reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *J Bacteriol* 178: 2071-2078
- Offner S, Ziese U, Wanner G, Typke D, Pfeifer F (1998). Structural characteristics of halobacterial gas vesicles. *Microbiology* 144: 1331-1342
- Offner S, Hofacker A, Wanner G, Pfeifer F (2000). Eight of Fourteen gvp Genes Are Sufficient for Formation of Gas Vesicles in Halophilic Archaea. *J Bacteriol* 182: 4328-4336
- Oren A (1994). The ecology of the extremely halophilic *FEMS Microbiol Rev* 13: 415-440
- Oren A (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 334-348
- Pabo CO, Sauer RT (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61: 1053-1095
- Palmer BR, Marinus MG (1994). The dam and dcm strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene* 143: 1-12
- Patenge N, Haase A, Bolhuis H, Oesterheldt D (2000). The gene for halophilic  $\beta$ -galactosidase (*bgaH*) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promotor analyses in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* 36: 105-113
- Pfeifer F, Griffig J, Oesterheldt D (1993). The *fdx* gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarium* (*H. halobium*). *Mol Gen Genet* 239: 66-71
- Pfeifer F, Ghahraman P (1993). Plasmid pHH1 of *Halobacterium salinarium*: characterization of the replicon region, the gas vesicle gene cluster and insertion elements. *Mol Gen Genet* 238: 193-200
- Pfeifer F, Offner S, Krüger K, Ghahraman P, Englert C (1994). Transformation of halophilic archaea and investigation of gas-vesicle synthesis. *Syst Appl Microbiol* 16: 569-577
- Pfeifer F, Krüger K, Röder R, Mayr A, Ziesche S, Offner S (1997). Gas vesicle formation in halophilic archaea. *Arch Microbiol* 167: 259-268
- Pfeifer F, Zotzel J, Kurenbach B, Röder R, Zimmermann (2001). A p-loop motif and two basic regions in the regulatory protein GvpD are important for the repression of gas vesicle formation in the archaeon *Haloferax mediterranei*. *Microbiology* 147: 63-73
- Pfeifer F, Gregor D, Hofacker A, Plößer P, Zimmermann P (2002). Regulation of Gas Vesicle Formation in Halophilic Archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 175-181
- Plößer P & Pfeifer F (2002). A bZIP protein from halophilic archaea: structural features and dimer formation of cGvpE from *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* 45: 511-520
- Plößer P (2002). Studien zum Transkriptionsaktivator cGvpE aus dem extrem halophilen Archaeon *Halobacterium salinarum* PHH4: ein basisches Leucinzipper-Protein. Dissertation, TU-Darmstadt
- Qureshi SA, Bell SD, Jackson SP (1997). Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J* 16: 2927-2936

- Qureshi SA & Jackson SP (1998).** Sequence-Specific DNA Binding by the *S. shibatae* TFIIB Homolog, TFB, and Its Effect on Promotor Strength. *Molecular Cell* 1: 389-400
- Reeve JN, Sandman K, Daniels CJ (1997).** Archaeal Histones, Nucleosomes, and Transcription Initiation. *Cell* 89: 999-1002
- Reiter WD, Hüdelpohl U, Zillig W (1990).** Mutational analysis of an archaebacterial promoter: Essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9509-9513
- Rodriguez-Valera F (1993).** Introduction to saline environments: 1-23. In Vreeland RH & Hochstein LL (ed.). The biology of halophilic bacteria. CRC Press, Inc Boca Raton, Fla
- Rodriguez-Valera F, Juez G, Kushner D (1983).** *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Sys Appl Microbiol* 4: 369-381
- Röder R & Pfeifer F (1996).** Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of *Haloferax mediterranei* and identification of the endogenous transcriptional activator gene. *Microbiology* 142: 1715-1723
- Röder R (1997).** Untersuchungen zur genetischen Regulation der Gasvesikelbildung bei dem halophilen Archaeon *Haloferax mediterranei*. Dissertation, TU-Darmstadt
- Rowlands, T., Baumann, P., Jackson, P. (1994).** The TATA-binding protein: A general transcription factor in eukaryotes and archaebacteria. *Science* 264: 1326-1329
- Sambrook & Russell (2001).** Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL. Third Edition Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Sartorius-Neef S (2000).** Untersuchungen zur Translation von Gasvesikelgenen in halophilen Archaea. Diplomarbeit, TU-Darmstadt
- 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. *Anal Biochem* 166: 368-379
- Sehgal SN & Gibbons NE (1960).** Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Microbiol* 6: 165-169
- Shear H & Walsby AE (1975).** An investigation into the possible light-shielding role of gas vacuoles in a planktonic blue-green algae. *Br Phycol J* 10: 241-251
- Simon R (1981).** Morphology and protein composition of gas vesicles from wild type and gas vacuole deficient strains of *Halobacterium salinarium* strain 5. *J Gen Microbiol* 125: 103-111
- Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, Aldredge T, Bashirzadeh R, Blakely D, Cook R, Gilbert K, Harrison D, Hoang L, Keagle P, Lumm W, Pothier B, Qiu D, Spadafora R, Vicaire R, Wang Y, Wierzbowski J, Gibson R, Jiwani N, Caruso A, Bush D, Reeve JN, et al.(1997).** Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* 179: 7135-7155
- Sniezko I, Dobson-Stone C, Klein A (1998).** The treA gene of *Bacillus subtilis* is a suitable reporter gene for the archaeon *Methanococcus voltae*. *FEMS Microbiol Lett* 164: 237-242
- Soppa J (1999a).** Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects. *Mol Microbiol* 31: 1295-1305
- Soppa J (1999b).** Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box. *Mol Microbiol* 31: 1589-1592
- Southern EM (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 5: 503-517
- Shporer M, Civan MM (1977).** Pulsed nuclear magnetic resonance study of 39K within halobacteria. *J Membr Biol* 12: 385-400

- She Q, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez MJ, Chan-Weiher CC, Clausen IG, Curtis BA, De Moors A, Erauso G, Fletcher C, Gordon PM, Heikamp-de Jong I, Jeffries AC, Kozera CJ, Medina N, Peng X, Thi-Ngoc HP, Redder P, Schenk ME, Theriault C, Tolstrup N, Charlebois RL, Doolittle WF, Duguet M, Gaasterland T, Garrett RA, Ragan MA, Sensen CW, Van der Oost J (2001).** The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA* 3: 7835-7840
- Stoeckenius W & Knau WH (1968).** Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membrane. *J Cell Biol* 38: 337-357
- Stoeckenius W, Bogomolni RA (1982).** Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Annu Rev Biochem* 51: 587-616
- Thomm M & Wich G (1988).** An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to TATA box of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 16: 151-163
- Thompson DK, Palmer JR, Daniels CJ (1999).** Expression and heat-responsive regulation of TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* 33: 1081-1092
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354
- Walsby AE (1969).** The permeability of blue-green alga gas-vacuole membranes to gas. *Proc R Soc London Ser B* 173: 235-255
- Walsby AE (1972).** Structure and function of gas vacuoles. *Bacterial Rev* 36: 1-32
- Walsby AE & Hayes P (1989).** Gas vesicle proteins. *Biochem J* 264: 313-322
- Walsby AE (1994).** Gas vesicles. *Microbiol Rev* 58: 94-144
- Woese CR & Fox GE (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5088-5090
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4576-4579
- Wolff EK, Bogomolni RA, Scherrer P, Hess B, Stoeckenius W (1986).** Color discrimination in halobacteria: spectroscopic characterization of a second sensory receptor covering the blue-green region of the spectrum. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7272-7276
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982).** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 24: 1214-1222
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 5: 103-119
- Zaccai G, Cendrin F, Haik Y, Borochoy N, Eisenberg H (1989).** Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *J Mol Biol* 208: 491-500
- Zhilina TN, Zavarzin GA (1979).** [Comparative cytology of *Methanosarcina* and a description of *Methanosarcina vacuolata* n. sp.] *Mikrobiologiya*. 48: 279-285 (russisch)

## ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Abb.	Abbildung
<i>bgaH</i>	Gen für halobakterielle Betagalatosidase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin; Carboxy-
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>fdx</i>	Gen für halobakterielles Ferredoxin
G	Guanin
<i>gvpX</i>	Gen X aus der vac-Region, <i>gas vesicle protein</i>
GvpX	Protein, Genprodukt von <i>gvpX</i>
h	Stunde(n)
<i>Hb.</i>	<i>Halobacterium</i>
<i>Hf.</i>	<i>Haloferax</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N-	Amino...
nt	Nukleotid(e)
ONPG	ortho-nitro-phenylgalaktosid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
T	Thymin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units oder Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vac	Gasvesikelphänotyp
v/v	Volumen pro Volumen
v/w	Volumen pro Gewicht
X-Gal	5-bromo-4-chlorindolyl- $\beta$ -D-galaktosid
ZT	Zimmertemperatur

## ANHANG

### Lebenslauf

Name	Dagmar Gregor	
Geburtstag	04.01.1972	
Geburtsort	Groß-Gerau	
Schulbildung	1978-1982	Grundschule Worfelden
	1982-1991	Gymnasium Theresianum Mainz
	1991	Abitur
Akademische Ausbildung	1991-1998	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
	1998	Diplomprüfung  Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt
	1998-2002	Promotionsarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt

## **Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt am Institut für Mikrobiologie und Genetik in der Zeit von Juli 1998 bis September 2002 angefertigt.

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

Darmstadt, den 18.09.2002

(Dagmar Gregor)