

Biochemie

**Natrium/Protonen-Antiporter und  
mechanosensitive Kanäle von  
*Halomonas elongata*:**

**Überlebensstrategien  
bei osmotischem Stress**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Matthias Kurz**

aus Dortmund

-2003-

Dekan: Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter: Prof. Dr. E. A. Galinski

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Galla

Tage der mündlichen Prüfungen: 28.04.2003

09.05.2003

12.05.2003

Tag der Promotion: 12.05.2003

All men dream: but not equally. Those who dream by night in the dusty recesses of their minds wake in the day to find that it was vanity: but the dreamers of the day are dangerous men, for they may act their dreams with open eyes, to make it possible. This I did.

T.E. Lawrence „of Arabia“



## **Vorwort**

Was heißt eigentlich extrem?

Der Mensch ist von seinen rein biologischen Ansprüchen her auf eine bestimmte Art von Lebensraum angewiesen. Optimale Bedingungen sind für ihn Temperaturen im Bereich von 15 bis 25°C (wenn wir einen Mitteleuropäer betrachten), pH 7,5, 21% Sauerstoff und 78% Stickstoff sowie Spuren anderer Gase in der Atmosphäre, ein Luftdruck von 1000 Hpa und ein Ozonschutzschild gegen ultraviolette Strahlung sowie ausreichend Wasser und abwechslungsreiche tierische und pflanzliche Nahrung, um nur ein paar wichtige Punkte zu nennen. Zu diesen Ansprüchen an seine Umgebung kommen in den sogenannten „zivilisierten Regionen“ die Errungenschaften der Technik, ohne die der Durchschnitt der Bevölkerung nicht mehr auskommen glaubt. Bestimmte gesellschaftliche Normen hinsichtlich des Lebensraumes ergänzen schließlich unsere Vorstellung von dem, was als „normal“ angesehen wird. Moralische Ansprüche an das Zusammenleben und gesetzliche Regelungen kommen hinzu.

Jemand der sich freiwillig außerhalb dieses Rahmens aufhält, und sei es auch nur für eine kurze (Urlaubs-)Zeit, findet sich rasch im Rollenklischee eines Außenseiters wieder. Der Volksmund spricht bewundernd, mitleidig lächelnd oder auch ablehnend von Extremsportlern, Abenteurern und Aussteigern. Ein negativer Unterton haftet allen diesen Begriffen an. Die betreffende Person bewegt sich außerhalb des „Normalen“. Technische Hilfsmittel werden in einigen Fällen eingesetzt, um das Überleben unter den extremen Bedingungen zu sichern. In anderen Fällen wiederum wird versucht, gänzlich auf technische Hilfsmittel zu verzichten und nur auf Ressourcen der Natur zuzugreifen. Eines haben alle diese „Abweichungen von der Norm“ gemeinsam: der Bereich optimaler (oder „normaler“) Lebensbedingungen wird verlassen, jedoch nur soweit, wie es dem betrachteten Individuum als tolerabel erscheint.

Menschliches Leben ist unter all diesen „extremen“ Bedingungen immer noch möglich. In der Regel wird von dem „Extremisten“ eine Verbesserung der Lebensqualität wahrgenommen.

Angesichts dieser Sicht des Begriffes „extrem“ ist es nicht verwunderlich, dass bestimmte Organismen damit bezeichnet werden. Sie leben und überleben unter Bedingungen, die für *Homo sapiens* auf kürzere oder längere Sicht schädlich oder sogar tödlich sind.

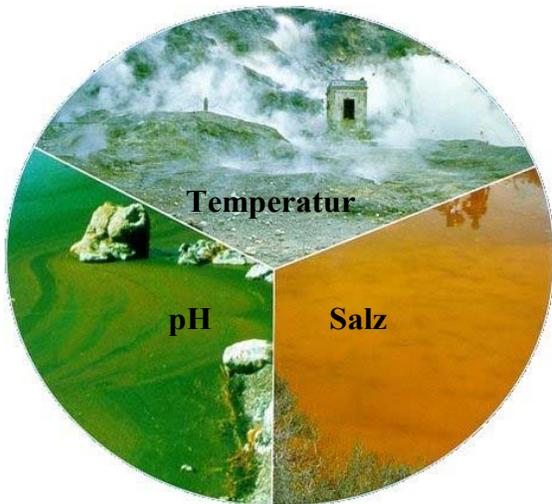


Abb. Vor.1: extreme Lebensräume [nach Tagungsband: Biotechnology of Extremophiles, Deckblatt, 1993]

Unter den „Extremophilen“ oder „Extremisten“ finden sich hauptsächlich Mikroorganismen. Zu ihren Lebensräumen gehören schweflige oder saure heiße Quellen, alkalische Seen, Salzseen, Gletscher und arktische Hochseegebiete. Unterschiedliche Mechanismen erlauben ihnen das Überleben in einer Vielfalt von Ökosystemen, die für den Menschen lebensfeindlich sind. Aus Sicht dieser Organismen sind sicherlich wir die „extreme“ Spezies.

Ein objektiver Betrachter wird in *Homo sapiens* nur eine Spezies von vielen sehen, die an ihre ökologische Nische angepasst ist und Werkzeuge nutzt; ein Extremsportler oder Aussteiger erscheint als ein Individuum, das in der Wahl seines Lebensraums nur geringfügig vom Durchschnitt abweicht.

Warum aber sich mit diesen Organismen beschäftigen? Zum einen geht natürlich eine gewisse Faszination von ihnen aus. Menschliche Neugier ist seit je eine der treibenden Kräfte jeglicher Forschungsaktivität. Es gibt jedoch auch wirtschaftliche Aspekte, die die Forschung an extremophilen Organismen vorantreiben. In der klassischen Verfahrenstechnik werden gerne die Parameter Druck, Temperatur, pH-Wert und Wasseraktivität variiert, um die Produktausbeuten zu optimieren. Dies steht oft im Widerspruch zu den Toleranzen der biologischen Materialien (z.B. Enzyme), die in der modernen Verfahrenstechnik ihren Platz gefunden haben. Extremophile Organismen schließen die Lücke zwischen Biologie und Technik. Sie liefern entweder direkt das Material, das unter den gegebenen Anforderungen ausreichend stabil ist oder sie weisen Wege zur Stabilisierung von Biomolekülen auf.

Eine aus menschlicher Sicht „extremophile“ Spezies ist *Halomonas elongata*, ein salztolerantes (moderat halophiles) Bakterium. Dessen Mechanismus zur Anpassung an einen wechselnden Salzgehalt (Salinität) der Umgebung beruht auf kleinen organischen Molekülen, die auch in hoher Konzentration keinen messbaren Einfluss auf den Stoffwechsel haben. Diese sogenannten kompatiblen Solute (bei *H. elongata* Ectoine) machen diesen Organismus nicht nur für die Molekularbiologie sondern mittlerweile auch für die Kosmetikindustrie interessant.



Abb. Vor.2: *Halomonas elongata*  
[Vreeland & Martin 1980]

Wie überlebt *Halomonas* den plötzlichen Wechsel von einem Medium mit hoher Salinität (oder generell hoher osmotischer Aktivität) in eines mit niedriger osmotischer Aktivität?

und

Wie verhindert *Halomonas*, dass bei hoher Salinität der Umgebung (Medium) die Salzkonzentration (Natriumkonzentration) im Zellinneren gefährlich hoch wird?

Das sind die beiden Fragen, zu deren Beantwortung diese Arbeit beitragen soll.



# **Inhalt**

<b>VORWORT .....</b>	<b>I</b>
<b>INHALT .....</b>	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
I.1.    EXTREME LEBENSÄUERE .....	1
I.2.    SALZADAPTATION .....	3
I.3.    ANWENDUNG, WIRKUNG UND PRODUKTION KOMPATIBLER SOLUTE .....	5
I.4.    MECHANOSENSITIVE KANÄLE .....	8
I.5.    NATRIUM/PROTONEN-ANTIPORTER .....	12
<b>II. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
II.1.    ORGANISMEN .....	15
II.2.    PLASMIDE .....	16
II.3.    MATERIALIEN .....	17
II.3.1. <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	17
II.3.1.1.    Primer .....	17
II.3.1.2.    spezielle Materialien für molekularbiologische Arbeiten .....	19
II.3.1.3.    Chemikalien und Medienbestandteile .....	20
II.3.2. <i>Geräte</i> .....	21
II.3.3. <i>Medien</i> .....	22
II.3.3.1.    alkalisches Komplexedmedium HKx (Horikoshi 1999) .....	22
II.3.3.2.    Fischpeptonmedium FPx (Frings 1995) .....	22
II.3.3.3.    Komplexedmedium ABx .....	23
II.3.3.4.    Komplexedmedium Kx (Severin et al. 1992) .....	23
II.3.3.5.    Luria Bertani Medium LBx .....	23
II.3.3.6.    Minimalmedium MM63x (Larsen et al. 1987) .....	23
II.3.4. <i>Lösungen für die Herstellung kompetenter Zellen</i> .....	24
II.3.5. <i>Lösungen für Agarose Gelelektrophorese</i> .....	24
II.3.6. <i>Lösungen für Southern-Transfer und -Hybridisierung</i> .....	25

II.4.	METHODEN .....	26
II.4.1.	<i>Kulturverfahren</i> .....	26
II.4.1.1.	Stammhaltung .....	26
II.4.1.2.	Flüssigkulturen .....	26
II.4.1.3.	Verfolgung des Zellwachstums .....	27
II.4.1.4.	Zellernte .....	27
II.4.2.	<i>osmotische Schocks</i> .....	28
II.4.2.1.	Durchführung .....	28
II.4.2.2.	Bestimmung der Überlebensrate .....	28
II.4.2.3.	Solutextraktion nach Bligh und Dyer [Bligh & Dyer, 1959] .....	29
II.4.2.4.	Bestimmung der Solutmenge durch HPLC .....	29
II.4.3.	<i>Herstellung kompetenter E. coli Zellen</i> .....	30
II.4.4.	<i>Transformation und Test kompetenter Zellen</i> .....	30
II.4.5.	<i>Isolierung von Nukleinsäuren</i> .....	31
II.4.5.1.	Gesamt DNA .....	31
II.4.5.2.	Gesamt RNA .....	31
II.4.5.3.	Plasmid DNA .....	31
II.4.6.	<i>Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren</i> .....	31
II.4.7.	<i>Manipulation von Nukleinsäuren</i> .....	31
II.4.8.	<i>Agarose Gelelektrophorese</i> .....	32
II.4.8.1.	DNA .....	32
II.4.8.2.	RNA .....	32
II.4.8.3.	Detektion und Größenbestimmung von DNA Fragmenten .....	32
II.4.8.4.	Präparative Aufreinigung von DNA mit Agarosegelen .....	32
II.4.9.	<i>Amplifikation von DNA mittels Polymerase Kettenreaktion</i> .....	33
II.4.9.1.	Touchdown-PCR .....	34
II.4.9.2.	Primer Walking .....	35
II.4.9.3.	RACE nach Bertioli & Burrows [1994] .....	36
II.4.9.4.	Inverse PCR .....	37
II.4.10.	<i>Quantifizierung von mRNA mittels Realtime PCR</i> .....	39
II.4.11.	<i>Southern-Hybridisierung</i> .....	41
II.4.11.1.	Konstruktion Digoxigenin-markierter Sonden .....	41
II.4.11.2.	Southern-Transfer .....	41
II.4.11.3.	Immunologischer Nachweis .....	42
II.4.12.	<i>Transposon-Mutagenese</i> .....	43
II.4.13.	<i>Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Identifizierung teilweise lysierter Bakterienkulturen</i> .....	44
II.4.13.1.	Untersuchungen an <i>E. coli</i> .....	45
II.4.13.2.	Untersuchungen an <i>H. elongata</i> .....	46
II.4.14.	<i>elektrophysiologische Messungen</i> .....	47
II.4.14.1.	Herstellung von Riesensphäroplasten .....	47
II.4.14.2.	Membranisolierung und Konstruktion von Riesenliposomen .....	47
II.4.14.3.	patch-clamp Messungen .....	48
II.4.15.	<i>Analyse der nhaD Expression in H. elongata</i> .....	49

II.4.16.	<i>Inaktivierung von nhaD</i> .....	49
II.4.16.1.	Konstruktion von pKHeAP $\Omega$ 1 .....	50
II.4.17.	<i>Expression von H. elongata nhaD in E. coli</i> .....	51
II.4.17.1.	Konstruktion des Expressionsvektors pUCHelNhaD .....	52
II.4.18.	<i>Sequenzierung</i> .....	53
II.4.19.	<i>Sequenzanalyse</i> .....	53
II.4.19.1.	Datenbankrecherche .....	53
II.4.19.2.	Sequenzvergleich .....	53
II.4.19.3.	Promotoranalyse .....	53
II.4.19.4.	Aminosäuresequenz-Analyse .....	53
II.4.19.5.	Phylogenetischer Baum .....	53
II.4.20.	<i>Sequenzbearbeitung und -darstellung</i> .....	53
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>55</b>
III.1.	MECHANOSENSITIVE KANÄLE .....	55
III.1.1.	<i>Sequenzvergleich bei Msc's</i> .....	55
III.1.2.	<i>Southern-Hybridisierung</i> .....	57
III.1.3.	<i>PCR an H. elongata</i> .....	58
III.1.4.	<i>Wirkung osmotischer Schocks bei H. elongata, E. coli und M. halophilus</i> .....	60
III.1.4.1.	Überlebensraten nach hypoosmotischem Schock .....	60
III.1.4.2.	Bedeutung der Zellwand.....	63
III.1.4.3.	Überblick über die Schocktoleranz von <i>H. elongata</i> .....	64
III.1.4.4.	Solutgehalte nach osmotischem Downschock .....	66
III.1.5.	<i>Schockexperimente an „Lake Bogoria“ Isolat 25B1</i> .....	67
III.1.6.	<i>Entwicklung einer Screening Methode für Kanaldefekt-Mutanten</i> .....	68
III.1.7.	<i>Transposon-Mutagenese und Screening</i> .....	71
III.1.8.	<i>Elektrophysiologische Untersuchungen zum Nachweis mechanosensitiver Kanäle</i> .....	72
III.2.	NATRIUM/PROTONEN-ANTIORTER VOM TYP NHAD .....	74
III.2.1.	<i>H. elongata und LBI 25B1</i> .....	74
III.2.1.1.	DNA Sequenzanalyse .....	74
III.2.1.2.	Sequenzvergleich mit NHADs anderer Organismen .....	79
III.2.1.3.	Strukturvorhersage.....	81
III.2.2.	<i>Expression von nhaD in H. elongata</i> .....	84
III.2.3.	<i>Inaktivierung von H. elongata nhaD</i> .....	86
III.2.4.	<i>Expression von nhaD in E. coli</i> .....	87

---

<b>IV. DISKUSSION</b> .....	<b>91</b>
IV.1. OSMOADAPTATION UND SALZSTRESS .....	91
IV.2. UNTERSUCHUNGEN AN BAKTERIENPOPULATIONEN .....	92
IV.3. ENTWICKLUNG EINES SCREENINGVERFAHRENS ZUR DETEKTION VON ZELLPOPULATIONEN MIT GESTÖRTER MEMBRANINTEGRITÄT UNTER HYPOOSMOTISCHEM STRESS.....	93
IV.4. PHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG MECHANOSENSITIVER KANÄLE BEI <i>H. ELONGATA</i> .....	99
IV.5. ENTWICKLUNG VON DEGENERIERTEN PRIMERN ZUR AMPLIFIKATION DER GENE MECHANOSENSITIVER KANÄLE VON <i>H. ELONGATA</i> .....	102
IV.6. NATRIUM/PROTONEN ANTIPORTER MARINER ORGANISMEN .....	105
IV.7. REGULATION DER EXPRESSION VON <i>H. ELONGATA NHAD</i> .....	106
IV.8. KOMPENSATION DES VERLUSTES VON <i>E. COLI NHAA</i> DURCH <i>H. ELONGATA NHAD</i> .....	109
IV.9. AUSBLICK .....	111
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>115</b>
<b>QUELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>A1</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>A19</b>
<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>A21</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

$a_w$	Wasseraktivität
Bp	Basenpaare, Längenbezeichnung für DNA Fragmente
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
cDNA	komplementäre DNA
dsDNA	doppelsträngige DNA (double stranded)
ssDNA	einzelsträngige DNA (single stranded)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Massenangaben: Gramm Zentrifugen: Vielfaches der Erdbeschleunigung
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	demineralisiertes Wasser
<i>H. elongata</i>	<i>Halomonas elongata</i>
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography)
kbE	Koloniebildende Einheiten
LBI 25B1	Lake Bogoria Isolat 25B1
M	Molarität, Abkürzung für mol/L
<i>M. halophilus</i>	<i>Marinococcus halophilus</i>
Msc('s)	mechanosensitiver Kanal (mechanosensitive channel) (pl.)
MscL (S, M)	mechanosensitiver Kanal hoher (kleiner, geringer) Leitfähigkeit (mechanosensitive channel large (small, micro) conductance)
Nha('s)	Natrium/Protonen Antiporter (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter) (pl.)
NhaA (B, C, D)	Natrium/Protonen Antiporter vom Typ A (B, C, D)
OD	optische Dichte (Absorption)
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH <sub>i</sub>	Intrazellulärer pH-Wert
TBM	Trockenbiomasse
t <sub>D</sub>	Verdopplungszeit [h]
w/v	Konzentration: Gewicht pro Volumen (weight per volume)



# **I. Einleitung**

## **I.1. Extreme Lebensräume**

Ein Großteil der irdischen Flora und Fauna stellt ähnliche Ansprüche an ihre Habitate wie der Mensch. Doch bereits bei unseren nächsten Verwandten, den Säugetieren, gibt es Spezies, die sich in Lebensräumen wohlfühlen, an die sich *Homo sapiens* nur schwer gewöhnen, oder in denen er nur unter Zuhilfenahme von Technik längere Zeit überleben kann. Man denke hier an die Wüstenspringmaus (*Jaculus orientalis*), den Polarfuchs (*Alopex canis lagopus*) oder den Pottwal (*Physeter macrocephalus*).

Darüber hinaus gibt es Organismen, die an ökologische Nischen mit noch extremeren Umweltbedingungen angepasst sind. Zu ihren Habitaten gehören Geysire (Thermophile und Hyperthermophile), das ewige Eis der Polargebiete (Psychrophile), extrem saure Gewässer (Acidophile) sowie Sodaseen (Alkaliphile), wobei letztere auch den geologischen Formationen mit geringer Wasseraktivität wie Salinen und Salzseen (Halophile) zuzuordnen sind. Man unterscheidet Lebewesen, die die extremen Bedingungen lediglich tolerieren von solchen, für die sie zwingend notwendig sind. So hat zum Beispiel der hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* sein Temperaturoptimum im Bereich zwischen 70 und 100°C und wächst unterhalb von 45°C nicht mehr.

Diese Organismen gehören größtenteils, jedoch nicht ausschließlich, zu den *Bacteria* und *Archaea*. Beispiele sind *Spirulina*, eine alkaliphiles Cyanobakterium und *Sphagnum*, eine Moosart, die in sauren Seen Südnorwegens beheimatet ist. Die „Rekorde“ werden fast alle von *Bacteria* und *Archaea* gehalten [<http://www.g-o.de/kap4a/40ed0050.htm>]:

- Hitze: 113°C *Pyrolobus fumarii*
- Kälte: -15°C Mikroalgen (Cryptoendolithotrophe)
- Säure: pH < 0 *Picrophilus torridus*
- Base: pH > 10 *Natronobacterium pharaonis*
- Druck >1000 Atm Seegurken (*Scytopetalaceae*)
- Strahlung: > 3 Mrad *Deinococcus radiodurans*
- Salz: > 5 M *Halobacteriaceae*

In einigen Fällen liegt auch Anpassung an mehrere Extreme vor, wie bei dem haloalkaliphilen fakultativ anaeroben Lake Bogoria Isolat 25B1 [Duckworth et al. 2000] oder bei *Deinococcus radiodurans* [Anderson et al. 1956, <http://deinococcus.allbio.org/>]. Letzterem hat seine Fähigkeit

außer radioaktiver Strahlung eine ganze Reihe von Umweltextremen zu überstehen, unter anderem Vakuum, Kälte und oxidative Schäden, den Titel „Conan das Bakterium“ eingetragen - in Anlehnung an den Fantasy-Film „Conan der Barbar“ (1982, mit Arnold Schwarzenegger). Es gibt bereits Spekulationen hinsichtlich der Weltraumtauglichkeit von *D. radiodurans*. Extremophile erscheinen in ihrer Gesamtheit somit als ideale Modellorganismen, wenn es um Überlegungen zum Aufbau extraterrestrischer Lebensformen geht [Litchfield 1998, [http://science.nasa.gov/newhome/headlines/ast14dec99\\_1.htm](http://science.nasa.gov/newhome/headlines/ast14dec99_1.htm)].

Genauso vielfältig wie die Lebensräume, die sie besiedeln, sind die Anpassungsmechanismen, die die Extremophilen entwickelt haben. Sie betreffen alle Bestandteile der Zelle: Proteine, Nukleinsäuren, Membranen und Cytosol. Auf Ebene der Membranen erfolgt beispielsweise eine Variation des Schmelzpunktes je nach Umgebungstemperatur, aber auch in Abhängigkeit von der Salinität [Vreeland 1984, Adams & Russel 1992]. Zum Schutz von DNA und Proteinen vor thermischer Denaturierung werden spezielle Proteine (Chaperone) synthetisiert. Auch auf Ebene der Proteine findet eine Anpassung an extreme Umweltbedingungen statt, sowohl hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung als auch der Struktur [Reviews: Hough & Danson 1999, Madigan & Oren 1999, Jaenicke 2000]. Eine geringerer Glycin-Anteil vermindert die Anfälligkeit gegenüber thermischer Auffaltung, während bei halophilen Organismen ein hoher Anteil saurer Aminosäuren an der Oberfläche eine hohe cytosolische Konzentration von  $\text{Na}^+$  und / oder  $\text{K}^+$  kompensiert.

Diese Schutzmechanismen, die eine Besiedlung der für uns unwirtlichen Räume ermöglichen, sind es auch, die das Interesse der Industrie an extremophilen Organismen geweckt haben. In Lösungen der Probleme beim Umgang mit diesen Organismen wurde viel investiert. Als Beispiel seien Fermentationsanlagen für Halophile auf Kunststoffbasis genannt, welche im Gegensatz zu Edelstahlkonstruktionen auch bei einem hohen Salzgehalt der Medien nicht korrodieren. Gleichzeitig erlaubt der Einsatz extremophiler Organismen einen geringeren Aufwand hinsichtlich der Sterilität der Prozesse: Die Wachstumsbedingungen sind für andere Organismen in der Regel derartig widrig, dass nur selten Kontaminationen auftreten.

Mittlerweile haben Extremophile und die aus ihnen gewonnenen Produkte ihre angestammte Umgebung und auch die Laboratorien verlassen. Sie begegnen uns im Haushalt nicht mehr nur als Lebensmittel verderbende Kontaminanten auf gekühlter oder gepökelter Nahrung. Enzyme aus alkaliphilen Organismen werden längst in Waschmitteln eingesetzt, ihre Pendanten aus Thermophilen folgen vermutlich in den nächsten Jahren. Protektive Stoffe (Ectoine [Galinski1986]) zur Stabilisierung von Enzymen und Nukleinsäure, die mittlerweile auch

Bestandteil von Hautcremes sind (Hydro-CellLife, Fa. Marbert, Düsseldorf; Seba Med Micro 100, Fa. Sebapharm GmbH & Co. KG, Bad Salzig), haben in letzter Zeit die Halophilen zu einem lukrativen Forschungsobjekt gemacht.

## 1.2. Salzadaptation

Gedanken über Salz macht man sich, wenn überhaupt, beim Würzen von Nahrungsmitteln oder im Winter, wenn es seinen Einsatz im Straßenverkehr findet. Man sollte jedoch nicht den klassischen Gebrauch vergessen: Salz ist das älteste Konservierungsmittel, das die Menschheit kennt. Trotz der exzessiven Mengen, die bei der Haltbarmachung von Fleisch oder Häuten benutzt wurden, traten immer wieder pinke Verfärbungen der konservierten Ware oder pinke „Salzflecken“ auf. Dies war besonders in der Fischindustrie ein Problem, das nach einer Lösung und damit erst einmal nach einer Erklärung verlangte. Als Verursacher identifizierte man Mikroorganismen [Kellerman 1915, Browne 1922], ein nicht ganz unerwarteter Fund. Allerdings war man überrascht, dass die Kontaminationen ihre Ursache tatsächlich in der extremen Salztoleranz (über 25%) der isolierten Organismen, halophile *Archaea*, hatte und nicht in einer mangelhaften Konservierungstechnik.

Zwei Probleme sind bei der Adaptation an eine hochgradig saline Umgebung zu bewältigen. Das eine ist die mangelnde Verfügbarkeit von Wasser, die man durch eine verringerte Wasseraktivität ( $a_w$ ) beschreiben kann [Brock et al. 1994]. Es steht nicht mehr ausreichend Wasser zur Verfügung, um zum Beispiel Nährstoffe zu solubilisieren. Im Vergleich zu destilliertem Wasser ( $a_w = 1,00$ ) zeigen bereits frische Lebensmittel wie Brot eine leicht verringerte Wasseraktivität (0,90), wohingegen gepökelte Lebensmittel wie gesalzener Fisch ( $a_w = 0,75$ ), oder Trockennahrung wie Kekse ( $a_w = 0,70$ ) eine Wasseraktivität aufweisen, bei der kaum noch Wachstum beobachtet wird. Die Grenze für Wachstum wurde mit  $a_w = 0,72$  bestimmt [Brock et al. 1994]. Dieser Wert wird von gesättigten Salzlösungen unterschritten ( $a_w < 0,70$ ). Salopp ausgedrückt ist eine solche Salzlösung „trocken wie ein Keks“, was sehr anschaulich zeigt, dass trockene Habitate und solche mit hoher osmotischer Aktivität ähnliche Anforderungen an die Bewohner stellen.

Einher mit einer verminderten Wasseraktivität in der Umgebung geht osmotischer Stress. Da die Cytoplasmamembran lebender Organismen keine Diffusionsbarriere für Wasser darstellt, würde ein osmotisches Gefälle zu starkem Wasserverlust und letztendlich zum Austrocknen führen. Um dem entgegenzuwirken muss die intrazelluläre Osmolarität angepasst werden [Review: Csonka & Epstein 1996], ein Prozess, der sehr eng mit einer Reihe

zellphysiologischer Phänomene verknüpft ist, wie interner pH [Booth 1985] und Ionenstärke [Richey et al. 1987], Hitze- [Tesone et al. 1981] sowie Kältetoleranz [Ko et al. 1994]. Es gibt zwei Strategien, mit denen Bakterien dem Wasserverlust entgegenwirken: „salt-in-cytoplasm“- und „organic-osmolyte“-Strategie.

Extrem halophile *Archaea* und viele anaerobe halophile *Bacteria* sind an Standorten zu finden, die konstant hohe Salinitäten (> 10 bis 15% w/v) aufweisen. Sie gleichen das osmotische Gefälle durch Akkumulation molarer Mengen an KCl bzw. NaCl im Cytosol aus. [Oren 1986, Galinski 1995]. Der Nachteil dieser „salt-in“ Strategie ist, dass sämtliche Zellkomponenten an die hohe Salzkonzentration angepasst sein müssen. Besonders der Enzymapparat der extrem halophilen Spezies benötigt zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und damit der Funktion hohe Konzentrationen an  $K^+$  oder  $Na^+$ . Mit einem hohen Anteil an sauren Proteinen [Hough & Danson 1997, 1999] sind die Organismen auf Hochsalz-Habitate beschränkt.

Eine Möglichkeit wesentlich flexibler auf wechselnde osmotische Verhältnisse zu reagieren bietet die Verwendung kompatibler Solute [Galinski 1995, Lengler et al. 1999, Poolman & Glasker 1998]. Dies sind kleine, gut wasserlösliche, organische Moleküle die bei neutralem pH-Wert ungeladen sind. Sie interferieren auch in molaren Konzentrationen kaum mit dem Zellstoffwechsel („kompatibel“ [Brown 1976]) wodurch auf eine Anpassung der Proteine verzichtet werden kann. Gefunden wird die „organic-osmolyte“ Strategie bei halotoleranten oder halophilen heterotroph anaeroben, fakultativ anaeroben und phototrophen *Bacteria* sowie bei methanogenen *Archaea* die in einen breiten Spektrum an Salinität (0,2 - 25% Salz w/v) Lebensräume besiedeln, darunter auch solche mit stark schwankendem Salzgehalt. Die Solute werden entweder *de novo* synthetisiert [Göller 1999] oder, wenn vorhanden, aus dem Medium aufgenommen [Jebbar et al. 1997, Peter et al. 1998].

Kompatible Solute entstammen verschiedenen Stoffklassen: Zucker, Polyole, Aminosäuren und deren Derivate sowie Tetrahydropyrimidine. Einen Überblick über die verschiedenen Solute geben Galinski [1995] und da Costa et al. [1998]. Neben ihrer Funktion als Osmotikum zum Ausgleich eines osmotischen Gefälles und damit zur Retention von Wasser wirken kompatible Solute auch als stabilisierende Agenzien für Proteine und andere Zellkomponenten gegen Denaturierungsstress. Bei halophilen Bakterien findet man neben Gycinbetain hauptsächlich die Tetrahydropyrimidinderivate Ectoin und Hydroxyectoin [Galinski et al. 1985, Galinski 1993, 1995]. Diese sind mit einer wesentlich günstigeren

Energiebilanz zu synthetisieren als zum Beispiel Trehalose, die von nicht-halophilen Bakterien unter osmotischem Stress verwendet wird [Oren 1999]. Darüber hinaus würde die Akkumulation von Trehalose in molaren Mengen zu Viskositätsproblemen führen.

### **1.3. Anwendung, Wirkung und Produktion kompatibler Solute**

Die bereits angesprochene stabilisierende Wirkung kompatibler Solute auf Zellkomponenten gegen verschiedene denaturierende Stressfaktoren lässt diesen eine große Bedeutung in der rasch wachsenden Landschaft der „Life Science“ zukommen. Nicht nur in Forschung und Entwicklung sowie in der Produktion steigt der Bedarf an biologischem Verbrauchsmaterial: Zahlreiche Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, forensische Methoden und nicht zuletzt die Umweltanalytik stützen sich zunehmend auf Nachweise auf der Basis von empfindlichen Biomolekülen. Erhöhter Bedarf, einfache Handhabung sowie Lagerfähigkeit erfordern stabilisierende Additive, wobei sich kompatible Solute als gute Kandidaten erwiesen haben. Der genaue Mechanismus nach dem kompatible Solute einer Denaturierung entgegenwirken ist noch nicht bekannt, es werden aber verschiedene Ansätze diskutiert [Clegg et al. 1982, Arakawa & Timasheff 1983, Wiggins 1990, Liu & Bolen 1995]. Es gibt jedoch eine Reihe empirischer Nachweise der stabilisierenden Wirkung *in vivo* und *in vitro*.

Ein oft verwendetes Konservierungsverfahren ist die Trocknung von Bakterienpräparaten. Es konnte unter anderem von Louis [1994] und Karla [1997] gezeigt werden, dass die Überlebensrate nach der Rekonstituierung bei den Bakterienpräparaten deutlich höher ist, die in Gegenwart von Trehalose oder Saccharose getrocknet wurden, als bei solchen, denen das Wasser in Abwesenheit von Schutzstoffen entzogen wurde. Glycinbetain bietet verschiedenen Enzymen und hitzeempfindlichen *E. coli* Mutanten Schutz vor thermischer Denaturierung bzw. Inaktivierung [Caldas et al. 1999]. Eine mögliche Anwendung dieses Effekts in der Diagnostik zeichnet sich durch die Untersuchungen zur thermostabilisierenden Wirkung von Ectoin auf Antikörper und -konjugate durch Kaufmann et al. [1999] ab. Analog zum Hitzestress lässt sich ein positiver Einfluss von Glycinbetain auf die Haltbarkeit von Enzymen unter Kältestress beobachten [Lippert & Galinski 1992]. Wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen sind gerade bei molekularbiologischen Anwendungen ein typischer Stressfaktor. Bei Untersuchungen an dem Modellenzym Lactatdehydrogenase (LDH) zeigt sich jedoch, dass Tetrahydropyrimidine einen deutlich stärkeren Effekt als Glycinbetain aufweisen [Lippert & Galinski 1992, Göller 1999, Knapp et al. 1999].

Das breite Wirkungsspektrum der kompatiblen Solute hat auch das Interesse der kosmetischen Industrie geweckt. Nachdem eine schützende Wirkung der Ectoine für die menschliche Haut

nachgewiesen werden konnte [Bünger 1998 & 1999], kam im September 2000 die erste kosmetische Formulierung auf der Basis von Ectoin, dem Solut aus *Halomonas elongata* (RonaCare™, Firma Merck, Darmstadt) auf den Markt.

Nicht zuletzt der höhere Bedarf der kosmetischen Industrie bei einer Erweiterung der Produktpalette weg von der Exklusivität hin zum breiten Markt macht effektive und kostengünstige Produktionsverfahren notwendig. Ein bereits bestehendes Fermentationsverfahren zur Gewinnung von Ectoin aus *H. elongata*, das auch von der Firma Merck angewandt wird, beruht auf dem von Galinski und Sauer entwickelten „Bakterienmelken“ [1998].

In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen produziert *H. elongata* entweder Ectoin allein oder als Hauptsolut in Kombination mit Hydroxyectoin [Wohlfarth et al. 1990]. Zur Ectoinproduktion wird *H. elongata* in einem Fed-Batch-Prozess bei Glucosefütterung zunächst zu Zelldichten von 30 bis 40 g/l Trockenbiomasse (TBM) angezogen. Anschließend erfolgt eine Inkubation in Medien mit abwechselnd hoher und niedriger Salinität. Unter Hochsalzbedingungen produziert der Organismus zum Ausgleich des osmotischen Gefälles Ectoin, der Massenanteil liegt bei 15 bis 20% der TBM. Wird durch Verdünnen des Kulturmediums dessen Osmolarität gesenkt (hyposmotischer Schock) droht eine Erhöhung des Turgors durch eindiffundierendes Wasser und Lyse der Zellen. Als Antwort entlässt daher *H. elongata* seine Solute in das Medium. Durch einfache Verfahren, zum Beispiel Querstromfiltration [Bailey & Meagher 1997], lassen sich die Produkte in einer zellrümmerfreien Lösung von der Bakteriensuspension trennen.

Der Mechanismus nach dem der Solutausfluss erfolgt, ist für *H. elongata* noch nicht geklärt. Es ist jedoch zu vermuten, dass mechanosensitive Kanäle [Msc's, siehe Kapitel I.4] daran beteiligt sind. Diese öffnen bei steigendem Turgor und damit steigender Membranspannung, was zu einem nicht-selektiven Ausfluss cytoplasmatischer Bestandteile führt. Msc's sind bei einer Reihe von Mikroorganismen, die hyposmotische Schocks nahezu unbeschadet überleben, nachgewiesen worden und bei *E. coli* bislang am besten untersucht [Levina et al. 1999].

Für die Produktion der Ectoine existieren verschiedene Verbesserungsansätze:

Die Entwicklung eines Hochzelldichtekulturverfahrens mit dem haloalkaliphilen anaeroben Lake Bogoria Isolat 25B1 (LBI 25B1) [Karla 2000] verspricht die Produktion von Hydroxyectoin freiem Ectoin in größerem Maßstab.

Die Produktion von Hydroxyectoin wird mit der Fermentation von *M. halophilus* angestrebt. Eine Kultivierung ist hier auch unter aeroben Bedingungen zu hohen Zelldichten möglich,

wobei man unter spezifischen Bedingungen ausschließlich Hydroxyectoin als Produkt erhält [Frings et al. 1995b; Kurz, Münster, unveröffentlicht]. Ein Nachteil von *M. halophilus* ist, dass der Organismus unter Standardbedingungen nicht melkbar ist. Aber es gibt mittlerweile auch hier einen Lösungsansatz [Schiraldi, Neapel, unveröffentlicht].

Die bislang angesprochenen Verfahren beruhen auf einer Produktion mit Naturstämmen, die im Gegensatz zu gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) in der Bevölkerung eine größere Akzeptanz erfahren. Im weiteren unterliegen die technischen Anlagen bei den angesprochenen Produktionsstämmen niedrigeren Sicherheitsvorschriften. Es gibt jedoch auch Ansätze zur Expression der Ectoinogene von *Marinococcus halophilus* und der Produktion von Ectoin in *E. coli* [Bestvater 2001], sowie einer Modifikation des Produktionsstammes *H. elongata* zur Steigerung der Ausbeute [Kunte, Bonn, Patent in Vorbereitung].

Eine weitere interessante Idee liegt in der Darstellung von Ectoinen und Ectoinanaloga durch chemische Synthese [Koichi et al. 1991, Voss 2002]. Durch Modifikation von Strukturelementen ergibt sich auch die Möglichkeit, die Wirkungsweise der Solute auf struktureller Ebene besser zu verstehen [Galinski et al. 2001]. Aufgrund der stereochemischen Eigenschaften der Produkte ergeben sich jedoch zum Teil erhebliche Probleme, die eine Produktion über den Labormaßstab hinaus zu diesem Zeitpunkt unwirtschaftlich machen.

Forschung an den Mechanismen der Salzadaptation und Solutproduktion bei Mikroorganismen sind nicht nur daher auch weiterhin von Interesse.

Zwei der Mechanismen, die *Halomonas elongata* ermöglichen osmotischen Stress zu überleben, sind Gegenstand dieser Arbeit. Mechanosensitive Kanäle (Msc's) ermöglichen einen unbeschadeten raschen Wechsel von Medien hoher Osmolarität in solche mit niedriger, während Natrium/Protonen-Antiporter (Nha's) in Medien hoher Salinität für Na<sup>+</sup>-Homöostase sorgen. Nicht nur die eigentliche Funktion im prokaryotischen Organismus, sondern auch die Diversifikation der Funktion im Verlauf der Evolution, die Übernahme weiterer Aufgaben in höheren Organismen, machen diese Systeme zu interessanten Forschungsobjekten.

## 1.4. Mechanosensitive Kanäle

Mechanosensitive Kanäle (Msc's) sind bei dem zur Zeit verwendeten Verfahren zur Produktion von Ectoin durch Fermentation von *H. elongata* der wahrscheinlichste Mechanismus zur Ausschleusung der Solute nach einem hypoosmotischen Schock. Die Funktionen von Msc's sind jedoch weitaus vielfältiger.

Msc's treten in allen drei Zweigen des phylogenetischen Stammbaums in Erscheinung, bei *Archaea*, *Bacteria* und *Eucarya*. Dies deutet auf einen frühen evolutionären Ursprung hin. Des Weiteren führt die offensichtliche Notwendigkeit von Wasser für die Existenz irdischen Lebens zu dem Schluss, dass Msc's in ihren Ursprüngen allein der Osmoregulation dienen, einer Funktion, die sie bei *Archaea* und *Bacteria* auch heute noch besitzen [Sackin 1995, Sachs & Morris 1998]. Zusätzlich sind Msc's in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen zu finden, bei Tastsinn und Schmerzempfindung [Burnstock & Wood 1996], Gehör [Howard et al. 1988, Hackney & Furness 1995], Blutdruckregulation [Chapleau 1992], Turgorkontrolle bei Pflanzenzellen sowie Zellwachstum [Duncan & Turner 1995] und Regulation des Zellvolumens [Nichol & Hutter 1996]. Dies alles deutet darauf hin, dass die Wahrnehmung mechanischer Reize zu den ältesten der Signalwege gehört, die sich entwickelt haben. Interessanterweise ist die Summe der Informationen, die das menschliche Gehirn von mechanisch stimulierten Rezeptoren erhält, größer als die Summe der Informationen aller übrigen Sinneswahrnehmungen [Detweiler 1989].

Trotz der erkennbar großen Bedeutung der Wahrnehmung mechanischer Reize erschloss sich deren molekulare Basis erst verhältnismäßig spät mit dem Aufkommen der patch-clamp Techniken [Hamill et al. 1981]. Nach Messungen an Hühnerembryos [Guharay & Sachs 1984] und *Xenopus laevis* [Brehm et al. 1984] wurden von Martinac et al. [1987] Msc's in *E. coli* und damit erstmalig bei *Bacteria* beschrieben. Beobachtungen in *Archaea* sind verhältnismäßig junges Datum [Le Dain et al. 1998].

Unter den bekannten prokaryotischen Msc's sind die von *E. coli* am besten charakterisiert. Es lassen sich drei Typen nachweisen, die nach der Stärke ihrer Leitfähigkeit mit MscL, MscS und MscM (aus dem Englischen: Large, Small und Micro) bezeichnet werden [Berrier et al. 1996]. Durch Unterdruck, der mit einer Patch-Pipette angelegt wird, können die Kanäle geöffnet werden. Der notwendige Unterdruck ist dabei um so größer, je größer die Leitfähigkeit des Msc ist. Dies haben Messungen an rekonstituierten Liposomen [Delcour et al. 1989, Häse et al. 1995] und Riesen-Sphäroplasten [Sukharev et al. 1997] ergeben. Msc's

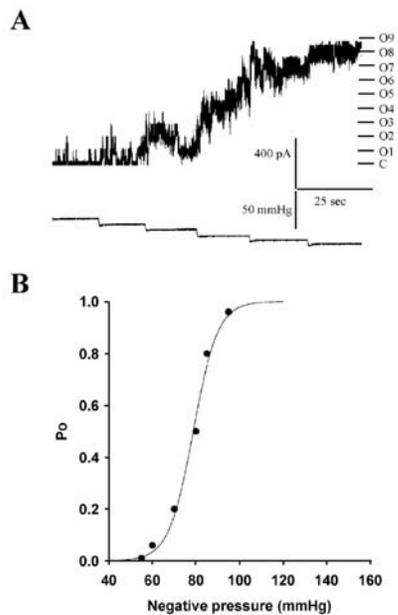


Abb. I.1: Aktivierung von in Liposomen rekonstituierte MscL [Martinac et al. 2001]:  
**A)** Verlauf von Leitfähigkeit (Stromstärke I bei einer Pipettenspannung  $V = 30\text{mV}$ ) MscL (oberen) und Unterdruck (untere)  
 C = geschlossener Zustand, O1-9 = 1-9 Kanäle geöffnet  
**B)** Öffnungswahrscheinlichkeit aufgetragen gegen den Unterdruck

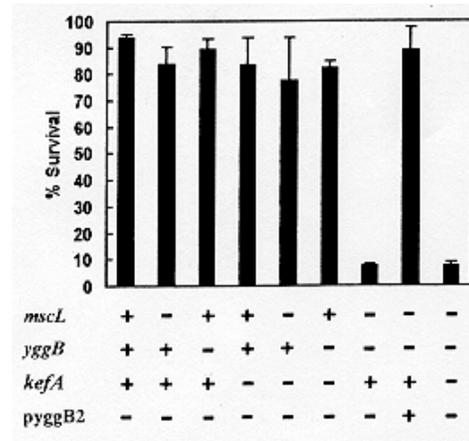


Abb. I.2: Überlebensraten von *E. coli* in Abhängigkeit von mechanosensitiven Kanälen. Ein Wildtypstamm und verschiedene Mutanten, bei denen unterschiedliche Msc's funktionsfähig (+) oder durch Mutation defekt sind (-) wurden hypoosmotischen Schocks unterworfen. Die codierenden Gene sind *mscL* für MscL, *yggB* für MscS und *kefA*. Letzteres codiert für einen auf Membranspannung öffnenden Kanal, der für einen hypoosmotischen Schock offensichtlich keine Rolle spielt. *pyggB2* ist ein Plasmid, das das für MscS codierende Gen trägt. [Levina et al. 1999]

reagieren direkt auf die Zugspannung, die in der Doppellipidschicht auftritt, wenn eine externe Kraft an der Membran angreift [Martinac et al. 1990, Markin & Martinac 1991]. Das aus den Daten entwickelte „Bilayer-Modell“ [Hamill & McBride 1997] wird in seiner Gültigkeit durch verschiedene Beobachtungen an *Bacteria* [Delcour et al. 1989, Martinac et al. 1990, Häse et al. 1995, Berrier et al. 1989, Sukharev et al. 1999] und *Archaea* [LeDain et al. 1998, Kloda & Martinac 2001] bestätigt.

In Abbildung I.1 ist am Beispiel einer Patch-clamp Messung an *E. coli* MscL das Öffnungsverhalten für einen Membranausschnitt mit mehreren Msc's in Abhängigkeit von dem angelegten Unterdruck dargestellt. Die Öffnungswahrscheinlichkeit eines einzelnen Kanals lässt sich durch eine Boltzmann-Verteilung beschreiben:

$$\frac{P_0}{1-P_0} = \exp[\alpha(p - p_{1/2})] \quad \text{[Gleichung I.1]}$$

Dabei ist  $P_0$  die Öffnungswahrscheinlichkeit,  $p$  der Unterdruck mit  $P(p_{1/2}) = 0,5$  (bei  $p = p_{1/2}$  ist die Hälfte der Kanäle geöffnet) und  $\alpha$  die Steigung von  $\ln[P_0/(1-P_0)]$  aufgetragen gegen  $p$  [Martinac 2001].

Die Bedeutung der Msc's bei hypoosmotischen Schocks wurde von Levina et al. [1999] umfassend dargestellt (Abb. I.2). Wie viele überlebenswichtige Systeme sind auch Msc's redundant angelegt. Bei *E. coli* sind mindestens zwei, MscL und MscS, wesentlich an der Antwort auf einen plötzlichen hypoosmotischen Schock beteiligt. Mutanten, die nur noch eines der codierenden Gene (*mscL* bzw. *yggB*) besitzen, sind in ihrer Überlebensfähigkeit kaum beeinträchtigt, während eine Mutation beider Gene die Überlebensrate drastisch senkt. Transformation einer derartigen Mutante mit einem Plasmid, das für einen Msc codiert, kompensiert den Verlust der Msc's vollständig. In erster Linie liegen die zwei beobachteten Systeme nicht aus Redundanzgründen vor, auch wenn das in früheren Stadien der Evolution der Fall gewesen sein mag. Es handelt sich vielmehr um eine spezialisierte Antwort auf unterschiedlich starke hypoosmotische Schocks. Während MscS bei geringerer Membranspannung eine kleinere Pore öffnet und selektiv kleine Osmolyte freisetzt, wird mit MscL eine große Pore bei großer Membranspannung geöffnet und in einer bedrohlicheren Situation zugunsten des Überlebens eine nicht-selektive Freisetzung auch von kleinen Proteinen ermöglicht [Berrier et al. 1992]. Es ist zu beachten, dass nicht jedes Kanalprotein, dass auf eine an der Membran liegende Zugspannung reagiert, zwingend eine Antwortfunktion bei hypoosmotischen Schocks übernimmt. Dies wurde am Beispiel von *kefA* gezeigt, dessen Genprodukt mechanosensitive Eigenschaften besitzt, dessen Fehlen aber keinen Einfluss auf die Überlebensrate hat.

Im Gegensatz zu funktionellen Informationen entzogen sich die strukturellen Daten von Membranproteinen, speziell die von Ionenkanälen, lange dem Zugriff. Interessanterweise ist neben einem  $K^+$ -Kanal, KcsA aus *Streptomyces lividans* [Doyle et al. 1998], der mechanosensitive Kanal MscL aus *Mycobacterium tuberculosis* [Chang et al. 1998] eines der Proteine, mit denen auf diesem Gebiet ein Durchbruch gelang [Review: Rees et al. 2000]. Der MscL von *M. tuberculosis* ist damit nicht nur funktionell, sondern auch strukturell gut bestimmt [Moe et al. 2000]. Obwohl MscL von *M. tuberculosis* und *E. coli* auf Aminosäureebene nur 37% Homologie aufweisen, lassen sich funktionelle Einheiten bis zu einer Auflösung von einzelnen Residuen korrelieren [Maurer et al. 2000]. Ausgehend von einer allgemein gültigen MscL-Struktur und physiologischen Daten wurde ein mehrstufiges Modell für den Öffnungsmechanismus entwickelt, das von Biggin & Sansom [2001] um die entstehende Pore ergänzt wurde [Abb. I.3].

Einen weitergehenden Überblick über Aspekte der Forschung an mechanosensitiven Kanälen geben Morris [1990], Sackin [1995], Hamill & McBride [1996], Garcia-Añoveros & Corey [1997], Sachs & Morris [1998] und Martinac [2001].

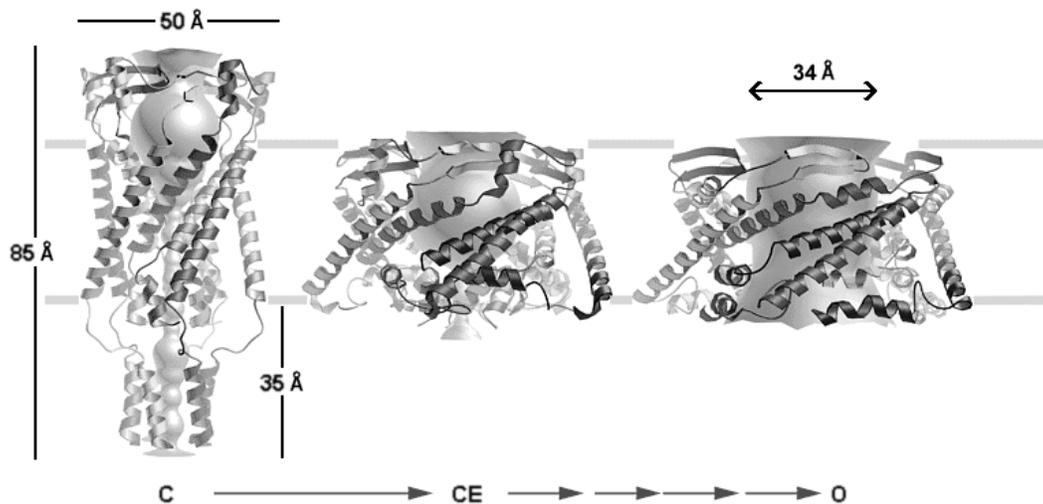


Abb. I.3: Modell des MscL von *Mycobacterium tuberculosis* und Öffnungsmechanismus: C geschlossener Zustand, CE geschlossen erweiterter Zustand, O geöffneter Zustand. Der großflächig zusammenhängende Bereich in der Kanalmitte deutet Lage und Ausdehnung der Kanalpore in den unterschiedlichen Zuständen an. [Biggin 2001]

Ausgehend von den Forschungen an bekannten mechanosensitiven Kanälen ergeben sich verschiedene Perspektiven für die Untersuchungen an *H. elongata*. Homologiebetrachtungen von Aminosäure- und Gensequenzen bieten einen molekularbiologischen Ansatz. Gleichzeitig ergibt sich aus der Bedeutung der Kanäle für das Überleben eines hypoosmotischen Schocks ein Ansatz aus der physiologischen Richtung. Ein wichtiges Hilfsmittel ist dabei die Möglichkeit, die Kanäle durch Metallionen [Berrier et al. 1992] oder peptidische Toxine [Oswald et al. 2002] zu blockieren. Durch die Patch-clamp Technik besteht die Möglichkeit, Msc's mit elektrophysiologischen Methoden zu charakterisieren.

Ein hervorragendes Modell ist mit *E. coli* gegeben, da verschiedene Mutanten existieren, deren Gene für Msc's deletiert sind [Levina et al. 1999].

## 1.5. Natrium/Protonen-Antiporter

Eine bislang noch nicht angesprochene Problematik von Lebensräumen mit hohem Salzgehalt sind Natrium- und pH-Homöostase. Beide sind eng miteinander und mit weiteren Prozessen verknüpft. Sowohl  $\text{Na}^+$  als auch Protonen spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen bioenergetischen Prozessen. Zu hohe oder zu niedrige Konzentrationen dieser Ionen stellen einen hohen Stressfaktor für jede Zelle dar. Daher ist es nicht weiter erstaunlich, dass Natrium/Protonen Antiportern ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, Nha's) in einem ähnlich diversen Spektrum physiologischer Prozesse eine Bedeutung zukommt wie Msc's. Sie sind in den Cytoplasmamembranen nahezu aller Zellen zu finden [Padan & Schuldiner 1994, Padan 1998], mit *Clostridium fervidus* als einziger bisher bekannter Ausnahme [Speelmans et al. 1993].

Der interne pH-Wert ( $\text{pH}_i$ ) von Säugerzellen ist mit  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase [Busa & Nuccitelli 1984], Genexpression [Isfort et al. 1993], Zellbeweglichkeit, Zellkontraktilität und Zell-Zell-Kopplung [Orchard & Kentish 1990], Zelladhäsion [Tominaga et al. 1998] und Zelltod [McConkey & Orrenius 1996, Gottlieb et al. 1996] verknüpft. Neben Nha's besitzen sie eine Reihe weiterer Mechanismen zur Regulation des  $\text{pH}_i$  [Pucéat 1999]. Die Salztoleranz von Pflanzen hängt von der Kompartimentisierung von  $\text{Na}^+$  ab [Blumwald 2000] und kann durch Überexpression von Nha's erhöht werden [Apse et al. 1999]. Eine Abhängigkeit zwischen Blütenfärbung und dem Expressionslevel von Nha's konnte von Yamaguchi et al. [2001] beobachtet werden.

In Bakterien nehmen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter in der Regel drei wichtige Aufgaben wahr:

- 1) Die Umwandlung eines Protonen- in einen Natriumgradienten ist für den  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Cotransport verschiedener Metabolite wie Melibiose [Tsuchiya & Wilson 1978], Serin und Threonin [Hama et al. 1987] oder Prolin [Chen et al. 1985] notwendig. Weiterhin werden einige flagellare Motoren durch einen  $\text{Na}^+$ -Gradienten angetrieben [Atsumi et al. 1992],
- 2) da eine hohe intrazelluläre Konzentration von  $\text{Na}^+$  und auch  $\text{Li}^+$  toxisch ist [Padan & Schuldiner 1994], ist die Ausschleusung dieser Ionen notwendig und
- 3) in einer alkalischen Umgebung wird  $\text{pH}_i$  über Nha's geregelt [Padan & Schuldiner 1994].

Bislang sind eine Reihe verschiedener Gene identifiziert worden, die für bakterielle Nha's codieren. Als Beispiele seien *nhaA* [Karpel et al. 1988], *nhaB* [Pinner et al. 1992] und *chaA* [Ivey et al. 1993] aus *E. coli*, *nhaC* aus *B. firmus* [Ivey et al. 1993b] und *napA* aus *E. hirae* [Waser et al. 1993] genannt. Die Genprodukte lassen sich strukturell und funktionell

verschiedenen Familien zuordnen [Padan & Schuldiner 1993 Padan et al. 2001]. Wie an *E. coli* zu sehen ist, liegen analog den Msc's auch hier aus Gründen der Spezialisierung verschiedene Systeme vor. Ein System hoher Kapazität und niedriger Affinität, NhaA, und ein hochaffines System niedriger Kapazität, NhaB, sind notwendig, um eine Adaptation an ein breites Spektrum von pH-Werten und Salinitäten zu ermöglichen. Eine *E. coli* Mutante mit deletiertem NhaA, ist nicht in der Lage, bei hohen Salinitäten zu wachsen [Padan et al. 1989]. Entsprechend wird bei hohen Salinitäten, unter denen NhaA essentiell ist, die Expression hochreguliert. Ein gleichzeitig vorliegender erhöhter pH-Wert verstärkt diesen Effekt noch. Während NhaB bei fehlendem NhaA noch einen gewissen Restschutz vor hoher Salinität bietet, führt eine doppelte Deletion beider Nha's bereits bei niedrigen Salzkonzentrationen zu extrem verlangsamtem Wachstum der Mutanten [Pinner et al. 1993]. Die alleinige Deletion von NhaB, dessen Expression von pH und  $\text{Na}^+$  unabhängig ist, kann durch NhaA kompensiert werden. *chaA* kommt keine nachweisbare Bedeutung im Zusammenhang mit der Salztoleranz von *E. coli* zu.

Neben zwei zu *E. coli* NhaA und NhaB homologen Antiportern ist das marine Bakterium *Vibrio parahaemolyticus* mit einem weiteren Typ Nha ausgestattet, NhaD, der mit seiner

Entdeckung in diesem Organismus erstmals beschrieben wurde [Nozaki et al. 1998]. Die genaue Funktion ist noch ungeklärt, NhaD ist jedoch in der Lage, die doppelte Deletion von NhaA und NhaB zu kompensieren, wenn es in einer entsprechenden *E. coli* Mutante exprimiert wird. In *V. cholerae*, einem nahen Verwandten von *V. parahaemolyticus* wurden zu den beschriebenen drei Systemen noch zwei weitere mit NAH-Funktion vom Typ NhaC gefunden [Padan et al. 2001].

Im Gegensatz zu Msc's ist die

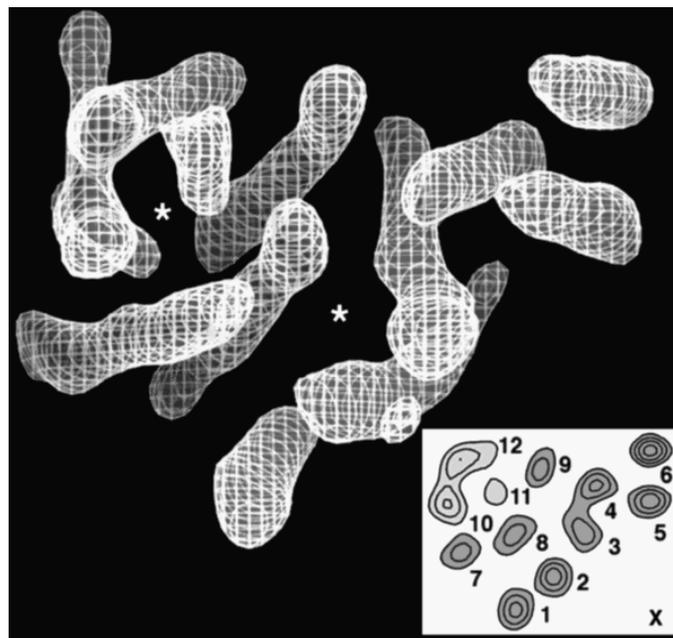


Abb. 1.4: Röntgenstruktur von NhaA in einer Auflösung von 7Å, Aufsicht auf die Membranebene. Es sind stabförmige Bereiche hoher Dichte zu erkennen, die mit den 12 Transmembranhelices korrelierbar sind, die aufgrund verschiedener Hydropathieplots postuliert wurden. Mögliche Ionentransportwege sind mit einem Stern \* gekennzeichnet. Eine Schemazeichnung der Lage der Helices auf Höhe der Membran mit willkürlicher Nummerierung ist unten rechts eingeschoben. [Williams 2000].

Strukturaufklärung bei Nha's erst in den Anfängen. 2000 wurde von Williams eine Kristallstruktur des *E. coli* NhaA in niedriger Auflösung veröffentlicht [Abb. I.4]. 12 erkennbare mögliche Transmembranbereiche korrelieren mit den nach Hydrophathieuntersuchungen postulierten 10 bis 12 Transmembranhelices. NhaA kristallisiert als Dimer,

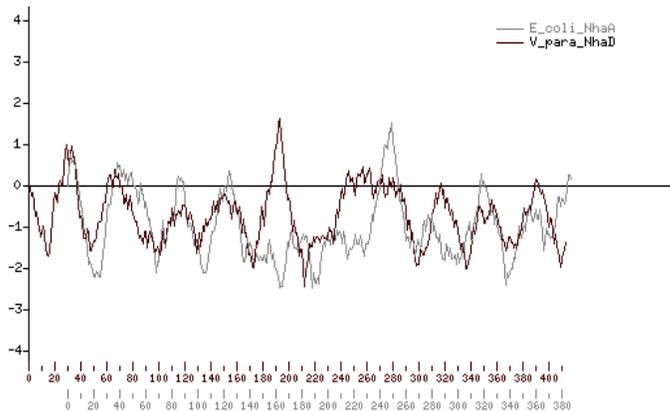


Abb. I.5: Vergleich der Hydrophathie-Plots von *E. coli* NhaA (grau) und *V. parahaemolyticus* NhaD (schwarz). Die Hydrophathie ist in Willkürlichen Einheiten aufgetragen. Residuennummern sind unten notiert.

Der vergleichende Plot wurde nach dem Kyte-Doolittle Algorithmus mit dem Programm des Weizmann Institutes erstellt [<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/>].

Die Datenbankeinträge (accession number) sind P13738 für *E. coli* NhaA und BAA25994 für *V. parahaemolyticus* NhaD.

es ist allerdings noch nicht geklärt, ob das Monomer oder das Dimer funktionell aktiv ist.

Auf der Basis von Hydrophathie-Plots werden bei NhaD ebenfalls 10 bis 12 Transmembranbereiche postuliert [Nozaki et al. 1998].

Ein Vergleich der Plots von *E. coli* NhaA und *V. parahaemolyticus* NhaD zeigt signifikante Unterschiede, die keine Ähnlichkeit der Tertiärstrukturen erwarten lassen. [Abb. I.5]

Neueste Untersuchungen an Nha's sind in einem aktuellen Review von Padan et al. [2001] zusammengefasst. Aspekte der Kopplung von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Zirkulation in Zellen und die Bedeutung von Nha's wurden in einem älteren Review [Padan & Schuldiner 1993] beschrieben. Abhandlungen zu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiportern in Säugerzellen finden sich bei Yun et al. [1995] und Pucéat [1999].

Analog zu Msc-Defektmutanten existieren Defektmutanten von *E. coli*, denen die Gene für Nha's fehlen [Padan et al. 1989, Pinner et al. 1993]. Sie bieten sich als ideale Modelle für die Untersuchung des *H. elongata* NhaD [diese Arbeit] an. Gegebenenfalls ist eine Kompensation des Verlustes der *E. coli* eigenen Nha's durch Expression des *H. elongata* NhaD möglich. Eine Inaktivierung oder Deletion der Gene in *H. elongata* ermöglicht die Bestimmung der physiologischen Bedeutung für diesen Organismus. Die große Zahl an bekannten Nha Sequenzen vereinfacht eine Zuordnung eines *H. elongata* Antiporters zu einer der Nha Familien.

## II. Material und Methoden

### II.1. Organismen

Stamm	Genotyp / Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Delta$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>deoR supE44</i> $\lambda^-$ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan 1983
<i>Escherichia coli</i> MJF367	F <sup>-</sup> <i>rha thi gal lacZ</i> $\Delta$ <i>mscL::Cm</i>	Levina et al. 1999
<i>Escherichia coli</i> MJF451	F <sup>-</sup> <i>rha thi gal lacZ</i> $\Delta$ <i>yggb</i>	Levina et al. 1999
<i>Escherichia coli</i> MJF455	F <sup>-</sup> <i>rha thi gal lacZ</i> $\Delta$ <i>mscL::Cm</i> $\Delta$ <i>yggb</i>	Levina et al. 1999
<i>Escherichia coli</i> NM81	<i>melBLid, nhaB<sup>+</sup> <math>\Delta</math>nhaA1, kan<sup>+</sup>, <math>\Delta</math>lacZY, thr1</i> (Km <sup>R</sup> )	Padan et al. 1989
<i>Escherichia coli</i> NM81 pUCHelNhaD	<i>melBLid, nhaB<sup>+</sup> <math>\Delta</math>nhaA1, kan<sup>+</sup>, <math>\Delta</math>lacZY, thr1</i> zu pUCHelNhaD siehe II.2 (Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	diese Arbeit [II.4.17]
<i>Escherichia coli</i> XL1blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 relA1</i> $\lambda^-$ <i>lac<sup>-</sup></i> [F <sup>'</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10(tet)]	Bullock et al. 1987
<i>Escherichia coli</i> XL1blue pUCHelNhaD	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 relA1</i> $\lambda^-$ <i>lac<sup>-</sup></i> [F <sup>'</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10(tet)] zu pUCHelNhaD siehe II.2 (Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	diese Arbeit [II.4.17]
<i>Escherichia coli</i> S17.1	RP4-2(TC::Mn)(Km::Tn7) chromosomal integriert Sm <sup>R</sup> <i>pro</i>	Simon et al. 1983
<i>Escherichia coli</i> SM10	RP4-2(TC::Mn) chromosomal integriert Km <sup>R</sup> <i>thi thr leu</i>	Simon et al. 1983

Stamm	Genotyp / Eigenschaften	Referenz
<i>Halomonas elongata</i> DSM2581 <sup>T</sup>	Wildtyp	Vreeland et al. 1980
<i>Halomonas elongata</i> Tn1732	Transposon Tn1732 zufällig in Genom inseriert, Km <sup>R</sup>	diese Arbeit [II.4.16]
<i>Halomonas elongata</i> NhaD-Ω	Ω-Kassette aus pAP45-Ω in <i>nhaD</i> inseriert, Sm <sup>R</sup>	diese Arbeit [II.4.16]
<i>Halomonas halodenitrificans</i> DSM 735 <sup>T</sup>	Wildtyp	Dobson & Franzmann 1996
Lake Bogoria Isolat 25B1	Gram negativ, haloalkaliphil, denitrifizierend	Duckworth et al. 2000
<i>Marinococcus halophilus</i> DSM20408 <sup>T</sup>	Wildtyp	Novitsky & Kushner 1976

## II.2. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGEM <sup>®</sup> -T	Klonierungsvektor für PCR-Produkte, Amp <sup>R</sup>	Promega, Madison, WI, USA
pHP45-Ω	Ω-Kassette, Sm <sup>R</sup>	Prentki & Krisch 1984
pK18HeAPΩ1	pK18 <i>mobSacB</i> , <i>H. elongata nhaD</i> -Fragment, Ω-Kassette: Km <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	diese Arbeit [II.4.16]
pK18 <i>mobSacB</i>	Km <sup>R</sup> , negative Selektion auf Saccharose	Schäfer 1994
pSUP102	Selbstmordvektor zur Transposon-Mutagenese	Simon et al. 1995
Gm::Tn1732	pACYC184-Gm::Tn1732 <i>mob</i> Cm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Kunte & Galinski 1995
pUC18	Amp <sup>R</sup> <i>lacZ'</i>	Norrandar et al. 1983
pUCHelNhaD	<i>H. elongata</i> NhaD zur Expression in pUC18 <i>β-lac</i> inseriert	diese Arbeit [II.4.17]

## II.3. Materialien

### II.3.1. Verbrauchsmaterialien

#### II.3.1.1. Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' ->3'	Hersteller
<b>Konstruktion <i>yggB</i>-Sonde</b>		
YM1F (5')	CTA GGA TCC GCG CGT ATG GCT GC	MWG
YM2R (3')	GTT TTG GAT CCA CAT CAA GTT GCC	MWG
<b>Konstruktion <i>mscL</i>-Sonde</b>		
MSNR1 (5')	CGA ATT TGC GAT GCG CGG GAA C	MWG
MSBS1 (3')	AAA GAT GGC AAA GGC CAC AAT CAG	MWG
<b>Primer mit Zufallsnukleotiden: <i>mscL</i></b>		
HRCLF1 (5')	GGY AAC GTS GTS GAC CTS GC	MWG
HRCLF2 (5')	GAC CTG GCC CTG GSC GTS ATC ATH	MWG
HRCLF3 (5')	GAC GTC GCC GTC GSC GTS ATC ATH	MWG
HRCLR1 (3')	SGC GAT GAT BAR GAA GTT CAT	MWG
HRCLR2 (3')	GGC GAA GGC GAT GAT SAG GAA RTY	
<b>Primer mit Zufallsnukleotiden: <i>yggB</i></b>		
HRCSF1 (5')	CGC CGC ATG GAC GTC NTC RTC GGY	MWG
HRCSR1 (3')	CTG CGG GAA CGG GAT YYC RAT GYY	MWG
<b>Primer Walking pUC</b>		
PULAC1	GAT GTG CTG CAA GGC GAT TA	MWG
PULAC2	TGT GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG	MWG
<b>Primer Walking NhaD</b>		
APKS1	GAT CGC CGA CAA CCT GAC CA	MWG
HeAPf1	ACT GGG CTT CAT GGG TTA CCT GG	MWG
HeAPf2	ATC TCG CCG ATC GCC GAC AAC C	MWG
HeAPr1A	GGC CAC CAC GAT ATT GAC GCA GG	MWG
HeAPr1B	CCA CCA CGA CAT TGA TGC AAC AGA	MWG
HeAPr2	GAG AGC ATG GCC GAA TGG CAC G	MWG
<b>RACE</b>		
G <sub>15</sub> XBX (5')	TAG ATC TAG AGC TC G <sub>15</sub>	Roth
HeAPrace1 (3')	GTT GTC GGC GAT CGG CGA GAT GAT	MWG
HeAPrace2 (3')	GAT CGG CGA GAT GAT GAC GG	MWG
HeAPrace3 (3')	TGA CCA CGG CGC ACA TCA	MWG

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' -&gt;3'</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Inverse PCR upstream <i>nhaD</i></b>		
HeAPupF1 (5')	GGC GAT CGT GAT GAG CCT GTT C	MWG
HeAPupF2 (5')	CGC TGG TGA ACC ACC TGG TA	MWG
HeAPupR1 (3')	GAG GTT GAT GAA GCG CTT GTC G	MWG
HeAPupR2 (3')	CCA CGA CAT TGA TGC AAC AG	MWG
<b>Inverse PCR downstream <i>nhaD</i></b>		
HeAPdwF1 (5')	CGA TGC TCT CGT CCG GAT AG	ROTH
HeAPdwR1 (3')	CAG GCT CTG ACG CAG GTA GT	ROTH
<b>Sonde für <i>NhaD</i></b>		
sNhaDf1 (5')	ATC GCC GAC AAC CTG ACC AC	MWG
sNahDr1 (3')	CAG GCT CTG ACG CAG GTA GT	MWG
<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' -&gt;3'</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Insertion einer <math>\Omega</math>-Kassette in <i>nhaD</i></b>		
pHeAPexF1 (5')	Ata agc ttC CGG CCC TGC TGA TG (Hind III)	MWG
pHeAPexR1 (3')	ATc ccg ggT TCG CTC TGG GTG TT (Xma I)	MWG
<b>Expression von <i>nhaD</i></b>		
HeNxpF1 (5')	GAA ACT Gca tat gCG CAA GTC C (Nde I)	ROTH
HeNxpR1 (3')	CGC ACg acg tcG GCT GGA AG (Aat II)	ROTH
<b>Realtime PCR 16S rRNA</b>		
t16SF (5')	CTG TCG TCA GCT CGT GTT GTG	ROTH
t16SR (3')	GAC CGA ATC GCT GGC AAA	ROTH
<b>Realtime PCR <i>nhaD</i></b>		
tNhaF (5')	AGC GTG GTG CCT TTT GAT GT	ROTH
tNhaR (3')	CAT CAC CAC ACC GTA GAA GAA CAG	ROTH

A, C, G, T = eindeutiges Nukleotid;

B = C, G, T; H = A, C, T; N = A, C, G, T; R = A, G; S = G, C; Y = C, T degenerierte Primer;  
 kleine Buchstaben kennzeichnen Bereiche mit konstruierten Restriktionsschnittstellen. In diesen Bereichen sind die Primer zum Teil nicht vollständig komplementär zur DNA-Matrize.  
 Das Restriktionsenzym ist in Klammern angegeben.

Der G<sub>15</sub>XBX Primer dient zur Amplifikation eines cDNA-Fragment mit 3' C-Tail

**II.3.1.2. spezielle Materialien für molekularbiologische Arbeiten**

Anti-DIG-Antikörper	Roche
Blocking Reagent	Roche
CDP Star	Roche
DNA Polymerase Bio Therm	GeneCraft
DNase I	Sigma
dNTPs	GeneCraft
DIG DNA Labeling Mix	Roche
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas
Gene Ruler 100bp DNA Ladder plus	MBI Fermentas
Gene Ruler $\lambda$ DNA <i>Hind</i> III	MBI Fermentas
Hexanucleotid Mix	Roche
Klenow Enzyme	Roche
6x Loading Dye Solution	MBI Fermentas
Lysozym	Sigma
pGEM-T Vector System I	Promega
positiv geladene Nylonmembran	Roche
Pwo DNA Polymerase	Sawady
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas und New England Biolabs
Reverse Transcriptase Superscript II	Gibco BRL
RNase	Sigma
SYBR <sup>®</sup> PCR Master Mix	Applies Biosystems
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase	MBI Fermentas

Die für die Enzyme geeigneten Puffer und Zusätze wurden vom Hersteller mitgeliefert.

**II.3.1.3. Chemikalien und Medienbestandteile**

Acetonitril, HPLC grade	Roth
Agar	Sigma
Ammoniumchlorid p.a., NH <sub>4</sub> Cl	Merck
Ammoniumsulfat p.a., (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck
Antibiotic Medium (Assay Broth) No.3	Oxoid
Bis-Tris	Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat p.a., K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO), p.a.	Roth
Gadoliniumchlorid GdCl <sub>3</sub>	Merck
Glucose * H <sub>2</sub> O (Monohydrat)	Merck
Glycerin (wasserfrei)	Merck
Glyoxal 40%	Merck
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma
Kaliumhydroxid p.a., KOH	Merck
Eisensulfat p.a., FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck
Ethylendiamintetraacetat, Dinatrium- (EDTA)	Fluka
Ethidiumbromid 10mg/ml	Roth
Hefeextrakt (Yeast Extract)	Fluka
Kaliumacetat, KAc	Fluka
Kalziumchlorid p.a., CaCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O	Merck
Künstliches Meersalz (Tropic Marine)	Tagis-Aquarium, Dreieich
Magnesiumsulfat p.a., MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck
Magnesiumchlorid, MgCl <sub>2</sub>	Merck
Mangansulfat, MnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	Merck
Maleinsäure	Sigma
Marine Peptone S 090	Primex
(3-[N-Morpholino]propansulfonsäure), MOPS	Sigma
Natriumcarbonat p.a., Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
Natriumhydrogencarbonat p.a., NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Natriumchlorid NaCl	Merck
Natriumlactat, Na-Lactat, 50% in H <sub>2</sub> O	Merck

---

Natrium-Laurylsarcosin, SLS	Sigma
Natrium-Laurylsulfat, SDS	Sigma
Natriumnitrat p.a., NaNO <sub>3</sub>	Merck
tri-Natriumcitrat, Na <sub>3</sub> Citrat	Sigma
Pepton (aus Casein pankreatisch verdaut)	Merck
Pipes	Roth
Rubidiumchlorid RbCl	Sigma
Saccharose	Merck
Tris	Roth
Triton 100	Sigma

### II.3.2. Geräte

Gelelektrophoresekammern	Life Technologies
GeneAmp <sup>®</sup> 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
HPLC Komplettsystem	Thermo Separation Produkts
Inkubationsschüttler Innova 4230	New Brunswick Scientific
Lichtmikroskop, Vergrößerung max. 100x	Zeiss
Lumineszenzspektrometer LS 50	Perkin Elmer
Patch-Clamp Apparatur	Eigenanfertigung, Uni Osnabrück
Photometer Novaspec II	Pharmacia Biotech
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Sicherheitswerkbank NU-440-400E	Nuaire
Spannungsquelle 250/2,5	Bio Rad
Thermocycler Primus	Eppendorff
Thermoschüttler Thermomixer Compact	Eppendorff
Tischschüttler Ika-Vibrax-VXR	Janke & Kunkel
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Ultrazentrifuge L70	Beckmann
Vakuumblotting Apparatur	Bio Rad
Zentrifuge J2-71	Beckmann
Zentrifuge Universal 16-R	Hettich

### II.3.3. Medien

Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf Flüssigmedien. Zur Erstellung von festen Nährmedien wurden 1,5% Agar zugesetzt. Antibiotika zur Selektion wurden ausnahmslos nach der Dampfsterilisation zugegeben. Sofern nicht anders vermerkt, wurde  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  verwendet. Die Mengenangaben beziehen sich auf Endkonzentrationen in 1 l Medium.

Das x im Namenskürzel der Medien ist durch die Salinität in Prozent zu ersetzen. LB1 steht z.B. für LB-Medium mit 1% (w/v) an NaCl.

#### II.3.3.1. alkalisches Komplexedium HKx (Horikoshi 1999)

Lösung A	x * 10 g/l	NaCl
	5 g/l	Pepton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Na-Lactat
	0,2 g/l	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
	5 g/l	$\text{NaNO}_3$
	pH 9,7	
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 800 ml/l	
Lösung B	6 g/l	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
	4 g/l	$\text{NaHCO}_3$
	1 g/l	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 200 ml/l	

Nach Dampfsterilisation werden die Lösungen auf 1 l Gesamtvolumen vereinigt.

#### II.3.3.2. Fischpeptonmedium FPx (Frings 1995)

Lösung A	14,7 g/l	marine peptone S90
	12 g/l	Tris/HCl
	x * 9 g/l	NaCl
	x * 1 g/l	künstliches Meersalz
	2 g/l	$\text{NH}_4\text{Cl}$
	10 mg/l	$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
	pH 7,5	
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 890 ml/l	
Lösung B	1 mg/l	$\text{MnSO}_4$
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 5 ml/l	
Lösung C	0,5 g/l	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 5 ml/l	
Lösung D	10 g/l	Glucose x 1 $\text{H}_2\text{O}$
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 100 ml/l	

Nach Dampfsterilisation wurden die Lösungen A bis D auf 1 l Gesamtvolumen vereinigt.

**II.3.3.3. Komplexmedium ABx**

x \* 10 g/l NaCl  
 17,5 g/l Antibiotic Medium No.3 (OXOID)

**II.3.3.4. Komplexmedium Kx (Severin et al. 1992)**

x \* 9 g/l NaCl  
 x \* 1g/l künstliches Meersalz  
 6 g/l Tris  
 7,5 g/l Hefeextrakt  
 7,5 g/l Pepton  
 pH 7,5

**II.3.3.5. Luria Bertani Medium LBx**

5 g/l Hefeextrakt  
 10 g/l Pepton  
 x \* 10 g/l NaCl  
 pH 7

**II.3.3.6. Minimalmedium MM63x (Larsen et al. 1987)**

Lösung A x \* 10 g/l NaCl  
 13,61 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 4,21 g/l KOH  
 1,98 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 0,25 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 1,1 mg/l FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 pH 7,2  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 900 ml/l

Lösung B 4,36 g/l Glucose x 1 H<sub>2</sub>O  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 100 ml/l

Nach der Dampfsterilisation wurden die Lösungen vereinigt.

**Varianten: MM63Gcr/x**

Anstelle von Glucose werden 4,05 g/l Glycerin als Kohlenstoffquelle verwendet. Alle Medienbestandteile können in einem Ansatz sterilisiert werden.

**MM63Gly/x**

Anstelle von Glucose wurden 5 g/l Glycin als Kohlenstoffquelle verwendet.

**MM63Ser/x**

Anstelle von Glucose wurden 5 g/l Serin als Kohlenstoffquelle verwendet.

**MM63Pro/x**

Anstelle von Glucose wurden 5 g/l Prolin als Kohlenstoffquelle verwendet.

### II.3.4. Lösungen für die Herstellung kompetenter Zellen

**TFB1:**      3,023 g      RbCl  
                 2,473 g      MnCl<sub>2</sub> \* 4H<sub>2</sub>O  
                 0,736 g      KAc  
                 0,368 g      CaCl<sub>2</sub> \* H<sub>2</sub>O  
                 47,5 ml      Glycerin  
                 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 250 ml, pH 5,8  
                 Nach Sterilfiltration wurde die Lösung im Kühlschrank gelagert

**TFB2:**      0,302 g      RbCl  
                 2,757 g      CaCl<sub>2</sub> \* H<sub>2</sub>O  
                 0,523 g      MOPS  
                 37,4 ml      Glycerin  
                 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 250 ml, pH 8,0  
                 Nach Sterilfiltration wurde die Lösung im Kühlschrank gelagert

### II.3.5. Lösungen für Agarose Gelelektrophorese

**BPTE:**      6,000 g/l      Bis-Tris  
                 3,000 g/l      Pipes  
                 0,290 g/l      EDTA (Dinatriumsalz)

**10x BPTE:**    Der Puffer kann als 10x Konzentrat angesetzt werden.

**Glyoxal-Mix:** 600 µl      DMSO  
                 175 µl      Glyoxal (40%)  
                 120 µl      10x BPTE  
                 48 µl      Glycerin  
                 20 µl      Ethidiumbromid (10mg/ml)  
                 37 µl      H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
                 Lagerung erfolgt aliquotiert bei -70°C

**TEA:**      Wird durch Verdünnen des Konzentrates 50x TEA hergestellt

**50xTEA:**    242,28 g/l      Tris  
                 18,60 g/l      EDTA (Dinatriumsalz)  
                 30 ml/l      Eisessig  
                 pH 8,0

### II.3.6. Lösungen für Southern-Transfer und -Hybridisierung

<b><u>Denaturierungslösung:</u></b>	20 g/l 87,7 g/l	NaOH NaCl	
<b><u>Neutralisierungslösung:</u></b>	60,6 g/l 87,7 g/l	TRIS / HCl NaCl	pH 7,0
<b><u>20xSSC:</u></b>	175,5 g/l 88,2 g/l	NaCl Na <sub>3</sub> Citrat	pH 7,0
<b><u>Maleinsäurepuffer:</u></b>	11,6 g/l 8,8 g/l	Maleinsäure NaCl	pH 7,5
<b><u>10x Blockierungslösung:</u></b>	100 g/l	Blocking Reagent	ad 1 l Maleinsäurepuffer
<b><u>Prähybridisierungslösung:</u></b>	2 ml 2,5 ml 100 µl 20 µl	10x Blockierungslösung 20x SSC 10% (w/v) NLS 10% (w/v) SDS	ad. 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b><u>Hybridisierungslösung:</u></b>	Prähybridisierungslösung 0,4 mg/ 10 ml	DNA-Sonde	
<b><u>2x Waschpuffer:</u></b>	4ml 20µl	20x SSC 10% (w/v) SDS	
<b><u>0,5x Waschpuffer:</u></b>	1ml 20µl	20x SSC 10% (w/v) SDS	
<b><u>Waschlösung:</u></b>	0,3%	Tween	in Maleinsäurepuffer
<b><u>2x Blockierungslösung:</u></b>	2ml ad 10ml	10x Blockierungslösung Maleinsäurepuffer	
<b><u>Anti-DIG-AK-lösung:</u></b>	1:10.000	Anti-DIG-Antikörper	in Blockierungslösung
<b><u>Detektionspuffer:</u></b>	12,1 g/l 6,0 g/l	TRIS / HCl NaCl	pH 9,5
<b><u>Nachweisreagenz:</u></b>	1:100	CDP-Star	in Detektionspuffer
<b><u>Strippingpuffer:</u></b>	0,25 M 10 % (w/v)	HCl SDS	
<b><u>2x SSC:</u></b>	1:10	20x SSC	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

## II.4. Methoden

### II.4.1. Kulturverfahren

Stamm (auch Derivate)	verwandte Medien (siehe II.3.3.)
<i>Escherichia coli</i> Verschiedene Stämme	LB, AB und MM63 mit 0% bis 7% Salinität
<i>Halomonas elongata</i> DSM2581 <sup>T</sup>	K und MM63 mit 1% bis 25% Salinität
<i>Halomonas halodenitrificans</i> DSM 735 <sup>T</sup>	K mit 2% bis 20% Salinität
Lake Bogoria Isolat 25B1	HK mit 2% bis 20% Salinität
<i>Marinococcus halophilus</i> DSM20408 <sup>T</sup>	FP mit 2% bis 20% Salinität

#### II.4.1.1. Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Verdünnungsausstriche auf festen Nährböden angefertigt, für 24 h bei 37° C inkubiert und anschließend für maximal 3 Monate bei 4° C gelagert.

Langzeitkulturen wurden mittels des Mikrobank<sup>TM</sup> Systems (Mast Diagnostica) angelegt und bei -70° C gelagert.

Eine Variante der Langzeitlagerung in 96well-Platten wurde für *Halomonas*-Transposonmutanten entwickelt. Die Mutanten wurden in 100 µl Medium über Nacht in den Vertiefungen der Platten angezogen. Die ausgewachsenen Kulturen wurden mit gleicher Menge einer Lösung 4 M Glycerin / 4 M Saccharose versetzt und bei -70° C gelagert.

#### II.4.1.2. Flüssigkulturen

Falls für eine spezielle Methode nicht anders beschrieben, wurden alle Anzuchten bei 180 rpm und 37° C im Inkubationsschüttler durchgeführt. Gegebenenfalls wurden zur Selektion Antibiotika zugesetzt.

### II.4.1.3. Verfolgung des Zellwachstums

Anzuchten zur Verfolgung des Zellwachstums wurden wahlweise sterilen Einweg-Küvetten oder in Schüttelkolben mit seitlichem Messfortsatz durchgeführt.

Das Wachstum wurde über die photometrische Bestimmung der Absorption der Kultur bei 600 nm (optische Dichte,  $OD_{600}$ ) ermittelt. Aufgrund des Streulichtphänomens weicht die gemessene Absorption bei zunehmender Partikeldichte (Zelldichte) von der tatsächlichen Absorption ab, die  $OD_{600}$  wird bei Werten größer als 0,5 unterbestimmt. Zur Korrektur kann die sogenannte „Dalgaard-Anpassung“ eingesetzt werden [Dalgaard et al. 1994]. Die reale  $OD_{600}$  einer ausgewachsenen Kultur wird durch Verdünnung bestimmt. Absorptionen einer Verdünnungsreihe werden gegen die rechnerisch aus der höchsten Verdünnung ermittelte  $OD_{600}$  aufgetragen. Die Parameter A und B der folgende Gleichung werden dann numerisch ermittelt:

$$\text{Dalgaard-Gleichung:} \quad OD_{\text{real}} = OD_{\text{gemessen}} + A \times (OD_{\text{gemessen}})^B$$

Diese Kalibration muß nur einmal je Medientyp und Bakterinstamm durchgeführt werden. Bei allen weiteren Messungen kann die reale  $OD_{600}$  über die Dalgaard-Gleichung berechnet werden. Es müssen keine Proben entnommen und aufwändig verdünnt werden. Dies hat zusätzlich eine Verminderung des Kontaminationsrisikos zur Folge.

In einer Logarithmischen Auftragung der Wachstumskurven kann die Wachstumsrate  $\mu$  [ $h^{-1}$ ] als Steigung bestimmt werden. Die Verdopplungszeit  $t_D$  berechnet sich dann nach

$$t_D = \ln 2 / \mu$$

Auf eine Bestimmung von Nass- und Trockengewicht sowie Zellzahl wurde verzichtet, da diese mit der realen  $OD_{600}$  linear korrelieren [Koch et al. 1981]

### II.4.1.4. Zellernte

Kulturvolumina bis 3 ml wurden in 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäßen 1 Minute bei maximaler Drehzahl und Raumtemperatur zentrifugiert. Kulturvolumina bis 100 ml wurden in 50 ml Reaktionsgefäßen 10 Minuten bei 2.800 g und je nach Erfordernis bei Raumtemperatur oder 4° C zentrifugiert [Zentrifuge Hettich].

## II.4.2. osmotische Schocks

### II.4.2.1. Durchführung

Zur Vorbereitung osmotischer Schocks wurden die Organismen in einem geeigneten Medium gewünschter Salinität angezogen. Die Überführung in ein Medium mit geänderter Salinität erfolgte in mindestens zwei Schritten zehnfacher Verdünnung, nach dem zweiten Schritt wurde für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden Kontrollen in einem Medium, das mit dem Ausgangsmedium identisch ist, in der selben Anzahl an Schritten verdünnt. Die Verdünnung in Schritten zehnfacher Verdünnung erfolgte allein aus Praktikabilitätsgründen. Da zur Bestimmung der Überlebensraten [II.4.2.2] weitere Verdünnungsschritte notwendig waren und oft eine große Probenzahl vorlag, vereinfachte die Beibehaltung des Verdünnungsfaktors 10 Probenhandhabung und Berechnungen.

Ein Zusatz von Gadolinium zum Blockieren von MSCs erfolgte gegebenenfalls im Austauschmedium so dass einer Endkonzentration von 1 mM nach dem Verdünnen der Kultur erreicht wurde.

Zum Verdau der Zellwand wurden die Kulturen mit Lysozym (1 mg / ml Medium) und EDTA (3 mM) für 5 Minuten bei 37° C inkubiert.

### II.4.2.2. Bestimmung der Überlebensrate

Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden von jeder Suspension in einer Zehnfach-Verdünnungsreihe Aliquots angelegt, die der OD<sub>600</sub> zufolge 10<sup>5</sup> bis 10<sup>3</sup> Zellen je 1 ml enthalten. 100 µl der Aliquots wurden auf geeignetem festen Nährmedium ausgestrichen und zur Anzucht inkubiert. Die Salinität des festen Nährmedien entsprach der des Austauschmediums oder der für den Organismus optimalen Salinität, falls bei der gegebenen Salinität kein oder extrem vermindertes Wachstum zu erwarten ist. Die Anzahl der Kolonien wird manuell bestimmt. Erhalten wird die Zahl der koloniebildenden Einheiten (kbE). Hierbei ist zu beachten, das *M. halophilus* in der Regel als Diplokokkus vorliegt, die Anzahl der kultivierbaren Zellen in einem definierten Aliquot der Kultur entspricht der doppelten Anzahl an kbE.

### II.4.2.3. Solutextraktion nach Bligh und Dyer [Bligh & Dyer, 1959]

Zur Gewinnung der Biomasse und zur Bestimmung der Solutgehalte in den Zellen wurden die Kulturen für 15 Minuten bei 2.800 g und Raumtemperatur abzentrifugiert [Zentrifuge Hettich]. Die Zellpellets wurden in ausgewogene 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und nach Trocknung das Trockengewicht der Biomasse ermittelt. Die Solute wurden durch eine modifizierte Bligh & Dyer-Extraktion [Galinski 1986] aus den gefriergetrockneten Zellen in eine wässrige Phase überführt:

- 30 mg getrocknetes Zellmaterial zerkleinern
- 500 µl Bligh & Dyer-Lösung (10 Volumen Methanol + 5 Volumen Chloroform + 4 Volumen H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub>) zugeben
- 30 Minuten auf einem Tischschüttler inkubieren
- 130 µl Chloroform und 130 µl H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> zusetzen, die Suspension erneut für 30 Minuten schütteln
- zur Phasentrennung für 10 Minuten bei 16.060 g zentrifugieren [Tischzentrifuge]
- Die obere, wässrige Phase, welche die Solute enthält, abpipettieren und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen

Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20° C gelagert. Zur HPLC-Analyse wurden die Proben 1:10 mit HPLC-Laufmittel (75 % (v/v) Acetonitril) verdünnt.

### II.4.2.4. Bestimmung der Solutmenge durch HPLC

Die Auftrennung und Quantifizierung der kompatiblen Solute erfolgte mittels einer HPLC-Anlage der Firma Thermo Separation Products (Riviera Beach, USA).

Die Anlage wurde von der Software "Chrom Quest<sup>TM</sup> Chromatography Data System" für Windows NT<sup>®</sup> gesteuert. Die Datenaufnahme und Auswertung der Chromatogramme erfolgte ebenfalls mit diesem Programm.

Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus 75 % (v/v) Acetonitril (HPLC-grade) und 25 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> verwendet. Die Flussrate betrug bei allen Messungen 1 ml / min. Das Laufmittel wurde vor der Verwendung zunächst durch 15 minütiges Durchströmen mit Helium entgast.

Die Solutkonzentration der Proben wurde jeweils durch Vergleich mit einem entsprechendem Standard ermittelt.

### II.4.3. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Übernachtkultur in 25 ml LB1 Medium
- 100 ml LB1 Medium werden mit 1 ml der ausgewachsene Kultur angeimpft
- bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultivieren und dann auf Eis kühlen
- Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 2500 g und 4° C sedimentieren
- Überstand verwerfen, die Zellen in 30 ml TFB1 resuspendieren
- 90 Minuten auf Eis inkubieren
- erneute Sedimentation für 5 Minuten bei 2500 g und 4° C
- Zellen in 4 ml TFB2 resuspendieren
- Aliquots zu je 100 µl in Eppendorff-Reaktionsgefäße überführen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefkühlen

Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70° C.

### II.4.4. Transformation und Test kompetenter Zellen

Ein Aliquot der zu transformierenden oder zu testenden Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Zum Test der kompetenten Zellen wurde 0,1 ng pUC18 zugefügt. Alternativ wurde eine geeignete Menge des zu transformierenden Vektors hinzugegeben. Nach vorsichtigem Umrühren wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 45 Sekunden bei 42° C im Wasserbad inkubiert. 900 ml LB Medium wurden zugegeben und es wurde unter Schütteln eine Stunde bei 37° C inkubiert. Aliquots zu 100 µl wurden auf festem LB1-Nährmedium ausgestrichen.

## II.4.5. Isolierung von Nukleinsäuren

### II.4.5.1. Gesamt DNA

Die Isolierung von Gesamt DNA erfolgte mit dem E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit der Firma Peqlab (Erlangen) nach Herstellerangaben.

### II.4.5.2. Gesamt RNA

Die Isolierung von Gesamt RNA erfolgte mit dem E.Z.N.A. Bacterial RNA Kit der Firma Peqlab (Erlangen) nach Herstellerangaben.

### II.4.5.3. Plasmid DNA

Kleinere Mengen Plasmid DNA (aus bis zu 3 ml Kultur) wurden mit dem GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) isoliert. Die Isolierung größerer Mengen (aus bis zu 50 ml Kultur) erfolgte mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II der Firma Peqlab (Erlangen), jeweils nach Herstellerangaben.

## II.4.6. Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Absorption einer geeigneten Verdünnung der zu bestimmenden Nukleinsäure wurde bei 260 nm, 280 nm und 320 nm bestimmt. Die Absorption bei 320 nm diente der Hintergrundkorrektur.

Aus der Absorption bei 260 nm lässt sich die Konzentration wie folgt bestimmen: Eine Absorption von  $OD_{260} = 1$  entspricht 50 µg / ml dsDNA, 33 mg ssDNA oder 40 mg / ml RNA. Der Quotient Absorption (260 nm) : Absorption (280 nm) beschreibt die Reinheit. Bei einer reinen DNA Lösung liegt der Quotient zwischen 1,7 und 1,9, höhere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit RNA, niedrigere auf eine Verunreinigung mit Proteinen. Eine reine RNA Lösung weist einen Quotienten von 1,9 bis 2,0 auf.

## II.4.7. Manipulation von Nukleinsäuren

Standardmanipulationen an Nukleinsäuren, z.B. Restriktionsverdau, Ligation oder C-Tailing, erfolgten mit käuflichen Enzymen nach Herstellerangaben.

## **II.4.8. Agarose Gelelektrophorese**

### **II.4.8.1. DNA**

Ein Agarosegel für DNA wurden mit 1,5 % Agarose (w/v) in TAE präpariert. Die Proben wurden in geeigneter Verdünnung mit Probenpuffer der Firma MBI aufgetragen. Die Elektrophoresen wurde mit 5 V/cm durchgeführt.

### **II.4.8.2. RNA**

Ein Agarosegel für RNA wurden mit 1,5 % Agarose (w/v) in zweifach autoklaviertem BPTE präpariert. Die Proben wurden mit einem Volumen Glyoxylatmix verdünnt und nach einstündiger Inkubation bei 55° C aufgetragen. Die Elektrophoresen wurde mit 4 V/cm durchgeführt.

### **II.4.8.3. Detektion und Größenbestimmung von DNA Fragmenten**

Die Detektion von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Ethidiumbromid. Dieser Farbstoff interkaliert mit den Basenpaaren der DNA-Doppelhelix und fluoresziert bei Wechselwirkungen mit den Ringsystemen unter UV-Licht. DNA-Agarosegele wurden zum Färben für 10 Minuten in einer wässrigen Lösung von 1 µg / ml Ethidiumbromid inkubiert.

Zur Ermittlung der Größe von DNA-Fragmenten wurden parallel zu den Proben Größenstandards der Firma MBI Fermentas aufgetragen.

### **II.4.8.4. Präparative Aufreinigung von DNA mit Agarosegelen**

Zur präparativen Auftrennung von DNA wurden geeignet große Mengen an DNA Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Detektion der gewünschten Banden unter möglichst kurzer Einwirkung von UV-Strahlung, um eine Degeneration der DNA zu verhindern. Die gewünschte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten.

Fragmente mit einer Länge bis zu 800 bp wurden mit dem Silica Spin Fragment Isolation Kit der Firma Biometra (Göttingen) eluiert. Da das Verfahren auf Absorption an eine Silikatmatrix beruht, drohen bei längeren Fragmenten Strangbrüche durch Scherkräfte. längere Fragmente wurden daher mit Ultrafree-DA Säulen der Firma Amicon (Bedford) eluiert.

### II.4.9. Amplifikation von DNA mittels Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur selektiven Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. In einem Standardprotokoll folgen auf eine initiale Denaturierung der DNA mehrere Zyklen von Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und Elongation. Es schließt sich eine finale Elongation an.

Verlauf einer Standard-PCR			
Initiale Denaturierung	5 Minuten	95° C	20 bis 30 Zyklen
Denaturierung	45 Sekunden	95° C	
Annealing	30 Sekunden	primerabhängig *	
Elongation	1 Minute je 1000 Basen	72° C	
finale Elongation	5 Minuten	72° C	

(\*) Eine einfache Formel zur Berechnung der optimalen Annealingtemperatur beruht primerabhängig auf der Anzahl möglicher A/T und G/C Basenpaarungen:

$$2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) = \text{Annealingtemperatur } [^{\circ}\text{C}]$$

Mit sinkender Annealingtemperatur binden die Primer unspezifischer, dies wird zum Beispiel bei einer Toichdown-PCR [II.4.9.1] ausgenutzt, um mit degenerierten Primern verwandte Gensequenzen zu suchen.

Die Reaktionen wurden standardmäßig in 100 µl Gefäßen wie folgt angesetzt:

Reaktionsansatz einer Standard-PCR	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	34 µl
10 x DNA Polymerase Puffer (**)	5 µl
dNTP-Mix (je 10mM)	5 µl
5' Primer 100 pM	2,5 µl
3' Primer 100 pM	2,5 µl
DNA Template (0,1 - 1 µg/µl)	1 µl
DNA Polymerase (**)	2 µl

(\*\*) Für eine PCR die hohe Lesegenauigkeiten erfordert, wurde die Proofreading-Polymerase aus *Pyrococcus wosei* eingesetzt (*Pwo*). In allen anderen Fällen wurde BioTherm DNA-Polymerase benutzt.

Eine Analyse der PCR-Produkte erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese [II.4.8]

Im Folgenden werden einige Spezialanwendungen der PCR beschrieben.

### II.4.9.1. Touchdown-PCR

Bei der Touchdown-PCR wird gezielt ausgenutzt, dass bei einer Annealing-Temperatur, die unterhalb des Optimums für den eingesetzten Primer liegt, die Bindung des Primers unspezifischer wird. Es werden Fehlpaarungen ermöglicht, so dass auch Sequenzen mit verwandten Primerbindungsstellen amplifiziert werden. Auf diese Weise ist es möglich, mit Primern, die spezifisch bei einem Gen in einem definierten Organismus binden, verwandte Gene in verwandten Organismen nachzuweisen. Der Erfolg hängt dabei von der Ähnlichkeit der Sequenzen ab.

Ausgehend von einer optimalen Annealing-Temperatur wird in einer ersten Folge von Amplifikationszyklen die Annealing-Temperatur schrittweise gesenkt. In jedem Zyklus kommen daher Produkte aus unspezifischeren Primer-Bindungen hinzu. In einer optionalen Folge von Zyklen bei konstanter Annealing-Temperatur können die gebildeten Produkte weiter amplifiziert werden. Die Menge der gebildeten Produkte und damit die Intensität einer Bande auf einem Agarose-Gel nimmt mit sinkender Spezifität ab.

Verlauf einer Touchdown-PCR			
Initiale Denaturierung	5 Minuten	95° C	
Denaturierung	45 Sekunden	95° C	20 Zyklen
Annealing	30 Sekunden	primerabhängig, T wird in jedem Zyklus um 0,5°C erniedrigt	
Elongation	1 Minute je 1000 Basen	72° C	
Denaturierung	45 Sekunden	95° C	optional 5 bis 15 Zyklen
Annealing	30 Sekunden	primerabhängig konstant	
Elongation	1 Minute je 1000 Basen	72° C	
finale Elongation	5 Minuten	72° C	

In dieser Arbeit wurde über Touchdown-PCR versucht, mit für *E. coli mscL* (MscL) und *ycgB* (MscS) spezifischen Primern in *H. elongata* und LBI 25B1 Gene die für MSCs codieren zu amplifizieren. Weiterhin wurde versucht mit für *H. elongata nhaD* spezifischen Primern in LBI 25B1 und *M. halophilus* Gene zu amplifizieren, die für NHAs codieren.

### II.4.9.2. Primer Walking

„Primer Walking“ oder auch „Walking on the Chromosome“ wird eingesetzt, um von einer bekannten Sequenz ausgehend einen unbekanntem Abschnitt des Chromosoms weiter zu sequenzieren.

Dazu wird zunächst genomische DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut, so dass Fragmente aus bekannter und unbekannter DNA mit etwa 3 kb Länge entstehen. Restriktionsenzyme die im Verdau optimale Fragmentlängen lieferten werden über Southern Hybridisierung [II.4.11] bestimmt. Anschließend werden mit einem geeigneten Restriktionsenzym genomische DNA und ein bekannter Vektor, z.B. pUC18, parallel verdaut. Vektor und Fragmente werden in verschiedenen Mischungsverhältnissen zur Ligation inkubiert.

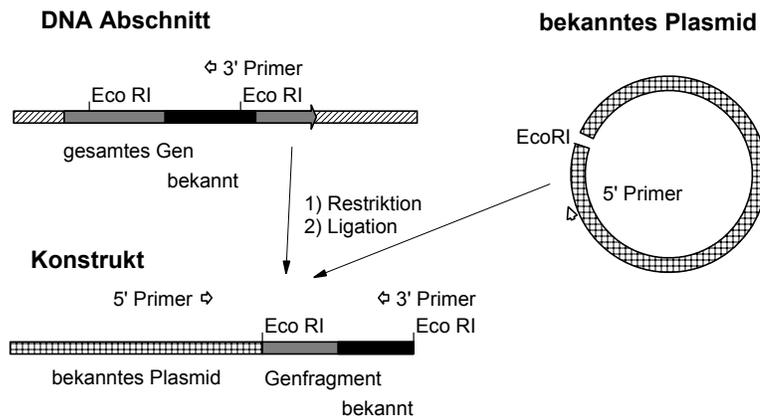


Abb. II.1: Prinzip des „Primer Walking“. Genomische DNA und ein Plasmid werden mit dem selben Restriktionsenzym verdaut und anschließend ligiert. Ein Teil der Konstrukte hat die dargestellte Form. Man wählt einen Primer aus der bekannten DNA Sequenz des Gens (schwarz) und einen zweiten aus der bekannten Vektorsequenz (kariert). Das PCR-Produkt enthält einen Teil der bekannten Sequenz, einen Teil des Vektors und einen Teil der unbekanntem Sequenz. Je nach Lage der Schnittstellen kann auch über Anfang und Ende des Gens hinausgelesen werden.

Für die nachfolgende PCR wird ein Primer aus der bekannten Gensequenz gewählt, der zweite Primer aus der Sequenz des Vektors. Bei geeigneter Wahl der Primer erhält man ein PCR-Produkt das außer einem Teil der bekannten Gensequenz und einem Teil der Vektorsequenz eine unbekanntem Sequenz des Vektors trägt. Die PCR erfolgt unter spezifischen Annealingbedingungen.

In dieser Arbeit war „Chromosome Walking“ eine Methode um die Sequenz von *H. elongata nhaD* aufzuklären. Als Vektor wurde pUC18 verwandt. Die auf pUC18 und der bekannten Sequenz von *H. elongata nhaD* basierenden Primer sind unter II.3.1.1. aufgeführt.

### II.4.9.3. RACE nach Bertoli & Burrows [1994]

Wie der Name (engl.: rapid amplification of cDNA ends = schnelle Vervielfältigung von cDNA Enden) schon aussagt wird diese Methode zur Analyse von cDNA eingesetzt. Die exakte Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes ist oftmals von Interesse. mRNA wird zunächst revers in cDNA transkribiert, dies kann mit genspezifischen oder mit Zufallsprimern erfolgen. Um ein bekanntes 3'-Ende am cDNA Strang zu erhalten wird ein sogenanntes

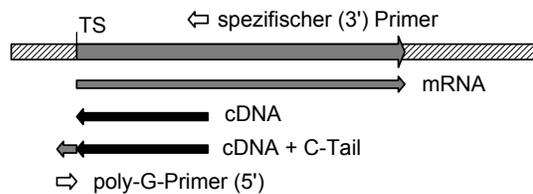


Abb. II.2: Prinzip der RACE: Ein DNA Abschnitt (gestreift) mit einem Gen (Grau) ist dargestellt (TS = Transkriptionsstart). Die mRNA (grau, schmaler Pfeil) wird in cDNA (schwarz, schmaler Pfeil) revers transkribiert. An die cDNA wird ein poly-C-Tail angehängt (schwarzer und grauer Pfeil). Mit einem für den c-Tail spezifischen Primer und einem genspezifischen Primer lässt sich die Sequenz der cDNA amplifizieren.

C-tailing durchgeführt. Dabei wird eine Folge von Cytosin-Nukleotiden an die einzelsträngige cDNA angehängt. In einer PCR mit poly-G-Primer und genspezifischem Primer wird nun die gewünschte cDNA Sequenz vervielfältigt.

Auf diese Weise kann natürlich auch eine teilweise bekannte Sequenz in 5'-Richtung weiter bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde nach Herstellerangaben in einer reversen Transkription mit der Reversen Transkriptase Superscript II zunächst wahlweise mit den für *H. elongata nhaD* spezifischen Primern HeAPrace1, HeAPrace2 und HeAPrace3 [II.3.1.1] einzelsträngige cDNA erzeugt. C-Tailing erfolgte mit Terminaler Desoxyribonucleotidyltransferase von MBI Fermentas. Anschließend wurde in einer spezifischen PCR mit dem für die reverse Transkription eingesetzten Primer und G<sub>15</sub>XBX die Zielsequenz amplifiziert.

<b>Reaktionsansatz für Reverse Transkription</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , 2x autoklaviert	6 µl
Gesamt RNA (1 µg/µl)	5 µl
dNTP-Mix (je 10mM)	1 µl
genspezifischer Primer 100 pM	1 µl
<b>Inkubation: 10 Minuten 70° C, auf Eis abkühlen</b>	
5 x First Strand Buffer	4 µl
DTT (0,1M)	2 µl
<b>Inkubation: 2 Minuten 42° C</b>	
Superscript II Reverse Transkriptase	1 µl
<b>Inkubation: 1 Stunde 42° C, 15 Minuten 70° C, Abkühlen auf Eis</b>	

Fällung der cDNA erfolgte in 1% CTAB / 0,35 M NaCl (Zugabe von 5 µl 5x konzentrierter Stammlösung). Nach Zentrifugation bei 10.000 g für 30 Minuten wurde in 20 µl 1,2 M NaCl resuspendiert und mit 50 µl Ethanol erneut gefällt. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 10.000 g für 30 Minuten wurde mit 70% (w/v) Ethanol gewaschen. Die cDNA wurde in 15,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.

<b>Reaktionsansatz für C-Tailing</b>	
cDNA	10 µl
5x Reaktionspuffer	4 µl
CoCl <sub>2</sub> (5m M)	3 µl
dCTP (100 mM)	1 µl
Terminale Desoxynukleotidyl Transferase	2 µl
<b>Inkubation: 10 Minuten 70° C, auf Eis abkühlen</b>	

Fällung und Aufreinigung der cDNA erfolgte nach dem gleichen Protokoll das nach der reversen Transkription angewandt wurde.

PCR mit genspezifischem Primer und dem G<sub>15</sub>XBX-Primer für den C-Tail erfolgte nach Standardprotokoll mit einer Annealingtemperatur von 55°C oder nach dem Protokoll einer Touchdown-PCR.

Bei der Verwendung von HeAPrace3 wurde in einer Variante sogenannte nested PCR durchgeführt. Zusätzlich zu HeAPrace3 wurde der weiter *upstream* gelegene Primer HeAPrace1 eingesetzt um eine höhere Produktspezifität zu erreichen.

#### II.4.9.4. Inverse PCR

Inverse PCR ist eine weitere Methode um ausgehend von einer bekannten DNA Sequenz weitere Sequenzabschnitte zu bestimmen. Damit die Methode erfolgreich angewandt werden kann, müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein. Erstens muss sich der bekannte DNA-Abschnitt zwischen zwei identischen Restriktionsschnittstellen befinden, die etwa 3000 bp auseinander liegen (eine der Restriktionsschnittstellen darf sich allerdings auch in diesem Sequenzbereich befinden). Zweitens muss innerhalb der bekannten Sequenz eine weitere Restriktionsschnittstelle liegen, die in dem durch das erste Restriktionsenzym begrenzten Bereich genau einmal schneidet. Drittens muss das zweite Restriktionsenzym so schneiden, das upstream und downstream der Schnittstelle zwei Primer zu konstruieren sind, die als Paar für eine PCR einzusetzen sind.

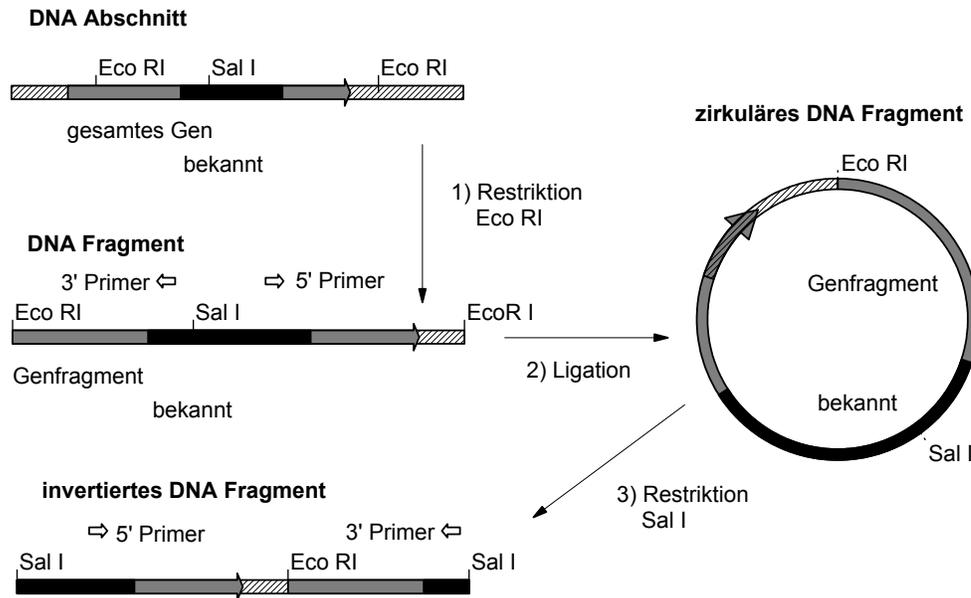


Abb. II.3: Prinzip der Inversen PCR: Genomische DNA wird mit geeigneten Restriktionsenzymen so verdaut, dass auf einem DNA Fragment bekannte und unbekannte Sequenzabschnitte zu finden sind. Durch Ligation wird die DNA zirkularisiert. Nach Schneiden mit dem zweiten Restriktionsenzym liegt die DNA wieder linear vor, die Lage der Primer (offene Pfeile) zueinander ist invertiert. Je nach Lage der Restriktionsschnittstellen kann gegebenenfalls von der bekannten Sequenz aus nur in eine Richtung weiter sequenziert werden kann.

Nach Verdau mit der ersten Restriktionsendonuklease wird die DNA durch Ligation zirkularisiert. Eine erneute Linearisierung erfolgt durch schneiden mit der zweiten Restriktions-endonuklease. Über ein geeignetes Primerpaar lässt sich die gewünschte Sequenz vervielfältigen. Der zweite Restriktionsverdau ist theoretisch nicht notwendig, da die Primer bereits in der zirkulären Struktur eine Inverse Lage zueinander haben. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass die anschließende PCR bessere Ergebnisse liefert, wenn der DNA Strang linearisiert ist.

### II.4.10. Quantifizierung von mRNA mittels Realtime PCR

Zur Quantifizierung von mRNA-Transkripten kann die sogenannte Realtime PCR angewandt werden. Über reverse Transkription mit Hexanukleotiden als Zufallsprimern wird zunächst die mRNA in cDNA umgeschrieben.

In einer Standard PCR werden anschließend spezifisch ca. 80 bp große Fragmente amplifiziert. Dabei wird in Echtzeit (realtime) die Menge des gebildeten PCR Produktes verfolgt. Dies erfolgt über die Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR® Green, der in dsDNA interkaliert und auch nur dort fluoreszieren kann. Die Kenngröße der Realtime-PCR ist der Schwellenzyklus, der PCR-Zyklus bei dem die Fluoreszenz eine bestimmte Intensität erstmalig überschreitet. Über den Vergleich der Schwellenwerte kann auf die ursprüngliche Menge an mRNA rückgeschlossen werden. Über den Vergleich mit einem Standard kann auf die Menge an eingesetzter Gesamt-RNA kalibriert werden.

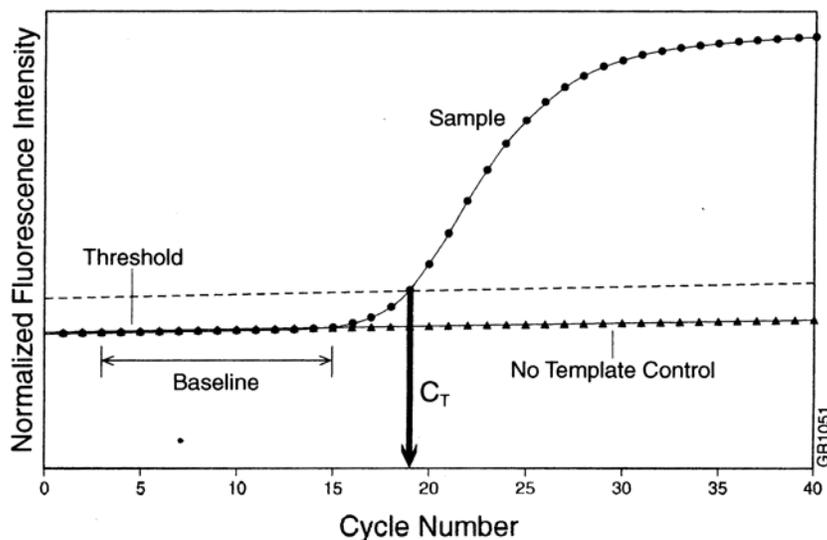


Abb. II.4: Verlauf der Fluoreszenz während einer Realtime-PCR mit der Zyklenzahl. Die Fluoreszenz einer Kontrolle ohne Template verläuft auf der Basislinie (Dreiecke). Bei einer Probe mit Template steigt die Fluoreszenz mit Zunahme der PCR-Produkte. Der Schwellenwert (Threshold) ist so zu wählen, dass die Zunahme der PCR-Produkte zum Zeitpunkt, an dem er überschritten wird (Schwellenzyklus  $C_T$ ), einen exponentiellen Verlauf hat. (Aus dem Handbuch des GeneAmp® 5700 Sequence Detection System).

Für die quantitative PCR ist es wichtig, dass die amplifizierten Fragmente mit einer Toleranz von 5 % gleich groß sind und die Primer nicht als limitierende Faktoren fungieren. Zusätzlich dürfen keine Nebenprodukte entstehen, da diese die Messergebnisse erheblich verfälschen.

<b>Reaktionsansatz für Reverse Transkription</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , 2x autoklaviert	6 µl
Gesamt RNA (1 µg/µl)	5 µl
dNTP-Mix (je 10mM)	1 µl
Hexanukleotid Mix	1 µl
<b>Inkubation: 10 Minuten 65° C, auf Eis abkühlen</b>	
5 x First Strand Buffer	4 µl
DTT (0,1M)	2 µl
<b>Inkubation: 2 Minuten 42° C</b>	
Superscript II Reverse Transkriptase	1 µl
<b>Inkubation: 1 Stunde 42° C, 15 Minuten 70° C, Abkühlen auf Eis</b>	

<b>Reaktionsansatz für Realtime PCR</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	13,87 µl
cDNA in geeigneter Verdünnung (*)	1,25 µl
5'-Primer	1,00 µl
3'-Primer	1,00 µl
SYBR <sup>®</sup> Greem PCR Master Mix	7,88 µl

(\*) In einer Verdünnungsreihe 1:10, 1:100 und 1:1000 wurde die optimale Verdünnung der Ansätze aus der reversen Transkription bestimmt. Als Standard diente *H. elongata* 16S rRNA. Die Primersequenzen sind [II.3.1.1] zu entnehmen.

<b>Verlauf der Realtime-PCR</b>			
Vorlauf	2 Minuten	50° C	
Initiale Denaturierung	10 Minuten	95° C	
Denaturierung	15 Sekunden	95° C	40 Zyklen
Annealing und Elongation	30 Sekunden	60° C	

Für diese Arbeit wurde zur Detektion das GeneAmp<sup>®</sup> 5700 Sequence Detection System eingesetzt.

### II.4.11. Southern-Hybridisierung

Southern Hybridisierung ist eine Methode zur Detektion und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Proben. Zur Hybridisierung werden markierte DNA-Sonden eingesetzt. Um den unnötigen Umgang mit Radioaktivität zu vermeiden wurden hier Digoxigenin-markierte (DIG-) Sonden eingesetzt. Die Detektion erfolgte über Anti-DIG-Antikörper, die mit einer Luziferase gekoppelt waren. Die in einer photochemischen Reaktion erzeugte Lumineszenz wurde über die Belichtung eines Films sichtbar gemacht.

#### II.4.11.1. Konstruktion Digoxigenin-markierter Sonden

In einer PCR wurden unter Standardbedingungen die gewünschten DNA-Fragmente vervielfältigt. Zur Konstruktion einer *mscL*- (MscL) spezifischen Sonde wurden YM1F und YM2R verwandt. Das resultierende Fragment wurde mit *ClaI* verdaut, um Sonden einer Länge von ca. 500 bp zu erhalten. Zur Konstruktion einer *ybbG*- (MscS) spezifischen Sonde wurden MSNR1 und MSBS1 verwandt.

Zur Digoxigenin-Markierung wurden zunächst 15 µl des Reaktionsansatzes für 10 Minuten bei 95° C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. 2 µl Hexanukleotid Mix, 2 µl DIG-DNA-Labeling Mix und 1 µl Klenow Fragment wurden zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Ein gesamter Ansatz wird zur Hybridisierungslösung gegeben.

Zur Größenbestimmung wird bei der Gelelektrophorese parallel zu den Proben ein DIG-markierter Größenstandard aufgetragen.

#### II.4.11.2. Southern-Transfer

Nach dem Auftrennen über Agarose-Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran mittels einer Vakuumblotting-Apparatur. Hier werden die verschiedenen Lösungen durch das Gel und die Nylonmembran gesaugt.

Eine geeignet große Nylon-Membran wurde auf der porösen Auflage der Apparatur ausgerichtet. Der Rest der Unterlage wurde mit einer Maske abgedeckt und das Gel wurde über der Membran platziert. Nach Abdichten der Apparatur wurde ein Vakuum angelegt und das Gel mit Denaturierungslösung überschichtet. Für 20 Minuten wurde nach Bedarf Denaturierungslösung nachgelegt, um ein Trocknen und Kolabieren des Gels zu verhindern. Danach wurde die Denaturierungslösung entfernt und für 20 Minuten mit Neutralisierungslösung überschichtet. Zum Transfer der DNA wurde das Gel anschließend je nach Dicke für 1 bis 2 Stunden mit 20x SSC überschichtet.

Nach Abschluß der Prozedur wurde das Gel entfernt und mit Ethidiumbromid gefärbt um zu überprüfen, ob der DNA-Transfer erfolgreich war. Zur Fixierung der DNA auf der Nylonmembran wurde diese für 10 Minuten unter UV-Licht inkubiert.

### **II.4.11.3. Immunologischer Nachweis**

Zur Hybridisierung und Detektion wurde die Nylonmembran mit der fixierten DNA mit verschiedenen Lösungen inkubiert. Die Hybridisierungstemperatur lag dabei zwischen 42° C und 55° C, die optimale Temperatur wurde empirisch bestimmt.

Während des gesamten Protokolls darf die Nylonmembran nicht trocknen.

#### **Hybridisierung**

- 2 Stunden Prähybridisierungslösung bei Hybridisierungstemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen
- über Nacht Hybridisierungslösung mit gewünschter Sonde bei Hybridisierungstemperatur
- zwei Waschschrte mit 2x Waschpuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur
- zwei Waschschrte mit 0,5x Waschpuffer für 5 Minuten bei Hybridisierungstemperatur

#### **Detektion**

- 2 Minuten Waschpuffer bei Raumtemperatur
- 45 Minuten 2x Blockierungslösung bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen
- 30 Minuten Anti-DIG-AK-Lösung bei Raumtemperatur
- zwei Waschschrte mit Waschlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur
- 2 Minuten Detektionspuffer
- Einschweißen der Membran in Folie
- 3 Minuten Nachweisreagenz
- Belichtung eines Röntgenfilms, Entwicklung des Films mit Standardchemikalien

#### **Stripping**

Um die Nylonmembran erneut zu verwenden müssen die Sonden entfernt werden. Dazu sind die folgenden Schritte notwendig:

- zweimal 1 Minute  $H_2O_{\text{bidest}}$  bei Raumtemperatur
- zweimal 15 Minuten Strippinglösung
- zwei Waschschrte mit 2x SSC

Die Nylonmembranen werden in 2x SSC gelagert.

### II.4.12. Transposon-Mutagenese

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Funktionalität von Genen liegt in ihrer Inaktivierung und der Analyse des resultierenden Phänotyps.

Die Transposon-Mutagenese ist ein Werkzeug zur zufälligen Inaktivierung von Genen. Wird bei einem Bakterium die Existenz eines bestimmten Gens vermutet, bei dessen Inaktivierung ein eindeutiger Phänotyp zu erwarten ist, kann die Transposon-Mutagenese zur Identifikation genutzt werden. Über ein geeignetes Screening-Verfahren können Mutanten mit dem erwarteten Phänotyp isoliert werden.

Von Kunte wurde 1995 Verfahren zur Transposon-Mutagenese speziell für *H. elongata* entwickelte, dass unter anderem bereits erfolgreich zur Identifizierung der Ectoin-Gene [Göller et al. 1998] eingesetzt wurde. Dabei wurden die Selbstmord-Vektoren pSUP101 und pSUP102-Gm genutzt, um die Transposons Tn5 und Tn1732 in das Genom von *H. elongata* einzuführen. Übertragung des Plasmids erfolgte mittels Konjugation mit *E. coli* SM10. Es konnte gezeigt werden, dass Tn1732 zufällig in das *H. elongata* Genom insertiert wird.

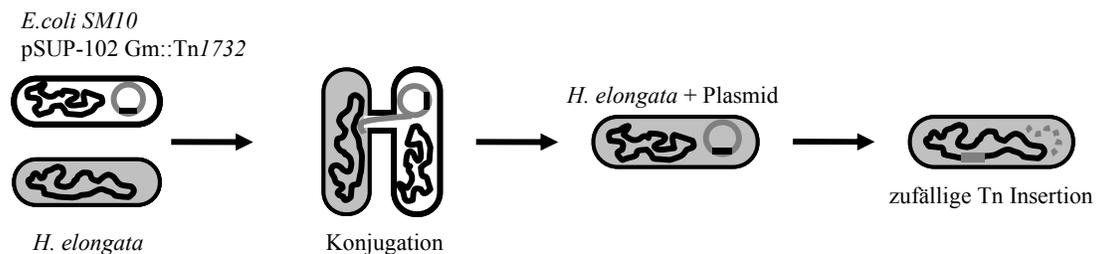


Abb. II.5: Transposon-Mutagenese. Oben: Bei der Konjugation wird das Plasmid pSUP-102Gm::Tn1732 von *E. coli* auf *H. elongata* übertragen. Das Transposon insertiert zufällig in das Genom von *H. elongata*, der verbleibende Rest des Vektors wird metabolisiert.

Die Konjugation von *E. coli* SM10 pSUP102-Gm::Tn1732 erfolgte nach der von Kunte & Galinski [1995] entwickelten Methode:

- *H. elongata* wurde über Nacht in AB2 Medium kultiviert (OD<sub>600</sub> ca. 1,2)
- *E. coli* SM10 wurde über Nacht auf festem AB2 Medium ausgestrichen, die Kolonien wurden in vorgewärmtem AB2 Medium zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 resuspendiert
- *E. coli* und *H. elongata* wurden im Verhältnis 1:4 (OD<sub>600</sub>) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt, 2 Minuten bei 6.500 g zentrifugiert
- Das Sediment wurde in 50 µl AB2 Medium resuspendiert. Auf vorgewärmtem AB2 Festmedium wurde ein angefeuchteter Nitrozellulosefilter (hydrophil, Porengröße 0.45 µm) gelegt. Die Suspension wurde aufgetragen.

- Über Nacht wurde bei 37° C inkubiert.
- Der Nitrozellulosefilter wurde in ein Ependorff Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml AB2 Medium versetzt. Durch Schütteln wurden die Zellen resuspendiert.
- Selektion erfolgte durch Ausstreichen von Aliquots der Suspension auf mit Kanamycin supplementiertem AB2 Festmedium.

#### II.4.13. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Identifizierung teilweise lysierter Bakterienkulturen

Bei einem hypoosmotischen Schock dringt aufgrund der höheren osmotischen Aktivität im Zellinneren Wasser aus dem Außenmedium ein und der Turgor steigt. Eine Zelle, die keine Schutzmechanismen besitzt um das osmotische Gefälle auszugleichen und über keine ausreichend rigide Zellwand verfügt, die einem hohen Turgor standhält, lysiert.

Eine einfache Methode zur Unterscheidung lebender, intakter Zellen und toter oder lysierter Zellen beruht auf dem selektiven Eindringen von Fluoreszenzfarbstoffen in Bakterienzellen deren Zellmembran defekt oder deren Energiestoffwechsel gestört ist. Der Test basiert auf dem Vorhandensein von ATP-abhängigen Membranproteinen, die ein breites Spektrum lipophiler, also membrangängiger und potentiell cytotoxischer Substanzen, bereits in der Membran abfangen und in den extrazellulären Raum abgeben [Lewis 1994]. Ein Substrat dieser Schutzproteine (Multidrug Resistance Carrier, MRC) ist das Fluorophor Ethidiumbromid (EtBr). Die Intensität der Fluoreszenz von EtBr steigt durch Interkalation mit Nukleinsäuren, weswegen es in der Molekularbiologie weit verbreiteten Einsatz zur Detektion von DNA und RNA findet.

Differentialfärbemethoden zur Unterscheidung zwischen toten und lebenden Bakterien sind auch kommerziell verfügbar. Wie an dem Beispiel des LIVE/DEAD® *BacLight*<sup>TM</sup> Viability Test-Kits (Molecular Probes) zu sehen, sind diese Produkte oft umständlich zu handhaben und durch die eingesetzten Fluorophore sehr kostenintensiv. Ethidiumbromid ist als weit verbreitetes Verbrauchsmaterial vergleichsweise preiswert. Von Karla [2002] wurde daher eine Methode entwickelt, die auf der Aufnahme von Ethidiumbromid durch Zellen basiert.

Die Methode diente zum Nachweis von Zellen, deren Energiestoffwechsel gestört ist. Für diese Arbeit war ein Nachweis lysierter Bakterien notwendig. Da das Messsignal jedoch in erster Linie von der Interkalation des EtBr mit den Nukleinsäuren herrührt und nicht von dem Weg des Eindringens von EtBr in die Zellen, erschien die Methode als geeignet. Lebende

Zellen verhindern über die MRCs ein Eindringen von Ethidiumbromid. Bei toten Zellen, insbesondere bei (lysierten) Zellen mit defekter Membran dringt EtBr ein. Da bei lysierten Zellen die Zellmembran nicht mehr überwunden werden muss, war ein schnellerer Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zu nicht Lysierten toten Zellen zu erwarten.

#### II.4.13.1. Untersuchungen an *E. coli*

Bei *E. coli* sind MSCs bekannt und weitgehend charakterisiert. Zudem existieren Mutanten, denen MscL (MJF 367,  $\Delta mscL$ ), MscS (MJF 451,  $\Delta yggB$ ) beziehungsweise beide MSCs (MJF 455,  $\Delta mscL\Delta yggB$ ) fehlen [Levina et al. 1999]. Es existiert somit ein geeignetes Modell, um das Fluoreszenzverhalten des Wildtyps mit unterschiedlichen Mutanten zu vergleichen.

Anzucht und Messung erfolgte nach folgendem Protokoll (Mengenangaben je Loch):

- Die Bakterien wurden über Nacht in 96-Loch Mikrotiterplatten (Nunc, für Zellkultur) in MM63Gcr/5 supplementiert mit 2 mM Ectoin bis zu einer realen OD<sub>600</sub> von ca. 1,5 kultiviert.
- In einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc Fluoroplate) wurden 90 µl 5% (w/v) NaCl (isoosmotisch) oder 90 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (hypoosmotischer Schock) vorgelegt
- 10 µl der Bakterienkultur wurde zugegeben und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
- 50 µl EtBr-Lösung (30 µg/ml) wurde zugegeben

Sofort nach der Zugabe von EtBr wurde die Datenaufnahme gestartet. Die Messung erfolgte in einem Perkin Elmer LS50 Lumineszenzspektrometer mit Erweiterung zur Messung von Mikrotiterplatten. Gemessen wurde bei 20° C über einen Zeitraum von 81 Minuten, wobei für die Erfassung aller 96 Löcher pro Zyklus 3 Minuten benötigt wurden. Die Aufzeichnung der Messwerte erfolgte mit dem Programm FL WinLab, Version 3.0 (Perkin Elmer). Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 500 nm, die Emission wurde bei 580 nm gemessen. Die Spaltbreite wurde sowohl für Anregung als auch für Emission auf 10 nm gesetzt.

#### II.4.13.2. Untersuchungen an *H. elongata*

Um die Übertragbarkeit der Methode auf *H. elongata* zu gewährleisten, wurden vor Beginn eines Screenings von Transposonmutanten mit hohem Durchsatz Messungen am Wildtyp vorgenommen. Anzucht und Messung erfolgten Analog dem Protokoll, das für *E. coli* benutzt wurde [II.4.13.1].

In Änderung des Protokolls erfolgte die Anzucht in MM63Gcr/10, da *H. elongata* bei höheren Salinitäten als *E. coli* wachsen kann. Ein hypoosmotischer Schock in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  fällt entsprechend drastischer aus. Ein Wechsel in isoosmotisches Medium wurde durch 10% (w/v) NaCl dargestellt.

Ein Aliquot der Kultur wurde mit 3% Tween 20 versetzt, um gezielt eine Lyse der Kultur zu erreichen. Zur Messung wurde in 10% NaCl verdünnt.

Zusätzlich wurde *H. elongata* in Gegenwart von 1 mM  $\text{Gd}^{3+}$  (Endkonzentration) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  verdünnt, um das Fluoreszenzverhalten nach einem hypoosmotischen Schock unter lysierenden Bedingungen zu erfassen. Um einen Einfluss von  $\text{Gd}^{3+}$  auf das Fluoreszenzverhalten der Kultur an sich auszuschließen, erfolgte eine Verdünnung in 10% NaCl in Gegenwart von 1 mM  $\text{Gd}^{3+}$ .

Für das Screening wurden auf einer Mikrotiterplatte 96 Mutanten von Typ *H. elongata* Tn/732 in MM63Gcr/10 angezogen. Die Messung erfolgte nach Verdünnung in jeweils einmal  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  (hypoosmotischer Schock) und 10% NaCl (isoosmotisch). Der Messzeitraum wurde auf 60 Minuten verkürzt.

Zur Auswertung wurde die Differenz der Messsignale zwischen den Messungen nach hypoosmotischem Schock und unter isoosmotischen Bedingungen gebildet.

## II.4.14. elektrophysiologische Messungen

### II.4.14.1. Herstellung von Riesensphäroplasten

*H. elongata* Riesensphäroplasten wurden nach einer von Martinac et al. [1987] beschriebenen modifizierten Prozedur präpariert.

Von einer Übernachtskultur in K5 Medium wurde eine neue Kultur in 100 ml vorgewärmten K5 Medium angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,2 kultiviert. 60  $\mu\text{g/ml}$  Cephalixin wurden zugefügt und die Suspension weiter kultiviert bis die unter dem Lichtmikroskop sichtbaren sphärischen Riesenzellen einen Durchmesser von ca. 7  $\mu\text{m}$  aufwiesen.

Die Riesenzellen wurden bei 1500 g und 4° C zentrifugiert und in 2,5 ml 0,8 M Saccharose resuspendiert. Nacheinander wurden unter vorsichtigem Rühren 150  $\mu\text{l}$  1 M Tris (pH 7,8), 120  $\mu\text{l}$  Lysozym (5 mg / ml), 30  $\mu\text{l}$  DNase I (5 mg / ml) und 120  $\mu\text{l}$  0,125 M EDTA zugegeben. Für 5 Minuten wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde langsam eine Lösung mit 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,7 M Saccharose und 10 mM Tris (pH 7,8) zugegeben und für weitere 4 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde auf 7 ml einer Lösung mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,8 M Saccharose und 10 mM Tris (pH 7,8) geschichtet und durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 1000 g und 4° C gewaschen.

### II.4.14.2. Membranisolierung und Konstruktion von Riesenliposomen

Die Präparation der Membranen von *H. elongata* folgt einem verkürzten Protokoll nach Ishidate et al. [1986], ergänzt durch die Prozedur von Berrier et al. [1989].

100 ml einer Übernachtskultur in K5 Medium wurden durch Zentrifugation bei 4° C und 2500 g für 5 Minuten sedimentiert. Die Zellen wurden zum Waschen in 10 ml Anzuchtmedium resuspendiert und unter identischen Bedingungen erneut sedimentiert. Es wurde in 2 ml einer 20 %igen Saccharoselösung resuspendiert und mit je 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  DNase und RNase versetzt. Die Suspension wurde durch zweimalige Passage einer French Press bei 10.000 psi aufgeschlossen. Größere Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 2000 g abgetrennt.

Der Überstand wurde mit 5 mM EDTA versetzt und auf einen zweiteiligen Saccharosegradienten (0,8 ml 60 % Saccharose und 2,5 ml 25 % Saccharose) gegeben. Anschließend wurde für 3,5 Stunden in einem Beckmann SW 50.1 Rotor bei 40 krpm

zentrifugiert. Die an der Phasengrenze zwischen den Saccharoselösungen sichtbare Bande wurde über eine seitlich eingestochene Kanüle entnommen. Die Membranfraktion wurde durch Zentrifugation bei 90 krpm in einem Beckmann TI 100 Rotor sedimentiert und in 10 mM HEPES Puffer (pH 7,4) resuspendiert.

Eine Fusion der Membranfragmente mit Azolectin in Riesenliposomen erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr.-Ing. R. Wagner (Lehrstuhl für Biophysik, Osnabrück) über Einfrier/Auftau-Zyklen nach dem Protokoll von Criado & Keller [1987].

#### **II.4.14.3. patch-clamp Messungen**

Patch-clamp Messungen erfolgten in der Arbeitsgruppe von Dr.-Ing. R. Wagner (Lehrstuhl für Biophysik, Osnabrück) an einer Apparatur gängiger Bauart (aus eigener Fertigung) in 10 mM HEPES Puffer pH 7,5. Glasmikropipetten wurden mit einem Elektroden-Ziehgerät kurz vor Gebrauch hergestellt.

Nach Konstituierung des Gigaohm-Siegels zwischen Patch-Pipette und Riesenliposom bzw. Riesensphäroplast wurde eine Pipettenspannung von 30 mV angelegt und die Aufzeichnung des Messsignals gestartet.

Ein Unterdruck in der Patch-Pipette wurde durch Ansaugen mit einer Einwegpipette erzeugt.

Die Aufzeichnung der verstärkten und gefilterten Messdaten erfolgte elektronisch.

#### II.4.15. Analyse der *nhaD* Expression in *H. elongata*

Zur Analyse der Expression von *nhaD* wurden je 10 ml *H. elongata* aus einer K5-Medium-Übernachtskultur in je 100 ml vorgewärmtes K2, K5, K10 und K20 Medium überführt. Zum Startzeitpunkt und nach 10 Minuten, 30 Minuten sowie 1, 2 und 3 Stunden wurde eine Probe von je 1,5 ml entnommen. Parallel wurde das Wachstum der Kultur über die optische Dichte verfolgt.

Die Zellen aus den Proben wurden geerntet und die RNA isoliert. Über Realtime-PCR [II.4.10] wurde die Menge an *nhaD* mRNA quantifiziert (Primer tNhaF und tNhaR), als externer Standard diente 16S rRNA (Primer t16SF und t16SR)

#### II.4.16. Inaktivierung von *nhaD*

Eine Möglichkeit zur Überprüfung der Funktionalität eines Gens und des zugehörigen Genproduktes ist dessen Inaktivierung.

In dieser Arbeit wurde versucht, *nhaD* durch Insertion eines Elementes zu inaktivieren, das zum Abbruch der Translation führt. Dazu wurde die von Prentki & Krisch [1984] beschriebene  $\Omega$ -Kassette aus pHP45- $\Omega$  in eine Teilsequenz von *nhaD* inseriert und das entstandene Fragment in pK18*mob*SacB inkloniert [II.4.16.1]. Mit dem resultierenden Vektor pKHeAP $\Omega$ 1 wurde der *E. coli* SM10 transformiert und mit *H. elongata* zur Konjugation gebracht [siehe dazu auch die Abhandlung zur Transposon-Mutagenese, II.4.12]. Selektion erfolgte über die Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz aus der  $\Omega$ -Kassette und die von SacB vermittelte Saccharoseunverträglichkeit auf mit 20% (w/v) Saccharose und 200  $\mu$ g / ml supplementiertem AB2 Medium.

Die resultierenden Mutanten *H. elongata* NhaD- $\Omega$  wurden in flüssigen Komplexmedien und auf festen Komplexmedien verschiedener Salinitäten kultiviert und auf auffälliges Wachstumsverhalten bei hohen Salinitäten überprüft. Alle Anzuchten erfolgten unter Selektion auf Streptomycin- und Spectinomycinresistenz.

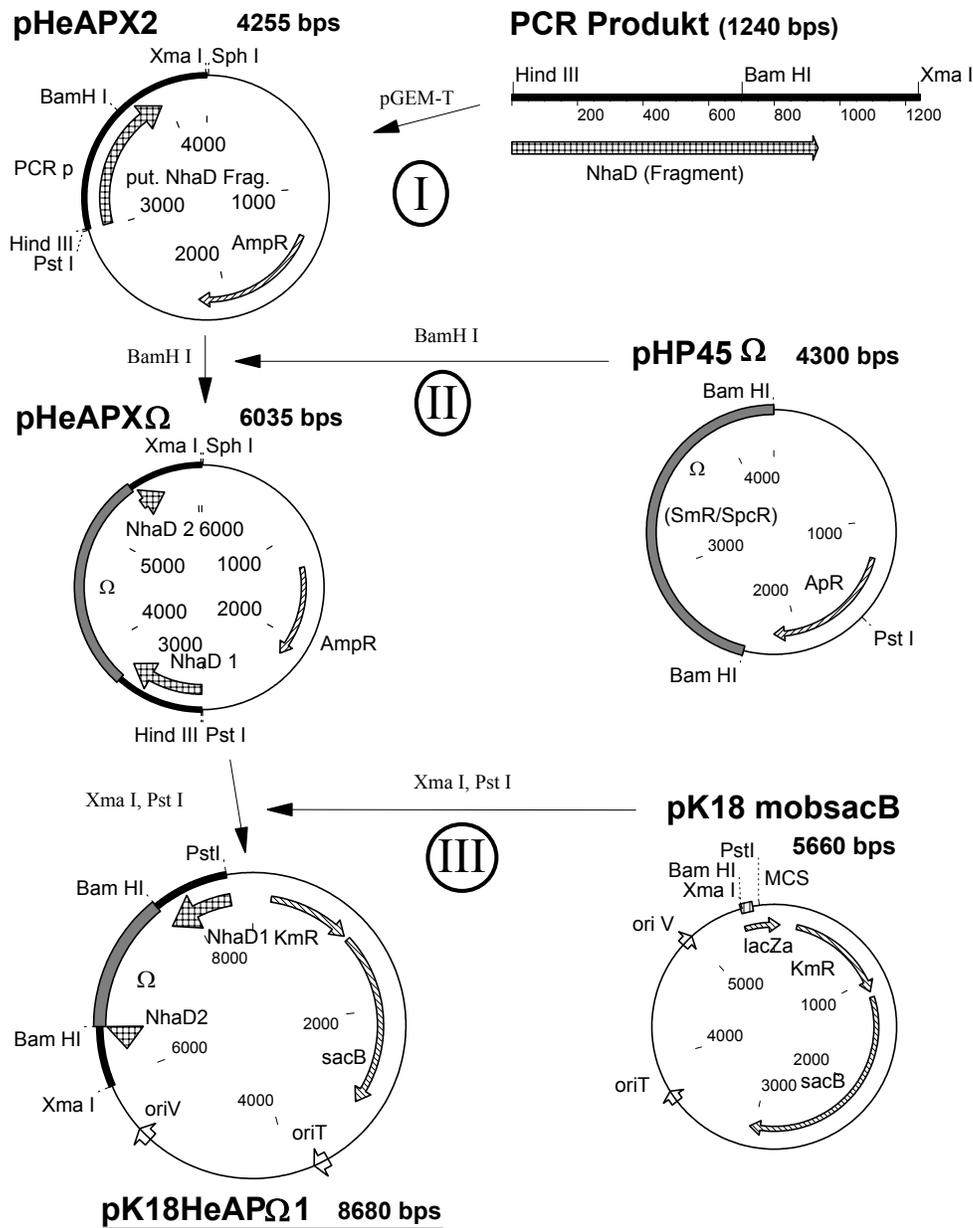
II.4.16.1. Konstruktion von pKHeAP $\Omega$ 1

Abb. II.2.: Klonierungsstrategie für einen Vektor zur Insertion einer  $\Omega$ -Kassette in das *nhaD*-Gen von *H. elongata*.

I) Amplifikation einer 1240bp langen Sequenz aus *H. elongata*, eine 950bp Teilsequenz codiert für ein C-Terminales Fragment des *NhaD*. Die Primer wurden um je eine Sequenz mit Hind III- beziehungsweise Xma I-Restriktionsschnittstelle erweitert. Zwischenklonierung des PCR-Produkts in pGEM-T.

II) Ausschneiden der  $\Omega$ -Kassette aus pHP45- $\Omega$  und Insertion über die Bam HI-Schnittstelle von pHeAPX2.

III) Klonierung der um die  $\Omega$ -Kassette erweiterten *H. elongata*-Sequenz in pK18mobSacB über Xma I- und Pst I-Schnittstellen. Der resultierende Vektor wird mit pK18HeAP $\Omega$ 1 bezeichnet.

#### II.4.17. Expression von *H. elongata nhaD* in *E. coli*

Zur Expression von *H. elongata nhaD* in *E. coli* wurde ein Vektor auf der Basis von pUC18 konstruiert [II.4.16.1]. Mit dem Vektor pUCHelNhaD wurden der Standardlaborstamm *E. coli* XL1-Blue und die Mutante *E. coli* NM81 transformiert. Da *H. elongata nhaD* über PCR vervielfältigt wurde ist die Sequenz im resultierenden Vektor möglicherweise fehlerhaft. Daher wurden für Wachstumsexperimente verschiedene Klone eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob *E. coli H. elongata nhaD* mRNA gebildet hat und ob die Expression über den pUC18 Lac-Promotor zu steuern ist, wurde XL1-Blue pUCHelNhaD in LB1 ohne Zusatz, unter Zusatz von Glucose (Repression des Promotors) und unter Zusatz von 0,5 mM IPTG (Induktion des Promotors) kultiviert. Parallel wurde XL1-Blue pUC18 als Blindprobe in LB1 kultiviert. Gesamt RNA wurde isoliert und über reverse Transkription (Reverse Transcriptase Superscript II) in cDNA umgeschrieben. In einer Standard-PCR mit *nhaD* spezifischen Primern wurden gleiche Mengen an cDNA eingesetzt und die relative Menge an gebildeter DNA über die Intensität der Produktbanden im Agarosegel abgeschätzt.

*E. coli* XL1-Blue pUCHelNhaD und pUC18 wurden in LB1, LB5 und LB5 0,5 mM IPTG kultiviert um zu überprüfen, ob *H. elongata NhaD* das Wachstumsverhalten eines *E. coli* Stammes beeinflusst, der alle eigenen NHAs besitzt.

*E. coli* NM81 pUCHelNhaD und pUC18 wurden in LB1, LB5 und LB5 0,5 mM IPTG kultiviert um zu untersuchen, ob der Verlust von NhaA durch *H. elongata NhaD* kompensiert werden kann.

Alternativ erfolgte eine Anzucht auf festem Minimalmedium mit C-Quellen, die über Na<sup>+</sup>-Cotransport aufgenommen werden: MM63Gly, MM63Ser und MM63Pro, jeweils mit 1% und 5% Salinität. Parallel erfolgte eine Kontrollanzucht auf MM63Gcr. Dazu wurden einzelne Kolonien der Organismen mit sterilen Zahnstochern zunächst auf festes MM63/1 Medium übertragen und bis zu einer sichtbaren Größe bei 37° C bebrütet. Die Kolonien wurden mit sterilen Samstempeln auf die verschiedenen Medien übertragen und bei 37° C bebrütet. Die Größe der Kolonien diente als Indikator für die Wachstumsgeschwindigkeit.

Alle Anzuchten erfolgten unter Selektion auf Ampicillinresistenz.

### II.4.17.1. Konstruktion des Expressionsvektors pUCheINhaD

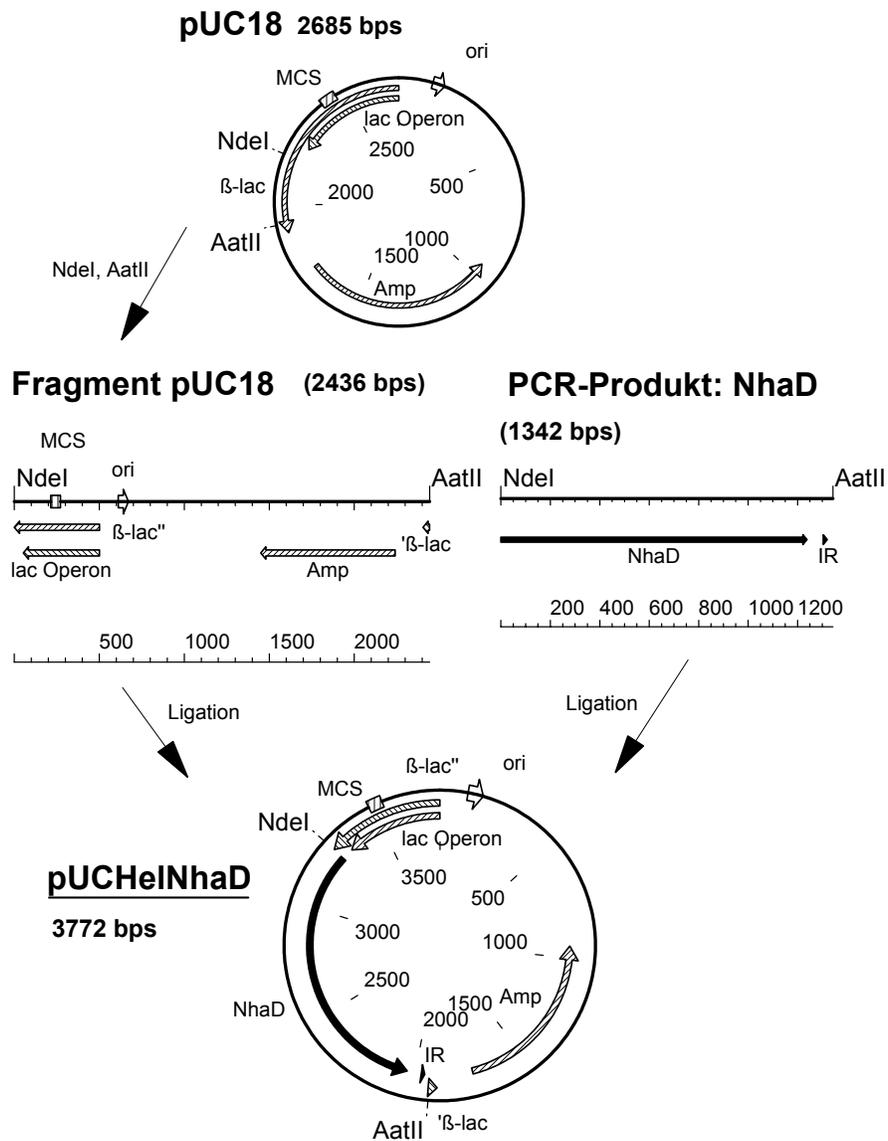


Abb. II.X.: Klonierungsstrategie für einen Vektor zur Expression von *H. elongata nhaD* in *E. coli*.

Eine 1342bp langen Sequenz aus *H. elongata* wird über PCR amplifiziert, die Primersequenzen sind soweit modifiziert, dass das Met-Startcodon in einer *NdeI*-Restriktionsschnittstelle liegt, der komplementäre Primer enthält eine *AatII*-Restriktionsschnittstelle. Über die Schnittstellen wird die Sequenz in pUC18 kloniert, so dass das *nhaD*-Gen im Leserahmen insertiert ist. Der resultierende Vektor wird mit pUCheINhaD bezeichnet.

### **II.4.18. Sequenzierung**

Alle Sequenzierungsreaktionen sowie deren Auswertung wurden als Auftragsarbeit von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

### **II.4.19. Sequenzanalyse**

#### **II.4.19.1. Datenbankrecherche**

Zur Suche nach ähnlichen DNA- und Aminosäuresequenzen wurden das Programme BLASTN, BLASTP und BLASTX des NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>] eingesetzt.

#### **II.4.19.2. Sequenzvergleich**

Vergleich zweier Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Programm BLAST des NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>].

Vergleich multipler Aminosäuresequenzen und Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaft der Sequenzen erfolgte mit den Programmen MULTALIN [<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>] und CLUSTAL W [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>].

#### **II.4.19.3. Promotoranalyse**

Promotoranalysen wurden über das multifunktionelles Interface SEARCHLAUNCHER gestartet [<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>].

#### **II.4.19.4. Aminosäuresequenz-Analyse**

Aminosäuresequenzanalysen zur Vorhersage von Strukturelementen wurden über das multifunktionelles Interface SEARCHLAUNCHER [<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>] gestartet.

#### **II.4.19.5. Phylogenetischer Baum**

Phylogenetische Verwandtschaft wurde mit PHYLODENDRON dargestellt [<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>].

### **II.4.20. Sequenzbearbeitung und -darstellung**

Bearbeitung und grafische Darstellung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen Clone Manager, Primer Designer und Plasmid Map Enhancer von Scientific and Educational Software.



### **III. Ergebnisse**

#### **III.1. Mechanosensitive Kanäle**

*Halomonas elongata*, ein halophiles Eubakterium, produziert zum Ausgleich des osmotischen Gefälles in extrem salzhaltigen Medien kompatible Solute. Neben dieser Schutzfunktion wird bei kompatiblen Soluten eine protektive Wirkung vor denaturierendem Stress für Biomoleküle sowie eine schützende Wirkung für die Haut beobachtet. Daher erfolgt mittlerweile eine großtechnische Produktion kompatibler Solute auf Basis des von Galinski und Sauer entwickelten „Bakterienmelkens“ [1998]. Hierbei wird *H. elongata* zur Solutproduktion unter Hochsalzbedingungen kultiviert und durch Verdünnung mit bidestilliertem Wasser einem hypoosmotischen Schock unterzogen. Die Solute werden als Antwort auf den Schock freigesetzt. Analog der Produktion von Soluten mit *H. elongata* kann die Produktion auch mit dem haloalkaliphilen „Lake Bogoria“ Isolat 25B1 erfolgen, auch diese Spezies ist melkbar.

Ein weit verbreiteter Schutzmechanismus vor drohender Lyse durch in die Zellen diffundierendes Wasser und damit zunehmenden Turgor bei einem hypoosmotischen Schock sind mechanosensitive Kanäle (Msc's). Eines der Ziele dieser Arbeit ist der physiologische Nachweis von Msc's in *H. elongata* und LBI 25B1 sowie gegebenenfalls die Identifikation der zugehörigen Gensequenz.

##### **III.1.1. Sequenzvergleich bei Msc's**

Zwei Msc's von *E. coli*, MscL und MscS, sind nachweislich am Schutz des Organismus bei einem hypoosmotischen Schock beteiligt [Levina et al. 1999]. Bei einer Reihe von Organismen sind zu MscL oder MscS homologe Proteine bekannt. Bei einem Vergleich der Sequenzen zeigen sich konservierte Bereiche für beide Typen von Msc's [Abb. III.1].

Es fällt auf, dass bei den bekannten Msc's für MscL die konservierten Bereiche ausgeprägter und zusammenhängender sind. Bei MscS finden sich vorwiegend punktuell konservierte Residuen. Eine genauere Betrachtung zeigt allerdings, dass unter den drei am engsten verwandten Spezies (*E. coli*, *E. ictaluri* und *Synechocystis sp.*) ebenfalls ein zusammenhängender Bereich hoher Homologie zu finden ist [Abb. III.1 B), grau unterlegt].

Von diesen Beobachtungen ausgehend kann man vermuten, dass die Aminosäuresequenz eines Msc von *H. elongata* in den konservierten Regionen ebenfalls Homologien zu den bekannten Spezies aufweist, soweit der postulierte Msc den Typen MscL oder MscS entspricht.

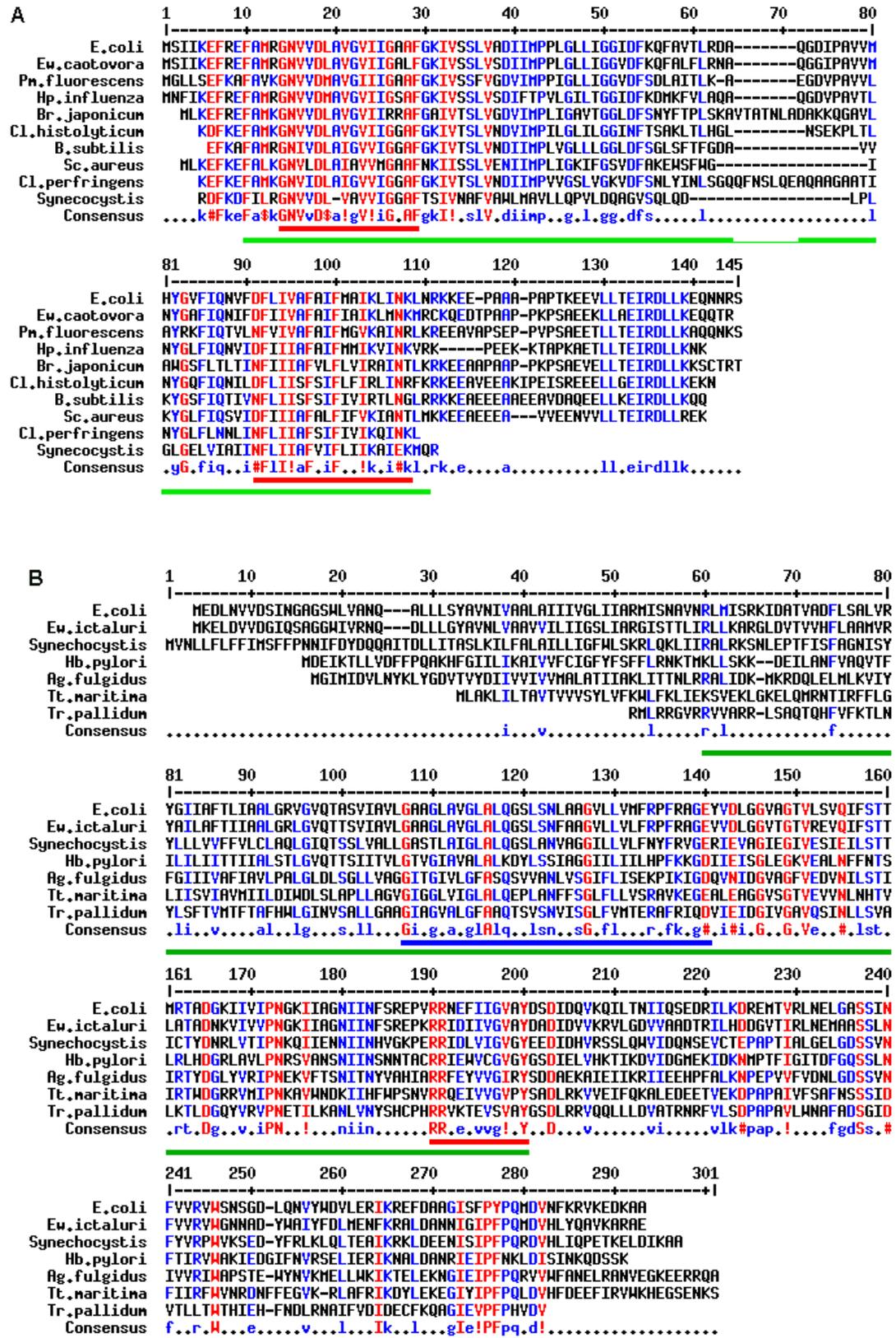


Abb. III.1: Vergleich der MscL- und MscS-Aminosäuresequenzen verschiedener Organismen, Legende Folgeseite.

Abb. III.1: Vergleich der A) MscL- und B) MscS-Aminosäuresequenzen verschiedener Organismen. Der Sequenzvergleich wurden mit dem Programm MULTALIN [<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>] durchgeführt. Eine Nummerierung der Residuen erfolgt ausgehend von der längsten Sequenz. Bereiche hoher Homologie sind schwarz dargestellt, Bereiche geringerer Homologie oder ohne Homologie grau. Nicht vorhandene Residuen sind als Strich dargestellt. Konservierte Bereiche sind in der Zeile Consensus notiert, große Buchstaben stehen für hohe, kleine für niedrige Konservierung. Ähnliche Residuen wurden von dem Programm durch Symbole notiert: ! für I, V; \$ für L, M; % für F, Y; # für N, D, Q, E, B, Z. Ein Punkt kennzeichnet Residuen ohne erkennbare Homologie.

Die Sequenzen sind unter folgenden Datenbankeinträge (accession-numbers) zu finden:

A) *Escherichia coli* [NP\_289852], *Erwinia carotovora* [O68284], *Pseudomonas fluorescens* [ZP\_00086229], *aemophilus influenza* [NP\_438786], *Bradyrhizobium japonicum* [AAF04321], *Clostridium histolyticum* [Q9X722], *Bacillus subtilis* [P94585], *Staphylococcus aureus* [BAB95100], *Clostridium perfringens* [BAA08847], *Synecocastis sp.* [NP\_440913]

B) *E. coli* [NP\_289491], *Erwinia ictaluri* [O52401], *Synecocystis sp.* [NP\_442288], *Helicobacter pylori* [NP\_223633], *Archaeoglobus fulgidus* [ZP\_00064767], *Thermotoga maritima* [NP\_229363], *Treponema pallidum* [AAD36629]

Nach den unter A) und B) mit einer roten Markierung unterlegten Bereichen wurden die degenerierten Primer für eine PCR mit genomischer DNA von *H. elongata* entworfen [III.1.3]. Der unter B) blau markierte Bereich stellt den Bereich höchster Homologie unter den ersten drei Spezies dar, unter A) ist der Bereich höchster Homologie unter den ersten drei Spezies zwischen den rot markierten Bereichen, einschließlich dieser, zu finden. Bereiche die den DNA-Sonden aus der Southern-Hybridisierung entsprechen sind grün markiert.

### III.1.2. Southern-Hybridisierung

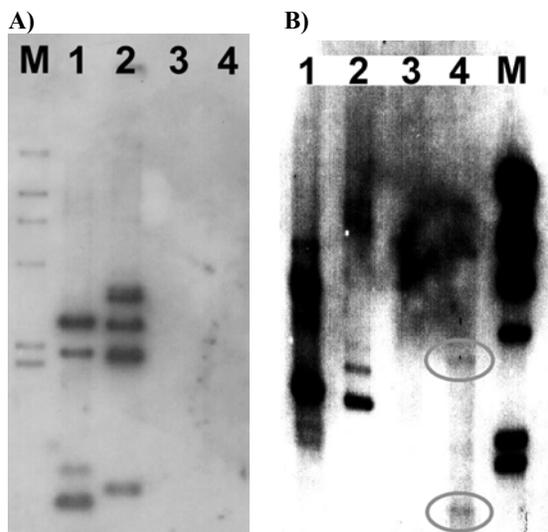


Abb. III.2: Hybridisierung von DIG-markierten DNA Sonden aus *E. coli* A) MscL und B) MscS mit genomischer DNA (In Klammern: Restriktionsverdau) 1 *E. coli* (Bam HI, Hind III), 2 *E. coli* (Sal I), 3 *H. elongata* (Bam HI, Hind III), 4 *H. elongata* (Sal I). M bezeichnet den Größenmarker, DIG-markierte DNA des  $\lambda$ -Phagen (Bam HI, Hind III).

Unter A) und B) sind die erwarteten Hybridisierungssignale bei *E. coli* (Spuren 1 und 2) sowie der Größenmarker (M) zu detektieren. Bei A) sind keine weiteren Signale zu erkennen. Für Abbildung B) wurde der Kontrast soweit erhöht, dass zwei Hybridisierungsereignisse bei *H. elongata* 4 (grau markiert) erkennbar sind, dadurch sind die erwarteten Signale bei Größenmarker und *E. coli* sowie Verunreinigungen extrem verstärkt.

Obwohl Sequenzvergleiche auf DNA-Ebene [nicht dargestellt] gezeigt haben, dass bereits bei eng verwandten Spezies wie *E. coli* und *Ew. carotovora* nur geringe Homologien existieren, besteht die Möglichkeit, dass genügend Homologien zwischen Msc's von *E. coli* und *H. elongata* bestehen, um auswertbare Hybridisierungsereignisse eintreten zu lassen.

Es wurden mit Digoxigenin (DIG) markierte DNA-Sonden konstruiert, deren Sequenzen für die Residuen 10 bis 110 bei MscL (aus *E. coli mscL*) und 60 bis 200 bei MscS (aus *E. coli yggB*, dem für MscS codierenden Gen) codieren. Die Sonden wurden zur Hybridisierung mit genomischer DNA von *H. elongata* und *E. coli* inkubiert.

Wie in Abb. III.2 dargestellt, konnten neben den erwarteten Hybridisierungsereignissen bei *E. coli* ebenfalls schwache Signale

detektiert werden, die auf eine Hybridisierung von *E. coli yggB* mit genomischer DNA von *H. elongata* hindeuten. Es existieren demnach im Genom von *H. elongata* Bereiche, die homolog zu *yggB* sind. Dies deutet auf eine mögliche Codierung eines Msc dieses Typs im Genom hin.

### III.1.3. PCR an *H. elongata*

Die Southern-Hybridisierung lässt nur minimale Homologien auf DNA-Ebene zwischen *E. coli Msc's* und dem *H. elongata* Genom erkennen [III.1.2]. Trotzdem wurde zunächst eine PCR durchgeführt, bei der die Primer eingesetzt wurden, die für die Konstruktion der *E. coli Msc*-DNA-Sonden verwendet worden waren. Selbst bei einer verminderten Stringenz der Annealing-Temperatur in einer Touchdown-PCR [II.4.9.1] konnten jedoch keine PCR-Produkte detektiert werden, die im erwarteten Größenbereich lagen.

Daraufhin wurde versucht, über die Aminosäuresequenz Primer zu entwickeln, die die Vervielfältigung eines für einen Msc kodierenden Gens ermöglichen. Über den Sequenzvergleich [III.1.1] sind Bereiche hoher Homologie zwischen den Msc's unterschiedlicher Spezies auf Proteinebene identifiziert. Zusätzlich zur Konservierung wurde auch die funktionelle Komponente der Teilsequenzen in Betracht gezogen [Moe et al. 1998, Ajouz et al. 2000], um zu gewährleisten, dass gezielt nach Msc's und nicht nach konservierten Transmembranregionen gesucht wird. Insbesondere ist MscL G22 für eine Funktion des Proteins von herausragender Bedeutung [Yoshimura et al. 1999]. Anhand dieser Überlegungen wurden je zwei Bereiche ausgewählt, die in Abb. III.2 mit einer schwarzen Markierung versehen sind. Die Sequenzen mit den am häufigsten verwandten Aminosäuren sind in Abb. III.3 dargestellt.

#### MscL:

a) **GNVVDLAVGVII**                      b) **IDFLIIAF**  
       LL M        V                                      N I VS

#### MscS:

a) **RRIEFVIG**                                      b) **GIEIPFPQ**  
       ND? V    N S

Abb. III.3: Aminosäuresequenzen mit am stärksten konservierten Residuen für ausgewählte Bereiche von MscL und MscS. In der unteren Reihe sind gegebenenfalls häufig verwandte alternative Residuen angezeigt, das Fragezeichen bei MscS a) zeigt an, dass hier keine Konservierung zu erkennen ist. Nach a) wurden die Primer für den codogenen DNA Strang entworfen, nach b) die für den komplementären.

Nach den für diese Sequenz am häufigsten von *H. elongata* verwandten Codons [<http://www.kazusa.or.jp/codon/>] wurden die Primer entwickelt, unterschiedliche Codons für identische Aminosäuren und Codons für abweichende Aminosäuren wurden durch Wobbeln einzelner Positionen berücksichtigt. Um die Zahl möglicher Primer zu beschränken und eine beliebig große Zahl

möglicher PCR-Produkte zu vermeiden, wurde die Zahl der gewobbelten Positionen im Primer eingeschränkt. Die Wahl von definierten und gewobbelten Nukleotiden erfolgte nach Häufigkeit der Verwendung des jeweiligen Codons. Bei identischen Häufigkeiten und zur weiteren Reduktion der Primerzahl erfolgte die Auswahl willkürlich.

Die entwickelten Primer sind in Tabelle III.1 zusammengefaßt, die Sequenzen der entworfenen Primer sind dem Materialteil [II.3.1.1] zu entnehmen.

Tabelle III.1: Primer mit Zufallssequenzen für eine Amplifikation postulierter Genabschnitte. Nomenklatur z.B.: Halomonas randomized channel large forward Nummer 1

	a) codogener Strang	b) komplementärer Strang
MscL	HRCLF1, HRCLF2, HRCLF3	HRCLR1, HRCLR2
MscS	HRCSF1	HRCSR1

Mit genomischer DNA von *H. elongata* und LBI 25B1 als Template wurde unter verschiedenen stringenten Bedingungen PCR betrieben, als Variante wurde auch Touchdown-PCR angewendet. Die erhaltenen Produkte im erwarteten Größenbereich wurden über präparative Agarosegele aufgereinigt und in den Standardvektor pGEM-T<sup>®</sup> einkloniert. Die Sequenzierung der einklonierten Fragmente erfolgte durch die Firma MWG.

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm BLAST des NCBI und der Variante BLASTX, bei der eine Übersetzung der Codons erfolgt, auf Homologien zu bekannten Proteinen überprüft. Wie erwartet waren unter den Produkten auch solche, die einen möglichen offenen Leserahmen enthielten. Eine Homologie zu einem der bekannten Msc's konnte jedoch bei keinem der PCR-Produkte festgestellt werden. Ein Produkt wies hohe Homologie zu einem Natrium/Protonen-Antiporter auf. Im Verlauf weiterer Untersuchungen stellte sich heraus, dass es sich tatsächlich um das Fragment eines Gens für einen ein Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter vom Typ NhaD handelte [III.2].

### III.1.4. Wirkung osmotischer Schocks bei *H. elongata*, *E. coli* und *M. halophilus*

#### III.1.4.1. Überlebensraten nach hypoosmotischem Schock

Neben molekularbiologischen Ansätzen zur Suche nach Msc's wurde auf physiologischer Ebene versucht, einen Nachweis für die Anwesenheit mechanosensitiver Kanäle zu führen. Da die primäre Funktion der Msc's bei Mikroorganismen in einer Sicherung des Überlebens bei hypoosmotischen Schocks liegt, wurden zunächst die Überlebensraten von *H. elongata* im Vergleich zu *E. coli* und *M. halophilus* bei Schocks unter verschiedenen Bedingungen bestimmt [II.4.2].

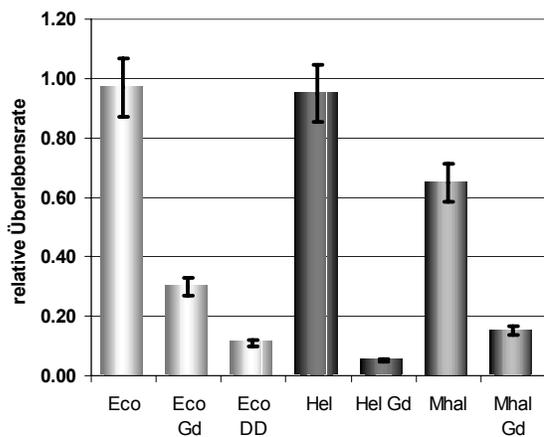


Abb. III.4: Überlebensraten nach hypoosmotischen Schocks. *E. coli* (Eco) wurde aus LB5 Medium in  $H_2O_{\text{bidest}}$  überführt, *H. elongata* (Hel) und *M. halophilus* (Mhal) aus K10 beziehungsweise FP10. Der Schock erfolgte ohne Zusatz bzw. in Anwesenheit des Kanalblockers Gadolinium ( $Gd^{3+}$ ). Weiterhin wurde *E. coli* MJF455, bei dem MscL und MscS durch Deletion fehlen (Eco DD), aus LB5 in  $H_2O_{\text{bidest}}$  überführt. Die Überlebensrate wurde durch Auszählung der kbE von Ausstrichen geeignet verdünnter Aliquots bestimmt. Die Überlebensrate bei Verdünnung der Kultur mit dem Anzuchtmedium wird gleich 1,0 gesetzt. Der Fehler bei Doppelbestimmung ist eingezeichnet.

mechanosensitiver Kanäle. *M. halophilus*, der nicht melkbar ist [Galinski et al., Bonn, unveröffentlicht], besitzt vermutlich keine Msc's.

Diese Theorie wird durch das Verhalten der Organismen bei einem hypoosmotischen Schock unter Zusatz von 1 mM Gadolinium, einem bekannten Kanalblocker [Berrier et al. 1992], gestützt. Analog zu einem Schock ohne  $Gd^{3+}$  an *E. coli* MJF455, der keine Msc's besitzt,

Wie aus Abb. III.4 ersichtlich ist, überlebt annähernd die gesamte Population von *E. coli* und *H. elongata* einen Schock aus einem salzhaltigen Anzuchtmedium in bidestilliertes Wasser. *M. halophilus* zeigt mit 65% eine signifikant verringerte Überlebensrate. Dies deutet darauf hin, dass *H. elongata* und *E. coli* beide einen Mechanismus besitzen, der sie bei einem hypoosmotischen Schock schützt. *M. halophilus* hingegen besitzt diesen Schutz nicht. Angesichts der „Melkbarkeit“ von *H. elongata* [Sauer & Galinski 1998] ist ein naheliegender Mechanismus das Vorhandensein

sinkt bei *H. elongata* und *E. coli* die Überlebensrate drastisch, im Fall von *H. elongata* signifikant stärker als bei *E. coli*. *M. halophilus* zeigt ebenfalls bei einem hypoosmotischen Schock in Anwesenheit von  $Gd^{3+}$  eine noch weiter verringerte Überlebensrate. Die Beobachtungen scheinen zunächst in einem Widerspruch zu der Anwesenheit von Msc's in der Zellmembran von *H. elongata* und deren Abwesenheit bei *M. halophilus* zu stehen. Es sind jedoch noch weitere Daten zu berücksichtigen. Zunächst einmal ist das Verhältnis der überlebenden Zellen im Vergleich eines hypoosmotischen Schocks ohne und mit  $Gd^{3+}$  zu notieren. Für *H. elongata* beträgt es 19:1, für *M. halophilus* 6:1. Weiterhin ist zu beachten, dass *E. coli* nur bei 5% Salinität kultiviert wurde, da dies die Obergrenze für ein ungehindertes Wachstum darstellt, und somit der hypoosmotische Schock geringer ausfällt. Das Verhältnis von überlebenden Zellen bei einem hypoosmotischen Schock des *E. coli* Wildtyps zur Kanaldeletionsmutante MJF455 ist mit 10:1 daher näher am Ergebnis für *H. elongata* angesiedelt. Dies ergibt einen weiteren starken Hinweis auf die Anwesenheit von Msc's in der Zellmembran von *H. elongata*.

Es bleibt noch das Verhalten von *M. halophilus* zu klären. Dieser Organismus besitzt eine rigide Zellwand [Novitsky et al. 1976], die einen gewissen Schutz vor der Lyse bei steigendem Turgor bietet. Wie die geringere Überlebensrate aufzeigt, ist deren Schutzwirkung nicht so stark wie die von Msc's bei *H. elongata* und *E. coli*. Das weitere, drastische Absinken der Überlebensrate bei einem hypoosmotischen Schock unter Zusatz von Gadolinium lässt sich aus dessen Wirkungsmechanismus erklären.  $Gd^{3+}$  bindet vermutlich nicht direkt an einen Msc, sondern verändert durch eine Anbindung an die Zellmembran deren mechanische Eigenschaften [Berrier et al. 1992]. Die Membran wird rigider und eine Übertragung der Membranspannung auf den Msc verhindert. Es ist durchaus vorstellbar, dass  $Gd^{3+}$  die Eigenschaften und die Struktur der Zellmembran oder auch der Zellwand soweit stört, dass dies auch einen negativen Einfluss auf deren Integrität bei einem hypoosmotischen Schock an *M. halophilus* hat ohne dass Msc's involviert sind.

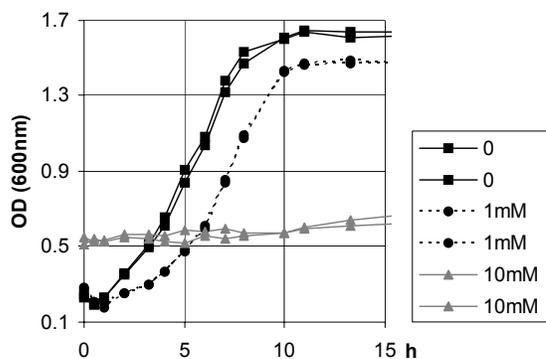


Abb. III.5: Wachstum von *H. elongata* in K5 Medium ohne (0) und mit 1 mM beziehungsweise 10 mM Gadolinium

Ein Zusatz von 1mM Gadolinium zum Anzuchtmedium beeinflusst die Überlebensrate von *H. elongata* bei Verdünnen der Kultur mit identischem Medium nicht (nicht dargestellt). Die Lag-Phase der Kultur wird jedoch verlängert, wie Abb. III.5 zu entnehmen ist. Erst bei höheren Konzentrationen wirkt die Anwesenheit von Gadolinium auch ohne einen hypoosmotischen Schock letal.

Lichtmikroskopische Beobachtungen stützen die Ergebnisse hinsichtlich der Überlebensrate. Es wurde jeweils ein Tropfen der stationären Kultur auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Mittels Durchsaugen wurde das Medium ausgetauscht, die Beobachtungen sind in Tab. III.2 zusammengefasst.

Tabelle III.2: Lichtmikroskopische Beobachtungen bei einem Medien austausch

Organismus (Anzuchtmedium)	Austauschmedium	Beobachtungen
<i>E. coli</i> (LB5)	LB5	keine Lyse
<i>E. coli</i> (LB5)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	keine Lyse
<i>E. coli</i> (LB5)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , 1mM Gd <sup>3+</sup>	rasche Lyse nahezu aller Zellen, Aggregation
<i>E. coli</i> MJF455 (LB5)	LB5	keine Lyse
<i>E. coli</i> MJF455 (LB5)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	rasche Lyse eines Großteils der Zellen
<i>H. elongata</i> (K10)	K10	keine Lyse
<i>H. elongata</i> (K10)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	keine Lyse
<i>H. elongata</i> (K10, 1mM Gd <sup>3+</sup> )	K10, 1mM Gd <sup>3+</sup>	keine Lyse, bereits im Anzuchtmedium Aggregation
<i>H. elongata</i> (K10)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , 1mM Gd <sup>3+</sup>	rasche Lyse nahezu aller Zellen, Aggregation
<i>M. halophilus</i> (FP10)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Lyse eines Teils der Zellen
<i>M. halophilus</i> (FP10)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , 1mM Gd <sup>3+</sup>	rasche Lyse nahezu aller Zellen, Aggregation

### III.1.4.2. Bedeutung der Zellwand

Überlegungen bezüglich der schützenden Rolle der Zellwand bei einem hypoosmotischen Schock an *M. halophilus* führen zwangsläufig zu der Frage, wie groß die Rolle der Zellwand

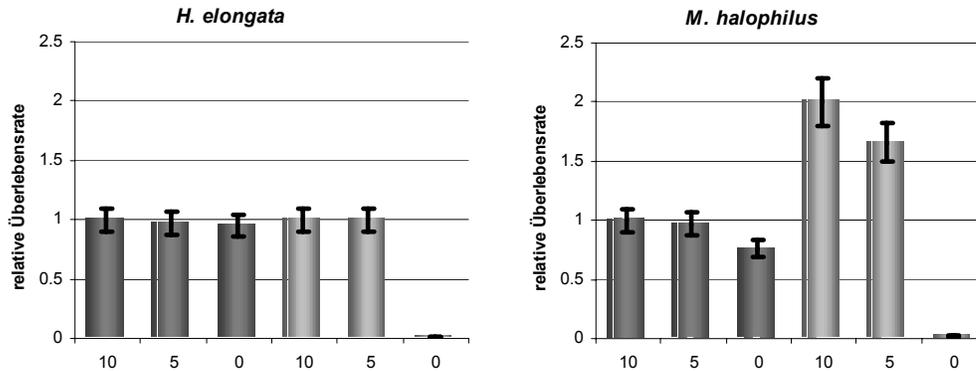


Abb. III.6: Hypoosmotische Schocks an *H. elongata* und *M. halophilus*: Die Organismen wurden im Anzuchtmedium (K10 und FP10) mit Lysozym/EDTA inkubiert und danach in destilliertes Wasser mit 10% Salz (10), 5% (5) und ohne Salzzusatz (0) überführt. Die Bestimmung der Überlebensrate erfolgte durch Auszählung der koloniebildenden Einheiten des Ausstrichs eines geeignet verdünnten Aliquots der Suspension. Die Überlebensrate unbehandelter Zellen ist dunkel, die behandelte Zellen hell dargestellt. Der Fehler bei Doppelbestimmung ist eingezeichnet.

anderer Organismen bei einem hypoosmotischen Schock ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde sowohl bei *H. elongata* als auch bei *M. halophilus* die Zellwand mit Lysozym und EDTA abgebaut. Anschließend wurden hypoosmotische Schocks durchgeführt [II.4.2] und die Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt (Abb. III.6).

Wie schon gezeigt überlebt bei *H. elongata* die gesamte Population einen hypoosmotischen Schock beim Übergang von 10% Salinität in destilliertes Wasser. Ein gleichwertiger Schock führt bei *M. halophilus* zu einer reduzierten Überlebensrate von 65%. Schwächere Schocks oder Verdünnung werden von beiden Organismen vollständig überlebt. Wird vor einem Schock die Zellwand durch eine Behandlung mit Lysozym / EDTA abgebaut, sind zum Teil drastische Änderungen zu verzeichnen. Besonders bei *M. halophilus* ist zu beobachten, dass sich bei einer Verdünnung der Kultur in äquivalenter wässriger Lösung die Überlebensrate zu verdoppeln scheint. Dieser Widerspruch lässt sich jedoch durch die Physiologie von *M. halophilus* erklären: Der Organismus liegt unter den gegebenen Kulturbedingungen als Diplokokkus vor. Eine Behandlung mit Lysozym / EDTA löst diesen Verband auf, was auch unter dem Lichtmikroskop zu verfolgen ist. Anstelle einer kbE je Diplokokkus können zwei kbE für zwei separate Zellen in einem Verdünnungsausstrich nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der tatsächlichen Überlebensrate ist die beobachtete scheinbare Überlebensrate der Kultur noch zu halbieren. Unter Berücksichtigung dieser Daten zeigt sich, dass beide Organismen nach Behandlung mit Lysozym / EDTA eine Verdünnung aus Medium in eine

äquisaline Lösung vollständig überleben. Ein hypoosmotischer Schock von 10% auf 5% NaCl hingegen wird nur von einer *H. elongata* Kultur zu 100% überlebt, bei *M. halophilus* sinkt die Überlebensrate auf 85%. Ein hypoosmotischer Schock in destilliertes Wasser schließlich führt bei beiden Organismen zu einer Lyse nahezu aller Zellen.

Hieraus ist ersichtlich, dass auch ein Organismus der Msc's besitzt (*H. elongata*) bei einem drastischen hypoosmotischer Schock für das Überleben eine Zellwand benötigt. Für einen Organismus ohne Msc's (*M. halophilus*) ist die Zellwand bereits bei einem geringeren hypoosmotischen Schock notwendig.

### III.1.4.3. Überblick über die Schocktoleranz von *H. elongata*

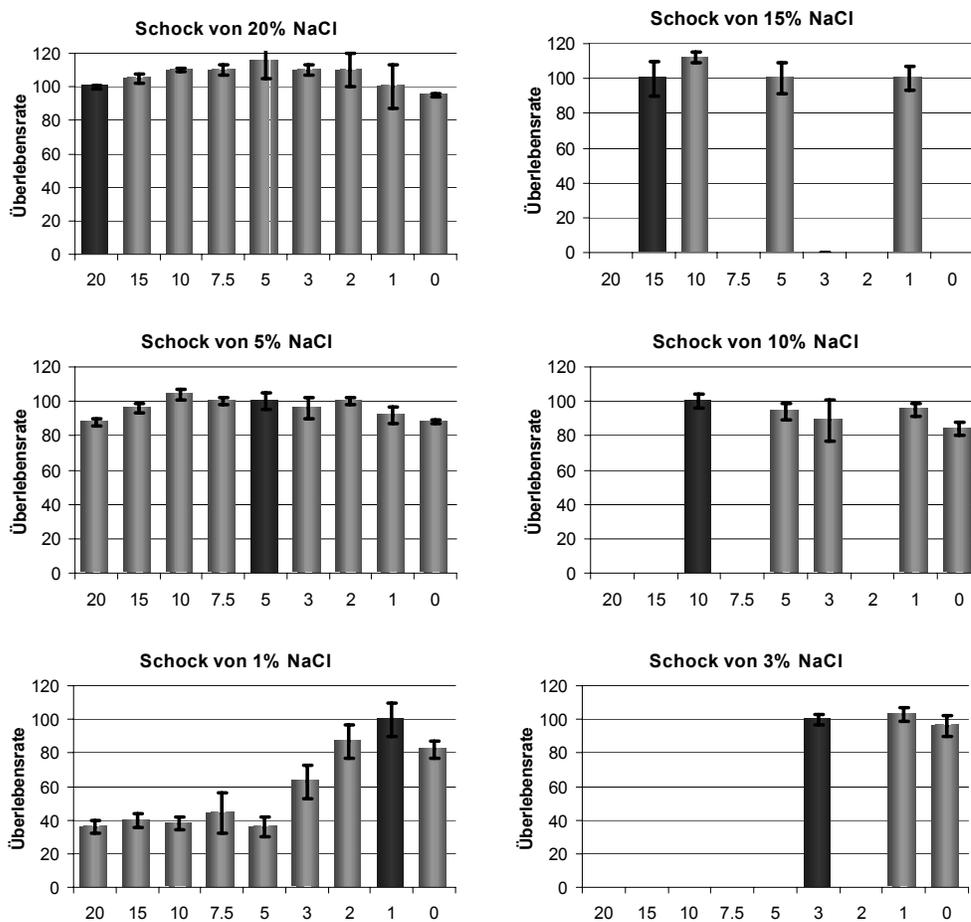


Abb. III.7: Überlebensraten von *H. elongata* bei hyper- und hypoosmotischen Schocks. Anzuchten erfolgten in K-Medium mit der angegebenen Salinität. Die Salinität des Austauschmediums ist unter den Diagrammen in Prozent (w/v) angegeben. Die Bestimmung der Überlebensrate erfolgte durch Auszählung der kBE des Ausstrichs eines geeignet verdünnten Aliquots der Suspension auf K-Medien mit einer Salinität gleich dem Austauschmedium, mindestens jedoch K2% Salinität. Die Überlebensrate bei einem Wechsel in identisches Medium wurde gleich 100% gesetzt (dunkel dargestellt). Der Fehler bei Doppelbestimmung ist eingezeichnet.

Um einen Überblick über die Toleranz von *H. elongata* bezüglich osmotischer Schocks zu bekommen, wurde der Organismus bei verschiedenen Salinitäten kultiviert und anschließend

in eine repräsentative Auswahl unterschiedlicher Medien überführt [II.4.2] (Abb. III.7). In der Regel lässt sich sowohl bei hypo- als auch bei hyperosmotischen Schocks innerhalb des Rahmens der Messungenauigkeit eine Überlebensrate oberhalb von 90% bestimmen. Die auffälligste Ausnahme von dieser Beobachtung stellt die Population dar, die bei 1% Salinität kultiviert wurde. Bei hyperosmotischen Schocks, die einen Wechsel der Salinität um mehr als zwei Prozentpunkte darstellen, sinkt die Überlebensrate unter 50%, bei zwei Prozentpunkten Unterschied sind es unter 70%. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass 1% Salinität für *H. elongata* ungünstige Wachstumsbedingungen darstellen, das Wachstumsoptimum liegt bei etwa 3% Salinität. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Organismus mit der niedrigen Salinität im Anzuchtmedium soweit gestresst ist, dass er auf eine drastische Erhöhung nicht mehr ausreichend schnell reagieren kann und zu einem Teil stirbt.

Weiterhin ist bei den Kulturen die von 5% beziehungsweise 20% Salinität in ein breites Spektrum anderer Salinitäten überführt wurden zu vermerken, dass im mittleren Salinitätsbereich die höchsten Überlebensraten zu verzeichnen sind, während in Richtung der Extreme die Überlebensraten leicht abnehmen. Für eine Salinität von 5% ist dieses noch ohne weitere Erklärung zu verstehen, bei der Anpassung an extremere Salinitäten erscheint es normal, dass ein kleiner Teil der Zellen abstirbt. Bei 20% Salinität ergibt sich hier aber ein Widerspruch. Es ist allerdings möglich, dass ein hypoosmotischer Schock den Teilungsprozess fördert und in Teilung befindliche Zellen die Teilung frühzeitig vollziehen. Von Arana et al. [1997] und Kaprelyants & Kell [1992] wurde im Zusammenhang mit Medienwechseln das Phänomen lebender aber nicht kultivierbarer Zellen beschrieben. Dieses Phänomen könnte auch hier dazu führen, dass es Zellen gibt, die bei der Verdünnung in Medien hoher Salinität oder bei einem Wechsel in solche mit drastisch geänderter Salinität zwar noch lebensfähig sind, aber aus nicht näher zu bestimmenden Gründen auf Festagar keine Kolonien bilden können. Mit den zur Verfügung stehenden Methoden konnte dies jedoch nicht weiter geklärt werden.

Das Vorhandensein lebensfähiger aber nicht kultivierbarer Zellen scheidet jedoch zur Erklärung des Schockverhaltens des bei 1% Salinität kultivierten *H. elongata* aus. Unter dem Lichtmikroskop ist zu beobachten, dass etwa die Hälfte der Zellen innerhalb einer Minute nach einem drastischen hyperosmotischen Schock jegliche sichtbare Aktivität einstellt. Über einen längeren Zeitraum kann man vereinzelt die Lyse dieser inaktiven Zellen beobachten, deutliche Zeichen dafür, dass die Zellen abgestorben sind.

### III.1.4.4. Solutgehalte nach osmotischem Downschock

Bei der industriellen Produktion kompatibler Solute steht nicht das Überleben der Kultur sondern vielmehr eine maximale Ausbeute an produzierten Soluten im Mittelpunkt des Interesses. Die Ausschleusung kompatibler Solute nach einem hypoosmotischen Schock ist

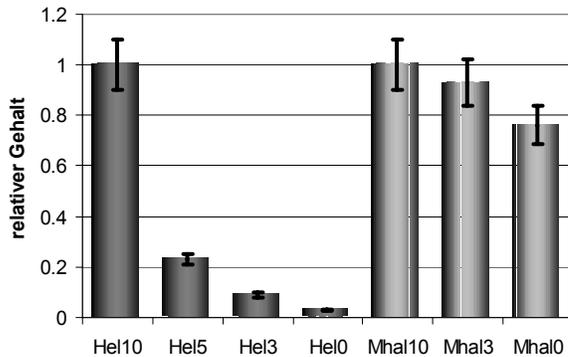


Abb. III.8: Solutgehalt in der Trockenbiomasse von *H. elongata* (Hel, dunkel) und *M. halophilus* (Mhal, hell). Die Organismen wurden von K10 bzw. FP10 Medium in Salzlösungen mit 10% (10), 5% (5), 3% (3) und ohne Salzgehalt (0) überführt. Die Bestimmung der Solutmenge erfolgte durch HPLC nach Extraktion. Der Fehler bei Doppelbestimmung ist eingezeichnet.

daher eine wichtige Größe und zudem ein Indiz für das Vorhandensein mechanosensitiver Kanäle sowie eine Möglichkeit, deren Leistungsfähigkeit zu charakterisieren.

Zur Bestimmung des cytoplasmatischen Solutgehaltes wurden die kompatiblen Solute nach einem hypoosmotischen Schock [II.4.2] aus der Trockenbiomasse (TBM) extrahiert und die erhaltene Menge durch HPLC ermittelt.

In Abbildung III.8 ist der Solutgehalt in der TBM in Abhängigkeit von der Salinität des Austauschmediums und damit der Stärke des Schocks dargestellt. *H. elongata* setzt bereits beim Wechsel von 10% auf 5% Salinität drei Viertel der Solute frei, nur ein Viertel wird zurückbehalten. Bei stärkeren Schocks werden über 90% der Solute freigesetzt. Im Gegensatz dazu sind in der TBM von *M. halophilus* auch

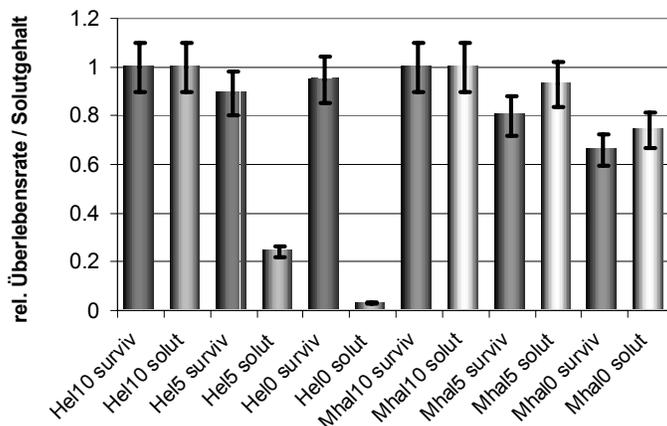


Abb. III.9: Solutgehalt (hell, solut) im Vergleich zur Überlebensrate (dunkel, surviv) nach einem hypoosmotischen Schock. Vergleich von *M. halophilus* (Mhal) und *H. elongata* (Hel). Die Salinität der Anzuchtmedien liegt bei 10%, es wurde in destilliertes Wasser (0) und 10%ige- (10) sowie 5%ige (5) Salzlösung überführt. Der Fehler bei Doppelbestimmung ist eingezeichnet.

nach einem hypoosmotischen Schock von 10% auf destilliertes Wasser noch 75% der Solute wiederzufinden. Stellt man Überlebensrate und Solutgehalt gegenüber (Abb. III.9) erkennt man bei *H. elongata*, dass mit zunehmender Stärke des hypoosmotischen Schocks bei nahezu gleichbleibender Überlebensrate oberhalb 95% der Solutgehalt sinkt. Bei *Marinococcus* korrelieren

Überlebensrate und Solutgehalt der Trockenbiomasse. Dieser Organismus setzt demnach nur dann Solute frei, wenn er lysiert. Hier findet sich ein weiterer starker Hinweis dafür, dass *Halomonas elongata* mechanosensitive Kanäle besitzt, *Marinococcus halophilus* hingegen nicht.

### III.1.5. Schockexperimente an „Lake Bogoria“ Isolat 25B1

Neben *H. elongata* ist der haloalkaliphile LBI 25B1 ein weiterer Kandidat für die Produktion von kompatiblen Soluten, speziell Hydroxyectoin. Auch dieser Organismus ist melkbar, ein erster Hinweis dafür, dass mechanosensitive Kanäle in der Zellmembran zu finden sind. Um weitere Hinweise zu erhalten, wurde die Antwort des Organismus auf hypoosmotische Schocks untersucht [II.4.2].

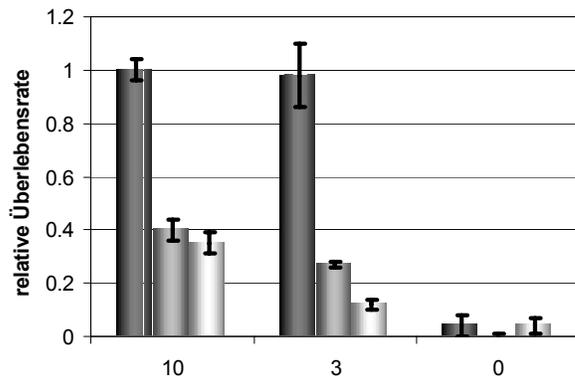


Abb. III.10: Überlebensraten von LBI 25B1. Anzucht erfolgte in HK10, Überführung in demineralisiertes Wasser (0) und Salzlösungen mit 3% (3) und 10 % (10) NaCl. Mit NaOH und HCl wurde der pH-Wert auf 9,7 eingestellt, den pH-Wert des HK-Mediums. Dargestellt sind unbehandelte Kulturen (dunkelgrau), ein Schock in Anwesenheit von 1mM Gd<sup>3+</sup> 1mM (hellgrau) und ein Schock nach Behandlung mit Lysozym / EDTA (ganz hell). Der Fehler bei Doppelbestimmung ist eingezeichnet.

Analog zu *H. elongata* überlebte LBI 25B1 unbehandelt einen hypoosmotischen Schock von 10% auf 3% Salinität. Eine Überführung in demineralisiertes Wasser mit einem dem Anzuchtmedium entsprechenden pH-Wert war allerdings für den Großteil der Kultur letal. Die Ergebnisse nach einer Behandlung des Organismus mit Lysozym / EDTA bei einem Medienwechsel in Gegenwart von Gadolinium waren überraschend. Entgegen allen Erwartungen wurde bereits die Übertragung in eine Salzlösung, die in

pH-Wert und Salinität dem Medium entspricht, von weniger als der Hälfte der Zellen überlebt. Bei einem hypoosmotischen Schock sank die Überlebensrate weiter. Hieran zeigt sich, dass sich mit dem verwendeten Verfahren keine klare Aussage darüber treffen lässt, ob LBI 25B1 mechanosensitive Kanäle besitzt oder nicht. Der Organismus reagierte unter den gegebenen Bedingungen offenbar sehr sensibel auf eine Beschädigung oder Beeinflussung seiner auf einen alkalischen Lebensraum zugeschnittene Hülle. Ein Grund könnte das Karbonatbedürfnis des Organismus sein. Die Schocks wurden nur in Salzlösungen mit einem pH-Wert von 9,7 durchgeführt, die Lösungen waren nicht mit Karbonat gepuffert.

### III.1.6. Entwicklung einer Screening Methode für Kanaldefekt-Mutanten

Nach physiologischen Hinweisen auf mechanosensitive Kanäle bei *H. elongata* ist eine Identifikation der zugehörigen Gene das nächste Ziel. Letztendlich kann nur über die funktionelle Charakterisierung eines definierten Genproduktes ein eindeutiger Beweis für die Existenz von Msc's geführt werden. Eine mögliche Strategie ist die ungerichtete Mutagenese des Organismus, Screening nach Kanaldefektmutanten und Identifikation der inaktivierten Gene positiver Mutanten.

Ein hypoosmotischer Schock führt auch beim Fehlen aller Msc's nicht zum Absterben der gesamten Kultur durch Lyse [III.1.4.1]. Da zu vermuten ist, dass auch bei *H. elongata* Msc's redundant angelegt sind, ist eine einfache ja/nein Antwort nicht zu erwarten. Hierauf beruhen zahlreiche Screeningverfahren, die wachstumslimitierende Faktoren oder Antibiotikaresistenzen ausnutzen.

Die auf der Absorption von Ethidiumbromid beruhende Methode von Karla [2002] zum Nachweis abgestorbener Zellen in einer Kultur wurde weiterentwickelt [II.4.13] und zunächst an *E. coli* als Modell erprobt. Von diesem Organismus existieren Mutanten, denen MscL (MJF 367,  $\Delta mscL$ ), MscS (MJF 451,  $\Delta yggB$ ) beziehungsweise beide Msc's (MJF 455,  $\Delta mscL \Delta yggB$ ) fehlen [Levina 1999]. Am Wildtyp (DH5 $\alpha$ ) und den drei Kanaldefektmutanten wurde anhand der Zunahme der Fluoreszenz der zeitliche Verlauf der Aufnahme von Ethidiumbromid beim Übergang in äquisalines Medium und nach einem hypoosmotischen Schock verfolgt (Abb. III.11).

Die Differenz der Fluoreszenzsignale (Abb. III.11 B) zeigt, dass beim Wildtyp (DH5 $\alpha$ ) kein Unterschied im Fluoreszenzverhalten zwischen der geschockten und der nicht geschockten Kultur besteht. Die Einzelmutanten (MJF367 und MJF451) zeigen nach einem hypoosmotischen Schock eine erhöhte Fluoreszenz, im Falle von MJF451 ist zusätzlich ein leichter Anstieg zu erkennen. Die Doppelmutante MJF455 zeigt im Zeitverlauf einen drastischen Anstieg der Fluoreszenz nach einem hypoosmotischen Schock.

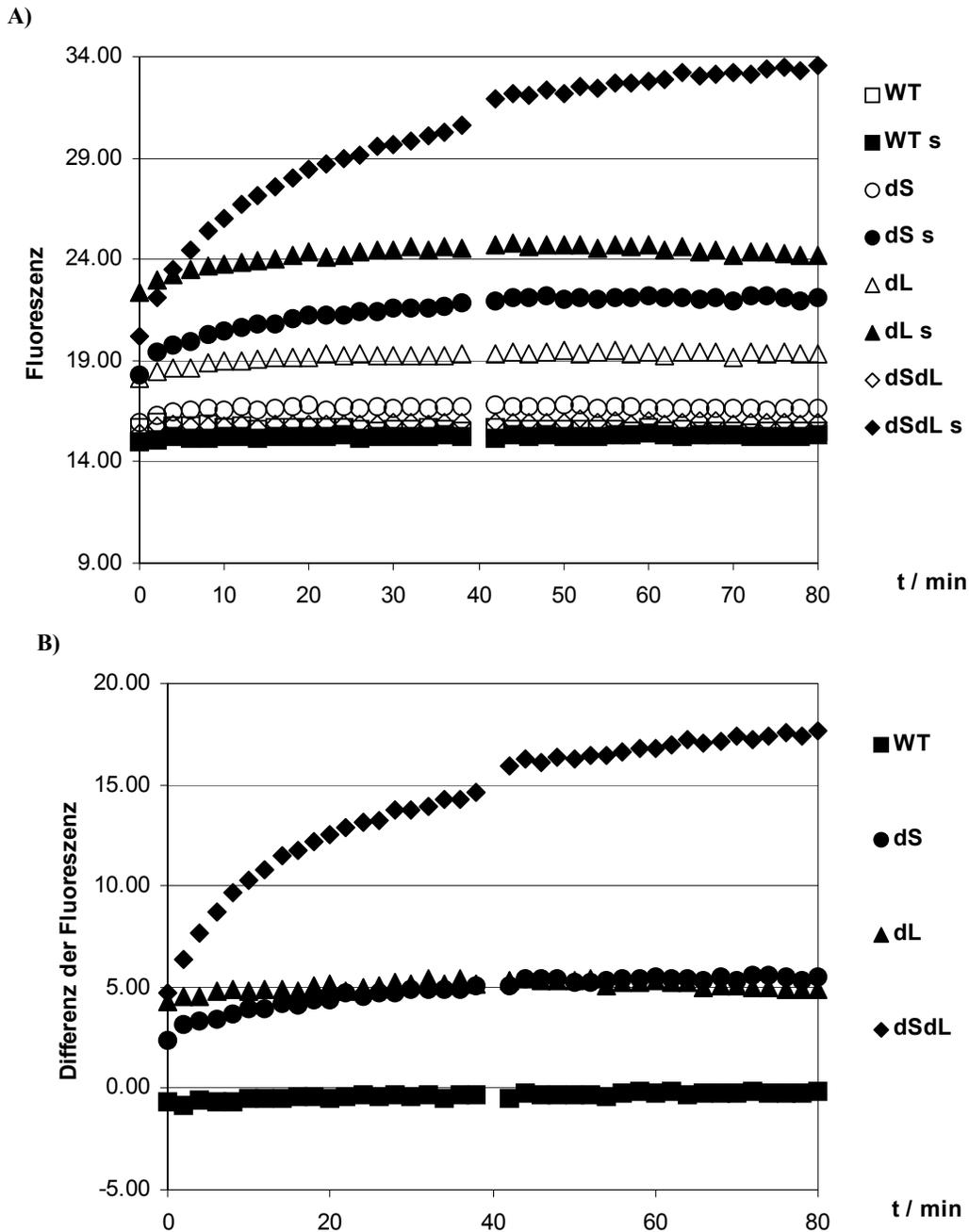


Abb. III.11: Ethidiumbromidaufnahme durch *E. coli* nach Medienwechsel, dargestellt anhand der Zunahme der Fluoreszenz (willkürliche Einheiten).

A) Verlauf der Fluoreszenz bei *E. coli* DH5 $\alpha$  (WT, Quadrate), MJF451 (dS - für deleterierter MscS, Kreise), MJF 367 (dL, Dreiecke) und MJF 455 (dSdL, Rauten). Übernachtskulturen wurden aus MM63Gcr/5, 2mM Ectoin in eine äquivalente NaCl-Lösung (offene Symbole) und für einen hypoosmotischen Schock in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (gefüllte Symbole) überführt. Nach Zugabe von Ethidiumbromid wurde die Messung gestartet.

B) Die Differenz der Fluoreszenzsignale zwischen geschockten und nicht-geschockten Zellen ist in gleicher Symbolik notiert.

Dies entspricht in allen Punkten den Erwartungen. Beim Wildtyp DH5 $\alpha$ , der noch beide Msc's besitzt, beträgt die Überlebensrate nach einem hypoosmotischen Schock annähernd 100%. Es kann kein zusätzliches Ethidiumbromid in die Zellen eindringen. Im Gegensatz

dazu lysieren nach einem hypoosmotischen Schock bei der Doppelmutante MJF455 90% aller Zellen, Ethidiumbromid kann eindringen und in die DNA interkalieren. Als Folge steigt die Fluoreszenz in der Zellsuspension. Auf die Überlebensraten der Einzelmutanten hat ein hypoosmotischer Schock nur einen geringen Einfluß. Offensichtlich reicht die Zahl der lysierten Zellen jedoch auch hier aus, um ein zum Wildtyp signifikant unterschiedliches Signal zu erzeugen.

Die dargestellten Daten zeigen, dass die Nachweismethode nicht nur eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und Doppelmutante, sondern auch die Identifikation der Einzelmutanten erlaubt. Damit eignet sich das Verfahren auch zum Screening nach derartigen Mutanten bei *H. elongata*, der vermutlich mit redundanten Msc's ausgestattet ist.

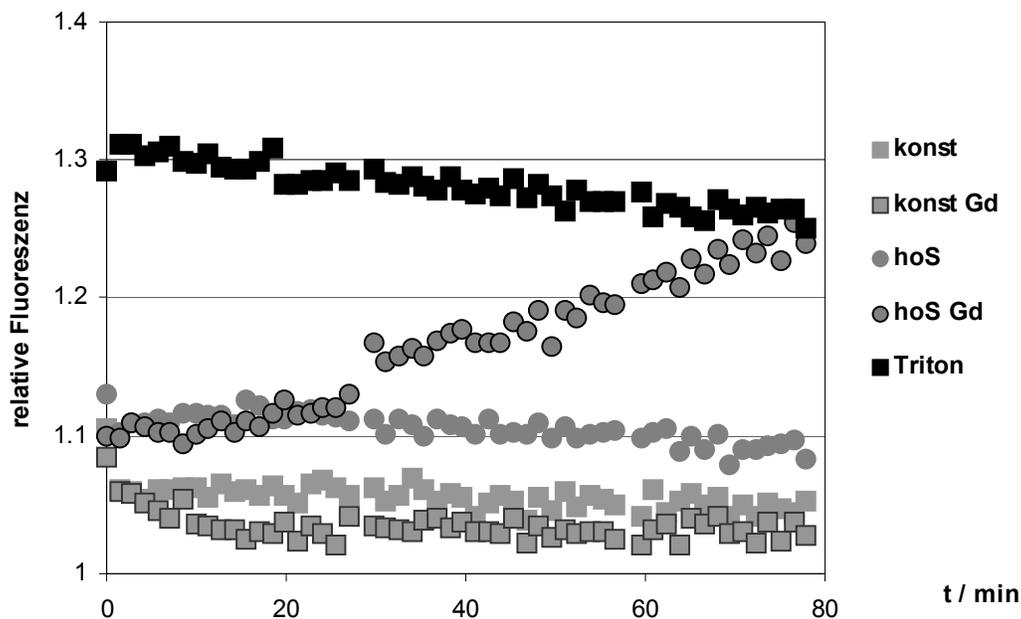


Abb. III.12: Ethidiumbromidaufnahme durch *H. elongata*, dargestellt durch den Fluoreszenzverlauf. Es wurde für alle Messungen die gleiche Übernachtskultur aus MM63Gcr/10 Medium verwendet. Neben einem mit Triton lysierten Aliquot (schwarze Quadrate) wurden die Messungen nach der Übertragung in eine äquivalente NaCl-Lösung (konst, hellgraue Quadrate) und in destilliertes Wasser (hoS, graue Kreise) durchgeführt. Der Zusatz von  $Gd^{3+}$  (Gd) ist durch schwarze Umrandung gekennzeichnet. Der Fluoreszenzverlauf von Ethidiumbromid in Wasser ( $H_2O$ ) ist mit \* dargestellt. Es wurde auf die Anfangsfluoreszenz von Ethidiumbromid in Wasser normiert.

Um zu gewährleisten, dass das Testverfahren auch für *H. elongata* anwendbar ist, wurde der Organismus unter verschiedenen Bedingungen aus dem Anzuchtmedium MM63Gcr/10 in andere Medien überführt und nach Zugabe von Ethidiumbromid der Verlauf der Fluoreszenz verfolgt.

Ein Aliquot der Kultur, das keinem hypoosmotischen Schock unterworfen wurde zeigt wie erwartet keinen Anstieg der Fluoreszenz. Gleiches gilt für ein Aliquot, das in eine äquisaline Lösung mit 1mM  $Gd^{3+}$  überführt wird, und bei dem ebenfalls keine Lyse der Zellen zu beobachten ist. Ein mit Triton 100 lysiertes Aliquot der Kultur weist bereits zu Beginn der Messung eine stark erhöhte Fluoreszenz auf. Nach einem hypoosmotischen Schock durch Übertragung in destilliertes Wasser zeigt sich eine leicht erhöhte Fluoreszenz. Nach einem hypoosmotischen Schock in Gegenwart von  $Gd^{3+}$  ist die Fluoreszenz zunächst nur leicht erhöht, steigt dann aber im weiteren Zeitverlauf an, bis sie das Niveau einer durch Triton 100 lysierten Kultur erreicht.

Das angewandte Verfahren ist demnach auch dazu geeignet, die Lyse von Zellen einer *H. elongata* Kultur zu detektieren.

### III.1.7. Transposon-Mutagenese und Screening

Zufallsmutanten von *H. elongata* wurden mittels Transposon-Mutagenese erzeugt. Dabei werden Gene zufällig durch Insertion eines Transposons deaktiviert [II.4.12, Kunte & Galinski 1995]. Die Selektion der Mutanten erfolgte zunächst über die durch das Transposon vermittelte Kanamycin-Resistenz und die Salztoleranz von *H. elongata*. Anschließend wurden über das beschriebene Screeningverfahren [II.4.13, III.1.6] Mutanten mit auffälligem Fluoreszenzverhalten gesucht.

Unter 1500 untersuchten Transposonmutanten befanden sich 30 mit auffälligem Fluoreszenzverhalten. Als auffällig wurden dabei in erster Linie Mutanten erachtet, die vom Beginn der Messung an eine vor dem Hintergrund stark erhöhte Fluoreszenz aufwiesen (Abb. III.1.13 A) oder bei denen die Fluoreszenz signifikant über den Hintergrund anstieg (Abb. III.1.13 B). Bei diesen Mutanten ist anzunehmen, dass nach einem hypoosmotischen Schock ein Teil der Kultur lysiert, was auf gestörte oder fehlende mechanosensitive Kanäle zurückzuführen ist. Andere Auffälligkeiten, wie beständig sinkende (Abb. III.1.13 C) oder eine konstant niedrigere Fluoreszenz wurden ebenfalls registriert. Diese sind vermutlich nicht auf defekte Msc's sondern auf andere Phänomene zurückzuführen.

Auffällige Mutanten, bevorzugt die, die einen möglichen Kanaldefekt aufweisen, wurden zur Bestimmung der Überlebensrate hypoosmotischen Schocks unterworfen. Unter den 20 derartig weiter betrachteten Mutanten befindet sich keine, die nach einem hypoosmotischen Schock auffällig niedrige Überlebensraten aufweist.

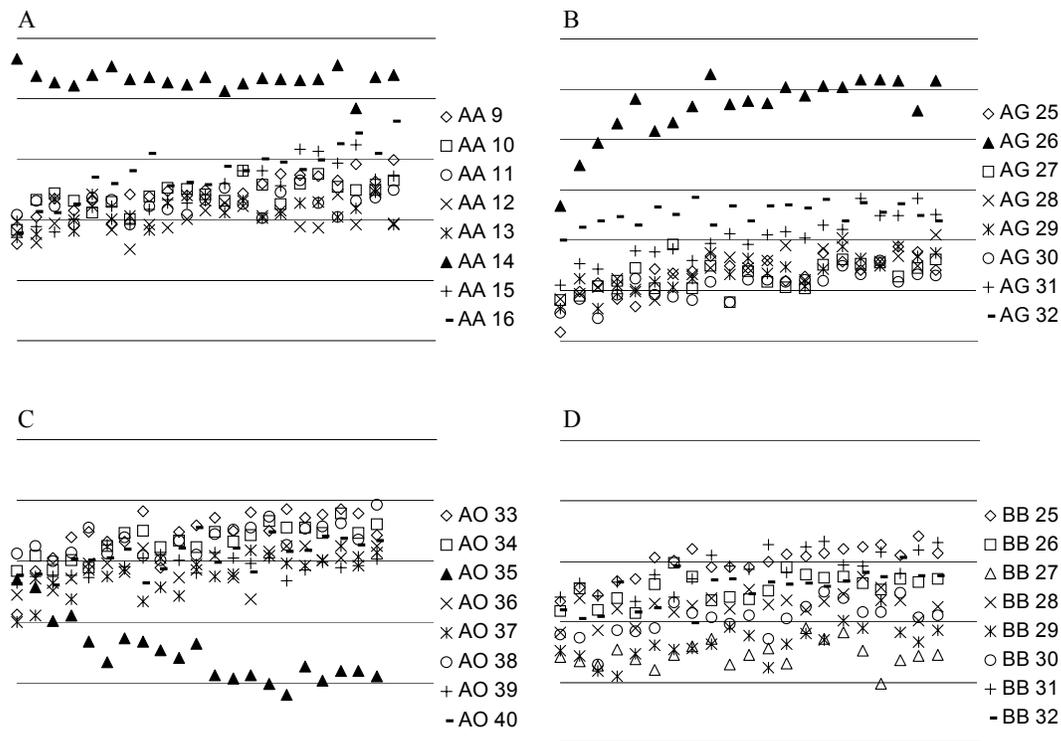


Abb. III.13: Screening der *H. elongata* Transposonmutanten: Die Differenz der Fluoreszenz von geschockter und nicht geschockter Kultur ist im Zeitverlauf einer einstündigen Messung in willkürlichen, nicht notierten Einheiten aufgetragen. Der Abstand zweier Linien beträgt in allen Grafiken 0,5 Einheiten. Für die Gesamtheit der Mutanten wurden repräsentativ drei auffällige Verläufe (AA14, AG26 und AO35, schwarze Dreiecke in A, B und C) vor einem Hintergrund unauffälliger Mutanten dargestellt (übrige Symbole). Auffällig im Sinne eines möglichen Kanaldefektes sind konstant höhere Fluoreszenz (A) und rasch über den Hintergrund ansteigende Fluoreszenz (B). Andere Auffälligkeiten wie eine beständig sinkende Fluoreszenz (C) wurden ebenfalls registriert.

### III.1.8. Elektrophysiologische Untersuchungen zum Nachweis mechanosensitiver Kanäle

Nach modifizierten Protokollen [II.4.14] wurden analog der Experimente von Martinac et al. [1987] Riesensphäroplasten präpariert und analog Berrier et al. [1989] Membranfragmente in Riesensphäroplasten rekonstituiert. Zum elektrophysiologischen Nachweis mechanosensitiver Kanäle wurden an den Riesensphäroplasten und -sphäroplasten patch-clamp Messungen durchgeführt.

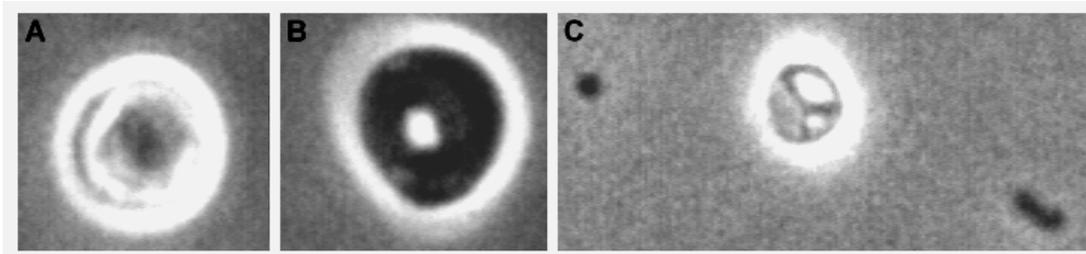


Abb. III. 14: Riesensphäroplasten von *H. elongata*, lichtmikroskopische Aufnahmen. Alle Aufnahmen erfolgten bei gleicher Vergrößerung. A unbehandelte Riesenzellen, B Riesenzellen nach Abbau der Zellwand, C unbehandelte Riesenzelle (Mitte) und normale *H. elongata* (links und rechts) im Vergleich.

Die Riesensphäroplasten [Abb. III.14] erwiesen sich als so fragil, dass ein Großteil bereits bei Kontakt mit der Patch-Pipette lysierte. Nur bei dreien von 20 Sphäroplasten bildete sich ein Gigaohm-Siegel zwischen Pipette und Membran aus. Bei Messungen ohne und mit an der Pipette angelegtem Unterdruck konnten keine Auffälligkeit im Messsignal detektiert werden. Die Riesenliposomen erwiesen sich als stabiler, es kam nur in einem Fall direkt beim Kontakt zur Lyse. Die Formierung des Gigaohm-Siegels erfolgte bei der Hälfte der untersuchten Liposomen. Allerdings konnte auch hier nur in einem Fall nach Anlegen des Unterdrucks Auffälligkeiten im Signal beobachtet werden [Abb. III.15]. Die Messung konnte nicht wiederholt werden, da das Liposom im Anschluss lysierte.

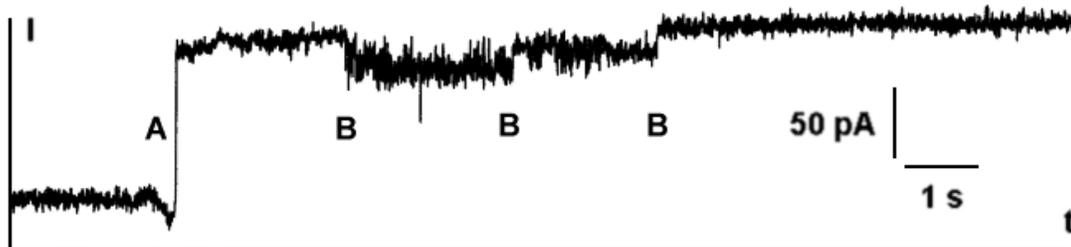


Abb. III.15: Patch-clamp Messung an mit Azolectin in Riesenliposomen fusionierten Membranfragmenten von *H. elongata*. Aufgetragen ist die gemessene Stromstärke  $I$  gegen die Zeit bei einer angelegten Membranspannung von 30mV. A) erster Sprung von ca 100pA im Messsignal beim Anlegen des Unterdrucks B) weitere Sprünge von ca 20 pA im weiteren Verlauf der Messung

Die Veränderungen im Messsignal lassen auf Öffnungen mit einer Leitfähigkeit von ca. 3 nS (A) und 0,7 nS (B) schließen. Eine Leitfähigkeit von 3 nS liegt in der Größenordnung der bei MscL mit 2,5 nS bis 3,4 nS bestimmten Leitfähigkeiten [Martinac 2001]. Die geringeren Leitfähigkeiten lassen sich keinem bekannten Msc zuordnen. Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit liegt hier ein weiterer aber nur sehr unsicherer Hinweis auf Msc's bei *H. elongata* vor. Ein Artefakt bei der Messung ist nicht auszuschließen.

## III.2. Natrium/Protonen-Antiporter vom Typ NhaD

Die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes und einer konstanten Na<sup>+</sup>-Konzentration sind für eine Zelle unerlässlich. Dies gilt für Bakterienzellen ebenso wie für die Zellen höherer Lebewesen. Bis auf eine bislang bekannte Ausnahme verfügen fast alle Organismen über Natrium/Protonen Antiporter (NHAs) als einen Mechanismus der pH- und Na<sup>+</sup>-Homöostase [I.5]. Es ist daher nicht weiter verwunderlich, dass *H. elongata* ebenfalls über dieses System zur Kontrolle von pH-Wert und Na<sup>+</sup>-Konzentration verfügt.

### III.2.1. *H. elongata* und LBI 25B1

#### III.2.1.1. DNA Sequenzanalyse

Bei der Analyse von PCR-Produkten, bei den genomische *H. elongata* DNA als Template eingesetzt wurde [III.1.3] wurden mehrere Sequenzen mit offenen Leserahmen gefunden. Eine Datenbanksuche mit Hilfe des Programms BLASTX des NCBI zeigte bei einer dieser Sequenzen, dass das hypothetische Proteinfragment 80% Homologie zu *Vibrio parahaemolyticus* NhaD aufweist. Aufgrund der Bedeutung, die NHAs zukommt, wurde mittels Primer Walking [II.4.9.2] und Inverser PCR [II.4.9.4], die Sequenz sowohl weiter *upstream* als auch *downstream* zu bestimmt. Die Sequenz ist in Abbildung II.16 dargestellt.

```

1 gccactgatcgccatcgctcagcgactccagcgacatgccgaacaactgaaaggcacctc
61 cgggacgaaaccggataccaggctggctcccacggctcgtggatagggcccgccaccggggc
121 gccgagtgatgtcccagccggcgatggctcgtggatcgagccccctgaacgtcaggg
181 tgaccccgcatccggatagagcttgctcatgggtcggagcctccggcggcgggccttgca
241 cgaaccgtaatgatccaccaggggccgaaggccggcaccggcagcagccgatgaatga
301 ccaggcggcggaagaccagtggcgtcagaccggatcgcgccggagtggtcaacggact
361 gtcgaaacgtcattcagaccccgcaatatcggtgtctcggcgacgcaggacagtatagtt   rpoH
    -35a                               -10a

421 cagctcccctcccttctgctgccagacgcagcaggaccgcaatgcagcaaaaaaagttcctc
481 gaagagagtaattagccggctcaagagATGacgaacactgtttctttcatgtagaattcg   σ70
    SDa                               -35b                               -10b
                                M T N T V S F M * N S

541 CCTcgttttatcgacccttccgccctcccgtctcaggatgctttcgtcATGctgacaaac
    P R F I D P S A L P S Q D A F V M L T N
601 catcgttctccacactggctccggcacagcgcggcggccaggctttctcgtgctcgcg
    H R S P H W L R H S A R W P G F L V L A
661 ctgccgatcctgctgttcagccccctcgcccaggctgcttccgccggcgagctcgacctg
    L P I L L F S P L A Q A A S A G E L D L
721 acttcagcctccccggtttcatcgccgttaccctcttctcggccgctatgtcctgggtg
    T S S L P G F I A V T L F L A A Y V L V
781 atggccgaagagaaaactgcacatgcgcaagtccaagccgggtgctggctgcgccgggtctg
    SDb                               M R K S K P V L V A A G L
    M A E E K L H M . . .

841 atctggcgatgattggctgggtctatgttcacgcgggcctgcccgatgcctccgaagag
    I W A M I G W V Y V H A G L P D A S E E
901 gccttcagcgaaacactgctggaatacagcgagttgctgctcttctcgtggttagccatg
    A F S E T L L E Y S E L L L F L L V A M

```

961 acctacatcaatgccatggaagagcgccgctcttcgacaagctgcgccgctggctggctc  
 T Y I N A M E E R R V F D K L R A W L V  
 1021 gagaagggcttcagttaccgggtcgtgttctggatccaccggcatcctcgcttctggatc HRCLF2  
 E K G F S Y R S L W F I T G I L A F W I  
 1081 tcgccgatcgcggcaaacctgaccacggccctgctgatgtgcgccgtggtcaccaaggtc  
 S P I A D N L T T A L L M C A V V T K V  
 1141 gccgagggcgacaagcgcttcatcaacctctggttgcacatgctgctgggctcccaat  
 A E G D K R F I N L C C I N V V V A S N  
 1201 gccggcggtgccttcagccccttcggcgatatcagaccctgatggctctggcaggccaag  
 A G G A F S P F G D I T T L M V W Q A K  
 1261 ctggctgagttccaggaattcttcgagctcggcccgctgggaaccacctggta HRCLR2  
 L V E F Q E F F E L L G P A L V N H L V  
 1321 ccggcgatcgtgatgagcctgttcatcaagaaccgcaagcccgcgcccctcgaggaacat  
 P A I V M S L F I K N R K P A A L E E H  
 1381 atctggctcaagcgggcgcccggcgcatcgttctgctgttctctggtagcagatcgtcatc  
 I W L K R G A R R I V L L F L V T I V I  
 1441 tcggtactctgccacaccatgctgaacctgccgcccgcactcggcatgatgacgggcctc  
 S V L C H T M L N L P P A L G M M T G L  
 1501 ggtttctcgcagttcttcggctactacctgcgtcagagcctgccccgctcgtggaacgc  
 G F L Q F F G Y Y L R Q S L P R S L E R  
 1561 aagcgtaccgctacagccagcgcgactggcgcaagctggagtcactgggcagcgtg  
 K R T R Y S Q R G D W R K L E S L G S V  
 1621 gtgccttttgatgtcttaccgcaatcgcccgtccgaatgggataacctgctgttcttc  
 V P F D V F T R I A R S E W D T L L F F  
 1681 tacgggtggtgatgtccgttggggactgggcttcatgggttacctggccgtgctctcc  
 Y G V V M S V G G L G F M G Y L A V L S  
 1741 gagaccctctacacgggttgggatcccgtctgggcgaacatcagtgtgggctggctcgc  
 E T L Y T G W D P V W A N I S A G L V S  
 1801 tcgggtggcgacaacatcccggctatgttcgccgctcatctccatggagcccgacatgcc  
 S V V D N I P V M F A V I S M E P D M S  
 1861 atgggcaactggctgctgatcacctcaccgcccgtggcgccagctctgctctcgggtg  
 M G N W L L I T L T A G V G G S L L S V  
 1921 ggctccgcccgggtgtggcactgatggccaggcgcgggtatctacaccttcgccagt  
 G S A A G V A L M G Q A R G I Y T F A S  
 1981 cacatgcgctgggcccggctatcgccctgggctatgtagcagtggtgcgtccacctga  
 H M R W A P V I A L G Y V A V W S S T \*  
 2041 tgatcaacgctgacagcttcgccatcttccaactagggtccgaattgacctgctcccgtccg  
 \* (\*2) (\*3)  
 2101 gcggcccgcggcgggccttcacccctcttcagccccagtcgctgctgcccattcggcg  
 → ←  
 2161 atgctctcgtccggatagccggcaaagcagcgatcctgttccctcgactcgatctccacc  
 2221 cagtccggcttgttctccagcatgaggtgcaccgcttcgggaggccttggcaagtactg  
 2281 tcgatggccgagggcgaagggatgcacgagttccggccagcgcggatcgaacaccagagc  
 2341 gcactggcacaccgcaacagaaatgccgctccccgggctcgttagaccatcgatctcg  
 2401 gcctgatagatcgacgtgtgctcggcaccgtgaaccaccagggtgcccgcacgcgctc  
 2461 aggttgatggcataaccacccccgcccggcctcttgcgacagatcgaacagtagcagcgg  
 2521 ttgaaggatagggatgcccgcacacgcacgaaaccgcaccgcccgaatgacaggaa  
 2581 cctcagtagcatgatgattctccctgacgccttgcgcttgactggcctaagcgtagaaa  
 2641 accggggcgacagaaccagcgttccgccaactccaacctcccacgccttcgaaccgccc  
 2701 gatgttggtagcgggtgtgcagcagcgttcccgcgctaggatgagacgggtcgcca  
 2761 ttcactccatgagggagtaccgatgcacaggacagccagcgcactccaagcaagtcccgc

Abb. II.16: DNA Sequenz von *H. elongata nhaD* mit Regionen *upstream* und *downstream* des codierenden Bereiches: **-35a** und **-10a** möglicher *rpoH* Heatschock Promotor mit t möglichem Transkriptionsstart, **SDa** mögliche zu *rpoH* gehörende Shine Dalgarno Sequenz und ATG (2 x) sowie CCT mögliche Startcodons. **-35b** und **-10b** möglicher  $\sigma 70$  Housekeeping Promotor mit t (in CCT) möglichem Transkriptionsstart, **SDb** möglicher zu  $\sigma 70$  gehörender Shine Dalgarno Sequenz und atg möglichem Startcodon. Unter der Sequenz ist in Großbuchstaben die Aminosäuresequenz notiert. tga und \* Stopp-Codons, (\*2) im zweiten und (\*3) dritten Leserahmen. → ← *inverted repeat*. Grau markiert sind die Bereiche, nach denen die Primer sNhaDf1 und sNhaDr1 für *nhaD* DNA-Sonden synthetisiert wurden. Die Stellen an denen die degenerierten Primer HRCLF2 und HRCLR2 gebunden haben sind unterstrichen.

Es ließen sich nach dem Review von Wösten [1998] und mit Hilfe von Internetdatenbanken [<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>] zwei hypothetische Promotorregionen identifizieren. Ab bp 508 ist eine dem Standard *Housekeeping* Promotor  $\sigma 70$  entsprechende Sequenz mit voraussichtlichem Transkriptionsstart bp 543 zu finden. Alternativ existiert ab bp 361 eine zu *rpoH* ( $\sigma 32$ ) ähnliche Sequenz mit einem vermuteten Transkriptionsstart ab bp 393. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Heatshock-Promoter, also um einen Promotor, der bei Stress positiv reguliert wird.

Ausgehend von dem  $\sigma 70$  Promotor wurde eine Ribosomen-Bindestelle [Shine & Dalgarno 1974] (bp 787) und ein Methionin-Startcodon (ATG) (bp 800) identifiziert. Eine bis zum nächsten Stopp-Codon im Leserahmen (bp 2038) abgeleitete Aminosäuresequenz ist 412 Residuen lang. Unter Berücksichtigung des alternativen Transkriptionsstartpunktes wurde nach dem stressregulierten Promotor eine weitere Shine-Dalgarno Sequenz gefunden. Beginnt die Translation nach dem hier möglichen Methionin-Startcodon (bp 589), so besitzt die abgeleitete Aminosäuresequenz eine Länge von 483 Residuen. Mit dem alternativen Startcodon CCT (Prolin, bp 541) erhält man eine Sequenz von 499 Residuen Länge.

Zusätzlich liegt ab bp 508 ein weiteres Methionin-Codon im Leserahmen. Hier könnte ein 8 Residuen langes Signalpeptid codiert sein. Ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Proteinexpression ist allerdings die Unterdrückung von Stoppcodons [Yoshimura et al. 1999b, Lee & RajBhandary 1991, Brenner et al. 1965]. Es ist an dieser Stelle daher ebenfalls möglich, dass unter bestimmten Umständen ein aus 510 Residuen bestehendes Peptid gebildet wird.

Da es bislang nicht gelungen ist, über eine RACE [II.4.9.3] den exakten Transkriptionsstart zu bestimmen, können diesbezüglich nur Vorhersagen anhand der Sequenz versucht werden. Die Funktionalität der Promotorregionen ist noch nicht geklärt, insbesondere steht der Nachweis aus, ob es sich bei der dem *rpoH* Promotor ähnlichen Sequenz tatsächlich um einen zusätzlichen, stressregulierten Promotor handelt. Ebenfalls nicht geklärt ist die Funktion des *inverted repeat* ab bp 2103. Es ist vorstellbar, dass hier die Termination der Transkription erfolgt, zu einem klassischen Terminationssignal fehlt jedoch eine TA-reiche Region.

Zusätzlich zu den beschriebenen, *nhaD* betreffenden Elementen wurden in der dargestellten Sequenz weitere Motive gefunden. Sie sind Abbildung III.17 zu entnehmen.

Ein weiterer offener Leserahmen in Richtung von *nhaD* liegt über dem *inverted repeat* (IR). Es existiert ein Met-Startcodon (bp 2083) von dem aus ein 104 Residuen langes Peptid codiert

sein könnte. Dies spricht eher gegen eine Funktion des IR. Über eine Datenbanksuche mit dem Programm Blast konnten jedoch keine homologen Sequenzen gefunden werden. Die Funktion des hypothetischen Proteins ist unklar.

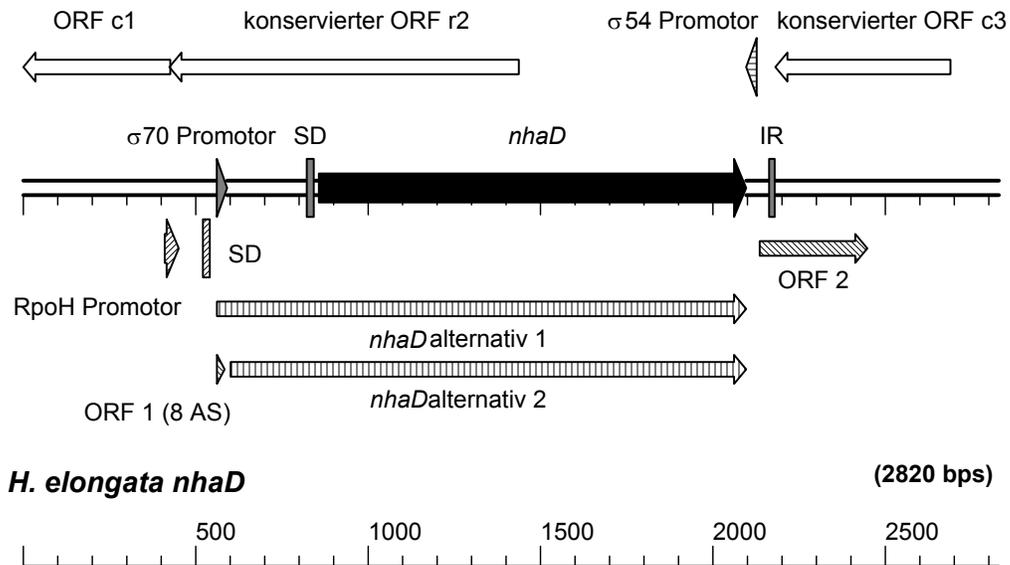


Abb. III.17: *H. elongata nhaD* (schwarz) sowie Bereiche *up-* und *downstream* des NhaD ORF.

Ein hypothetischer  $\sigma 70$  Promotor (Pfeil) sowie eine hypothetische Shine-Dalgarno Sequenz (SD, Box) sind *upstream* eingezeichnet (grau). *Downstream* wurde ein *inverted repeat* (IP, graue Box) gefunden. Weiterhin existieren eine dem *rpoH* Heatschock-Promotor ähnliche Sequenz sowie eine zweite hypothetische SD Sequenz. Ein längeres mRNA Transkript könnte für zwei alternative, längere NhaD Aminosäureketten codieren. Zusätzlich findet sich in diesem Transkript ein sehr kurzer ORF (1) über 8 AS. Ein weiterer ORF (2) ist downstream von NhaD zu finden.

Entgegen der Leserichtung von *nhaD* sind drei offene Leserahmen (ORF c1, c2 und c3) und eine einem  $\sigma 54$  Promotor ähnliche Sequenz zu finden.

Entgegen der Leserichtung von NhaD konnten drei offene Leserahmen identifiziert werden. Der erste (ORF c1) setzt sich vermutlich über die dargestellte Sequenz hinaus fort, zu der Aminosäuresequenz des hypothetischen Proteins konnten keine homologen Datenbanksätze gefunden werden. Zu den Aminosäuresequenzen der beiden anderen ORFs existieren homologe Datenbankeinträge, eine Funktion ist jedoch auch hier nicht geklärt.

Zwischen ORF c2 und ORF c3 wurde eine einem  $\sigma 54$  Promotor ähnliche Sequenz gefunden. Eine in Leserichtung folgende Ribosomen-Bindestelle konnte nicht identifiziert werden.

Mit dem Primerpaar sNhaDf1 und sNhaDr1 wurde eine Touchdown-PCR an genomischer DNA von LBI 25B1 und *M. halophilus* durchgeführt. Bei beiden Organismen konnte ein PCR-Produkt von ca. 450 bp Länge isoliert werden. Die bei *M. halophilus* gefundene Sequenz enthielt keine offenen Leserahmen mit Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Die in

Abbildung III. 18 dargestellte Sequenz aus LBI 25B1 codiert möglicherweise für einen NHA vom Typ NhaD.

```

1  atcgccgacaacctgaccaccgccctgctgatgtgcgccgtgatcaccaaggtggccgag
   I A D N L T T A L L M C A V I T K V A E
61  ggcgacaagcgcttcatcaacctctcctgctcaatatcgtggtagccgccaacgccggg
   G D K R F I N L S C V N I V V A A N A G
121 ggtgccttcagccccttcggcgacatcaccaccctgatgggtgtggcaggcaggcctgggt
   G A F S P F G D I T T L M V W Q A G L V
181 aagttctacgagttcttcgaactgctggtgcccctcactgggtcaactacctgattccggcc
   K F Y E F F E L L V P S L V N Y L I P A
241 gtgggtgatgagcgccttcatcaagaaccgcaagcccgcagcctgcaggaggacgtctgg
   V V M S A F I K N R K P D S L Q E D V W
301 ctcaagcgcggcgcccggcgcatcatcgcgctcttctgctcaccgtggccaccgccgtg
   L K R G A R R I I A L F L L T V A T A V
361 gcctgccacacctgctgcacctgccgcgggtgctgggcatgatgacgggccttggctac
   A C H T L L H L P P V L G M M T G L G Y
421 ctgcagttcttcggctactacctgcgctcagagcctg
   L Q F F G Y Y L R Q S L

```

Abb. II.18: DNA Sequenz eines Fragments des hypothetischen LB 25B1 *nhaD*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Großbuchstaben notiert. Die Primerbindungsstellen von sNhaDf1 und sNhaDr1 sind fett dargestellt.

Wie in Abbildung III.19 dargestellt sind die Sequenzen aus *H. elongata* und LBI 25B1 zu 82% identisch. Da LBI 25B1 nach bisherigen Erkenntnissen den *Halomonadaceae* zuzuordnen ist [Duckworth 2000, Karla 2002], ist dies durch die Verwandtschaft der Organismen zu erklären.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	
25B1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
HeLo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
25B1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
HeLo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
25B1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
HeLo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
25B1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
HeLo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
25B1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
HeLo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
25B1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
HeLo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
25B1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
HeLo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
25B1	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
HeLo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									

Abb. III.19: Ein Ausschnitt aus *H. elongata nhaD* (Helo) und der sequenzierte Bereich von LBI 25B1 *nhaD* (25b1, hypothetisch) im Vergleich. Identische Nukleotide sind schwarz dargestellt, unterschiedliche grau. Die Primerbindungsstellen von sNhaDf1 und sNhaDr1 sind grau hinterlegt.

### III.2.1.2. Sequenzvergleich mit NHaDs anderer Organismen

Eine Datenbanksuche mit Hilfe des Programms BLAST ergab hohe Homologien zwischen den aus den DNA Sequenzen der *Halomonadaceae* abgeleiteten Aminosäuresequenzen und denen von NhaD zweier *Vibrionaceae*, *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus*. Eine vergleichende Darstellung der vier Aminosäuresequenzen ist in Abb. II.20 zu finden. Läßt man den um 56 Residuen längeren N-Terminus des *V. cholerae* NhaD unberücksichtigt, ergibt sich eine Identität der Sequenzen von über 60%, ein sehr starker Hinweis darauf, dass es sich bei den hypothetischen Proteinen der *Halomonadaceae* um Natrium/Protonen-Antiporter vom Typ NhaD handelt.

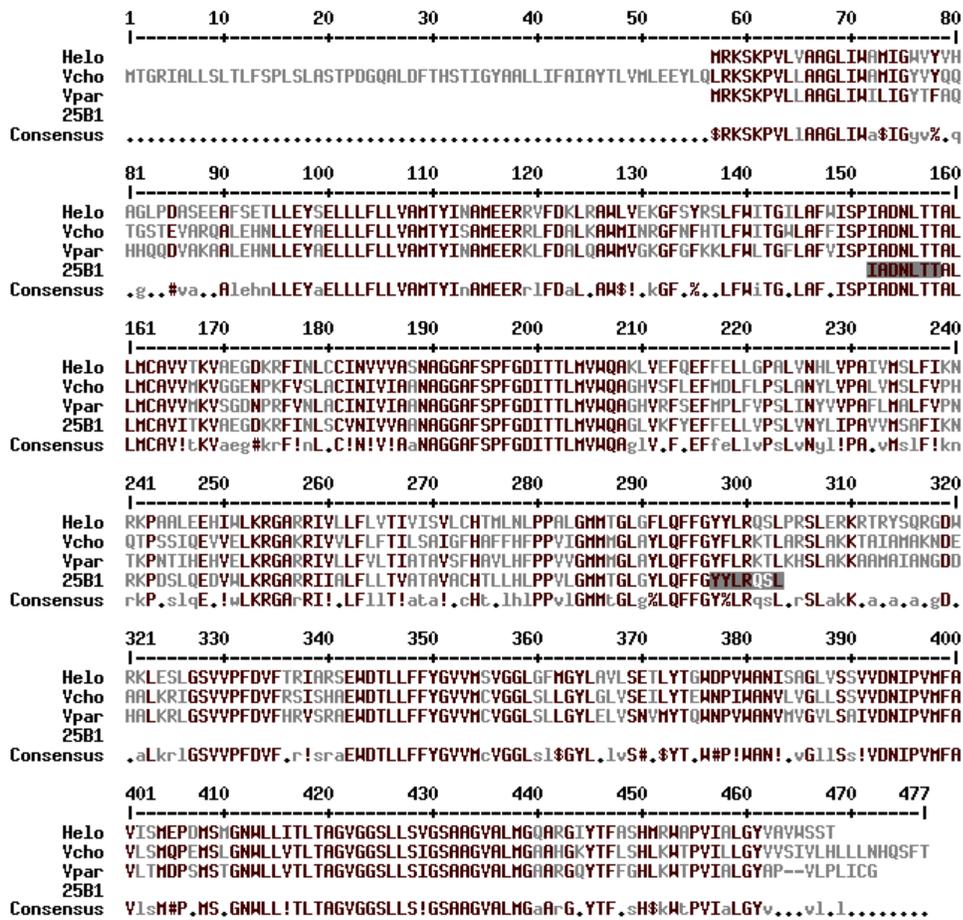


Abb. III.20: Vergleich der NhaD-Aminosäuresequenzen von *H. elongata* (Helo), *Vibrio cholerae* (Vcho), *Vibrio parahaemolyticus* (Vpar) und „Lake Bogoria“ Isolat 25B1 (25B1). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm MULTALIN [http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html] durchgeführt. Eine Nummerierung der Residuen erfolgt ausgehend von der längsten Sequenz. Bereiche hoher Homologie sind schwarz dargestellt, Bereiche geringerer Homologie oder ohne Homologie grau. Nicht vorhandene Residuen sind als Strich dargestellt. Konservierte Bereiche sind in der Zeile Consensus notiert, große Buchstaben stehen für hohe, kleine für niedrige Konservierung. Ähnliche Residuen sind von dem Programm durch Symbole notiert: ! für I, V; \$ für L, M; % für F, Y; # für N, D, Q, E, B, Z. Ein Punkt kennzeichnet Residuen ohne erkennbare Homologie. Die Bereiche, die bei „Lake Bogoria“ Isolat 25B1 möglicherweise durch die verwendeten Primer Homologien aufweisen sind grau hinterlegt.

Sequenzvergleiche zwischen den betrachteten NHAs und anderen Vertretern der Familie der Natrium/Protonen-Antiporter bestätigen die Zuordnung zum Typ NhaD. Zu Vertretern von diesem der vier Zweige von NHAs (NhaA (und NapA), NhaB, NhaC und NhaD) bestehen die größten Ähnlichkeiten in der Sequenz. Die phylogenetische Verwandtschaft ist in Abb. III.21 dargestellt.



Abb. III.21: Phylogenetische Verwandtschaft einer Auswahl prokaryotischer  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter. Die in dieser Arbeit behandelten Antiporter sind grau unterlegt, der NHA des Lake Bogoria Isolates 25B1 ist nach dem in dieser Arbeit sequenzierten Fragment eingeordnet.

Die phylogenetische Verwandtschaft wurde mit den Multisequenz-Alignment Werkzeugen MULTALIN [<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>] und CLUSTAL W [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>] bestimmt, der phylogenetische Baum wurde mit PHYLODENDRON [<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>] erstellt. Die Datenbankeinträge (accession-number) sind in der Grafik willkürlich nummeriert:

(1) P13738 ; (2) 1817175A; (3) AAC33562; (4) JX0360; (5) H64713; (6) AAC66821; (7) H75278; (8) AAD08299; (9) G75431; (10) AAF95185; (11) AAF96106; (12) D70179; (13) AAF96911; (14) BAA25994; (15) AAF95049; (16) JC4814; (17) BAA36041.

### III.2.1.3. Strukturvorhersage

Eine wesentliche Voraussetzung für das Verständnis der Funktion eines Proteins ist die Kenntnis seiner Struktur. Gerade bei Membranproteinen steht aber trotz der jüngsten Erfolge die Strukturaufklärung noch in den Anfängen [Rees et al. 2000]. Es existieren jedoch verschiedene Ansätze, um Sekundärstrukturelemente vorherzusagen. In dieser Arbeit wurden drei Programme eingesetzt, um eine erste Annäherung an die Sekundärstruktur des *H. elongata* NhaD zu erreichen. Alle Daten wurden über den SEARCHLAUNCHER [<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>] übertragen. Die Ergebnisse der „Protein Hydrophilicity / Hydrophobicity Search“ (Weizmann Institut), von SOPM und von Tmpred sind in den Abbildungen III.22 und III.23 dargestellt.

```
-----> STRONGLY preferred model: N-terminus inside
10 strong transmembrane helices, total score : 16391
```

#	from	to	length	score	orientation	#	from	to	length	score	orientation
1	7	27	(21)	2411	i-o	2	39	59	(21)	1204	o-i
3	81	97	(17)	1926	i-o	4	120	138	(19)	1057	o-i
5	203	221	(19)	2410	i-o	6	225	242	(18)	1543	o-i
7	290	312	(23)	2145	i-o	8	322	344	(23)	1070	o-i
9	357	385	(29)	1640	i-o	10	395	412	(18)	985	o-i

Abb. III.22 Ausgabe von Tmpred, links Helices von innen nach außen (i-o) rechts von außen nach innen (o-i), # Helixnummer, from und to erste und letzte Residue der Helix, score Bewertung der Helix

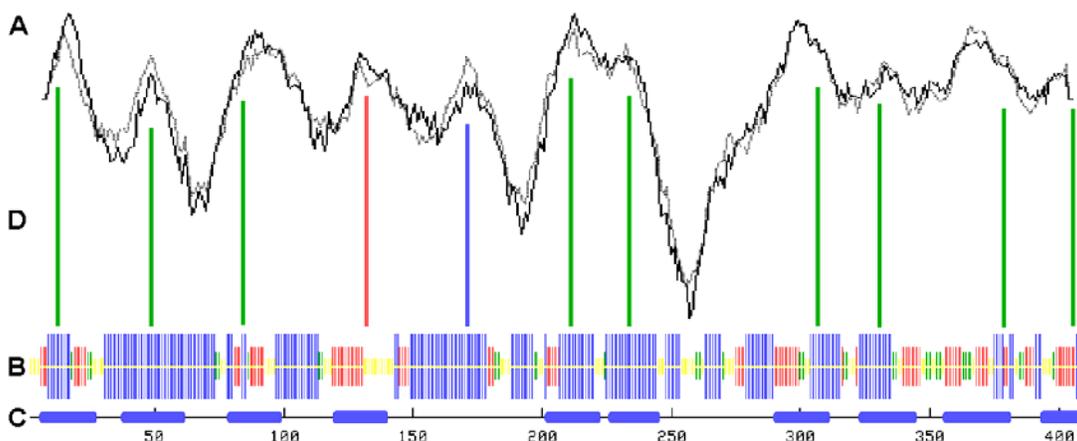


Abb. III.23: A) Hydropathieplot von *H. elongata* NhaD nach dem Programm des Weizmann Institutes (schwarzer Kurvenverlauf). Auftragung der Hydrophilie gegen die Residuennummer. Hydrophobe (hypothetische Transmembran-) Bereiche sind durch hohe Werte dargestellt, hydrophile Bereiche durch niedrige. Durch Abzählen der positiven Spitzen erhält man die Anzahl möglicher Transmembranhelices, es sind 9 bis 11 Spitzen zu erkennen.

B) Strukturvorhersage für *H. elongata* NhaD mit SOPM. Mögliche Helixbereiche (blau),  $\beta$ -Faltblätter (rot),  $\beta$ -Schleifen (grün) und andere Strukturen (gelb) sind gegen die Residuennummer aufgetragen. Hier sind bis zu 15 Helixbereiche abzuleiten.

C) Transmembranhelices nach Tmpred sind durch blaue Boxen auf der Abszisse dargestellt.

D) Übereinstimmungen aller drei Modelle, die eine Transmembranhelix nahe legen, sind durch grüne Balken dargestellt, eine weitere Übereinstimmung zwischen A und B ist blau, eine weitere zwischen A und C rot markiert

Die Ergebnisse des Hydropathieplots und der Sekundärstrukturvorhersage sind sicher nicht direkt miteinander vergleichbar, da bei ersterem die Berechnungen auf die Hydrophilie von Sequenzbereichen abgestimmt sind während die Strukturvorhersage auf hypothetische Strukturelemente abzielt. Ein Vergleich der Lage der hypothetischen Transmembran (Helix-) Bereiche mit den postulierten Helices ist allerdings möglich. Dabei zeigt sich zum Teil eine gute Korrelation von Transmembranbereichen und Helices. Postulierte Helices außerhalb der hypothetischen Transmembranbereiche stehen dabei nicht im Widerspruch zu einem möglichen Modell. Cytoplasmatische oder extrazelluläre Domänen mit Helixstrukturen sind ebenfalls denkbar. Bezieht man die Berechnungen von TMpred mit in die Betrachtungen ein, erkennt man neun Bereiche, in denen alle drei Vorhersagen korrelieren. Es finden sich dort mögliche Membranbereich, Helixstrukturen und Transmembranhelices. An zwei weiteren Stellen korrelieren immerhin noch zwei der Vorhersagen. Mit einem höheren Gewicht auf der Vorhersage der Transmembranhelices durch TMpred und der Berücksichtigung der Tatsache dass sehr viele Membranproteine eine gerade Anzahl Transmembranhelices besitzen, wurde ein zweidimensionales Modell der Sekundärstruktur von *H. elongata* NhaD entwickelt (Abb. III.24).

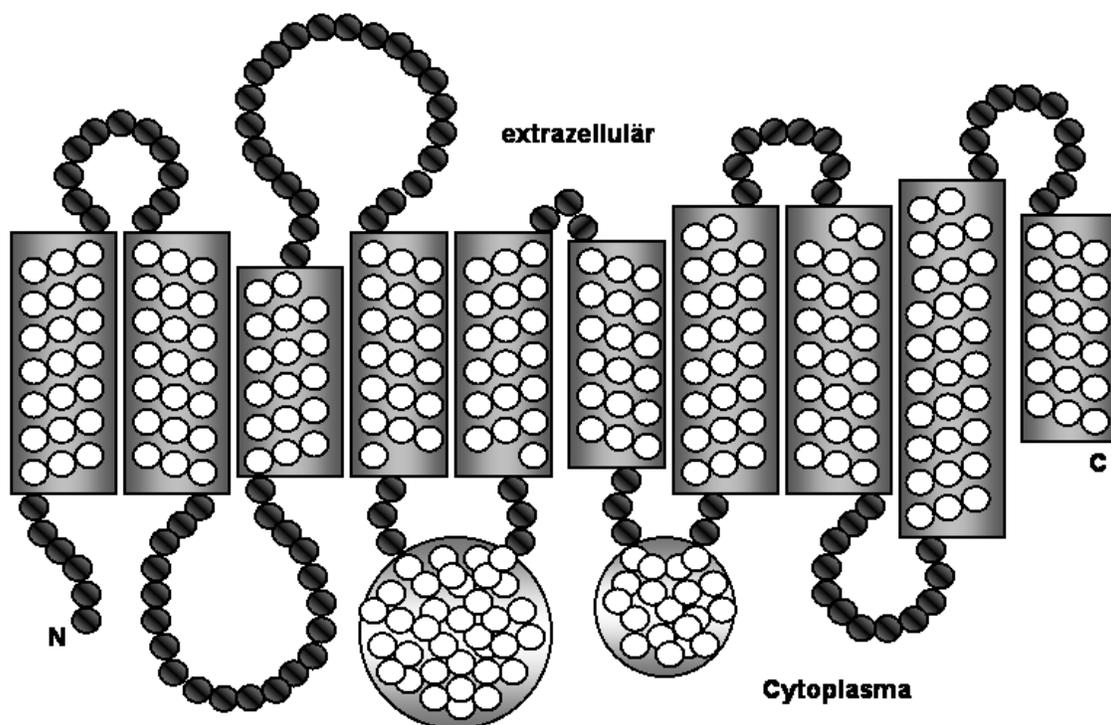


Abb. III.23: Vorhergesagte Sekundärstruktur für *H. elongata* NhaD mit 10 Transmembranhelices und zwei größeren intrazellulären Domänen zwischen Helix 4 und 5 sowie 6 und 7 nach TMpred. N = N-Terminus, C = C-Terminus.

---

Neben 10 Transmembranhelices und den verbindenden Loops sind zwei größere (65 und 48 Residuen) intrazelluläre Domänen zu erkennen. Unter Berücksichtigung der Strukturvorhersage (kann man davon ausgehen, dass auch dort helikale Bereiche zu finden sind. Es fällt auf, dass die Helices 3 und 10 verkürzt sind, während Helix 9 länger ist, als es die Dicke der Membran erfordert. Ob es sich dabei um Artefakte der Algorithmen handelt, oder ob dies der tatsächlichen Struktur entspricht und funktionelle Hintergründe vorliegen, lässt sich ohne weitere Daten nicht klären.

Die vorhergesagte Struktur befindet sich in der Zahl der Transmembranhelices auch in Übereinstimmung mit der von Nozaki et al. [1998] vorhergesagten Struktur für *V. parahaemolyticus* NhaD. Allerdings existiert kein zweidimensionales Modell dieses Antiporters.

### III.2.2. Expression von *nhaD* in *H. elongata*

Über das Expressionsverhalten eines Gens lassen sich Rückschlüsse auf seine Funktionalität ziehen. Da bei *H. elongata* *nhaD* vermutet wird, dass das Genprodukt zur Salztoleranz des Organismus beiträgt, wurde die Expression unter verschiedenen Salinitäten des Anzuchtmediums untersucht. Eine Übernachtskultur von *H. elongata* in K5 Medium wurde durch Verdünnen (1:10) in K2 (hyposmotisch), K5 (isoosmotisch) sowie K10 und K20 (hyperosmotisch) Medium überführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die mRNA Menge über Realtime PCR bestimmt.

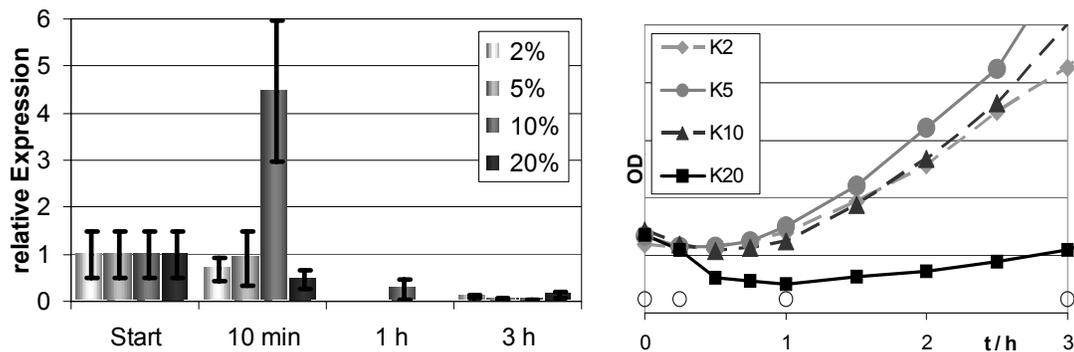


Abb. III.25: Expression von *H. elongata* *nhaD* nach verschiedenen Medienwechseln (links: die Salinitäten der Medien sind in der Legende verzeichnet, jeweils w/v) und Wachstum des Organismus unter den gegebenen Bedingungen (rechts: graue Quadrate 2%, Graue Kreise 5%, schwarze Dreiecke 10%, schwarze Quadrate 20%, jeweils w/v). Die zeitpunkte der Probennahme sind durch offene Kreise markiert. Die Expression zu Beginn der Messungen wurde gleich „1“ gesetzt und entspricht der Expression von *nhaD* in der stationären Phase bei 5% Salinität. Der Fehler einer Doppelbestimmung ist eingetragen.

Wie in Abbildung III.25 dargestellt ist, konnte hier zunächst einmal gezeigt werden, dass *nhaD* überhaupt exprimiert wird, es liegt demnach ein funktionelles Gen vor.

Bei 5% Salinität des Mediums wurde *nhaD* in der stationären Phase auf konstantem Niveau exprimiert. Im weiteren Verlauf der Messung zeigten sich bereits 10 Minuten nach dem Medienwechsel signifikante Unterschiede in der Expression. In einem Medium geringerer und gleiche Salinität blieb das Expressionsniveau innerhalb der Fehlertoleranz konstant. Eine Erhöhung der Salinität auf 10% führte zu einer Verstärkung der Expression um das 4,5-fache. Interessanterweise blieb das Expressionsniveau von *nhaD* bei einer drastischeren Erhöhung der Salinität (auf 20%) ebenfalls konstant. Innerhalb der folgenden drei Stunden sank das Expressionsniveau von *nhaD* in allen vier Medien auf unter 10% des Anfangsniveaus, wobei bei 10% Salinität eine zusätzliche Messung nach einer Stunde zeigt, dass bereits zu diesem Zeitpunkt das Expressionsniveau auf einen Wert deutlich unterhalb des Anfangsniveaus gesunken ist.

Zur Interpretation des Expressionsverhaltens ist auch eine Betrachtung des Wachstumsverhaltens über den beobachteten Zeitraum notwendig. Bei den Kulturen in K2, K5 und K10 Medium begann nach einer Lag-Phase von etwa 30 Minuten das Wachstum der Kultur. Nach einer Stunde war logarithmisches Wachstum zu erkennen. Im Gegensatz dazu war bei 20% Salinität zunächst ein Absterben der Kultur zu beobachten, nach einer Stunde war der niedrigste OD-Wert für die Kultur erreicht. Erst danach war ein erneutes, in den beobachteten 3 Stunden lineares Anwachsen zu verzeichnen. Aufgrund dieses signifikant unterschiedlichen Wachstumsverhaltens bleibt die Kultur in K20 in den folgenden Überlegungen zunächst unberücksichtigt.

Das Expressionsverhalten von *nhaD* weist auf eine starke Abhängigkeit des Bedarfs an NhaD von der Salinität des Mediums hin. Bei einem Wechsel zu geringerer Salinität und bei konstanter Salinität bleibt der Expressionslevel gleich, bei erhöhter Salinität nimmt die Expression von *nhaD* zu. Diese Daten untermauern die Theorie, dass *nhaD* unter der Kontrolle eines stressaktivierten Promotors steht. Möglicherweise handelt es sich dabei um die beschriebene *rpoH* ähnliche Erkennungssequenz [III.2.1.1]. Mit Beginn der Wachstumsphase nach 30 Minuten sinkt das Expressionslevel wieder. Dies deutet darauf hin, dass eine kurzfristig verstärkte Expression von *nhaD* mit der Anpassung an rasch erhöhte Salinität in der Umgebung verbunden ist. Zumindest während des Wachstums tritt die Expression von *nhaD* gegenüber anderen Prozessen in den Hintergrund. Anhand der vorliegenden Daten ist jedoch nicht zu klären, ob andere Mechanismen für die langfristige Anpassung an Salinitäten konstant hoher Level verantwortlich sind. Die Tatsache, dass die Expression von *nhaD* in dem beobachteten Zeitraum nie vollständig zum Erliegen kam, erhärtet die Vermutung, dass die Expression unter konstanten Bedingungen von einem stressunabhängigen Promotor reguliert wird. Möglicherweise handelt es sich dabei um die beschriebene  $\sigma 70$  ähnliche Erkennungssequenz [III.2.1.1]. Wie an der in der stationären Phase befindlichen Übernachtskultur zu erkennen ist, tritt nach dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase die Expression von *nhaD* gegenüber anderen Prozessen wieder weiter in den Vordergrund.

Bei einem Wechsel von 5% Salinität zu 20% Salinität erfährt *H. elongata* offensichtlich derartig großen Stress, dass ein Teil der Kultur abstirbt. Auch das anschließende Wachstum verläuft deutlich langsamer als unter weniger drastischen Bedingungen. Die Expression von *nhaD* wird überraschenderweise nicht hoch- sondern herunterreguliert. Zwei Ursachen kommen zur Erklärung dieses Phänomens in Frage. Zum einen ist es möglich, dass für einen drastischeren hyperosmotischen Schock effektivere Schutzmechanismen zur Verfügung

stehen. Zum anderen könnte die zur Konstruktion von NhaD notwendige Energie für andere Prozesse benötigt werden, die für das Überleben des Organismus unter den gegebenen Bedingungen essentiell sind.

### III.2.3. Inaktivierung von *H. elongata nhaD*

Zur Inaktivierung wurde versucht, in *H. elongata nhaD* ein Element einzufügen, durch das die Translation vorzeitig abbricht [II.4.16]. Idealerweise sollte das verbleibende Proteinfsegment nicht mehr funktionsfähig sein. Zu dem Zeitpunkt, als die Arbeiten an diesen Untersuchungen begannen, war nur die Region von *nhaD* bekannt, die für den C-terminalen Bereich von NhaD codiert sowie eine kurze Sequenz *downstream* des ORF [Abb. II.16, bp 1070 bis bp 2300]. Der von der eingefügten  $\Omega$ -Kassette verursachte Abbruch der Translation ist daher sehr nahe am C-Terminus zu finden. Die resultierenden Mutanten *H. elongata* NhaD- $\Omega$  wurden auf festen Komplexmedien verschiedener Salinität kultiviert. Es zeigten sich im Bereich zwischen 2% und 20% Salinität keine signifikanten Unterschiede zwischen der Größe der Kolonien der Mutanten und der Koloniegröße beim Wildtyp. Bei der Kultivierung in Flüssigmedium zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante im Wachstumsverhalten bei 5% und 10% Salinität [Abb. III.26].

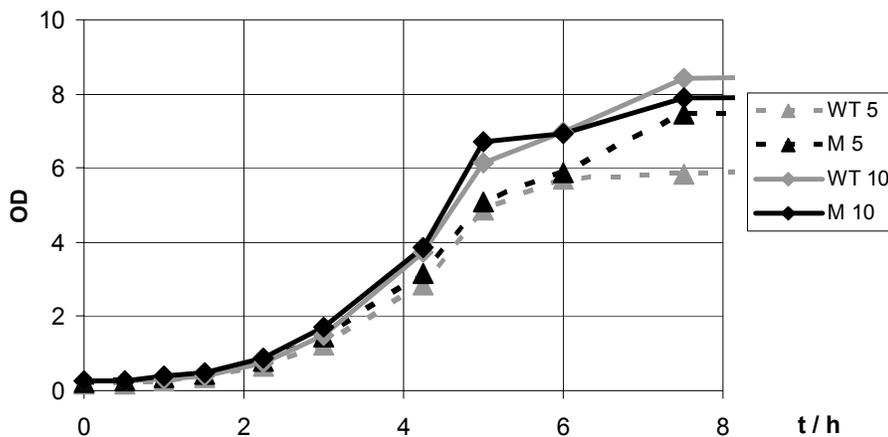


Abb. III.26: Wachstumskurven für *H. elongata* Wildtyp (grau) und NhaD- $\Omega$  (schwarz) bei 5% (durchbrochene Linie, Dreiecke) und 10% (durchgezogene Linie, Rauten) Salinität.

Anhand der vorhandenen Daten ist nicht zu klären, aus welchem Grund kein Phänotyp zu beobachten ist. Zum einen könnte die  $\Omega$ -Kassette zu weit *downstream* im Gen insertiert sein, um die Funktionalität sichtlich zu beeinträchtigen. Zum anderen könnte die Inaktivierung von NhaD von anderen Natrium/Protonen-Antiportern kompensiert werden.

### III.2.4. Expression von *nhaD* in *E. coli*

Eine weitere Möglichkeit, um die Funktionalität von *H. elongata nhaD* zu überprüfen besteht in dem Nachweis, dass NhaD den Verlust von *E. coli* NHAs kompensiert. Um diesen Nachweis zu führen, wurde der Expressionsvektor pUCHelNhaD konstruiert [II.4.17]. Mit diesem wurden *E. coli* XL1-Blue, der beide *E. coli* Antiporter besitzt, und NM81, bei dem *nhaA* deletiert ist, transformiert.

Zunächst folgte eine Kontrolle, um die Funktion des Vektors zu überprüfen. XL1-Blue pUCHelNhaD wurde unter Repression (Glucose) und Induktion (IPTG) des Lac-Promotors

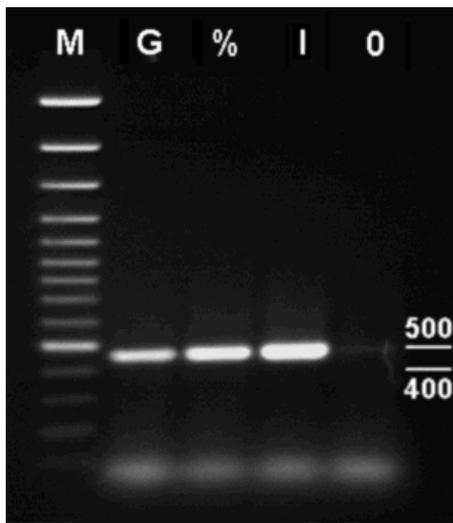


Abb. III.27: Agarosegel zur qualitativen Abschätzung der gebildeten Menge an *nhaD* mRNA. **M** 100bp „plus“ Größemarker (MBI), **G** Repression mit Glucose, **%** ohne Zusatz, **I** Induktion mit IPTG, **0** pUC18 Kontrolle. Markierungen für Fragmentlängen von 400 und 500 bp sind eingefügt.

kultiviert sowie ohne Zusätze. Als Kontrolle diente XL1-Blue pUC18. Aus je einem Aliquot der Kulturen wurde mRNA isoliert und in reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe einer PCR wurde qualitativ die Menge an gebildeter mRNA abgeschätzt [II.4.17, Abb. III.27]. Von der Intensität der Produkt-Banden bei einer Größe von 450bp kann man auf leicht ansteigende Mengen an mRNA in der Reihenfolge Kultur mit Repressor, ohne Zusatz und mit Induktor schließen. Die Induktion war demnach erfolgreich, eine vollständige Repression des Promotors konnte nicht erreicht werden. Wie erwartet wurde in dem Kontrollansatz kein PCR-Produkt gebildet.

Anhand der Analyse des Wachstums einer Auswahl von zufällig ausgewählten *E. coli* XL1-Blue pUCHelNhaD Transformanten (im Folgenden: Konstrukt, Nummern #1, #4, #5 und #7) im Vergleich zu *E. coli* XL1-Blue pUC18 (im Folgenden: Kontrolle) wurde untersucht, wie die Expression von *nhaD* das Wachstumsverhalten eines Organismus beeinflusst, der eigene, funktionierende NHAs besitzt ([II.4.17, Abb. III.28 links]). Bereits bei 1% Salinität des Mediums zeigten sich Unterschiede im Wachstum. Die Konstrukte wuchsen im Vergleich rascher, allerdings erreichten die Kulturen nur eine deutlich geringere Zelldichte. Bei 5% Salinität wuchsen die Konstrukte im Gegensatz zur Kontrolle gar nicht. In einer mit IPTG induzierten Kultur bei 5% Salinität zeigten sich auch Unterschiede zwischen den Konstrukten, die hier Wachstum aufwiesen.

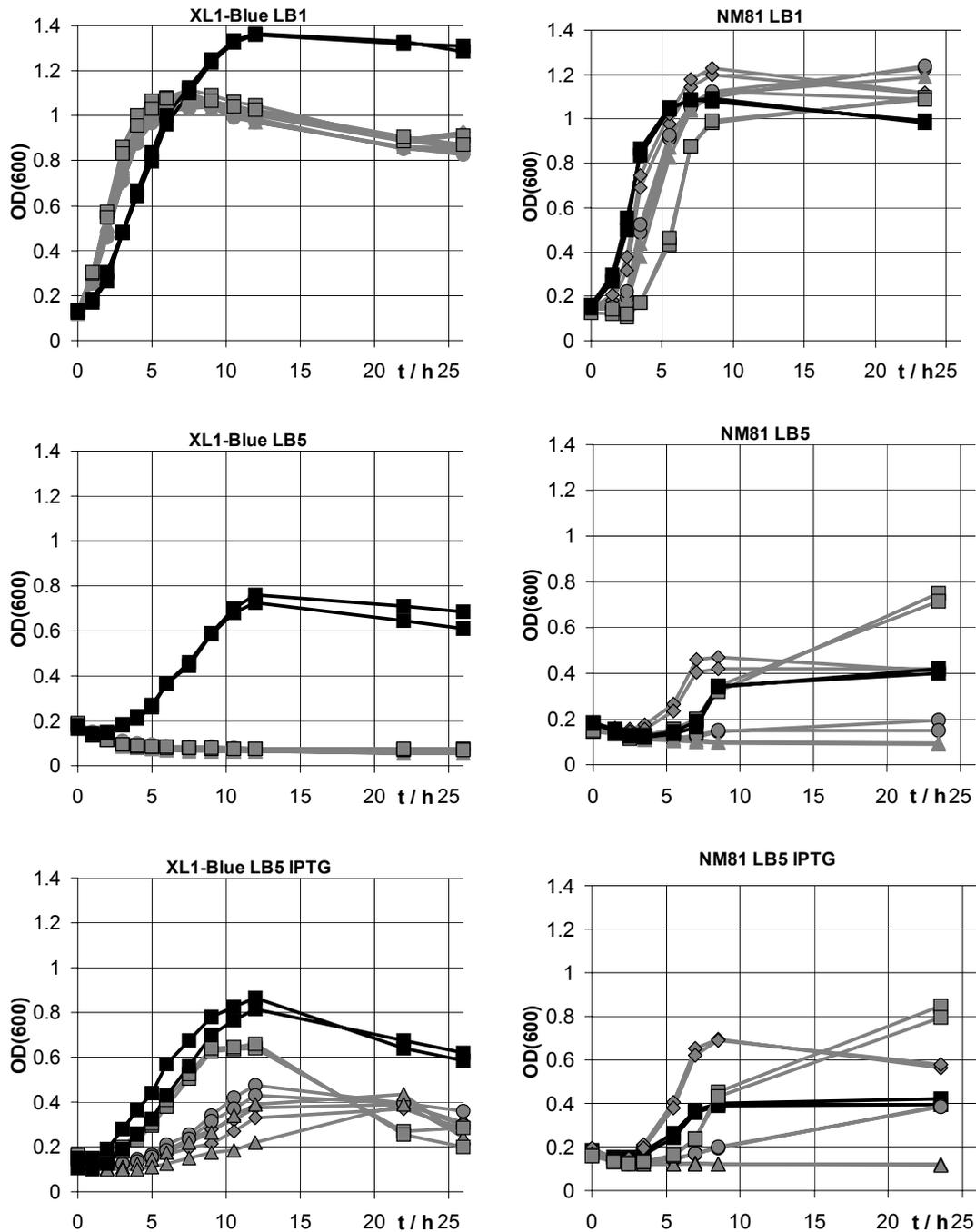


Abb. III.28: Expression von *H. elongata nhaD* in *E. coli* XL1blue (links) und *E. coli* NM81 (rechts), Anzuchten in unterschiedlichen Medien. Von oben nach unten: LB1, LB5 und LB5 0,5 mM IPTG. *E. coli* pUC18 (■) dienen als Kontrolle. Es wurden eine Auswahl von Transformanten mit pUC<sub>HelNhaD</sub> eingesetzt (zufällige Nummerierung: ◆ #1, ▲ #4, ■ #5, ● #7). In den Darstellungen für die mit IPTG induzierten Kulturen sind alle grauen Symbole schwarz umrandet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit erfolgte dies in den übrigen Graphen nur für Transformanten mit auffälligem Wachstumsverhalten. Die Kulturen erfolgten in Doppelbestimmung.

Während #5 im Verlauf der ersten 9 Stunden parallel zur Kontrolle wächst zeigen die übrigen Konstrukte ein deutlich verlängerte Lag-Phase und langsames Wachstum. Zudem erreichen die Kulturen nur eine geringere Zelldichte als #5. Die Kontrolle erreichte bei 5% Salinität,

und damit bei höherem osmotischen Stress und höherem Energiebedarf zur Bewältigung des Stresses, wie erwartet eine geringere Kulturdichte als bei 1% Salinität.

Bei Bakterien, die ein größeres Plasmid tragen, ist geringeres Wachstum keine ungewöhnliche Beobachtung. Daher ist es nicht weiter erstaunlich, dass die Konstrukte nur eine geringere Kulturdichte erreichten als die Kontrolle und unter zusätzlichem Stress gar nicht mehr wuchsen.

Das schnellere Wachstum der Konstrukte bei 1% Salinität steht allerdings im Widerspruch zu der These, dass dies die Erklärung für das beobachtete Verhalten ist. Möglicherweise zeigt sich hier ein Vorteil der Expression von *H. elongata* NhaD zusätzlich zu den *E. coli* eigenen NHAs. Dieser Geschwindigkeitsvorteil beim Wachstum führt jedoch zu einem höheren Energieverbrauch durch Expression des zusätzlichen Gens. Eine Kultur kann bei gleichem Nährstoffangebot nicht zu der selben Zelldichte heranwachsen wie die Kontrolle.

Damit lässt sich jedoch nicht erklären, dass die Konstrukte bei 5% Salinität ohne Induktion kein Wachstum aufwiesen, die induzierten Kulturen hingegen schon. Dies würde bedeuten, dass unter Salzstress die normale Aktivität des Lac-Promotors nicht ausreicht, um einen Vorteil aus der Expression von NhaD zu erhalten. Bei einer zusätzlichen Induktion und damit noch höherem Energieverbrauch scheint hingegen wieder ein gewisses Wachstum möglich zu sein. Dieser Phänomen bedarf der weiteren Klärung durch zusätzliche Untersuchungen.

Ein Vergleich der Konstrukte untereinander zeigt bei den induzierten Kulturen Unterschiede im Wachstumsverhalten. Hier bestätigt sich die Vermutung, dass auch bei der PCR mit einer *proofreading* DNA-Polymerase in ausreichender Menge fehlerhafte Nukleotide in die PCR-Produkte eingebaut wurden, um nach der Konstruktion von Expressionsvektoren bei verschiedenen Transformanden unterschiedlichen Phänotypen beobachten zu können. Analog zu den Sequenzen im Expressionsvektor sind die gebildeten Proteine dann nicht mit *H. elongata* NhaD identisch. Welcher Phänotyp einem regulären *H. elongata* NhaD entspricht, kann anhand der vorliegenden Daten allerdings nicht entschieden werden, eine Sequenzierung der Plasmide erfolgte aus Zeit- und Kostengründen bislang nicht.

*E. coli* NM81 pUCHelNhaD (im Folgenden: Kompensationsmutante) und *E. coli* NM81 pUC18 (im Folgenden: Defektkontrolle) wurden in verschiedenen Medien kultiviert um zu untersuchen, ob der Verlust von NhaA durch *H. elongata* NhaD kompensiert werden kann (II.4.17, Abb. III.28 rechts).

In LB1 Medium wachsen Kompensationsmutanten und Defektkontrolle ohne signifikante Unterschiede. Bei 5% Salinität hingegen zeigten sich sowohl bei den induzierten als auch bei

den nicht-induzierten Kulturen auch zwischen den Kompensationsmutanten drastische Unterschiede im Wachstumsverhalten. #4 wächst in beiden Fällen gar nicht. #1 wächst in beiden Fällen schneller als die Defektkontrolle und erreicht nicht-induziert die selbe Zelldichte. Nach Induktion wird eine deutlich höhere Zelldichte erreicht. #5 wächst in beiden Fällen langsamer als Defektkontrolle, erreicht jedoch die höchste Zelldichte aller Organismen der Versuchsreihe und zeigt induziert und nicht-induziert gleiches Wachstum. #7 wächst deutlich langsamer als die Defektkontrolle. Nicht-induziert wird nur eine geringe Zelldichte erreicht, induziert die Zelldichte der Defektkontrolle. Die Erklärung für das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Kompensationsmutanten ist identisch mit der für die bei *E. coli* XL1-Blue pUCHelNhaD beobachteten Unterschiede.

Alternativ zur Kultivierung in Flüssigmedien erfolgte eine Anzucht von Kompensationsmutanten und Defektkontrolle auf festem Minimalmedium mit Glycin, Serin und Prolin als Kohlenstoffquellen, die über  $\text{Na}^+$ -Cotransport aufgenommen werden. Eine Kontrollanzucht wurde mit Glycerin als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Hier zeigten sich anhand der Koloniegröße als Indikator keine Unterschiede im Wachstumsverhalten.

Zumindest in Flüssigkultur konnte bei *E. coli* NM81 pUCHelNhaD #1 eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit unter Salzstress nachgewiesen werden, im induzierten Zustand wurde auch die Zelldichte der Kontrollkultur übertroffen. Bei #5 zeigte sich zwar langsames Wachstum als bei der Kontrolle, was aber dafür induziert und nicht-induziert zu größeren Zelldichten führte. Die erreichten Zelldichten entsprachen allerdings nicht denen einer Kultur bei niedrigerer Salinität oder denen einer Kultur von *E. coli* XL1-Blue pUC18, der beide eigenen NHAs besitzt.

Zusammenfassend konnte damit kein endgültiger Beweis dafür erbracht werden, dass es sich bei *H. elongata* NhaD tatsächlich um einen Natrium/Protonen-Antiporter handelt, der zur Ausbildung der Salztoleranz des Organismus notwendig ist. Der Verlust von NhaA in *E. coli* konnte durch *H. elongata* NhaD nur teilweise kompensiert werden. Es ist jedoch in Betracht zu ziehen, dass die physiologischen Unterschiede und die phylogenetische Entfernung zwischen *E. coli* und *H. elongata* zu groß sein könnten, um ein einwandfreies Funktionieren des Antiporters zu ermöglichen. Die vorliegenden Daten beweisen jedoch ausreichend, dass es sich bei *H. elongata* nhaD um ein funktionelles Gen handelt, dessen Genprodukt an der Ausbildung einer Salztoleranz beteiligt sein kann.

## **IV. Diskussion**

### **IV.1. Osmoadaptation und Salzstress**

Auch wenn der Begriff Osmoadaptation eine Dynamik beschreibt, nämlich den Prozess der Anpassung an bestimmte osmotische Verhältnisse der Umgebung, wird Osmoadaptation sehr oft mit der Anpassung an statischen osmotischen Stress in Verbindung gebracht. Man neigt dazu, an eine Saline zu denken, an Pökelfleisch oder vielleicht auch ein Glas Honig. Osmoadaptation wird mit einer Anpassung an hohe osmotische Aktivität gleich gesetzt. Dies ist sicherlich nicht falsch, denn in jedem der genannten potentiellen Lebensräume für Mikroorganismen herrscht eine niedrige Wasseraktivität [Brock et al. 1994], die osmotischen Stress verursacht. Doch die statische Osmolarität der Umgebung ist nur ein Teilaspekt des osmotischen Stresses.

Wie jedes Ökosystem sind auch die Habitate von *E. coli*, *H. elongata*, LBI 25B1 und *M. halophilus* nur selten statisch. Bei Regen erfolgt gegebenenfalls eine rasche Verdünnung des umgebenden Mediums. Die Osmolarität nimmt rasch ab und ein hypoosmotischer Schock tritt ein. Umgekehrt nimmt bei Trockenheit mit dem Verdunsten von Wasser die Osmolarität der Umgebung zu, das umgebende Medium wird hyperosmotisch. Dieser Wechsel der osmotischen Verhältnisse im Habitat beinhaltet ebenfalls Stress für den Organismus. Die Mechanismen, nach denen eine Anpassung an eine höhere oder geringere Osmolarität erfolgt, unterscheiden sich dabei deutlich.

Ein erhöhter Salzgehalt der Umgebung ist ein häufiger Faktor für osmotischen Stress in natürlichen Habitaten. Gerade hier ist jedoch zu beachten, dass nicht alleine die Osmolarität, sondern auch die Anwesenheit von Natrium-Ionen Stress verursacht. Zusätzlich zum osmotischen herrscht ein chemischer Stress. Es wird daher auch direkt von Salzstress gesprochen. Ein möglicher Mechanismus um  $\text{Na}^+$  aus dem Zellinneren herauszutransportieren sind Natrium/Protonen-Antiporter, wie zum Beispiel *E. coli* NhaA. Die Expression von *E. coli* NhaA wird durch  $\text{Na}^+$  induziert [Karpel et al. 1991]. Allerdings handelt es sich hierbei *nicht* um eine osmoregulatorische Antwort, denn die Regulation der Expression erfolgt spezifisch und bereits in niedrigen Konzentrationen durch  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$ . Echte Mechanismen zur Osmoregulation in einer hochosmotischen Umgebung befassen sich mit der Anpassung der Osmolarität von Cyto- und Periplasma. Dazu zählen die *de novo* Synthese [Göller 1999] oder Aufnahme [Jebbar et al. 1997] kompatibler Solute [Galinski 1995, Lengler et al. 1999], Akkumulation molarer Mengen an KCl [Oren 1986, Galinski 1995] und nicht zuletzt die Expression verschiedener Transportsysteme für diese Stoffe [Csonka & Epstein 1996].

Mechanosensitive Kanäle (Msc's) werden zur Beantwortung eines hypoosmotischen Schocks exprimiert. Auch wenn sie in bei höheren Organismen im Laufe der Evolution weitere Aufgaben übernommen haben [Martinac 2001], dienten sie in ihren Ursprüngen allein der Osmoregulation, einer Funktion, die sie bei *Archaea* und *Bacteria* auch heute noch besitzen [Sackin 1995, Sachs & Morris 1998].

## **IV.2. Untersuchungen an Bakterienpopulationen**

Die Reaktion eines einzelnen Bakteriums auf seine Umgebung oder deren Änderung ist aufgrund der geringen Größe und der Zellmorphologie nicht zu erfassen. Vielmehr können nur Gesamtpopulationen untersucht werden. Die Beschreibung des physiologischen Zustandes einer Bakterienkultur erfolgt sehr oft über Wachstumsverläufe und damit im Zusammenhang stehenden Erscheinungen [Schlegel 1992]. Kenngrößen des Wachstumsverhaltens sind Lebendzellzahl, Gesamtzellzahl, Biomasse und Wachstumsraten. Bei einem Wechsel der Umweltbedingungen sind zusätzlich Überlebensraten und weitere anpassungsbedingte Phänomene von Interesse. Qualitative Aussagen, ob unter bestimmten Testbedingungen Bakterienwachstum zu beobachten ist, werden ebenfalls hinzugezogen. Die Bestimmung der Kenngrößen erfolgt über die Auszählung koloniebildender Einheiten (kbE), durch Massenbestimmungen und Trübungsmessungen [Koch et al. 1981]. Der Stoffwechsel einer Bakterienkultur wird in der Regel durch die Bestimmung von Substraten und Metaboliten in der Biomasse oder im Kulturüberstand charakterisiert, so zum Beispiel der Gehalt an kompatiblen Soluten [Galinski 1986].

Bei allen Betrachtungen ist zu berücksichtigen, dass eine Kultur prokaryotischer Organismen verschiedene Wachstumsphasen durchläuft. Wie Untersuchungen gezeigt haben, gehen die Zustände, die von der Population eingenommen werden, weit über die klassische Einteilung der Wachstumskurve in lag- oder Adaptations-Phase, eponentielle Wachstumsphase, stationäre Phase und Degradationsphase hinaus. Sie können mit den klassischen Methoden der Mikrobiologie nicht mehr vollständig erfasst werden [Lloyd & Hayes 1995]. Fluoreszenzfarbstoffe sind eines der Mittel, die zur Beschreibung unterschiedlicher Vitalitätszustände eingesetzt werden können [Lloyd & Hayes 1995, Kaprelyants & Kell 1992].

Alle betrachteten Größen, die den Zustand einer Bakterienpopulation beschreiben, hängen nicht nur von den Umgebungsbedingungen ab, sondern sind zudem für bestimmte Wachstumszustände charakteristisch, selbst wenn man sich nur auf die klassisch beschriebenen Wachstumsphasen beschränkt. Besonders bei vergleichenden Studien sind

daher nicht nur die Kulturbedingungen der betrachteten Populationen sondern auch deren Wachstumszustand zu berücksichtigen.

Bei Untersuchungen einer großen Zahl verschiedener Organismen, wie sie zum Beispiel Screeningverfahren erfordern, ist es notwendig, die experimentelle Methodik zu miniaturisieren, um einen hinreichend großen Probendurchsatz zu gewährleisten. Dies steht oft in Konkurrenz zu dem Bedürfnis, die Präzision der Messungen beizubehalten. Zusätzlich besteht die Notwendigkeit, zum Zeitpunkt der Datenaufnahme oder Probennahme eine Synchronität der Wachstumsphase zu gewährleisten. Gerade im Bereich der Screeningverfahren besteht immer wieder der Bedarf nach neuen, schnellen und daher notwendigerweise einfach zu handhabenden Analysemethoden.

### **IV.3. Entwicklung eines Screeningverfahrens zur Detektion von Zellpopulationen mit gestörter Membranintegrität unter hypoosmotischem Stress**

Die überwiegende Mehrheit der existierenden Screeningverfahren beruht auf einer einfachen „ja / nein“-Antwort. Es genügt in der Regel nachzuweisen, ob unter bestimmten Bedingungen Zellwachstum möglich, eingeschränkt oder nicht möglich ist, oder ob eine auf bestimmten Stoffwechselfvorgängen beruhende Farbreaktion zu beobachten ist. Bei den Untersuchungen an *Halomonas elongata* und *Escherichia coli* hat sich jedoch herausgestellt, dass eine derart einfache Antwort für die untersuchte Fragestellung nicht zu erzielen ist.

Mechanosensitive Kanäle [I.4] sichern das Überleben von Bakterienzellen bei einem hypoosmotischen Schock. Wie schon von Levina et al. [1999] an verschiedenen *E. coli* Mutanten gezeigt wurde, stirbt bei einem hypoosmotischen Schock nicht die gesamte Population ab, wenn Defekte der Msc's vorliegen oder Msc's deletiert sind. In dieser Arbeit konnten die Daten reproduziert und für *H. elongata* und das Lake Bogoria Isolat 25B1 analoge Daten erhoben werden. Bei einer Blockade der Msc's durch Gadolinium ist ein hypoosmotischer Schock nicht für die gesamte Population letal. Sowohl bei dem *E. coli* Wildtyp als auch bei Mutanten mit deletierten Msc's bilden die Teile der Population, die einen hypoosmotischen Schock überlebt haben, ebenso wie ein Aliquot einer nicht geschockten Kultur auf festen Nährmedien Kolonien aus. In ihrer Größe sind diese nicht voneinander zu unterscheiden, da die Existenz von Msc's nicht das Wachstumsverhalten an sich beeinflusst sondern nur das Überleben bei einem hypoosmotischen Schock. Analog

unterscheiden sich auch die Kolonien von unterschiedlich behandelten *H. elongata* und LBI 25B1 Populationen nicht in Form und Größe. Zur quantitativen Bestimmung der Überlebensraten ist ein Auszählen der koloniebildenden Einheiten (kbE) notwendig.

Durch Transposon-Mutagenese wurden Zufallsmutanten erzeugt, aus denen in einem Screeningverfahren solche zu isolieren waren, die einen Defekt oder eine Deletion der mechanosensitiven Kanäle aufwiesen. Wie groß die Zahl der insgesamt zu untersuchenden Mutanten ist die man betrachten muss, um statistisch die gewünschte Mutante darunter zu finden, kann man durch eine einfache Abschätzung bestimmen [nach: Kunte, Bonn, persönliche Information]. Bei einer Größe des Genoms von ca. 4500 kb und einer durchschnittlichen Größe eines Gens von 1 kb bis 1,5 kb ist mit einer Zahl von ca. 3000 bis 4000 Genen zu rechnen. Bei einer statistischen Verteilung der Insertion des Transposons in die unterschiedlichen Gene würde demnach eine Untersuchung von 4000 Mutanten ausreichen um für jedes Gene eine Knockout-Mutante zu finden. Diese Wahrscheinlichkeitsverteilung beschreibt natürlich nur ein statistisches Modell. Zusätzlich liegt hier keine Gleichverteilung vor, da es bestimmte Bereiche im Genom von *H. elongata* gibt, in die das verwendete Transposon Tn1732 bevorzugt insertiert [Kunte & Galinski 1995]. Daher ist von vorn herein eine größere Zahl von Mutanten zu untersuchen um statistisch jedes Gen einmal durch ein Transposon auszuschalten. Zusätzlich ist das mehrfache dieser minimal zu untersuchenden Mutantenzahl zu betrachten, um nicht nur statistisch sondern auch unter realen Bedingungen eine realistische Chance zu haben, jedes Gen einmal auszuschalten. Bei einer geschätzten minimalen Zahl von 5000 Mutanten und einer dreifachen Wiederholung erhält man eine Zahl von 15.000 Mutanten. Ein auf Auszählung der kbE beruhendes Screeningverfahren zur *Quantifizierung* der Überlebensrate wäre bei dieser erforderlichen Mutantenzahl zu aufwändig. Jede einzelne Probe erfordert die Anfertigung von mindestens vier Verdünnungsreihen und mindestens vier Verdünnungsausstrichen (jeweils zwei hypoosmotische Schocks und zwei Kontrollen) auf festem Nährmedium. Alleine der Materialaufwand von mindestens 60.000 Petrischalen mit festem Nährmedium lässt diese Methode im Vergleich zu herkömmlichen Screeningverfahren wenig sinnvoll erscheinen. Für das Screening war es jedoch ausreichend, eine *qualitative* Aussage über das Überleben der Populationen zu treffen.

Der LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Viability Test-Kits (Molecular Probes) ist eine kommerziell erhältliche Differentialfärbemethode zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen auf der Basis von Fluoreszenzfarbstoffen. Sie beruht auf der Existenz der von Lewis [1994] und

Brennan et al. [2001] in Übersichtsartikeln beschriebenen bakteriellen Multidrug Resistance Proteine (Mdr's). Mittlerweile wurden diese Proteine in verschiedensten Bakterien gefundenen. Sie gehören zu den ABC-Transporten, sind ATP-abhängig und tragen durch ihr sehr breites Substratspektrum aktiv zur Resistenz der Zellen gegen Antibiotika und andere zellschädigende Substanzen bei, die über die Membran eindringen. Von Sami et al. [1998] wurde Ethidiumbromid (EtBr) als ein Substrat der Mdr beschrieben und zur Detektion von *Lactobacillus brevis* Mutanten genutzt, die einen Defekt in einem Gen trugen, das Resistenz gegen Hopfen vermittelt. Der Test-Kit der Firma Molecular Probes beruht auf zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, von denen der eine, SYBR Green<sup>®</sup>, in der Lage ist, auch durch eine intakte Zellmembran zu diffundieren. Der zweite Farbstoff, Propidiumiodid (ProI), hat eine Ähnliche Struktur wie EtBr und ist ein Substrat der Mdr's, wird also am Eindringen in eine intakte Zelle gehindert. Erst nach dem Verlust der Membranintegrität dringt ProI in die Zelle ein und verdrängt SYBR Green<sup>®</sup>. Lebende und tote Zellen weisen damit eine Fluoreszenz bei unterschiedlicher Wellenlänge auf. Anhand des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten kann man die Anteile lebender und toter Zellen in einer Probe abschätzen. Für eine exakte Aussage sind auf die speziellen Versuchsbedingungen abgestimmte Kalibrierungen notwendig.

An *Halomonas halodenitrificans* und dem Lake Bogoria Isolat 25B1 wurde von Karla [2000] exemplarisch nachgewiesen, dass auch Organismen der Gruppe *Halomonadaceae* Mdr's besitzen. Dieser Nachweis konnte in dieser Arbeit durch Fluoreszenzvergleich bei toten und lebenden Zellen auch für *H. elongata* erbracht werden.

Von Maurer & Dougherty [2001] wurde der LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Viability Test bereits erfolgreich zum Massenscreening von Msc-Mutationen weiterentwickelt. Es wurde bei einer Person ein Durchsatz von „über 75 (untersuchten) Mutationen in 23 Stunden“ erreicht. Bei einer erforderlichen Zahl von 15.000 zu untersuchenden Mutanten waren jedoch immer noch ca. 200 Labortage (ca. ein Jahr) einzuplanen, in der eine Person nahezu ausschließlich mit diesem Verfahren zur Analyse der Mutanten beschäftigt wäre. Eine weitere Beschleunigung des Screeningverfahrens oder die Entwicklung einer Alternative war daher wünschenswert.

Die Methode ist speziell zur Unterscheidung verschiedenen Msc-Mutationen entwickelt worden. In der von Maurer und Dougherty veröffentlichten Arbeit wurde ein *E. coli* Stamm ohne Msc's mit verschiedenen Vektoren transfiziert, die für die Expression definierter MscL-Mutanten codieren. Gegenüber dem Wildtyp (WT) sollten zwei verschiedenen Mutationstypen identifiziert werden. Sogenannte *gain-of-function*-Mutationen (Funktions-

gewinn), bei denen MscL eine größere Öffnungswahrscheinlichkeit als der WT besitzt oder auch ständig geöffnet ist zeigen gegenüber dem WT ein langsames Wachstum, da ständig Metabolite über den geöffneten Kanal verloren werden. *Loss-of-function*-Mutationen (Funktionsverlust) zeichnen sich gegenüber dem WT durch eine geringere Überlebensrate nach einem hypoosmotischen Schock aus. Da bei der in dieser Arbeit untersuchten Problemstellung nur Mutationen mit einem Funktionsverlust von Interesse waren, zeichnete sich bereits im Vorfeld ab, dass für diese Arbeit auch eine vereinfachte Testmethodik möglich war.

Ausgangspunkt für das in Kapitel II.4.13 beschriebene Methode war der von Karla [2000] entwickelte Test zur Nitrittoxizität. Die bereits etablierte Methode wurde ausschließlich zur Identifikation von Zellen mit intakter Membran und gestörtem Energiehaushalt genutzt. Durch eine Entkopplung der Atmungskette mit Cyanid oder Nitrit kann kein ATP mehr gebildet werden. Als eine Folge davon stellen die ATP-abhängigen Mdr ihre Funktion ein und EtBr kann in die Zellen eindringen. Bei Organismen mit fehlenden oder defekten Msc's war nach einem hypoosmotischen Schock eine Lyse eines Teils der Kultur zu erwarten. Da die Zellmembran in diesem Fall zerstört wäre, war ein rasches Eindringen von EtBr in die Zelle zu erwarten. Von dieser Voraussetzung her sprach nichts gegen die Anwendbarkeit des Testsystems. Jüngste Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass bei einem hypoosmotischen Schock auch dann ein Verlust der Membranintegrität festzustellen ist, wenn der Organismus mechanosensitive Kanäle besitzt. Vázquez-Laslop et al. [2001] konnten nachweisen, dass die bei *E. coli* schon lange beobachtete Freisetzung kleiner cytoplasmatischer Proteine bei einem hypoosmotischen Schock [Berrier et al. 1992] nicht zwingend über Msc's erfolgt sondern möglicherweise durch einen Verlust der Membranintegrität zu erklären ist. Es konnte hier jedoch gezeigt werden, dass ein hypoosmotischer Schock keinen nachweisbaren Einfluß auf das Fluoreszenzverhalten eines *E. coli* hat, der über alle eigenen Msc's verfügt.

Ein weiteres Problem der Anwendbarkeit der Methode liegt in der Möglichkeit, dass *H. elongata* verschiedene Typen von Msc's besitzen könnte, wodurch ein Verlust eines der Gene durch die *verbliebenen* Kanäle kompensiert werden könnte. Untersuchungen an drei Kanaldeletionsmutanten von *E. coli* denen MscL (MJF 367,  $\Delta mscL$ ), MscS (MJF 451,  $\Delta yggB$ ) beziehungsweise beide Msc's (MJF 455,  $\Delta mscL\Delta yggB$ ) fehlen [Levina 1999] haben gezeigt, dass auch die Mutanten denen nur einer der Kanäle fehlt eine signifikante Steigerung des Fluoreszenzsignals aufweisen. Auch in dieser Hinsicht sprach demnach nichts gegen eine Einsetzbarkeit des Testsystems für die betrachtete Problemstellung.

Die Übertragbarkeit des Testsystems auf *H. elongata* wurde durch Wiederholung dieser Untersuchungen bestätigt. Ein Kanaldefekt wurde hierbei durch Blockieren der Kanäle mit Gadolinium simuliert, wobei ein Einfluss des  $Gd^{3+}$  auf das Testsystem ausgeschlossen werden konnte.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Screeningverfahren lassen sich pro Tag parallel zu anderen Arbeiten problemlos 192 Proben (zwei 96-Loch Platten) bearbeiten, dies entspricht 15.000 Mutanten in 78 Arbeitstagen (ca. vier Monate). Bei ausschließlicher Arbeit mit dem Testsystem ist eine Erhöhung des Durchsatzes auf 288 (drei 96-Loch Platten) Proben oder 15.000 Mutanten in 52 Arbeitstagen (ca. drei Monate) möglich. Selbst wenn man aus Zumutbarkeitsgründen von einer Screening-Zeit von vier Monaten für eine Person ausgeht, entspricht dies einer Verkürzung der Zeit auf ein Drittel gegenüber der von Maurer & Dougherty [2001] vorgestellten Methode. Dieser Zeitvorteil entsteht vermutlich daher, dass bei der Methode von Maurer und Dougherty eine Verdünnungsreihe erstellt werden muss, während bei dem hier beschriebenen Verfahren ein hypoosmotischer Schock in destilliertem Wasser und eine Verdünnung in einer äquisalinen Kochsalzlösung als Kontrolle ausreichen. In der für die eigentliche Datenaufnahme benötigten Zeit unterscheiden sich die beiden Verfahren nicht, bei Maurer und Dougherty sind 75 Minuten Inkubation notwendig, die hier beschriebene Methode erfordert die Aufnahme eines Zeitverlaufs der Fluoreszenz über 60 bis 80 Minuten. Ein weiterer, drastischer Vorteil der in dieser Arbeit beschriebenen Methode sind die geringeren Materialkosten. An die Stelle eines Kits mit kostenintensiven Spezialfarbstoffen tritt Ethidiumbromid als weit verbreitetes, preisgünstiges Verbrauchsmaterial.

Die Anwendung in der Praxis hat gezeigt, dass das Screeningverfahren für die spezielle Problematik der Detektion von Kanaldeletionsmutanten nicht genügend spezialisiert ist. Eine Reihe von Mutanten wies nach einem hypoosmotischen Schock ein reproduzierbar erhöhtes Fluoreszenzsignal auf. Dies wäre sicherlich auch mit dem von Maurer und Dougherty [2001] entwickelten Verfahren zu beobachten. In einer nachgeschalteten Untersuchung der Überlebensrate bei Schockexperimenten konnte jedoch bei keiner der Mutanten eine Auffälligkeit festgestellt werden, die auf Defekte an *Msc's* schließen ließ. Zur Identifikation des mutierten Gens wären bei jeder einzelnen Mutante aufwändigere Klonierungs- und Sequenzierungsschritte notwendig gewesen, aber auch bei einer Beschränkung auf die Bestimmung der Überlebensraten wäre die Identifikation einer Kanaldefektmutation in einem sinnvollen Zeitrahmen nur durch Zufall möglich gewesen.

Da das Testsystem ein Eindringen von Ethidiumbromid in die Zellen registriert, erzeugt jede Mutante, die nach einem hypoosmotischen Schock die Membranintegrität verliert, ein positives Signal. Dies war auch bei den *E. coli* Mutanten, denen nur einer der *E. coli* eigenen Msc's fehlte, der Fall. Angesichts der großen Breite an Salinitäten, unter denen *H. elongata* überleben kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass der Organismus analog *E. coli* mehrere Msc's besitzt, die für unterschiedlich starke hypoosmotische Schocks ausgelegt sind. Bei den *E. coli* Mutanten war zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals zusätzlich eine niedrigere Überlebensrate nachweisbar. Dies bedeutet allerdings nicht notwendigerweise, dass auch bei *H. elongata* Mutanten mit Defekten an einzelnen Msc's eine niedrigere Überlebensrate nachweisbar ist. In der Redundanz von Msc's liegt daher ein Problem das dazu führen könnte, dass eine Mutante mit einem defekten Msc nicht über dieses Screeningverfahren identifiziert wird.

Weiterhin können Mutationen die die Stabilität der Membran herabsetzen zu einem positiven Signal führen, obwohl die Msc's unberührt bleiben. Beispiele hierfür betreffen nicht nur Membranproteine sondern auch den an der Membransynthese beteiligten Enzympool. Auch hier führen die Mutationen nicht notwendigerweise zu einer Lyse sondern können zu einem zeitweisen Verlust der Membranintegrität führen. Die hohe Zahl von 30 Mutanten mit auffälligem Fluoreszenzverhalten bei 1500 untersuchten Transposonmutanten spricht dafür, dass entweder sehr viele Faktoren die Membranintegrität unter einem hypoosmotischen Schock beeinflussen, oder dass in bestimmte Gene, die zur Membranintegrität beitragen, Transposons besonders häufig insertieren.

Mutationen an den Multidrug Resistance Proteinen könnten ebenfalls ein positives Testsignal hervorrufen. Da hier jedoch auch ohne einen hypoosmotischen Schock eine erhöhte Fluoreszenz messbar wäre, wären diese Mutanten im Rahmen der Testergebnisse zu identifizieren.

Die Unzulänglichkeit des Testsystems in diesem speziellen Fall stellt daher nicht die Methodik an sich in Frage.

Das entwickelte Screeningverfahren ist lediglich für eine Vorauswahl der Mutanten geeignet, da überverhältnismäßig viele Mutanten mit verminderter Membranintegrität unter einem hypoosmotischen Schock identifiziert werden. Da das von Maurer und Dougherty entwickelte Verfahren ebenfalls auf dem Nachweis der Membranintegrität basiert, würde dort eine identisch hohe Zahl von Mutanten detektiert. Es ist bei beiden Verfahren eine nähere Charakterisierung der vorausgewählten Mutanten notwendig. 30 auffällige Mutanten unter

1500 betrachteten lassen sich auf mögliche 300 unter 15.000 mindestens zu untersuchenden Mutanten hochrechnen. Jede einzelne Mutante muss für die Bestimmung der Überlebensrate kultiviert werden und wie oben beschrieben in mindestens vier Verdünnungsreihen für mindestens vier Ausstriche präpariert werden. Der Materialaufwand von mindestens 1200 festen Nährböden in Petrischalen ist noch vertretbar, es ist jedoch zu bedenken, dass im ungünstigsten Fall ein Zeitaufwand von etwa drei Monaten zusätzlich zu dem ohnehin zeitaufwändigen Screeningverfahren entsteht [zeitliche Einschätzung nach eigenen Erfahrungen an den untersuchten 30 Mutanten]. Hinzu kommt das bereits beschriebene Problem redundanter Msc's. Hierdurch besteht die Möglichkeit, dass Mutanten mit defekten Msc's durch das Screening gar nicht erfasst werden. Diese Überlegungen führten dazu, dass die Untersuchungen nach 1500 Mutanten eingestellt wurden.

#### **IV.4. Physiologische Charakterisierung mechanosensitiver**

##### **Kanäle bei *H. elongata***

Auf der Basis physiologischer Untersuchungen konnte die Vermutung erhärtet werden, dass *H. elongata* mechanosensitive Kanäle besitzt. Ein erster Hinweis darauf war bereits durch die Fähigkeit des Organismus gegeben, bei einem hypoosmotischen Schock die kompatiblen Solute rasch freizusetzen [Sauer & Galinski 1998]. Andere Mechanismen zur Ausschleusung kompatibler Solute - wie zum Beispiel spezialisierte Transportsysteme oder durch Signale (z.B. Ionen) gesteuerte Kanäle - wären ebenfalls denkbar. Da ein hypoosmotischer Schock je nach Stärke eine sehr schnelle Reaktion erfordert, sind vergleichsweise langsame Prozesse wie aktiver Transport jedoch eher unwahrscheinlich. Zudem besteht die Frage nach der Kontrolle des Transporters. Signale würden - so auch bei durch Signale gesteuerten Kanälen - eine zusätzliche Verzögerung bewirken. Eine Expression im Bedarfsfall ist sicherlich ebenfalls mit einem zu hohen Zeitbedarf für den Organismus verbunden.

Zyklen von Wachstum unter hyperosmotischen Bedingungen gefolgt von hypoosmotischen Schocks werden in einem von Sauer & Galinski [1998] entwickelten Verfahren, dem Bakterienmelken, zur großtechnischen Produktion kompatibler Solute genutzt, ohne dass der eigentliche Mechanismus der Freisetzung bekannt ist. Die Identifikation des Mechanismus ist für die Produktion nicht notwendigerweise von Interesse, eine anderweitige Nutzung des Mechanismus ist jedoch vorstellbar. Ein auf mechanosensitiven Kanälen beruhendes System könnte *H. elongata* als Expressionssystem für kleine Proteine interessant machen. Bereits von Berrier et al. [1992] wurde vorgeschlagen, dass der Verlust kleiner cytoplasmatischer Proteine

auf deren Durchtritt durch mechanosensitive Kanäle zurückzuführen ist. Eine Überexpression kleinerer Proteine unter Salzstress würde mit gleichzeitiger Produktion des Schutzstoffes Ectoin [vergleiche I.3] erfolgen. Bei einem hypoosmotischen Schock würden nach der Produktion Produkt und Solut parallel kontrolliert ausgeschleust, ein kontinuierliches Verfahren ähnlich dem Bakterienmelken wäre vorstellbar. Parallel zur Suche nach für Msc's codierenden Genen bei *H. elongata* wurde daher eine physiologische Charakterisierung der Msc's angestrebt.

Ein erster Ansatz für diesen Nachweis waren elektrophysiologische Messungen. Dieser Ansatz war besonders daher interessant, weil aus der gemessenen Leitfähigkeit die Größe einer möglichen Kanalpore zu extrapolieren ist [Martinac 2001]. Eine direkte Umsetzung der für *E. coli* beschriebenen Methoden erwies sich allerdings als nicht durchführbar, die Protokolle [II.4.14] zur Erzeugung von Riesenliposomen [Ishidate et al. 1986, Berrier et al. 1989] und Riesensphäroplasten [Martinac et al. 1987] mussten modifiziert werden. Auch die elektrophysiologischen Messungen an sich erwiesen sich als problematisch, so dass die Ergebnisse wenig befriedigend waren. Lediglich eine nicht reproduzierte Messung deutet auf mindestens einen Typ mechanosensitiver Kanal hin, dessen Leitfähigkeit und damit Porengröße in der Größenordnung von *E. coli* MscL liegen könnte. Messungen an *H. elongata* Riesenliposomen erwiesen sich insgesamt als erfolgversprechender während Messungen an Riesensphäroplasten sämtlich ohne Ergebnis blieben.

Wie sich in dieser Arbeit gezeigt hat, sind die auf *E. coli* Membranen optimierten Versuchsbedingungen für die an Medien höherer Salinität angepasste Membran von *H. elongata* ungeeignet. Nur etwas mehr als 10% der Riesensphäroplasten waren unter den gegebenen Bedingungen stabil, der Rest lysierte sofort bei Kontakt mit der Patch-Pipette. Vermutlich ist für die Stabilität der Zellmembran ein höherer Salzgehalt notwendig, der auch in natürlichen Habitaten des Organismus vorliegt. Dies steht allerdings im Widerspruch zu einem einwandfreien Funktionieren und Genauigkeit der Patch-clamp Methode, die möglichst geringe Salzkonzentrationen in den Messpuffern erfordern.

Sehr starke Hinweise auf die Existenz mechanosensitiver Kanäle in der Membran von *H. elongata* ergeben sich aus dem Verhalten des Organismus bei einem hypoosmotischen Schock. Die Annäherung an die Phänomenologie eines hypoosmotischen Schocks erfolgte aus drei Richtungen. Zunächst einmal existiert mit *E. coli* ein gut charakterisiertes Modellsystem. Nicht nur der Organismus an sich ist bestens beschrieben, sondern auch die *E. coli* Msc's.

Zudem existieren Mutanten, denen einer oder mehrere der Msc's fehlen [Levina et al. 1999]. Als zweites existiert mit *M. halophilus* ein Organismus, der nicht melkbar ist und der demzufolge vermutlich keine Msc's besitzt [Galinski et al., unveröffentlicht]. Drittens sind die Msc's durch dreiwertige Metallionen, insbesondere Gadolinium [Berrier et al. 1989, Ruffert et al. 1999] oder toxische Peptide [Oswald et al. 2002] zu blockieren. Damit ist der Verlust mechanosensitiver Kanäle simulierbar, wenn eine entsprechende genetische Manipulation nicht möglich ist. Gadolinium hat im Gegensatz zu Peptiden den Nachteil, dass es nicht spezifisch die Msc's verschließt sondern die mechanischen Eigenschaften der Membran soweit verändert dass eine Übertragung der mechanischen Spannung auf die Msc's verhindert wird [Berrier et al. 1992]. Wie aus patch-clamp Untersuchungen [Berrier et al. 1989, Ruffert et al. 1999] und der Messung ausgeschleuster Metabolite [Berrier et al. 1992, Ruffert et al. 1997] bekannt ist, ist die Blockade der Msc's im Konzentrationsbereich von 1 mM  $Gd^{3+}$  allerdings vollständig. Es konnte gezeigt werden, dass dies eine Konzentration ist, die das Wachstumsverhalten von *H. elongata* zwar geringfügig stört aber keinesfalls letal für den Organismus ist.

Bei einem Vergleich der drei Organismen miteinander zeigt *H. elongata* nach einem hypoosmotischen Schock ein Verhalten, das dem von *E. coli* deutlich ähnlicher ist als dem von *M. halophilus*. Selbst extreme hypoosmotische Schocks vom oberen Bereich der tolerierten Salinität (20% w/v) in destilliertes Wasser hinein werden von einer *H. elongata* Population zu annähernd 100% überlebt. Eine *M. halophilus* Population hingegen erleidet bereits unter weniger drastischen Bedingungen signifikante Verluste. Aufgrund der geringeren Salztoleranz sind mit *E. coli* keine derartig extremen Schocks durchzuführen, eine Population überlebt jedoch einen Schock von Salinitäten am oberen Toleranzbereich (5% w/v) in destilliertes Wasser hinein nahezu vollständig. Die Verhältnisse kehren sich im gewissen Rahmen um, wenn die hypoosmotischen Schocks in Gegenwart von Gadolinium durchgeführt werden. Die Überlebensrate ist bei allen drei Organismen nach einem hypoosmotischen Schock in Gegenwart von  $Gd^{3+}$  signifikant geringer als ohne Zusätze im Medium. Bei *H. elongata* fällt der Einfluss von Gadolinium auf die Überlebensrate jedoch deutlich stärker ins Gewicht als bei *E. coli*.

Auch bei der Betrachtung der Soluttfreisetzung zeigen sich Unterschiede zwischen *H. elongata* und *M. halophilus*. *M. halophilus* behält, sofern er nicht lysiert, im Rahmen der experimentellen Genauigkeit sämtliche Solute zurück. Dies wurde bereits von Frings et al. [1995b] beobachtet, wobei dort mit weniger drastischen osmotischen Schocks gearbeitet

wurde. Allerdings wurden von Frings et al. Zellen aus der stationären Phase eingesetzt, die Hydroxyectoin als einziges Solut enthielten.

Tab. IV.1: Solutgehalt von *M. halophilus* aufgeschlüsselt nach Ectoin und Hydroxyectoin sowie Überlebensrate unter verschiedenen hypoosmotischen Schocks [diese Arbeit]. Die relativen Mengen an Ectoin und Hydroxyectoin beziehen sich auf die Menge des einzelnen Solutes die in der Trockenbiomasse nachgewiesen werden konnte. Die Menge an Soluten insgesamt beschreibt die Summe der Stoffmengen von Hydroxyectoin und Ectoin.

Salinität des Austauschmediums	Überlebensrate	Menge Solute in der TBM		
		Ectoin	Hydroxyectoin	Solute gesamt
10 % NaCl	100 %	100 %	100 %	100 %
5 % NaCl	95 % ± 10 %	90 % ± 9 %	95 % ± 10 %	93 % ± 9 %
0 % NaCl	73 % ± 7 %	73 % ± 7 %	82 % ± 8 %	79 % ± 8 %

Eine Aufschlüsselung der Solute, die vor und nach einem osmotischen Schock in der Trockenbiomasse nachzuweisen sind [diese Arbeit] deutet eine leicht höhere Durchlässigkeit der Zellmembran für Ectoin bei einem hypoosmotischen Schock. Dies deckt sich mit jüngsten Beobachtungen von Galinski et al. [Bonn, unveröffentlicht]. Allerdings sind angesichts der Größe des Messfehlers diese Daten nicht sehr aussagekräftig.

Im Gegensatz zu dem bei *M. halophilus* beobachteten Rückhalten der Solute setzt *H. elongata* in Abhängigkeit von der Stärke des hypoosmotischen Schocks kompatible Solute frei. Hieran lässt sich am deutlichsten ablesen, dass *H. elongata* analog *E. coli* mechanosensitive Kanäle besitzt, *M. halophilus* hingegen nicht.

#### **IV.5. Entwicklung von degenerierten Primern zur Amplifikation der Gene mechanosensitiver Kanäle von *H. elongata***

Die Identifikation von Genen über degenerierte Primer ist eine verbreitete Methode. Dabei wird zum einen von einer bekannten Aminosäuresequenz ausgehend mit degenerierten Primern am Genom des entsprechenden Organismus gearbeitet [z.B. Antonopoulos et al. 2003]. Zum anderen werden über Betrachtungen der Proteinfamilien konservierte Aminosäuresequenzen identifiziert [z.B. Pirae & Vining 2002]. In beiden Fällen dient eine Aminosäuresequenz als Vorlage für die zu entwerfenden Primer. Die eigentliche Problematik liegt im Design der Primersequenz [Linhart & Shamir 2002], da zwar jedem Codon eindeutig eine Aminosäure zugeordnet ist, umgekehrt aber jede Aminosäure durch bis zu sechs Basen-Triplets codiert wird.

Die in dieser Arbeit eingesetzten degenerierten Primer wurden nach konservierten Sequenzbereichen der Sequenzfamilien der mechanosensitiven Kanäle vom Typ MscL und MscS entworfen [vergleiche III.1.3]. Da unter den betrachteten Sequenzen keine ausreichend langen Bereiche mit identischer Sequenz zu finden waren, kam zu der Problematik der mehrdeutigen Basenpositionen noch die der mehrdeutigen Aminosäurepositionen hinzu. Es wurde daher anhand der Aminosäure- und Codonhäufigkeit ein Kompromiss gesucht, um die Zahl der degenerierten Positionen im Primer soweit zu beschränken, dass die Zahl der möglichen spezifischen Bindungen für ein Primerpaar auf 256 ( $2^8$ ) beschränkt wurde. Zusätzlich wurde durch die Methode der Touchdown-PCR die Spezifität der Primerbindung herabgesetzt, um das Spektrum der PCR-Produkte soweit zu erweitern, dass auch Gene von Msc's erfasst werden, die nicht komplett mit der gefundenen Aminosäure-Konsensussequenz übereinstimmen.

Alle PCR-Produkte, die von der Länge her in der erwarteten Größenordnung lagen, wurden kloniert und sequenziert. Es wurde jedoch keines gefunden, das einen offenen Leserahmen aufwies, der für einen mechanosensitiven Kanal eines bekannten Typs codiert. Unter den möglichen Genprodukten befanden sich fast ausnahmslos Membranproteine, was den Verdacht nahe legt, dass von den Primern ein für Membranproteine typisches Motiv erkannt wird. Dies nicht überraschend, da der transmembrane Bereiche zum Entwurf der Primer benutzt wurden. Allerdings wurde darauf geachtet, dass mindestens einer der Primer einen Sequenzbereich abdeckt, der für die Funktionalität der Msc's wesentlich ist. Zumindest von dieser Seite her war eine höhere Spezifität zu erwarten. Die Sequenzbereiche von *H. elongata nhaD*, an denen die degenerierten Primer HRCLF2 und HRCLR2 gebunden haben, weisen allerdings weder auf Aminosäure- noch auf DNA-Ebene ausreichende Homologien auf, die erklären, warum die Primer ausgerechnet dort gebunden haben.

Für den mangelnde Erfolg der Methode lassen sich drei Erklärungsansätze finden:

Zunächst einmal könnte es sein, dass *H. elongata* keine mechanosensitiven Kanäle besitzt. Angesichts der eindeutigen Hinweise aus physiologischen Experimenten ist diese Erklärung jedoch höchst unwahrscheinlich. Als zweites könnte es sein, dass die mechanosensitiven Kanäle von *H. elongata* in ihrer Aminosäuresequenz wesentlich von den betrachteten Msc's abweichen. Die Diversität der für den Sequenzvergleich betrachteten Organismen spricht allerdings gegen diese Theorie.

Die wahrscheinlichste Ursache für den mangelnden Erfolg liegt in der Wahl der betrachteten Aminosäuresequenzen. Sie entstammen sowohl gram-positiven als auch gram-negativen

Organismen. Bei einer Beschränkung des Sequenzvergleichs auf gram-negative Organismen, zu denen auch *H. elongata* gehört, erhält man deutlich größere konservierte Sequenzbereiche bei MscL und MscS [vergleiche Abb. III.1A *E. coli*, *Ew. carotovora* und *Pm. fluorescens* sowie III.1B *E. coli* und *Ew. ictaluri*]. Unter dieser Voraussetzung ist es auch möglich, spezifischere degenerierte Primer zu entwickeln. Eine Wiederholung der Experimente mit diesen Primern erscheint sinnvoll.

## IV.6. Natrium/Protonen Antiporter mariner Organismen

Nach *Vibrio parahaemolyticus* [Nozaki et al. 1998], *Vibrio cholerae* [Dzioba et al. 2002] und dem metallreduzierenden *Shewanella oneidensis* [Heidelberg et al. 2003] ist *Halomonas elongata* der dritte Organismus für den ein Natrium/Protonen-Antiporter vom Typ NhaD beschrieben wird. Bei einer Datenbanksuche mit BLAST werden Sequenzen hypothetischer Proteine aus weiteren Organismen mit großer Homologie zu *H. elongata* NhaD gefunden: *Magnetococcus* sp. [Datenbankeintrag NZ\_AAAN01000309], *Microbulbifer degradans* [NZ\_AAAT 01000003] und *Rhodobacter sphaeroides* [NZ\_AAEE01000153]. Zusätzlich konnte in dem Lake Bogoria Isolat 25B1 eine DNA Sequenz identifiziert werden, die aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls für ein zu NhaD homologes Protein codiert. Bei allen diesen Organismen handelt es sich um marine Spezies. Organismen nicht-marinen Ursprungs oder höhere Organismen weisen in den verfügbaren Datenbanken keine Einträge von Proteinsequenzen mit signifikanten Homologien zu den beschriebenen NhaD auf. Natrium/Protonen-Antiporter der Typen NhaA (auch NapA) und NhaB finden sich in nahezu allen Bakterien. Sie bilden vermutlich die Basis für die pH- und Na<sup>+</sup>-Homöostase [Padan 2001]. Zu Antiportern vom Typ NhaC liegen noch keine ausreichenden Daten vor, um Aussagen über eine Korrelation mit Umweltbedingungen oder Besonderheiten im Stoffwechsel zu erlauben. Möglicherweise handelt es sich also bei NhaD um ein speziell von marinen Bakterien exprimiertes Protein. Interessanterweise zeigt sich bei den meisten marinen Bakterien eine weitere Gemeinsamkeit: sie benötigen für ein Wachstum der Population eine minimale Salinität in der Größenordnung von 1% bis 2% (w/v).

Herz et al. [2003] konnten nachweisen, dass für die Ausprägung der vollständigen Bandbreite der Na<sup>+</sup>- und Li<sup>+</sup>-Resistenz des humanpathogenen *V. cholerae* mehrere Antiporter (NhaA, NhaB, NhaC und NhaD) und eine an eine NADH-Quinon-oxidoreduktase gekoppelte Na<sup>+</sup>-Pumpe NQR notwendig sind. Der Verlust einzelner Elemente dieses komplexen Mechanismus kann teilweise durch die anderen Bausteine kompensiert werden. Daher ist es nicht weiter erstaunlich, dass eine *H. elongata* Mutante die nur einen verkürzten NhaD exprimiert keinen ausgeprägten Phänotyp zeigt. Bei der beschriebenen Mutante ist allerdings zusätzlich zu bedenken, dass die Mutation sehr nahe am C-Terminus liegt. Nach jüngsten Erkenntnissen [Ostroumov et al. 2002] liegen für die Funktionalität von *V. cholerae* NhaD wesentliche Residuen im Mittleren Bereich der Aminosäuresequenz.

### IV.7. Regulation der Expression von *H. elongata nhaD*

Ein wesentlicher Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression liegt in der Initiation der Transkription. Aus der RNA-Polymerase und einem Sigma-Faktor muss zunächst das RNA-Polymerase-Holoenzym ( $R\sigma$ ) gebildet werden. Erst dann ist die Erkennung einer entsprechenden Promotorsequenz möglich, und das Holoenzym kann an die DNA binden. Verschiedene Sigma-Faktoren sichern zum einen die Expression essentieller Gene (*Housekeeping*-Promotoren), ermöglichen aber auch eine Antwort auf wechselnde Umweltbedingungen (Stress- oder spezielle *Heatshock*-Promotoren).

Tabelle IV.2: hypothetische Promotorregionen zu *H. elongata nhaD* [diese Arbeit], *V. parahaemolyticus nhaD* [nach Nozaki et al. 1998] und Consensussequenzen bei *E. coli* sowie der von Göller [1999] gefundene  $\sigma 70$  abhängige Promotor vor *ectA* und der von Bestvater [2001] bestimmte Promotor vor *M. halophilus ectA* Kleine Buchstaben markieren Bereiche in denen die hypothetischen Promotorregionen nicht mit den Consensussequenzen übereinstimmen.

Promotor	Organismus	-35 Region	Spacer	-10 Region
$\sigma 70$ hypothetisch	<i>H. elongata</i>	aTGACg	18	TAgAAT
$\sigma 70$ <i>ectA</i>	<i>H. elongata</i>	TTGAaA	18	TATgAT
$\sigma 70$ <i>ectA</i>	<i>M. halophilus</i>	TTGAaA	18	TATAgT
$\sigma 70$ Consensus	<i>E. coli</i>	TTGACA	16-18	TATAAT
$\sigma 70$ hypothetisch	<i>V. parahaemolyticus</i>	cTctCA	17	TATAtT
$\sigma 70$ hypothetisch	<i>V. parahaemolyticus</i>	TTtgCA	15	ctTAAT
<i>rpoH</i> hypothetisch	<i>H. elongata</i>	tcGAAA	15	gCaATaT
<i>rpoH</i> Consensus	<i>E. coli</i>	CTGAAA	11-16	CCCATnT

Anhand der für *H. elongata* bestimmten DNA-Sequenz konnten vor der für *NhaD* codierenden Region zwei mögliche Promotorregionen bestimmt werden. Dazu wurde zunächst die Promotorsuche für Prokaryoten NNPP (neural network procaryotic promoter) über SEARCHLAUNCHER gestartet [<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>] und die ermittelten Sequenzen nach dem Übersichtsartikel von Wösten [1998] analysiert. Beide Quellen basieren auf Promotorsammlungen von *E. coli*, da vergleichbare Datenbanken für halophile Organismen nicht existieren. Zur Bestimmung der Promotoreregionen konnte jedoch auch der von Göller [1999] identifizierte  $\sigma 70$  abhängige Promotor vor *ectA* herangezogen werden.

Eine der hypothetischen *H. elongata* Promotorregionen weist starke Übereinstimmungen mit der Consensussequenz  $\sigma 70$ -abhängiger Promotoren auf [Harley & Reynolds 1987].  $\sigma 70$  (*RpoD*) zählt zu den primären Sigma-Faktoren, die die Expression der für das Überleben der

Bakterien essentiellen Gene kontrollieren. Auch zu der bereits für *H. elongata* beschriebenen Consensussequenz sowie zu der vor *M. halophilus ectA* gefundenen Sequenz [Bestvater 2001] bestehen starke Übereinstimmungen. Im Gegensatz dazu weisen beide von Nozaki et al. [1998] postulierten Promotorregionen vor *V. parahaemolyticus nhaD* nur geringe Ähnlichkeit zu den *H. elongata* Sequenzen auf, obwohl es sich, wie bei *M. halophilus*, um einen Organismus marinen Ursprungs handelt. Die für *V. parahaemolyticus* vorgeschlagenen Promotorregionen weisen in der -35 Region allerdings auch nur geringe Ähnlichkeiten mit der *E. coli* Consensussequenz auf.

Für eine mögliche Osmoregulation oder eine Regulation durch  $\text{Na}^+$ -induzierten Stress [Karpel et al. 1991] sind neben primären Sigma-Faktoren solche der Stressantwort in Betracht zu ziehen. In *E. coli* erfolgt die Vermittlung der allgemeinen Stressantwort durch  $\sigma\text{S}$  [Loewen & Hengge-Aronis 1994]. Die osmotische Regulation der Expression dieses Sigma-Faktors und die Stabilität des RNA-Polymerase Holoenzym  $\text{R}\sigma\text{S}$  unterliegt posttranslationaler Kontrolle [Muffler et al. 1996]. Eine Consensussequenz für  $\sigma\text{S}$  konnte in der bestimmten *H. elongata* Sequenz nicht identifiziert werden, allerdings werden in *E. coli* auch  $\sigma 70$  abhängige Promotoren von  $\sigma\text{S}$  erkannt [Tanaka et al. 1993]. Stattdessen wurde in dieser Arbeit ein Motiv gefunden, das der Consensussequenz  $\sigma 32(\text{rpoH})$ -abhängiger Promotoren ähnliches. Dies ist ein Sigma-Faktor, der in *E. coli* für die Regulation der Hitzeschock-Antwort verantwortlich ist. Die Transkriptionskontrolle von *rpoH* selbst erfolgt wiederum durch einen  $\sigma\text{S}$ - und drei  $\sigma 70$ -abhängige Promotoren [Arsène et al. 2000].

Während zwei mögliche  $\sigma 70$ -abhängige Promotoren auch für *V. parahaemolyticus nhaD* beschrieben wurden [Nozaki et al. 1998], fehlt dort jedoch der Hinweis auf eine Regulation durch einen stressaktivierten Promotor.

Bei Expressionsstudien wurde für *H. elongata* gefunden, dass die Expression von *nhaD* mindestens zwei Mechanismen folgt. In einer ausgewachsenen Kultur (stationäre Phase) wurde *nhaD* konstitutiv exprimiert. Nach einem Medienwechsel erfolgte zunächst eine rasche Anpassung an die neue Salinität: Eine hypersaline Umgebung führte zu einer Hochregulierung der Expression, bei gleicher Salinität und in einer hyposalinen Umgebung blieb das Expressionsniveau konstant. Diese kurzfristige (10 Minuten) Anpassung hat in der Kultur mit hypersalinem Medium zu einer Erhöhung des Expressionsniveaus um das 4,5-fache geführt. Nach Beginn des exponentiellen Wachstums (sichtbar nach 30 Minuten) wurde das Expressionsniveau bei Kulturen in Medien aller Salinitäten auf unter 10% des Anfangswertes wieder herunterreguliert. Ein „gearbox“-Promotor [Vicente et al. 1991, Göller 1999], der diese verminderte Expression bei hohen Wachstumsraten erklären würde, konnte

allerdings nicht identifiziert werden. Es ist jedoch zu überlegen, in wie weit 16S rRNA als Standard geeignet ist, wenn unterschiedliche Wachstumszustände einer Zellpopulation zu vergleichen sind. Von Nierlich [1972, 1972b] wurde bereits beschrieben, dass sich die Menge an rRNA und tRNA gegenüber der Menge an mRNA zunächst erhöht, sobald eine Bakterienpopulation in nährstoffreicheres Medium (frisches Medium) überführt wird. Bei Erreichen einer konstanten Wachstumsrate stellt sich wieder das ursprüngliche Mengenverhältnis ein. Während des exponentiellen Wachstums einer Kultur wurde zudem eine um das bis zu fünffache erhöhte Menge an rRNA in den Zellen nachgewiesen [Kjeldgaard 1961]. Unter diesen Gesichtspunkten sind kleinere beobachtete Änderungen in dem Expressionsmuster von *nhaD* sicherlich nicht mehr relevant. Der bei einer Erhöhung der Salinität beobachtete Anstieg des Expressionsniveaus ist jedoch immer noch als signifikant zu erachten. Exakte Zahlen über die Menge gebildeter *nhaD* mRNA lassen sich anhand der vorliegenden Daten jedoch keine Aussagen treffen.

Expressionsstudien und Sequenzanalyse weisen darauf hin, dass die Expression von *H. elongata nhaD* unter doppelter Kontrolle steht. Langfristige Anpassung und konstitutive Expression von *nhaD* werden durch einen  $\sigma 70$  abhängigen Promotor reguliert. Die spontane Antwort auf einen osmotischen Schock oder eine erhöhte  $\text{Na}^+$ -Konzentration [Karpel et al. 1991] erfolgt hingegen unter der Kontrolle eines stressaktivierten Promotors.

Eine derartige doppelte Kontrolle der Expression ist gerade im Bereich der Osmoregulation nicht ungewöhnlich. Für *H. elongata ectA* wurde ebenfalls ein möglicher zweifacher Promotor beschrieben [Göller 1999], der unter Kontrolle von  $\sigma 70$  und  $\sigma S$  steht. *E. coli nhaA* ist ein Beispiel für die duale Regulation der Expression eines Natrium/Protonen-Antiporters [Dover & Padan 2001] durch  $\sigma 70$  und  $\sigma S$ . Ein ähnliches Motiv wurde von Bestvater [2001] für die Ectoingene von *M. halophilus* gefunden. Konstitutive Expression erfolgt dort über einen  $\sigma A$ -abhängigen Promotor und die Antwort auf hyperosmotischen Stress durch Regulation mit  $\sigma B$ . Weitere Beispiele finden sich bei Krüger et al [1996] und Hecker & Völker [1998].

## **IV.8. Kompensation des Verlustes von *E. coli nhaA* durch *H. elongata nhaD***

*E. coli* wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um die Funktionalität von Natrium/Protonen-Antiportern verschiedener Organismen nachzuweisen. Beispiele hierfür sind *Vibrio cholerae* NhaD [Dzioba et al. 2002], ein pH regulierter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter aus *Methanococcus janaschii* [Hellmer 2002], *Bacillus subtilis* NhaG [Gouda 2002] und die  $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ -Antiporter von *Synechocystis* [Inaba et al. 2001]. Aus den Darstellungen der Methodik ist dabei nicht ersichtlich, unter der Kontrolle welcher Promotoren die Expression des jeweiligen Antiporters stattgefunden hat.

Wie schon beschrieben erfolgt die Regulation der Expression von *H. elongata nhaD* durch einen Promotor mit komplexem Aufbau. Von den *H. elongata* Ectoingenen wird ebenfalls vermutet, dass ihre Expression unter der Kontrolle mehrerer Promotoren steht. Dort ergaben sich bereits bei verschiedenen Versuchen, die Expression in *E. coli* unter Kontrolle von *H. elongata* Promotoren durchzuführen, Schwierigkeiten. Zusätzlich ergibt sich bei einer osmotisch regulierten Expression das Problem, dass sich nicht zwischen Effekten unterscheiden lässt, die auf die Expression an sich oder Umweltbedingungen zurückzuführen sind, und solchen, die auf einer regulationsbedingt unterschiedlich starken Expression beruhen. Daher wurde in dieser Arbeit auf eine Verwendung des *H. elongata* Promotorbereiches verzichtet. Stattdessen wurde die für NhaD codierende Sequenz in dem Vektor pUC18 hinter dem *lac*-Promotor anstelle des dort eigentlich befindliche *lacI<sup>q</sup>*-Gens eingefügt.

Auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* XL1-Blue, der noch beide *E. coli*-eigenen Antiporter besitzt, hatte die Anwesenheit des Expressionsvektors pUCHelNhaD eher einen negativen Einfluß. Bei niedriger Salinität zeigten sich zwar höhere Wachstumsraten, die Kulturdichte war jedoch deutlich geringer als bei einem Organismus, der nur den leeren pUC18 Vektor trug. Bei höheren Salinitäten waren sowohl Wachstumsrate als auch Kulturdichte signifikant niedriger, wenn der Antiporter exprimiert wurde.

Man muss sich an diesem Punkt sicher die Frage nach der Kompatibilität von *E. coli* und dem Antiporter eines halophilen Organismus stellen. Auffällig ist hierbei, dass in keiner der oben genannten Expressionsstudien ein transfizierter *E. coli* diskutiert wird, der *zusätzlich* zu allen eigenen Natrium/Protonen-Antiportern den eines anderen Organismus exprimiert. Es wurde auch keine publizierte Arbeit gefunden, in der versucht wurde, die Salztoleranz eines *E. coli* Wildtyps durch Expression fremder Nha's zu erhöhen. Die Problematik hierbei ist sicherlich,

dass die *E. coli* eigenen Antiporter in Regulation und Funktion optimal aufeinander abgestimmt sind [Padan et al. 2001]. Jeder Eingriff stört dieses System und ist damit zunächst einmal potentiell negativ für den Organismus. Unter bestimmten Umweltbedingungen ist sicher eine Verbesserung der Anpassung des Organismus möglich, unter den gegebenen Versuchsbedingungen war dies sicher nicht der Fall.

Für *E. coli* NM81, bei dem das Gen für NhaA deletiert ist, ist das Bild uneinheitlich. Bei niedriger Salinität ist das Wachstumsverhalten unabhängig von NhaD. Einer der mit dem Expressionsvektor pUCHelNhaD transformierten Klone zeigt jedoch bei höherer Salinität eine deutlich höhere Wachstumsrate als der mit pUC18 transfizierte Stamm (Kontrolle). Bei einer zusätzlichen Induktion mit IPTG wird zudem eine nahezu doppelte Zelldichte in der Kultur erreicht. Andere mit pUCHelNhaD transformierte Klone zeigen bei höherer Salinität kein Wachstum oder geringere Wachstumsraten und Kulturdichten. Auch die sehr hohe Varianz der Ergebnisse überrascht.

Hier stellt sich sicherlich die Frage nach der Qualität des Expressionsvektors. Die Konstruktion erfolgte durch Amplifikation des Gens mit der *proofreading Pwo*-DNA-Polymerase und Einklonierung des Fragmentes in pUC18 nach geeignetem Restriktionsverdau. Aufgrund der verwendeten Polymerase sollte das PCR-Produkt weitgehend fehlerfrei sein. Gegenüber einer Standard *Taq*-DNA-Polymerase mit einer Fehlerrate von  $10^{-4}$  besitzt eine *proofreading*-DNA-Polymerase, z.B. aus *Pyrococcus wosei* (*Pwo*), eine Fehlerrate in der Größenordnung  $10^{-5}$  oder besser. Bei einer Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes von 1500 bp würde statistisch nach 6,5 Amplifikationszyklen ein falsches Nukleotid in den neuen DNA-Strang eingebaut. Nach 26 Zyklen ergäben sich *statistisch* maximal 4 fehlerhafte Nukleotide je neu synthetisiertem Strang. Damit ist sicherlich zu erwarten, dass bei der Expression in verschiedenen Transformanden Phänotypen zu beobachten sind. Vier verschiedene Phänotypen bei den ersten vier untersuchten Transformanden sind allerdings extrem unwahrscheinlich.

Eine Sequenzierung der Expressionsvektoren, auf die bislang aus Zeit- und Kostengründen verzichtet wurde, ist zur Klärung des Phänomens unerlässlich. Bis dahin kann nur spekuliert werden, ob die Qualität der *Pwo*-DNA-Polymerase nicht den gewünschten Anforderungen entsprach und damit die Konstrukte mit einer hohen Zahl von Fehlern behaftet sind, was die unterschiedlichen Phänotypen erklären würde. Je nach Art der Mutationen liegt hier allerdings auch ein Ansatz, um die Bedeutung einzelner Aminosäuren oder ganzer Domänen von NhaD für die Funktion des Antiporters zu erkennen.

## IV.9. Ausblick

Die auf dem Eindringen von Fluoreszenzfarbstoffen beruhende Methode ist grundsätzlich zur Detektion von Zellpopulationen, die ihre Membranintegrität ganz oder teilweise eingebüßt haben, geeignet. Voruntersuchungen an *E. coli* und *H. elongata* haben gezeigt, dass auch eine geringe Anzahl defekter Zellen ein detektierbares Signal anzeigt. Damit wurde ein gegenüber kommerziell erhältlichen Differentialfärbemethoden deutlich preiswerteres aber immer noch empfindliches und einfach zu handhabendes Testsystem zu einer Screeningmethode mit hohem Durchsatz weiterentwickelt. Für das spezielle Problem der Detektion von Mutanten mit einem Defekt an mechanosensitiven Kanälen bleibt zu überlegen, ob die Methode geeignet ist und ob die Methode gegebenenfalls besser an die Problemstellung angepasst werden kann. Andernfalls sind andere Herangehensweisen in Betracht zu ziehen.

Mit einer aktuell etablierten *H. elongata* Genbank [Kunte et al., Bonn, unveröffentlicht] könnte sich die Suche nach den für mechanosensitive Kanäle codierenden Genen drastisch vereinfachen. Die beschriebenen *E. coli* Msc-Deletionsmutanten könnten mit der Genbank transformiert werden und die Transformanten auf eine Kompensation des Verlustes der Msc's getestet werden. Der größte Vorteil dieser Methode liegt sicherlich in der positiven Selektion. Durch eine Serie von Anzuchten unter hoher Salinität und hypoosmotischen Schocks werden Transformanten angereichert, die eine höhere Überlebensrate unter Schockbedingungen haben, vornehmlich also solche, die einen Msc exprimieren. Damit wird natürlich vorausgesetzt, dass die Expression eines *H. elongata* Msc in *E. coli* gelingt. Wie bereits von Göller [1999] für die Ectoinogene gezeigt, ist eine Expression der *H. elongata* Gene unter Kontrolle des eigenen Promotors in *E. coli* nicht immer möglich. Hier liegt für diese spezielle Problematik auch die größte mögliche Fehlerquelle. Da für die Funktionalität eines Msc eine Doppellipidschicht ausreichend ist [Hamill & McBride 1997], sollte die Übertragung in einen anderen Organismus wenig problematisch sein.

Parallel zu dem Screening der Genbank erscheint eine Wiederholung der PCR mit degenerierten Primern sinnvoll. Eine Erhöhung der Spezifität wird möglicherweise durch eine Beschränkung auf das design nach Aminosäuresequenzen gram-negativer Bakterien erreicht [MscL: *E. coli*, *Ev. carotovora* und *Pm. fluorescens*; MscS: *E. coli* und *Ev. ictaluri*].

Eine Optimierung der elektrophysiologischen Messungen an *H. elongata* Riesensphäroplasten oder an in Riesenliposomen rekonstituierten Membranfragmenten des Organismus erscheint

ebenfalls wünschenswert. Hier liegt ein weiteres Potential für den physiologischen Nachweis von Msc's. Außerdem kann über die ermittelte Leitfähigkeit die Porengröße eines Msc abgeschätzt werden. Auch bei Vorliegen von Röntgenstrukturdaten liegt darin die einzige Möglichkeit, die Übereinstimmung eines Strukturmodells mit der Situation *in vivo* zu korrelieren. Eine Lösung für dieses Problem könnte die Anzucht von *H. elongata* unter einer minimalen Salzkonzentration sein, da auch die Zellmembran an die Salinität angepasst wird. Dies ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn der Organismus auch unter suboptimalen Wachstumsbedingungen am unteren Salinitätsbereich Msc's exprimiert. Bisherige Untersuchungen an *E. coli* sprechen jedoch dafür, dass Msc's konstitutiv exprimiert werden.

Die vier bisher charakterisierten Natrium/Protonen-Antiporter vom Typ NhaD wurden ausschließlich in marinen Bakterien gefunden: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Shewanella oneidensis* und *Halomonas elongata*. Zusätzlich ist das Fragment eines hypothetischen NhaD aus Lake Bogoria Isolat 25B1 bekannt. Weitere zu diesen NhaDs homologe Sequenzen sind als Datenbankeinträge zu finden. Es ist dort jedoch noch nicht geklärt, ob es sich tatsächlich um funktionelle Genprodukte handelt oder um funktionslose offene Leserahmen. Die zugehörigen Organismen sind ebenfalls Bakterien marinen Ursprungs. Ob es sich bei NhaD um einen für diese Organismen typischen Antiporter handelt ist daher eine berechtigte Frage. Zur ihrer Beantwortung ist eine genauere Charakterisierung aller verfügbaren Antiporter und ein Vergleich der physiologischen Daten erforderlich. Die nächsten anzustrebenden Ziele sind daher eine Bestimmung der vollständigen Sequenz des Lake Bogoria Isolat 25B1 *nhaD* sowie physiologische Untersuchungen an den NhaDs beider *Halomonadaceae*. Wie schon für andere Organismen gezeigt [Dzioba et al. 2002, Padan 1989] ist eine vollständige Deletion der Gene ist dabei ein möglicher Schritt um die physiologische Bedeutung des Antiporters für die Salztoleranz von *H. elongata* oder LBI 25B1 zu klären.

Die offensichtlich durch mehrere Mechanismen regulierte Expression von *H. elongata nhaD* ist sicherlich auf eine komplexe Promotorstruktur zurückzuführen. Inwieweit es sich bei den zur bekannten  $\sigma 70$ - und *rpoH*-Consensussequenz ähnlichen Sequenzen tatsächlich um Promotorelemente handelt, ist beispielsweise über Reporterstudien zu klären. Eine in dieser Hinsicht bewährte Methode beruht auf der Verwendung des aus der Qualle *Aequorea victoria* isolierten grün-fluoreszierenden Proteins GFP [Chalfie et al. 1994].

---

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Existenz eines offenen Leserahmens entgegen der Leserichtung von *nhaD*. Beide Sequenzen überlappen zu mehr als der Hälfte. Die Aminosäuresequenz des hypothetischen Proteins ist zum Teil konserviert, es existiert bislang allerdings noch kein charakterisiertes Protein mit homologer Sequenz. *Upstream* des offenen Leserahmens existiert eine der  $\sigma_{54}$ -Consensussequenz ähnliche Region. Eine gegenläufige Codierung unterschiedlicher Proteine auf parallelen DNA-Strängen ist bekannt [Omer 1988], für Bakterien jedoch eher ungewöhnlich. Sollte sich bei einer näheren Untersuchung dieses Phänomens herausstellen, dass es sich hier tatsächlich um ein funktionierendes Operon handelt, ergibt sich die Frage nach der Funktion des hypothetischen Genprodukts. Insbesondere wäre es interessant, falls das Genprodukt in die Osmoregulation involviert ist.

Verschiedentlich wird der Zusammenhang zwischen der Salztoleranz von Pflanzen und der Expression von Natrium/Protonen-Antiportern diskutiert [Apse 1999, Blumwald 2000, Gimmler 2000]. Sollte es gelingen durch eine Mutation die Salztoleranz [Zhang & Blumwald 2001] oder auch die Resistenz gegen Trockenheit bei Nutzpflanzen zu erhöhen, ergeben sich vielseitige Möglichkeiten in der Urbarmachung von Trockengebieten und der Versorgung der dortigen Bevölkerung mit Nahrungsmitteln. Ein möglichst breites Verständnis der Funktion von Natrium/Protonen-Antiportern ist daher ein allgemein erstrebenswertes Ziel.



## V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gibt einen Einblick in die Antwort des halophilen Eubakteriums *Halomonas elongata* auf einen Wechsel von osmotischen Verhältnissen und Salinität in der Umgebung. Vergleichende Untersuchungen an dem Lake Bogoria Isolat 25B1 und *Marinococcus halophilus* haben auch bei diesen Organismen zu neuen Erkenntnissen geführt.

- Auf physiologischer Ebene konnten die Vermutungen erhärtet werden, dass *Halomonas elongata* mechanosensitive Kanäle besitzt. Bei vergleichenden Untersuchungen an *E. coli*, dessen mechanosensitive Kanäle bestens charakterisiert sind, zeigten sich signifikante Ähnlichkeiten in der Fähigkeit, einen hypoosmotischen Schock zu überleben. Die von der Stärke des Schocks abhängige Freisetzung kompatibler Solute und elektrophysiologische Untersuchungen lieferten weitere Hinweise.
- Anhand vergleichender Untersuchungen konnte für *M. halophilus* dargestellt werden, dass dieser Organismus *keine* mechanosensitiven Kanäle besitzt. Die Fähigkeit einen hypoosmotischen Schock zu überleben wird hier durch die höhere Stabilität der Zellwand mitbestimmt.
- Die Charakterisierung der für *H. elongata* vorhergesagten mechanosensitiven Kanäle auf genetischer Ebene gelang nicht.
- Allerdings konnte während der Arbeiten an dieser Problemstellung ein etabliertes Verfahren zum Nachweis cytotoxischer Verbindungen weiterentwickelt werden. Für weitere Untersuchungen steht nun eine auf Fluoreszenzmessungen beruhende Screeningmethode zur Verfügung, die Aussagen über die Membranintegrität einer Zellpopulation ermöglicht. Die Funktionalität der Methode konnte an *E. coli* Mutanten demonstriert werden.
- *H. elongata nhaD* konnte einschließlich weiterer Sequenzabschnitte *upstream* und *downstream* vollständig sequenziert werden. In den Bereichen *upstream* des offenen Leserahmens konnten zwei hypothetische Promotorregionen identifiziert werden. In Einklang mit der Promotoranalyse konnte anhand von Expressionsstudien nachgewiesen werden, dass die Expression von *H. elongata nhaD* einer dualen

- Kontrolle unterliegt. Eine langfristige Kontrolle der Expression erfolgt durch einen  $\sigma 70$ -abhängigen Promotor. Die kurzfristige Anpassungen an eine geänderte Salinität in der Umgebung wird durch einen *rpoH*-abhängigen Promotor reguliert.
- *H. elongata* NhaD hat, möglicherweise aus Kompatibilitätsgründen, einen negativen Einfluß auf das Wachstumsverhalten eines *E. coli* Stammes der noch alle eigenen Natrium/Protonen-Antiporter besitzt. Bei Untersuchungen an dem Antiporter-defizienten Stamm NM81 hat sich gezeigt, dass *H. elongata* NhaD in der Lage ist, den Verlust von *E. coli* NhaA teilweise zu kompensieren. Damit ist auch physiologisch der Nachweis erbracht, dass es sich bei der gefundenen Sequenz um ein funktionelles Gen handelt, das für einen Natrium/Protonen-Antiporter codiert.
  - Mit dem Lake Bogoria Isolat 25B1 konnte in einem weiteren Organismus eine Sequenz identifiziert werden, die möglicherweise für ein Fragment eines Natrium/Protonen-Antiporters vom Typ NhaD codiert. Beim Vergleich mit weiteren in Datenbanken abgelegten Sequenzen stellte sich heraus, dass neben den bekannten NhaDs weitere NhaD ähnliche Sequenzen für verschiedene weitere marine Bakterien zu finden sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei NhaD um einen Antiporter handelt, der speziell von marinen Organismen exprimiert wird.

## **Quellenverzeichnis**

Adams R.L. & Russel N.J.

**Interactive effects of salt concentration and temperature on growth and liquid composition in the moderate halophilic bacterium *Vibrio costicola*.**

Can J Microbiol, Vol 38, pp. 823-827 (1992)

Ajouz B., Berrier C., Besnard M., Martinac B., Ghazi A.

**Contributions of different extramembraneous domains of the mechanosensitive ion channel MscL to its response to membrane tension**

J Biol Chem, Vol.275, pp.1015-1022 (2000)

Anderson A.W., Nordan H.C., Cain R.F., Parrish G., Duggan D.

**Studies on a radioresistant *Micrococcus*. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation.**

Food Technol, Vol.10, pp. 575-577 (1956)

Antonopoulos D.A., Aminov R.I., Duncan P.A., White B.A., Mackie R.I., Tarro G.

**Characterization of the gene encoding glutamate dehydrogenase ( *gdhA*) from the ruminal bacterium *Ruminococcus flavefaciens* FD-1**

Arch Microbiol, Vol.179, pp.184-190 (2003)

Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E.

**Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis***

Science, Vol.285, pp.1256-1258 (1999)

Arana I., Pocino M., Muela A., Fernández-Astorga A., Barcina I.

**Detection and enumeration of viable but non-culturable transconjugants of *Escherichia coli* during the survival of recipient cells in river water**

J Appl Microbiol, Vol.83, pp.340-346 (1997)

Arakawa T. & Timasheff S.N.

**Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions**

Arch Biochem Biophys, Vol.224, pp.169-177 (1983)

Arsène F., Tomoyasu T., Bukau B.

**The heat shock response of *E. coli***

Int J Food Microbiol, Vol.55, pp.3-9 (2000)

Atsumi T., McCarter L., Imae Y.

**Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion motive forces**

Nature, Vol.355, pp.182-184 (1992)

Bailey S.M. & Meagher M.M.

**Crossflow microfiltration of recombinant *Escherichia coli* lysates after high pressure homogenization**

Biotechnol Bioeng, Vol.56, pp.304-310 (1997)

Berrier C., Coulombe A., Houssin C., Ghazi A.

**A patch clamp study of inner and outer Membranes and of contact zones of *E. coli*, fused into giant liposomes. Pressure-activated chanelns are localized in the inner membrane**

FEBS Lett, Vol.259, pp.27-32 (1989)

Berrier C., Coulombe A., Szabó I., Zoratti M., Ghazi A.

**Gadolinium inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria**

Eur J Biochem, Vol.206, pp.559-565 (1992)

Berrier C., Besnard M., Ajouz B., Coulombe A., Ghazi A.

**Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure**

J Memb Biol, Vol.151, pp.157-187 (1996)

Berrier C., Coulombe A., Houssin C., Ghazi A.

**A patch-clamp study of ion channels of inner and outer membranes and of contact zones of *E. coli*, fused into giant liposomes**

FEBS Lett, Vol.259, pp.27-32 (1989)

Bertioli D.J., Burrows P.R.

**A simple RACE method based on CTAB precipitation**

Meth Mol Cell Biol, Vol.5, pp.118-121 (1995)

Bestvater T.

**Regulation der Ectoin-Biosynthese-Gene in *Marinococcus halophilus* und bei rekombinanter Expression in *Escherichia coli***

Dissertation, Westfälische Willhelms-Universität Münster (2001)

Biggin P.C. & Sansom M.S.P.

**Channel gating: Twist to open**

Curr Biol, Vol.11, pp.R364-R366 (2001)

**Biotechnology of Extremophiles, first meeting on**, Tagungsband, Hamburg-Haarburg

In the framework of the Biotech programme of the Commission of the European

Communities 2-6 May 1993

Bligh E.G. & Dyer W.J.

**A rapid method of lipid extraction and purification**

Can J Biochem Physiol, Vol.37, pp.911-917 (1959)

Blumwald E

**Sodium transport and salt tolerance in plants**

Curr Opin Cell Biol, Vol.12, pp.431-434 (2000)

Booth I.R.

**Regulation of cytoplasmic pH in Bacteria**

Microbiol Rev, Vol.49, pp.359-378 (1985)

- Brehm P., Kullberg R., Moody-Corbet F.  
**Properties of non-junctional acetylcholine receptor channels on innervated muscle of *Xenopus laevis***  
J Physiol, Vol.350, pp.631-648 (1984)
- Brennan R.G., Saier M.H. & Paulsen I.T., Nikaido H., Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A., van Veen H.W., Hrycyna C.A., Sharom F.J., Liu R., Qu Q., Romsicki Y.  
**Multidrug Resistance**  
Sem Cell Dev Biol, Vol.12, pp.201-204 (2001)
- Brenner S., Stretton A.O., Kaplan S.  
**Genetic code: the 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression**  
Nature, Vol.206, pp.994-998 (1965)
- Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J.  
**Biology of microorganisms**, 7<sup>th</sup> ed.  
Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA (1994)
- Brown A.A.  
**Microbial water stress**  
Bact Rev, Vol.40, pp.803-846 (1976)
- Browne W.W.  
**Halophilic bacteria**  
Proc Soc Exp Biol Med, Vol.19, pp.321-322 (1922)
- Bünger J.  
**Neue Wirkstoffklasse schützt und pflegt die Haut**  
Parfümerie und Kosmetik, Vol.79, pp.32-35 (1998)
- Bünger J.  
**Ectoine added protection and care for the skin**  
Eurocosm, Vol.7, pp.22-24 (1999)
- Bullock A.D., Fernandez, J.M., Short J.M.  
**XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-Galactosidase selection**  
BioTechniques, Vol.5, pp.376-378 (1987)
- Burnstock G. & Wood J.N.  
**Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission**  
Curr Opin Neurobiol, Vol.6, pp.526-532 (1996)
- Busa W.B. & Nuccitelli R.  
**Metabolic regulation via intracellular pH**  
Am J Physiol, Vol.260, pp.R403-R409 (1984)
- Caldas T., Demont-Caulet N., Ghazi A., Richarme G  
**Thermoprotection by glycine betaine and choline**  
Microbiol, Vol. 145, pp.2543-2548 (1999)

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C.  
**Green fluorescent protein as marker for gene expression**  
Science, Vol.263, pp.802-805

Chapleau M.W.  
**Cardiovascular mechanoreceptors**  
Advan Compar Environ Physiol, Vol10, pp.138-164 (1992)

Chang G., Spencer R.H., Lee A., Barclay M.T., Rees D.C.  
**Structure of the MscL Homolog from Mycobacterium tuberculosis: A Gated Mechanosensitive Ion Channel**  
Science, Vol.282, pp.2220-2226 (1998)

Chen C.C., Tsuchiya T., Yamane Y., Wood J.M., Wilson T.H.  
**Na<sup>+</sup>(Li<sup>+</sup>)-proline cotransport in *Escherichia coli***  
J Membr Biol, Vol.84, pp.157-164 (1985)

Clegg J.S., Seitz P., Seitz W., Hazelwood C.F.  
**Cellular response to extreme water loss: the water replacement hypothesis**  
Cryobiol, Vol.19, pp.306-316 (1982)

Costa, da M.S., Santos H., Galinski E.A.  
**An Overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea**  
Adv Biochem Engineer Biotech, Vol.61, pp. 117-153 (1998)

Criado M. & Keller B.U.  
**A membrane fusion strategy for single- channel recordings of membranes usually non-accessible to patch-clamp pipette electrodes.**  
FEBS Lett, Vol.224, pp.172-176 (1987)

Csonka L.N. & Epstein W.  
**Osmoregulation**  
In: Neidhardt et al. (eds.): *Escherichia Coli and Salmonella Tryphimurium*, Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> ed., Chapter 77  
ASM, Washington, DC (1996)

Dalgaard P., Ross T., Kampermann L., Neumeyer K., McMeekin T.A.  
**Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data**  
Int J Food Microbiol, Vol.23, pp.391-404 (1994)

Delcour A.H., Martinac B., Adler J., Kung C.  
**Modified reconstitution method used in patch-clamp studies of *Escherichia coli* ion channels**  
Biophys J, Vol.56, pp.631-635 (1989)

Detweiler P.B.  
**Sensory transduction**  
In: Patton H.D. et al. (eds.): *Textbook of Physiology: Excitable Cells and Neurophysiology*, Saunders Company (1989), pp. 98-129

Duckworth A.W., Grant W.D., Jones B.E., Mejer D., Marquez M.C., Ventosa A.  
***Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas* from a soda lake of the east African rift valley**  
Extremophiles, Vol.4, pp.53-60 (2000)

Duncan R.L. & Turner C.H.  
**Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain**  
Calcif Tissue Int, Vol.57, pp.344-358 (1995)

Dobson S.J. & Franzmann P.D.  
**Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al 1983), *Halomonas* (Vreeland et al 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae***  
Int J Syst Bacteriol, Vol.46, pp.550-558 (1996)

Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R.  
**The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity**  
Science, Vol.280, pp.69-77 (1998)

Dover N. & Padan E.  
**Transcription of *nhaD*, the main Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli*, is regulated by Na<sup>+</sup> and growth phase**  
J Bacteriol, Vol.183, pp.644-653 (2001)

Dzioba J., Ostroumov E., Winogrodzki A., Dibrov P.  
**Cloning, functional expression in *Escherichia coli* and primary characterization of a new Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, *NhaD*, of *Vibrio cholerae***  
Mol Cell Biochem, Vol.229, pp.119-124 (2002)

Frings E.  
**Kompatible Solute ausgewählter halotoleranter und halophiler *Firmicutes*: Isolierung, identifizierung und Produktion**  
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn (1995)

Frings E., Sauer T., Galinski E.A.  
**Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52**  
J Biotechnol, Vol.43, pp.53-61 (1995b)

Galinski, E.A., Pfeiffer, H.P., Trüper, H.G.  
**1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidine-carboxylic acid: a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira***  
European J Biochem, Vol.149, pp.135-139 (1985).

Galinski E.A.  
**Salzadaption durch kompatible Solute bei halophilen phototrophen Bakterien.**  
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn (1986)

Galinski E.A.

**Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection**

Experimentia, Vol.48, pp.487-496 (1993)

Galinski E.A.

**Osmoadaptation in Bacteria**

Adv Microb Phys, Vol.37, pp.273-328 (1995)

Galinski E.A., Bestvater T., Kurz M., Voß P.

**Ectoines: Protection of proteins and other benefits**

International Conference on Halophilic Microorganisms / Sevilla (2001)

Garcia-Añoveres J. & Corey D.P.

**The molecules of mechanosensation**

Ann Rev Neurosci, Vol.20, pp.567-594 (1997)

Gimmler H.

**Primary sodium plasma membrane ATPases in salt-tolerant algae: facts and fictions.**

J Exp Bot, Vol.51, pp.1171-1178 (2000)

Göller K., Ofer A., Galinski E.A.

**Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis**

Fems Microbiology Letters, Vol.161, pp.293-300 (1998)

Göller K.

**Identifizierung und Charakterisierung des Ectoin-Genclusters in *Halomonas elongata***

Dissertation, Rheinische Friedrich-Willhelms-Universität Bonn (1999)

Gottlieb R.A., Gruol D.L., Zhu J.Y., Engler R.L.

**Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of vacuolar proton ATPase and apoptosis**

J Clin Invest, Vol.97, pp.2391-2398 (1996)

Gouda T., Kuroda M., Hiramatsu T., Nozaki K., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T.

**nhaG Na(+)/H(+) antiporter gene of *Bacillus subtilis* ATCC9372, which is missing in the complete genome sequence of strain 168, and properties of the antiporter.**

J Biochem (Tokyo), Vol.130, pp.711-717 (2001)

Guharay F. & Sachs F.

**Stretch activated single ion channel currents in tissue cultured embryonic chick skeletal muscle**

J Physiol, Vol.352, pp.685-701 (1984)

Hackney C.M. & Furness D.N.

**Mechanotransduction in vertebrate hair cells: Structure and function of the stereociliary bundle**

Am J Physiol, Vol. 268, pp.C1-C13 (1995)

Häse C.C., LeDain A.C., Martinac B.

**Purification and functional reconstitution of the recombinant large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli***

J Biol Chem, Vol.270, pp.18329-334 (1995)

Hama H., Shimamoto T., Tsuda M., Tsuchiya T.

**Properties of a Na<sup>+</sup>-coupled serine-threonine transport system in *Escherichia coli***

BBA, Vol.905, pp.231-239 (1987)

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J.

**Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches**

Pflügers Arch, Vol. 391, pp.85-100 (1981)

Hamill O.P. & McBride D.W.

**The pharmacology of mechanogated membrane ion channels**

Pharmacol Rev, Vol.48, pp.231-252 (1996)

Hamill O.P. & McBride D.W.

**Induced Membrane hypo/hyper-mechanosensitivity: a limitation of patch-clamp recording**

Ann Rev Physiol, Vol.59, pp.621-631 (1997)

Hanahan D.

**Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids**

J Mol Biol, Vol.166, pp.557-580 (1983)

Harley C.B., Reynolds R.P.

**Analysis of *E. coli* promoter Sequences**

Nucl Acids Res, Vol.15, pp.2343-2361 (1987)

Heidelberg J.F., Paulsen I.T., Nelson K.E., Gaidos E.J., Nelson W.C., Read T.D., Eisen J.A., Seshadri R., Ward N., Methe B., Clayton R.A., Meyer T., Tsapin A., Scott J., Beanan M., Brinkac L., Daugherty S., DeBoy R.T., Dodson R.J., Durkin A.S., Haft D.H., Kolonay J.F., Madupu R., Peterson J.D., Umayam L.A., White O., Wolf A.M., Vamathevan J., Weidman J., Impraim M., Lee K., Berry K., Lee C., Mueller J., Khouri H., Gill J., Utterback T.R., McDonald L.A., Feldblyum T.V., Smith H.O., Venter J.C., Nealson K.H., Fraser C.M.

**Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis***

Nat Biotechnol, Vol.20, pp.1118-1123 (2002)

Hellmer J., Patzold R., Zeilinger C.

**Identification of a pH regulated Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> antiporter of *Methanococcus jannaschii***

FEBS Lett, Vol.527, pp.245-249 (2002)

Herz K., Vimont S., Padan E., Berche P.

**Roles of NhaA, NhaB, and NhaD Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in survival of *Vibrio cholerae* in a saline environment**

J Bacteriol, Vol.185, pp.1236-1244 (2003)

Horikoshi K.

***Alkaliphiles: Some applications of their products for Biotechnologie***

Mmbr, Vol.63, pp.735-750 (1999)

Hough D.W. & Danson M.J.

**The structural basis of halophilicity**

Comp Biochem Physiol, Vol.117A, pp.307-312 (1997)

Hough D.W. & Danson M.J.

**Extremozymes**

Curr Opin Chem Biol, Vol.3, pp.39-46 (1999)

Howard J., Roberts W.M., Hudspeth A.J.

**Mechanoelectrical transduction by hair cells**

Ann Rev Biophys Chem, Vol.17, pp.99-124 (1988)

Isfort R.J., Cody D.B., Asquith T.N., Ridder G.M., Stuard S.B., LeBoeuf R.A.

**Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction**

Eur J Biochem, Vol.213, pp.349-357 (1993)

Ishidate K., Creeger E.S., Zrike J., Deb S., Glauner B., MacAlister T.J., Rothfield L.I.

**Isolation of differentiated membrane domains from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, including a fraction containing attachment sites between the inner and outer membranes and the murein skeleton of the cell envelope**

J Biol Chem, Vol.261, , pp.428-443 (1986)

Ivey D.M., Guffanti A.A., Zemsky J., Pinner E., Karpel R., Padan E., Schuldiner S., Krulwich T.A.

**Cloning and characterization of a putative  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter-deficient strains by the overexpressed gene**

J Biol Chem, Vol.268, pp.11296-303 (1993)

Ivey D.M., Guffanti A.A., Bossewitch J.S., Padan E., Krulwich T.A.

**Molecular cloning and sequencing of a gene from alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 that functionally complements an *Escherichia coli* strain carrying a deletion in the *nhaA*  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter gene**

J Biol Chem, Vol.266, pp.23483-23489 (1993b)

Jaenicke R.

**Stability and stabilization of globular proteins in solution.**

J Biotech, Vol.79, pp.193-203 (2000)

Jebbar M., von Blohm C., Bremer E.

**Ectoine functions as a osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via ABC-transport system OpuC**

Fems Microbiol Let, Vol.154, pp.325-330 (1997)

Kaprelyants A.S. & Kell D.B.

**Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry**

J Appl Bacteriol, Vol.72, pp.410-422 (1992)

Karla K.

**Haloalkaliphile denitrifizierende Halomonas-Arten in anaerober Hochzelldichtekultur: Auswege aus dem Problem der Nitrithemmung**

Dissertation, Westfälische Willhelms-Universität Münster (2000)

Karla K.

**Untersuchungen zur Trockenstabilisierung von *Vibrio fischeri* durch kompatible Solute**

Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Willhelms-Universität Bonn (1997)

Karpel R., Olami Y., Taglicht D., Schuldiner S., Padan E.

**Sequencing of the gene *ant* which affects the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity in *Escherichia coli***

J Biol Chem, Vol.236, pp.10408-10414 (1988)

Kellerman K.F.

**Micrococci causing red deterioration of salted codfish**

Centralbl Bact II Abt, Vol.42, pp.398-402 (1915)

Kjeldgaard N.O.

**The kinetics of ribonucleic acid- and protein formation in *Salmonella typhimurium* during the transition between different states of balanced growth**

Biochim Biophys Acta, Vol.49, pp.64-76 (1961)

Kloda A. & Martinac B.

**Identification of a mechanosensitive channel in *Archaea***

Biophys J, Vol.80, pp.229-240 (2001)

Knapp S., Ladenstein R., Galinski E.A.

**Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes b-hydroxyectoine and betaine**

Extremophiles, Vol.3, pp.191-198 (1999)

Ko R., Smith L.T., Smith G.

**Glycine Betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes***

J Bacteriol, Vol.176, pp.426-431 (1994)

Koch A.L.

**Growth measurement.**

In: Gerhard, P. et al. (eds), **Manual of Methods for general Bacteriology**, pp.179-207  
American Society for Microbiology, Washington, DC (1981)

Koichi M., Mitsuhiro M., Tatsuno N., Yoshio S.

**Production of tetrahydropyrimidine derivatives.**

Jp. Appl. 01-163483 (1991)

Kunte H.J. & Galinski E.A.

**Transposon mutagenesis in halophilic eubacteria: conjugal transfer and insertion of transposon Tn5 and Tn1732 in *Halomonas elongata***

Fems Microbiol Lett, Vol.128, pp.293-299 (1995)

Larsen P.I., Sydnes L.K., Landfald B., Strøm A.R.

**Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid and trehalose**

Arch Microbiol, Vol.147, pp.1-7 (1987)

Le Dain A.C., Saint N., Kloda A., Ghazi A., Martinac B.

**Mechanosensitive ion channels of the archaeon *Haloflex volcanii***

J Biol Chem, Vol.273, pp.12116-119 (1998)

Lee C.P. & RajBhandary U.L.

**Mutants of *Escherichia coli* initiator tRNA that suppress amber codons in *Saccharomyces cerevisiae* and are aminoacylated with tyrosine by yeast extracts.**

Proc Natl Acad Sci USA, Vol.88, pp.11378-11382 (1991)

Lengeler J.W., Drews G., Schlegel H.G.

**Biology of the prokaryotes**

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1999)

Levina N., Töttemeyer S., Stokes N.R., Louis P., Jonas M.A., Booth I.R.

**Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity**

EMBO J, Vol.18, pp.1730-1737 (1999)

Lewis K.

**Multidrug resistance Pumps in bacteria: variations on a theme**

Trends Bio Sci, Vol.19, pp.119-123 (1994)

Linhart C. & Shamir R.

**The degenerate primer design problem.**

Bioinformatics, Vol.18, pp.172-181 (2002)

Litchfield C.

**Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on Mars**

Meteorit Plan Sci, Vol. 33, pp. 813-819 (1998)

Lippert K. & Galinski E.A.

**Enzyme Stabilization by ectoine-type compatible solutes: Protection against heating, freezing and drying**

Appl Microbiol Biotech, Vol. 37, pp. 61-65 (1992)

Liu Y. & Bolen D.W.

**The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes**

Biochemistry, Vol.34, pp.12884 - 12891 (1995)

Lloyd D. & Hayes A.J.

**Vigour, vitality and viability of microorganisms**

FEMS Microbiol Let, Vol.133, pp.1-7 (1995)

Loewen P.C. & Hengge-Aronis R.

**The role of the sigma factor  $\sigma^S$  (KatF) in bacterial global regulation**

Ann Rev Microbiol, Vol. 44, pp.707-710 (1994)

Madigan M.T. & Oren A.

**Thermophilic and halophilic extremophiles.**

Curr opin Microbiol, Vol.2, pp.265-269 (1999)

Markin V.S. & Martinac B.

**Mechanosensitive ion channels as reporters of bilayer expansion. A theoretical model**

Biophys J, Vol.60, pp.1120-1127 (1991)

Martinac B., Buechner M., Delcour A.H., Adler J., Kung C.

**Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli***

Proc Natl Acad Sci USA, Vol.84, pp.2297-2301 (1987)

Martinac B., Adler J., Kung C.

**Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths**

Nature 1990, Vol.384, pp.261-263 (1990)

Martinac B.

**Mechanosensitive Channels in Prokaryotes**

Cell Physiol Biochem, Vol.11, pp.61-76 (2001)

Maurer J. A., Elmore D. E., Lester H. A., Dougherty D. A.

**Comparing and contrasting *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* mechanosensitive channels (MscL) - New gain of function mutations in the loop region**

J Biol Chem, Vol.275, pp.22238-22244 (2000)

McConkey D.J. & Orrenius S.

**Signal transduction pathways in apoptosis**

Stem Cells, Vol.14, pp.619-631 (1996)

Moe P.C., Blount P., Kung C.

**Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation**

Mol Microbiol, Vol.28, pp.583-592 (1998)

Moe P.C., Levin G., Blount P.

**Correlating a protein structure with function of a bacterial mechanosensitive channel**

J Biol Chem, Vol. 275, pp.31121-31127 (2000)

Morris C.E.

**Mechanosensitive ion channels**

J Membr Biol, Vol.113, pp.93-107 (1990)

Mufler A., Traulsen D.D., Lange R., Hengge-Aronis R.

**Posttranscriptional osmotic regulation of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli***

J Bacteriol, Vol.178, pp.1607-1613

Nichol J.A. & Hutter O.F.

**Tensile strength and dilatational elasticity of giant sarcolemmal vesicles shed from rabbit muscle**

J Physiol, Vol.493, pp. 187-198 (1996)

Nierlich D.P.

**Regulation of ribonucleic acid synthesis in growing bacterial cells. I. Control over the total rate of RNA synthesis**

J Mol Biol, Vol.72, pp.751-64 (1972)

Nierlich D.P.

**Regulation of ribonucleic acid synthesis in growing bacterial cells. II. Control over the composition of the newly made RNA**

J Mol Biol, Vol.72, pp.765-77 (1972b)

Norlander J., Kempe T., Messing J.

**Construction of improved M13 cloning vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis**

Gene, Vol.26, pp.101-106 (1983)

Novitsky T.J. & Kushner D.J.

***Plantococcus halophilus* sp. nov., a facultatively halophilic coccus**

Int J Syst Bacteriol, Vol.26, pp. 53-57 (1976)

Nozaki K., Kuroda T., Mitsushima T., Tsuchiya T.

**A new  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter, NhaD, of *Vibrio parahaemolyticus***

BBA, Vol.1369, pp.213-20 (1998)

Omer A.D., Lowe T.M., Russel A.G., Ebhardt H., Eddy S.R., Dennis P.P.

**Supplemental material for "homologs of small nucleolar RNAs in archaea"**

Science, Vol.288, pp.517-522 (2000)

Orchard C.H. & Kentish J.C.

**Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle**

Am J Physiol, Vol.258, pp.C967-C981 (1990)

Oren A.

**Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius***

Can J Microbiol, Vol.32, pp.4-9 (1986)

Oren A.

**Bioenergetic aspects of halophilism**

Microbiol Mol Biol, Vol.63, pp.334-348 (1999)

- Ostroumov E., Dzioba J., Loewen P.C., Dibrov P.  
**Asp(344) and Thr(345) are critical for cation exchange mediated by NhaD, Na(+)/H(+) antiporter of *Vibrio cholerae***  
Biochim Biophys Acta, Vol.1564, pp. 99-106 (2002)
- Oswald R.E., Suchyna T.M., McFeeters R., Gottlieb P., Sachs F.  
**Solution structure of peptide toxins that block mechanosensitive ion channels**  
J Biol Chem, Vol.277, pp.34443-34450 (2002)
- Padan E., Maisler N., Taglicht D., Karpel R., Schuldiner S.  
**Deletion of ant in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter system(s)**  
J Biol Chem, Vol.264, pp. 20297-302 (1989)
- Padan E. & Schuldiner S.  
**Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters, molecular devices that couple the Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> circulation in cells**  
J Bioenerg Biomembr, Vol.25, pp.647-669 (1993)
- Padan E. & Schuldiner S.  
**Molecular physiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters, key transporters in circulation of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> in cells**  
BBA Bioenergetics Vol.1185, pp.129-151 (1994)
- Padan E.  
In: A. Oren (ed.): **Microbiology and Biochemistry of hypersaline Environments**  
CRC Press, Boca Raton, FL, pp.163-175 (1998)
- Padan E., Venturi M., Gerchman Y., Dover N.  
**Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters**  
BBA , Vol.1505, pp.144-157 (2001)
- Peter H., Burkovski A., Krämer R.  
***Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing and characterization of the proline/ectoine uptake system ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier EctP**  
J Bacteriol 180 6005-6012 (1998)
- Pinner E., Padan E., Schuldiner S.  
**Cloning, sequencing and expression of the NhaB gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Escherichia coli***  
J Biol Chem, Vol.267, pp.11064-11068 (1992)
- Pinner E., Kotler Y., Padan E., Schuldiner S.  
**Physiological role of NhaB, a specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *E. coli***  
J Biol Chem, Vol.268, pp.1729-1734 (1993)
- Pirae M., Vining L.C.  
**Use of degenerate primers and touchdown PCR to amplify a halogenase gene fragment from *Streptomyces venezuelae* ISP5230.**  
J Ind Microbiol Biotechnol, Vol.29, pp.1-5 (2002)

Poolman B. & Glasker E.

**Regulation of compatible solute accumulation in bacteria**

Mol Microbiol, Vol.29, pp.397-407 (1998)

Prentki P. & Krisch H.M.

***In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment***

Gene, Vol.29, pp.303-313 (1984)

Pucéat M.

**pH<sub>i</sub> regulatory ion transporters: an update on structure, regulation and cell function**

Cell Mol Life Sci, Vol.55, pp.1216-1299 (1999)

Rees D.C., Ghang G., Spencer R.H.

**Crystallographic analyses of ion channels: Lessons and challenges**

J Biol Chem, Vol. 275, pp.713-716 (2000)

Richey B., Cayley D.S., Mossing M.C., Kolaka C., Anderson C.F., Farrar T.C., Record M.T.  
**Variability in the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*: differences between in vitro and in vivo effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression**

J Biol Chem, Vol.262, pp.7157-7164 (1987)

Ruffert S., Lambert C., Peter H., Wendisch V.F., Kramer R.

**Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity**

Eur J Biochem Vol.247, pp.572-580 (1997)

Ruffert S., Berrier C., Kramer R., Ghazi A

**Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum***

J Bacteriol, Vol.181, No.5, pp.167-76 (1999)

Sachs F. & Morris C.E.

**Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells**

Rev Physiol Biochem Pharmacol, Vol.132, pp.1-77 (1998)

Sackin H.

**Mechanosensitive channels**

Ann Rev Physiol, Vol.57, pp.333-353 (1995)

Sami M., Suzuki K., Sakamoto K., Kadokura H. Kitamo K., Yoda K.

**A plasmid pRH45 of *Lactobacillus brevis* confers hop resistance**

J Gen Appl Microbiol, Vol.44, pp.361-363 (1998)

Sauer T. & Galinski E.A.

**Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes**

Biotech Bioeng, Vol.57, pp.306-313 (1998)

- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A.  
**Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum***  
Gene, Vol. 145, pp.69-73 (1994)
- Schlegel H.G.  
**Allgemeine Mikrobiologie**  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1992)
- Severin J., Wohlfarth A., Galinski E.A.  
**The role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria**  
J Gen Microbiol, Vol.138, pp.1629-1638 (1992)
- Shine J. & Dalgarno L.  
**The 3'-terminal sequence of E. coli 16S-ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites**  
Proc Natl Acad Sci USA, Vol.71, pp.1342-1346 (1974)
- Simon R., Priefer U., Pühler A.  
**A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria**  
Bio/Technology, Vol.1, pp.784-791 (1983)
- Simon R., Quandt J., Klipp W.  
**New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria**  
Gene, Vol.80, pp.161-169 (1995)
- Speelmans G., Poolman B., Abee T., Konings W.N.  
**Energy transduction in the thermophilic anaerobic bacterium *Clostridium fervidus* is exclusively coupled to sodium-ions**  
Proc Natl Acad Sci USA, Vol.90, pp. 7975-7979 (1993)
- Sukharev S.I., Blount P., Martinac B., Kung C.  
**Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, proteins and activities**  
Ann Rev Physiol, Vol.59, pp.633-657 (1997)
- Sukharev S.I., Sigurdson W.J., Kung C., Sachs F.  
**Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL**  
J Gen Physiol, Vol.113, pp.523-539 (1999)
- Tanaka K., Takayanagi Y., Fujita N., Ishihama A., Takahashi H.  
**Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli***  
Proc Natl Acad Sci USA, Vol.90, pp.3511-3515 (1993)

Tesone S., Hughes A., Hurst A.

**Salt extends the upper temperature limit for growth of food-poisoning bacteria**

Can J Microbiol, Vol.27, pp. 970-972 (1981)

Tominaga T., Ishizaki T., Narumiya S., Barber D.L.

**Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading**

EMBO J, Vol.17, pp.4712-4722 (1998)

Tsuchiya T. & Wilson T.H.

**Cation-sugar cotransport in the melibiose transport system of *Escherichia coli***

Membr Biochem, Vol.2, pp.63-79 (1978)

Vicente M., Kushner S.R., Garrido T., Aldea M.

**The role of the 'gearbox' in the transcription of essential genes**

Mol Microbiol, Vol.5, pp.2085-2091 (1991)

Vázquez-Laslop N., Lee H., Hu R., Neyfakh A.A.

**Molecular Sieve Mechanism of Selective Release of Cytoplasmic Proteins by Osmotically Shocked *Escherichia coli***

J Bacteriol, Vol.183, pp.2399-2404 (2001)

Voss P.

**Synthese von kompatiblen Soluten mit ectoinanaloger Struktur und Charakterisierung des protektiven Effektes auf biochemische Modellsysteme und *Escherichia coli***

Dissertation, Westfälische Willhelms-Universität Münster (2002)

Vreeland R.H.

***The family Halomonadaceae***

In: M.P. Starr et al. (eds.), **The Prokaryotes**, 2<sup>nd</sup> ed., Chapter 167.

Springer Verlag Berlin (1980)

Vreeland R.H. & Martin E.L.

**Growth characteristics, effects of temperature and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongata***

Can J Microbiol, Vol.26, pp.746-752 (1980)

Vreeland R.H., Anderson R., Murray R.G.E.

**Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*.**

J Bacteriol Vol.160, pp.879-883 (1984)

Waser M., Hess-Bienz D., Davies K., and Solioz M.

**Cloning and disruption of a putative Na/H-antiporter gene of *Enterococcus hirae***

J Biol Chem, Vol.267, pp.5396-5400 (1992)

Wiggins P.M.

**Role of water in biological processes**

Microbiol Rev, Vol.54, pp.432-449 (1990)

Williams K.

**Three-dimensional Structure of the ion-coupled transport protein NhaA**

Nature, Vol.403, pp.112-115 (2000)

Wösten M.M.S.M.

**Eubacterial sigma-factors**

FEMS Microbiol Rev, Vol.22, pp.127-150 (1999)

Wohlfahrt A., Severin J., Galinski E.A.

**The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae***

J Gen Microbiol, Vol.136, pp.705-712 (1990)

Yamaguchi T., Fukada-Tanaka S., Inagaki Y., Saito N., Yonekura-Sakakibara K., Tanaka Y., Kusumi T., Iida S.

**Genes encoding the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and flower coloration**

Plant Cell Physiol, Vol.42, pp.451-461 (2001)

Yoshimura K., Batiza A., Schroeder M., Blount P., Kung C.

**Hydrophilicity of a single residue within MscL correlates with increased channel mechanosensitivity**

Biophys J, Vol.77, pp.1960-1972, (1999)

Yoshimura K., Ito K., Nakamura Y.

**Amber (UAG) suppressors affected in UGA/UAA-specific polypeptide release factor 2 of bacteria: genetic prediction of initial binding to ribosome preceding stop codon recognition**

Genes Cells, Vol.4, pp.253-266, (1999b)

Yun C.C.H., Tse C.-M., Nath S.K., Levine S.A., Brant S.R., Donowitz M.

**Mammalian Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family: structure and functional studies**

Am J Physiol, Vol.269, pp.G1-11 (1995)

Zhang H.X. & Blumwald E.

**Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruits**

Nature Biotechnol, Vol.19, pp.765-768 (2001)

## Internet Quellen

Astrobiologie:	<a href="http://astrobiology.arc.nasa.gov/overview.html">http://astrobiology.arc.nasa.gov/overview.html</a>
Codon-Verwendung:	<a href="http://www.kazusa.or.jp/codon/">http://www.kazusa.or.jp/codon/</a>
<i>Deinococcus radiodurans</i> :	<a href="http://deinococcus.allbio.org/">http://deinococcus.allbio.org/</a>
Multisequenz-Alignment:	<a href="http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html">http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html</a>
Multisequenz-Alignment:	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>
NCBI Homepage:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Nukleinsäure- und Proteinsequenz-Analyse:	<a href="http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/">http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/</a>
Phylogenetischer Baum:	<a href="http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html">http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html</a>
Vergleich der Hydrophathie	<a href="http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/">http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/</a>

## **Danksagung**

Bei der Erstellung dieser Arbeit haben mich zahlreiche Menschen auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene unterstützt. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön aussprechen.

- Herrn Prof. Dr. E.A. Galinski danke ich für das interessante Thema dieser Arbeit, für das große Interesse an den Ergebnissen und meinen Fortschritten, interessante Diskussionen sowie für die Flexibilität auf neue Aspekte einzugehen, die sich im Verlauf der Arbeiten ergeben haben.
- Herrn Prof. Dr. H.-J. Galla danke ich für die Übernahme des Koreferates der Arbeit.
- Herrn Dr. J. Kunte (Bonn) danke ich für zahlreiche methodische und theoretische Hinweise sowie interessante Diskussionen.
- Frau Prof. Dr. E. Padan (Jerusalem), Herrn Dr. J. Kunte (Bonn) und Herrn Prof. Dr. I.A. Booth (Aberdeen) danke ich dafür, dass sie mir ohne Umstände Bakterienstämme für meine Arbeit zur Verfügung gestellt haben.
- Herrn Dr.-Ing. Wagner (Osnabrück) danke ich für die Möglichkeit, Patch-Clamp Messungen durchführen zu können.
- Bei meinem Arbeitskreis bedanke ich mich für ein einmaliges, stets fröhliches Arbeitsklima, zahlreiche Tipps, Ideen und Hilfestellungen.
- Auch der übrigen Institutsbelegschaft gilt mein Dank für ein gutes Betriebsklima und stetige Hilfsbereitschaft.
  
- Ein besonderes Dankeschön an all diejenigen, die mit Korrektur und Durchsicht dieser Arbeit zu deren Konsistenz und Fehlerfreiheit beigetragen haben.
  
- Meinen Eltern danke ich für mehr, als auf dieser Seite einen Platz fände.
- Meinen Freunden, besonders Ulrike, danke ich dafür, dass sie mich in schwierigen Situationen immer wieder aufgemuntert haben.
- Der *StimmBand* danke ich für viel Musik.
  
- Der DFG danke ich für das Doktorandenstipendium, das mir ermöglicht hat, meine Arbeiten im Rahmen des Graduiertenkollegs „Membranproteine“ durchzuführen.



## Lebenslauf



Name: Matthias Kurz

Geburtsdatum: 02.08.1970

Geburtsort: Dortmund

Familienstand: ledig

Name der Eltern: Werner und Renate Kurz, geb. Hohengarten

Schulbildung: St. Libori-Grundschule, Dortmund 1977-1981  
Stadtgymnasium Dortmund 1981-1990

Abitur: 28.05.1990

Grundwehrdienst: Sanitäter: PzAufklBtl 210 und InstKP 210  
Gfm Rommel Kaserne, Augustdorf, 1990 – 1991

Lehre: Mathematisch-technischer Assistent  
HOESCH AG, Dortmund, 1991-1994

Hochschulstudium: Biochemie (Diplom)  
Ruhr-Universität Bochum, 1994-1999

Diplomarbeit: „Elektronenspinresonanzspektroskopie von Bakteriorhodopsinmutanten  
unter Berücksichtigung von Spin-Spin-Wechselwirkungen“,  
Institut für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum

Abschluss: Diplom-Biochemiker 24.08.1999

Promotionstudiengang: Chemie  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, seit 10'1999

Dissertation: Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität  
Münster, unter Anleitung von Prof. Dr. E. A. Galinski, seit 10'1999

Stipendium: DFG-Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Membranproteine“ der  
Westfälischen Wilhelms Universität Münster, 10'1999 – 10'2002

Berufsbezogene Tätigkeiten: Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biophysik der Ruhr-  
Universität Bochum, 10'1998 - 12'1998  
  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie  
und Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-  
Universität Bonn seit 10'2002

