

Regulation der Genexpression in halophilen Archaea

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

eingereicht von
Michael Dambeck
aus Wiesbaden



Frankfurt am Main, 2010

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Soppa
Prof. Dr. Beatrix Süß

Datum der Disputation:

Aus der Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen:

Dambeck M, Soppa J. (2008). Characterization of a *Haloferax volcanii* member of the enolase superfamily: deletion mutant construction, expression analysis, and transcriptome comparison. *Arch Microbiol.* **190**(3):341-53.

Soppa J, Baumann A, Brenneis M, Dambeck M, Hering O, Lange C. (2008). Genomics and functional genomics with haloarchaea. *Arch Microbiol.* **190**(3):197-215.

Johnsen U, Dambeck M, Zaiss H, Fuhrer T, Soppa J, Sauer U, Schönheit P. (2009). D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem.* **284**(40):27290-303.

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Archaea – die dritte Domäne des Lebens	3
2.2	Modellorganismus <i>Haloferax volcanii</i>	5
2.3	Die Enolase Superfamilie	6
2.3.1	<i>iftA</i> – Ein Mitglied der Familie	6
2.3.2	„La superfamilia“	7
2.4	Die DNA-Architektur	7
2.4.1	DNA Wrapper	9
2.4.2	Archaeale Histone	9
2.4.3	Posttranslationale Modifikation von Histonen	10
2.4.4	Histon Acetyltransferasen (HATs)	11
2.4.5	Histon Deacetylasen (HDACs)	12
2.4.6	Was bisher geschah	13
2.5	Archaeale Motilität und Chemotaxis	14
2.5.1	Archaeale Flagellen	14
2.5.2	Chemotaxis	15
2.6	Zielsetzung	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Charakterisierung von <i>iftA</i>	18
3.1.1	<i>In silico</i> Analysen zur Funktionsaufklärung	18
3.1.2	<i>in frame</i> Deletionsmutante von <i>iftA</i>	20
3.1.3	Medium- und Wachstumsphasen-abhängige Expression von <i>iftA</i>	22
3.1.4	Untersuchung des Transkriptoms in Abhängigkeit von IftA	25
3.2	Genregulation durch Protein-Acetylierung/Deacetylierung	27
3.2.1	Charakterisierung der Histonmutanten	27
3.2.2	Transkriptom abhängig von Histonacetylierungen	28
3.2.2.1	Der Acetylierte Zustand	28
3.2.2.2	Der Deacetylierte Zustand	31
3.2.3	Transkriptom Analysen von Acetylase- und Deacetylase mutante	31
3.2.3.1	Das Pat1-abhängige Transkriptom	32
3.2.3.2	Das Sir2-abhängige Transkriptom	33
3.2.4	Sir2 – eine Klasse III Histondeacetylase (HDAC)	38
3.2.4.1	Transkription und Translation von Sir2	38

3.2.4.2	Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta sir2$	39
3.2.4.3	Das Flagellen Gencluster	44
3.2.5	Untersuchung der Chemotaxis in <i>H. volcanii</i>	45
3.2.5.1	„Chemical-in-plug“ Assay	45
3.2.5.2	Kapillar Assay	46
4	Diskussion	48
4.1.1	IftA und die Enolase Superfamilie	48
4.1.2	Proteinacetylierung/-deacetylierung und Histone	53
4.1.2.1	Sir2, Motilität und Chemotaxis – Theorie.....	58
4.1.2.2	Sir2, Motilität und Chemotaxis – ...und Praxis	60
4.1.2.3	Regulation der Transkription – Pat1, Sir2 und das Histon.....	63
5	Material und Methoden	64
5.1	Materialien.....	64
5.1.1	Laborgeräte.....	64
5.1.2	Chemikalien	65
5.1.3	Verbrauchsmaterialien	66
5.1.4	Enzyme.....	66
5.1.5	Antikörper	67
5.1.6	Größenstandards.....	67
5.1.7	System-Kits	67
5.1.8	Plasmide	68
5.1.9	Oligonukleotide.....	69
5.2	Organismen und Zellzucht.....	70
5.2.1	Organismen	70
5.2.2	Nährmedien und Zellkultivierung	71
5.2.3	Stammhaltung.....	74
5.2.4	Bestimmung der Zelldichte	75
5.2.5	Methoden zur Untersuchung der Chemotaxis.....	75
5.2.5.1	Allgemeine Vorbereitungen	75
5.2.5.2	„Chemical-in-Plug“ Methode.....	76
5.2.5.3	Kapillar Assay	76
5.3	Molekularbiologische Methoden.....	78
5.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	78
5.3.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>H. volcanii</i>	79
5.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>H. volcanii</i>	80

5.3.4	Reinigung von Nukleinsäuren	81
5.3.5	Phenol/Chloroform Extraktion	81
5.3.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	82
5.3.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Lösungen	82
5.3.8	Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Lösungen	83
5.3.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonuklease	84
5.3.10	Ligation	84
5.3.11	Dialyse von DNA Lösungen	84
5.3.12	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	85
5.3.13	Sequenzierung	86
5.3.14	Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Membranen (Northern Transfer)....	87
5.3.15	Hybridisierung und Chermolumineszenznachweis	88
5.3.16	Dnase-Behandlung von RNA	89
5.3.17	cDNA Synthese	90
5.3.18	quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)	90
5.3.19	Transformation von Mikroorganismen	91
5.4	Biochemische Methoden	94
5.4.1	Präzipitation von Proteinen aus Lösungen	94
5.4.2	Proteinbestimmung (BCA-Assay)	94
5.4.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	95
5.4.4	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Transfer)	97
5.4.5	Immunologische Detektion von Proteinen	98
5.4.6	Herstellung von Microarray-Kontrollen	100
5.4.7	Herstellung von DNA-Microarrays	101
5.4.8	Markierung von komplexen Proben durch cDNA-Erststrangsynthese	103
5.4.9	Hybridisierung auf DNA-Microarrays	104
5.4.10	Detektion	106
5.4.11	Quantifizierung der Signalintensitäten mit GenePix®	107
5.4.12	Auswertung der Hybridisierungsdaten	107
5.5	in silico: Programme, Datenbanken und Internetseiten	108
5.5.1	Programmierung einer eigenen Datenbank	109
6	Literaturverzeichnis	113
7	Anhang	125
7.1	Abkürzungsverzeichnis	125
7.2	Danksagung	129

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion ausgewählter Gene näher charakterisiert und ihr globaler Einfluß auf die Regulation der Genexpression untersucht. Im Fokus der Untersuchungen stand ein Gen, welches im Rahmen der Promotion von Alexander Zaigler in der Arbeitsgruppe Soppa (Universität Frankfurt) zunächst als Transkriptionsregulator ähnlich zu *rspA* aus *E. coli* identifiziert wurde. Zu Beginn dieser Arbeit konnte durch *in silico* Analysen das entsprechende Genprodukt zur Enolase Superfamilie (COG1441) zugeordnet werden. Mit Hilfe der „pop-in/pop-out“ Methode wurde das Gen in *H. volcanii* *in frame* deletiert und durch Wachstumsversuche, Northern- sowie Westernblot Analysen näher charakterisiert. Bei der Untersuchung des Wachstums konnte ein bemerkenswerter Phänotyp entdeckt werden: nur der Wechsel der Nährstoffquelle von reichhaltigen zu armen Bedingungen resultierte in einer dreitägigen Lagphase. Darüber hinaus wurde die Genexpression im Laufe eines Wachstumzyklus mittels Northern- und Westernblot Analysen bestimmt. Während das Transkript in reichhaltigem Medium nur transient expremiert wurde, wurde es in nährstoffarmen Bedingungen in allen Wachstumsphasen sehr stark induziert. Durch die Ergebnisse konnte zudem eine translationale Regulation der Genexpression nachgewiesen werden. Die Resultate offenbarten eine wichtige Funktion bei der Transition von reichem zu ärmerem Nährstoffangebot und führten schließlich zur Genbezeichnung *iftA* („important for transition A“). Desweiteren wurden Transkriptomuntersuchungen der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp zum Zeitpunkt der höchsten transienten Expression von *iftA* durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass *iftA* etwa 1% aller Gene des Genoms beeinflusst und gleichzeitig die Zahl differentieller Funktionen dieser Gene sehr gering ist. Die Ergebnisse führten insgesamt zu der Annahme, dass *iftA* eine Doppelfunktion besitzt, sowohl als enzymatisches Protein im Energiestoffwechsel als auch als essentieller Regulator mit noch unbekannter Funktion.

Neben *iftA* fiel das Augenmerk auf mehrere Gene, die im Rahmen der Promotion von Neta Altman-Price an der Universität in Tel-Aviv als Histon-Acetylasen und –Deacetylasen identifiziert wurden. Zudem konnte in *H. volcanii* ein essentielles Gen, welches für ein Histon kodiert, entdeckt werden. Das Histon besitzt konservierte Lysinreste, die im eukaryotischen Histon H3 Ziele für eine posttranslationale Acetylierung sind. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Lysinreste irreversibel zum einen in Glutamin

(acetylierter Zustand) und zum anderen in Arginin (deacetylierter Zustand) mutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktionen und die Einflüsse der beiden Histonmutanten sowie einer Acetylase- ($\Delta pat1$) und einer Deacetylase-Deletionsmutante ($\Delta sir2$) auf die globale Genregulation analysiert. Dazu wurden zunächst Transkriptomuntersuchungen in der exponentiellen Wachstumsphase mittels Microarray Analysen an den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten einen erheblich stärkeren Einfluß auf die Regulation der Genexpression durch das acetylierte Histon sowie der Deacetylase-Deletionsmutante im Vergleich zu den Ergebnissen des deacetylierten Histons und der Acetylase-Deletionsmutante. In der exponentiellen Wachstumsphase liegt das Histon in *H. volcanii* daher in überwiegend deacetylierter Form vor. Durch die Analysen konnte auch demonstriert werden, dass Sir2 und das Histon eine regulatorische Wirkung auf exakt die gleichen Gene ausüben und daher unmittelbar miteinander in Verbindung stehen. Die experimentelle Bestätigung dieses Zusammenhangs stellt im Reich der Archaea bisher ein absolutes Novum dar.

Die Untersuchungen des Transkriptoms der $\Delta sir2$ Mutante enthüllte zudem einen positiven Einfluß von Sir2 auf ein größeres Gencluster (HVO_1201-25). Die Gene dieses Clusters konnten durch *in silico* Analysen der Chemotaxis und der Flagellenbiosynthese zugeordnet werden. Für die weitere Charakterisierung der Deletionsmutante wurden daher Untersuchungen zur Bestimmung der Motilität von *H. volcanii* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Sir2 die Beweglichkeit und gerichtete Fortbewegung von *H. volcanii* in erheblichem Maße beeinflusste, während die Biosynthese der Flagellen nicht beeinträchtigt war. Die Deacetylierung spielt daher eine unmittelbare Rolle bei der Signaltransduktion und Motilität.

Insgesamt konnte durch die Arbeit gezeigt werden, dass die Acetylierung und Deacetylierung von Proteinen durch Pat1 resp. Sir2 die Regulation der Genexpression beeinflusst. Dies geschieht in *H. volcanii* indirekt durch die posttranslationale Veränderung von internen Signalen oder direkt durch die Modulierung des Histons und die damit verbundene Änderung der DNA-Struktur.

2 Einleitung

2.1 Archaea – die dritte Domäne des Lebens

Das Leben auf unserem Planeten lässt sich in drei Domänen unterteilen: Eukarya, Bakteria und Archaea. Während Organismen höherer Ordnung wie Tiere und Pflanzen zu den Eukarya zählen, sind Bakterien und Archaeen niedere, einzellige Organismen (Prokaryoten). Diese rein morphologischen Untersuchungen waren der Grund dafür, warum Archaeen erst sehr spät mithilfe von 16S/23S rRNA Analysen als von den Bakterien unabhängige Domäne erkannt wurden (Woese & Fox, 1977; Woese, 1990). Nach dieser Entdeckung galten Archaea oftmals als extremophil (darunter befanden sich u.a. halo-, baro-, acido-, alkaliphile Spezies), da sie in verschiedenen extremen Habitaten gefunden werden konnten. Heute gilt die Adaptation an extreme Habitate nicht mehr als generelles Charakteristikum von Archaea. An moderaten Standorten machen Archaea bis zu 40% der Biomasse aus und kommen somit ubiquitär in der Umwelt vor (DeLong, 1998; DeLong & Pace, 2001).

Die Domäne der Archaea lässt sich in mehrere Phyla einteilen (**Abbildung 1**). Die beiden größten Gruppen stellen die Eury- bzw. Crenarchaeota dar. Erstere ist mit methanogenen, thermo-, halo- und psychrophilen Vertretern die diverseste Gruppe. Daneben gibt es noch die Gruppe der Nanoarchaeota, die bisher nur durch ein einziges Mitglied *Nanoarchaeum equitans* bekannt ist. Dieses Archaeon besitzt ein sehr kleines Genom (Huber *et al.*, 2002), dem offenbar essentielle Gene fehlen (Podar *et al.*, 2008). Das Überleben erreicht der Organismus nur

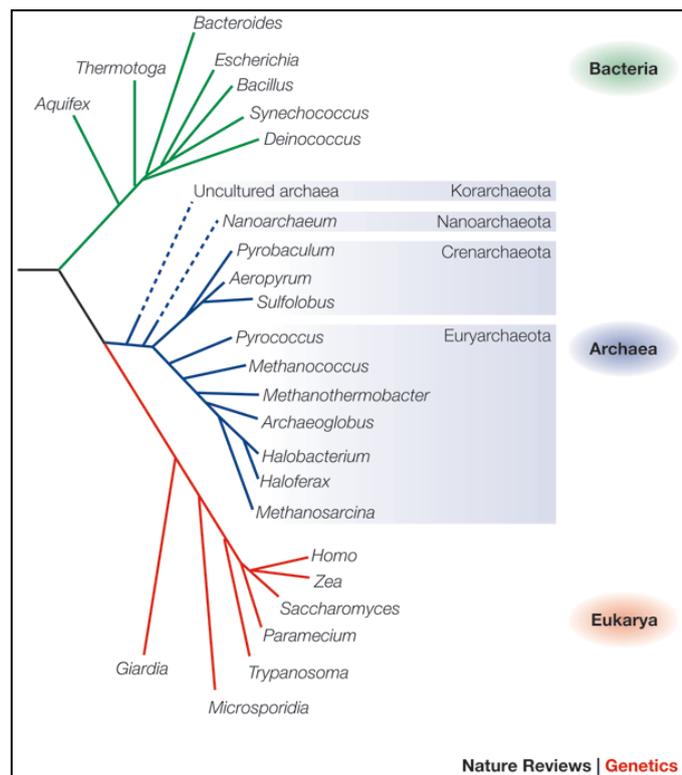


Abbildung 1

Phylogenetischer Stammbaum (Mevarech & Allers, 2005). Die Unterteilung des Stammbaums basiert auf 16S rRNA Sequenzanalysen. Die Domäne der Archaea und deren Phyla sind in blau dargestellt. Noch unsichere Phyla sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

durch eine parasitäre bzw. symbiotische Lebensweise mit dem Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. Die vierte bisher bekannte Gruppe stellt die Korarchaeota dar. Diese ist bisher jedoch nur durch DNA Sequenzanalysen aus der Umwelt bekannt (Barns *et al.*, 1996; Reysenbach *et al.*, 2000), weil noch kein Vertreter in Reinkultur kultivierbar war.

Archaea stellen nicht nur durch die genetischen Evidenzen eine eigenständige Domäne dar, sondern zeigen zudem auch molekulare und biochemische Merkmale, die sie von den beiden anderen Domänen unterscheidet. Neben Gene und Proteine für verschiedene zelluläre Prozesse (Schäfer *et al.*, 1999; Amend & Shock, 2001; Roesser & Muller, 2001; Makarova & Koonin, 2003) besitzen Archaea auch einen charakteristischen Aufbau ihrer Zellwände und –membranen (De Rosa *et al.*, 1986; Kandler & König, 1998). Statt einfacher Fettsäuren, wie sie in Eukaryoten und Bakterien üblich sind, besitzen Archaea Glycerin-Diether oder sogar Glycerin-Tetraether (einschichtige Membran, Monolayer) sowie verzweigte Isopren-Einheiten. Eine weitere Eigenschaft der Archaea kennzeichnet der Besitz verschiedener Homologien zu Bacteria und Eukarya. So hat der informationsverarbeitende Prozess – Transkription, Translation, Replikation, Rekombination – eukaryotischen Charakter (Huet *et al.*, 1983; Dennis, 1997; Bell & Jackson, 2001; Matsunaga *et al.*, 2001; Grabowski & Kelman, 2003), wohingegen der zentrale Metabolismus und die genomische Organisation denen der Bacteria gleicht (Olsen & Woese, 1997; Doolittle & Logsdon, 1998; Rivera *et al.*, 1998; Karlin *et al.*, 2002; Reeve, 2003; Londei, 2005). Neben diesen eindeutigen Klassifizierungen gibt es im Bereich des Zellzyklus auch eine Mischung von Genen, die eukaryotische und bakterielle Merkmale besitzen (Bernander, 2003).

Mittlerweile stehen mehr als 50 sequenzierte archaeale Genome zur Verfügung, was die Bedeutung der Forschung an Archaea hervorhebt.

2.2 Modellorganismus *Haloferax volcanii*

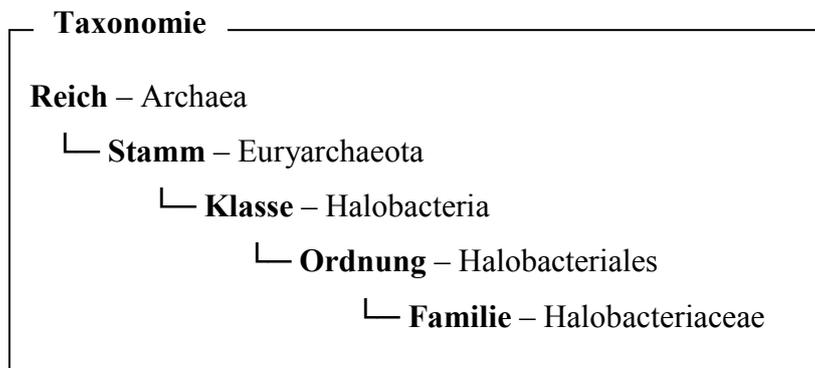


Abbildung 2
Taxonomie von *Haloferax volcanii*.

Haloferax volcanii ist ein mesophiles Archaeon, welches an Habitaten mit hohen Salzkonzentrationen, wie dem Toten Meer, großen Salzseen oder in hypersalinen ozeanischen Umgebungen zu finden ist. Das Genom besitzt eine Größe von 4 Mbp und verteilt sich neben dem Chromosom auf mehrere Megaplasmide (pHV1-4). *H. volcanii* ist zudem polyploid (Breuert *et al.*, 2006).

Das (Über-)Leben in hypersalinen Habitaten sichert sich *H. volcanii* durch die intrazelluläre Akkumulation von Kaliumionen (bis zu 4 M) (Christian & Waltho, 1962). Die Proteine sind so strukturiert, dass sie sich in Gegenwart dieser hohen Ionenkonzentrationen falten können (Blecher *et al.*, 1993). Dazu präsentieren die Proteine eine höhere Anzahl von geladenen Aminosäuren an der Oberfläche, während sie einen hydrophoben Kern im Inneren bilden (Eisenberg, 1995). Dies erhöht die Stabilität sowohl unter hypersalinen Bedingungen als auch hohen Temperaturen. Bei niedrigen extrazellulären Salzkonzentrationen <1 M kommt es zu einer Denaturierung von Proteinen (Wright *et al.*, 2002).

H. volcanii besitzt wie viele Archaea keine Zellwand und nutzt S-Layer zur Strukturierung (Kessel *et al.*, 1988). Die Zellen sind polymorph, gelten in der Regel aber als stäbchenförmig. *Haloferax* besitzen die typische Etherverbindung und enthalten ein hohes Maß an Carotinoide und Lycopin, was ihnen ihre charakteristische rote Farbe verleiht (Asker *et al.*, 2002).

Im Reich der Archaea und im speziellen Fall der Klasse der Halobacteria stellt *H. volcanii* ein gut untersuchter Modellorganismus dar. Seit kurzem ist auch die annotierte

Genomsequenz bekannt. Dadurch sind *in silico* Analysen wesentlich einfacher möglich. Der Organismus ist sehr einfach zu kultivieren. Der Metabolismus von *H. volcanii* ist sehr vielseitig. Der Organismus kann sowohl aerob als auch anaerob mit verschiedenen Zuckern und Aminosäuren als alleinige Kohlenstoffquelle wachsen. Unter anaeroben Bedingungen werden dabei Nitrat oder DMSO als terminale Elektronenakzeptoren genutzt. Die Generationszeit von 4 Stunden ist relativ kurz. Zudem sind eine Vielzahl biochemischer, genetischer und molekularbiologischer Methoden etabliert.

2.3 Die Enolase Superfamilie

2.3.1 *iftA* – Ein Mitglied der Familie

Bereits vor einigen Jahren wurde im Rahmen von Transkriptomanalysen ein Shotgun-DNA-Microarray von *H. volcanii* hergestellt und damit die Änderungen beim Wechsel von Casaminosäuren zu Glukose als Kohlenstoffquelle beobachtet (Zaigler et. al., 2003). Von den 2.880 klonierten Shotgun-Fragmenten, was einer einfachen Genomabdeckung entspricht, waren mehr als 270 Transkripte nach dem Wechsel auf Glukose differentiell expremiert. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine, die bei der Glukose Degradation oder dem Transport beteiligt sind, induziert waren. Im Gegensatz dazu waren u.a. Proteine repremiert, die im zentralen Metabolismus (TCA-Zyklus), in der Translation in Form von überwiegend ribosomalen Proteinen sowie in der Elektronentransferkette eine Rolle spielen. Transkripte für Proteine mit regulatorischer Funktion waren sowohl induziert als auch repremiert. Vertreter dieser Klasse war ein zu *E. coli* Lrp (leucine responsive protein) homologes Protein oder auch Untereinheiten für Serin-Protein-Kinasen.

Eines der induzierten Transkripte kodierte für den offenen Leserahmen HVO_1488. Analysen mit der Proteinsequenz von HVO_1488 zeigten die Zugehörigkeit des Proteins zur Enolase Superfamilie. Zudem war eine Homologie zu den Regulatoren RspA aus *E. coli* („regulator of stationary phase“, Huisman & Kolter, 1994), SpaA aus *Streptomyces coelicolor* (Schneider et al., 1996) und Spa2 aus *Streptomyces ambofaciens* (Aubert et al., 1997) zu erkennen.

2.3.2 „La superfamilia“

Die Enolase Superfamilie (COG1441) besteht aus einer Vielzahl von Proteinen mit sehr unterschiedlichen Funktionen: Enolase, 3-Methylaspartat-Ammonium-Lyase, Zucker Dehydratasen, Mandelat Racemasen, O-Succinylbenzoat Synthasen, *N*-Acylaminosäure Racemasen und Muconat lactonisierende Enzyme, um nur einige zu nennen (Gerlt *et al.*, 2005). Diese Funktionsdiversität führt dazu, dass innerhalb dieser Gruppe keine hohe Sequenzkonservierung besteht. Dadurch wurde diese Superfamilie erst vor rund 15 Jahren entdeckt (Babbitt *et al.*, 1996). Die katalytische Eigenschaft, die alle Familienmitglieder gemeinsam haben, ist die einleitende Reaktion. Dabei wird ein Alpha-Proton des Carboxylat-Substrates abgespalten, wobei ein Enolat-Anion als Intermediat entsteht. Für diese Reaktion ist ein Mg^{2+} -Ion zur Stabilisierung des Zwischenproduktes notwendig. Das Metallion ist dabei über drei hoch konservierte Aminosäurereste innerhalb des katalytischen Zentrums mit dem Enzym komplexiert. Die nachfolgenden Reaktionen unterscheiden sich je nach Funktionsweise des Enzyms stark voneinander. Die Produkte dieser Reaktionen sind daher sehr unterschiedlich innerhalb der Familie.

Proteine, deren Funktionen bereits bekannt sind, sind u.a. im zentralen und sekundären Stoffwechsel oder der Regulation beteiligt (Gerlt *et al.*, 2005). Dennoch gibt es eine Vielzahl Proteine der Enolase Superfamilie, deren Funktionen noch unbekannt sind. Vertreter der Superfamilie können in allen drei Domänen des Lebens gefunden werden. Während in Bacteria und Eukaryoten bereits mehrere Enzyme experimentell untersucht wurden (Huisman & Kolter, 1994; Schneider *et al.*, 1996; Aubert *et al.*, 1997), wurde in Archaea bisher nur die Gluconat-Dehydratase aus *Sulfolobus solfataricus* und *Thermoproteus tenax* charakterisiert (Lamble *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005; Kim & Lee, 2005).

2.4 Die DNA-Architektur

Das Volumen von pro- und eukaryotischen Genomen ist deutlich größer als der zur Verfügung stehende Platz einer Zelle. Das zirkuläre Genom von *E. coli* beispielsweise hat eine Länge von 2 mm und ein Volumen von $200 \mu m^3$. Das Volumen einer *E. coli* Zelle beträgt jedoch nur etwa $1-2 \mu m^3$ (Kubitschek & Friske, 1986). In *E. coli* liegt das Genom als Nukleoid mit einer Größe von nur etwa $0,5 \mu m^3$ vor. Archaea besitzen ungefähr die gleichen

Ausmaße. Um diesen Grad der Reduktion zu erreichen, kann die DNA mehrere Mechanismen durchlaufen: „Supercoiling“, „macromolecular Crowding“ und die Assoziation mit DNA-Bindeproteinen. Die auf diese Weise verdichtete DNA führt zu einer sehr hohen Konzentration in prokaryotischen Nukleoiden und eukaryotischen Interphase Nuklei ($\sim 30 \text{ mg ml}^{-1}$). Hoch konzentrierte DNA neigt zu Selbstassemblierung und Aggregatbildung, was die Funktionalität des Genoms einschränkt. Die Zugänglichkeit der DNA obliegt dabei den Proteinen, die sie kompaktieren, und spielt eine entscheidende Rolle beim Verhindern von Aggregaten. Dies macht das Genom zu einer kompakten und dennoch flexiblen und zugänglichen Struktur (Minsky *et al.*, 1997).

Die chromosomalen Architekten, die bei der Organisation und Kondensation des Genoms eine Rolle spielen, sind in der Regel kleine, einfache, mit der DNA interagierende Proteine. Sie können verschiedene Effekte auf die Struktur der DNA besitzen wie sie z.B. (ver-)biegen oder beugen („*benders*“), miteinander verknüpfen („*bridgers*“) oder umwickeln („*wrappers*“; **Tabelle 1**).

Tabelle 1

Überblick über die unterschiedlichen Proteinklassen, die an der Architektur der DNA in den verschiedenen Reichen beteiligt sind (Luisterburg *et al.*, 2008).

		„ <i>wrappers</i> “	„ <i>benders</i> “	„ <i>bridgers</i> “
Eukaryoten		H2A, H2B, H3, H4 (Kernhistone)	HMG	H1 (Linker Histon) BAF SMC
Archaea	Crenarchaeota	<i>Lrp</i> *	Cren7 Sul7	Alba <i>Lrp</i> * SMC
	Euryarchaeota	HMfA und HMfB (Histone) <i>Lrp</i> *	MC1 HU	Alba <i>Lrp</i> * SMC
Bakterien	Gram positive	<i>Lrp</i> *	HU	<i>Lrp</i> * Lsr2 (H-NS-ähnlich) SMC
	Gram negative	<i>HU</i> * <i>Lrp</i> *	<i>HU</i> * IHF Fis	H-NS <i>Lrp</i> * <i>Fis</i> * SMC H1-ähnliche Proteine

* Diese Proteine zeigten eine Doppelfunktion bei der Bindung an die DNA in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration oder der DNA Sequenz. Die Sekundärfunktion ist in kursiv dargestellt.

2.4.1 DNA Wrapper

Die Untersuchungen in dieser Arbeit bezogen sich im Speziellen auf DNA „Wrapper“, also Proteine, die die DNA auf ihrer Oberfläche aufwickeln und somit das Volumen der DNA erheblich reduzieren. DNA Wrapper können zudem die Supercoiledform der DNA induzieren. Besonders in Eukaryoten ist das Aufwickeln der DNA mit Hilfe von Histonproteinen gut untersucht. Histone werden notwendigerweise von allen Eukaryoten expremiert und bilden zusammen mit der genomischen DNA die Nukleosomen. Die Proteine besitzen eine charakteristische Histonfalte (drei hydrophobe α -Helices) und interagieren mit der DNA über deren kleine Furche (Luger *et al.*, 1997). Der Kern eines Nukleosoms besteht aus einem Histonoktamer (2x je H2A, H2B, H3 und H4). Ein Oktamer wickelt etwa 146 bp DNA mit einer linksgängigen Drehung auf. Der Abstand zwischen zwei Nukleosomen auf der genomischen DNA beträgt ca. 200 bp.

Nukleosomen reprimieren allgemein die Proteininteraktionen mit der DNA wie z.B. bei der Transkription. Der Mechanismus, wie aufgewickelte DNA zugänglich gemacht wird, besteht hauptsächlich in der Umstrukturierung des Chromatins. Dabei werden vor allem die C- und N-terminalen Bereiche der Histonproteine posttranslational modifiziert (Methylierung, Acetylierung etc.). Viele Chromatinbindende Proteine besitzen Bindemotive, die speziell solche Modifikationen erkennen können und die Struktur und Funktion des Chromatins verändern (Taverna *et al.*, 2007).

2.4.2 Archaeale Histone

Euryarchaeota besitzen zu den Histonen homologe Proteine, was für einen frühen Ursprung dieser Proteinfamilie spricht (White & Bell, 2002; Sandman & Reeve, 2006). In Genomen von Crenarchaeota wurden bisher hingegen – bis auf *Thermofilum pendens* – keine entsprechenden Gene gefunden, die für ein histonähnliches Protein kodieren. *T. pendens* könnte das Gen durch lateralen Gentransfer erhalten haben (Sandman & Reeve, 2006). Für den evolutionsbedingten Verlust von Genen scheinen Histone ebenfalls anfällig zu sein wie es am Beispiel der euryarchaealen Thermoplamatales (White & Bell, 2002) oder den eukaryotischen Dinoflagellates (Moreno Diaz de la Espina *et al.*, 2005) zu sehen ist. Das bisher am besten untersuchte Histon in Archaea ist das HMf Protein aus dem hyperthermophilen *Methanothermus fervidus* (Sandman *et al.*, 1990). Zwei HMf Polypeptide (HMfA und HMfB) bilden dabei Homo- und Heterodimere mit

unterschiedlichen DNA Bindeeigenschaften (Sandman *et al.*, 1994). Die Homodimere HMfA₂ und HMfB₂ lagern sich wiederum zu Tetrameren zusammen (Marc *et al.*, 2002). Die HMf Proteine sind mit den eukaryotischen Kernhistonen nicht nur in Sequenz und Struktur verwandt, sondern verpacken die DNA auch in nukleosom-ähnlichen Strukturen (Starich *et al.*, 1996; Sandman *et al.*, 1998). Archaeale Nukleosomen bilden Tetramere, vergleichbar mit den H3-H4 Dimere in Eukaryoten (Grayling *et al.*, 1997). Diese binden etwa 60 bp DNA um sich. Die archaealen Histone sind deutlich kürzer als die eukaryotischen Vertreter. Bis auf wenige Ausnahmen fehlt ihnen der C- und N-terminale Bereich, die in Eukaryoten Orte für extensive posttranslationale Modifikationen (u.a. Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung) sind (Jenuwein & Allis, 2001; Sandman & Reeve, 2006). Das Fehlen dieser Bereiche in Archaea deutet darauf hin, dass archaeale Histone nicht im gleichen Maße wie in Eukaryoten Ziel regulatorischer Prozesse sind. Bis jetzt wurden noch keine Beweise für posttranslationale Modifikationen archaealer Histonproteine gefunden (Sandman & Reeve, 2006).

2.4.3 Posttranslationale Modifikation von Histonen

Die Organisation des Genoms ist sehr dynamisch. Die Regulation essentieller Genomfunktionen wie zum Beispiel die Genexpression, Replikation und DNA Reparatur erfordert eine hohe Plastizität des Chromatins. Diese (Ver-)Formbarkeit wird durch verschiedene Mechanismen erreicht. Einer davon ist die Auflockerung der DNA-Bindung der Histone entweder durch chemische Modifikation der DNA z.B. durch Methylierung oder des Histons (Cedar & Bergman, 2009). Eine häufige Modifikation in Eukaryoten ist die Acetylierung der Kernhistone H3 und H4 an ihren N-terminalen Bereichen. Acetylierte Histone können als Bindungsstelle für spezifische Proteine mit einer Bromodomäne dienen und auf diese Weise Gene aktivieren (Mujtaba *et al.*, 2007). Histonacetylierung ist daher generell an der Aktivierung der Transkription beteiligt (Clayton *et al.*, 2006), wohingegen die Deacetylierung zu einer Deaktivierung führt (Grunstein, 1997; Wade & Wolffe, 1997; Kuo & Allis, 1998; Struhl, 1998; Workman & Kingston, 1998). In **Abbildung 3** sind die verschiedenen Histonmodifikationen in Eukaryoten und ihre biologische Funktion zusammengefasst. Da den archaealen Histonen der N-terminale Bereich fehlt und bisher auch noch keine posttranslationalen Modifikationen nachgewiesen werden konnten (Forbes *et al.*, 2004), ist die Funktionsweise der DNA Auflockerung und die Aktivierung der Genexpression noch völlig unklar. In Archaea sind bisher erst wenige Fälle von

posttranslationaler Modifikation von DNA-Bindeproteinen bekannt. Als Beispiele seien die Acetylierung von Alba in *S.solfataricus* (Bell *et al.*, 2002) und die Methylierung von Sul7 und Cren7 in Crenarchaea (Guo *et al.*, 2008) genannt.

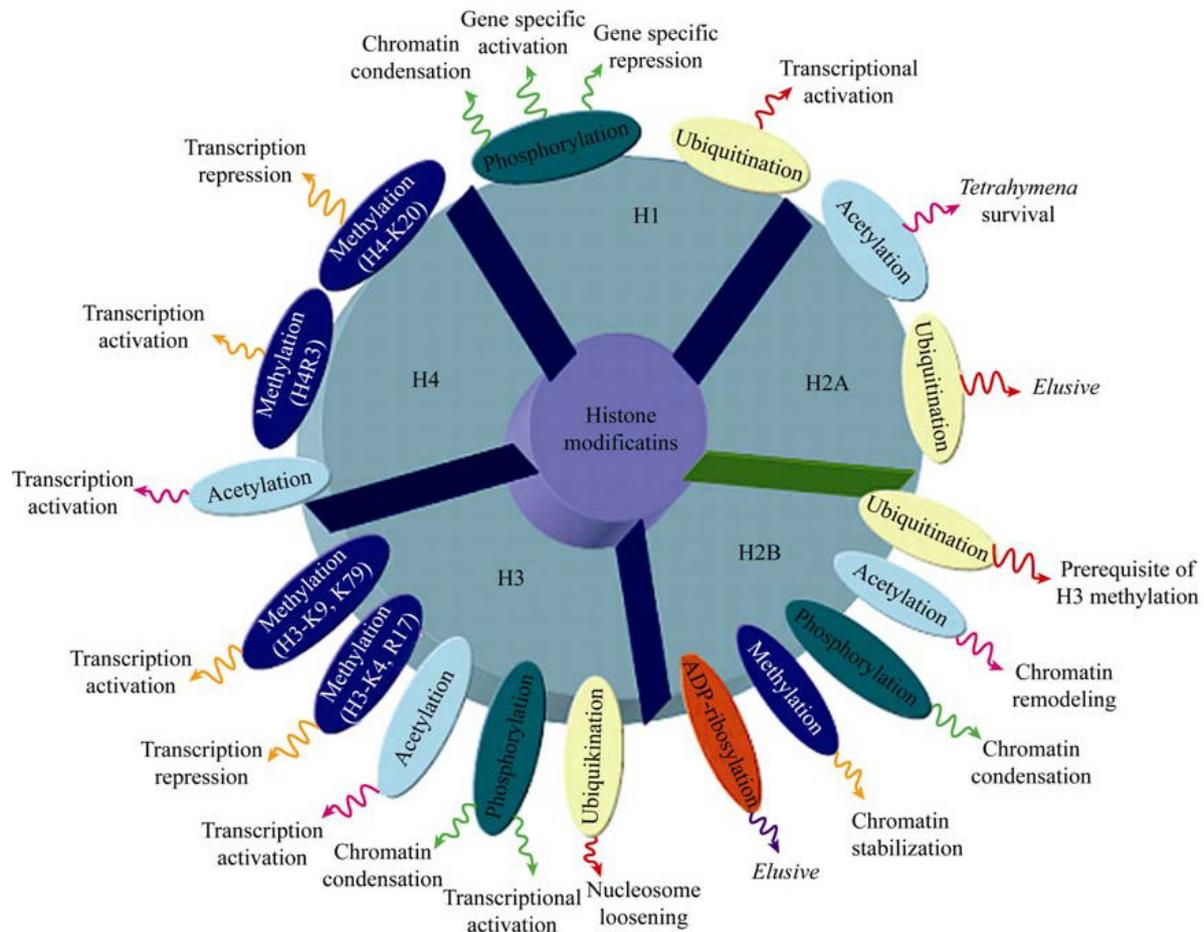


Abbildung 3

Schematische Darstellung von Histonmodifikationen in Eukaryoten und deren biologische Funktion (Munshi *et al.*, 2008; Fig. 1).

2.4.4 Histon Acetyltransferasen (HATs)

Die Acetylierung und Deacetylierung von Histonen und dessen Potential bei der Regulation der Genexpression wurde in den 1960er Jahren entdeckt (Phillips, 1963; Allfrey *et al.*, 1964; Inoue & Fujimoto, 1969). Da Histone als die ersten Zielproteine der Acetylierung identifiziert wurden, wurden die Acetyltransferasen und Deacetylasen nach ihnen benannt. Durch die wachsende Anzahl identifizierter Proteine, die keine Histone und dennoch Ziele für HATs und HDACs sind, ist die Nomenklatur in der Zwischenzeit irreführend.

Histon Acetyltransferasen katalysieren die Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die ϵ -NH₂-Gruppe der Lysinseitenkette. Dieser Prozess ist sehr dynamisch. HATs sind hoch konserviert und bilden multiple Komplexe (Kimura *et al.*, 2005). Anders als die HDACs besitzen HATs eine wesentlich diversere Struktur und Funktion (Yang, 2004). HATs acetylieren Lysinreste von Proteinen nicht zufällig, sondern konnte durch Kristallstrukturanalysen ein Erkennungsmotiv GKxxP identifiziert werden (Rojas *et al.*, 1999; Bannister *et al.*, 2000). Viele HATs zeigen eine deutliche Substratspezifität abhängig von der Zusammensetzung der Untereinheiten des HAT Komplexes und der spezifischen Rekrutierung des Komplexes an die Stelle der Acetylierung (Waterborg, 2002). HAT Komplexe besitzen ebenfalls eine Funktion in der Dekondensation des Chromosoms, DNA Reparatur und der Acetylierung von Proteinen, die keine Histone sind (Lee & Workman, 2007).

Im Gegensatz zu den HDACs ist die eindeutige Klassifizierung der HATs unklar. Sie werden in zwei generelle Gruppen unterteilt: A- und B-Typ HATs. A-Typ HATs katalysieren hauptsächlich Acetylierungen, die bei der Transkription eine Rolle spielen. Diese werden in fünf weitere Subgruppen eingeteilt (Roth *et al.*, 2001). Die cytoplasmatischen HATs des B-Typs acetylieren de novo synthetisierte Histone, fördern deren Lokalisation im Kern und die Positionierung auf der neu synthetisierten DNA (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Allis *et al.*, 1985).

2.4.5 Histon Deacetylasen (HDACs)

HDACs können in zwei unterschiedliche Familien eingeteilt werden. Zum einen gibt es die „klassischen“ Zink-abhängigen HDACs, die strukturell zu den Hda1/Rpd3 Proteinen aus Hefe gehören (de Ruijter *et al.*, 2003), und zum anderen die NAD⁺-abhängigen Proteine, die zu Sir2 homolog sind (Haigis & Guarente, 2004). Histon Deacetylasen werden abhängig von ihrem phylogenetischen Ursprung weiter in vier Unterklassen unterteilt (Gregoretto *et al.*, 2004). Klasse I, II und IV HDACs stellen die klassische HDAC Familie dar. Homologe Proteine der Sir2 aus Hefe (SIRT1) repräsentieren die Klasse III Deacetylasen, die in Säugetieren auch als Sirtuine bezeichnet werden. HDACs der Klasse III weisen keinerlei Homologien zu Proteinen der anderen Klassen auf (Verdin *et al.*, 2008). HDACs sind oft auch Komponenten größerer Multiproteinkomplexe (Munshi *et al.*, 2008).

Sirtuine nutzen zur Katalyse statt eines elektrophilen Zn²⁺-Ions, welches die direkte Hydrolyse der Amidbindung durch Wasser begünstigt, NAD⁺ als Cosubstrat. Dabei wird die

Acetylgruppe auf das NAD^+ übertragen, welches die Spaltung in Nicotinamid und 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose zur Folge hat (Denu, 2005). Diese Reaktion ist vom NAD^+/NADH Verhältnis abhängig. Daher kann der Stoffwechsel Teil des Regulationsmechanismus von SIRTs sein. Das bei der Reaktion entstehende Nicotinamid ist wiederum ein nicht-kompetitiver SIRT Hemmer (Schmidt *et al.*, 2004; Grubisha *et al.*, 2005). Die große Zahl an weiterer NAD^+ -abhängiger Enzyme innerhalb einer Zelle macht den Einsatz eines solchen Deacetylasehemmers durch die entstehenden Nebeneffekte sehr schwierig (Belenky *et al.*, 2007).

2.4.6 Was bisher geschah...

In bisherigen Untersuchungen im Rahmen einer Promotion in der Arbeitsgruppe Mevarech an der Universität in Tel-Aviv konnten zum ersten Mal in *H. volcanii* Acetyltransferasen (HAT) und Histon Deacetylasen (HDAC) identifiziert werden. Die Analysen ergaben drei Gene, die für HAT homologe Proteine kodieren. Sie wurden entsprechend ihrer Homologie zu Proteinen aus Hefe Pat1, Pat2 und Elp3 benannt. Weiterhin konnten zwei HDACs HdaI und Sir2 entdeckt werden. Durch *in silico* Analysen der Genlokalisierungen konnte zudem ein histonähnliches Protein identifiziert werden, welches unmittelbar an *hdaI* grenzt und möglicherweise mit ihm ein Operon bildet. Die Vermutung lag nahe, dass das Histon Ziel für eine Deacetylierung durch HdaI ist. Im Umkehrschluß setzt das eine Acetylierung des Histons voraus, welches ein Novum in Reich der Archaea darstellen würde. Nähere Untersuchungen der Histonsequenz zeigte die Konservierung zweier Lysinreste, welche häufig Ziele für Acetylierung in anderen Organismen sind. Eine Deletion des Histongens konnte nicht erzielt werden, da es offenbar ein essentielles Gen ist, so dass die beiden Lysinreste mutiert wurden. Eine Änderung in Glutamin simuliert den acetylierten, die Substitution zu Arginin den deacetylierten Zustand. Durch Wachstumsversuche konnte ein sehr interessanter Phänotyp dieser Histonmutanten identifiziert werden. Beide Mutanten zeigten eine deutlich höhere Überlebensrate gegenüber dem Wildtyp, wenn Zellen aus der stationären Wachstumsphase auf festes Medium ausgestrichen wurden.

Neben dem Gen für das Histonprotein konnte auch *hdaI* nicht deletiert werden und stellt somit ein essentielles Gen für *H. volcanii* dar. Von allen anderen Genen, die für HATs oder HDACs kodieren, ließen sich Deletionsmutanten herstellen.

2.5 Archaeale Motilität und Chemotaxis

2.5.1 Archaeale Flagellen

Die Fortbewegung ist eine weit verbreitete Eigenschaft von Prokaryoten. Sie kann schwimmend als auch als Oberflächen-abhängige Translokation stattfinden. Verschiedene Spezies erzielen eine Beweglichkeit durch unterschiedliche physiologische Mechanismen. Zu den effektivsten Organellen für die Fortbewegung zählen Flagellen und Typ-IV Pili. Während beide Systeme in Bakterien relativ gut untersucht sind, stehen archaeale Vertreter erst seit Kurzem im Fokus der Forschung. Es existieren eindeutige Hinweise, dass sich das archaeale deutlich vom bakteriellen Flagellen-System unterscheidet und mehr dem bakteriellen Typ-IV-Pilus-System ähnelt. Beiden gemeinsam sind der multiflagellinartige Charakter, die Anwesenheit homologer Proteine, N-terminale Sequenzähnlichkeiten zwischen archaealen Flagellin und bakteriellen Typ-IV-Pilin und ähnliche Mechanismen im Aufbau (Thomas *et al.*, 2001a, b; Bardy *et al.*, 2004).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Archaea zeigten die Anwesenheit von dünnen Filamenten. Durch die Deletion eines Genclusters, welches große Homologien zu bekannten *fla*-Genclustern aufwies, konnten die Filamente in der Tat als Flagellen identifiziert werden (Jarrell *et al.*, 1996; Patenge *et al.*, 2001). Die Struktur der archaealen Flagellen ist in vielerlei Hinsicht ungewöhnlich im Vergleich zu den bakteriellen Flagellen bzw. dem Typ-IV-Pilus. Der Durchmesser eines archaealen Flagellums ist 10-13 nm (Thomas *et al.* 2001a) und liegt damit zwischen dem Durchmesser eines Typ-IV-Pilus (6 nm; Nudleman & Kaiser, 2004) und dem eines bakteriellen Flagellums (ca. 20 nm; Jones & Aizawa, 1991).

In archaealen Genomen konnten bisher keine homologen Gene für die Struktur oder für den Aufbau von Flagellen identifiziert werden, wie sie in Bakterien bekannt sind (Faguy & Jarrell, 1999). Die archaealen Flagelline ähneln stattdessen den Typ-IV Pilinen. Das kodierende Gencluster für die Flagellen Biosynthese in Archaea besteht aus bis zu 13 Genen: FlaAB (COG1681) sind die archaealen Flagelline, FlaCDEFG die Basis- und Motorproteine, FlaH (COG630), FlaI (COG2874) und FlaJ (COG1955) sind für die Sekretion der Flagelline verantwortlich während FlaK (COG1989) als Peptidase ein Signalpeptid der Flagelline abspaltet (Sandy *et al.*, 2006).

überträgt die Phosphorylgruppe von CheA auf einen eigenen konservierten Aspartatrest (Wolanin *et al.*, 2002). Das entstehende CheY-P reguliert dann die Umschaltung des Flagellenmotors (Bren & Eisenbach, 1998; McEvoy *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2000; Sagi *et al.*, 2003; Szurmant *et al.*, 2003). Dies ändert die Richtung oder die Geschwindigkeit der Rotation der Flagelle. Die Rezeptoren adaptieren sich an die Umweltreize und können dadurch Konzentrationsgradienten von Attraktant oder Repellents sensieren (Mesibov *et al.*, 1973). Generell ist der Anregungsprozess hoch konserviert, während die Adaptation sich deutlich voneinander unterscheidet. Die **Tabelle 2** zeigt eine Übersicht aller bisher bekannten Proteine, die an der Chemotaxis beteiligt sind, ihre Funktion sowie ihr biologisches Vorkommen.

Tabelle 2

Eine Liste von Proteinen, die an der Chemotaxis beteiligt sind (Szurmant & Ordal, 2004; Table 1)

Protein	Funktion	Zu finden in
Signalerkennung und -transduktion		
Methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs)	Rezeptoren	Universell in allen chemotaktischen Bakterien und Archaea
CheD	Glutamin Deamidase	Alle chemotaktischen Archaea, Gram-positive Bakterien, <i>Thermatoga</i> , und einige Proteobacterien
Ligand binding proteins	Ligandenerkennung	<i>E. coli</i> ; bisher keine anderen Organismen bekannt
Anregung		
CheA	Histidin Kinase	Universell in allen chemotaktischen Bakterien und Archaea
CheW	Bindeglied	Universell in allen chemotaktischen Bakterien und Archaea
CheY	Responseregulator	Universell in allen chemotaktischen Bakterien und Archaea
Adaptation		
CheR	Methyltransferase	Universell in allen chemotaktischen Bakterien und Archaea (mit Ausnahme, <i>H. pylori</i>)
CheB	Methylesterase	Universell in allen chemotaktischen Bakterien und Archaea (mit Ausnahme, <i>H. pylori</i>)
CheV	Bindeglied und Adaptation	Viele Bakterien einschließlich <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium; jedoch nicht in Archaea oder <i>E. coli</i>
Signalentfernung		
CheC	Phosphatase und Adaptation	Alle chemotaktischen Archaea, Gram-positive Bakterien, <i>Thermatoga</i> , und einige Proteobacterien
CheX	Mögliche Phosphatase	Spirochetes, einige Archaea, einige Gram-positive Bakterien, <i>Thermatoga</i> , und einige Proteobacterien
CheZ	Phosphatase	β - und γ -Proteobacterien
FliY	Phosphatase der Flagellenumschaltung	Gram-positive Bakterien, einige Spirochetes, and <i>Thermatoga</i>
CheY*	Phosphatverbraucher	α -Proteobacterien und möglicherweise andere

2.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener Gene mit bisher unbekannter bzw. unbestätigter Funktion und deren Einfluss auf die Genregulation. Durch die mittlerweile sehr gut etablierten Möglichkeiten der Genmanipulation im haloarchaealen Modellorganismus *H. volcanii* sollten die zu untersuchenden Gene *in frame* deletiert und die Deletionsmutanten mit verschiedenen Methoden näher untersucht werden. Im ersten Schritt sollte mit Hilfe der Microarray Technologie globale Transkriptomanalysen an den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt werden, um Hinweise auf eine veränderte Regulation diverser Gene zu finden und um dadurch Rückschlüsse auf deren mögliche globale oder lokale Funktion treffen zu können. Die zu untersuchenden Gene waren ein zu Beginn dieser Arbeit unbekanntes Gen mit einer hohen Homologie zu einem in *E. coli* als Transkriptionsregulator *rspA* („regulator of stationary phase A“) annotiertes Gen, sowie die vor Kurzem in der Arbeitsgruppe Mevarech an der Universität von Tel-Aviv entdeckten Gene, welche für Histon Acetyltransferasen (Pat1, Pat2, Elp3) bzw. Deacetylasen (HdaI, Sir2) in *H. volcanii* kodieren. Durch die Arbeiten konnte zudem ein Gen für ein Histon-ähnliches Protein sowie konservierte Lysinreste identifiziert werden, die Ziele für eine Acetylierung in eukaryotischem Histon H3 sind.

Neben den Microarray Analysen sollten die Mutanten durch morphologische, mikrobiologische und biochemische Untersuchungen näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten abhängig oder unabhängig der Resultate aus den Microarray Analysen nach Phänotypen der Mutanten gesucht werden, um die Funktion der Gene aufzuklären.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von *iftA*

3.1.1 *In silico* Analysen zur Funktionsaufklärung

Die Enolase Superfamilie besteht aus einer Vielzahl an Proteinen mit diversesten Funktionen. Darunter befinden sich sowohl Enzyme, die Reaktionen in verschiedenen Stoffwechselwegen katalysieren, als auch regulatorische Proteine. Um eine Vorhersage über die mögliche Funktion des Proteins, welches von HVO_1488 kodiert wird, treffen zu können, wurden zunächst verschiedene *in silico* Untersuchungen durchgeführt.

Das Gen HVO_1488 ist auf dem Hauptchromosom von *H. volcanii* lokalisiert (chr:1.358.000 1.359.238; http://archaea.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?g=refSeq&i=HVO_1488). Es hat eine Größe von 1.239 bp und kodiert für ein 412 Aminosäuren großes Protein mit der kalkulierten Masse von 45,8 kDa. Der Theoretische Isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei 4,49.

Stromabwärts von HVO_1488 liegt in umgekehrter Orientierung das Gen HVO_1487, das als Galaktokinase annotiert ist. HVO_1489 liegt stromaufwärts und kodiert in selber Orientierung für ein hypotetisches Protein. Der intergene Bereich zwischen beiden Genen ist 85 bp lang und damit groß genug für einen Promotor für *iftA*. Durch die Arbeiten von Mariam Brenneis (2007) konnte gezeigt werden, dass in diesem Bereich mit einer sehr hohen Ähnlichkeit sowohl ein BR-Element als auch eine TATA-Box liegen (»AAA« und »TTTACTAA«). Beide Elemente besitzen die korrekte Anordnung und Distanz stromaufwärts vom Transkriptionsstart von HVO_1488. Das Primärtranskript von *iftA* konnte bei diesen Untersuchungen als leaderlos und unmittelbar mit dem Adenin des Startcodons beginnend identifiziert werden. All diese Daten deuten daher auf ein monocistronisches mRNA-Transkript von *iftA* hin.

Eine Suche nach homologen Proteinen von IftA in anderen Organismen ergab Treffer mit einer hohen Identität in drei Vertretern der Haloarchaea: *Haloarcula marismortui* (88%), *Halobacterium salinarum* (88%) und *Haloquadratum walsbyi* (85%). Im vierten Haloarchaeon *Natronomonas pharaonis*, dessen Genomsequenz bekannt ist, konnte kein IftA-homolog gefunden werden. Trotz der sehr hohen Identitäten sind die genomische Lokalisation von *iftA* sowie die Anordnung um das Gen herum in den Spezies nicht hoch

<i>IftA</i>	(1)	MGKN---YA	DLHDPNAEYT	MRELSAETMG	VTAKRGGGRD	VEITDVQTTM	VDGNFPWTLV	RIYDAGVVG	TG-EAYWGAG	----VPELIE	RMKPFVIGEN
<i>H. marismortui</i>	(1)	MGKANDVDYA	DLHDPNAEYT	MRELSAETMG	VTAKRGGGRD	VEITDVQTTM	VDGNFPWTLV	RIYDAGVVG	TG-EAYWGAG	----VPELIE	RMKPFVIGEN
<i>E. coli</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	MKIIVKAEVVF	TOPGRNFVTL	KITTEDGITG	LG-DATLNGR	ELSVASYLQD	HLCPLQLGRD
<i>S. coelicolor</i>	(1)	-----	-----	-----	-----	MKITAADVVV	TSPGRNFVTL	RITTEDGLTG	LG-DATLNGR	ELAVEAYLRE	HVAPLLLGRD
<i>P. putida</i>	(1)	-----	-----	---MSEVLIT	GLRTRAVNVV	LAYPVHTAVG	TVGTAPLVLI	DLATSAGVVG	HSYLFAYPV	ALKSLKQLLD	DMAAMIVNEP
<i>IftA</i>	(92)	PLDIDRLYEH	LVQKMSGEGS	VEGVTVTAIS	GIEVALHDLA	GKILDIIPAYQ	LLGGKYRDKV	RVXCDCHTEE	EADPEACADE	AERVVDELGY	DALKFDLDDV
<i>H. marismortui</i>	(96)	PLDIDRLYEH	LIQKMSGEGS	VEGVTVTAIA	GIEVALHDLA	GKILEVPAIQ	LLGGKYRDEM	RVXCDCHTEE	EADPEACAE	ARRVVDELGY	DALKFDLDDV
<i>E. coli</i>	(60)	AHRIEDIWQF	FYKGAYWRR-	-GPVTMSAIS	AVDMALWDIK	AKAANMPLYQ	LLGGASREGV	MVXC--HTTG	HSIDEALDDY	AR--HQELGF	KAIRVQCQGI
<i>S. coelicolor</i>	(60)	AHAVEIDTQY	LYRGAYWRR-	-GPVTMAAVA	AVDMALWDIK	CKAAGMPLYQ	LLGGACRTGA	LAYG--HASG	RDIPPELLSV	RE--HLADGF	RAVRIQSGI
<i>P. putida</i>	(78)	LAPVS--LEA	MLAKRFCLAG	YTGLIRMAAA	GIDMAAWDAL	GKHVETPLVK	LLGANARF-V	QAVDSHSLDG	---VKLATE	RAVTAELGF	RAVKTKIGY
<i>IftA</i>	(191)	-----	-----SGHE	KDRANRH--	-LRPGE---	----IRHKAE	IVEKVTERVK	DKADVAEDCH	WTFS-GGSAK	RLAAELEDYD	VWLEDDVPP
<i>H. marismortui</i>	(195)	-----	-----SGLE	KDRANRH--	-LRPGE---	----IRHKAE	IVEKVTEEVK	DEADVAEDCH	WTFS-GSSGK	RLAAEIEEYD	VWLEDDVPP
<i>E. coli</i>	(154)	GMKTTYGMSK	----GKGLA	YEPATKG---	-QWPEEQLWS	TEKYLDPMFK	LFDAVRNKFG	FNEHLLHDMH	HRLT-PIEAA	RFGKSIDERY	MFWMEDPTPA
<i>S. coelicolor</i>	(154)	GLDSVYGVAA	SAAGDGDTRYD	YEPARRTGAA	HRPRTEETWD	TRAYLRHMPT	VEFAVRHTFG	FELPLLHDGH	HRMT-PIQAA	RLGKDLPEYD	LFWLEDATPG
<i>P. putida</i>	(170)	-----	-----	-----	-----	---ALDQLA	VVRSIRQAVG	DDFGIMVDYN	QSLD-VPAAI	KRSQALQQEG	VTWLEEDTLQ
<i>IftA</i>	(262)	-ENLDVQEEV	TKSTLTETIV	GENRYRVTEL	RRLIENQAVD	IVAPDMPKVG	GMRTEQKIAD	VANQYYVPVA	MHNVS--SPV	ATMASAHVGT	AIPNSLAVEY
<i>H. marismortui</i>	(266)	-ENIEVQEEV	TKSTTTEITV	GENRYRVTEE	RRLIENQAVD	MIAPDMPKVG	GMRRETRKVD	VANQYYIPVA	MHNVS--SPI	ATMASAHVGA	AVPNLSLAVEY
<i>E. coli</i>	(243)	-ENQECFRLI	RQHTVTEIAV	GEVFNISWDC	KQLIEEQLID	YIRTTLTHAG	GITGMRRIAD	FASLYQVRTG	SHGPSDLSPV	CMAAALHFDL	WVNFEGVQEY
<i>S. coelicolor</i>	(252)	-EQQALRLI	REHTTTELAI	GEVFNVDHY	TTLQERLID	YVRSAVTHTG	GITAVRKLID	MAVYGIKSG	MHGPTDISPV	GMAAALHLLD	AVHNFQIQEY
<i>P. putida</i>	(226)	-HDYEGHQRI	QSKLNVEVQM	GENWLGPEEM	FKALSIGACR	LAMPDAMKIG	GVTGWIRASA	LAQQGIPMPS	SHLFQ-----	--ELSAHLIA	ATPTAHLER
<i>IftA</i>	(360)	HSYELGWDD	LVEETVIEDG	YIEIPEKFGI	GVTLDMDTVE	EHMVDGETLF	DEA-----	---			
<i>H. marismortui</i>	(364)	HSYELGWDD	LVEETVIEDG	YIEIPEEFGI	GLTLDLDAVE	EHVVDGETVF	DEA-----	---			
<i>E. coli</i>	(343)	MGYEQMLEV	FPHNWTFDNG	YMHGDKKPLG	GIEFDEKLAA	KYPYEPAYLP	VARLEDGTLV	NW-			
<i>S. coelicolor</i>	(352)	MRHAPDTLEV	FRTSYRFEDG	LLHFGAEPGL	GVELDDGAAA	RFPYEPAYLP	VNRLSDGTVH	DW-			
<i>P. putida</i>	(319)	LDLAG---SV	IEPILTFEGG	NAVIPDLKGG	GIIWREKEIG	KYLV	-----	---			

Abbildung 5

Vergleich der IftA Protein Sequenz mit verschiedenen COG1441 Mitgliedern. Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt. Die fünf Sequenzen sind IftA aus *H.volcanii*, das homologe Protein aus *H.marismortui*, RspA aus *E.coli*, SpaA aus *S.coelicolor* und die Mandelat Racemase aus *P.putida*. Zu 100% konservierte Aminosäuren sind fett und grau hinterlegt. Sieben Reste, die am katalytischen Zentrum beteiligt sind, sind unterhalb der Sequenzen mit einem Stern markiert. Drei dieser Aminosäuren sind an der Komplexierung des Mg^{2+} -Ions beteiligt und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Position mit dem Kreis ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal der Mandelat Racemasen innerhalb der Enolase Superfamilie: Aspartat oder Threonin.

konserviert. Dadurch läßt sich keine Vorhersage über eine mögliche Funktion durch die Syntenie treffen. Es konnten zudem keine regulatorischen *cis*-Elemente im Upstream-Bereich von *iftA* gefunden werden.

Um den evolutionären Hintergrund aufzuklären, wurde ein „multiple sequence alignment“ mit der Proteinsequenz von IftA mit allen sieben bereits bekannten archaealen COG1441 Mitgliedern sowie 24 ausgesuchten bakteriellen Vertretern unterschiedlicher Unterfamilien erstellt. Mit diesen Sequenzen wurden mehrere phylogenetische Stammbäume mit den Einstellungen „parsimony“ und „distance matrix“ erzeugt. Diese Analysen zeigten die Zugehörigkeit von IftA zu der Familie der Mandelat Racemasen, welche zur Enolase Superfamilie COG1441 gehört. Die Stammbäume zeigten jedoch auch, dass die Sequenz Konservierung innerhalb der Enolase Superfamilie sehr stark voneinander differiert, so dass eine Vorhersage der Funktionsweise und mögliche Substratspezifität von IftA nicht möglich war.

Abbildung 5 zeigt das Alignment von IftA mit vier unterschiedlichen Vertretern der Mandelat Racemase Unterfamilie. Darunter sind die regulatorischen Proteine RspA von *E. coli* sowie SpaA von *S. coelicolor*. Eine weitere Sequenz stammt von der Mandelat Racemase aus *P. putida*, deren 3D-Struktur und Funktion bereits aufgeklärt wurde. Das für die erste Reaktion essentielle Mg^{2+} -Ion wird dabei von drei konservierten negativ geladenen

Aminosäuren gebunden (Pfeil oberhalb der Sequenzen). Insgesamt wurden sieben Reste in *P. putida* identifiziert, die im katalytischen Zentrum an der enzymatischen Reaktion beteiligt sind (Lando *et al.*, 1994). Sechs davon sind auch in IftA von *H. volcanii* konserviert. Das Siebte – ein Lysin – ist durch ein Aspartat ersetzt worden, was daraufhin deutet, dass Mandelat nicht das Substrat von IftA ist.

Die *in silico* Untersuchungen haben zusammenfassend keinen eindeutigen Hinweis ergeben, welche genaue Funktion IftA in *Haloferax volcanii* besitzen könnte. Um sich der Antwort zu nähern, sollte im ersten Schritt eine *in frame*-Deletionsmutante hergestellt und die möglichen phenotypischen Auswirkungen im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden.

3.1.2 *in frame* Deletionsmutante von *iftA*

Die Deletionsmutante wurde mit der sogenannten „pop-in/pop-out“-Methode (Allers *et al.*, 2004; van Ooyen & Soppa, 2007) hergestellt. Dabei wird durch zwei aufeinanderfolgende Selektionsschritte das Gen durch eine *in frame* deletierte Kopie ersetzt.

Abbildung 6a zeigt die schematische Darstellung der genomischen Anordnung um das Gen *iftA* im Wildtyp, nach der Integration des Plasmids mit der Deletionsvarianten des Gens und die *in frame* Deletionsmutante nach erfolgreichem „Pop-out“. Alle drei Varianten wurden mit der Southern Blot Analyse nachgewiesen (**Abbildung 6b**).

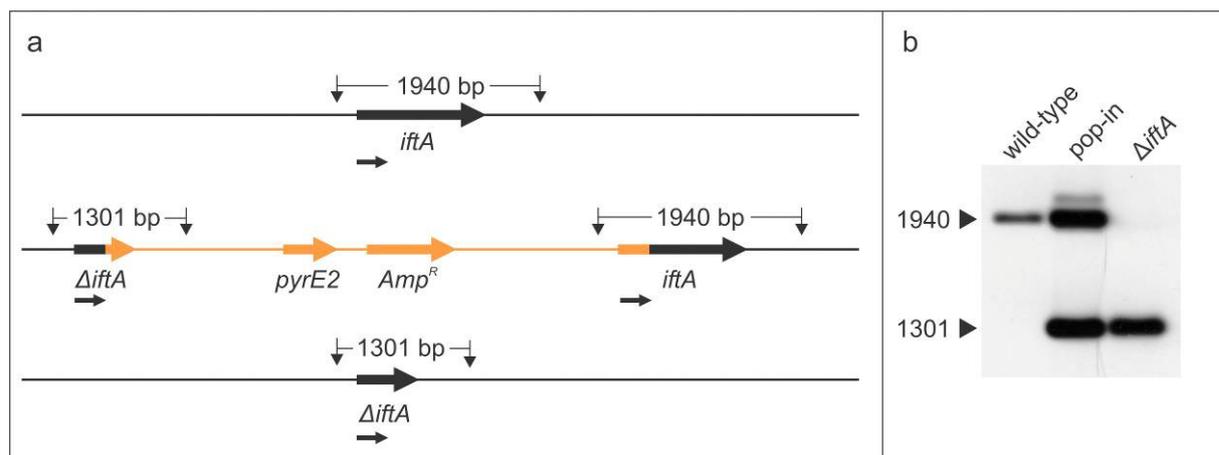
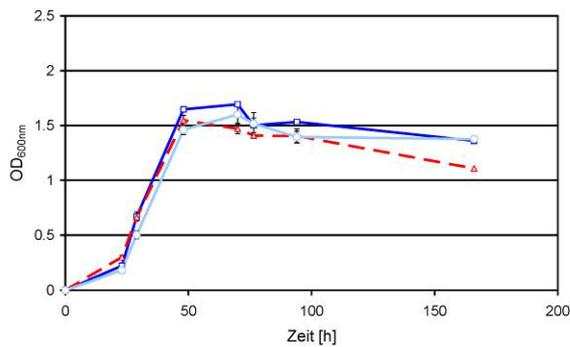


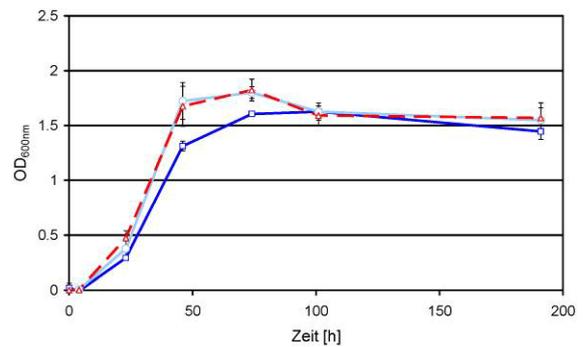
Abbildung 6

Konstruktion der *in frame* Deletionsmutante. **a** Die Anordnung der Gene im Genom von *Haloferax volcanii* ist schematisch für den Wildtyp (Oben), die „pop-in“-Variante mit integriertem Plasmid (orange; Mitte) und *in frame* Deletionsmutante (Unten) dargestellt. Restriktionsschnittstellen und die Größe der resultierenden Fragmente werden durch die senkrechten Pfeile markiert. Unterhalb der jeweiligen Schemata ist die verwendete Sonde zum Nachweis mittels Southern Blot Analyse gezeigt (waagrechter Pfeil). **b** Ergebnis der Southern Blot Analyse.

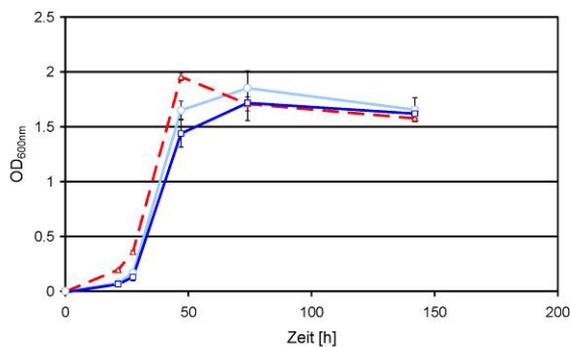
a. Komplex → Komplex



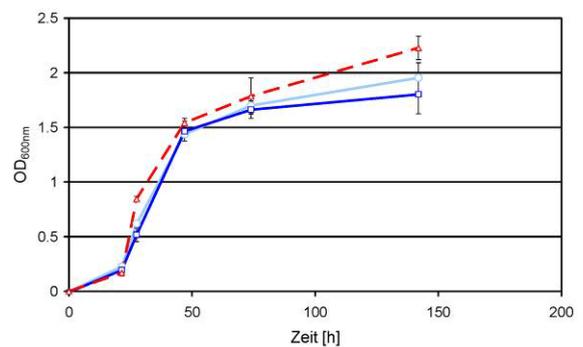
b. Cas → Cas



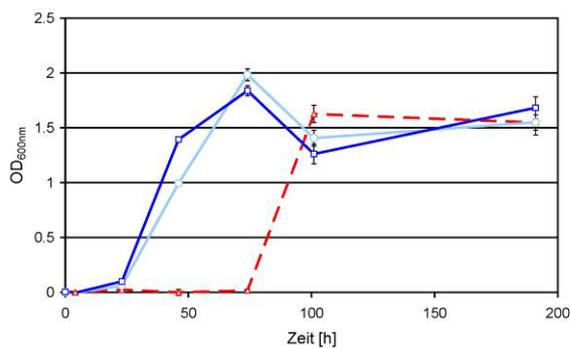
c. Glc → Glc



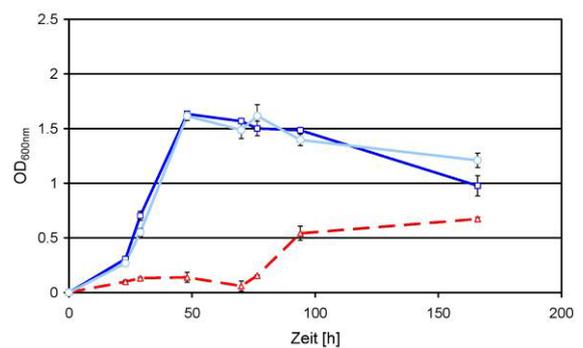
d. Glc → Cas



e. Cas → Glc



f. Komplex → Glc

**Abbildung 7**

Untersuchung des Phenotyps der *iftA* Deletionsmutante. Die Wachstumskurven zeigen in **blau** den Wildtyp, **rot gestrichelt** die Deletionsmutante und die komplementierte Mutante in **hellblau**. Für die Kurven wurden drei unabhängige biologische Replikate gemessen und die Durchschnittswerte sowie Standardabweichungen berechnet. Wachstum in **a** Komplexmedium, **b** Casaminosäuren und **c** Glukose. Wechsel der Kohlenstoffquelle von **d** Glukose zu Casaminosäuren, **e** Casaminosäuren zu Glukose und **f** Komplexmedium zu Glukose. In allen Fällen wurde eine stationäre Vorkultur als Inokulum verwendet.

Mit der Deletionsmutanten wurden anschließend Wachstumsversuche im unmittelbaren Vergleich mit dem Wildtyp durchgeführt. Dazu wurden weit mehr als die in **Abbildung 7** gezeigten Wachstumsbedingungen getestet. In nahezu allen Fällen konnte kein Unterschied der Mutante zum Wildtyp festgestellt werden. In **Abbildung 7** sind einige ausgesuchte Wachstumskurven exemplarisch dargestellt. Die Mutante zeigte keinerlei Phänotyp, wenn (1) stationäre Zellen aus Komplexmedium in das gleiche Medium

überimpft wurden (**Abbildung 7a**), (2) Casaminosäure-Medium mit stationären Zellen aus dem gleichen Medium angeimpft wurde (**Abbildung 7b**), (3) Glukosemedium mit einem stationären Inokulum aus der gleichen Kohlenstoffquelle angeimpft wurde (**Abbildung 7c**), Zellen aus jedem der drei bisher genannten Medien in Casaminosäure-Medium (**Abbildung 7d**) oder Komplexmedium überimpft wurden. Sobald jedoch ein Wechsel der Kohlenstoffquelle von Casaminosäuren (**Abbildung 7e**) oder Komplexmedium (**Abbildung 7f**) zu Glukose statt fand, zeigte die Mutante eine deutlich längere Lagphase im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Phenotyp änderte sich nicht, wenn das Inokulum aus unterschiedlichen Wachstumsphasen – exponentiell, spät-exponentiell usw. – stammte. Schon in der Arbeit von Alexander Zaigler (2003) konnte gezeigt werden, dass *H. volcanii* Casaminosäuren als Kohlenstoffquelle gegenüber Glukose bevorzugt. Das spiegelte sich in einer geringeren Generationszeit wider.

Als Kontrolle, dass der Phenotyp nur durch die Deletion von *iftA* hervorgerufen wird, wurde die Mutante durch ein entsprechendes Plasmid, welches die Kopie des Wildtypgens unter einem konstitutiven Promotor trägt, komplementiert. Die komplementierte Mutante zeigte anschließend keinen Phenotyp und wuchs in allen getesteten Medien im gleichen Maße wie der Wildtyp (**Abbildung 7**).

3.1.3 Medium- und Wachstumsphasen-abhängige Expression von *iftA*

Da der Phenotyp der Mutante erst beim Wechsel von einem reichhaltigeren zu einem nährstoffärmeren Medium in Erscheinung trat, sollte im Anschluß an die Wachstumsversuche ein Expressionsprofil von *iftA* erstellt werden. Dazu wurden zunächst im Wildtyp Northern Blot Analysen zur Charakterisierung der Transkription von *iftA* im Verlauf des Wachstums durchgeführt. Der Nachweis zeigte ein einzelnes Transkript mit einer ermittelten Größe von 1.350 nt \pm 85 nt ($n = 6$; **Abbildung 8**). Der Vergleich mit dem annotierten offenen Leserahmen (1.239 nt) zeigte, dass *iftA* für ein monocistronisches Transkript kodiert. Dieses Ergebnis entspricht auch der genomische Organisation. Die ermittelte Größe des *iftA* Transkriptes ist 111 nt (\pm 85 nt) größer als der offene Leserahmen, was auf ein um eine 5'- und/oder 3'-UTR verlängertes Transkript hindeutet. Brenneis *et al.* (2007) konnte bereits zeigen, dass das *iftA* Transkript leaderlos ist und eine 153 nt große 3'-UTR besitzt. Beide Ergebnisse stehen somit in Einklang. Während der Northern Blot Analysen wurde auch das Transkript für das verkürzte *iftA* Gen der Mutante nachgewiesen (ohne Abbildung).

Für die Northern Blot Analysen wurde der Wildtyp jeweils bis in die stationäre Wachstumsphase inkubiert und als Inokulum eingesetzt. Wenn die Zellen von Komplexmedium in das gleiche Medium überimpft wurden, zeigte *iftA* einen erheblichen Anstieg der Transkriptmenge schon kurz (4h) nach der Überimpfung (**Abbildung 8a**). Das Transkript war ebenso schnell wieder runter reguliert. Diese transiente Expression von *iftA* zeugt für eine regulierende Funktion des Gens beim Übergang von der ruhenden, stationären Phase in das exponentielle Wachstum. Das gleiche Expressionsverhalten konnte für das Wachstum in Casaminsäuren nachgewiesen werden (**Abbildung 8b**). Bei Wachstum auf Glukose hingegen wurde das Transkript von *iftA* zwar ebenfalls sehr schnell hoch reguliert, jedoch fand danach im Verlauf des Wachstums keine Runterregulierung statt (**Abbildung 8c**), so dass *iftA* bis in die späte stationäre Phase in hohem Maße nachweisbar war. Der Unterschied zwischen transienter und andauernder Expression von *iftA* in Casaminsäuren bzw. Glukose wurde auch durch zwei weitere Ergebnisse unterstützt (**Abbildung 8d-e**). Die transiente Induktion konnte auch beim Überimpfen von stationärem Inokulum aus Glukose- in Casaminsäuremedium

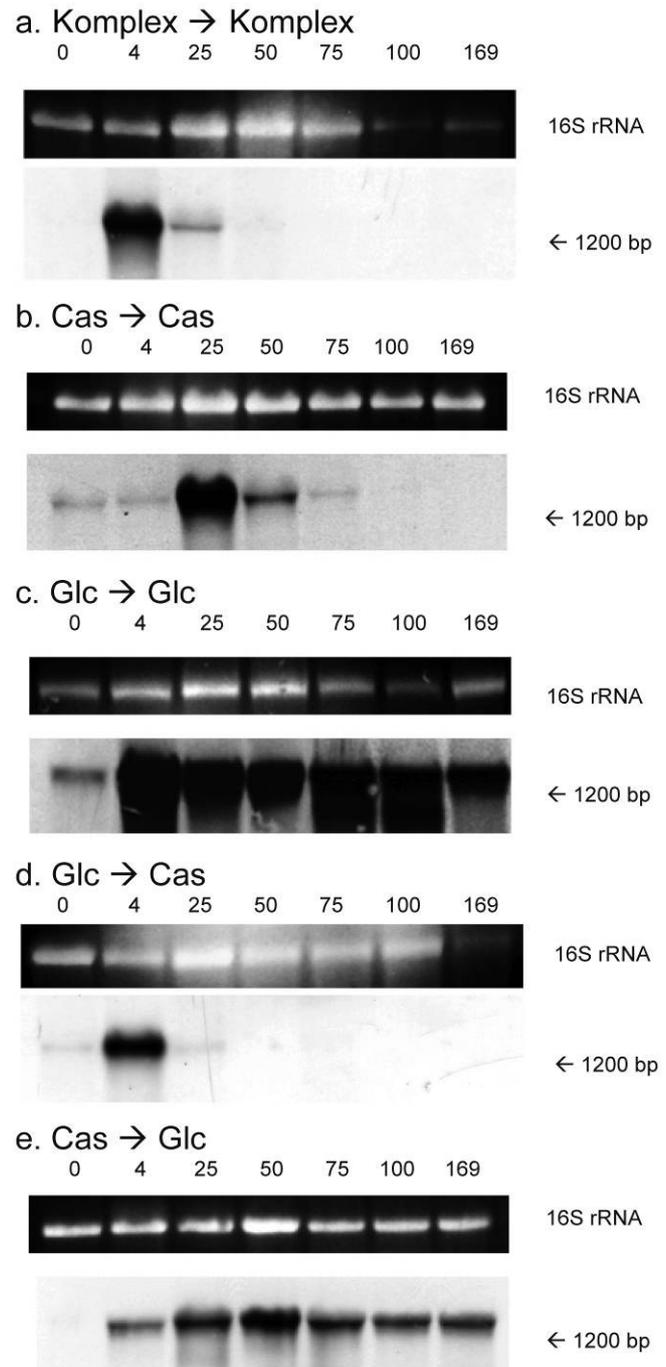


Abbildung 8

Transkriptlevel von *iftA* nach Überimpfung stationärer Kulturen in frisches Medium. In der oberen Zeile ist jeweils die durch Ethidiumbromid gefärbte 16S rRNA als Ladekontrolle zu sehen. Darunter ist der entwickelte Northern Blot zum Nachweis des *iftA* Transkriptes dargestellt. Die Zahlen oberhalb jeder Grafik bezeichnen den Zeitpunkt (in h) der Probenentnahme. **a-e** Die Kulturen wurden in unterschiedlichen Medien bis zur stationären Wachstumsphase inkubiert und ein Inokulum in frisches Medium überführt. Über jeder Grafik ist das der Wechsel der Kohlenstoffquelle angegeben.

beobachtet werden. Wohingegen das Überimpfen einer stationären Kultur aus Casaminsäure- in Glukosemedium anhaltende Expression zeigte. Alle Experimente wurden in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt.

In allen untersuchten Bedingungen konnte eine schnelle Induktion von *iftA* nach Überimpfen der Kultur in frisches Medium beobachtet werden. Ein großer Unterschied bestand in der persistenten Expression des Gens in Glukosemedium im Vergleich zur transienten Induktion auf Casaminsäure- oder Komplexmedium, bei der das Transkript schon nach sehr kurzer Zeit wieder runter reguliert wurde.

Da der Transkriptlevel alleine nichts über das tatsächlich exprimierte Protein aussagt, wurden parallel Western Blot Analysen durchgeführt. Um das Protein später nachweisen zu können und kein spezifischer Antikörper verfügbar war, wurde ein Genkonstrukt von *iftA* erzeugt, welches für ein Protein mit angehängtem Hexahistidin-Tag kodiert. Das native Gen des Wildtyps wurde mithilfe der „pop-in/pop-out“ Methode durch das Konstrukt ausgetauscht. Dadurch konnte ein Stamm erzeugt werden, der ein nachweisbares IftA in unveränderter Genomanordnung und nativem Promotor besitzt. Dieser Stamm zeigte keinerlei Phenotyp nach Überimpfen von Casaminsäure- zu Glukosemedium im Vergleich zum Wildtyp, was für ein voll funktionsfähiges Protein spricht.

Die Western Blot Analysen sind in **Abbildung 9** dargestellt. Wenn die Kulturen nach Überimpfen in Komplex- oder Casaminsäuremedium wuchsen, konnte das Protein nur

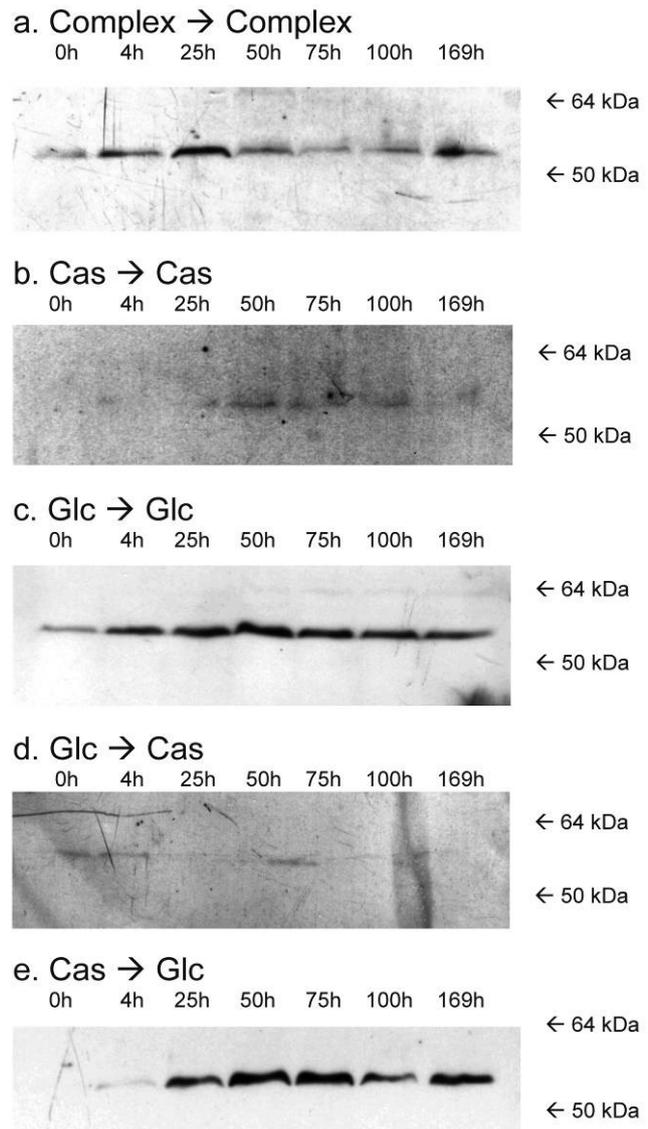


Abbildung 9

Proteinlevel von IftA nach Überimpfung von stationären Kulturen in frisches Medium. Der Nachweis erfolgte mit kommerziellen Tetrahistidin Antikörper (Qiagen, Hilden). **a-e** Die gewählten Bedingungen entsprachen exakt denen, der Northern Blot Analysen.

nach Überbelichtung des Films schwach nachgewiesen werden (**Abbildung 9a, b, d**). Im direkten Vergleich mit den entsprechenden Northern Blot Analysen aus **Abbildung 8** kann auf der Proteinebene kein gleichzeitiger steiler Anstieg der Expression des Proteins beobachtet werden. Hier erfolgt eine Regulation auf translationeller Ebene. In Komplexmedium erfolgte eine leichte Erhöhung der Expression von IftA nach 25 h (**Abbildung 9a**), während kein eindeutig induziertes Signal für das Protein in Casaminsäuremedium zu sehen war (**Abbildung 9b, d**). Bei Wachstum in Glukosemedium hingegen konnte eine schnelle Induktion sowie die durchgehende Expression von IftA nachgewiesen werden (**Abbildung 9c, e**). Unter diesen Bedingungen entsprachen die Ergebnisse der Induktion des Proteinlevels sehr genau zu den Northern Blot Analysen (vgl. **Abbildung 8** und **Abbildung 9**).

Die Ergebnisse der Analysen zeigten, dass die Expression von *iftA* in Glukosemedium über den gesamten Wachstumsverlauf induziert wurde, während IftA in Casaminsäure- oder Komplexmedium nur transient expremiert wurde.

3.1.4 Untersuchung des Transkriptoms in Abhängigkeit von IftA

Der Phenotyp der Mutante und die bisherigen Untersuchungen deuteten auf eine wichtige Funktion von IftA beim Wechsel der Kohlenstoffquelle von einem reicheren zu einem ärmeren Medium oder beim Wechsel der stationären zur exponentiellen Phase hin. Um eine erste Annäherung über die mögliche Funktionweise von IftA zu erhalten, wurde das Transkriptom des Wildtyps und der Mutante nach Überimpfen von der stationären Wachstumsphase aus Komplexmedium in frisches Medium untersucht. Unter diesen Bedingungen zeigte die Mutante keinerlei Wachstumsdefizite im Vergleich zum Wildtyp (**Abbildung 7a**). Dadurch waren die Transkriptom Analysen nicht durch sekundäre Nebeneffekte gestört, was eine Interpretation der Ergebnisse erschwert hätte. Die Analyse erfolgte 25 h nach Überimpfung der Kultur in frisches Medium, was dem Zeitpunkt entspricht, bei dem eine Induktion von IftA nachweisbar war (**Abbildung 9a**). Für die Untersuchungen wurde ein Shotgun DNA Microarray verwendet, der bereits in mehreren Studien erfolgreich angewendet wurde (Zaigler *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2007; Large *et al.*, 2007). Insgesamt wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt und die durchschnittlichen Induktionslevel von Mutante zu Wildtyp sowie Standardabweichungen berechnet. Insgesamt zeigten 31 Transkripte in der Mutante eine um mindestens das Zweifache veränderte Expression gegenüber dem Wildtyp. Das entspricht etwa 1% des

Gesamtgenoms, welches durch die Deletion von *IftA* reguliert wird. In **Tabelle 3** sind alle 31 unterschiedlich regulierten Transkripte und ihre putative Funktion aufgelistet. Insgesamt repräsentieren die Transkripte nur wenige verschiedene Funktionsgruppen. In einigen Fällen kodieren mehrere Klone für den gleichen Genomabschnitt, z.B. ABC Transporter oder den 2-Oxosäure-Dehydrogenase Komplex. Dies reduzierte die Liste der differentiellen Funktionen, die durch *IftA* im Wildtyp oder der Mutante reguliert wurden.

Tabelle 3Regulierte ORFs in der *ΔiftA* Mutante

Bezeichnung	ORF	Beschreibung / Funktion	Änderung der Expression ± StAbw
437-E03	HVO_2694	Putative ABC transporter permease protein	4.7 ± 0.7
446-C08	HVO_2695	Sugar ABC transporter substrate binding protein	4.7 ± 1.0
OADH1 E1β	HVO_2959	2-oxo acid dehydrogenase complex 1 E1β subunit	3.7 ± 0.5
459-E03	HVO_2692	Sugar ABC transporter ATP-binding protein	3.6 ± 0.5
440-A11	HVO_A0146	Sugar ABC transporter ATP-binding protein	3.4 ± 0.2
437-G12	HVO_2960	2-oxo acid dehydrogenase complex 1 E2 subunit	3.4 ± 1.7
455-D01	HVO_0104	DNA repair and recombination protein; RadA	3.3 ± 0.2
458-E01	HVO_2961	2-oxo acid dehydrogenase complex 1 E3 subunit	3.2 ± 1.0
438-C02	HVO_2958	2-oxo acid dehydrogenase complex 1 E1α subunit	3.2 ± 0.1
458-A10	HVO_2959	2-oxo acid dehydrogenase complex 1 E1β subunit	3.1 ± 0.7
451-B05	HVO_2690	Oxidoreductase	3.1 ± 0.3
OADH1 E3	HVO_2961	2-oxo acid dehydrogenase complex 1 E3 subunit	3.1 ± 1.5
OADH1 E1α	HVO_2958	2-oxo acid dehydrogenase complex 1 E1α subunit	3.0 ± 0.6
459A05	HVO_2690	Oxidoreductase	2.4 ± 0.5
448A10	HVO_2957	Lipoic acid synthetase	2.1 ± 0.3
432-F8	HVO_A0467	Putative lipid/cholesterol transport	0.5 ± 0.3
459-D6	HVO_2622	Aldehyde reductase / maltose transacetylase	0.5 ± 0.3
432-H4	HVO_0497	Conditioned medium-induced protein 9	0.5 ± 0.1
436-G10	HVO_2508	Carbamoyl-phosphate synthase small subunit	0.5 ± 0.2
448-H3	HVO_1446	Fructose-1,6-bisphosphatase	0.5 ± 0.9
<i>iftA</i>	HVO_1488	Starvation sensing protein	0.5 ± 0.2
457-D3	HVO_1150	IS200-type transposase	0.5 ± 0.1
456-F6	HVO_0494	Putative transcription regulator	0.5 ± 0.0
448-G3	HVO_1091	Alpha-1 subunit of 20S proteasome	0.5 ± 0.2
432-D4	HVO_2374	Phosphate regulatory protein homolog; Prp1	0.5 ± 0.3
435-H10	HVO_0884	Aldehyde reductase	0.5 ± 0.3
443-G12	HVO_2598	Polyphosphate kinase	0.4 ± 0.2
434-F4	HVO_0948	Putative stress response protein	0.4 ± 0.1
431-H3	HVO_2376	Phosphate ABC transporter permease; PstC2	0.3 ± 0.1
435-H11	HVO_2599	Serine/threonine protein phosphatase	0.3 ± 0.1
431-D7	HVO_2376	Phosphate ABC transporter permease; PstC2	0.2 ± 0.1

3.2 Genregulation durch Protein-Acetylierung/Deacetylierung

3.2.1 Charakterisierung der Histonmutanten

In *H. volcanii* konnte das Histon im Rahmen der Promotion von Neta Altman-Price in der Arbeitsgruppe Mevarech in Tel-Aviv nicht deletiert werden und ist daher essentiell (Altman-Price & Mevarech, 2009). Um trotzdem eine Aussage über die Funktion der Histone und ihren Einfluß auf die Zelle untersuchen zu können, wurden verschiedene Substitutionen am Protein durchgeführt. Das Histon in *H. volcanii* besitzt zwei konservierte Lysinreste an

Position 56 und 120, welche Ziele für eine Acetylierung sind (Altman-Price, unveröffentlichte Daten). Die Veränderung der beiden Aminosäuren zu Glutamin simuliert eine dauerhafte Acetylierung, wohingegen eine Arginin-Substitution den konstanten Zustand einer Deacetylierung kopiert. Beide Mutationen sind irreversibel und für eine Acetylierung nicht mehr zugänglich. Der Austausch der Aminosäuren hatte wachstumsphasenabhängige Auswirkungen auf das Überleben der Zellen. In erster Annäherung wurden daher morphologische Untersuchungen durchgeführt und Zellen des Wildtyps und der beiden Mutanten K56R, K120R (RR) und K56Q, K120Q (QQ) miteinander verglichen. In allen Fällen unterschieden sich die Kulturen beim Wachstum in Komplexmedium nicht von einander (**Abbildung 10**). Auch konnte bei mikroskopischen Untersuchungen kein morphologischer Unterschied in der exponentiellen Wachstumsphase festgestellt werden (**Abbildung 11a-c**). Im Gegensatz hierzu unterschieden sich Wildtyp und Mutanten in ihrer Morphologie sehr deutlich von einander, wenn die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreichten. Die Zellen der Mutanten (**Abbildung 11e,f**) waren im Mittel etwa um das Vierfache länger als der Wildtyp (**Abbildung 11d**).

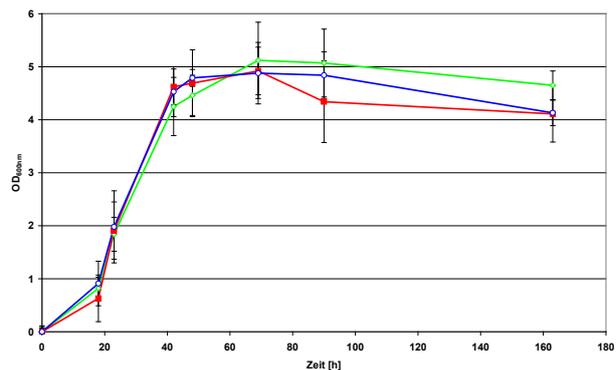
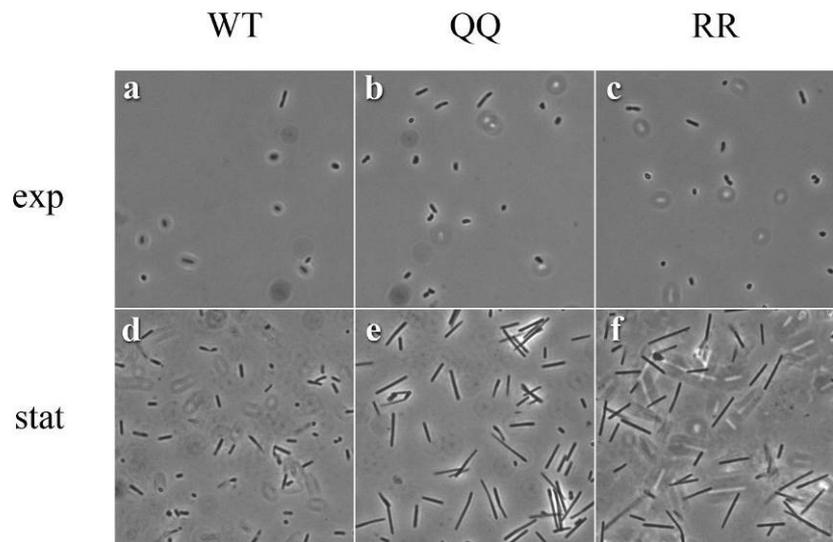


Abbildung 10

Graphische Darstellung des Wachstums von Wildtyp (rot) und der Histonmutanten QQ (grün) und RR (blau). Es wurde das Wachstum von drei unabhängige Kulturen gemessen.

Abbildung 11

Mikroskopische Aufnahmen von Wildtyp und Histonmutanten in unterschiedlichen Wachstumsphasen. **a-c** In der oberen Reihe ist die exponentielle Wachstumsphase nach 24 h zu sehen. **d-f** Die untere Reihe stellt die Kulturen in der stationären Wachstumsphase dar. Von links nach rechts sind jeweils der Wildtyp und die Mutanten QQ und RR zu sehen.



3.2.2 Transkriptom abhängig von Histonacetylierungen

Welchen Einfluß die acetylierte bzw. deacetylierte Form des Histons auf die Zelle hat, wurde durch Transkriptom Analysen mittels Microarrays untersucht. Um die Wirkung sekundärer Wachstumseffekte auszuschließen, wurden die Kulturen in Komplexmedium gezogen und für mindestens 30 Generationen in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten bevor die Proben entnommen wurden. Für die Analysen wurde das Transkriptom der Histonmutante gegen das des Wildtyps verglichen. Insgesamt wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt und ausgewertet (**Tabelle 4** und **Tabelle 5**).

3.2.2.1 Der Acetylierte Zustand

Bei den Untersuchungen der Histonmutante, deren Lysinreste an Position 56 und 120 durch Glutamin ersetzt wurden und damit einen dauerhaft acetylierten Zustand des Histons simulieren, waren insgesamt 107 Transkripte differentiell reguliert (**Tabelle 4**). Das entspricht ungefähr 3,5% aller Gene. 77 Transkripte waren mehr als das Doppelte in der Mutante induziert. Die Funktionen sind sehr divers, jedoch sind einige Transkripte oder Funktionsklassen besonders häufig vertreten: Muc19 Precursor protein, Transporter oder hypothetische Proteine. Insgesamt waren 30 Transkripte reprimiert. Auch hier waren die

Funktionsklassen sehr weit gestreut. Auffällig waren mehrere Transkripte, die für Kinase, ATPasen, Transducer Proteine und Flagellenbiosynthese und -sekregation kodieren.

Insgesamt wurden auch acht kleine RNAs reguliert, deren Funktion bis jetzt jedoch noch nicht geklärt wurde.

Tabelle 4

Regulierte ORFs in der Histonmutante K56Q, K120Q

Bezeichnung	Beschreibung / Funktion	Anderung der Expression ± StAbw
<i>457E4</i>	Muc19 precursor	14 ± 7.4
<i>436H10</i>	Muc19 precursor	13.9 ± 11.7
<i>451D8</i>	universal stress protein, hypothetical	11.8 ± 18.4
<i>445D7</i>	unknown	11.5 ± 7.8
<i>436G4</i>	ribose ABC transporter	11.4 ± 9
<i>449H8</i>	methionyl-tRNA synthetase, hypothetical	8.6 ± 12.9
<i>439E11</i>	Muc19 precursor	8.5 ± 4.1
<i>457G9</i>	Muc19 precursor	8.1 ± 0.9
<i>452B3</i>	Muc19 precursor	7.9 ± 4.1
<i>458A8</i>	NAD ⁺ synthetase, enoyl-CoA hydratase	7.6 ± 10.8
<i>458C12</i>	unknown	7.3 ± 14.4
<i>440F8</i>	hypothetical	6.3 ± 2.9
sRNA194		6.1 ± 7.2
sRNA194_100uM		6.1 ± 7.1
<i>456C9</i>	Adenylyl cyclase, hypothetical	5.9 ± 2.5
<i>452H8</i>	ribose ABC transporter	5.1 ± 1.4
<i>439G7</i>	excinuclease ABC, NTP pyrophosphohydrolase	5.1 ± 6
<i>441F11</i>	Muc19 precursor	4.4 ± 1.6
<i>439E4</i>	sodium dependent transporter, seryl-tRNA synthetase	4.3 ± 5.3
H35.2r		4.1 ± 4.8
<i>460G4</i>	hypothetical	4 ± 5.3
<i>452H3</i>	archaeal flagellin biosynthesis/type II secretion system protein	4 ± 0.8
<i>435E1</i>	ribose ABC transporter permease, transcription regulator	3.8 ± 1.3
<i>442F8</i>	spore coat polysaccharide synthesis spsK	3.7 ± 1.1
<i>444E12</i>	ribose ABC transporter permease	3.7 ± 0.6
sRNA194_10uM		3.7 ± 3.1
<i>432A1</i>	ribose ABC transporter permease	3.4 ± 0.9
<i>436C9</i>	ribose ABC transporter permease	3.4 ± 1.7
<i>456A8</i>	unknown	3.4 ± 2.7
<i>454G7</i>	unknown	3.4 ± 4.3
<i>457C11</i>	dnaG	3.3 ± 3.8
<i>459E2</i>	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain, hypothetical	3.3 ± 3.7
<i>456C7</i>	phosphoglycerate dehydrogenase, oxidoreductase	3.3 ± 3.2
<i>456C8</i>	hypothetical	3.2 ± 3.8
<i>455A9</i>	unknown	3.1 ± 1.2
rspA		3.1 ± 4.2
<i>459D5_alt</i>	hypothetical protein, phage integrase/site-specific recombinase	2.9 ± 0.6
<i>459C2</i>	mRNA 3'-end processing factor, hypothetical protein	2.8 ± 3.2
<i>457A11</i>	hypothetical protein, PRC-barrel domain, putative	2.8 ± 1.2
<i>434E2_alt</i>	unknown	2.8 ± 3.1
<i>460H8</i>	hypothetical protein, transcription regulator	2.7 ± 2.5
<i>452C2</i>	unknown	2.7 ± 1
<i>432C3</i>	transposase (IS4 family)	2.7 ± 3
sRNA34		2.6 ± 2.6
<i>432E3</i>	Htr-like protein	2.6 ± 2.7
sRNA194_b		2.6 ± 1.4
<i>432G3</i>	UDP-glucose 4-epimerase, branched-chain amino acid aminotransferase	2.6 ± 3.2
<i>460A3</i>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	2.5 ± 1.7
<i>447A7</i>	Muc19 precursor, putative	2.5 ± 0
<i>453E02</i>	Protein of unknown function (DUF1628) family	2.4 ± 0.8
<i>451B8</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase, adenosylcobalamin-dependent	2.4 ± 2.8
<i>439C3</i>	Dipeptide transport system permease protein	2.3 ± 0.2
<i>450D10</i>	acetate--CoA ligase	2.3 ± 1

458C8	hypothetical protein, 3-ketoacyl-CoA thiolase	2.3 ± 2.3
455D4	carbon monoxide dehydrogenase middle subunit CoxM/CutM homologues, hp	2.3 ± 2
436C10	glycolate oxidase subunit GlcD	2.2 ± 1.2
448A6	kinase anchor protein	2.2 ± 2
oadh3E1a		2.2 ± 0.4
439B11	acetate--CoA ligase	2.2 ± 0.7
460H7	oligopeptide ABC transporter	2.2 ± 0.6
459E03_alt	hypothetical protein, sugar ABC transporter ATP-binding protein	2.2 ± 1.8
441D4	Tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase	2.1 ± 0.4
441C3	transposase (IS4 family)	2.1 ± 0.7
451F12	sugar ABC transporter permease protein	2.1 ± 0.5
442B10	acetate--CoA ligase	2.1 ± 1.1
444A7	mehrere hypothetical protein	2.1 ± 0.4
451E12	sugar ABC transporter permease protein	2.1 ± 0.6
sRNA174sense		2.1 ± 1.6
438H12	oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein	2.1 ± 0.5
441C4*	type II/IV secretion system ATPase	2.1 ± 2
458G3	unknown	2.1 ± 1.9
454D7	transposase (IS4 family), membrane protein	2.1 ± 0.4
457C3	aconitate hydratase 1, hypothetical protein, thioredoxin	2.1 ± 0.3
450F4	sugar ABC transporter ATP-binding protein (UGPC)	2 ± 0.6
442B7	unknown	2 ± 0.3
443G7	DNA topoisomerase I	2 ± 1.3
458G9	unknown	2 ± 0.3

441H2	cationic amino acid transporter	0.5 ± 0.4
449B2	unknown	0.5 ± 0.2
441E6	iron transport protein A	0.5 ± 0.2
441B5	DNA damage-inducible protein	0.5 ± 0.3
cmip4		0.5 ± 0.4
453B4	unknown	0.5 ± 0.2
450D5	type II/IV secretion system ATPase	0.5 ± 0.3
441H8	hypothetical protein, signal-transducing histidine kinase-like	0.5 ± 0.2
457E8	maltose transport system permease protein malF	0.5 ± 0.3
441A10	hypothetical protein	0.5 ± 0.2
439F9	integral membrane protein, putative (TBD)	0.5 ± 0.2
458D1	transcription initiation factor, hypothetical protein	0.5 ± 0.1
459H4_alt	UDP-glucose 4-epimerase	0.5 ± 0.3
458B7	MCP domain signal transducer	0.5 ± 0.1
459F4	unknown	0.5 ± 0.2
459C1_alt	hypothetical protein, copper-translocating P-type ATPase	0.4 ± 0.1
451B6	K+-dependent Na+/Ca+ exchanger homolog	0.4 ± 0.4
437H6	unknown	0.4 ± 0
455B6	archaeal flagellin biosynthesis/type II secretion system protein, Protein of unknown function (DUF439) family	0.4 ± 0
432F10	hypothetical protein	0.4 ± 0
436C7	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.4 ± 0.4
435F3	unknown	0.4 ± 0.3
435F12	Htr15 transducer	0.4 ± 0.1
434A10	bifunctional purine biosynthesis protein PurH	0.4 ± 0.2
432C6	adenylate kinase, hypothetical	0.4 ± 0.2
436H4	sensor histidine kinase	0.3 ± 0
436G10	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase, transcription regulator	0.3 ± 0.1
459F4_alt	unknown	0.3 ± 0.1
436A7	unknown	0.2 ± 0.5
452H10	unknown	0.1 ± 0.2

3.2.2.2 Der Deacetylierte Zustand

Die Transkriptomanalysen der Histonmutante (RR), welche den deacetylierten Zustand der beiden Lysinreste nachahmt, ergab kein eindeutiges Ergebnis (**Tabelle 5**). Insgesamt gab es sehr viele Transkripte, die nur in einem von drei Experimenten eine mehr als zweifache Regulation zeigten. Diese wurden für die Auswertung jedoch nicht berücksichtigt. Nur sechs Transkripte waren in mindestens zwei Experimenten induziert, aber keine reprimiert. Die Funktionen, die von diesen wenigen Klonen repräsentiert werden, sind sehr divers.

Tabelle 5

Regulierte ORFs in der Histonmutante K56R, K120R

Bezeichnung	Beschreibung / Funktion	Anderung der Expression ± StAbw
459D8	stage V sporulation protein R-like	5.3 ± 5.9
452A6	tRNA-guanine transglycosylase, transposase (IS4 family)	4.9 ± 6.8
442D5	unknown	4.8 ± 6.8
458C12	unknown	3.2 ± 0.6
456A4	ABC transporter	2.5 ± 1.7
444G9	fibronectin type III domain protein, hypothetical	2.2 ± 0.8

3.2.3 Transkriptom Analysen von Acetylase- und Deacetylase mutante

Bisherige Untersuchungen führten zur Identifizierung von Genen, die für drei Acetylasen (*pat1*, *pat2* und *elp3*) und zwei Deacetylasen (*hda1* und *sir2*) in *H. volcanii* kodieren (Altman-Price & Mevarech, 2009). Bis auf die essentielle Deacetylase Hda1 konnten alle Gene *in frame* deletiert werden. Durch die Deletion alleine konnte jedoch noch keine Hypothese über die genaue Funktionsweisen der Proteine und deren Targets aufgestellt werden. Histone sind zwar gut untersuchte Ziele für Acetylierungen, aber nicht die Einzigen. Für die weitere Charakterisierung wurden daher globale Transkriptom Analysen durchgeführt, um mögliche Ziele und Einflößbereiche der Protein-Acetylierung bzw. -Deacetylierung zu identifizieren. Zum Zeitpunkt der Analysen standen jedoch nur die $\Delta sir2$ sowie $\Delta pat1$ Deletionsmutanten zur Verfügung. Die Deletionsmutanten zeigten in Komplexmedium keinen wachstumsabhängigen Phenotyp, so dass die Zellen für die Analysen aus der stationären Wachstumsphase in frisches Medium überimpft und die

Proben nach 25h in der exponentiellen Wachstumsphase entnommen wurden. Es wurden die Veränderungen der Transkription zwischen Mutante und Wildtyp in insgesamt vier unabhängigen Experimenten untersucht und die durchschnittlichen Induktionslevel sowie Standardabweichungen von allen Klonen berechnet, die in mindestens drei Experimenten vertreten waren.

3.2.3.1 Das Pat1-abhängige Transkriptom

In **Tabelle 6** sind die Ergebnisse der Transkriptomuntersuchungen der Deletionsmutante $\Delta pat1$ im Vergleich zum Wildtyp zusammengefaßt. Insgesamt waren 18 Transkripte in der Mutante um mindestens das Zweifache differentiell expremiert. Dies entspricht einer Beeinflussung von weniger als 1% aller Gene durch Pat1. Von den 11 induzierten Transkripten kodieren knapp die Hälfte für den gleichen Genomabschnitt HVO_1736/37. Die zwei Gene haben die putative Funktion eines DNA Reparatur Proteins (HVO_1736) und einer noch unbekannt Funktion (HVO_1737). Bioinformatische Analysen lassen vermuten, dass es sich bei HVO_1737 um ein Protein mit endonukleolytischen Eigenschaften handelt und möglicherweise bei der Restriktions Modifikation oder der Exision Reparatur eine Rolle spielt (Kinch *et al.*, 2005). Die sieben repremierten Transkripte zeigen insgesamt vier putative Funktionen und liegen alle auf einem der Megaplasmide (pHV3) von *H. volcanii*. Drei davon sind jeweils zweifach repräsentiert. Keines der repremierten Transkripte ist mehr als zweifach reguliert.

Tabelle 6
Regulierte ORFs in der *Δpat1* Deletionsmutante

Bezeichnung	ORF	Beschreibung / Funktion	Anderung der Expression ± StAbw
435G3	HVO_1736	DNA repair protein	83.8 ± 89.4
	HVO_1737	Protein of unknown function (DUF790) superfamily	
445A12	HVO_A0441	Helicase conserved C-terminal domain protein, putative	22.2 ± 8.8
447D7	HVO_1737	Protein of unknown function (DUF790) superfamily	14.2 ± 27.1
448A2	HVO_1736	DNA repair protein	8.5 ± 2.9
	HVO_1737	Protein of unknown function (DUF790) superfamily	
	HVO_1736	DNA repair protein	
443A10	HVO_1737	Protein of unknown function (DUF790) superfamily	6.9 ± 1.4
448F4	HVO_1736	DNA repair protein	5.3 ± 2.9
452E7	HVO_2190	gluconate permease gntP	3.0 ± 0.1
456F12	HVO_A0196	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	2.8 ± 0.3
436A9	HVO_1998	arsenite transport protein	2.3 ± 0.5
442B9	HVO_0907	cytochrome c oxidase subunit I	2.2 ± 1.3
	HVO_0477	aminopeptidase	
433G8	HVO_0478	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type II	2.1 ± 0.1
458B3	HVO_B0300	Uricase	0.5 ± 0.2
443B10	HVO_B0205	spore coat protein	0.5 ± 0.0
458A3	HVO_B0370	molybdenum transport transmembrane protein modB	0.5 ± 0.0
454H2	HVO_B0300	Uricase	0.5 ± 0.1
442F6	HVO_B0034	unknown	0.5 ± 0.0
458H2	HVO_B0034	unknown	0.5 ± 0.0
435D12	HVO_B0370	molybdenum transport transmembrane protein modB	0.5 ± 0.1

3.2.3.2 Das Sir2-abhängige Transkriptom

In **Tabelle 7** sind die Genomabschnitte zusammengefaßt, die um mehr als das Zweifache reguliert waren. Insgesamt wurden 36 Gene durch die Abwesenheit von Sir2 induziert – Sir2 wirkt also reprimierend auf die Transkription. Einige Funktionen oder Gene werden durch mehrere Klone repräsentiert. Insgesamt kodieren sechs Klone für ein Muc19 precursor protein (Mucin 19; HVO_2160), sieben für ein ABC Transporter (HVO_B0217-221) und jeweils vier für Gene, annotiert in der Sporensynthese, bzw. drei für ein Zellteilung Kontrollprotein (HVO_1907). Die Funktion der ABC Transporter ist zusätzlich noch durch zwei weitere Klone vertreten. Ein Gen involviert im „Twin-Arginine Translocation Pathway“ ist das am höchsten induzierte Transkript, aber auch mit einer hohen Standardabweichung. Erstaunlicherweise war der gleiche Klon bei den *Δpat1* Transkriptomanalysen ebenfalls dreifach induziert.

28 Gene waren beim Vergleich der Transkriptome zwischen *Δsir2* und dem Wildtyp reprimiert. Insgesamt repräsentieren davon 23 Gene nur fünf Gencluster und zeigen damit eine sehr geringe Anzahl an Funktionen, die durch Sir2 beeinflusst werden. Das mit Abstand

größte Cluster, welches zudem auch am stärksten reprimiert wurde, war das Flagellen/Chemotaxis-Cluster (HVO_1200-1225). Von den ca. 3.000 Klonen des Mikroarrays wird dieses Cluster von insgesamt 12 Klonen repräsentiert, von denen acht bei diesem Experiment reguliert waren. Sechs dieser acht Klone zeigen eine Regulation um mehr als das Hundertfache. Die zweite Gruppe stark reprimierter Transkripte mit insgesamt fünf Vertretern ist HVO_1431-33. Dieses Cluster besteht aus einer Reihe hypothetischer Proteine mit einer Ausnahme – einem Gen, welches für ein Fibronectin homologes Protein kodiert. Ein weiteres hypothetisches Protein (HVO_2175) existierte dreimal bei den reprimierten Genen. Die letzten beiden Cluster sind jeweils 3- bzw. 2-fach vertreten (HVO_3002-05 und HVO_0554-57). Beiden gemein ist ein Htr15 Transducer Protein.

Tabelle 7
Regulierte ORFs in der $\Delta sir2$ Deletionsmutante

Bezeichnung	ORF	Beschreibung / Funktion	Anderung der Expression \pm StAbw
456F12	HVO_A0196	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	75.9 \pm 40.7
458E6		unknown	16 \pm 6.5
456C9	HVO_2160	Muc19 precursor, putative	9.2 \pm 4.1
432A8	HVO_A0190 HVO_A0191	lipoprotein, putative hypothetical protein	8.3 \pm 5.7
455A9	HVO_1572	DNA gyrase, B subunit	8.2 \pm 1.5
445D7		unknown	7.7 \pm 6.7
452B3	HVO_2160	Muc19 precursor, putative	7.4 \pm 5.5
439E11	HVO_2160	Muc19 precursor, putative	7.2 \pm 2.4
457E4	HVO_2160	Muc19 precursor, putative	7.1 \pm 2.9
436H10	HVO_2160	Muc19 precursor, putative	6.6 \pm 2.6
457G9	HVO_2160	Muc19 precursor, putative	4.5 \pm 2
456F4	HVO_B0217	branched-chain amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	3.9 \pm 3.2
455C7	HVO_B0217	branched-chain amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	3.9 \pm 2.5
458G11	HVO_B0217	branched-chain amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	3.8 \pm 2
442F1	HVO_B0218	branched-chain amino acid ABC transporter permease protein	3.6 \pm 1.8
455F4	HVO_B0221	branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein	3.4 \pm 0.9
460F9	HVO_B0205	spore coat protein	3.4 \pm 0.5
438E4	HVO_B0217	branched-chain amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	3.1 \pm 1.4
450A4	HVO_B0205	spore coat protein	3.1 \pm 1.1
433D9	HVO_B0377	hypothetical protein	3 \pm 0
460F7	HVO_B0205	spore coat protein	3 \pm 1.1
439E8	HVO_2091	4-aminobutyrate aminotransferase	2.9 \pm 1.3
448G12	HVO_B0356	unknown	2.8 \pm 1.6
458H5	HVO_B0220	branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein	2.8 \pm 1.7
458E2	HVO_0044	acetylglutamate kinase	2.6 \pm 0.2
455G8	HVO_2058	RmlD substrate binding domain superfamily	2.5 \pm 1.1
446A8		unknown	2.5 \pm 1.2
450F5	HVO_1907	cell division control protein 48 homolog	2.3 \pm 1.2
436F4	HVO_2025	HTR-like protein	2.3 \pm 1.2
442F8	HVO_2056	spore coat polysaccharide synthesis spsK	2.2 \pm 0.9
457C8	HVO_1986	ABC transporter permease protein	2.2 \pm 1
440G2	HVO_2058	RmlD substrate binding domain superfamily	2.1 \pm 0
431G8	HVO_1907	cell division control protein 48 homolog	2.1 \pm 0.8
431E3	HVO_0062	dipeptide ABC transporter dipeptide-binding	2 \pm 1.1

457E6	HVO_0040	membrane bound his kinase A	2 ± 0.4
437A12	HVO_1907 HVO_1908	cell division control protein 48 homolog nitrate reductase	2 ± 1.1
<hr/>			
460E2	HVO_1803 HVO_1804	Uncharacterized conserved protein nicotinate phosphoribosyltransferase (TBD)	0.5 ± 0.1
460B3	HVO_0556 HVO_0557	transposase transposase	0.5 ± 0.2
445C2		unknown	0.5 ± 0.4
448D5	HVO_0900 HVO_0901	branched-chain amino acid ABC transporter permease protein branched-chain amino acid ABC transporter, permease protein	0.4 ± 0.2
457D2	HVO_1433 HVO_1434	conserved hypothetical protein hypothetical protein	0.4 ± 0.2
441C4*	HVO_1160	type II/IV secretion system ATPase	0.3 ± 0.2
455A10	HVO_1212	circadian regulator	0.3 ± 0.1
452B9		unknown	0.3 ± 0
440E2	HVO_3002 HVO_3003	ABC transporter ATP-binding protein conserved hypothetical protein	0.3 ± 0.1
457E8	HVO_B0106 HVO_B0107	putative extracellular solute binding protein maltose transport system permease protein malF	0.2 ± 0.1
460E3	HVO_0554 HVO_0555	MCP domain signal transducer Htr15 transducer	0.1 ± 0.1
455B2	HVO_2175	hypothetical protein (TBD)	0.1 ± 0.1
456D12		unknown	0.1 ± 0
456H10	HVO_3002 HVO_3003 HVO_3004 HVO_3005	ABC transporter ATP-binding protein conserved hypothetical protein integral membrane protein Htr15 transducer	0.1 ± 0
455F10	HVO_2175	hypothetical protein (TBD)	0.1 ± 0
445C9	HVO_1431 HVO_1432	conserved hypothetical protein fibronectin type III domain protein	0.1 ± 0.1
456H4	HVO_3005	Htr15 transducer	0.1 ± 0.1
436H4	HVO_1201	sensor histidine kinase	0.1 ± 0.1
451D2	HVO_2175	hypothetical protein (TBD)	0.1 ± 0
436C11	HVO_1431 HVO_1432 HVO_1432	conserved hypothetical protein fibronectin type III domain protein conserved hypothetical protein	0.1 ± 0
439H5	HVO_1431 HVO_1432 HVO_1433	conserved hypothetical protein fibronectin type III domain protein conserved hypothetical protein	0.1 ± 0.1
444G9	HVO_1431 HVO_1432	conserved hypothetical protein fibronectin type III domain protein	0.1 ± 0.1
442H6	HVO_1205 HVO_1206	Chemotaxis protein cheD. CheA histidine kinase	0.1 ± 0.1
453E9	HVO_1201 HVO_1202	sensor histidine kinase conserved hypothetical protein	0 ± 0
437D11	HVO_1205 HVO_1206	Chemotaxis protein cheD. CheA histidine kinase	0 ± 0
447F6	HVO_1217	type II/IV secretion system ATPase	0 ± 0
456D2	HVO_1217 HVO_1218	type II/IV secretion system ATPase archaeal flagellin biosynthesis/type II secretion system protein	0 ± 0
453B3	HVO_1210 HVO_1211	Flagellin A1 precursor flagellin A protein	0 ± 0

Die Abwesenheit der Deacetylase Sir2 führt zu einem erhöhten Grad acetylierter Proteine. Auf der anderen Seite simuliert der Aminosäureaustausch von Lysin zu Glutamat den vollständig acetylierten Zustand des Histons. Beim Vergleich beider Ergebnisse der Transkriptomanalysen konnte der direkte Zusammenhang von Sir2 und Histone hergestellt werden (Vgl. **Tabelle 4** und **Tabelle 7**). Insgesamt sind 10 Transkripte in beiden nahezu identisch reguliert (kursive Bezeichner). Im Falle von HVO_1160 – einer Typ II/IV ATPase – wurde das Transkript konträr reguliert (*).

In **Tabelle 8** ist eine Zusammenfassung aller Genotypen, der Einfluß von Sir2 und Pat1 auf die jeweiligen Proteine sowie speziell auf das Histon gezeigt und die dazugehörige Anzahl von unterschiedlich regulierten Transkripte im Vergleich zum Wildtyp aufgelistet. Bei der $\Delta pat1$ Mutante (**2**) und der Histonmutante K56R, K120R (**5**) waren nur sehr wenige Transkripte differentiell reguliert, während die Deletion von *sir2* (**3**) und die irreversible Acetylierung des Histons (**4**) in der Summe eine sechsfache Erhöhung von regulierten Transkripten zur Folge hatte als zusammen in **2** und **5** (Verhältnis 133:24; doppelte Einträge wurden gezählt). In der exponentiellen Wachstumsphase ist der Unterschied zum Wildtyp bei acetylierten Proteinen größer als bei deacetyliertem Zustand. Es ist daher davon auszugehen, dass das Histon und die Proteine im Wildtyp hauptsächlich deacetyliert vorliegen.

Durch die Abwesenheit eines acetylierten Histons waren lediglich sechs Transkripte verändert (**5**), während insgesamt 18 Transkripte reguliert waren, wenn zusätzlich die Acetylierung von Proteinen inhibiert war (**2**). Auf der anderen Seite war die Anzahl der Transkripte wesentlich höher, wenn ausser dem Histon weiterhin Proteine deacetyliert werden (**4**) oder keine Sir2-abhängige Deacetylierung stattfinden konnte (**3**). Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass deacetylierte Proteine zusammen mit dem acetylierten Histon QQ die größte Regulation von Transkripten ausübt.

Tabelle 8

Die Übersicht der einzelnen Mutanten zeigt den Einfluß von Pat1 und Sir2 auf das Acetylom.

Nr.	Genotyp	Substrat / Produkt (deacetyliert)	Enzym	Produkt / Substrat (acetyliert)	Regulierte Transkripte*
1	Wildtyp	Histon Protein X	 Pat1 Sir2	Ac-Histon Ac-Protein X	-
2	$\Delta pat1$	Histon Protein X	 Pat1 Sir2	Ac-Histon Ac-Protein X	18
3	$\Delta sir2$	Histon Protein X	 Pat1 Sir2	Ac-Histon Ac-Protein X	64
4	Histon QQ	Histon Protein X	 Pat1 Sir2	Histon QQ Ac-Protein X	107
5	Histon RR	Histon RR Protein X	 Pat1 Sir2	Ac-Histon Ac-Protein X	6

* Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Transkriptomanalysen jeweils Mutante/Wildtyp

Für eine zusätzliche und genauere Bestimmung der Transkriptmengen wurden für die Gene HVO_1210 und HVO_1211 eine quantitative Realtime-PCR durchgeführt (**Tabelle 9**). Für das Wachstum der Kulturen wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie zuvor (s. **3.2.3**). Insgesamt wurden fünf biologisch unabhängige Experimente durchgeführt und die durchschnittlichen Transkriptmengenverhältnisse zwischen der Mutante $\Delta sir2$ und dem Wildtyp mit der entsprechenden Standardabweichung berechnet. Die ermittelten Verhältnisse lagen zwischen einer drei- bis fünfzigfachen Erhöhung der Transkriptmenge im Wildtyp (nicht dargestellt). Die Werte für HVO_1210 und HVO_1211 lagen innerhalb eines Experimentes immer im gleichen Bereich, was einem Transkriptmengenverhältnis von 1:1 entspricht.

Tabelle 9

qRT-PCR Ergebnisse der am höchsten in den Microarray Analysen reprimierten Transkripte.

Bezeichnung	Relative Transkriptmenge [$\Delta sir2$ / Wildtyp]
HVO_1210	0.21 ± 0.17
HVO_1211	0.23 ± 0.19

3.2.4 Sir2 – eine Klasse III Histondeacetylase (HDAC)

Durch die Ergebnisse der Transkriptomanalysen richtete sich die Aufmerksamkeit im Folgenden hauptsächlich auf die $\Delta sir2$ Deletionsmutante und das Gen im Speziellen.

Das Deacetylasegen *sir2* (HVO_2194) ist auf dem Hauptchromosom von *H. volcanii* lokalisiert (chr:2062859 – 2063617; http://archaea.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?g=refSeq&i=HVO_2194). Es besitzt eine Größe von 759 bp und kodiert für 252 Aminosäuren. Das daraus resultierende Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von 26,9 kDa und einen theoretischen Isoelektrischen Punkt von 4,6.

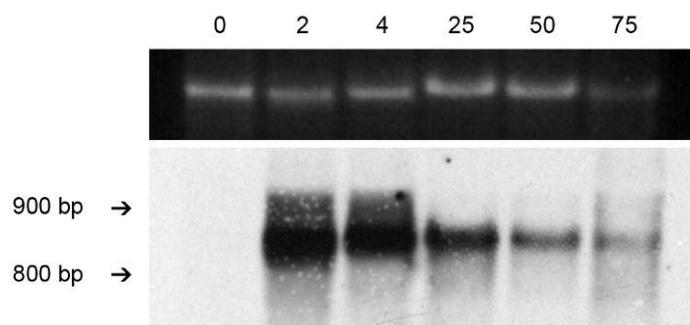
Die beiden unmittelbaren Nachbargene von *sir2* sind eine Phosphoribosyl Aminoimidazol Succinocarboxamid Synthase (HVO_2193) stromaufwärts in umgekehrter Orientierung und eine Sensor Kinase (HVO_2195) stromabwärts. Der Abstand der Gene beträgt zwischen HVO_2193 und *sir2* 147 bp sowie 8 bp zwischen *sir2* und HVO_2195.

3.2.4.1 Transkription und Translation von Sir2

Für die erste Charakterisierung von *sir2* (HVO_2194) wurde die Expression auf transkriptioneller sowie translationeller Ebene während des Wachstumszyklusses untersucht. Die Analysen wurden am Wildtyp in Komplexmedium durchgeführt. Dabei wurden Zellen aus der stationären Wachstumsphase in frisches Medium überführt und anschließend der Verlauf der Transkription (**Abbildung 12**) sowie der Translation von Sir2 (**Abbildung 13**) verfolgt. Anhand der Northern Blot Analysen ließ sich die Größe des Transkriptes auf $867 \text{ nt} \pm 82 \text{ nt}$ ($n = 3$; **Abbildung 12**) determinieren. Damit ist das Transkript um etwa 100 nt länger als der ORF von *sir2*. Obwohl die genomische Anordnung von *sir2* zusammen mit HVO_1295 auf ein dicistronisches Transkript schließen läßt,

Abbildung 12

Nachweis der Transkription von *sir2* mittels Northern Blot Analyse. Das Wachstum erfolgt in Komplexmedium nach Überimpfung einer stationären Kultur, die ebenfalls in Komplexmedium wuchs. Die obere Zeile zeigt die mit Ethidiumbromid gefärbte 16S rRNA als Ladekontrolle. Die Zahlen zeigen den Zeitpunkt der Probenentnahme in h.



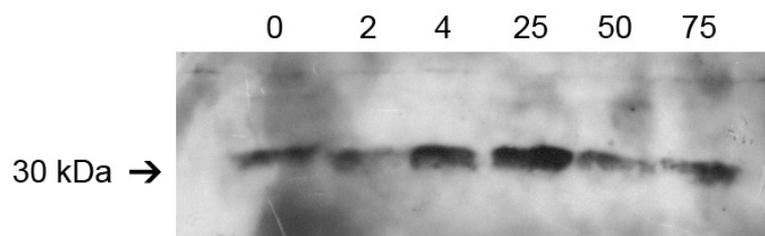
handelt es sich bei *sir2* dennoch um ein monocistronisches Transkript mit Leader und/oder 3'-UTR.

Das *sir2* Transkript war zu Beginn der Analyse nicht vorhanden oder unterhalb der Nachweisgrenze (**Abbildung 12**). Bereits kurz nach Überimpfung der Kultur war die Transkription stark induziert und nahm im Verlauf des Wachstums kontinuierlich ab. In der stationären Wachstumsphase nach 75 h war das Transkript noch in sehr geringen Mengen nachweisbar, während nach über 100 h kein Signal detektierbar war (Daten nicht gezeigt).

Durch die Verfügbarkeit eines Sir2 Antikörpers konnte parallel neben dem Transkriptions- auch der Translationsverlauf während eines Wachstumzyklus untersucht werden (**Abbildung 13**). Die Western Blot Analysen zeigten ein in allen Wachstumsphasen nachweisbares Protein mit einer Größe von 31 kDa. Die Proteinmenge nahm dabei zwischen 2 h und 25 h zu, um nach weiteren 25 h wieder auf das basale Niveau zu sinken. Beim unmittelbaren Vergleich mit den Transkriptmengen der Northern Blot Analysen zeigte der Translationslevel nicht die gleiche Kinetik. Die Expression des Proteins stieg im Gegensatz zur Expression des Transkripts nur gering an. Zudem war die Induktion der Translation zeitversetzt. Eine Regulation auf translationaler Ebene ist daher anzunehmen. Während das Transkript in spätstationärer Wachstumsphase nicht mehr nachweisbar war, existierte das Protein weiterhin in allen Phasen, was für ein sehr stabiles Protein spricht.

Abbildung 13

Proteinlevel nach der Überimpfung einer stationären Kultur in frische Komplexmedium. Der Nachweis erfolgt mit einem spezifischen Antikörper gegen Sir2.



3.2.4.2 Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta sir2$

Die Ergebnisse der Transkriptomuntersuchungen der Deacetylase-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zeigten die starke Repression eines größeren Genclusters in der Mutante. In den *in silico* Analysen konnte es daraufhin als ein Flagellen- und Chemotaxis-zugehöriges Gencluster identifiziert werden. Sir2 hat demzufolge einen starken Einfluß auf die Beweglichkeit und die Reizsensierung von *H. volcanii*. Es lag nahe, dies durch weitere Versuche näher zu untersuchen.

Die Motilität der Zellen wurde zunächst anhand des Schwärmverhaltens untersucht. Dazu wurde der Wildtyp, die Mutante als auch eine komplementierte Mutante auf Komplexmedium mit niedriger Agarkonzentration inokuliert und mehrere Tage bei 42°C inkubiert (**Abbildung 14**). Durch den geringen Agaranteil war es den Zellen möglich, sich durch ihren Bewegungsapparat im und auf dem Medium entlang der Nährstoffkonzentration fortzubewegen, was auch optisch in Form von sogenannten „Schwärmringen“ zu beobachten war (**Abbildung 14a**). Während der Wildtyp sehr gutes Schwärmverhalten zeigte (**Abbildung 14a,d**), konnte in der $\Delta sir2$ Mutante über den gesamten Zeitraum der Beobachtung kein Schwärmen festgestellt werden (**Abbildung 14e**). Interessanterweise konnte der Phänotyp der Mutante durch die Überexpression von Sir2 nicht komplementiert werden (**Abbildung 14f**). Es war sogar im Vergleich zur Mutante überhaupt keine Kolonie zu sehen. Diese Ergebnisse wurden unabhängig voneinander auch in der Arbeitsgruppe Mevarech bestätigt.

Um zu untersuchen, ob der Phänotyp möglicherweise durch einen defekten Bewegungsapparates hervorgerufen wird, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Wirth (Universität Regensburg) die Beweglichkeit der Zellen des Wildtyps sowie der $\Delta sir2$ Deletionsmutante genauer untersucht. Die Zellen wurden auf weichem Schwärmagar angezogen, um die Ausbildung der Flagellen zu induzieren und die

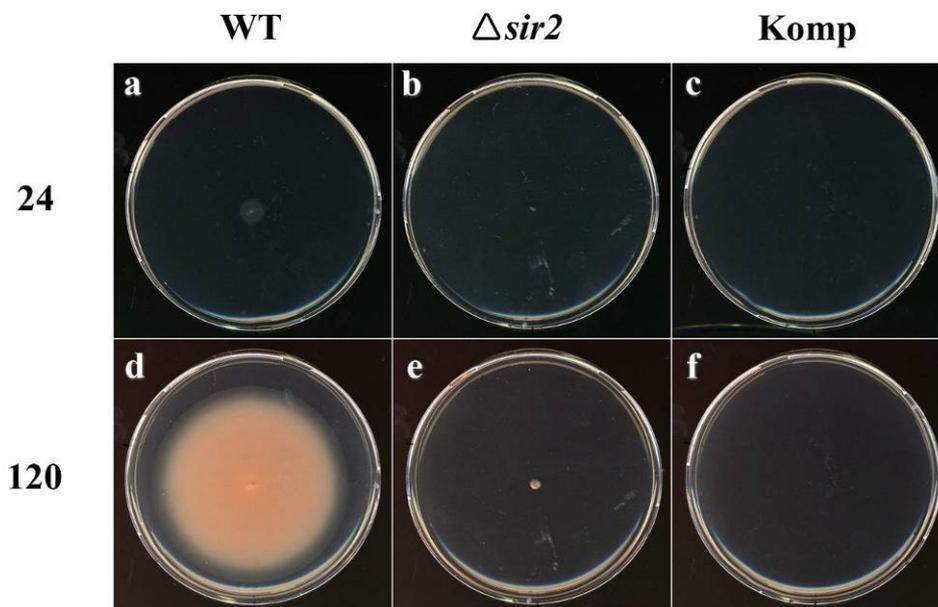


Abbildung 14

Schwärmen der Zellkulturen auf Medium mit einer geringen Agarkonzentration. Die obere Reihe zeigt das Schwärmen nach 24 h. Darunter zu sehen sind die gleichen Kulturen nach 120 h. Von links nach rechts ist der Wildtyp, die $\Delta sir2$ Mutante und die komplementierte Mutante (Komp) zu sehen.

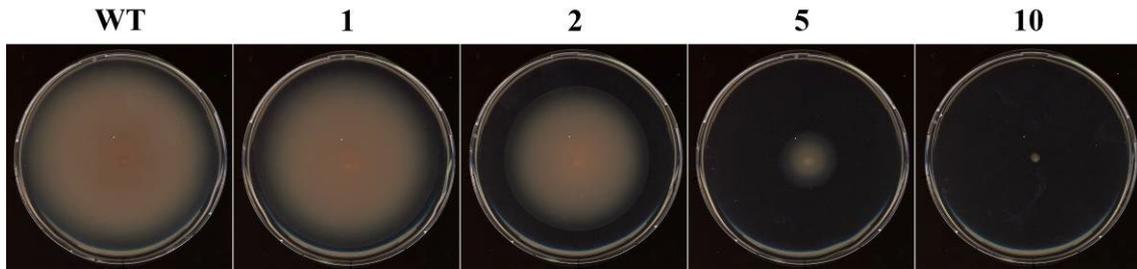
Motilität unter den bestmöglichen Bedingungen zu untersuchen. Die Beweglichkeit der aus dem Agar isolierten Zellen wurde daraufhin in einer Kapillare bei 37°C mit Hilfe eines Mikroskopes analysiert. Die gerichtete Fortbewegung wurde mittels Computersoftware oder manuell ausgewertet. Die Morphologie des Wildtyps war ein langes, dünnes Stäbchen mit hoher Eigenrotation, was zu einer guten Stabilisierung der Schwimmlage führt. Die Fortbewegung erfolgte überwiegend geradlinig ($>0,8$) und es konnte kaum ein Torkeln der Zellen beobachtet werden. Insgesamt zeigten ungefähr 80% der Zellen in einer Probe eine gute Beweglichkeit, was sich auch in einer geringen Sedimentationsrate widerspiegelte – etwa die Hälfte der Zellen war nach 10 Min Beobachtungszeit sedimentiert. Es konnte zudem eine Maximalgeschwindigkeit von $8,3 \mu\text{m s}^{-1}$ ermittelt werden. Dies entspricht in etwa einer Geschwindigkeit, die die Arbeitsgruppe Wirth bereits für *H. salinarum* zeigen konnten (nicht veröffentlichte Daten). Die Durchschnittsgeschwindigkeit vom Wildtyp lag bei etwa $5,6 \mu\text{m s}^{-1}$ (**Tabelle 10**; **CD**, 3_4.4_37_schwimmen_manual_track_2x.avi).

Die Maximalgeschwindigkeit der Δsir2 Mutante dagegen betrug nur $2,2 \mu\text{m s}^{-1}$ bzw. $1,1 \mu\text{m s}^{-1}$ die Durchschnittsgeschwindigkeit. Auch optisch unterschieden sich die Zellen der Mutante in Form von kürzeren, dickeren Stäbchen ebenfalls vom Wildtyp. Die Beweglichkeit war deutlich beeinträchtigt und die Fortbewegung erfolgte stark ungerichtet. Die gemessene Geradlinigkeit betrug meist weniger als 0,4. Es konnte zudem ein ausgeprägtes Torkeln der Zellen der Deletionsmutante beobachtet werden. Die Stabilisierung der Schwimmlage fiel den Zellen schwer und abrupte Richtungswechsel waren sehr häufig zu sehen. Die Sedimentationsrate war ebenfalls sehr hoch. Insgesamt waren mehr als 90% aller Zellen bereits in den ersten fünf Minuten nach Beginn der Beobachtung in der Kapillare sedimentiert (**Tabelle 10**; **CD**, 4_0-Mutante.avi).

Tabelle 10

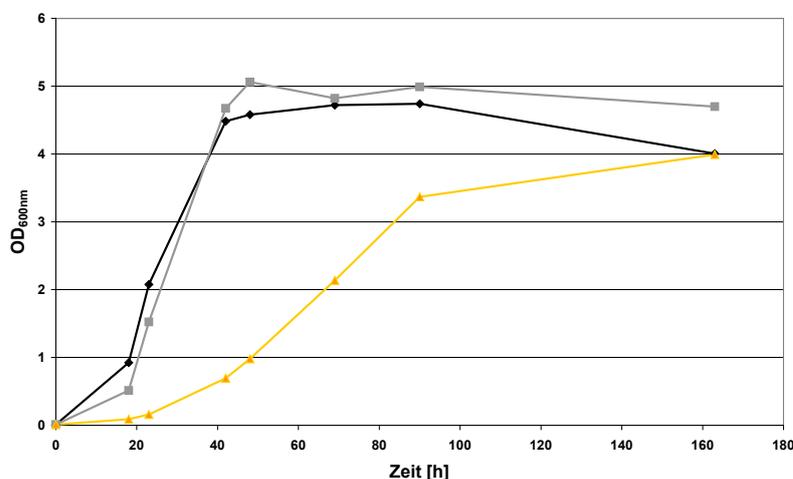
Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der Motilität in der Arbeitsgruppe Wirth (Uni Regensburg).

	$v_{\text{max}} [\mu\text{m s}^{-1}]$	$\bar{v} [\mu\text{m s}^{-1}]$	Geradlinigkeit	Torkeln	Motilität	Sedimentationsrate
Wildtyp	8,3	5,6	$>0,8$	-	++	$<50\%$ in 10 Min
Δsir2 Mutante	2,2	1,1	$<0,4$	+	-	$>90\%$ in 5 Min

**Abbildung 15**

Schwärmverhalten des Wildtyps unter Zugabe von unterschiedlichen Nicotinamidkonzentrationen. Die Kulturen wurden insgesamt 96 h inkubiert und die Platten aus der gleichen Vorkultur mit derselben Menge inokuliert. Die Zahlen über den Bildern stellt die eingesetzte Konzentration an Nicotinamid in mg ml^{-1} dar.

Da Sir2 bisher nur *in silico* als NAD^+ -abhängige Deacetylase identifiziert wurde, könnte das bei der Reaktion entstehende Nicotinamid als nicht kompetitiver Hemmstoff wirken. Der Einfluß von Nicotinamid sollte daher untersucht werden. Es wurde zunächst das Schwärmverhalten des Wildtyps in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Nicotinamid untersucht (**Abbildung 15**). Die Zellen wurden auf Schwärmagar mit unterschiedlichen Nicotinamidkonzentrationen für 96 h inkubiert. Während bei geringen Mengen kaum eine Veränderung zu beobachten war, zeigte der Wildtyp mit steigender Konzentration ein vermindertes Schwärmverhalten. Bei Zugabe von 10 mg ml^{-1} konnte sogar der gleiche Phänotyp wie bei der Δsir2 Mutante beobachtet werden. Da Nicotinamid nicht nur bei der Deacetylierung von Proteinen, sondern auch in vielen anderen metabolischen Prozessen eine Rolle spielt, könnte die Abwesenheit der Schwärmeneigenschaft auf allgemein schlechtes Wachstum des Organismus zurück zu führen sein. Um eine Antwort darauf zu finden, wurde die Einwirkung der höchsten Nicotinamidkonzentration (10 mg ml^{-1}) auf das Wachstum untersucht (**Abbildung 16**). Während der Wildtyp und die

**Abbildung 16**

Wachstum von Wildtyp (schwarz), Δsir2 Mutante (grau) und Wildtyp mit Nicotinamid (orange). Die Konzentration von NAM betrug 10 mg ml^{-1} .

$\Delta sir2$ Mutante keinerlei Wachstumsdefizit auswies, konnte ein starker Einfluß des Nicotinamids auf das Wachstum des Wildtyps gezeigt werden. Die Generationszeit der Zellen betrug nur noch etwa 9 h, was einer Verdreifachung gegenüber dem Wert des Wildtyps entspricht. Die Kultur wuchs also zwar langsamer, die Ausbeute war in allen Fällen dennoch die Gleiche. Nach etwa 100 h erreichte der Wildtyp unter Einfluß von Nicotinamid die gleiche optische Dichte, wie der Wildtyp ohne NAM nach ca. 35 h. Das Wachstum mit NAM war daher lediglich um ca. 50% gehemmt, jedoch keinesfalls komplett inhibiert. Der effiziente inhibitorische Einfluß von Nicotinamid auf die Fortbewegung ist also auf eine spezifische Hemmung zurückzuführen.

Auch mikroskopische Untersuchungen zeigten keinen Unterschied in der Morphologie der Zellen des Wildtyps mit und ohne Nicotinamid (vgl. **Abbildung 17a und b**). Die Zellen hatten in der stationären Wachstumsphase das gleiche Aussehen wie der Wildtyp. Die Morphologie der $\Delta sir2$ Mutante hingegen unterschied sich vom Wildtyp. Die Zellen besaßen im Durchschnitt etwa die doppelte Länge. Der Einfluß von Nicotinamid ruft also den gleichen Phänotyp wie die Deletion von Sir2 hervor, wirkt aber gleichzeitig weniger auf den Zellzyklus in der stationären Wachstumsphase ein.

Neben Nicotinamid wurde auch Trichostatin A (TSA) auf eine inhibitorische Wirksamkeit getestet. TSA ist ein spezifischer Inhibitor von Klasse I und II Histon-Deacetylasen (Vanhaecke *et al.*, 2004). Es wurde das Schwärmverhalten des Wildtyps bei Anwesenheit von 20 μM TSA untersucht. Bei dieser Konzentration trat ein vermindertes Wachstum einer *H. volcanii* Kultur ein (Altman-Price & Mevarech, 2009). Beim Vergleich des Schwärmens der Zellen des Wildtyps mit und ohne TSA sowie der $\Delta sir2$ Mutante konnte allerdings keinerlei vermindertes Schwärmverhalten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

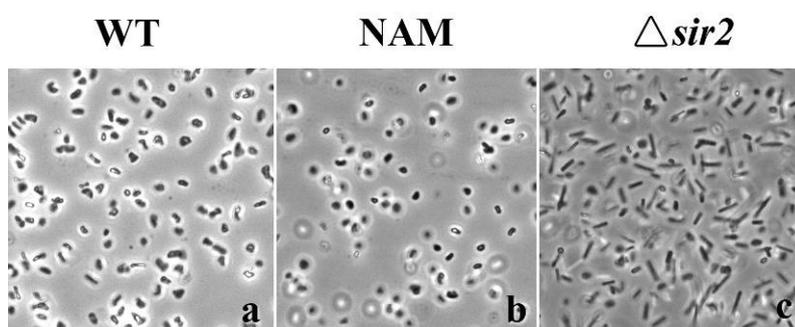


Abbildung 17

Mikroskopische Untersuchung der Morphologie von Wildtyp **a** ohne und **b** mit Nicotinamid (NAM) sowie **c** der $\Delta sir2$ Mutante. Die Analysen wurden bei einer Zelldichte von $4 \cdot 10^9$ Zellen ml^{-1} vorgenommen. Die Nicotinamidkonzentration betrug 10 mg ml^{-1} .

3.2.4.3 Das Flagellen Gencluster

In den Transkriptomanalysen der $\Delta sir2$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp waren die am stärksten in der Deletionsmutante reprimierten Transkripte in einem einzigen Cluster (zwischen HVO_1201-18) zu finden. *In silico* Untersuchungen ergaben in diesem Genombereich ein größeres Gencluster, welches für Gene kodiert, die an der Biosynthese von Flagellen und der Chemotaxis beteiligt sind. Das Cluster erstreckt sich von HVO_1200 bis HVO_1225 über ein etwa 25 kbp großen Bereich. **Abbildung 18** zeigt einen schematischen Überblick sowie **Tabelle 11** eine Zusammenfassung über das Flagellen/Chemotaxis Gencluster. HVO_1200, HVO_1201 und HVO_1203 kodieren für Proteine, die in ihrer Struktur zu den FlaD und FlaE Proteinen analog sind. Das *fla*-Cluster wird durch Chemotaxisgene HVO_1205-07 (*cheD*, *cheC3*, *cheY*) unterbrochen. Danach erschließt sich das eigentlich *fla*-Cluster bestehend aus den Genen *flaA/B/C/D/E/F/G/H/I/J*. Die Suche nach einem homologen Protein der Preflagellin Pepsidase (FlaK) aus *H. salinarum* zeigte ein zum *fla*-Cluster entferntes Gen auf dem Hauptchromosom.

Unmittelbar nach dem Cluster für den Flagellenaufbau folgen weitere Gene, die in der Chemotaxis eine Rolle spielen. HVO_1219 und HVO_1221 sind bisher nur als Proteine der DUF439 Familie annotiert. In *H. salinarum* konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine ebenfalls an der Chemotaxis beteiligt sind, so dass sie als CheF1 und CheF2 bezeichnet wurden.

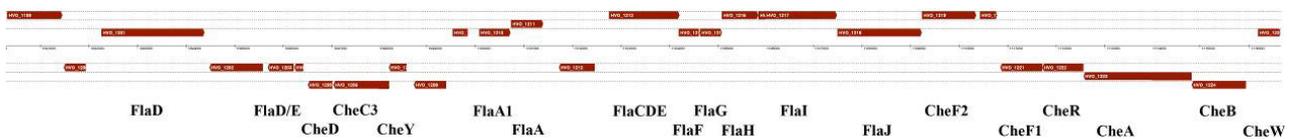


Abbildung 18

Schematische Darstellung der genomischen Anordnung rund um das Flagellen/Chemotaxis-Cluster. Das Cluster besitzt eine Ausdehnung von etwa 25 kbp. Das erste Gen, welches zu diesem Cluster zählt, ist HVO_1200. Das letzte HVO_1225 ist CheW und ist der Chemotaxis zuzuordnen. Insgesamt gibt es zwei Operone für die Chemotaxis unterbrochen durch das Flagellencluster (HVO_1210-1218).

Tabelle 11
Zusammenfassung des Flagellen(rot)/Chemotaxis(grün) Genclusters.

Bezeichner	Gen	Genombereich
HVO_1200	<i>flaD/E</i>	1,091,481-1,091,936R
HVO_1201	<i>flaD/E</i>	1,092,259-1,094,385F
HVO_1203	<i>flaD/E</i>	1,095,684-1,096,214R
HVO_1205	<i>cheD</i>	1,096,507-1,097,016R
HVO_1206	<i>cheC3</i>	1,097,038-1,098,225R
HVO_1207	<i>cheY</i>	1,098,222-1,098,590R
HVO_1209	<i>flaB1</i>	1,099,534-1,099,872F
HVO_1210	<i>flaA1</i>	1,100,086-1,100,727F
HVO_1211	<i>flaA</i>	1,100,738-1,101,400F
HVO_1213	<i>flaC/D/E</i>	1,102,755-1,104,209F
HVO_1214	<i>flaF</i>	1,104,193-1,104,630F
HVO_1215	<i>flaG</i>	1,104,631-1,105,080F
HVO_1216	<i>flaH</i>	1,105,077-1,105,826F
HVO_1217	<i>flaI</i>	1,105,827-1,107,491F
HVO_1218	<i>flaJ</i>	1,107,496-1,109,238F
HVO_1219	<i>cheF2*</i>	1,109,235-1,110,353F
HVO_1221	<i>cheF1*</i>	1,110,849-1,111,715R
HVO_1222	<i>cheR</i>	1,111,719-1,112,561R
HVO_1223	<i>cheA</i>	1,112,561-1,114,831R
HVO_1224	<i>cheB</i>	1,114,834-1,115,934R
HVO_1225	<i>cheW</i>	1,116,184-1,116,657F
HVO_2993	<i>flaK⁺</i>	2,822,983-2,824,035R

* Gehört zur Familie der DUF439, das kürzlich in *H. salinarum* als ein neues Chemotaxis Protein (CheF) identifiziert wurde (Schlesner *et al.*, 2009).

+ Zeigt Homologien zu dem in *H. salinarum* annotierten *flaK*

3.2.5 Untersuchung der Chemotaxis in *H. volcanii*

3.2.5.1 „Chemical-in-plug“ Assay

Durch die bisher erzielten Ergebnisse kam die Frage auf, wenn *H. volcanii* in der Lage ist sich fortzubewegen, auf welche Reize dabei positiv oder negativ sensiert wird? Eine Antwort auf diese Frage würde bei der weiteren Aufklärung des Bewegungsapparates durch fortführende Analysen eine große Rolle spielen. Für die Untersuchung der Chemotaxis wurde daher zunächst die Motilität rein qualitativ auf verschiedene Substanzen mit der sog. „chemical-in-plug“ Methode getestet. Dazu wurden Platten mit niedriger Agarkonzentration, in denen schwärmende *H. volcanii* Zellen eingeschlossen waren, hergestellt. In diesen Platten wurden vorher bereits Agarplugs mit der zu testenden Substanz eingesetzt. Bei einem positiven Stimulus sollte die Zelldichte um einen Plug im Laufe der Zeit zunehmen, während bei einem Repellent ein zellfreier Ring entstehend sollte. Alle Substanzen wurden dreifach bestimmt und die entstandenen Ringe mit höherer Zelldichte

optisch ausgewertet (**Abbildung 19**). Als Kontrolle diente ein Plug ohne einen Zusatz. In **Tabelle 12** sind die Ergebnisse zusammengefasst. Besonders stark ausgeprägt waren die Zelldichten für Leucin (positiv) und Cystein (negativ). Einige Zucker, Aminosäuren und Metabolite zeigten mäßig positive Chemotaxis. Von den getesteten Substanzen trat neben Cystein nur bei Valin ein sehr schwach ausgeprägter zellfreier Bereich auf.

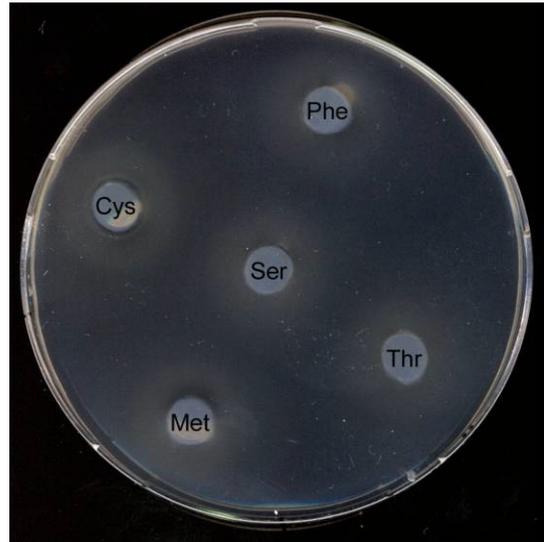


Abbildung 19

„Chemical-in-plug“ Assay. In den 2%igen Agarplugs sind jeweils 100 mM Substanz enthalten. Um die Plugs herum bilden sich runde Flächen mit einer hohen Zelldichte. Nur unmittelbar am Rand der Plugs zeigen sich bei einer positiven oder negativen Chemotaxis entsprechende Ringe.

3.2.5.2 Kapillar Assay

Für eine quantitative Untersuchung der Chemotaxis wurde ein Kapillar Assay durchgeführt. Dazu wurde in Basalsalz mit schwärmenden Zellen eine Kapillare mit der zu testenden Substanz gehalten. Bei einem Attraktant schwimmen die Zellen vermehrt in die Kapillare, während bei einem Repellent die gegenteilige Reaktion zu beobachten wäre. Durch Ausspateln der Flüssigkeit aus der Kapillare kann auf diese Weise eine quantitative Analyse durchgeführt werden. Es wurde mit dieser Methode eine Vielzahl an chemischen Agenzien getestet und die Chemotaxis im Vergleich zur Kontrolle ohne Substanz ausgewertet. Pro Substanz und Experiment wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Insgesamt wurden zwei biologisch unabhängige Experimente angefertigt, die Lebend-Zellzahlen bestimmt und mit Hilfe einer Negativkontrolle normiert.

Der überwiegende Teil der getesteten Substanzen hat keine chemotaktische Wirkung auf *H. volcanii* (**Tabelle 12**). Es zeigten vor allem Glukose und Leucin eine stark positive Chemotaxis, während bei Cystein das gegenteilige Verhalten zu sehen war. Die Ergebnisse für Xylose, Glycerin und Arginin zeigten insgesamt ebenfalls eine Chemotaxis, jedoch mit hohen Standardabweichungen. Eine ganze Reihe von Nicotinamid-haltiger Substanzen konnte ebenfalls positiv getestet werden.

Tabelle 12Übersicht aller getesteten Substanzen und ihre Wirkung auf die Chemotaxis von *H. volcanii*.

Substanz	Chemotaktisches Verhalten		Substanz	Chemotaktisches Verhalten	
	„In-Plug“	Kapillar *		„In-Plug“	Kapillar *
Zucker:			Aminosäuren:		
Glukose	+	3.2 ± 0.9	Cys	--	0.1 ± 0.2
Xylose	+	2.1 ± 1.4	Ser	+	0.9 ± 0.7
Arabinose	o	0.8 ± 0.3	Met	+	0.7 ± 1.0
Saccharose	+	1.0 ± 0.3	Asn	o	0.7 ± 0.6
Galaktose	+	1.6 ± 0.5	Arg	o	0.5 ± 0.7
Maltose	o	1.1 ± 0.1	Lys	o	1.4 ± 1.1
Metabolite:			Asp	o	1.8 ± 0.8
Ornithin	o	1.4 ± 0.8	Trp	o	1.3 ± 0.5
Pyruvat	+	1.7 ± 1.1	Phe	o	0.9 ± 0.3
Succinat	o	0.5 ± 0.3	Gly	o	0.7 ± 0.6
Gluconat	o	0.7 ± 0.4	Ala	o	1.2 ± 0.5
Gluconolacton	o	1.0 ± 0.4	Leu	++	2.7 ± 0.9
Glycerin	+	2.3 ± 1.3	Iso	o	0.8 ± 0.6
Nicotinamid	+	2.0 ± 0.8	Val	-	1.2 ± 0.3
NAD ⁺	+	1.7 ± 0.1	Pro	o	1.0 ± 0.2
NADP ⁺	+	2.2 ± 0.8	His	o	1.6 ± 0.7
Oxalacetat	+	1.3 ± 0.6	Thr	+	1.5 ± 0.8

* Die Zahlen geben das Verhältnis zwischen der Zellzahl einer Kapillare mit Substanz und der Kontrolle ohne Zusatz an. Ein Wert >1 spiegelt eine positive Chemotaxis wider.

4 Diskussion

4.1.1 IftA und die Enolase Superfamilie

Die bioinformatischen Untersuchungen der Primärsequenz von IftA zeigten die eindeutige Zugehörigkeit zur Familie der Mandelat Racemasen (MR) bzw. der Enolase Superfamilie COG1441. IftA besitzt zudem konservierte Aminosäuren, die im aktiven Zentrum beteiligt sind und dessen Tertiärstruktur in anderen Vertretern der Superfamilie bereits aufgeklärt wurde. Daher legen die Analysen nahe, dass auch IftA ein Mg^{2+} -Ion komplexiert und die Übertragung eines Protons eines α -Kohlenstoffatoms auf eine Carboxygruppe katalysiert. Allerdings ist die Identität von IftA zu keinem Mitglied der MR Familie mit bekannter Substratspezifität hoch genug, um einen Hinweis auf das mögliche Substrat zu erhalten. Diese Eigenschaft ist sehr typisch für die Enolase Superfamilie. Zum einen ist insgesamt die Konservierung aller Proteine innerhalb der Superfamilie sehr gering, zum anderen bewirken bereits wenige Änderungen der Aminosäurekomposition eine starke Veränderung in der Substratspezifität. Daher ist in der Regel eine experimentelle Vorgehensweise zur Aufklärung des Substrates erforderlich.

Die dauerhafte Induktion von *iftA* in Glukosemedium deutet auf eine Beteiligung von IftA bei der Glukosedegradation hin. Haloarchaea bauen Glukose auf dem Semi-Phosphorylativen Entner-Doudoroff-Weg (sED) ab (Danson, 1988; Siebers & Schönheit, 2005). In diesem Stoffwechselweg gibt es in der Tat ein Mitglied der Enolase Superfamilie, die Gluconat-Dehydratase (GDH), welche die Dehydratisierung von Gluconat zu 2-keto-3-Deoxygluconat katalysiert. Die identische Wachstumsrate und Ausbeute der Deletionsmutante auf Glukosemedium im Vergleich zum Wildtyp spricht jedoch gegen die Vermutung, dass IftA im Energiestoffwechsel die Rolle der GDH besitzt. Wäre dies der Fall, müßte es eine zweite GDH in *H.volcanii* geben, die nach der Deletion von IftA dessen Funktion übernimmt. Demnach sollte zu vermuten sein, dass beide Proteine sich sehr ähnlich sind. In der Tat gibt es ein weiteres Protein, welches zu 78% Identität zu IftA aufweist. Das kodierende Gen ist in der provisorischen Genomsequenz von *H.volcanii* nicht annotiert und liegt zwischen den Genen HVO_B0038 und HVO_B0039. Dieses Genprodukt stand im Fokus bei der Aufklärung des Xylose Degradations Weges (Johnson *et al.*, 2009). Die Untersuchungen deuteten daraufhin, dass es sich bei dem Protein um eine Xylonat Dehydratase handelt. Eine Funktion als Gluconat-Dehydratase kann aber bisher durch das

Fehlen entsprechender Analysen nicht ausgeschlossen werden. Es wäre daher denkbar, dass die Xylonat-Dehydratase übergreifende Funktion besitzt.

Während die Deletionsmutante bei kontinuierlichem Wachstum auf Glukose keinerlei Phenotyp zeigt, ist der Phenotyp nach Überimpfen von stationären Zellen aus einem nährstoff-reicherem Medium in Glukosemedium sehr stark ausgeprägt. Nach einer drei Tage andauernden Lag-Phase der Mutante, wuchsen die Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Wildtyp. Eine regulatorische Funktion von IftA in der Mutante scheint ausgeschlossen zu sein. Einige Ergebnisse sprechen dafür, dass IftA eine regulatorische Funktion spezifisch für den Beginn des Wachstums aus der ruhenden Phase besitzt. Zum einen ist die Induktion der Expression von IftA in Casaminsäure- und Komplexmedium nur sehr kurz, zum anderen ist die Transkription von etwa 25 Genen durch geringe Mengen IftA auf Komplexmedium, und damit ohne den Einfluß sekundärer Effekte, verändert.

IftA ist nicht der einzige Vertreter der MR Familie, bei dem eine regulatorische Funktion vermutet wird. Bereits 1994 haben Huisman und Kolter in *E.coli* den Einfluß von RspA auf die Expression von Genen nachgewiesen, die unmittelbar an der stationären Wachstumsphase beteiligt sind. Auch im Stamm der *Actinomyces* gibt es zwei bekannte Vertreter mit regulatorischer Funktion. Die Deletion von SpaA in *S.coelicolor* hatte die Störung der Antibiotika Produktion zur Folge. Dieser Effekt trat jedoch nur im nährstoffärmsten von drei getesteten Medien auf (Schneider *et al.*, 1996). In *S.ambofaciens* verursachte die Deletion von *spa2*, einem *spaA* Homolog, ebenfalls einen stationären Wachstumsphasen-abhängigen Phenotyp. Dieser äußerte sich in reduzierter Mycelbildung und Sporenpigmentierung (Aubert *et al.*, 1997). Die Funktionsweise sowie möglichen Substrate von SpaA und Spa2 sind völlig unbekannt. Für RspA jedoch konnte vor Kurzem die Funktion enträtselt werden (Gerlt *et al.*, 2005). Demnach wirkt RspA als spezifische Zuckersäure Dehydratase mit D-Mannat und D-Altronat als Substrate. Demnach existieren Signaltransduktionswege, bei denen Zuckersäuren oder deren Metabolite eine entscheidende Rolle spielen und RspA, SpaA und Spa2 eine regulatorische Funktion bei der Verarbeitung dieses intrazellulären Signals besitzen.

In Anlehnung an die Befunde von RspA könnte eine Zuckersäure auch das Substrat von IftA sein, welche nicht im zentralen Stoffwechsel zu finden ist und nur bei der Signal Transduktion beteiligt ist. Diese Hypothese wird von der sehr kurzen Induktion der Expression von IftA in nährstoffreicherem Medium sowie des Phenotyps der Deletionsmutante gestützt. Dennoch kann dieses Modell keine Erklärung für den

durchgehend hohen Expressionslevel von IftA in Glukosemedium geben. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Doppelfunktion von IftA als Gluconat-Dehydratase im Energiestoffwechsel und eine noch unbekannt regulatorische Funktion. Während im Stoffwechsel die Deletion durch eine zweite GDH oder ein Enzym mit ähnlicher Funktion kompensiert werden kann, funktioniert dies jedoch nicht für die Regulationsfunktion. Ein Beispiel für eine solche Art der Doppelfunktion existiert ebenfalls in der Enolase Superfamilie COG1441 in Form der Enolase aus *E.coli*. Während der Großteil des Enzyms seine Funktion in der Glykolyse ausübt, sind etwa 5-10% der Enolase Teil des Degradasoms, einem RNA-Degradation-Proteinkomplex (Carpousis, 2007). Dieser Proteinkomplex besteht u.a. aus der Endoribonuklease RnaseE, der Phosphat-abhängigen Exoribonuklease Polynukleotid Phosphorylase (PNPase) und der DEAD-Box RNA-Helikase B (RhlB). Der genaue Mechanismus und Interaktion der Enolase mit dem Komplex ist bis heute noch nicht vollständig geklärt – die Beteiligung ist jedoch sicher. Durch Transkriptom Vergleiche in *E.coli* einer Enolase Deletionsmutante mit dem Wildtyp konnten differenziert regulierte Gene identifiziert werden, die an der Aufnahme oder der Verwertung von verschiedenen Kohlenstoffquellen beteiligt sind (Berstein *et al.*, 2004). Das Degradasom ist dabei in einer Zytoskelett-artigen Struktur innerhalb der Zelle organisiert. Der helikale Aufbau der Enolase ist dabei abhängig von der gewundenen Struktur der RnaseE (Taghbalout & Rothfield, 2008).

Anhand des Enolase Beispiels könnte auch IftA eine entsprechende Doppelfunktion besitzen: auf der einen Seite die Funktion einer GDH, lokalisiert im zentralen Glukosestoffwechsel und austauschbar durch eine zweite GDH oder adäquates Enzym. Eine zweite Funktion von IftA wäre die Regulation bei Beginn des Wachstums. Dies setzt voraus, dass IftA für die Signal Transduktion ein anderes Substrat in einer alternativen Reaktion verwendet, welche nicht durch ein zweites Enzym kompensiert werden kann. Für die Aufklärung der Funktionsweise von IftA und Unterscheidung zwischen den verschiedenen hypotetischen Modellen ist die Bestimmung des Substrates von großer Bedeutung. Durch die Aufklärung des Xylose Degradationsweges in *H.volcanii* besteht eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Schönheit in Kiel, wo bereits die Proteine des Abbauweges biochemisch charakterisiert worden sind und noch weiter untersucht werden. Da IftA möglicherweise eine Rolle in diesem oder einem ähnlichen Stoffwechselweg, der von der Arbeitsgruppe Schönheit gerade untersucht wird, spielt, findet die weitere Charakterisierung und Aufklärung der Substratspezifität dort statt.

Auch wenn das Substrat von IftA noch nicht aufgeklärt werden konnte, sind die Ergebnisse umfangreicher als es bisher für ein Mitglied der Enolase Superfamilie (COG1441) mit regulatorischer Funktion der Fall ist (Huisman & Kolter, 1994; Schneider *et al.*, 1996; Aubert *et al.*, 1997). IftA ist nun der erste Vertreter der Superfamilie, dessen globaler Einfluß auf die differentielle Transkription von Genen in Ab- bzw. Anwesenheit des Proteins untersucht wurde. In den DNA Mikroarray Analysen konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Teil (~1%) der Gene 25 h nach Überimpfung in Komplexmedium einen veränderten Transkriptionslevel in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Unter den gewählten Bedingungen traten keinerlei wachstumsbedingten Nebeneffekte auf. Die globale Reaktion der Gene auf die Deletion von IftA war sehr spezifisch. Die differentiell transkribierten Gene konnten insgesamt nur einigen wenigen Genclustern und funktionellen Kategorien zugeordnet werden (**Tabelle 3**). In der Abwesenheit von IftA waren 16 Transkripte runterreguliert, was einer induzierenden Wirkung von IftA im Wildtyp entspricht. Sieben dieser Gene kodieren für Proteine, die im Phosphatmetabolismus beteiligt sind. Darunter befindet sich u.a. eine Polyphosphat Kinase, ein „Phosphat regulierendes Protein“, eine Serin/Threonin Protein Kinase und ein Phosphat

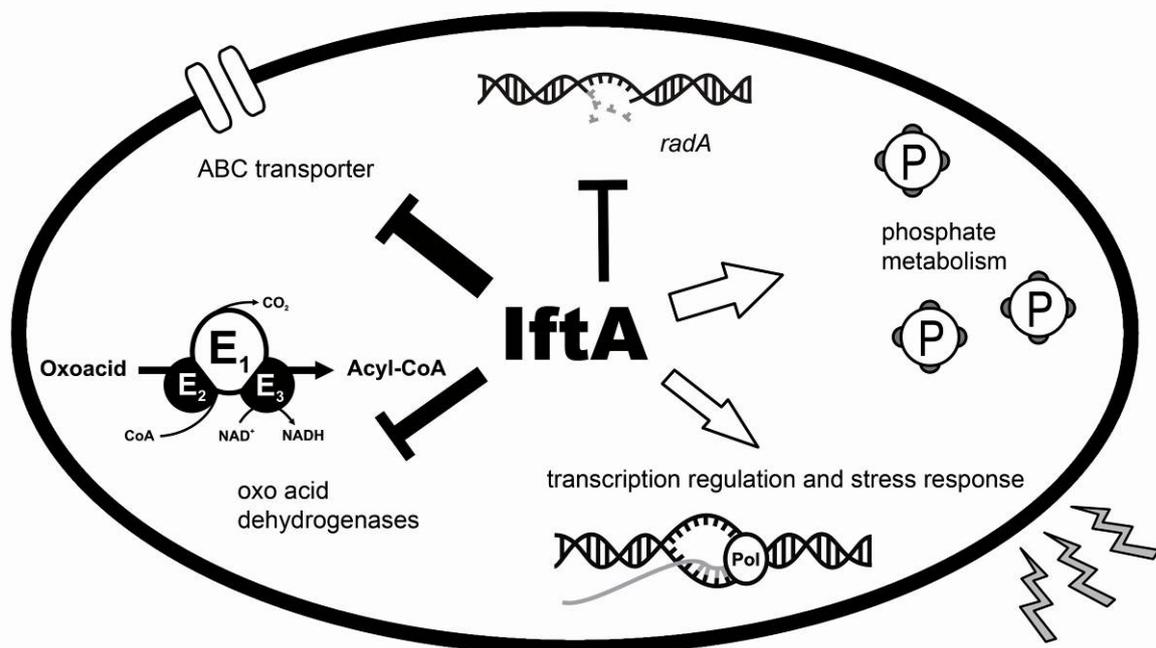


Abbildung 20

Schematische Übersicht über die globale Regulation durch IftA. Die Transkriptomvergleiche von Wildtyp mit der Deletionsmutante führten zur Identifikation von Genen mit unterschiedlichen Transkriptleveln. Diese Gene werden also durch die Ab- bzw. Anwesenheit von IftA beeinflusst (**Tabelle 3**). Die Genprodukte repräsentieren insgesamt nur sehr wenige Proteinkomplexe und biologische Funktionen. IftA besitzt keine DNA Bindedomäne, so dass die Regulation nicht durch eine direkte Interaktion mit dem Zielgen vonstatten geht.

ABC Transporter Operon. Vier Gene kodieren für Proteine, die bei der Stressantwort und Genregulation eine Rolle spielen (Transkriptionsregulator, „stress response protein“, „Phosphat regulierendes Protein“ und „conditioned medium induced protein 9“). Die Anzahl der Funktionen von den in der Mutante hochregulierten Genen ist noch spezifischer. Acht der 15 Transkripte gehören zu einem Gencluster, der für einen 2-Oxosäure Dehydrogenase Komplex (OADHC1, Jolley *et al.*, 2000) und eine Lipoat Synthase kodiert. Das Substrat des OADHC1 konnte vor Kurzem identifiziert werden (Sisignano *et al.*, 2009). Demzufolge katalysiert der Komplex die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxo-3-Methylvalerat zu 2-Methylbutyryl-CoA – einem Zwischenschritt der Isoleucin Degradation.

Die Ergebnisse der Transkriptom Analysen sind in **Abbildung 20** noch einmal schematisch zusammengefaßt. Eine Genregulation von IftA findet dabei lediglich indirekt statt, denn kein Vertreter der Enolase Superfamilie besitzt eine DNA Bindedomäne. Die Identifizierung von Genen, die durch IftA beeinflusst werden, eröffnet die Möglichkeit, diese ebenfalls *in frame* zu deletieren und eine mögliche epistatische Interaktion mit IftA aufzudecken.

Beim Vergleich der Expressionslevel von mRNA und Protein (**Abbildung 8** und **Abbildung 9**) wird deutlich, dass die Translationseffizienz nicht konstant ist, aber vor allem eine Regulation auf translationaler Ebene stattfindet. Jüngste Ergebnisse einer globalen Untersuchung zeigten, dass 10% der Gene von *H.volcanii* und 20% der Gene von *H.salinarum* unter einer wachstumsphasen-abhängigen translationalen Kontrolle stehen (Lange *et al.*, 2007). Das *iftA* Transkript ist leaderlos und besitzt eine 3'-UTR von 153 nt, was einer – gegenüber der durchschnittlichen UTR – bedeutend längeren UTR entspricht (Durchschnitt: 57 nt, Median: 49 nt; Brenneis *et al.*, 2007). Es ist daher zu vermuten, dass die 3'-UTR eine Rolle bei der Regulation der Translation von IftA spielt. In der Tat konnte bereits für zwei unterschiedliche Transkripte eine wichtige Rolle ihrer 3'-UTRs bei der Regulation gezeigt werden (Brenneis & Soppa, 2009).

4.1.2 Proteinacetylierung/-deacetylierung und Histone

Vor Beginn dieser Arbeit waren bereits mehrere Gene in *H. volcanii* identifiziert worden, die für Histon Acetyltransferasen (HAT; *pat1*, *pat2*, *elp3*) und –Deacetylasen (HDAC; *hdaI*, *sir2*) kodieren (Altman-Price & Mevarech, 2009). Welche allgemeinen oder möglicherweise regulatorischen Funktionen die Gene *in vivo* ausüben, war allerdings noch völlig unklar. Eine Deletion der einzelnen Gene brachte die essentielle Funktion von *hdaI* (HVO_0522) zum Vorschein – *hdaI* war das einzige Gen, das sich nur dann deletieren ließ, wenn eine extrachromosomale Kopie vorhanden war. Von allen anderen HATs und HDACs konnten Deletionsmutanten erzeugt werden. Bei der Untersuchung der genomischen Organisation der Gene konnte eine operonähnliche Anordnung um das *hdaI* Gen entdeckt werden. Der 3'-Bereich von *hdaI* überlappt mit einer CCA-anfügenden tRNA-Nukleotidtransferase. Unmittelbar stromaufwärts von *hdaI* liegt ein Gen, welches große Ähnlichkeit mit der H3-H4 Kerndomäne des Histons besitzt, wie sie auch im *Methanopyrus kandleri* HMk Histon vorhanden ist. Die Vermutung lag nahe, dass das Histon zum einen Ziel für Acetylierungen ist und zum anderen diese durch HdaI katalysiert werden.

Es war bekannt, dass HATs und HDACs weit mehr Proteine in einer Zelle acetylieren und deacetylieren als nur Histone, die für die Namensgebung verantwortlich waren (Glozak *et al.*, 2005). Um der Funktionsweise der Deacetylasen und Acetyltransferasen einen Schritt näher zu kommen, wurden daher globale Transkriptomanalysen der Deletionsmutanten $\Delta pat1$ und $\Delta sir2$ im Vergleich mit dem Wildtyp durchgeführt. Die Mutanten *pat2* und *elp3* standen zum Zeitpunkt der Analysen noch nicht zur Verfügung. Bei der Abwesenheit der Acetyltransferase Pat1 waren nur sehr wenige Gene in der exponentiellen Wachstumsphase in ihrer Transkription gegenüber dem Wildtyp verändert. Alle betroffenen Gene, die im Wildtyp induziert waren, liegen auf dem Megaplasmid pHV3. Keines der Transkripte war mehr als zweifach reguliert, was darauf hindeutet, dass durch die Pat1-abhängige Acetylierung nur eine geringe positive Regulation auf sehr wenige Gene stattfindet. Neben Genen mit unbekannter Funktion waren eine Uricase und ein Molybdäntransportprotein in den Ergebnissen zweifach vorhanden. Es ist jedoch bisher nichts darüber bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen Acetylierung und den genannten Funktionen existiert.

Viele Transkripte, welche in den Transkriptomanalysen im Wildtyp durch die Anwesenheit von Pat1 reprimiert wurden, kodieren für Gene mit verschiedenen Funktionen. Die meisten sind nur durch einzelne Transkripte repräsentiert, wohingegen der

Genomabschnitt HVO_1736-37 als einziger besonders häufig und mit sehr hohen Induktionsleveln (>5) identifiziert werden konnte. HVO_1736 ist ein DNA Reparatur Protein sowie HVO_1737 ein Protein, welches zur Proteinfamilie mit unbekannter Funktion (DUF790) zählt. Sehr wahrscheinlich kodiert es für ein Protein, das an der Restriktions Modifikation oder der Excision Reparatur eine Rolle spielt (Kinch *et al.*, 2005). Bleibt also die Acetylierung eines Proteins durch Pat1 aus, wird in der Mutante die DNA Reparatur Maschinerie konstant hoch gehalten. Unterstützt wird das Ergebnis zusätzlich durch den hohen Transkriptlevel einer Helikase (HVO_A0441). Während der Knospung der Hefe konnte gezeigt werden, dass acetyliertes Histon bei Beendigung der DNA Reparatur nach einem Strangbruch involviert ist (Chen & Tyler, 2008; Costelloe & Lowndes, 2010). Das Histon H3 wird dabei an Position 56 an einem Lysinrest acetyliert. Die acetylierte Form des Histons wird für die erneute Kondensation der DNA nach einer Reparatur während der S-Phase benötigt und stellt gleichzeitig u.a. ein internes Signal zum Weiterführen des Zellzyklus dar. Dies bedeutet für *H. volcanii*, dass durch die Deletion von Pat1 das Histon nicht mehr acetyliert werden kann und somit das Signal zur Beendigung von DNA Reparaturen und die Repression entsprechender Gene ausbleibt. Der Zellzyklus von *H. volcanii* war insgesamt jedoch nicht betroffen, da die Zellen keinerlei morphologischen oder wachstumsabhängigen Phänotyp zeigten. Die Ergebnisse der Transkriptomanalysen demonstrieren, dass die Funktionen von Pat1 möglicherweise von anderen Acetyltransferasen komplementiert werden können und nur sehr wenige Transkripte speziell in Abhängigkeit von Pat1 reguliert werden. In der Arbeitsgruppe Mevarech wurden auch einige Doppelmutanten erzeugt, die in Zukunft durch weitere Transkriptomvergleiche eine Antwort darauf liefern könnten.

Die Deletion der HDAC *sir2* in *H. volcanii* resultierte in einer Transkriptomänderung von 64 Transkripten im Vergleich zum Wildtyp. Die Transkripte lassen sich insgesamt in nur wenige Funktionsgruppen einteilen. Das spricht dafür, dass Sir2 ebenfalls wie Pat1 eine sehr gezielte Funktion innerhalb der Zelle ausübt. Von den in der Deletionsmutante induzierten Transkripten sind das Muc19 Precursor Protein sowie ABC Transporter überdurchschnittlich häufig vertreten. Muc19 ist bisher nur als putativ annotiert. Es weist Homologien zu Adhesinen und anderen Oberflächenproteinen u.a. von *Streptococcus* und *Staphylococcus* auf. Welche genaue Funktion Muc19 in *H. volcanii* besitzt, ist jedoch bisher nicht bekannt. In humanen Krebsepithelzellen konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von HDAC Inhibitoren wie TSA oder Butyrat *muc* Gene induziert (Vincent *et al.*, 2007;

Hatayama *et al.*, 2007). HDACs scheinen dabei über die posttranslationale Modifikation der Histone eine regulatorische Wirkung auf Mucine zu haben. Oberflächen-Glykoproteine sind bei den Archaea weit verbreitet. Sie bilden eine Art Schutzhülle um die Zelle und verhindern damit vor allem eine Austrocknung (**Abbildung 21**). Zusammen mit den S-Layer Glykoproteinen, die unmittelbar die Oberfläche der archaealen Zelle stabilisieren, stellen Mucine einen effektiven Schutz vor extremen Bedingungen (hohe Temperaturen, hoher Salzgehalt, etc.) dar (Eichler, 2003). Wie alle Oberflächen-Glykoproteine müssen auch Mucine exportiert werden. Diese werden mit Hilfe von Transportern an die Oberfläche transportiert. Eine Induktion von Muc-Genen könnte daher parallel auch in einer positiven Expression von geeigneten Transportproteinen resultieren. Ob das in den Transkriptomanalysen induzierte ABC-Transporter Gencluster HVO_B0217-221 eine derartige Funktion besitzt, ist jedoch nicht geklärt. Neben Muc19 ist auch ein weiteres als „spore coat“ annotiertes Protein (SCP) in der Deletionsmutante induziert. SCP weist Ähnlichkeit zu CotA aus *Bacillus subtilis* auf. CotA ist an der äußeren Schicht von Sporen lokalisiert (Imamura *et al.*, 2010). Die Vermutung liegt nahe, dass sich durch die Deletion von Sir2 die Oberflächenstruktur von *H. volcanii* nachhaltig ändert. Die geplante elektronenmikroskopische Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Rachel (Universität Regensburg) könnte schon sehr bald Aufschluss darüber geben.

Bei den im Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase induzierten Transkripte ist die Mehrheit im Bereich der Chemotaxis und Flagellensynthese zu finden. Zehn der 28 Transkripte kodieren für Gene der genannten Funktionen. Zusätzlich existieren noch vier weitere Transkripte, die auf ein als Fibronectin annotiertes Gen verweisen. Fibronectin wird in der Regel an der Zelloberfläche präsentiert und ist dort an der Zelladhäsion beteiligt (Campbell, 2008). 50% der induzierten Transkripte sind also an der Ausbildung von Oberflächenorganellen, der Signaltransduktion und anschließender Motilität beteiligt. Es ist bisher nichts darüber bekannt, dass die Deacetylierung von Proteinen einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Expression von Flagellen und die Chemotaxis besitzt. In *E. coli*

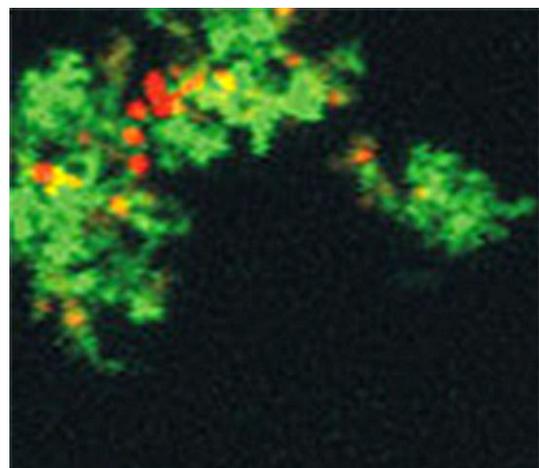


Abbildung 21

Haloquadratum walbyi (rot) schützt sich mit einer Halomucinschleimhülle (grün) vor dem „Austrocknen“.
 Urheber: Max-Planck-Institut für Biochemie/Oesterhelt

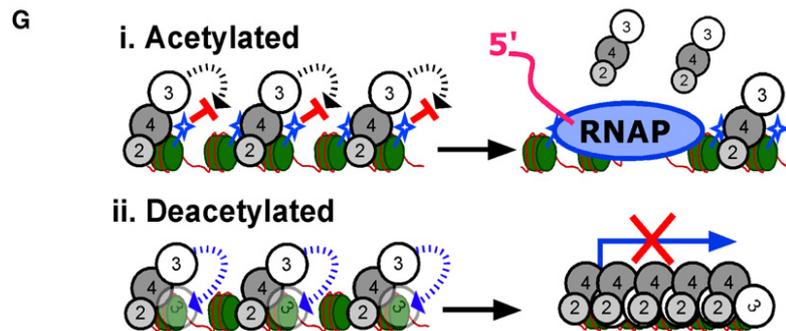


Abbildung 22

Schematisches Modell der Transkriptionsregulation durch den Sir-Komplex in *S. cerevisiae*. Die DNA ist dabei in Nukleosomen kompaktiert (grün). Das Histon H4 kann am Lysin 16 acetyliert werden. Im acetylierten Zustand liegt die DNA als Heterochromatin vor und der Komplex kann durch die RNA Polymerase (blau) verdrängt werden. Wird das Histon H4 am Lysinrest 16 durch Sir3 deacetyliert, kondensiert die DNA und die Transkription wird durch einen übergeordneten Sir-Komplex verhindert. (Johnson *et al.*, 2006)

konnte eine Acetylierung des Responseregulators CheY *in vivo* nachgewiesen werden (Khan *et al.*, 2000). CheY vermittelt dabei das Signal zwischen den Transmembran Methylakzeptierenden Chemotaxis Protein (MCP) Rezeptor Komplexen und dem basalen Flagellenmotor. Welche genauen Mechanismen durch die Acetylierung von CheY in Gang gesetzt werden, ist jedoch noch völlig unbekannt. Arbeiten über humane Melanomzellen konnten einen Einfluß des Deacetylaseinhibitors TSA und einem DNA Methyltransferase Inhibitors, 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza-dC), auf die Motilität der Zellen zeigen (Koh *et al.*, 2007). Die Motilität und Chemotaxis wurde dabei indirekt durch die Aktivierung und Expression eines Rezeptors für Sphingosin-1-Phosphat stimuliert. Die Inhibierung der Methyltransferase resultiert dabei in der fehlenden Methylierung von Basen im Promotorbereich und die Aktivierung der Transkription des Rezeptors. Wie die Deaktivierung der HDAC durch TSA die Transkription beeinflusst, ist jedoch nicht genau geklärt. Vermutlich findet die Regulation ebenfalls durch die Deacetylierung von DNA Bindeproteinen statt.

In Eukaryoten existieren verschiedene Proteine der Sirtuinfamilie. Im Menschen z.B. gibt es sieben Sirtuine (SIRT1-7), die in insgesamt vier Klassen eingeteilt werden (**Tabelle 13**). Alle haben jeweils unterschiedliche Substrate und üben verschiedene Funktionen innerhalb der Zelle aus. Auch eine differenzierte Lokalisation zeichnet die SIRTs aus. Eine Sir-abhängige Regulation der Transkription konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden (Moazed *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2006). Dabei katalysiert ein Sir-Komplex bestehend aus Sir2/3/4 die Deacetylierung von Histon H4 an Position K16 (**Abbildung 22**). Die Acetylierung ist beispielsweise für die Assemblierung von neu synthetisierten Histonen in Nukleosomen wichtig sowie bei der Bildung von Heterochromatin. Sir-Komplexe binden unmittelbar an

den mit DNA gepackten Nucleosomen und verändern dadurch die Struktur des Heterochromatins. Die Transkription der auf diese Weise kompaktierte DNA ist dadurch stillgelegt. Für das Silencing sind jedoch *in vitro* alle drei Sir Proteine von Nöten (Johnson *et al.*, 2006). In *H. volcanii* konnte allerdings neben *sir2* keine Gene gefunden werden, die für homologe Sir3 oder Sir4 Proteine kodieren. Auf welche Weise Sir2 in *H. volcanii* die Transkription reguliert, bleibt vorerst noch im Dunkeln. Für weitere Arbeiten käme vor allem die Suche nach möglichen Interaktionspartnern von Sir2 in Frage. Möglicherweise existiert auch in Archaea ein Sir-ähnlicher-Komplex, der direkt oder indirekt an die DNA oder den Histonen bindet und dadurch unmittelbar Einfluß auf die Regulation der Transkription besitzt.

Tabelle 13Übersicht der Sirtuin Proteinfamilie. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Sirtuin>)

Klasse	Species			Intracelluläre Lokalisation	Aktivität	Funktion
	Yeast	Mouse	Human			
Ia	Sir2 oder Sir2p, Hst1 oder Hst1p Hst2 oder Hst2p	Sirt1	SIRT1	Nukleus	Deacetylase	Metabolismus, Inflammation
Ib		Sirt2	SIRT2	Cytoplasma	Deacetylase	Zellzyklus, Tumorgenese
Ic		Sirt3	SIRT3	Nukleus und Mitochondrien	Deacetylase	Metabolismus
II	Hst3 oder Hst3p, Hst4 oder Hst4p	Sirt4	SIRT4	Mitochondrien	ADP-ribosyl Transferase	Insulin Sekretion
III		Sirt5	SIRT5	Mitochondrien	Deacetylase	Ammonium Detoxifikation
IVa		Sirt6	SIRT6	Nukleus	ADP-ribosyl Transferase	DNA Reparatur
IVb		Sirt7	SIRT7	Nukleus	unbekannt	rDNA Transkription

4.1.2.1 Sir2, Motilität und Chemotaxis – Theorie...

Neben Chemotaxis Genen waren hauptsächlich Transkripte für Flagellen im Wildtyp induziert. Beide Funktionen – Flagellen und Chemotaxis – teilen sich ein ca. 25kbp Gencluster. Über Flagellen in Archaea ist bisher noch nicht viel bekannt. *H. salinarum* stellt in dieser Hinsicht den Modellorganismus dar, an dem vor allem in der Arbeitsgruppe Oesterhelt (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) gearbeitet wird. Dort wird auch die Chemotaxis von *H. salinarum* intensiv untersucht. **Abbildung 23** zeigt eine schematische Übersicht der Signaltransduktion in *H. salinarum* wie sie bisher bekannt ist.

H. salinarum ist mono- oder bipolar flagelliert. Die Flagellen bilden dabei eine definierte Struktur („polar cap“) aus (Kupper *et al.*, 1994). Jedes einzelne Filament besitzt einen eigenen Flagellenmotor. Die Rotation kann im (vorwärts) oder gegen den Uhrzeigersinn (rückwärts) erfolgen (Marwan *et al.*, 1991). Die Flagellen bestehen aus 5 verschiedenen Flagellinen (FlgA1-A2 und FlgB1-B3; Alam & Oesterhelt, 1987; Gerl *et al.*, 1989). Diese beiden Einheiten sind in zwei unterschiedlichen Transkripten kodiert. Es existiert in *H. salinarum* noch ein weiteres Gencluster FlaD-FlaJ, was bei der Biosynthese der Filamente eine Rolle spielt (**Abbildung 24**). FlaI beispielsweise ist essentiell für den Bau der Flagellen. Die Deletion des Gens resultierte in einer unflagellierten Mutante (Patenge *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass der Zusammenbau keineswegs wie in

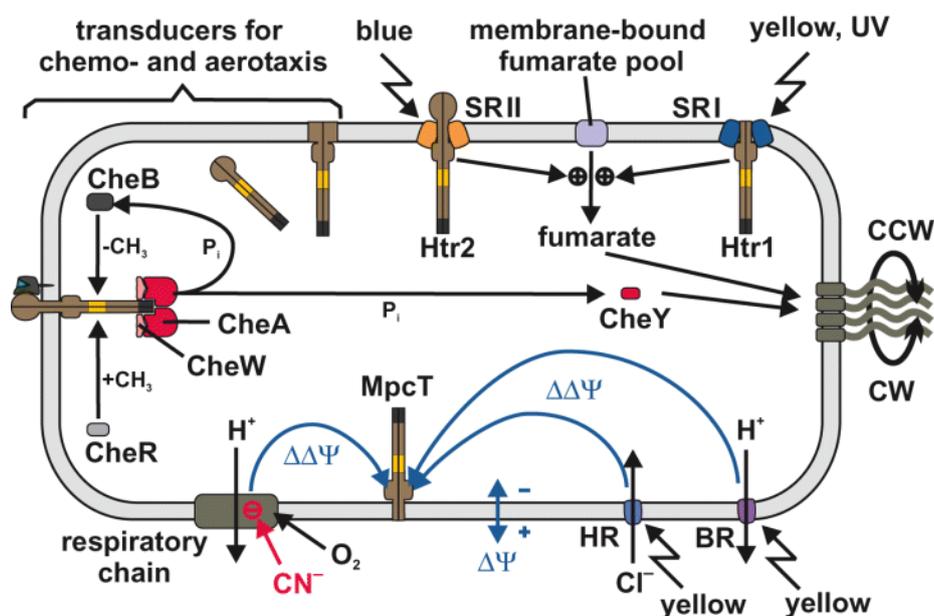
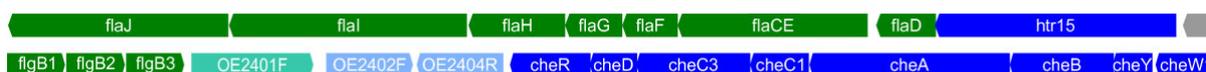


Abbildung 23

Schematische Darstellung der Signaltransduktion und Transducer Proteine (Htrs) in *H. salinarum*. (Koch & Oesterhelt, 2005)

**Abbildung 24**

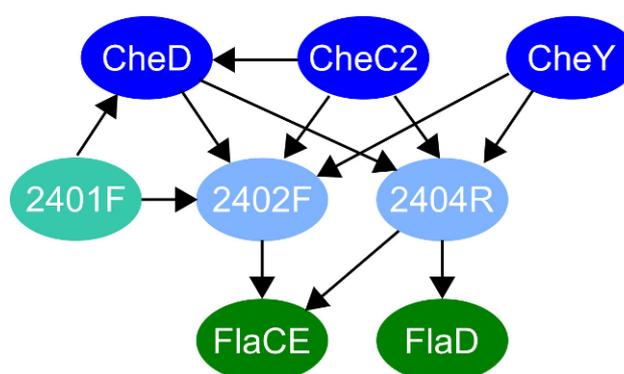
Flagellen und Chemotaxis Gencluster von *H. salinarum*. Blau sind Gene, die in der Chemotaxis involviert sind, während in grün Gene für den Bewegungsapparat dargestellt sind. (Schlesner *et al.*, 2009)

Bakterien stattfinden kann. In Bakterien werden die Flagelline durch das hohle Filament nach außen transportiert und am Ende das Filament erweitert. Archaeale Flagellins hingegen werden wahrscheinlich an der Basis des Flagellums angefügt. Zum einen sind die Flagellen in *H. salinarum* nur etwa halb so dick wie in Bakterien. zum anderen konnte in einem Modell des halobakteriellen Flagellums kein zentraler Kanal innerhalb des Filaments gezeigt werden (Cohen-Krausz and Trachtenberg, 2002).

In unmittelbarer Nähe des Fla-Gencluster existiert auch in *H. salinarum* ein Chemotaxis-Gencluster bestehend aus *cheR/D/C3/C1/A/B/Y/W*. In jüngsten Untersuchungen konnten zudem drei bisher unbeachtete Gene zwischen den beiden großen Genclustern als *cheF1* (OE2401F), *cheF2* (OE2402F) und *cheF3* (OE2404R) identifiziert werden (Schlesner *et al.*, 2009). Es konnte darüber hinaus durch Analysen der Protein-Protein Interaktion gezeigt werden, dass diese drei Proteine sowohl mit Che (Y, D und C2) als auch Fla (CE und D) Proteinen interagieren (**Abbildung 25**). Eine der Deletionsmutanten war beispielsweise nicht mehr in der Lage die Rotation der Flagellen umzuschalten – die Zellen konnten nur vorwärts schwimmen. Die Signaltransduktion war nachhaltig gestört (Schlesner *et al.*, 2009).

Die Genomabschnitte beider Organismen gleicht sich sehr stark. Die Organisation mancher Gene ist teilweise eine andere, jedoch konnten ohne Ausnahme exakt die gleichen Gene in *H. volcanii* identifiziert werden (Vgl. **Abbildung 18** und **Abbildung 23**). Durch den hohen haloarchaealen Verwandtschaftsgrad ist daher die gleiche Weise beim Zusammenbau und der Chemotaxis anzunehmen.

Die Transkriptomanalysen aus dieser Arbeit an *H. volcanii* zeigten die Repression des kompletten *fla/che*-Genclusters in der $\Delta sir2$ Deletionsmutante. Interessanterweise

**Abbildung 25**

Identifizierte Interaktionen zwischen Che und Fla Proteinen in *H. salinarum*. OE2401F, OE2402F und OE2404R sind die neu entdeckten CheF1-F3. Sie vermittelt u.a. die Signalweiterleitung zur Flagelle. (Schlesner *et al.*, 2009)

bezog sich die Repression nicht nur auf *fla*-Gene, sondern auch speziell auf *che* Genregionen. Die Regulation der Transkription durch Sir2 beeinflusst also den kompletten Bereich für die Flagellensynthese und Chemotaxis und nicht nur einen von beiden. Ob Sir2 die Transkription aller Gene direkt beeinflusst, z.B. durch Bildung von Komplexen an den Histonen oder indirekt durch die Deacetylierung von regulatorischen Proteinen, konnte noch nicht geklärt werden. Weitere Untersuchungen an Deletionsmutanten, deren Transkriptom und Protein-Protein Interaktionen könnten Aufschluss darüber geben, wie die einzelnen Gene sich möglicherweise gegenseitig in ihrer Transkription beeinflussen und wie das Regulationsnetzwerk aufgebaut ist.

4.1.2.2 Sir2, Motilität und Chemotaxis – ...und Praxis

Wie durch die Western Blot Analysen gezeigt werden konnte, ist Sir2 in allen Wachstumsphasen präsent. Eine Regulation der Motilität durch Sir2 sollte daher ständig stattfinden. Auf der anderen Seite wird auch die Translation von Sir2 selbst von *H. volcanii* sehr genau kontrolliert. Während das Transkript von *sir2* in der Transitionsphase sehr stark expremiert wurde, konnte keine gleichwertige Induktion auf Proteinebene nachgewiesen werden. Ein leichter Anstieg der Expression des Proteins war nur transient zu beobachten. Das Protein war zudem zu einem Zeitpunkt nachweisbar, an dem keinerlei Transkript vorlag. Die Translation von Sir2 wird also nicht nur sehr genau überwacht, sondern zeigt das Protein auch eine hohe Stabilität. Es ist zu vermuten, dass sowohl die Translation als auch die Degradation von Sir2 einen Kontrollmechanismus darstellt, um das Proteinverhältnis konstant zu halten. Interessanterweise konnte der Phänotyp der Mutante durch die Überexpression einer extrachromosomalen *sir2* Kopie nicht komplementiert werden. Das Gegenteil war sogar der Fall – die komplementierte Mutante zeigte keinerlei Schwärmverhalten mehr. Sir2 stellt somit ein Modellbeispiel für den schmalen Grat einer präzisen Regulation der Genexpression dar.

Ein basales Protein wie Sir2 übt sehr wahrscheinlich eine globale Rolle bei der Deacetylierung aus. Zum einen existiert neben *sir2* nur noch eine weitere HDAC, *hdaI*, zum anderen dient die Deacetylierung von Proteinen auch der Aktivierung oder Deaktivierung der auszuübenden Funktion. Letzteres kann, muss sich aber wiederum nicht auf die Regulation der Transkription auswirken. Durch die gewählte Methode der Transkriptomanalysen lässt sich eine solche globale Funktion von Sir2 nicht identifizieren. Eine globale Identifikation von de- oder acetylierten Proteinen („Acetylom“) ist bisher

absolut neuartig (Choudhary *et al.*, 2009) und konnte im Rahmen der Arbeit noch nicht angewendet werden. Für fortführende Arbeiten wäre dies ein zusätzlicher Ansatz zur Aufklärung der Funktion von Sir2. Interessanterweise ist Sir2 im Gegensatz zu HdaI nicht essentiell. Die Transkriptomanalysen legen nahe, dass einige Gene speziell von Sir2 abhängig sind, die Funktion von Sir2 jedoch in keinen lebensnotwendigen Bereichen involviert ist. Entweder wird die Funktion durch eine andere HDAC komplementiert – aufgrund der bisherigen Ergebnisse kommt dazu nur HdaI oder eine noch völlig unbekannte Deacetylase in Frage –, oder die Funktionen von Sir2 und HdaI sind strikt getrennt. Während HdaI essentielle Deacetylierungen katalysiert, ist Sir2 für das Überleben des Organismus entbehrlich. Es ist bekannt, dass HdaI zur Klasse II der HDACs gehört, während Sir2 eine Klasse III HDAC darstellt. Beide unterscheiden sich vor allem in ihrer katalytischen Funktionsweise (Yang & Seto, 2008). In Eukaryoten kommen beide sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma vor. Dies spricht für eine völlig voneinander unabhängige Proteinklientel. Der Nuclei-Import einer HDAC, deren Funktion von einer bereits vorhandenen zweiten HDAC übernommen werden kann, ist vollkommen ungeschlüssig. Weitere Untersuchungen zum Verhältnis zwischen Sir2 und HdaI sind daher erforderlich.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalysen führten klar zur Vorhersage eines Phänotyps. Während der Wildtyp sehr gute Schwärmeigenschaften zeigte, war dies in der $\Delta sir2$ Deletionmutante komplett inhibiert (**Abbildung 14d,e**). Aber entgegen der ersten Vermutung, dass die Mutante keine Flagellen besitzt, konnte in der Arbeitsgruppe Wirth (Universität Regensburg) eine gleichwertige Filamentierung der Oberfläche erkannt werden (persönliche Mitteilung). Außerdem zeigte die Mutante in den „Motility Assays“ der Arbeitsgruppe Wirth eine Beweglichkeit, jedoch mit verminderter Geschwindigkeit und Geradlinigkeit. Der Phänotyp wird also nicht, wie zunächst vermutet, durch das Fehlen von Flagellen, sondern durch den Mangel gerichteter Bewegung hervorgerufen. Erstaunlicherweise muss daher die hohe Taumelrate der Mutante dazu führen, dass diese in den Schwärmversuchen kaum Fortbewegung zeigt. Die Mutante ist nicht mehr in der Lage gerichtet entlang eines Konzentrationsgradienten zu schwärmen. Die fehlende Deacetylierung stört in erheblichem Maße die Signaltransduktion eines Stimulus. Dies wird durch die Acetylierung des Responseregulators CheY (s. o.) reguliert. CheF1 und F2 sind erst kürzlich in *H. salinarum* als zusätzliche Regulatoren der Flagellenbewegung identifiziert worden und könnten daher ebenfalls neben CheY eine Rolle spielen.

Inwiefern diese Proteine posttranslational modifiziert werden, ist aufgrund der Aktualität der Ergebnisse aber noch völlig unbekannt.

Es konnte durch diese Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass *H. volcanii* chemotaktisch aktiv ist. Neben Zuckern und Aminosäuren kann *H. volcanii* auch Intermediate des Stoffwechsels oder Coenzyme wie NAD⁺ sensieren. Eine positive Wirkung auf die Chemotaxis begründet sich in der Regel auf die Möglichkeit diese Substrate verwerten zu können. Glukose, Xylose, Galaktose und Saccharose stellen dabei die klassischen Zucker dar, die *H. volcanii* verstoffwechseln kann. Pyruvat wird dabei als Acetyl-CoA dem TCA-Zyklus zugeführt. Glycerin kann phosphoryliert oder durch eine Dehydrogenase für den Embden-Meyerhoff Stoffwechselweg herangezogen werden (Falb *et al.*, 2008). Glycerin kommt sehr häufig in hypersalinen Habitaten vor und steht daher in der Regel als Nährstoff für Haloarchaea zur Verfügung (Borowitzka *et al.*, 1977; Phadwal & Singh, 2003). In *H. volcanii* konnte bei Leucin als einzige Aminosäure eine starke Chemotaxis beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist sehr überraschend, da *H. volcanii* keinerlei Wachstum mit Leucin als einziger Kohlenstoffquelle zeigt, während Isoleucin gut verwertet werden kann (Sisignano *et al.*, 2009). Wie Leucin und nicht Isoleucin positiv auf die Chemotaxis wirkt, ist daher vollkommen unbekannt. Sehr wahrscheinlich handelt es sich jedoch um ein falschpositives Ergebnis.

Interessanterweise befindet sich auch Nicotinamid unter der Attraktanten, was in hohen Konzentrationen zur Inhibierung der NAD⁺-abhängigen HDACs sowie zu Wachstumsdefiziten führt. In geringen Konzentrationen hat es also eine stimulierende Wirkung. Die einzige Substanz, die optisch wie auch experimentell als stärkstes Repellent in Erscheinung trat, war Cystein. Durch die lange Inkubationszeit (>12h) ist es jedoch möglich, dass durch den oxidativen Zerfall des Cysteins Intermediate entstanden, die eine inhibitorische Wirkung besitzen (Storch *et al.*, 1999).

Insgesamt sind die Ergebnisse teilweise noch inhomogen. Während z.B. in der „Chemical-in-Plug“ Methode eine positive Chemotaxis bei Serin und Methionin identifiziert werden konnte, trat dies bei der Kapillar Methode nicht ein. Für die erste Identifikation von chemotaktisch wirksamen Substanzen konnten die beiden Methoden jedoch erfolgreich angewendet werden. Durch die zeitliche Limitierung dieser Arbeit konnten die Methoden, die bereits für *H. salinarum* etabliert sind, noch nicht vollständig auf *H. volcanii* übertragen werden und bedürfen der weiteren organismusspezifischen Optimierung.

4.1.2.3 Regulation der Transkription – Pat1, Sir2 und das Histon

Die Transkriptomanalysen der Histonmutanten tragen ebenfalls dazu bei, die Funktion von Sir2 und den Einfluss des Histons auf die Regulation der Transkription in *H. volcanii* aufzuklären. Während die Analysen der Mutante mit dem deacetylierten Histon, dessen Lysinreste in Arginin verändert wurden, keinerlei aussagekräftiges Ergebnis erzielte, stellen die Analysen der irreversibel acetylierten Form ein beachtliches Resultat dar. Zehn Microarray Transkripte sind sowohl in den Analysen über Sir2 als auch der Histonmutante QQ im Vergleich zum Wildtyp in der gleichen Wachstumsphase identisch induziert oder reprimiert. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig das Zusammenspiel von Sir2 und dem Histon und verdeutlicht, dass die Regulation der Genexpression dieser zehn Transkripte auf der Modulierung der DNA-Bindung des Histons beruht.

Gleichzeitig wird mit diesem Resultat aber auch die bisherige Vermutung, dass HdaI, mit dem das Histon ein Operon bildet, nicht die exklusive Deacetylase ist. Da HdaI essentiell für *H. volcanii* ist und entsprechend keine Deletionsmutante für diese Arbeit zur Verfügung stand, kann bisher keinerlei Aussage darüber getroffen werden, inwiefern HdaI überhaupt an der Deacetylierung des Histons beteiligt ist. Für die weitere Aufklärung ist daher die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion von Bedeutung.

Beim Vergleich aller Transkriptomanalysen konnte auch gezeigt werden, dass das Histon in der exponentiellen Wachstumsphase hauptsächlich in deacetylierter Form vorliegt, da der Unterschied von Acetylase-Deletionsmutante oder irreversibel acetyliertem Histon zum Wildtyp sehr gering war. Das Ergebnis verdeutlicht, dass in *H. volcanii* eine Histon-abhängige Regulation der Genexpression stattfindet. Die irreversible Acetylierung des Histons zeigte zudem einen stärkeren Einfluß auf das Transkriptom als die $\Delta sir2$ Mutante, bei der das Histon durch eine andere HDAC – wahrscheinlich HdaI – weiterhin deacetyliert werden kann. Insgesamt konnte damit zum ersten Mal im Reich der Archaea ein Zusammenhang zwischen posttranslationaler Modifikation eines DNA-Bindeproteins und der regulatorischen Funktion bei der Genexpression nachgewiesen werden.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Weiterstadt
Axon GenePix® 4200A	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Axioskop 40 + Axiocam MRm	Carl Zeiss, Oberkochen
Beckman Avanti J-25 Zentrifuge	Beckmann, München
Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Hanau
Blotting Apparatur Fastblot B43	Biometra, Göttingen
Brutschrank	Buchhofer, Reutlingen
Brutschrank B6060	Heraeus Instruments, Hanau
Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
GenePulser® Elektroporation System	Bio-Rad, München
Heizblock BT3	Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK
Heizblock HLC BT 1302	Scientific Plastics Ltd, Milton Keynes, UK
Hybridisierungsöfen Compact Line OV4	Biometra, Göttingen
Innova 4300 Inkubator Shaker	New Brunswick, Nürtingen
Microgrid II Arrayer	Biorobotics, Woburn, USA
Mikroskop Axiostar Plus	Carl Zeiss, Oberkochen
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop Tec, Rockland, USA
Neubauer Zählkammer	Hirschmann, Eberstadt
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz
Pipette Eppendorf Reference® 0,5µl-10µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette FinnpiPETTE® Digital 200µl-1000µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipette FinnpiPETTE® Digital 40µl-200µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipette FinnpiPETTE® Digital 5µl-40µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipette StarLab MicroOne® 0,1µl-2,5µl	STARLAB, Ahrensburg
Polystar 242	Rische + Herfurth, Hamburg

Bezeichnung	Hersteller
RealTime-PCR Cycler Rotor Gene 3.5	Cobett Research, Mortlake, AU
SDS Gellaufkammer	Hoefer, Holliston, USA
Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Sorvall RC 5C plus Zentrifuge	Kendro, Hanau
Sorvall RC2-B Zentrifuge	Du Pont, Wilmington, USA
Specord® S600 Spectrophotometer	Analytic Jena, Jena
SPECTRAmax® 340PC	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Tischzentrifuge 5415C Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
UV-Stratalinker® 1800	Stratagene, Leiden, NL
Videosystem, E.A.S.Y. 440K	Herolab, Wiesloch
Waage PM 4800 Delta Range	Mettler, Gießen
Waage TE1245OCE	Sartorius, Göttingen

5.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose Typ VII, low melting point	Appllichem, Darmstadt
Ampicillin-Natrium Salz	Roth, Karlsruhe
Bacto™-Agar	BD, Heidelberg
Bacto™-Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto™-Trypton	BD, Heidelberg
DIG- dUTP	Roche, Mannheim
5-FOA	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Novobiocin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PureExtreme® dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
SYTO® 61 red fluorescent nucleic acid stain	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Weitere Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma Aldrich (Taufkirchen), Appllichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Roche (Mannheim) erworben. Die Chemikalien hatten mindestens einen Reinheitsgrad von „p.a.“.

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Biomax Light Film	Kodak, Stuttgart
Chromatographiepapier (GB 002 und GB 004)	Whatman, Dassel
Dialysemembran	Millipore, Eschborn
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Falcon Tubes (15 / 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Hybond-N Nylonmembran	GE Healthcare, München
Mikrotiterplatten (Rund-, / V- / Flachboden)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Greiner bio-one, Solingen
Pipettenspitzen (10 / 200 / 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Protran BA85 Nitrocellulosemembran	Whatman, Dassel
Reaktionsgefäße (0.2 / 1,5 / 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Whatman, Dassel

5.1.4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Big Dye Terminator RR Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
DNase I	Roche, Mannheim
DyNAmo™ SYBR® Green qPCR Master Mix	Finnzymes, Espoo, FL
M-MLV- Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Point Mutant	Promega, Mannheim
Pfu – DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RQ1 Dnase (RNase frei)	Promega Mannheim
T4 – DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Hot Start Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Taq PCR Mastermix	Qiagen, Hilden

5.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Rabbit IgG, Peroxidase gekoppelt	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Anti-Mouse IgG, Peroxidase gekoppelt	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tetra-His Antikörper (aus Maus)	Qiagen, Hilden
Anti-Digoxigenin, fab fragments, Alkalische Phosphatase gekoppelt	Roche, Mannheim
Acetylase- / Deacetylaseantikörper aus Kaninchen	Davids Biotechnologie, Regensburg

5.1.6 Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Lambda DNA <i>Eco</i> 130I Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RiboRuler™ Low Range RNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
SeeBlue Plus 2 Protein Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

5.1.7 System-Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockfort, USA
PCR-Kombi-Kit	Seqlab, Göttingen
PureYield™ Plasmid Midiprep Systems	Promega, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit	Axygen, Union City, USA
RNA Cleanup Kit	Macherey-Nagel, Düren
Rneasy® Mini- / Midi-Kit	Qiagen Hilden
Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Leiden, NL

5.1.8 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
pMH101	Vektor zur Klonierung eines Deletionsplasmids; Replikationsursprung sowie Ampicillinresistenz für <i>E. coli</i> . Selektionsgen <i>pyrE</i> aus <i>H. volcanii</i> .	Mathias Hammelmann
pSD1-R1/6	Shuttlevektor; Replikationsursprünge für <i>E. coli</i> und <i>H. volcanii</i> ; Ampicillin- und Novobiocinresistenz zur Selektion; <i>dhfr</i> -Gen hinter einem starken synthetischen Promotor.	Danner & Soppa, (1996)
pMD2	Ausgangsplasmid: pMH101; Deletionsvariante des Gens HVO_1488.	Diese Arbeit
pMD4	Ausgangsplasmid: pSD1-R1/6; Komplementation der HVO_1488 Deletionsmutante.	Diese Arbeit
pMD6	Ausgangsplasmid: pMH101; HVO_1488 + 3'-UTR und N-terminalen 6xHis-Tag.	Diese Arbeit
pMD10	Ausgangsplasmid: pTNA-HVO_0117-His; Plasmid für die Komplementation der Sir2 Deletion unter dem induzierbaren <i>tna</i> -Promotor	Diese Arbeit
pQE30	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> ; Ampicillinresistenz; N-terminaler 6xHis-Tag	Qiagen, Hilden
pQE30/Acetylase	Ausgangsplasmid: pQE30; Acetylase (<i>pat1</i>) aus <i>H. volcanii</i> zur Aufreinigung.	Mathias Hammelmann
pQE30/Deacetylase	Ausgangsplasmid: pQE30; Acetylase (<i>sir2</i>) aus <i>H. volcanii</i> zur Aufreinigung.	Mathias Hammelmann
pTNA-HVO_0117-His	Ausgangsplasmid: pMH101; Plasmid zur Überproduktion von HVO_0117 unter dem induzierbaren <i>tna</i> -Promotor.	Sebastian Schulz

5.1.9 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Anwendung
RspAH1-5'	cca gat cga tcc tac cgc gtc aga agc gac	Amplifikation zweier Fragmente von HVO_1488 und 5'-UTR. Anfügen eines N-terminalen 6xHis-Tags mit Hilfe der Oligonukleotide. Klonierung in pMH101.
RspAH1-3'	gag ctc gtg gtg atg gtg atg gtg cat gaa ggg tag ttt act cgg ac	
RspAH2-5'	cac cat cac cat cac cac gag ctc ggg aag aac tac gcg gac tta c	
RspAH2-3'	cca gtc tag att acg cct cgt cga aca gcg	
RspAH3-5'	cgg tat cga tta ccg cgt cag aag cga c	
RspAH3-3'	cgc ggg atc cct cgt aca ggc gg	
5 rspA1	gcg aat cga tta ccg cgt cag aag cga cgc c	Amplifikation zweier Fragmente (up-/downstream) von HVO_1488 zur Klonierung in pMH101. Deletion von HVO_1488. 3 rspA1 sowie 5 rspA2 wurden bei einer zweiten Klonierung durch RspA1 3' resp. RspA2 5' ausgetauscht, um eine Fusion der Fragmente durch eine PCR zu ermöglichen.
3 rspA1	gcg agg atc cct cgt aca ggc ggt cga tgt c	
5 rspA2	gcg agg atc ccg cga gac gca gaa aat cgc gg	
3 rspA2	gcg atc tag agc tcg acc gag ccg agc gc	
RspA1 3'	gcg tct cgc gct cgt aca ggc ggt cga tgt cg	
RspA2 5'	gcc tgt acg agc gcg aga cgc aga aaa tcg c	
rspA-N 5'	cta cgc gga ctt aca cga ccc g	Sonde für das Gens HVO_1488 oder der verkürzten Version.
rspA-N 3'	acg cct cgt cga aca gcg tc	
rspA4 5'	ccc tcc atg ggt aag aac tac gcg	Amplifikation des Gens HVO_1488 mit 350 bp 3'-UTR zur Klonierung in pSD1-R1/6. Komplementation der Deletionsmutante.
rspA4 3'	gct cgg tac cct ccg cga gg	
HisTag 5'	cac cat cac cat cac cac gag ctc	Nachweis des His-Tags im Genom.
HisTag 3'	gag ctc gtg gtg atg gtg atg gtg	
Sir2-1	gaa gct tcc act tcc gtg cg	Amplifikation des <i>sir2</i> -Gens zur Überprüfung der Wildtyp oder mutierten Genvariante.
Sir2-2	agt tgg ccg ccg gta atc tg	

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) bezogen und in TE-Puffer pH8 mit einer Konzentration von 50 pmol/μl gelöst.

5.2 Organismen und Zellzucht

5.2.1 Organismen

a) *Escherichia coli*

E. coli XL1 blue MRF' (Stratagene, Leiden; Bullock *et al.*, 1987)

D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac
[F'*proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tet^R)*]

b) *Haloferax volcanii*

Stamm	Genotyp	Beschreibung
H26	DS70 Δ <i>pyrE</i>	Uracil auxotroph
WR541	DS70 Δ <i>pyrE</i> Δ <i>hdrB</i> Δ <i>leuB</i> Δ <i>trpA</i>	Auxotrophie für: Uracil, Thymidin, Leucin, Tryptophan
WR580	WR541 Δ <i>sir2</i>	Deletion Deacetylase <i>sir2</i>
WR643	WR541 Δ <i>pat1::trpA</i>	Deletion Acetylase <i>pat1</i>
WR644	WR541 Δ <i>pat2::hdrB</i>	Deletion Acetylase <i>pat2</i>
WR660	WR541 Δ <i>elp3::leuB</i>	Deletion Acetylase <i>elp3</i>
WR676	WR541 <i>hvv::K120R</i>	Punktmutation des Histons an Position 120 (K \rightarrow R)
WR680	WR541 <i>hvv::K56Q,K120Q</i>	Punktmutation des Histons an Position 56 und 120 (K \rightarrow Q)
WR681	WR541 <i>hvv::K56R,K120R</i>	Punktmutation des Histons an Position 56 und 120 (K \rightarrow R)
WR701	WR541 <i>hvv::K56R</i>	Punktmutation des Histons an Position 56 (K \rightarrow R)
WR705	WR541 <i>hvv::K56Q</i>	Punktmutation des Histons an Position 56 (K \rightarrow Q)
WR706	WR541 <i>hvv::K120Q</i>	Punktmutation des Histons an Position 120 (K \rightarrow Q)

Alle WR-Stämme wurden von Prof. Moshe Mevarech (Universität Tel-Aviv, Israel) bezogen. H26 wurde von Prof. Thorsten Allers (Universität Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt.

5.2.2 Nährmedien und Zellkultivierung

a) *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* wurde in SOB⁺-Komplexmedium durchgeführt (Hanahan, 1983). Für die Kultivierung in Flüssigmedium wurden geeignete Erlenmeyerkolben mit 100-600 ml Medium oder Reagenzgläsern mit 5 -10 ml Medium befüllt. Das Wachstum erfolgte aerob bei 37°C auf einem Flachbettschüttler bei 250 Upm. Festmedien wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

SOB ⁺		
Stoff	Menge	Endkonzentration
NaCl	0,6 g	10 mM
KCl	0,187 g	2,5 mM
1 M MgCl ₂ /MgSO ₄	10 ml	10 mM
Trypton	20 g	2%
Hefeextrakt	5 g	0,5%
ad 1000 ml VE-H ₂ O und autoklavieren		

Zur Herstellung von Festmedien wurde 1,2% (w/v) Bacto™-Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

Selektivmedien wurden durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin nach Abkühlen des Mediums hergestellt.

b) *Haloferax volcanii*

Die Kultivierung von *H. volcanii* erfolgte sowohl in Komplexmedium (Nieuwlandt & Daniels, 1990) als auch in synthetischem Medium. Die Kulturen wuchsen aerob oder anaerob (N₂ Atmosphäre) in 30 ml Medium bei 250 Upm und 42°C. Feste Medien wurden im Brutschrank bei 42°C inkubiert.

I. Daniels Komplexmedium

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Salzlösung	NaCl	125 g	2,14 M
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	45 g	221 mM
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10 g	40,6 mM
	KCl	10 g	134 mM
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,34 g	9 mM
	1 M Tris/HCl pH 7,2	50 ml	50 mM
ad 900 ml VE-H ₂ O, autoklavieren			

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Nährstoff- lösung	Trypton	5 g	0,5 %
	Hefe-Extrakt	2 g	0,2 %
ad 100 ml VE-H ₂ O, autoklavieren			

Die Nährstoffe wurden nach Autoklavieren zur Salzlösung hinzugegeben. Für das Wachstum von auxotrophen Kulturen wurde zusätzlich 1 ml

- Uracil (50 mg/ml Stammlösung) und/oder
- Tryptophan (50 mg/ml Stammlösung) und/oder
- Leucin (50 mg/ml Stammlösung) und/oder
- Thymidin (40 mg/ml Stammlösung) und/oder

ins Medium gegeben.

II. Synthetisches Medium

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Spurenelementlösung	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g	3,5 µM
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,03 g	1,5 µM
	H ₃ BO ₃	0,3 g	50 µM
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,2 g	8,5 µM
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,01 g	0,5 µM
	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,02 g	1 µM
	Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0,03 g	1 µM

pH mit HCl auf 3-4 einstellen, ad 100 ml VE-Wasser, sterilfiltrieren

	Stoff	Menge	Endkonzentration
C-Quellen	Casaminosäuren	20 g	0,25%
	Glukose	20 g	0,25%
	Xylose	20 g	0,25%

jeweils nur eine C-Quelle herstellen, ad 100 ml VE-Wasser, autoklavieren

	Stoff	Menge	Endkonzentration
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,23 g	8 µM

pH mit HCl auf 3-4 einstellen, ad 100 ml VE-Wasser, sterilfiltrieren

	Stoff	Menge	Endkonzentration
	NH ₄ Cl	5,35 g	10 mM

ad 100 ml VE-Wasser, autoklavieren

	Stoff	Menge	Endkonzentration
	K ₂ HPO ₄	8,7 g	1 mM

ad 50 ml VE-Wasser, autoklavieren

	Stoff	Menge	Endkonzentration
	NaNO ₃	17 g	50 mM

ad 200 ml VE-Wasser, autoklavieren

Als Basis für das synthetische Medium diente die Salzlösung, wie sie bereits im Komplexmedium benutzt wurde. Nach Abkühlen der Lösungen wurden diese wie folgt zusammengegeben:

900 ml	Salzlösung
10 ml	NH ₄ Cl
1 ml	K ₂ HPO ₄
1 ml	Spurenelemente
1 ml	FeSO ₄
1 ml	1x MEM Vitamin Solution (Sigma Aldrich, Taufkirchen)
12,5 ml	C-Quelle

Für anaerobes Wachstum:

50 ml	NaNO ₃
-------	-------------------

Für auxotrophe Stämme: siehe Komplexmedium.

Selektionsmedien wurden durch Zugabe von Novobiocin (Endkonzentration 0,4 µg/ml) oder 5-FOA (Endkonzentration 150 µg/ml) hergestellt.

Für Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,3% Bacto™-Agar hinzugegeben.

5.2.3 Stammhaltung

a) *Escherichia coli*

Für die dauerhafte Lagerung von *E. coli* Stämmen wurden jeweils 1 ml einer Übernachtskultur in 2 ml Mikro-Schraubröhren mit jeweils 1 ml sterilem Lagerpuffer (68% Glycerin (w/v), 13 mM MgCl₂) versetzt und bei -80°C gelagert.

b) *Haloferax volcanii*

Dauerkulturen wurden in dicht schließenden Schraubgefäßen bei Zimmertemperatur gelagert.

5.2.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Für eine exakte Bestimmung wurde die Zelldichte mittels Zählkammer nach Neubauer ermittelt. Für die Aufnahme einer Wachstumskurve wurde die Zelldichte alternativ in einem Klett-Photometer mit dem Filter # 54 (Transmission von 520 nm bis 580 nm) bestimmt.

5.2.5 Methoden zur Untersuchung der Chemotaxis

5.2.5.1 Allgemeine Vorbereitungen

CB (Chemotaxis buffer) entspricht der Salzlösung für das Komplexmedium ohne Kohlenstoffquelle.

Zellkulturen von *H.volcanii* wuchsen bis zu einer Dichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen ml⁻¹ in flüssigem Komplexmedium. Fünf Schwärmplatten (Agarkonzentration 0,3%) wurden dreimal mit jeweils 1 µl Kultur angeimpft (Layout siehe **Abbildung 26**) und 2 Tage bei 42°C im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen äußeren Schwärmringe wurden zusammen mit weichem Agar abpipettiert und in 42°C warmen CB (25 ml in einem 50 ml Falcontube) überführt. Feste Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 42°C und 500 g für 10 Min sedimentiert und der Überstand in ein frisches vorgewärmtes Falcontube überführt. Die Zellen des Überstandes wurden durch Zentrifugation bei 42°C und 3.000 g für 15 Min sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit 42°C warmen CB gewaschen.

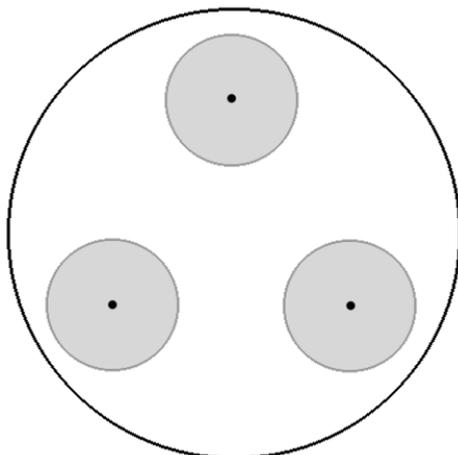


Abbildung 26
Schematische Darstellung einer Schwärmplatte. Die Platte wurde an drei Stellen mit jeweils 1 µl Kultur inokuliert und für mehrere Tage bei 42°C im Dunkeln inkubiert. Es bildeten sich um die Einstichstellen konzentrische Kreise unterschiedlichen Durchmessers.

5.2.5.2 „Chemical-in-Plug“ Methode

Zunächst wurden die Agar-Plugs mit den zu testenden Substanzen vorbereitet. Dazu wurden die Substanzen in 50 ml Falcontubes abgewogen und in 4 ml CB gelöst (250 mM ml⁻¹). 2,2% (w/v) Agar wurden in 400 ml CB in der Mikrowelle gelöst und anschließend autoklaviert. Die Falcontubes mit den Chemikalien wurden mit der abgekühlten Lösung auf 40 ml aufgefüllt, vorsichtig gemischt und direkt in Petrischalen gegossen. Für den Assay wurden aus dem festen

Agar Plugs ausgestanzt und in eine leere Petrischale gesetzt. 60 ml CB wurden mit 0,3% (w/v) Agar versetzt und autoklaviert. Die gewaschenen Zellen (s. o.) wurden in 1 ml CB resuspendiert und in die abgekühlte (ca. 45°C warme) Lösung gegeben. Jeweils 30 ml

Zellsuspension wurde im Anschluss in die Petrischalen mit den Agar-Plugs gegossen und nach dem Verfestigen über Nacht bei 42°C inkubiert (Abbildung 27).

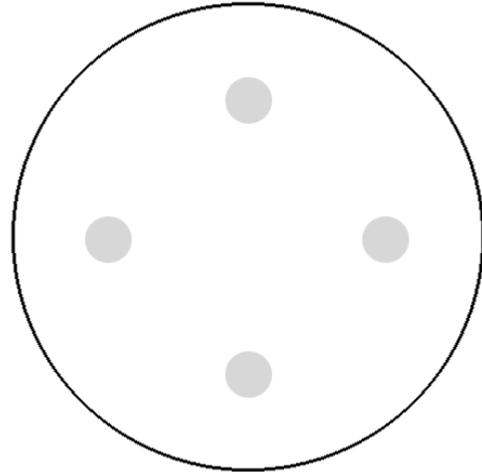


Abbildung 27

Schematische Darstellung einer „In-Plug“-Platte. In die Platte wurden 2%ige Agarplugs mit der zu testenden Substanz eingesetzt und mit flüssigem CB mit niedriger Agarkonzentration gefüllt. In das noch warme Basalsalz wurden vor dem Gießen schwärmende Zellen hinzugegeben.

5.2.5.3 Kapillar Assay

Für den Kapillar Assay wurden 10 µl Einmalkapillare an einem Ende am Bunsenbrenner zugeschmolzen. Die zu testenden Substanzen wurden in CB gelöst (100 mM ml⁻¹) und 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Die Kapillaren wurden am Brenner abgeflammt und mehrere mit der Öffnung nach unten in die Gefäße gegeben. Die Kapillaren können so bei 4°C gelagert werden.

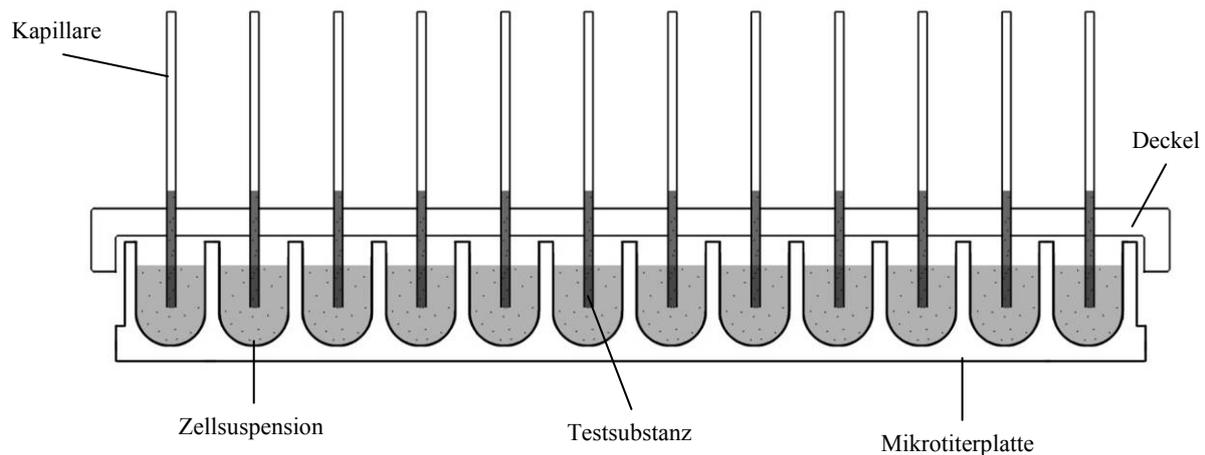


Abbildung 28

Schematische Darstellung des Kapillar Assays. In eine 96-Well Mikrotiterplatte wurden schwärmende *H. volcanii* Zellen pipettiert und durch einen Deckel Kapillare mit unterschiedlichen Substanzen eingeführt. Als Trägermedium diente CB.

Alle folgenden Schritte wurden bei 37°C Umgebungstemperatur durchgeführt. Die gewaschenen Zellen (s. o.) wurden in entsprechendem Volumen warmen CB resuspendiert und jeweils 200 µl in Wells einer Rundboden-Mikrotiterplatte gefüllt. Die Platte wurde mit einem dünnen Styropordeckel (eigene Herstellung) verschlossen. Die zuvor vorbereiteten und vorgewärmten Kapillaren wurden dreimal mit CB gewaschen und jeweils eine Kapillare durch den Deckel in ein Well gesteckt (**Abbildung 28**). Als Kontrollen dienten Kapillare mit CB und ohne Chemikalie gefüllt, sowie 200 µl CB ohne Zellen. Die Inkubation erfolgte für 1-3 Tage bei 42°C im Wasserbad (ansonsten Austrocknungsgefahr!) unter leichtem Schwenken. Anschließend wurden die Kapillaren dreimal in CB gewaschen und der Inhalt einer jeweiligen Kapillare gemessen (Lineal). Das zugeschnolzene Ende wurde aufgebrochen und der Inhalt in 1 ml CB im 1,5 ml Reaktionsgefäß ausgeblasen. 20-50 µl dieser Zellsuspension wurden auf 1,5% (w/v) Komplexmedium Agarplatten ausgespatelt und für mehrere Tage bei 42°C inkubiert. Die Kolonien wurden anschließend pro Platte gezählt und mit Hilfe der Kontrollplatte, auf der die Kapillare ohne Testsubstanz ausgespatelt wurde, normiert. Die Experimente wurden in Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

a) analytischer Maßstab

Die Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979).

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Lösung 1	1M Tris/HCl; pH 8,0	50 ml	50 mM
	EDTA	3,7 g	10 mM
	RnaseA	0,1 g	100 mg/l

ad 1000 ml mit H₂O bid.

Die Lösung wurde vor der Rnase Zugabe autoklaviert und bei 4°C gelagert.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Lösung 2	NaOH	8 g	200 mM
	SDS	10 g	1% (w/v)

ad 1000 ml mit H₂O bid.

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Lösung 3	KAc	314 g	3,2 M

ad 1000 ml mit H₂O bid., pH 5,5 (mit Essigsäure einstellen).

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Zur Plasmidisolierung aus *E. coli* wurden 1,5 ml einer über Nacht in SOB⁺-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) gezogenen Kultur 1 Min bei 18.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment in 150 µl Lösung 1

resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 150 µl Lösung 2 lysiert. Die Suspension wurde durch mehrfaches Invertieren der Reaktionsgefäße gemischt und mit 150 µl Lösung 3 neutralisiert. Anschließend wurde 10 Min bei 18.000 g zentrifugiert, der Überstand in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 2,5 Volumen 98%igem Ethanol versetzt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Min bei 18.000 g. Das Sediment wurde dann mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, 5 Min bei 18.000 g zentrifugiert und nach dem Abnehmen des Überstandes in einem Volumen von 30-50 µl H₂O bid. resuspendiert.

b) präparativer Maßstab

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* im präparativen Maßstab erfolgte mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System der Firma Promega nach Angaben des Herstellers.

5.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus *H. volcanii*

Die Durchführung der chromosomalen DNA-Isolierung erfolgte nach Rosenshine et. al. (1987).

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Lysepuffer	NaCl	0,6 g	100 mM
	EDTA	0,037 g	1 mM
	SDS	0,05 g	0,05% (w/v)
	Tris	0,12 g	10 mM
			ad 100 ml VE-H ₂ O, pH 8,0

15 ml einer exponentiell wachsenden *H.volcanii* Kultur wurde durch Zentrifugation für 20 Min bei 3.000 g bei Raumtemperatur sedimentiert und in 500 µl des entsprechenden Basalsalzes suspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lysepuffer wurden die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren bis zum vollständigen Aufschluss gemischt. Die Wasserphase wurde vorsichtig mit 8 ml Ethanol (p.a.) überschichtet. Die an der Phasengrenze ausfallende chromosomale DNA wurde auf eine gebogene Pasteurpipette gewickelt. Anschließend wurden beide Phasen gemischt, die ausfallende DNA weiter aufgewickelt und die

Pasteurpipette für mindestens 5 Min im Gefäß belassen, wobei die DNA durch partielles Dehydrieren fester an die Kapillare band. Die DNA wurde durch zweimaliges Eintauchen der Pasteurpipette in Ethanol und einmalig in Ether gewaschen. Nach kurzem Trocknen der DNA an der Luft wurde die DNA in 500 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst. Zur vollständigen Ablösung wurde die DNA-Lösung 20 Min auf 60°C erhitzt. Die Konzentration der Lösung wurde bestimmt und die Intaktheit der DNA durch gelektrophoretische Auftrennung kontrolliert.

5.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. volcanii*

Die Isolierung von RNA erfolgte modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987).

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Aufschlußlösung	Guanidiniumthiocyanat	100 g	4,0 M
	750 mM Natriumcitrat-Lösung, pH 7,0	7 ml	25 mM
	30% Natriumlauroylsarcosinat	3,5 ml	0,5% (v/v)
	β-Mercaptoethanol	1 ml	0,1 M
			ad 210 ml DMPC-H ₂ O

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Haloarchaea wurden 2 ml Kultur für 40 Sek bei 10.000 g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde in 400 µl Aufschlußlösung resuspendiert und anschließend mit 50 µl 2 M Natriumacetat pH 4, 400 µl Phenol und 100 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) vermischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei -20°C wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 18.000 g in einer Tischzentrifuge für 15 Min vollständig getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit dem 2,5 fachen Volumen 96% Ethanol vermischt, 30 Min bei -20°C inkubiert und 30 Min bei 18.000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 700 µl 70% Ethanol gewaschen. Es folgte ein Zentrifugation für 15 Min bei 18.000 g. Das Sediment wurde in DMPC behandeltem H₂O gelöst.

Alternativ wurde die Gesamt-RNA aus *H.volcanii* mit Hilfe des RNeasy® Mini-Kits der Firma Qiagen isoliert. Dazu wurden $1 \cdot 10^9$ Zellen durch Zentrifugation bei 18.000 g für eine Minute geerntet und in 100 µl DMPC behandeltem H₂O aufgenommen. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Kontrolle der Qualität und der Quantität der RNA erfolgte über UV Spektroskopie und denaturierender Formaldehyd Gelelektrophorese.

5.3.4 Reinigung von Nukleinsäuren

a) Präzipitation von DNA aus Lösungen

Zur Präzipitation von DNA wurde die Nukleinsäure-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Kaliumacetat-Lösung pH 5,5 und 2,5 Volumen 96% Ethanol versetzt, gemischt und für 20 Min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 18.000 g sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Sediment mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 18.000 g wurde das Präzipitat in einem geeigneten Volumen H₂O bid. aufgenommen.

b) Reinigung mittels Kit

Zur Reinigung von PCR Fragmenten über Säulen wurde das PCR-Kombi-Kit der Firma Seqlab oder das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet

c) Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem PCR-Kombi-Kit der Firma Seqlab oder dem AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit der Firma Axygen nach Angaben des Herstellers.

5.3.5 Phenol/Chloroform Extraktion

Um Nukleinsäurelösungen von Proteinen zu reinigen, wurde eine Extraktion mit Phenol/Chloroform durchgeführt. Hierzu wurde die Probe zunächst mit DEPC behandeltem H₂O auf 400 µl aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 320 µl Phenol und 80 µl

Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 18.000 g wurde die wässrige Phase abgenommen und nochmals mit 400 µl Chloroform:Isoamylalkohol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation bei 18.000 g wurde die DNA in der wässrigen Phase durch Kaliumacetat und Ethanol präzipitiert (Sambrook *et al.*, 1989).

5.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Konzentrationen von DNA- und RNA-haltigen Lösungen wurden mit dem NanoDrop™ Spektrophotometer ND-1000 bestimmt wofür 1 µl Probe pro Messung benötigt wurde. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der bei 260 nm gemessenen optischen Dichte. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA bzw. 40 ng/µl RNA. Das Verhältnis der Extinktionen OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt die Reinheit des Nukleinsäure-Präparates an und sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

5.3.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Lösungen

	Stoff	Menge	Endkonzentration
10x TBE-Puffer	Tris	107,8 g	890 mM
	Borsäure	55 g	890 mM
	EDTA	7,5 g	20 mM
ad 1000 ml H ₂ O bid., autoklavieren			
	Stoff	Menge	Endkonzentration
6x DNA Probenpuffer	1 M Tris/HCl, pH 7,5	0,8 ml	20 mM
	87% Glycerin (v/v)	23 ml	50% (v/v)
	Bromphenolblau (ges. Lsg.)	0,8 ml	0,25% (v/v)
	Xylencyanol (ges. Lsg.)	0,8 ml	0,25% (v/v)
ad 40 ml H ₂ O bid.			

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 0,7%-1,8%igen Agarosegelen mit 1x TBE-Puffer als Laufpuffer bei einer Spannung von 2-8 V/cm. Dazu wurden die DNA-Lösungen mit 1/6 Volumen DNA Probenpuffer versetzt. Nach der Auftrennung wurde die DNA mittels Ethidiumbromid angefärbt, unter UV-Licht visualisiert und mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage ausgewertet. Anhand der DNA-Größenstandards konnten die Fragmentgrößen von DNA-Fragmenten bestimmt werden.

5.3.8 Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Lösungen

	Stoff	Menge	Endkonzentration
10x MOPS Puffer	MOPS	104,7 g	500 mM
	EDTA	3,7 g	10 mM
ad 1000 ml H ₂ O bid., pH 7 mit NaOH einstellen			

	Stoff	Endkonzentration	Menge
RNA Probenpuffer	10x MOPS-Puffer	1x	100 ml
	Formamid	50% (v/v)	5 ml
	37% Formaldehyd (v/v)	6,8% (v/v)	1,8 ml
	87% Glycerin (v/v)	15% (v/v)	1,3 ml
	Bromphenol (ges. Lsg.)	0,1% (v/v)	10 µl
	Xylencyanol (ges. Lsg.)	1% (v/v)	100 µl
	Ethidiumbromid (0,1 mg/ml)	0,5 µg /ml	50 µl
ad 10 ml H ₂ O bid.			

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Hierzu wurden 0,9 g Agarose in 77 ml H₂O bid. durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, nach dem Abkühlen auf 60°C mit 9 ml 10x MOPS und 3,2 ml 37%igem Formaldehyd versetzt und die Gele danach sofort gegossen. Die RNA-Proben wurden in dem 4-fachen Volumen Probenpuffer aufgenommen, 10 Min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 2-8 V/cm mit 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer. Nach der Auftrennung wurde die RNA unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

5.3.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonuklease

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller angegebenen Puffer. Die DNA Konzentration im Reaktionsansatz betrug etwa 50 ng/ μ l. Pro μ g DNA wurden 2-10 U Restriktionsenzym eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 2-16 Stunden. Restriktionsspaltungen wurden durch Präzipitation mit Kaliumazetat und Ethanol oder durch Hitzeinaktivierung für 20 Min bei 65°C oder 80°C beendet.

5.3.10 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in 20 μ l Gesamtvolumen. Pro Reaktion wurden 100-200 ng Vektor eingesetzt. Das molare Insert:Vektor Verhältnis variierte dabei zwischen 3:1 und 10:1. Zur DNA-Lösung wurde 1/10 Volumen Ligationpuffer und 1 U T4-DNA-Ligase zugegeben. Die Inkubation erfolgte mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei Raumtemperatur oder 4°C.

5.3.11 Dialyse von DNA Lösungen

Um Verunreinigungen durch kleine Moleküle wie z.B. Salze vor der Sequenzierung, Ligation oder Transformation zu entfernen, wurde die DNA-Lösung dialysiert. Dazu wurde zunächst eine Petrischale mit H₂O bid. gefüllt und auf die Wasseroberfläche vorsichtig ein Dialyseplättchen aufgebracht. Anschließend wurden 5-20 μ l DNA-Lösung vorsichtig auf das Dialyseplättchen pipettiert und die Lösung für mindestens 1 h bei Zimmertemperatur dialysiert. Nach erfolgter Dialyse wurde die DNA-Lösung vorsichtig abgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Dialyseplättchen konnten nach mehrstündiger Reinigung in H₂O bid. erneut verwendet werden.

5.3.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA Fragmenten erfolgte in 20 µl, 50 µl oder 100 µl Reaktionsvolumen. Folgende Endkonzentrationen an PCR Komponenten wurden eingesetzt:

- 1,5 mM MgCl₂
- 160 µM dTTP und dATP
- 240 µM dGTP und dCTP
- 100 pmol je Primer
- 0,1 µl/10 µl DNA Polymerase
- 1x Polymerase Puffer

Diente chromosomale DNA als Matritze, wurden 1-2 ng pro µl Reaktionsansatz eingesetzt. Bei Plasmid DNA und PCR Produkt wurden 0,5 ng pro µl Reaktionsansatz verwendet. Das PCR Programm bestand aus einer initialen Denaturierung (15 Min, 96°C), 25 bis 30 Zyklen Denaturierung (30 Sek, 96°C), Annealing (30 Sek, T_M – 5-8°C) und Elongation (x Sek, 72°C), sowie einer anschließenden Elongation (5 Min, 72°C). Die Elongationszeit betrug bei der Taq Polymerase 1 Min und bei der Pfu Polymerase 2 Min pro kb zu synthetisierenden Stranges. Die Annealingtemperatur der Oligonukleotide lag ca. 5-8°C unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur. Für analytische Zwecke wurde die Taq Polymerase verwendet. Für Klonierungen wurde die Pfu-Polymerase verwendet, da diese eine Proofreading-Aktivität besitzt. Alternativ wurde in einigen Fällen der Taq PCR Mastermix der Firma Qiagen verwendet.

PCR ohne isolierte Vorlage

Bei der PCR ohne isolierte Vorlage wurde als Matritze keine gereinigte DNA sondern komplette Zellen eingesetzt. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas Material einer Bakterien-Kolonie von einer Agarplatte abgenommen und die Zellen in den Reaktionsansatz überführt. Bei *H. volcanii* wurden die Zellen zunächst bis zur exponentiellen Phase angezogen, dann 100 µl der Zellen 1 Min bei 18.000 g abzentrifugiert, in 400 µl H₂O bid. aufgenommen und lysiert. 1 µl des Zelllysats wurden in einem 20 µl PCR Ansatz als Vorlage eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren in beiden Fällen identisch mit denen der PCR mit isolierter Vorlage.

Fusions-PCR

Durch Fusions-PCR können zwei DNA Fragmente mit überlappenden Enden ohne Ligation zu einem einzigen DNA-Stück zusammengefügt werden. Dazu werden die zu fusionierenden Abschnitte in äquimolaren Konzentrationen (ca. 100-200 ng) zunächst ohne Oligonukleotide in die PCR-Reaktion (50 µl Ansatz) eingesetzt. Die Anlagerungstemperatur liegt 5-10°C unter der T_M des überlappenden Bereiches. Die Dauer der Anlagerung beträgt 1 Min. Nach 5 Zyklen wurden Oligonukleotide zur weiteren Amplifikation hinzugegeben und 15-20 Zyklen das Temperaturprofil analog zur präparativen Amplifikation durchgeführt.

Herstellung DIG-markierter Sonden

Durch den Einbau von DIG-11-dUTP (Roche, Mannheim) anstelle von dTTP in einer PCR-Reaktion können PCR-Produkte markiert werden. DIG-11-dUTP markierte Sonden wurden zum Nachweis von mRNA oder DNA-Fragmenten durch Hybridisierung verwendet. Die PCR-Reaktion unterscheidet sich von einer Standard-PCR nur hinsichtlich der dTTP Konzentration (20 µM) und der doppelt so langen Elongationszeit. DIG-11-dUTP wurde in einer Endkonzentration von 160 µM eingesetzt. Der erfolgreiche Einbau des DIG-11-dUTP konnte durch ein verlangsamtes Laufverhalten des PCR Produktes im Agarosegel kontrolliert werden.

5.3.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR Produkten erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1992). Die Menge an Vorlage in Nanogramm wurde mit der Faustformel: Größe in bp / 50 errechnet. Der 10 µl Reaktionsansatz enthielt neben der zu sequenzierenden DNA und H₂O bid. noch 5 pMol Sequenzierprimer, 1,5 µl Reaktionspuffer und 1 µl Big-Dye Terminator Reaktionsmix. Die Sequenzierreaktion wurde in einem Thermocycler mit 25 Zyklen des folgenden Temperaturprofils durchgeführt: Denaturierung (10 Sek, 96°C), Annealing (5 Sek, 50°C), Elongation (4 Min, 60°C). Die fluoreszenz-markierte DNA wurde anschließend durch Kaliumazetat und Ethanol präzipitiert, getrocknet und der Firma SRD zur Sequenzanalyse übergeben.

5.3.14 Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Membranen (Northern Transfer)

Der Transfer von RNA erfolgte mittels Kapillartransfer (Low & Rausch, 1994; Ming *et al.*, 1994).

	Stoff	Menge	Endkonzentration
20 x SSC Puffer	NaCl	175,3 g	3 M
	Tri-Natriumcitrat	88,2 g	300 mM
			ad 1000 ml VE-H ₂ O, pH 7,0

Der Aufbau des Northern-Blots von unten nach oben war:

- 20 Blatt GB 004 Chromatographiepapier
- 3 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Transferpuffer equilibriert
- 1 Nylonmembran in H₂O bid. vorgequollen und in Transferpuffer equilibriert.
- Agarosegel mit zu transferierender RNA
- 3 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Transferpuffer equilibriert

Die einzelnen Lagen hatten eine Größe von jeweils 8 x 12 cm. Der Northern-Blot wurde luftblasenfrei aufgebaut. Als Transferpuffer diente 20x SSC. Um den Pufferfluss zu gewährleisten, wurde der oben beschriebene Aufbau mit einem 12 x 30 cm langem Stück GB 002 Chromatographiepapier mit zwei Pufferreservoirs verbunden. Um die Verdunstung zu minimieren, wurde der Blot mit einer Gelgießkammer abgedeckt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach erfolgtem Transfer wurde auf der Nylonmembran die Lage der Probenaschen mit Bleistift markiert. Die Verteilung der RNA (rRNA) wurde unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert. Anschließend wurde die RNA im Stratalinker® bei 1.200 mJ durch UV-Strahlung mit der Nylonmembran quervernetzt.

5.3.15 Hybridisierung und Chermolumineszenznachweis

	Stoff	Menge	Endkonzentration
100x Denhardt's	Rinderserumalbumin	10 g	2% (w/v)
	Ficoll 400	10 g	2% (w/v)
	Polyvinylpyrrolidon	10 g	2% (w/v)
ad 500 ml H ₂ O bid., filtrieren, Lagerung bei -20°C			

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Hybridisierungs-lösung	Formamid	225 ml	50% (v/v)
	20x SSC	112,5 ml	5x
	100x Denhardt's	13,5 ml	3x
	20% SDS	11,1 ml	0,5% (v/v)
	30% Natriumlaurylsarcosinat	3 ml	0,2% (v/v)
	30% Dextransulfat	75 ml	5%(v/v)
Autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur			

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Maleinsäure puffer	Maleinsäure	11,6 g	100 mM
	NaCl	8,77 g	150 mM
	Polyvinylpyrrolidon	10 g	2% (w/v)
ad 500 ml VE-H ₂ O, Autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur			

Der **Waschpuffers** wurde unmittelbar vor der Verwendung durch Zugabe von 0,3% Tween 20 (v/v) frisch hergestellt.

Zur Herstellung der **Blockinglösung** wurde dem Maleinsäurepuffer 1% Blockingreagenz (w/v) zugegeben. Danach wurde die Lösung autoklaviert und bei 4°C gelagert.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Nachweispuﬀer	Tris	12,11 g	100 mM
	NaCl	5,84 g	100 mM
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2,99 g	50 mM

ad 500 ml VE-H₂O, Autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

Die Nylonmembran wurde zweimal (zuerst ohne, dann mit 120 µg tRNA) für 1 h in 10 ml Hybridisierungslösung im Hybridisierungsöfen bei 40°C inkubiert. Die Digoxigenin markierte Sonde wurde zur Denaturierung für 5 Min auf 98°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. 30 µl der Sonde wurde in 10 ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die Lösung wurde kurz gemischt und in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 50°C für 16 h. Der Nachweis erfolgte mit dem DIG Luminescence Detection Kit unter Verwendung von CDP* nach Angaben des Herstellers.

5.3.16 Dnase-Behandlung von RNA

Zur Entfernung von genomischer DNA wurde Gesamt RNA aus *H.volcanii* mit RQ1 RNase-freier DNase der Firma Promega behandelt.

Komponente	Menge	Endkonzentration
Gesamt RNA	x µl	6 µg
RQ1 DNase	6 µl	6 U
10x Puffer	6 µl	1x

ad 60 µl DMPC H₂O bid.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 6 µl Stopp-Lösung (20 mM EGTA pH 8) und 10 minütiger Inkubation bei 65°C beendet. Danach wurde die RNA mit dem NucleoSpin® RNA Clean-up Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt.

5.3.17 cDNA Synthese

Komponente	Menge
Zufallshexamere (1mg/ml)	0,6 µl
dNTPs (1,0 mM dATP+dTTP; 1,5 mM dCTP+dGTP)	8 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	2 µl
RNA	1 µg
5x RT Puffer	8 µl
ad 40 µl DMPC H ₂ O bid.	

Zur Synthese der cDNA wurde die RNA zunächst für 10 Min bei 65°C denaturiert. Die Anlagerung der Zufallshexamere erfolgte für 5 Min auf Eis. Nach Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase wurden die Ansätze 60 Min bei 42°C inkubiert. Eine weitere Stunde Inkubation erfolgte nach erneuter Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase. Die Reaktion wurde durch 5 minütiges Erhitzen bei 80°C inaktiviert.

5.3.18 quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung von Transkript-Mengen wurde DNA-freie cDNA als Matrize für die Realtime-PCR Analyse eingesetzt.

Komponente	Endkonzentration/Menge
cDNA	1 µl
Oligonukleotid 1	0,8 µM
Oligonukleotid 2	0,8 µM
DyNAmo™ SYBR® Green qPCR Master Mix	12,5 µl
ad 25 µl H ₂ O bid.	

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	10 Min	94°C	
Denaturierung	30 Sek	94°C	
Annealing	45 Sek	65-68°C	50
Elongation	60 Sek	72°C	
Finale Elongation	5 Min	72°C	

Neben den zu bestimmenden Proben wurden noch Kontrollen angesetzt: ohne Template (H₂O bid.) sowie gesamt RNA (Kontrolle von DNA Kontamination während der cDNA Synthese). Von jeder cDNA Probe wurden drei verschiedene Verdünnungen (unverdünnt/1:10/1:100) analysiert. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Proben auf 99°C erhitzt und der Schmelzpunkt jeder Probe bestimmt. Für jede Probe wurde mit Hilfe der Rotor Gene 6 Software der Schnittpunkt mit dem Schwellenwert kalkuliert (Ct-Wert) und die Daten mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet (Livak & Schmittgen, 2001). Die Ct-Werte des Kontrolltranskripts *hpyA* wurden zur Normalisierung der zu untersuchenden Transkriptmengen genutzt.

5.3.19 Transformation von Mikroorganismen

1 Transformation von *E.coli*

Zur Vorbereitung der *E.coli*-Zellen für die Elektroporation wurde eine über Nacht gezogene Vorkultur in 35 ml SOB⁺-Medium in einem Verhältnis von 1:100 in eine Hauptkultur mit 400 ml SOB⁺-Medium überimpft und bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde bei 4°C und 4.000 g in vorgekühlten Zentrifugenbechern sedimentiert und nacheinander in 150 ml, 50 ml und 20 ml einer auf 4°C vorgekühlten, autoklavierten, 10%igen (v/v) Glycerinlösung suspendiert. Die Zentrifugationsbedingungen der Waschschrte entsprachen denen der Zellernte. Zwischen den Waschschrten wurden die Zellen auf Eis gehalten. Nach der Dekantierung der Überstände erfolgte die Resuspendierung mit vorgekühlten Pipetten. Nach dem letzten Waschschrte wurde erneut zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in 150 µl 10%igem Glycerin aufgenommen. Diese konzentrierte *E.coli*-

Zellsuspension wurde in 50 μ l Aliquots aufgeteilt, ~~in~~ flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die zur Transformation vorbereiteten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-3 μ l DNA-Lösung gemischt und weitere 10 Min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte 2 mm-Spaltküvette gefüllt und weitere 10 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit dem Programm **EC3** des MicroPulser™ Elektroporators der Firma Bio-Rad elektroporiert. Zur Regeneration der Zellen und zur Expression der Antibiotikaresistenz wurde direkt nach dem Puls 1 ml SOB⁺-Medium dazugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die transformierten Zellen auf antibiotikahaltigen SOB⁺-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2 Transformation von *H.volcanii*

Für die PEG vermittelte Transformation wurden 2 ml einer exponentiellen *H.volcanii*-Kultur durch 2 minütige Zentrifugation bei 6.000 g geerntet. Das Zellsediment wurde in 180 μ l SBL/EDTA (10:1 SBL:EDTA-Lösung) resuspendiert und die Sphäroblastenbildung mikroskopisch kontrolliert. Nach Zugabe von 10 μ l DNA-Lösung (2-5 μ g Plasmid-DNA in 0,8 M NaCl) wurden die Reaktionsgefäße 20-mal vorsichtig invertiert und für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde mit 210 μ l PEG-Lösung versetzt. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Aggregatbildung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Der Ansatz wurde mit 1,6 ml SVL versetzt, 100 μ l der Zellsuspension auf Selektivmedium ausgespatelt und bei 42°C inkubiert.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Sphäroblastenbildungslösung (SBL)	NaCl	23,4 g	800 mM
	KCl	1 g	27 mM
	1 M Tris/HCl pH 8,2	25 ml	50 mM
	Saccharose	75 g	15% (w/v)

ad 500 ml H₂O bid., steril filtrieren

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Sphäroblastenverdünnungslösung (SVL)	NaCl	100 g	3,4 M
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	21,6 g	175 mM
	KCl	1,3 g	34 mM
	1 M Tris/HCl pH 7,2	25 l	50 mM
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,4 g	5 mM
	Saccharose	75 g	15% (w/v)

ad 500 ml H₂O bid., steril filtrieren

Stoff	Menge	Endkonzentration
EDTA	18,5 g	500 mM

ad 100 ml SBL, pH 8,2 einstellen, steril filtrieren

Stoff	Menge	Endkonzentration
PEG 600	6 ml	60% (v/v)
SBL	4 ml	40% (v/v)

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Präzipitation von Proteinen aus Lösungen

Die Präzipitation von Proteinen erfolgte nach der Methode von Wessel und Flügge (Wessel & Flugge, 1984). Hierzu wurden zunächst 2 ml Halobakterienkultur abzentrifugiert, in 100 µl H₂O bid. aufgenommen und lysiert. Danach wurden jeweils 4 Teile Methanol, 1 Teil Chloroform und 3 Teile H₂O bid. nacheinander hinzugegeben. Nach jeder einzelnen Zugabe wurde die Lösung gründlich gemischt und für 30 Sek. bei 18.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen und das präzipitierte Protein durch Zugabe von 3 Teilen Methanol und Zentrifugation für 2 Min bei 18.000 g gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Proteinpräzipitat kurz an der Luft getrocknet. Danach wurde das Protein in 100-200µl 25 mM Tris/HCl pH 8 durch Erwärmen auf 65°C gelöst.

5.4.2 Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Proteinkonzentrationen wurden nach der BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985) mithilfe des BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Methode beruht auf der Biuret-Reaktion von Proteinen mit Cu²⁺ zu Cu⁺ im alkalischen Milieu. Das gebildete Cu⁺ wird von BCA komplexiert. Die farbigen Komplexe zeigen eine starke Absorption bei 562 nm. Zur Proteinbestimmung wurden in einer Mikrotiterplatte jeweils 10 µl Proteislösung mit 200 µl Nachweisreagenz (Verhältnis 50:1 Reagenz A:Reagenz B) versetzt und für 30 Min bei 37°C inkubiert. Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden in Doppelbestimmung und geeigneten Verdünnungen bestimmt. Als Standard dienten BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen (0-2 mg/ml). Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm im Photometer bestimmt.

5.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen molaren Masse erfolgte in modifizierter Form nach Laemmli (Laemmli, 1970).

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Trenngel- puffer	Tris	181,65 g	1,5 M
	SDS	3,84 g	0,384% (w/v)
ad 1000 ml H ₂ O bid., pH 8,8			

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Sammelgel- puffer	Tris	60,55 g	0,5 M
	SDS	4 g	0,4% (w/v)
ad 1000 ml H ₂ O bid., pH 6,8			

Stoff	Menge	Endkonzentration
APS	0,1 g	10% (w/v)
ad 1 ml H ₂ O bid.		

	Stoff	Menge	Endkonzentration
4 x Probenpuffer	0,5M Tris/HCl pH6,8	3,125 ml	0,13 M
	86% Glycerin	6,84 ml	50% (v/v)
	SDS	1,2 g	10% (w/v)
	Bromphenolblau	60 mg	0,5% (w/v)
ad 12 ml H ₂ O bid. zum Gebrauch 4 Teile Puffer und 1 Teil β -Mercaptoethanol mischen			

	Stoff	Menge	Endkonzentration
10 x Laufpuffer	Tris	30,3 g	0,25 M
	Glycin	144 g	1,92 M
	SDS	10 g	1% (w/v)
			ad 1000 ml H ₂ O bid.

	Trenngel	Stoff	Sammelgel
12 % iges Polyacrylamid-Gel	3 ml	H ₂ O bid.	3 ml
	2,3 ml	Trenngel-/Sammelgelpuffer	1,27 ml
	3,6 ml	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	666 µl
	135 µl	10% APS	80 µl
	9 µl	Temed	7 µl

Menge reicht für ein Minigel (80 x 100 x 1,5 mm)

Zunächst wurde das Trenngel (4/5 der Gesamtlaufstrecke) in die Kammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol abgenommen, die Lösung für das Sammelgel eingefüllt und der Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit ¼ Volumen 4x Probenpuffer versetzt, 5 Min auf 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Pro Spur wurden 10-40 µg Gesamtprotein aufgetragen. In eine Spur wurde ein vorgefärbter Proteinmarker aufgetragen. Der Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 Volt für ca. 2 Stunden.

5.4.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Transfer)

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Transferpuffer	Glycin	14,4 g	192 mM
	Methanol	200 ml	20% (v/v)
	Tris	3 g	25 mM
			ad 1000 ml H ₂ O bid.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
10x PBS	NaCl	80 g	1,37 M
	KCl	2 g	27 mM
	Na ₂ HPO ₄	11,5 g	65 mM
	KH ₂ PO ₄	2 g	9 mM
			ad 1000 ml H ₂ O bid.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Tintenfärbelösung	10x PBS	100 ml	1x PBS
	Tween 20	0,5 ml	0,05 % (v/v)
	Eisessig	10 ml	1% (v/v)
	Tinte	1 ml	0,1% (v/v)
			ad 1000 ml H ₂ O bid.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Coomassie - Lösung	Coomassie Blue R-250	2,5 g	0,25% (w/v)
	Methanol	500 ml	50% (v/v)
	Eisessig	100 ml	10% (v/v)
			ad 1000 ml H ₂ O bid.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Entfärbelösung	Methanol	50 ml	5% (v/v)
	Eisessig	100 ml	10% (v/v)
			ad 1000 ml H ₂ O bid.

Für den Transfer von Proteinen wurde nur das Trenngel und die darin aufgetrennten Proteine verwendet. Das Blottingpapier und die Blottingmembran wurden jeweils in der benötigten Grösse (9 x 6 cm) zurechtgeschnitten.

Der Aufbau des Blots von unten nach oben war:

- Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Transferpuffer equilibriert
- Nitrocellulosemembran, in Transferpuffer equilibriert
- Polyacrylamidgel
- Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Transferpuffer equilibriert

Der Transfer erfolgte für 2 h bei 2mA/cm² in der Fastblot B43 Blotting Apparatur der Firma Biometra. Danach wurde das Gel für 1 h mit Coomassie-Lösung gefärbt und über Nacht entfärbt, um die Effizienz des Transfers festzustellen. Die Membran wurde ca. 15 Min in Tintefärbelösung unter Schütteln inkubiert, in H₂O bid. gespült und das Bandenmuster dokumentiert.

5.4.5 Immunologische Detektion von Proteinen

	Stoff	Menge	Endkonzentration
PBST	10x PBS	100 ml	1x PBS
	Tween 20	1 g	0,1% (w/v)
			ad 1000 ml H ₂ O bid.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Blocking-Lösung	Magermilchpulver	5 g	5% (w/v)
	BSA	3 g	3% (w/v)
nur einen der beiden Stoff je nach Bedarf ansetzen, ad 100 ml PBS			

	Stoff	Menge
ECL-Lösung A	0,1 M Tris/HCl pH 8,6	200 ml
	Luminol	50 mg
ECL-Lösung B	para-Hydroxycoumarinsäure	11 mg
	DMSO	10 ml

Die Nitrocellulosemembran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht in 100 ml Blocking-Lösung inkubiert. Anschließend dreimal für jeweils 10 Min in PBST gewaschen und danach kurz in PBS geschwenkt. Der Erstantikörper wurde im Verhältnis 1:10.000 in 10 ml Blocking-Lösung (BSA) verdünnt und die Membran für 1 h bei Zimmertemperatur mit der Antikörperlösung inkubiert. Ungebundener Erstantikörper wurde durch drei Waschschrte von jeweils 10 Min mit PBST entfernt und die Membran kurz in PBS geschwenkt. Es folgte Inkubation für 1 h mit dem sekundären, Peroxidase konjugierten Antikörper, der ebenfalls in Blocking-Lösung (Milchpulver) verdünnt wurde (1:10.000). Nach drei weiteren Waschschrten in PBST wurde die Nachweisreaktion durchgeführt.

Für den ECL Nachweis wurden 10 ml Lösung A mit 1 ml Lösung B und 3 μ l 30% H_2O_2 gemischt. Die Membran wurde 2 Min inkubiert und in Folie eingeschweißt. Die Biomax Light Filme der Firma Kodak wurden 5-30 Min exponiert, 1 Min in Entwickler geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und ca. 3 Min in Fixierer gelegt. Am Ende wurden die Filme mit Wasser gewaschen und danach getrocknet.

5.4.6 Herstellung von Microarray-Kontrollen

a) Interne Standardisierung

Für die interne Standardisierung wurde das *rpoS*-Gen aus *E.coli* gewählt. Für die PCR-Amplifizierung wurde ein Taq/Pfu-DNA-Polymerase Gemisch (10:1) eingesetzt. Mit den Oligonukleotiden rpoS-1 und rpoS-2 und 1 µl *E.coli*-Kultur als DNA-Vorlage wurde in einer Standard-PCR mit einer initialen 5 minütigen Denaturierungsphase das *rpoS*-Gen amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit dem PCR-Script™ Amp Cloning Kit der Firma Stratagene kloniert. Das erhaltene Plasmid pRpoS wurde für die *in vitro* Transkription verwendet. Hierzu wurden 2 µg Plasmid mit der Restriktionsendonuklease *NotI* gespalten. Die DNA-Lösung wurde Phenol/Chloroform extrahiert und mit Kaliumacetat in Anwesenheit von Ethanol präzipitiert. Die *in vitro* Transkription wurde mit T7-Polymerase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Danach erfolgte eine Reinigung des Ansatzes inklusive DNase-Behandlung mit einer RNeasy® Mini-Säule nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde eine Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und eine gelektrophoretische Kontrolle der Probe durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Probe bei -20°C gelagert. Für die interne Standardisierung wurden zu 1010 Zellen direkt nach Zellaufschluss 35 ng *in vitro* Transkript zugegeben. Für das Aufbringen auf die DNA-Microarrays wurden die PCR-Produkte wie unter 5.3.4 a) beschrieben präzipitiert.

b) Heterologe Kontrollen

Für die Herstellung heterologer Kontrollen, die zusätzlich zur PCR-Bibliothek auf die DNA-Chips aufgebracht wurden, wurden 500 bp-Bereiche des Formiat-Dehydrogenase-Gens, des *rpoA*-Gens aus *E.coli*, des Chloramphenicol-Resistenzgens aus dem Vektor pACYC184 und des Vektors pSK+ in Standard-PCRs amplifiziert. Für die Amplifizierung der *E.coli*-Gene wurde die PCR mit 1 µl *E.coli*-Kultur als DNA-Vorlage mit einer initialen 5 minütigen Denaturierungsphase durchgeführt. Für die PCR-Amplifizierung wurde ein Taq/Pfu-DNA-Polymerase Gemisch (10:1) eingesetzt. Bei den Amplifizierungen mit Plasmid-DNA als DNA-Vorlage wurde die initiale Denaturierungsphase auf 1 Min verkürzt. Die PCR-Produkte wurden wie unter 5.3.4 a) beschrieben präzipitiert.

c) Microarray Positionslichter

Die Microarray-Positionslichter dienten als Kontrolle der gesamten Herstellung des DNA-Microarrays, der Bearbeitung der Slides und nach der Hybridisierung als Hilfestellung bei der Quantifizierung der Signalintensitäten. Für die Herstellung von Microarray Positionslichtern wurde ein 500 bp-Bereich des Vektors pSK+ mit Cy5- bzw. Cy3-markierten Oligonukleotiden in einer Standard-PCR amplifiziert. Für die PCR-Amplifizierung wurde ein Taq/Pfu-DNA-Polymerase Gemisch (10:1) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden wie unter 5.3.4 a) beschrieben präzipitiert.

5.4.7 Herstellung von DNA-Microarrays

a) Aufbringen der DNA auf die Chips

Die mit Kaliumacetat in Anwesenheit von Isopropanol präzipitierten PCR-Produkte wurden in einer DNA-Konzentration von mindestens 100 ng/µl in „spotting-Puffer“ gelöst. Die Herstellung des hochdichten Rasters auf den mit Poly-L-Lysin beschichteten Glas-Objektträgern (Poly Prep™, Sigma) erfolgte mit dem Roboter Microgrid II (Biorobotics), der die DNA-Lösung mit 4 Mikrodispensierungs-Nadeln (Testchips) bzw. 8 Nadeln (genomweite Chips) auf die Glasoberfläche transferierte. Vor jedem Herstellen von Microarrays wurden routinemäßig die Nadeln mit fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten (siehe 5.4.6 c) getestet, im Ultraschall-Bad mit H₂O bid. gereinigt und anschließend über Nacht in 70% Ethanol inkubiert. Das Aufnahmevolumen der geschlitzten Nadeln betrug ca. 500 nl. Der Durchmesser der Rasterpunkte betrug ca. 150 µm, die Abstände zwischen den Mittelpunkten der Sonden 350 µm. Nach der Aufnahme der DNA-Lösung wurden nacheinander 59 Objektträger bedruckt. Da die ersten Rasterpunkte, die von den Nadeln abgesetzt werden, ein deutlich höheres Volumen besitzen, wurden die ersten acht Objektträger als „Prespotting-Slides“ verworfen und nur die anschließend bedruckten Objektträger für Microarray Versuche verwendet. Der Roboter wurde auf eine „Target height“ von 0,02 mm eingestellt und meist ohne „soft-touch“ Funktion eingesetzt. Danach wurden die Nadeln in den Waschstationen des Roboters gereinigt. Zuerst wurde für 35 Sek ein Waschschrift in H₂O bid. durchgeführt, danach folgte 35 Sek ein Waschschrift in 70% Ethanol und abschließend wurden die Nadeln für 30 Sek durch Vakuum getrocknet. Die Luftfeuchtigkeit im Inneren des Robotergehäuses wurde bei einer Temperatur von

20-25°C so hoch wie möglich gehalten (40-50% Luftfeuchtigkeit). Die Mikrotiterplatten mit den PCR-Produkten wurden in der „Biobank“ des Roboters auf 6°C gekühlt, um die Verdunstung möglichst gering zu halten. Die Objektträger wurden in der Reihenfolge der Herstellung nummeriert. Nach dem Aufbringen der DNA wurde die Qualität der Arrays visuell anhand der Morphologie der Rasterpunkte bestimmt, wobei hier nicht auf die homogene Verteilung der Nukleinsäurelösung rückgeschlossen werden kann (Khitrov, 2001). Alternativ wurden ausgewählte Objektträger mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO®61 gefärbt und die Sonden-Homogenität anhand der Bindung des Farbstoffs an die DNA beurteilt (Yue *et al.*, 2001; Shearstone *et al.*, 2002). Für die spätere Zuordnung wurden Microsoft Excel Tabellen, in denen der Klon- bzw. Genname der PCR-Produkte der jeweiligen Mikrotiterplattenposition definiert war, in die Software des Roboters (TAS Application Suite 2.7.1.18) importiert und für den Axon-Scanner spezifische Dateien exportiert.

b) Prozessierung der Objektträger

Nachdem die gesamten PCR-Produkte auf die Glas-Objektträger transferiert waren, wurde der Umriss des Rasters mit einem Diamantschreiber markiert. Die Objektträger wurden zur Immobilisierung zunächst bei 80°C für 10 Min auf einem Heizblock getrocknet und die PCR-Produkte im Crosslinker (Stratagene) mit UV-Strahlung einer Energie von 150 mJ behandelt. Zur Blockierung der positiv geladenen Poly-L-Lysin-Oberfläche wurde zunächst 1 g Bernsteinsäureanhydrid vollständig in 200 ml 1,2-Dichlorethan im Ultraschallbad gelöst. Es folgt die Zugabe von 2,5 ml 1-Methylimidazol. Die Lösung wurde in einen Behälter gefüllt, in dem die Objektträger in einem Halter 1 h bei Zimmertemperatur abgedeckt unter leichtem Schwenken inkubiert wurden. Die Objektträger wurden zweimal kurz in 1,2-Dichlorethan gewaschen und zur Denaturierung der DNA auf den Objektträgern diese im Halter in 95°C-heisses Wasser für 2 Min inkubiert. Nach einem Waschschrift in 96%igem Ethanol für 1 Min wurden die Objektträger bei Zimmertemperatur (alternativ unter einem Abzug) getrocknet. Die Objektträger wurden anschließend im Dunkeln bei Zimmertemperatur gelagert.

5.4.8 Markierung von komplexen Proben durch cDNA-Erststrangsynthese

Die Markierung der isolierten RNA-Proben erfolgte durch Inkorporation fluorochrommodifizierter Nukleotide direkt während der Synthese des cDNA-Stranges (DeRisi *et al.*, 1996; Eisen und Brown, 1999).

	Stoff	Menge	Endkonzentration
low-T-dNTP-Mix	100 mM dTTP	20 µl	2 mM
	100 mM dATP	50 µl	5 mM
	100 mM dGTP	50 µl	5 mM
	100 mM dCTP	50 µl	5 mM
			ad 1000 µl H ₂ O bid.
	Stoff	Menge	Endkonzentration
	EDTA	18,5 g	0,5 M
			ad 100 µl H ₂ O bid.
	Komponente	Menge	
	RNA	20 µg	
	Hexamer-Mix (1 mg/ml)	0,6 µl	
	Low-T-dNTP-Mix	4 µl	
	5x Puffer	8 µl	
	Cy3-dUTP bzw. Cy5-dUTP (1 mM)	2,5 µl	
	M-MLV Reverse Transkriptase	2 µl	
			ad 40 µl H ₂ O bid.

Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkription wurde nach fünfminütiger Denaturierung bei 65°C für 2 Min auf Eis abgekühlt, mit 2 µl M-MLV Reverse Transkriptase RNase H Minus (Promega) versetzt und für 2 h bei 42°C inkubiert. Alternativ wurde nach 1 h erneut 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 5 µl EDTA-Lösung gestoppt. Die RNA wurde durch

alkalische Hydrolyse abgebaut, indem 10 µl 1 M NaOH zugesetzt und bei 65°C für 10 Min inkubiert wurde. Anschließend wurde mit 25 µl 1 M HEPES (pH 7,5) der pH-Wert neutralisiert. Für die anschließende Reinigung wurden für die Zweifarben-Hybridisierung die entsprechenden Cy3- und Cy5-Reaktionen vereint. Die Ansätze wurden mit H₂O bid. auf ein Volumen von 500 µl gebracht. Anschließend folgten eine Ultrafiltration mit einer Microcon® YM-30-Säule (Millipore) und ein erneuter Waschschrift durch Zugabe von 500 µl H₂O bid. Das Endvolumen betrug nach der letzten Ultrafiltration ca. 17 µl. Zum Abschluß wurde 1 µl Hefe-tRNA [4 mg/ml] zugegeben.

5.4.9 Hybridisierung auf DNA-Microarrays

Alle Hybridisierungen wurden als Zweifarben-Experiment durchgeführt, d.h. dass eine Probe, die mit Cy3 markiert war, zusammen mit einer zweiten Probe, die mit Cy5 markiert war, auf einen Chip hybridisiert wurde. Im Wesentlichen wurde nach der von Eisen und Brown (1999) beschriebenen Methode vorgegangen.

	Stoff	Menge	Endkonzentration
20x SSC Puffer	NaCl	175,3 g	3 M
	tri-Natriumcitrat	88,2 g	300 mM
pH7, ad 1000 µl H ₂ O bid.			
	Stoff	Menge	Endkonzentration
Prähybridisierungs-lösung	BSA Fraktion V	1 g	10 mg/ml
	20x SSC	17,5 ml	3,5x
	20% SDS-Lösung (v/v)	500 µl	0,1%
ad 100 µl H ₂ O bid.			

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Hybridisierungslösung	50x Denhardt's-Lösung	1,6 µl	2,5x
	20x SSC	4,8 µl	3x
	cDNA	17 µl	
	Hefe-tRNA (4 mg/ml)	1 µl	125 µg/ml
	1% SDS-Lösung (v/v)	2,6 µl	0,08%

ad 32 µl H₂O bid., ausreichend für Deckglas 44 x 22 mm

	Stoff	Menge	Endkonzentration
Waschpuffer	A 20x SSC	12,5 ml	0,5x
	20% SDS-Lösung (v/v)	250 µl	0,01%
	B 20x SSC	1,5 ml	0,06x

jeweils ad 500 ml H₂O bid.

Vor der Hybridisierung wurde der Objektträger prähybridisiert. 100 ml Prähybridisierungslösung wurden in einem Glasbehälter 1 h bei 50°C in einem Brutschrank temperiert. Danach wurde der Objektträger in die Prähybridisierungslösung gegeben und 25 Min bei 50°C inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde der Objektträger in einer Halterung zuerst 30 Sek in 250 ml H₂O bid., dann 30 Sek in 250 ml Isopropanol in einem Glasbehälter unter Rühren bei Zimmertemperatur gewaschen. Zum Trocknen wurde der Objektträger für 5 Min bei 1.000 g zentrifugiert. Der prähybridisierte Objektträger wurde sofort für die Hybridisierung verwendet.

Die markierte cDNA wurde in Hybridisierungspuffer ohne SDS 2 Min bei 98°C denaturiert und auf 45°C abgekühlt. Anschließend wurde 0,08% (v/v) SDS zugegeben, vorsichtig gemischt, leicht zentrifugiert und die Hybridisierungslösung in die Mitte des bedruckten Bereiches eines prähybridisierten Objektträgers pipettiert. Um das benötigte Probenvolumen möglichst klein zu halten, wurden die Hybridisierungen unter einem Deckgläschen (Sigma, Hybri-Slips 40 x 22 mm) durchgeführt und ein

Probenvolumen von 32 μ l verwendet. Danach wurde das Deckglas vorsichtig und luftblasenfrei auf dem Objektträger platziert. Damit die Hybridisierungslösung unter dem Deckglas während der Hybridisierung nicht eintrocknet, wurde im Inneren der Hybridisierungskammer ein feuchtes Milieu geschaffen, indem in die dafür vorgesehenen Vertiefungen in der Hybridisierungskammer Hybridisierungspuffer gegeben wurde. Der Objektträger wurde sofort in die Hybridisierungskammer eingebracht, die Kammer wurde verschlossen und in einen auf 64°C temperierten Brutschrank gelegt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h im Dunkeln bei 64°C. Anschließend wurde der Objektträger der Hybridisierungskammer entnommen und zur Ablösung des Deckglases in ein mit 20 ml Waschpuffer A gefülltes Becherglas getaucht. Nach Ablösung des Deckglases wurde der Objektträger in einer Halterung in einem mit 250 ml Waschpuffer A gefüllten Glasbehälter transferiert und unter leichtem Rühren im Dunkeln für 5 Min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Halterung hat eine Kapazität für maximal 10 Objektträger. Der Objektträger wurde anschließend 5 Min in 250 ml Waschpuffer B gewaschen. Die Waschschrte wurden einmal wiederholt. Danach wurde der Objektträger zum Trocknen für 5 Min bei 1.000 g zentrifugiert. Bis zur Detektion, die direkt im Anschluss erfolgte, wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in lichtgeschützten Behältern gelagert.

5.4.10 Detektion

Die DNA-Chips wurden mit dem Laserscanner Axon GenePix® 4200A detektiert. Die Anregung von Cy3 bzw. Cy5 erfolgte seriell. Zunächst wurden die durch Cy5 erzeugten Signale mit einem Laserlicht einer Wellenlänge von 635 nm, anschließend die durch Cy3 erzeugten Signale mit einem Laserlicht einer Wellenlänge von 532 nm angeregt. Die Detektion der Cy5-Signale erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 670 nm; die der Cy3-Signale bei einer Emissionswellenlänge von 570 nm. Die erzeugten Bilder wurden getrennt im 16bit-TIFF-Format gespeichert. Die Slides wurden zunächst mit einer Laserintensität von 500 PMT für den Cy3- und Cy5-Kanal gescannt. Danach wurden die Laserintensitäten so verändert, dass das Signalverhältnis der roten und grünen Signale über den gesamten gescannten Bereich bzw. anhand der gemittelten Signalverhältnisse des internen Standards ungefähr 1 war. Die maximale Laserintensität in beiden Kanälen

wurde so eingestellt, dass möglichst wenig Sonden in der Signalsättigung lagen und möglichst viele Sonden auswertbar waren.

5.4.11 Quantifizierung der Signalintensitäten mit GenePix®

Die Quantifizierung der Signalintensitäten erfolgte mit der Software GenePix® Pro 6.0. Die detektierten Bilder wurden zunächst in Falschfarben wiedergegeben, wobei entsprechend der Laser-Wellenlängen für Cy3 die Farbe Grün und für Cy5 die Farbe Rot gewählt wurde. Die Software überlagert anschließend diese beiden Bilder. Hat ein Signal in beiden Laser-Kanälen die gleiche Intensität, ergibt sich die Mischfarbe Gelb, das zugehörige Gen wird also in beiden Proben in gleicher Menge transkribiert. Wird ein Gen in einer der beiden Proben stärker exprimiert, kommt es zu einer Verschiebung des Signals zu Rot oder Grün. Zur Quantifizierung der Signalintensitäten wurde über das Falschfarbenbild ein geometrisches Raster gelegt, das zuerst automatisch und anschließend manuell an das Bild angepasst wurde. Hierzu wurde der Sondendurchmesser entweder durch Korrektur des Durchmessers angepasst oder der Spot gegebenenfalls als negativ bewertet. Die Signalintensitäten sowie die Hintergrundintensitäten beider Fluoreszenzfarbstoffe wurden von der Software für jede Sonde berechnet und in einer Tabelle mit der eindeutigen Zuordnung zu den auf dem DNA-Chip aufgebrauchten PCR-Fragmenten ausgegeben.

5.4.12 Auswertung der Hybridisierungsdaten

Die Analyse der Hybridisierungsdaten, die nach der Auswertung durch die Software GenePix® Pro 6.0 erhalten wurde, wurde zunächst in Microsoft Excel durchgeführt. Hier erfolgte zunächst das Filtern nach positiv auswertbaren Sonden. Zur Normierung wurde das Verhältnis zwischen den Signalintensitäten für Cy3 und Cy5 über den gesamten Array ermittelt und damit das Cy5 Signal für alle Punkte normiert. Anhand der normierten Daten wurden in Microsoft-Excel die Signalintensitäten in einem zweidimensionalen Koordinatensystem aufgetragen (Scatter-Plot). Das Verhältnis der Signalintensitäten von Cy5-markierter Probe zu

Cy3-markierter Probe ergibt den Regulationsgrad eines Gens. Die normierten Datensätze der Reproduzierungen wurden für weitere statistische Auswertungen verwendet und die entsprechenden Experimente in einer Tabelle nebeneinander gestellt. Es wurde nach Sonden gefiltert, die in allen Versuchen repräsentiert waren.

5.5 **in silico: Programme, Datenbanken und Internetseiten**

d) *Haloferx volcanii* Genom

<http://www.halolex.mpg.de/public/>

<http://zdna2.umbi.umd.edu/~haloweb/hvo.html>

<http://archaea.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=haloVolc1>

e) Sequenzvergleiche, Alignments, Blasts, Sequenzen, Stammbäume

NCBI Blast <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ClustalW <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

EMBL <http://www.ebi.ac.uk/embl/>

NCBI..... <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PubMed..... <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

PHYLIP <http://bioweb.pasteur.fr/phylogeny/intro-fr.html>

f) Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen

http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html

g) Identifizierung konservierter DNA und RNA Motive

http://meme.sdsc.edu/meme4_1/cgi-bin/meme.cgi

Mit Hilfe des Programms MEME können konservierte Sequenzmotive mit variabler Lokalisierung in den Sequenzen identifiziert werden. Die Motive können hierbei in allen oder nur in einzelnen oder mehrmals in einer Sequenz vorhanden sein.

h) Suche nach definierten Sequenzmotiven

<http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/PatSearch/>

Das Programm PatSearch (Grillo *et al.*, 2003) erlaubt es, Sequenzen nach beliebigen, vordefinierten Sequenzmustern zu durchsuchen. Hierbei können auch Fehlpaarungen, Insertionen und Deletionen berücksichtigt werden.

i) Computersoftware

- Auswertung von Filmen und Bildern :
ImageJ..... <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
Adobe® Photoshop®
- Auswertung von Sequenzierungen, Alignments, Lokaler Blast:
Bioedit..... <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>
- Planung von Klonierungen, Alignments:
Clone Manager Suite 7 Sci-Ed Software, Cary, NC, USA
- Auswertung von Realtime PCR Analysen:
Rotor Gene 6.1 Cobett Research, Mortlake, AU
- Auswertung Microarray Analysen:
Microsoft® Excel® 2003

5.5.1 Programmierung einer eigenen Datenbank

Zu Beginn dieser Arbeit war die Auswertung der Microarray Analysen eine sehr umständliche und damit zeitintensive Arbeit. Aufgrund der Größe der einzelnen Microarray Shotgunklone von mehr als 1-2 kbp und die Limitierung einer eindeutigen Sequenzierung auf etwa 1 kbp wurde die Sequenz jedes Klons zweifach – also sowohl der 5'- als auch 3'-Bereich – bestimmt. Teilweise wurde die Sequenz des Klons sogar mehr als zweifach ermittelt. Um nun Rückschlüsse auf die Funktion des Microarray Klons ziehen zu können, wurden die einzelnen Sequenzen mittels „BLAST Search“ auf der Seite von NCBI (siehe 5.5e) analysiert. Die Funktion wurde daraufhin durch die Analyse der homologen Sequenzen aus anderen Organismen festgestellt. Die Ergebnisse waren jedoch teilweise recht ungenau. Durch die Fertigstellung der

Genomsequenzierung während dieser Arbeit konnte die Auswertung von Microarray Analysen zwar auf das annotierte Genom von *H. volcanii* beschränkt werden, war aber dennoch weiterhin sehr zeitraubend. Da im Vorfeld der Arbeit bereits geplant war, die Microarray Technologie extensiv zu nutzen, wurde eine Lösung für eine wesentlich schnellere Auswertung gesucht. Dazu wurde eine webbasierte SQL-Datenbank aus dem annotierten *H. volcanii* Genom und den Sequenzen der Microarray Klone erstellt. Die Verarbeitung der Daten erfolgte daraufhin mit einem PHP Skript, welches über jeden Internetbrowser – ausdrücklich empfohlen sei hier aber der Firefox® – ausgeführt werden kann.

Bei Aufruf der Internet- bzw. Intranetseite gibt es die Möglichkeit den Namen des Microarray Klons in ein Textfeld einzugeben (**Abbildung 29**) oder sich über einen Link die komplette Liste mit der Bezeichnung aller Microarray Klone anzeigen lassen (**Abbildung 30**). Wurde der Klon von Interesse gefunden, wird im Hintergrund ein „BLAST Search“ der Klonsequenzen gegen das Genom durchgeführt. Das Ergebnis wird daraufhin ausgewertet und grafisch auf der nächsten Seite aufbereitet dargestellt (**Abbildung 31**). Durch diese Automatisierung kann die Auswertung von Microarray Analysen nun in wenigen Minuten erfolgen, was bisher meist mehrere Stunden gedauert hat.

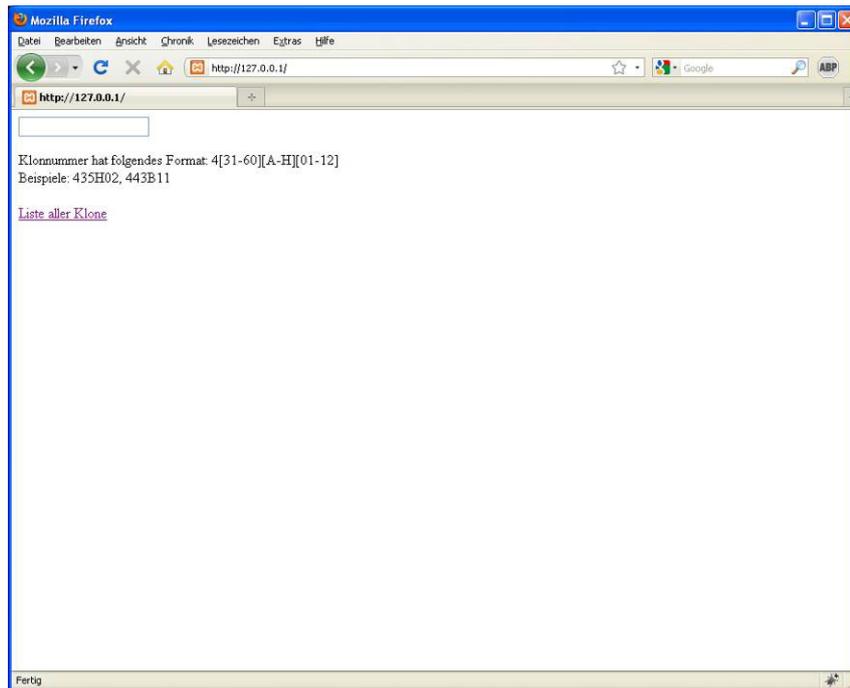


Abbildung 29

Startseite für die semi-automatische Auswertung von Microarray Analysen. In das Textfeld kann direkt die Klonbezeichnung eingegeben werden, dessen Information angezeigt werden soll. Es gibt auch einen Verweis auf die Liste aller Klone (siehe **Abbildung 30**).

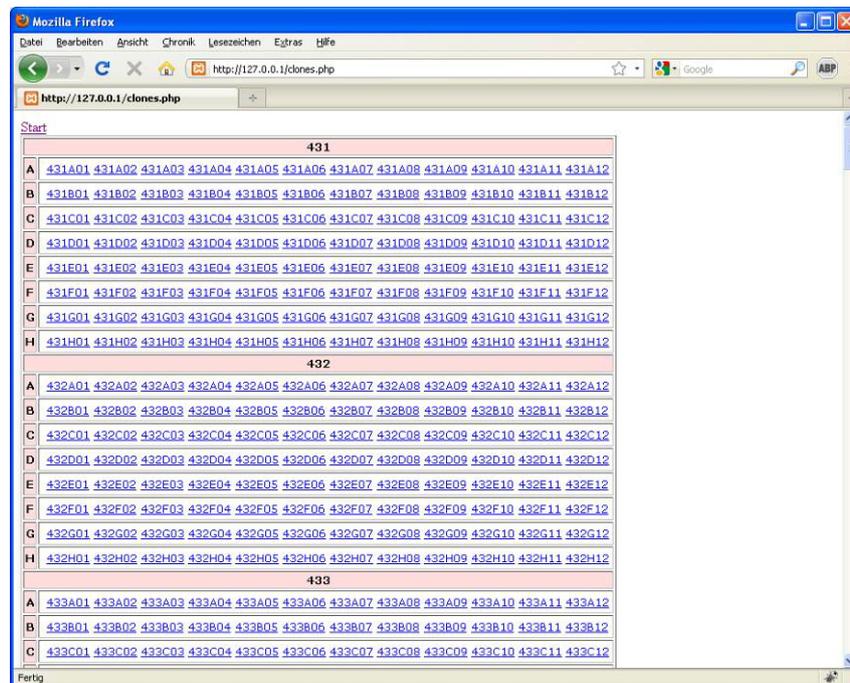


Abbildung 30

Die Liste aller Microarray Klone. Für die Bezeichnung der Klone stand das Layout einer Microtiterplatte Pate. 431 ist z.B. die Platten-Nr., A01 das Well, welches das PCR-Produkt des Klons enthält.

The screenshot shows a web browser window with the URL `http://127.0.0.1/clones.php`. The main content area displays information for clone **431E06**, with start and end coordinates of 1,407,689 and 1,409,016. It features a genomic map with gene annotations for *glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain B* (HVO_1539) and *glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain C* (HVO_1540). A table below the map provides detailed data for these genes and their overlaps with individual clones (ya, yb, za, zb) and the full clone 431E06. To the right, a sequence viewer displays the DNA sequence for the clone, with a scrollable text area. Navigation icons are located below the genomic map.

Code	Region	Size	Protein name	
HVO_1539	1,406,931 - 1,408,200F	1269	glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain B	
HVO_1540	1,408,196 - 1,409,507F	1311	glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain C	

Code	Region	HVO_1539	HVO_1540
431E06 ya	1,407,789 - 1,408,606	412 (32.5%)	411 (31.4%)
431E06 yb	1,407,789 - 1,408,852	412 (32.5%)	657 (50.1%)
431E06 za	1,408,326 - 1,408,916	-	591 (45.1%)
431E06 zb	1,407,836 - 1,408,916	365 (28.8%)	721 (55.0%)
431E06	1,407,789 - 1,408,916	412 (32.5%)	721 (55.0%)

Abbildung 31

Informationsbildschirm eines einzelnen Klon. **1** Bezeichnung des Klon. **2** zeigt die exakte Anfangs- und Endposition der Klonsequenz bezogen auf das Genom von *H. volcanii*. **3** Annotierte Genomsequenz. Zeigt die Position der Gene, ihre Orientierung, Bezeichnung und Funktion. **4** Bezeichnung des Genoms (chr = Chromosom, pHV1, pHV2, pHV3 und pHV4 sind die Megaplasmide). **5** Position der einzelnen Sequenzen des Klon (rosa) und komplett zusammen gesetzt (rot) grafisch dargestellt. **6** Steuerung der Grafik: nach links oder rechts verschieben sowie zoomen. **7** Genaue Daten über die in der Grafik gezeigten Gene; farblich zugeordnet (blau oder grün). **8** Genaue Daten über die einzelnen Klonsequenzen: Bezeichnung, Position im Genom sowie Anzahl der Basenpaare, die sie mit einem Gen überlappt. Die Prozentzahl gibt an, wieviel des Gens durch den Microarray Klon abgedeckt wird. **9** Sequenz des Genomabschnitts resultierend aus der Positionsangabe (**2**).

6 Literaturverzeichnis

- Ahmed H, Ettema TJ, Tjaden B, Geerling AC, van der Oost J, Siebers B. (2005).** The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. *Biochem J.* **390**(Pt 2):529-40.
- Aizawa SI. (1996).** Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* **19**(1):1-5.
- Alam, M. and Oesterhelt, D. (1987).** Purification, reconstitution and polymorphic transition of halobacterial flagella. *J. Mol. Biol.* **194**:495-499.
- Allers T., Ngo H. P., Mevarech M., Lloyd R. G. (2004).** Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Appl Environ Microbiol* **70**(2): 943-53.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. (1963).** Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **51**:786-94.
- Allis CD, Chicoine LG, Richman R, Schulman IG. (1985).** Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**(23):8048-52.
- Altman-Price N, Mevarech M. (2009).** Genetic Evidence for the Importance of Protein Acetylation and Protein Deacetylation in the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol.* **191**(5):1610-7.
- Amend, J. P. & Shock, E. L. (2001).** Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 175-243.
- Asker D, Awad T, Ohta Y. (2002).** Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TM(T): an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon. *J Biosci Bioeng.* **93**(1):37-43.
- Aubert M, Weber E, Gintz B, Chater KF, Decaris B. (1997).** Inactivation or amplification of the *spa2* gene, encoding a potential stationary phase regulator, affects differentiation in *Streptomyces ambofaciens*. *Can J Microbiol.* **43**:1118-1125.
- Babbitt PC, Hasson MS, Wedekind JE, Palmer DR, Barrett WC, Reed GH, Rayment I, Ringe D, Kenyon GL, Gerlt JA. (1996).** The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the alpha-protons of carboxylic acids. *Biochemistry.* **35**(51):16489-501.
- Bannister AJ, Miska EA, Görlich D, Kouzarides T. (2000).** Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol.* **10**(8):467-70.
- Bardy SL, Ng SY, Jarrell KF. (2004).** Recent advances in the structure and assembly of the archaeal flagellum. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **7**(1-2):41-51.

- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. & Pace, N. R. (1996).** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 9188–9193.
- Belenky P, Bogan KL, Brenner C. (2007).** NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci.* **32**(1):12-9.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (2001).** Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr Opin Microbiol* **4**, 208-213.
- Bell SD, Botting CH, Wardleworth BN, Jackson SP, White MF. (2002).** The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science.* **296**(5565):148-51.
- Bernander, R. (2003).** The archaeal cell cycle: current issues. *Mol Microbiol* **48**, 599-604.
- Bernstein JA, Lin PH, Cohen SN, Lin-Chao S. (2004).** Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(9):2758-63.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blecher, O., Goldman, S. & Mevarech, M. (1993).** High expression in *Escherichia coli* of the gene coding for dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii*. Reconstitution of the active enzyme and mutation studies. *Eur J Biochem* **216**, 199-203.
- Borowitzka LJ, Kessly DS, Brown AD (1977).** The salt relations of *Dunaliella*. Further observations on glycerol production and its regulation. *Arch Microbiol.* **113**:131–138
- Bren A, Eisenbach M. (1998).** The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J Mol Biol.* **278**(3):507-14.
- Brenneis M, Soppa J. (2009).** Regulation of translation in haloarchaea: 5'- and 3'-UTRs are essential and have to functionally interact in vivo. *PLoS One.* **4**(2):e4484.
- Breuert S, Allers T, Spohn G, Soppa J. (2006).** Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PLoS One,* **20**;1:e92.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987).** XL1-blue a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-377.
- Campbell ID. (2008).** Studies of focal adhesion assembly. *Biochem Soc Trans.* **36**(Pt 2):263-6.
- Carpousis AJ. (2007).** The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol.* **61**:71-87.

- Cedar H, Bergman Y. (2009).** Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* **10**(5):295-304.
- Chen CC, Tyler J. (2008).** Chromatin reassembly signals the end of DNA repair. *Cell Cycle.* **7**(24):3792-7.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. (2009).** Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* **325**(5942):834-40.
- Christian, J. H. & Waltho, J. A. (1962).** Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **65**, 506-508.
- Clayton AL, Hazzalin CA, Mahadevan LC. (2006).** Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol Cell.* **23**(3):289-96.
- Cohen-Krausz, S. and Trachtenberg, S. (2002).** The structure of the archeobacterial flagellar filament of the extreme halophile *Halobacterium salinarum* R1M1 and its relation to eubacterial flagellar filaments and type IV pili. *J. Mol. Biol.* **321**:383-395
- Costelloe T, Lowndes NF. (2010).** Chromatin assembly and signalling the end of DNA repair requires acetylation of histone h3 on lysine 56. *Subcell Biochem.* **50**:43-54.
- Danner, S. & Soppa, J. (1996).** Characterization of the distal promoter element of halobacteria in vivo using saturation mutagenesis and selection. *Mol Microbiol* **19**, 1265-1276.
- Danson MJ. (1998).** Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv Microb Physiol.* **29**:165-231.
- De Rosa, M., Gambacorta, A. & Gliozzi, A. (1986).** Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol Rev* **50**, 70-80.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. (2003).** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* **370**(Pt 3):737-49.
- DeLong, E. F. (1998).** Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 649-654.
- DeLong, E. F. & Pace, N. R. (2001).** Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol* **50**, 470-478.
- Dennis, P. P. (1997).** Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**, 1007-1010.
- Denu JM. (2005).** The Sir 2 family of protein deacetylases. *Curr Opin Chem Biol.* **9**(5):431-40.

- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y.A., and Trent, J.M. (1996)** Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* **14**: 457-460.
- Dobell C. (1958)**. Antony van Leeuwenhock and his „little animals“. *Russell & Russell*, New York, N.Y.
- Doolittle, W. F. & Logsdon, J. M., Jr. (1998)**. Archaeal genomics: do archaea have a mixed heritage? *Curr Biol* **8**, R209-211.
- Eichler J. (2003)**. Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco)proteins. *Microbiology*. **149**(Pt 12):3347-51.
- Eisen, M.B., and Brown, P.O. (1999)** DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* **303**: 179-205.
- Eisenberg H. (1995)**. Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys* **318**(1):1-5. Review.
- Falb M, Müller K, Königsmair L, Oberwinkler T, Horn P, von Gronau S, Gonzalez O, Pfeiffer F, Bornberg-Bauer E, Oesterhelt D. (2008)**. Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*. **12**(2):177-96.
- Forbes AJ, Patrie SM, Taylor GK, Kim YB, Jiang L, Kelleher NL. (2004)**. Targeted analysis and discovery of posttranslational modifications in proteins from methanogenic archaea by top-down MS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**(9):2678-83.
- Gerl, L., Deutzmann, R. and Sumper, M. (1989)**. Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family-Identification of all five gene products. *FEBS Letters*. **244**:137-140.
- Gerlt JA, Babbitt PC, Rayment I. (2005)**. Divergent evolution in the enolase superfamily: the interplay of mechanism and specificity. *Arch Biochem Biophys*. **433**(1):59-70. Review.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. (2005)**. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. **363**:15-23.
- Grabowski, B. & Kelman, Z. (2003)**. Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annu Rev Microbiol* **57**, 487-516.
- Grayling RA, Bailey KA, Reeve JN. (1997)**. DNA binding and nuclease protection by the Hmf histones from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*. *Extremophiles*. **1**(2):79-88.
- Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV. (2004)**. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*. **338**(1):17-31.
- Grubisha O, Smith BC, Denu JM. (2005)**. Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. *FEBS J*. **272**(18):4607-16.

- Grunstein M. (1997).** Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. **389**(6649):349-52.
- Guo L, Feng Y, Zhang Z, Yao H, Luo Y, Wang J, Huang L. (2008).** Biochemical and structural characterization of Cren7, a novel chromatin protein conserved among Crenarchaea. *Nucleic Acids Res.* **36**(4):1129-37.
- Haigis MC, Guarente LP. (2006).** Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* **20**(21):2913-21.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hatayama H, Iwashita J, Kuwajima A, Abe T. (2007).** The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochem Biophys Res Commun.* **356**(3):599-603.
- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A. & Zillig, W. (1983).** Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *Embo J* **2**, 1291-1294.
- Huisman GW, Kolter R. (1994).** Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. *Science.* **265**(5171):537-9.
- Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K. (2010).** Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *J Bacteriol.* **192**(2):518-24.
- Inoue A, Fujimoto D. (1969).** Enzymatic deacetylation of histone. *Biochem Biophys Res Commun.* **36**(1):146-50.
- Jarrell KF, Bayley DP, Florian V, Klein A. (1996).** Isolation and characterization of insertional mutations in flagellin genes in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol Microbiol.* **20**(3):657-66.
- Jenuwein T, Allis CD. (2001).** Translating the histone code. *Science.* **293**(5532):1074-80.
- Johnson A, Li G, Sikorski TW, Buratowski S, Woodcock CL, Moazed D. (2009).** Reconstitution of heterochromatin-dependent transcriptional gene silencing. *Mol Cell.* **35**(6):769-81.
- Johnsen U, Dambeck M, Zaiss H, Fuhrer T, Soppa J, Sauer U, Schönheit P. (2009).** D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem.* **284**(40):27290-303.
- Jolley KA, Maddocks DG, Gyles SL, Mullan Z, Tang SL, Dyall-Smith ML, Hough DW, Danson MJ. (2000).** 2-Oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes in the halophilic Archaea? Gene sequences and protein structural predictions. *Microbiology.* **146** (Pt 5):1061-9.
- Jones CJ, Aizawa S. (1991).** The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv Microb Physiol.* **32**:109-72.

- Kandler, O. & König, H. (1998).** Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* **54**, 305-308.
- Karlin, S., Brocchieri, L., Trent, J., Blaisdell, B. E. & Mrazek, J. (2002).** Heterogeneity of genome and proteome content in bacteria, archaea, and eukaryotes. *Theor Popul Biol* **61**, 367-390.
- Kessel M, Buhle EL Jr, Cohen S, Aebi U. (1988).** The cell wall structure of a magnesium-dependent halobacterium, *Halobacterium volcanii* CD-2, from the Dead Sea. *J Ultrastruct Mol Struct Res.* **100**(1):94-106.
- Khan S, Pierce D, Vale RD. (2000).** Interactions of the chemotaxis signal protein CheY with bacterial flagellar motors visualized by evanescent wave microscopy. *Curr Biol.* **10**(15):927-30.
- Khitrov, G. (2001)** Use of inexpensive dyes to calibrate and adjust your microarray printer. *Biotechniques* **30**: 748.
- Kim S, Lee SB. (2005).** Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner-Doudoroff pathway. *Biochem J.* **387**(Pt 1):271-80.
- Kimura A, Matsubara K, Horikoshi M. (2005).** A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J Biochem.* **138**(6):647-62.
- Kinch LN, Ginalski K, Rychlewski L, Grishin NV. (2005).** Identification of novel restriction endonuclease-like fold families among hypothetical proteins. *Nucleic Acids Res.* **33**:3598-605.
- Koh E, Bandle R, Clair T, Roberts DD, Stracke ML. (2007).** Trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine switch S1P from an inhibitor to a stimulator of motility through epigenetic regulation of S1P receptors. *Cancer Lett.* **250**(1):53-62.
- Kofoed EC, Parkinson JS. (1988).** Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**(14):4981-5.
- Kubitschek HE, Friske JA. (1986).** Determination of bacterial cell volume with the Coulter Counter. *J Bacteriol.* **168**(3):1466-7.
- Kuo MH, Allis CD. (1998).** Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays.* **20**(8):615-26.
- Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., Grünberg, H., Uwer, U., Gluch, M. and Oesterheld, D. (1994).** The flagellar bundle of *Halobacterium salinarium* is inserted into a distinct polar cap structure. *J. Bacteriol.* **176**:5184-5187.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lamble HJ, Milburn CC, Taylor GL, Hough DW, Danson MJ. (2004).** Gluconate dehydratase from the promiscuous Entner-Doudoroff pathway in *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett.* **576**(1-2):133-6.
- Lando JA, Gerlt JA, Kozarich JW, Koo CW, Shah VJ, Kenyon GL, Neidhart DJ, Fujuta S, Petsko GA. (1994).** The role of lysine 166 in the mechanism of mandelate racemase from *Pseudomonas putida*: mechanistic and crystallographic evidence for stereospecific alkylation by (R)- α -phenylglycidate. *Biochemistry* **33**:635-643.
- Lange C, Zaigler A, Hammelmann M, Twellmeyer J, Raddatz G, Schuster SC, Oesterhelt D, Soppa J. (2007).** Genome-wide analysis of growth phase-dependent translational and transcriptional regulation in halophilic archaea. *BMC Genomics.* **8**:415.
- Large A, Stamme C, Lange C, Duan Z, Allers T, Soppa J, Lund PA. (2007).** Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene. *Mol Microbiol.* **66**(5):1092-106.
- Lee KK, Workman JL. (2007).** Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**(4):284-95.
- Londei, P. (2005).** Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 185-200.
- Low, R. & Rausch, T. (1994).** Sensitive, nonradioactive northern blots using alkaline transfer of total RNA and PCR-amplified biotinylated probes. *Biotechniques* **17**, 1026-1028, 1030.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997).** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* **389**(6648):251-60.
- Luijsterburg MS, White MF, van Driel R, Dame RT. (2008).** The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **43**(6):393-418.
- Makarova, K. S. & Koonin, E. V. (2003).** Comparative genomics of Archaea: how much have we learned in six years, and what's next? *Genome Biol* **4**, 115.
- Marc F, Sandman K, Lurz R, Reeve JN. (2002).** Archaeal histone tetramerization determines DNA affinity and the direction of DNA supercoiling. *J Biol Chem.* **277**(34):30879-86.
- Marwan W, Alam M, Oesterhelt D. (1991).** Rotation and switching of the flagellar motor assembly in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol.* **173**(6):1971-7.
- Matsunaga, F., Forterre, P., Ishino, Y. & Myllykallio, H. (2001).** *In vivo* interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11152-11157.

- McEvoy MM, Bren A, Eisenbach M, Dahlquist FW. (1999).** Identification of the binding interfaces on CheY for two of its targets, the phosphatase CheZ and the flagellar switch protein fliM. *J Mol Biol.* **289**(5):1423-33.
- Merz AJ, So M, Sheetz MP. (2000).** Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature.* **407**(6800):98-102.
- Mesibov R, Ordal GW, Adler J. (1973).** The range of attractant concentrations for bacterial chemotaxis and the threshold and size of response over this range. Weber law and related phenomena. *J Gen Physiol.* **62**(2):203-23.
- Minsky A, Ghirlando R, Reich Z. (1997).** Nucleosomes: a solution to a crowded intracellular environment? *J Theor Biol.* **188**(3):379-85.
- Moazed D, Rudner AD, Huang J, Hoppe GJ, Tanny JC. (2004).** A model for step-wise assembly of heterochromatin in yeast. *Novartis Found Symp.* **259**:48-56; discussion 56-62, 163-9.
- Mujtaba S, Zeng L, Zhou MM. (2007).** Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene.* **26**(37):5521-7.
- Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A. (2008).** Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics.* **36**(2):75-88.
- Nieuwlandt D. T., Daniels C. J. (1990).** An expression vector for the archaebacterium *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol* **172**(12): 7104-10.
- Nudleman E, Kaiser D. (2004).** Pulling together with type IV pili. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **7**(1-2):52-62.
- Nutsch T, Oesterhelt D, Gilles ED, Marwan W. (2005).** A quantitative model of the switch cycle of an archaeal flagellar motor and its sensory control. *Biophys J.* **89**(4):2307-23.
- Olsen, G. J. & Woese, C. R. (1997).** Archaeal genomics: an overview. *Cell* **89**, 991-994.
- Patenge N, Berendes A, Engelhardt H, Schuster SC, Oesterhelt D. (2001).** The *fla* gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol.* **41**(3):653-63.
- Phadwal K, Singh PK (2003).** Isolation and characterization of an indigenous isolate of *Dunaliella sp.* for beta-carotene and glycerol production from a hypersaline lake in India. *J Basic Microbiol.* **43**:423-429
- Phillips DM. (1963).** The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J.* **87**:258-63.
- Podar M, Anderson I, Makarova KS, Elkins JG, Ivanova N, Wall MA, Lykidis A, Mavromatis K, Sun H, Hudson ME, Chen W, Deciu C, Hutchison D, Eads JR, Anderson A, Fernandes F, Szeto E, Lapidus A, Kyrpides NC, Saier MH Jr, Richardson PM, Rachel R, Huber H, Eisen JA, Koonin EV, Keller M, Stetter KO. (2008).** A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. *Genome Biol* **9**(11):R158.

- Reeve, J. N. (2003). Archaeal chromatin and transcription. *Mol Microbiol* **48**, 587-598.
- Reysenbach, A. L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3798-3806.
- Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E. & Lake, J. A. (1998). Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6239-6244.
- Roesser, M. & Muller, V. (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ Microbiol* **3**, 743-754.
- Rojas JR, Trievel RC, Zhou J, Mo Y, Li X, Berger SL, Allis CD, Marmorstein R. (1999). Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. *Nature*. **401**(6748):93-8.
- Rosenshine, I., Zusman, T., Werczberger, R., and Mevarech, M. (1987) Amplification of specific DNA sequences correlates with resistance of the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* to the dihydrofolate reductase inhibitors trimethoprim and methotrexate. *Mol Gen Genet* **208**: 518-522.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem.* **70**:81-120.
- Ruiz-Carrillo A, Wangh LJ, Allfrey VG. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science*. **190**(4210):117-28.
- Sagi Y, Khan S, Eisenbach M. (2003). Binding of the chemotaxis response regulator CheY to the isolated, intact switch complex of the bacterial flagellar motor: lack of cooperativity. *J Biol Chem.* **278**(28):25867-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E. G. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.
- Sandman K, Krzycki JA, Dobrinski B, Lurz R, Reeve JN. (1990). Hmf, a DNA-binding protein isolated from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*, is most closely related to histones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(15):5788-91.
- Sandman K, Grayling RA, Dobrinski B, Lurz R, Reeve JN. (1994). Growth-phase-dependent synthesis of histones in the archaeon *Methanothermus fervidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(26):12624-8.
- Sandman K, Pereira SL, Reeve JN. (1998). Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome. *Cell Mol Life Sci.* **54**(12):1350-64.
- Sandman K, Reeve JN. (2006). Archaeal histones and the origin of the histone fold. *Curr Opin Microbiol.* **9**(5):520-5.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-108.

- Schafer, G., Engelhard, M. & Muller, V. (1999).** Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 570-620.
- Schlesner M, Miller A, Streif S, Staudinger WF, Müller J, Scheffer B, Siedler F, Oesterhelt D. (2009).** Identification of Archaea-specific chemotaxis proteins which interact with the flagellar apparatus. *BMC Microbiol.* **9**:56.
- Schmidt MT, Smith BC, Jackson MD, Denu JM. (2004).** Coenzyme specificity of Sir2 protein deacetylases: implications for physiological regulation. *J Biol Chem.* **279**(38):40122-9.
- Schneider D, Bruton CJ, Chater KF. (1996).** Characterization of *spaA*, a *Streptomyces coelicolor* gene homologous to a gene involved in sensing starvation in *Escherichia coli*. *Gene.* **177**(1-2):243-51.
- Schuster M, Zhao R, Bourret RB, Collins EJ. (2000).** Correlated switch binding and signaling in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem.* **275**(26):19752-8.
- Shearstone, J.R., Allaire, N.E., Getman, M.E., and Perrin, S. (2002)** Nondestructive quality control for microarray production. *Biotechniques* **32**: 1051-1052, 1054, 1056-1057.
- Siebers B, Schönheit P. (2005).** Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr Opin Microbiol.* **8**(6):695-705.
- Sisignano M, Morbitzer D, Gägens J, Oldiges M, Soppa J. (2009).** A 2-oxoacid dehydrogenase complex of *Haloferax volcanii* is essential for growth on isoleucine but not the other branched chain amino acids. *Microbiology*. [Epub ahead of print]
- Skerker JM, Berg HC. (2001).** Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(12):6901-4.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. & other authors (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Starich MR, Sandman K, Reeve JN, Summers MF. (1996).** NMR structure of HMfB from the hyperthermophile, *Methanothermus fervidus*, confirms that this archaeal protein is a histone. *J Mol Biol.* **255**(1):187-203.
- Storch KF, Rudolph J, Oesterhelt D. (1999).** Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *EMBO J.* **18**(5):1146-58.
- Struhl K. (1998).** Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**(5):599-606.
- Szurmant H, Bunn MW, Cannistraro VJ, Ordal GW. (2003).** *Bacillus subtilis* hydrolyzes CheY-P at the location of its action, the flagellar switch. *J Biol Chem.* **278**(49):48611-6.
- Taghbalout A, Rothfield L. (2008).** RNaseE and RNA helicase B play central roles in the cytoskeletal organization of the RNA degradosome. *J Biol Chem.* **16**;283(20):13850-5.

- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. (2007).** How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol.* **14**(11):1025-40.
- Thomas NA, Bardy SL, Jarrell KF. (2001a).** The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol Rev.* **25**(2):147-74.
- Thomas NA, Chao ED, Jarrell KF. (2001b).** Identification of amino acids in the leader peptide of *Methanococcus voltae* preflagellin that are important in posttranslational processing. *Arch Microbiol.* **175**(4):263-9.
- van Ooyen J, Soppa J. (2007).** Three 2-oxoacid dehydrogenase operons in *Haloferax volcanii*: expression, deletion mutants and evolution. *Microbiology* **153**(Pt 10):3303-13.
- Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V. (2004).** Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr Med Chem.* **11**(12):1629-43.
- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. (2003).** Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* **19**(5):286-93.
- Vincent A, Perrais M, Desseyn JL, Aubert JP, Pigny P, Van Seuningen I. (2007).** Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells. *Oncogene.* **26**(45):6566-76.
- Wade PA, Wolffe AP. (1997).** Histone acetyltransferases in control. *Curr Biol.* **7**(2):R82-4.
- Waterborg JH. (2002).** Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochem Cell Biol.* **80**(3):363-78.
- Wessel, D. & Flugge, U. I. (1984).** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**, 141-143.
- White MF, Bell SD. (2002).** Holding it together: chromatin in the Archaea. *Trends Genet.* **18**(12):621-6. Review.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-4579.
- Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB. (2001).** Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3**(10):REVIEWS3013.
- Workman JL, Kingston RE. (1998).** Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem.* **67**:545-79.

- Wright, D. B., Banks, D. D., Lohman, J. R., Hilsenbeck, J. L. & Gloss, L. M. (2002).** The effect of salts on the activity and stability of *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii* dihydrofolate reductases. *J Mol Biol* **323**, 327-344.
- Yang XJ. (2004).** The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res.* **32**(3):959-76.
- Yang XJ, Seto E. (2008).** The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**(3):206-18.
- Yue, H., Eastman, P.S., Wang, B.B., Minor, J., Doctolero, M.H., et al., (2001)** An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res* **29**: E41-41.
- Zaigler A, Schuster SC, Soppa J. (2003).** Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol.* **48**(4):1089-105.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

A

A	Adenosin
Amp	Ampicillin
Asp	Aspartat

B

BCA	Bicinchoninic acid
bid.	Bidestilliert
Bp	Basenpaar

C

C	Cytosin
CB	Chemotaxis Puffer (buffer)

D

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
------	------------------------------

EtOH	Ethanol
------	---------

G

G	Guanosin
g	Schwerebeschleunigung
g	Gramm
ges.	Gesättigt

I

IRES	Internal ribosome entry site
------	------------------------------

J

J	Joule
---	-------

K

kg	Kilogramm
----	-----------

L

Lsg.	Lösung
------	--------

M

M	Molar
mA	Milliampere
Mbp	Megabasenpaare
MCS	Multiple cloning site
mg	Milligramm
miRNA	microRNA
Min	Minute
mJ	Millijoule
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA

N

NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
n.b.	nicht bestimmt
ncRNA	Noncoding RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar

n.n.	nicht nachweisbar
Novo	Novobiocin
nt	Nukleotide
O	
<hr/>	
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
ORF	Open reading frame
Ori	Replikationsursprung
P	
<hr/>	
p.a.	Per analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
pmol	Picomol
R	
<hr/>	
RBS	Ribosombindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
S	
<hr/>	
Sek	Sekunde
Ser	Serin
sRNA	Small RNA
T	
<hr/>	
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Thr	Threonin
TPP	Thiamin Pyrophosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	
<hr/>	
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region

UV Ultraviolett

V

V Volt

v/v Volumen pro Volumen

W

w/v Gewicht pro Volumen

Z

z.B. Zum Beispiel

7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von am Institut für molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe Universität in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Soppa durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Soppa für die Vergabe des Themas, die Möglichkeit zur Durchführung der Promotion in seiner Arbeitsgruppen, seine Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente sowie für seine stete Geduld.

Ich bedanke mich bei Prof. Moshe Mevarech von der Universität Tel-Aviv für die freundliche Unterstützung und Kooperation. Neta Altman-Price danke ich für die geleistete Vorarbeit sowie Shahar Barak für die nette Korrespondenz.

Danken möchte ich mich zudem bei Prof. Dr. Reinhard Wirth für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Beatrix Süß bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem Josef-Buchmann-Doktorandenstipendienfond danke ich für die Finanzierung.

Mein herzlicher Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Soppa für das sehr gute Arbeitsklima und die stets gute Zusammenarbeit. Besonders danken möchte ich Christian Lange für sein fundiertes Wissen und unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie Mathias Hammelmann für seine Laborerfahrung, die er mit Tipps und Tricks weitergab. Oliver Hering danke ich für seine Vorbildfunktion. Herzlich bedanken möchte ich Catherina Hildenbrand für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Meiner Frau Regina und meinem Sohn Florian danke ich für ihr Verständnis und ihre ganz persönliche Unterstützung im Laufe meiner Promotion.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Dambeck
Geburtsdatum	13.08.1978
Geburtsort	Wiesbaden
Wohnort	Idstein
Familienstand	verheiratet
Kinder	1 Sohn
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1984 – 1988	Grundschule Idstein
1988 – 1990	Limerschule, Idstein
1990 – 1997	Pestalozzi Gymnasium, Idstein Abschluss: Abitur

Wehrdienst

1997 – 1998	1. Führungsunterstützungsregiment 40, Mainz
-------------	---

Hochschulausbildung

1998 – 2000	Studium der Informatik an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt
2000 – 2004	Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt mit den Schwerpunktfächern Mikrobiologie, Biochemie und Genetik
2004 – 2005	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörg Soppa Abschluss: Diplom-Biologe

Promotion

2005 – 2010	Naturwissenschaftliche Dissertation am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt a.M. unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörg Soppa
-------------	---

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, 14. Januar 2010

Michael Dambeck