

**“Untersuchung des Zellzyklusses von *Halobacterium salinarum*
unter besonderer Berücksichtigung des SMC-Proteins Sph1”**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main**

**von
Ute Herrmann
aus Frankfurt am Main**

**Frankfurt am Main 2002
(DF1)**

“Untersuchung des Zellzyklusses von *Halobacterium salinarum* unter besonderer Berücksichtigung des SMC-Proteins Sph1”

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Ute Herrmann
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2002
(DF1)

vom Fachbereich Biologie und Informatik (15) der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. B. Streit

Gutachter: Prof. Dr. J. Soppa
Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation: 20.12.2002

AUS DER ARBEIT HERVORGEANGENE VERÖFFENTLICHUNGEN:

Herrmann U. und Soppa, J. (2002) Cell cycle-dependent expression of an essential SMC-like protein and dynamic chromosome localization in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.*, im Druck

IN VORBEREITUNG:

Herrmann U., and Soppa, J. (2002) Change in the phenotype of *Halobacterium salinarum* upon overproduction and depletion of the Sph1 Protein.

DANKSAGUNG:

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

Herrn Prof. Dr. Jörg Soppa möchte ich für die Vergabe des Themas, seine Anregungen und Hilfestellungen, sowie für die Diskussionen der Ergebnisse danken.

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Achim Kröger für seine stete Diskussionsbereitschaft im Arbeitsgruppenseminar und die Förderung meiner Arbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Achim Kröger und Prof. Dr. Karl-Dieter Entian danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt Simone Biel, Dr. Roland Groß, Dr. Matthias Rose und Dr. Jörg Simon.

Herrn Prof. Dr. Helmut Steiger und seiner Frau Ingeborg danke ich für die gute Nachbarschaft und für die Nutzung ihres Aufenthaltsraums.

Ich danke den Arbeitsgruppen von Dr. Anita Marchfelder, Universität Ulm; Dr. Martin Müller, ETH Zürich und Dr. Paul Walther, Universität Ulm für die große Hilfsbereitschaft bei der Kultivierung und Hochdruck-Schockgefrierung von *Halobacterium salinarum* Zellen.

Bei Dr. Reinhard Rachel, Universität Regensburg und seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Elektronenmikroskopie.

Meinen Kommilitonen Ulrike Böcker, Daniela Hildebrand, Andreas Hofmann, Isabel Schmitt, Sandra Schütz und Stefanie Steidl möchte ich für die vielen wissenschaftlichen und unwissenschaftlichen Diskussionen danken.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Labormitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Soppa für die Zusammenarbeit.

Bei Alexandra zur Mühlen und Alexander Zaigler möchte ich mich für das lustige Arbeitsklima bedanken. Bei Alexander Zaigler bedanke ich mich außerdem für die gute Zusammenarbeit, seine grenzenlose Geduld, seinen Beistand in schweren Zeiten und seine Gesellschaft in guten Zeiten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, meiner Oma, Yusi Birim und natürlich Carsten Schleyer für ihre Unterstützung und viele andere Dinge, die man allzu leicht für selbstverständlich hält.

I.	ZUSAMMENFASSUNG	1
II.	EINLEITUNG	3
1.	Archaea.....	3
2.	Zellzyklus.....	4
3.	Synchronisation.....	6
4.	SMC Proteine	9
5.	Zielsetzung.....	13
III.	ERGEBNISSE	14
1.	Proteine der SMC Familie und weitere Zellzyklusproteine in <i>H. salinarum</i>	14
1.1	SMC Proteine in <i>H. salinarum</i>	14
1.2	Transkription von <i>sph1</i> und weiterer Zellzyklusgene.....	17
2.	Wachstumsphasen-abhängige Expression von <i>sph1</i> und weiteren Zellzyklusgenen in <i>H. salinarum</i>	21
2.1	Transkriptanalyse.....	21
2.2	Proteinakkumulation.....	23
3.	Modulation der Sph1 Konzentration in <i>H. salinarum</i>	25
3.1	Überproduktion von Sph1.....	25
3.2	Depletion von Sph1.....	29
3.3	Quantifizierung der Molekülzahl je <i>H. salinarum</i> -Zelle.....	31
4.	Etablierung einer Synchronisationsmethode.....	32
4.1	Wirkung von eukaryalen Zellzyklusinhibitoren.....	32
4.2	Hydroxyharnstoff.....	34
4.3	Aphidicolin.....	35
4.4	Bestimmung der Zellteilungsebene.....	38
4.5	Synchronisationsprozedur.....	40
4.6	Zellteilung nach Entfernen des Inhibitors.....	45
5.	Zellzyklus-abhängige Expression von <i>sph1</i> und weiteren Zellzyklusgenen von <i>H. salinarum</i>	46
5.1	Transkriptanalyse.....	46
5.2	Proteinakkumulation.....	48
6.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	49
7.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	55
7.1	Wachstum in Kapillaren.....	55
7.2	Lokalisation von Sph1 in <i>H. salinarum</i>	55
IV.	DISKUSSION	59
1.	Änderung der intrazellulären Sph1 Konzentration.....	59
2.	Etablierung einer Synchronisationsprozedur.....	60
3.	Synchronisationsprozeduren für archaeale Organismen.....	61
4.	Zellzyklus abhängige Expression haloarchaealer Zellzyklusgene.....	62
5.	Sph1-haltige Komplexe.....	63
6.	Expressionsprofile weiterer haloarchaealer Zellzyklusgene.....	64
7.	Intrazelluläre Lokalisation von Sph1 in Zellen von <i>H. salinarum</i>	65

8.	Sph1 – ein Rad18 Homolog?.....	67
9.	Dynamische intrazelluläre Lokalisation des Chromosoms in Zellen von <i>H. salinarum</i>	68
10.	Zellteilungsmodus von <i>H. salinarum</i>	70
11.	Regulierte Genexpression in <i>H. salinarum</i>	71
12.	Antisense System.....	72
13.	<i>H. salinarum</i> – ein archaealer Modellorganismus.....	73
V.	EXPERIMENTELLER TEIL	74
1.	Inhibitoren und Oligonukleotide.....	74
1.1	Inhibitoren.....	74
1.2	Oligonukleotide.....	74
	a) Oligonukleotide für die Amplifikation von Genen für die Klonierung.....	74
	b) Oligonukleotide für die Herstellung von Sonden.....	75
	c) Oligonukleotide für Sequenzierreaktionen.....	76
2.	Verwendete Organismen und Zellzucht.....	77
2.1	Verwendete Organismen.....	77
	a) <i>E. coli</i>	77
	b) <i>H. salinarum</i>	77
2.2	Nährmedien.....	77
	a) <i>E. coli</i>	77
	b) <i>H. salinarum</i>	78
2.3	Zellzucht.....	79
2.4	Zellzucht in Kapillaren.....	79
2.5	Aufnahme einer Wachstumskurve.....	79
2.6	Stammhaltung.....	80
	a) <i>E. coli</i>	80
	b) <i>H. salinarum</i>	80
3.	Molekularbiologische Methoden.....	81
3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>H. salinarum</i>	81
3.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>H. salinarum</i>	82
3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	83
	a) Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab.....	83
	b) Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab.....	84
3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	84
3.5	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	85
3.6	Präzipitation von DNA aus Lösungen.....	86
	a) Präzipitation mit Polyethylenglycol (PEG).....	86
	b) Präzipitation mit Kaliumazetat in Anwesenheit von Ethanol.....	87
3.7	Dialyse von DNA-Lösungen.....	87
3.8	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	88
3.9	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Lösungen.....	88
3.10	Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Lösungen.....	89
3.11	Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	90
3.12	Dephosphorylierung von Nukleinsäuren.....	91
3.13	Ligation.....	92
3.14	Transformation von Mikroorganismen.....	92
	a) <i>E. coli</i>	92

b) <i>H. salinarum</i>	93
3.15 Polymerasekettenreaktion.....	95
a) Standard-Polymerasekettenreaktion.....	95
b) Polymerasekettenreaktion mit „ganzen Zellen“.....	96
c) Herstellung DIG-markierter Sonden.....	97
3.16 Sequenzierreaktion.....	98
3.17 Transfer von Nukleinsäuren.....	99
a) Transfer von RNA auf Membranen.....	99
b) Transfer von DNA auf Membranen.....	100
3.18 Hybridisierung und Chemolumineszenznachweis.....	101
4. Proteinbiochemische Methoden.....	103
4.1 Heterologe Expression von <i>sphI</i> _{H6} in <i>E. coli</i> und Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins.....	103
4.2 Herstellen eines Rohextraktes aus <i>H. salinarum</i>	105
4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	105
4.4 Präzipitation von Proteinen aus Lösungen.....	105
a) nach Mevarech.....	105
b) nach Wessel und Flügge.....	105
4.5 Acrylamidgelelektrophorese.....	106
4.6 Western Transfer.....	110
4.7 Immunologische Detektion von Proteinen.....	112
4.8 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen.....	113
5. Zellbiologische Methoden.....	114
5.1 Agarose beschichtete Objektträger.....	114
5.2 Fixierung von <i>H. salinarum</i> Zellen, DNA-Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen und Fluoreszenzmikroskopie.....	114
5.3 Synchronisationsprozedur.....	115
6. Elektronenmikroskopische Methoden.....	116
6.1 Hochdruckgefrierung.....	116
6.2 Gefriersubstitution.....	116
6.3 Erstellen von Schnittpräparaten.....	117
6.4 Elektronenmikroskopie.....	117
6.5 Immunogoldmarkierung mit Silberverstärkung.....	118
7. Material.....	121
7.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	121
7.2 Enzyme.....	122
7.3 Plasmide.....	122
7.4 Membranen, Filter und Kits.....	123
7.5 Geräte.....	123

VI. LITERATURVERZEICHNIS 125

VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 141

I. Zusammenfassung:

Das Genom des Archaeons *Halobacterium salinarum* kodiert vier Proteine der SMC Protein Superfamilie. Zwei Proteine bilden dabei eine neue Gruppe und werden „SMC-artige Proteine von *H. salinarum*“ (Sph1 und Sph2) genannt. Eine Transkriptanalyse ergab, dass *sph1* und das 114 bp stromabwärts gelegene *hp24* Gen ausschließlich in exponentiell wachsenden Zellen transkribiert werden. In Zellen der stationären Wachstumsphase ist keines der beiden Transkripte nachweisbar. Die Funktion von Sph1 wurde durch Versuche mit Überproduktions- und Depletionsstämmen von *H. salinarum* untersucht. Die konditionale Überproduktion von Sph1 inhibiert die weitere Zellteilung und führt zu einer Längenzunahme der Zellen. Erstmals wurde durch ein antisense-mRNA-System in einem Archaeon ein Protein, Sph1, depletiert. Die Depletion führt ebenfalls zur Inhibition der weiteren Zellteilungsereignisse. Beide Phänotypen zeigen, dass Sph1 eine essentielle Rolle im Verlauf des Zellzyklusses einnimmt.

Um Zellzyklus spezifische Ereignisse zu analysieren wurde eine Synchronisationsprozedur für *H. salinarum* entwickelt. Dazu wurde der Effekt von sechs eukaryalen Zellzyklusinhibitoren auf den Zellzyklus von *H. salinarum* untersucht. Bei geeigneter Konzentration verursacht der effizienten DNA Polymerase Inhibitor Aphidicolin eine schnelle und reversible Zellzyklusblockade, während andere zelluläre Prozesse nicht beeinflusst werden. Durch Ermittlung der Zelldichte, der mittleren Zelllänge und des Anteils an Septum bildenden Zellen wurde festgestellt, dass nach Entfernen des Inhibitors ca. 70 % der in der Kultur vorhandenen Zellen den Zellzyklus synchron durchlaufen. Diese Prozedur erlaubt erstmals die Untersuchung der Zellzyklus abhängigen Regulation der Transkription, Proteinakkumulation sowie der intrazellulären DNA-Lokalisation in einem Archaeon. Transkriptionsstudien mit synchron wachsenden *H. salinarum*-Kulturen ergaben, dass das *sph1* Transkript eindeutig Zellzyklus abhängig reguliert ist. Die maximale Transkriptmenge ist dabei zum Zeitpunkt der Septumbildung nachweisbar. Die Expression des *hp24* Gens beginnt etwa eine Stunde vor der Expression des *sph1* Gens. Bevor die *sph1* Transkriptmenge ihr Maximum erreicht, nimmt die *hp24* Expression wieder ab. Das *cdcH* Gen, das für ein Protein der Cdc48 Familie kodiert, ist wie das *sph1* Gen um den Zeitpunkt der Septumbildung stark induziert, während ein *ftsZ* Allel nicht in Zellzyklus abhängiger Weise reguliert ist. Die Transkriptionsmuster zeigen, dass die Transkription verschiedener Gene im Verlauf des haloarchaealen Zellzyklusses präzise reguliert wird. Die Sph1 Proteinmenge ist ebenfalls

während des Zellzyklusses reguliert; sie ist erhöht, wenn die Segregation der neuen Chromosomen nahezu abgeschlossen ist. Folglich hat Sph1 vermutlich eine Funktion in der späten Phase der Replikation, z.B. in der DNA-Reparatur wie auch die eukaryalen Rad18 Proteine. Im Gegensatz zum *sph1* Transkript ist das Protein während des gesamten Zellzyklusses in *H. salinarum* nachweisbar. Es ist daher nicht auszuschließen, dass Sph1 eine weitere Funktion ausübt, die eine Präsenz während des gesamten Zellzyklusses benötigt.

Ein Färbeprotokoll mit einem DNA spezifischen Fluoreszenzfarbstoff wurde entwickelt, um die intrazelluläre Lokalisation des Nukleoids in *H. salinarum* zu bestimmen und seine differenzierte Positionierung im Verlauf des Zellzyklusses in synchronisierten Zellen zu verfolgen. Synchronisierte Kulturen wurden mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass das haloarchaeale Nukleoid nach einer anfänglichen Verteilung auf die gesamte Zelle in der Zellteilungsebene kondensiert. Im weiteren Verlauf wird die DNA zügig an die $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ Positionen transportiert. Alle DNA-Strukturen wurden auch in unbehandelten Zellen beobachtet, so dass Synchronisationsartefakte ausgeschlossen werden können. Diese Daten beweisen, dass die DNA in Haloarchaea aktiv zu spezifischen intrazellulären Regionen transportiert wird und legen nahe, dass die Replikation in der Zellteilungsebene erfolgt, wie es in den letzten Jahren für einige bakterielle Arten nachgewiesen wurde.

Die Untersuchungen bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen molekularer Details des archaealen Zellzyklusses.

II. Einleitung:

1. Archaea

Lebende Organismen lassen sich in die drei Domänen, Bacteria, Archaea und Eukarya einteilen (Woese *et al.*, 1990). Die Domäne der Archaea (früher: Archaeobacteria umfasst die drei Reiche der Crenarchaeota, der Euryarchaeota und der Korarchaeota (Abbildung 1). Viele archaeale Arten besiedeln extreme Habitate, an denen andere Organismen nicht lebensfähig sind. Die Amplifikation von 16 S rDNA aus Bodenproben mesophiler Habitate hat jedoch klar gezeigt, dass Archaea auch in nicht extremen Biotopen weit verbreitet sind (DeLong und Pace, 2001; DeLong, 1998). Archaea bilden eine der tiefsten Abzweigungen im Stammbaum der Organismen und besitzen molekulare Eigenschaften von denen bislang angenommen wurde, dass sie einzig den Eukarya vorbehalten wären. Aus diesem Grund können Untersuchungen archaealer Organismen auch zum besseren Verständnis der Biologie eukaryaler Organismen führen.

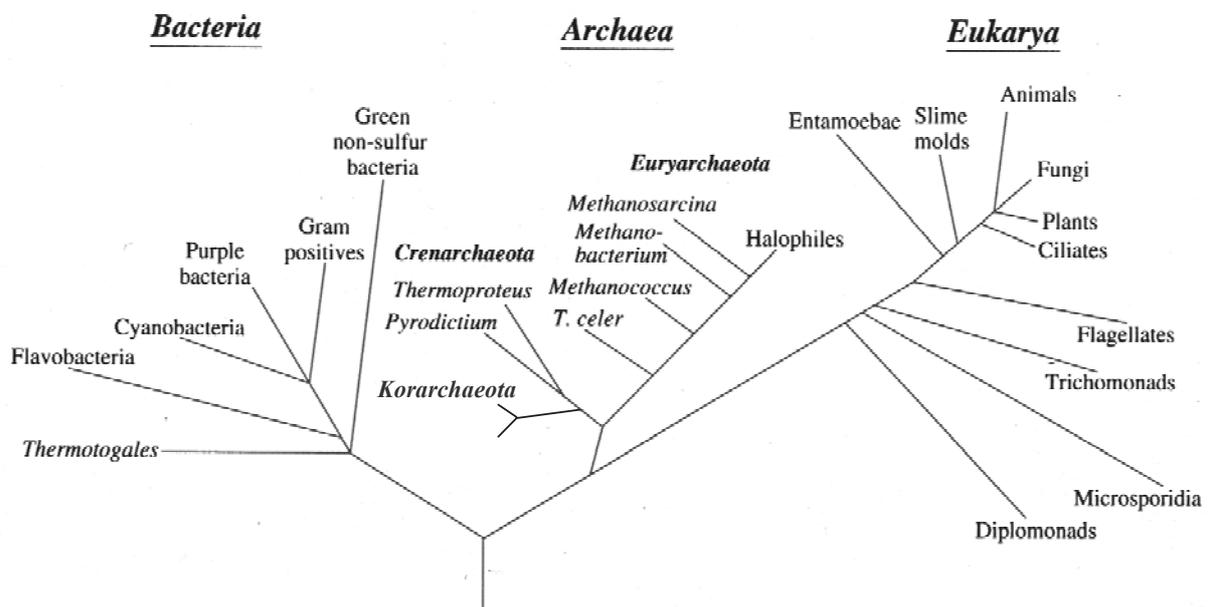


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Organismen

verändert nach Brock *et al.* (1994)

Archaeale Organismen zeichnen sich durch eine faszinierende Mischung aus Eigenschaften der beiden anderen Organismengruppen aus. Vollständige Genomsequenzen wie z.B. die von *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith *et al.*, 1997), *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997), *Pyrococcus horikoshii*

(Kawarabayasi *et al.*, 1998), *Aeropyrum pernix* (Kawarabayasi *et al.*, 1999), *Halobacterium salinarum* (Ng *et al.*, 2000), *Sulfolobus solfataricus* (She *et al.*, 2001) und *Thermoplasma acidophilum* (Ruepp *et al.*, 2000) zeigen, dass archaeale Organismen sowohl Gene mit bakteriellen als auch eukaryalen Homologen besitzen. Obwohl es sich bei Archaea um Prokarya handelt sind insbesondere die Proteine der Informationsverarbeitung, d.h. Replikation, Rekombination, Transkription (Transkriptionsfaktoren, Polymerase) und Translation zu denen der Eukarya homolog (Olsen und Woese, 1997). Im Gegensatz dazu sind die Proteine der zentralen Stoffwechselwege näher mit bakteriellen als mit eukaryalen Proteinen verwandt. Die Archaea haben jedoch auch eigene, nur auf ihre Domäne beschränkte Merkmale, wie z.B. bestimmte rRNA Motive, über Etherbindung verknüpfte Membranlipide, eigene Zellmembrankomponenten, sowie einzelner Gene und Proteine, die an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt sind (Übersichtsartikel von Amend und Shock, 2001; Bell *et al.*, 2001; Roesser und Müller, 2001; Bernander, 2000; Schäfer *et al.*, 1999). Während die Stoffwechselwege und die biochemischen Eigenschaften unterschiedlicher archaealer Arten bereits umfangreich untersucht worden sind, sind die Eigenschaften des archaealen Zellzyklusses nahezu unbekannt. Die sequenzierten archaealen Genome enthalten eine bemerkenswerte Mischung aus Genen mit Ähnlichkeiten zu Zellzyklusgenen aus Eukarya und aus Bacteria. Mit Zellzyklusgenen werden dabei solche Gene bezeichnet, deren Genprodukte an der Replikation der Chromosomen, der Prozessierung des Nukleoids oder der Zellteilung beteiligt sind. Folglich lässt sich die mosaikartige Zusammensetzung auch auf den Zellzyklus von Archaea übertragen, obwohl längst noch nicht alle Zellzyklusgene identifiziert sind (Übersichtsartikel von Bernander, 1998). Trotz der raschen Zunahme an verfügbaren Sequenzinformationen ist bislang nur wenig darüber bekannt, wie der Zellzyklus in archaealen Organismen tatsächlich verläuft.

2. Zellzyklus

In den letzten Jahren hat das Interesse am Zellzyklus der Prokarya stark zugenommen. Es wurde erkannt, dass auch der prokaryale Zellzyklus einer strengen zeitlichen und örtlichen Kontrolle unterliegt. Die Miteinbeziehung zellbiologischer Fragestellungen und Methoden in die Untersuchung von Bakterien wurde vor allem durch drei Modellsysteme vorangetrieben, *Caulobacter crescentus*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* (Übersichtsartikel von Jensen *et al.*, 2002; Donachie, 2001; England und Gober, 2001; Errington, 2001; Harry, 2001; Dewar und Dorazi, 2000; Martin und Brun, 2000). So findet z.B. die Replikation bei *B. subtilis* in der

Mitte der Zellen statt; die neu gebildeten Chromosomen werden zu den Zellpolen transportiert. In den Tochterzellen muss die DNA dann von den Polen wieder in die Zellmitte gebracht werden, um dort repliziert werden zu können. Inzwischen wird sogar der Begriff „Mitoseapparat“ im Zusammenhang mit den Bacteria verwendet (Graumann, 2001; Jensen und Shapiro, 2000; Losick und Shapiro, 1999; Wheeler und Shapiro, 1997) oder wie bei Sawitzke und Augustin (2001) beschrieben ein Apparat, der in der Lage ist, replizierte DNA in einer definierten Richtung zu bewegen (Glaser *et al.*, 1997).

Während das Wissen um die molekularen Ereignisse des Zellzyklusses von Eukarya und Bacteria in den letzten Jahren stetig gewachsen ist, ist über den Zellzyklus archaealer Organismen bislang nur wenig bekannt (Böhlke *et al.*, 2002; Malandrin *et al.*, 1999; Übersichtsartikel von MacNeill, 2001; Bernander, 2000; Bernander, 1998). Allgemein lässt sich der Zellzyklus aller Prokarya und Eukarya in unterschiedliche Phasen einteilen (Tabelle 1), wobei jede einzelne Phase durch einen bestimmten DNA Gehalt gekennzeichnet ist. Die erste Phase (B in Bacteria; G1 in Eukarya) beginnt mit der Entstehung einer neuen Zelle nach der Zellteilung und endet mit der Initiation der Replikation. Während dieser Phase ist der DNA Gehalt in der Zelle minimal und stets konstant. In der nächsten Phase (C in Bacteria; S in Eukarya) steigt der DNA Gehalt kontinuierlich an. In Eukarya folgt die G2 Phase, die Zeit zwischen der DNA-Synthese und der Segregation der Chromosomen, in der die Zelle an Masse zunimmt. In der sich anschließenden Phase (D in Bacteria; M und Zytokinese in Eukarya), findet die Segregation der Chromosomen bzw. die Aufteilung der Zellkerne statt (Mitose und Kernteilung in Eukarya). In dieser Phase ist der DNA Gehalt am höchsten. Obwohl Archaea Prokarya sind, sind sie vermutlich näher mit den Eukarya als mit den Bacteria verwandt. Aus diesem Grund wurde die Zellzyklus Terminologie der Eukarya auch für die Archaea übernommen

Erst seit kurzer Zeit werden Zellzyklusuntersuchungen an archaealen Arten vorgenommen. Eine Methode, um den Zellzyklus zu untersuchen, ist die FACS Analyse („fluorescence activated cell sorter“) von Zellen, deren DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt wurde (Bernander *et al.*, 1998). Bei einigen crenarchaealen Arten konnte gezeigt werden, dass sie in der exponentiellen Phase ein oder zwei Chromosomen und in der stationären Phase zwei Chromosomen enthalten. Der Zellzyklus ist anders aufgeteilt als in Bacteria, bei denen es eine lange G1-Phase gibt und die Zellteilung fast direkt nach Abschluss der Replikation erfolgt. Crenarchaeota dagegen replizieren die Chromosomen kurz nach der Zellteilung und weisen eine ausgeprägte G2-Phase auf, in der sie auch in die stationäre Phase gehen (Hjort und

Bernander, 1999; Poplawski und Bernander, 1997). Bei *M. jannaschii*, der wie *H. salinarum* zu den Euryarchaeota zählt, wurde entdeckt, dass die Zellen in der exponentiellen Phase ca. 6 bis 10 Kopien des Chromosoms enthalten, und dass die Kopienzahl in der stationären Phase auf zwei bis drei sinkt (Malandrin *et al.*, 1999). Momentan ist unklar, ob dies auch für andere Euryarchaeota wie *H. salinarum* gilt, oder ob es z.B. eine Adaptation von *M. jannaschii* an die hohen Wachstumstemperaturen darstellt.

Ereignis	Bacteria	Eukarya
Massenzunahme	B	G₁
DNA-Synthese	C	S
Massenzunahme	—	G₂
Segregation der Chromosomen	D	Mitose
Zellteilung	D	Zytokinese

Tabelle 1: Zellzyklusphasen in Eukarya und Bacteria

3. Synchronisation

Für die Untersuchung Zellzyklus bezogener Prozesse ist eine Synchronisationsprozedur für den zu untersuchenden Organismus von erheblicher Bedeutung. Die dabei entstehende synchrone Kultur ist durch einen hohen Anteil von Zellen charakterisiert, die zur gleichen Zeit die gleiche Zellzyklusphase durchlaufen. Viele Prozeduren für meist eukaryale Organismen wurden beschrieben und einige neuere Übersichtsartikel fassen die Prinzipien und Vorteile zahlreicher Methoden zusammen (Davis *et al.*, 2001; Helmstetter *et al.*, 2001; Doležal *et al.*, 1999; Futcher, 1999; Walker, 1999; O'Connor und Jackmann, 1998). Zwei grundsätzlich voneinander zu unterscheidende Methoden kommen dabei zum Einsatz. Einerseits die Selektionsmethode, die junge Zellen aus einer Kultur mit Zellen unterschiedlichen Alters selektiert und diese dazu nutzt, eine synchrone Kultur zu starten. Andererseits wird die Induktionsmethode verwendet. Die Synchronisation in einer Kultur

wird induziert, indem anfangs der Fortgang des Zellzyklusses verhindert wird bis eine ausreichende Massezunahme stattgefunden hat und die Kultur anschließend wieder in das exponentielle Zellwachstum entlassen wird. Während Induktionsmethoden unter möglichen Artefakten leiden, die aufgrund von unerwünschten Reaktionen auf die eingesetzten Inhibitoren entstehen können haben diese einen enormen Vorteil gegenüber den Selektionsmethoden, da große Zellmengen synchronisiert werden können und sind daher die Methoden der Wahl, wenn Zellbestandteile isoliert werden sollen, z.B. für Northern und Western Blot Analysen.

Um den Fortgang des Zellzyklusses bei der Induktionsmethode zu blockieren werden Substanzen verwendet, die in bestimmten Phasen des Zellzyklus die Zellen spezifisch inhibieren (Abbildung 2). Die zum Einsatz kommenden Substanzen sind dabei entweder synthetisch hergestellte oder natürlich vorkommende Hemmstoffe, wie z.B. Aphidicolin (Übersichtsartikel von Planchais *et al.*, 2000). Ein zur Synchronisation verwendeter Inhibitor sollte verschiedene Ansprüche erfüllen. Die von ihm bewirkte Blockade sollte Zellzyklusphasen spezifisch sein und schnell einsetzen. Um die nachfolgenden Zellzyklusphasen nicht zu beeinträchtigen sollte der Inhibitor in geringen Konzentrationen wirken. Die Blockade sollte reversibel sein und es sollte sichergestellt werden, dass die Blockade nicht mit dem Tod der Zellen einhergeht. Durch die Behandlung sollten keine Auswirkungen auf den Energiemetabolismus und andere zelluläre Prozesse zu verzeichnen sein und der Inhibitor sollte sich nahezu vollständig wieder aus der Kultur entfernen lassen.

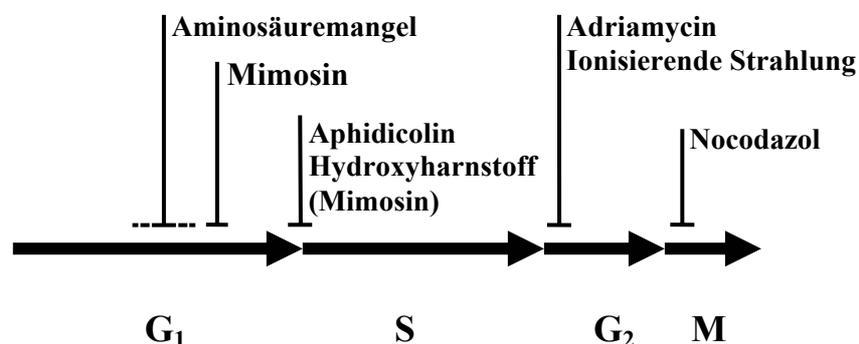


Abbildung 2: Möglichkeiten zur Inhibition des eukaryalen Zellzyklus

Eine Vielzahl von Techniken kann genutzt werden, um Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt des Zellzyklusses zu inhibieren. In der Darstellung ist ein Ausschnitt aus den verfügbaren Methoden gezeigt.

Aphidicolin ist ein vielfach eingesetzter Inhibitor, der aus *Cephalosporium aphidicola* stammt (Bucknall *et al.*, 1973), und spezifisch die eukaryale DNA Polymerasen α und δ inhibiert (Sala *et al.*, 1980). Der Inhibitor ist ebenfalls in *H. salinarum* wirksam und hemmt in dem Archaeon den Thymidineinbau während der Replikation, sowie die Zellteilung, während die Transkription und die Translation nicht beeinflusst werden (Forterre *et al.*, 1984; Schinzel und Burger, 1984).

Die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* werden häufig als Modellorganismen der Eukarya angesehen und synchronisierte Kulturen wurden umfangreich in Zellzyklusstudien eingesetzt (Übersichtsartikel von Futcher, 2000; Futcher, 1999; Walker, 1999). Außerdem wurden viele Zelllinien höherer Eukarya, von Pflanzen bis hin zu Säugerzellen synchronisiert (Übersichtsartikel von Davis *et al.*, 2001; Sharma, 1999; O'Connor und Jackman, 1998).

Innerhalb der Domäne der Bacteria gibt es drei Modellorganismen die vorzugsweise genutzt werden (Übersichtsartikel von Harry, 2001; Helmstetter *et al.*, 2001; D'Ari, 2001). Die Zellteilung von *E. coli* wird schon seit langem untersucht und die Methodik zur Generierung synchronisierter Zellen wurde schon vor einigen Jahrzehnten eingeführt. Der zweite Modellorganismus ist *B. subtilis*, der durch das Auswachsen von Sporen für eine Generationszeit synchronisiert werden kann. Die dritte Art ist *C. crescentus*, die mit jeder Zellteilung zwei unterschiedliche Zellformen ausbildet, d.h. gestielte Zellen die an Oberflächen haften und mit Flagellen versehene Schwärmerzellen. Da die Replikation in Schwärmerzellen von Natur aus unterdrückt ist, kann die Isolierung von Schwärmerzellen als Ausgangsmaterial für synchrone Kulturen genutzt werden. Die Charakterisierung aller drei Spezies hat ergeben, dass die Zellzyklusregulation in Bacteria nicht einheitlich ist. So ist in *C. crescentus* die Chromosomensegregation mit der Zellteilung eng verbunden, während beide Prozesse in *E. coli* und noch einfacher in *B. subtilis* entkoppelt werden können.

Innerhalb der Domäne der Archaea ist bisher nur die Synchronisation einer einzigen Art innerhalb des Reiches der Crenarchaeota beschrieben worden, dem thermoacidophilen *Sulfolobus acidocaldarius* (Hjort und Bernander, 2001; Jansson *et al.*, 2000). Synchronisierte Kulturen können nicht nur zur Untersuchung der zeitlichen Regulation Zellzyklus spezifischer Prozesse, wie z.B. Transkription, Translation oder post-translationaler Modifikation, sondern auch zur Untersuchung dynamischer, intrazellulärer Lokalisation verschiedener zellulärer Komponenten, wie z.B. von Chromosomen oder Proteinen. Kürzlich wurde entdeckt, dass in *B. subtilis* die Replikation an einer bestimmten Stelle in der Zelle stattfindet, dem so

genannten „Replisom“ in der Zellteilungsebene. Die soeben replizierten Replikationsursprünge des Chromosoms werden zügig aktiv in Richtung der Zellpole transportiert (Lemon und Grossman, 1998). Dieser aktive Transport der bakteriellen Nukleotide sind mittlerweile auch in *E. coli* und *C. crescentus* nachgewiesen worden (Übersichtsartikel von Lemon und Grossman, 2001; Margolin, 2000). Die am DNA Transport beteiligte molekulare Maschinerie ist bislang völlig unbekannt. Zunächst wurde angenommen, dass das „Structural Maintenance of Chromosomes“ (SMC) Protein von *B. subtilis* beteiligt sein könnte, jedoch wurde mittlerweile nachgewiesen, dass das SMC Protein für den Transport der Replikationsursprünge des Chromosoms entbehrlich ist. Das SMC Protein wird jedoch für die Segregation der Terminusregion des Chromosoms benötigt (Graumann, 2000; Übersichtsartikel von Graumann, 2001). Obwohl der DNA Transport in Archaea vermutlich ebenfalls einer strikten zeitlichen und örtlichen Regulation unterliegt, gibt es bislang keine Untersuchungen, die den Transport direkt belegen können. Während die Arbeiten an *S. acidocaldarius* der Annahme zumindest nicht widersprechen, scheint dem Euryarchaeon *M. jannaschii* ein exaktes DNA Partitionierungssystem zu fehlen. *M. jannaschii* besitzt während des exponentiellen Wachstums 10 bis 15 Genomäquivalente. Häufig wurden sowohl eine inäquale Zellteilung sowie eine inäquale Verteilung der Nukleotide beobachtet (Malandrin *et al.*, 1999).

4. SMC Proteine

Vor einigen Jahren wurde durch die Komplementation einer Hefemutante ein Gen entdeckt, dessen Produkt für die Verteilung der Chromosomen in der Mitose essentiell ist; es wurde zunächst mit „Stability of Mini Chromosomes“ (SMC) bezeichnet (Strunnikov *et al.*, 1993). In den folgenden Jahren wurde klar, dass es sich bei den SMC Proteinen um eine in Eukarya, Bacteria und Archaea vorkommende Proteinfamilie handelt. Die Familie der nun mit „Structural Maintenance of Chromosomes“ (SMC) bezeichneten Proteine, besteht aus Proteinen mit wichtigen Funktionen in der Erhaltung der Chromosomen, d.h. DNA Kondensation, Zusammenhalt der Schwesterchromatiden, Rekombination, DNA Reparaturmechanismen und genomweiter Genregulation. Die meisten, wenn nicht alle dieser Prozesse sind innerhalb des Zellzyklusses differentiell reguliert. Proteine der SMC Familie haben gemeinsame strukturelle Eigenschaften (Abbildung 3) und sind von den meisten Prokarya bis hin zu den höheren Eukarya konserviert (Übersichtsartikel von Harvey, 2002; Hirano, 2002; Ball und Yokomori, 2001; Cromie *et al.*, 2001; Graumann, 2001; Jones und

Sgouros, 2001; Soppa, 2001; Cobbe und Heck, 2000; Strunnikov und Jessberger, 1999). Alle Proteine der SMC Familie haben eine fünf Domänen Struktur. Sie besitzen globuläre N- und C-terminale Domänen und zwei ausgedehnte α -helikale coiled-coil Regionen. In diesem Bereich kann das typische „4+7“-Muster gefunden werden, d.h. die Aminosäurereste an Position vier und sieben sind hydrophob und ermöglichen auf diese Weise eine Wechselwirkung der Helices. Während in allen bisherigen Modellen die intermolekulare Dimerisierung der coiled-coil Domänen zweier Monomere postuliert wurde, gehen Haering *et al.* (2002) davon aus, dass die coiled-coil Bildung durch intramolekulare Wechselwirkungen zustande kommt. Die Dimerisierung erfolgt dann durch die Bindung zweier Gelenkregionen aneinander. In beiden Modellen werden Dimere gebildet, so dass im Fall von Homodimeren vollkommen symmetrische und im Fall von Heterodimeren teilweise symmetrische Moleküle entstehen. Die N- und C-terminalen Domänen, die ein Walker A Motiv, bzw. ein konserviertes mögliches Walker B Sequenzmotiv enthalten, das DA-Box genannt wird, sind für die ATPase Aktivität des SMC Proteins verantwortlich.

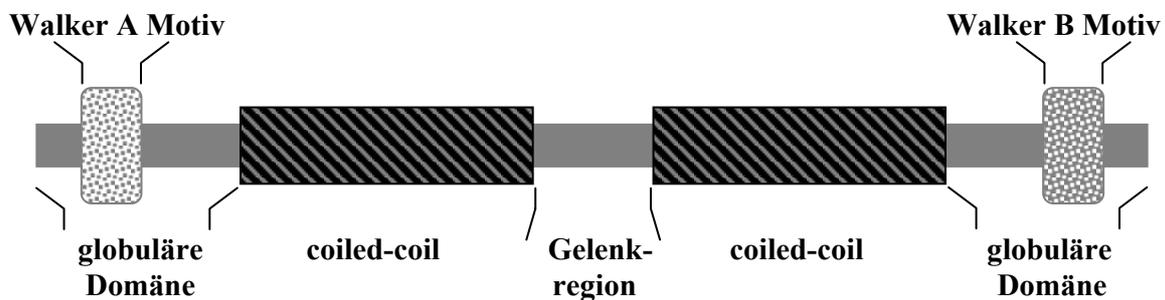


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänen eines SMC Proteins

Die einzelnen Domänen sind durch unterschiedliche Musterungen voneinander abgegrenzt. Die beiden globulären Domänen beinhalten konservierte Sequenzmotive (Walker A und Walker B Motiv).

In Eukarya wurden sechs Klassen von SMC Proteinen identifiziert, die mit SMC1 bis SMC6 bezeichnet werden (Hirano, 1999; Fousteri und Lehmann, 2000). Die eukaryalen SMC Proteine bilden spezifische Kombinationen von Heterodimeren aus: SMC1 mit SMC3, SMC2 mit SMC4 und SMC5 mit SMC6. Diese SMC Heterodimere bilden zusammen mit weiteren nicht-SMC Proteinen hochmolekulare Komplexe, die verschiedene Funktionen haben. Wie an Hefemutanten gezeigt wurde, können die Dimere einander funktionell nicht ersetzen, und Mutationen in einzelnen *smc* Genen sind letal. Die am besten untersuchten SMC haltigen

Komplexe, sind das Kohäsion und das Kondensin, welche SMC1-SMC3 bzw. SMC2-SMC4 Heterodimere enthalten. Kohäsion ist am Zusammenhalt der Schwesterchromatiden sowie an Reparaturmechanismen beteiligt, während Kondensin die Kondensation der DNA in der Mitose vermittelt und an der genomweiten Genregulation beteiligt ist. SMC5 und SMC6 wurden erst kürzlich in *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana* und Säugerzellen identifiziert und charakterisiert (Taylor *et al.*, 2001; Fousteri und Lehmann, 2000; Mengiste *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1995). Untersuchungen an *S. pombe* haben gezeigt, dass das SMC5-SMC6 Heterodimer an der Reparatur von DNA beteiligt ist (Verkade *et al.*, 2001; Verkade *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1995). Sie sind selbst in der Abwesenheit von UV-Schäden essentiell (Fousteri und Lehmann, 2000; Lehmann *et al.*, 1995).

Im Gegensatz zu Eukarya besitzen Prokarya nur ein oder kein *smc* Gen, so dass prokaryale SMC Proteine folglich Homodimere ausbilden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben die symmetrische Struktur der Homodimere mit den langen starren coiled-coils und der flexiblen Gelenkregion gezeigt (Melby *et al.*, 1998). Die Struktur eines Proteins wurde aufgeklärt, welches die terminale Region eines Homodimers nachahmt und aus einer N-terminalen und C-terminalen SMC Domäne besteht, die durch ein artifizielles Linkerpeptid miteinander verknüpft sind (Löwe *et al.*, 2001). Es wurde offensichtlich, dass die beiden Domänen gemeinsam eine Nukleotidbindedomäne bilden. Jedoch gab die Strukturaufklärung keinen Aufschluss darüber, wie SMC an chromosomale DNA bindet.

Am besten untersucht ist das SMC artige Protein von *B. subtilis* (BsSMC) das ebenfalls ein Homodimer bildet und in Abwesenheit anderer Proteine an DNA binden kann, wobei einzelsträngige DNA bevorzugt wird. Das BsSMC aggregiert an diskreten Stellen in der Nähe der beiden Zellpole. In Zellen, die kurz vor der Einschnürung stehen, kommt es auch in der Mitte der Zellen vor (Graumann *et al.*, 1998). Die Zahl und die Position der Aggregate ändern sich im Verlauf des Zellzyklusses. Einige, jedoch nicht alle dieser Stellen korrelieren mit der Position des bakteriellen Chromosoms innerhalb der Zelle. Mit Deletionsmutanten wurde bestätigt, dass BsSMC für die Chromosomenverteilung wichtig ist (Britton *et al.*, 1998; Moriya *et al.*, 1998).

Neben den „echten“ SMC Proteinen sind weitere Gruppen von Proteinen der SMC Familie in Prokarya und Eukarya weit verbreitet. Eine Gruppierung prokaryalen SMC Proteine ist im „Cluster of Orthologous Group of proteins“ (COG) 0419 (Tatusov *et al.*, 2001) zusammengefasst und bildet ein archaeales und ein bakterielles Subcluster (Soppa, 2001). Die eukaryalen Proteine, Rad50 genannt, bilden eine weitere Untergruppierung die phylogenetisch

mit den Proteinen der COG 0419 Gruppe verwandt sind. Obwohl bislang nur wenige Proteine dieser Gruppe untersucht worden sind, ist ihre konservierte Funktion vermutlich die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch Rekombination von DNA Enden (Cromie *et al.*, 2001). Das einzige bislang charakterisierte bakterielle Protein dieser Gruppe ist SbcC aus *E. coli*. SbcC ist ein Dimer und weist die typische fünf Domänenstruktur auf, bildet einen Komplex mit SbcD und ist eine Nuklease mit zwei nukleolytischen Zentren (Connelly *et al.*, 1999; Connelly *et al.*, 1998). Das Rad50 Protein aus *Schizosaccharomyces pombe* ist das am besten untersuchte eukaryale Protein. Es dimerisiert und bildet mit den beiden Proteinen Mre11 und Xrs2 einen Komplex. Dieser Komplex ist wichtig für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, Erhaltung der Telomere, die Signalisierung von Zellzyklus Kontrollpunkten und Rekombinationsereignissen in der Meiose (Chen *et al.*, 2001; Hartsuiker *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2001).

Die Rad18 Homologe, die ausschließlich in Eukarya vertreten sind, bilden eine weitere Gruppierung in der Familie der SMC Proteine (Lehmann *et al.*, 1995). Rad18 ist nachweislich an der Reparatur von DNA nach UV-Schädigung beteiligt. Da Rad18 jedoch auch in unbehandelten Zellen essentiell ist, wird heutzutage angenommen, dass es ebenso eine wichtige Rolle in der Replikation einnimmt. Kürzlich wurde festgestellt, dass das Rad18 Protein aus *S. pombe* mit einem weiteren Mitglied der Rad18 Gruppierung, Spr18, ein Dimer bildet. Das Dimer bildet zusammen mit drei weiteren Proteinen einen Komplex (Fousteri und Lehmann, 2000).

Viele γ -Proteobakterien beinhalten im Gegensatz zu einem echten SMC Protein ein Mitglied einer anderen Gruppe der SMC Familie, das sog. MukB (Soppa, 2001). MukB ist vermutlich in der Lage, SMC funktionell zu ersetzen, da es ebenfalls essentiell für die Chromosomensegregation ist und eine *mukB* Mutante von *E. coli* einen Phänotyp zeigt, der vergleichbar ist mit dem einer *smc* Mutante von *B. subtilis* (Niki *et al.*, 1991). MukB bildet ebenfalls Homodimere (Melby *et al.*, 1998), und es wurden Wechselwirkungen von MukB mit den beiden Proteinen MukE und MukF gezeigt (Yamazoe *et al.*, 1999).

Die bisher sequenzierten archaealen Genome kodieren für jeweils ein oder im Fall von *M. jannaschii* für zwei Proteine der SMC Familie. Zusätzlich wurden bei *S. acidocaldarius* (Elie *et al.*, 1997) und *H. salinarum* (Ruepp *et al.*, 1998) zufällig Gene für Proteine der SMC Familie entdeckt. Das SMC Homolog aus *H. salinarum* wurde Sph1 (früher: Hp71) genannt und besitzt die typische fünf Domänenstruktur der Proteine der SMC Familie. Um sicherzustellen, dass Sph1 in *H. salinarum* tatsächlich gebildet wird, wurde das Protein mit

immunologischen Methoden nachgewiesen. Die homologe und heterologe Überproduktion von Sph1 resultierte in der Zunahme der mittleren Zelllänge, so dass Sph1 möglicherweise am Fortgang des Zellzyklusses beteiligt ist (Ruepp *et al.*, 1998).

5. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Zellzyklus von *H. salinarum* untersucht werden. Zentraler Punkt sollte die Untersuchung des Sph1 Proteins sein, um die mögliche Beteiligung von Sph1 am Zellzyklus von *H. salinarum* zu untersuchen. Dabei sollte die physiologische Rolle von Sph1 durch Kombination von molekulargenetischen, biochemischen, immunologischen und elektronenmikroskopischen Methoden eingegrenzt werden.

Da der Zellzyklus archaealer Organismen bislang nur unzureichend untersucht worden war, sollte eine Reihe Methoden zur Analyse Zellzyklus spezifischer Prozesse in *H. salinarum* etabliert werden. Ausgangspunkt hierfür war die Etablierung eines Synchronisationsprotokolls, das es ermöglichen sollte, die Expression des *sph1* Gens und weiterer für den Zellzyklus relevanter Gene zu untersuchen. Immunologische Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, wann und in welchem Umfang das Genprodukt von *sph1* in der Zelle vorhanden ist. Neben der Zellzyklus abhängigen Expression sollten auch die Auswirkungen auf die Überproduktion und die Depletion von Sph1 in *H. salinarum* ermittelt werden. Dazu sollte der in einem haloarchaealen Expressionsvektor vorliegende, konstitutive Promotor durch einen für Haloarchaea bislang nicht verfügbaren, induzierbaren starken Promotor ersetzt werden. Dieses Konstrukt sollte außerdem, im weiteren Verlauf der Arbeit, als Grundlage für das Erstellen des ersten archaealen antisense System genutzt werden.

Das Etablieren eines Protokolls zur Fixierung von *H. salinarum*-Zellen und eines Protokolls zur Fluoreszenzfärbung von DNA in fixierten *H. salinarum*-Zellen sollte weitere Einblicke in die dynamische Lokalisation der DNA während des Zellzyklus geben. Elektronenmikroskopische Untersuchungen sollten letztendlich die Lokalisation von Sph1 klären und Aussagen über dessen Positionierung im Vergleich zur DNA erlauben.

III. Ergebnisse:

1. Proteine der SMC Familie und weitere Zellzyklusproteine aus *H. salinarum*

1.1 SMC Proteine in *H. salinarum*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stand die Genomsequenz von *H. salinarum* noch nicht zur Verfügung. Es war jedoch das *sph1* Gen aus *H. salinarum* bekannt, das für ein Protein der SMC Protein Familie kodiert (Ruepp *et al.*, 1998). Eine Sekundärstrukturvorhersage des abgeleiteten Proteins weist die typische fünf Domänenstruktur der SMC Proteine auf. Die Wahrscheinlichkeit eine coiled-coil Struktur auszubilden ist sogar bedeutend höher als die von echten SMC Proteinen. Da in den bisher sequenzierten archaealen Genomen ein oder zwei (*M. jannaschii*) SMC Proteine kodiert werden, wurde zunächst mittels Southern Blot Analyse die Anzahl der Genkopien von *sph1* im Genom von *H. salinarum* bestimmt. Dazu wurden Spaltungen chromosomaler DNA mit einer *sph1*-spezifischen dsDNA-Sonde hybridisiert. Die erwartungsgemäß nachzuweisenden *sph1*-enthaltenden Spaltungsprodukte, sind in (Abbildung 4A) dargestellt. Die Stringenz des Hybridisierungspuffers in der Southern Blot Analyse wurde über einen weiten Bereich (10 % bis 50 % (v/v)) variiert. Im Bereich von 20% bis 50% Formamid im Hybridisierungspuffer hybridisierte jeweils nur eine Bande (Abbildung 4B). Bei sehr niedriger Stringenz (10 % Formamid (v/v)) hybridisierte eine Vielzahl von Banden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigen, dass in *H. salinarum* nur ein Sph1-Protein kodiert wird.

Vor dem *sph1* Gen liegt im Abstand von 114 bp ein weiteres Gen, das aufgrund des Molekulargewichtes des abgeleiteten, kleinen löslichen Proteins, mit *hp24* bezeichnet wurde. Beide offenen Leserahmen sind in die gleiche Richtung orientiert. Etwa 600 bp stromaufwärts von *hp24* und ca. 500 bp stromabwärts von *sph1* konnten keine weiteren offenen Leserahmen gefunden werden, so dass *sph1* und *hp24* einen Gencluster bilden. Für dieses flankierende Gen wurde ebenfalls die Anzahl der Genkopien im Genom von *H. salinarum* mit Hilfe einer *hp24*-spezifischen Sonde bestimmt. Die Lokalisation des zur Sonde komplementären Bereiches des *hp24* Gens, sowie die erwartungsgemäß nachzuweisenden *hp24*-enthaltenden Spaltungsprodukte, sind in Abbildung 4A dargestellt. In Abbildung 4C ist ein Southern Blot nach Hybridisierung in Hybridisierungspuffer mit 50 % Formamidanteil (v/v) dargestellt. Es ist jeweils nur eine spezifische Bande nachweisbar. Durch Herabsetzung der Stringenz durch die Herabsetzung der Formamidkonzentration auf 10 % (v/v) konnte ebenfalls nur eine Genkopie nachgewiesen werden.

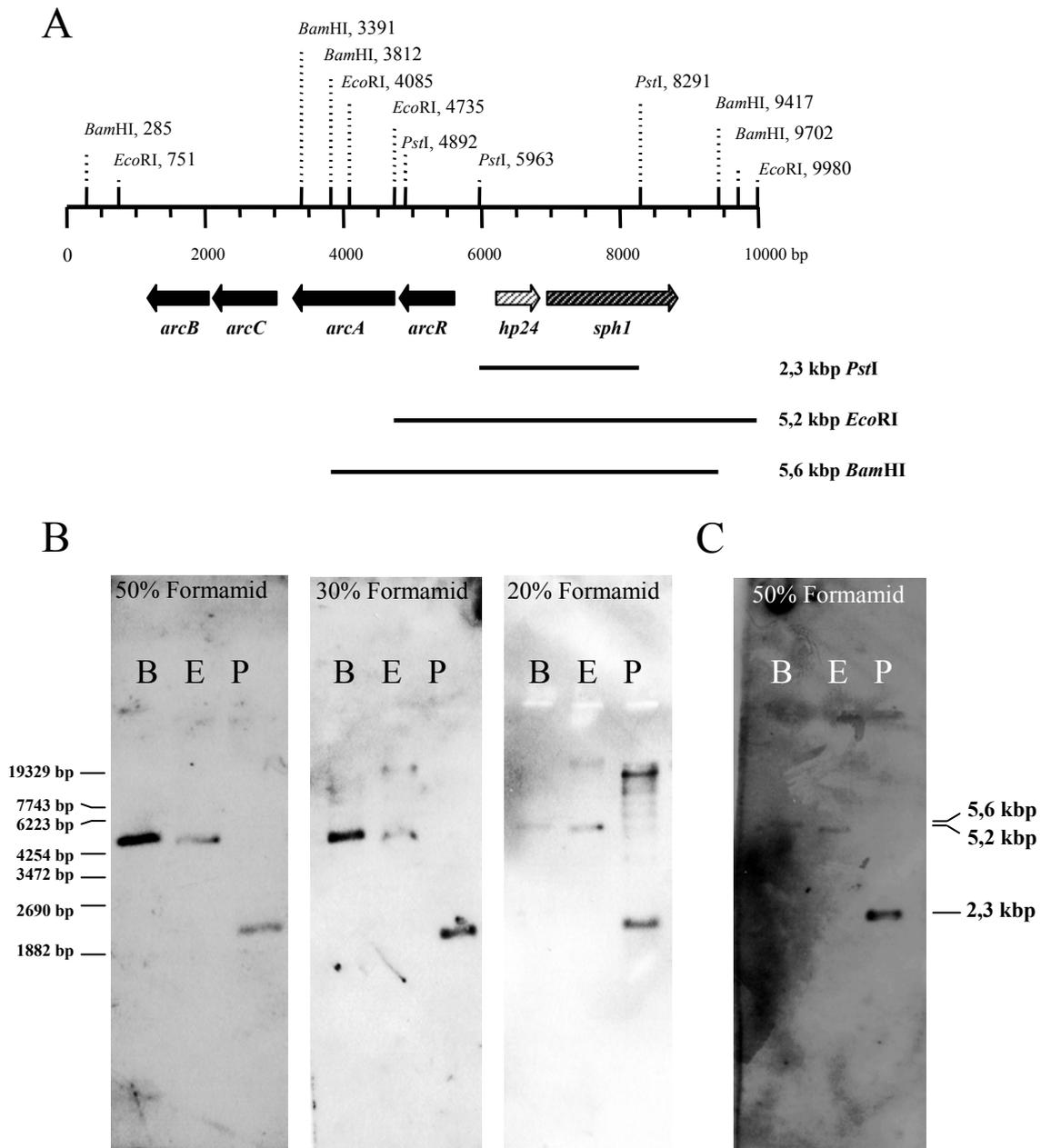


Abbildung 4: Southern Blot Analyse mit einer *sph1*- bzw. *hp24*-spezifischen Sonde
 (A) Schematische Darstellung des *sph1* und *hp24* beinhaltenden Genombereichs. Die nach der Spaltung mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen zu erwartenden *sph1* und *hp24* enthaltenden Spaltungsprodukte sind abgebildet und die Größe der entsprechenden Fragmente ist angegeben. (B) Southern Analyse mit einer *sph1*-spezifischen Sonde. (C) Southern Blot Analyse mit einer *hp24*-spezifischen Sonde. Es wurden die jeweils angegebenen Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer verwendet. Die Hybridisierung erfolgte in allen vier Fällen für 18 h bei 45 °C. Die Spaltung der genomischen DNA von *H. salinarum* erfolgte mit den jeweils durch Abkürzungen angegebenen Restriktionsendonukleasen: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; P, *Pst*I.

Trotzdem beinhaltet die erst zu einem späteren Zeitpunkt verfügbare Genomsequenz ein weiteres Gencluster. Dieser enthält zwei offene Leserahmen mit Ähnlichkeiten zum *hp24* bzw. zum *sph1*-Gen. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen beider Sph-Proteine zeigt,

dass die Ähnlichkeit nur gering ist (Abbildung 5). Im gesamten Bereich des Proteinalignments sind 17 % der Aminosäurereste von Sph1 mit denen von Sph2 identisch. Im C-terminalen Bereich ist an 30 % der Positionen die Aminosäuresequenz beider Proteine gleich. Diese Ähnlichkeit reichte nicht aus, das *sph2* Gen mittels der *sph1*-spezifischer Sonde in der Southern Blot Analyse nachzuweisen.

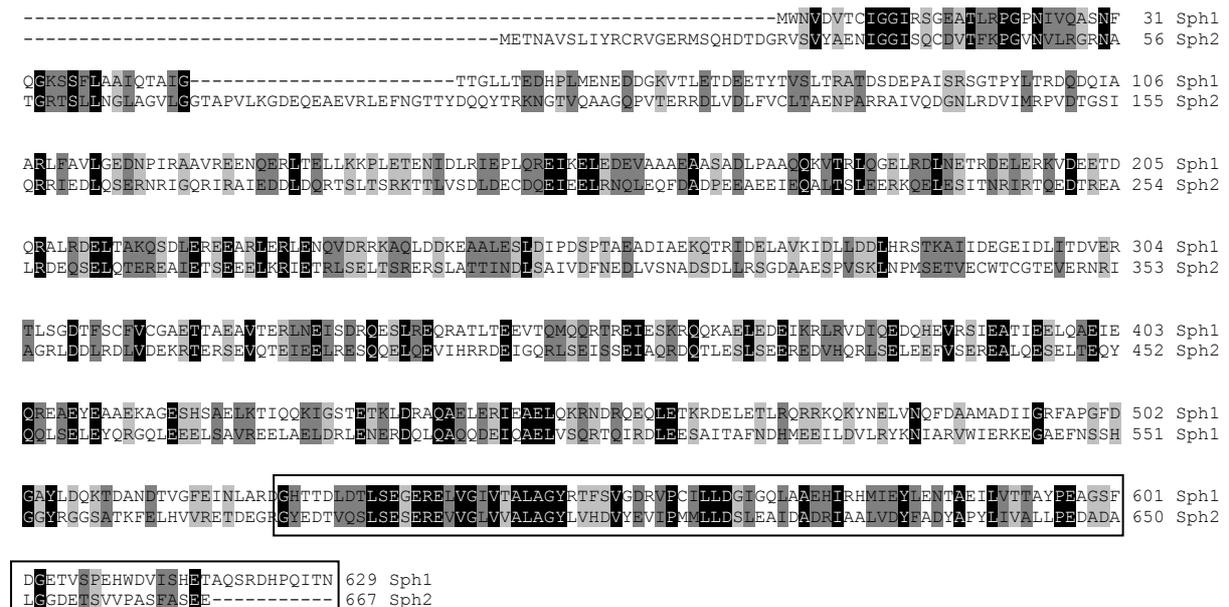


Abbildung 5: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Sph1 und Sph2

Alignment der beiden Proteine der Sph-Gruppe. Identische Aminosäurereste wurden schwarz unterlegt, Aminosäurereste mit stark konservierten Funktionen wurden dunkelgrau unterlegt, Aminosäurereste mit gering konservierten Funktionen wurden hellgrau unterlegt. Im gesamten analysierten Bereich sind die beiden Sequenzen zu 17 % identisch, im hervorgehobenen Bereich des C-Terminus beträgt die Identität 30 %.

Mit der Verfügbarkeit des halobakteriellen Genoms (Ng *et al.*, 2000) konnten drei weitere offene Leserahmen entdeckt werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz in Sekundärstrukturvorhersagen eine Zugehörigkeit zur SMC Protein Superfamilie nahe legen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller vier Gene wurden mit einem speziell für die Analyse von „coiled-coil“-Strukturen entwickelten Programm untersucht (Lupas, 1997; Lupas 1996a; Lupas 1996b). In Abbildung 6 sind diese vier Proteine mit den entsprechenden coiled-coil Domänen schematisch dargestellt: 1) Ein „echtes“ SMC Protein, das 1190 Aminosäuren umfasst, 2) ein Mitglied der archaealen SMC Untergruppierung COG 0419 (Tatusov *et al.*, 2001), welches 883 Aminosäuren umfasst, 3) das 629 Aminosäuren lange Hp71 und 4) ein 667 Aminosäuren langes Protein mit Ähnlichkeit zu Hp71. Da die beiden letzt genannten eine

neue Gruppe innerhalb der SMC Proteine bilden, der bislang keine weiteren Mitglieder angehören, werden diese zur Gruppe der „SMC-ähnlichen Proteine aus *H. salinarum*“ (Sph) zusammengefasst und aufgrund dessen im Folgenden Sph1 bzw. Sph2 genannt. SMC und COG 0419 gehören unterschiedlichen Unterfamilien der SMC Protein Superfamilie an, die in Archaea und Bacteria weit verbreitet sind (Soppa, 2001). Proteine aller drei Unterfamilie können anhand der Primärstruktur, der Länge ihrer coiled-coil Domänen und ihrer Gelenkregionen unterschieden werden.

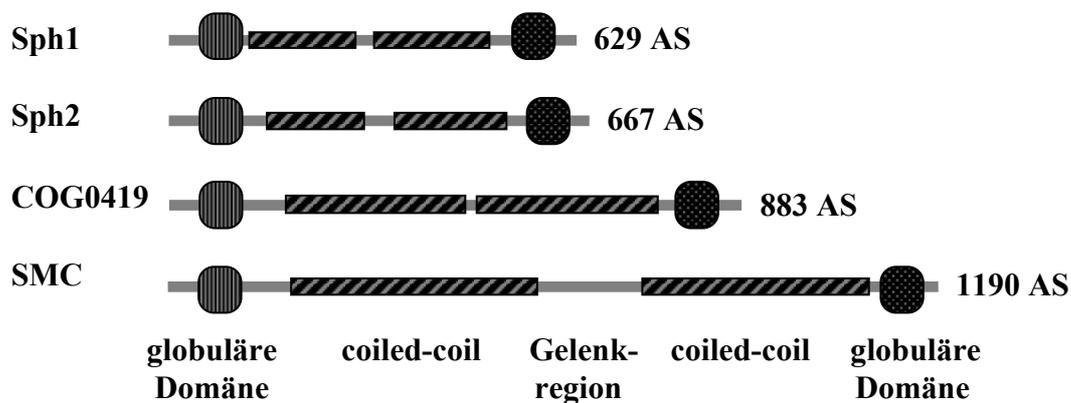


Abbildung 6: Überblick über die Domänenstruktur von vier Proteinen der SMC Familie aus *H. salinarum*

Konservierte Bereiche sind durch die gleichartige Musterung hervorgehoben. Die Lage der coiled-coil Domänen wurde mit dem Programm COILS (Lupas, 1996) bestimmt.

Da alle charakterisierten eukaryalen und prokaryalen SMC-Proteine, sowie SMC-ähnlichen Proteine, an Prozessen innerhalb des Zellzyklusses, wie z.B. der Chromosomensegregation, Chromosomenkondensation, DNA Reparaturmechanismen, genomweiter Genregulation, sowie Rekombination beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dies auch für Sph1, ein neues Mitglied der SMC Protein Superfamilie, seine Gültigkeit hat.

1.2 Transkription von *sph1* und weiterer Zellzyklusgene

Die Genomsequenz ergab, dass das *sph2* Gen von einem Gen flankiert wird, dass für ein Ortholog von Hp24 kodiert (Abbildung 7). Dieses konnte, wie schon *sph2*, aufgrund der geringen Sequenzübereinstimmung, in der Southern Blot Analyse nicht nachgewiesen werden. Die konservierte Anordnung könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass eine gemeinsame Transkription bzw. Translation den nötigen Selektionsdruck bewirkt hat, der

dazu führte, dass die Genanordnung beibehalten wurde. Daher wurde untersucht, ob *sph1* und *hp24* möglicherweise gemeinsam transkribiert werden, obwohl die intergene Region von 114 bp ausreichend Platz für Terminations- und Initiationssequenzen bieten würde.

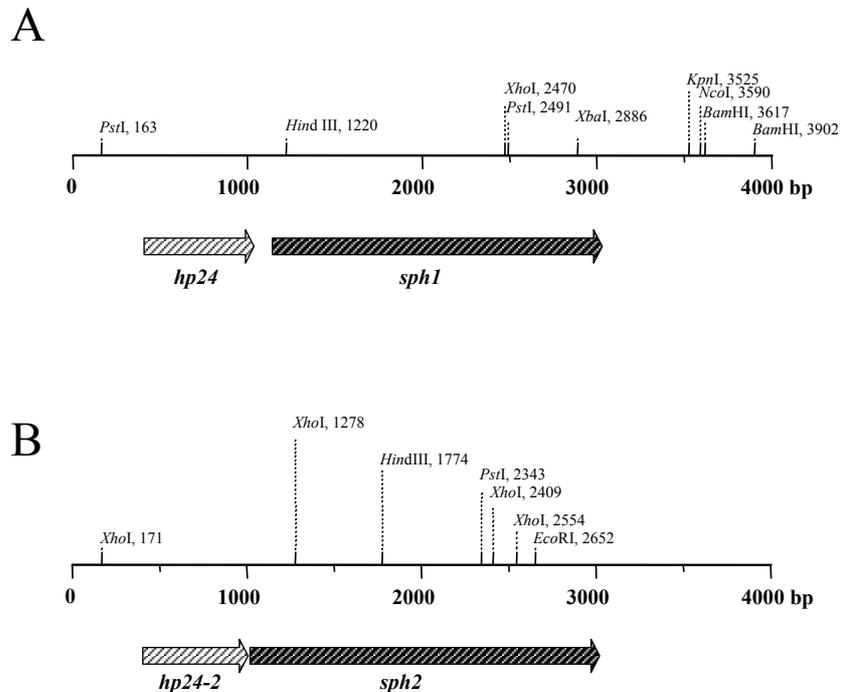


Abbildung 7: Konservierte Anordnung der Gencluster *sph1/hp24* bzw. *sph2/hp24-2*
Schematische Darstellung zweier genomischer Bereiche aus *H. salinarum*, die jeweils 4000 bp umfassen und (A) für die Gene *sph1* und *hp24* bzw. (B) die Gene *sph2* und *hp24-2* kodieren. Die Transkriptionsrichtung ist durch die Pfeilspitzen dargestellt.

Northern Blot Analysen mit *hp24*- und *sph1*-spezifischen Sonden führten zum Nachweis monocistronischer Transkripte (Daten nicht gezeigt). Da kein gemeinsames Transkript vorhanden ist, gibt es keinen Hinweis auf eine mögliche Interaktion der beiden Genprodukte. Dennoch wurde *hp24* in die sich anschließenden Untersuchungen einbezogen. Neben den Transkripten von *sph1* und *hp24* wurden weitere Gene untersucht, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zu bekannten Zellzyklusproteinen aus Bacteria und Eukarya aufweisen. Es sind dies ein *ftsZ* Allel (Margolin *et al.*, 1996), das *cdcH* Gen (Bibikov und Oesterhelt, unveröffentlicht; Datenbankeintrag Nr. X79560), sowie das *smc* und das *smc-IP* Gen (Soppa, 2002). FtsZ ist ein Tubulin Homolog, dass in den meisten Bacteria vorhanden ist und wesentlich an der Septumbildung im Verlauf der Zellteilung beteiligt ist (Harry, 2001).

Es ordnet sich früh in der Zellteilungsebene an und bildet dort den so genannten Z-Ring aus, welcher der Reihe nach weitere essentielle Proteine rekrutiert, bevor er sich zusammenzieht, um das Septum auszubilden (Rothfield *et al.*, 1999; Margolin, 2000). In vegetativ wachsenden *B. subtilis* Kulturen, die sich durch binäre Einschnürung teilen, wird der Z-Ring in der Zellmitte ausgebildet. Diese mediale Position wird durch die Proteine der Min Familie und den Zustand des Chromosoms negativ reguliert (Harry, 2001). FtsZ bindet und hydrolysiert GTP, polymerisiert in GTP abhängiger Weise und ist möglicherweise am Aufbau eines bakteriellen Zytoskelettes beteiligt (Scheffers und Driessen, 2001; Gilson und Beech, 2001; Erickson, 2001). FtsZ Homologe sind in allen untersuchten euryarchaealen Arten vorhanden (Baumann und Jackson, 1996; Bult *et al.*, 1996; Margolin *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997; Wang und Lutkenhaus, 1996). Vor einigen Jahren wurde ein *ftsZ* Gen auch in *H. salinarum* nachgewiesen (Margolin *et al.*, 1996), und mit einem anti-FtsZ Antikörper konnten Ringstrukturen in der Zellteilungsebene von *Haloferax volcanii* (Poplawski *et al.*, 2000) nachgewiesen werden.

CdcH ist das haloarchaeale Homolog der CdcH/VCP Unterfamilie der AAA Proteine. AAA Proteine (ATPase assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten, Kunau *et al.*, 1993) kommen in allen drei Organismengruppen vor. Sie sind an Funktionen des 26S Proteasoms, der Biogenese von Peroxisomen, der Assemblierung von Proteinen in die Membran, Vesikel vermittelten Transport, Genregulation und Zellzyklusregulation beteiligt (Ogura und Wilkinson, 2001). Die Mitglieder der Cdc48/VCP Unterfamilie sind möglicherweise an der Kontrolle der Zellteilung beteiligt (Shi *et al.*, 1995; Feiler *et al.*, 1995, Fröhlich *et al.*, 1991) und werden in sich teilenden Zellen stark exprimiert.

Neben Sph1 und Sph2, sowie einem Vertreter der COG 0419 Gruppe, liegt in *H. salinarum*, wie bereits erwähnt, auch ein offener Leserahmen vor, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz große Ähnlichkeit zu den „echten“ SMC Proteinen aufweist. In fünf archaealen Arten vier verschiedener Gattungen ist das *smc* Gen von einem offenen Leserahmen eines hypothetischen Proteins flankiert, dass der Gruppe der „SMC interagierenden Proteine“ (SMC-IP) zugeordnet wird (Soppa, 2001). Der Abstand zwischen den beiden offenen Leserahmen ist gering; in einigen Fällen überschneiden sich die beiden Gene sogar. Da das SMC Protein aller Wahrscheinlichkeit nach nicht alleine agiert, sondern mit anderen Proteinen einen Komplex bildet, sollte durch die Transkriptanalyse gleichzeitig nachgewiesen werden, ob *smc* und *smc-IP* möglicherweise gemeinsam transkribiert werden. Es wurden jedoch nur zwei monocistronische Transkripte nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), so dass diese Annahme nicht bestätigt werden konnte.

Anhand der spezifischen Signale auf den Röntgenfilmen konnten die Transkriptgrößen der einzelnen Gene ermittelt werden. Dazu wurden die Laufstrecken der Banden des Größenstandards ausgemessen und gegen ihre logarithmierten Größen in einer Graphik aufgetragen. Die Transkriptgrößen aller untersuchten Gene wurden mit den Größen der entsprechenden offenen Leserahmen verglichen (Tabelle 2). Alle Transkripte, mit Ausnahme des *smc* Transkripts, sind länger als die entsprechenden offenen Leserahmen. Dies ist untypisch für haloarchaeale Transkripte, die meist keinen 5'-untranslatierten Bereich aufweisen und am oder nur wenige Nukleotide vor dem offenen Leserahmen beginnen. Es könnte daher sein, dass in diesen zusätzlich transkribierten Bereichen nicht kodierende Sequenzen enthalten sind, die für die Regulation der Transkriptstabilität bzw. der Translationseffizienz entscheidend sind. Für Proteine, die am Zellzyklus beteiligt sind, ist es wichtig, dass sie ausschließlich zu dem Zeitpunkt in der Zelle verfügbar sind, zu dem ihre Funktion benötigt wird. Dies wird in vielen Fällen nicht nur durch einen gezielten Abbau der mRNA bewirkt, sondern darüber hinaus durch eine Inhibition der weiteren Proteinsynthese und den Abbau des entsprechenden Proteins erreicht.

Gen	Transkriptgröße	Größe des offenen Leserahmens
<i>sph1</i>	2350 nt	1887 bp
<i>hp24</i>	850 nt	627 bp
<i>cdcH</i>	2600 nt	2286 bp
<i>ftsZ</i>	1950 nt	1125 bp
<i>smc</i>	3600 nt	3573 bp
<i>smc-IP</i>	950 nt	840 bp

Tabelle 2: Transkriptgrößen ausgewählter Zellzyklusgene

Mit Hilfe des verwendeten Molekulargewichtsmarkers wurden die Größen der in der Northern Blot Analyse nachgewiesenen Transkripte bestimmt.

2. Wachstumsphasen-abhängige Expression von *sph1* und weiteren Zellzyklusgenen in *H. salinarum*

2.1 Transkriptanalyse

Um zu untersuchen, ob Sph1 während des Wachstums von *H. salinarum* benötigt wird, wurde eine Flüssigkultur von *H. salinarum* von der frühen exponentiellen bis in die späte stationäre Phase kultiviert (Abbildung 8A) und in regelmäßigen Abständen Aliquots entnommen. Im Anschluss daran wurde aus den Proben die RNA isoliert und mit einer *sph1* spezifischen Sonde eine Northern Blot Analyse durchgeführt (Abbildung 8B). Es ist deutlich zu erkennen, dass die *sph1* Transkriptmenge im Verlauf der frühen und mittleren exponentiellen Phase zunimmt und dann, während der Transitionsphase, in geringem Umfang absinkt; zu Beginn der stationären Phase fällt sie drastisch ab. In RNA Isolaten aus *H. salinarum* Kulturen die 40 Stunden und älter sind, konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Mit einer *hp24*-spezifischen Sonde wurde ein vergleichbares Expressionsmuster nachgewiesen (Abbildung 8B), so dass beide Proteine in sich teilenden und nicht in ruhenden Zellen benötigt werden.

Um das Wachstumsphasen-abhängige Expressionsmuster von *hp24* und *sph1* besser einordnen zu können, wurden auch die Wachstumsphasen-abhängige Transkriptakkumulation der drei möglichen haloarchaealen Zellzyklusgene *ftsZ*, *cdcH*, sowie des *smc-IP* Gens bestimmt (Abbildung 8B). Das Expressionsprofil des haloarchaealen *ftsZ* Gens unterscheidet sich deutlich von denen für *sph1* und *hp24* nachgewiesenen Expressionsprofilen. Ein hohes Transkriptlevel wurde während der gesamten exponentiellen Phase beobachtet. Dieses nimmt zu Beginn der stationären Phase geringfügig ab, allerdings um nicht mehr als den Faktor zwei. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Nachweis von FtsZ in Zellen der stationären Phase in *Haloferax volcanii* (Poplawski *et al.*, 2000).

Für das Gen des haloarchaealen Cdc48/VCP Homologs wurde angenommen, dass es, wie die bereits charakterisierten Mitglieder dieser Familie, in sich teilenden Zellen stark exprimiert wird. Entgegen der Annahme zeigte sich, dass die *cdcH* Transkriptmenge in Zellen der frühen exponentiellen Phase gering ist, mit dem Altern der Kultur zunimmt und in Zellen der stationären Wachstumsphase am höchsten ist (Abbildung 8B). Folglich ist die Konzentration des *cdcH* Transkripts umgekehrt zur Wachstumsrate korreliert, und die Funktion des Genproduktes scheint vor allem in ruhenden Zellen notwendig zu sein. Das Transkriptionsmuster von *smc-IP*, des Genes, das den Offenen Leserahmen des „echten“ *smc* Genes flankiert, entsprach denen von *sph1* und *hp24*. Jedoch liegt die Transkriptmenge des *smc-IP* Gens zu Beginn der exponentiellen Phase unterhalb der Nachweisgrenze, nimmt dann

im Laufe der mittleren exponentiellen Wachstumsphase deutlich zu und sinkt mit Beginn der Transitionsphase wieder stark ab.

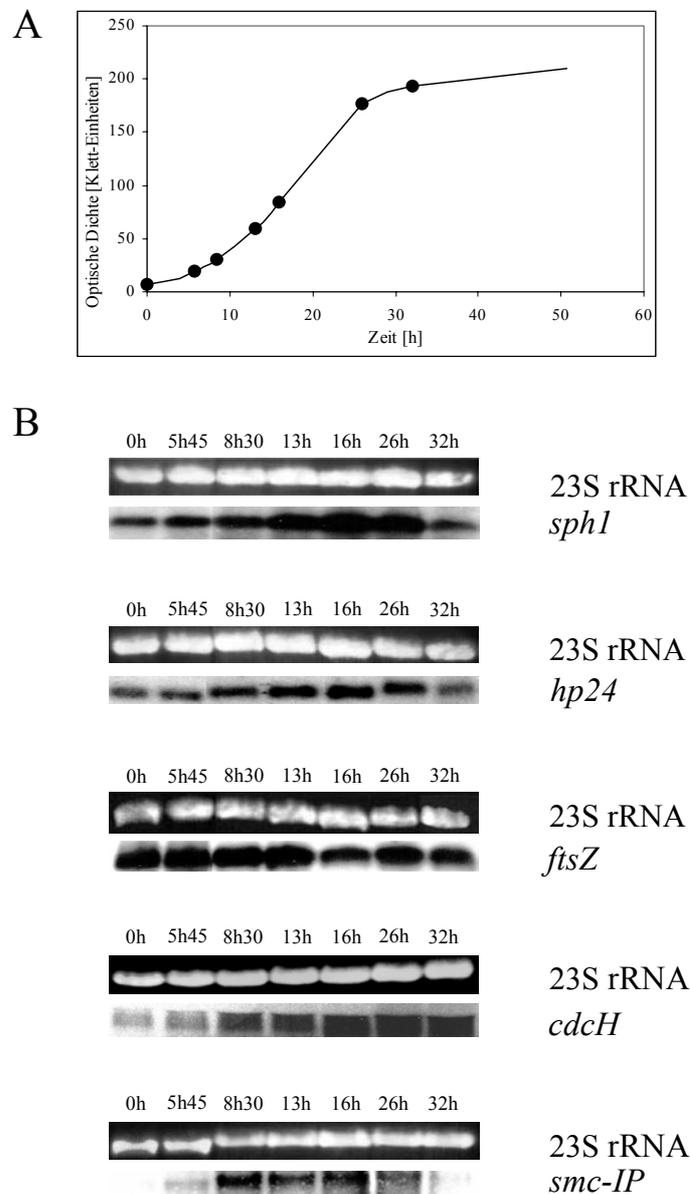


Abbildung 8: Wachstumsphasen abhängig Expression ausgewählter Zellzyklusgene

(A) Aerobes Wachstum einer *H. salinarum* Kultur in Support-Medium. Die Zunahme der Zelldichte wurde mit einem Klett-Photometer bestimmt.

(B) Northern Blot Analysen ausgewählter Zellzyklusgene. Die Proben wurden zu den in der Graphik markierten Zeiten entnommen, Gesamt-RNA isoliert, jeweils 3 µg Gesamt-RNA auf jede Spur aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Um die gleichmäßige Beladung der Spuren wiederzugeben ist über jedem Northern Blot die Ethidiumbromid gefärbte 23S rRNA gezeigt. Nach Northern Transfer wurden die Membranen mit den in der Abbildung angegebenen spezifischen Sonden hybridisiert (von oben nach unten: *sph1*, *hp24*, *ftsZ*, *cdcH*, *smc-IP*).

Der Nachweis von drei unterschiedlichen Wachstumsphasen-abhängigen Expressionsmustern zeigt, dass es sich in allen untersuchten Fällen um spezifische Muster handelt und unterstreicht, dass *sph1* in ruhenden Zellen nicht exprimiert wird.

2.2 Proteinakkumulation

Um zu untersuchen, ob die in der Zelle vorhandenen Sph1 Proteinmengen mit den gemessenen Transkriptmengen korrelieren oder ob Sph1 eine lange Halbwertszeit besitzt, in der Zelle bestehen bleibt und daher möglicherweise auch noch in älteren Zellen eine Funktion hat, wurde die in der Kultur akkumulierte Sph1 Menge mit Hilfe einer Western Blot Analyse bestimmt. Dazu wurden aus derselben Kultur, aus der auch die Proben für die RNA-Isolate stammten, Aliquots entnommen, und gleiche Mengen der löslichen Proteinfractionen jeder Probe elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 9A). Mit einem anti-Sph1 Antikörper (Ruepp *et al.*, 1998) wurde anschließend das Sph1 Protein spezifisch nachgewiesen (Abbildung 9B). Dabei konnte festgestellt werden, dass in der frühen und mittleren exponentiellen Phase die Sph1 Menge zunächst zunimmt, sich im weiteren Verlauf der mittleren bis späten exponentiellen Phase nur geringfügig ändert und dann mit dem Beginn der Transitionsphase deutlich abfällt. In der stationären Phase ist nur noch ein sehr schwaches Signal zu detektieren. Somit ist der spezifische Sph1 Proteingehalt zumindest qualitativ entsprechend der Transkriptmenge in den Zellen vorhanden. Sieht man sich allerdings die Mengen bei 8,5 Stunden und 16 Stunden an, so scheint es, dass sich der Sph1 Proteingehalt konstant bleibt, während sich das *sph1* Transkriptlevel um mindestens den Faktor zwei ändert. Möglich ist daher eine post-transkriptionelle Kontrolle der Genexpression. Ungeachtet dessen, nimmt die Sph1 Menge deutlich mit dem Beginn der stationären Wachstumsphase ab. Für eine halbquantitative Analyse des relativen Sph1 Proteingehalts wurde der Röntgenfilm gescannt und die Signale densitometrisch ausgewertet (Abbildung 9C). Dabei wurde festgestellt, dass in Zellen der frühen stationären Wachstumsphase nur etwa 5 % der Sph1 Menge vorhanden ist, die in exponentiell wachsenden Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese Daten weisen darauf hin, dass das Sph1 Protein entweder instabil ist und die Sph1 Synthese zu Beginn der stationären Phase endet, oder dass es spezifisch abgebaut wird. In jedem Fall stehen die Ergebnisse im Einklang mit einer möglichen Zellzyklus-spezifischen Funktion von Sph1 und Hp24 in *H. salinarum*.

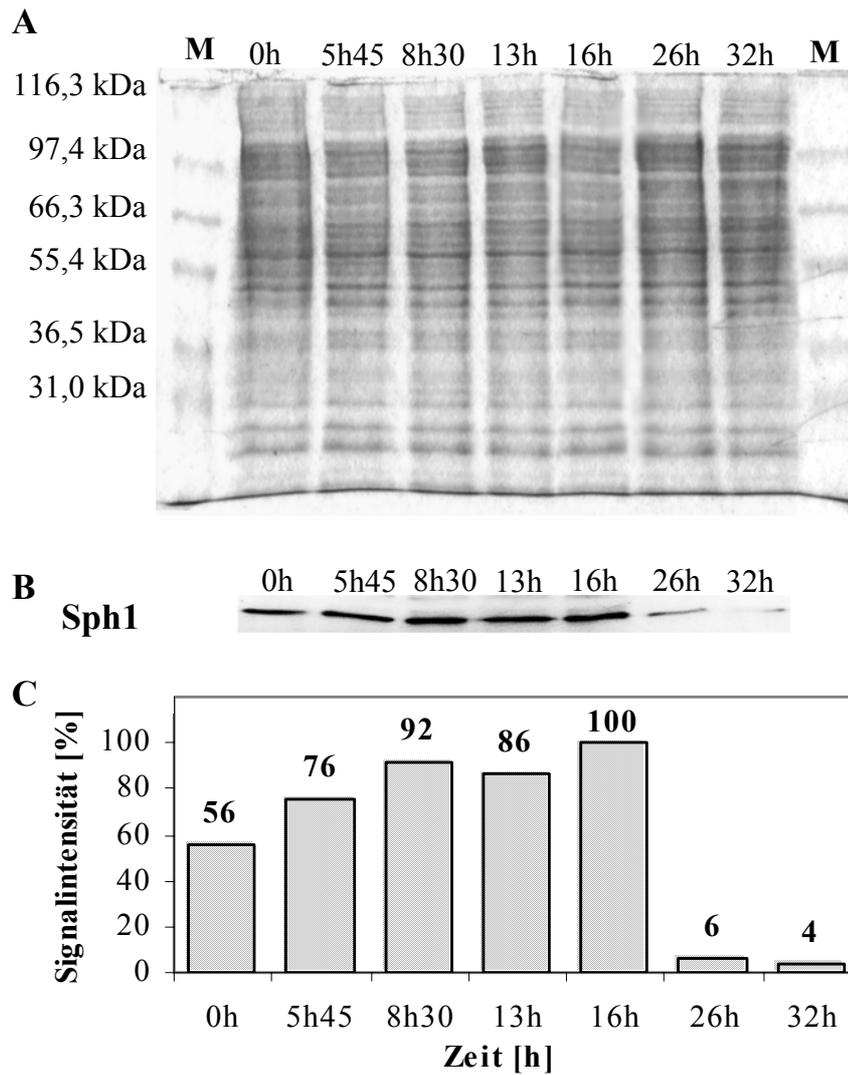


Abbildung 9: Wachstumsphasen abhängige Sph1 Akkumulation

(A) Während des aeroben Wachstums einer *H. salinarum* Kultur wurden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und jeweils 15 μg der entsprechenden Rohextrakte auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größen des Molekulargewichtsstandards [M] sind jeweils angegeben. (B) Das Gel wurde geblottet und mit einem anti-Sph1-Antikörper wurden die Sph1 Akkumulation ermittelt. Der Blot wurde gescannt und die relative Signalintensitäten ermittelt und (C) in einem Balkendiagramm gegen die Zeit aufgetragen. Das Signal mit der höchsten Intensität wurde mit 100 % gleichgesetzt.

3. Modulation der Sph1 Konzentration in *H. salinarum*

3.1 Überproduktion von Sph1

Zur Charakterisierung der Funktion von Sph1 sollte das Protein von außen steuerbar überproduziert sowie depletiert werden. Frühere Ergebnisse haben bereits gezeigt, dass die Überproduktion von Sph1 möglicherweise den Fortgang des Zellzyklusses beeinflusst. Die normalerweise pleiomorphe Zellgestalt von *H. volcanii* (Kugeln, unregelmäßige Zellen und Kurzstäbchen) wurde durch die heterologe Produktion von Sph1 dramatisch geändert; es wurden lange Stäbchen ausgebildet. In *H. salinarum* konnte als Folge der homologen Überproduktion von Sph1 ein Anstieg der durchschnittlichen Zelllänge und das Auftreten von einigen sehr langen Zellen beobachtet werden. Jedoch war die Änderung des Phänotyps bei Überproduktion von Sph1 in den an sich schon stäbchenförmigen Zellen weniger deutlich (Ruepp *et al.*, 1998). Das verwendete Vektorkonstrukt enthielt einen konstitutiven Promotor. Der durch die konstitutive Expression von *sph1* entstehenden Phänotyp der Transformanden war uneinheitlich und instabil. Eine präzise Interpretation der Ergebnisse war demzufolge nicht möglich. Daher wurde ein neuer Vektor konstruiert, der anstelle des bislang verwendeten starken konstitutiven Promotors pR1/6 (Danner und Soppa, 1996) einen starken regulierbaren Promotor enthalten sollte. Ein solches Konstrukt sollte es ermöglichen, die Überproduktion von Sph1 in *H. salinarum* gezielt zu induzieren und den resultierenden stabilen Phänotyp zu charakterisieren. Für Haloarchaea stand jedoch bislang kein regulierter Promotor zur Verfügung, so dass ein geeigneter Bereich aus dem Genom von *H. salinarum* identifiziert werden musste. Daher wurde zunächst der intergene Bereich zwischen dem *arcC* und dem *arcB* Gen des *arcRACB*-Genclusters aus *H. salinarum* (Abbildung 10A) vor das *sph1* Gen kloniert. Die Gene des *arcRACB*-Genclusters kodieren für die Proteine des Arginindeiminaseweges. Durch Arbeiten am Arginindeiminaseweg war gezeigt worden, dass die Expression der Gene des fermentativen Argininabbaus durch das Substrat Arginin reguliert werden (Soppa *et al.*, 1998; Ruepp *et al.*, 1996). Nach externer Zugabe von Arginin erfolgt innerhalb weniger Minuten eine starke Induktion der Expression. Auch wenn eine genaue Promotorcharakterisierung nicht vorlag, sollte der Promotor eines der Gene für die Steuerung der Sph1 Produktion herangezogen werden. Die Transkription des *arcB* Genes ist in der exponentiellen Wachstumsphase äußerst gering, kann aber durch Zugabe von Arginin nachweislich um etwa den Faktor 20 gesteigert werden (Ruepp *et al.*, 1996). Der putative Promotorbereich des *arcB* Genes wurde stromaufwärts des *sph1* Genes in einen bestehenden haloarchaealen Expressionsvektor inseriert. Es entstand das Plasmid pUH3 (Abbildung 10A). Nach Transformation des *H. salinarum* Wildstammes DSM 670 mit pUH3 stellte sich heraus,

dass die Zellen bereits in Abwesenheit von Arginin signifikant länger waren als Wildtypzellen. Damit konnte zwar der schon früher beschriebene Phänotyp der Zellen bei einer konstitutiven Überproduktion von Sph1 bestätigt werden (Ruepp *et al.*, 1998), es konnte jedoch nicht die erwartete kontrollierbare Produktion, sondern nur eine konstitutive Expression von *sph1* erzielt werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden in einer Northern Blot Analyse die *sph1* Transkriptlevel des Wildstammes DSM 670 und einer frisch durch Transformation hergestellten Überproduktionsvariante vor und 3 Stunden nach erfolgter Argininzugabe analysiert (Abbildung 10B). Das *sph1* Transkript ist in der Überproduktionsvariante DSM 670/pUH3 deutlich nachweisbar. Im Gegensatz dazu liegt die *sph1* Transkriptmenge in den RNA-Isolaten aus dem Wildstamm unterhalb der Nachweisgrenze. Die Zugabe von Arginin bewirkt keine weitere Steigerung der *sph1* Transkriptmenge in der Variante, sondern führt zu deren Reduktion. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bereits innerhalb von 3 Stunden ein Teil der in der Flüssigkultur enthaltenen Zellen das Plasmid verliert und somit die konstitutive Expression von *sph1* nicht mehr erfolgen kann. In einem unabhängigen Versuch mit einem anderen zu exprimierenden Gen wurde festgestellt, dass ein Bereich von ca. 200 bp vor dem *arcB* Gen einen konstitutiven Promotor enthält (Nadja Patenge, persönliche Mitteilung).

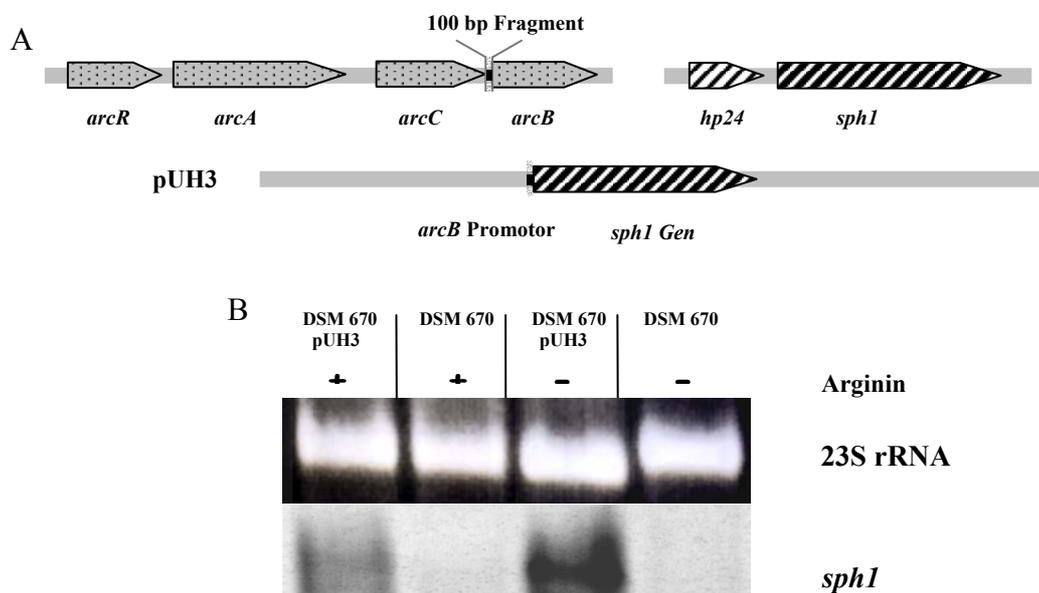


Abbildung 10: Konstitutive Expression des *sph1* Gens.

(A) Schematische Darstellung der Bereiche des *H. salinarum* Genoms, die den verwendeten Promotor bzw. das *sph1* Gen enthalten. Die beiden markierten Fragmente wurden zur Konstruktion des Vektors pUH3 verwendet, der die homologe Expression des Sph1 Gens in *H. salinarum* ermöglicht. (B) Der Sph1 Überproduktionsstamm DSM 670/pUH3 und der Wildtypstamm DSM670 wurden bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Aus beiden Kulturen wurde jeweils eine Probe entnommen und gesamt RNA isoliert. Die Kulturen wurden mit jeweils 1,25 % Arginin versetzt und für weitere 3 h auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde erneut gesamt RNA isoliert. Der Nachweis des *sph1* Transkripts erfolgte mit einer *sph1*-spezifischen Sonde. verwendete Abkürzungen: *arcR*, Gen eines möglichen Regulators; *arcA*, Gen der Arginin-Deiminase; *arcC*, Gen der Carbamat-Kinase; *arcB*, Gen der katabolen Ornithintranscarbomylase.

Dem als Promotor gewählten intergenen Bereich zwischen dem *arcC* und dem *arcB* Gen fehlen augenscheinlich Kontrollelemente, um die Regulation des Vektor kodierten *sph1* Allels zu erreichen. Um doch noch eine konditionale Überproduktion des Sph1 Proteins in *H. salinarum* zu erzielen, wurde der verwendete intergene Bereich von 100 bp durch einen erweiterten Bereich des *arcB* Promotors ersetzt. Das 1,2 kbp umfassende Promotorelement, das etwa 400 bp vor dem offenen Leserahmen von *arcB* beginnt und fasst das gesamte *arcB* Gen umfasst (Abbildung 11A), wurde zunächst in den Blueskriptvektor pSK+ kloniert (pUH4). Anschließend wurde das Fragment anstelle des bislang verwendeten konstitutiven Promotors stromaufwärts des *sph1* Genes in den Vektor pUH3 inseriert, so dass eine Transkriptionsfusion entstand. *H. salinarum* Zellen, die mit dem resultierenden Plasmid pUH6 transformiert worden waren, wiesen mittlere Zelllängen vergleichbar zum Wildstamm DSM 670 auf. In einem Experiment wurde untersucht, ob die Expression des *sph1* Genes in der Überexpressionsvariante durch Zugabe von Arginin induziert werden kann. In Abwesenheit von Arginin wuchs der pUH6 enthaltende *H. salinarum*-Stamm ununterscheidbar vom Wildtyp. Nach Argininzugabe begannen jedoch die optischen Dichten der Kontrollkultur und des Überproduktionsstammes DSM 670/pUH6 sich voneinander zu unterscheiden (Abbildung 11B). Während die optische Dichte der Kontrollkultur stetig anwuchs, nahm die Steigung der optischen Dichte der Testkultur mit Arginin in zeitabhängiger Weise deutlich ab. In einer Western Blot Analyse mit *sph1*-spezifischem Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Sph1 Menge innerhalb der Zellen tatsächlich nach Induktion mit Arginin zunimmt (Abbildung 11C) und dass die Sph1 Menge drei Stunden nach Zugabe des Arginins etwa dreimal höher war als zu Beginn des Versuchs (Abbildung 11D). Im Gegensatz zum Wildtyp wurde durch Zugabe von Arginin die Zellteilung blockiert; die Zellen wuchsen in der Länge. Vier Stunden nach Induktion war die mittlere Zelllänge auf mehr als auf das doppelte einer uninduzierten Kontrollkultur bzw. des Wildstammes DSM 670 angewachsen (Abbildung 11E). Der beobachtete Phänotyp, die Western Blot Analyse, sowie die gemessene optische Dichte bestätigen, dass die Arginin-abhängige konditionale Überproduktion von Sph1 erreicht wurde. Folglich ist die Produktion von Sph1 in einer erhöhten Dosis bzw. zu einem unangemessenen Zeitpunkt im Zellzyklus von *H. salinarum* nicht mit dem Fortgang des Zellzyklusses vereinbar. Transkription, Translation, Energiemetabolismus und andere zelluläre Prozesse scheinen nicht betroffen zu sein.

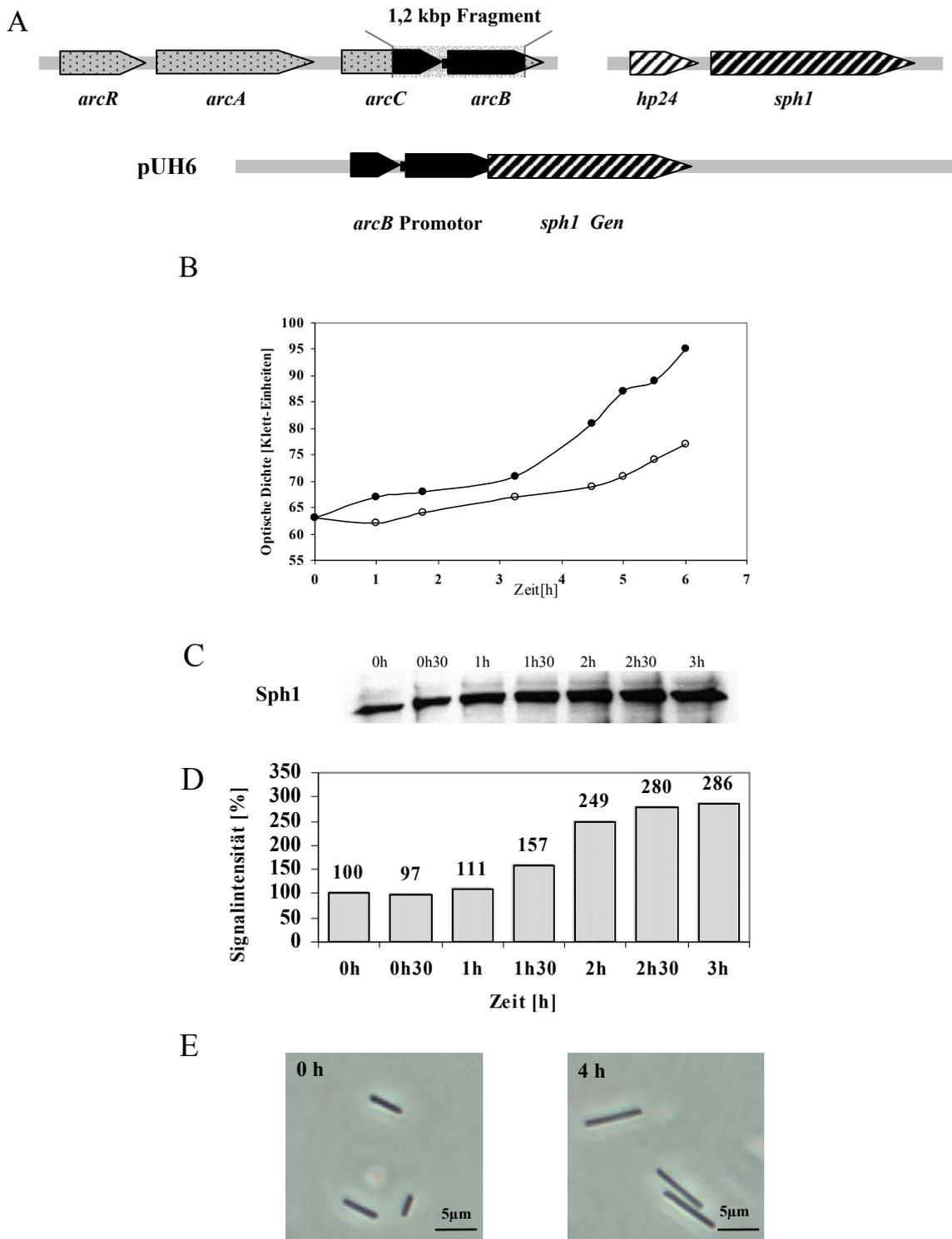


Abbildung 11: Homologe Überproduktion von Sph1 in *H. salinarum*

(A) Schematische Darstellung der Bereiche des *H. salinarum* Genoms, die den verwendeten Promotor bzw. das *sph1* Gen enthalten. Die beiden markierten Fragmente wurden zur Konstruktion des Vektors pUH6 verwendet, der die regulierte homologe Expression des Sph1 Gens in *H. salinarum* ermöglichte. (B) Wachstum des Wildstammes DSM 670 (●) und des Überproduktionsstammes DSM 670/ pUH6 (○) nach Zugabe von Arginin. Die Änderung der Zelldichte wurde mit einem Klett-Photometer bestimmt.

(C) Western Blot Analyse mit einem anti-Sph1-Antikörper. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeiten aus der Kultur des Überproduktionsstammes entnommen und 10 μ g löslichen Zellproteins auf jede der Spuren aufgetragen. Der Blot wurde gescannt und die relative Signalintensitäten ermittelt und (D) in einem Balkendiagramm gegen die Zeit aufgetragen. Das Signal mit der niedrigsten Intensität wurde mit 100 % gleichgesetzt. (E) Mikroskopische Aufnahmen von Zellen des Überproduzenten vor Induktion (linkes Bild) und 4 h nach Induktion mit Arginin (rechtes Bild).

verwendete Abkürzungen: *arcR*, Gen eines möglichen Regulators; *arcA*, Gen der Arginin-Deiminase; *arcC*, Gen der Carbamat-Kinase; *arcB*, Gen der katabolen Ornithintranscarbomylase.

3.2 Depletion von Sph1

Da Sph1 für den erfolgreichen Verlauf des Zellzyklusses von essentieller Bedeutung zu sein scheint, wäre eine Nullmutation des *sph1* Genes möglicherweise letal. Ist der Ausfall der Sph1 Funktion mit der Überlebensfähigkeit unvereinbar, so können keine Klone einer entsprechenden Variante erhalten werden, bei denen ein Gensatz mit einem Resistenzgen durchgeführt wurde. Daher wurde versucht, eine konditionale Depletionsvariante zu erzeugen, um den Phänotyp bei fehlender Sph1-Funktion untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurde erstmals in Archaea versucht, die intrazelluläre Produktion von anti-sense-mRNA zu induzieren, um die Bildung von Sph1 zu unterbinden. Obwohl die in Eukarya erfolgreich eingesetzte antisense Technik (De Backer et al., 2002; Chicas und Macio 2001; Vaucheret et al., 2001) für die Unterdrückung der Expression in Archaea bislang noch nicht eingesetzt worden war, gab es Hinweise, dass in Archaea antisense RNAs in natürlich vorkommenden Regulationsprozessen eine Rolle spielen (Krüger und Pfeifer, 1996; Stolt und Zillig, 1993). Somit konnte vermutet werden, dass *sph1*-antisense-mRNA die Bildung des Proteins verhindern würde.

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass *sph1* nicht gemeinsam mit *hp24* transkribiert wird und das stromaufwärts von *sph1* kein weiteres Gen liegt, dass mit *sph1* abgelesen werden. Diese Informationen waren für die geplante Depletion des *sph1* Genes nötig, um auszuschließen, dass aufgrund der Depletion polare Effekte auf andere Gene auftreten könnten. Der Überexpressionsvektor pUH6 war der Ausgangspunkt für den Versuch Sph1 gezielt zu depletieren bzw. seine Bildung zu verhindern. Das *sph1* Gen wurde aus dem Vektor ausgeschnitten und das invertierte *sph1* Gen wieder in den Vektor inseriert (Abbildung 12A). Es entstand das Plasmid pUH8, dass die Arginin abhängige Bildung von *sph1*-antisense mRNA erlauben sollte. Der Wildstamm DSM 670 von *H. salinarum* wurde mit pUH8 transformiert und die Transkription des *sph1*-antisense Transkripts wurde durch Zugabe von Arginin gezielt induziert. Dabei wurde durch Messung der optischen Dichte der Kultur sowie durch Lichtmikroskopie die Ausbildung des Phänotyps verfolgt und mit einer unbehandelten Kultur und einer Wildtyp-Kultur von *H. salinarum* verglichen. Erneut waren die Vektor enthaltende Kultur DSM 670/pUH8 und die Kontrollkultur vor der Induktion nicht voneinander zu unterscheiden (Abbildung 12B). Nach der Induktion der *sph1*-antisense mRNA Synthese hörten die Zellen der Testkultur auf sich zu teilen und begannen stattdessen in die Länge zu wachsen (Abbildung 12C). Folglich ergab sich für die Überproduktion und die Depletion von Sph1 in *H. salinarum* der gleiche Phänotyp. Somit wird die essentielle Rolle von Sph1 für den korrekten Verlauf des Zellzyklusses von *H. salinarum* unterstrichen.

Außerdem ist festzustellen, dass Sph1 nicht redundant kodiert ist und dass die Funktion bei Ausfall von Sph1 nicht oder nur teilweise von Sph2 bzw. einem anderen Protein übernommen wird, da ansonsten die Depletion ohne Phänotyp geblieben wäre.

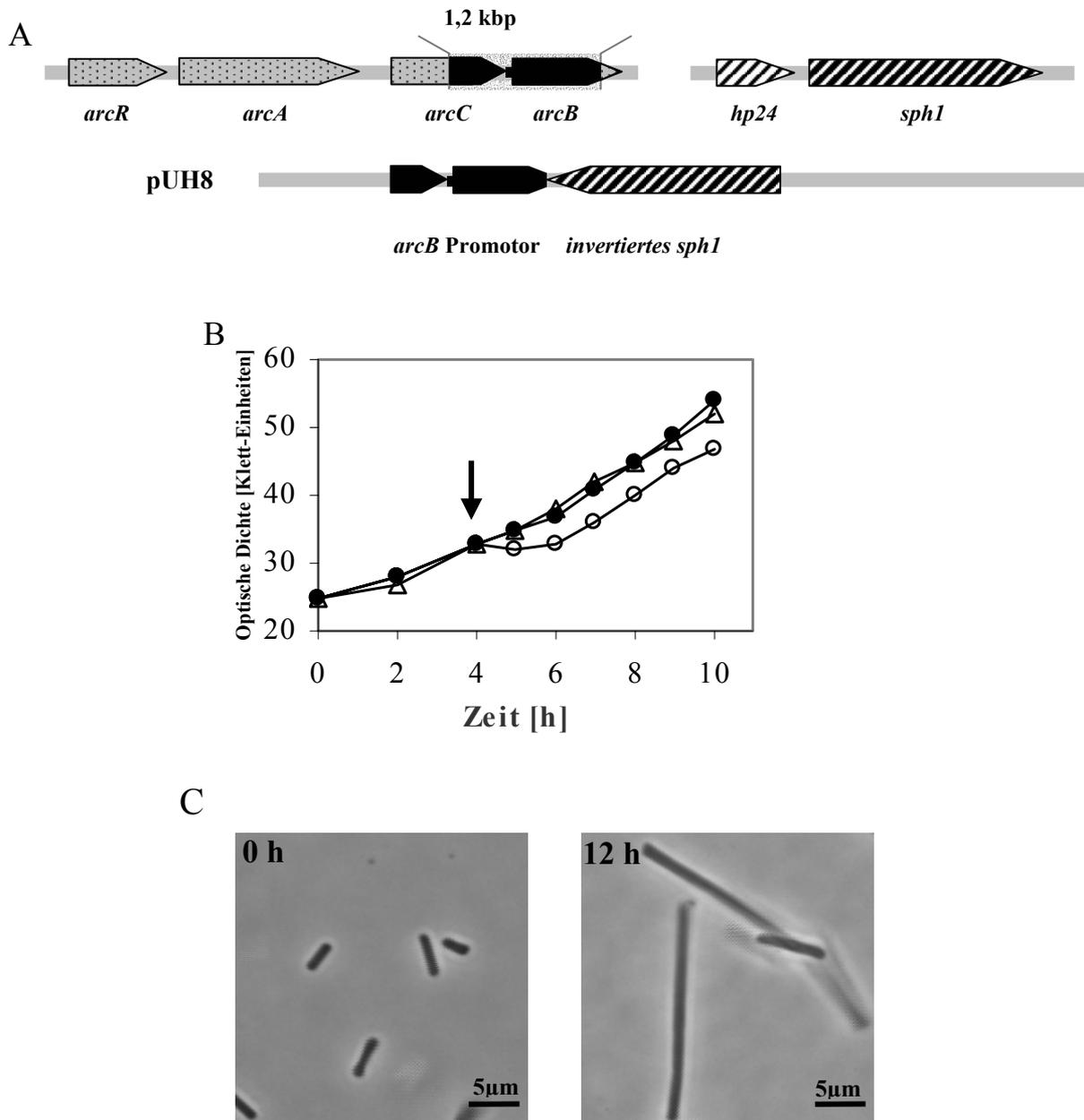


Abbildung 12: Depletion von Sph1

(A) Schematische Darstellung der Bereiche des *H. salinarum* Genoms, die den verwendeten Promotor bzw. das *sph1* Gen enthalten. Die beiden markierten Fragmente wurden zur Konstruktion des Vektors pUH6 verwendet, der die regulierte Depletion des Sph1 Gens in *H. salinarum* ermöglichte. (B) Wachstum einer Kultur von DSM 670 (△) und von zwei Plasmid tragenden Kulturen DSM 670/pUH8 (○/●) die das invertierte *sph1* Gen unter Kontrolle eines Arginin induzierbaren Promotors tragen. Der Zeitpunkt, zu dem zu einer der beiden Kulturen (○) Arginin gegeben wurde ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die andere Kultur (●), sowie der Wildstamm (△) wurden ohne Arginin weiter inkubiert. Die Änderung der Zelldichte wurde mit einem Klett-Photometer bestimmt. (C) Mikroskopische Aufnahmen der DSM 670/pUH8 Kultur vor (linke Abbildung) und 12h nach Zugabe von Arginin (rechte Abbildung).

verwendete Abkürzungen: *arcR*, Gen eines möglichen Regulators; *arcA*, Gen der Arginin-Deiminase; *arcC*, Gen der Carbamat-Kinase; *arcB*, Gen der katabolen Ornithintranscarbomylase.

3.3 Quantifizierung der Molekülzahl je *H. salinarum*-Zelle

Zur Quantifizierung der Molekülzahl je Zelle, des Sph1 Anteils an der löslichen Zellfraktion, sowie zur Bestimmung der Nachweisgrenze von Sph1 in der Western Blot Analyse, wurde Sph1 heterolog in *E. coli* produziert. Dazu wurde das *sph1* Gen in den Vektor pPCR-Script kloniert und das Gen anschließend in den bakteriellen Expressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden) inseriert. Durch die Klonierung wurde der offene Leserahmen des *sph1* Gens am 5'-Ende um sechs Histidincodons erweitert und steht unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren *lac*-Promotors. Es entstand das Plasmid pUH10. Nach Transformation von *E. coli* mit dem Plasmid pUH10 wurde der transgene Stamm zur Produktion des rekombinanten Fusionsproteins Sph1_{H6} herangezogen. Nach Induktion der Expression mit IPTG konnte Sph1_{H6} im Zellextrakt des pUH10 tragenden *E. coli*-Stammes nachgewiesen werden (Abbildung 13). Die sechs N-terminalen Histidinreste des Fusionsproteins Sph1_{H6} ermöglichten die Reinigung des Proteins mit einer Nickel-Affinitäts-Chromatographie. Definierte Mengen des gereinigten, rekombinanten Sph1_{H6} wurden zusammen mit löslichem Zellextrakt aus *H. salinarum* auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Western Blot Analyse wurde halbquantitativ die Molekülzahl pro Zelle ermittelt.

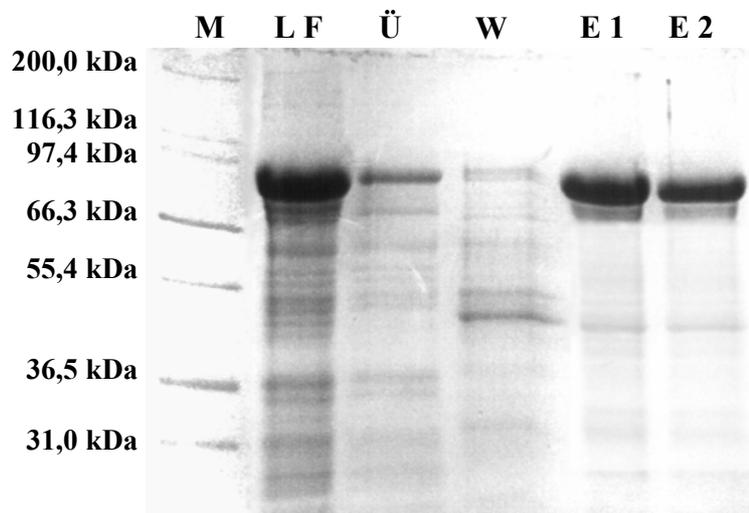


Abbildung 13: Reinigung des rekombinanten Sph1_{H6}

In der ersten Spur ist der Molekulargewichtsstandard [M] aufgetragen; die Größen sind jeweils angegeben. In der zweiten Spur sind 15 µg Rohextrakt des *E. coli* Sph1_{H6}-Expressionsstammes nach IPTG-Induktion aufgetragen. In der dritten Spur [Ü] sind 5 µg des Überstands nach Inkubation mit der NCS-Matrix aufgetragen. Die vierte Spur zeigt 1 µg der ersten Waschfraktion. In der fünften und sechsten Spur sind jeweils 10 µg gereinigtes rekombinantes Sph1 nach der ersten [E1] bzw. nach der zweiten [E2] Elution von der Affinitätsmatrix aufgetragen.

Zunächst wurden auf ein SDS-PAGE 2 µg der löslichen Proteinfraction aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das im Anschluss durch Western Blot Analyse immunologisch nachgewiesene spezifische Sph1-Signal wurde mit einer Verdünnungsreihe von Sph1_{H6}, die ebenfalls im Immunologischen Nachweis eingesetzt wurde, verglichen, und auf diese Weise wurde die Sph1-Menge auf dem Western Blot abgeschätzt. Der Sph1-Anteil der löslichen Proteinfraction macht demnach ca. 0,1% aus. In einer Zelle liegen $5,4 \cdot 10^{21}$ mol Sph1 vor. Eine *H. salinarum* Zelle enthält demnach im Durchschnitt rund 3000 Sph1 Moleküle. Da das *H. salinarum* Genom etwa $3 \cdot 10^6$ bp umfasst, steht pro Kilobase genomischer DNA ein Sph1 Molekül zur Verfügung.

4. Etablierung einer Synchronisationsmethode

4.1 Wirkung von eukaryalen Zellzyklusinhibitoren

Als Voraussetzung für die Charakterisierung Zellzyklus-spezifischer Prozesse war die Etablierung einer Synchronisationsmethode, die es für Euryarchaea bislang nicht gab, dringend erforderlich. Als Grundvoraussetzung für das Erstellen eines Synchronisationsprotokolls wurde der Einfluss verschiedener, bei Eukarya wirksamer, Zellzyklusinhibitoren auf das Wachstum von *H. salinarum* untersucht. Dabei wurden neben Aphidicolin, einem Hemmstoff, der nachweislich die Replikation von *H. salinarum* blockiert (Forterre *et al.*, 1984), Inhibitoren ausgewählt, die in Eukarya verschiedene Zellzyklusphasen blockieren. Die verwendeten Inhibitoren und ihre Wirkorte in Eukarya sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Inhibitor	Wirkort in Eukarya	Literatur
Aphidicolin	Replikation (DNA-Polymerasen α and δ)	Matherly <i>et al.</i> , 1989; Spadari <i>et al.</i> , 1985; Forterre <i>et al.</i> , 1984
Hydroxyharnstoff	Replikation (Ribonukleotidreduktase)	Anand <i>et al.</i> , 1995
Mimosin	Replikation (Replikationsgabel)	Krude, T., 1999; Lin <i>et al.</i> , 1996; LaLande <i>et al.</i> , 1990
Nocodazol	Segregation (Tubulin-Polymerisation)	Samaké und Smith, 1996; Krek und DeCaprio, 1995
Puromycin	Translation (Elongation)	Kaufmann <i>et al.</i> , 1993

Tabelle 3: Eukaryale Zellzyklusinhibitoren und deren Wirkorte

Um die Sensibilität von *H. salinarum* gegenüber den verschiedenen Inhibitoren zu testen wurde zunächst eine sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Wildtypkultur von *H. salinarum* in 7 Kulturen aufgeteilt und sechs dieser Kulturen mit jeweils einem der Inhibitoren versetzt. Die unbehandelte Kultur diente als Kontrolle. Die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen waren vergleichbar mit denen in Eukarya wirksamen Inhibitormengen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Mimosin, Valinomycin und Nocodazol zeigten keinen oder geringe Effekte auf Wachstum und Zelllänge und beeinflussten die Zellteilung von *H. salinarum* gar nicht oder nur in geringem Umfang. In den entsprechenden Kulturen waren im gesamten Versuchsverlauf teilende Zellen in einer Häufigkeit zu finden, die mit den in der Wildtyp-Kultur beobachteten Teilungshäufigkeiten vergleichbar ist.

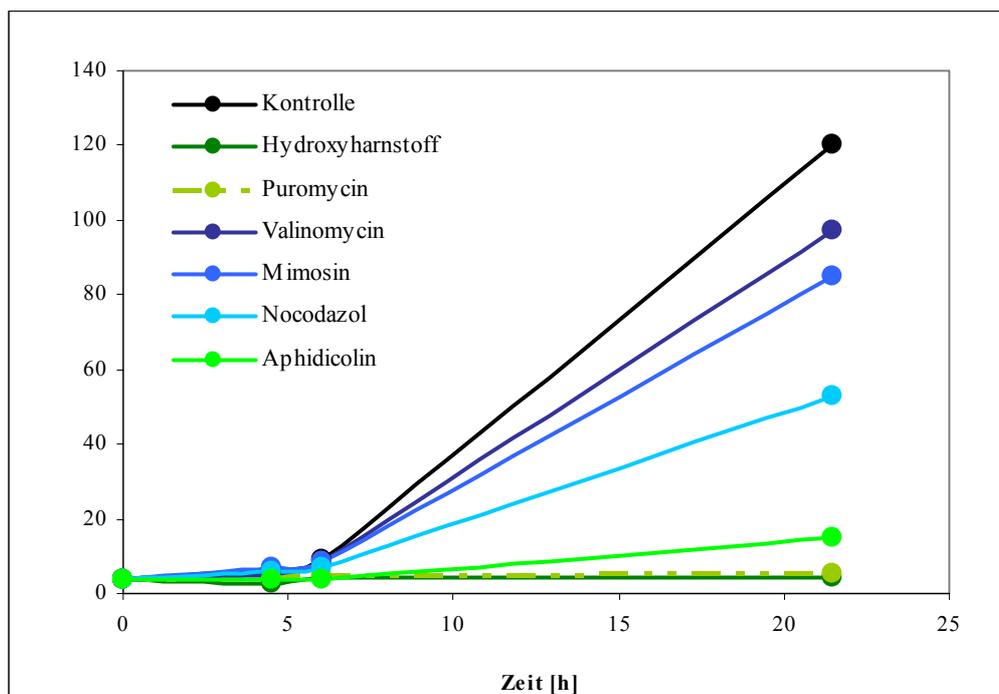


Abbildung 14: Hemmstoffbehandlung von *H. salinarum* Kulturen

Die Analyse zeigt die Änderung der Zelldichten von 6 *H. salinarum*-Kulturen nach Zugabe einer der Inhibitoren (● Hydroxyharnstoff, ● Puromycin, ● Valinomycin, ● Mimosin, ● Nocodazol und ● Aphidicolin) im Verlauf der Inhibitorbehandlung sowie einer *H. salinarum*-Kultur, der keiner der Inhibitoren zugesetzt wurde (●). Die Zelldichten wurden jeweils mit der Zählkammer ermittelt.

Möglicherweise gibt es für diese Substanzen in *Halobacterium* keinen homologen Wirkort oder dieser ist so unterschiedlich von dem in Eukarya, dass er nicht betroffen wird. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die Substanzen das Zytoplasma erst gar nicht erreichen, bzw.

bei den benötigten Salzkonzentrationen unwirksam waren. Hydroxyharnstoff, Puromycin, sowie Aphidicolin inhibierten die Zellteilung vollständig. Dieser Effekt konnte sowohl durch die Stagnation in der Zelldichtezunahme, sowie im Fehlen von Zellteilungsereignissen beobachtet werden. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte von den verwendeten Lösungsmitteln stammen, in denen die Inhibitoren gelöst waren, wurden Testkulturen mit den Lösungsmitteln inkubiert. Bei den verwendeten Konzentrationen konnten keine inhibitorischen Wirkungen nachgewiesen werden. Im Folgenden wurden die durch das Aphidicolin und den Hydroxyharnstoff verursachten Effekte näher charakterisiert.

4.2 Hydroxyharnstoff

Um die inhibitorische Wirkung von Hydroxyharnstoff zu überprüfen, wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen auf das Wachstum von *H. salinarum* untersucht. Zunächst wurde mit einer Konzentration von 15 µg/ml Kultur begonnen. Da mit dieser Konzentration nur eine mäßige Hemmung der Zellteilung zu erreichen war, wurde die Konzentration auf 150 µg/ml und schließlich auf 1,5 mg/ml *H. salinarum* Kultur gesteigert. In Abbildung 15 sind auf der rechten Seite Zellen vor der Zugabe von 1,5 mg/ml Hydroxyharnstoff und 5 bzw. 10 Stunden nach der Zugabe gezeigt. Auf der linken Seite die graphische Auswertung der statistischen Analyse von jeweils 50 Zellen dargestellt. Während die mittlere Zelllänge der meisten Zellen nach Hydroxyharnstoff Zugabe unbeeinflusst bleibt – der Mittelwert sinkt von 4,2 µm (Standardabweichung 1,2 µm) auf 3,7 µm (Standardabweichung 1,3 µm) – und sowohl die Zellteilung als auch das Wachstum der meisten Zellen gehemmt sind, wächst ein geringer Anteil der Zellen von etwa 10 % weiter in der Länge. Innerhalb der nächsten 5 Stunden beginnt dann auch der restliche Teil der Zellen in der Länge zu wachsen, so dass die mittlere Zelllänge auf 4,6 µm (Standardabweichung 1,3 µm) anwächst. Der beobachtete Effekt ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nicht alle Zellen in gleichem Umfang durch Hydroxyharnstoff gehemmt werden, so dass bei einem Teil der Zellen sowohl die Zellteilung als auch das Zellwachstum betroffen ist, bei einem anderen Teil jedoch die Zellen weiterhin in der Lage sind in der Länge zu wachsen. Im Versuchsverlauf änderte sich der Anteil der Zellen deren Zellwachstum durch Hydroxyharnstoff inhibiert war nur in geringem Umfang. Versuche, durch eine höhere Hydroxyharnstoffkonzentration eine vollständige Inhibition aller Zellen zu erzielen, ergaben kein verbessertes Verhältnis von wachsenden zu verzögert wachsenden Zellen.

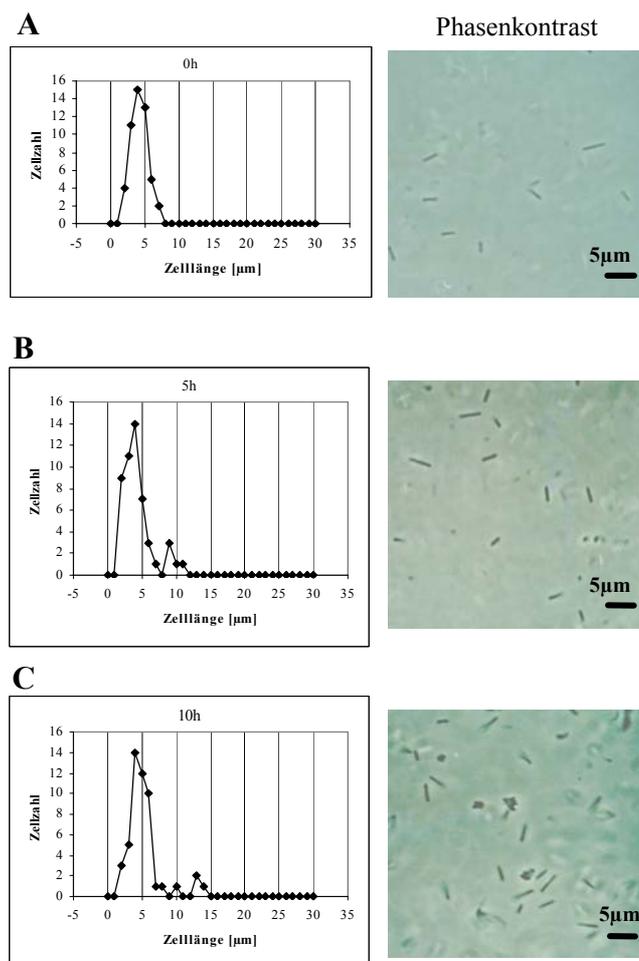


Abbildung 15: Hydroxyharnstoffbehandlung einer *H. salinarum* Kultur

Die Analyse zeigt (A) Zellen vor Behandlung mit Hydroxyharnstoff, (B) nach 5 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor und (C) nach 10 Stunden in Anwesenheit des Hydroxyharnstoffs. Auf der linken Seite sind die Größenverteilungen der Zelllängen graphisch dargestellt, auf der rechten Seite sind die mikroskopische Aufnahmen typischer Zellen abgebildet. Für jede graphische Darstellung wurden von jeweils 50 Zellen die Zelllängen ausgemessen.

4.3 Aphidicolin

Da mit Hydroxyharnstoff keine zufrieden stellenden Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde der Einfluss von Aphidicolin näher untersucht. Die Eignung von Aphidicolin als Inhibitor der DNA Polymerase wurde bereits beschrieben (Forterre *et al.*, 1984; Schinzel und Burger, 1984) und es war bekannt, dass durch verlängerte Inkubation mit dem Inhibitor Zelllängen von bis zu 40 µm erreicht wurde, was etwa dem zehnfachen der mittleren Zelllängen einer unbehandelten Kultur entspricht (Oesterhelt und Marwan, 1987). Allerdings war Aphidicolin zuvor nie zur Synchronisation von *H. salinarum* genutzt worden, so dass keine vollständige reversible Inhibition der Replikation ohne einen Einfluss auf andere

zelluläre Prozesse notwendig war. Daher musste die Aphidicolinkonzentration zunächst optimiert werden. *H. salinarum* zeigte in den Experimenten eine hohe Sensitivität gegenüber Aphidicolin; die Effekte waren deutlich von der eingesetzten Dosis abhängig. Bei einer Konzentration von weniger als 20 μM änderte sich die mittlere Zelllänge im Verlauf der Inkubation nur geringfügig, so dass sich die Zellen in Anwesenheit des Inhibitors weiterhin teilen konnten und die Zellen den Zellzyklus vollständig durchliefen. Konzentrationen von mehr als 50 μM führten zu einer ausnahmslosen Inhibierung der Zellteilung, jedoch war auch das Zellwachstum von *H. salinarum* vollständig gehemmt. Bei einer Konzentration von 30 μM Aphidicolin nahmen die Zellen signifikant an Länge zu, während die Zellteilung komplett unterbunden war. Durch Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie wurde kontrolliert, dass sowohl die Stäbchen förmige Zellgestalt als auch das Erscheinungsbild des Nukleoids unverändert blieben. Durch das anhaltende zelluläre Wachstum wurde deutlich, dass die Zellen weiterhin lebensfähig waren. In Abbildung 16 sind auf der rechten Seite Zellen vor Aphidicolinbehandlung bzw. 5 Stunden und 10 Stunden nach Zugabe des Inhibitors abgebildet. Für eine statistische Analyse wurden die Zelllängen von jeweils 50 Zellen bestimmt und graphisch ausgewertet (Abbildung 16, linke Seite). Die Zelllängenverteilung einer exponentiell wachsenden *H. salinarum*-Kultur folgt einer Normalverteilung um den Mittelwert 4,1 μm (Standardabweichung 1,7 μm). Nach 5 Stunden in Gegenwart des Aphidicolins war die Normalverteilung der Zelllängen in der Kultur weiterhin erhalten. Die Varianz änderte sich nur geringfügig von 2,8 auf 3,3, während die mittlere Zelllänge auf 7,2 μm (Standardabweichung 1,8 μm) anwuchs. Nach 10 Stunden hatte sich die mittlere Zelllänge nahezu verdreifacht, auf einen Wert von 11,9 μm (Standardabweichung 3,4 μm). Zu diesem Zeitpunkt waren allerdings einige Zellen deutlich kürzer als das statistische Mittel, so dass vermutlich schon wieder vereinzelte Teilungen stattgefunden hatten. Dementsprechend stieg die Varianz signifikant von 3,3 auf 11,4. Folglich nimmt die Zelllänge für mindestens fünf Stunden linear zu, während die Varianz fast unverändert bleibt, so dass die Zellzyklusblockade bestätigt wird. Eine Aphidicolin behandelte Kultur und eine unbehandelte Kontrollkultur wurden hinsichtlich der Geschwindigkeiten verglichen, mit denen die mittleren Zelllängen zunehmen. Frisch aus einer Teilung hervorgegangene Zellen aus einer Kultur der exponentiellen Wachstumsphase haben eine mittlere Zelllänge von 3,0 μm und wachsen unter den verwendeten Bedingungen 4 Stunden, bis sie sich wieder teilen. Das entspricht einer mittleren Längenzunahme von 0,8 μm je Stunde. Zellen die mit Aphidicolin behandelt wurden, wachsen in den ersten fünf Stunden um 3,1 μm . In diesem Zeitraum wachsen sie mit einer mittleren Längenzunahme von

0,6 μm je Stunde. Die Geschwindigkeit der Zelllängenzunahme zeigt, dass die durchschnittliche zelluläre Wachstumsrate von *H. salinarum* nur geringfügig beeinflusst wird und somit Transkription, Translation, Energiestoffwechsel und andere zelluläre Prozesse durch die Aphidicolinbehandlung vermutlich gar nicht oder nur geringfügig beeinträchtigt werden. Somit ist Aphidicolin ideal für das Erstellen einer Synchronisationsprozedur geeignet. Als Hindernis erwies sich dabei, dass sich eine hohe Variabilität der Aphidicolinaktivität in Abhängigkeit der Charge und der Hersteller ergab. So musste die optimal einzusetzende Aphidicolinkonzentration jeder Charge neu ermittelt werden.

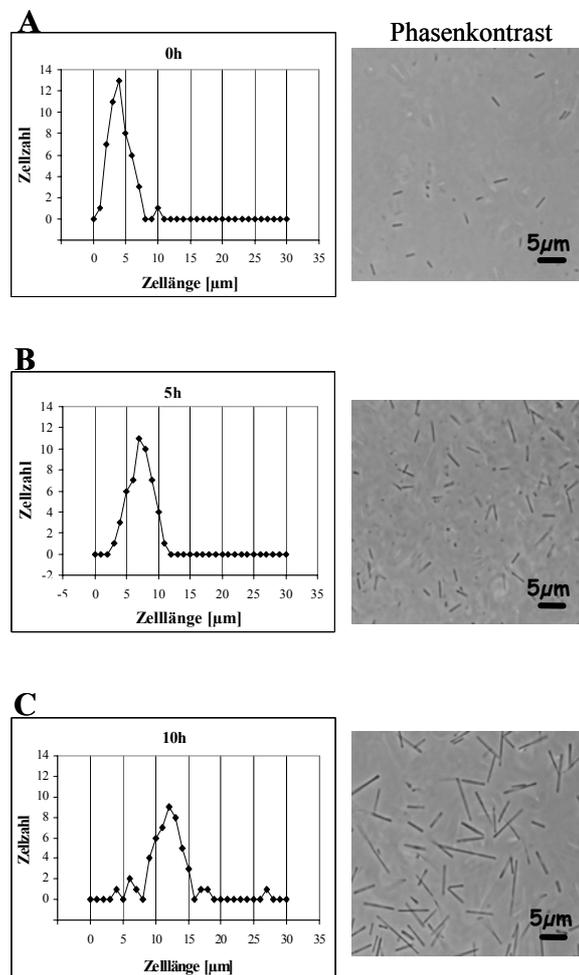


Abbildung 16: Aphidicolinbehandlung einer *H. salinarum* Kultur

Die Analyse zeigt (A) Zellen vor Behandlung mit Aphidicolin, (B) nach 5 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor und (C) nach 10 Stunden in Anwesenheit des Aphidicolins. Auf der linken Seite sind die Größenverteilungen der Zelllängen graphisch dargestellt, auf der rechten Seite sind die mikroskopische Aufnahmen typischer Zellen abgebildet. Für jede graphische Darstellung wurden von jeweils 50 Zellen die Zelllängen ausgemessen.

4.4 Bestimmung der Zellteilungsebene

Während der eigentliche Grund für die Optimierung der Zellzyklusinhibition durch Aphidicolin in der Etablierung einer Synchronisationsmethode lag, wurden durch die Inhibition und das anschließende Entfernen des Inhibitors weitere Experimente ermöglicht. Als ein Beispiel wurde die Zellteilungsebene bei verschiedenen Zelllängen bestimmt. Zunächst wurden die Zelllängen einer exponentiell wachsenden *H. salinarum*-Kultur vor Aphidicolinzugabe bestimmt. Die Zellteilungsebene von 100 Zellen wurde ausgemessen und es wurde festgestellt, dass sich die Zellen im Bereich der Zellmitte teilen. Die Daten sind in Abbildung 17A gezeigt, die mittlere Zelllänge betrug $6,9 \mu\text{m}$ (Standardabweichung $1,7 \mu\text{m}$), und der mittlere Abstand vom Septum zum nächsten Zellpol betrug $3,0 \mu\text{m}$ (Standardabweichung $0,5 \mu\text{m}$). Der Unterschied zwischen diesem gemessenen Abstand vom Zellpol und dem der aus den Zelllängen ermittelten Zellmitte, nämlich $3,45 \mu\text{m}$, ist nicht signifikant; Messungen der Abstände von beiden Zellpolen aus ergaben identische Werte. Anschließend wurde die *H. salinarum*-Kultur für 4 Stunden mit Aphidicolin behandelt, der Inhibitor entfernt, und mit wiedereinsetzender Zellteilung wiederum die Zellteilungsebene von 100 Zellen bestimmt (Abbildung 17B). Die mittlere Zelllänge war auf $9,8 \mu\text{m}$ (Standardabweichung $1,9 \mu\text{m}$) angewachsen, der Abstand vom Septum zum nächstgelegenen Zellpol betrug $4,2 \mu\text{m}$ (Standardabweichung $0,9 \mu\text{m}$) und ist somit geringfügig weniger als die Hälfte der mittleren Zelllänge, d.h. $4,9 \mu\text{m}$. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 16 stündiger Aphidicolinbehandlung ein deutlich verändertes Bild (Abbildung 17C). Die mittlere Zelllänge war auf $15,7 \mu\text{m}$ angewachsen (Standardabweichung $4,3 \mu\text{m}$), jedoch fand die Septenbildung eindeutig nicht in der Zellmitte statt; sie lag im Mittel $3,9 \mu\text{m}$ (Standardabweichung $1,6 \mu\text{m}$) vom nächsten Zellpol entfernt. Der Zellteilungsmechanismus in *H. salinarum* ist so ausgerichtet, dass das Septum in Zellen normaler Größe in der Zellmitte gebildet wird und geringe Zelllängenunterschiede ausgeglichen werden können, allerdings zeigen die Untersuchungen an gegenüber dem unbehandelten Wildtyp deutlich längeren Zellen, dass dieser Mechanismus indirekt zu sein scheint und von Informationen abhängig ist, die an den Zellpolen generiert werden.

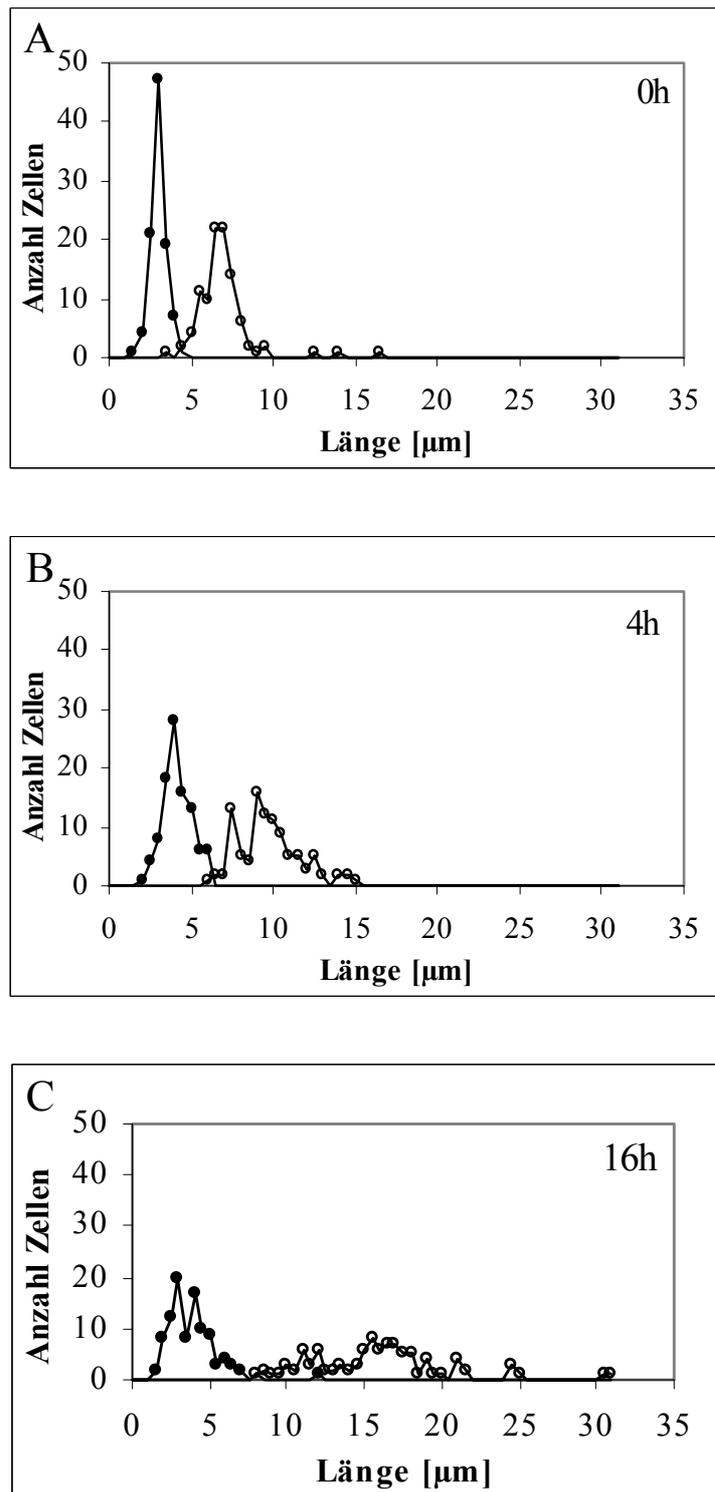


Abbildung 17: Septumbildung in *H. salinarum*

Exponentiell wachsende *H. salinarum* Zellen wurden gar nicht (A), sowie 4 h (B) und 16 h (C) mit Aphidicolin behandelt. Nach Aufheben der Blockade wurden Proben auf Agarose beschichtete Objektträger aufgebracht und im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Von 100 eingeschnürten Zellen wurde sowohl die gesamte Zelllänge (○) als auch der Abstand zum näheren der beiden Zellpole bestimmt (●).

4.5 Synchronisationsprozedur

Anhand verschiedener Parameter, wie z.B. der Generationszeit, des Teilungsmodus und des Längenzunahme in Anwesenheit des Inhibitors Aphidicolin, wurde eine Synchronisationsmethode für *H. salinarum* entwickelt (Abbildung 18). Diese zeichnete sich durch zwei aufeinander folgende Inkubationsschritte mit dem Inhibitor Aphidicolin aus, die durch einen Inkubationsschritt ohne Aphidicolin voneinander getrennt waren. Diese Methode ermöglichte zwar das Synchronisieren von *H. salinarum* Kulturen, die Summe der Inkubationszeiten betrug jedoch etwa 30 Stunden.

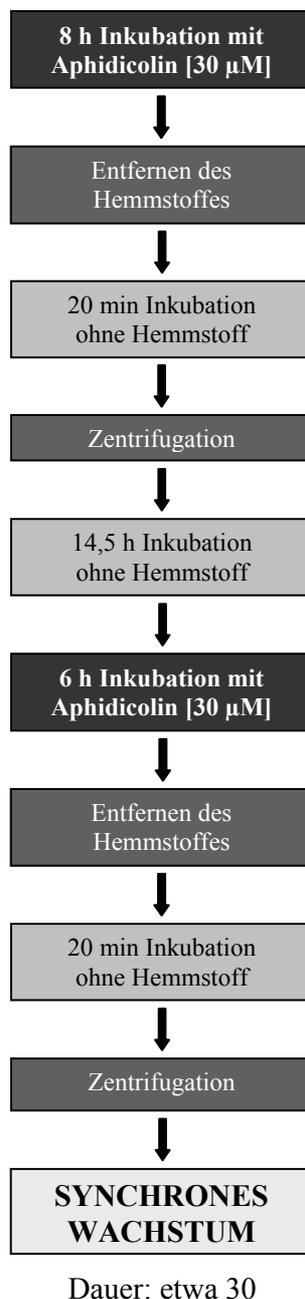


Abbildung 18: Schematischer Ablauf der zweistufigen Synchronisationsprozedur

Durch Optimierung der einzelnen Schritte konnte aus der zeitaufwendigen 2-Schritt-Prozedur eine effektive 1-Schritt-Prozedur entwickelt werden, die es erlaubt, eine *H. salinarum*-Kultur innerhalb von 5 Stunden zu synchronisieren. Von entscheidender Bedeutung für die Optimierung war das ausschließliche Verwenden von auf die Wachstumstemperatur von 42°C vorgewärmten Mediums, sowie die Verwendung von auf 42°C temperierten Kulturgefäßen, Zentrifugenröhrchen, Glaspipetten sowie des Rotors. Auf diese Weise konnte verhindert werden, dass die Zellen neben der Zentrifugation auch noch durch einen Temperaturgradienten beeinflusst wurden. Um mit einer möglichst homogenen Population arbeiten zu können, wurde die Startkulturen ausschließlich mit einzelnen Kolonien inokuliert und durch fortlaufende Verdünnungsschritte für mindestens 30 Generationen in der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. In Abbildung 19 ist ein Überblick über das endgültige Synchronisationsprotokoll gegeben.

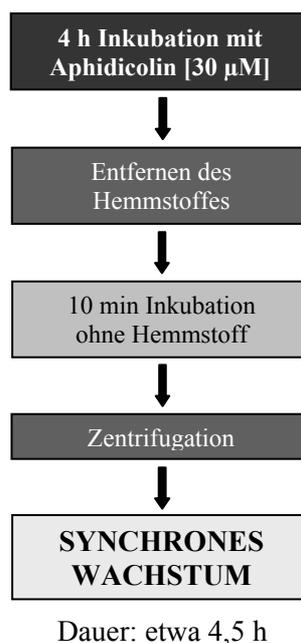


Abbildung 19: Schematischer Ablauf der einstufigen Synchronisationsprozedur

Als ein Beispiel soll hier ein typisches, mit Methode 2 durchgeführtes Experiment beschrieben werden: 20 ml einer exponentiell wachsenden *H. salinarum*-Kultur wurden mit einer Endkonzentration von 30 µM Aphidicolin versetzt und vier Stunden bei 42°C inkubiert,

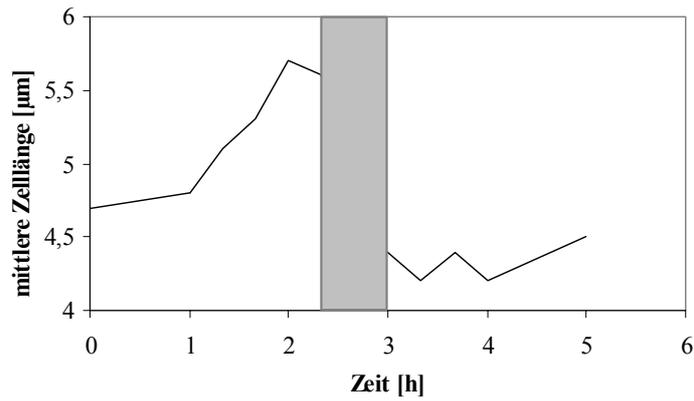
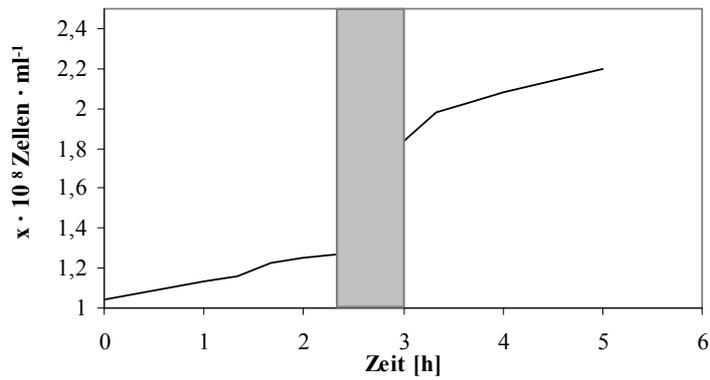
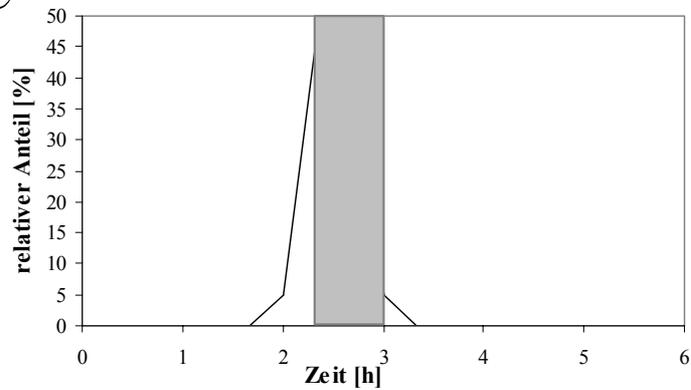
bis die Zellen von 3,2 μm Zelllänge auf 4,7 μm angewachsen waren. Dies entspricht etwas weniger als der doppelten Durchschnittslänge, die *H. salinarum*-Zellen aufweisen, die ohne Aphidicolin in der exponentiellen Phase bei den verwendeten Wachstumsbedingungen wachsen. Danach wurde der Hemmstoff durch Zentrifugation entfernt und anschließend der Grad der Synchronisation durch das Messen der Zelldichte, sowie der mittleren Zelllänge bestimmt.

Die Konsequenzen der Aphidicolinbehandlung sind in den Abbildungen 20 dargestellt. Die mittlere Zelllänge nahm für die ersten zwei Stunden nach Entfernen des Aphidicolins weiterhin zu. Innerhalb der nächsten 40 Minuten hingegen sank sie deutlich ab, was auf eine synchrone Zellteilung hindeutet (Abbildung 20A). Ein zweiter Parameter, die Zelldichte, ergab das gleiche Ergebnis (Abbildung 20B). Die Zelldichte nahm innerhalb der ersten zwei Stunden nach Entfernen des Inhibitors nicht zu. Im Gegensatz dazu änderte sich die Zelldichte innerhalb der folgenden Stunde drastisch. In Abbildung 20D sind mikroskopische Bilder von Aliquots gezeigt, die zu den angegebenen Zeitpunkten aus der synchronisierten *H. salinarum*-Kultur entnommen wurden. Während der ersten beiden Stunden nach Entfernen des Inhibitors ist kaum Zellteilung zu beobachten. Beachtlich ist der hohe Anteil an Zellen bei 2 Stunden 20 Minuten und 2 Stunden 40 Minuten, die sich sichtbar im Prozess der Teilung befinden. Für mehrere Stunden finden nachfolgend nahezu keine Zellteilungen mehr statt.

Um die Anzahl der sich teilenden Zellen zu quantifizieren wurden in regelmäßigen Abständen Proben aus der Kultur entnommen. Von jeweils 100 zufällig ausgewählten Zellen wurde anschließend die Anzahl der Zellen mit sichtbaren Einschnürungen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 20C dargestellt. Zum Zeitpunkt 2 Stunden 20 Minuten teilen sich 45 % der Zellen. Insgesamt befinden sich in einem Zeitraum von 20 Minuten, nämlich von 2 Stunden 20 Minuten bis 2 Stunden 40 Minuten 80 % der Zellen in Teilung. Anhand der Anzahl der Zellen, die sich in einer unbehandelten Kultur in Teilung befinden, das sind 3,7 %, und der Generationszeit von 4 Stunden, kann die Dauer des Teilungsprozesses bestimmt werden. Unter den verwendeten Wachstumsbedingungen ergibt sich für den Teilungsprozess von *H. salinarum* eine Zeitdauer von 8,8 Minuten. Der Teilungsprozess erfolgt zügig, so dass anzunehmen ist, dass die beobachteten Zellen, die gerade ihre Teilung vollziehen, damit erst kürzlich begonnen haben und den Prozess schon bald wieder abschließen werden. Innerhalb von 20 Minuten erfolgt in 80 % der Zellen die Teilung.

Zusammenfassend zeigen diese drei Parameter, dass die neu eingeführte Prozedur zu einer hohen Zellzyklussynchronität der *H. salinarum*-Kultur führt. Daher ist die Methode ideal für die Untersuchung von Zellzyklus abhängigen Prozessen, wie z.B. der Charakterisierung

morphologische Veränderungen oder der Transkriptanalyse bzw. der Bestimmung von Mengenänderungen spezifischer Proteine geeignet.

A**B****C**

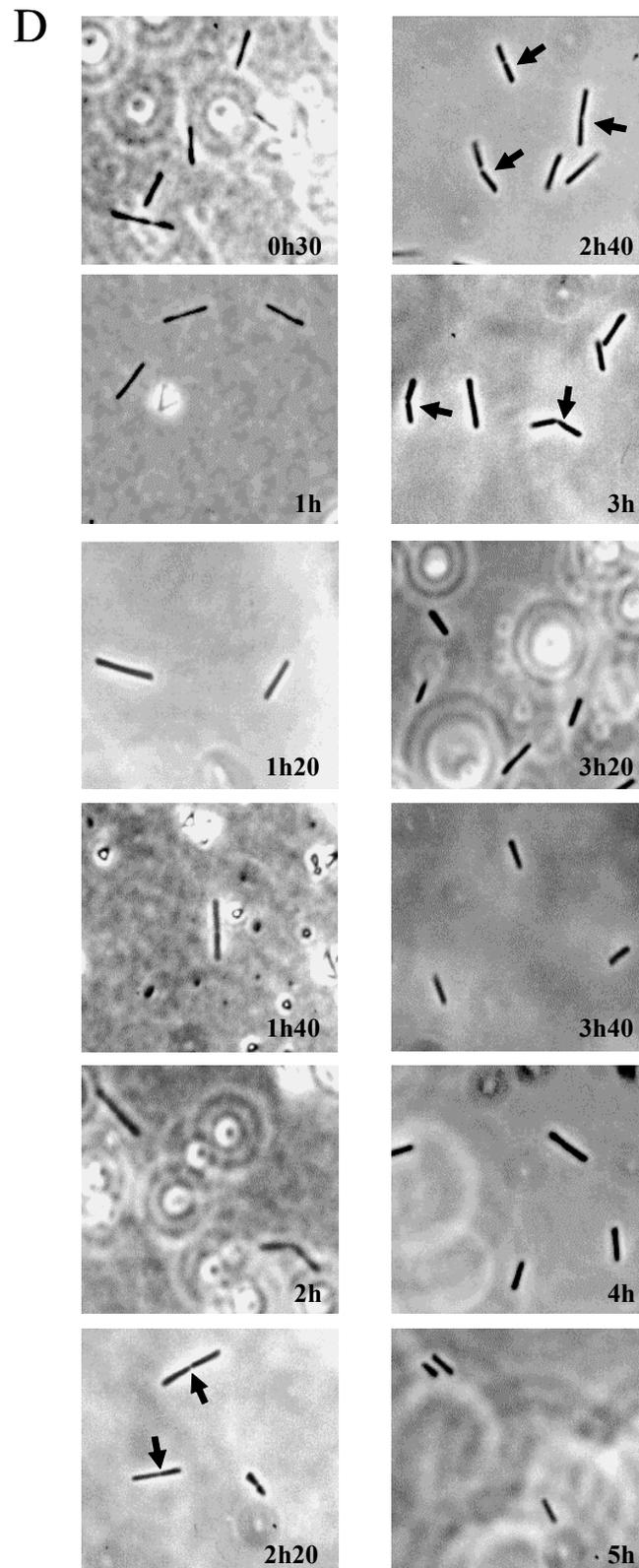


Abbildung 20: Synchronisation von *H. salinarum*

(A) Änderung der mittleren Zelllänge nach Entfernen des Aphidicolins. Für jeden der Messpunkte wurde die Länge von 50 Zellen gemittelt. (B) Zelldichten zu unterschiedlichen Zeiten nach Entfernen des Inhibitors. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer Zählkammer. (C) Anteil der eingeschnürten Zellen. Zu jedem Zeitpunkt wurde von 100 Zellen der Anteil der Zellen mit einer sichtbaren Einschnürung bestimmt. (D) Mikroskopische Aufnahmen typischer Zellen der jeweils angegebenen Zeiten der Probenentnahme. Mit Pfeilen sind Zellen markiert, die sichtbare Einschnürungen aufweisen.

4.6 Zellteilung nach Entfernen des Inhibitors

Wurden *H. salinarum* Kulturen mehrere Stunden mit dem Inhibitor Aphidicolin behandelt und der Hemmstoff anschließend durch Zentrifugation aus dem Kulturmedium entfernt, so hatten die Zellen je nach Inkubationsdauer und Aphidicolincharge mittlere Zelllängen von 4,8 bis zu 6,4 μm . Ein Weiterwachsen ohne Inhibitor führte anschließend zwangsläufig zum Einsetzen der Zellteilung. Je nachdem, wie lange die Zellen zuvor unter Einfluss des Aphidicolins gewachsen waren, setzte die Zellteilung der Zellen nach 1 Stunde 40 Minuten bis 2 Stunden 20 Minuten ein. Diese beobachtete Abhängigkeit des Beginns der Teilungsereignisse von der mittleren Zelllänge der Kultur nach Aphidicolinbehandlung ist in Abbildung 21 graphisch dargestellt. Bei mittleren Zelllängen von 4,8 μm und 5,2 μm setzte die Zellteilung nach 2 Stunden und 20 Minuten ein, mittlere Zelllänge von 5,6 und 5,9 μm hingegen führten zu einem Beginn der Zellteilung nach 2 Stunden Inkubation ohne den Inhibitor. Die Inkubation der Zellen bis zu einer mittleren Zelllänge von 6,1 μm bis 6,4 μm verlegte das Einsetzen der Teilungsereignisse um weitere 20 Minuten nach vorne. Die Aphidicolinbehandlung bis zu längeren mittleren Zelllängen hatte jedoch auch zu Folge, dass die Zellen sich in einem größeren Zeitraum teilten und daher nicht den gleichen Grad an Synchronität erreichten, den sie bei einer mittleren Zelllänge von 4,8 μm erlangten.

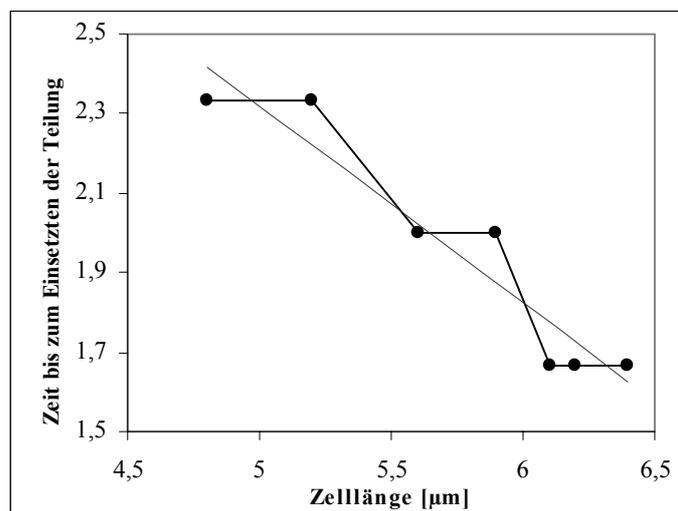


Abbildung 21: Zellteilung nach Entfernen des Inhibitors

H. salinarum Kulturen wurden in Aphidicolin haltigem Medium bis zum Erreichen verschiedener mittlerer Zelllängen inkubiert. Anschließend wurde das Aphidicolin gewaschen. Im Verlauf der Synchronisation wurde protokolliert, wann die Masse der Zellen mit der Teilung beginnt.

5. Zellzyklus-abhängige Expression von *sph1* und weiteren Zellzyklusgenen von *H. salinarum*

5.1 Transkriptanalyse

Mit synchronisierten *H. salinarum*-Kulturen wurde die Transkriptakkumulation von *sph1* während des Zellzyklusses untersucht. Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass das *sph1*-Transkript nur während einer bestimmten Phase des Zellzyklusses gebildet wird (Daten nicht gezeigt), wurde der Versuch auf die Verwendung weiterer Sonden und die Anwendung höherer zeitlicher Auflösung ausgeweitet. Dazu wurde die zunächst verwendete zeitliche Auflösung im „interessanten“ Zeitbereich erhöht indem die Probenentnahme nicht mehr stündlich sondern im Abstand von 20 Minuten erfolgte. Dadurch wurde ermöglicht, die differentielle Transkription noch genauer zu verfolgen.

Mehr als eine Stunde nach Entfernen des Aphidicolins war kein oder nahezu kein Transkript nachweisbar. Im Vergleich dazu war die spezifische *sph1* Transkriptmenge zum Zeitpunkt 1 Stunde 40 Minuten deutlich erhöht, so dass von einer abrupten Induktion der Transkription auszugehen ist (Abbildung 22). Diese findet möglicherweise nach dem Passieren eines bislang noch unbekanntes Zellzyklus Kontrollpunktes statt. Das Transkriptlevel bleibt für etwa 1,5 Stunden hoch, mit einem schwach ausgeprägten Maximum bei 2 Stunden 40 Minuten. Zum Zeitpunkt 3 Stunden 20 Minuten ist das Transkriptlevel immer noch hoch, fällt dann jedoch innerhalb der nächsten 20 Minuten unterhalb der Nachweisgrenze. Danach ist kein Transkript mehr nachweisbar. Folglich wird die Transkription von *sph1* herabgesetzt. Die *sph1* mRNA ist daher entweder außergewöhnlich instabil oder wird spezifisch abgebaut. *Sph1* wird deutlich in Zellzyklus-abhängiger Weise auf der Transkriptionsebene reguliert.

Ein Zellzyklusabhängiges Transkriptionsmuster wurde auch für drei weitere Gene nachgewiesen (Abbildung 22). Die Transkription des *hp24* Gens ist im Zellzyklus von *H. salinarum* stark reguliert. Die *hp24* Transkriptmenge steigt allerdings schon kurz nach entfernen des Aphidicolins an und erreicht sein Maximum bereits nach 1 Stunde synchronen Wachstums der Kultur. Mit dem Beginn der *sph1* Transkription nimmt das *hp24* Transkript wieder ab. Während die in der stationären Wachstumsphase überwiegende Expression von *cdcH* an einer möglichen Beteiligung am Zellzyklus zweifeln ließ, ist die Transkriptmenge deutlich in Zellzyklus abhängiger Weise reguliert. Die Regulation erfolgt dabei in ähnlicher Weise wie die von *sph1*, jedoch erfolgt die Induktion erst zu einem späteren Zeitpunkt und ein geringer Anteil *cdcH* spezifischer mRNA ist auch in nicht induzierten Zellzyklus-Phasen vorhanden (Abbildung 22). Im Gegensatz zu den eben erwähnten Beispielen ist *ftsZ* nicht

streng Zellzyklus reguliert, jedoch kann im gesamten Verlauf des Experimentes eine allmähliche Zunahme der Transkriptmenge verzeichnet werden. Die Entdeckung vier verschiedener Transkriptmuster unterstreicht 1) die hohe Synchronität der Kultur und 2) dass die zeitliche Auflösung hoch genug ist um zwischen einer Vielzahl verschiedener Schritte im haloarchaealen Zellzyklus zu unterscheiden.

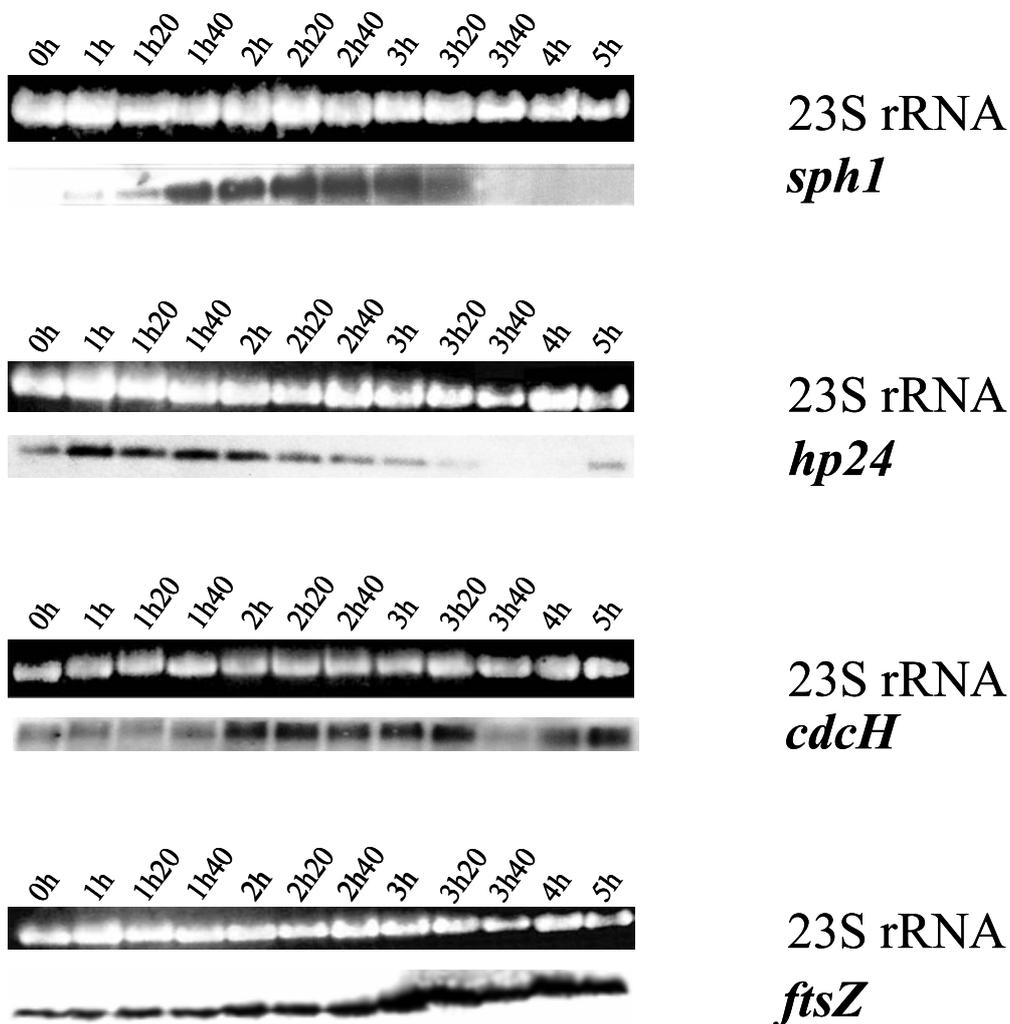
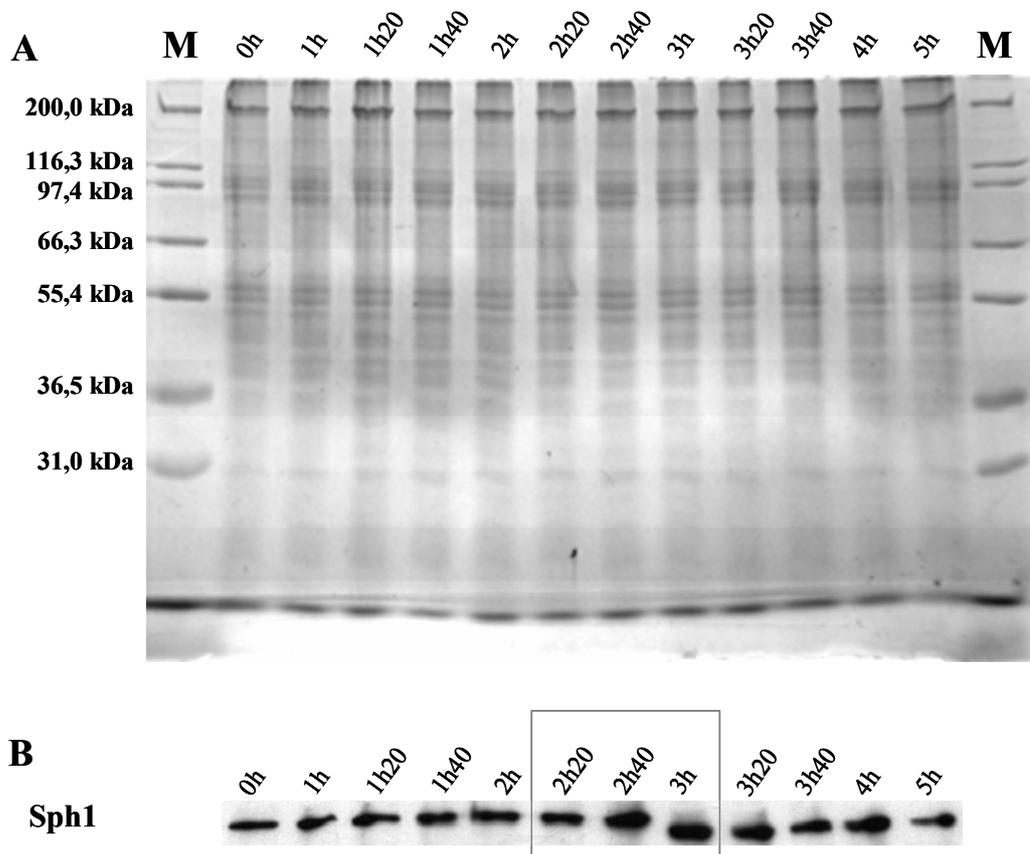


Abbildung 22: Transkription in Abhängigkeit des Zellzyklusses von *H. salinarum*
Northern Blot Analysen ausgewählter Zellzyklusgene. Die Proben in regelmäßigen Abständen aus einer synchronisierten *H. salinarum*-Kultur entnommen, Gesamt-RNA isoliert, jeweils 3 µg Gesamt-RNA auf jede Spur aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Um die gleichmäßige Beladung der Spuren wiederzugeben ist über jedem Northern Blot die Ethidiumbromid gefärbte 23S rRNA gezeigt. Nach Northern Transfer wurden die Membranen mit den in der Abbildung angegebenen spezifischen Sonden hybridisiert (von oben nach unten: *sph1*, *hp24*, *cdcH*, *ftsZ*).

5.2 Proteinakkumulation

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Transkriptanalyse auf Proteinebene bestätigt werden können, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt (Abbildung 23A und B). Im Gegensatz zum Transkript ist das Protein während des gesamten Zellzyklusses vorhanden. Halbquantitative Bestimmung des Proteinlevels ergab jedoch, dass die Proteinmenge trotzdem Zellzyklus abhängig variiert und zur Zeit der höchsten Transkriptionsinduktion ebenfalls erhöht ist. Allerdings ist die Variation nur zweifach und stimmt nicht genau mit dem Transkriptionsprofil überein, d.h. zwischen 1 Stunde 40 Minuten und 2 Stunden 20 Minuten ist das Transkriptlevel sehr hoch und das Proteinlevel ist im Vergleich zum Zeitpunkt 0 Stunden nur unwesentlich erhöht. Nach drei Stunden nimmt die Proteinmenge deutlich ab, so dass neben der mRNA auch das Protein instabil ist oder spezifisch abgebaut wird, so dass nur etwa die Hälfte der maximal vorhandenen Sph1 Menge bestehen bleibt (Abbildung 23C). Das Expressionsmuster von Sph1 deutet darauf hin, dass es eine bedeutende biologische Funktion um bzw. und/oder kurz nach der Septumbildung einnimmt. Während des restlichen Zellzyklusses hat es möglicherweise eine weitere Funktion, die ein basales Proteinlevel benötigt oder es ist durch einen bislang unbekanntem posttranslationalen Regulationsprozess inaktiviert.



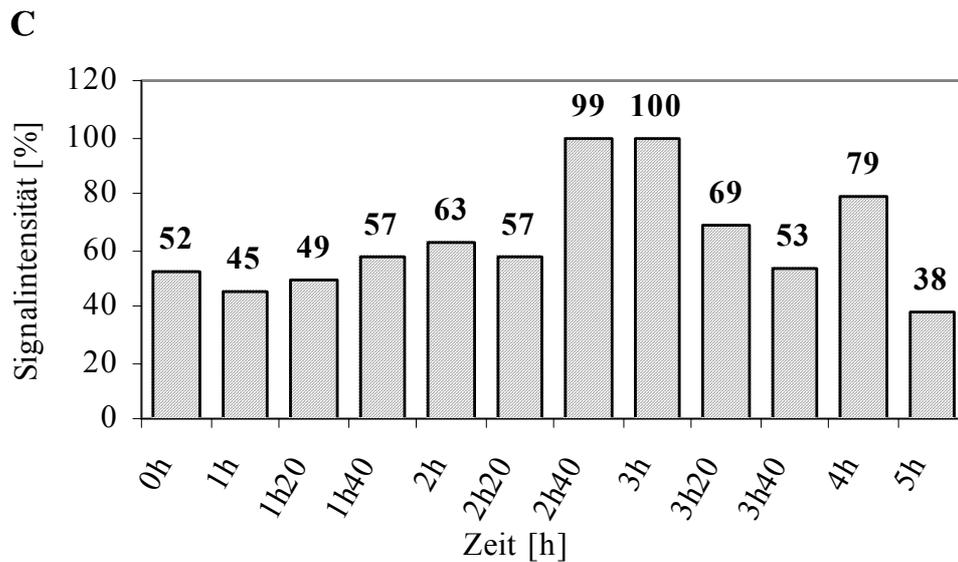


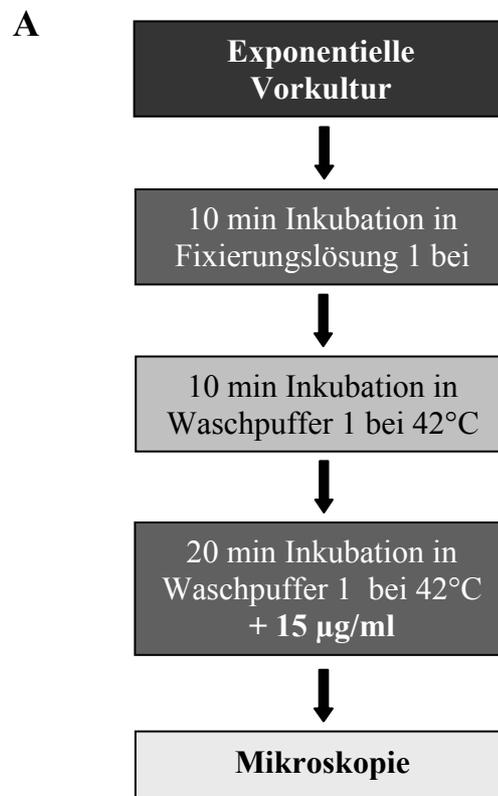
Abbildung 23: Zellzyklus abhängige Sph1 Akkumulation

(A) Während des synchronen Wachstums einer *H. salinarum* Kultur wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und jeweils 10 µg der entsprechenden Rohextrakte auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größen des Molekulargewichtsstandards [M] sind jeweils angegeben. (B) Das Gel wurde geblottet und mit einem anti-Sph1-Antikörper wurden die Sph1 Akkumulation ermittelt. Der Blot wurde gescannt und die relative Signalintensitäten ermittelt und (C) in einem Balkendiagramm gegen die Zeit aufgetragen. Das Signal mit der höchsten Intensität wurde mit 100 % gleichgesetzt.

6. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von synchronisierten *H. salinarum*-Kulturen wurden angestrebt, um die Zellzyklus abhängige differentielle intrazelluläre Lokalisation des Chromosoms zu untersuchen und die Ergebnisse mit den bereits erhaltenen Expressionsprofilen zu vergleichen. Als Grundvoraussetzung wurden zwei Methoden zur Fixierung von *H. salinarum*-Zellen und anschließender Färbung der chromosomalen DNA entwickelt. Unterschiedliche DNA Farbstoffe wurden erprobt: DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol), PicoGreen™ und Hoechst 33342. Da die verschiedenen DNA Farbstoffe auf unterschiedliche Weise an die DNA binden, wurde zunächst eine Reihe von Farbstoff Konzentrationen getestet. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die DNA unter den verwendeten Bedingungen mit Farbstoff gesättigt ist. Mit Hilfe eines auf der fixierenden Wirkung von Glutardialdehyd basierenden Fixierungsprotokolls (Abbildung 24A) und anschließender DAPI-Färbung konnten zunächst erste Foci in Zellen von *H. salinarum* detektiert werden. In fast allen beobachteten Zellen füllten die vermeintlichen Nukleoide die

gesamte Zelle aus (Daten nicht gezeigt). Nur in einzelnen Fällen konnten distinkte Foci beobachtet werden (Abbildung 24B).



B

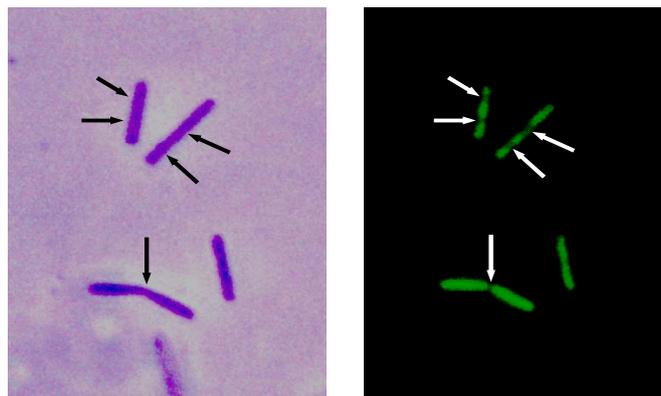


Abbildung 24: Fixierung von *H. salinarum* Zellen und Färbung der intrazellulären DNA (Protokoll 1)

(A) Schematischer Ablauf des Fixierungs- und Färbeprotokolls.

(B) Aus einer exponentiell wachsenden *H. salinarum* Kultur wurde ein Aliquot entnommen und wie im Versuchsablauf dargestellt behandelt. Die Zellen wurden auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht und mikroskopiert. Die erhaltenen DNA-spezifischen Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe des Programms Corel Select Edition mit dem Phasenkontrastmikroskopischen Bild überlagert.

Daraufhin wurde ein anderes Fixierungsprotokoll etabliert (Abbildung 25A), das mit entsprechend geringerer Salzkonzentration im Fixierungspuffer für *H. volcanii*-Zellen schon gute Ergebnisse gebracht hatte (Poplawski *et al.*, 2000). Nach anschließender Färbung der DNA mit Hoechst 33342 konnte eine deutlich verbesserte Darstellung der DNA erzielt werden (Abbildung 25B).

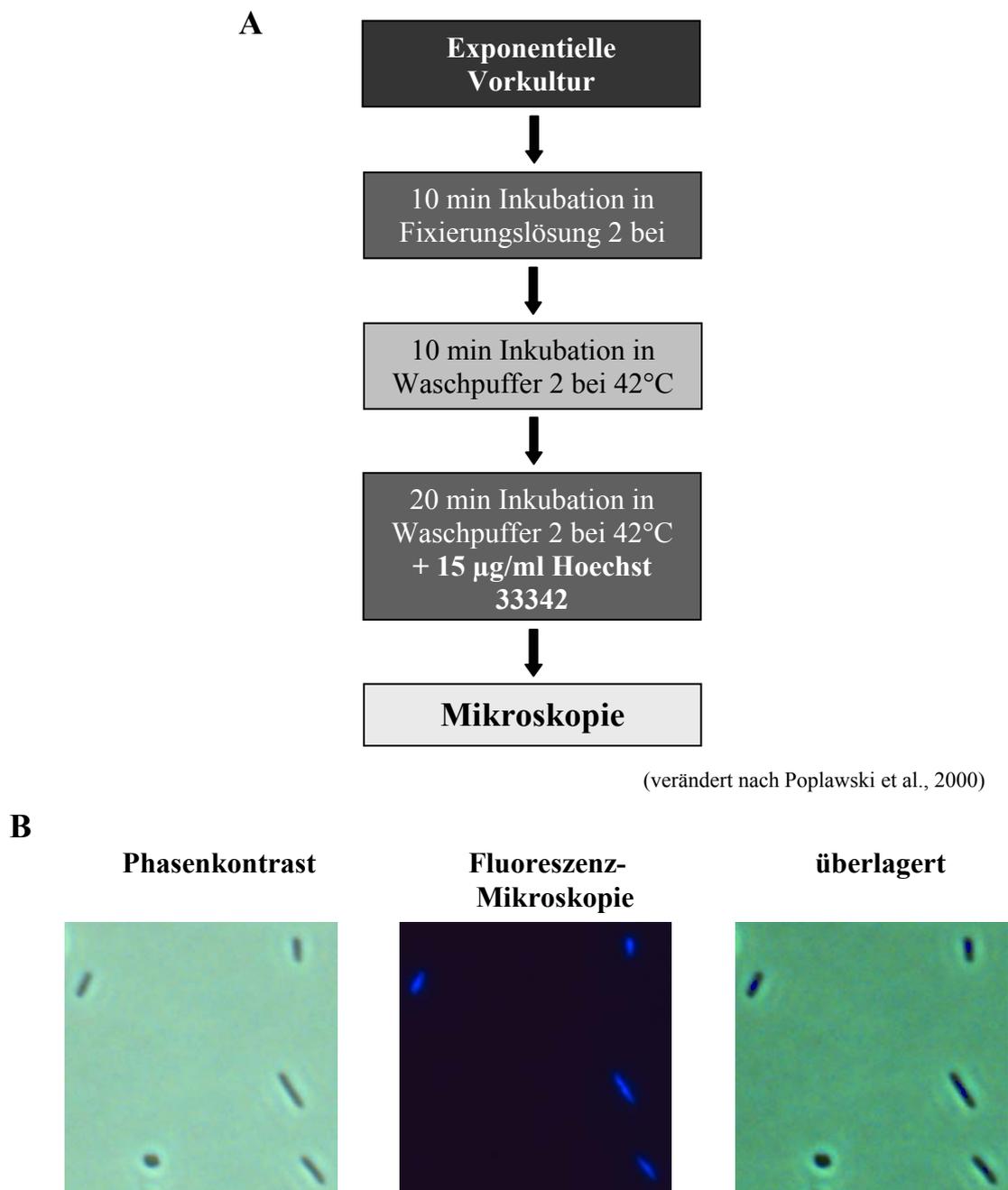


Abbildung 25: Fixierung von *H. salinarum* Zellen und Färbung der intrazellulären DNA (Protokoll 2)

(A) Schematischer Ablauf des Fixierungs- und Färbeprotokolls.

(B) Aus einer exponentiell wachsenden *H. salinarum* Kultur wurde ein Aliquot entnommen und wie im Versuchsablauf dargestellt behandelt. Die Zellen wurden auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht und mikroskopiert. Die erhaltenen DNA-spezifischen Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe des Programms Corel Select Edition mit dem Phasenkontrastmikroskopischen Bild überlagert.

So konnten in einer exponentiell wachsenden *H. salinarum*-Kultur verschiedene Verteilungsmuster der DNA in den Zellen beobachtet werden (Abbildung 26).

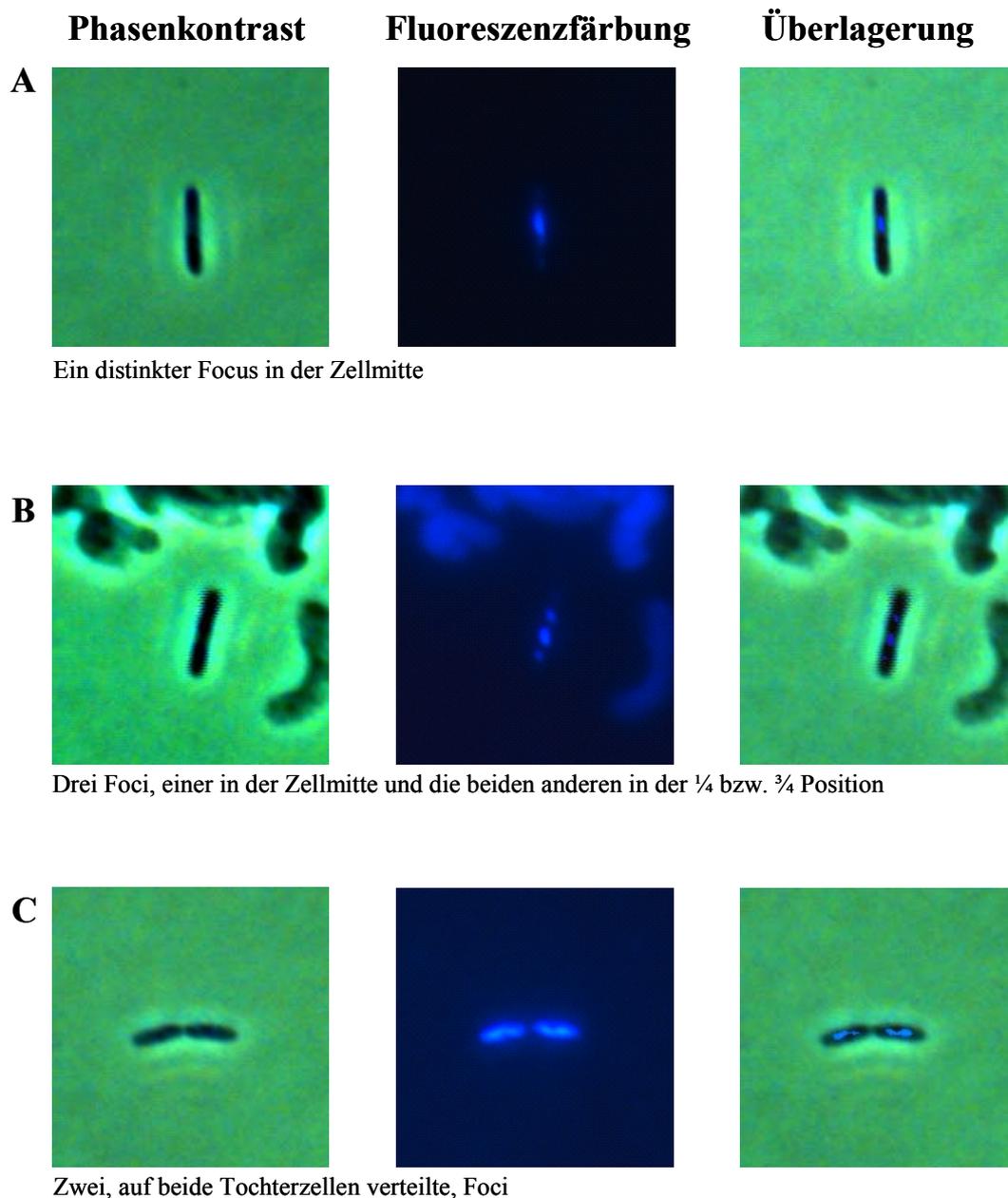


Abbildung 26: Dynamische Intrazelluläre DNA-Lokalisation

Aus einer *H. salinarum* Kultur wurde ein Aliquot entnommen und gemäß des in Abbildung 25 aufgeführten Protokolls die Zellen fixiert und die intrazelluläre DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Dabei konnten unterschiedliche Verteilungen der DNA in der Zelle beobachtet werden (A-C).

Um zu überprüfen, ob sich die DNA Lokalisation tatsächlich in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen ändert, wurde eine *H. salinarum*-Kultur synchronisiert. Aliquots, die in regelmäßigen Abständen aus der synchronisierten Kultur entnommen wurden, wurden fixiert

und die DNA mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Aus jeder der Proben wurde die Lokalisation der DNA in 50 zufällig ausgewählten Zellen protokolliert. Jeweils zwei für jeden Zeitpunkt typische Zellen sind in Abbildung 27A gezeigt. Dabei wiesen mindestens 35 der 50 beobachteten Zellen ($\geq 70\%$) die gezeigte Lokalisation der DNA auf. Zum Zeitpunkt der Aphidicolinentfernung ist die DNA in der ganzen Zelle verteilt. Nach 1 Stunde 20 Minuten ist sie bereits in der Zellmitte kondensiert. Daher findet in *H. salinarum* die Replikation vermutlich ebenfalls an einem fixierten Punkt in der Zellteilungsebene statt, so wie es für *B. subtilis* kürzlich gezeigt wurde und für weitere Bacteria schon seit längerem vermutet wird.

Nach 1 Stunde 40 Minuten können drei fluoreszierende Foci in den Zellen ausgemacht werden, einer in der Zellmitte und die anderen beiden bei ungefähr $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ der Zelle. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einem gebräuchlichen Modell, dass neu replizierte DNA aktiv vom Platz der Replikation zu den Zellmittelpunkten der zukünftigen Tochterzellen transportiert wird. Nach 2 Stunden ist der Focus in der Zellmitte verschwunden, so dass die Replikation zumindest als nahezu abgeschlossen gelten kann. Nach 2 Stunden 20 Minuten sind die beiden neu entstandenen Nukleotide deutlich voneinander entfernt und sind auf nahezu die gesamte neu entstehende Tochterzelle verteilt, jedoch nicht in der Zellmitte oder an den Zellpolen nachweisbar. Nach 2 Stunden 40 Minuten befinden sich viele Zellen immer noch in Teilung, es häufen sich allerdings die aus Teilungen hervorgegangenen, deutlich kleineren Zellen in der Kultur an.

Um auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten intrazellulären Lokalisation der DNA um ein Synchronisationsartefakt handelt, dass nur in Aphidicolin behandelten Zellen auftritt, wurde die intrazelluläre Lokalisation der DNA auch in Zellen einer Wildtyp Kultur bestimmt. Alle in Zellen der synchronisierten Kultur nachgewiesenen Färbemuster konnten auch in Zellen der unbehandelten Kultur beobachtet werden (Abbildung 27B). Folglich sind die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie nicht auf ein Synchronisationsartefakt zurückzuführen. Diese Bilderserie gibt erstmals Einblick in das dynamische Verhalten der DNA in einem Archaeon und erlaubt die Korrelation mit weiteren Zellzyklusereignissen. Anhand der Daten wird deutlich, dass die intrazelluläre Lokalisation der DNA einer strikten zeitlichen und räumlichen Kontrolle unterliegt.

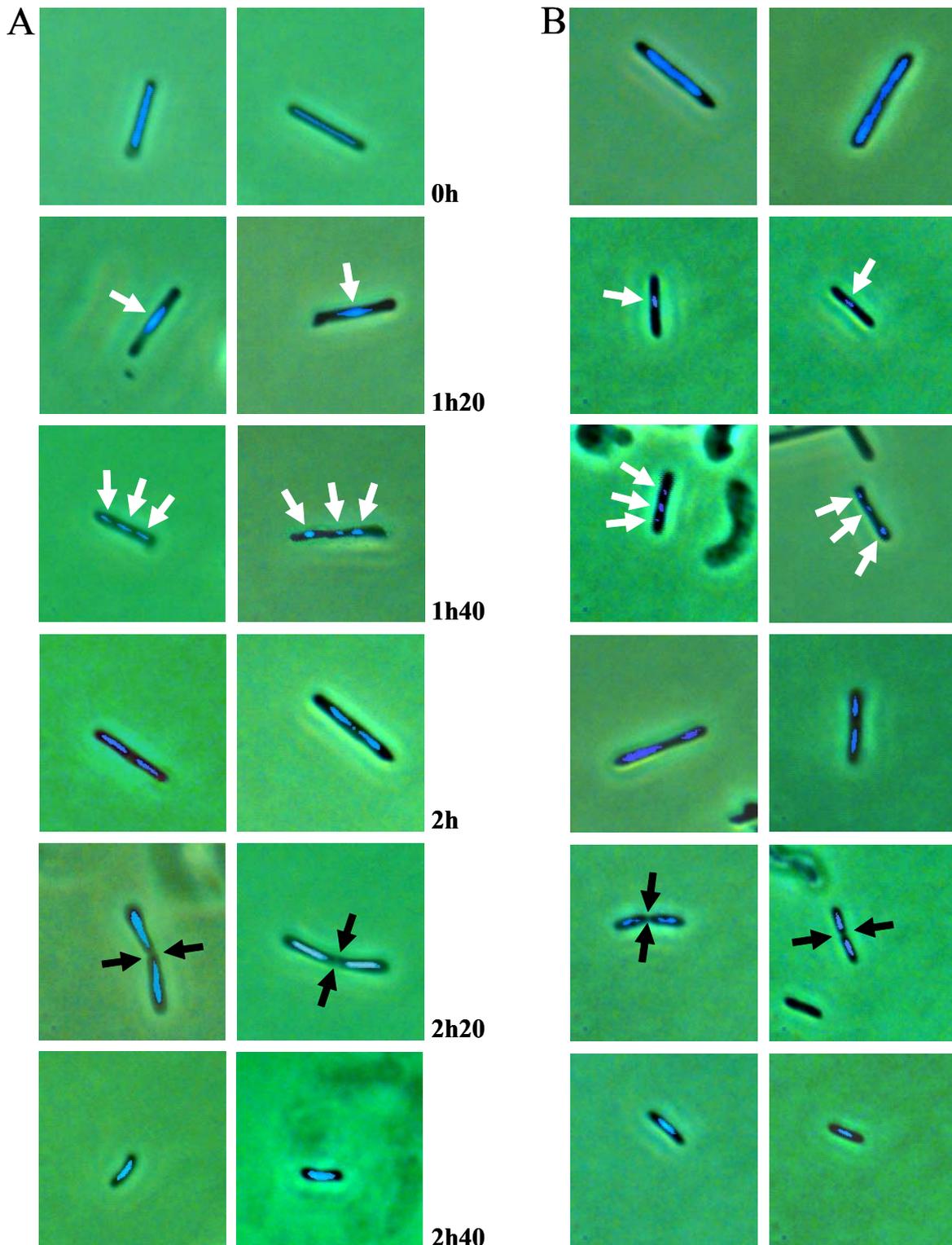


Abbildung 27: Dynamische intrazelluläre Lokalisation der DNA

(A) Aus einer synchronisierten Kultur wurden zu den angegebenen Zeiten Aliquots entnommen. Die Zellen wurden fixiert und die DNA mit Hoechst 33342 gefärbt. Für jeden der Zeitpunkte sind zwei typische Zellen gezeigt. In einigen Fällen ist die Position der DNA mit einem weißen Pfeil angegeben oder die Zellmitte mit schwarzen Pfeilen markiert.

(B) Um auszuschließen, dass die in (A) gezeigte DNA Lokalisation ein Synchronisationsartefakt darstellt, wurden aus einer exponentiell wachsenden *H. salinarum* Kultur ebenfalls ein Aliquot entnommen, die Zellen fixiert und die DNA angefärbt. Alle während der Synchronisation beobachteten DNA-Verteilungen konnten auch in Zellen beobachtet werden, die einer unbehandelten Kultur entstammten.

7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

7.1 Wachstum in Kapillaren

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben zum Ziel, die örtliche Auflösung, die die Methode bietet, mit der zeitlichen Auflösung der Synchronisationsmethode zu verknüpfen. Bei einer Reihe von archaealen Arten hat es sich als Vorteil erwiesen, die Zellen vor elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Kapillaren wachsen zu lassen (Rieger *et al.*, 1997). Erstens wachsen die Zellen zu höheren Zelldichten, und zweitens können Zentrifugationsschritte bei der Präparation und damit einhergehende Zellschädigungen vermieden werden. Da für das Projekt die möglichst native Erhaltung aller Strukturen innerhalb der Zelle von großer Bedeutung war, wurde untersucht, ob diese Methode auch mit *H. salinarum* verwendet werden kann. Zunächst wurden die Zellen in die Kapillaren eingefüllt, an beiden Enden mit einer heißen Pinzette verschmolzen und in steriles Kulturmedium überführt. Vergleichbar mit anderen Arten wächst *H. salinarum* in Kapillaren zu deutlich höheren Zelldichten als in Flüssigkulturen. Durch anschließendes Herausdrücken der Flüssigkeit aus den Kapillaren und Ermittlung der Zelldichte wurde bestimmt, dass diese mehr als 10^{10} Zellen/ml erreicht. Allerdings wurde auch festgestellt, dass die Zellen in parallel beimpften Kapillaren oder sogar an verschiedenen Stellen innerhalb einer Kapillare nicht gleichmäßig schnell wachsen. Gründe dürften der Einschluss kleiner Luftblasen sein, die zu variierenden Sauerstoffkonzentrationen führen könnte, oder ungleichmäßige Diffusionsraten in verschiedenen Bereichen der Kapillaren, wodurch Unterschiede in der Nährstoffversorgung entstehen würden. Diese ungleichmäßige Verteilung der Zellen in den Kapillaren und das damit einhergehende ungleichmäßige Wachstum der Kultur machte es unmöglich in Kapillaren kultivierte Kulturen zu synchronisieren. Daher wurde versucht, die Zellen in Flüssigkultur wachsen zu lassen, durch Zentrifugation zu konzentrieren und anschließend in Kapillaren aufzusaugen. Der lichtmikroskopische Vergleich der Zellen vor und nach der Behandlung ließ keinerlei Unterschiede erkennen, so dass für die bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen auf die Zellzucht in Kapillaren verzichtet wurde.

7.2 Lokalisation von Sph1 in *H. salinarum*

Eine Kultur von *H. salinarum* wurde synchronisiert und es wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, konzentriert, in Kapillaren überführt und eingefroren. Dazu wurde die Hochdruckschnelleinfrierung gewählt. Dabei wurden Zellen unter Hochdruck mit einer Abkühlrate von mehr als 5000 °K je Sekunde eingefroren (Hohenberg *et al.*, 1994). Die Proben wurden dann in gekühltem Zustand (-196°C) gelagert und anschließend für die

Elektronenmikroskopischen Untersuchungen vorbereitet. Die chemische Fixierung der Zellen und die Substitution des Wassers durch Ethanol erfolgte in Temperaturschritten von -90°C bis -20°C , da auf diese Weise der höchste Erhaltungsgrad der Zellen erzielt werden sollte. Für die anschließende Einbettung wurden zwei verschiedene Kunstharze verwendet (Lowicryl und Epon/Araldit). Aus den eingebetteten Präparaten wurden anschließend mit dem Mikrotom Ultradünnschnitte angefertigt und diese unter dem Elektronenmikroskop betrachtet. Abbildung 28 zeigt Dünnschnitte von Zellpräparaten, die auf die beschriebene Weise erstellt wurden. Das Zytoplasma ist gleichmäßig kontrastiert und es sind keine Entmischungen zu erkennen. Es ergab sich ein fundamentaler Unterschied zwischen dem hier durch Hochdruckschnelleinfrierung erzielten Erhaltungsgrad der Zellstruktur und den zuvor erhaltenen Elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei Zimmertemperatur langsam chemisch fixierter *H. salinarum* Zellen (Ruepp *et al.*, 1998). Dieser bedeutende Unterschied in der Strukturerhaltung bildete die Grundlage für die im Anschluss durchgeführte Immunelektronenmikroskopie.

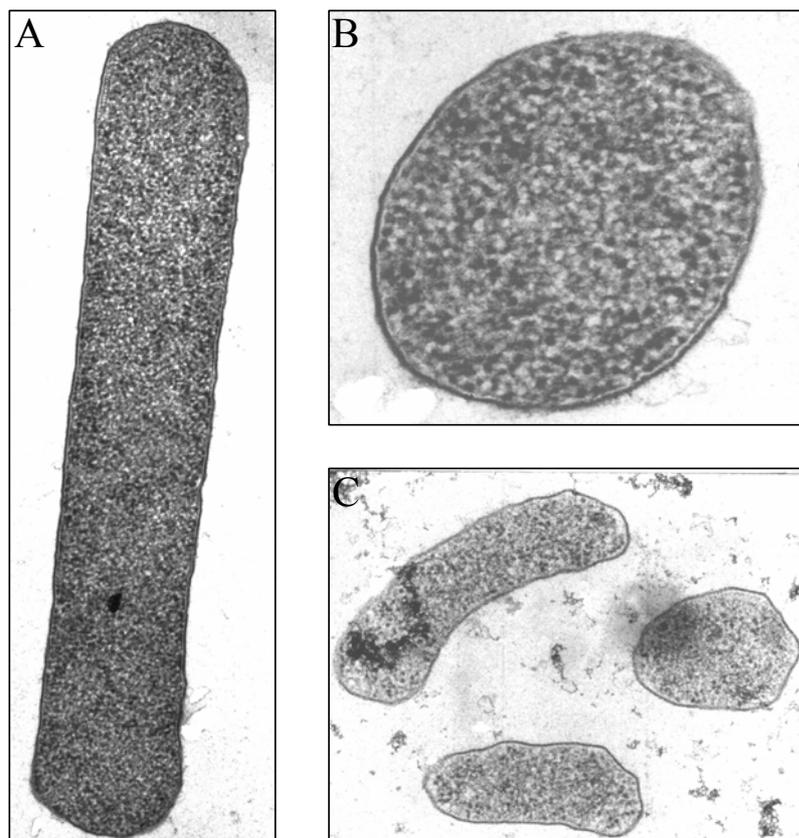


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten von *H. salinarum*

Aus einer *H. salinarum* Kultur wurde ein Aliquot entnommen, die Zellen in Kapillaren überführt und Hochdruckgefroren. Nach Gefriersubstitution wurden die Kapillaren in Kunstharz eingebettet und von den ausgehärteten Blöckchen mit dem Ultramikrotom Dünnschnitte erstellt. Die fixierten Präparate wurden im Elektronenmikroskop betrachtet. (A) Längsschnitt, Vergrößerung 17.000 fach; (B) Querschnitt, Vergrößerung 22.000 fach; (C) Übersicht über mehrere Zellen; Vergrößerung 13.000 fach.

Sph1 wurde unter Verwendung von Proben einer synchronisierten Kultur mit dem vorhandenen Huhn-anti-Sph1-Antikörper in Zellen lokalisiert. In Abbildung 29 sind Dünnschnitte von *H. salinarum* gezeigt, die mit Anti-Sph1_{H6}-Antikörper als primärem Antikörper und einem Gold markierten sekundären Antikörper untersucht worden waren. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit polyklonalen Sph1-spezifischen Antikörpern aus Hühnereiern eine Bindung der Gold konjugierten Antikörper stattfand. Die Antikörperkonzentration wurde so gewählt, dass keine unspezifischen Bindungen an das Kunstharz stattfanden. Die Markierungseffizienz wurde durch Markierung mit Antikörpern, die mit „Ultra-small-Gold“ beladen sind, und anschließende Silberverstärkung gesteigert. Die in vorhergegangenen Versuchen gefundene (Ruepp *et al.*, 1998) relativ gleichmäßige Verteilung auf das Zytoplasma konnte dabei nicht bestätigt werden. Es ist möglich, dass es sich dabei um ein Artefakt aufgrund des geringen Erhaltungsgrades subzellulärer Strukturen bei der chemischen Fixierung handelte.

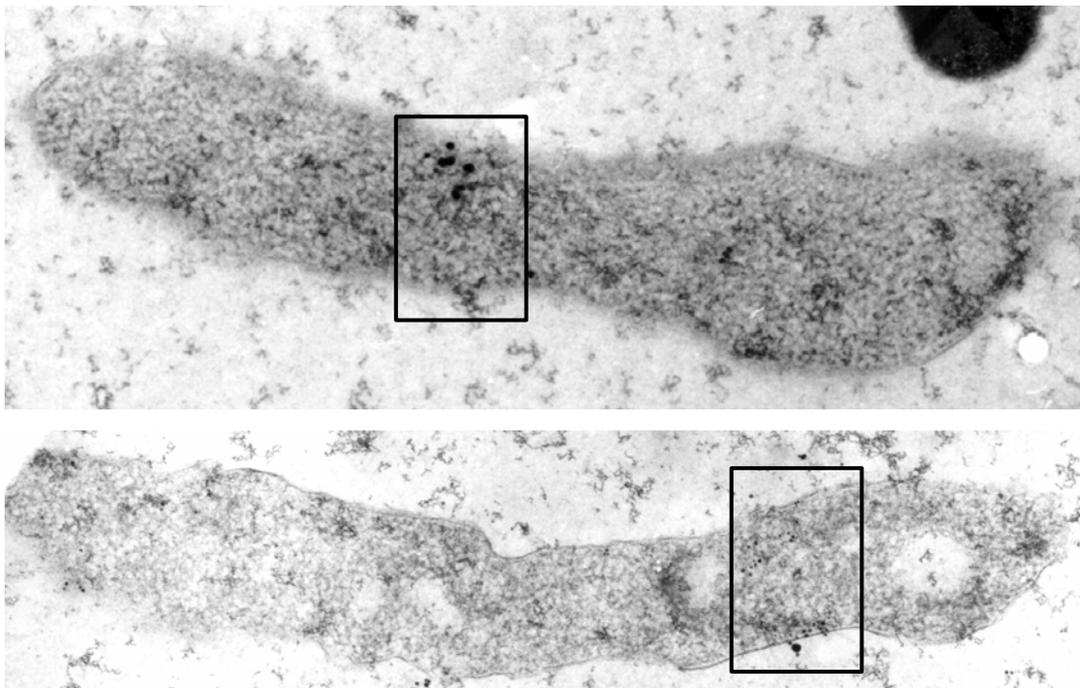


Abbildung 29: Immunogoldelektronenmikroskopie mit Dünnschnitten von *H. salinarum*

Die Dünnschnitte wurden wie in Material und Methoden beschrieben hergestellt und anschließend mit einem spezifischen Huhn-anti-Sph1 Antikörper das Sph1 Protein in der Zelle lokalisiert. Als sekundärer Antikörper diente ein Gold markierter Kaninchen-anti-Huhn Antikörper. Die Goldmarkierung wurde anschließend Silber verstärkt.

Sph1 wurde tatsächlich nur an diskreten Stellen in der Zelle gefunden, wie es bei dem *B. subtilis* SMC-Homolog der Fall ist (Graumann *et al.*, 1998). Die Markierung von bis zu 40

Goldkörnern je Zelle reichte leider nicht aus, um zu erkennen, ob Sph1 an intrazellulären Strukturen beteiligt ist. Weiterhin bleibt zu klären, ob Sph1 im Verlauf des Zellzyklusses an wechselnden Orten in der Zelle zu finden ist und ob es im Bereich des Nukleoids lokalisiert ist.

IV. Diskussion:

Dass Proteine der SMC Familie in Archaea vorkommen wurde durch Arbeiten von Elie *et al.* (1997) an *Sulfolobus solfataricus* bekannt. Das dort entdeckte Gen kodiert für ein Protein der COG 0419 Gruppe der SMC Familie. Durch Analyse der verfügbaren archaealen Genomsequenzen wurden weitere offene Leserahmen gefunden, die ebenfalls für Proteine der SMC Familie kodieren. Bislang ist mit einem Rad50 Homolog aus *Pyrococcus furiosus* nur ein archaeales SMC Protein experimentell untersucht worden (Hopfner *et al.*, 2000). In Übereinstimmung mit den für eukaryale und bakterielle Rad50 Proteine diskutierte Funktionen (Cromie *et al.*, 2001) wurde herausgefunden, dass Rad50 aus *P. furiosus* eine ATP-abhängige Exonuclease Aktivität besitzt. Die vorliegende Arbeit stellt daher die zweite experimentelle Charakterisierung eines archaealen SMC Proteins, nämlich Sph1 aus *H. salinarum*, dar. Von Sph1 war zunächst bekannt, dass die homologe Überproduktion in *H. salinarum* bzw. die heterologe Produktion in *Haloferax volcanii* zur Änderung der Zellgestalt führte. Außerdem deutete die Sekundärstruktur auf eine Verwandtschaft zu eukaryalen Zellzyklusproteinen hin. Daher sollte geklärt werden, ob Sph1 möglicherweise an Zellzyklus-spezifischen Funktionen beteiligt ist und gegebenenfalls selbst im Verlauf des Zellzyklusses differentiell reguliert wird.

1. Änderung der intrazellulären Sph1 Konzentration

Um die biologische Funktion von Sph1 einzugrenzen wurde die intrazelluläre Sph1 Konzentration variiert. Von Ruepp *et al.* (1998) konnte bereits gezeigt werden, dass die homologe Überproduktion von Sph1 in *H. salinarum* zur morphologischen Veränderungen führte. Der Phänotyp war uneinheitlich und instabil, so dass ein konditionaler Sph1 Überexpressionsstammes konstruiert wurde. Zellen die mit dem entsprechenden Plasmid transformiert worden waren hatten den gleichen Phänotyp wie der *H. salinarum* Wildstamm DSM 670. Im Gegensatz zum Wildtyp wurde nach Induktion der *sph1* Expression in der Variante die Zellteilung blockiert. Alle Zellen wuchsen in der Länge während die intrazelluläre Sph1 Konzentration anstieg. Ein vergleichbarer Phänotyp ist auch für die Überproduktion des Zellzyklusproteins PW29 aus der Maus gezeigt worden. Gemeinsam mit zwei SMC Proteinen bildet PW29 einen Komplex. Überproduktion von PW29 führt ebenfalls zur Blockade der Zellteilung. Demzufolge reicht die Anwesenheit einer am Komplex

beteiligten Komponente in erhöhter Konzentration aus, die Zellteilung zu inhibieren (Darwiche *et al.*, 1999). Wie im Fall von Sph1 ist der genaue Mechanismus bislang noch unbekannt.

Da sich die Deletion von *sph1* als letal erweisen könnte, wurde Sph1 in *H. salinarum* konditional depletiert. Der Zellzyklus wurde durch die Induktion der anti-*sph1*-mRNA Synthese blockiert. Da keine Zellteilung erfolgte wuchsen die Zellen in der Länge. Ein entsprechender Phänotyp wurde bei einer *smc* Nullmutante in *C. crescentus* beobachtet. Die Mutation ist konditional letal, so dass die Mutanten nur in Minimalmedium oder bei verminderten Temperaturen wachsen können. Unter diesen Wachstumsbedingungen wächst *C. crescentus* deutlich langsamer als unter optimalen Wachstumsbedingungen. Nur wenn die Zellen verlangsamt wachsen kann also der letale Phänotyp kompensiert werden. (Jensen und Shapiro, 1999). Auch bei *smc* Nullmutanten von *B. subtilis* und *mukB* Nullmutanten von *E. coli* ist der beobachtete Phänotyp konditional letal (Britton *et al.*, 1998; Graumann *et al.*, 1998; Melby *et al.*, 1998; Moriya *et al.*, 1998; Niki *et al.*, 1992; Niki *et al.*, 1991). Ob die Sph1 Depletion durch die Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit ebenfalls Teilungsaktivität aufweist, muss in folgenden Versuchen geklärt werden. Im Gegensatz zu den Zellen des Sph1 Depletionsstamms von *H. salinarum* wachsen die Zellen der *smc* Nullmutante von *C. crescentus* nicht in die Länge. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, die Replikation in allen Zellen abgeschlossen wird und die Chromosomen auf die beiden Zellhälften aufgeteilt vorliegen (Jensen und Shapiro, 1999). In *H. salinarum* wie auch in *C. crescentus* wird vermutlich beim Passieren eines Kontrollpunkts das Fehlen des SMC Proteins bzw. dadurch verursachte Abweichungen des Zellzyklusverlaufs, erkannt. Der Zellzyklus wird daraufhin nicht weiter durchlaufen. Wie diese Detektion von Modifikationen im Zellzyklus durch einen vermeintlichen Kontrollpunkt erfolgt ist weiterhin ungeklärt.

2. Etablierung einer Synchronisationsprozedur

Für die Untersuchung Zellzyklus spezifischer Prozesse in *H. salinarum* wurde eine Synchronisationsprozedur entwickelt. Zur Entwicklung des Synchronisationsprotokolls wurde Aphidicolin, ein Inhibitor der eukaryalen DNA Polymerase II verwendet, von dem bekannt war, dass er den Thymidineinbau und die Zellteilung in *H. salinarum* hemmt (Forterre *et al.*, 1984; Schinzel und Burger, 1984). Für *H. salinarum* war beschrieben, dass eine verlängerte Inkubation mit Aphidicolin zur Bildung von Zellen einer Länge von 40 µm führen kann, was

in etwa dem zehnfachen der mittleren Zelllänge einer unbehandelten Kultur entspricht (Oesterhelt und Marwan, 1987). Während die Zunahme der mittleren Zelllänge durch Aphidicolin bestätigt werden konnte, musste jedoch zur vollständigen Inhibition der Zellteilung einer Kultur die verwendete Aphidicolinkonzentration optimiert werden. Die optimierte Aphidicolinkonzentration von 30 μM eignet sich hervorragend um die Zellteilung exponentiell wachsender Zellen vollständig zu inhibieren; kein offensichtlicher Effekt auf die Transkription, die Translation und andere zelluläre Prozesse wurde beobachtet. Die verwendete Aphidicolinkonzentration von 30 μM ist relativ hoch im Vergleich zu Konzentrationen die für Synchronisationsprozeduren in Säugerzellen (Matherly *et al.*, 1998) verwendet werden, entspricht allerdings etwa den zur Synchronisation von Pflanzenzellen verwendeten Konzentrationen (Planchais *et al.*, 2000). Im Vergleich zu den in *S. solfataricus* benötigten Konzentrationen, ist die in *H. salinarum* eingesetzte Aphidicolinkonzentration gering (Hjort und Bernander, 2001). Erst Konzentrationen von 600 μM Aphidicolin führten in *S. solfataricus* zu einer Verminderung der Wachstumsrate, einer signifikanten Verminderung der Elongationsrate während der Replikation, sowie zur Inhibition der Zellteilung eines Teils der Population. Da bei den eingesetzten Konzentrationen unspezifischen Effekte nicht ausgeschlossen werden konnten und die Zellzyklus Blockade nur unvollständig war, wurde der Inhibitor nicht zur Synchronisation von *S. solfataricus* verwendet.

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass in *H. salinarum* der Fortgang des Zellzyklusses durch die Inhibition der DNA Polymerase vollständig unterbunden ist. Die Inhibition der Replikation war die Basis für die Entwicklung der Synchronisationsprozedur. Mit dieser Methode konnte in Flüssigkulturen von *H. salinarum* ein hoher Grad an Synchronität erzielt werden. Gleichzeitig wurden bis zu 45% eingeschnürter Zellen beobachtet. Im Zeitraum von 2 Stunden und 20 Minuten bis 2 Stunden und 40 Minuten nach Entfernen des Aphidicolins zeigten bis zu 80% der Zellen sichtbare Einschnürung. Die zu den beiden Zeitpunkten beobachteten Zellen sind dabei nicht identisch. Die Zeit, die eine Zelle in Teilung verbringt beträgt nur 8,8 Minuten. Da der Abstand zwischen den Messungen 20 Minuten beträgt, hatten die zum Zeitpunkt 2 Stunden und 20 Minuten beobachteten Zellen zum Zeitpunkt 2 Stunden 40 Minuten die Teilung bereits abgeschlossen.

3. Synchronisationsprozeduren für archaeale Organismen

H. salinarum ist die einzige euryarchaeale Art und die zweite archaeale Art, für die eine Synchronisationsprozedur zur Verfügung steht. Die andere Art ist das hyperthermophile

Crenarchaeon *S. acidocaldarius*, für das bereits vier Protokolle entwickelt wurden. Neben einer einfachen Methode, die auf der Verdünnung von Zellen der stationären Wachstumsphase in frisches Medium beruht (Hjort und Bernander, 1999), gibt es die Möglichkeit, durch vorübergehende Inkubation thermosensitiver Mutanten bei der selektiven Temperatur eine Zellzyklusblockade auszulösen (Bernander *et al.*, 2000). Das dritte Protokoll nutzt einen synthetischen Inhibitor der Hypusination des Translationsinitiationsfaktors 5A. Inkubation mit dem Inhibitor führt zur Einstellung der Zellteilungsaktivität, so dass Kulturen erhalten werden, deren Zellen jeweils zwei Chromosomen enthalten. Nach Entfernen des Inhibitors konnte eine partielle Synchronisation der Zellteilung beobachtet werden, die aber nicht über 15% lag (Jansson *et al.*, 2000). Die zweite Methode nutzt den Topoisomeraseinhibitor Daunomycin. Nach Entfernen des Inhibitors sind die *S. acidocaldarius* Kulturen ebenfalls partiell synchronisiert, allerdings konnten nur etwa 5 % der Zellen gleichzeitig in Teilung beobachtet werden (Hjort und Bernander, 2001). Die in dieser Arbeit beschriebene Synchronisationsprozedur führt daher zu dem mit Abstand höchsten Synchronitätsgrad, der je für eine archaeale Art erreicht wurde und wird sich daher als grundlegend für die Charakterisierung des archaealen Zellzyklusses erweisen.

4. Zellzyklus abhängige Expression haloarchaealer Zellzyklusgene

Mit Hilfe des neuen Protokolls konnte herausgefunden werden, dass die Transkription von *sph1* im Verlauf des Zellzyklusses stark reguliert wird. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass Sph1 eine Zellzyklus abhängige Funktion hat. In Übereinstimmung dazu zeigte sich, dass auch die Proteinmenge in der Zelle Zellzyklus abhängig kontrolliert ist. Allerdings ist während des gesamten Zellzyklusses eine basale Proteinkonzentration vorhanden und die Induktion ist auch nur zweifach. Eine weitaus deutlichere Diskrepanz zwischen Transkriptmenge und dem Proteingehalt wurde für das SMC artige Protein Rad50 während der Meiose von *Saccharomyces cerevisiae* beschreiben (Raymond und Kleckner, 1993). Auch in diesem Fall gab die Induktion der Transkription den Hinweis auf die Proteinfunktion, denn obwohl sich die Proteinkonzentration von Rad50 nicht ändert, ist das Protein für den erfolgreichen Verlauf der Meiose essentiell. Die Existenz einer basalen Sph1 Konzentration in der Zelle legt nahe, dass entweder eine zweifach höhere Proteinkonzentration ausreicht, um die Zellzyklus-spezifische Funktion zu steuern, oder dass posttranslationale Regulation der Sph1 Aktivität zusätzlich zur Transkriptions- und Translationsregulation stattfindet.

Aus Eukarya ist bekannt, dass das SMC Protein während des gesamten Zellzyklusses im Nukleus vorhanden ist; nur in kondensierten Chromosomen akkumuliert es entlang der Zellteilungsebene (Übersichtsartikel von Hirano, 1998). Von Losada *et al.* (1998) wurde herausgefunden, dass sich während des Zellzyklusses die Affinität der SMC beinhaltenden Komplexe zu Chromatin ändert, so dass diese Proteine, trotz ihrer Anwesenheit in der Zelle, möglicherweise nicht ständig in den Komplexen präsent sind.

5. Sph1-haltige Komplexe

Alle bislang bekannten Mitglieder der SMC Protein Superfamilie bilden Komplexe mit nicht-SMC Untereinheiten (Fujioka, *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 2002; Jones und Sgouros, 2001; Zheng *et al.*, 1999), so dass auch für Sph1 angenommen wird, dass es mit weiteren Proteinen interagiert. Die konservierte Anordnung von Genen hat kürzlich zur Entdeckung von zwei Proteinen geführt, die mit prokaryotischen SMC Proteinen interagieren (Soppa *et al.*, 2002; Mascarenhas *et al.*, 2002). Da auch die gemeinsame Transkription von Genen häufig dann erfolgt, wenn die Genprodukte eine gemeinsame Funktion ausüben, wurde vermutet, dass das Protein eines mit *sph1* gemeinsam transkribierten Gens einen geeigneten Partner für eine Wechselwirkung mit dem Sph1 Protein abgeben würde. Da die Gene von *sph1* und *hp24* nahe beieinander liegen und das ebenfalls für ihre Paraloge *sph2* und sein flankierendes Gen gilt, wurde die Transkription von *sph1* und *hp24* untersucht. Es stellte sich heraus, dass die beiden Gene getrennt voneinander transkribiert werden. Die Untersuchung der Transkriptionsmuster von *sph1* und *hp24* im Verlauf des Wachstums von *H. salinarum* zeigte, dass beide Gene während der exponentiellen Wachstumsphase in der Zelle exprimiert werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das *hp24* Transkript wie auch das *sph1* Transkript Zellzyklus-abhängig reguliert werden. Allerdings wird das *hp24* Gen etwa 1 Stunde vor dem *sph1* Gen induziert und anschließend gleich wieder reprimiert, so dass die Hp24 Funktion vermutlich der Sph1 Funktion vorangeht.

Auch wenn Hp24 nicht an einem möglichen Sph1-haltigen Komplex beteiligt sein könnte, ist es unwahrscheinlich, dass Sph1, ein Protein das während des Zellzyklusses einer derartig strikten Kontrolle unterliegt, ohne die spezifische Wechselwirkung mit anderen Proteinen agieren kann. Die Reinigung von Komplexen durch Nickelaffinitätschromatographie aus *H. volcanii* (Rose und Pohlschröder, 2002) haben gezeigt, dass eine solche Reinigung auch unter den in halophilen Archaea vorherrschenden Hochsalzbedingungen möglich ist. Erste Versuche der Reinigung des Sph1_{H6} Proteins nach homologer Produktion durch einen

haloarchaealen Sph1_{H6} Überproduktionsstamm sind fehlgeschlagen (Daten nicht gezeigt). Eine Optimierung des Protokolls in Anlehnung an das von Rose und Pohlschröder (2002) verwendete wird die Frage über mögliche Komplexpartner von Sph1 klären können.

6. Expressionsprofile weiterer haloarchaealer Zellzyklusgene

Neben den Transkripten von *hp24* und *sph1* wurden noch weitere Transkripte auf ihre Anwesenheit im Zellzyklus von *H. salinarum* untersucht. Die Analysen unterstreichen die Effektivität der Synchronisationsprozedur, da die Untersuchung vier verschiedener Gene die Unterscheidung vier verschiedener Transkriptionsprogramme im Zellzyklus erlaubte. Das *cdcH* Gen wurde ausgewählt, da das abgeleitete Protein der Familie der Cdc48 Proteine zugeordnet werden kann. Diese Proteine sind möglicherweise an der Regulation des Zellzyklusses beteiligt. Das beobachtete Transkriptionsmuster stimmt mit einer möglichen Funktion im Zellzyklus überein. Die Transkription des *cdcH* Gens ist ähnlich wie die des *sph1* Gens reguliert, allerdings erfolgt seine Induktion zu einem späteren Zeitpunkt im Zellzyklus. Eine unerwartete Entdeckung war, dass die Menge des *cdcH* Transkripts im Verlauf des Wachstums einer nicht synchronisierten *H. salinarum*-Kultur während der Transitionsphase ansteigt. Die *cdcH* Transkriptmenge ist in Zellen der stationären Wachstumsphase deutlich höher als in exponentiellen wachsenden Zellen. Welche Funktion das CdcH Protein in Zellen der stationären Phase ausübt bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass CdcH ein Zellzyklusinhibitor ist, der während der Entwicklung in der exponentiellen Wachstumsphase zu jeweils einem bestimmten Zeitpunkt benötigt wird und in Zellen der stationären Wachstumsphase die Zellteilung permanent verhindert.

Überraschenderweise ist das Transkript des untersuchten *ftsZ* Allels nicht Zellzyklus abhängig reguliert. Dennoch haben Studien mit Antikörpern gegen das abgeleitete Protein des gleichen Allels gezeigt, dass FtsZ auch in *H. salinarum* an der Septumbildung beteiligt ist. Daher könnte die FtsZ-Ring Bildung in *H. salinarum* möglicherweise ausschließlich auf der posttranslationalen Ebene reguliert werden. Das Genom von *H. salinarum* enthält mehrere *ftsZ* Allele, so dass eine mögliche Erklärung ist, dass das in dieser Studie verwendete *ftsZ* Allel eine andere Funktion übernimmt als zunächst angenommen wurde. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass es sich bei dem in der Zelle nachgewiesenen Protein nicht um das gleiche handelt, das die Grundlage für die Antikörper Herstellung bildete. Die Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen haloarchaealen FtsZ Proteine sind untereinander zu 50% identisch. Daher wird erst eine genaue Untersuchung aller *ftsZ* Allele aus

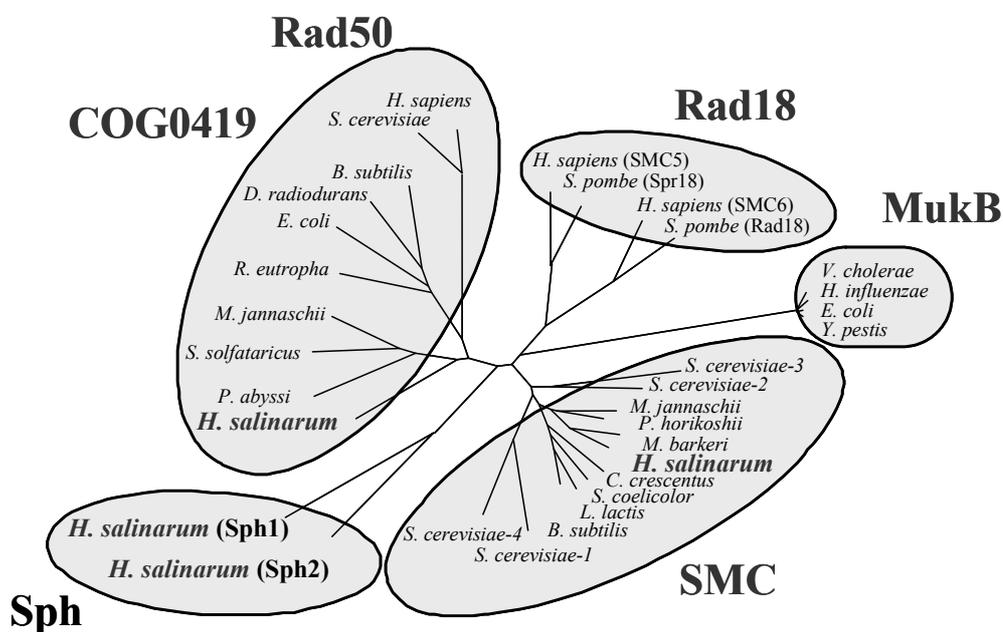
H. salinarum auf ihre Zellzyklus abhängige Expression bzw. Lokalisation nötig sein, um die Allele herauszufinden, die tatsächlich an der Septumbildung beteiligt sind und um herauszufinden welche Rolle die anderen *ftsZ* Allele im Zellzyklus von *H. salinarum* übernehmen.

7. Intrazelluläre Lokalisation von Sph1 in Zellen von *H. salinarum*

Zur Klärung der intrazellulären Lokalisation von Sph1 wurde Immunogold-Elektronenmikroskopie an Dünnschnittpräparaten eingebetteter *H. salinarum* Zellen durchgeführt. Die Zellen, von denen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen stammen, waren gut erhalten. Wie anhand des eng gepackten Zytoplasmas sowie der intakten Membranen zu sehen ist, gibt es keinen Hinweis auf Autolyse. Dieser Erhaltungsgrad bildete die Grundlage für die Immunlokalisation von Sph1 in *H. salinarum* Zellen. Durch einen immunologischen Nachweis war bereits bekannt, dass die polyklonalen Antikörper (Ruepp *et al.*, 1998) Sph1 spezifisch binden können, so dass Sph1 in Dünnschnitten eingebetteter *H. salinarum* Zellen detektiert werden konnte. Durch den Gold markierten sekundären Antikörper konnte nach Silberverstärkung die Lage des Sph1 Proteins bestimmt werden. Die Auswertung wurde erschwert, da von den betrachteten Dünnschnitten nur wenige Zellen im Längsschnitt zeigten. Daher konnten nur die beiden gezeigten Elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Bestimmung der Lokalisation von Sph1 herangezogen werden. Im Widerspruch zu vorhergehenden Ergebnissen mit weniger gut erhaltenen Zellen (Ruepp *et al.*, 1998), wurde das Sph1 Protein nicht in der Nähe der Zytoplasmamembran innerhalb des gesamten Zytoplasmas gefunden. Sph1 war ausschließlich an distinkten Stellen innerhalb der Zellen zu finden. Viele Epitope sind durch Fixierung, Einbettung und das Erstellen der Dünnschnitte nicht für den Antikörper zugänglich. Im Gegensatz zu den 300 Sph1 Molekülen, die in einem Schnittpräparat von 100 nm Dicke je Zelle vorhanden sein sollten – das entspricht 1/10 von 3.000 Sph1 Epitopen, die nach halbquantitativer Analyse in einer Zelle mit einem mittleren Durchmesser von 1 µm vorliegen – konnten nur maximal 40 Silber verstärkte Goldmarkierungen nachgewiesen werden. Anhand der wenigen verfügbaren Daten kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich bei den beobachteten Markierungen um Artefakte handelt. Weitere Experimente mit unbehandelten und synchronisierten Zellen, sowie die Immunmarkierung und Auswertung einer größeren Anzahl an

Dünnschnittpräparaten müssen durchgeführt werden, um die Beobachtungen zur Lokalisation von Sph1 in *H. salinarum* Zellen zu bestätigen.

Eukarya besitzen SMC Proteine aus drei Gruppen, d.h. „echte“ SMC Proteine, Rad50 Proteine und Rad18 Proteine. Bislang ist *H. salinarum* der einzige Vertreter der Prokarya, in dessen Genom ebenfalls Proteine aus drei verschiedenen Unterfamilien kodiert werden (Abbildung 30). Abgesehen von *sph1* und *sph2* befindet sich im Genom von *H. salinarum* ein offener Leserahmen, dessen abgeleitetes Protein den „echten“ SMC Proteinen zugeordnet werden kann. Vermutlich übernimmt das SMC Protein in *H. salinarum*, wie die bakteriellen und eukaryalen Orthologe, eine wichtige Rolle in der Kondensation und Kohäsion von Chromosomen im Zellzyklus ein. Außer den Proteinen der Sph Gruppe und dem „echten“ SMC kodiert *H. salinarum* für ein weiteres SMC artiges Protein, das der COG 0419 Gruppe angehört (Abbildung 30). Durch Charakterisierung von Proteinen aus *E. coli* und *P. furiosus* konnte herausgefunden werden, dass Rad50 und COG 0419 Proteine gleiche Funktionen haben. Für das COG 0419 Protein aus *H. salinarum* wird daher angenommen, dass es, wie die charakterisierten Mitglieder dieser Gruppe, ebenfalls an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist.



© by J.Soppa 2002

Abbildung 30: Phylogenetischer Stammbaum der SMC-Proteinfamilie.

Der Stammbaum wurde für die vier haloarchaealen SMC Proteine, sowie für 28 ausgewählte Proteine der SMC Familie erstellt. Dazu wurde ein multiples Proteinsequenzalignmet der C-terminalen und N-terminalen Regionen mit den Programmen ProtDist und Fitch (Felsenstein, 1996) bearbeitet. Die schattierten Ellipsen markieren die einzelnen Untergruppen. Die haloarchaealen Proteine sind fett gedruckt. Für alle Organismen wurden Standardabkürzungen verwendet

8. Sph1 – ein Rad18 Homolog?

Sph1 hat ebenfalls eine Funktion im Zellzyklus, wie durch die folgenden Ergebnisse bewiesen werden konnte:

1. Sph1 kommt ausschließlich in der exponentiellen Wachstumsphase, also in sich teilenden Zellen vor, während in Zellen der stationären Phase kein Sph1 nachgewiesen werden kann.
2. Eine Änderung des nativen Expressionslevels, d.h. die Depletion oder die Überproduktion von Sph1, löst eine Zellzyklusblockade aus.
3. Sowohl die Transkription als auch die Translation unterliegen einer Zellzyklus abhängigen Regulation.

Die genaue biologische Funktion von Sph1 in der Zelle bleibt weiterhin ungeklärt. Da am N-Terminus eine Walker A Box und am C-Terminus eine Walker B Box sowie eine UvrA Sequenz vorhanden sind, kann angenommen werden, dass Sph1, wie andere SMC-artige Proteine, ATP und DNA bindet. Transkript- und Proteinkonzentrationen in synchronisierten Zellen haben ihr Maximum 2 Stunden 40 Minuten nach Entfernen des Inhibitors. Zu dieser Zeit ist der größte Teil der Tochterchromosomen schon segregiert, die meisten Zellen zeigen sichtbare Einschnürungen und einige Zellen haben die Teilung bereits abgeschlossen. Folglich wird eine Beteiligung von Sph1 in der frühen Phase der Replikation oder der Chromosomensegregation ausgeschlossen. Stattdessen lässt sich seine Beteiligung auf einen späteren Zeitpunkt im Zellzyklus eingrenzen. Durch den Ausschluss der Funktionen, die SMC und COG 0419 zugeordnet werden, kann vermutet werden, dass die Mitglieder der dritten haloarchaealen Unterfamilie, nämlich Sph1 und Sph2, das Gegenstück zum eukaryalen Rad18 bilden. Das *rad18* Gen ist in *S. pombe* essentiell und bildet mit einem zweiten SMC-artigen Protein der Rad18 Familie sowie weiteren Proteinen einen Komplex. Der Komplex hat zahlreiche Funktionen; er ist an einem alternativen Reparaturmechanismus für UV Photoprodukte beteiligt (im Gegensatz zur Exzisionsreparatur), spielt eine Rolle in der Rekombinationsreparatur von Doppelstrangbrüchen die durch ionisierende Strahlung entstanden sind, ist an der Signalisierung von Kontrollpunkten nach DNA Schädigung beteiligt und hat vermutlich eine Funktion in der Regulation der Chromatinstruktur (Taylor *et al.*, 2001; Fousteri und Lehmann, 2000; Verkade *et al.*, 1999; Lehmann *et al.* 1995). DNA Reparatur spielt nicht nur eine Rolle nach Strahlungs induzierter DNA-Schädigung, sondern auch während der Termination der Replikation, wenn unübliche DNA Strukturen und

verschlungene Chromosomen entwirrt werden müssen, um den Transport der separierten Chromosomen in unterschiedliche Zellregionen zu ermöglichen. Eine Teilnahme an der DNA Reparatur und möglicherweise an der Signalisierung von Kontrollpunkten würde gut zu der beobachteten Induktion der *sph1* Transkription passen. Daher soll in den folgenden Experimenten geklärt werden, ob Sph1 eine oder mehrere der Funktionen von Rad18 ausübt und ob es Komplexe mit weiteren Proteinen, z.B. Sph2 bildet.

9. Dynamische intrazelluläre Lokalisation des Chromosoms in Zellen von *H. salinarum*

Für *H. salinarum* wurde ein Zellfixierungs- und DNA-Färbeprotokoll entwickelt. Es ermöglichte die Zellzyklus-abhängige dynamische intrazelluläre Lokalisation des Chromosoms in synchronisierten Zellen zu verfolgen. Die folgende Abfolge von Ereignissen, die schematisch in Abbildung 31 wiedergegeben sind, wurde vor der Entstehung der neuen Tochterzellen beobachtet:

1. Die DNA ist über das gesamte Zytoplasma der Zelle verteilt.
2. Die DNA kondensiert in der Zellteilungsebene.
3. Die DNA ist auf die Zellteilungsebene und die $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ Positionen verteilt
4. / 5. Die DNA befindet sich in den beiden Zellhälften mit Ausnahme der Zellteilungsebene und der Zellpole.
6. Die DNA ist, mit Ausnahme der Zellpole, über das gesamte Zytoplasma der neu entstandenen Tochterzellen verteilt.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem neuen Modell der DNA Replikation, Chromosomen Segregation und des Zellzyklusses in Bacteria, das kürzlich aus den Arbeiten mit *B. subtilis*, *E. coli* und *C. crescentus* entstanden ist (Übersichtsartikel von Graumann, 2001; Lemon und Grossman, 2001; Margolin, 2001). Im Gegensatz zu früheren Modellen wurde entdeckt, dass die Replikation von einem statischen Komplex in der Zellteilungsebene durchgeführt ist, während die DNA beweglich ist (Lemon und Grossman, 1998). Neu replizierte Replikationsursprünge werden von einem aktiven Mechanismus zu den $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ Positionen transportiert. Das bakterielle SMC Protein ist am Transport der Replikationsursprünge nicht beteiligt, jedoch essentiell für die Segregation der nachfolgend replizierten chromosomalen Regionen, möglicherweise auf einer Kondensin ähnlichen

Funktion basierend (Graumann, 2000). Unsere Daten zeigen, dass auch das Archaeon *H. salinarum* einen Mechanismus für aktiven DNA-Transport besitzt. Anhand der Positionierung der DNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten kann die Geschwindigkeit der DNA Translokation von der Zellteilungsebene zur $\frac{1}{4}$ bzw. $\frac{3}{4}$ Position mit $0,07 \mu\text{m}$ pro Minute berechnet werden, während die das Längenwachstum der Zelle mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,01 \mu\text{m}$ pro Minute erfolgt. Folglich kann jeglicher Mechanismus der passiven DNA Translokation ausgeschlossen werden. Auch wenn weitere experimentelle Daten fehlen, weist die Kondensation des Chromosoms in der Zellteilungsebene unmittelbar vor der Segregation darauf hin, dass *H. salinarum*, wie auch *B. subtilis*, ein statisches Replisom in der Zellteilungsebene besitzt.

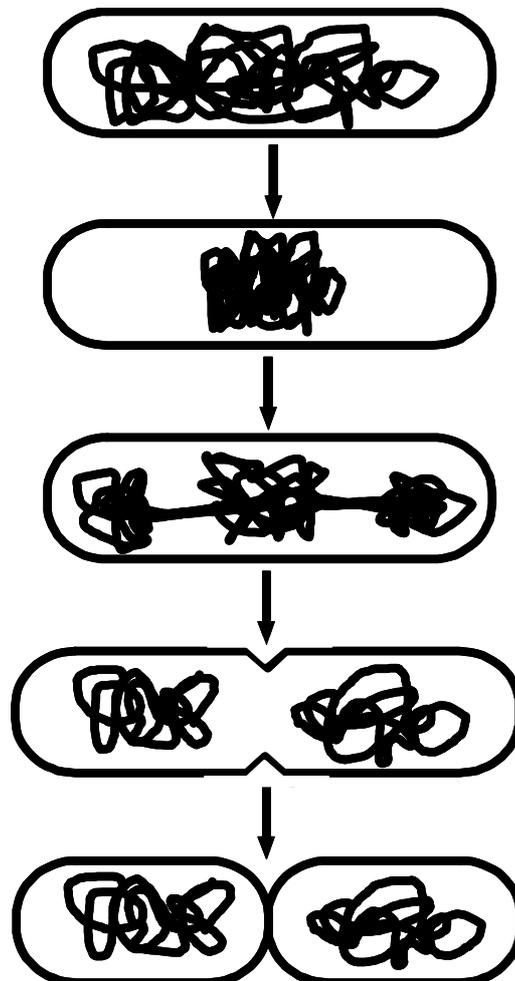


Abbildung 31: Schematische Darstellung der intrazellulären Lokalisation der DNA im Zellzyklus von *H. salinarum*.

Die einzelnen Darstellungen wurden aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 27 abgeleitet und stehen im Einklang mit den für *B. subtilis* erhaltenen Daten (Graumann, 2001).

10. Zellteilungsmodus von *H. salinarum*

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass *H. salinarum* eine sehr strikte Zellzykluskontrolle besitzt und daher ein exzellentes Modell zur Untersuchung des archaealen Zellzyklusses darstellt. Der Zellzyklus wird blockiert, wenn sein normaler Ablauf gestört wird. Die genaue Kontrolle geschieht möglicherweise durch das Vorhandensein verschiedener Kontrollpunkte. Bestimmte Kontrollpunkte sorgen dafür, dass der Fortlauf des Zellzyklusses inhibiert wird, wenn entweder die Replikation inhibiert wird oder die Sph1 Konzentration zu hoch bzw. zu niedrig ist. In beiden Fällen ist die Zellteilung blockiert während die Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit weiter wachsen, so dass Transkription, Translation und Energiemetabolismus nicht durch diese Kontrollpunkte reguliert werden. In *B. subtilis* ist die Zellteilung nur schwach mit der Replikation und Segregation gekoppelt. Die Depletion von SMC führt zu Defekten in der Chromosomensegregation, was eine hohe Anzahl an Zellen ohne Nucleoid zur Folge hat (Britton *et al.*, 1998; Graumann *et al.*, 1998; Moriya *et al.*, 1998). In der Strenge seines Zellzyklus erinnert *H. salinarum* eher an *C. crescentus*. Die Inhibition der DNA Segregation führt, wie in *H. salinarum*, nicht zur Bildung von Zellen ohne Nucleoid.

Bislang wurde in einem weiteren Archaeon DNA Segregation und der genaue Ablauf der Teilung untersucht. Der Zellzyklus von *Sulfolobus* besitzt eine kurze G₁ und eine lange G₂ Phase (Bernander und Poplawski, 1997). Bemerkenswert ist, dass es ein beachtliches Zeitintervall zwischen der Ende der Chromosomen Replikation und dem Abschluss der Nucleoid Trennung gibt (Poplawski und Bernander, 1997). Die lange Zeit bevor das Chromosom in der Zellteilungsebene kondensiert und die später zügig erfolgende Verteilung der DNA auf die ¼ bzw. ¾ Positionen legen nahe, dass es sich in *H. salinarum* anders verhält. Jedoch lassen die aktuellen Daten keine Quantifizierung der Länge der unterschiedlichen Zellzyklusphasen zu und müssen daher in folgenden Studien untersucht werden.

Durch die Inkubation mit Aphidicolin wuchs die mittlere Zelllänge von *H. salinarum*-Kulturen an. Nach Entfernen des Aphidicolin wurden die Zellen zur Untersuchung des Teilungsmodus genutzt. Dabei wurde deutlich, dass Zellen, die länger als 8 µm waren, nicht mehr in der Lage waren die Zellmitte zu bestimmen. Sowohl bei unbehandelten als auch bei Aphidicolin behandelten Zellen wurde das Septum immer in einem festen Abstand von 3 µm bis 4 µm, von einem der beiden Zellpole aus gemessen, gebildet. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch ungeklärt. Es ist anzunehmen, dass entweder an einer bestimmten Stelle der Zelle ein bislang unbekanntes Signal produziert wird oder dass es einen indirekten Mechanismus gibt, der z.B. an den Ort der Replikation gekoppelt ist. In anderen archaealen

Arten gibt es bislang nur wenige Studien zum Teilungsmodus. Zwar wurde festgestellt, dass in *Pyrodictium abyssi* (Horn *et al.*, 1999), *H. volcanii* (Wang und Lutkenhaus, 1996), und *S. acidocaldarius* (Poplawski und Bernander, 1997) die Septumausbildung vornehmlich in der Mitte der Zelle erfolgt, aber es gibt auch Arten, wie z.B. *Methanococcus* (Malandrin *et al.*, 1999) die sich asymmetrisch teilen und solche wie *Haloferax mediterranei*, die symmetrische und asymmetrische Teilung aufweisen (Poplawski *et al.*, 2000). Auch in Bacteria ist der Mechanismus, nach dem die Lage des Septum bestimmt wird weiterhin ungeklärt. Diskutiert werden derzeit drei mögliche Mechanismen (Harry *et al.*, 2001). Die drei Modellorganismen *E. coli*, *B. subtilis* und *C. crescentus*, unterscheiden sich auch hinsichtlich des Zellzyklusses allgemein in einigen wichtigen Punkten voneinander. Daher ist es wichtig auch in Archaea zwischen gemeinsamen und speziellen Eigenschaften des Zellzyklusses der einzelnen Arten zu unterscheiden.

11. Regulierte Genexpression in *H. salinarum*

Die Transkription der Strukturgene des Arginindeiminaseweges, *arcA*, *arcB* und *arcC*, ist durch externe Zugabe von Arginin in das Kulturmedium stark induzierbar (Soppa *et al.*, 1998; Ruepp *et al.*, 1996). Zur genaueren Charakterisierung wurden die DNA-Sequenzen stromaufwärts von *arcB* untersucht. In diesem Bereich wurde an der (+1) Position des offenen Leserahmens von *arcB* eine Basenabfolge entdeckt, die Ähnlichkeiten zu einem starken, halobakteriellen Promotor mit konstitutiver Expression (Danner und Soppa, 1996) aufweist. Klonierung des intergenen Bereiches zwischen *arcC* und *arcB* vor das *sphI* Gen in einen haloarchaealen Expressionsvektor und die anschließende Transformation von *H. salinarum* mit dem entsprechenden Konstrukt, führten zum gleichen Phänotyp, der bereits durch die homologe Überproduktion von Sph1 erzielt werden konnte (Ruepp *et al.*, 1998). Die Zellen wuchsen auch ohne Zugabe von Arginin in der Länge. Folglich verhielt sich die inserierte Sequenz von etwa 100 bp tatsächlich wie ein starker konstitutiver Promotor. Eine weitere Steigerung der Transkriptmenge durch Argininzugabe war nicht möglich. Die Arginin induzierbare Expression des *sphI* Gens konnte erst erzielt werden, nachdem der verwendete Bereich deutlich auf 1,2 kbp vergrößert worden war. In dieser Sequenz waren neben der intergenen Region auch etwa 50% des *arcC* Gens und 80% des *arcB* Gens enthalten. Gezielte Verkürzung des verwendeten „Promotors“ wird klären, welche Bereiche für die Arginin induzierbare Expression essentiell sind.

12. Antisense System

Während die artifizielle Regulation von Genen durch antisense-Systeme in Eukarya weit verbreitet ist (Übersichtsartikel von De Backer *et al.*, 2002; Chicas und Macino, 2001; Vaucheret *et al.*, 2001), war für Archaea bislang kein entsprechendes System verfügbar. In früheren Experimenten war die natürliche Regulation halobakterieller Systeme durch antisense-RNA für den Phagen Φ H (Stolt und Zillig, 1993) und die Gasvesikelsynthese (Krüger und Pfeifer, 1996) beschrieben worden. Mit Hilfe des zur Regulation der Genexpression verwendbaren *arcB* Promotors, wurde ein System etabliert, dass die gezielte Depletion von Proteinen in Zellen archaealer Organismen ermöglicht. Dieses artifizielle antisense-mRNA System bildet daher die Grundlage für Untersuchungen weiterer Gene, deren Nullphänotyp in *H. salinarum* letal ist und erweitert somit das Spektrum an molekularbiologischen Methoden, die für Haloarchaea zur Verfügung stehen. Da die Mechanismen, die an eukaryalen antisense-RNA Systemen beteiligt sind, noch nicht umfassend bekannt sind, könnten Untersuchungen an dem vermutlich weniger komplexen archaealen System, möglicherweise auch zur Entdeckung neuer Systemkomponenten in Eukarya führen.

13. *H. salinarum* – ein archaealer Modellorganismus

Sulfolobus acidocaldarius entwickelt sich derzeit zum Modellorganismus der Crenarchaeota (Hjort und Bernander, 2001; Bernander *et al.*, 2000; Hjort und Bernander, 1999; Charlebois *et al.*, 1998; Bernander und Poplawski, 1997; Poplawski und Bernander, 1997), während *H. salinarum* das Potential hat zum Modellorganismus der Euryarchaeota zu werden. Neben der vollständigen Genomsequenz (Ng *et al.*, 2000) stehen diverse Klonierungsvektoren, Transformationsmethoden, Methoden zur funktionalen Genomanalyse, Mutagenesetechniken sowie weitere hoch entwickelte molekulargenetische Techniken zur Verfügung. Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Reihe neuer Techniken entwickelt, welche die Rolle von *H. salinarum* als haloarchaealen Modellorganismus deutlich verbessern wird:

1. Es wurde der erste haloarchaeale Expressionsvektor mit einem regulierten Promotor konstruiert.
2. Es wurde das erste archaeale antisense System etabliert.
3. Es wurde eine neue Synchronisationsmethode entwickelt, die es erstmals ermöglichte ein Euryarchaeon zu synchronisieren.
4. Es wurde eine DNA Färbemethode für *H. salinarum* etabliert.
5. Es wurde durch Hochdruckgefrierung die Darstellung von *H. salinarum* Zellen in der Elektronenmikroskopie verbessert.

So konnte mit Hilfe der neu geschaffenen Methoden die Zellzyklus spezifische Regulation von Transkripten in Archaea entdeckt, die dynamische intrazelluläre Lokalisation des Chromosoms bestimmt, erste Anzeichen für die Auswahl der Teilungsebene in *H. salinarum* festgestellt und Hinweise auf mögliche Funktionen von Sph1, Hp24 und CdcH gefunden werden.

V. Experimenteller Teil:

1. Inhibitoren und Oligonukleotide:

1.1 Inhibitoren

Es wurden die folgenden Stammlösungen mit den jeweils angegebenen Lösungsmitteln hergestellt. Die untersuchten Inhibitorkonzentrationen sind in Klammern gesetzt. In DMSO gelöst wurden: 10 mg ml⁻¹ Aphidicolin (5 - 20 µg ml⁻¹); 0.4 mg ml⁻¹ Nocodazol (40 - 100 ng ml⁻¹). In H₂O bid. gelöst wurden: 10 mg ml⁻¹ Hydroxyharnstoff (15 µg ml⁻¹ - 1.5 mg ml⁻¹); 20 mg ml⁻¹ Mimosin (40 µg ml⁻¹); 10 mg ml⁻¹ Puromycin (200 µg ml⁻¹). In Chloroform gelöst wurde: 1 mg ml⁻¹ Valinomycin (100 ng ml⁻¹).

1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma ARK (Darmstadt) synthetisiert.

a) Oligonukleotide für die Amplifikation von Genen für die Klonierung

Um die verschiedenen DNA-Bereiche in Vektoren klonieren zu können war das Einführen geeigneter Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen notwendig. Dies erfolgte durch die Konstruktion von Oligonukleotiden, die zu den 5'- bzw. 3'-Enden der jeweiligen Gene homologe Sequenzen in ihren 3'-Abschnitten trugen und deren 5'-Enden die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen enthielten. Da Restriktionsendonukleasen häufig nur dann an ihre Erkennungssequenzen binden, wenn diese flankierende Bereiche besitzen, wurden bei der Konstruktion der Oligonukleotide 6 bis 8 zusätzliche Basen an das 5'-Ende synthetisiert.

- invertiertes *sphI*:

hp7linvers1	5'-TTT TAT TAT CgA ggT ACC Tag AAC TCA g-3'
hp7linvers2	5'-AAT gCA ACg gCC ATg gTT AAT TCg Tg-3'
- *sphI*:

Myo-Bam	5'-gAC ggg ATC CAT gTg gAA CgT AgA TgT AAC-3'
Myo-Bam rev	5'-Cgg ggg ATC CTT AAT TCg TgA TTT gAg gg-3'

- *arcB* Promotor (~ 100 bp)

ParcB3-Nco	5'-gCT	CTC	gAC	gTC	CAT	ggT	gTC	TAC	TAg	ATg	C-3'
ParcB5-Apa	5'-CgC	TCg	ATg	ggg	CCC	CCg	gCA	CgA	CAG	TCg-3'	
- *arcB* Promotor (~ 1,2 kbp)

arcBProApaI	5'-ggT	CgT	TCC	ggg	CCC	gAA	gCC	gg-3'	
arcBProNcoI	5'-CgT	CCA	Tgg	gAT	CCT	AAT	CgA	TCT	gg-3'

b) Oligonukleotide für die Herstellung von Sonden

Zum Nachweis von mRNA-Transkripten in der Northern Blot Analyse und zum Nachweis von Genen in der Southern Blot Analyse werden Sonden benötigt. Dazu wurde unter Einbau des Basenanalogs Digoxigenin-11-dUTP mit Hilfe von jeweils zwei Oligonukleotiden ein Teil des Gens amplifiziert, dessen Transkript in der Northern Blot Analyse bzw. dessen Allele in der Southern Blot Analyse nachgewiesen werden sollte.

Northern Blot Analyse

- *hp24* Sonde (806bp):

hp24Sonde1	5'-gAC	ggA	CCA	CTg	CTg	TAA	g-3'
BKS-RE2	5'-CTC	gAC	AgA	TgA	ACC	CAC	g-3'
- *sph1* Sonde (1048 bp)

BSK-1	5'-gCT	TCg	CgT	TgT	TCg	ATC-3'	
BKS4	5'-Tgg	AgA	ACg	AAg	ACg	ACg	g-3'
- *cdcH* Sonde (607 bp):

cdcHHindIII	5'-ggC	ACA	AgC	TTg	TCg	CgA	CCg	CAC	ggC	gg-3'
cdcHSonde	5'-CgT	gAT	CTT	CTT	CgA	CgA	gCT	gg-3'		
- *ftsZ* Sonde (1154 bp)

ftsZHindIII	5'-CCC	ACA	AgC	TTT	TAT	Cgg	Atg	Acg	TCg	Agg-3'
ftsZSphI	5'-gCg	gAA	gCA	TgC	gAA	Atg	gAT	ggC	gAc	gg-3'
- *smc-IP* Sonde (806 bp):

SMC1bp-3	5'-ggA	ACT	CCT	Cgg	TCg	CCT	gC-3'
SMC1bp-5	5'-ggT	ggC	Cag	TCC	Cgg	CCA	Cg-3'

Southern Blot Analyse

- *hp24* Sonde (316 bp):

BKS2	5'-ACg	ggA	TCg	ACg	gAA	Cgg-3'	
BKS-RE2	5'-CTC	gAC	AgA	TgA	ACC	CAC	g-3'
- *sph1* Sonde (304 bp)

con 6	5'-ACC	CTC	AgA	Cag	CgC	Cg-3'
RUN 3	5'-AgC	TgT	CCg	ATA	CCA	TCC-3'

c) Oligonukleotide für Sequenzierreaktionen

Für die Überprüfung der Nukleotidsequenzen nach Klonierungen wurden die Plasmide sequenziert. Dazu wurden jeweils kurze Oligonukleotidprimer von 18 bis 23 nt Länge verwendet.

- pUH3/ pUH4/ pUH6:
SEQ 2 5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3'
BKS-RE3 5'-gCC gTC gTC TTC gTT CTC C-3'
- pUH8:
SEQ2 5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3'
BKS-RE1* 5'-ATC ggT Cgg TTC gCA CCC-3'
- pUH10
sequPtpQE 5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3'

2. Verwendete Organismen und Zellzucht:

2.1 Verwendete Organismen

a) *E. coli*

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

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(tet^r)]

b) *H. salinarum*

Halobacterium salinarum DSM670 (Stoeckenius und Rowen, 1967)

2.2 Nährmedien

a) *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* Stämmen diente das Komplexmedium SOB (Hannahan, 1985):

2 % Trypton (w/v)	20 g
0,5 % Hefeextrakt (w/v)	5 g
10 mM NaCl	0,6 g
2,5 mM KCl	0,187 g
	ad 990 ml H ₂ O demin.

Die Substanzen wurden gelöst und anschließend 10 ml einer 1 M MgCl₂/1 M MgSO₄-Stammlösung zugegeben. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung bei Zimmertemperatur gelagert.

Für das Erstellen fester Medien wurde vor dem Autoklavieren 1,2 % Bacto-Agar (w/v) zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium unter Rühren auf 60°C abgekühlt und ggf. ein Antibiotikum zugegeben. Das Medium wurde in sterile Petrischalen gegossen und über Nacht getrocknet. Die Lagerung von festen Medien erfolgte bei 4°C.

Zur Zucht von *E. coli* wurde das Antibiotikum Ampicillin verwendet.

Stammlösung: 2 mg Ampicillin-Natrium-Salz pro ml H₂O bidest.

Endkonzentration: 100 µg/ml

Wurden die Zellen neben der Ampicillinresistenz außerdem auf das Fehlen der β -Galactosidase Produktion selektioniert, wurden 0,1 mM IPTG und $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ X-Gal in die Platten eingegossen.

b) *H. salinarum*

Zur Zucht von *H. salinarum* Stämmen wurde *H. s.*-Support-Medium (Cline *et al.*, 1989) verwendet. Dazu wurden zwei Lösungen hergestellt und getrennt voneinander autoklaviert:

Salzlösung:

4,3 M NaCl	250 g
80 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 g
24 mM KCl	2 g
10 mM <i>tri</i> -Natriumcitrat	3 g
1,2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
50 mM Tris	50 ml einer 1 M Lösung; pH7,2 ad 800 ml H_2O demin.

Nährstofflösung:

1,5 % Hefeextrakt (w/v)	3 g
2,5 % Trypton (w/v)	5 g
	ad 200 ml H_2O demin.

Nach dem Autoklavieren wurden die Lösungen zusammengegeben und durchmischt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Medium bei Zimmertemperatur gelagert.

Für das Erstellen fester Medien wurde vor dem Autoklavieren 1,2 % Agar (w/v) zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium unter Rühren auf 60°C abgekühlt und ggf. ein Antibiotikum zugegeben. Das Medium wurde in sterile Petrischalen gegossen und über Nacht getrocknet. Die Lagerung von festen Medien erfolgte bei 4°C .

Zur Zucht von *H. salinarum* wurde das Antibiotikum Novobiocin verwendet.

Stammlösung: 10 mg Novobiocin pro ml H_2O bidest.

Endkonzentration: $0,1 \mu\text{g/ml}$

2.3 Zellzucht

Für die Zellzucht in kleinem Maßstab wurde eine *H. salinarum*-Kultur in 35 ml Support-Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bei 42°C mit 220 Upm auf einem Flachbettschüttler bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert.

2.4 Zellzucht in Kapillaren

Einzelne Zellulosekapillaren wurden in Stücke von ca. 20 mm Länge zerschnitten und in einer Glaspetrischale aufbewahrt. Zur Sterilisation wurden die Kapillaren mit H₂O bid. bedeckt, 15 min unter Schütteln inkubiert und bei 100°C im Trockenschrank getrocknet. Die Prozedur wurde zweimal wiederholt. 100 µl Zellsuspension wurden in den Deckel eines Reaktionsgefäßes gegeben. Ein Ende der Zellulosekapillare wurde in die Zellsuspension eingetaucht, so dass sich die Kapillare aufgrund der wirkenden Kapillarkräfte mit der Zellsuspension füllen konnte. Beide Enden der Kapillare wurden mit einer heißen Pinzette fest zusammengedrückt und auf diese Weise verschlossen. Die verschlossenen Zellulosekapillaren wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit sterilem Medium überführt und bei 42°C und 250 Upm auf dem Schüttler inkubiert.

2.5 Aufnahme einer Wachstumskurve

In einem 100 ml Klett-Kolben wurden 35 ml Support-Medium gegeben und die Extinktion des Mediums bestimmt. Die Messung der Extinktion erfolgte in einem Klett-Photometer mit dem Filter # 54 (Transmission von 520 nm bis 580 nm). Dazu wurde der Klett-Kolben in den Lichtweg eingesetzt. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden wurde die Ausrichtung des Kolbens immer beibehalten. Dieser Nullwert wurde im Anschluss von allen weiteren Messwerten subtrahiert. Anschließend wurde das Medium mit einer geeigneten Menge einer exponentiell wachsenden Kultur beimpft. Die Kultur wurde bei 42°C und 220 Upm auf einem Schüttler inkubiert und in regelmäßigen Abständen wurde die Änderung der Optischen Dichte ermittelt. Neben der photometrischen Bestimmung der Extinktionsänderung wurde zusätzlich die Zelldichte der Kultur mit einer Zählkammer bestimmt. Alle Messwerte wurden protokolliert und graphisch ausgewertet.

2.6 Stammhaltung

a) *E. coli*

Lagerpuffer:

67 % Glycerin (w/v)	38,5 g einer 87 %igen Lösung (w/v)
13 mM MgCl ₂	650 µl einer 1 M Stammlösung
	ad 11 ml H ₂ O bid.

Zur längerfristigen Lagerung von *E. coli* Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde der Lagerpuffer in Aliquots a 1 ml auf Dauerkulturröhrchen verteilt und autoklaviert. Bei Bedarf wurde 1 ml einer in der exponentieller Wachstumsphase befindlichen *E. coli*-Kultur zu 1 ml Lagerpuffer gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die Kultur mit dem Lagerpuffer durchmischt und die so präparierten Kulturen anschließend bei -70°C gelagert.

b) *H. salinarum*

H. salinarum Stämme wurden bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase in Anwesenheit des benötigten Antibiotikums kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in Medium ohne Antibiotikum aufgenommen. Die Kulturen wurden in dicht schließenden Schraubgefäßen bei Zimmertemperatur gelagert.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. salinarum*

Aufschlusslösung:

Guadiniumthiocyanat	100 g
H ₂ O bid.	120 ml
<i>tri</i> -Natriumcitrat	7 ml einer 0,75 M Lösung; pH 7,0
Natriumlaurylsarcosinat	10,6 ml einer 10 %igen Lösung (w/v)
2-Mercaptoethanol	1 ml

Das Guadiniumthiocyanat wird durch Zugabe des Wassers gelöst, um den Lösungsvorgang zu beschleunigen wird die Lösung auf 40°C temperiert.

Nach Zugabe der restlichen Bestandteile und kräftigem Durchmischen, wird die Aufschlusslösung bei +4°C gelagert.

Natriumazetatlösung:

3 M Natriumazetat	82,0 g
pH 4,0	
	ad 200 ml H ₂ O demin.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. salinarum* wurde im Wesentlichen nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt; Änderungen zu dem Protokoll werden im folgenden beschrieben. Die *H. salinarum*-Kulturen, aus denen die RNA isoliert wurde, hatten Zelldichten von $1 \cdot 10^7$ Zellen·ml⁻¹ bis $2 \cdot 10^9$ Zellen·ml⁻¹. 2 bis 12 ml Kultur wurden auf 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und 40 sec mit 13.000 Upm bei Zimmertemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 400 µl Aufschlusslösung versetzt und so lange resuspendiert, bis die Lösung homogen war. Nacheinander wurden die folgenden Lösungen zugegeben: 50 µl 3 M Natriumazetat, pH 4,0; 400 µl Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol 49:1 (v/v). Zwischen diesen Schritten wurde die Lösung gründlich durchmischt. Der Ansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Die vollständige Phasentrennung erfolgte durch 15-minütige Zentrifugation mit 13.000 Upm in einem vorgekühlten Rotor (-20°C) in einer Tischzentrifuge. Von der wässrigen Phase wurden 400 µl vorsichtig abgenommen, in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml -20°C kaltem Ethanol p.a. gemischt. Der Ansatz wurde erneut 30 min bei 13.000 Upm in einem

vorgekühlten Rotor (-20°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl Aufschlusslösung aufgenommen, gelöst und mit 500 µl -20°C kaltem Ethanol p.a. versetzt. Nach 30 min Zentrifugation bei 13.000 Upm vorgekühlten Rotor in einer Tischzentrifuge, wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Sediment drei Minuten unter dem Abzug getrocknet. Die RNA wurde in 20 bis 200 µl sterilem H₂O bid. aufgenommen, kräftig durchmischt und durch 10-minütiges Erhitzen auf 60°C vollständig gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Probe bei -20°C gelagert.

3.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. salinarum*

Basalsalz:

4,3 M NaCl	250 g
80 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O	20,0 g
24 mM KCl	1,75 g
10 mM <i>tri</i> -Natriumcitrat	3 g
1,2 mM CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,175 g
45 mM Tris	45 ml einer 1 M Lösung; pH7,2 ad 1000 ml H ₂ O demin.

Lysepuffer:

100 mM NaCl	0,6 g
10 mM Tris	0,12 g
1 mM Na ₂ EDTA	0,037 g
0,05 % SDS (w/v)	0,05 g
pH 8,0	
	ad 100 ml H ₂ O bid.

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. salinarum* wurde im Wesentlichen nach der Methode von Mevarech (Rosenshine *et al.*, 1987) durchgeführt. Die *H. salinarum*-Kulturen, aus denen die chromosomale DNA isoliert wurde, befanden sich in der frühen stationären Wachstumsphase. 15 ml Kultur wurden 6 min mit 4.500 g bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 500 µl Basalsalz aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 4 ml Lysepuffer und anschließendes auf- und abpipettieren. Die Wasserphase wurde anschließend vorsichtig mit 8 ml Ethanol p.a. überschichtet und die an

der Phasen grenze ausfallende chromosomale DNA wurde auf eine Glaskapillare gewickelt. Beide Phasen wurden gemischt und die Glaskapillare für weitere 5 min im Gefäß belassen. Durch partielle Dehydratisierung der DNA wurde diese noch fester an die Glaskapillare gebunden. Durch zweimaliges Eintauchen in Ethanol p.a. und einmaliges Eintauchen in Diethylether wurde die an die Glaskapillare gebundene DNA gewaschen und anschließend kurz an der Luft getrocknet. Durch Inkubation in 2 ml H₂O bid. über Nacht bei 4°C wurde die DNA von der Glaskapillare gelöst. Zur vollständigen Ablösung wurde die DNA 20 min auf 60°C erhitzt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde ein Spektrum aufgenommen. Um zu überprüfen, ob die chromosomale DNA intakt war, wurden 2 µl der DNA-Lösung auf einem Agarosegel aufgetrennt.

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

a) Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Puffer 1:

50 mM Tris	3,0 g
10 mM Na ₂ EDTA	1,86 g
pH 8,0	
RNAse (Endkonzentration 100 µg/ml)	
	ad 500 ml H ₂ O bid.

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Puffer 2:

0,2 M NaOH	4 g
1 % SDS (w/v)	5 g
	ad 500 ml H ₂ O bid.

Puffer 3 (eisgekühlt):

3,2 M Kaliumazetat	58,9 g
pH 5,5	
	ad 200 ml H ₂ O bid.

TE-Puffer:

10 mM Tris	0,12 g
1 mM Na ₂ EDTA	0,04 g
pH 7,2	
	ad 100 ml H ₂ O bid.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus 5 ml-*E. coli*-Kulturen erfolgte mit Hilfe der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Bei dieser Technik wird die chromosomale DNA von *E. coli* besonders effektiv entfernt. DNA denaturiert bei stark alkalischem pH und liegt dann einzelsträngig vor. Nach der Neutralisation hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA sehr rasch, während die weitaus größere chromosomale DNA ausfällt.

Zunächst wurde 1 ml einer über Nacht kultivierten *E. coli*-Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch 30 sec Zentrifugation in einer Tischzentrifuge sedimentiert und in 150 µl Puffer 1 suspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 150 µl Puffer 2 und vorsichtiges zehnmaliges Umdrehen des Reaktionsgefäßes. Durch Zugabe von 150 µl Puffer 3 wurde der Ansatz wieder neutralisiert. Das Zellysat wurde mindestens 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert, anschließend 400 µl des Überstands vorsichtig abgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml 96 %igem Ethanol (v/v) wurde der Ansatz 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde durch Zugabe von 500 µl 70 %igen Ethanol (v/v) und anschließende 5 min Zentrifugation bei 13.000 Upm gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen und das Präzipitat in 50 µl TE-Puffer gelöst. In eine sich gegebenenfalls anschließende analytische Spaltung der Plasmid-DNA wurden 2 µl der Plasmid-DNA-Lösung eingesetzt.

b) Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Jetstar Maxi-Säulen verwendet. Dabei wurden die Isolierung aus 500 ml *E. coli*-Kultur gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch in einem Hitachi-Photometer oder in einem Spektralphotometer bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration

errechnet sich aus der bei 260 nm gemessenen Optischen Dichte (OD_{260}), der verwendeten Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotiden spezifischen Multiplikationsfaktor. Eine bei OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 ng/ μ l doppelsträngiger DNA bzw. 40 ng/ μ l RNA. Die Reinheit von DNA-Präparaten wurde durch den Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} ermittelt. Proteinfreie Nukleinsäurelösungen weisen dabei ein Verhältnis $OD_{260} : OD_{280}$ von 1,8 bis 2 auf.

Alternativ zur photometrischen Bestimmung wurden die Konzentrationen geringerer DNA-Mengen durch den Vergleich von Fluoreszenzintensitäten Ethidiumbromid gefärbter DNA im Agarosegel durchgeführt. Da die Fragmentgrößen und die aufgetragenen Mengen des ebenfalls angefärbten DNA-Standards bekannt waren, wurde dieser zur Abschätzung der DNA-Mengen herangezogen.

3.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

TE-Puffer:

10 mM Tris	0,12 g
1 mM EDTA	0,04 g
pH 8,0	
	ad 100 ml H ₂ O bid.

Kaliumazetat –Lösung:

3,2 M Kaliumazetat	58,9 g
pH 5,5	
	ad 200 ml H ₂ O bid.

Häufig enthalten Nukleinsäurelösungen unerwünschte Verunreinigungen durch Proteine, die durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt werden können. Bei dieser Methode werden die in der DNA-Lösung enthaltenen Proteine denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase bzw. an der Phasengrenze an, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst bleiben. Nach der Extraktion werden die Nukleinsäuren abschließend mit Kaliumazetat in Anwesenheit von Ethanol präzipitiert (siehe auch Präzipitation mit Kaliumazetat in Anwesenheit von Ethanol).

In einem sterilen Reaktionsgefäß wurden 100 µl einer Nukleinsäurelösung mit 400 µl TE-Puffer versetzt. Anschließend wurden 250 µl Phenol zugegeben und der Ansatz kräftig geschüttelt. Zur Phasentrennung wurden 250 µl Chloroform-Isoamylalkohol 49:1 (v/v) zugegeben und der Ansatz erneut kräftig geschüttelt. Die vollständige Phasentrennung wurde durch 5 min Zentrifugation bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge bewirkt. Der Nukleinsäure haltige Überstand wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und der Ansatz kräftig geschüttelt, um das restliche Phenol auszuwaschen. Die Phasentrennung erfolgte durch 5 min Zentrifugation bei 13.000 Upm. Der Nukleinsäure haltige Überstand wurde wiederum in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäurelösung wurde anschließend mit 2,5 Volumina 96 %igem Ethanol (v/v) versetzt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Kaliumazetat-Lösung wurde der Ansatz kurz geschüttelt und anschließend für 1 h auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 25 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde durch Zugabe von 250 µl 70 %igem Ethanol (v/v) und anschließende 25 min Zentrifugation bei 13.000 Upm gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen und das Präzipitat einem geeigneten Volumen H₂O bid. gelöst.

3.6 Präzipitation von DNA aus Lösungen

a) Präzipitation mit Polyethylenglycol (PEG)

PEG-Lösung:

26 % PEG 8000 (w/v)	26 g
7 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,17 g
0,6 M Natriumazetat	8,2 g
pH 4,0	

ad 100 ml H₂O demin.

Um nach der Polymerasekettenreaktion Oligonukleotide und Desoxynukleotide vom erwünschten PCR-Produkt abzutrennen wurde ein Präzipitation mit Polyethylenglycol durchgeführt.

Der PCR-Ansatz wurde mit 10 % PEG-Lösung (v/v) versetzt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz mindestens 1 h bei 4°C inkubiert. Um das Präzipitat zu

sedimentieren wurde der Ansatz 30 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde durch Zugabe von 500 µl 70 %igem Ethanol (v/v) und 5 min Zentrifugation bei 13.000 Upm gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen und das Präzipitat einem geeigneten Volumen H₂O bid. gelöst. Die Ausbeute der Methode ist von der Inkubationsdauer bei 4°C abhängig. Während einer einstündigen Inkubation wurden nur etwa 50 % der Ausbeute erzielt. Es musste für mindestens 12 h bei 4°C inkubiert werden, um eine weitgehend vollständige Präzipitation zu erhalten.

b) Präzipitation mit Kaliumazetat in Anwesenheit von Ethanol

Kaliumazetat-Lösung:

3,2 M Kaliumazetat	58,9 g
pH 5,5	
	ad 200 ml H ₂ O bid.

Bei der Präzipitation mit Kaliumazetat und Ethanol wird die Nukleinsäurelösung mit einem monovalenten Salz, sowie Alkohol versetzt. Die Nukleinsäure fällt aus und wird durch Zentrifugation sedimentiert. Neben dem Salz bleiben auch viele andere kleine, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst, so dass ein gewisser Reinigungseffekt erzielt wird.

Zunächst wurde die Nukleinsäurelösung mit 2,5 Volumina 96 %igem Ethanol (v/v) versetzt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Kaliumazetat-Lösung wurde der Ansatz kurz geschüttelt und anschließend für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde durch Zugabe 500 µl 70 %igen Ethanols (v/v) und anschließende 30 min Zentrifugation bei 13.000 Upm gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen und das Präzipitat einem geeigneten Volumen H₂O bid. gelöst.

3.7 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 ca. 15 ml H₂O bid. gefüllt und auf die Wasseroberfläche vorsichtig ein Dialyseplättchen aufgebracht. Anschließend wurden 5 – 20 µl DNA-Lösung vorsichtig auf das Dialyseplättchen pipettiert und die Lösung für mindestens 3 h bei Zimmertemperatur dialysiert. Nach erfolgter Dialyse wurde die DNA-Lösung vorsichtig abgenommen, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Dialyseplättchen konnten nach mehrstündiger Reinigung in H₂O bid. wieder verwendet werden.

3.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA erfolgte in 10 bis 500 µl Gesamtvolumen bei einer DNA Konzentration von 50 bis 60 ng/µl unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Für die Spaltung von 1 µg DNA wurden zwischen 1 und 20 U Restriktionsendonuklease eingesetzt. Dabei ist 1 U einer Restriktionsendonuklease definiert als die Aktivität, die 1 µg DNA des Phagen Lambda unter den für das Enzym optimalen Bedingungen in 1 Stunde vollständig spaltet.

3.9 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Lösungen

10 x TBE-Puffer:

890 mM Tris	216 g
890 mM Borsäure	110 g
10 mM Na ₂ EDTA	18,6 g
pH 7,0	
	ad 2000 ml H ₂ O demin.

10 x DNA-Probenpuffer:

50 % Glycerin (v/v)	23 ml einer 87 %igen Lösung (v/v)
0,25 % Bromphenolblau (ges. Lsg.) (v/v)	800 µl
0,25 % Xylencyanol (ges. Lsg.) (v/v)	800 µl
0,4 % Orange G (ges. Lsg.) (v/v)	1280 µl
20 mM Tris	800 µl einer 1 M Lösung; pH 7,5
	ad 40 ml H ₂ O bid.

DNA-Fragmentgemische wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele enthielten 0,5 bis 1,8% Agarose (w/v) in 1 x TBE-Puffer. Die Proben wurden mit 10 % (v/v) Probenpuffer versetzt und in die Probentaschen des Gels gegeben. Um die Fragmentgrößen der DNA-Lösungen bestimmen zu können wurde in eine Probentasche ein DNA-Längenstandard pipettiert. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern in 1 x TBE-Puffer durchgeführt. Es wurde eine Spannung von 2 bis 8 V pro cm Gel angelegt. Nach erfolgter Auftrennung wurde die DNA durch Interkalation von Ethidiumbromid und anschließender Fluoreszenzanregung mit Licht von 302 nm Wellenlänge sichtbar gemacht. Die Verteilung der DNA-Fragmente und des Standards im Agarosegel wurde dokumentiert. Anhand der DNA-Längenstandards konnten dann die Fragmentgrößen bestimmt werden. Es kamen zwei DNA-Längenstandards zum Einsatz. Für Fragmentgrößen von 1 bis 20 kbp wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Eco130I* und *HindIII* gesplante DNA des Phagen Lambda verwendet (λ E). Die Größenbestimmung kleinerer Fragmente erfolgte im Vergleich zu der mit der Restriktionsendonuklease *SduI* gesplante DNA des Vektors pSK+.

3.10 Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Lösungen

10 x Morpholinopropansulfonsäure-Puffer (MOPS-Puffer):

500 mM Morpholinopropansulfonsäure 104,7 g

10 mM Na₂EDTA 3,7 g

pH 7,0

ad 1000 ml H₂O demin.

(MOPS-Puffer verfärbt sich nach dem Autoklavieren gelb.)

RNA-Probenpuffer:

10 x MOPS-Puffer 1 ml

50 % Formamid (v/v) 5 ml einer 100 %igen Lösung

6,8 % Formaldehyd (v/v) 1,84 ml einer 37 %igen Lsg. (w/v)

11,7 % Glycerin (v/v) 1,34 ml einer 87 %igen Lsg. (w/v)

1 % Xylencyanol (ges. Lsg.) (v/v) 100 μ l

1 % Bromphenolblau (ges. Lsg.) (v/v) 100 μ l

5 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) (w/v) 50 μ l

ad 10 ml H₂O bid.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

RNA-Lösungen wurden durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Herstellung von fünf Flachbettgelen der Größe 8 x 12 cm wurden 4,2 g Agarose in 370 ml sterilem H₂O bid. durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Die Lösung wurde unter dem Abzug unter Rühren auf 60°C abgekühlt und mit 21 ml 10 x MOPS-Puffer, sowie 6,3 ml Formaldehydlösung (37 %) versetzt. In jede der Flachbettkammern wurden sofort ca. 80 ml der Gellösung gegossen und nach Einsetzen der Platzhalter für die Probenaschen für mindestens eine Stunde bei Zimmertemperatur abgekühlt. Die Proben wurden mit 400 % (v/v) Probenpuffer versetzt und 10 min auf 65°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proben in die Probenaschen des Gels gegeben (maximales Taschenvolumen 50 µl). Anhand der Quantifizierung der rRNA Fluoreszenz in Ethidiumbromid gefärbten Gelen wurden die auf das Gel aufgetragenen Mengen normiert. Um die Fragmentgrößen von Transkripten in der Northern Blot Analyse bestimmen zu können wurde in eine Probenasche ein RNA-Längenstandard pipettiert. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern in 1 x MOPS-Puffer durchgeführt. Es wurde eine Spannung von ca. 80 V angelegt. Nach 1,5 h wurde das Gel umgedreht und die Stromrichtung der Kammer geändert, da durch die Verwendung eines Laufpuffers mit einer niederen Ionenstärke nach zwei Stunden eine vollständige Ladungstrennung erreicht worden wäre. Diese würde die weitere Auftrennung der RNA verhindern. Nach erfolgter Auftrennung wurde die rRNA durch Fluoreszenzanregung des interkalierten Ethidiumbromids mit Licht von 302 nm Wellenlänge sichtbar gemacht. Die Verteilung der rRNA und des Standards im Agarosegel wurde dokumentiert. Anhand des RNA-Längenstandards konnten später die Transkriptgrößen bestimmt werden. Die RNA-Fragmente des RNA-Längenstandards besaßen dabei die folgenden Größen: 9488 nt, 6225 nt, 3911 nt, 2800 nt, 1898 nt, 872 nt, 562 nt und 363 nt.

3.11 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

TE-Puffer:

10 mM Tris	0,12 g
1 mM Na ₂ EDTA	0,04 g
pH 8,0	
	ad 100 ml H ₂ O bid.

Silicat-Material bindet Nukleinsäuren in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze wie z.B. Natriumjodid, Guanidinisothiocyanat oder Natriumperchlorat und kann, nach

einem Waschschrift mit einem Salz-Ethanol-Puffer, durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen (H₂O bid. oder TE-Puffer) wieder eluiert werden.

Die gewünschte Nukleinsäure haltige Bande wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus einem Agarosegel ausgeschnitten und das Gelblöckchen in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Gelblöckchen wurde mit 3 Volumina Hochsalzpuffer versetzt und 10 min bei 50°C inkubiert. Alle 2 min wurde der Ansatz geschüttelt um die Agarose vollständig zu lösen. Anschließend wurde die Agarose-DNA-Lösung in eine Qiagen-Säule gegeben. Die Säule wurde 1 min bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei wurden die Nukleinsäuren von einer Silicat-Matrix zurückgehalten, während die im Puffer gelöste Agarose ungehindert passieren konnte. Um eventuell ebenfalls zurückgehaltene, ungelöste Agarose zu entfernen wurde die Säulenmatrix 1-mal mit 500 µl Hochsalzpuffer gespült. Die DNA wurde 1-mal mit einem Ethanolpuffer gewaschen und die überschüssige Flüssigkeit durch Zentrifugation aus der Säulenmatrix entfernt. Mit 60 µl Elutionspuffer wurde die DNA wieder von der Säule eluiert.

3.12 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Um die Religation linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, wurden mit Hilfe von Alkalischer Schrimps Phosphatase die 5'-Phosphatgruppen abgespalten. Es wurde gemäß der Angabe des Herstellers 1 U pro 2,5 µg Plasmid-DNA eines 3 kbp-Vektors verwendet. Die Reaktion wurde durch 15 min Erhitzen auf 65°C gestoppt.

3.13 Ligation

10 x T4-DNA-Ligasepuffer:

300 mM Tris	1,8 g
100 mM MgCl ₂	1,0 g
100 mM Dithiothreitol	0,77 g
10 mM ATP	500 µl einer 1 M Stammlösung
pH 7,8	
	ad 50 ml H ₂ O bid.

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in Ansätzen von 8 bis 20 µl. Die DNA-Konzentration der zu ligierenden Fragmente wurde in Abhängigkeit des gewünschten Vektor/Insert-Verhältnisses innerhalb der Reaktion variiert und lag zwischen 20 und

500 µg/ml. In jede Reaktion wurden 1 bis 2 U T4-DNA-Ligase eingesetzt und 16 h bei 4, 16 oder 20°C inkubiert. Dabei ist 1 U T4-DNA-Ligase definiert als die Aktivität, die in 20 min bei 37°C 1 nmol ³²PP_i in die Norit-absorbierbare Form umwandelt.

3.14 Transformation von Mikroorganismen

a) *E. coli*

Vorbereitung der Zellen für die Elektroporation

Zunächst wurden *E. coli*-Kulturen durch Entfernen von Salzen aus dem Medium und Konzentrieren der Zellen für die Transformation vorbereitet. Dazu wurden 50 ml SOB-Medium mit einer Kolonie eines frischen Verdünnungsausstriches inokuliert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde aus der Vorkultur im Verhältnis 1:100 in 2 x 500 ml Hauptkultur überimpft. Die beiden Kulturen wurden inkubiert bis sie eine bei 600 nm Optische Dichte von 0,6 aufwiesen. Die Kulturen wurden in sterile, vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt. Durch 20 min Zentrifugation bei 4.000 g und 4°C wurden die Zellen sedimentiert und mit ebenfalls vorgekühlten Pipetten in jeweils 200 ml eisgekühlter, sterilfiltrierter 10 %iger Glycerinlösung (v/v) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und die Zellsedimente in jeweils 50 ml Glycerinlösung suspendiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellsedimente in jeweils 200 µl Glycerinlösung aufgenommen. Die so konzentrierten Zellen wurden in Aliquots von je 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Durchführung der Elektroporation

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mit 2 µl DNA-Lösung versetzt. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit 5 ng pSK+ versetzt. Ein weiterer Ansatz ohne Zugabe von DNA-Lösung diente als Nullkontrolle. Die Zellen wurden vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zell-DNA-Suspension vorsichtig und luftblasenfrei in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und das ganze wiederum für 10 min auf Eis inkubiert. Um einen Kurzschluss zu vermeiden, wurden die Kontaktstellen der Elektroporationsküvette sorgfältig mit einem Papiertuch getrocknet. Die Küvette wurde in den Gene Pulser eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte bei 1.500 V, 800 Ω und 25 µF. Die Abklingzeiten sollten bei 13-17 ms liegen. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml vorgewärmtem SOB-Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Reagenzglas überführt und zur Regeneration der Zellen und zur Expression des

Antibiotikaresistenzgens wurden die Zellen 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden in geeigneter Verdünnung auf SOB-Selektivplatten ausplattiert. Unter optimalen Bedingungen sind mit dem verwendeten *E. coli*-Stamm Transformationseffizienzen von $1-2 \cdot 10^9$ Transformanden pro μg eingesetzter DNA zu erwarten.

b) *H. salinarum*

Sphäroblastenbildungslösung (SBL):

2 M NaCl	116 g
27 mM KCl	2 g
50 mM Tris	50 ml einer 1 M Lösung, pH 7,2
15 % Saccharose (w/v)	150 g
	ad 1000 ml H ₂ O demin.

Die Lösung wurde sterilfiltriert und anschließend bei Zimmertemperatur gelagert.

Sphäroblastenverdünnungslösung (SVL):

3,85 M NaCl	180 g
70 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O	14,0 g
24 mM KCl	1,4 g
10 mM <i>tri</i> -Natriumcitrat	2,2 g
1,2 mM CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,14 g
45 mM Tris	30 ml einer 1 M Lösung; pH7,2
15 % Saccharose (w/v)	97,5 g
	ad 650 ml H ₂ O demin.

Die Lösung wurde sterilfiltriert und anschließend bei Zimmertemperatur gelagert.

PEG-Lösung:

60 % PEG 600 (w/v)	6 g
	ad 10 ml SBL

EDTA-Lösung:

0,5 M Na ₂ EDTA	18,5 g
pH 8,2	
	ad 100 ml SBL

H. salinarum wurde nach der Methode von Cline *et al.* (1989) transformiert, die etwas modifiziert wurde. Dazu wurden 35 ml Support-Medium mit einer Kolonie eines frischen Verdünnungsausstriches inokuliert und die Kultur bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Von der Kultur wurde 1 ml abgenommen und in frisches Medium überimpft und die Kultur wiederum bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Die Kultur wurde ein weiteres Mal verdünnt und anschließend bis zu einer Zelldichte von 60 bis 80 Klett-Einheiten auf dem Schüttler inkubiert. Für die Transformation wurden 2 ml Halobakterien-Kultur 6 min bei 6.000 Upm in einer zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Zellsediment in 180 µl SBL suspendiert. Die Zellen wurden 5 min auf dem Reaktionsgefäßinkubator geschüttelt. Zur Sphäroblastenbildung wurden 20 µl EDTA-Lösung zugeben und die Reaktionsgefäße vorsichtig 20-mal umgedreht. Die Zellen wurden 10 bis 30 min bis zur vollständigen Sphäroblastenbildung inkubiert. Zwischendurch wurden geringe Mengen entnommen um die vollständige Sphäroblastisierung der Zellen im Phasenkontrastmikroskop zu verfolgen. Zur Sphäroblastensuspension wurden 20 µl DNA-Lösung (2 µg – 5 µg Plasmid-DNA in 2 M NaCl) zugeben und die Suspension durch 20-mal umdrehen der Reaktionsgefäße vorsichtig gemischt. Die Sphäroblasten-DNA-Suspension wurde weitere 5 min inkubiert. In den Deckel der Reaktionsgefäße wurden 230 µl PEG-Lösung vorgelegt. Durch Verschließen der Reaktionsgefäße und anschließendes rasches Schwenken wurden die Lösungen miteinander vermischt bis keine Schlieren mehr vorhanden waren. Die Ansätze wurden 20 min bei Zimmertemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden 10 µl der Lösung entnommen und im Phasenkontrastmikroskop auf Bildung von Zellaggregaten kontrolliert, die für die erfolgreiche Durchführung der Transformation essentiell sind. Durch Zugabe von 1.600 µl SVL wurde die PEG-Konzentration in den Ansätzen drastisch gesenkt. Eine erneute Kontrolle der Zellen im Phasenkontrastmikroskop zeigte, dass sich die Zellaggregate wieder voneinander gelöst hatten. Ein 100 µl Aliquot wurde auf eine Support-Mediumplatte mit Novobiocin (0,1 µg/ml) ausplattiert und die Platte für etwa 10 bis 14 Tage bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Transformation ausgewertet und die Transformanden charakterisiert.

3.15 Polymerasekettenreaktion

a) Standard-Polymerasekettenreaktion

10 x *Taq*-Polymerasepuffer:

500 mM KCl	0,75 g
100 mM Tris	0,24 g
1 % Triton X-100 (w/v)	0,2 g
pH 9,0	

ad 20 ml H₂O bid.

Desoxynukleotidgemisch:

1,0 mM dATP	10 µl einer 100 mM-Stammlösung
1,0 mM dTTP	10 µl einer 100 mM-Stammlösung
1,5 mM dGTP	15 µl einer 100 mM-Stammlösung
1,5 mM dCTP	15 µl einer 100 mM-Stammlösung

ad 1000 µl H₂O bid.

Mit Hilfe von PCR-Reaktionen können spezifisch DNA-Bereiche amplifiziert werden. Die Vervielfältigung erfolgt dabei mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-DNA-Polymerase) in einem zyklisch ablaufenden Temperaturprogramm. Ein Zyklus besteht dabei aus drei Phasen: der Denaturierung der DNA-Vorlage, der Hybridisierung der beiden einzelsträngigen Oligonukleotide (Annealing) mit der DNA-Vorlage und der Verlängerung der Oligonukleotide durch Desoxynukleotide (Extension). Die Zusammensetzung und das Temperaturprofil musste für jeden einzelnen zu amplifizierenden DNA-Bereich optimiert werden. Eine Standard PCR-Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

DNA-Vorlage	0,02 bis 1 µg
Oligonukleotid 1	100 pMol
Oligonukleotid 2	100 pMol
Desoxynukleotidgemisch	16 µl
10 x <i>Taq</i> -Polymerasepuffer	10 µl
MgCl ₂ [10 mM]	15 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2 µl einer 1:10 Verdünnung
	ad 100 µl H ₂ O bid.

Bei der *Taq*-DNA-Polymerase handelte es sich um ein Eigenisolat, deren Aktivität nicht bestimmt wurde. Wurden DNA-Amplifikate für die Klonierung verwendet, so wurde anstelle der *Taq*-DNA-Polymerase die *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Der Vorteil der *Pfu*-DNA-Polymerase liegt in der 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, die der *Taq*-DNA-Polymerase fehlt. Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase führt zu einer 10-mal höheren Genauigkeit der DNA-Synthese.

Das Temperaturprofil einer Standard PCR sah folgendermaßen aus:

Denaturierung	95°C	10 sec
Annealing	55°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
30 Zyklen		

Die Länge der Denaturierungsschrittes und die Temperatur wurde dabei je nach DNA-Vorlage variiert. Während bei Plasmid-DNA 10 sec bei 95°C ausreichend waren, wurde bei Einsatz chromosomaler DNA die Länge auf 30 bis 45 sec erhöht und die Temperatur auf 96°C gesteigert.

Die Temperatur des Annealing-Schrittes ist von den verwendeten Oligonukleotiden abhängig. Dabei kam es auf das Oligonukleotid mit der geringeren Hybridisierungstemperatur an. Diese ermittelt man im einfachsten Fall über die so genannte „2+4“-Regel:

$$\text{Hybridisierungstemperatur} = 4^{\circ}\text{C für jedes G bzw. C} + 2^{\circ}\text{C für jedes A bzw. T}$$

Diese Regel gilt allerdings nur für Oligonukleotide mit ungefähr 20 Basen.

Die Länge des Extensions-Schrittes ist von der Syntheserate der verwendeten DNA-Polymerase abhängig und beträgt für die eingesetzte *Taq*-DNA-Polymerase etwa 1000 Basen/Minute.

b) Polymerasekettenreaktion mit „ganzen Zellen“

Zur schnellen Überprüfung von *E. coli*-Transformanden auf die eingebrachte Plasmid-DNA bzw. zur Überprüfung von *H. salinarum*-Transformanden auf die korrekte Integration von

Plasmid-DNA in das Genom, wurde in eine Polymerasekettenreaktion anstelle einer reinen Plasmidpräparation ein geringes Volumen des transgenen Organismus eingesetzt.

Von einer *E. coli*- bzw. *H. salinarum*-Kultur wurden 10 µl in ein 0,2 µl-Reaktionsgefäß vorgelegt, die Zellen sedimentiert und die folgenden Lösungen zugegeben:

Oligonukleotid 1	20 pMol
Oligonukleotid 2	20 pMol
Desoxynukleotidgemisch	3 µl
10 x <i>Taq</i> -Polymerasepuffer	2 µl
MgCl ₂ [10 mM]	1,2 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,5 µl einer 1:10 Verdünnung ad 20 µl H ₂ O bid.

Für die Durchführung der Polymerasekettenreaktion wurde ein Temperaturprofil vergleichbar mit dem einer Standard PCR verwendet.

c) Herstellung DIG-markierter Sonden

Zum Nachweis von mRNA wurde eine Hybridisierung durchgeführt. Als Sonde diente ein Digoxigenin-11-dUTP markiertes PCR-Produkt, das komplementär zur Sequenz des nachzuweisenden Gens war. Die Sonde wurde mittels Standard-PCR hergestellt, wobei das Basenanalogon Digoxigenin-11-dUTP eingebaut wurde.

Desoxynukleotidgemisch:

1,0 mM dATP	10 µl einer 100 mM-Stammlösung
0,125 mM dTTP	1,25 µl einer 100 mM-Stammlösung
1,5 mM dGTP	15 µl einer 100 mM-Stammlösung
1,5 mM dCTP	15 µl einer 100 mM-Stammlösung ad 1000 µl H ₂ O bid.

DIG-11-dUTP:

2 µl pro 100 µl Reaktion
Konzentration der Stammlösung: 1mM
Endkonzentration: 20 µM

3.16 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Der Reaktionsansatz beinhaltet die folgenden Substanzen:

Reaktionsansatz:

DNA-Vorlage	100 – 500 ng
Oligonukleotid	10 pMol
Reaktionsmix	4 µl
	ad 10 µl H ₂ O bid.

Der Reaktionsmix (BigDye Terminator RR Mix) wurde gebrauchsfertig geliefert und enthielt DNA-Polymerasepuffer, Desoxynukleotide, basenspezifisch Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide, sowie eine thermostabile DNA Polymerase. Die Sequenzierreaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurde das folgende Temperaturprofil verwendet:

Denaturierung	96°C	10 sec
Annealing	50°C	5 sec
Extension	60°C	4 min
25 Zyklen		

Da die an die Didesoxynukleotide gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe hitzelabil sind, wurde der Extensionsschritt bei 60°C anstelle von 72°C in der üblichen Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Nach dem Durchlauf von 25 Zyklen wurden zum Reaktionsansatz 10 µl H₂O bid. gegeben. Die im Reaktionsansatz enthaltene DNA wurde in Anwesenheit von Ethanol mit Kaliumazetat aus der Lösung präzipitiert und getrocknet. Die getrocknete DNA wurde der Firma SRD (Oberursel) übergeben. Dort wurde die DNA wieder in Formamid gelöst, erhitzt und auf einem gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion und Auswertung der Signale der markierten DNA-Fragmente erfolgte mit einem ABI Prism sequencer 377.

3.17 Transfer von Nukleinsäuren

a) Transfer von RNA auf Membranen

20 x SSC-Puffer:

3 M NaCl	175,3 g
300 mM <i>tri</i> -Natriumcitrat	88,2 g
pH 7,0	
	ad 1000 ml H ₂ O demin.

5 x ASSC-Puffer:

0,75 M NaCl	43,8 g
75 mM <i>tri</i> -Natriumcitrat	22,06 g
10 mM NaOH	0,4 g
pH 11,5	
	ad 1000 ml H ₂ O demin.

Methylenblaulösung:

0,04 % Methylenblau (w/v)	0,04 g
0,5 M NaAcetat · 2H ₂ O	6,8 g
pH 5,0	
	ad 100 ml H ₂ O demin.

Der Transfer von RNA erfolgte mittels Kapillartransfer (Löw and Rausch, 1994; Ming et al. 1994). 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 (Qiabrane, ungeladen; Qiagen), in H₂O demin. vorgequollen und in Transferpuffer equilibriert.
- Agarosegel mit zu transferierender RNA
- 3 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Transferpuffer equilibriert

Zwischen den Lagen auftretenden Luftblasen wurden mit einem Reagenzglas vorsichtig heraus gewalzt. Die einzelnen Lagen hatten eine Größe von jeweils 8 x 12 cm. Als

Transferpuffer diente 20 x SSC Puffer. Um den Pufferfluss nicht zu stoppen wurde der oben beschriebene Aufbau mit einem 12 x 30 cm langen Stück GB 002 Chromatographiepapier mit zwei Pufferreservoirs verbunden. Um die Verdunstung zu minimieren wurde anschließend der Blot mit einer Gelgießkammer (8 x 12 cm) abgedeckt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Alternativ zu dieser Transfermethode wurde mit 5 x ASSC-Puffer für 2 h transferiert. Der Aufbau blieb dabei unverändert (s.o.).

Nach erfolgtem Transfer wurde die Lage der Probestaschen mit einem Bleistift markiert. Die Nylonmembran wurde für eine Minute in Methylenblaulösung geschwenkt. Methylenblaulösung interkaliert reversibel mit der RNA. Die Membran wurde mehrfach mit H₂O demin. gewaschen und zwischen zwei Folien gelegt. Die Verteilung der rRNA und des Standards im Agarosegel wurden auf die Folie übertragen. Anschließend wurde die RNA durch UV-Quervernetzung im Stratalinker bei 120 mJoules mit der Nylonmembran quervernetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran zwischen zwei Blättern GB 002 Chromatographiepapier gelagert.

b) Transfer von DNA auf Membranen

Der DNA-Transfer erfolgte durch einen Kapillartransfer nach Southern (1975). Vor dem Transfer wurde die DNA im Gel durch eine Säure- und Alkalibehandlung in kleinere Fragmente zerlegt und denaturiert. Dazu wurde das Gel auf dem Schüttler nacheinander in den folgenden Lösungen inkubiert:

- 30 min 0,25 M HCl
- 45 min 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
- 60 min 0,5 M Tris/HCl pH 8; 1,5 M NaCl
- 10 min 5 x ASSC pH 11,5

Anschließend wurde die DNA auf die eine geladene Nylonmembran transferiert. Der Aufbau bestand dabei wie für den RNA-Transfer beschrieben, jedoch wurde anstelle der ungeladenen eine geladene Nylonmembran verwendet und als Transferpuffer diente 5 x SSC; pH 11,5. Die Transferzeit betrug 2,5 h. Nach erfolgtem Transfer wurde die Lage der Probestaschen mit einem Bleistift markiert. Die Nylonmembran wurde für eine Minute in Methylenblaulösung geschwenkt. Methylenblaulösung interkaliert reversibel mit der DNA. Die Membran wurde mehrfach mit H₂O demin. gewaschen und zwischen zwei Folien gelegt. Die Verteilung der des Standards im Agarosegel wurde auf die Folie übertragen. Anschließend wurde die DNA

durch UV-Quervernetzung im Stratalinker bei 120 mJoules mit der geladenen Nylonmembran quervernetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran zwischen zwei Blättern GB 002 Chromatographiepapier gelagert.

3.18 Hybridisierung und Chemolumineszenznachweis

100 x Denhardt`s Lösung:

2 % Rinderserumalbumin (w/v)	10 g
2 % Ficoll 400 (w/v)	10 g
2 % Polyvinylpyrrolidon (w/v)	10 g
	ad 500 ml H ₂ O bid.

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und anschließend bei -20°C gelagert.

Hybridisierungslösung:

50 % Formamid (v/v)	225,0 ml
5 x SSC	112,5 ml 20 x SSC
3 x Denhardt`s Lösung	13,5 ml 100 x Denhardt`s Lösung
0,5 % SDS (v/v)	11,1 ml einer 20 %igen Lsg. (w/v)
0,2 % Natriumlaurylsarcosinat (v/v)	3,0 ml einer 30 %igen Lsg. (w/v)
5 % Dextransulfat (v/v)	75,0 ml einer 30 %igen Lsg. (w/v)

Die Hybridisierungslösung wurde autoklaviert und anschließend bei Zimmertemperatur gelagert. Für die Southern Blot Analyse wurde die Formamidkonzentration von 10 bis 50 % (v/v) variiert.

Blockinglösung:

100 mM Maleinsäure	11,6 g
150 mM NaCl	8,77 g
pH 7,5	
	ad 500 ml H ₂ O demin.

1 % Blocking Reagenz (w/v) (Roche, Mannheim) wurden zugesetzt, die Lösung autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert.

Waschpuffer:

100 mM Maleinsäure	11,6 g
150 mM NaCl	8,77 g
pH 7,5	

ad 500 ml H₂O demin.

Der Puffer wurde autoklaviert und bei Zimmertemperatur gelagert. Vor der Verwendung wurde frisch 0,3 % Tween 20 (w/v) zugegeben.

Nachweispuffer:

100 mM Tris	12,11 g
100 mM NaCl	5,84 g
50 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O	2,99 g
pH 9,5	

Der Puffer wurde autoklaviert und bei Zimmertemperatur gelagert.

Die Nylonmembran wurde zur Vorhybridisierung 1 h in Hybridisierungslösung im Hybridisierungsofen bei 45°C inkubiert. Die Sonde wurde zur Denaturierung für 5 min auf 100°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Die zur Vorhybridisierung verwendete Hybridisierungslösung wurde aus dem Hybridisierungsröhrchen in ein Reagenzglas gegeben und mit der Sonde versetzt. Die Lösung wurde kurz gevortext und zurück in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte 16 h bei 45°C. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde wurde nach der Hybridisierung in ein Vorratsgefäß überführt und wurde anschließend zwei- bis dreimal wieder verwendet. Der Nachweis der Digoxigenin markierten Sonde erfolgte mit dem DIG Luminescence Detection Kit unter Verwendung von CDP* nach den Angaben des Herstellers.

4. Proteinbiochemische Methoden

4.1 Heterologe Expression von *sph1_{H6}* in *E. coli* und Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins

Puffer B:

8 M Harnstoff	480,5 g
0,1 M NaH ₂ PO ₄	13,8 g
10 mM Tris	1,2 g
pH 8	
ad 1000 ml H ₂ O demin.	

Puffer C:

8 M Harnstoff	480,5 g
0,1 M NaH ₂ PO ₄	13,8 g
10 mM Tris	1,2 g
pH 6,3	
ad 1000 ml H ₂ O demin.	

Waschpuffer:

100 mM Imidazol	1,36 g
ad 200 ml Puffer C	

Elutionspuffer:

100 mM Na ₂ EDTA	3,72 g
ad 100 ml Puffer C	

Durch die Klonierung des *sph1* Gens in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden), wurde der offene Leserahmen des *sph1* Gens am 5'-Ende um sechs Histidincodons erweitert und unter die Kontrolle des IPTG induzierbaren T5-Phagenpromotors gestellt. Nach Transformation von *E. coli* mit dem Vektorkonstrukt konnte durch Zugabe des Laktoseanalogons IPTG die Synthese des rekombinanten Fusionsproteins Sph1_{H6} induziert werden. Das Protein Sph1_{H6} trägt am N-Terminus sechs Histidinreste, die eine Reinigung mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglichen.

Für eine einfache und schnelle Reinigung rekombinanten Fusionsproteins in kleinem Maßstab wurden in einem Reagenzglas 5 ml Medium mit einer einzelnen Kolonie eines transgenen *E. coli*-Stammes beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden am folgenden Tag 3 ml vorgewärmten Mediums beimpft. Zur Kontrolle wurde zusätzlich weitere 3 ml Medium beimpft. Beide Kulturen wurden inkubiert, bis ihre bei 600 nm bestimmte Optische Dichte 0,5 – 0,7 erreicht hatte. Anschließend wurde bei einer der Kulturen die Induktion der Expression des im Expressionsvektor kodierten *sph1_{H6}* Gens durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 4 mM) herbeigeführt. Beide Kulturen wurden weitere 4-5 h bei 37°C inkubiert. Aus jedem Reagenzglas wurden jeweils 2 ml entnommen und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch 3 min Zentrifugation bei 3.000 Upm sedimentiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellsedimente in jeweils 400 µl Puffer B suspendiert. Durch vorsichtiges Schütteln wurde die Lyse der Zellen bewirkt. Die Lysate wurden 10 min bei 13.000 Upm zentrifugieren, um die Zellwandbruchstücke abzutrennen. Die das lösliche enthaltenden Überstände wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt. Von jedem Ansatz wurden 10 µl abgenommen und (lösliches *E. coli*-Zellprotein). Zu jedem Überstand wurden 20µl einer 50 %igen NCS-Matrix gegeben und die Ansätze 30 min bei Zimmertemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Um die Matrix zu sedimentieren wurden die Ansätze anschließend für 10 sec bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden zur späteren Analyse überführt (ungebundenes lösliches *E. coli*-Zellprotein). Die sedimentierten Matrizen wurden dreimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer gewaschen. Vom ersten Waschschrift wurden die Überstände in sterile Reaktionsgefäße überführt (Überstand des 1. Waschschriftes) und zur späteren Analyse aufbewahrt. Anschließend wurden 100 µl Elutionspuffer zugeben und die Ansätze 2 min bei 20°C inkubiert, um das Protein von den Matrizen zu lösen. Die Ansätze wurden 10 sec bei 13.000 Upm zentrifugiert um die Matrix zu sedimentieren. 100 µl des Überstandes wurden in ein frisches Gefäß überführt (Eluat 1). Anschließend wurde die Elution wiederholt (Eluat 2). Von allen Proben (lösliches *E. coli*-Zellprotein, ungebundenes lösliches *E. coli*-Zellprotein, Überstand des 1. Waschschriftes, Eluat 1 und Eluat 2) der induzierten Kultur und der uninduzierten Kontrollkultur wurden die Proteinkonzentration bestimmt und die Proteinpräparationen auf einem Polyacrylamidgel analysiert.

Waren die Synthese und die anschließende Reinigung des Sph1_{H6} Proteins erfolgreich, so wurde die Prozedur erneut im präparativen Maßstab durchgeführt.

4.2 Herstellen eines Rohextraktes aus *H. salinarum*

Aus einer *H. salinarum*-Kultur wurden 2 ml entnommen und die Zellen durch 40 sec Zentrifugation bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit einem geeigneten Volumen H₂O bid. versetzt und kräftig geschüttelt, so dass sogleich der Zellaufschluss erfolgte. Zelltrümmer und Membranen wurden durch 1 min Zentrifugation bei 13.000 Upm von dem löslichen Zellprotein abgetrennt und der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Proteinlösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Für eine einfache und schnelle Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das BCA Protein Assay Reagent verwendet. Diese Methode basiert auf der Biuret-Reaktion von Proteinen mit Cu²⁺ zu Cu⁺ im alkalischen Milieu. Das gebildete Cu⁺ wird von bicinchronic acid (BCA) in einem Komplex gebunden der eine starke Absorption bei 562 nm aufweist. Zur Proteinbestimmung wurden jeweils 10 µl Proteinlösung mit 200 µl Nachweisreagenz versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Standard dienten BSA-Lösungen bekannter Konzentration. Im Anschluss wurde die Absorption der Proben bei 550 nm im ELISA-Reader bestimmt.

4.4 Präzipitation von Proteinen aus Lösungen

a) nach Mevarech (Mevarech, pers. Mitteilung)

Für die Fällung halobakterieller Proteine nach Mevarech wurde zu einer Proteinlösung 10 % (v/v) 3 M Trichlorazetat-Lösung gegeben. Die Lösungen wurden gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe 15 min mit 13.000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und der Niederschlag in einem geeigneten Volumen 1 M Tris/HCl pH 7,2 gelöst.

b) nach Wessel und Flügge (1984)

Die denaturierende Proteinpräzipitation nach Wessel und Flügge beruht auf der Wirkung von Chloroform. Zunächst wird die Proteinlösung mit Methanol verdünnt und anschließend die

Proteine durch Zugabe von Chloroform präzipitiert. Die Zugabe von Wasser trennt die Lösung in zwei Phasen an deren Phasengrenze sich die präzipitierten Proteine sammeln.

Zunächst wurden in einem Reaktionsgefäß 100 µl Proteinlösung mit 400 µl Methanol versetzt und gemischt. Der Ansatz wurde 10 sec bei 13.000 Upm bei Zimmertemperatur in einer zentrifugiert und anschließend 100 µl Chloroform zugegeben. Nach kräftigem Durchmischen wurde der Ansatz erneut 10 sec bei 13.000 Upm zentrifugiert. Es wurden 300 µl H₂O bid. zugegeben, der Ansatz kräftig durchmischt und 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das präzipitierte Protein durch Zugabe von 300 µl Methanol und anschließende Zentrifugation für 2 min bei 13.000 Upm gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Proteinpräzipitat kurz an der Luft getrocknet. Das Protein wurde in einem geeigneten Volumen H₂O bid. gelöst.

4.5 Acrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in modifizierter Form nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei werden Polypeptide aufgrund ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt, so dass Anionen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel, das dann wie ein Molekularsieb wirkt, sind die Mobilitäten der SDS-Polypeptid-Komplexe proportional zum Logarithmus der Molekülmassen der Polypeptide. Ausnahmen bilden hier Glycoproteine, Membranproteine sowie im Fall von Halobakterien, Proteine mit stark negativer Nettoladung. Die Zuckerreste der Glycoproteine bzw. die zahlreichen negativen Aminosäuren verursachen eine geringere Beladung mit SDS, was zu einer niedrigeren Nettoladung des Moleküls führt. Folglich wandern solche Proteine langsamer durch das Gel und täuschen aufgrund dessen ein höheres Molekulargewicht vor.

Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris	36,4 g
0,4 % SDS (w/v)	0,8 g
8 mM EDTA	0,6 g
pH 8,8	
	ad 200 ml H ₂ O demin.

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris	12,1 g
0,4 % SDS (w/v)	0,8 g
8 mM EDTA	0,6 g
pH 6,8	
	ad 200 ml H ₂ O demin.

APS-Lösung: (täglich frisch ansetzen)

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	1 g
	ad 10 ml H ₂ O demin.

In einer Gelgießvorrichtung wurden gleichzeitig mehrere Gele auf einmal gegossen. In allen Versuchen wurden 0,75 mm dicke Gele mit 10 % und 12 % Polyacrylamid (v/v) verwendet. Für die Anfertigung von 30 ml Trenngellösung wurden je nach benötigter Polyacrylamid Endkonzentration folgende Ansätze hergestellt:

Acrylamid Endkonzentration	10 % (v/v)	12 % (v/v)
PROTOGEL [®] Acrylamidlösung	10 ml	12 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml
H ₂ O demin.	12,5 ml	10,5 ml

Um die Polymerisation zu starten wurden die Lösungen gemischt und die folgenden Lösungen zugegeben:

- 50 µl TEMED
- 90 µl 10 % APS-Lösung

Die Lösungen wurden durch vorsichtiges Umschwenken gemischt und die Trenngele mit einer Pipette gegossen (ca. 4/5 der Laufstrecke) und mit H₂O bid. überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels (mind. 30 min) wurde das H₂O bid. abgegossen. Für 12 ml Sammelgellösung wurden die folgenden Lösungen zusammengegeben:

Acrylamid Endkonzentration	5 % (v/v)
PROTOGEL [®] Acrylamidlösung	2,0 ml
Sammelgelpuffer	3,2 ml
H ₂ O demin.	6,8 ml

Die Lösung wurden gemischt und zur Polymerisation die folgenden Lösungen zugegeben:

24 µl TEMED
40 µl APS-Lösung

Die Sammelgele wurden mit einer Pipette gegossen und die Kämme eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde die Apparatur auseinander genommen, die Gele in feuchte Papiertücher eingeschlagen und bei 4°C gelagert. Die Haltbarkeit der Gele ist auf ca. 3 Monate begrenzt.

Gelelektrophorese

Probenpuffer:

1,25 M Tris/HCl pH 6,8	2,5 ml
SDS	1 g
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
87 % Glycerin (w/v)	5,8 ml
Bromphenolblau	5 mg
	ad 25 ml H ₂ O bid.

10 x Laufpuffer:

250 mM Tris	30,0 g
1,92 M Glyzin	144,0 g
1 % SDS (w/v)	10,0 g
	ad 1000 ml H ₂ O demin.

Der pH-Wert des Laufpuffers sollte 8,3 betragen. Ist dies nicht der Fall, so ist das Glyzin alt und der Puffer kann nicht verwendet werden. Der pH-Wert darf keines Falls nachträglich mit Natriumhydroxid oder Salzsäure eingestellt werden, da die Salzionen die Elektrophorese empfindlich stören würden.

Die Proteinproben wurden mit 1 Volumen Probenpuffer versetzt. Um die Proteine vollständig zu denaturieren wurden sie für 5 min auf 65°C erhitzt und mit einer Hamilton-Spritze in die Probenaschen des Gels gegeben (max. Taschenvolumen 40 µl). In eine freie Tasche wurde ein Molekulargewichtsstandard pipettiert. Es kamen zwei Molekulargewichtsstandards zum Einsatz. Für Coomassie gefärbte SDS-PAGEs wurde der ungefärbte Standard Mark 12 verwendet. Die Eichproteine hatten Molekulargewichte von 6 kDa bis 200 kDa. Die Größenbestimmung in der Western Blot Analyse erfolgte durch den vorgefärbten Molekulargewichtsstandard SeeBlue. Die Eichproteine hatten Molekulargewichte von 4 kDa bis 250 kDa. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 Volt unter ständiger Wasserkühlung. wurde beendet, wenn die blaue Farbbande des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hatte.

Proteinfärbung mit Coomassie Blau

Färbelösung:

0,25 % Coomassie Blue R-250	1,25 g
50 % techn. Methanol (v/v)	250 ml
10 % Essigsäure (v/v)	50 ml
	ad 500 ml H ₂ O demin.

Entfärbelösung:

5 % techn. Methanol (v/v)	50 ml
10 % Essigsäure (v/v)	100 ml
	ad 1000 ml H ₂ O demin.

Das Polyacrylamidgel wurde aus der Halterung entfernt und das Sammelgel vorsichtig vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde 30 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch anschließende Inkubation in Entfärbelösung entfernt. Die Entfärbung erfolgte über Nacht. Die Verteilung der Proteine und des Standards im SDS-PAGE wurden dokumentiert. Anhand der Molekulargewichtsstandards konnten dann die Molekulargewichte der Proteine bestimmt werden.

Trocknung der SDS-Polyacrylamidgele

Glyzerin haltige Entfärbelösung:

10 % Glyzerin (v/v)	11,5 ml einer 87 %igen Lsg. (w/v)
5 % techn. Methanol (v/v)	50 ml
10 % Essigsäure (v/v)	100 ml
ad 1000 ml H ₂ O demin.	

Um die Gele zu archivieren wurden sie getrocknet. Damit die Gele nicht während des Trockenvorganges rissen wurden sie zunächst für 60 min in Glyzerin haltiger Entfärbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Blätter Zellophanpapier gelegt und in einem Geldryer für 120 min bei 80°C und Stufe 1 getrocknet.

4.6 Western Transfer

Anoden-Puffer 1:

300 mM Tris	36,33 g
20 % Methanol (v/v)	200 ml
pH 10,4	
ad 1000 ml H ₂ O demin.	

Anoden-Puffer 2:

25 mM Tris	3,03 g
20 % Methanol (v/v)	200 ml
pH 10,4	
ad 1000 ml H ₂ O demin.	

Kathodenpuffer:

25 mM Tris	3,03 g
40 mM Aminocarbonsäure	5,25 g
20 % Methanol (v/v)	200 ml
ad 1000 ml H ₂ O demin.	

Ponceau S-Färbelösung

2 % Ponceaurot (w/v)	2,0 g
3 % Trichloressigsäure (w/v)	3,0 g
	ad 100 ml H ₂ O demin.

Nach der Auftrennung von Proteinlösungen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine mittels Western Transfer auf eine immobilisierende Membran transferiert werden. Der Proteintransfer erfolgte von 0,75 mm dicken SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe der Transferapparatur in einem Semidry-Verfahren mit einem diskontinuierlichen Puffersystem. Es wurden 12 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, sowie eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Der Aufbau des Western Blots von unten nach oben war:

- Graphitanode, mit H₂O demin. befeuchtet
- 4 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Anodenpuffer 1 equilibriert
- 2 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Anodenpuffer 2 equilibriert
- 1 Nitrocellulosemembran, in H₂O demin. vorgequollen
- SDS-Polyacrylamidgel mit zu transferierenden Proteinen
- 6 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Kathodenpuffer equilibriert
- Graphitkathode, mit H₂O demin. befeuchtet

Zwischen den Lagen auftretenden Luftblasen wurden mit einem Reagenzglas vorsichtig heraus gewalzt. Der Blotaufbau wurde mit 1 kg Gewicht gleichmäßig beschwert. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 0,9 mA/cm² Membranfläche. Damit die Gele während des Transfers nicht quellen und die Bindefähigkeit der Nitrocellulosemembran erhöht wird, enthielten die Transferpuffer jeweils 20 % Methanol (v/v). Nach dem Transfer wurde der Blot 1 min bei Raumtemperatur in Ponceau S-Färbelösung gefärbt. Mit H₂O demin. wurde anschließend die überschüssige Farbe gewaschen. Die Ponceaurotfärbung wurde gewählt, da sie empfindlicher als es eine Coomassiefärbung des Gels ist und die Trichloressigsäure in der Färbelösung wurde eingesetzt um die Proteine gleichzeitig auf der Membran zu fixieren. Bei der späteren Absättigung der Proteinbindungsstellen auf der Membran ging die Färbung wieder verloren. Die Verteilung der Proteine des Molekulargewichtsstandards wurden mit einem Bleistift markiert und die Nitrocellulosemembran bis zur immunologischen Detektion zwischen zwei Blatt GB 002 Chromatographiepapier aufbewahrt.

4.7 Immunologische Detektion von Proteinen

10 x PBS-Puffer:

NaCl	72,0 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	14,2 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,8 g
pH 7,4	
	ad 1000 ml H ₂ O demin.

Waschpuffer:

0,1 % Tween 20 (w/v)	1 g
10 x PBS	100 ml
	ad 1000 ml H ₂ O demin.

Blocking-Lösung:

1 % Magermilchpulver (w/v)	1 g
	ad 100 ml Waschpuffer

Die Lösung wird immer frisch angesetzt und filtriert.

Die Nitrocellulosemembran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 20 min in 100 ml Blocking-Lösung inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 7 Minuten in 50 ml Waschpuffer gewaschen. Der anti-Sph1-Antikörper (Erstantikörper) wurde im Verhältnis 1 : 2.500 in 10 ml Blocking-Lösung verdünnt und die Membran über Nacht bei Zimmertemperatur mit der Antikörperlösung inkubiert. Ungebundener Erstantikörper wurde durch drei Waschschrte von jeweils 7 Minuten mit 50 ml Waschpuffer entfernt. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit dem sekundären, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper, der ebenfalls in Blocking-Lösung verdünnt wurde (1 : 80.000). Nach drei weiteren siebenminütigen Waschschrten in PBS-Tween wurde die Nachweisreaktion durchgeführt. Für die Nachweisreaktion wurden im Verhältnis 1:1 beide ECL-Nachweisreagenzien gemischt (0,125 ml/cm² Membranfläche) und die Membran unter vorsichtigem Schütteln 1 min inkubiert. Die Membran wurde aus dem Nachweisreagenz entnommen und die überschüssige Flüssigkeit durch 15 sec Abtropfen entfernt. Nach Einschweißen in eine Klarsichtfolie wurde die Membran 5 sec bis 20 min auf einem Röntgenfilm exponiert.

4.8 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Amidoschwarz-Lösung:

0,1 % Amidoschwarz (w/v)	0,02g
45 % Methanol (v/v)	9 ml
10 % Essigsäure (v/v)	2 ml
	ad 20 ml H ₂ O demin.

Entfärbe-Lösung:

20 % Methanol (v/v)	10 ml
10 % Essigsäure (v/v)	5 ml
	ad 50 ml H ₂ O demin.

Die Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen nach Root und Reisler (1989) wurde angewendet um nach einem erfolgten Chemolumineszenznachweis die an der Nitrocellulosemembran gebundenen Proteine anzufärben. Die Membran wurde nach dem Chemolumineszenznachweis aus der Folie entnommen und 5 min bei Zimmertemperatur in 20 ml Amidoschwarz-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Amidoschwarz-Lösung zurück in ein Vorratsgefäß gegossen und die Nitrocellulosemembran wurde für 15 min in 50 ml Entfärbe-Lösung inkubiert. Die Membran wurde anschließend zwischen zwei Blatt GB 002 Chromatographiepapier getrocknet. Die Verteilung der Proteine und des Molekulargewichtsstandards auf der Nitrocellulosemembran wurde dokumentiert.

5. Zellbiologische Methoden

5.1 Agarose beschichtete Objektträger

Um lebende *H. salinarum* Zellen für die Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie auf dem Objektträger zu fixieren, wurden Objektträger mit einer dünnen Schicht Agarose beschichtet (Glaser et al., 1997). Trägt man eine geringe Menge einer *H. salinarum* Flüssigkultur auf den Objektträger auf und deckt die die Suspension anschließend mit einem Deckgläschen ab, so saugt sich die Agarose mit der Kulturflüssigkeit voll und quillt auf, so dass die Zellen sanft an das Deckgläschen gedrückt werden. Die Zellen liegen dann alle in einer Ebene und lassen sich besser photographisch dokumentieren.

Zunächst wurden 4 % Agarose (w/v) in H₂O bid. eingewogen und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Je 2 ml der noch heißen Lösung wurden vorsichtig auf einen Objektträger aufgebracht, so dass die ganze Oberfläche gleichmäßig bedeckt war. Der Objektträger wurde für 12 h bei Zimmertemperatur getrocknet, bis das Wasser vollständig aus der Agaroseschicht verdunstet war. Der Objektträger wurde anschließend in der Mikroskopie eingesetzt.

5.2 Fixierung von *H. salinarum* Zellen, DNA-Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen und Fluoreszenzmikroskopie

Fixierungspuffer:

4 % Formaldehyd (v/v)	10,8 ml einer 37 %igen Lösung (w/v)
0,1 M Na-Cacodylat	2,14 g
4,2 M NaCl	25,54 g
220 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O	4,47 g
40 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,99 g
pH 7	
	ad 100 ml H ₂ O bid.

Waschpuffer:

10 mM Tris	0,12 g
20 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,41 g
20 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,49 g
pH 7,5	
	ad 100 ml H ₂ O bid.

Um die intrazelluläre Lokalisation des Nukleoides zu bestimmen wurden Zellen aus *H. salinarum*-Kulturen im Wesentlichen wie bei Poplawski et al. (2000) beschrieben fixiert. Die *H. salinarum*-Zellen wurden in Support-Medium bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert. Es wurden 500 µl Kultur aus dem Kolben entnommen und die Zellen durch 5 min Zentrifugation mit 6.000 Upm bei Zimmertemperatur sedimentiert. Die Zellen wurden in 500 µl Fixierungspuffer aufgenommen und 10 min bei 42°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert, in Waschpuffer resuspendiert und für weitere 10 min bei 42°C inkubiert. Zu den in Waschlösung vorliegenden Zelle wurden 15 µg/ml Hoechst 33342 Stammlösung gegeben. Die Färbung der DNA erfolgte für 20 min bei 42°C. Nach der DNA-Färbung wurden die fixierten Zellen auf Agarose beschichtete Objektträger aufgebracht. Die Fluoreszenz gefärbten Zellen wurden im Phasenkontrast betrachtet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Mikroskopische Bilder wurden mit einem CCD Kamerasystem erstellt und die erhaltenen Bilder mit dem Graphikprogramm Corel Photo-Paint Select Edition übereinander gelegt.

5.3 Synchronisationsprozedur

Zu Beginn jeden Experiments wurden aus *H. salinarum* DSM 670 Dauerkulturen Vereinzelungsausstriche auf Support-Medium Platten erstellt und so lange bei 42°C inkubiert, bis auf der Platte sichtbare Kolonien vorhanden waren. Eine einzelne Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher in 30 ml Support-Medium überführt und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bei 42°C und 250 Upm auf dem Schüttler inkubiert. Die *H. salinarum* Kulturen wurden durch fortlaufende Verdünnungsschritte für mindestens 30 Generationen in der exponentiellen Phase inkubiert. Das Aphidicolin wurde in einer Konzentration von 30 mM in DMSO gelöst. Aliquots der Lösung wurden bei -80°C gelagert. Aphidicolin wurde in einer Endkonzentration von 30 µM zu einer exponentiell wachsenden *H. salinarum*-Kultur mit einer Zelldichte von 10^8 Zellen ml⁻¹ gegeben. Die Zellen wurden kultiviert, bis die mittlere Zelllänge ungefähr 5 µm erreicht hatte (ca. 4 h), so dass etwas weniger als das Doppelte der Zelllänge einer unbehandelten *H. salinarum*-Kultur erreicht wurde. Der Inhibitor wurde durch Zentrifugation (4.500 g, 6 min) aus dem Medium entfernt. Das Aphidicolin haltige Medium wurde verworfen und die Zellen in einem gleichen Volumen vorgewärmten Mediums resuspendiert. Um das überschüssige Aphidicolin zu entfernen wurden die Zellen 10 min bei 42°C und 250 Upm auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen (s.o.) und durchliefen anschließend den Zellzyklus.

6. Elektronenmikroskopische Methoden

6.1 Hochdruckgefrierung

Für die Elektronenmikroskopie wurden Zellen entweder in verschlossenen Zellulosekapillaren kultiviert oder kurz vor Beginn der Hochdruckgefrierung in solche überführt. Die Zellulosekapillaren wurden in eine Petrischale mit 1-Hexadecen und in der Lösung in ca. 2-3 mm lange Stücke geschnitten. Jeweils drei bis vier Kapillarstückchen wurden zwischen zwei kleine Aluminiumschalen von jeweils 3 mm Innendurchmesser gelegt. Dieses „Sandwich“ wurde in eine Halterung eingespannt und die Hochdruckgefrierung (Müller and Moor, 1984; Studer et al., 1989) der in den Kapillaren enthaltenen Proben nach Hohenberg et al., 1994 durchgeführt.

6.2 Gefriersubstitution

Substitutionslösung:

0,5 % Uranylacetat (w/v)	0,15 g
2 % Glutardialdehyd (v/v)	1,2 ml einer 50 %igen Lsg. (w/v)
1 % Formaldehyd (v/v)	1,5 ml einer 20 %igen Lsg. (w/v)
	ad 30 ml 99,8 % Ethanol p.a.

Epon 812:

46 % AGAR 100 Resin (Epon) (v/v)	5 ml
21 % DDSA (1.Härter) (v/v)	2,3 ml
30 % MNA (2.Härter) (v/v)	3,2 ml
2,7 % BDMA (Beschleuniger) (v/v)	0,3 ml

Biologische Präparate für das Elektronenmikroskop müssen dünn sein, um sie mit den stark wechselwirkenden Elektronen durchstrahlen zu können. Die Kapillaren wurden deshalb in ein spezielles Harz eingebettet. Dazu wurde das in den Proben enthaltene Wasser zunächst gegen Ethanol und anschließend gegen das Kunstharz Epon (Kushida, 1967) ausgetauscht. Die Gefriersubstitution erfolgte in der Substitutionslösung mit dem folgenden Temperaturprofil (Humbel and Müller, 1986):

9 h	bei	-90°C
8 h	bei	-60°C
4,5 h	bei	-30°C
1,5 h	bei	-20°C

Alle folgenden Schritte wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Da Epon zwar in Aceton, jedoch nicht in Ethanol löslich ist, wurden die Kapillaren 2-mal für 3 min in einer Glaspetrischale in absolutem Aceton gewaschen und in Epon eingebettet (Luft, 1961). Dazu wurde das Aceton in drei Schritten gegen das Kunstharz ausgetauscht. Die Kapillaren wurden in einer Porzellanschale 6 h in Epon/Aceton (1 Teil Epon + 2 Teile Aceton) inkubiert. Über Nacht erfolgte eine Inkubation der Kapillaren in Epon/Aceton (2 Teile Epon + 1 Teile Aceton). In die Vertiefungen einer Gummimatte wurde jeweils eine Kapillare und ein beschriftetes Schildchen gelegt und beides mit absolutem Epon überschichtet. Die Kapillaren wurden so für 2 h inkubiert. Die Polymerisationsreaktion wurde für 48 h bei 60°C durchgeführt.

6.3 Erstellen von Schnittpräparaten

Die polymerisierten Harzblöckchen wurden aus der Gummimatte herausgedrückt. Mit einer Rasierklinge wurden zunächst die Kanten des Harzblöckchens getrimmt. Das Blöckchen wurde in den Halter eines Ultramikrotoms eingespannt und mit einem Glasmesser das Kunstharz bis 0,1 mm an die eingebettete Kapillare heran entfernt. Die ersten Dünnschnitte der Kapillare erfolgten ebenfalls mit einem Glasmesser. Für das Erstellen von Ultradünnschnitten mit ≤ 100 nm Dicke wurde das Glasmesser des Ultramikrotoms gegen ein Diamantmesser ausgetauscht.

6.4 Elektronenmikroskopie

Als Objektträger wurden runde Netzchen (Grids) aus Kupfer verwendet. Die Netzchen wurden mit einem dünnen Kohlefilmen belegt. Dazu wurde ein Graphitstäbchen auf elektrischem Wege erhitzt und der verdampfende Kohlenstoff bis zu einer Schichtdicke von ca. 10 nm auf eine saubere Glimmeroberfläche aufgedampft. Durch Eintauchen der beschichteten Glimmeroberfläche in H₂O bid. wurde der Kohlefilm abgelöst. Der auf der

Wasseroberfläche schwimmende Kohlefilm wurde auf die Grids übertragen. Die so beschichteten Objektträger waren hydrophob und mussten daher vor dem Aufbringen der Proben benetzbar gemacht werden. Dies erfolgte in einer partiell evakuierten Kammer mit zwei Elektroden, zwischen denen eine Spannung angelegt wurde die das Restgas ionisierte und auf diese Weise eine Glimmerentladung verursachte. Dadurch wurden Ladungen auf den Kohlefilm gebracht, der vorübergehend einen hydrophilen Charakter annahm und so die Ultradünnschnitte von eingebetteten und geschnittenen Proben aufnehmen konnte. Die Schnitte wurden kurze Zeit adsorbiert und überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt. Um die Zellen in der Elektronenmikroskopie erkennen zu können wurden die Proben mit negativ kontrastiert. Die Negativkontrastierung mit Schwermetallsalzen ist eine einfache und schnelle Methode der Kontrastierung. Sie erlaubt die Darstellung von Proteinen und Proteinaggregaten mit einer Auflösung von 1,0 bis 1,5 nm. Das entspricht Proteindomänen von 5-15 Aminosäuren. Die Proben wurden für 5 min mit 2 % Uranylacetat (v/v) kontrastiert. Anschließend wurden Objektträgernetzchen in einen Objekthalter eingespannt und über eine Schleuse in das Elektronenmikroskop eingeführt. Transmissionselektronenmikroskopische Bilder wurden in einem Philips CM 12 Elektronenmikroskop bei 100 oder 120 kV und in Verbindung mit einer Weitwinkelkamera und einem Tietz Computer erstellt.

6.5 Immunogoldmarkierung mit Silberverstärkung

10 x PBS-Puffer:

1,4 M NaCl	81,1 g
27 mM KCl	2 g
15 mM KH ₂ PO ₄	2 g
81 mM NaH ₂ PO ₄	11,5 g
	ad 1000 ml H ₂ O demin.

Der Puffer wird autoklaviert und bei 4°C gelagert.

PBS-Glyzin-Puffer:

50 mM Glyzin	3,75 g
	ad 1000 ml PBS-Puffer

Blocking-Lösung:

0,1 % CWFG (v/v)	5 µl
5 % BSA (w/v)	0,25 g
	ad 5 ml PBS-Puffer

Inkubationspuffer:

0,1 % acetyliertes BSA (v/v)	100 µl einer 10 %igen Lsg. (w/v)
	ad 10 ml PBS-Puffer

Fixierungslösung: (täglich frisch ansetzen)

1 % Glutardialdehyd (v/v)	0,05 ml
	ad 5 ml Inkubationspuffer

Kontrastierungslösung:

2 % Uranylacetat (v/v)	0,1 ml
	ad 5 ml H ₂ O bid.

Um Proteine in Schnittpräparaten für die Elektronenmikroskopie nachzuweisen wurden die Proteine mit spezifischen Gold gekoppelten Antikörpern markiert. Die Durchführung erfolgte nach Tommassen (1985). Alle Reaktionsschritte wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Inkubationslösungen wurden in Tropfen von jeweils ca. 100 µl auf einen Streifen Parafilm M pipettiert und die Nickelgrids vorsichtig mit einer Pinzette auf die Lösungen gelegt. Die Schnitte wurden auf den Nickelgrids zunächst für 17 min in PBS-Glyzin-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Blockierung für 30 min. Die Schnitte wurden 3-mal für 3 min in Inkubationspuffer gewaschen. Mit Hilfe eines Filterpapierstreifens wurde die Pufferlösung vorsichtig vom Grid gesogen. Der Erstantikörper wurde 1 : 1000 in Inkubationspuffer verdünnt und die Schnitte darin für 105 min inkubiert. Die Schnitte wurden 6-mal für 3 min in Inkubationspuffer gewaschen. Mit Hilfe eines Filterpapierstreifens wurde die Pufferlösung vorsichtig vom Grid gesogen. Der Ultrasmall-Gold beladene Zweitantikörper wurde in 1 : 20 Verdünnung auf die Schnitte gegeben und 50 min inkubiert. Die Schnitte wurden 6-mal für 3 min in Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnittpräparate 3-mal für 3 min in PBS-Puffer gewaschen. Die Proben wurden für 5 min in Fixierungslösung fixiert und anschließend für 5 min in PBS-Puffer inkubiert. Die

Schnittpräparate wurden 2-mal für 5 min in H₂O bid. gewaschen. Die Silberverstärkung erfolgte für 12 min, dazu wurden die Proben mit einer Schachtel abgedeckt. Die Schnitte wurden 6-mal für 2 min in H₂O bid. gewaschen. Abschließend wurden die Proben 12 min mit Kontrastierungslösung inkubiert und 3-mal für 2 min in H₂O bid. gewaschen. Das Grid mit den Schnittpräparaten wurde auf ein Filterpapier gelegt und getrocknet. Die Immunogold markierten Schnittpräparate wurden im Elektronenmikroskop untersucht.

7. Material

7.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen:

11-DIG-dUTP	Roche, Mannheim
1-Hexadecen	Merck, Darmstadt
Agarose Ultra Pure DNA Grade	Biorad, München
Amidoschwarz 10B	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natrium-Salz	Roche, Mannheim
Antikörper, sekundär	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aphidicolin	Serva, Heidelberg
Bacto [®] -Agar	BD, Heidelberg
Bacto [®] -Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto [®] -Trypton	BD, Heidelberg
BCA Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, IL, USA
BigDye Terminator RR Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA Fraktion V	Roche, Mannheim
CDP*	Serva, Heidelberg
Coomassie Blue R-250	Serva, Heidelberg
DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol)	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide	Roche, Mannheim
DIG Luminescence Detection Kit	Roche, Mannheim
ECL Western Blot Detection Kit	Amersham Bioscience, Freiburg
Gene Ruler, DNA-Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Glücksklee [®] Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt am Main
Guanidiniumthiocyanat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hoechst 33342	Molecular Probes, Leiden, NL
Hydroxyharnstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG	Serva, Heidelberg
Mark 12	Invitrogen, Karlsruhe
Methylenblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mimosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Morpholinopropansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Novobiocin	Merck, Darmstadt
Orange G	Merck, Darmstadt
PicoGreen™	Molecular Probes, Leiden, NL
Ponceaurot	Merck, Darmstadt
PROTOGEL® Acrylamidlösung	National Diagnostic, Atlanta, USA
Puromycin	Roth, Karlsruhe
RNA- Molekulargewichtsmarker	USB, Cleveland, USA
Roti®-Phenol, TE-gesättigt	Roth, Karlsruhe
SeeBlue, Molekulargewichtsmarker	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck, Darmstadt
Valinomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
λE, DNA-Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Alle weiteren Chemikalien (Reinheitsgrad, zur Analyse) wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Merck, Darmstadt oder Roth, Karlsruhe bezogen.

7.2 Enzyme:

Alkalische Schrimps Phosphatase	USB Corp., Bad Homburg
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene, Leiden, NL
RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden bei MBI Fermentas, St.Leon-Rot erworben.

7.3 Plasmide:

pPCR-Script, pBluescript II-Vektor	Stratagene, Leiden, NL
------------------------------------	------------------------

pQE-30	Qiagen, Hilden
pSDR ^{1/6} -Sph1	Ruepp <i>et al.</i> , 1998
pSK+, pBluescript II-Vektor	Stratagene, Leiden, NL

7.4 Membranen, Filter und Kits:

Chelating Fast Flow Sepharose™	Amersham Bioscience, Freiburg
Chromatographiepapier GB 002	Schleicher & Schüll, Dassel
Chromatographiepapier GB 004	Schleicher & Schüll, Dassel
Dialysemembran White VSWP	Millipore, Eschborn
Jetstar Maxi-Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Nirocellulosemembran Hybond NX	Amersham Bioscience, Freiburg
Nitrocellulosemembran Protran BA 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Qiabrane, ungeladene Nylonmembran	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter; 0,22 µm Porengröße	Millipore, Eschborn
Sterilfilter; 0,45 µm Porengröße	Millipore, Eschborn

7.5 Geräte:

2117 Multiphor II Electrophoresis Unit	LKB Bromma
2301 Macrodrive 1 Power Supply	LKB Bromma
CCD Kamerasystem Zeiss AxioCam	Carl Zeiss, Jena
CM 12 Elektronenmikroskop	Philips, Hamburg
ELISA-Reader	Molecular Devices, Ismaning
Flachbettschüttler	New Brunswick, Nürtingen
Gatan TV 673 Weitwinkelkamera	Gatan, München
Geldryer	Biorad, München
Gene Pulser	Biorad, München
Hybridisierungsofen Compact Line OV4	Biometra, Göttingen
Klett-Photometer 800-3	Mantostat Corp., USA
Sorvall RC 5C plus, Zentrifuge	Kendro, Hanau
Spectrophotometer U-1100	Hitachi Ltd., Tokio, Japan

Stratalinker 1800

Thermocycler GeneAmp PCR System 2400

Tietz Computer

Tischzentrifuge Labofuge pico

Stratagene, Leiden, NL

Applied Biosystems, Weiterstadt

Tietz, München

Heraeus Instruments, Hanau

VI. Literaturverzeichnis:

Amend, J.P. and Shock, E.L. (2001) Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 175-243.

Anand, S., Verma, H., Kumar, L. and Singh, N. (1995) Induction of apoptosis in chronic myelogenous lymphocytes by hydroxyurea and adriamycin. *Cancer Lett.*, **88**, 101-105.

Anderson, D.E., Trujillo, K.M., Sung, P. and Erickson, H.P. (2001) Structure of the Rad50•Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by Electron Microscopy. *J. Biol. Chem.*, **276**, 37027-37033.

Ball, A.R. and Yokomori, K. (2001) The structural maintenance of chromosomes (SMC) family of proteins in mammals. *Chromosome Res.*, **9**, 85-96.

Baumann, P. and Jackson, S.P. (1996) An archaeobacterial homologue of the essential eubacterial cell division protein FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6726-6730.

Bell, S.D., Magill, C.P. and Jackson, S.P. (2001) Basal and regulated transcription in Archaea. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 392-395.

Bernander, R. (1998) Archaea and the cell cycle. *Mol. Microbiol.*, **29**, 955-961.

Bernander, R. (2000) Chromosome replication, nucleoid segregation and cell division in archaea. *Trends Microbiol.*, **8**, 278-283.

Bernander, R. and Poplawski, A. (1997) Cell cycle characteristics of thermophilic Archaea. *J. Bacteriol.*, **179**, 4963-4969.

Bernander, R., Poplawski, A. and Grogan, D.W. (2000) Altered patterns of cellular growth, morphology, replication and division in conditional-lethal mutants of thermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Microbiology*, **146**, 749-757.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.

- Böhlke, K., Pisani, F., Rossi, M. and Antranikian, G. (2002) Archaeal DNA replication: spotlight on a rapid moving field. *Extremophiles*, **6**, 1-14.
- Britton, R.A., Lin, D.C-H. and Grossman, A.D. (1998) Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev.*, **12**, 1254-1259.
- Bucknall, R.A., Moores, H., Simms, R. and Hesp, B. (1973) Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**, 294-298.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) XL1-blue a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**, 376-377.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D. *et al.* (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science*, **273**, 1058-1073.
- Charlebois, R.L., She, Q., Sprott, D.P., Sensen, C.P. and Garrett, R.A. (1998) *Sulfolobus* genome: from genomics to biology. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 584-588.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2001) Promotion of the Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the RAD50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol. Cell.*, **8**, 1105-1115.
- Chicas, A. and Macio, G. (2001) Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO Rep.*, **2**, 992-996.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- Cline, S.W., Lam, W.L., Charlebois, R.L., Schalkwyk, L.C. and Doolittle, W.F. (1989) Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can J. Microbiol.*, **35**, 148-152.
- Cobbe, N. and Heck, M.M.S. (2000) Review: SMCs in the world of chromosome biology – from prokaryotes to higher eukaryotes. *J. Strut. Biol.*, **129**, 123-143.

Connelly, J.C., de Leau, E.S. and Leach, D.R.F. (1999) DNA cleavage and degradation by the SbcCD protein complex from *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 1039-1046.

Connelly, J.C., Kirkham, L.A. and Leach, D.R.F. (1998) The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7969-7974.

Cromie, G.A., Connelly, J.C., and Leach, D.R.F. (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: Conserved mechanisms from phage to humans. *Mol. Cell*, **8**, 1163-1174.

D'Ari, R. (2001) Cycle-regulated genes and cell cycle regulation. *BioEssays*, **23**, 563-565.

Danner, S. and Soppa, J. (1996) Characterization of the distal promoter element of halobacteria *in vivo* using saturation mutagenesis and selection. *Mol. Microbiol.*, **19**, 1265-1276.

Darwiche, N., Freeman, L.A. and Strunnikov, A. (1999) Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene*, **233**, 39-47.

Davis, P.K., Ho, A. and Dowdy, S.F. (2001) Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *BioTechniques*, **30**, 1322-1331.

De Backer, M.D., Raponi, M. and Arndt, G.M. (2002) RNA-mediated gene silencing in non-pathogenic and pathogenic fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 323-329.

DeLong, E.F. (1998) Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 323-329.

DeLong, E.F. and Pace, N.R. (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.*, **50**, 470-478.

Dewar, S.J. and Dorazi, R. (2000) Control of division gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **187**, 1-7.

Doležel, J., Číhalíková, J., Weiserová, J. and Lucretti, S. (1999) Cell cycle synchronization in plant root meristems. *Meth. Cell Sci.*, **21**, 95-107.

Donachie, W.D. (2001) Co-ordinate regulation of the *Escherichia coli* cell cycle or The cloud of unknowing. *Mol. Microbiol.*, **40**, 779-785.

Elie, C., Baucher, M.-F., Fondrat, C. and Forterre, P. (1997) A protein related to eucaryal and bacterial DNA-motor proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Mol. Evol.*, **45**, 107-114.

England, J.C. and Gober, J.W. (2001) Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 674-680.

Erickson, H.P. (2001) The FtsZ protofilament and attachment of ZipA – structural constraints on the FtsZ power stroke. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 55-60.

Errington, J. (2001) Septation and chromosome segregation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 660-666.

Feiler, H.S., Desprez, T., Santoni, V., Kronenberger, J., Caboche, M. and Traas, J. (1995) The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional *CDC48* homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *EMBO Journal*, **14**, 5626-5637.

Felsenstein, J., (1996). Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Meth. Enzymol.*, **266**, 418-427.

Forterre, P., Elie, C. and Kohiyama, M. (1984) Aphidicolin inhibits growth and DNA synthesis in halophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.*, **159**, 800-802.

Fousteri, M.I. and Lehmann, A.L. (2000) A novel SMC protein complex in *Schizosaccharomyces pombe* contains the Rad18 DNA repair protein. *EMBO Journal*, **19**, 1691-1702.

Fröhlich, K.U., Fries, H.W., Rudiger, M., Erdmann, R., Botstein, D., and Mecke, D. (1991) Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J. Cell Biol.* **114**, 443-453.

Fujioka, Y., Kimata, Y., Nomaguchi, K., Watanabe, K. And Kohno, K. (2002) Identification of a novel non-structural maintenance of chromosomes (SMC) component of the SMC5-SMC6 complex involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21585-21591.

Futcher, B. (1999) Cell cycle synchronization. *Meth. Cell Sci.*, **21**, 79-86.

Futcher, B. (2000) Microarrays and cell cycle transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 710-715.

Gilson, P.R. and Beech, P.L. (2001) Cell division protein FtsZ: running rings around bacteria, chloroplasts and mitochondria. *Res. Microbiol.*, **152**, 3-10.

Glaser, P., Sharpe, M.E., Raether, B., Perego, M., Ohlsen, K. and Errington, J. (1997) Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes Dev.* **11**, 1160 - 1168.

Graumann, P.L. (2000) *Bacillus subtilis* SMC is required for proper arrangement of the chromosome and for efficient segregation of replication termini but not for bipolar movement of newly duplicated origin regions. *J. Bacteriol.*, **182**, 6463-6471.

Graumann, P.L. (2001) SMC proteins in bacteria: Condensation motors for chromosome segregation? *Biochimie*, **83**, 53-59.

Graumann, P.L., Losick, R. and Strunnikov, A.V. (1998) Subcellular localization of *Bacillus subtilis* SMC, a protein involved in chromosome condensation and segregation. *J. Bacteriol.*, **180**, 5749-5755.

Haering, C., Löwe, J., Hochwagen, A. and Nasmyth, K. (2002) Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesion complex. *Mol. Cell*, **9**, 773-788.

Hannahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning – A practical approach, Band I, 109-135. Hrsg.: Glover, D.M. IRL Press, Oxford, Washington D.C.

Harry, E.J. (2001) Bacterial cell division. *Mol. Microbiol.*, **40**, 795-803.

Hartsuiker, E., Vaessen, E., Carr, A.M. and Kohli, J. (2001) Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair. *EMBO Journal*, **20**, 6660-6671.

Harvey, S.H., Krien, M.J.E. and O'Connell, M.J. (2002) Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins, a family of conserved ATPases. *Genome Biol.*, **3**, 3003.1-3003.5.

Helmstetter, C.E., Thornton, M. and Grover, N.B. (2001) Cell-cycle research with synchronous cultures: an evaluation. *Biochimie*, **83**, 83-89.

Hirano, M. and Hirano, T. (1998) ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer. *EMBO Journal*, **17**, 7139-7148.

Hirano, T. (1999) SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev.*, **13**, 11-19.

Hirano, T. (2002) The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.*, **16**, 399-414.

Hjort, K. and Bernander, R. (1999) Changes in cell size and DNA content in *Sulfolobus* cultures during dilution and temperature shift experiments. *J. Bacteriol.*, **181**, 5669-5675.

Hjort, K. and Bernander, R. (2001) Cell cycle regulation in the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Mol. Microbiol.*, **40**, 225-234.

Hohenberg, H., Mannweiler, K. and Müller, M. (1994) High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes. *J. Microsc.*, **175**, 34-43.

Hopfner, K.-P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P. and Trainer, J.A. (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*, **101**, 789-800.

Horn, C., Paulmann, B., Kerlen, G., Junker, N. and Huber, H. (1999) In vivo observation of anaerobic hyperthermophiles by using a high-intensity dark-field microscope. *J. Bacteriol.*, **181**, 5114-5118.

Humble, B.M. and Müller, M. (1986) Freeze substitution and low-temperature embedding. In: Müller, M., Becker, R.P., Boyde, A. and Wolosewick, J.J. (edt.) The science of biological specimen preparation 1985. SEM Inc., AMF O'Hare, Ill., USA, pp. 175-183.

Jansson, B.P., Malandrin, L. and Johansson, H.E. (2000) Cell cycle arrest in archaea by the hypusination inhibitor N^1 -Guanyl-1,7-Diaminoheptane. *J. Bacteriol.*, **182**, 1158-1161.

Jensen, R.B. and Shapiro, L. (2000) Proteins on the move: dynamic protein localization in prokaryotes. *Trends Cell Biol.*, **10**, 483-488.

Jensen, R.B., Wang, S.C. and Shapiro, L. (2002) Dynamic localization of proteins and DNA during bacterial cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 167-176.

Jones, S. and Sgouros, J. (2001) The cohesion complex: sequence homologies, interaction networks and shared motifs. *Genome Biol.*, **2**, 0009.1-0009.12.

Kaufmann, S.H., Desnoyer, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirer, G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **53**, 3976-3985.

Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y. et al. (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.*, **6**, 145-152.

Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y. et al. (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.*, **5**, 147-155.

Klenk, H. P., Clayton, R.A., Tomb, J.-F., White, O., Nelson, K.E. et al. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, **390**, 364-370.

Kleuser, B., Rieter, H. and Adam, G. (1985) Selective effects by valinomycin on cytotoxicity and cell cycle arrest of transformed versus nontransformed rodent fibroblasts in vitro. *Cancer Res.*, **45**, 3022-3028.

Krek, W. and DeCaprio, J.A. (1995) Cell synchronization. *Meth. Enzymol.*, **254**, 114-124.

Krude, T. (1999) Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp. Cell Res.*, **247**, 148-159.

Krüger, K. and Pfeifer, F. (1996) Transcript analysis of the c-vac region and differential synthesis of the two regulatory gas vesicle proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarium* PHH4. *J. Bacteriol.*, **178**, 4012-4019.

Kunau, W.H., Beyer, A., Franken, T., Götte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A. and Wiebel, F.F. (1993) Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie*, **75**, 209-224.

Kushida, H. (1967) A new embedding method employing DER 736 and Epon 812. *J. Elec. Micros.*, **16**, 278-283.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

LaLande, M. (1990) Mimosine reversibly blocks the mammalian cell cycle in late G1 phase. *Exp. Cell Res.*, **186**, 332-339.

Lehmann, A.R., Walicka, M., Griffiths, D.J.F., Murray, J.M., Watts, F.Z., McCready, S. and Carr, A.M. (1995) The *rad18* gene of *Schizosaccharomyces pombe* defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 7067-7080.

Lemon, K.P. and Grossman, A.D. (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev.*, **15**, 2031-2041.

Lemon, K.P., and Grossman, A.D. (1998) Localization of bacterial polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* **282**, 1516-1519.

Lin, H.-B., Falchetto, R., Mosca, P.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hamlin, J.L. (1996) Mimosine targets serine hydroxymethyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2548-2556.

Losada, A., Hirano, M. and Hirano, T. (1998) Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.*, **12**, 1986-1997.

Losick, R. and Shapiro, L. (1999) Changing views on the nature of the bacterial cell: from biochemistry to cytology. *J. Bacteriol.*, **181**, 4143-4145.

Löw, R. and Rausch, T. (1994) Sensitive, nonradioactive northern blots using alkaline transfer of total RNA and PCR-amplified biotinylated probes. *BioTechniques*, **17**, 1027-1030.

Löwe, J., Cordell, S.C. and van den Ent, F. (2001) Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *J. Mol. Biol.*, **306**, 25-35.

Luft, J.H. (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409-414.

Lupas, A. (1996a) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 375-382.

Lupas, A. (1996b) Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.*, **266**, 513-525.

Lupas, A. (1997) Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 388-393.

MacNeill, S. (2001) Understanding the enzymology of archaeal DNA replication: progress in form and function. *Mol. Microbiol.*, **40**, 520-529.

Malandrin, L., Huber, H. and Bernander, R. (1999) Nucleoid structure and partitioning in *Methanococcus jannaschii*: An archaeon with multiple copies of the chromosome. *Genetics*, **152**, 1315-1323.

Margolin, W. (2000) Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Reviews*, **24**, 531-548.

Margolin, W. (2001) Bacterial cell division: A moving MinE sweeper boggles the MinD. *Curr. Biol.*, **11**, R395-R398.

Margolin, W., Wang, R. and Kumar, M. (1996) Isolation of an *ftsZ* homolog from the archaeobacterium *Halobacterium salinarum*: implications for the evolution of FtsZ and tubulin. *J. Bacteriol.*, **178**, 1320-1327.

- Martin, E.M. and Brun, Y.V. (2000) Coordinating development with the cell cycle in *Caulobacter*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 589-595.
- Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A.V. and Graumann, P.L. (2002) Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO Journal*, **21**, 3108-3118.
- Matherly, L.H., Schuetz, J.D., Westin, E. and Goldman I.D. (1989) A method for synchronization of cultured cells with aphidicolin: application to the large-scale synchronization of L1210 cells and the study of the cell cycle regulation of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase. *Anal. Biochem.*, **182**, 338-345.
- Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G. and Erickson, H.P. (1998) The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J. Cell Biol.*, **142**, 1595-1604.
- Mengiste, T., Revenkova, E., Bechtold, N. and Paszkowski, J. (1999) An SMC-like protein is required for efficient homologous recombination in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, **18**, 4505-4512.
- Ming, Y.Z., Di, X., Gomez-Sanchez, E.P. and Gomez-Sanchez, C.E. (1994) Improved downward capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *BioTechniques*, **16**, 58-59.
- Moriya, S., Tsujikawa, E., Hassan, A.K.M., Asai, K., Kodama, T. and Ogasawara, N. (1998) A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Mol. Microbiol.*, **29**, 179-187.
- Müller, M. and Moor, H. (1984) Cryofixation of thick specimens by high-pressure freezing. In: Müller, M., Becker, R.P., Boyde, A. and Wolosewick, J.J. (edt.) The science of biological specimen preparation 1985. SEM Inc., AMF O'Hare, Ill., USA, pp. 131-183.
- Ng, W.V., Kenndy, S.P., Mahairas, G.G., Berquist, B., Pan, M., *et al.* (2000) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12176-12181.

Niki, H., Imamura, R., Kitaoka, M., Yamanaka, K., Ogura, T., and Hiraga, S. (1992) *E. coli* MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *EMBO J.* **11**, 5101-5109.

Niki, H., Jaffe, A., Imamura, R., Ogura, T., and Hiraga, S. (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* **10**, 183-193.

O'Connor, P.M., and Jackman, J. (1998) Synchronization of mammalian cells. *Results and Problems in cell differentiation*, **22**, 63-74.

Oesterhelt, D. and Marwan, W. (1987) Change of membrane potential is not a component of the photophobic transduction chain in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.*, **169**, 3515-3520.

Ogura, T. and Wilkinson, A.T. (2001) AAA⁺ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes to Cells*, **6**, 575-597.

Olsen, G.J. and Woese C.R. (1997) Archaeal genomics: an overview. *Cell*, **89**, 991-994.

Planchais, S., Glab, N., Inzé, D. and Bergounioux, C. (2000) Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett.*, **476**, 78-83.

Poplawski, A. and Bernander, R. (1997) Nucleoid structure and distribution in thermophilic Archaea. *J. Bacteriol.*, **179**, 7625-7630.

Poplawski, A., Gullbrand, B. and Bernander, R. (2000) The *ftsZ* gene of *Haloferax mediterranei*: sequence, conserved gene order, and visualization of the FtsZ ring. *Gene*, **242**, 357-367.

Raymond, W.E. and Kleckner, N. (1993) Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD50 gene during meiosis: steady-state transcript levels rise and fall while steady-state protein levels remain constant. *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 390-400.

Rieger, G., Müller, K., Hermann, R., Stetter, K.O. and Rachel, R. (1997) Cultivation of hyperthermophilic archaea in capillary tubes resulting in improved preservation of fine structures. *Arch. Microbiol.*, **168**, 373-379.

- Roesser, M. and Müller, V. (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ. Microbiol.*, **3**, 743-754.
- Root, D.D. and Reisler, E. (1989) Copper iodide staining of protein blots on nitrocellulose membranes. *Anal. Biochem.*, **181**, 250-253.
- Rose, R.W. and Pohlschröder, M. (2002) In vivo analysis of an essential archaeal signal recognition particle in its native host. *J. Bacteriol.*, **184**, 3260-3267.
- 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.
- Rothfield, L., Justice, S. and Garcia-Lara, J. (1999) Bacterial cell division. *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 423-448.
- Ruepp, A. and Soppa, J. (1996) Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarum* (*Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the *arcRACB* gene cluster. *J. Bacteriol.*, **178**, 4942-4947.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M.L., Koretke, K.K., Volker, C. *et al.* (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature*, **407**, 508-513.
- Ruepp, A., Wanner, G. and Soppa, J. (1998) A 71-kDa protein from *Halobacterium salinarum* belongs to a ubiquitous P-loop ATPase superfamily with head-rod-tail structure. *Arch. Microbiol.*, **169**, 1-9.
- Sala, F., Parisi, B., Burroni, D., Amileni, A.R., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1980) Specific and reversible inhibition by aphidicolin in the alpha-like DNA polymerase of plant cells. *FEBS Lett.*, **117**, 93-98.
- Samaké, S. and Smith, L.C. (1996) Synchronization of cell division in eight-cell bovine embryos produced in vitro: effects of nocodazole. *Mol. Reprod. Dev.*, **44**, 486-492.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.

Sawitzke, J. and Austin, S. (2001) An analysis of the factory model for chromosome replication and segregation in bacteria. *Mol. Microbiol.*, **40**, 786-794.

Schäfer, G., Engelhard, M. and Müller, V. (1999) Bioenergetics of Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 570-620.

Scheffers, D. and Driessen, A.J. (2001) The polymerization mechanism of the bacterial cell division protein FtsZ. *FEBS Lett.*, **506**, 6-10.

Schinzel, R., and Burger, K.J. (1984) Sensitivity of halobacteria to aphidicolin, an inhibitor of eukaryotic α -type DNA polymerases. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 187-190.

Sharma, A.K. (1999) Synchronization in plant cells – an introduction. *Meth. Cell Sci.*, **21**, 73-78.

She, Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G. *et al.* (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7835-7840.

Shi, J., Dixon, R.A., Gonzales, R.A., Kjellbom, P., and Bhattacharyya, M.K. (1995) Identification of cDNA clones encoding valosin-containing protein and other plant plasma membrane-associated proteins by a general immunoscreening strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4457-4461.

Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J. *et al.*, (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.*, **179**, 7135-7155.

Soppa, J. (2001) Prokaryotic structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: distribution, phylogeny, and comparison with MukBs and additional prokaryotic and eukaryotic coiled-coil proteins. *Gene*, **278**, 253-264.

Soppa, J., K. Kobayashi, M.-F. Noirot-Gros, D. Oesterhelt, S.D. Ehrlich, E. Dervyn, N., N. Ogasawara, and S. Moryia (2002) Discovery of two novel families of proteins, which are

proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* members ScpA and ScpB. *Mol. Microbiol.*, **45**, 59-71.

Soppa, J., Link, T. A., z. Mühlen, A., Ruepp, A. and Vatter, P. (1998) Regulation of gene expression in *Halobacterium salinarum*: The *arcRACB* gene cluster and the TATA box-binding protein. in: *Microbiol. and Biogeochem. of hypersaline environments*, Ohren, A. (edt.), CRC Press, 249-263.

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

Stoeckenius, W. and Rowen, R. (1967) A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. *J. Cell Biol.*, **34**, 365-393.

Stolt, P. and Zillig, W. (1993) Antisense RNA mediates transcriptional processing in an archaeobacterium, indicating a novel kind of RNase activity. *Mol. Microbiol.*, **7**, 875-882.

Strunnikov, A.V. and Jessberger, R. (1999) Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins. *Eur. J. Biochem.*, **263**, 6-13.

Strunnikov, A.V., Larionov, V.L. and Koshland, D. (1993) *SMC1*: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *J. Cell Biol.*, **123**, 1635-1648.

Studer, D., Michel, M. and Müller, M. (1989) High-pressure freezing comes of age. *Scanning Microsc. Suppl.*, **3**, 252-269.

Tatusov, R. L., Natale, D. A., Garkavtsev, I. V., Tatusova, T. A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D., and Koonin, E.V. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucl. Acids Res.* **29**, 22-28.

Taylor, E.M., Moghraby, J.S., Lees, J.H., Smit, B., Moens, P.B. and Lehmann, A.R. (2001) Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18/Spr18 Complex. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 1583-1594.

Tomassen, J., Leunissen, J., van Damme-Jongsten, M. and Overduin, P. (1985) Failure of *E. coli* K-12 to transport PhoE-LacZ hybrid proteins out of the cytoplasm. *EMBO J.*, **4**, 1041-1047.

Vaucheret, H., Béclin, C. and Fagard, M. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.*, **114**, 3083-3091.

Verkade, H.M., Bugg, S.J., Lidsay, H.D., Carr, A.M. and O'Connell, M.J. (1999) Rad18 is required for DNA repair and checkpoint responses in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2905-2918.

Verkade, H.M., Teli, T., Laursen, L.V., Murray, J.M. and O'Connell, M.J. (2001) A homologue of the Rad18 postreplication repair gene is required for DNA damage response throughout the fission yeast cell cycle. *Mol. Gen. Genet.*, **265**, 993-1003.

Walker, G.M. (1999) Synchronization of yeast cell populations. *Meth. Cell Sci.*, **21**, 87-93.

Wang, S., Melkounian, Z., Woodfork, K.A., Cather, C., Davidson, A.G., Wonderlin, W.F. and Strobl, J.S. (1998) Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *J. Cell. Physiol.*, **176**, 456-464.

Wang, X. and Lutkenhaus, J. (1996) FtsZ ring: the eubacterial division apparatus conserved in archaeobacteria. *Mol. Microbiol.*, **21**, 313-319.

Wessel, D. and Flügge, 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.

Wheeler, R.T. and Shapiro, L. (1997) Bacterial chromosome segregation: is there a mitotic apparatus?. *Cell*, **88**, 577-579.

Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms – proposal for the domains archaea, bacteria, and eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576-4579.

Yamazoe, M., Onogi, T., Sunako, Y., Niki, H., Yamanaka, K., Ichimura, T., and Hiraga, S. (1999) Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **18**, 5873-5884.

Yoshimura, S.H., Hizume, K., Murakami, A., Sutani, T., Takeyasu, K. and Yanagida, M. (2002) Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer. *Curr. Biol.*, **12**, 508-513.

Zheng, L., Chen, Y. and Lee, W.-H. (1999) Hec1p, an evolutionarily conserved coiled-coil protein, modulates chromosome segregation through interaction with SMC proteins. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 5417-5428.

VII. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Amoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDMA	N,N-Dimethylbenzylamin
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CTP	Cytosintriphosphat
CWFG	Coldwaterfish Gelatine
DDSA	Dodecenybersteinsäureanhydrid
demin.	demineralisiert
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
E	Eluat
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
°K	Grad Kelvin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LF	lösliches Zellprotein
M	Molekulargewichtsstandard
min	Minuten
MNA	Methyl Nadic [®] Anhydrid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
Na ₃ EDTA	Ethylendiamintetraacetat
NCS	Nickel-Chelat-Sepharose
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclelease
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan
TTP	Tyrosintriphosphat
Tween	Polyoxyethylenglycolorbitolmonolaureat
U	Aktivitätseinheit von Enzymen (μ mol Substrat/min)
Ü	Überstand nach Inkubation mit NCS-Matrix
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
W	Überstand nach dem ersten Waschschrift
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

