

Charakterisierung des Zellzyklusses von  
*Halobacterium salinarum*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Anke Baumann  
aus Kronberg im Taunus

Frankfurt am Main 2008  
(D30)

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

Dekan : Prof. Dr. Volker Müller

Gutachter : Prof. Dr. Jörg Soppa  
Prof. Dr. Eckhard Boles

Datum der Disputation: 27.10.2008

## Aus der Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen:

---

Baumann, A., Lange, C. and Soppa, J. (2007) Transcriptome changes and cAMP oscillations in an archaeal cell cycle. *BMC Cell Biology* 8:21

Soppa, J., Baumann, A., Brenneis, M., Dambeck, M., Hering, O. and Lange, C. (2008) Genomics and functional genomics with haloarchaea. *Arch Microbiol* DOI 10.1007/s00203-008-0376-4

Baumann, A. and Soppa, J. (2008) Real time analysis of purple membrane formation in living *Halobacterium salinarum* cells using a Bacterio-Opsin-GFP fusion (in Vorbereitung).

Baumann, A., Hammelmann, M., Lange, C. and Soppa, J. (2008) Cell cycle-dependent protein oscillations in the halophilic Archaeon *H. salinarum* (in Vorbereitung).

## Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2005 bis Juli 2008 am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Soppa durchgeführt.

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Jörg Soppa für die sehr gute Betreuung, die immerwährende Diskussionsbereitschaft und die Vergabe des Themas dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Christopher J. Reuter und Prof. Dr. Julie A. Maupin-Furlow möchte ich mich für die Bereitstellung des Vektors pJAM1020 bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft. Besonders danke ich Dr. Christian Lange für die Hilfe mit Microsoft Excel und Mathias Hammelmann für die Zusammenarbeit bei den 2D-Gelen. Bei Mariam Brenneis bedanke ich mich für die vielen Diskussionen, Mittagspausen und ihre Freundschaft.

Sehr zu danken habe ich meinem Freund Gunnar für sein immerwährendes Verständnis, seine stetige Unterstützung und seine Hilfe in allen Lebenslagen während des Studiums, der Diplomarbeit und der Doktorarbeit.

Meinem Dad, meiner Schwester und meiner Omi danke ich für alles, was sie für mich getan haben.

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Zusammenfassung</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2. Einleitung</b> .....  | <b>3</b>  |
| 2.1. Die Domäne der Archaea .....   | 3         |
| 2.2. Der Zellzyklus und zellzyklusabhängige Transkriptom-<br>und Proteomänderungen.....         | 5         |
| 2.3. Die Genexpression in Archaea.....  | 8         |
| 2.4. Die archaeale Replikation.....   | 12        |
| 2.5. Der sekundäre Botenstoff cAMP und Phosphorylierungen<br>während Signaltransduktionen ..... | 15        |
| 2.6. Das Purpurmembranprotein, Bacteriorhodopsin, und<br>die Anwendung von GFP.....             | 16        |
| 2.7. Zielsetzung .....  | 19        |
| <b>3. Materialien und Methoden</b> .....  | <b>20</b> |
| 3.1. Material.....  | 20        |
| 3.1.1. Chemikalien.....   | 20        |
| 3.1.2. Enzyme .....   | 22        |
| 3.1.3. Kit-Systeme .....  | 23        |
| 3.1.4. Verbrauchsmaterial .....   | 23        |
| 3.1.5. Laborgeräte .....  | 24        |
| 3.1.6. Oligonukleotide.....   | 25        |
| 3.1.7. Vektoren .....   | 28        |
| 3.1.8. Antikörper .....   | 29        |
| 3.1.9. Computerprogramme, Datenbanken und Internet-Seiten.....                                  | 30        |
| 3.2. Organismen, Kultivierung und Stammhaltung .....  | 31        |
| 3.2.1. Organismen.....  | 31        |
| 3.2.2. Nährmedien und Kultivierung .....  | 31        |
| 3.2.3. Stammhaltung .....   | 34        |
| 3.3. Molekularbiologische Methoden .....  | 34        |
| 3.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....   | 34        |
| 3.3.2. Präzipitation von Nukleinsäuren aus Lösungen.....  | 37        |
| 3.3.3. Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen / Reinigung<br>von Nukleinsäuren.....      | 37        |
| 3.3.4. Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsendonukleasen .....                       | 37        |
| 3.3.5. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Nukleinsäuren .....                          | 37        |

---

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 3.3.6.   | Ligation von Nukleinsäuren .....  | 38 |
| 3.3.7.   | Dialyse von Nukleinsäure-Lösungen .....   | 38 |
| 3.3.8.   | Sequenzierung .....   | 39 |
| 3.3.9.   | Transformation von Mikroorganismen .....  | 39 |
|          | a) <i>E. coli</i> .....   | 39 |
|          | b) <i>H. salinarum</i> .....  | 40 |
| 3.3.10.  | Generierung von Vektoren zur Expression von GFP-Fusionen .....                                    | 41 |
| 3.3.11.  | Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>H. salinarum</i> .....                                    | 42 |
| 3.3.12.  | Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>H. salinarum</i> .....   | 43 |
| 3.3.13.  | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse .....                      | 44 |
| 3.3.14.  | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen .....   | 45 |
| 3.3.15.  | Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....   | 45 |
| 3.3.16.  | Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA .....   | 46 |
| 3.3.17.  | Transfer von RNA aus Agarosegelen auf eine Membran .....  | 47 |
| 3.3.18.  | Hybridisierung von Digoxigenin-markierten Sonden .....  | 48 |
| 3.3.19.  | Chemolumineszenznachweis von Digoxigenin-markierten Sonden ...                                    | 49 |
| 3.3.20.  | Analyse des Einbaues von BrdU in die DNA .....  | 50 |
| 3.4.     | Proteinbiochemische Methoden .....  | 51 |
| 3.4.1.   | Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....   | 51 |
| 3.4.2.   | Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran....                                | 53 |
| 3.4.3.   | Immunologische Detektion von Proteinen .....  | 54 |
| 3.4.4.   | 2D-Gelelektrophorese zur globalen Analyse zellzyklusabhängiger<br>Proteomänderungen .....         | 56 |
| 3.4.4.1. | Aufarbeitung der Proben .....   | 56 |
| 3.4.4.2. | Isoelektrische Fokussierung .....   | 58 |
| 3.4.4.3. | Auftrennung der Proben in der zweiten Dimension .....   | 59 |
| 3.4.4.4. | Silberfärbung für die globale Proteomanalyse .....  | 60 |
| 3.4.4.5. | Analyse und Auswertung der 2D-Gele .....  | 61 |
| 3.5.     | Zellbiologische Methoden .....  | 63 |
| 3.5.1.   | Mikroskopie .....   | 63 |
| 3.5.2.   | Synchronisation .....   | 63 |
| 3.5.3.   | cAMP-Messungen .....  | 64 |
| 3.6.     | Mikroarray Analyse zur globalen Untersuchung zellzyklusabhängiger<br>Transkriptomänderungen ..... | 64 |
| 3.6.1.   | DNA-Mikroarrays .....   | 64 |

---

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 3.6.2.    | Globale zellzyklusabhängige Transkriptomanalyse .....                                     | 64         |
| 3.6.3.    | cDNA-Synthese und Hybridisierung .....  | 65         |
| 3.6.4.    | Detektion und Auswertung der Mikroarrays.....   | 66         |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>68</b>  |
| 4.1.      | Synchronisation von <i>H. salinarum</i> Kulturen.....                                     | 68         |
| 4.1.1.    | Optimierung der Synchronisation .....   | 68         |
| 4.1.2.    | Analyse von zwei Zellzyklen in synchronisierten <i>H. salinarum</i><br>Kulturen .....     | 69         |
| 4.2.      | Globale Transkriptomanalyse synchroner Zellkulturen.....                                  | 71         |
| 4.2.1.    | Zellzyklusabhängige Transkriptomänderungen .....  | 71         |
| 4.2.2.    | Gruppierung der regulierten Gene.....   | 74         |
| 4.2.3.    | Verifizierung der zellzyklusabhängig regulierten Transkriptmengen....                     | 76         |
| 4.2.4.    | Zellzyklusregulierte Gene von <i>H. salinarum</i> .....                                   | 80         |
| 4.2.5.    | Transkriptprofile von Genen, die als Zellzyklusgene annotiert<br>sind.....                | 81         |
| 4.2.6.    | Identifizierung von clusterspezifischen konservierten Motiven .....                       | 85         |
| 4.3.      | Globale Proteomanalyse synchroner Zellkulturen .....                                      | 88         |
| 4.3.1.    | Analyse von zellzyklusabhängigen Proteomänderungen<br>mit silbergefärbten 2D-Gelen.....   | 88         |
| 4.3.2.    | Analyse zellzyklusabhängiger Proteomänderungen mittels DIGE .....                         | 89         |
| 4.4.      | Phosphoproteine in <i>H. salinarum</i> .....  | 99         |
| 4.5.      | Zellzyklusabhängige Konzentration des putativen Signalmoleküls cAMP                       | 100        |
| 4.5.1.    | Bestimmung der cAMP-Konzentration in exponentiellen<br><i>H. salinarum</i> Kulturen ..... | 100        |
| 4.5.2.    | Bestimmung der cAMP-Konzentration in synchronen<br><i>H. salinarum</i> Kulturen .....     | 101        |
| 4.6.      | Analyse der Replikation in <i>H. salinarum</i> .....                                      | 103        |
| 4.6.1.    | Analyse der Replikation in exponentiellen <i>H. salinarum</i> Kulturen.....               | 103        |
| 4.6.2.    | Analyse der Replikation in synchronen <i>H. salinarum</i> Kulturen .....                  | 105        |
| 4.7.      | Expression von GFP-Fusionsproteinen in <i>H. salinarum</i> .....                          | 109        |
| 4.7.1.    | Generierung von Vektoren zur Expression von GFP-Fusionen.....                             | 109        |
| 4.7.2.    | Analyse putativ-induzierbarer Promotoren .....  | 110        |
| 4.7.3.    | Analyse der Purpurmembran-Bildung in lebenden Zellen .....                                | 111        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion .....</b>   | <b>115</b> |
| 5.1.      | Synchronisation von <i>H. salinarum</i> und Eukarya .....                                 | 115        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 5.2.      | Analyse zellzyklusabhängiger Transkriptomänderungen<br>mit DNA-Mikroarrays .....  | 117        |
| 5.3.      | Vergleich der Transkriptomänderungen von <i>H. salinarum</i><br>mit Eukarya, <i>Caulobacter</i> und <i>Sulfolobus</i> ..... | 119        |
| 5.4.      | Promotorstruktur zellzyklusregulierter Gene.....  | 122        |
| 5.5.      | Die Proteinexpression von <i>H. salinarum</i> .....   | 123        |
| 5.6.      | Zellzyklusabhängige differentielle Proteinexpression .....  | 124        |
| 5.7.      | Zellzyklusabhängige Phosphorylierung von Proteinen .....  | 128        |
| 5.8.      | Das Signalmolekül cAMP und dessen<br>zellzyklusspezifische Konzentrationsänderungen .....                                   | 129        |
| 5.9.      | Untersuchung der Replikationsphase in <i>H. salinarum</i> .....   | 131        |
| 5.10.     | Der Zellzyklus von <i>H. salinarum</i> .....  | 134        |
| 5.11.     | Untersuchung putativ-induzierbarer Promotoren.....  | 134        |
| 5.12.     | Analyse der Purpurmembran-Entstehung in lebenden <i>H. salinarum</i><br>Zellen mit einer Bacterio-Opsin-GFP-Fusion.....     | 135        |
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>136</b> |
| <b>7.</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>151</b> |

## 1. Zusammenfassung

*H. salinarum* ist einer von zwei archaealen Organismen, die synchronisiert werden können. Die Synchronisations-Methode konnte in dieser Arbeit optimiert werden. Nahezu 100 % aller Zellen teilen sich in einer Zeitspanne von einem Viertel der Generationszeit. Die Analyse zweier aufeinanderfolgender Zellzyklen zeigte, dass die Zellen sich auch im zweiten Zyklus synchron teilen.

Die Zellsynchronisation wurde angewendet, um zellzyklusabhängige Vorgänge in *H. salinarum* auf unterschiedlichen Ebenen zu charakterisieren. Mittels DNA-Mikroarrays wurden Transkriptomänderungen untersucht. Nur 87 Gene zeigten zellzykluspezifische Regulationen. Dies entspricht 3 % aller vorhergesagten offenen Leserahmen und ist somit im Vergleich zu allen anderen Organismen, deren Transkriptome untersucht wurden, deutlich geringer. Die Transkriptmengen von 15 ausgewählten Genen wurden mit Northern Blot Analysen verifiziert. Die regulierten Gene konnten in sieben Gruppen mit unterschiedlichen Transkriptprofilen eingeordnet werden. Gruppenspezifische DNA-Sequenzmotive wurden gefunden, von denen angenommen wird, dass sie in die zellzykluspezifische Transkriptionsregulation involviert sind. Überraschenderweise wurden die meisten als Zellzyklusgene annotierten Gene konstitutiv transkribiert. Die Analyse zellzyklusabhängiger Proteomänderungen erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese. 1200 Proteine konnten reproduzierbar detektiert werden. Die meisten Proteine wurden konstitutiv exprimiert. Nur 30 Proteine zeigten eine zellzyklusabhängige Regulation. Dies entspricht 2,5 % der reproduzierbar detektierten Proteine. Es konnten unterschiedliche Expressionsprofile gefunden werden. Aus den Transkriptom- und Proteomanalysen folgt, dass auf Ebene der Genexpression nur wenige zellzyklusabhängige Regulationen existieren.

Sekundäre Botenstoffe spielen eine wesentliche Rolle bei Signaltransduktionen und sind an Regulationen von Zellzyklen beteiligt. Eine Methode zur Messung intrazellulärer cAMP-Konzentration in *H. salinarum* konnte etabliert werden. Die basale cAMP-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  in haloarchaealen Zellen ist bedeutend höher als die von Hefe. Synchrone Kulturen wurden auf die Oszillation des sekundären Botenstoffes hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration zellzyklusabhängig zweimal kurzfristig signifikant erhöht wird. Die cAMP-Konzentration steigt einmal vor und einmal direkt nach der Zellteilung an.

cAMP könnte daher ein wichtiges Signal für das Fortschreiten des Zellzyklusses sein.

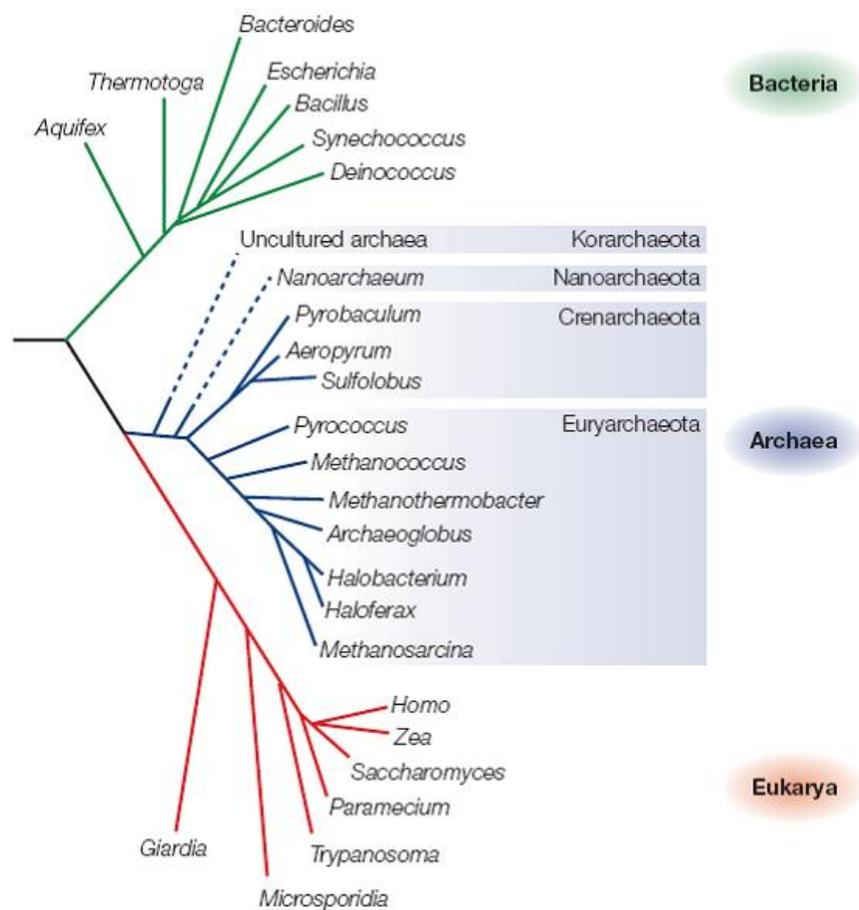
Es konnte eine Methode zur Analyse der Replikation in *H. salinarum* entwickelt werden. Hierfür wurde das Basenanalogen BrdU und ein spezifischer Antikörper gegen dieses verwendet. Die Analyse synchroner Kulturen zeigte das überraschende Ergebnis, dass die Zellen ihre DNA während des gesamten Zellzyklusses zu replizieren scheinen. Vor allem die DNA-Synthese in synchronen Kulturen während der Teilungsphase der Zellen stellt einen völlig neuartigen Zellzyklusablauf dar.

Für *in vivo* Analyse von Zellzyklusproteinen können diese mit GFP markiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Mit dieser Methode konnten wichtige zellzyklusabhängige Aspekte in anderen Arten aufgeklärt werden. Für einen GFP-Modellversuch wurde in dieser Arbeit ein Fusionsgen bestehend aus den offenen Leserahmen von *bop* (*bacterio-opsin*) und *gfp* (*green fluorescent protein*) erstellt. Die Expression des chromosomalen *bop* Gens und des plasmidkodierten *bop-gfp* Fusionsgens wurde mit Northern Blot Analysen nachgewiesen. Die Purpurmembranbiogenese wurde fluoreszenzmikroskopisch in lebenden *H. salinarum* Zellen untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Bildung der Purpurmembran ca. 15 Stunden nach Eintritt der Zellen in die stationäre Wachstumsphase beginnt. Innerhalb der folgenden sieben Stunden stieg sowohl die Anzahl an Zellen mit fluoreszierenden Signalen als auch die durchschnittliche Anzahl an Signalen pro Zelle gleichmäßig an. Die Ergebnisse zeigen, dass GFP-Fusionsproteine in *H. salinarum* z. B. zur Charakterisierung von differentieller Genexpression verwendet werden können. Des Weiteren könnten sie für die Untersuchung zellzyklusabhängiger Proteinlokalisierung und für die Analyse der intrazellulären Verteilung putativer Cytoskelettproteine eingesetzt werden.

## 2. Einleitung

### 2.1. Die Domäne der Archaea

Sequenzvergleiche der für die ribosomalen RNA kodierenden DNA-Abschnitte führten 1977 zur Aufspaltung der Domäne der Prokarya in zwei divergente Gruppen, die der Eubakterien und die der Archaeobakterien (Woese & Fox, 1977). Zu letzteren wurden anfangs nur methanogene Archaea gerechnet. Weitere Studien ergaben, dass die Archaea (Einzahl: Archaeon, griechisch für der/das Alte) neben der Domäne der Eukarya und der Domäne der Prokarya die dritte Domäne des Lebens bilden (Woese *et al.*, 1990).



**Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum (Allers & Mevarech, 2005).** Sequenzanalysen ribosomaler RNAs führten zu der Unterteilung aller Organismen in drei Domänen des Lebens. Der Zweig der Archaea besteht aus unterschiedlichen Phyla. Gestrichelte Linien repräsentieren unsichere Phyla.

Unterteilt werden die Archaea in Euryarchaeota (methanogene und halophile Organismen), Crenarchaeota (hyperthermophile Organismen), Korarchaeota (bisher noch nicht kultivierbar) (Barns *et al.*, 1996) und Nanoarchaeota

(*Nanoarchaeum equitans*; bisher das einzig bekannte Mitglied) (Huber *et al.*, 2002) (Abb. 1).

Archaea sind einzellig und zwischen 0,1 µm und 15 µm groß. Das Genom liegt frei im Cytoplasma vor und ist zirkulär geschlossen. Die Gene können in Operons angeordnet sein, die polycistronisch transkribiert werden. Das größte sequenzierte Genom besitzt *Methanosarcina acetivorans* mit  $5,75 \times 10^6$  Basenpaaren (bp). Das kleinste hat *Nanoarchaeum equitans* mit  $4,9 \times 10^5$  bp (Waters *et al.*, 2003). Sequenzvergleiche zwischen den drei Domänen zeigten, dass in Archaea sowohl homologe Gene zu Eukarya wie auch zu Prokarya vorkommen. Proteine zentraler Stoffwechselprozesse werden von Genen kodiert, die homolog zu denen von Bakterien sind (Rivera *et al.*, 1998). Die Hauptkomponenten der an der Replikation, der Transkription und der Translation beteiligten Proteinkomplexe der Archaea ähneln denen der Eukarya. Charakteristisch für Archaea ist die Zusammensetzung ihrer Zellmembran. Diese weist Isoprenoid-Seitenketten auf, die über Ether-Bindungen mit Glycerin-1-Phosphat verknüpft sind. Die bisher charakterisierten Archaea können aerob oder anaerob sowie autotroph oder heterotroph mit unterschiedlichen Zuckern oder Aminosäuren als Kohlenstoff- oder Energiequellen wachsen.

Ein Teil der Archaea lebt unter sogenannten extremen Bedingungen, wie z. B. *Pyrococcus furiosus*. Dieser Organismus wächst optimal bei 100°C (thermophil). Archaea wurden an kalten Standorten (psychrophil) sowie in sauren Gewässern (acidophil) gefunden. Die sogenannten Haloarchaea wurden unter anderem aus Salzseen isoliert, wo die Konzentration anorganischer Salze zwischen 2 - 5 M liegt. Die Anpassung der Organismen an diese Salzkonzentrationen wird dadurch erreicht, dass die Zellen intrazellulär eine hohe Ionenkonzentration (meist  $K^+$ ) aufrechterhalten. Als Konsequenz ist das Proteom sehr sauer, da eine große Anzahl negativer Ladungen an der Oberfläche von Proteinen deren Löslichkeit unter diesen Bedingungen erhöht (Dennis & Shimmin, 1997; Tebbe *et al.*, 2005). Halophile Archaea müssen sich an variierende Umweltbedingungen, wie z. B. Trockenheit und intensive Sonneneinstrahlung, anpassen. Eine hohe Resistenz gegenüber UV-Strahlung aufgrund eines Photo-Reaktivierungsmechanismus mit zwei putativen Photolyasen konnte gezeigt werden (Baliga *et al.*, 2004; McCready & Marcello, 2003). Haloarchaea sind in der Lage, sowohl unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen zu wachsen.

Ein extrem halophiler Vertreter ist *Halobacterium salinarum*, einer der

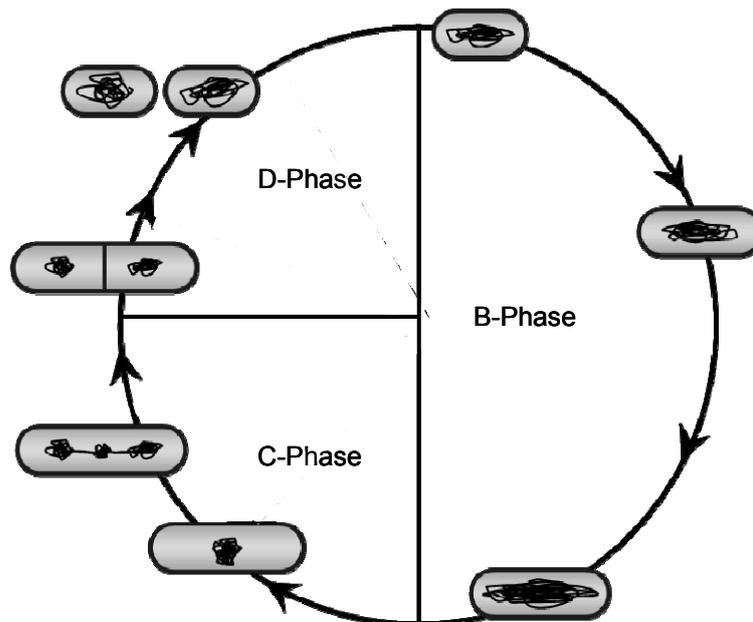
Modellorganismen zur Untersuchung archaealer Prozesse (Soppa, 2006). Es zeigt optimale Wachstumsraten bei Salzkonzentrationen von 4,3 M. Die Zellen sind stäbchenförmig, beweglich und zwischen 3 - 7 µm lang. Aufgrund eines Retinalproteines ist *H. salinarum* in der Lage, Photosynthese zu betreiben. Die Zellen können Pyruvat oxidieren (Plaga *et al.*, 1992) und Arginin fermentieren. Die Genome von zwei „unterschiedlichen“ Laborstämmen wurden sequenziert und verglichen (*species* NRC-1 und *strain* R1) (Ng *et al.*, 2000; Pfeiffer *et al.*, 2008). Es stellte sich heraus, dass die DNA-Sequenzen nahezu identisch sind, die Annotierungen der offenen Leserahmen sich aber um 20 % unterscheiden. Neben dem GC-reichen Hauptchromosom (68 %) finden sich 2 bzw. 4 Replikons mit einem geringeren GC-Gehalt (ca. 59 %). *H. salinarum* ist polyploid und hat durchschnittlich 25 Genomkopien während der exponentiellen Wachstumsphase (Breuert *et al.*, 2006). Eine Vielzahl an Transkriptom- und Proteomanalysen wurden durchgeführt (Bisle *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2007; Soppa *et al.*, 2008; Tebbe *et al.*, 2005; Twellmeyer *et al.*, 2007). Der Organismus ist eine von zwei archaealen Spezies, die synchronisiert werden können. Diese Methode eignet sich dazu Zellzyklusstudien durchzuführen (Baumann *et al.*, 2007; Herrmann & Soppa, 2002). Genetische, biochemische und zellbiologische Methoden wurden etabliert, so dass unterschiedliche Aspekte halophiler Archaea untersucht werden können.

## **2.2. Der Zellzyklus und zellzyklusabhängige Transkriptom- und Proteomänderungen**

Die Verdopplung der Erbsubstanz einer Zelle mit anschließender Zellteilung ist eines der wesentlichen Kennzeichen des Lebens. Die Entstehung einer neuen Zelle ist in allen Organismen hochgradig reguliert. Dieser Vorgang wird als Zellzyklus bezeichnet (Abb. 2: bakterieller Zellzyklus). Er beinhaltet die Massenzunahme einer Zelle (G<sub>1</sub>-Phase in Eukarya; B-Phase in Bakterien), die Replikation der DNA (S-Phase in Eukarya; C-Phase in Bakterien), die Verteilung der DNA (Mitose in Eukarya; D-Phase in Bakterien) und die Zellteilung (Cytokinese in Eukarya; D-Phase in Bakterien). In Eukarya und *Sulfolobus* (siehe unten) kommt es zudem zur postreplikativen sogenannten G<sub>2</sub>-Phase und/oder zur Ruhephase (G<sub>0</sub>-Phase).

Über den archaealen Zellzyklus ist bisher wenig bekannt. Die DNA-Verteilung in *Sulfolobus solfataricus* wurde mittels Durchflusscytometrie untersucht (Bernander

& Poplawski, 1997). Es stellte sich heraus, dass die Zellen eine kurze  $G_1$ -Phase und eine lange postreplikative Phase haben. Homologe Gene zu sogenannten Zellzyklusgenen von Bakterien und Eukarya wurden unter anderem in *H. salinarum* identifiziert (Ruepp *et al.*, 1998; Soppa *et al.*, 2002). Das *sph1* Gen z. B. kodiert für ein Protein, das Ähnlichkeit mit den Proteinen der SMC (*structural maintenance of chromosomes*) Superfamilie aufweist. Es wird vermutet, dass Sph1 eine Rolle im Zellzyklus spielt, da die Überproduktion des Proteins zu einer Zunahme der durchschnittlichen Zelllänge führte (Ruepp *et al.*, 1998). Während Eukarya mehrere *smc* Gene besitzen, haben Bakterien und Archaea meist nur eines. Daneben können SMC-ähnliche Proteine vorkommen, die zu dem prokaryalem SMC Subcluster gehören (COG= *cluster of orthologous group of proteins*; 0419) (Soppa, 2001; Tatusov *et al.*, 2001).



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines exemplarischen prokaryotischen Zellzyklusses.** Die Zellen (stäbchenförmig dargestellt) durchlaufen eine festgelegte Reihenfolge von Ereignissen. Nachdem die Zellmasse zugenommen hat (B-Phase), wird das Genom (schwarze Linien in den Zellen) repliziert (C-Phase). Nach Verteilung des Genomes auf die Tochterzellen findet die Zellteilung statt (D-Phase) und ein neuer Zellzyklus beginnt.

Der Übergang von einer Zellzyklusphase in die nächste erfolgt erst, wenn die Vorgänge innerhalb dieser Phase vollständig und korrekt abgelaufen sind. Kontrollmechanismen stellen z. B. sicher, dass die Zellteilung erst erfolgt, wenn das komplette Genom repliziert wurde. Diese Kontrollen werden als *checkpoints* bezeichnet. Der Übergangskontrollpunkt von der  $G_1$ -Phase zur S-Phase kann den

Beginn der Replikation verzögern, wenn Fehler wie z. B. Mutationen in der DNA gefunden wurden. Die Verzögerung ermöglicht es den Zellen Reparaturen durchzuführen, damit die Erbinformation korrekt erhalten bleibt. Ohne diese Koordination besteht ein hohes Risiko für Mutationen, genomische Instabilität und den Tod der Zelle (Myung *et al.*, 2001). Die Kontrollen können genutzt werden, um Zellen zu synchronisieren und um damit den Zellzyklus einzelner Organismen zu charakterisieren. Synchrone Kulturen zeichnen sich dadurch aus, dass sich ein hoher Anteil von Zellen oder alle Zellen in der gleichen Zellzyklusphase befinden. Studien in diesem Bereich können bisher nur mit wenigen Organismen betrieben werden, wie mit den Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* (Cho *et al.*, 1998; Schwob & Nasmyth, 1993; Spellman *et al.*, 1998), *Schizosaccharomyces pombe* (Oliva *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2005; Rustici *et al.*, 2004) und *Arabidopsis* (Menges & Murray, 2002) mit den Bakterien *Caulobacter crescentus* (Evinger & Agabian, 1977), *Bacillus subtilis* (Siccardi *et al.*, 1975) und *Escherichia coli* (Bates *et al.*, 2005; Cassler *et al.*, 1995; Helmstetter *et al.*, 1992) und mit den Archaea *Sulfolobus acidocaldarius* (Hjort & Bernander, 1999; Hjort & Bernander, 2001; Jansson *et al.*, 2000) und *Halobacterium salinarum* (Baumann *et al.*, 2007; Herrmann & Soppa, 2002).

Transkriptom- und Proteomanalysen zeigten, dass die Level spezifischer Transkripte und Proteine in allen untersuchten Organismen zellzyklusabhängig variieren. Die ersten globalen Analysen zellzyklusabhängiger Transkriptmengen-Änderungen wurden mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, und einige Hundert oszillierende Transkripte wurden gefunden (Cho *et al.*, 1998; Spellman *et al.*, 1998). In drei unabhängigen Studien mit *S. pombe* zeigten 400 bis 750 Gene eine zellzyklusabhängige Transkriptionsregulation (Oliva *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2005; Rustici *et al.*, 2004). In einer Meta-Analyse, in der die drei Datensätze verglichen wurden, stellte sich heraus, dass rund 500 Gene als zellzyklusreguliert betrachtet werden können (Marguerat *et al.*, 2006). In etwa die gleiche Anzahl wurde in einer Zelllinie von *Arabidopsis* gefunden. Es sind vermutlich mehr Gene reguliert, da der Mikroarray nur ein Drittel des Genomes repräsentierte (Menges *et al.*, 2002). Untersuchungen des humanen Zellzyklusses zeigten, dass 700 Gene in Fibroblasten und 900 Gene in HeLa Zellen eine zellzyklusabhängige Regulation der Transkription aufweisen (Cho *et al.*, 2001; Iyer *et al.*, 1999; Whitfield *et al.*, 2002). In dem Bakterium *Caulobacter crescentus* sind 553 Gene reguliert, was 19 % des Genoms entspricht (Laub *et al.*, 2000). In der

Analyse mit dem zu den Crenarchaeota gehörigen Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* stellte sich heraus, dass 346 Transkripte unterschiedlich reguliert werden (Lundgren & Bernander, 2007).

Die Proteinmengen-Änderungen in Abhängigkeit vom Zellzyklus wurden in *Caulobacter crescentus* untersucht. Mit zweidimensionaler (2D)-Gelelektrophorese konnten ein Viertel (979) aller vermuteten Genprodukte reproduzierbar detektiert werden. Davon unterlagen ca. 15 % (144 Proteine) einer zellzyklusabhängigen Regulation (Grunenfelder *et al.*, 2001). Eine Proteomanalyse zur Identifizierung aller an der Spindelbildung beteiligten Komponenten wurde mit synchronen, in der Mitose-Phase angehaltenen, HeLa Zellen durchgeführt (Sauer *et al.*, 2005). Ein Nachteil der 2D-Gelelektrophorese ist, dass Proteine, die nur schwach exprimiert werden, meist nicht reproduzierbar detektiert werden können (Gygi & Aebersold, 1999). Mittels Affinitätstags und MS-Analyse wurde das *S. cerevisiae* Proteom während eines synchronen Zellzyklusses untersucht und mit den Transkriptomdaten von Spellman *et al.* verglichen (Flory *et al.*, 2006; Spellman *et al.*, 1998). Die Korrelation zwischen den beiden Datensätzen stellte sich als nicht signifikant heraus. Die Analyse von Proteinleveln scheint neben der von Transkriptleveln für eine vollständige Beschreibung der Regulation eines Zellzyklusses essentiell zu sein.

### **2.3. Die Genexpression in Archaea**

Die archaeale Transkription wird durch eine einzelne DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) katalysiert. Diese RNAP ist homolog zu den entsprechenden bakteriellen und eukaryotischen Multienzymkomplexen, aber sie ist am nächsten verwandt mit der eukaryotischen RNAPII (Langer *et al.*, 1995). Für die basale *in vitro* Transkription der meisten Promotoren sind neben der RNAP zwei Transkriptionsfaktoren, das TBP (TATA-Box-Bindeprotein) und der TFB (*transcription factor B*) ausreichend. Die archaealen TBPs und TFBs sind in ihren Strukturen und Funktionen homolog zu den eukaryotischen TBPs und TFIIBs (Langer *et al.*, 1995; Littlefield *et al.*, 1999). Die Initiation der Transkription beginnt mit der Promotorerkennung durch TBP, welches AT-reiche Sequenzen (Box A oder TATA-Box) erkennt (Abb. 3). Die Interaktion wird durch TFB stabilisiert. Das Protein kontaktiert einen DNA-Bereich stromaufwärts von der TATA-Box, das *transcription factor B recognition element* (BRE) (Qureshi & Jackson, 1998). Der TBP-TFB Komplex rekrutiert die RNAP, wobei wenig über den Vorgang der

Rekrutierung und die Interaktionen der einzelnen Komponenten bekannt ist. Eukarya benötigen für die Initiation der Transkription zusätzlich sechs generelle Transkriptionsfaktoren (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF und TFIIH). In Archaea wurde ein Homolog zu TFIIIE $\alpha$  identifiziert, wobei es zu den übrigen gTFs (außer TFIIB) keine Homologe gibt (Bateman *et al.*, 2000). In Eukarya stabilisiert TFIIIE den Präinitiationskomplex. Er rekrutiert TFIIH und stimuliert dessen Helikase- und Kinase-Aktivität. Damit wird die geöffnete Formation des Präinitiationskomplexes induziert. Während der frühen Elongation verlässt TFIIIE den Komplex. Da es in Archaea kein Homolog zu TFIIH gibt, wird kein ATP zur Öffnung des Initiationskomplexes benötigt. Archaeales TFE ist *in vitro* nicht essentiell für die Initiation der Transkription, stimuliert jedoch die Rate der Initiation an einigen schwachen Promotoren (Hanzelka *et al.*, 2001). TFE scheint zudem eine stabilisierende Funktion während der Elongation zu übernehmen (Grunberg *et al.*, 2007).

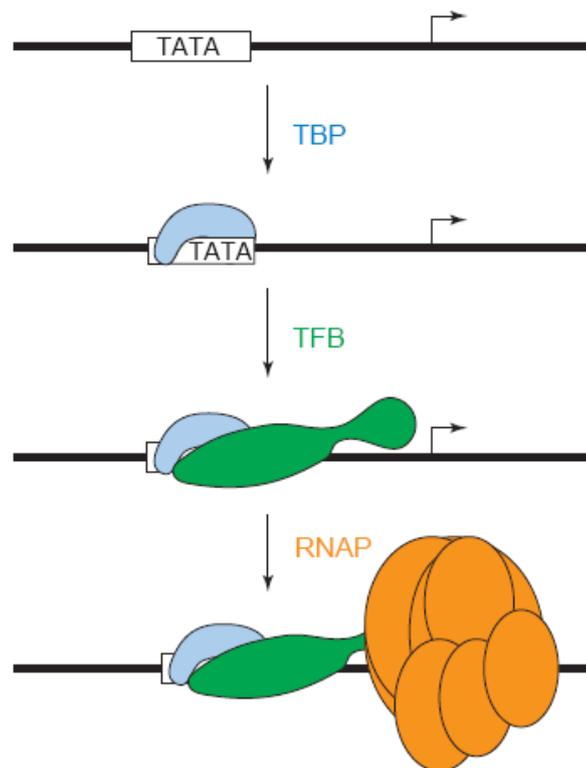


Abb. 3: **Modell der archaealen Transkriptionsinitiation** (Bell & Jackson, 1998). Der Transkriptionsstart ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das TBP ist blau dargestellt, TFB grün und die RNAP orange. TBP übernimmt die Erkennung der TATA-Box und rekrutiert zusammen mit TFB die RNAP.

Die meisten Haloarchaea besitzen mehrere TBP und TFB Isoformen. So wurden

z. B. in *Halobacterium* sp. NRC-1 sechs *tbp* und sieben *tfb* Gene gefunden. Es wird vermutet, dass durch unterschiedliche TBP-TFB Paarungen eine Regulation der Transkription erreicht werden kann (Baliga *et al.*, 2000; Facciotti *et al.*, 2007). Transkriptionsregulationen wurden anhand einzelner Gene studiert, wie z. B. dem *Bacterio-opsin* Gen (2.6.) und dem *Arginin* Gencluster (Ruepp & Soppa, 1996). In *Halobacterium salinarum* konnten durch Sequenzvergleiche 27 Transkriptionsregulatoren identifiziert werden, von denen bisher nur wenige charakterisiert wurden. Strukturgene für Gasvesikelsynthese werden durch den Transkriptionsregulator GvpE aktiviert, welcher stromaufwärts vom *BR*-Element an die DNA bindet. Es wird vermutet, dass dieses Protein einen direkten Kontakt mit dem basalen Transkriptionskomplex eingeht (Hofacker *et al.*, 2004). Die DNA-Bindedomänen der meisten archaealen Transkriptionsregulatoren ähneln denen der Bacteria (*helix-turn-helix motif*). Es kommen jedoch auch Motive eukaryotischen Transkriptionsregulatoren vor. Z. B. enthält das GvpE Protein ein *basic leucine zipper* Motiv.

Eine wesentliche Rolle bei der Transkriptionsregulation in Eukarya spielen Histone. Diese Proteine sind klein, basisch und besitzen ein gemeinsames zentrales strukturelles Motiv, die sog. Histon-Faltung (Arents & Moudrianakis, 1995). Diese besteht aus einer langen zentralen  $\alpha$ -Helix, welche beidseitig von zwei kürzeren  $\alpha$ -Helices flankiert wird. Die Kondensation der DNA wird erreicht, indem 146 Basenpaare DNA um ein Histonoctamer gewunden sind (Nukleosom), welches dann seinerseits weiter schraubenförmig aufgewickelt wird. Der Komplex aus DNA und DNA-bindenden Proteinen wird als Chromatin bezeichnet. In allen sequenzierten archaealen Genomen gibt es Chromatinproteine. In allen Euryarchaea und in einem Crenarchaeon (*Cenarchaeum symbiosum*) konnten Histone identifiziert werden (Preston *et al.*, 1996). Die archaeale Histon-Faltung wird durch drei  $\alpha$ -Helices gebildet, die durch zwei kurze  $\beta$ -Faltblätter getrennt sind. Ungefähr 90 Basenpaare DNA sind mit einem Histontetramer assoziiert. In Eukarya können die flexiblen amino- und carboxyterminalen Enden der Histone posttranslational modifiziert werden. Acetylierungen durch Chromatin modifizierende Komplexe führen zu einer Schwächung der positiven Ladung der Histone, wobei diese eine geringere Affinität zur DNA aufweisen. Hyperacetylierte Stellen sind häufig in Promotorbereichen zu finden. Durch Analysen mit isolierten archaealen Histonen konnten bisher keine Modifikationen detektiert werden wie sie in Eukarya vorkommen (Dinger *et al.*, 2000; Forbes *et al.*, 2004). Forbes *et al.*

konnten jedoch zeigen, dass ein Histon von *Methanosarcina acetivorans* durch Oxidation modifiziert werden kann. Die Analyse von dem Chromatinprotein Alba (*acetylation lowers binding affinity*) von *S. solfataricus* ergab, dass es spezifisch acetyliert und deacetyliert werden kann (Bell *et al.*, 2002).

*In vitro* Studien zeigten eine verlangsamte Transkription bei Histon-gebundener DNA im Vergleich zu proteinfreier DNA (Xie & Reeve, 2004). Der Mechanismus der archaealen Elongation scheint daher eher dem der eukaryotischen RNAPIII zu ähneln. Dieser Enzymkomplex kann ebenfalls ohne weitere Hilfsfaktoren Histon-gebundene DNA transkribieren. Inwieweit die archaealen Histone *in vivo* einen Einfluss auf die Transkriptionsregulation haben, ist unklar. Die Termination der Transkription in Archaea kann wahrscheinlich durch unterschiedliche Mechanismen bewirkt werden. Es wurden z. B. penta-U-Motive am Ende der 3'untranslatierten Bereiche von mRNAs gefunden und es wird vermutet, dass Haarnadelstrukturen bzw. die Topologie der mRNAs eine Rolle spielen (Brenneis *et al.*, 2007; Santangelo & Reeve, 2006).

Die Translation der mRNAs erfolgt in allen drei Domänen durch ribosomale RNAs, ribosomale Proteine und Faktoren, die an der Initiation, der Elongation und/oder der Termination beteiligt sind. Zur Initiation der Translation schließen sich die Untereinheiten der Ribosomen, die mRNA, die Hilfsfaktoren und die Initiator tRNA in einer genau festgelegten Abfolge zusammen, die sich in Eukaryoten und Bakterien unterscheidet. Der Vorgang ist bei den Eukarya komplexer als bei den Bakterien. Es wurde vermutet, dass die Translation in Archaea wie bei den Bakterien abläuft, da beide prokaryotischer Natur sind, polycistronische mRNAs besitzen und *Shine-Dalgarno* (SD)-Motive gefunden wurden. Durch Sequenzanalysen wurden in Archaea jedoch rund zehn Homologe zu eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren identifiziert (Bell & Jackson, 1998; Dennis, 1997). Bakterien benötigen nur drei Initiationsfaktoren. Analysen von archaealen mRNAs zeigten, dass auch solche ohne 5'untranslatierten Bereich existieren. Transkripte mit 5'UTR haben nicht zwangsläufig SD-Motive. Auch bei Bakterien wurden mRNAs mit und ohne SD-Motive identifiziert und „*leader*“-lose Transkripte nachgewiesen (La Teana *et al.*, 2000; O'Connor *et al.*, 1999). Der Mechanismus der Translation, vor allem der der Initiation, kann bei den Archaea nicht in eukaryotisch oder prokaryotisch eingeteilt werden, da es in allen drei Domänen mehrere unterschiedliche Abläufe zu geben scheint, die neben den bekannten noch erforscht werden müssen.

## 2.4. Die archaeale Replikation

Zur Weitergabe der genetischen Information von einer Zelle an ihre Nachkommen muss die DNA während des Zellzyklusses (Abschnitt 2.2.) verdoppelt werden. Dieser Vorgang wird von Multienzymkomplexen, den DNA-abhängigen DNA-Polymerasen (DNAP), katalysiert. In allen drei Domänen des Lebens finden sich mehrere verschiedene DNAPs, *E. coli* hat z. B. fünf unterschiedliche. Sie übernehmen neben der Replikation auch DNA-Reparaturen oder sind nur in einen der beiden Prozesse involviert. Die Replikation beginnt am sogenannten *origin of replication* (ori), an dem die DNA entwunden und geöffnet wird (Abb. 4). Diese häufig AT-reichen Sequenzen werden von Multienzymkomplexen (*origin of replication complex* = *orc*) erkannt, die mit weiteren Proteinen wie z. B. Helikasen für die Rekrutierung der DNAP verantwortlich sind. Bei Bakterien übernehmen die DnaB-Helikasen die Öffnung der DNA-Stränge, wohingegen die Eukarya und die Archaea MCM (*minichromosome maintenance*) Proteine aktivieren. Die semikonservative Replikation verläuft bidirektional.

Die zirkulären Genome der Bacteria besitzen jeweils nur einen ori, während die Genome von Eukarya viele Replikationsursprünge aufweisen. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurden rund 322 Replikationsursprünge identifiziert (Raghuraman *et al.*, 2001; Yabuki *et al.*, 2002). In ersten Studien mit Archaea wurde festgestellt, das *Pyrococcus abyssi* einen ori hat. In *Sulfolobus acidocaldarius* wurden drei oris identifiziert (Lundgren *et al.*, 2004). In *Haloferox volcanii* wurden fünf Initiationsstellen gefunden (zwei auf dem Hauptchromosom), die in der Lage waren, autonom die Replikation einzuleiten (Norais *et al.*, 2007). Bioinformatische Analysen sagten für *H. salinarum* zwei Initiationsstellen voraus (Zhang & Zhang, 2003; Zhang & Zhang, 2005). Beide werden von einem der neun *cdc6/orc* (*cell division cycle; origin of replication*) Gene flankiert. Eine *in vivo* Funktion konnte nur für eine Stelle bewiesen werden (Berquist & DasSarma, 2003; Pfeifer *et al.*, 1981). Der ori von *H. salinarum* besteht aus 750 Basenpaaren und dem *orc7* Gen (OE4380F). Er beinhaltet eine direkte Sequenzwiederholung (*direct repeat*) bestehend aus 31 Basenpaaren, welche von AT-reichen Sequenzen flankiert wird. Die räumliche Nähe von ori und *cdc6* Genen wurde auch in anderen Organismen gefunden und scheint für wirkliche Replikationsursprünge typisch zu sein. Die Genprodukte von *cdc6/orc* zeigen Ähnlichkeit zu dem Replikationsinitiator DnaA von *E. coli* (Erzberger *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000).

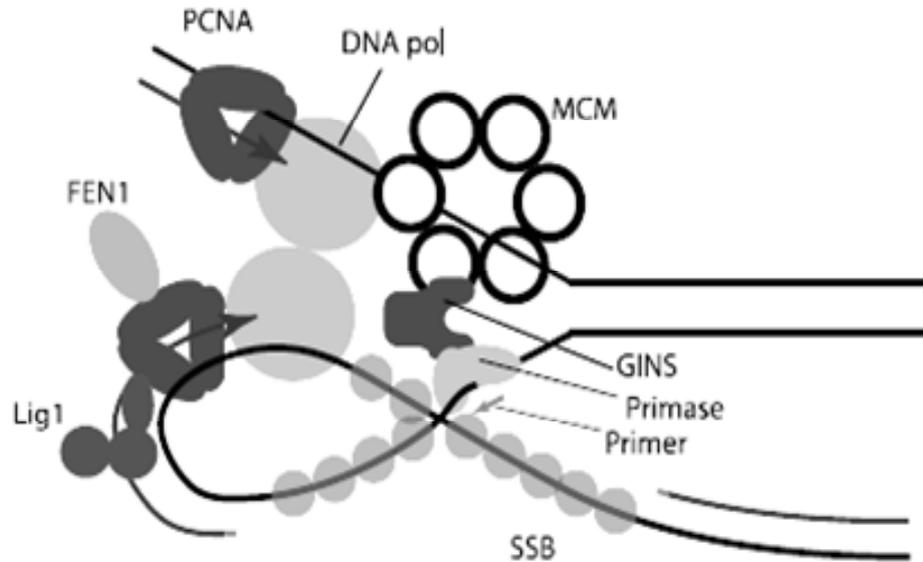


Abb. 4: **Modell der archaalen DNA-Replikationsgabel (Barry & Bell, 2006)**. Die Nomenklatur der Enzyme ist die von *Sulfolobus*. Die MCM-Helikase trennt die beiden parentalen DNA-Stränge. Einzelsträngige DNA wird von SSBs (*single stranded binding protein*) stabilisiert. Die Primase synthetisiert die ersten RNA-Primer, die von der DNAP verlängert werden. Die Nuklease (FEN1) entfernt die RNA-Abschnitte aus den DNA-Strängen. Nachdem die Lücken aufgefüllt wurden verbindet die Ligase (Lig1) die Stränge. GINS (*go, ichi, nii, san*; japanisch) stellt wahrscheinlich eine Verbindung der MCM-Helikase und der Primase dar. PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) bildet die Ringklemme.

Um die Replikation zu untersuchen, werden unterschiedliche Methoden angewandt. Die Lokalisation von beteiligten Proteinen kann mittels Markierung mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP; Abschnitt 2.6.) analysiert werden. Zur Ermittlung der Synthesephase wird z. B. der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin mit anschließender Autoradiographie oder der Einbau von Basenanaloga wie z. B. 5'-Brom-2-Deoxyuridin (BrdU) in die DNA untersucht. BrdU wird während der Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und kann mittels Antikörpern nachgewiesen werden. Meta- und Anaphasechromosomen von Säugetierzellen konnten mit dieser Technik studiert werden (Vogel *et al.*, 1986). In *B. subtilis*, *C. crescentus* und *E. coli* konnte die intrazelluläre DNA-Lokalisation in asynchronen bzw. synchronen Zellen gezeigt werden (Adachi *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2001; Lewis & Errington, 1997). Zwei Mechanismen wurden für die DNA-Replikation vorgeschlagen: ein Modell, in dem die DNAP sich entlang der DNA bewegt (*tracking model*) und ein anderes, in dem sich das Replisom in der Zellmitte befindet, und die DNA aktiv zu den Zellpolen bewegt wird (*factory model*). Coimmuno-Lokalisationsstudien bewiesen für *B. subtilis* das zweite Modell der Replikation (Lemon & Grossman, 1998). Auch in *E.*

*coli* und *C. crescentus* konnte der aktive Transport der replizierten DNA gezeigt werden (Adachi *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2008; Jensen & Shapiro, 1999; Jensen *et al.*, 2001). Im Unterschied zu *E. coli* und *B. subtilis* ist das Replisom bei *C. crescentus* kein stationärer Komplex. Zu Beginn der Replikation ist es an einem der Zellpole lokalisiert und bewegt sich während der Elongation zur Zellmitte.

Es ist bekannt, dass Prokarya alle Cytoskelettelemente exprimieren, von denen man zunächst dachte, dass sie nur in Eukarya vorkommen (Graumann, 2007). Diese Elemente sind an dem Transport der DNA beteiligt. Proteine, die mit Bestandteilen des Cytoskeletts anderer Organismen verwandt sind, konnten in Archaea identifiziert werden und in einzelnen Zellen wurden filamentöse Strukturen detektiert (Hara *et al.*, 2007; Trent *et al.*, 1997). Das MukB Protein von *E. coli* ist verwandt mit dem eukaryotischen Enzym Dynamin, einem mit Mikrotubulinen assoziiertem Protein. Es zeigt funktionelle und strukturelle Homologie zu Proteinen der bereits erwähnten SMC Superfamilie. Es ist an der DNA-Kondensation und/oder der Trennung und Ordnung der Schwesterchromatide beteiligt (Adachi *et al.*, 2008). In *B. subtilis* übernehmen ScpA und ScpB (*segregation and condensation proteins*) durch Interaktion mit dem SMC Protein eine ähnliche Rolle. Das Sph1 (*Smc like protein of Halobacterium salinarum*) Protein (siehe oben) aus *H. salinarum* könnte ähnliche Funktionen katalysieren.

In *H. salinarum* wurden 5 bis 6 *ftsZ* (*filamentous temperature sensitive Z*) Gen-Homologe identifiziert, die Funktion der Proteine aber noch nicht untersucht. Das FtsZ Protein ist unter anderem in *E. coli* und *Caulobacter* an der Initiation der Bildung der Teilungsebene beteiligt. Die Proteine sind homolog zu eukaryotischem Tubulin und bilden vor der Zellteilung in der Zellmitte ringförmige Strukturen.

Die Replikation kann mit Hemmstoffen unterbunden werden. Wenn dieser Arrest des Zellzyklusses reversibel ist und keine Auswirkungen auf andere zelluläre Prozesse hat, können damit Zellen synchronisiert werden. Ein solcher Inhibitor ist Aphidicolin aus *Nigrospora oryzae* (Huberman, 1981). Er wirkt spezifisch auf die eukaryotischen DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\delta$ . Zudem inhibiert er auch die Replikation in *H. salinarum* (Forterre *et al.*, 1984), wobei andere zelluläre Prozesse nicht betroffen werden. Aphidicolin kann somit für die Synchronisation von humanen HeLa S3 Zellen, von *Arabidopsis* und von *Halobacterium salinarum* verwendet werden (Baumann *et al.*, 2007; Herrmann & Soppa, 2002; Menges & Murray, 2002; Sauer *et al.*, 2005).

---

## 2.5. Der sekundäre Botenstoff cAMP und Phosphorylierungen während Signaltransduktionen

Reaktionen von Zellen auf externe Signale und intrazelluläre Prozesse werden häufig mittels Signalkaskaden reguliert. Hierbei wirkt zunächst z. B. ein extrazellulärer Stimulus, das Primärsignal, auf seinen Rezeptor. Dieser transduziert dann das Signal an einen Effektor. In die nachfolgende Weiterleitung des Signales sind viele Proteine involviert, bis es zu einer Antwort, z. B. die Aktivierung eines Genes, kommt. Neben der Weiterleitung des Signals durch Proteine werden häufig sekundäre Botenstoffe wie z. B. cAMP, cGMP und Calcium generiert oder freigesetzt, die dann wiederum das Signal verstärken oder weiterleiten. Der bekannteste sekundäre Botenstoff ist cAMP. Er wurde in nahezu allen Bakterien gefunden und beeinflusst in vielen Eukaryoten die Genexpression auf der Ebene der Transkription. In *E. coli* spielt cAMP eine Rolle bei der Verwertung von Zuckern. In Anwesenheit von Glukose ist die cAMP-Konzentration in den Zellen niedrig, während sie in Abwesenheit stark ansteigt (Katabolit-Repression). Ohne Glukose ist ein Protein, das an der Signaltransduktion beteiligt ist durch Phosphorylierung aktiv und aktiviert seinerseits die Adenylatcyclase. Dieses Enzym generiert aus ATP cAMP. Das *catabolite activator protein* (CAP) bindet cAMP und beeinflusst die Genexpression. Die Inaktivierung von cAMP zu AMP wird durch Phosphodiesterasen katalysiert.

In *S. cerevisiae* beeinflusst cAMP die Aktivität unterschiedlicher Enzyme, z. B. die Proteinkinase A durch Änderung ihres Phosphorylierungsstatus oder ihrer Genexpression. Es konnte gezeigt werden, dass das cAMP-Level das Fortschreiten des Zellzyklus bei dem Übergang von G<sub>1</sub>-Phase zur Synthesephase in Hefe beeinflusst (Baroni *et al.*, 1994; Tokiwa *et al.*, 1994). Die Messungen von cAMP-Leveln in synchronen *S. cerevisiae* Kulturen ergaben eine zellzyklusabhängige Variation der intrazellulären Konzentration (Muller *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1990). Auch in dem einzelligen Eukaryoten *Tetrahymena pyriformis* konnte eine zellzyklusabhängige Oszillation von cAMP detektiert werden (Dickinson *et al.*, 1976). In Archaea konnten cAMP-Konzentrationen in *H. volcanii*, *Sulfolobus solfataricus* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* gemessen werden (Leichtling *et al.*, 1986), aber die Funktion des Botenstoffes blieb unklar. Eine bioinformatische Studie zeigte, dass in 16 von 20 archaealen Genomen, die 2005 bekannt waren, ein Gen vorkommt, das für eine putative Adenylatcyclase kodiert (Galperin, 2005).

Eine wichtige Rolle während Signaltransduktionen spielen posttranslationale Modifizierungen von Proteinen. Dabei ist die reversible Phosphorylierung hervorzuheben. Diese Art der Modifikation wird häufig bei Vorgängen angewandt, bei denen schnelle Änderungen eines Proteinstatus von Nöten sind. Die ersten phosphorylierten Proteine in der Domäne der Archaea wurden in *H. salinarum* beschrieben (Spudich & Stoeckenius, 1980). Mittels anti-Phosphotyrosin Antikörpern konnten Proteine, die an ihren Tyrosinen phosphoryliert waren, in Zellextrakten von *Haloferax volcanii*, *Methanosarcina thermophila* und *Sulfolobus solfataricus* nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 1997). Proteinphosphorylierungen sind bei Eukaryoten an wichtigen Ereignissen im Zellzyklus beteiligt, wie z. B. den Übergängen von einer Zellzyklusphase zur nächsten. Hierbei zu erwähnen sind die Cdks (*cyclin-dependent protein kinases*). In der Bäckerhefe wird das Cdc45 (*cell division cycle*) Protein, das für die Initiation der Replikation benötigt wird, durch zwei Cdks aktiviert. In archaealen Genomen scheint es im Vergleich zu denen von Bacteria viel weniger Gene zu geben, die für an der Signaltransduktion beteiligte Proteine kodieren (Galperin, 2005). So wurden neben den bereits erwähnten Genen für Adenylatcyclasen nur noch solche für Serin-, Threonin- und Tyrosinkinase sowie Histidinkinase identifiziert. Während die meisten dieser Enzyme in Archaea noch nicht charakterisiert worden sind, konnte eine Beteiligung der Histidinkinase CheA in einem Zweikomponentensystem von *H. salinarum* gezeigt werden (Rudolph & Oesterhelt, 1995; Rudolph *et al.*, 1995).

## **2.6. Das Purpormembranprotein, Bacteriorhodopsin, und die Anwendung von GFP**

Das am besten charakterisierte Protein von *Halobacterium salinarum* ist das Membranprotein Bacteriorhodopsin (BR). Das Protein ist eine durch Licht angetriebene Protonenpumpe, die vor mehr als 30 Jahren entdeckt wurde (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971). Der durch BR erzeugte Protonengradient wird von ATP-Synthasen für die ATP-Synthese genutzt. BR setzt sich aus einem Vorläuferprotein (Bacterio-Opsin = Bop) und einem Chromophor, Retinal, welches kovalent an ein Lysin gebunden ist, zusammen (Abb. 5 A) Die Funktion des Proteins und der Mechanismus, der die Absorption eines Photons mit dem vektoriellen Transport eines Protons über die Cytoplasmamembran verbindet, konnten aufgeklärt werden (Haupts *et al.*, 1999; Lanyi, 2006). Es war eines der ersten Membranproteine, das kristallisiert werden konnte und alle Strukturen, die

es in aktiver und inaktiver Form besitzt, konnten gezeigt werden (Edmonds & Luecke, 2004; Lanyi, 2004). Die Verteilung des Proteins in der Membran ist nicht zufällig, sondern hochgradig geordnet. Es kommt in bestimmten Arealen der Zellmembran vor und kann bis zu 50 % der Zelloberfläche bedecken (Oesterhelt & Stoeckenius, 1973). Diese Areale werden auch als *patches* bezeichnet und die Gesamtheit als Purpurmembran. BR-Trimere setzen sich zu einem zweidimensionalen Kristallgitter zusammen (Henderson & Unwin, 1975).

Die Genexpression von *bop* ist reguliert. Unter hohem Sauerstoffpartialdruck wird das Gen nicht transkribiert. Bei niedrigem Sauerstoffgehalt wird es induziert, selbst wenn kein Licht vorhanden ist (Shand & Betlach, 1991; Sumper *et al.*, 1976). Daher wird in Flüssigkulturen von *H. salinarum* in der frühen exponentiellen Wachstumsphase kein BR gefunden. Abhängig vom Sauerstoffgehalt beginnt die Bop-Expression in der späten exponentiellen oder frühen stationären Wachstumsphase. Experimente zur durchschnittlichen *bop* Expression wurden ausschließlich mit biochemischen oder molekulargenetischen Techniken (z. B. Isolierung der Purpurmembran, Northern und Western Blot Analysen, DNA-Mikroarrays) durchgeführt. Wenige elektronenmikroskopische Studien befassten sich mit der Entstehung der Purpurmembran bei einzelnen Zelle (Blaurock & Stoeckenius, 1971; Neugebauer *et al.*, 1978). Bei diesen Studien können nur wenige Zellen detektiert werden und bisher gibt es weder statistische Analysen über eine Zellpopulation noch Untersuchungen zum zeitabhängigen Erscheinen der Purpurmembran in lebenden Einzelzellen.

Analysen von Proteinlokalisationen werden standardmäßig mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* durchgeführt (Abb. 5 B). Dabei wird das zu untersuchende Protein mit GFP fusioniert (Chalfie *et al.*, 1994). Mit solchen Fusionsproteinen konnten interessante Einblicke in die eukaryotische und prokaryotische Zellbiologie gewonnen werden (Davis & Vierstra, 1998; Graumann, 2007; Margolin, 2000; Phillips, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die mit GFP fusionierte  $\alpha$ -Untereinheit der DNAP III in der Zellmitte oder in den dreiviertel Positionen von *B. subtilis* lokalisiert ist (Lemon & Grossman, 1998). Die Anregungsmaxima von GFP liegen bei 395 nm und 480 nm, die Emissionswellenlänge liegt bei 509 nm. Zur Erhöhung der Emission und der Löslichkeit des Proteins wurden durch Punktmutationen verschiedene Varianten des Proteins hergestellt, z. B. ein sogenanntes kleines lösliches Derivat (*small soluble* GFP; Phe99Ser, Met153Thr und Val163Ala). Die fluoreszierenden

Signale einer Zelle konnten im Vergleich zum nativen Protein 45fach gesteigert werden (Crameri *et al.*, 1996). Das Derivat Ser65Thr hat nur ein Anregungsmaximum bei Wellenlängen von 470 bis 490 nm (Heim *et al.*, 1995).

Die Anwendbarkeit von GFP zur Untersuchung der Genexpression in *H. salinarum* und *Haloferax volcanii* konnte bereits gezeigt werden, was beweist, dass die Faltung von GFP nicht durch hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen beeinflusst wird (Nomura & Harada, 1998; Reuter & Maupin-Furlow, 2004). Nomura und Harada analysierten die durchschnittliche Produktion von Bop-GFP in *H. salinarum* zu einem Zeitpunkt der stationären Wachstumsphase. Das Fusionsprotein konnte mittels Western Blot Analyse nachgewiesen und mittels Spektroskopie charakterisiert werden. Die Untersuchungen erfolgten mit isolierten Membranfraktionen und nicht mit Einzelzellen.

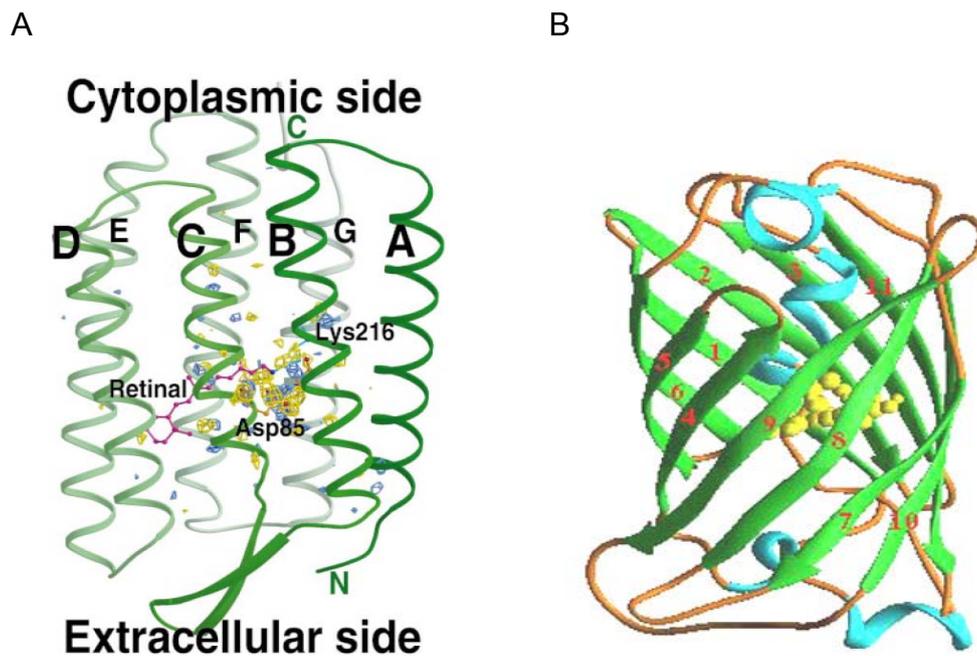


Abb. 5: **Bändermodell von BR (Edman *et al.*, 1999) und GFP (Yang *et al.*, 1996).** **A.** Bändermodell von BR. Gezeigt sind die sieben Transmembran-Helices (grün, A-G), das Retinal (lila), welches kovalent mit Lysin216 verbunden ist und eine weitere wichtige Aminosäure (Asp85). **B.** Bändermodell von GFP. Die elf  $\beta$ -Faltblätter (grün) bilden einen Zylinder. Kurze  $\alpha$ -Helices (blau) befinden sich an der Ober- und Unterseite des Zylinders. Das Chromophor (gelb) wird durch drei Aminosäuren im Zentrum des Proteins gebildet.

## 2.7. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den Zellzyklus von *Halobacterium salinarum* zu charakterisieren. Hierfür sollte das Protokoll für die Synchronisation von *H. salinarum* optimiert werden, so dass eine Synchronität der Zellen von 80 - 100 %, statt wie zuvor beschrieben von 40 %, erreicht werden kann (Herrmann & Soppa, 2002). Hochsynchronisierte Kulturen sollten für globale Transkriptom- sowie Proteomanalysen eingesetzt werden. Es sollten in diesem Zusammenhang DNA-Mikroarrays durchgeführt werden und die Expression ausgewählter Gene sollte mittels Northern Blot Analysen bestätigt werden. Durch 2D-Gelelektrophorese sollte die Anzahl zellzyklusregulierter Proteine bestimmt werden.

Kleine Signalmoleküle wie cAMP oder cGMP sind häufig an Vorgängen des Zellzyklusses beteiligt. Um zu studieren, ob cAMP auch im Zellzyklus von *H. salinarum* eine Rolle spielt, sollte eine Methode zur cAMP-Quantifizierung etabliert werden. Die intrazellulären cAMP-Konzentrationen sollten zunächst in exponentiellen, später auch in synchronen Kulturen untersucht werden.

Signaltransduktionswege beinhalten neben intrazellulären Konzentrationsänderungen von Botenstoffen u. a. häufig die Aktivierung von Proteinkinasen. Um zu ermitteln, ob Phosphorylierungen von Proteinen für den Zellzyklus von *H. salinarum* wichtig sind, sollten Zelllysate synchroner Kulturen mittels Antikörpern, welche gegen phosphorylierte Aminosäurereste gerichtet sind, untersucht werden. Ferner sollte in synchronen Kulturen die Phase der Replikation analysiert werden. Zu diesem Zweck sollte eine Methode etabliert werden, mit welcher der Einbau und der Nachweis des Basenanalogs BrdU ermittelt werden kann.

Für zukünftige Untersuchungen von zellzyklusabhängigen Lokalisationen von Proteinen sollte die Verwendbarkeit von GFP-Fusionen in *H. salinarum* geprüft werden. Hierfür sollten ein membranständiges (Bacterio-Opsin) sowie ein lösliches Protein (Arginindeiminase) mit dem fluoreszierenden Protein fusioniert werden. In diesem Zusammenhang sollten auch verschiedene induzierbare Expressionsvektoren erstellt bzw. untersucht werden, da für *H. salinarum* bislang nur solche mit konstitutiven Promotoren vorliegen. In einem Modellversuch sollte der Einbau der Bacterio-Opsin-GFP-Fusion analysiert werden, da bislang zwar bekannt ist, dass das Protein erst in der stationären Phase in die Membran eingelagert wird, jedoch nicht zu welchem Zeitpunkt.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad p. a.

| <b>Stoff</b>                     | <b>Hersteller</b>               |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Agarose                          | Roth, Karlsruhe                 |
| Ammoniumperoxodisulfat           | Merck, Darmstadt                |
| Ampicillin-Natrium-Salz          | Roth, Karlsruhe                 |
| Aphidicolin                      | Serva, Heidelberg               |
| Bacto <sup>®</sup> -Agar         | BD, Heidelberg                  |
| Bacto <sup>®</sup> -Hefeextrakt  | BD, Heidelberg                  |
| Bacto <sup>®</sup> -Pepton       | BD, Heidelberg                  |
| Bacto <sup>®</sup> -Trypton      | BD, Heidelberg                  |
| Bernsteinsäure                   | Sigma Aldrich, Taufkirchen      |
| Betain-Monohydrat                | Sigma Aldrich, Taufkirchen      |
| β-Mercaptoethanol                | Roth, Karlsruhe                 |
| <i>Big Dye Terminator RR Mix</i> | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| <i>Blocking Reagenz</i>          | Roche, Mannheim                 |
| Borsäure                         | Roth, Karlsruhe                 |
| Bromphenolblau                   | Merck, Darmstadt                |
| Calciumdichlorid-Dihydrat        | Merck, Darmstadt                |
| Chloroform                       | Fluka, Neu-Ulm                  |
| Cy3-dUTP                         | GE Healthcare, München          |
| Cy5-dUTP                         | GE Healthcare, München          |
| Coomassie Blue R-250             | Serva, Heidelberg               |
| Desoxyribonukleotide             | MBI Fermentas, St. Leon-Rot     |
| Dextransulfat                    | Roth, Karlsruhe                 |
| Dichlorethan                     | Roth, Karlsruhe                 |
| <i>DIGE specific CY2-Dye</i>     | GE Healthcare, München          |
| <i>DIGE specific CY3-Dye</i>     | GE Healthcare, München          |
| <i>DIGE specific CY5-Dye</i>     | GE Healthcare, München          |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| Digoxigenin-11-dUTP                                   | Roche, Mannheim             |
| Dikaliumhydrogenphosphat                              | Merck, Darmstadt            |
| Dimethylformamid                                      | Roth, Karlsruhe             |
| Dimethylsulfoxid                                      | Roth, Karlsruhe             |
| Dinatriumhydrogenphosphat                             | Merck, Darmstadt            |
| Dimyristoylphosphatidylcholin                         | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Entwickler, Kodak, GBX                                | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Ethylendiamintetraessigsäure-Dihydrat                 | Roth, Karlsruhe             |
| Essigsäure  | Roth, Karlsruhe             |
| Ethanol 99 % p. a.                                    | Roth, Karlsruhe             |
| Ethidiumbromid  | Fluka, Neu-Ulm              |
| Ficoll 400  | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Fixierer, Kodak, GBX                                  | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Formaldehyd 37 %                                      | Merck, Darmstadt            |
| Formamid 100 %  | Roth, Karlsruhe             |
| <i>GeneRuler</i> <sup>®</sup> -100 bp DNA-Leiter-Plus | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| <i>GeneRuler</i> <sup>®</sup> -1kb DNA-Leiter         | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Glukose-Monohydrat                                    | Merck, Darmstadt            |
| Glycerin 87 %   | Roth, Karlsruhe             |
| Glycin  | Roth, Karlsruhe             |
| Guanidiniumthiocyanat                                 | Roth, Karlsruhe             |
| Isoamylalkohol  | Merck, Darmstadt            |
| Isopropanol   | Roth, Karlsruhe             |
| Kaliumazetat  | Fluka, Neu-Ulm              |
| Kaliumchlorid   | Roth, Karlsruhe             |
| Kaliumdihydrogenphosphat                              | Merck, Darmstadt            |
| Luminol-Natriumsalz                                   | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Magermilchpulver                                      | AppliChem, Darmstadt        |
| Magnesiumdichlorid                                    | Roth, Karlsruhe             |
| Magnesiumsulfat                                       | Roth, Karlsruhe             |
| Maleinsäure   | Roth, Karlsruhe             |
| Methanol  | Roth, Karlsruhe             |
| Methylenblau  | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Methylimidazol  | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Natriumazetat   | Roth, Karlsruhe             |

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| Natriumcarbonat                                      | Roth, Karlsruhe             |
| Natriumchlorid                                       | Roth, Karlsruhe             |
| Natriumhydroxid                                      | Roth, Karlsruhe             |
| Natriumlauroylsarcosinat                             | Fluka, Neu-Ulm              |
| Natriumthiosulfat                                    | Roth, Karlsruhe             |
| Novobiocin   | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| (N-Morpholino)-Propansulfonsäure                     | Roth, Karlsruhe             |
| para-Hydroxycumarinsäure                             | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Polyethylenglycol 600                                | Sigma Aldrich, Taufkirchen  |
| Phenol   | Roth, Karlsruhe             |
| Polyvinylpyrrolidon                                  | Merck, Darmstadt            |
| Rinderserumalbumin                                   | Roth, Karlsruhe             |
| RNA-Leiter, <i>High Range</i>                        | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Roti-Block   | Roth, Karlsruhe             |
| Saccharose   | Roth, Karlsruhe             |
| Salzsäure  | Roth, Karlsruhe             |
| <i>SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Prestained Standard</i> | Invitrogen, Karlsruhe       |
| Silbernitrat   | Roth, Karlsruhe             |
| <i>Sodium Dodecyl Sulfat</i>                         | Roth, Karlsruhe             |
| Tetramethylethyldiamin                               | Serva, Heidelberg           |
| Tinte, Königsblau                                    | Pelikan, Hannover           |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat                           | Roth, Karlsruhe             |
| Tris   | Roth, Karlsruhe             |
| Triton X-100   | Roth, Karlsruhe             |
| Trizol   | Invitrogen, Karlsruhe       |
| t-RNA (aus Hefe)                                     | Roche, Mannheim             |
| Tween 20   | Roth, Karlsruhe             |
| Xylencyanol  | Merck, Darmstadt            |

### 3.1.2. Enzyme

| Enzym                                    | Hersteller                  |
|--|-----------------------------|
| Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase  | Roche, Mannheim             |
| <i>Calf Intestinal Phosphatase (CIP)</i> | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| DNase                                    | Qiagen, Hilden              |
| <i>Hot-Star Taq DNA-Polymerase</i>       | Qiagen, Hilden              |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| Klenow-Fragment                           | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| <i>M-MLV Reverse Transcriptase RNaseH</i> |                             |
| <i>Minus Point Mutant</i>                 | Promega, Mannheim           |
| <i>Pfu</i> -Polymerase                    | Promega, Mannheim           |
| Restriktionsendonukleasen                 | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| RNaseA                                    | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase                | Promega, Mannheim           |
| T4-DNA-Ligase                             | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| T4-Polynukleotid-Kinase                   | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |

### 3.1.3. Kit-Systeme

| <b>Kit</b>                                    | <b>Hersteller</b>                     |
|---|---------------------------------------|
| <i>Bicinchoninic acid (BCA) Assay Reagent</i> | Pierce, Rockford, IL, USA             |
| <i>CDP-Star</i>                               | Roche, Mannheim                       |
| <i>cyclic AMP (direct) EIA Kit</i>            | Assay Designs Inc. Ann Arbor, MI, USA |
| <i>Taq PCR Master Mix Kit</i>                 | Qiagen, Hilden                        |
| <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>            | Qiagen, Hilden                        |
| <i>QIAquick PCR Purification Kit</i>          | Qiagen, Hilden                        |
| <i>RNeasy Mini Kit</i>                        | Qiagen, Hilden                        |

### 3.1.4. Verbrauchsmaterial

| <b>Material</b>                           | <b>Hersteller</b>          |
|---|----------------------------|
| <i>BioMax Light Film</i>                  | Kodak, Stuttgart           |
| Chromatographiepapier (GB 002 und GB 004) | Roth, Karlsruhe            |
| Deckgläschen                              | MAGV, Rabenau-Londorf      |
| Dialysemembran                            | Millipore, Eschborn        |
| Elektroporationsküvetten (1mm)            | Biorad, München            |
| HybriSlips Deckgläschen                   | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Mikrotiterplatten                         | Sarstedt, Nümbrecht        |
| Nitrocellulosemembran                     | Whatman, Dassel            |
| Nylonmembran, Hybond-N                    | GE Healthcare, München     |
| Objektträger (76 x 26 mm)                 | Diagonal, Münster          |
| Pipettenspitzen                           | Sarstedt, Nümbrecht        |
| Poly-L-Lysin-Glas Objektträger            | Sigma Aldrich, Taufkirchen |

|   |  |
|---|--|
| Reaktionsgefäße (0,2 ml)                    | Sarstedt, Nümbrecht                    |
| Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)              | Eppendorf, Hamburg                     |
| Reaktionsgefäße (10 und 50 ml)              | Sarstedt, Nümbrecht                    |
| Sterilfilter                                | Whatman, Dassel                        |
| YM-30 Mikrokonzentratoren                   | Millipore, Eschborn                    |
| <br>  |  |
| <b>3.1.5. Laborgeräte</b>                   |  |
| Brutschrank B6060                           | Heraeus Instruments, Hanau             |
| Brutschrank                                 | Buchofer, Reutlingen                   |
| Fluoreszenz Mikroskop Axioskop 40           | Carl Zeiss, Oberkochen                 |
| Gene Amp PCR-System 2400                    | Applied Biosystems, Weiterstadt        |
| Gene Amp PCR-System 9700                    | Applied Biosystems, Weiterstadt        |
| GenePulser® Elektroporation System          | Biorad, München                        |
| Heizblock                                   | Liebisch, Bielefeld                    |
| <i>High Resolution System E.A.S.Y 440K</i>  | Herolab, Wiesloch                      |
| (Geldokumentationsanlage)                   |  |
| Hybridisierungsöfen <i>Compact Line OV4</i> | Biometra, Göttingen                    |
| Innova 4300 <i>Inkubator shaker</i>         | New Brunswick scientific,<br>Nürtingen |
| Mikroskop Axioskop Standard 25              | Carl Zeiss, Oberkochen                 |
| Mikroskop Axioskop 40                       | Carl Zeiss, Oberkochen                 |
| Magnetrührer RETbasic                       | IKA Labortechnik, Staufen              |
| <i>Mastercycler® gradient</i>               | Eppendorf, Hamburg                     |
| Nanodrop Spektrophotometer ND-1000          | Nanodrop Technologie, Rockland,<br>USA |
| Neubauer-Zählkammer                         | Hirschmann, Eberstadt                  |
| Pipette 2,5µl MicroOne®                     | Starlab, Ahrensberg                    |
| Pipette 10 µl, Eppendorf                    | Eppendorf, Hamburg                     |
| Pipette 40 µl Finnpipette®                  | Labsystems, Quickborn                  |
| Pipette 200 µl Finnpipette®                 | Labsystems, Quickborn                  |
| Pipette 1000 µl Finnpipette®                | Labsystems, Quickborn                  |
| Pipettierhilfe, Pipetus®                    | Hirschmann, Eberstadt                  |
| pH-Meter CG 825                             | Schott, Mainz                          |
| <i>SANOclav</i> (Autoklav)                  | Adolf Wolf, Bad Überkingen             |
| <i>UV-Stratalinker 1800</i>                 | Stratagene, Leiden, NL                 |

|                               |                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Vortex Genie 2®               | Scientific Industries, Bohemia, USA |
| Waage TE1245OCE               | Sartorius AG, Göttingen             |
| Waage PM 4800 Delta Range®    | Mettler, Gießen                     |
| Zentrifuge 5417               | Eppendorf, Hamburg                  |
| Zentrifuge 5810R              | Eppendorf, Hamburg                  |
| Zentrifuge Sorvall RC 5C plus | Du Pont, Bad Homburg                |

### 3.1.6. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers, Ulm, bezogen. Sie wurden in TE-Puffer zu 50 pmol/µl gelöst und bei -20°C gelagert.

**Tabelle 1: Oligonukleotide für die Klonierungen**

Die Tabelle zeigt die Namen der Oligonukleotide und die Sequenz. Zudem ist die Anwendung der Oligonukleotide angegeben.

| Name                                    | Sequenz (5' - 3')                    | Anwendung  |
|---|--------------------------------------|--|
| 5' <i>bop</i> prom<br><i>Xho</i> I      | CTCGAGCACGCGTGCACGCATCGACTTCAC       | Vervielfältigung des <i>bop</i> Promotors für die Plasmide pAB5, 6 und 10                |
| 3' <i>bop</i> prom<br><i>Nco</i> I      | CCATGGGCAACAGTACCTAACGAGGATATG       |  |
| 5' <i>tnaA</i> prom<br><i>Xho</i> I     | CTCGAGGGGCGGACCGCGAGCCGGC            | Vervielfältigung des <i>tnaA</i> Promotors für die Plasmide pAB 7, 8 und 11              |
| 3' <i>tnaA</i> prom<br><i>Nco</i> I     | CCATGGACGAAACCGGGAGAACGGCGACCG       |  |
| 5' <i>bop</i> + <i>Nco</i> I            | CATGCCATGGTGGAGTTATTGCCAACAGCAGTGGAG | Vervielfältigung des <i>bacterio-opsin</i> Gens für die Plasmide pAB 1, 2, 5, 6, 7 und 8 |
| 3' <i>bop</i> -<br>Stopp+ <i>Eco</i> RV | GATATCGTCGCTGGTCGCGGCCGCGCCGTCG      |  |
| 5' <i>Nco</i> I+2bp<br><i>Arg</i>       | TATACCATGGTGATGAGTAGTGAATCACCG       | Vervielfältigung des <i>arginindeiminase</i> Gens für die Plasmide pAB3 und 4            |
| 3' <i>Arg</i> -Stopp<br><i>Pme</i> I    | GTTTAAACTCCGGAGTGCGTCGAAGCG          |  |
| 5' smRS-GFP                             | ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGG      | Vervielfältigung des smRS-GFP für die Plasmide pAB 2, 6 und 8                            |

|                                  |                                  |   |
|----------------------------------|----------------------------------|---|
| 5'smRS-GFP+2bp                   | TGATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTG | Vervielfältigung des smRS-GFP für das Plasmid pAB 4           |
| 3'smRS-GFP                       | TTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG      | Vervielfältigung des smRS-GFP für die Plasmide pAB 2, 4 und 8 |
| 3'smRS-GFP<br><i>EcoRV</i>       | GATATCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC   | Vervielfältigung des smRS-GFP für das Plasmid pAB 6           |
| Seq 1 lang                       | GATGCAGGAGAAAGACCGCCTCG          | Für die Sequenzierung von pAB 1, 2, 3, 4 und 9                |
| Seq2<br><i>bop/tnaA</i><br>prom  | GCATGCGACACCCGGCGAGAGAGG         | Für die Sequenzierung von pAB 5, 6, 7, 8, 10 und 11           |
| Seq2<br><i>bop/tnaA</i><br>promR | GCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCC         | Für die Sequenzierung von pAB 5, 6, 7, 8, 10 und 11           |

### Tabelle 2: Oligonukleotide und Sonden für Northern Blot Analysen

Die Tabelle zeigt die Oligonukleotide, die zur Herstellung von Sonden für Northern Blot Analysen verwendet wurden. Die Zielgene von denen die Transkripte transkribiert wurden sind angegeben. Die Länge der Sonden und die Hybridisierungstemperaturen sind gezeigt.

| Name            | Sequenz (5' - 3')          | Zielgen  | Länge (bp) | Hybridisierungstemperatur (°C) |
|-----------------|----------------------------|--|------------|--------------------------------|
| OE4345R_Sonde1F | GAAGAGGTGGCGATGCAAGG       | <i>ribonucleoside-diphosphate reductase (EC 1.17.4.1) beta chain</i> | 398        | 50                             |
| OE4345R_Sonde1R | ACGAGATCCCGCAGGAAGTC       |  |            |                                |
| OE4304R_Sonde1F | ACGAGATCCCGCAGGAAGTC       | <i>ABC-type transport system permease protein</i>                    | 448        | 55                             |
| OE4304R_Sonde1R | AGCCGCCGATGAGCAAGTAG       |  |            |                                |
| OE2019F_Sonde1F | AGTCGAGATGGCCGAGGAGTT<br>C | <i>fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)</i>                  | 300        | 50                             |
| OE2019F_Sonde1R | CGATTGCGCCCTTCACGGATTC     |  |            |                                |
| OE3571R_Sonde1F | TCGTGCAGGGCACCATCTAC       | <i>GMP synthase (glutamine-hydrolyzing), subunit</i>                 | 260        | 50                             |

|                        |                      |  |      |    |
|------------------------|----------------------|--|------|----|
| OE3571R_Sonde1R        | ACAGACCGCGACCTTCTCAG | <i>B</i>   |      |    |
| OE1414R_Sonde1F        | TGACGAGGGCGGCATCTATC | <i>cell division protein<br/>ftsZ4</i>   | 373  | 50 |
| OE1414R_Sonde1R        | GGTCTGTGGCAGCTCATT   |  |      |    |
| OE4419Sonde1F          | GCCGTGATTTCTGCTGGAG  | <i>argininosuccinate<br/>lyase;EC 4.3.2.1</i>                                      | 164  | 45 |
| OE4419Sonde1R          | GTCCGGGTTCTTCTTCTGGG |  |      |    |
| OE4676 HP F<br>Sonde_1 | GCACAGACTTCGGACGACTC | <i>hypothetical<br/>protein</i>  | 150  | 45 |
| OE4676 HP R<br>Sonde_1 | GCCACAGACTGTGCAGGTT  |  |      |    |
| SIR R Sonde_1 F        | TGGCGACCCATCTGGACTAC | <i>transcription<br/>regulator sirR</i>  | 310  | 45 |
| SIR R Sonde_1R         | TGCTCGGTGACCGTGAGTTC |  |      |    |
| ORC 7 Sonde_1F         | AAGACGGGCACCGGAAAGAC | <i>cell division<br/>control protein<br/>cdc6 homolog</i>                          | 310  | 45 |
| ORC 7 Sonde_1R         | CGAAACATCGGAGCCCTCAC |  |      |    |
| OE 1679 Sonde_1 F      | GGTTCGCCAACCATTCTGC  | <i>ABC-type transport<br/>system periplasmic<br/>phosphate-binding<br/>protein</i> | 400  | 45 |
| OE 1679 Sonde_1<br>R   | TGGATGATGGTCCGGTCCTG |  |      |    |
| hp24 F Sonde1          | GACGGACCACTGCTGTAAG  | <i>conserved<br/>hypothetical<br/>protein</i>                                      | 800  | 50 |
| hp24 R Sonde1          | CTCGACAGATGAACCCACG  |  |      |    |
| Sph1 F Sonde1          | GCTTCGCGTTGTTGATC    | <i>SMC-like protein<br/>sph1</i>   | 1050 | 55 |
| Sph1 R Sonde1          | TGGAGAACGAAGACGACGG  |  |      |    |
| Sph2 Sonde1 F          | CAGAGCGTCGTGACTTGG   | <i>SMC-like protein<br/>sph2</i>   | 716  | 50 |
| Sph2 Sonde1 R          | GCTGTGATTCACGCAGTTCC |  |      |    |

|                   |                       |  |     |    |
|-------------------|-----------------------|--|-----|----|
| OE3214F_Sonde1F   | ACAAGCTGCTGGCGGGACTAC | <i>Precorrin-3B C-17 methyltransferase</i>           | 247 | 50 |
| OE3214F_Sonde1R   | TGCTTCCGGTGGTCGTTCTC  |  |     |    |
| CDC_H_Sonde2F     | GAGGACGCCAAAGACGACTC  | <i>AAA-type ATPase (transitional ATPase homolog)</i> | 470 | 45 |
| CDC_H_Sonde2R     | CGATCATGCGGTCGATCAGG  |  |     |    |
| CDC6/ORC6_2_S.1 F | GGGTGTTTCGAGGAGATCTTC | <i>cell division control protein cdc6 homolog</i>    | 355 | 45 |
| CDC6/ORC6_2_S.1 R | ACACGATCCCGCAGGATGTC  |  |     |    |
| 5'bob Sonde1      | GTTGACGCGGATCAGGGAAC  | <i>Bacterio-Opsin</i>                                | 270 | 50 |
| 3'bob Sonde1      | TCAGCCACACGACGGGATAC  |  |     |    |
| GFP Sonde_2_F     | TGTCAGTGGAGAGGGTGAAG  | <i>GFP</i>   | 270 | 50 |
| GFP Sonde_2_R     | CGAGGGTGTCTCCCTCAAAC  |  |     |    |

### 3.1.7. Vektoren

**Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete und erstellte Vektoren**

Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Vektoren. Die Vektornamen und -beschreibungen sind angegeben.

| Plasmid   | Beschreibung   | Quelle                         |
|-----------|--|--------------------------------|
| pSD1-R1/6 | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle Vektor</i>  | (Danner & Soppa, 1996)         |
| pUH6      | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle Vektor</i> ; <i>arcB</i> Promotor und <i>sph1</i> Gen                 | (Herrmann, 2002)               |
| pJAM1020  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle Vektor</i> mit <i>smRSGFP</i>   | (Reuter & Maupin-Furlow, 2004) |
| pAB1      | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H. salinarum-E.coli Shuttle Vektor</i> ; <i>arcB</i> Promotor und <i>bop</i> Gen ohne Stoppkodon | diese Arbeit                   |

|       |  |              |
|-------|--|--------------|
| pAB2  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle</i> Vektor; <i>arcB</i> Promotor und<br><i>bop-gfp</i> Gen              | diese Arbeit |
| pAB3  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle</i> Vektor; <i>arcB</i> Promotor und<br><i>arg</i> Gen ohne Stoppkodon  | diese Arbeit |
| pAB4  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle</i> Vektor; <i>arcB</i> Promotor und<br><i>arg-gfp</i> Gen              | diese Arbeit |
| pAB5  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum- E.coli Shuttle</i> Vektor; <i>bop</i> Promotor und<br><i>bop</i> Gen ohne Stoppkodon  | diese Arbeit |
| pAB6  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle</i> Vektor; <i>bop</i> Promotor und<br><i>bop-gfp</i> Gen               | diese Arbeit |
| pAB7  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum- E.coli Shuttle</i> Vektor; <i>tnaA</i> Promotor und<br><i>bop</i> Gen ohne Stoppkodon | diese Arbeit |
| pAB8  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle</i> Vektor; <i>tnaA</i> Promotor und<br><i>bop-gfp</i> Gen              | diese Arbeit |
| pAB9  | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle</i> Vektor; Kontroll-Vektor mit<br><i>arcB</i> Promotor                 | diese Arbeit |
| pAB10 | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E.coli Shuttle</i> Vektor; Kontroll-Vektor mit<br><i>bop</i> Promotor                  | diese Arbeit |
| pAB11 | Ampicillin Resistenz, Novobiocin Resistenz;<br><i>H.salinarum-E. coli Shuttle</i> Vektor; Kontroll-Vektor mit<br><i>tnaA</i> Promotor                | diese Arbeit |

### 3.1.8. Antikörper

anti-BrdU, Clone BU-33, Maus, Sigma Aldrich, Taufkirchen, 1 : 2000 verdünnt

anti-p-Tyr (PY99), Sc-7020, Maus, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1 : 2000 / 1 : 1000 verdünnt

anti-p-Thr # 9381, Hase, Cell Signaling Technology, Inc., 1 : 1000 verdünnt

anti-Hase IgG (whole molercul)-peroxidase, Sigma Aldrich, Taufkirchen, 1: 10000 verdünnt

anti-Maus IgG (whole molercul)-peroxidase, Sigma Aldrich, Taufkirchen, 1 : 10000 verdünnt

### 3.1.9. Computerprogramme, Datenbanken und Internet-Seiten

#### Mikroarray Auswertung

Genepix<sup>®</sup>Pro3.0

Axon, Union City, CA, USA

Genespring3.0

Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA

#### 2D-Gel Auswertung

DeCyder 2D Software, Version 6.5.14 GE Healthcare, München

#### *Halobacterium salinarum* Genom

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

(öffentliche Internetseite)

<https://edman.rzg.mpg.de>

(interne Internetseite)

#### Sequenzvergleiche und Sequenzmotive

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

FASTA <http://www2.ebi.ac.uk./fasta3> (Pearson, 1990)

ClustalW <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw> (Thompson *et al.*, 1994)

BLAST <http://www.ebi.ac.uk/blast2> (Altschul *et al.*, 1997)

AlignAce <http://atlas.med.harvard.edu/cgi-bin/alignace.pl> (Hughes *et al.*, 2000)

MEME <http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html> (Bailey & Elkan, 1995; Bailey & Gribskov, 1998)

RNA Structure Logos <http://www.cbs.dtu.dk/~gorodkin/appl/slogo.html>  
(Gorodkin *et al.*, 1997; Schneider & Stephens, 1990)

#### Analyse von Bildern und Filmen

ImageJ <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>

## 3.2. Organismen, Kultivierung und Stammhaltung

### 3.2.1. Organismen

#### a) Escherichia coli (E. coli)

*E. coli* XL1-blue MRF<sup>-</sup> (Stratagene, Leiden, NL);  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac$  [F<sup>'</sup>proAB+lacZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)] (Bullock *et al.*, 1987)

#### b) Halobacterium salinarum

*Halobacterium salinarum* DSM670 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)

### 3.2.2. Nährmedien und Kultivierung

Bei der Herstellung von Festmedium wurden die entsprechenden Lösungen vor dem Autoklavieren (20 min, 120°C) mit 1,2 % Bacto-Agar (w/v) versetzt. Selektivmedium für *E. coli* wurde vor dem Inokulieren mit Ampicillin (100 µg / ml) versetzt. Zu *H. salinarum* Selektivmedien wurde vor dem Inokulieren Novobiocin (0,4 µg / ml) gegeben.

#### Escherichia coli

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde SOB<sup>+</sup>-Komplexmedium verwendet (Hanahan, 1985). Die Zellen wurden bei 37°C auf einem Inkubationsschüttler bei 250 Upm oder in einem Brutschrank angezogen.

#### SOB<sup>+</sup>-Medium

| Stoff                                    | Endkonzentration | Menge/l |
|--|------------------|---------|
| Trypton                                  | 2 % (w/v)        | 20 g    |
| Hefeextrakt                              | 0,5 % (w/v)      | 5 g     |
| NaCl                                     | 10 mM            | 0,584 g |
| KCl                                      | 2,5 mM           | 0,187 g |
| 1 M MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub> | 10 mM            | 10 ml   |
| ad 1 l mit VE-H <sub>2</sub> O           |                  |         |

Halobacterium salinarum

*H. salinarum* wurde auf Pepton- (Soppa & Oesterhelt, 1989), Support- (Cline *et al.*, 1989b) oder Minimalmedium (Grey & Fitt, 1976) bei 42°C angezogen. Flüssigmedien wurden auf einem Inkubationsschüttler bei 250 Upm inkubiert. Festmedien in einem Brutschrank.

Pepton-Medium

| Stoff                                | Endkonzentration | Menge/l |
|--------------------------------------|------------------|---------|
| NaCl                                 | 4,3 M            | 250 g   |
| MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O | 80 mM            | 20 g    |
| Tri-Natriumcitratx2 H <sub>2</sub> O | 10 mM            | 3 g     |
| KCl                                  | 24 mM            | 1,78 g  |
| Pepton                               | 1 % (w/v)        | 10 g    |

ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O

Support-Medium

Für die Herstellung von Festmedium wurden zu 800 ml Basalsalz 1,2 % Bacto-Agar (w/v) gegeben. Nach dem Autoklavieren wurde die Nährstofflösung zugegeben.

Basalsalz

| Stoff                                 | Endkonzentration | Menge/l |
|---------------------------------------|------------------|---------|
| NaCl                                  | 4,3 M            | 250 g   |
| MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O  | 80 mM            | 20 g    |
| Tri-Natriumcitratx2 H <sub>2</sub> O  | 10 mM            | 3 g     |
| KCl                                   | 24 mM            | 1,78 g  |
| CaCl <sub>2</sub> x2 H <sub>2</sub> O | 1,2 mM           | 0,176 g |
| 1 M Tris/HCl, pH=7,2                  | 50 mM            | 50 ml   |

ad 1l für reines Basalsalz bzw. ad 0,8l für Support-Medium mit VE-H<sub>2</sub>O

Nährstofflösung

| Stoff       | Endkonzentration | Menge/l |
|-------------|------------------|---------|
| Hefeextrakt | 0,3 % (w/v)      | 3 g     |
| Trypton     | 0,5 % (w/v)      | 5 g     |

ad 0,2 l mit VE-H<sub>2</sub>O

Minimalmedium

Der pH-Wert wurde anstelle von pH=6,6 auf pH=7 eingestellt (Grey & Fitt, 1976).

| Stoff                                | Menge/l  |
|--------------------------------------|----------|
| NaCl                                 | 250 g    |
| MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O | 20 g     |
| KCl                                  | 1 g      |
| KNO <sub>3</sub>                     | 0,1 g    |
| CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O | 0,71 mg  |
| Tri-Natriumcitratx2H <sub>2</sub> O  | 0,5 g    |
| Glycerin                             | 1 g      |
| CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O | 0,005 mg |
| FeCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O | 2,3 mg   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,15 g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,15 g   |
| ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O | 0,44 mg  |
| L-Alanin                             | 0,43 g   |
| L-Arginin                            | 0,40 g   |
| L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat    | 0,05 g   |
| L-Glutamat                           | 1,3 g    |
| Glycin                               | 0,06 g   |
| L-Isoleucin                          | 0,44 g   |
| L-Leucin                             | 0,8 g    |
| L-Lysin                              | 0,85 g   |
| L-Methionin                          | 0,37 g   |
| L-Phenylalanin                       | 0,26 g   |
| L-Prolin                             | 0,5 g    |
| L-Serin                              | 0,6 g    |
| L-Threonin                           | 0,5 g    |
| L-Tyrosin                            | 0,2 g    |
| L-Valin                              | 1,0 g    |
| 1 M Tris/HCl, pH=7,0                 | 50 ml    |

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest

Das Medium wurde sterilfiltriert.

Vor Gebrauch wurde 1 % (w/v) Glukose hinzugefügt. Die Aminosäuren stammen von den Firmen Merck, Sigma und Roth.

### 3.2.3. Stammhaltung

Zum Anlegen von *E. coli* Dauerkulturen wurden 2 ml Schraubgefäße jeweils mit 1 ml Lagerpuffer (68 % Glycerin (w/v), 13 mM MgCl<sub>2</sub>) befüllt und autoklaviert. 1 ml *E. coli* Kultur wurde zu der kalten Lösung gegeben, durchmischt und bei -80°C gelagert.

Frühstationäre *H. salinarum* Kulturen wurden in sterilen Szintillationsgefäßen gelagert. Zellen, die auf Selektivmedium angezogen wurden, wurden abzentrifugiert (10 min, 4500 x g), in Basalsalz gewaschen, erneut zentrifugiert, in frischem Medium ohne Antibiotikum resuspendiert und in sterile Szintillationsgefäße überführt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

## 3.3. Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

a) Standard-Reaktion

#### PCR-Puffer (10 x)

| Stoff                                 | Endkonzentration | Menge/0,1 l |
|---------------------------------------|------------------|-------------|
| KCl                                   | 500 mM           | 3,75 g      |
| Tris                                  | 100 mM           | 1,2 g       |
| Triton X-100                          | 1 % (w/v)        | 1 g         |
| pH = 9                                |                  |             |
| ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |             |

#### Desoxynukleotidgemisch (dNTP-Mix (66 % GC-Gehalt))

| Stoff                               | Endkonzentration | Menge/1 ml |
|-------------------------------------|------------------|------------|
| 100 mM dATP Stammlsg.               | 1 mM             | 10 µl      |
| 100 mM dTTP Stammlsg.               | 1 mM             | 10 µl      |
| 100 mM dCTP Stammlsg.               | 1,5 mM           | 15 µl      |
| 100 mM dGTP Stammlsg.               | 1,5 mM           | 15 µl      |
| ad 1 ml mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |            |

Standard-PCR-Ansatz

| Stoff                                 | Menge                      |
|---------------------------------------|----------------------------|
| DNA-Vorlage                           | 5 - 300 ng*                |
| 10 x <i>Taq</i> -PCR-Puffer           | 10 µl                      |
| dNTP-Mix                              | 16 µl                      |
| Oligonukleotid 1                      | 50 pMol                    |
| Oligonukleotid 2                      | 50 pMol                    |
| 10 mM MgCl <sub>2</sub>               | 15 µl                      |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase            | 1 µl einer 1:10 Verdünnung |
| ad 100 µl mit H <sub>2</sub> O bidest |                            |

\*Diente chromosomale DNA als Vorlage, so wurden 200 bis 300 ng eingesetzt; Diente ein Plasmid als Vorlage, so wurden 5 bis 10 ng eingesetzt; Diente ein „kurzes“ DNA-Fragment als Vorlage, so wurden 10 bis 30 ng eingesetzt.

Alternativ wurde die Standard-Reaktion unter Verwendung des *Master Mix* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Temperaturprofil einer Standard-PCR

|                                |      |   |
|--------------------------------|------|---|
| 1 x Denaturierung              | 96°C | 5 min                                       |
| 25 x Denaturierung             | 96°C | 40 sec Plasmide/<br>60 sec chromosomale DNA |
| Anlagerung der Oligonukleotide | *    | 30 sec                                      |
| Strang-Verlängerung            | 72°C | 60 sec/1kb synthetisierte<br>DNA            |
| 1 x Finale Strang-Verlängerung | 72°C | 3 min                                       |

\*Die Anlagerungstemperatur hing von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der verwendeten Oligonukleotide ab. Als Faustformel gilt:  $T_m = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C)$ . Die verwendete Temperatur lag 5 - 10°C unter der errechneten.

Die *Taq*-DNA-Polymerase (DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) wurde bei quantitativen Ansätzen verwendet. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die für

Klonierungen eingesetzt wurden, wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase (DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*) verwendet, welche eine 3'-5'-Exonuklease-Korrekturleseaktivität besitzt. Durch letzteres arbeitet das Enzym langsamer als die *Taq*-DNA-Polymerase und es wurden für die Strang Verlängerung 60 sec für 500 bp gerechnet.

b) Reaktion mit „ganzen Zellen“

Um zu überprüfen, ob Zellen Plasmide aufgenommen haben, wurden Einzelklone von *E. coli* bzw. Flüssigkultur von *H. salinarum* anstelle einer reinen DNA-Vorlage in der PCR eingesetzt. *E. coli* Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, auf eine markierte Stelle einer Selektionsplatte ausgestrichen, welche dann bei 37°C inkubiert wurde. Der Zahnstocher wurde kurz in einen vollständigen PCR-Ansatz (siehe Standard PCR-Ansatz, aber ohne DNA-Vorlage) eingetaucht.

Für eine Reaktion mit *H. salinarum* Zellen wurden 5 bis 10 µl Kultur sedimentiert und in ca. 100 µl H<sub>2</sub>O bidest gegeben, um die Zellen zu lysieren und um Störungen der PCR aufgrund des hohen Salzgehaltes zu verhindern. Von dieser Lösung wurde 1 µl in einen vollständigen PCR-Ansatz gegeben. Das Temperaturprofil erfolgte nach Standard-Bedingungen.

c) Reaktion zur Herstellung Digoxigenin-11-dUTP-markierter (DIG-11-dUTP)

Sonden

DIG-11-dUTP markierte Sonden wurden in Northern Blot Analysen eingesetzt. Mittels eines Antikörpers, der gegen das Basenanalogen DIG-11-dUTP gerichtet war, konnte die untersuchte mRNA nachgewiesen werden.

Desoxynukleotidgemisch

| Stoff                               | Endkonzentration | Menge/1 ml |
|-------------------------------------|------------------|------------|
| 100 mM dATP Stammlsg.               | 1 mM             | 10 µl      |
| 100 mM dTTP Stammlsg.               | 0,125 mM         | 1,25 µl    |
| 100 mM dCTP Stammlsg.               | 1,5 mM           | 15 µl      |
| 100 mM dGTP Stammlsg.               | 1,5 mM           | 15 µl      |
| ad 1 ml mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |            |

Der PCR-Ansatz war bis auf den dNTP-Mix wie bei dem Standard-Ansatz. Pro 100 µl Reaktionsansatz wurden 2 µl 1mM DIG-11-dUTP (Endkonzentration 20 µM) zugegeben. Das Temperaturprofil wurde insoweit geändert, dass für die Strang Verlängerung 60 sec für 500 bp gerechnet wurden.

### **3.3.2. Präzipitation von Nukleinsäuren aus Lösungen**

Nukleinsäurelösungen wurden mit dem 2,5fachen Volumen absoluten EtOH (v/v) sowie mit 1/10 Volumen 3,2 M Kaliumazetat (pH = 4,8) versetzt. Die Lösung wurde gemischt und entweder 60 min bei -20°C oder 30 min bei -80°C inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 18000 x g) wurde das Präzipitat mit 500 µl 70%igen EtOH (v/v) gewaschen (30 min, 18000 x g). Das Präzipitat wurde nach dem Trocknen in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O bidest gelöst.

### **3.3.3. Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen / Reinigung von Nukleinsäuren**

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen und zur Reinigung von PCR-Ansätzen oder Spaltungsansätzen wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) bzw. das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

### **3.3.4. Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsendonukleasen**

Für die Spaltung von Nukleinsäuren betrug die DNA-Konzentration im Ansatz ca. 20 ng / µl, maximal wurden 3 µg DNA in einem Ansatz hydrolisiert. Die geeigneten Puffer und die Bedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt. Präparative Ansätze (z. B. Spaltung von PCR-Fragmenten, die anschließend in eine Ligation eingesetzt werden sollten) wurden mindestens 10 h inkubiert; Analytische Ansätze (z. B. Überprüfung von Vektoren) wurden 2 bis 3 h bei geeigneter Temperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der Enzyme beendet. Gegebenenfalls wurde die gespaltene Nukleinsäure mittels Kaliumazetat in Anwesenheit von Ethanol präzipitiert oder mittels des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

### **3.3.5. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Nukleinsäuren**

Zur Reduktion der effizienten intramolekularen Ligation von linearisierten Vektoren wurde deren 5'Phosphatgruppe mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase

abgespalten. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben und wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen 100 mM EDTA (pH = 8) gestoppt, da EDTA den Cofaktor des Enzymes (Zink) komplexiert.

Die Phosphorylierung von PCR-Fragmenten und mittels des Klenow-Fragmentes aufgefüllter Vektoren wurde mit der T4-Polynukleotid-Kinase durchgeführt. Es wurde eine 1:10 Verdünnung der Kinase in dem mitgelieferten Puffer hergestellt, so dass eine Arbeitslösung mit der Konzentration von 1 Unit / µl entstand. Der Reaktionsansatz (10 µl Endvolumen) wurde mit 1 µl dieser Lösung sowie 1 mM ATP versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzymes erfolgte durch Zugabe von 50 mM NaCl und Inkubation bei 70°C für 20 min.

Zum Auffüllen von 5'-überstehenden Enden wurde das Klenow-Fragment verwendet. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben zusammengestellt. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 37°C und für 20 min bei Raumtemperatur. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70°C für 20 min.

### 3.3.6. Ligation von Nukleinsäuren

Zur Verbindung (Ligation) von restringierten Nukleinsäuren wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Die Reaktion fand in einem Volumen von 20 µl statt, wobei 50 bis 100 ng Vektor, 0,75 mM ATP, 5 Units Ligase und 1/10 Volumen Puffer verwendet wurden. Um abzuschätzen, welche Molaritäten der Fragmente eingesetzt werden sollten, wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{bp Fragment} \times 3; 5 \text{ oder } 10^*}{\text{bp Vektor}} = \text{ng Fragment}$$

\*Die Fragmente wurden im dreifachen, fünffachen oder zehnfachen molaren Überschuss eingesetzt.

Die Reaktion fand über Nacht bei Raumtemperatur statt.

### 3.3.7. Dialyse von Nukleinsäure-Lösungen

Nukleinsäure-Lösungen, die entsalzt werden sollten, wurden auf ein Dialyseplättchen gegeben, welches auf der Wasseroberfläche einer mit H<sub>2</sub>O bidest gefüllten Petrischale lag. Es wurde 30 bis 60 min dialysiert, die DNA wurde vorsichtig von dem Plättchen abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

### 3.3.8. Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmiden oder PCR-Produkten erfolgten nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1992).

#### Reaktionsansatz

| Stoff                            | Menge/10 $\mu$ l      |
|----------------------------------|-----------------------|
| PCR-Produkt bzw. Plasmid         | 3 - 20 ng bzw. 150 ng |
| <i>Big-Dye Terminator RR Mix</i> | 1 $\mu$ l             |
| Reaktionspuffer                  | 1,5 $\mu$ l           |
| Oligonukleotid                   | 5 pmol                |

#### Temperaturprofil der Sequenzierreaktion

25x

|                                 |      |        |
|---------------------------------|------|--------|
| Denaturierung                   | 96°C | 10 sec |
| Anlagerung des Oligonukleotides | 50°C | 5 sec  |
| Strang-Verlängerung             | 60°C | 4 min  |

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Für die Aufbereitung der Proben wurden diese mit H<sub>2</sub>O bidest auf 20  $\mu$ l aufgefüllt und mit 2  $\mu$ l 3 M NaAc (pH = 4,6) sowie 50  $\mu$ l 98%igem EtOH versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Sequenzierprodukte präzipitiert (11 min, 18000 x g), das Präzipitat mit 250  $\mu$ l 70%igem EtOH gewaschen (3 min, 18000 x g) und getrocknet. Die Analyse und Auswertung der Sequenzierprodukte führte die Firma SRD (Oberursel) durch.

### 3.3.9. Transformation von Mikroorganismen

a) *E. coli* (Dower *et al.*, 1988)

Zur Vorbereitung der Zellen für die Elektroporation wurde eine SOB<sup>+</sup>-Übernackkultur im Verhältnis 1:100 in 500 ml SOB<sup>+</sup>-Medium überimpft, und bei 30°C oder 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 - 0,6 kultiviert. Alle verwendeten Materialien, Lösungen und Zentrifugen waren auf 4°C vorgekühlt. Die Zellen wurden sedimentiert (20 min, 4000 x g). Das Sediment wurde dreimal hintereinander in sinkenden Volumina 10%igem Glycerin (v/v) resuspendiert (250 ml; 125 ml; 25 ml) und zwischendurch zentrifugiert (20 min, 4000 x g). Das

Sediment wurde in 150 µl 10%igem Glycerin (v/v) resuspendiert. Aliquots a 70 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Elektroporation wurden die vorbereiteten Zellen auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA vermischt (2 - 5 ng Vektor bzw. 2 µl eines Ligationsansatzes) und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Biorad, München) luftblasenfrei überführt. Die Zellsuspension wurde im Genepulser® Elektroporations System (Biorad, München) elektroporiert (Einstellungen: 800 Ω; 1500 V; 25 µFarad). Unmittelbar nach der Poration wurde 1 ml vorgewärmtes SOB<sup>+</sup>-Medium in die Küvette gegeben und die Zellsuspension wurde in ein steriles Reagenzglas überführt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in geeigneten Verdünnungen auf antibiotikahaltigen SOB<sup>+</sup>-Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

b) *H. salinarum* (modifiziert nach (Cline *et al.*, 1989a))

Sphäroblastenbildungslösung (SBL)

| Stoff                                 | Endkonzentration | Menge/0,2 l |
|---------------------------------------|------------------|-------------|
| NaCl                                  | 2 M              | 23,4 g      |
| KCl                                   | 27 mM            | 0,4 g       |
| 1 M Tris/HCl; pH = 8,75               | 50 mM            | 10 ml       |
| Saccharose                            | 15 % (w/v)       | 30 g        |
| ad 200 ml mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |             |

Sphäroblastenverdünnungslösung (SVL)

| Stoff                                 | Endkonzentration | Menge/0,5 l |
|---------------------------------------|------------------|-------------|
| NaCl                                  | 3,85 M           | 112,5 g     |
| MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O  | 70 mM            | 9,25 g      |
| KCl                                   | 24 mM            | 0,9 g       |
| tri-Natriumcitratx2H <sub>2</sub> O   | 10 mM            | 0,15 g      |
| 1 M Tris/HCl, pH = 7,4                | 50 mM            | 25 ml       |
| CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O  | 1 mM             | 73,5 mg     |
| Saccharose                            | 15 % (w/v)       | 75 g        |
| ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |             |

EDTA-Lösung

| Stoff                  | Endkonzentration | Menge/0,1 l |
|------------------------|------------------|-------------|
| EDTAx2H <sub>2</sub> O | 0,5 M            | 18,6 g      |
| pH = 8,2               |                  |             |
| ad 100 ml mit SBL      |                  |             |

PEG-Lösung

| Stoff   | Endkonzentration | Menge/10 ml |
|---------|------------------|-------------|
| PEG 600 | 60 % (w/v)       | 6 ml        |
| SBL     | 40 % (w/v)       | 4 ml        |

2 ml einer exponentiellen Kultur wurden sedimentiert (6 min, 3800 x g), in 180 µl SBL durch kräftiges Schütteln suspendiert und 5 min unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl EDTA-Lösung wurde das Reaktionsgefäß 20 Mal invertiert. Die Zellen wurden 20 bis 30 min bis zur vollständigen Sphäroblastenbildung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bildung der Sphäroblasten wurde mikroskopisch überprüft. Nach Zugabe von 20 µl DNA-Lösung (2 bis 5 µg DNA in 2 M NaCl) wurde das Reaktionsgefäß 20 Mal vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In den Deckel des Reaktionsgefäßes wurden 180 bis 200 µl PEG-Lösung vorgelegt. Durch Schließen des Gefäßes und rasches Schwenken wurden die Lösungen gemischt, bis keine Schlieren mehr vorhanden waren. Nach 20 min Inkubation wurde die Lösung durch Zugabe von 1600 µl SVL verdünnt. 100 µl des Ansatzes wurden auf novobiocinhaltigem (0,4 µg / ml) Pepton-Festmedium ausgestrichen und 1500 µl wurden in flüssigem novobiocinhaltigem (0,4 µg / ml) Pepton-Medium angeimpft. Nach Wachstum der Zellen bei 42°C wurden diese mehrfach in frisches Medium mit Novobiocin (0,4 µg / ml) überimpft.

**3.3.10. Generierung von Vektoren zur Expression von GFP-Fusionen**

Für die Untersuchung putativ-induzierbarer Promotoren und der Expression von GFP-Fusionen wurden unterschiedliche Vektoren konstruiert. Ausgangsvektor war der von U. Herrmann (Herrmann, 2002) erzeugte Vektor pUH6. Dieser enthält den *arcB* Promotor und den offenen Leserahmen des *sph1* Gens. Die verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung von Fragmenten für die Vektor-Konstruktionen sind unter 3.1.6. Tabelle 1 aufgelistet. pUH6 wurde mit *Acc65I* gespalten, die

Enden wurden aufgefüllt, phosphoryliert und das linearisierte Produkt mit *NcoI* gespalten (zur Entfernung des offenen Leserahmens von *sph1*). Der offene Leserahmen von *bop* ohne das Stoppkodon wurde integriert und nachfolgend das *gfp* Gen, welches von pJAM1020 (Reuter & Maupin-Furlow, 2004) als DNA-Vorlage amplifiziert wurde. Es entstanden die Vektoren pAB1 (*arcB* Promotor + *bop* ohne Stoppkodon) und pAB2 (*arcB* Promotor + *bop-gfp*). Die Vektoren pAB3 (*arcB* Promotor + *arg* ohne Stoppkodon) und pAB4 (*arcB* Promotor + *arg-gfp*) wurden auf die gleiche Weise generiert, nur dass anstelle von *bop* das Gen für die Arginindeiminase eingesetzt wurde. Als Kontrollvektor wurde ein Konstrukt nur mit dem *arcB* Promotor ohne Fusionsgen erstellt (pAB9). Um das Fusionsgen *bop-gfp* unter die Kontrolle seines eigenen Promotors zu stellen, wurde pAB1 mit *XhoI* und *NcoI* gespalten, um den *arcB* Promotor durch den *bop* Promotor zu ersetzen (*gfp* enthält eine *NcoI* Erkennungsstelle, daher wurde der Umweg über pAB1 gewählt). Das daraus resultierende Plasmid (pAB5) wurde mit *EcoRV* gespalten und das *gfp* Gen integriert (pAB6). Als Kontrollvektor wurde ein Konstrukt nur mit dem *bop* Promotor, ohne Fusionsgen, erstellt (pAB10). Neben dem durch Arginin induzierbaren Promotor sollte auch ein putativer Tryptophan-induzierbarer Promotor untersucht werden. Der erste Vektor wurde auf die gleiche Weise wie pAB5 konstruiert, nur dass anstelle des *bop* Promotors der Promotor von OE4331R (putativer Tryptophanase Promotor; *ptnaA*) verwendet wurde. Es entstand pAB7, in das nach Spaltung mit *EcoRV* das *gfp* Gen integriert wurde (pAB8). Als Kontrollvektor wurde ein Konstrukt nur mit dem *ptnaA* Promotor ohne Fusionsgen erstellt (pAB11). Alle generierten Vektoren wurden sequenziert. Nach Transformation der Vektoren in *H. salinarum* wurden diese mittels PCR überprüft.

### 3.3.11. Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. salinarum*

#### Lysepuffer

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| NaCl                               | 100 mM           | 5,8 g   |
| Tris                               | 10 mM            | 1,21 g  |
| EDTAx2H <sub>2</sub> O             | 1 mM             | 0,372 g |
| 20 % SDS (w/v)                     | 0,05 % (v/v)     | 2,5 ml  |
| pH= 8,0                            |                  |         |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

10 ml einer exponentiellen Kultur wurden sedimentiert (15 min, 4500 x g), in 300 µl Basalsalz resuspendiert und mit 2,5 ml Lysepuffer bis zum vollständigen Zellaufschluss gemischt. Das Lysat wurde vorsichtig mit 5 ml 98%igem EtOH überschichtet. Die an der Phasengrenze ausgefallene DNA wurde auf eine Glaskapillare gewickelt. Beide Phasen wurden vermischt und die DNA wurde 5 min in der Lösung inkubiert. Die an die Kapillare gebundene DNA wurde durch je zweimaliges Eintauchen in 98%igem EtOH und Ether gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Lösen der DNA erfolgte in TE-Puffer bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

### 3.3.12. Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. salinarum*

a) Isolierung von Gesamt-RNA (Chomczynski & Sacchi, 1987) für Northern Blot Analysen

#### Aufschlusslösung

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| 750 mM tri-Na-Citrat, pH = 7  | 7 ml    |
| 10 % Natriumlauroylsarcosinat | 10,6 ml |
| β-Mercaptoethanol             | 1 ml    |
| Guanidiniumthiocyanat         | 100 g   |
| H <sub>2</sub> O bidest       | 129 ml  |

2 ml Kultur wurden in einer Tischzentrifuge sedimentiert (1 min, 18000 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 400 µl Aufschluslösung vollständig resuspendiert. Das Gemisch wurde für 30 bis 60 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden nacheinander folgende Lösungen zugegeben: 50 µl 2 M NaAc (pH = 4), 400 µl Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1). Nach jeder Zugabe wurden die Lösungen gründlich durchgemischt. Der Ansatz wurde 30 min bei -20°C inkubiert, zentrifugiert (20 min, 18000 x g) und 400 µl des Überstandes wurden mit 1 ml eiskaltem 98%igem EtOH versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei -20°C folgte die Sedimentierung der RNA (30 min, 18000 x g). Das Sediment wurde mit 500 µl eiskaltem 70%igem EtOH gewaschen (15 min, 18000 x g), anschließend 30 bis 60 min bei 30°C getrocknet und in 30 - 50 µl DMPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

b) Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. salinarum* für Mikroarray Analysen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus  $9 \times 10^8$  Zellen wurde das Qiagen *RNeasy Mini Kit* verwendet. Das Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben mit Ausnahme

der Lysozym-Behandlung. Eine DNase Behandlung mit dem Qiagen *RNase-Free DNase Set* wurde standardmäßig durchgeführt.

### 3.3.13. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse

#### Puffer 1

| Stoff                  | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------|------------------|---------|
| Tris                   | 50 mM            | 6,06 g  |
| EDTAx2H <sub>2</sub> O | 10 mM            | 3,72 g  |
| RNaseA                 | 100 µg / ml      | 100 mg  |

pH = 8,0

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest

Die Lösung wurde (vor der RNase Zugabe) autoklaviert und bei 4°C gelagert.

#### Puffer 2

| Stoff    | Endkonzentration | Menge/l |
|----------|------------------|---------|
| 1 M NaOH | 0,2 M            | 200 ml  |
| SDS      | 1 % (w/v)        | 10 g    |

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### Puffer 3

| Stoff | Endkonzentration | Menge/l  |
|-------|------------------|----------|
| KAc   | 3,2 M            | 313,92 g |

pH = 5,5 (mit Essigsäure einstellen)

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Für die Plasmidisolierung aus *E. coli* (Birnboim & Doly, 1979) wurden 1,5 ml einer Plasmid-tragenden über Nacht Kultur sedimentiert (30 sec, 18000 x g). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 150 µl Puffer 1 suspendiert und zur Zellyse mit 150 µl Puffer 2 versetzt. Durch mehrfaches vorsichtiges Invertieren der Reaktionsgefäße wurde die Suspension gemischt und durch Zugabe von 150 µl Puffer 3 neutralisiert. Es wurde 10 min bei 18000 x g zentrifugiert. Der Überstand (ca. 400 µl) wurde in ein frisches Gefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde 1 ml 98%iges Ethanol (v/v) hinzugegeben und anschließend zentrifugiert

(15 min, 18000 x g). Das Sediment wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen (5 min, 18000 x g), luftgetrocknet und in 50 µl TE oder Wasser resuspendiert.

Die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (>50 µg) aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des *PureYield™ Plasmid Midiprep Systems* der Firma Promega nach Angaben des Herstellers.

### 3.3.14. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Konzentrationen von DNA- und RNA-haltigen Lösungen wurden mit dem Nanodrop Spektrophotometer ND-1000 bestimmt.

Falls erforderlich erfolgte die Quantifizierung zusätzlich nach der Gelelektrophorese. Hierbei diente, nach Färbung des Gels, ein Molekulargewichtsstandard bekannter Konzentration als Vergleich zur Berechnung.

### 3.3.15. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

#### 10 x DNA-Probenpuffer

| Stoff                                 | Endkonzentration | Menge/0,1 l |
|---------------------------------------|------------------|-------------|
| 1 M Tris/HCl, pH = 8,0                | 20 mM            | 2 ml        |
| 86 % Glycerin (v/v)                   | 50 % (v/v)       | 58 ml       |
| Bromphenolblau                        | 0,25 % (w/v)     | 250 mg      |
| Xylencyanol                           | 0,25 % (w/v)     | 250 mg      |
| ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |             |

#### TBE-Puffer (10 x)

| Stoff  | Endkonzentration | Menge/l  |
|--|------------------|----------|
| Tris   | 0,89 M           | 107,81 g |
| Borsäure   | 0,89 M           | 55,03 g  |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 0,02 M           | 7,45 g   |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest und autoklavieren |                  |          |

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden je nach Bedarf 0,7%ige bis 1,8%ige Gele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende

Menge Agarose in 1 x TBE-Puffer erhitzt und anschließend in Gelkammern gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Geles gegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 80 Volt in 1 x TBE-Puffer. Nach Färbung des Geles in einem Ethidiumbromidbad (1 mg / l; 20 min) wurde die DNA mittels Fluoreszenzanregung (302 nm) visualisiert und dokumentiert. Anhand von DNA-Größenstandards konnten die Fragmentgrößen der eingesetzten DNA bestimmt werden.

### 3.3.16. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

#### MOPS-Puffer (10 x)

| Stoff                  | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------|------------------|---------|
| MOPS                   | 500 mM           | 104,7 g |
| EDTAx2H <sub>2</sub> O | 10 mM            | 3,7 g   |

pH = 7,0

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest

Die Lösung wurde über Nacht mit 0,1 % (v/v) DMPC inkubiert und anschließend autoklaviert.

#### RNA-Probenpuffer

| Stoff                        | Endkonzentration | Menge/10 ml |
|------------------------------|------------------|-------------|
| 10 x MOPS-Puffer             | 1 x              | 1 ml        |
| 100 % Formamid (v/v)         | 50 % (v/v)       | 5 ml        |
| 37 % Formaldehyd (v/v)       | 6,8 % (v/v)      | 1,84 ml     |
| 87 % Glycerin (v/v)          | 15 % (v/v)       | 1,34 ml     |
| Bromphenolblau               | 0,1 % (w/v)      | 10 mg       |
| Xylencyanol                  | 1 % (v/v)        | 100 µl      |
| Ethidiumbromid (0,1 mg / ml) | 0,5 µg / ml      | 50 µl       |

ad 10 ml mit H<sub>2</sub>O bidest

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden je nach Bedarf 0,7%ige bis 1,8%ige Gele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde die benötigte Menge an Agarose in H<sub>2</sub>O bidest erhitzt und nach dem Abkühlen mit den entsprechenden Mengen 10 x MOPS und 37%igem Formaldehyd (v/v) versetzt, bevor sie in RNA-Gelkammern gegossen wurde. Die RNA-Proben wurden mit RNA-Probenpuffer

versetzt (400 % (v / v)), 10 min auf 65°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und aufgetragen. Die RNA wurde bei einer Spannung von 100 Volt in 1 x MOPS-Puffer aufgetrennt, mittels Fluoreszenzanregung (302 nm) visualisiert und dokumentiert.

### 3.3.17. Transfer von RNA aus Agarosegelen auf eine Membran (Northern Blot)

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

#### 20 x SSC-Puffer (Transferpuffer)

| Stoff                         | Endkonzentration | Menge/l |
|-------------------------------|------------------|---------|
| NaCl                          | 3 M              | 175,3 g |
| <i>tri</i> -Natriumcitrat     | 0,3 M            | 88,2 g  |
| pH = 7.0                      |                  |         |
| ad 1 l H <sub>2</sub> O bidet |                  |         |

#### 5 x ASSC-Puffer

| Stoff                          | Endkonzentration | Menge/l |
|--------------------------------|------------------|---------|
| NaCl                           | 0,75 M           | 43,8 g  |
| <i>tri</i> -Natriumcitrat      | 75 mM            | 22,06 g |
| NaOH                           | 10 mM            | 0,4 g   |
| pH = 11.5                      |                  |         |
| ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

Aufbau des Blots von unten nach oben:

- 20 Blatt GB 004 Chromatographiepapier
- 3 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Transferpuffer equilibriert
- 1 Nylonmembran (Nylonmembran, Hybond-N, GE Healthcare, München),  
in H<sub>2</sub>O bidest vorgequollen (10 min) und in Transferpuffer equilibriert
- Agarosegel mit zu transferierender RNA
- 3 Blatt GB 002 Chromatographiepapier, in Transferpuffer equilibriert

Das Format von Papier und Gel betrug 8 x 12 cm. Die einzelnen Lagen wurden luftblasenfrei aufeinandergelegt. Ein 12 x 30 cm langes Stück GB 002 Chromatographiepapier wurde oben aufgelegt und mit zwei Pufferreservoirs

verbunden. Der Transfer erfolgte mit 20 x SSC-Puffer für 16 h oder mit 5 x ASSC-Puffer als Transferpuffer für 3 h bei Raumtemperatur. Die Lage der Probestaschen wurde nach dem Transfer mit Bleistift auf der Membran markiert. Aufgrund der großen Mengen an 16S rRNA und 23S rRNA in den Zellen konnten diese auf der Membran durch Fluoreszenzanregung des interkalierten Ethidiumbromids mit Licht einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht und als Ladekontrolle verwendet werden. Die RNA wurde in einem Stratalinker bei 1200 mJoules durch UV-Strahlung mit der Membran quervernetzt.

### 3.3.18. Hybridisierung von Digoxigenin-markierten Sonden

Für den Nachweis einer bestimmten RNA wurde die Membran mit der transferierten Gesamt-RNA mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten Sonde inkubiert. Der Nachweis der Sonde und somit der RNA, erfolgte mit dem DIG Luminescence Kit.

#### 100 x Denhardt`s Lösung

| Stoff                             | Endkonzentration | Menge/0,5 l |
|-----------------------------------|------------------|-------------|
| Rinderserumalbumin                | 2 % (w/v)        | 10 g        |
| Ficoll 400                        | 2 % (w/v)        | 10 g        |
| Polyvinylpyrrolidon               | 2 % (w/v)        | 10 g        |
| ad 500 ml H <sub>2</sub> O bidest |                  |             |

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

#### Hybridisierungslösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Formamid                           | 50 % (v/v)       | 500 ml  |
| 20 x SSC                           | 5 x              | 250 ml  |
| 100 x Denhardt`s Lösung            | 3 x              | 30 ml   |
| 20 % SDS (w/v)                     | 0,5 % (v/v)      | 25 ml   |
| 30 % Natriumlaurylsarcosinat (v/v) | 0,2 % (v/v)      | 6 ml    |
| 30 % Dextransulfat (w/v)           | 5 % (v/v)        | 166 ml  |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

Die Hybridisierungslösung wurde autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

Die quervernetzte Nylonmembran wurde zur Vorhybridisierung in 10 ml Hybridisierungslösung mit 120 µg tRNA für 1 h bei 45 bis 58 °C (sondenspezifisch, siehe Tabelle 2) im Hybridisierungssofen unter Drehen inkubiert. Die DIG-11-dUTP markierte Sonde (15 bis 30 µl des PCR-Ansatzes) wurde in 10 ml Hybridisierungslösung mit 120 µg tRNA 10 min auf 100°C erhitzt und ca. 20 min auf Eis abgekühlt. Die Vorhybridisierungslösung wurde verworfen, und die sondenhaltige Lösung zu der Nylonmembran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte unter Drehen für 16 h bei 45 bis 58°C (sondenspezifisch; Tbl. 2). Die Lösung wurde bei -20°C gelagert und bis zu dreimal wiederverwendet.

### 3.3.19. Chemolumineszenznachweis von Digoxigenin-markierten Sonden

#### Maleinsäurepuffer

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Maleinsäure                        | 100 mM           | 11,6 g  |
| NaCl                               | 150 mM           | 8,77 g  |
| pH = 7,5                           |                  |         |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

#### Blockierungslösung

1 % Blocking Reagenz (w/v) in Maleinsäurepuffer  
 Der Puffer wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

#### Waschpuffer (frisch)

0,3% Tween 20 (w/v) in Maleinsäurepuffer

#### Nachweisepuffer

| Stoff  | Endkonzentration | Menge/l |
|--|------------------|---------|
| Tris   | 100 mM           | 12,11 g |
| NaCl   | 100 mM           | 5,84 g  |
| MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O                          | 50 mM            | 10,17 g |
| pH = 9,5   |                  |         |
| ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest                                 |                  |         |
| Der Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. |                  |         |

Methylenblaulösung

| Stoff                             | Endkonzentration | Menge/0,1 l |
|-----------------------------------|------------------|-------------|
| Methylenblau                      | 0,04 % (w/v)     | 0,04 g      |
| NaAcetat x 2H <sub>2</sub> O      | 0,5 M            | 6,8 g       |
| pH = 5,0                          |                  |             |
| ad 100 ml H <sub>2</sub> O bidest |                  |             |

Die Nylonmembran wurde nach der Hybridisierung schrittweise je zweimal in 2 x SSC (5 min, RT), 1 x SSC, 0,5 x SSC und 0,25 x SSC (je 15 min; 5°C unter der Hybridisierungstemperatur) gewaschen. Alle Puffer enthielten 0,1 % SDS (w/v). Die Membran wurde 2 bis 5 min in 50 ml Waschpuffer geschwenkt und 1 bis 2 h in 100 ml Blockierungslösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je 15 min) mit 100 ml Waschpuffer wurde die Membran 3 min in 20 ml Detektionspuffer geschwenkt. 2 ml Detektionspuffer wurden mit 10 µl CDP-Star gemischt. Diese Lösung wurde 5 min auf der Membran verteilt. Die Membran wurde in eine Folie eingeschweißt. Röntgenfilme wurden 20 sec bis 60 min exponiert, 1 min in Entwickler geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und ca. 3 min in Fixierer gelegt. Die Nylonmembran wurde mit Methylenblau gefärbt, mehrfach mit Wasser gespült und in eine Folie eingeschweißt. Der exponierte Film wurde auf die gefärbte Membran gelegt, so dass die Lage der Probenaschen, der 16S rRNA und 23S rRNA sowie der Größenstandard übertragen werden konnte.

**3.3.20. Analyse des Einbaues von BrdU in die DNA**

Für die Untersuchung der Replikation von *H. salinarum* wurde das Basenalogon BrdU verwendet. Exponentielle bzw. synchronisierte Kulturen wurden mit 20 µg / ml oder 500 µg / ml BrdU (bei Synchronisationen 20 µg / ml) versetzt. Je nach Bedarf wurden  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen (bei Synchronisationen  $5 \times 10^7$  Zellen) entnommen, 1 min bei 18000 x g sedimentiert, in 34 µl H<sub>2</sub>O bidest lysiert, mit 4 µl 10 x Restriktionsendonukleasen-Puffer versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden 20 Units *NotI* hinzugegeben und über Nacht zur Spaltung der DNA bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 x DNA-Probenpuffer (siehe 3.4.15.) wurden die Proben in die Geltaschen eines 0,7%igen Agarosegels gegeben, und bei einer Spannung von 60 Volt in 1 x TBE-Puffer 5 bis 6h aufgetrennt. Nach Färbung des Geles in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l; 20

min) wurden die DNA mittels Fluoreszenzanregung (302 nm) visualisiert und dokumentiert. Das Gel wurde unter Schütteln nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert: 10 min in 0,25 M HCl; 45 min in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl; 60 min in 0,5 M Tris, 1,5 M NaCl (pH = 8) und 10 min in 20 x SSC (pH= 11,5). Der Transfer erfolgte nach dem Protokoll für Northern Blot Analysen (3.4.17.). Die DNA wurde in einem Stratalinker bei 1200 mJoules durch UV-Strahlung mit der Membran quervernetzt. Die Membran wurde nach dem Protokoll „Immunologische Detektion von Proteinen“ (3.4.3.) weiterbehandelt, um den BrdU-Einbau nachzuweisen. Zum Waschen und für die Antikörperverdünnung wurde TBS sowie TBST verwendet (3.4.3.).

### 3.4. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

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

##### Trenngelpuffer

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l  |
|------------------------------------|------------------|----------|
| Tris                               | 1,5 M            | 181,65 g |
| SDS                                | 0,384 % (w/v)    | 3,84 g   |
| pH = 8,8                           |                  |          |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |          |

##### Sammelgelpuffer

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Tris                               | 0,5 M            | 60,55 g |
| SDS                                | 0,4 % (w/v)      | 4 g     |
| pH = 6,8                           |                  |         |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

##### Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS)

| Stoff                               | Endkonzentration | Menge/1 ml |
|-------------------------------------|------------------|------------|
| APS                                 | 10 % (w/v)       | 0,1 g      |
| ad 1 ml mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |            |

5 x Probenpuffer

| Stoff                   | Endkonzentration | Menge  |
|-------------------------|------------------|--------|
| SDS                     | 10 % (w/v)       | 1 g    |
| Bromphenolblau          | 0,1 % (w/v)      | 10 mg  |
| 1 M Tris/HCl, pH = 6,8  | 0,15 M           | 1,5 ml |
| Saccharose              | 50 % (w/v)       | 5 g    |
| H <sub>2</sub> O bidest |                  | 6,5 ml |

mischen, a 800 µl aliquotieren, vor Gebrauch mit je 200 µl β-Mercaptoethanol versetzen.

10 x Laufpuffer

| Stoff  | Endkonzentration | Menge/l |
|--------|------------------|---------|
| Tris   | 0,25 M           | 30,3 g  |
| Glycin | 1,92 M           | 144 g   |
| SDS    | 1 % (w/v)        | 10 g    |

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest

12%iges Polyacrylamid-Gel

Trenngel

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| H <sub>2</sub> O bidest | 1,69 ml  |
| Trenngelpuffer          | 1,258 ml |
| 30 % Acrylamid (w/v)    | 2 ml     |
| 10 % APS-Lösung (w/v)   | 75 µl    |
| TEMED                   | 5 µl     |

Sammelgel

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O bidest | 1,5 ml |
| Sammelgelpuffer         | 635 µl |
| 30 % Acrylamid (w/v)    | 333 µl |
| 10 % APS-Lösung (w/v)   | 40 µl  |
| TEMED                   | 3,5 µl |

Zuerst wurde die Lösung für das Trenngel in die Gelgießkammer gefüllt und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde das Wasser abgenommen, die Lösung für das Sammelgel eingefüllt und ein Kamm eingesetzt.

1 - 8 x 10<sup>8</sup> *H. salinarum* Zellen wurden sedimentiert (6 min, 10000 x g), in H<sub>2</sub>O bidest (ca. 24 µl) lysiert und mit 1 x Probenpuffer versetzt. Nach 5 min Denaturierung der Proben bei 96°C wurden sie auf Eis abgekühlt, 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und die löslichen Bestandteile in die Geltaschen gefüllt. Ein Molekulargewichtstandard (SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Prestained Standard) diente bei jedem Gel zur Größenbestimmung. Die Proteine wurden unter Wasserkühlung zunächst bei einer Spannung von 80 Volt für ca. 30 min aufgetrennt, danach bei einer Spannung von 120 Volt für ca. 2 h.

### 3.4.2. Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran (Western Blot)

#### Transferpuffer

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Glycin                             | 192 mM           | 14,4 g  |
| Methanol                           | 20 % (v/v)       | 200 ml  |
| Tris                               | 25 mM            | 3 g     |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

#### 10 x PBS

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| NaCl                               | 1,37 M           | 80 g    |
| KCl                                | 0,027 M          | 2 g     |
| Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 0,065 M          | 11,5 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 0,009 M          | 2 g     |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

#### Tintenfärbelösung

| Stoff              | Endkonzentration | Menge   |
|--------------------|------------------|---------|
| 1 x PBS            | 98,9 %           | 1000 ml |
| Tween 20           | 0,049 %          | 0,5 ml  |
| 100%ige Essigsäure | 0,989 %          | 10 ml   |
| Tinte              | 0,0989 %         | 1 ml    |

Coomassie-Färbelösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Coomassie Blue R-250               | 0,25 % (w/v)     | 2,5 g   |
| Methanol                           | 50 % (v/v)       | 500 ml  |
| Eisessig                           | 10 % (v/v)       | 100 ml  |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

Entfärbelösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Methanol                           | 5 % (v/v)        | 50 ml   |
| Eisessig                           | 10 % (v/v)       | 100 ml  |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

Aufbau des Blots von unten nach oben:

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

Das Format des Papiers betrug 9 x 6 cm. Die einzelnen Lagen wurden luftblasenfrei aufeinandergelegt. Der Transfer erfolgte bei 100 bis 120 mA für 1,5 h und bei 200 mA für 30 min. Das Gel wurde 1 h mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und über Nacht entfärbt, um die Effizienz des Transfers festzustellen. Die Membran wurde ca. 15 min in Tintenfärbelösung unter Schütteln inkubiert, mit H<sub>2</sub>O bidest gespült und das Bandenmuster wurde dokumentiert.

**3.4.3. Immunologische Detektion von Proteinen**

Für die immunologische Detektion von Proteinen und für die Detektion des Basenanalogs BrdU wurden spezifische Antikörper verwendet (3.1.8.).

10 x PBS

| Stoff                           | Endkonzentration | Menge/l |
|---------------------------------|------------------|---------|
| NaCl                            | 1,37 M           | 80 g    |
| KCl                             | 0,027 M          | 2 g     |
| Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,065 M          | 11,5 g  |

|                                    |         |     |
|------------------------------------|---------|-----|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 0,009 M | 2 g |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |         |     |

PBST-Puffer

1 x PBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v)

10 x TBS

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Tris                               | 0,5 M            | 60,57 g |
| NaCl                               | 1,5 M            | 87,66 g |
| pH = 8,0                           |                  |         |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

TBST-Puffer

1 x TBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v)

Blockierungslösung

1 - 5 % Magermilchpulver in 1 x PBS oder 1 x TBS  
alternativ wurde 1 x Roti-Block (Roth, Karlsruhe) verwendet

Reagenzien bei BR-5: PBS, PBST und Milchpulver (Blockierung in 5 %)

Reagenzien bei anti-p-Tyr und anti-p-Thr: Roti-Block, TBS und TBST

Reagenzien bei anti-BrdU: TBS, TBST und Milchpulver (Blockierung in 2 %)

Die Membran wurde 1 h in geeigneter Blockierungslösung inkubiert, kurz in TBS/PBS gespült und mit 10 ml 1. Antikörperlösung (siehe 3.1.8; 1 x TBS/PBS mit 1 bis 2 % Milchpulver (w/v) oder Roti-Block; entsprechende Antikörper-Verdünnung) 1 h inkubiert. Die Inkubation mit anti-p-Tyr und anti-p-Thr erfolgte über Nacht bei 4°C. Das Waschen erfolgte mit TBST/PBST unter Schütteln 3 Mal für 10 min. Die Membran wurde kurz in TBS/PBS gespült und mit 10 ml Antikörperlösung 2 (1 x TBS/PBS mit 1 bis 2 % Milchpulver (w/v) oder Roti-Block; entsprechende Antikörper-Verdünnung, meist 1:10000) 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) erfolgte der ECL-Nachweis:

ECL-NachweisLösung A

200 ml 0,1 M Tris/HCl, pH = 8,6; 50 mg Luminol

Lösung B

11 mg para-Hydroxycumarinsäure in 10 ml DMSO lösen

10 ml Lösung A wurden mit 3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 1 ml Lösung B gemischt. Die Membran wurde 2 min in dem Gemisch geschwenkt und in Folie eingeschweißt. Röntgenfilme wurden 20 sec bis 60 min exponiert, 1 min in Entwickler geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und ca. 3 min in Fixierer gelegt.

#### **3.4.4. 2D-Gelelektrophorese zur globalen Analyse zellzyklusabhängiger Proteomänderungen**

Für die globale Analyse zellzyklusabhängiger Proteomänderungen wurden 2D-Gelelektrophoresen durchgeführt. Die Gele wurden entweder silbergefärbt, oder das *DIGE*-System wurde verwendet.

##### **3.4.4.1. Aufarbeitung der Proben**

2D-Probenpuffer

| Stoff             | Endkonzentration |
|-------------------|------------------|
| Harnstoff         | 7 M              |
| (Thio-Urea        | 2 M )            |
| CHAPS             | 4 % (w/v)        |
| pH = 8,8 oder 6,5 |                  |

Bis zur Protein-Konzentrationsbestimmung wurde Probenpuffer (pH=8,8) ohne Thio-Urea verwendet, danach Probenpuffer (pH=8,8) mit Thio-Urea.

Aus drei synchronisierten Kulturen wurden zu je acht Zeitpunkten je 4 x 10<sup>8</sup> Zellen sedimentiert (1 min, 12000 x g) und nach Entfernen des Überstandes bei -80°C gelagert. Aus einer exponentiellen Kultur (Standard) wurden mehrere Aliquots mit je 4 x 10<sup>8</sup> Zellen entnommen, und wie oben beschrieben behandelt und aufbewahrt. Die Probenaufarbeitung erfolgte leicht modifiziert nach Kirkland (Kirkland *et al.*, 2006). Die Sedimente wurden in 0,5 ml Trizol suspendiert, 20 min bei 65°C bis 70°C sowie 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform wurden die Proben 10 bis 15 sec stark geschüttelt, 5 min bei

Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (15 min, 12000 x g, 4°C). Die oberen wässrigen Phasen wurden verworfen. Die Proben wurden mit 0,15 ml 98 % EtOH versetzt, gemischt, 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zentrifugiert (5 min, 12000 x g, 4°C), um die restlichen Nukleinsäuren zu präzipitieren. Die Überstände wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 0,75 ml Isopropanol gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden präzipitiert (15 min, 12000 x g, 4°C) und in 2 ml 300 mM Guanidin Hydrochlorid in 98 % EtOH mittels eines Spatels suspendiert. Eine 20minütige Inkubation bei Raumtemperatur sowie die Zentrifugation (5 min, 12000 x g, 4°C) und das Suspendieren wurden viermal wiederholt. Nach der letzten Sedimentation wurde 2 Mal in je 2 ml Aceton gewaschen (5 min, 12000 x g, 4°C). Die Sedimente wurden luftgetrocknet und in 120 µl 2D-Probenpuffer (pH = 8,8 / ohne Thio-Urea) gelöst. Je 20 µl wurden für eine Protein-Konzentrationsbestimmung (BCA) nach Herstellerangaben eingesetzt (Smith *et al.*, 1985). Zu den verbleibenden 100 µl wurden je 15,2 mg Thio-Urea gegeben, um eine Endkonzentration von 2 M zu erhalten. Aliquots a 50 µg Protein wurden bei -20°C gelagert. Die verwendeten DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*; GE Healthcare, München) Farbstoffe wurden nach Herstellerangaben zu einer Endkonzentration von 200 pmol / µl gelöst. Je 200 pmol wurden für die Markierung der Proteine eingesetzt (die Proteine aus den synchronisierten Proben wurden mit Cy3 oder Cy5 markiert, der Standard mit Cy2). Sie erfolgte im Dunkeln für 30 min auf Eis, wurde durch Zugabe von 1 µl 10 mM Lysin gestoppt und die Proben wurden weitere 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Je eine mit Cy2, Cy3 und Cy5 markierte Probe wurden vereinigt und mit 2D-Probenpuffer (pH = 6,5; inklusive Thio-Urea) auf ein Endvolumen von 250 µl aufgefüllt (für 2 Gele wurden Mischungen aller Zeitpunkte der Einzelexperimente hergestellt, M1 für Synchronisation 1 usw. Für ein Gel wurde M1 mit Cy3 markiert und M2 mit Cy5; für das zweite Gel M1 mit Cy3 und M3 mit Cy5).

Nach Zugabe von 50 mM DTT und 2 % IPG Puffer (v/v; GE Healthcare) wurden die Proben je in eine Spur eines *Reswelling Tray* (GE Healthcare) entlang der Länge des *DryStrips* (18 cm *DryStrip*, pH = 4 - 5; GE Healthcare, München; 5 cm vom basischen Ende entfernt, pH = 4 - 4,7) aufgebracht. Ein *IPG*-Strip wurde mit der Gelseite nach unten auf die Lösung gelegt und mit 2 ml *Cover Fluid* (GE Healthcare) bedeckt. Die Rehydratisierung erfolgte über Nacht.

### 3.4.4.2. Isoelektrische Fokussierung

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden 10 ml *Cover Fluid* auf eine Kühlplatte (20°C) gegeben. Der *Immobiline DryStrip Tray* wurde aufgelegt, mit 15 ml *Cover Fluid* befüllt und in den *Tray* wurde der *DryStrip Aligner* gelegt. Die rehydratisierten *IPG-Strips* wurden mit H<sub>2</sub>O bidest gespült und je in eine Spur des *Aligners* mit der Gelseite nach oben gelegt. Mit H<sub>2</sub>O bidest getränkte *IEF-Elektrodenstreifen* wurden auf die anodischen und kathodischen Enden der *IPG-Strips* gelegt und die Elektroden wurden auf die Elektrodenstreifen platziert. Alles wurde mit *Cover Fluid* überschichtet (70 bis 80 ml). Die Proben wurden dann in der ersten Dimension (Isoelektrische Fokussierung) bei 44.900 Voltstunden aufgetrennt (Tabelle 4).

#### Tabelle 4: Einstellungen für die isoelektrische Fokussierung

Tabellarisch dargestellt sind die verwendeten Einstellungen während der isoelektrischen Fokussierung. Insgesamt wurden 10 Phasen mit den angegebenen Einstellungen definiert.

| Phase         | Spannung [V] | Stromstärke [mA] | Leistung [W] | Dauer              | Voltstunden [Vh] |
|---------------|--------------|------------------|--------------|--------------------|------------------|
| 1             | 100          | 2                | 5            | 5 h                | 500              |
| 2             | 300          | 2                | 5            | 1 h                | 300              |
| 3             | 900          | 2                | 5            | 10 min             | 150              |
| 4             | 1200         | 2                | 5            | 10 min             | 200              |
| 5             | 1500         | 2                | 5            | 10 min             | 250              |
| 6             | 1800         | 2                | 5            | 10 min             | 300              |
| 7             | 2100         | 2                | 5            | 10 min             | 350              |
| 8             | 2400         | 2                | 5            | 10 min             | 400              |
| 9             | 2700         | 2                | 5            | 10 min             | 450              |
| 10            | 3000         | 2                | 5            | 14 h               | 42.000           |
| <b>Gesamt</b> |              |                  |              | <b>21 h 10 min</b> | <b>44.900</b>    |

### 3.4.4.3. Auftrennung der Proben in der zweiten Dimension

Zur Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurden 12,5%ige Polyacrylamidgele ohne Sammelgel und Taschen verwendet (Trenngelpuffer siehe 3.4.1.).

#### 12,5%iges Polyacrylamid-Trenngel (Angaben für 4 Gele)

|                                |           |           |
|--------------------------------|-----------|-----------|
| H <sub>2</sub> O bidest        | 30,60     | ml        |
| Trenngelpuffer                 | 24        | ml        |
| <u>30%iges Acrylamid (w/v)</u> | <u>40</u> | <u>ml</u> |

mischen und 1 min entgasen

Zugabe von:

|                         |     |    |
|-------------------------|-----|----|
| 10%ige APS-Lösung (w/v) | 480 | µl |
| TEMED                   | 32  | µl |

mischen, in Gelgießkammer einfüllen und mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichten.

#### SDS-Äquibrierungspuffer

| Stoff               | Endkonzentration | Menge/l  |
|---------------------|------------------|----------|
| 1,5 M Tris          | 50 mM            | 33,5 ml  |
| Harnstoff           | 6 M              | 360,35 g |
| 87 % Glycerin (w/v) | 30 % (v/v)       | 345 ml   |
| SDS                 | 2 % (w/v)        | 20 g     |
| Bromphenolblau      | 0,25 % (w/v)     | 2,5 g    |

Zum Äquibrieren der Strips wurden diese in je ein Reagenzglas mit 20 ml SDS-Äquibrierungspuffer und 1 % DTT (w/v) gegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur (zwischendurch invertieren) wurden die Lösungen dekantiert, frischer Äquibrierungspuffer mit 4 % Jodacetamid (w/v) zugegeben und wie zuvor inkubiert. Die Strips wurden in Laufpuffer getaucht, auf das Gel gelegt und mit einer 40 bis 50°C warmen Agaroselösung (0,5 % Agarose (w/v) in Laufpuffer und 0,25 % Bromphenolblau (w/v)) überschichtet. Die Proteine wurden über Nacht bei einer Stromstärke von 24 mA (bei 4 Gelen) aufgetrennt.

#### 3.4.4.4. Silberfärbung für die globale Proteomanalyse

Die Methode von Yan *et al.* wurde leicht modifiziert (Yan *et al.*, 2000). Die Probenaufarbeitung erfolgte ähnlich wie für das DIGE-System, außer dass die Proteine nicht mit Farbstoffen markiert wurden. Zudem wurde Probenpuffer mit 2 M Thio-Urea verwendet. Auf ein Gel wurde je nur eine Probe aufgetrennt (150 µg Gesamtprotein) und ein Molekulargewichtsmarker diente als Größenstandard. Die isoelektrische Fokussierung und die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgten wie in 3.4.4.2. und 3.4.4.3. beschrieben.

##### Fixierungslösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Ethanol                            | 40 % (v/v)       | 400 ml  |
| Essigsäure                         | 10 % (v/v)       | 100 ml  |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

##### Sensitivierungslösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Ethanol                            | 30 % (v/v)       | 300 ml  |
| 5%iges Natriumthiosulfat (w/v)     | 0,2 % (v/v)      | 40 ml   |
| Natriumacetat                      | 0,83 M           | 68 g    |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

##### Silbernitrat-Lösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Silbernitrat                       | 14,7 mM          | 2,5 g   |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

##### Entwicklungslösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Natriumcarbonat                    | 235 mM           | 25 g    |
| 5%iges Natriumthiosulfat (w/v)     | 0,0001 % (v/v)   | 20 µl   |
| 37 % Formaldehyd (v/v)             | 0,15 % (v/v)     | 400 µl  |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

Stopp-Lösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| EDTAx2H <sub>2</sub> O             | 39 mM            | 14,5 g  |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

Geltrockner-Lösung

| Stoff                              | Endkonzentration | Menge/l |
|------------------------------------|------------------|---------|
| Ethanol                            | 20 % (v/v)       | 200 ml  |
| 86%iges Glycerin (w/v)             | 10 % (v/v)       | 117 ml  |
| ad 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest |                  |         |

Die Gele wurden 2 x 15 min in Fixierungslösung inkubiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation in Sensitivierungslösung. Danach wurden die Gele 3 x je 5 min in H<sub>2</sub>O bidest gewaschen. Nach 20 minütiger Inkubation in Silbernitrat-Lösung wurden die Gele erneut gewaschen (2 x je 1 min in H<sub>2</sub>O bidest), und dann 5 bis 10 min in Entwicklungslösung gelegt. Anschliessend wurden sie 10 min in Stopp-Lösung inkubiert und dann 3 x je 5 min in H<sub>2</sub>O bidest gewaschen. Das Trocknen erfolgte für mindestens 30 min in der Geltrockner-Lösung. Die trockenen Gele wurden in Folie eingeschweißt. Die Auswertung erfolgte visuell. Es wurde nach Proteinen gesucht, deren Expressionsprofil sich zellzyklusabhängig verändert. Auf diese Weise konnten keine potentiell positiven Proteine detektiert werden, da die Gel zu Gel Unterschiede in der Färbung zu groß waren.

**3.4.4.5. Analyse und Auswertung der 2D-Gele**

Die vierzehn 2D-Gele wurden mit dem Typhoon™ *Variable Mode Imager* (GE Healthcare, München) gescannt. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte bei: Cy3 = 550 nm, Cy5 = 650 nm und Cy2 = 490 nm (Cy = Cyanin). Von jedem Gel wurde so ein Multikanalbild erzeugt, d. h. es entstanden pro Gel 3 Bilder.

Für die Auswertung der Gele bzw. der 42 Bilder wurde die DeCyder 2D-Software, Version 6.5.14 (GE Healthcare, München) verwendet. Die Bilder wurden in die Datenbank eingelagert. Die Detektion und der Vergleich der Spots erfolgten automatisch. Als Richtwerte für die Detektion galten folgende Bedingungen: 1) Bereich  $\geq 250$ , 2) Volumen  $\geq 20000$ , 3) Höhe der Peaks  $\geq 60$ . Das Standardgel, auf dem die meisten Proteine/Artefakte gefunden wurden, wurde automatisch als Mastergel festgelegt. Über den auf allen Gelen aufgetragenen Standard (Cy2-

markiert) erfolgte die Normalisierung aller Proteinspots. Der BVA (*Biological Variation Analysis*)-Modus konnte für den quantitativen Vergleich eines Proteins auf allen Gelen verwendet werden. Allerdings wurde das Erscheinen eines Proteins über alle Gele für jeden Zeitpunkt nur graphisch dargestellt. Diese Werte konnten nicht exportiert werden. Tabellarisch konnten nur 2 Zustände verglichen werden, z. B. Zeitpunkt null Stunden und zwei Stunden. Angegeben wurden dann die normierten linearen Signalverhältnisse (Mittelwert der drei Einzelerperimente). Für die Auswertung wurden daher zum einen alle Zeitpunkte einmal auf null Stunden und einmal auf vier Stunden bezogen. Die Signalverhältnisse der Bezugspunkte (null Stunden zu null Stunden bzw. vier Stunden zu vier Stunden) sind somit eins. Die Tabellen wurden mit der Software Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) analysiert. Hierfür wurden jeweils die Signalverhältnisse (Ratios) und die T-Tests, die auf den Zeitpunkt null Stunden bezogen wurden, in einer Tabelle zusammengefasst, ebenso die auf den Zeitpunkt vier Stunden bezogen wurden. Um zu ermitteln ob ein Protein-Spot zu einem Zeitpunkt deutlich vom Mittelwert abwich, wurde der Maximal- und Minimalwert ermittelt. Die Voraussetzung hierfür war, dass ein T-Test für die Werte vorhanden sein musste. Von Werten mit negativen Vorzeichen wurden die Beträge der Kehrwerte ermittelt. Anschließend wurden die Verhältnisse aus Maximal- und Minimalwert gebildet. In der Auswertung verblieben 1044 Proteine bei den auf null Stunden bezogenen Daten und 1221 bei den auf vier Stunden bezogenen Daten. 841 Proteine fanden sich in beiden Auswertungen. Einen mindestens zweifachen Unterschied zwischen Maximal- und Minimalwert gab es für 270 Proteine. Da bei dieser Auswertung die Standardabweichungen nicht berücksichtigt wurden, wurden die potentiell regulierten Proteine in der DeCyder 2D-Software visuell überprüft. Es wurde zum einen kontrolliert, ob das *Matchen* eines Proteins auf allen Gelen richtig war. Zum anderen wurden die Graphiken der Proteine in Bezug auf die Standardabweichungen hin analysiert. Bei niedrigen Standardabweichungen und einer Hoch- oder Herunterregulation von mindestens zweifach wurde ein Protein als reguliert erachtet.

### 3.5. Zellbiologische Methoden

#### 3.5.1. Mikroskopie

Zellen wurden mittels Phasenkontrast- oder Fluoreszenzmikroskopie mit einer 400fachen oder 1000fachen Vergrößerung analysiert. Es wurde ein Standard-Mikroskop (Mikroskop Axioskop Standard 25, Carl Zeiss, Oberkochen), sowie ein Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop 40 Mikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen) verwendet. Zur Ermittlung der Zelldichte wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Bilder wurden mit der AxioCam MRm aufgenommen. Phasenkontrast und Fluoreszenzbilder wurden mit Adobe Photoshop 7.0 überlagert und bearbeitet. Die Wellenlängen für die Anregung und die Emission des kleinen löslichen grünfluoreszierenden Proteins waren 488 nm und 509 nm.

#### 3.5.2. Synchronisation

Die Synchronisationsmethode für *H. salinarum* wurde von U. Herrmann (Herrmann & Soppa, 2002) entwickelt und in dieser Arbeit optimiert.

Eine Einzelkolonie *H. salinarum* von einer Support-Festmediumplatte (nicht älter als 2 Wochen) wurde zum Beimpfen von 20 ml Support-Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben benutzt und die Zellen wurden zwei Tage bei 42°C und 250 Upm kultiviert. Die resultierende Kultur sollte sich in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase befinden (2 bis 6 x 10<sup>8</sup> Zellen / ml). Ein Aliquot wurde entnommen, in 20 ml Support-Medium überimpft und einen Tag bei 42°C und 250 Upm kultiviert. Zellen dieser Kultur wurden wie die zweite überimpft, so dass die Zelldichte nach einem Tag 2 bis 5 x 10<sup>8</sup> Zellen / ml betrug. Es wurde so garantiert, dass sich die Zellen für mehr als 40 Generationen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Für die eigentliche Synchronisation wurde die dritte Kultur mit 30 mM Aphidicolin (Serva, Heidelberg) versetzt (Endkonzentration 30 µM). Das Aphidicolin wurde in DMSO gelöst und in Aliquots zu 30 mM bei -80°C gelagert. Jedes Aliquot wurde nur einmal aufgetaut und handwarm zu den Zellen gegeben. Die Zelldichte und die durchschnittliche Zelllänge von 50 Zellen wurden alle 30 min ermittelt. Alle verwendeten Materialien (Kolben, Glaspipetten, Rotor etc.) wurden auf 42°C vorgewärmt.

Bei Erreichen einer durchschnittlichen Zelllänge von 5,7 µm (ca. 3,5 h) wurden die Zellen sedimentiert (4500 x g, 6 min) und schnell in 20 ml frischem Medium

resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei 42°C und 250 Upm wurden die Zellen erneut sedimentiert (4500 x g, 6 min) und schnell in 20 ml frischem Medium resuspendiert. Der Inhibitor war somit vollständig entfernt und die Zellen wuchsen synchron weiter. Die Zelldichte und die durchschnittliche Zelllänge wurden je nach Versuch alle 15 min oder alle 30 min ermittelt.

### **3.5.3. cAMP-Messungen**

Aus exponentiellen oder synchronen *H. salinarum* Kulturen wurden Aliquots mit jeweils  $1 \times 10^9$  Zellen entnommen und sedimentiert (18000 x g, 1 min). Das Sediment wurde zur Zelllyse schnell in 900 µl kaltem H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert. 100 µl 1 M NaCl wurden hinzugefügt und die Lösung wurde kräftig gemischt. Die Zelllyse und die Zugabe von NaCl erfolgten innerhalb von 30 sec, um den Abbau von cAMP zu vermeiden. Nach Zentrifugation (18000 x g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die cAMP-Messung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und je 100 µl wurden für die Konzentrationsbestimmungen mit dem „Direct cAMP Enzyme Immunoassay Kit“ eingesetzt. Die Detektion der cAMP-Konzentrationen erfolgte nach Herstellerangaben; Alle Proben wurden in Doppel-Bestimmung gemessen. Standard Proben und Kontrollen wurden bei jeder Messung mitbestimmt.

## **3.6. Mikroarray Analyse zur globalen Untersuchung zellzyklusabhängiger Transkriptomänderungen**

### **3.6.1. DNA-Mikroarray**

Die DNA-Mikroarrays von *H. salinarum* wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dieter Oesterhelt (MPI für Biochemie, Martinsried) erstellt. Jeder Mikroarray enthält genspezifische PCR-Produkte von mehr als 95 % der 2800 Gene, welche während des Genom-Sequenzierungs-Projekts der Oesterhelt Gruppe annotiert wurden. Die PCR-Produkte wurden wie beschrieben hergestellt und auf die beschichteten Objektträger aufgebracht (Lange *et al.*, 2007; Twellmeyer *et al.*, 2007; Zaigler *et al.*, 2003).

### 3.6.2. Globale zellzyklusabhängige Transkriptomanalyse

Drei *H. salinarum* Kulturen wurden wie in 3.5.2. beschrieben synchronisiert. Drei Kontrollkulturen wurden wie die synchronisierte Kultur behandelt, mit der Ausnahme, dass kein Aphidicolin hinzugegeben wurde. Zu zehn verschiedenen Zeitpunkten wurden aus allen Ansätzen Aliquots mit je  $9 \times 10^8$  Zellen isoliert. Die RNA wurde wie in 3.3.12. beschrieben isoliert. Die RNA der Kontrollkultur eines jeden Einzelexperimentes wurde vereinigt. Der Zellzyklus einer synchronisierte Kultur war um dreißig Minuten verzögert, im Gegensatz zu den anderen beiden, was anhand der Zelldichte, der Zelllänge und den Einschnürungen der Zellen festgestellt wurde. Die Zeiten wurden korrigiert, was zur Folge hatte, dass a) der fünf Stunden Zeitpunkt nur mit Proben aus zwei Experimenten analysiert werden konnte und dass b) ein elfter Zeitpunkt (nach 30 min) ohne Replikate generiert wurde, an dem tatsächlich keine Proben genommen wurden.

### 3.6.3. cDNA-Synthese und Hybridisierung

#### Reagenzien

*Low-T-dNTP-Mix* (5mM dATP, dCTP, dGTP, 2mM dTTP)

1 mM Cy5-dUTP

1 mM Cy3-dUTP

Hexamer-Mix (1mg / ml)

*Promega M-MLV Reverse Transcriptase Rnase H Minus, Point Mutant* (200 U /  $\mu$ l)

1 M NaOH

1 M Tris/HCl, pH = 7,5

0,5 M EDTAx2H<sub>2</sub>O, pH = 7,9

Hefe tRNA (4 mg / ml)

#### Ansatz

15  $\mu$ g RNA + RNase freies dH<sub>2</sub>O (insgesamt= 22,9  $\mu$ l Volumen)

0,6  $\mu$ l Hexamer-Mix

4  $\mu$ l *Low-T-dNTP-Mix*

2,5  $\mu$ l 1mM Cy5-dUTP bzw. 1mM Cy3-dUTP

8  $\mu$ l 5 x Puffer Promega

38  $\mu$ l

Die Ansätze wurden 5 min bei 65°C und anschliessend, zur Anlagerung der Hexamere, 2 min auf Eis inkubiert. Sie wurden mit je 2 µl Reverser Transkriptase versetzt und 1 h bei 42°C inkubiert. Es wurde je 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt und 1 h bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von je 5 µl 0,5 M EDTA (pH = 7,9) und 10 µl 1 M NaOH wurde das Enzym 1 h bei 65°C inaktiviert, die Proben 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt und mit je 25 µl 1 M Tris/HCl (pH = 7,5) neutralisiert. Die korrespondierenden mit Cy3-dUTP und Cy5-dUTP markierten cDNAs wurden vereinigt und auf 500 µl Gesamtvolumen mit DMPC behandeltem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ansatz wurde in einem Microcon YM-30 (Millipore/Amicon) auf ca. 50 µl konzentriert. Nach Zugabe von 450 µl mit DMPC behandeltem H<sub>2</sub>O erfolgte eine Konzentrierung auf 22 µl Endvolumen. Die Probe wurde mit 1 µl Hefe tRNA (4 mg / ml) versetzt und konnte hybridisiert oder bei -20°C gelagert werden. Für die Hybridisierung des Ansatzes auf einen Mikroarray wurde dieser in einer auf 50°C vorgewärmten Lösung (10 mg / ml BSA; 3,5 x SSC; 0,1 % SDS(v/v)) 25 min bei 50°C vorhybridisiert. Der Mikroarray wurde 30 sec mit H<sub>2</sub>O bidest und 30 sec mit Isopropanol gewaschen. Zum Trocknen wurde der Array 5 min bei 50 x g zentrifugiert. Die mit den Farbstoffen markierte Probe (23 µl) wurde mit 4,8 µl 20 x SSC und 1,6 µl 50 x Denhardt`s-Lösung versetzt (siehe 3.3.17. für 20 x SSC und 3.3.18. für Denhardt`s-Lösung), 2 min bei 98°C und dann bei 45°C inkubiert. Nach Zugabe von 2,6 µl 1%igem SDS wurde die Lösung auf den Mikroarray aufgebracht und luftblasenfrei mit einem Deckgläschen (Hybri-Slip, Sigma Aldrich, Taufkirchen) bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 68°C in einer Hybridisierungskammer in einem Brutschrank. Das Deckglas wurde durch Eintauchen in Waschpuffer A (0,5 x SSC; 0,01 % SDS (v/v)) gelöst. Der Mikroarray wurde in einen mit 250 ml Waschpuffer A befüllten Glasbehälter gestellt und 5 min gewaschen. Ein zweiter Waschschrift erfolgte für 5 min in 250 ml Waschpuffer B (0,06 x SSC). Beide Waschschrift wurden wiederholt. Zum Trocknen des Mikroarrays wurde dieser zentrifugiert (5 min, 50 x g).

#### **3.6.4. Detektion und Auswertung der Mikroarrays**

Die Mikroarrays wurden mit dem Laserscanner GenePix 4000A (Axon Instruments, Union City, CA, USA) gescannt. Die Laserintensitäten (*PMT-Voltage*) wurden so gewählt, dass das Signalverhältnis der durch Cy3 (Anregung bei Licht einer Wellenlänge von 532 nm) und Cy5 (Anregung bei Licht einer Wellenlänge von 635 nm) erzeugten Signale über den gesamten gescannten Bereich 1 ergab.

Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der Software GenePixPro 3.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Nach der automatischen Signaldetektion wurden alle Datenpunkte visuell überprüft und Signale mit schwachen Intensitäten sowie Signale, die durch Fluoreszenz-Artefakte erzeugt bzw. überlagert wurden, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Normalisierung und Filterung der Daten erfolgte mit der Software Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA). Alle Spots mit einem Signal zu Hintergrund Verhältnis von weniger als drei für die rote oder grüne Fluoreszenz wurden ausgeschlossen, ebenso alle Signale, die für eine Farbe eine geringere Fluoreszenzintensität als 1000 (willkürliche Einheit) besaßen. Der Durchschnitt aller rotgrünen Signalverhältnisse (Ratio of Medians) wurde auf 1 normiert, indem die Rotfluoreszenz, bzw. die nicht normierte Ratio durch den Mittelwert der Ratio of Medians geteilt wurde. Die 30 resultierenden Tabellen wurden in die Mikroarray Analyse Software Genespring 3.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) geladen. Von jedem einzelnen Transkript wurde eine Zeitreihe der mittleren normierten Ratio of Medians mit Standardabweichungen erstellt. Aus der weiteren Auswertung wurden alle Gene ausgeschlossen, für die es zu weniger als sieben Zeitpunkten Signale gab. Als nächstes wurden alle Gene ausgeschlossen, deren Signale zu keinem Zeitpunkte um mehr als 30 % vom Durchschnitt (Cy3 zu Cy5 Signal Intensitätsverhältnis zwischen 0,7 und 1,3) abwich. Ein clustern der restlichen Gene mit der Software war nur begrenzt möglich, daher wurden die Transkriptlevel-Profile der Gene visuell ausgewertet. Kriterien für die Identifizierung regulierter Gene waren eine zweifache Hoch- oder Herunterregulation zu mindestens einem Zeitpunkt. Die Rohdaten sowie die normalisierten Daten wurden bei der Datenbank „*Array Express*“ (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) hinterlegt. Die Eintrittsnummer ist E-MEXP-1033. Das Experiment hat den Namen „JWGU Soppa Halobacterium salinarum cell cycle regulation“.

---

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Synchronisation von *H. salinarum* Kulturen

#### 4.1.1. Optimierung der Synchronisation

Für die Untersuchung zellzyklusabhängiger Prozesse in *H. salinarum* wurde das Protokoll zur Synchronisation der Zellen (Herrmann & Soppa, 2002) optimiert. In der von U. Herrmann beschriebenen Methode erfolgte die Inkubation mit dem Replikaseinhibitor Aphidicolin für vier Stunden. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurde eine synchrone Zellkultur erhalten. Der Prozentsatz der Zellen, die sich innerhalb von einer Stunde teilten, belief sich auf etwa 40 %, was unzureichend für die Analyse von zellzyklusabhängigen Prozessen erschien. Verschiedene Schritte der Methode wurden optimiert. Die wichtigsten Punkte waren: 1) Die Anzahl von Generationen, in denen sich die Zellen vor der Synchronisation in der exponentiellen Phase befanden, wurde erhöht (Die Zellen wuchsen für mehr als vierzig Generationen exponentiell), 2) Die Aphidicolin-Behandlung erfolgte nicht über einen festgesetzten Zeitraum, sondern wurde beendet, wenn die Zellen eine durchschnittliche Zelllänge von 5,7  $\mu\text{m}$  erreichten, und 3) Die verwendete Festmediumplatte, von der die Einzelkolonie für die erste Inokulation genommen wurde, war höchstens zwei Wochen alt.

Eine optimierte Synchronisation ist in Abb. 6 graphisch dargestellt. Die durchschnittliche Zelllänge von 50 Zellen sowie die Zelldichte der Kultur während (0 h bis 3,5 h) und nach der Behandlung mit dem Replikaseinhibitor (3,5 h bis 8 h) sind gezeigt. Die Inkubation mit Aphidicolin führt zu einer sofortigen Inhibierung der Zellteilung, während die Zellen länger werden. Das Blockieren des Zellzyklusses ist reversibel. Für die Synchronisation wurden exponentielle Zellen bis zu einer durchschnittlichen Zelllänge von 5,7  $\mu\text{m}$  mit Aphidicolin inkubiert. Dies dauerte zwischen 3 Stunden 15 Minuten und 3 Stunden 50 Minuten. Während dieser Zeit änderte sich die Zelldichte nicht. Nach dem Entfernen des Inhibitors (in diesem Versuch bei 3,5 h) nahm die durchschnittliche Zelllänge für weitere zwei Stunden zu und erreichte ca. 6,8  $\mu\text{m}$ , was in etwa einer Verdopplung der Zelllänge im Vergleich zu unbehandelten exponentiell wachsenden Zellen entspricht, während die Zelldichte weiterhin konstant blieb. In der folgenden Stunde (5,5 h bis 6,5 h) konnte eine Abnahme der durchschnittlichen Zelllänge sowie eine Zunahme der Zelldichte beobachtet werden.

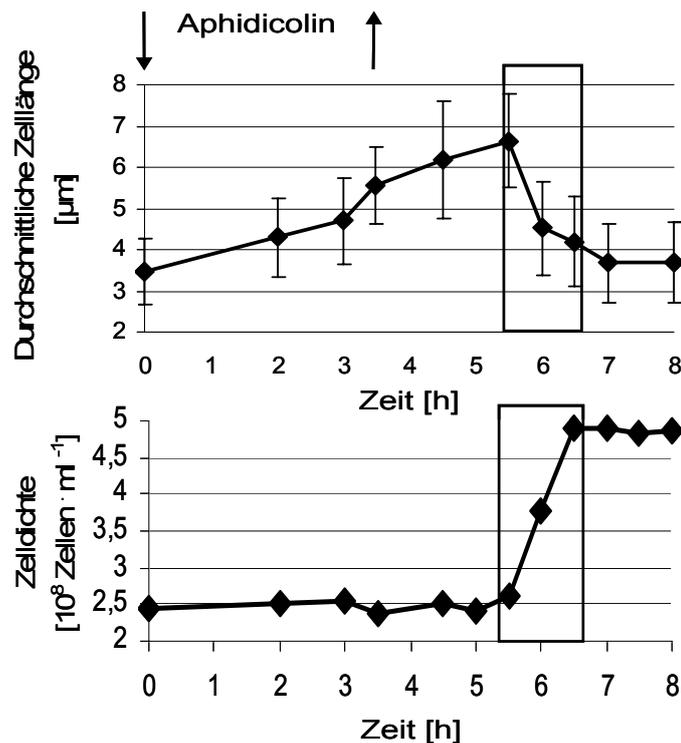


Abb. 6: **Optimierte Synchronisation von *H. salinarum* Kulturen.** Die Zelllängen von 50 Zellen wurden mikroskopisch mit einem Okularmikrometer bestimmt und die durchschnittliche Zelllänge sowie deren Standardabweichung errechnet. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zeitpunkte der Inhibitorzugabe und der -abnahme sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Phase der Zellteilung ist durch die Box markiert.

Nahezu 100 % der Zellen teilten sich innerhalb dieser Stunde, was einem Viertel der Generationszeit exponentiell wachsender Zellen entspricht. Etwa 30 min vor und auch in der Zellteilungsphase konnten viele Zellen mit Einschnürungen gesehen werden, die zu den anderen Zeitpunkten nicht vorhanden waren. In den folgenden 1,5 h veränderten sich weder die Zelldichte noch die durchschnittliche Zelllänge. Auch waren keine Zellen mit Einschnürungen zu detektieren. Somit konnte die Synchronität von *H. salinarum* von 40 % auf nahezu 100 % gesteigert werden.

#### 4.1.2. Analyse von zwei Zellzyklen in synchronisierten *H. salinarum* Kulturen

Bei Synchronisationen in Flüssigkulturen zeigt sich häufig, dass die Zellen für mehrere Teilungen synchron bleiben, allerdings verringert sich mit jeder Teilung die Höhe der Synchronität (Cho *et al.*, 1998; Dwek *et al.*, 1980). In synchronisierten *H. salinarum* Kulturen wurde bislang nur eine Zellteilung analysiert (Herrmann & Soppa, 2002). Durch die Optimierung der Synchronisationsmethode wurde vermutet, dass die Zellen sich für mehrere

Zellzyklen synchron verhalten. Aufgrund der Dauer des Experimentes wurden zwei Zellteilungen charakterisiert.

Die erste Zellteilung begann, wie auch schon Abb. 6 zeigt, zwei Stunden nach Entfernung des Inhibitors und dauerte eine Stunde, was anhand der Abnahme der durchschnittlichen Zelllänge sowie der Zunahme der Zelldichte festgestellt werden konnte. Während der Teilungsphase (5,5 h - 6,5 h) hatten die meisten Zellen sichtbare Einschnürungen (Abb. 7). In den nachfolgenden vier Stunden blieb die Zelldichte konstant, während die durchschnittliche Zelllänge etwas anstieg. Aufgrund der hohen Varianz konnte diese Beobachtung jedoch nicht signifikant verifiziert werden. Vier Stunden nach dem Beginn der ersten Zellteilung (ab 9,5 h), was einer Generation von exponentiell wachsenden Zellen entspricht, konnte in weniger als einer Stunde eine Zunahme der Zelldichte um 50 % festgestellt werden. Der drastischste Anstieg der Zelldichte wurde während eines Zeitraums von 30 Minuten beobachtet (9,5 h bis 10 h). In den nachfolgenden 2,5 h nahm die Zelldichte nur wenig zu (10 h bis 12 h).

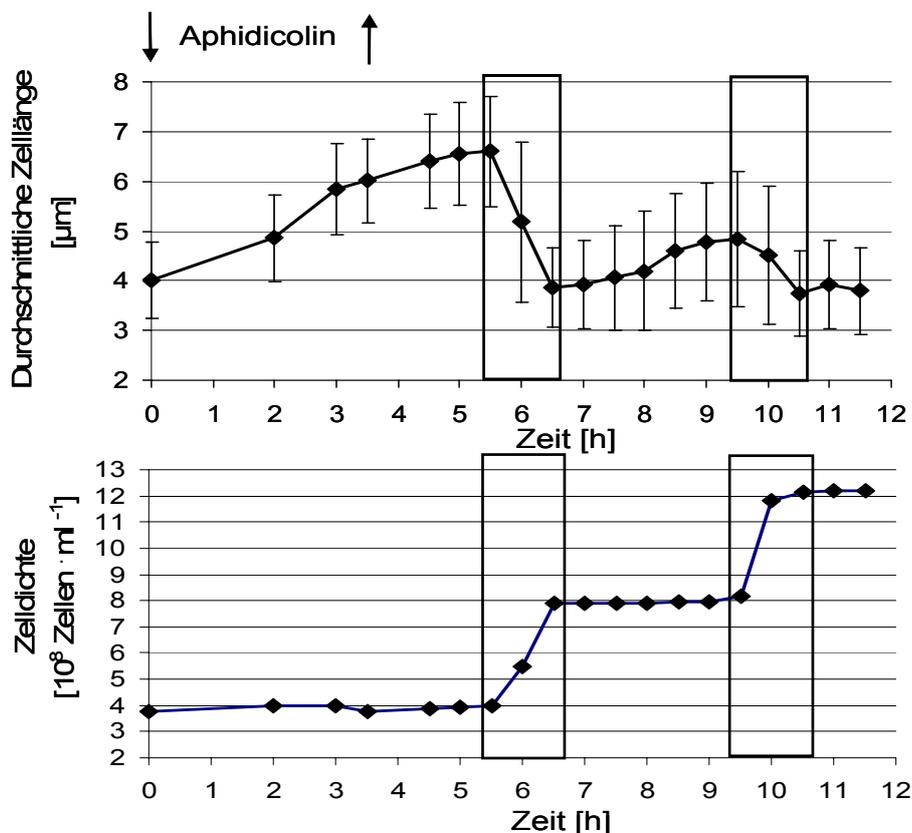


Abb. 7: Analyse von zwei aufeinanderfolgenden Zellzyklen in synchronen *H. salinarum* Kulturen. Die Zelllängen von 50 Zellen wurden mikroskopisch mit einem Okularmikrometer bestimmt und die durchschnittliche Zelllänge sowie deren Standardabweichung errechnet. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zeitpunkte der Inhibitorzugabe und -abnahme sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Phasen der Zellteilungen sind durch Boxen markiert.

Die durchschnittliche Zelllänge nahm während der Teilungsphase ab. Eine hohe Anzahl sichtbarer Einschnürungen der Zellen konnte, wie auch schon bei der ersten Zellteilung, kurz vor und während der Teilungsphase beobachtet werden. Wiederholungen mit unabhängigen Kulturen bestätigten die zweite synchrone Teilung. Die Ergebnisse sprechen für ein hohes Maß an Synchronität der Kulturen, da die Zellen sich zweimal jeweils in einer kurzen Zeit, verglichen mit der Generationszeit, synchron teilen. Aufgrund der Zeitintensivität wurden keine weiteren Teilungen analysiert; Es ist jedoch davon auszugehen, dass es noch ein bis zwei weitere synchrone Teilungen gibt. Da die Synchronität wie erwartet im ersten Zyklus am höchsten war, wurde dieser in den Folgeversuchen näher analysiert.

## **4.2. Globale Transkriptomanalyse synchroner Zellkulturen**

### **4.2.1. Zellzyklusabhängige Transkriptomänderungen**

Zur Charakterisierung zellzyklusabhängiger Transkriptomänderungen wurden DNA-Mikroarray Analysen durchgeführt (3.6.1 - 3.6.4.). *H. salinarum* Kulturen wurden synchronisiert und nach dem Entfernen des Inhibitors wurden zu zehn Zeitpunkten Proben entnommen und die RNA isoliert. Eine Kontrollkultur wurde wie die synchronisierte Kultur behandelt, mit der Ausnahme, dass zu der Kultur kein Aphidicolin zugegeben wurde. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die RNA der Kontrollkulturen eines jeden Einzelerperimentes wurde vereinigt. Nach cDNA-Synthese und Hybridisierung wurden die Mikroarrays gescannt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Microsoft Excel und Genespring 3.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA). Für 2457 Gene gab es Signale zu mindestens sieben Zeitpunkten. Die Signale von 661 dieser Gene variierten zu keinem Zeitpunkt um mehr als 30 % vom Durchschnitt und zeigten somit keine zellzyklusabhängige Regulation der Transkription. Die restlichen Gene (1796) wurden visuell analysiert, da ein Clustern mit Genespring 3.0 nur begrenzt möglich war. Ein Transkript wurde als reguliert betrachtet, wenn es zu mindestens einem Zeitpunkt wenigstens eine zweifache Abweichung vom durchschnittlichen Level zeigte. Überraschenderweise zeigten nur 87 der 1796 Gene eine zellzyklusabhängige Regulation der Transkriptmenge (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Gene mit zellzyklusabhängiger Regulation der Transkriptmenge**

Tabellarisch dargestellt sind die 87 zellzyklusabhängig regulierten Gene von *H. salinarum* (Nr. 1-87). Sie wurden in sieben Cluster coregulierter Gene gruppiert. Die meisten Gene sind in Operons oder funktionellen Genclustern angeordnet (schwarzer Strich). Der Genname und die Funktionsklasse sind gezeigt (nach der Datenbank für Archaea und andere Prokarya: Halolex).

| Nr. | Cluster | Bezeichnung | g.C./O* | Gen Name  | Funktionsklasse                 |
|-----|---------|-------------|---------|---|---------------------------------|
| 1   | 1       | OE2697R     |         | probable coenzyme PQQ synthesis protein E   | coenzyme metabolism             |
| 2   | 1       | OE3763F     |         | glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain A  | central intermediary metabolism |
| 3   | 1       | OE3764F     |         | glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain B  | central intermediary metabolism |
| 4   | 1       | OE3765F     |         | glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain C  | central intermediary metabolism |
| 5   | 1       | OE4345R     |         | probable ribonucleoside-diphosphate reductase   | nucleotide metabolism           |
| 6   | 2       | OE1806R     |         | probable periplasmic protein  | cell envelope                   |
| 7   | 2       | OE2844R     |         | transcription regulator homolog / <i>trkA</i> C-terminal domain                             | gene regulation                 |
| 8   | 2       | OE3308F     |         | malate dehydrogenase  | central intermediary metabolism |
| 9   | 2       | OE3759R     |         | hypothetical protein  | hypothetical protein            |
| 10  | 2       | OE3922R     |         | glutamate-ammonia ligase (EC 6.3.1.2)   | amino acid metabolism           |
| 11  | 2       | OE5212F     |         | SMC-like protein <i>sph1</i>  | cellular processes              |
| 12  | 3       | OE1620R     |         | phosphoribosylglycinamide formyltransferase   | nucleotide metabolism           |
| 13  | 3       | OE1951F     |         | phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (EC 4.1.1.21)                                      | nucleotide metabolism           |
| 14  | 3       | OE1952F     |         | phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (EC 4.1.1.21)                                      | nucleotide metabolism           |
| 15  | 3       | OE2274R     |         | phosphoribosylformylglycinamide synthase (EC 6.3.5.3)                                       | nucleotide metabolism           |
| 16  | 3       | OE2864F     |         | phosphoribosylamine--glycine ligase (EC 6.3.4.13)   | nucleotide metabolism           |
| 17  | 3       | OE3017R     |         | UDP-sugar hydrolase (EC 3.6.1.45) / 5'-nucleotidase   | nucleotide metabolism           |
| 18  | 3       | OE3139R     |         | amidophosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.14)  | nucleotide metabolism           |
| 19  | 3       | OE3724F     |         | phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase                                     | nucleotide metabolism           |
| 20  | 4       | OE1500R     |         | pyruvate, water dikinase (EC 2.7.9.2) (PEP synthase)  | central intermediary metabolism |
| 21  | 4       | OE2019F     |         | fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) 1  | central intermediary metabolism |
| 22  | 4       | OE4416R     |         | conserved protein   | conserved hypothetical protein  |
| 23  | 4       | OE4418R     |         | hypothetical protein  | hypothetical protein            |
| 24  | 4       | OE4419R     |         | argininosuccinate lyase (EC 4.3.2.1)  | amino acid metabolism           |
| 25  | 4       | OE6026R     |         | transcription initiation factor TFB   | transcription                   |
| 26  | 5       | OE1058R     |         | probable transposase (ISH1)   | transposases/ISH proteins       |
| 27  | 5       | OE1270F     |         | glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.-)  | amino acid metabolism           |
| 28  | 5       | OE1271F     |         | probable fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.-)  | lipid metabolism                |
| 29  | 5       | OE1352F     |         | hypothetical protein  | hypothetical protein            |
| 30  | 5       | OE1353F     |         | hypothetical protein  | hypothetical protein            |
| 31  | 5       | OE1356F     |         | conserved hypothetical protein  | conserved hypothetical protein  |
| 32  | 5       | OE1447R     |         | conserved hypothetical protein  | conserved hypothetical protein  |
| 33  | 5       | OE1448R     |         | conserved hypothetical protein  | conserved hypothetical protein  |
| 34  | 5       | OE1775R     |         | hypothetical protein  | hypothetical protein            |
| 35  | 5       | OE2046F     |         | conserved hypothetical protein  | conserved hypothetical protein  |
| 36  | 5       | OE2492F     |         | conserved protein   | conserved hypothetical protein  |
| 37  | 5       | OE3168R     |         | pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase  | miscellaneous                   |
| 38  | 5       | OE3554F     |         | carbamoyl-phosphate synthase  | amino acid metabolism           |
| 39  | 5       | OE3612R     |         | chemotactic signal transduction system<br>periplasmic substrate-binding protein <i>basB</i> | signal transduction             |
| 40  | 5       | OE3653R     |         | phosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.1)  | central intermediary metabolism |
| 41  | 5       | OE3654R     |         | hypothetical protein  | hypothetical protein            |
| 42  | 5       | OE3925R     |         | thermosome beta chain   | cellular processes              |
| 43  | 5       | OE4122R     |         | thermosome alpha chain  | cellular processes              |
| 44  | 5       | OE4159F     |         | adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)   | amino acid metabolism           |
| 45  | 5       | OE4300R     |         | hypothetical protein  | hypothetical protein            |
| 46  | 5       | OE4301R     |         | ABC-type transport system ATP-binding protein   | small molecule transport        |
| 47  | 5       | OE4302R     |         | ABC-type transport system ATP-binding protein   | small molecule transport        |
| 48  | 5       | OE4303R     |         | ABC-type transport system permease protein  | small molecule transport        |
| 49  | 5       | OE4304R     |         | ABC-type transport system permease protein  | small molecule transport        |

|    |   |         |   |                                    |
|----|---|---------|---|------------------------------------|
| 50 | 5 | OE4311F | ABC-type transport system substrate-binding protein     | small molecule transport           |
| 51 | 5 | OE4316F | ABC-type transport system permease protein              | small molecule transport           |
| 52 | 5 | OE4318F | ABC-type transport system ATP-binding protein           | small molecule transport           |
| 53 | 5 | OE4408F | phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)            | amino acid metabolism              |
| 54 | 5 | OE4410F | acyl-CoA thioester hydrolase homolog                    | conserved hypothetical protein     |
| 55 | 5 | OE4550F | ABC-type transport system ATP-binding protein           | small molecule transport           |
| 56 | 5 | OE4552F | ABC-type transport system permease protein              | small molecule transport           |
| 57 | 5 | OE4555F | ABC-type transport system permease protein              | small molecule transport           |
| 58 | 5 | OE4676F | hypothetical protein                                    | hypothetical protein               |
| 59 | 5 | OE4688F | conserved protein                                       | conserved hypothetical protein     |
| 60 | 6 | OE1794R | conserved hypothetical protein                          | conserved hypothetical protein     |
| 61 | 6 | OE1797R | transcription regulator <i>sirR</i>                     | gene regulation                    |
| 62 | 7 | OE1674R | probable phosphate transport operon protein <i>phoU</i> | transport                          |
| 63 | 7 | OE1675R | ABC-type transport system ATP-binding protein           | small molecule transport           |
| 64 | 7 | OE1676R | ABC-type transport system permease protein              | small molecule transport           |
| 65 | 7 | OE1678R | ABC-type transport system permease protein              | small molecule transport           |
| 66 | 7 | OE1679R | ABC-type transport system periplasmic binding protein   | small molecule transport           |
| 67 | 7 | OE2367F | aldehyde dehydrogenase                                  | miscellaneous                      |
| 68 | 7 | OE2458R | IMP dehydrogenase (EC 1.1.1.205)                        | nucleotide metabolism              |
| 69 | 7 | OE2924R | conserved hypothetical protein                          | conserved hypothetical protein     |
| 70 | 7 | OE3571R | GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) (EC 6.3.5.2)       | nucleotide metabolism              |
| 71 | 7 | OE3572R | CTP synthase (EC 6.3.4.2)                               | nucleotide metabolism              |
| 72 | 7 | OE4462F | conserved hypothetical protein                          | conserved hypothetical protein     |
| 73 | 7 | OE4466R | DNA repair protein                                      | replication, repair, recombination |
| 74 | 7 | OE5160F | glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6)                     | miscellaneous                      |
| 75 | 7 | OE5204R | arginine ornithine exchanger                            | small molecule transport           |
| 76 | 7 | OE5205R | ornithine carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3)             | amino acid metabolism              |
| 77 | 7 | OE5206R | carbamate kinase (EC 2.7.2.2)                           | amino acid metabolism              |
| 78 | 7 | OE5208R | arginine deiminase (EC 3.5.3.6)                         | amino acid metabolism              |
| 79 |   | OE1249R | conserved hypothetical protein                          | conserved hypothetical protein     |
| 80 |   | OE1302F | lipoate-protein ligase homolog                          | miscellaneous                      |
| 81 |   | OE2703F | probable copper-containing oxidoreductase               | miscellaneous                      |
| 82 |   | OE2973F | conserved hypothetical protein                          | conserved hypothetical protein     |
| 83 |   | OE3337F | insertion element protein (ISH2)                        | transposases/ISH proteins          |
| 84 |   | OE4077F | hypothetical protein                                    | hypothetical protein               |
| 85 |   | OE4380F | cell division control protein <i>cdc6</i> homolog       | cellular processes                 |
| 86 |   | OE7065F | cytochrome d ubiquinol oxidase (EC 1.10.3.-) chain I    | energy metabolism                  |
| 87 |   | OE7066F | cytochrome d ubiquinol oxidase (EC 1.10.3.-) chain II   | energy metabolism                  |

g.C./O\* = Gen Cluster oder Operon

Die meisten der regulierten Gene sind auf dem Hauptchromosom lokalisiert. Ein Beispiel für Gene, die auf einem der vier Plasmide zu finden sind, ist das Arginin Gencluster (OE5204R - OE5208R) auf *pHS3*. Mehr als die Hälfte der regulierten Gene sind in Operons oder funktionellen Genclustern angeordnet. 22 Gene sind als „hypothetisch“ oder „konserviert hypothetisch“ annotiert. Da diese Gene transkribiert werden und eine Funktion im Zellzyklus haben, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um echte Gene handelt.

#### 4.2.2. Gruppierung der regulierten Gene

Die 87 transkriptionsregulierten Gene konnten, basierend auf ihren zellzyklusspezifischen Transkriptprofilen, in sieben Cluster coregulierter Gene gruppiert werden. Da der Grad der Induktion bzw. der Repression der Transkripte innerhalb eines Clusters unterschiedlich war, wurde der jeweils höchste Wert eines jeden Gens zur Normalisierung (= 100 %) verwendet, bevor die Durchschnittswerte und Standardabweichungen ermittelt wurden. Die durchschnittlichen Regulationsprofile der sieben Cluster sind in Abb. 8. dargestellt. Das Entfernen des Replikaseinhibitors wurde in dieser und in den folgenden Abbildungen als Zeitpunkt null Stunden bzw. Minuten definiert. Die Box markiert die Phase der Zellteilung. Cluster 1, 2 und 4 enthalten Transkripte, die vorübergehend induziert werden, und dann auf ihr ursprüngliches Level zurückgehen. Die fünf Transkripte des 1. Clusters werden vor der Zellteilung induziert. Bei den sechs Transkripten des 2. Clusters erfolgt eine Induktion während der Zellteilung. Die sechs Gene des 4. Clusters werden nach der Teilungsphase induziert. Cluster 3-Transkripte (acht) zeigen bei null Stunden einen hohen Grad der Induktion, werden kurzfristig reprimiert, um während bzw. nach der Zellteilung wieder induziert zu werden. Nach erneuter Repression erlangen sie nach fünf Stunden wieder den gleichen Wert wie bei null Stunden. Cluster 5 schließt vierunddreißig Transkripte ein, deren Regulationslevel in den ersten eineinhalb Stunden nach Entfernung des Inhibitors konstant bleibt und dann ansteigt. Das 6. Cluster besteht aus nur zwei Transkripten, die die höchsten Induktionsraten vor und nach der Zellteilung aufweisen, während sie bei der Teilung stark reprimiert werden. Die Transkriptmenge der Gene des 7. Clusters (siebzehn) sinkt im Verlauf des Experimentes kontinuierlich. Neun Gene zeigten Expressionsprofile, die in keines der sieben Cluster eingeordnet werden konnten (Tabelle 5; Nr. 79 - 87).

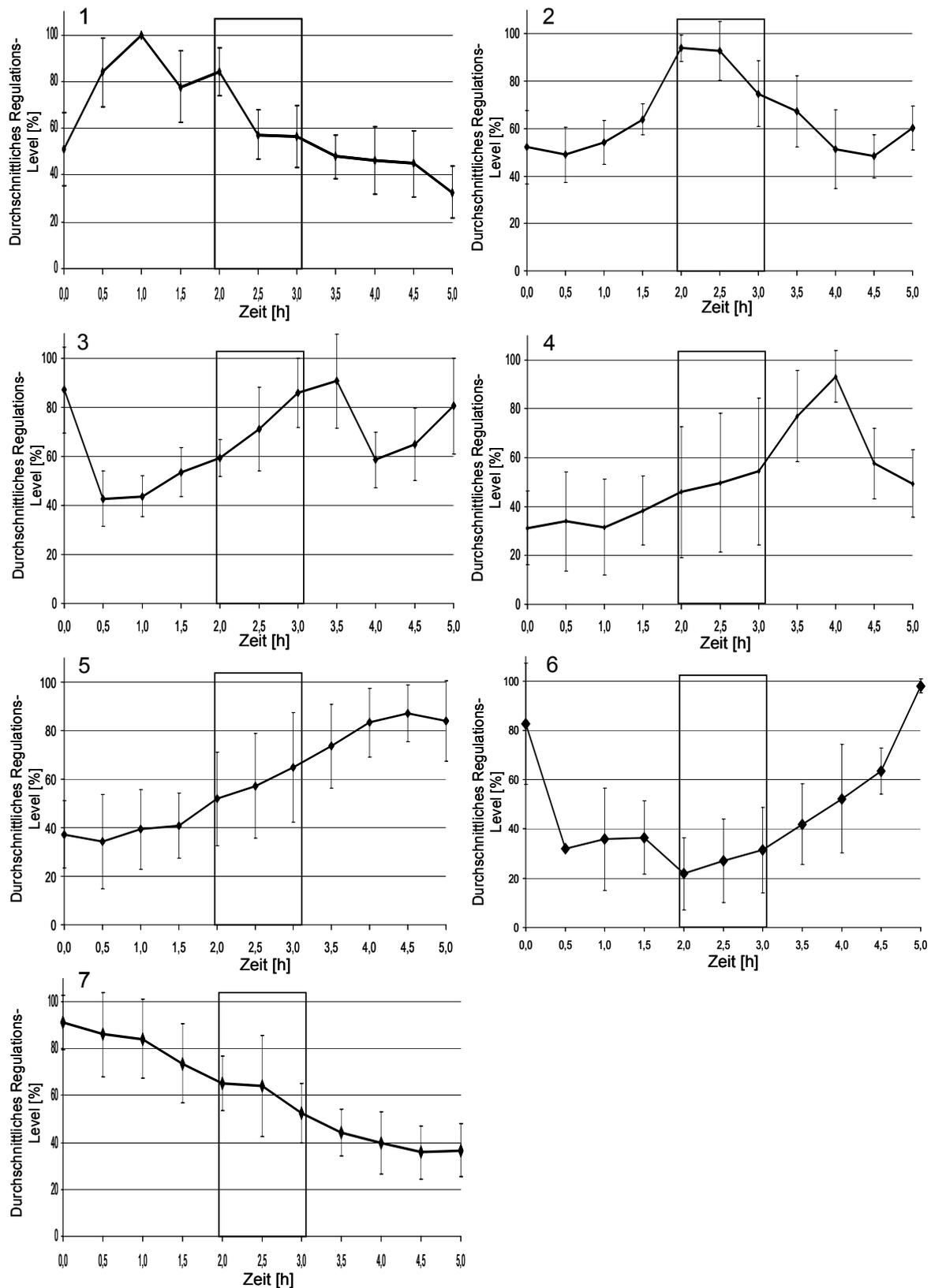


Abb. 8: **Durchschnittliche Transkriptmengen-Profile von sieben Clustern coregulierter Gene.** Die zellzyklusregulierten Transkripte konnten in sieben Cluster coregulierter Gene gruppiert werden. Gezeigt sind die durchschnittlichen Transkriptprofile aller sieben Cluster und die Standardabweichungen. Gene, die das gleiche Profil zeigen, sind meist nicht gleich stark induziert bzw. reprimiert. Die Profile aller Gene wurden jeweils auf ihren höchsten Wert normalisiert (= 100 %), bevor die Durchschnittswerte aller Gene eines Clusters ermittelt wurden. Die Phase der Zellteilung ist jeweils durch die Box markiert.

### 4.2.3. Verifizierung der zellzyklusabhängig regulierten Transkriptmengen

Zehn zellzyklusregulierte Gene, die alle unterschiedlichen Transkriptionsprofile repräsentieren, wie auch fünf nicht regulierte Kontrollgene, wurden zufällig ausgewählt, um die Ergebnisse der DNA-Mikroarray Analyse mit einer unabhängigen Methode zu verifizieren. Zu acht Zeitpunkten wurden Aliquots aus synchronen *H. salinarum* Kulturen für die RNA Isolierung entnommen. Es wurden 15 Northern Blot Analysen mit genspezifischen Sonden (siehe Tabelle 2) durchgeführt. Das Ergebnis (Abb. 9, Seite 77 bis 79) ist für jedes Transkript im Vergleich zu dem zugehörigen Transkriptprofil der Mikroarrays dargestellt (Durchschnitt von drei biologischen Replikaten; linke Seite der Abbildungen). In nahezu allen Fällen entsprechen die Resultate der Northern Blot Analysen denen der Mikroarray Analysen, was die Aussagekraft der Versuche unterstreicht. Als Ladekontrolle für die RNA Agarosegele ist die 23S rRNA abgebildet. Die Induktion bzw. Repression der mRNA-Menge ist in allen Northern Blot Analysen deutlich zu erkennen. Ein Beispiel für ein zu Cluster 1 gehörigem Gen ist OE4345R (Tbl. 5: Nr. 5; Seite 79, erstes Bild von oben). Die Induktion erfolgte eine Stunde nach Entfernung des Inhibitors für etwas weniger als eine Stunde. Danach sinkt die Transkriptmenge. Das Transkript des *sph1* Gens (Nr. 11; OE5212F; Cluster 2; Seite 77, erstes Bild von oben) sowie das Protein wurden bereits in der Arbeit von U. Herrmann als zellzyklusreguliert identifiziert (Herrmann & Soppa, 2002). Die Induktion erfolgte ausschließlich während der Zellteilung. In der Arbeit wurden noch zwei weitere Gene als reguliert betrachtet, die sich in dieser Arbeit als nicht reguliert herausstellten (OE5211F, Seite 77, letztes Bild; OE3356F). Gene, die zu dem 4. Cluster gehören sind OE4419R (Nr. 24; Seite 78, erstes Bild von oben) wie auch OE4416R (Tbl. 5: Nr. 22) und OE4418R (Tbl. 5: Nr. 23). Sie werden gemeinsam von einem Promotor cotranskribiert. Die Induktion für ca. 30 Minuten kurz nach der Zellteilung und die Cotranskription konnten mit der Northern Blot Analyse bestätigt werden. Ein Beispiel für ein Gen, das zu dem 5. Cluster gehört, ist OE4676F (Nr. 58, Seite 77, zweites Bild von oben). Das Gen ist vor und während der Zellteilung reprimiert und wird vier Stunden nach Entfernen des Inhibitors für ca. 60 Minuten induziert. Das 6. Cluster wird, wie bereits erwähnt, von zwei cotranskribierten Genen gebildet (OE1794R, Nr. 61; Seite 77, drittes Bild von oben; OE1797R). Die Repression zwischen einer und vier Stunden konnte mit der Northern Blot Analyse bestätigt werden. In diesem Zeitraum kann kein Transkript nachgewiesen werden. Ein schwach reguliertes Gen ist OE3571R

(Nr. 70; Cluster 7; Seite 79, zweites Bild von oben). Das kontinuierliche Absinken der Transkriptmenge ist zu erkennen.

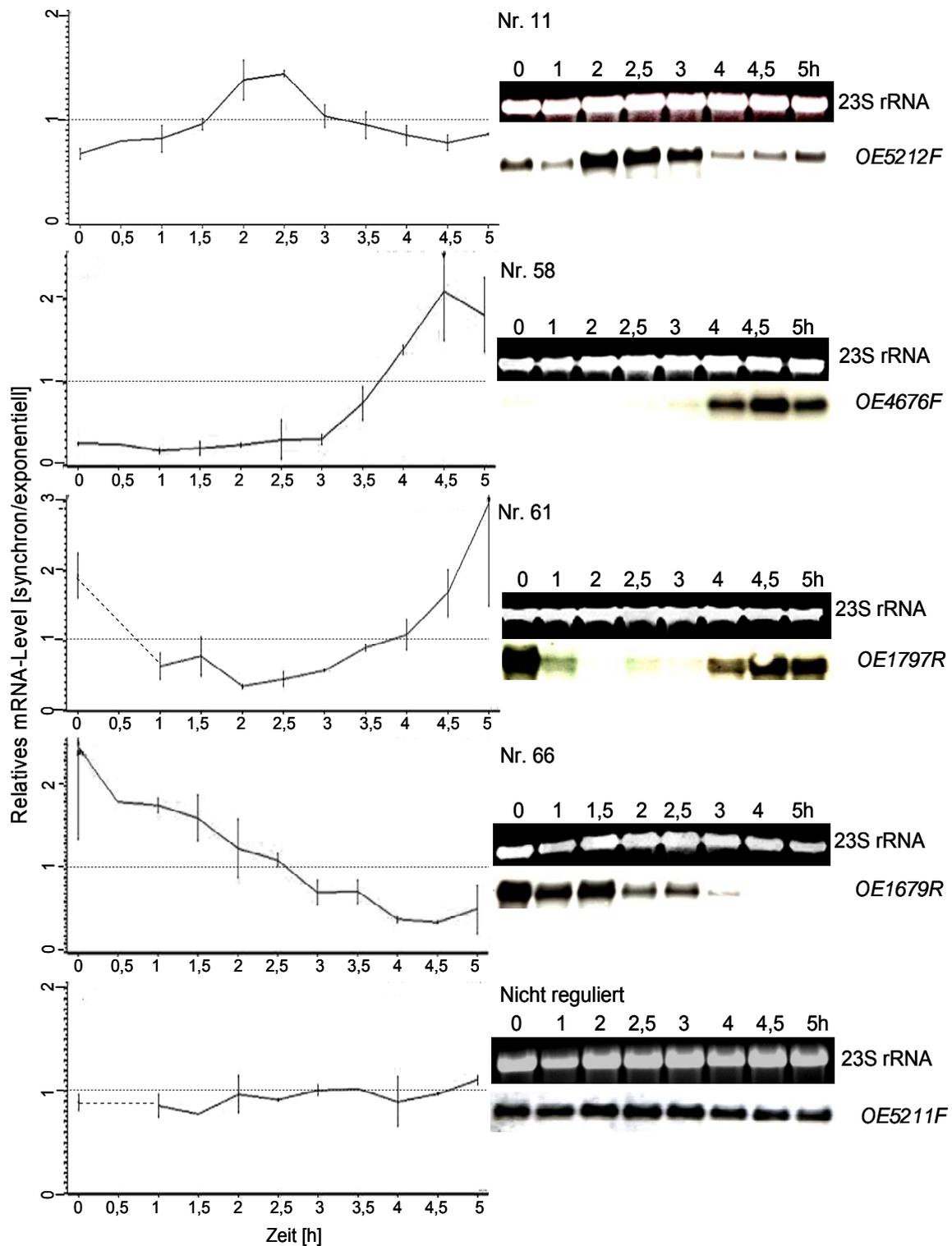


Abb. 9: **Verifizierung der Mikroarrays mittels Northern Blot Analysen.** Die Transkriptprofile von 10 regulierten sowie 5 nicht regulierten Genen wurden mittels Northern Blot Analysen verifiziert. Die durchschnittlichen Transkriptprofile dreier unabhängiger Mikroarray Analysen eines jeden Gens sind links gezeigt; rechts die Resultate der Northern Blot Analysen. Die Bezeichnungen der Gene sowie die Nr. aus Tabelle 5 stehen neben bzw. über den Blots.

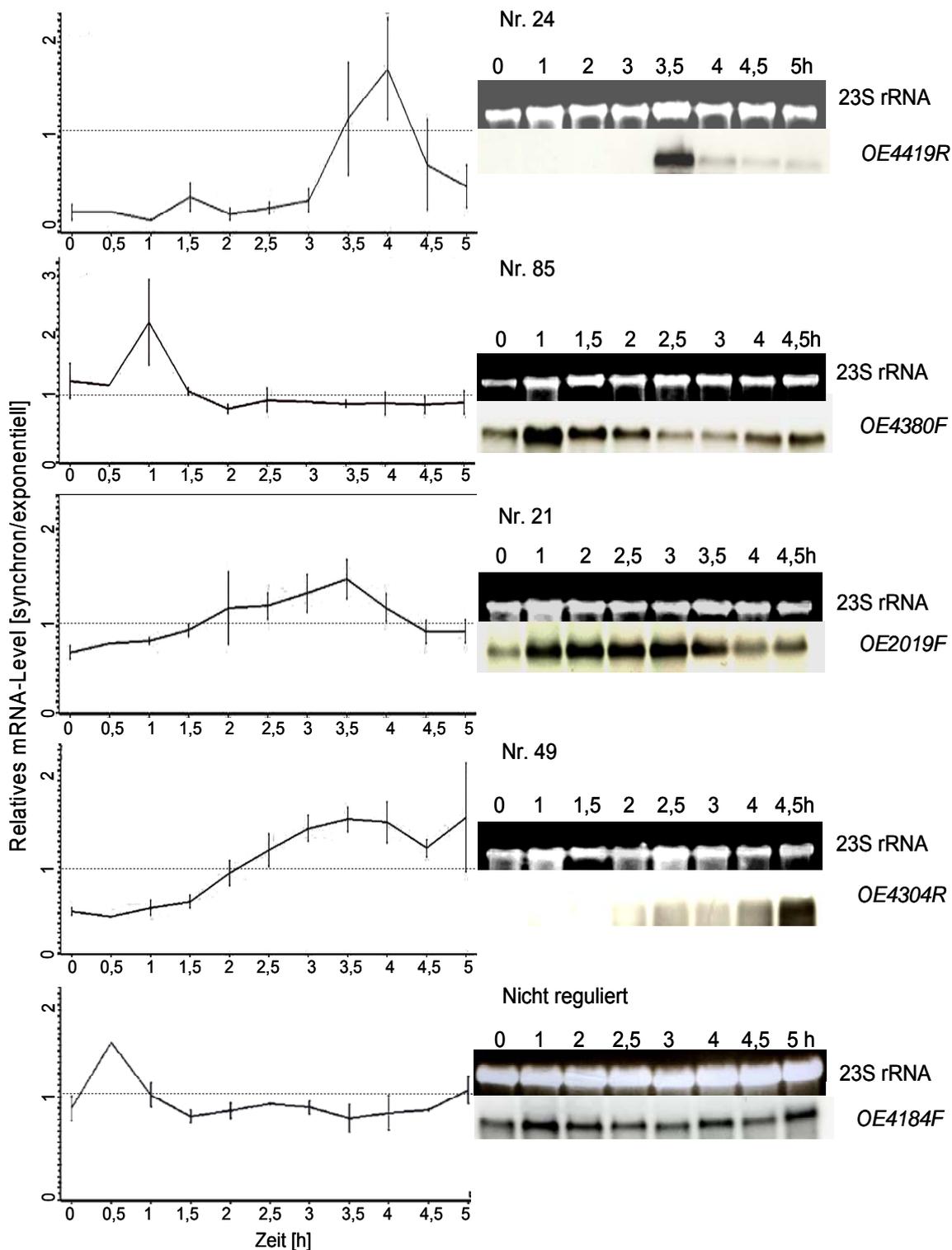


Abb. 9: **Verifizierung der Mikroarrays mittels Northern Blot Analysen.** Die Transkriptprofile von 10 regulierten sowie 5 nicht regulierten Genen wurden mittels Northern Blot Analysen verifiziert. Die durchschnittlichen Transkriptprofile dreier unabhängiger Mikroarray Analysen eines jeden Gens sind links gezeigt; rechts die Resultate der Northern Blot Analysen. Die Bezeichnungen der Gene sowie die Nr. aus Tabelle 5 stehen neben bzw. über den Blots.

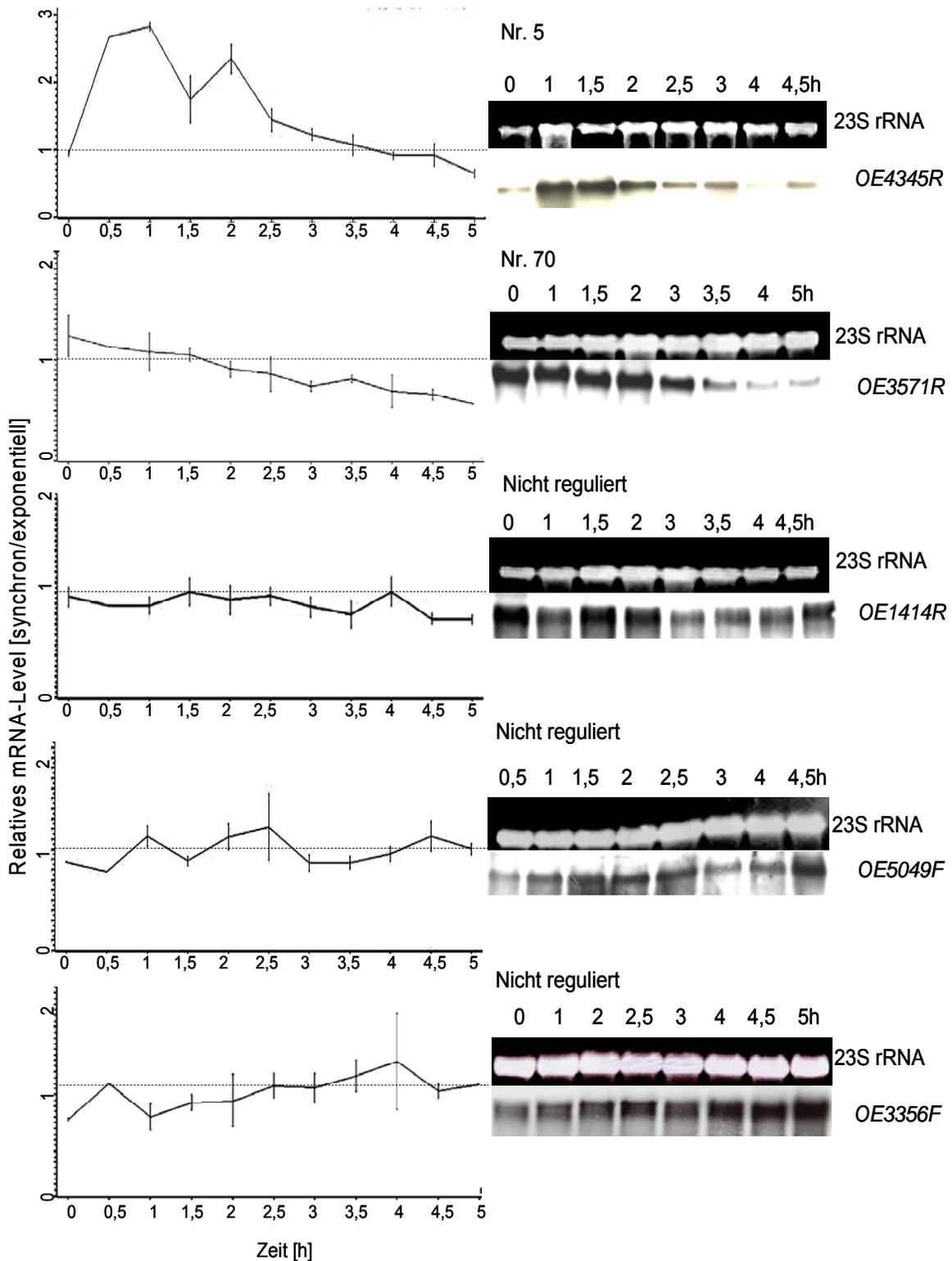


Abb. 9: **Verifizierung der Mikroarrays mittels Northern Blot Analysen.** Die Transkriptprofile von 10 regulierten sowie 5 nicht regulierten Genen wurden mittels Northern Blot Analysen verifiziert. Die durchschnittlichen Transkriptprofile dreier unabhängiger Mikroarray Analysen eines jeden Gens sind links gezeigt; rechts die Resultate der Northern Blot Analysen. Die Bezeichnungen der Gene sowie die Nr. aus Tabelle 5 stehen neben bzw. über den Blots.

#### 4.2.4. Zellzyklusregulierte Gene von *H. salinarum*

Zur Identifizierung zellzyklusabhängiger Prozesse in *H. salinarum* wurden die Gene der einzelnen Cluster auf ihre Funktion hin analysiert. Von Genen des 1. Clusters werden Proteine exprimiert, die in den zentralen Metabolismus involviert sind. Ein Protein ist am Nukleotidmetabolismus beteiligt. Gene des 2. Clusters kodieren für unterschiedliche Proteine. Z. B. gibt es ein Homolog zu einem Transkriptionsregulator, eine Malatdehydrogenase und ein hypothetisches Protein. Die zu Cluster 3 gehörigen Gene kodieren für Enzyme, die an der Purin Biosynthese beteiligt sind. Ein weiteres Purinbiosynthese-Gen war nicht auf den DNA-Mikroarrays vertreten, und eines hatte nahezu konstante Transkriptmengen. Die Oszillation dieser Transkripte im Zellzyklus mit der höchsten Induktion nach der Zellteilung und somit vor der nächsten Replikationsphase steht in direktem Zusammenhang mit der biologischen Funktion. Die Gene, deren Produkte an der Pyrimidin Biosynthese beteiligt sind, sind nicht zellzyklusreguliert. Gene des 4. Clusters kodieren unterschiedliche Proteine, z. B. zwei an der Glykolyse beteiligte Enzyme und ein Transkriptionsinitiationsfaktor B (TFB; OE6020R). Cluster 5 enthält Gene, deren höchste Induktion 1,5 h nach der Zellteilung erfolgt. Die meisten dieser Gene wurden vor und während der Teilung der Zellen nur wenig transkribiert und dann induziert (z. B. OE4676F, Nr. 58 (Tabelle 5) und Abb. 9), ähnlich zu M/G1 induzierten Genen, die in Eukaryoten gefunden wurden. Die Funktion von 13 der 34 Gene ist unbekannt. Dies ist im Vergleich zu den anderen Clustern eine hohe Anzahl. 10 Gene kodieren für Untereinheiten von drei verschiedenen ABC-Transportern. Diese Transporter könnten spezifisch für die Aufnahme von Substraten sein, die nach der Zellteilung benötigt werden. Cluster 6 wird von nur zwei Genen gebildet, die gemeinsam von einem Operon transkribiert werden (die offenen Leserahmen überlappen um 3 Nukleotide). Die Cotranskription konnte mittels Northern Blot Analyse bestätigt werden (OE1797R, Abb. 9). OE1797R kodiert für einen Transkriptionsregulator. Dieser gehört zu COG1321 („*Mn-containing transcriptional regulators*“) und es existieren Orthologe in allen archaealen Genomen. Das zweite Protein (OE1794R) hat keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Vermutlich handelt es sich um einen membranständigen Sensor, da es fünf Membranhelices besitzt. Zu Cluster 7 gehören 17 Gene, deren Transkriptmengen nach Entfernen des Inhibitors kontinuierlich abnehmen. Fünf Gene kodieren für Untereinheiten eines ABC-Transporters, der als phosphatspezifisch annotiert ist. Vier Gene kodieren für alle

---

an der Argininfermentation beteiligten Enzyme. Da die Gene des 7. Clusters am höchsten induziert sind, wenn der Inhibitor entfernt wird und ein nicht zyklisches Profil aufweisen, könnte es sich bei ihnen um Artefakte handeln. Die Induktion könnte durch die Synchronisationsprozedur erfolgt sein, obwohl die Kontrollkulturen gleich behandelt wurden, mit der einzigen Ausnahme, dass kein Aphidicolin zugegeben wurde.

#### **4.2.5. Transkriptprofile von Genen, die als Zellzyklusgene annotiert sind**

Die meisten der in *H. salinarum* als Zellzyklusgene annotierten Gene, zeigten in dieser Studie keine zellzyklusabhängige Regulation der Transkriptmengen. Eine Ausnahme ist z. B. *sph1* (Cluster 2; Tbl. 5: Nr. 11; OE5212F; Abb. 9), ein Mitglied der SMC (*structural maintenance of chromosome*) Proteinfamilie (Soppa, 2001). Ein weiteres Beispiel ist ein *cdc6* (*cell division cycle*) Gen. Es kodiert für ein Protein, dessen Homolog in Eukaryoten an der Replikationsinitiation beteiligt ist (Tbl. 5: Nr. 85; OE4380F; Abb. 9). Die anderen der neun *cdc6* Gene von *H. salinarum* zeigten eine konstitutive Transkription während der analysierten Zeitabstände.

In anderen untersuchten Organismen sind viele der als Zellzyklusgene annotierten Gene transkriptionsreguliert. Diese Regulation ist nur wenig konserviert; Es gibt jedoch einige Gene, die eine zellzyklusabhängige Regulation der Transkription in Hefe, *Arabidopsis* sowie menschlichen Zellen zeigen. Um sicherzustellen, dass diese Gene in *H. salinarum* tatsächlich nicht reguliert sind, wurden deren Transkriptprofile überprüft (Abb.10). Bei den Genen handelt es sich unter anderem um das archaeale Histon (OE1220F), Untereinheiten der DNA-Polymerase, Gene der SMC-Familie (OE1515R; OE1770F; OE5049F), alle *cdc* Paraloge sowie Gene, die für die Enzyme der Pyrimidin Biosynthese kodieren. Alle 32 Gene wurden konstitutiv transkribiert und zeigten keine zellzyklusabhängige Transkriptionsregulation in den untersuchten Zeitabständen.

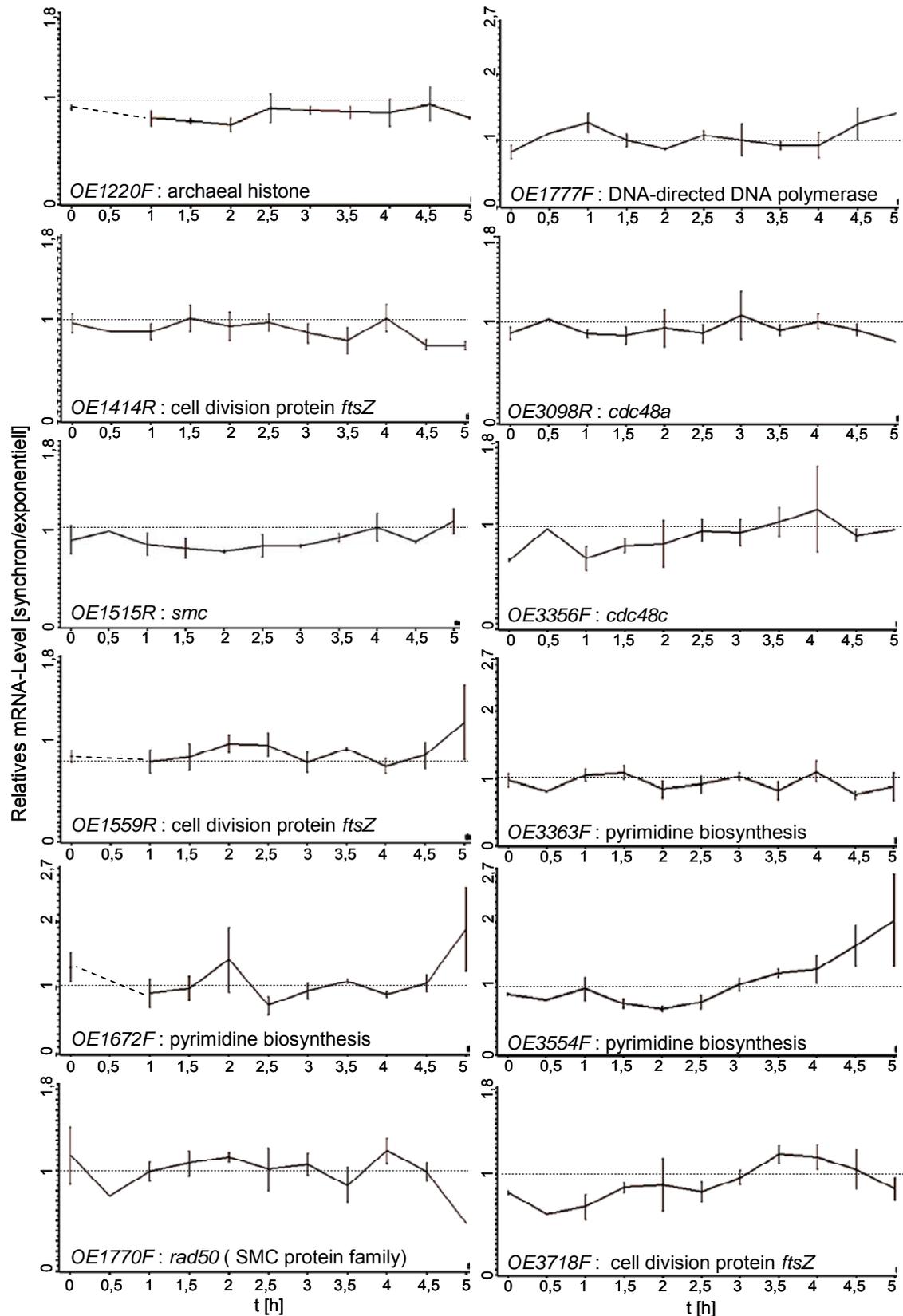


Abb. 10: **Transkriptprofile von ausgesuchten nicht regulierten Genen.** Die durchschnittlichen Transkriptprofile dreier unabhängiger Mikroarray Analysen sind gezeigt. Die Genbezeichnung sowie die Funktionsklasse (nach der Datenbank für Archaea und andere Prokarya: Halolex) sind den einzelnen Graphiken beigegefügt.

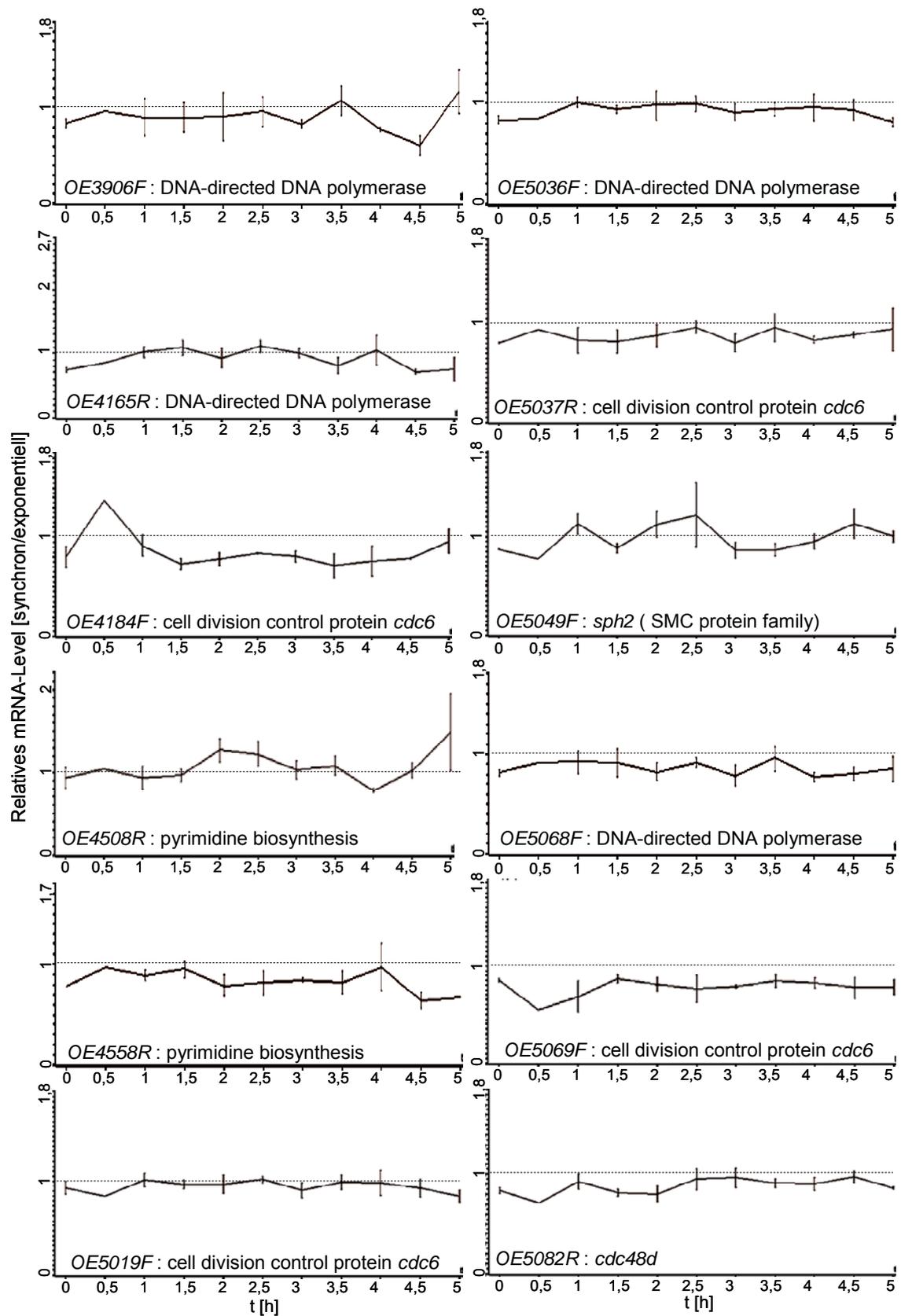


Abb. 10: **Transkriptprofile von ausgesuchten nicht regulierten Genen.** Die durchschnittlichen Transkriptprofile dreier unabhängiger Mikroarray Analysen sind gezeigt. Die Genbezeichnung sowie die Funktionsklasse (nach der Datenbank für Archaea und andere Prokarya: Halolex) sind den einzelnen Graphiken beigegefügt.

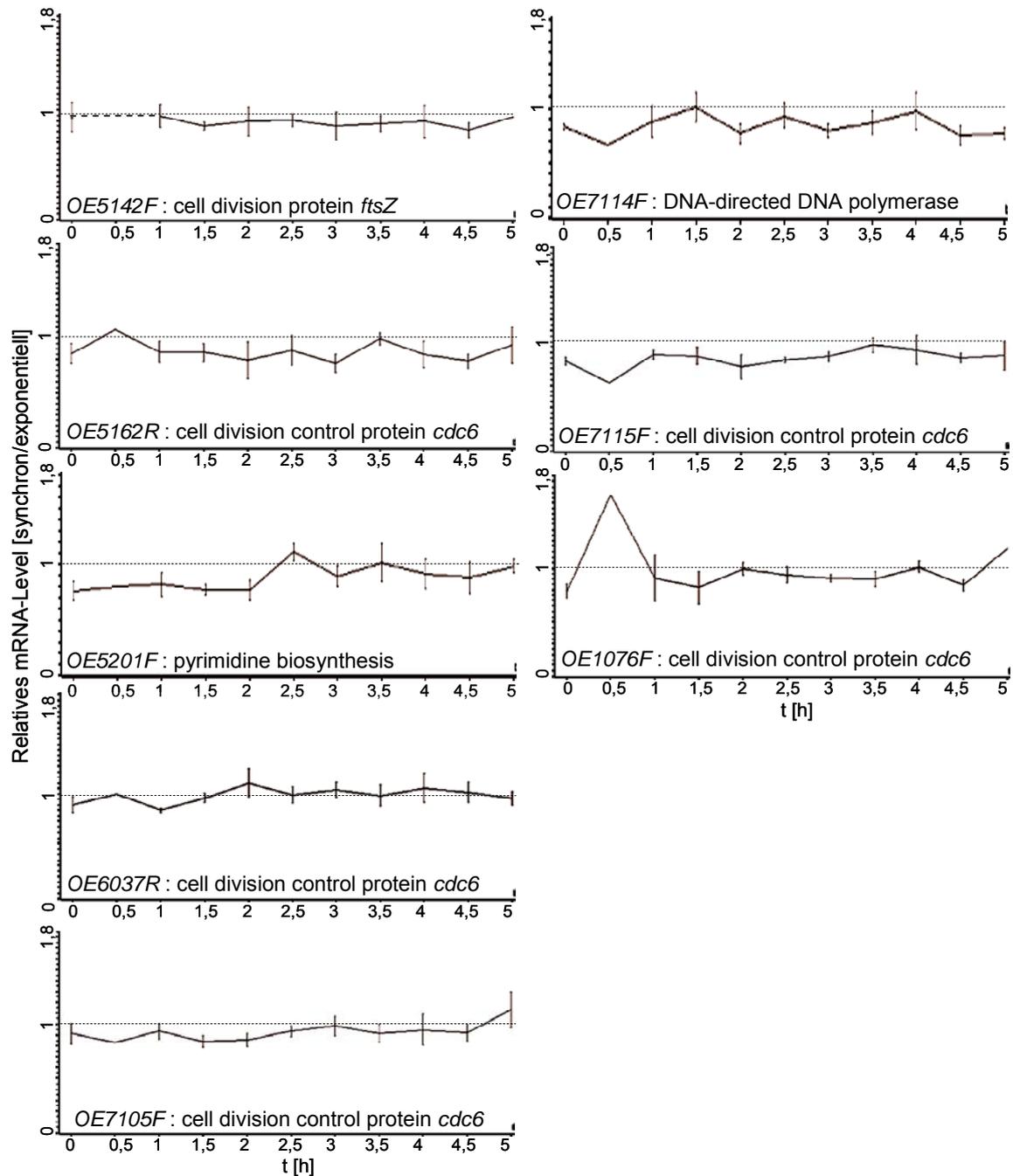


Abb. 10: **Transkriptprofile von ausgesuchten nicht regulierten Genen.** Die durchschnittlichen Transkriptprofile dreier unabhängiger Mikroarray Analysen sind gezeigt. Die Genbezeichnung sowie die Funktionsklasse (nach der Datenbank für Archaea und andere Prokarya: Halolex) sind den einzelnen Graphiken beigefügt.

#### 4.2.6. Identifizierung von clusterspezifischen konservierten Motiven

Gene, die eine ähnliche Regulation der Transkription aufweisen, könnten von einem gemeinsamen Transkriptionsregulator gesteuert werden. Zur Identifizierung von putativen regulatorischen Sequenzmotiven wurden clusterspezifische Sequenzvergleiche durchgeführt. Die analysierten Regionen umfassten 200 nt stromaufwärts sowie 200 nt stromabwärts des Translationsstarts. Da die meisten haloarchaealen Transkripte keinen 5′untranslatierten Bereich besitzen, stimmen Transkriptions- und Translationsbeginn in etwa überein (Brenneis *et al.*, 2007). Wenn die intergenische Region zwischen zwei Genen kleiner als 40 nt ist, wurden die Gene als Teil eines Operons angesehen, und nur das proximale Gen des Operons wurde in die Analyse eingeschlossen. Die meisten der 87 zellzyklusregulierten Gene sind Teil eines von 16 Operons, so dass die Anzahl der untersuchten Sequenzen deutlich kleiner war als die der regulierten Gene.

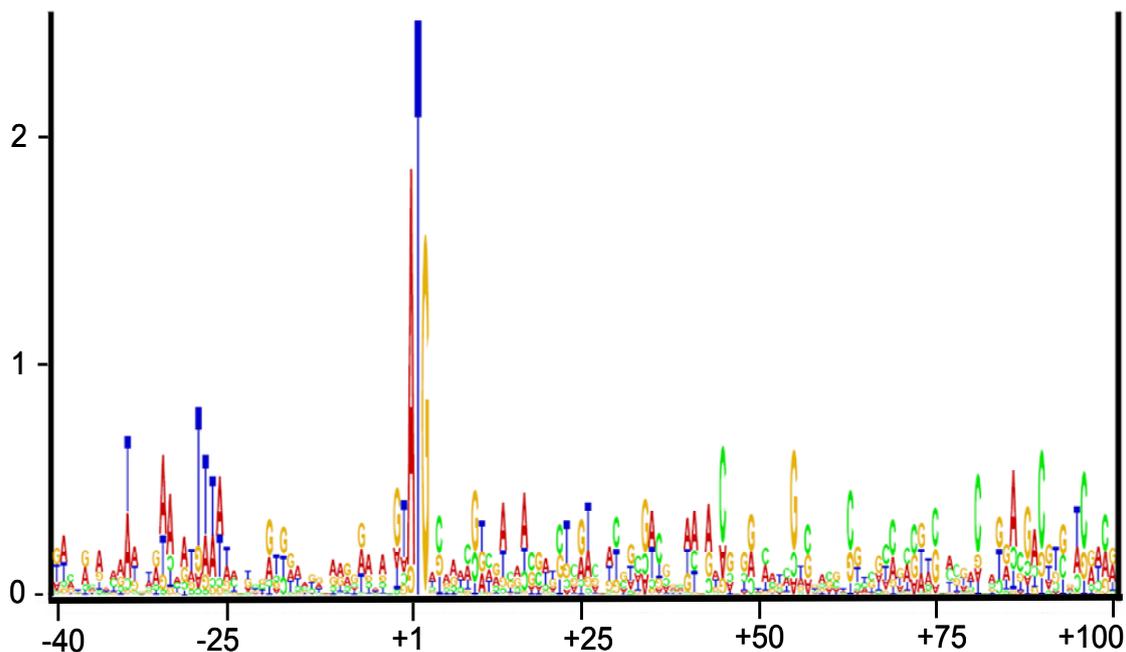


Abb. 11: **Analyse von clusterspezifischen Sequenzmotiven in Genen des 4. Clusters.** Das Programm „RNA Structure Logos“ wurde verwendet, um in einer 400 nt Region in Umgebung des Translationsstarts konservierte Motive zu identifizieren. Ein Ausschnitt eines Sequenzvergleichs von Genen des 4. Clusters (-40 bis +100 nt; x-Achse) ist gezeigt. Das basale Promotorelement „transcription factor B recognition element (BRE)“ und die „TATA-Box“ konnten identifiziert werden. Die y-Achse stellt den Konservierungsgrad der Nukleotide dar.

Die Sequenzvergleiche wurden mit verschiedenen Programmen durchgeführt. Mit „RNA Structure Logos“ (Gorodkin *et al.*, 1997; Schneider & Stephens, 1990) konnten in allen Clustern die TATA-Box und das basale Promotorelement

„transcription factor B recognition element“ (*BRE*) detektiert werden. Dies spricht dafür, dass Transkriptions- und Translationsbeginn bei den analysierten Genen nahezu übereinstimmen. Abb. 11 zeigt beispielhaft einen Teil des Sequenzvergleiches von Genen des 4. Clusters (-39 bis +100 nt). Die „TATA-Box“ ist um Position 27 - 28 nt stromaufwärts des Startkodons lokalisiert. Die abgeleitete Konsensus-Sequenz ist „TTTA“. Stromaufwärts von der „TATA-Box“ konnte das *BRE* identifiziert werden. Es konnten keine weiteren Sequenzmotive erkannt werden, was zu der Annahme führte, dass die regulatorischen Sequenzmotive keine feste Distanz zum Transkriptions- bzw. Translationsstart haben. Daher wurden Studien mit weiteren Programmen durchgeführt. Diese identifizieren nicht nur Motive an fixierten Regionen der Sequenzen, sondern detektieren allgemein konservierte Motive, die positionsunabhängig in den analysierten Regionen vorkommen. Mit den Programmen „AlignAce“ und „MEME“ („multiple EM for Motif Elicitations“) (Bailey & Elkan, 1994; Bailey & Gribskov, 1998; Bailey *et al.*, 2006) konnten für sechs der sieben Cluster konservierte Sequenzmotive gefunden werden. Cluster 6 konnte nicht analysiert werden, da es nur aus zwei Genen besteht, die von einem Promotor cotranskribiert werden. Die Ergebnisse der Analyse mit „MEME“ sind in Tabelle 6 zusammengefasst. „MEME“ identifiziert sich wiederholende lückenlose Muster in DNA- oder Proteinsequenzen.

**Tabelle 6: Regulatorische DNA-Sequenzmotive der zellzyklusregulierten Gencluster**

Die Tabelle zeigt das Cluster, in welches die regulierten Gene eingruppiert wurden; die Anzahl der Gene bzw. Sequenzen, die analysiert wurden; die Konsensussequenz der Motive; die Anzahl der Gene bzw. Sequenzen, in denen das Motiv vorkommt; die durchschnittliche Anzahl des Vorkommens des Motivs pro Gen bzw. Sequenz; den P-Wert und den Strang, auf dem das Motiv zu finden ist.

| Cluster | Anzahl an Genen/Sequenzen | Konsensus-Sequenz | Anzahl an Genen/Sequenzen mit Motiv | Durchschnittliche Anzahl des Vorkommens/Gen | Ø P-Wert | Strang +/- |
|---------|---------------------------|-------------------|-------------------------------------|---|----------|------------|
| 1       | 3                         | AMRRCRAC          | 3                                   | 5   | 1,60E-04 | 10/5       |
| 1       | 3                         | WGSAGKGSAACTC     | 3                                   | 1   | 2,79E-08 | 3/0        |
| 2       | 6                         | MCGARKWMRAC       | 5                                   | 2   | 1,08E-05 | 7/2        |
| 3       | 7                         | THTHCWYKRWSGTGK   | 6                                   | 2   | 1,20E-06 | 3/7        |
| 4       | 4                         | SWWCGASSMSG       | 4                                   | 5   | 1,60E-04 | 14/6       |
| 5       | 20                        | CRBCGASSDCRHCGH   | 18                                  | 3   | 7,88E-05 | 31/19      |
| 6       | 1                         | -----             | ---                                 | ---   | ---      | ---        |
| 7       | 10                        | RHSRYSRMCGA       | 10                                  | 5   | 4,16E-04 | 35/15      |

R= G oder A; Y= T oder C; M= A oder C; K= G oder T; S= G oder C; W= A oder T; H= A oder C oder T; B= G oder T oder C; D= G oder A oder T

Die clusterspezifischen Motive wurden nicht nur einmal pro Gen im Bereich der

Promotoren gefunden, sondern wiederholen sich mehrfach stromaufwärts wie auch stromabwärts in Bezug auf den Translationsstart in jedem analysierten Gen. Die Motive kommen in beiden Orientierungen vor und umfassen 8 bis 15 nt. In Cluster 1 wurden zwei verschiedene Motive gefunden. Das zweite Motiv kommt nur auf dem Plusstrang und im Durchschnitt nur einmal pro Gen vor. Es hat einen niedrigeren P-Wert als das erste Motiv und ist somit wahrscheinlicher.

Das Vorkommen, die Verteilung und die Orientierung des Motivs in den Sequenzen der Cluster 5 Gene sind schematisch in Abb. 12 A dargestellt. Abb. 12 B zeigt das Sequenzlogo dieses Motivs.

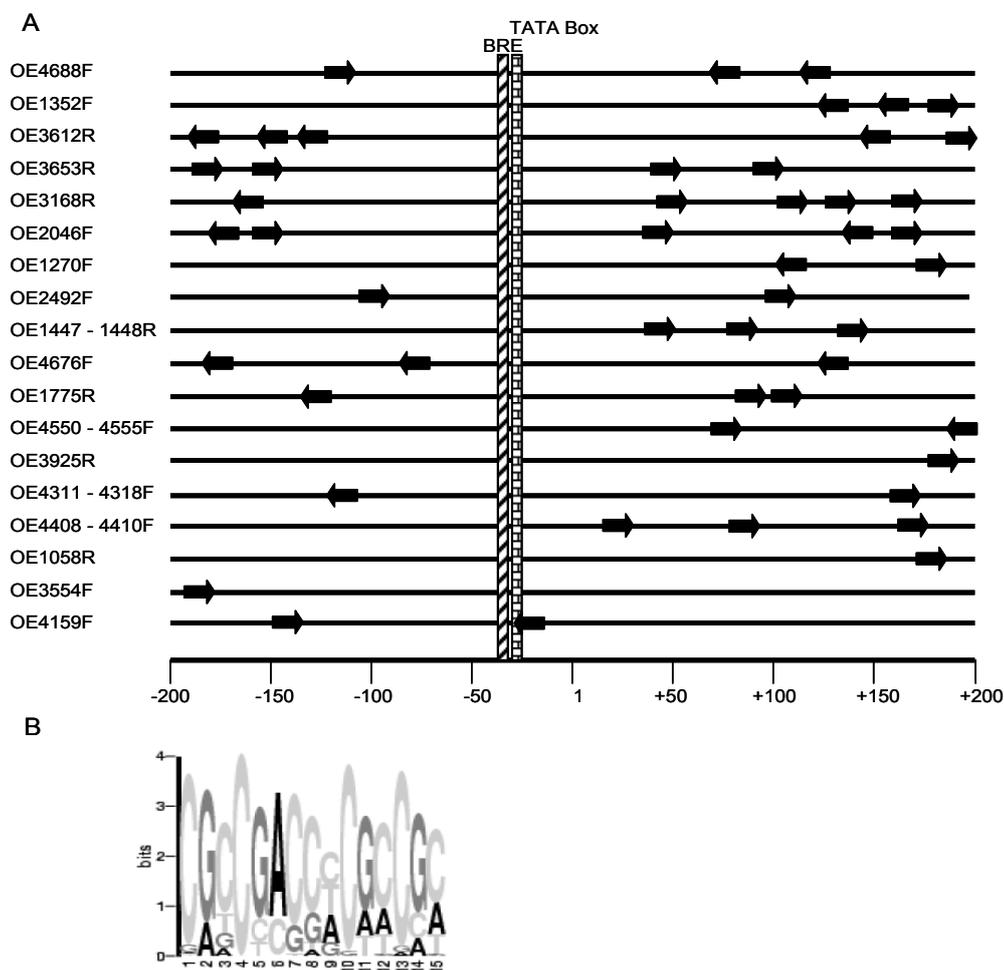


Abb. 12: **Konservierte DNA-Sequenzmotive in der Umgebung des Translationsstarts von Genen des 5. Clusters.** Das Programm „MEME“ wurde verwendet, um in einer 400 nt Region in Umgebung des Translationsstarts konservierte Motive zu identifizieren. **A.** Schematisch gezeigt sind die analysierten chromosomalen Regionen der regulierten Gene; die Nummerierung bezieht sich auf den Translationsstart. Die Genbezeichnung ist links gezeigt. Das basale Promotorelement „*transcription factor B recognition element (BRE)*“ und die „TATA-Box“ sind wie bei *leaderlosen* Transkripten positioniert. Die schwarzen Pfeile stellen die Position des konservierten Motivs und dessen Orientierung dar. **B.** Die Sequenz des konservierten Motivs der Cluster 5 Gene. Die y-Achse stellt den Konservierungsgrad der Nukleotide dar, die x-Achse die Länge des Motivs in Nukleotiden.

Deutlich zu erkennen ist, dass das Motiv stromaufwärts wie stromabwärts in Bezug auf den Transkriptionsstart (x-Achse: +1) vorkommt. Es liegt durchschnittlich dreimal pro Gen vor. Das Motiv konnte 37 Mal auf dem Plusstrang und 19 Mal auf dem Minusstrang identifiziert werden. Das Sequenzlogo der Cluster 5 Gene ist in Abb. 12 B. gezeigt. Es ist „GC-reich“ und enthält eine kurze direkte Wiederholung von „CGCCGAC“. Mit nur zwei Ausnahmen war die Region von -70 bis +40 Nukleotiden bei allen untersuchten Genen frei von Motiven.

### **4.3. Globale Proteomanalyse synchroner Zellkulturen**

#### **4.3.1. Analyse von zellzyklusabhängigen Proteomänderungen mit silbergefärbten 2D-Gelen**

Für die Analyse zellzyklusabhängiger Proteomänderungen wurden zweidimensionale (2D)-Gelelektrophoresen durchgeführt. Zwei unabhängige *H. salinarum* Kulturen wurden synchronisiert. Nach dem Entfernen des Replikaseinhibitors wurden zu acht unterschiedlichen Zeitpunkten je  $4 \times 10^8$  Zellen entnommen. Nach Aufarbeitung der Proben und isoelektrischer Fokussierung (pH = 4 - 4,7) wurden diese auf Proteingelen in der zweiten Dimension aufgetrennt (100kDa bis ca. 25kDa). Die Gele wurden anschließend silbergefärbt. Abb. 13 zeigt eins der zwei Experimente. Die gefärbten Gele sollten visuell analysiert werden.

Die visuelle Auswertung der silbergefärbten 2D-Gele war nicht möglich, da zum einen das Proteinstreifenmuster auf den Gelen nicht 100%ig identisch war und zum anderen die Gele unterschiedlich stark silbergefärbt waren. Dies erschwerte den Versuch, im mittleren unteren Bereich der Gele (25kDa - 55 kDa) Proteine zu identifizieren, die zellzyklusabhängig exprimiert werden. Im oberen mittleren Bereich der Gele sind sehr viele Proteine ähnlicher Größe (55kDa bis 100kDa) und mit ähnlichem isoelektrischen Punkt (pI = 4,3 - 4,5) zu sehen. Ein Protein aus diesem Bereich auf allen Gelen zu identifizieren war nicht durchführbar. Zusammenfassend kann man feststellen, dass diese Methode für die Analyse von zellzyklusabhängigen Proteomänderungen nicht geeignet ist. Um die Probleme mit der Silberfärbung und visuellen Auswertung von Gelen zu umgehen, wurde für die Analyse eine andere Methode gewählt (4.3.2.).

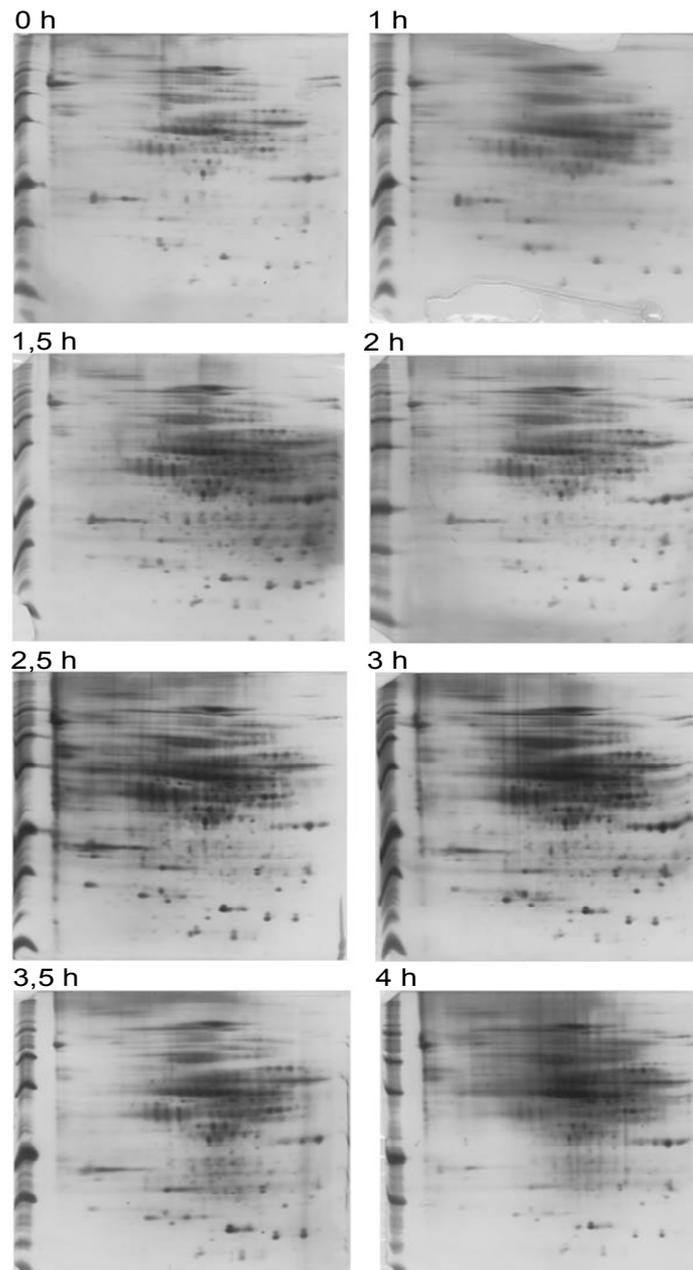


Abb. 13: **Proteomanalyse synchronisierter Zellen mittels 2D-Gelelektrophorese.** Gezeigt sind die silbergefärbten Gele nach der Auftrennung von Proteinen in zwei Dimensionen. Die Proteine wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (jeweilige Gelüberschrift) aus synchronisierten Kulturen isoliert.

#### 4.3.2. Analyse zellzyklusabhängiger Proteomänderungen mittels DIGE

Die DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*)-Methode ermöglicht es, drei unterschiedliche Proteinfractionen verschieden mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren und anschließend zusammen auf einem SDS-Gel aufzutrennen (Unlu *et al.*, 1997). Eine markierte Fraktion dient hierbei als interner Standard. Die eingesetzten Farbstoffe besitzen eine reaktive Gruppe (*N*-hydroxy-succinimidyl Ester). Daher ist die kovalente Verknüpfung der Farbstoffe mit der epsilon Aminogruppe von Lysin(en) eines Proteins möglich. Statistisch sollte nur ein Lysin

pro Protein markiert werden. Damit wird sichergestellt, dass eine Protein-Spezies nicht unterschiedlich markiert wird und somit verschiedene Auftrennungsmuster zeigt. Durch Anregung der drei Farbstoffe während des *Scannens* werden pro Gel drei Bilder erzeugt, die die Signalintensitäten aller markierten Proteine repräsentieren. Die Normierung mehrerer Gele erfolgte automatisch mit der DeCyder 2D-Software, Version 6.5.14 (GE Healthcare, München) über den internen Standard eines jeden Gels. Auch die Proteindetektion (das *Matchen*) erfolgte automatisch, wurde aber nachträglich manuell verbessert, durch das Setzen zusätzlicher Bezugspunkte. Zur Analyse der zellzyklusabhängigen Proteomänderungen wurden drei unabhängige *H. salinarum* Kulturen synchronisiert und wie unter 4.3.1 beschrieben weiterbehandelt. Proteine einer exponentiellen Kultur dienten als Standard. Die Proteine der synchronen Kulturen wurden mit Cy3 oder Cy5 markiert, die des Standards mit Cy2. Es wurde in diesem Fall kein Vergleich von synchron zu „nicht-synchron“ vorgenommen, sondern es sollten zeitabhängige Expressionsänderungen von Proteinen im Vergleich zum Standard analysiert werden. Tabelle 7 zeigt die 14 Gele bzw. die 42 Bilder.

### Tabelle 7: Analyse der 2D-Gele

Die Tabelle zeigt die 14 2D-Gele bzw. die 42 Bilder. Sie zeigt den Gelnamen und welcher Farbstoff für welchen Zustand gewählt wurde. Zusätzlich informiert sie, wie viele Proteine pro Gel bzw. Bild gefunden wurden und zeigt den Anteil derer, die *matched* wurden. Des Weiteren gibt die Tabelle Auskunft über die Match Qualität (0 = 100 % Übereinstimmung zwischen Master und Gel).

| Gel Nr. | Bild Nr. | Status  | Bild                               | Farbstoff | Anzahl der Spots | Matched | Gruppe*  | Match-Qualität |
|---------|----------|---------|------------------------------------|-----------|------------------|---------|----------|----------------|
| 10      | 1        | Matched | dige gel10 scan2 STANDARD CY2.gel  | Cy2       | 1261             | 956     | Standard | 2,4            |
| 10      | 2        | Matched | dige gel10 scan2 Cy3.gel           | Cy3       | 1261             | 956     | 1,5h     | 2,4            |
| 10      | 3        | Matched | dige gel10 scan2 Cy5.gel           | Cy5       | 1261             | 956     | 0h       | 2,4            |
| 11      | 4        | Matched | dige gel11 scan2 STANDARD CY2.gel  | Cy2       | 1844             | 1355    | Standard | 1,6            |
| 11      | 5        | Matched | dige gel11 scan2 Cy3.gel           | Cy3       | 1844             | 1355    | 1h       | 1,6            |
| 11      | 6        | Matched | dige gel11 scan2 Cy5.gel           | Cy5       | 1844             | 1355    | 2h       | 1,6            |
| 12      | 7        | Matched | dige gel12 scan3u STANDARD CY2.gel | Cy2       | 1746             | 1303    | Standard | 1,6            |
| 12      | 8        | Matched | dige gel12 scan3u Cy3.gel          | Cy3       | 1746             | 1303    | 2,5h     | 1,6            |
| 12      | 9        | Matched | dige gel12 scan3u Cy5.gel          | Cy5       | 1746             | 1303    | 3,5h     | 1,6            |
| 13      | 10       | Matched | dige gel13 scan2 STANDARD CY2.gel  | Cy2       | 1599             | 1231    | Standard | 1,8            |
| 13      | 11       | Matched | dige gel13 scan2 Cy3.gel           | Cy3       | 1599             | 1231    | 3h       | 1,8            |
| 13      | 12       | Matched | dige gel13 scan2 Cy5.gel           | Cy5       | 1599             | 1231    | 4h       | 1,8            |
| 14      | 13       | Matched | dige gel14 scan2 STANDARD CY2.gel  | Cy2       | 1702             | 1283    | Standard | 2,2            |
| 14      | 14       | Matched | dige gel14 scan2 Cy3.gel           | Cy3       | 1702             | 1283    | M1, M3   | 2,2            |
| 14      | 15       | Matched | dige gel14 scan2 Cy5.gel           | Cy5       | 1702             | 1283    | M1, M3   | 2,2            |
| 1       | 16       | Master  | dige gel1w scan3 STANDARD CY2.gel  | Cy2       | 2223             | 2223    | Standard | 3,9            |
| 1       | 17       | Matched | dige gel1w scan3 Cy3.gel           | Cy3       | 2223             | 2223    | 0h       | 3,9            |
| 1       | 18       | Matched | dige gel1w scan3 Cy5.gel           | Cy5       | 2223             | 2223    | 2,5h     | 3,9            |
| 2       | 19       | Matched | dige gel2w scan3 STANDARD CY2.gel  | Cy2       | 2151             | 1456    | Standard | 3,7            |
| 2       | 20       | Matched | dige gel2w scan3 Cy3.gel           | Cy3       | 2151             | 1456    | 1h       | 3,7            |
| 2       | 21       | Matched | dige gel2w scan3 Cy5.gel           | Cy5       | 2151             | 1456    | 3h       | 3,7            |
| 3       | 22       | Matched | dige gel3w scan3 STANDARD CY2.gel  | Cy2       | 2023             | 1433    | Standard | 5,2            |
| 3       | 23       | Matched | dige gel3w scan3 Cy3.gel           | Cy3       | 2023             | 1433    | 1,5h     | 5,2            |
| 3       | 24       | Matched | dige gel3w scan3 Cy5.gel           | Cy5       | 2023             | 1433    | 3,5h     | 5,2            |
| 4       | 25       | Matched | dige gel4w scan3 STANDARD CY2.gel  | Cy2       | 2074             | 1446    | Standard | 5,6            |
| 4       | 26       | Matched | dige gel4w scan3 Cy3.gel           | Cy3       | 2074             | 1446    | 2h       | 5,6            |
| 4       | 27       | Matched | dige gel4w scan3 Cy5.gel           | Cy5       | 2074             | 1446    | 4h       | 5,6            |
| 5       | 28       | Matched | dige gel5 scan3 STANDARD CY2.gel   | Cy2       | 737              | 578     | Standard | 2,3            |
| 5       | 29       | Matched | dige gel5 scan3 Cy3.gel            | Cy3       | 737              | 578     | M1, M2   | 2,3            |
| 5       | 30       | Matched | dige gel5 scan3 Cy5.gel            | Cy5       | 737              | 578     | M1, M2   | 2,3            |
| 6       | 31       | Matched | dige gel6 scan3 STANDARD CY2.gel   | Cy2       | 490              | 414     | Standard | 3,4            |
| 6       | 32       | Matched | dige gel6 scan3 Cy3.gel            | Cy3       | 490              | 414     | 0h       | 3,4            |
| 6       | 33       | Matched | dige gel6 scan3 Cy5.gel            | Cy5       | 490              | 414     | 1h       | 3,4            |
| 7       | 34       | Matched | dige gel7scan2 STANDARD CY2.gel    | Cy2       | 1785             | 1284    | Standard | 1,7            |
| 7       | 35       | Matched | dige gel7scan2 Cy3.gel             | Cy3       | 1785             | 1284    | 2h       | 1,7            |
| 7       | 36       | Matched | dige gel7scan2 Cy5.gel             | Cy5       | 1785             | 1284    | 1,5h     | 1,7            |
| 8       | 37       | Matched | dige gel8 scan2 STANDARD CY2.gel   | Cy2       | 1264             | 939     | Standard | 2,3            |
| 8       | 38       | Matched | dige gel8 scan2 Cy3.gel            | Cy3       | 1264             | 939     | 2,5h     | 2,3            |
| 8       | 39       | Matched | dige gel8 scan2 Cy5.gel            | Cy5       | 1264             | 939     | 3h       | 2,3            |
| 9       | 40       | Matched | dige gel9 scan2 STANDARD CY2.gel   | Cy2       | 1448             | 1059    | Standard | 2,1            |
| 9       | 41       | Matched | dige gel9 scan2 Cy3.gel            | Cy3       | 1448             | 1059    | 4h       | 2,1            |
| 9       | 42       | Matched | dige gel9 scan2 Cy5.gel            | Cy5       | 1448             | 1059    | 3,5h     | 2,1            |

\* die einzelnen Zeitpunkte wurden zu Gruppen sortiert, ebenso die Standardbilder. Bei M1, M2 und M3 wurden Mischungen der Proteinextrakte der einzelnen Synchronisationen verwendet.

Auf den meisten Gelen wurden zwischen 1200 und 2000 Proteine detektiert. Zwei Ausnahmen stellen die Gele fünf und sechs dar wo nur 500 bis 737 Proteine gefunden wurden. Nach automatischer Analyse der Standardbilder legte das

Programm ein sogenanntes Mastergel fest. Es handelt sich hierbei um das Gel, auf dem die meisten Signale gefunden wurden (Gel Nr. 1). Anschließend erfolgte ein automatischer Vergleich zwischen dem Proteinstreifen des Masters und den anderen Gelen. Durchschnittlich wurden ca. 1200 Proteine auf den anderen Gelen wiedergefunden. Eine visuelle Analyse bestätigte das Ergebnis. Die *Match*-Qualität repräsentiert morphologische Ähnlichkeiten der verglichenen Spots. Sie wird aus dem Vergleich zwischen dem Master und den anderen Gelen gebildet. Bei vollständiger Übereinstimmung beträgt die *Match*-Qualität null. Bei schlechten Vergleichen beträgt sie 15. In dieser Analyse ist die Qualität der meisten Gelen in einem guten Bereich zwischen 1,6 und 3,9. Zwei Gelen (Gel 3 und Gel 4) haben eine befriedigende *Match*-Qualität von 5,2 bzw. 5,5. Die weitere Auswertung erfolgte mit der Software Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA), da eine zeitabhängige Analyse der Proteinmengen im Vergleich zum Standard mit der DeCyder 2D-Software, Version 6.5.14 (GE Healthcare, München) nicht möglich war. Mit der vorhandenen Software konnten jeweils nur zwei Zeitpunkte miteinander verglichen werden (Auswertung: 3.4.4.5.). Auch konnte kein Vergleich zum Standard durchgeführt werden. Der Standard diente der Software nicht als biologische Probe, sondern nur als technischer Wert. Der zeitliche Verlauf der Menge eines Proteins wurde graphisch dargestellt, die Werte konnten jedoch nicht exportiert werden. Daher wurden alle Zeitpunkte einmal auf null Stunden und einmal auf vier Stunden bezogen. Der Maximal- und der Minimalwert eines Proteins wurde aus allen Werten ermittelt für die ein T-Test vorhanden war, damit diese Werte mindestens zweimal vorhanden waren. Es wurde nicht berücksichtigt, wie gut der T-Test war. Bei den auf null Stunden bezogenen Werten wurden 1045 Proteine gefunden, für die es einen Maximal- und einen Minimalwert gab, bei den auf vier Stunden bezogenen fanden sich 1221 Proteine. Für insgesamt 270 Proteine gab es einen mindestens zweifachen Unterschied. Diese wurden visuell in der DeCyder 2D-Software überprüft, da in die Auswertung keine Standardabweichungen mit einbezogen werden konnten. Es zeigte sich, dass es sich bei den meisten der 270 Proteine um falsch Positive handelte, da sie nur zu einem Zeitpunkt hoch- oder herunterreguliert waren, und dass meist mit einer hohen Varianz. Somit ist ein Großteil dieser Proteine nicht zellzyklusabhängig reguliert. Eine zellzyklusabhängige Regulation wurde für 30 Proteine gefunden (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Zellzyklusabhängig regulierte Proteine**

Die Tabelle zeigt die Nr. der regulierten Proteine, welche sich auf das Master Gel bezieht. Sie stellt dar, auf wie vielen Bildern ein Protein erschien. Die linearen maximalen und minimalen Werte bei der entsprechenden Stunde (h) sind gezeigt. Die Ratio stellt das Verhältnis von maximalem zu minimalem Wert dar. Der T-Test MAX\_MIN gibt die Signifikanz zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert an.

| Master Nr. | Erscheinen | MAX_Lin | MAX bei x h | MIN_Lin | MIN bei x h | Ratio       | T-Test MAX_MIN |
|------------|------------|---------|-------------|---------|-------------|-------------|----------------|
| 1237       | 24 (42)    | 2,04    | 3,50        | 0,58    | 2,50        | <b>3,53</b> | 0,11           |
| 1641       | 42 (42)    | 1,57    | 1,50        | 0,46    | 2,00        | <b>3,41</b> | 0,0097         |
| 1837       | 27 (42)    | 3,29    | 2,50        | 0,97    | 1,50        | <b>3,39</b> | 0,3            |
| 1787       | 39 (42)    | 1,53    | 2,50        | 0,46    | 2,00        | <b>3,34</b> | 0,018          |
| 1290       | 21 (42)    | 2,61    | 1,00        | 0,81    | 2,00        | <b>3,21</b> | 0,062          |
| 1586       | 42 (42)    | 1       | 0,00        | 0,31    | 2,00        | <b>3,19</b> | 0,032          |
| 1619       | 33 (42)    | 1,43    | 2,50        | 0,47    | 2,00        | <b>3,07</b> | 0,23           |
| 1755       | 15 (42)    | 2,77    | 4,00        | 1,00    | 0,00        | <b>2,77</b> | 0,3            |
| 1074       | 42 (42)    | 1,2     | 1,50        | 0,44    | 2,00        | <b>2,75</b> | 0,27           |
| 1447       | 18 (42)    | 1,2     | 3,50        | 0,44    | 1,50        | <b>2,75</b> | 0,11           |
| 1167       | 33 (42)    | 1,93    | 2,50        | 0,74    | 3,50        | <b>2,61</b> | 0,049          |
| 1792       | 39 (42)    | 1       | 0,00        | 0,39    | 2,00        | <b>2,55</b> | 0,016          |
| 1338       | 30 (42)    | 1,27    | 3,00        | 0,51    | 2,00        | <b>2,48</b> | 0,1            |
| 1724       | 42 (42)    | 1,17    | 3,00        | 0,48    | 2,00        | <b>2,46</b> | 0,0087         |
| 1343       | 42 (42)    | 1,39    | 1,50        | 0,58    | 2,00        | <b>2,39</b> | 0,06           |
| 1752       | 42 (42)    | 1,36    | 1,50        | 0,58    | 2,00        | <b>2,33</b> | 0,019          |
| 869        | 24 (42)    | 1,84    | 2,50        | 0,79    | 2,00        | <b>2,32</b> | 0,1            |
| 1760       | 39 (42)    | 1       | 0,00        | 0,43    | 2,00        | <b>2,30</b> | 0,027          |
| 1902       | 42 (42)    | 1,14    | 1,50        | 0,50    | 2,00        | <b>2,29</b> | 0,012          |
| 1381       | 21 (42)    | 1,9     | 2,00        | 0,85    | 1,50        | <b>2,24</b> | 0,031          |
| 1191       | 24 (42)    | 2,13    | 1,00        | 0,95    | 3,50        | <b>2,24</b> | 0,023          |
| 1404       | 27 (42)    | 2,01    | 2,50        | 0,91    | 1,50        | <b>2,21</b> | 0,88           |
| 1926       | 24 (42)    | 1,78    | 1,50        | 0,81    | 2,50        | <b>2,21</b> | 0,089          |
| 334        | 24 (42)    | 1       | 0,00        | 0,45    | 3,00        | <b>2,20</b> | 0,23           |
| 1222       | 36 (42)    | 1,87    | 3,00        | 0,85    | 1,00        | <b>2,19</b> | 0,082          |
| 1743       | 33 (42)    | 1,87    | 2,50        | 0,89    | 2,00        | <b>2,09</b> | 0,2            |
| 806        | 36 (42)    | 1,41    | 1,00        | 0,68    | 2,00        | <b>2,07</b> | 0,032          |
| 270        | 21 (42)    | 1,47    | 3,50        | 0,71    | 4,00        | <b>2,06</b> | 0,08           |
| 1157       | 27 (42)    | 1,42    | 1,00        | 0,69    | 2,00        | <b>2,06</b> | 0,23           |
| 314        | 18 (42)    | 1,01    | 0,00        | 0,50    | 1,00        | <b>2,03</b> | 0,0079         |

Die 30 regulierten Proteine zeigen 2 - 3,5-fache Änderungen der Expression. Die stärkste Regulation liegt bei einem Signalverhältnis von Maximal- zu Minimalwert von 3,53. Für acht der Proteine ergibt sich nur eine geringe Signifikanz zwischen minimalem und maximalem Wert (Master Nr.:1837, 1619, 1755, 1074, 1404, 1743, 1157 und 334). Die Regulation wurde nicht nur anhand der zwei Zeitpunkte festgemacht, sondern die Proteinmengen wurden während des gesamten vier Stunden Zeitraumes betrachtet. Hieraus resultieren auch für die oben genannten Proteine zellzyklusabhängige Expressionsänderungen. Die Expressionsprofile der 30 regulierten Proteine und zweier nicht regulierter sind in Abb. 14 dargestellt. Hierbei handelt es sich um die Originalgraphen aus DeCyder. Gezeigt sind die Proteinmehrmengen im Vergleich zum Standard. Die Kreuze repräsentieren die

normierten Mittelwerte der Proteinmenge eines Zeitpunktes, die Kreise die normierten Einzelmessungen der Zeitpunkt.

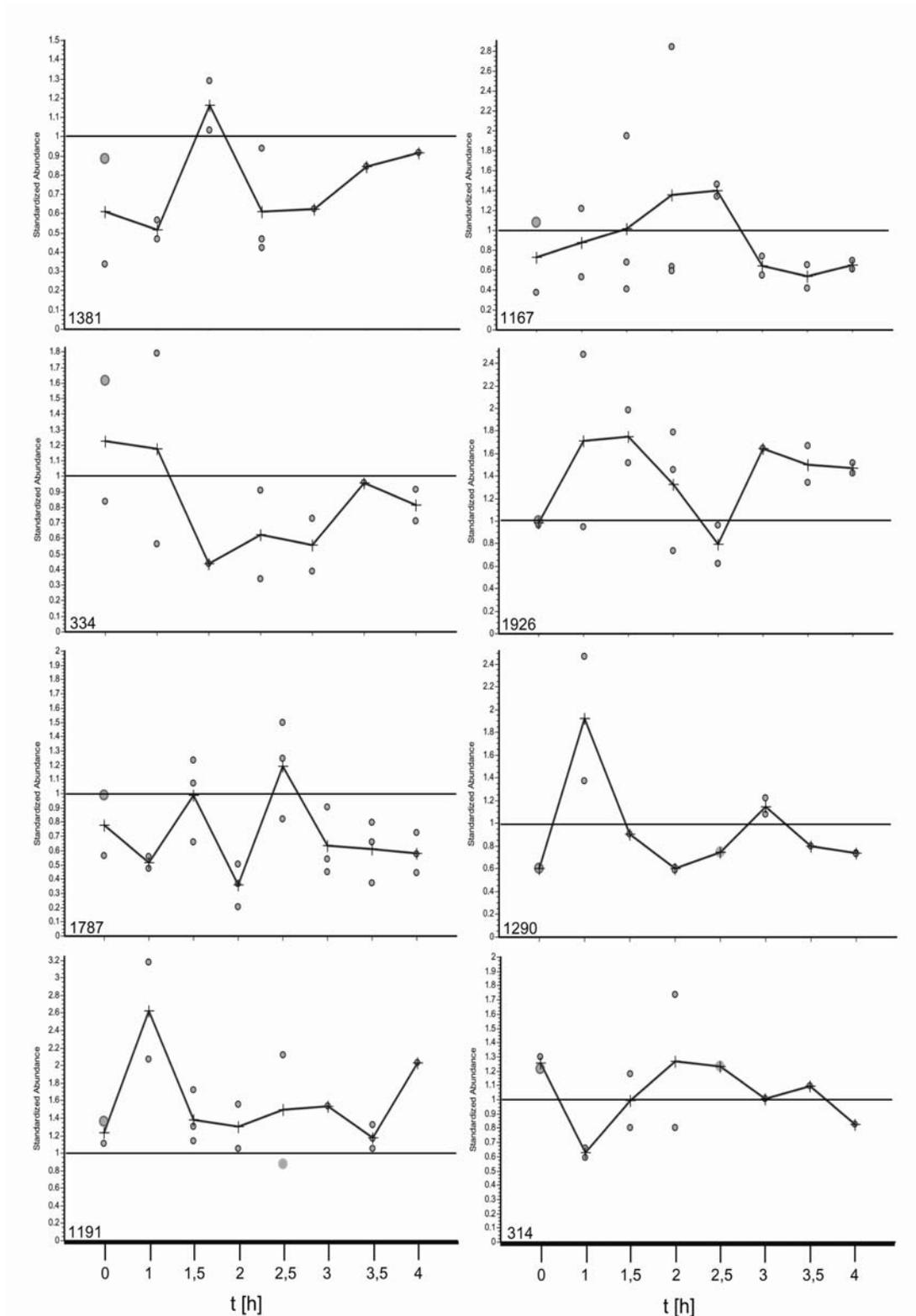


Abb. 14: **Zellzyklusabhängige Expressionsprofile von Proteinen.** Bei den Graphen handelt es sich um Originale aus der DeCyder 2D-Software. Gezeigt sind jeweils die auf den Standard normierten Proteinmengen während eines Zellzykusses (*Standardized Abundance*). Die Kreuze repräsentieren die normierten Mittelwerte der Proteinmengen eines Zeitpunktes und die Kreise die Einzelmessungen. Die Nummern der Proteine beziehen sich auf das Mastergel und wurden willkürlich festgesetzt.

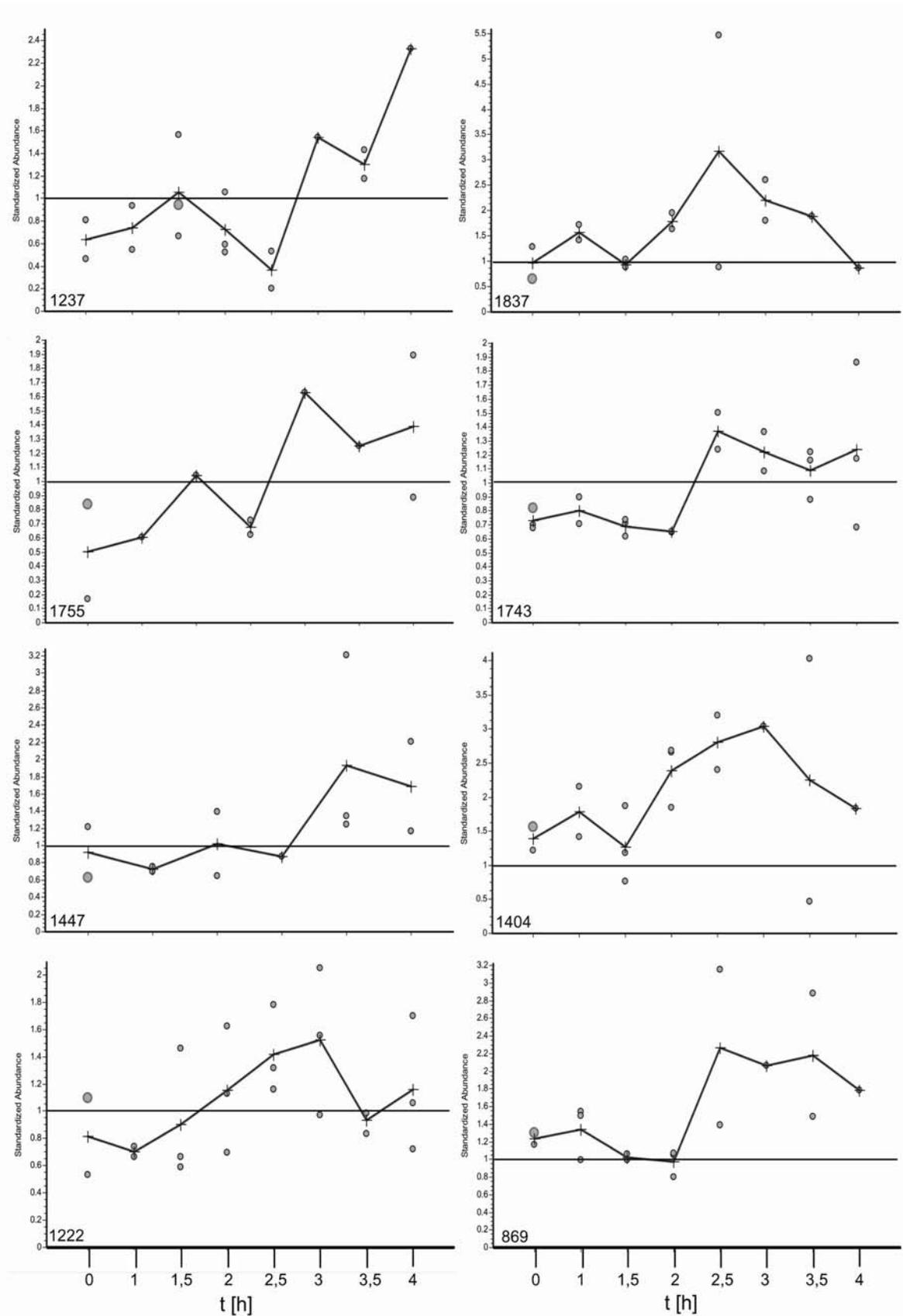


Abb. 14: **Zellzyklusabhängige Expressionsprofile von Proteinen.** Bei den Graphen handelt es sich um Originale aus der DeCyder 2D-Software. Gezeigt sind jeweils die auf den Standard normierten Proteinmengen während eines Zellzykusses (*Standardized Abundance*). Die Kreuze repräsentieren die normierten Mittelwerte der Proteinmengen eines Zeitpunktes und die Kreise die Einzelmessungen. Die Nummern der Proteine beziehen sich auf das Mastergel und wurden willkürlich festgesetzt.

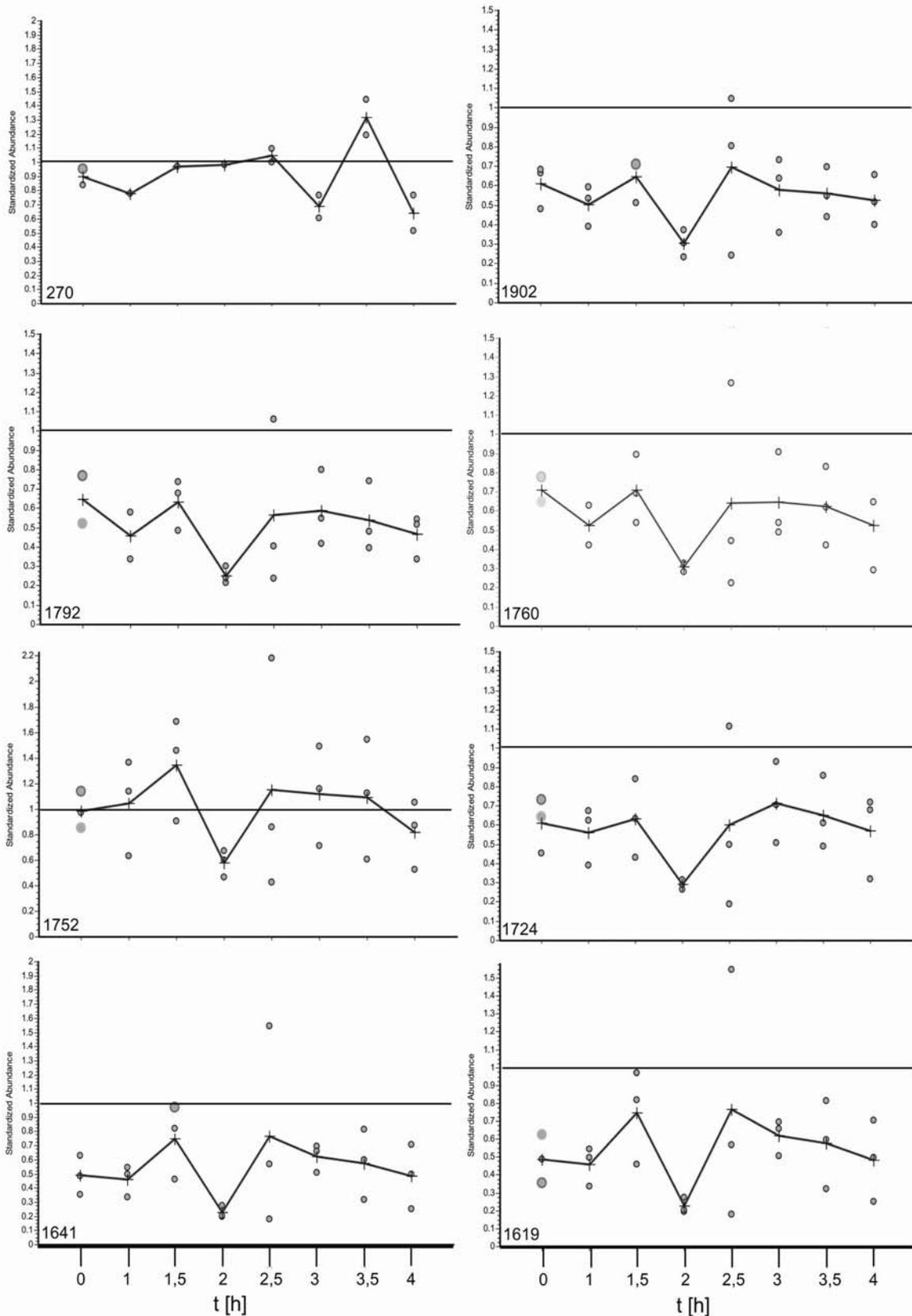


Abb. 14: **Zellzyklusabhängige Expressionsprofile von Proteinen.** Bei den Graphen handelt es sich um Originale aus der DeCyder 2D-Software. Gezeigt sind jeweils die auf den Standard normierten Proteinmengen während eines Zellzykusses (*Standardized Abundance*). Die Kreuze repräsentieren die normierten Mittelwerte der Proteinmengen eines Zeitpunktes und die Kreise die Einzelmessungen. Die Nummern der Proteine beziehen sich auf das Mastergel und wurden willkürlich festgesetzt.

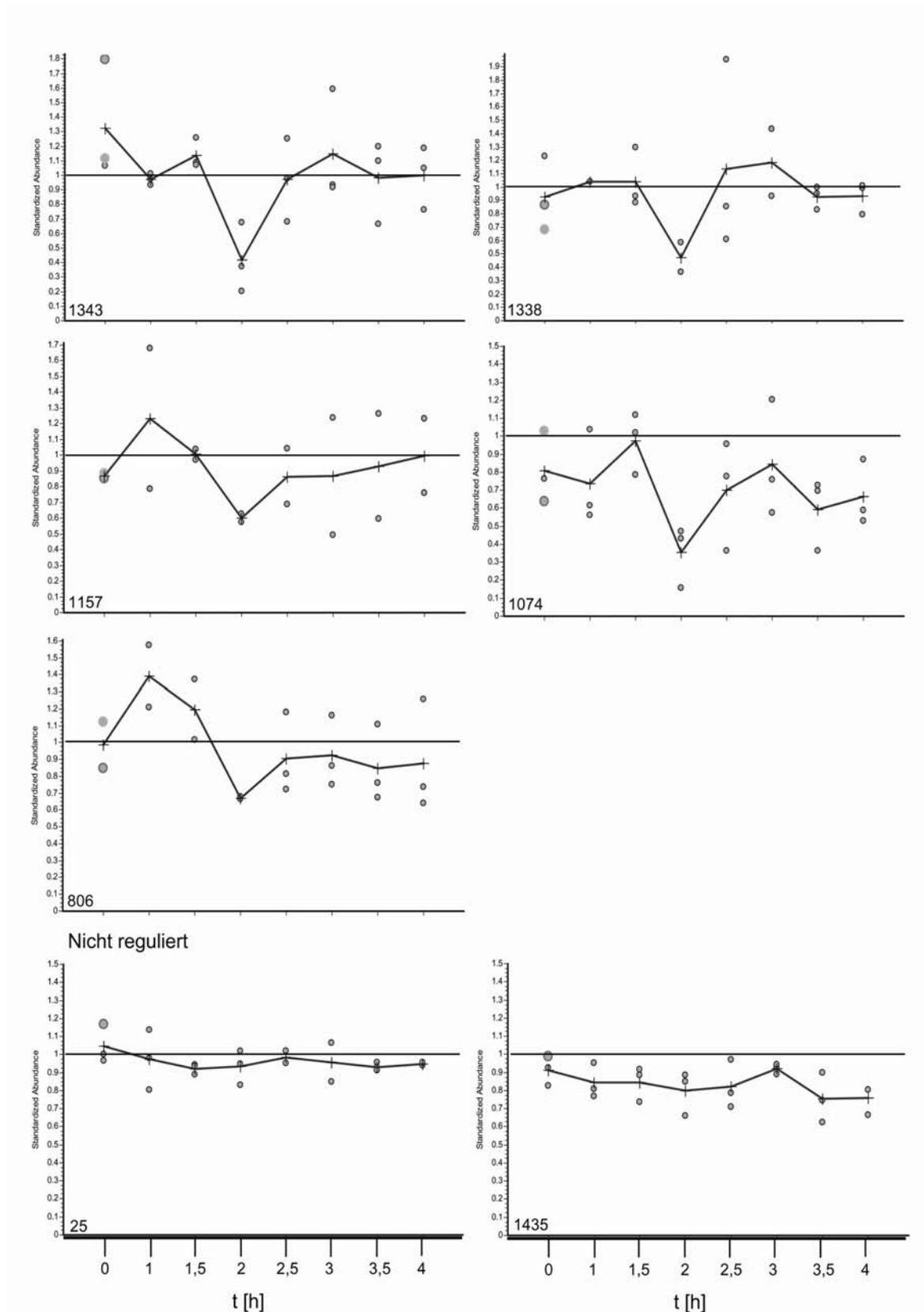


Abb. 14: **Zellzyklusabhängige Expressionsprofile von Proteinen.** Bei den Graphen handelt es sich um Originale aus der DeCyder 2D-Software. Gezeigt sind jeweils die auf den Standard normierten Proteinmengen während eines Zellzykusses (*Standardized Abundance*). Die Kreuze repräsentieren die normierten Mittelwerte der Proteinmengen eines Zeitpunktes und die Kreise die Einzelmessungen. Die Nummern der Proteine beziehen sich auf das Mastergel und wurden willkürlich festgesetzt. Zwei nicht regulierte Proteine (Master Nr. 25 und 1435) sind gezeigt.

Die zellzyklusabhängig regulierten Proteine zeigen unterschiedliche Expressionsprofile. Vier Proteine werden zu einem Zeitpunkt vor der Zellteilung hochreguliert (Master Nr. 1381, 1290, 1787 (s. u.) und 1191), während eines zum gleichen Zeitpunkt reprimiert wird (Master Nr. 314). Die Menge von acht Proteinen steigt während bzw. nach der Zellteilung an (Master Nr. 1237, 1837, 1755, 1743, 1447, 1404, 1222 und 869). Da die vier Stunden Werte dieser Proteine meist hohe Standardabweichungen aufweisen, kann nicht bestimmt werden, ob sie nach der Induktion wieder reprimiert werden. Ein Protein wird bei 3,5 h vorübergehend hochreguliert (270). Zwölf Proteine werden 2 Stunden nach Entfernen des Replikaseinhibitors, also kurz vor der Zellteilung, reprimiert (Master Nr. 1902, 1792, 1760, 1752, 1724, 1641 (s. u.), 1619, 1343, 1338, 1157, 1074 und 806). Abb. 15 zeigt eine dreidimensionale Darstellung der Mengen zweier regulierter Proteine (Master Nr. 1641 und 1787). Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen Proteinmengen bei 2 h (wenig) und 1,5 h (viel) bei Master Nr. 1641 und bei 2 h (wenig) und 2,5 h (viel) bei Master Nr. 1787. Die regulierten Proteine werden mittels Massenspektrometrie analysiert werden, um die Identität der Proteine zu aufzuklären.

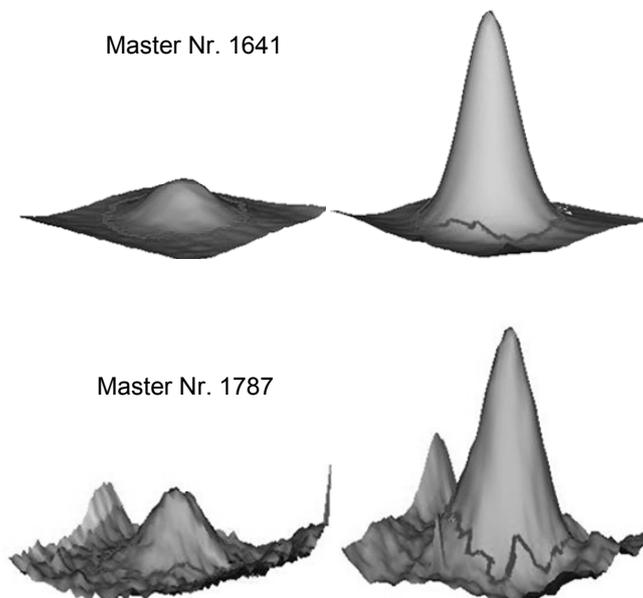


Abb. 15: **3D-Darstellung zweier Proteine.** Die Morphologie von zwei zellzyklusabhängig regulierten Proteinen ist gezeigt. Links sind die niedrigsten Proteinmengen und rechts die höchsten dargestellt.

#### 4.4. Phosphoproteine in *H. salinarum*

Die Regulation des Zellzyklusses kann auf unterschiedlichen Ebenen erfolgen. Ein bekannter Mechanismus ist die Änderung von Proteinaktivitäten durch Phosphorylierungen. Um zu ermitteln, ob diese Art der Regulation auch in *H. salinarum* existiert, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Untersuchung der Nachweisgrenze zweier anti-Phosphoprotein Antikörper. Aus zwei exponentiellen Kulturen ( $4 \times 10^8$  Zellen / ml) wurden  $1 \times 10^8$  und  $4 \times 10^8$  Zellen entnommen. Nach der Zellyse wurden die Proteinextrakte auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Membran wurde diese gefärbt (Abb. 16, oberes Bild). Die Membran wurde anschließend geteilt und mit je einem anti-Phosphoprotein Antikörper inkubiert.

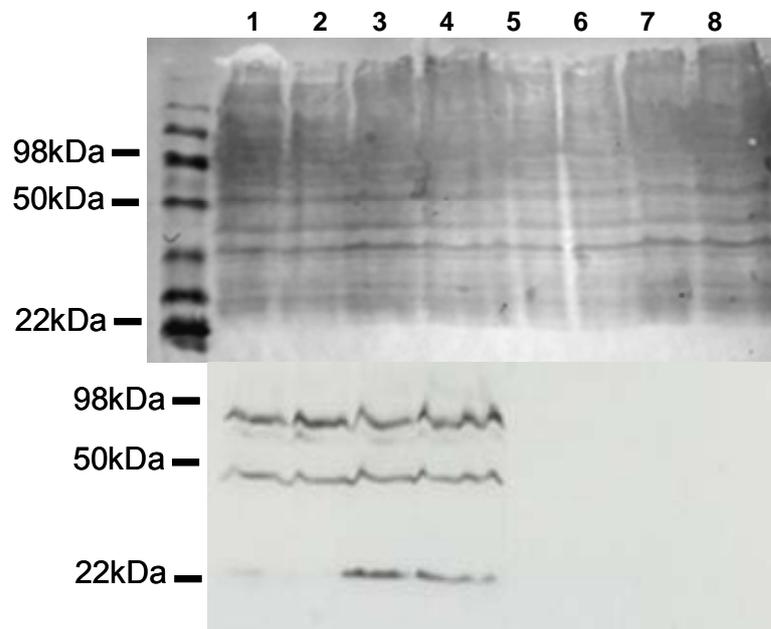


Abb. 16: **Analyse der Nachweisgrenze zweier anti-Phosphoprotein Antikörper.** Zellysate aus *H. salinarum* wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran übertragen. Die Membran wurde mit einer Tintenfärbelösung gefärbt (oberer Teil der Abbildung). Die Membran wurde geteilt und mit je einem anti-Phosphoprotein Antikörper inkubiert; Spur 1 - 4 = anti-Phosphotyrosin (1:2000); Spur 5 - 8 = anti-Phosphothreonin (1:1000). Für die Spuren 1, 2, 5 und 6 wurden  $1 \times 10^8$  Zellen verwendet, für die Spuren 3, 4, 7 und 8 wurden  $4 \times 10^8$  Zellen verwendet.

Es zeigte sich, dass die Signale für den anti-Phosphothreonin Antikörper unterhalb der Nachweisgrenze lagen (Abb. 16, unteres Bild, Spur 5 - 8). Mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper konnten fünf Proteine nachgewiesen werden, die an Tyrosin(en) phosphoryliert waren (unteres Bild, Spur 1 - 4). Mit der höheren Zell- bzw. Proteinkonzentration konnten drei deutliche Signale und zwei schwächere Signale detektiert werden (Spur 3 und 4). Die Proteinkonzentration der

Zellextrakte hatte jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Signalintensitäten. Da nur 5 Proteine nachgewiesen werden konnten war die Wahrscheinlichkeit gering in synchronen Kulturen zellzyklusabhängige Änderungen des Phosphorylierungsstatus dieser Proteine zu detektieren. Zwei *H. salinarum* Kulturen wurden synchronisiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden  $4 \times 10^8$  Zellen isoliert. Zwei Kontrollkulturen wurden in die Analyse eingeschlossen. Die Gesamtproteine der Proben wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt und auf Membranen übertragen. Die eingesetzte Antikörpermenge wurde verdoppelt (1:1000), um eine höhere Anzahl phosphorylierter Proteine zu detektieren. Es zeigte sich, dass die Erhöhung der Antikörpermenge nicht zu gesteigerten Signalintensitäten führte (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl an detektierbaren Proteinen und deren Konzentrationen unterschied sich nicht zwischen den synchronen Kulturen und den Kontrollen. Somit konnte gezeigt werden, dass die fünf nachgewiesenen Proteine nicht signifikant zellzyklusabhängig phosphoryliert werden.

#### **4.5. Zellzyklusabhängige Konzentration des putativen Signalmoleküls cAMP**

##### **4.5.1. Bestimmung der cAMP-Konzentration in exponentiellen *H. salinarum* Kulturen**

Kleine sogenannte Signalmoleküle sind häufig an dem korrekten Ablauf des Zellzyklusses beteiligt. Ein Beispiel ist cAMP, dessen Konzentration zellzyklusabhängig in mehrerer Eukaryoten oszilliert (Dickinson *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1990). Eine Methode zur quantitativen cAMP-Bestimmung wurde etabliert. In drei exponentiellen Kulturen von Komplexmedium, wurden die cAMP-Konzentrationen bestimmt und es zeigte sich, dass *H. salinarum* durchschnittlich 200 fmol cAMP pro  $1 \times 10^9$  Zellen enthält (Abb. 17). Die durchschnittliche cAMP-Konzentration von 200 fmol cAMP pro  $1 \times 10^9$  Zellen entspricht ungefähr 1 bis  $2 \times 10^5$  cAMP Molekülen pro Zelle. Die Adenylatcyclase generiert cAMP aus ATP. Damit steht die Menge an cAMP im Einklang mit ca.  $5 \times 10^6$  ATP Molekülen pro Zelle in exponentiellen *H. salinarum* Kulturen (Daten nicht gezeigt). 2 bis 4 % des in einer Zelle enthaltenen ATP wird somit für die Generierung von cAMP verwendet.

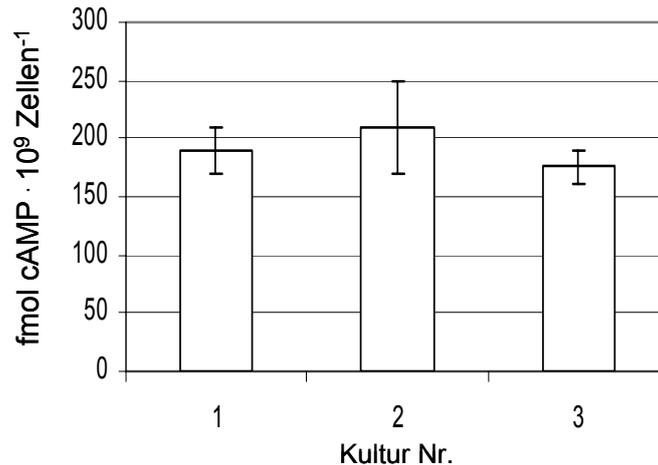


Abb. 17: **cAMP-Spiegel in exponentiellen *H. salinarum* Kulturen.** In drei unabhängigen Kulturen wurde die Konzentration von cAMP (fmol / 10<sup>9</sup> Zellen) bestimmt. Die Proben wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt.

#### 4.5.2. Bestimmung der cAMP-Konzentration in synchronen *H. salinarum* Kulturen

Es wurde untersucht, ob die Konzentration des Signalmoleküls cAMP im Zellzyklus von *H. salinarum* oszilliert. Drei exponentielle *H. salinarum* Kulturen wurden synchronisiert und nach Entfernen des Replikaseinhibitors (Zeitpunkt null Stunden) wurden alle 30 min Aliquots zur Bestimmung der cAMP-Konzentration entnommen. Die drei unabhängigen Experimente führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es war offensichtlich, dass die cAMP-Konzentration in den ersten 1,5 h nach dem Waschen der Zellen und zwischen 3,5 h und 5 h konstant blieb (Daten nicht gezeigt). In dem Bereich dazwischen (1,5 h - 3,5 h) gab es eine hohe Varianz der Konzentrationen. Um eine höhere zeitliche Auflösung dieses Bereiches zu untersuchen, wurden drei Kulturen synchronisiert und alle 15 min Proben entnommen und analysiert. Die cAMP-Konzentration einer Kultur ist in Abb. 18 A dargestellt. Sie steigt kurz vor der Zellteilung, die zwischen zwei und drei Stunden erfolgt, von 150 fmol / 10<sup>9</sup> Zellen auf 350 fmol / 10<sup>9</sup> Zellen an. Während der Zellteilung sinkt die cAMP-Konzentration auf 200 bis 250 fmol / 10<sup>9</sup> Zellen. Nach Vollendung der Teilung erhöht sich die Konzentration erneut auf etwa 300 fmol / 10<sup>9</sup> Zellen und verringert sich dann auf 150 fmol / 10<sup>9</sup> Zellen. Die durchschnittliche cAMP-Konzentration der drei unabhängigen Experimente ist in Abb. 18 B dargestellt. Da sich die absolute cAMP-Menge in den drei Einzelerperimenten unterschied, wurden die Daten normiert. Der jeweils höchste

Wert eines Experimentes wurde als 100 % definiert, die anderen Werte darauf bezogen und die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

Es zeigte sich deutlich, dass die Erhöhungen der cAMP-Konzentration vor und nach der Zellteilung sowie die Verringerung währenddessen spezifisch sind. Die zellzyklusabhängige Oszillation des Signalmoleküls impliziert, dass es an der Regulation des Fortschreitens des Zellzyklusses beteiligt ist.

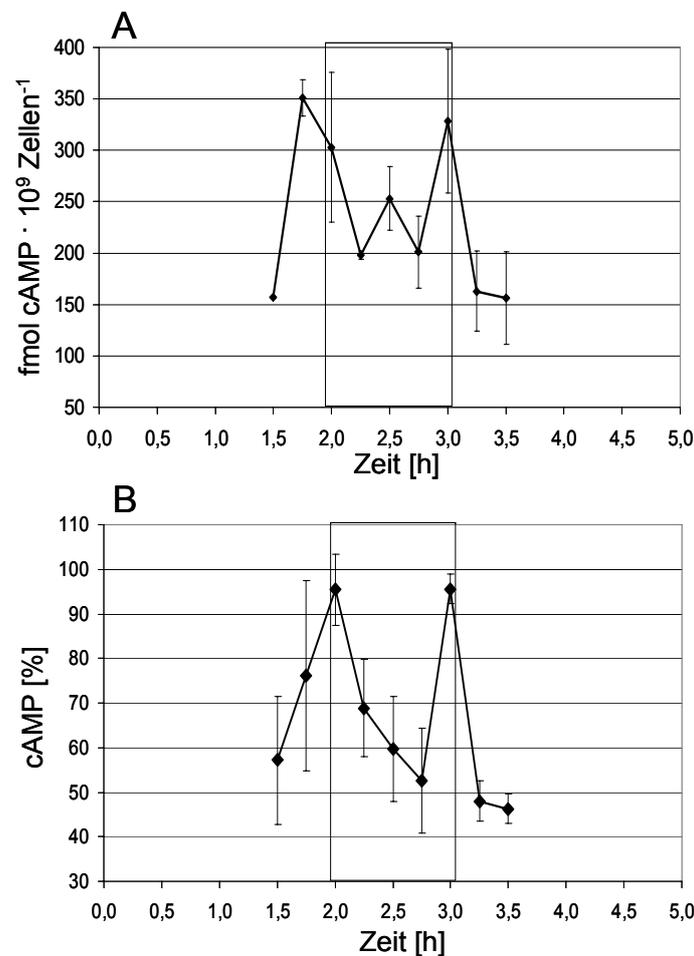


Abb. 18: **Zellzyklusabhängige Änderung der cAMP-Konzentration.** In synchronen *H. salinarum* Kulturen wurden in 15 min Intervallen die cAMP-Konzentrationen bestimmt. Die Periode der Zellteilung ist durch Boxen gekennzeichnet. **A.** Gezeigt ist ein Experiment. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die Standardabweichungen sind gezeigt. **B.** Durchschnittliche Änderungen der cAMP-Konzentration dreier biologischer Replikate. Die cAMP-Werte eines jeden Einzelexperimentes wurden auf ihren höchsten Wert normalisiert (= 100 %), bevor die Mittelwerte und Standardabweichungen der Experimente gebildet wurden.

## 4.6. Analyse der Replikation in *H. salinarum*

### 4.6.1. Replikation in exponentiellen *H. salinarum* Kulturen

Die Transkriptomanalysen lieferten keinen genauen Hinweis darauf, zu welchem Zeitpunkt die Replikation in synchronen *H. salinarum* Kulturen stattfindet, da die Gene für die an der Replikation beteiligten Proteine größtenteils nicht transkriptionsreguliert sind. Um die Synthesephase zu ermitteln, wurde eine Methode etabliert, um den Einbau des Thymidin-Analogons 5'-Brom-2-Deoxyuridin (BrdU) in die DNA exponentieller und synchroner Zellen nachzuweisen. Der Einbau erfolgt nur in replizierenden Zellen und sollte somit die Phase der DNA-Synthese reflektieren. Exponentielle *H. salinarum* Kulturen wurden zunächst für vier Stunden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen BrdU (20 µg / ml und 500 µg / ml) im Medium inkubiert. Unterschiedliche Zellzahlen wurden entnommen und sedimentiert. Die Zellen wurden lysiert und die genomische DNA zur Spaltung über Nacht mit einer Restriktionsendonuklease (NotI) inkubiert. Die gespaltene DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 19 A, oberes Bild) und auf eine Membran transferiert. Der BrdU-Einbau wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen (Abb. 19 A, unteres Bild). Auf eine vorherige Reinigung der genomischer DNA wurde verzichtet, um Verluste und somit eine Ungleichverteilung der DNA in den einzelnen Proben zu verhindern. Es zeigte sich, dass die hohe BrdU-Konzentration im Vergleich zu der niedrigeren zu keinem gesteigerten Einbau des Analogons in die DNA führte (Abb. 19 A; Vergleich von Spur 5 und 6). Die DNA-Konzentration in  $1 \times 10^6$  Zellen lag unterhalb der Nachweisgrenze, da keine Signale detektiert werden konnten (Spur 1 und 2). Bei der Verwendung von  $1 \times 10^7$  Zellen konnten schwache Signale erkannt werden (Spur 4 und 5). Wurden  $1 \times 10^8$  Zellen eingesetzt, so konnten deutlich Fragmente genomischer DNA detektiert werden, die das Basenanalogue eingebaut hatten (Spur 6 und 7). Allerdings war die Konzentration der DNA bei Verwendung von  $1 \times 10^8$  Zellen zu hoch, um reproduzierbar in einem kleinen Volumen (40 µl) mit einer Restriktionsendonuklease gespalten zu werden (z. B. Abb. 19 A, Spur 1 des Agarosegels). In weiteren Versuchen wurden Proben mit  $5 \times 10^7$  Zellen verwendet. Der Antikörper zeigte keinerlei Kreuzreaktion mit Zelllysaten, die nicht mit BrdU behandelt wurden (Abb. 19 A und B: Spur 1). Zur zeitabhängigen Analyse des Einbaus von BrdU in die DNA wurden exponentielle *H. salinarum* Kulturen für 75

min in Medium mit 20 µg / ml BrdU inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Aliquots entnommen. Die niedrige Konzentration wurde gewählt, um die Menge an freiem BrdU in den Zellen gering zu halten und mögliche toxische Effekte zu minimieren. Zudem konnte der BrdU-Einbau wie in Abb. 19 A gezeigt mit der höheren Konzentration nicht gesteigert werden. Der Einbau von BrdU in die DNA erfolgte bereits nach sehr kurzen Inkubationszeiten von 5 bis 10 min (Abb. 19 B; Spur 2 und 3). Je länger die Zellen auf Medium mit dem Basenalogon wuchsen, desto intensiver wurden die Signalintensitäten (Spur 2 - 8). Nach weiteren Optimierungsschritten (z. B. längeres Waschen, 3 x 10 min statt wie zuvor 2 x 5 min, Vergleich Abb. 19 A und B) war die etablierte Methode reproduzierbar und sensitiv genug, um die Replikation in synchronen *H. salinarum* Kulturen zu untersuchen.

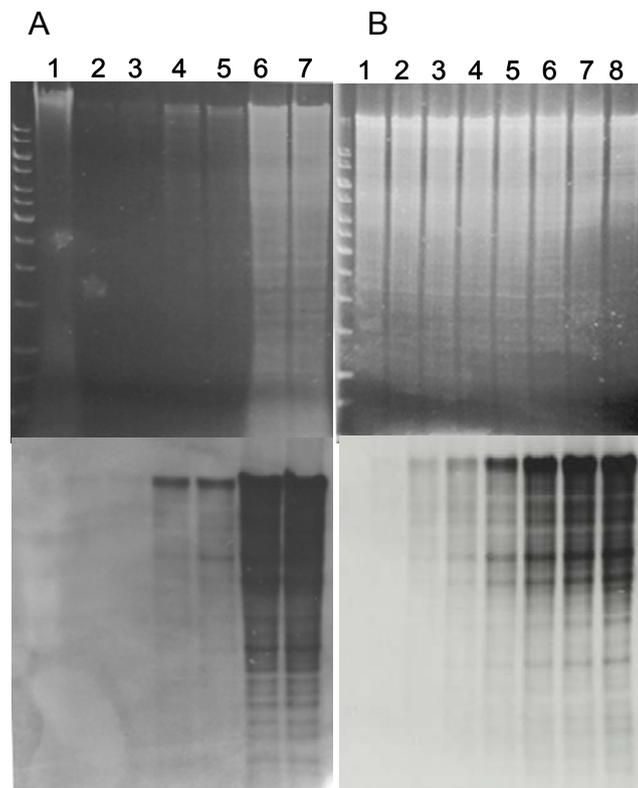


Abb. 19: **BrdU-Einbau in exponentiellen *H. salinarum* Kulturen.** **A.** Aliquots mit unterschiedlichen Zellzahlen wurden aus exponentiellen Kulturen entnommen, welche für 4 h mit 20 µg / ml, bzw. 500 µg / ml BrdU inkubiert worden waren. Nach Zellyse und Spaltung der genomischen DNA wurden die Ansätze vollständig auf einem Agarosegel aufgetrennt (oberes Bild). Spur 1 =  $1 \times 10^8$  Zellen, ohne BrdU; Spur 2 und 3 =  $1 \times 10^6$  Zellen; Spur 4 und 5 =  $1 \times 10^7$  Zellen; Spur 6 und 7 =  $1 \times 10^8$  Zellen; Spur 2, 4 und 6 mit 20 µg / ml BrdU; Spur 3, 5 und 7 mit 500 µg / ml BrdU. **B.** Zeitabhängige Analyse des BrdU-Einbaus. Aliquots mit je  $5 \times 10^7$  Zellen wurden aus exponentiellen Kulturen isoliert, welche unterschiedlich lange mit 20 µg / ml BrdU inkubiert worden waren. Spur 1 = Kontrolle, ohne BrdU; Spur 2 = 5 min; Spur 3 = 10 min; Spur 4 = 15 min; Spur 5 = 30 min; Spur 6 = 45 min; Spur 7 = 60 min; Spur 8 = 75 min. Oberes Bild: Agarosegel, unteres Bild: exponierter Film. (anti - BrdU 1:2000; anti - Maus 1:10000).

#### 4.6.2. Replikation in synchronen *H. salinarum* Kulturen

Zur Ermittlung der S-Phase im Zellzyklus wurden drei unabhängige Kulturen synchronisiert. Drei Kontrollkulturen wurden wie die synchronen Kulturen behandelt mit der einzigen Ausnahme, dass kein Aphidicolin hinzugegeben wurde. Nach dem Waschen der Zellen (null min) wurden alle Kulturen mit 20 µg / ml BrdU versetzt. Alle fünfzehn Minuten wurden Proben mit je  $5 \times 10^7$  Zellen entnommen, in Wasser lysiert und die genomische DNA zur Spaltung über Nacht mit *NotI* inkubiert. Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA. Die Gele wurden in Ethidiumbromid gefärbt, die DNA mittels Fluoreszenzanregung (302 nm) visualisiert und dokumentiert. Die gespaltene DNA wurde auf eine Membran transferiert und der BrdU-Einbau mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Zur Quantifizierung der Signalintensitäten erfolgte eine densitometrische Auswertung mit der Software „ImageJ“. Da die willkürlichen Signalintensitäten aufgrund von unterschiedlich lang gefärbten DNA-Gelen und unterschiedlich lang exponierten Filmen variierten, wurde der jeweils höchste Wert gleich 100 % gesetzt und die weiteren Werte darauf bezogen. Die Werte der Filme wurden anhand der Werte der Agarosegele normiert. Die Ergebnisse der drei Kulturen sind in Abb. 20 graphisch dargestellt. Die schwarzen Balken repräsentieren den BrdU-Einbau in die DNA der synchronen Kulturen, die weißen den Einbau des Analogons in die DNA der Kontrollen. Die synchronen Kulturen begannen etwas später als die Kontrollen mit der Synthese der DNA. Bei den Kontrollkulturen konnte bereits nach 15 - 30 Minuten der Einbau des Basenanalogs nachgewiesen werden. Die synchronen Kulturen hingegen schienen erst nach ca. 45 Minuten mit der Replikation zu beginnen. Die Signalintensitäten der synchronen Kulturen nahmen zwischen 45 min und 90 min stärker zu als die der Kontrollen. Während dieser Zeit wurde besonders viel BrdU in die DNA eingebaut zu werden. Nach etwa 90 Minuten, also 30 Minuten bevor die Phase der Zellteilung beginnt, schien die Replikation in zwei der synchronen Kulturen (Kultur 1 und 3) beendet worden zu sein. Bei der dritten synchronen Kultur schien die S-Phase 15 Minuten später vollendet zu sein. Die Signale der Kontrollkulturen nahmen kontinuierlich zu, je länger die Zellen in Medium mit BrdU kultiviert wurden. Somit sind Unterschiede zwischen den synchronen Kulturen und den Kontrollkulturen zu erkennen. Die Synthesephase synchroner Kulturen könnte 45 - 60 Minuten betragen. Während der Analyse der Zelldichten und -längen der synchronen Kulturen stellte sich heraus, dass die Inkubation mit dem

Basenanalogen die Synchronität der Zellen deutlich herabsetzte, so dass sich in der Teilungsphase nur noch ca. 40 - 50 % der Zellen synchron teilten. Dies könnte erklären, warum die Unterschiede nicht noch deutlicher hervortreten.

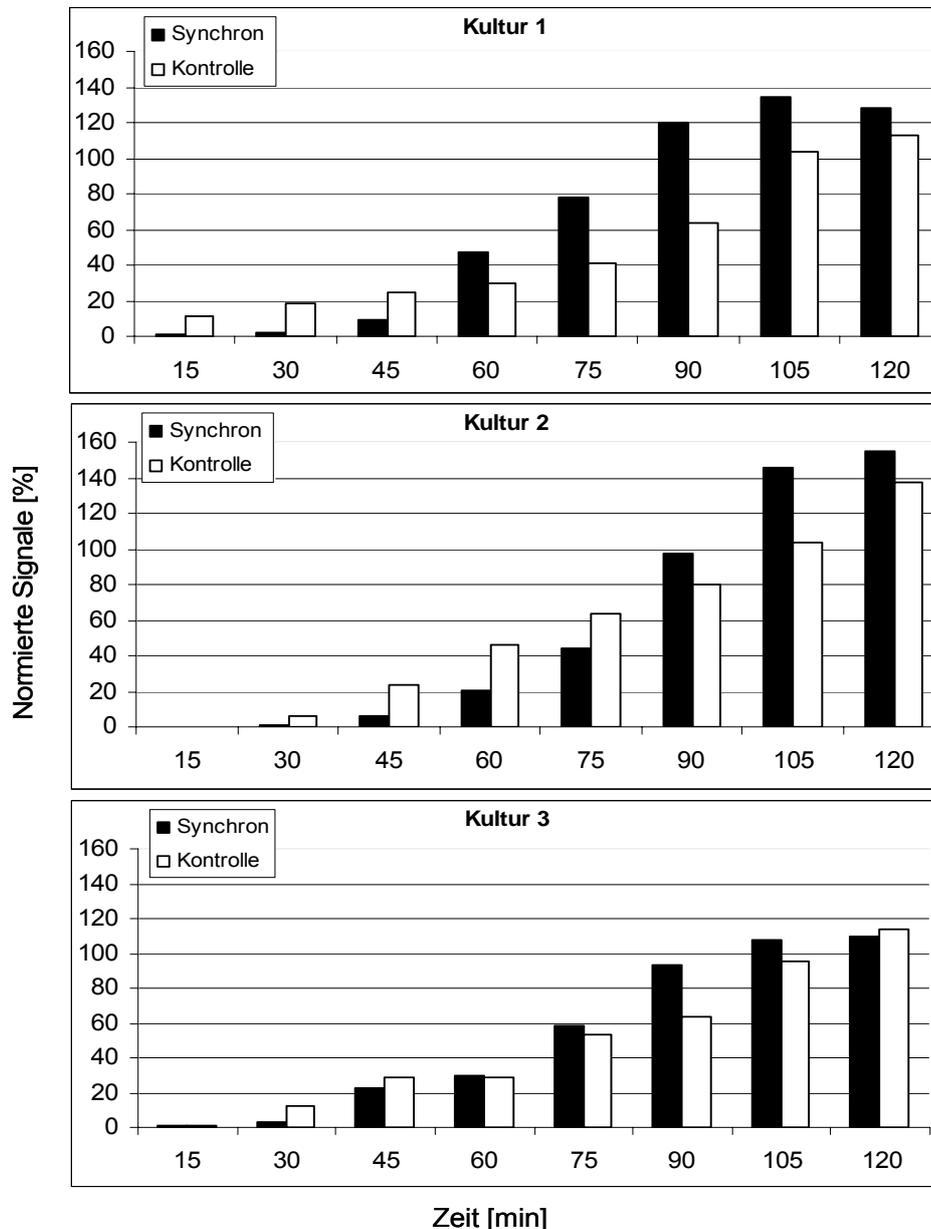
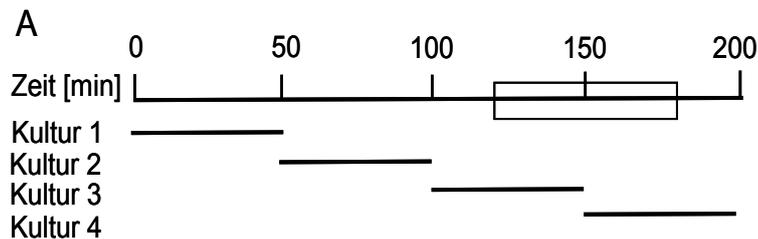


Abb. 20: **Analyse der Replikationsphase in synchronen *H. salinarum* Kulturen.** Zu drei synchronen Kulturen (schwarze Balken) sowie zu drei Kontrollkulturen (weiße Balken) wurde nach dem Waschen der Zellen je 20 µg / ml BrdU gegeben. In 15 min Intervallen wurden je  $5 \times 10^7$  Zellen isoliert. Die Zellen wurden lysiert und die DNA gespalten. Die DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegele wurden fotografiert und zusammen mit den exponierten Filmen mit der Software „ImageJ“ ausgewertet. Der jeweils höchste Wert der willkürlichen Signalstärken wurde gleich 100 % gesetzt und die weiteren Werte darauf bezogen. Diese Werte wurden anhand der Werte der Agarosegele normiert.

Aufgrund der geringen Synchronität der Zellen nach der BrdU-Applikation wurde die Versuchsdurchführung verändert. Die synchronen Zellen sollten kürzere Zeit mit dem Basenanalogen BrdU inkubiert werden. Für ein Experiment wurden vier

Kulturen synchronisiert und nach dem Entfernen des Replikaseinhibitors wurde zu der ersten Kultur 20 µg / ml BrdU gegeben. Nach 50 Minuten wurden aus dieser  $5 \times 10^7$  Zellen isoliert und Kultur 2 mit 20 µg / ml BrdU versetzt. Aus der zweiten Kultur wurde nach 50 min eine Probe entnommen. Zur gleichen Zeit wurde die dritte Kultur mit BrdU versetzt usw. Vier Kontrollkulturen wurden parallel ohne Aphidicolin kultiviert. Die BrdU-Behandlung erfolgte wie oben erwähnt. Eine schematische Darstellung der Durchführung ist in Abb. 21 A gezeigt. Es wurde in diesem Fall nicht nur die Zeit bis zur Zellteilung (120 min) untersucht, sondern auch die während (120 - 180 min, Box) und nach der Teilung (180 - 200 min).



**B**

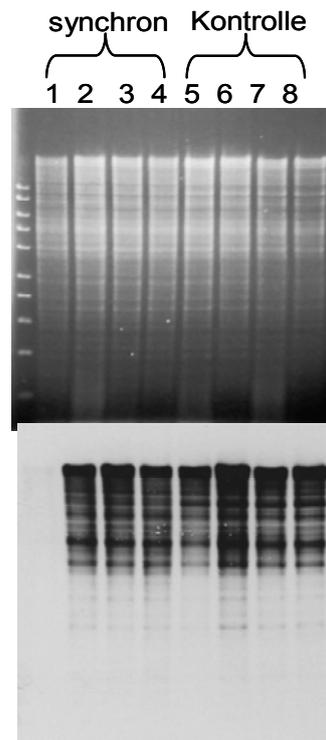


Abb. 21: **Modifizierte Analyse der S-Phase in synchronen *H. salinarum* Kulturen.** **A.** Graphische Darstellung des Versuches. Die waagerechten Striche kennzeichnen die Inkubationsphase mit BrdU. Die Box markiert die Zellteilungsphase. **B.** Vier synchrone Kulturen (Spur 1 - 4) sowie vier Kontrollkulturen (Spur 5 - 8) wurden zu bestimmten Zeitpunkten für je 50 min mit je 20 µg / ml BrdU inkubiert. Aliquots a  $5 \times 10^7$  Zellen wurden sedimentiert, lysiert und die DNA wurde mit einer Restriktionsendonuklease gespalten. Die Ansätze wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (oberes Bild), die DNA auf eine Membran transferiert und mit Antikörpern inkubiert (anti - BrdU 1:2000; anti - Maus 1:10000). Ein Film (unteres Bild) wurde exponiert.

Der Beginn der S-Phase in synchronen *H. salinarum* Kulturen schien mit diesem Experiment verifiziert werden zu können. In den ersten 50 Minuten nach Entfernung des Inhibitors wurde in der ersten synchronen Kulturen kein BrdU in die DNA eingebaut und somit die DNA nicht repliziert (Abb. 21 B; Spur 1). Die erste Kontrollkultur replizierte bereits nach dem Waschen der Zellen (Spur 5), was zeigt, dass das Waschen der Zellen die Replikation nicht beeinflusst und dass der verzögerte Start der Replikation in den mit Aphidicolin behandelten Kulturen wahrscheinlich auf die Synchronität der Zellen zurückzuführen ist. In den folgenden 50 min begannen die synchronen Zellen, ihr Genom zu replizieren, da viel BrdU nachgewiesen werden konnte (Spur 2). Das Ende der Synthesephase konnte nicht verifiziert werden, da BrdU auch in den späteren Kulturen, bis zur Zellteilung und danach, nachgewiesen werden konnte (Spur 3 und 4). Die vier Kontrollkulturen replizierten gleichmäßig zu allen Zeiten (Spur 5 - 8). Der Versuch wurde dreimal wiederholt und in keinem der drei Experimente konnte das Ende der Replikation ermittelt werden. Der Grad der Synchronität der Kulturen wurde während des Experimentes ermittelt. Wieder zeigte sich, dass die Synchronität mit steigender Dauer der BrdU-Behandlung abnahm. Es wurden weitere Versuche durchgeführt, um eine eventuelle Replikationspause vor Beginn der zweiten Zellteilung zu untersuchen. Drei weitere Kulturen wurden synchronisiert und die Zugabe des Basenanalogs erfolgte in der ersten Kultur 20 min nach der ersten Zellteilungsphase (200 min). Nach 50minütiger Inkubation (250 min) wurden  $5 \times 10^7$  Zellen isoliert und die zweite Kultur mit BrdU versetzt usw. Drei Kontrollkulturen wurden gleich behandelt. In allen Kulturen wurde das Basenanalogon während der jeweils 50 minütigen Inkubation in die DNA eingebaut (Daten nicht gezeigt). Die letzte Probe wurde kurz vor der zweiten synchronen Teilung entnommen, und auch hier replizierten die Zellen (Probenentnahme bei 350 min; zweite Teilung ab 360 min). Scheinbar erfolgt die DNA-Synthese (nahezu) während des gesamten Zellzyklusses.

#### 4.7. Expression von GFP-Fusionsproteinen in *H. salinarum*

Für die Analyse von Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklusses beteiligt sind, können diese mit einem fluoreszierenden Marker wie z. B. GFP markiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Mehrere Modellversuche sollten die Verwendbarkeit von GFP-Fusionsproteinen in *H. salinarum* aufklären.

##### 4.7.1. Generierung von Vektoren zur Expression von GFP-Fusionen

Zur Untersuchung der Transkription und der Translation von GFP, der Induzierbarkeit von Promotoren sowie der Analyse der Entstehung der Purpurmembran wurden unterschiedliche Vektoren erstellt. Ein membranständiges (Bop=Bacterio-opsin) und ein lösliches Protein (Arg=Arginindeiminase) wurden mit GFP fusioniert und unter die Kontrolle dreier verschiedener Promotoren gestellt (Klonierungsstrategie siehe 3.3.10.). Als Ausgangsvektor diente der von U. Herrmann erstellte Vektor pUH6 (Herrmann, 2002). Als Vorlage zur Amplifikation von *gfp* diente der Vektor pJAM1020 (Reuter & Maupin-Furlow, 2004). Alle generierten Vektoren (Abb. 22) wurden sequenziert, in *H. salinarum* transformiert und mittels PCR nachgewiesen. Alle transformierten Stämme zeigten die gleichen Wachstumsraten und erreichten dieselbe Dichte in der stationären Wachstumsphase.

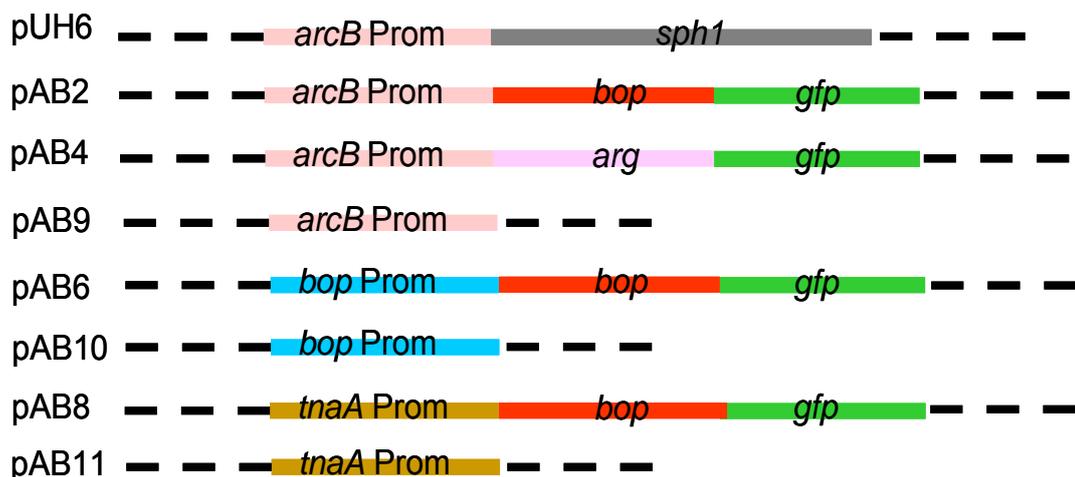


Abb. 22: **Vektoren zur Analyse der Expression von GFP-Fusionen.** Der Ausgangsvektor pUH6 wurde von U. Herrmann erstellt. Er enthält den offenen Leserahmen (orf) von *sph1* unter Kontrolle des *arcB* Promotors (*arc*=Arginincluster; Prom=Promotor). Die offenen Leserahmen von *bop* (*bacterio-opsin*) und *arg* (*arginindeiminase*) wurden ohne das Stopp-Kodon mit *gfp* fusioniert und unter die Kontrolle des *arcB* Promotors, des *bop* Promotors und des *tnaA* (putativer *tryptophanase* Promotors) gestellt. Drei Kontrollplasmide wurden erstellt, die jeweils nur den Promotor beinhalten.

#### 4.7.2. Analyse putativ-induzierbarer Promotoren

Für *H. salinarum* existiert *in vitro* bisher kein induzierbarer Promotor. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit zwei putativ-induzierbare Promotoren mittels *gfp* Fusionen analysiert werden. Des Weiteren wurde die wachstumsphasenabhängige Expression von *bop* unter der Kontrolle des endogenen Promotors untersucht. Die Transkription des *bop-gfp* Fusionsgens von unterschiedlichen Promotoren konnte in den drei Stämmen durch Northern Blot Analysen bestätigt werden (Abb. 23 und 24). Auch die Translation des Fusionsproteins zeigte sich in allen drei Stämmen in mittel- bis spätstationären Kulturen während der Fluoreszenzmikroskopie. In dem Stamm *H. s.* / pAB4 (*arcB* Promotor + *arg-gfp*) konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Ebenso konnten in diesen Zellen keine Signale bei der Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde dieser Stamm nicht weiter charakterisiert.

Um die Induzierbarkeit des *arcB* Promotors und des putativen Tryptophanase Promotors zu untersuchen, wurden die Stämme *H. s.* / pAB2 (*arcB* Promotor + *bop-gfp*) und *H. s.* / pAB8 (putativer *tnaA* Promotor + *bop-gfp*) auf Minimalmedium kultiviert und in der späten exponentiellen Wachstumsphase mit Arginin (0,5 bis 50 mM) bzw. Tryptophan (0,5 - 7,5 mM) versetzt. Nach 30 min wurden Zellen für die RNA Isolierung entnommen und Northern Blot Analysen mit einer *gfp* spezifischen Sonde durchgeführt. Aus den Kulturen wurden des Weiteren vor der Induktor Zugabe und bis zu vier Stunden danach mehrfach Proben für die Fluoreszenzmikroskopie entnommen. Es zeigte sich, dass das Fusionsgen bereits ohne Zugabe der potentiellen Induktoren von beiden Promotoren aus transkribiert wurde (Abb. 23 A, Spur 4; B, Spur 1). Eine Zugabe von Arginin (A) oder Tryptophan (B) führte zu keiner gesteigerten Transkriptmenge. Höhere Konzentrationen (ab 3 mM) der Aminosäuren verursachten verringerte Transkriptmengen (Abb. 23 A, Spur 2 und 3; B, Spur 5 - 7). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die Zellen bereits vor der Zugabe der Aminosäuren fluoreszierende Signale hatten (Abb. 23 C und D). Die Zugabe der Aminosäuren führte nicht zu einer Änderung der Fluoreszenzsignale (Daten nicht gezeigt). Beide Promotoren waren somit nicht geeignet, um regulierte Genexpressionen in *H. salinarum* zu untersuchen.

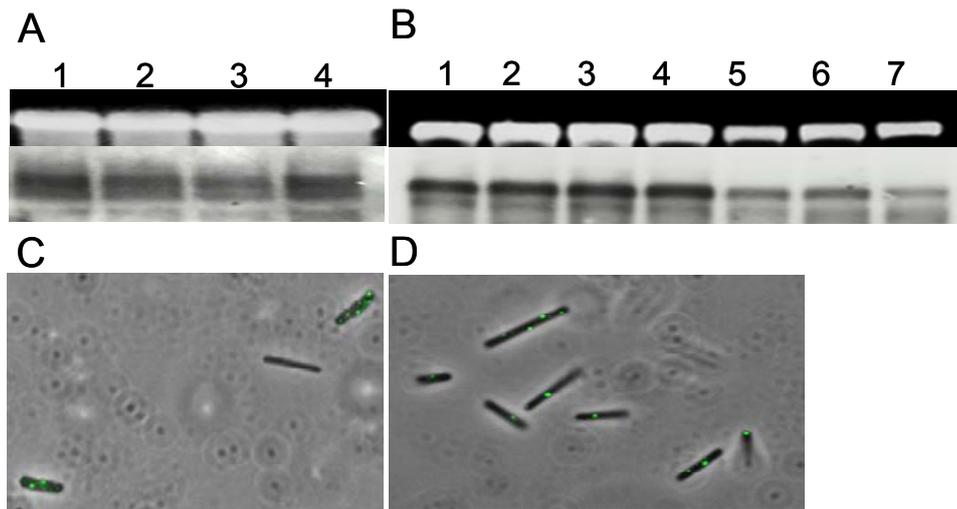


Abb. 23: **Northern Blot Analysen und Fluoreszenzmikroskopie zur Induzierbarkeit des *arcB* und des putativen *tnaA* Promotors.** *H. salinarum* Kulturen wurden bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase in Minimalmedium angezogen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Arginin- bzw. Tryptophankonzentrationen versetzt. Die Expression von Bop-GFP wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie zu mehreren Zeitpunkten vor und nach Zugabe untersucht. Aliquots für die RNA Isolierung wurden 30 min nach Zugabe von Arginin bzw. Tryptophan entnommen. 2 µg Gesamt-RNA wurden für die Analyse eingesetzt. **A.** Induzierbarkeit des *arcB* Promotors. *H. s.* / pAB2 (*arcB* Promotor + *bop-gfp*; Spur 1 - 3) wurde mit 0,5 mM (1); 5 mM (2) und 50 mM (3) Arginin (gelöst in Tris/HCl, pH = 7,1) sowie ohne Zugabe (4) inkubiert. **B.** Induzierbarkeit des putativen *tnaA* Promotors. *H. s.* / pAB8 (*tnaA* Promotor + *bop-gfp*; Spur 2 - 7) wurde mit 0,5 mM (2); 1 mM (3); 2 mM (4); 3 mM (5); 5 mM (6) und 7,5 mM (7) Tryptophan (gelöst in Tris/HCl, pH = 7,1) sowie ohne Zugabe (1) inkubiert. **C.** und **D.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *H. s.* / pAB2 (C) und *H. s.* / pAB8 (D) vor Zugabe der Aminosäuren.

#### 4.7.3. Analyse der Purpurmembran-Bildung in lebenden Zellen

Die Transkription des chromosomalen *bop* und der auf dem Vektor kodierten Fusionsgene wurde mit Northern Blot Analysen untersucht. Es wurden zwei verschiedene Sonden verwendet, die eine spezifisch für *bop* (Abb. 24 A), die andere spezifisch für *gfp* (Abb. 24 B). Aus stationären Kulturen (*H. s.*; *H. s.* / pAB11 (putativer *tnaA* Promotor); *H. s.* / pAB8 (putativer *tnaA* Promotor + *bop-gfp*); *H. s.* / pAB10 (*bop* Promotor); *H. s.* / pAB6 (*bop* Promotor + *bop-gfp*)) wurden Aliquots für die RNA-Isolierung entnommen.

Das chromosomale *bop* Transkript konnte in allen fünf Stämmen nachgewiesen werden (Abb. 24 A; Spur 1 - 5). Als Ladekontrolle ist die 23S rRNA gezeigt. Die reduzierte Transkriptmenge in dem Stamm *H. s.* / pAB8 (OE4331 Promotor + *bop-gfp*) zeigte sich in weiteren Analysen nicht (Spur 3). Es wurde in diesem Experiment wahrscheinlich dadurch verursacht, dass die anderen Stämme früher in die stationäre Phase eintraten. Die Transkriptgröße des chromosomalen *bop* belief sich auf 750 nt, was ungefähr der Größe des offenen Leserahmens entspricht (A; kräftige Signale). Das *bop-gfp* Gen konnte unter der Kontrolle beider Promotoren exprimiert werden (Spur 3 und 5; Abb. 24 A und B). Die ermittelte

Größe war 1510 nt (A und B; obere Signale). Für alle Transkripte wurde jeweils mehr als eine Bande nachgewiesen, was auf eine ineffiziente Termination der Transkription hindeutet.

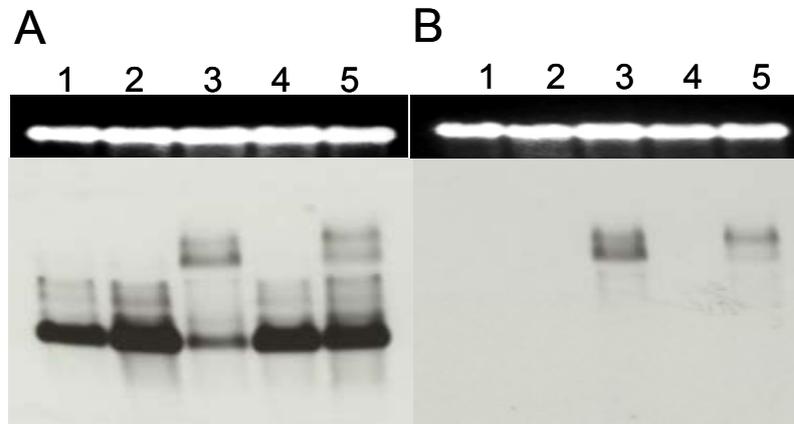


Abb. 24: **Northern Blot Analyse von chromosomalen *bop* und plasmidkodierten *bop-gfp* Transkripten.** Aus stationären Kulturen wurden Zellen für RNA Isolierung entnommen. 2  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden für die Analyse eingesetzt. Zwei verschiedene Sonden wurden verwendet: eine spezifisch für *bop* (A), die andere spezifisch für *gfp* (B). Spur 1 = *H. s.*; Spur 2 = *H. s.* / pAB11 (OE4331 Promotor); Spur 3 = *H. s.* / pAB8 (OE4331 Promotor + *bop-gfp*); Spur 4 = *H. s.* / pAB10 (*bop* Promotor); Spur 5 = *H. s.* / pAB6 (*bop* Promotor + *bop-gfp*)

Zur Analyse der Bildung der Purpurmembran wurden im Folgenden nur noch die Stämme *H. s.* / pAB6 (*bop* Promotor + *bop-gfp*) und *H. s.* / pAB10 (*bop* Promotor) verwendet, um die Bildung unter dem endogenen Promotor zu untersuchen. Die Zellen wurden auf Komplexmedium im Dunkeln angezogen. Die Wachstumsraten sowie die Zelldichten, die die Kulturen in der stationären Phase erreichten, waren identisch (Abb. 25).

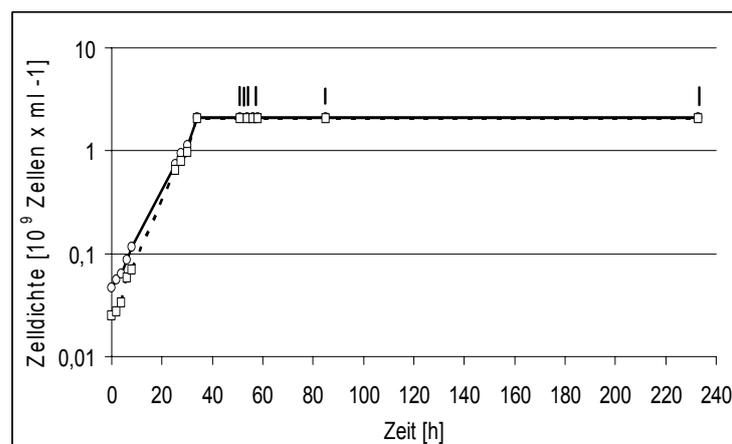


Abb. 25: **Wachstumskurve von *H. s.* / pAB6 und *H. s.* / pAB10.** Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Durchgehende Linie und Kreise = *H. s.* / pAB6 (*bop* Promotor + *bop-gfp*), gestrichelte Linie und Quadrate = *H. s.* / pAB10 (*bop* Promotor). Die Kulturen wurden während der gesamten Wachstumsphase mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die vertikalen Linien über den Wachstumskurven zeigen die Zeitpunkte, an denen Aliquots für die Fluoreszenzbilder in Abb. 26 genommen wurden.

Die Präsenz der Bop-GFP Fusion wurde mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Während der exponentiellen Wachstumsphase, der Transitionsphase und der frühen stationären Phase wurden mehrfach Proben entnommen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es konnten während dieser Phasen keine Fluoreszenzsignale detektiert werden. Nach 51 h Wachstum wurden in einigen Zellen ein bis zwei fluoreszierende Signale entdeckt (die Zeiten beziehen sich auf die in Abb. 25 gezeigten Wachstumskurven). Diese Zellen waren in der Minderheit und machten ca. 10 % der Population aus. In den folgenden sieben Stunden erhöhten sich sowohl die Anzahl der Zellen mit fluoreszierenden Signalen in der Population als auch die der Signale pro Zelle. Bei rund einem Drittel der Zellen erschienen nach 54 Stunden durchschnittlich zwei fluoreszierende Signale pro Zelle. Nach 56 Stunden fluoreszierten zwei Drittel der Population (mit durchschnittlich vier Signalen pro Zelle). 25 Stunden nach Eintritt der Zellen in die stationäre Wachstumsphase (58 h) zeigten alle Zellen Fluoreszenzsignale. Die durchschnittlichen Signale pro Zelle erhöhten sich von sieben bei 58 Stunden auf acht nach 233 Stunden. Abb. 26 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen mit fluoreszierenden Signalen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Bildung der Purpurmembran beginnt mit einzelnen *Patches*. In der späten stationären Wachstumsphase ist die Zelloberfläche bis zu 50 % mit der Purpurmembran bedeckt. Die Größe der Membran-*Patches* steigt mit dem Alter der Kultur. In dem Kontrollstamm *H. s. / pAB10 (bop Promotor)* konnten wie erwartet zu keinem Zeitpunkt fluoreszierende Signale beobachtet werden.

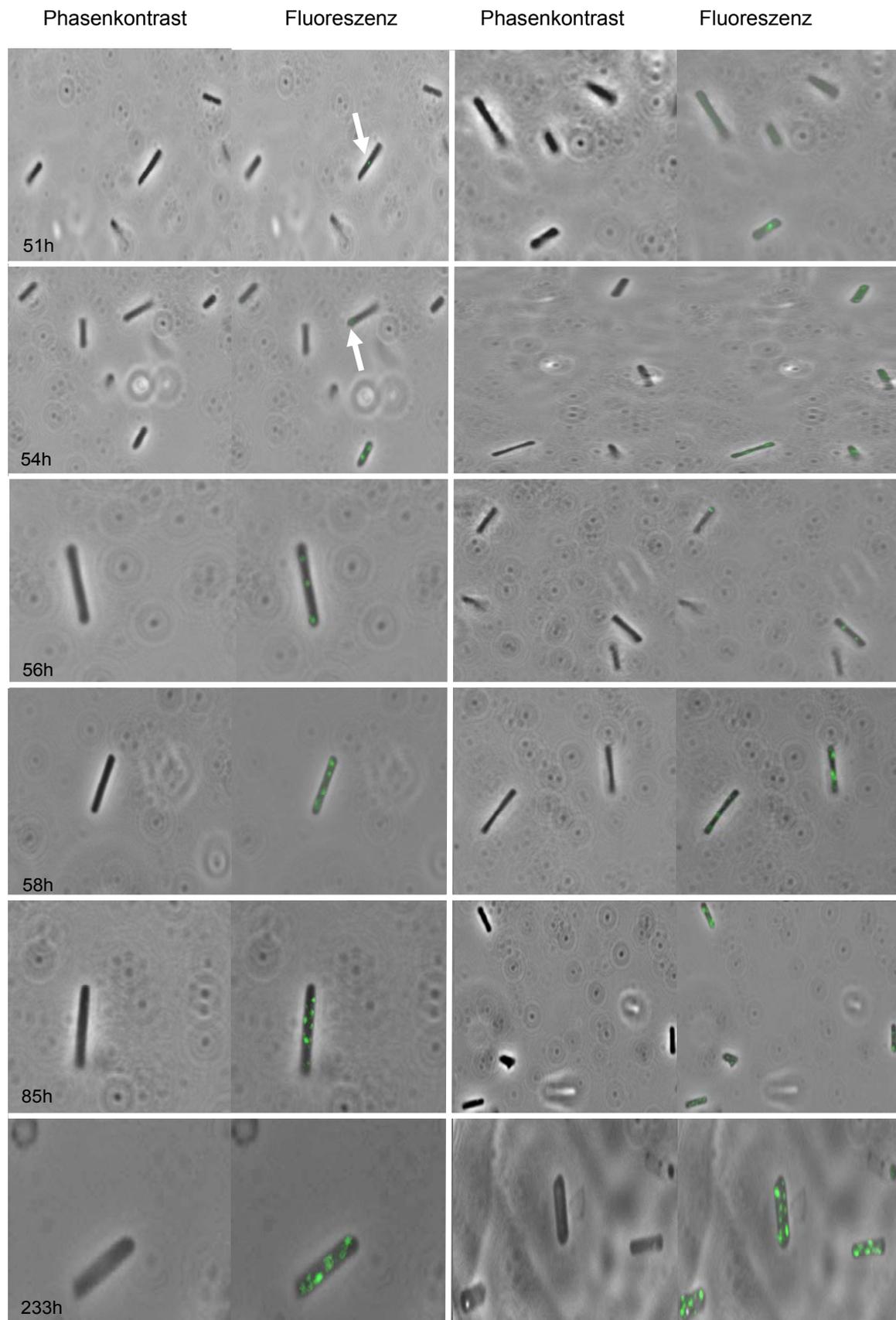


Abb. 26: **Analyse der Purpurmembran-Bildung mittels des Bop-GFP Fusionsproteins.** Die Fluoreszenzbilder zeigen Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der stationären Wachstumsphase von *H. s.* / pAB6 (*bop* Promotor + *bop-gfp*) analysiert wurden. Die Zeitpunkte sind in den linken Phasenkontrastbildern angegeben und entsprechen der Wachstumskurve in Abb. 25. Das erste und dritte Bild einer jeden Reihe ist eine Phasenkontrast Aufnahme, das zweite und vierte eine Fluoreszenzaufnahme. Weiße Pfeile kennzeichnen kleine Fluoreszenzsignale.

## 5. Diskussion

### 5.1. Synchronisation von *H. salinarum* und Eukarya

Für die Charakterisierung von Zellzyklen ist es von Vorteil synchrone Zellen zu verwenden. Die Synchronisationsmethode für *H. salinarum* basiert auf der reversiblen Blockierung der Replikation durch Aphidicolin und der daraus resultierenden Inhibierung der Zellteilung. Der Effekt von Aphidicolin auf die DNA-Synthese von *H. salinarum* wurde mittels radioaktiv markierten Nukleotiden untersucht (Forterre *et al.*, 1984). Die Autoren konnten zeigen, dass nach Zugabe des Inhibitors der Einbau von Thymidin sofort unterblieb. Die Transkription wurde erst nach Inkubationszeiten von 15 Stunden betroffen und eine Beeinflussung der Proteinbiosynthese konnte nicht festgestellt werden.

Das optimierte Protokoll für die Synchronisation von *H. salinarum* liefert eine hohe Anzahl synchroner Zellen. Nahezu 100 % der Zellen teilen sich in einer Stunde, was einem Viertel der Generationszeit exponentiell wachsender Zellen entspricht. Da die Transkriptprofile der ersten und der letzten Stunde des analysierten fünf Stunden Zeitraumes nicht identisch waren, scheint der erste Zellzyklus nach Entfernung des Inhibitors länger zu sein als vier Stunden. Damit würde die Zellteilung in synchronen Kulturen sogar einen noch kleineren Anteil des Zellzyklusses ausmachen.

Die erfolgreiche Synchronisation mit Aphidicolin zeigt, dass in *H. salinarum* Zellzykluskontrollen vorkommen, die die Zellteilung im Fall von Problemen bei der Replikation verhindern. Für die Zunahme des Zellvolumens verantwortliche Prozesse sind nicht mit der Replikation verbunden, da die Zunahme der Zelllänge mit der gleichen Rate wie in unsynchronen Zellen erfolgt.

Von anderen Arten ist bekannt, dass der Grad der Synchronität in Flüssigkulturen typischerweise schnell nach läßt und im zweiten Zellzyklus bereits deutlich geringer ist (Cho *et al.*, 1998; Dwek *et al.*, 1980). Auch bei *H. salinarum* ist die Synchronität im zweiten Zellzyklus geringer als im ersten. Es zeigt sich jedoch, dass sich ein Großteil der Zellen weiterhin synchron verhält. Wie bereits erwähnt, dauert der erste Zellzyklus aufgrund der Synchronisationsprozedur etwas länger als vier Stunden. Von dem Beginn der ersten Teilungsphase bis zur zweiten vergehen genau vier Stunden, was einer Generationszeit exponentiell wachsender Zellen entspricht. Somit erholen sich die Zellen schnell von der Behandlung. Ein ähnliches Phänomen wurde in synchronen *S. cerevisiae* Kulturen beobachtet

(Muller *et al.*, 2003). Die Zellen wurden mittels Gegenflußzentrifugation synchronisiert (Elutration) und es zeigte sich, dass die zweite G<sub>1</sub>-Phase kürzer war als die erste.

Auf Aphidicolin basierende Synchronisationsmethoden wurden auch für Eukarya angewandt, wie z. B. für *Arabidopsis* und für Tabak (Menges & Murray, 2002; Sorrell *et al.*, 2001). Die Synchronität der Zellen wurde mit verschiedenen Methoden verifiziert, z. B. mit FACS (*fluorescence activated cell sorter*)-Analysen, bei denen der Chromosomengehalt in unterschiedlichen Zellzyklusphasen ermittelt wurde. Eine Zelllinie von *Arabidopsis* wurde verwendet, um zellzyklusabhängige Transkriptomänderungen mittels Mikroarray Analysen zu untersuchen und viele regulierte Transkripte wurden identifiziert (Menges *et al.*, 2002). Aphidicolin wurde zudem eingesetzt, um humane Zelllinien zu synchronisieren. In zwei verschiedenen Zelllinien (HL-60, HeLa) induziert es die Apoptose in Zellen der Synthesephase (Kurose *et al.*, 2006). Die „Synchronisation“ wurde dadurch hervorgerufen, dass die Synthese-Phase Zellen starben und die restlichen Zellen am Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase angehalten wurden. Die mit diesem Protokoll synchronisierten Zellen hatten Schäden in der DNA wie z. B. Doppelstrangbrüche. Daher ist diese Art der Synchronisation für humane Zelllinien nicht empfehlenswert. In *H. salinarum* Kulturen konnte kein Absterben von Zellen beobachtet werden. Nach der Inkubation mit Aphidicolin konnten sich 100 % der Zellen in der Teilungsphase verdoppeln und waren daher offenbar intakt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Inhibitor keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von *H. salinarum* hat. Auch konnte keine Beeinflussung der Transkription während der Aphidicolin-Behandlung festgestellt werden. Mehrere Northern Blot Analysen wurden in diesem Zusammenhang durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubation mit dem Inhibitor aus einer Kultur entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. Die Transkriptmengen von ausgesuchten Genen blieben konstant.

Verschiedene Methoden wurden erfolgreich für die Synchronisierung von Organismen eingesetzt. Bei den meisten Protokollen werden Flüssigkulturen mit einem Zellzyklusinhibitor versetzt oder temperatursensitive Mutanten bei restriktiven Temperaturen inkubiert, so dass die Zellen zu einem Zeitpunkt des Zellzyklusses angehalten werden. Wenn sich alle Zellen an diesem Punkt befinden, wird der Inhibitor entfernt bzw. die Kultur auf die permissive Temperatur überführt und die Zellen wachsen synchron. Argumente besagen allerdings, dass

in Flüssigkulturen keine vollständige Synchronität erhalten werden kann (Cooper & Shedden, 2003; Cooper, 2005). Die Autoren gehen davon aus, dass sich in einer Flüssigkultur Zellen unterschiedlichen Alters, unterschiedlicher Länge und unterschiedlichen DNA-Gehalts befinden. Diese Zellen könnten nach einem Zellzyklusarrest nicht als gleich angesehen werden. In den entsprechenden Veröffentlichungen werden „Kriterien für eine erfolgreiche Synchronisation“ aufgestellt. Die meisten dieser Kriterien werden bei der Synchronisation von *H. salinarum* erfüllt: 1) Die Zellteilung dauert 25 % der Generationszeit, 2) Die Zelldichte verdoppelt sich in dieser Zeit, 3) Es konnte mehr als ein synchroner Zellzyklus gezeigt werden, 4) Die durchschnittlichen Zelllängen steigen und sinken kontinuierlich mit Fortschreiten des Zellzyklusses. Somit können viele der Gegenargumente entkräftet werden. Da für *H. salinarum* bisher nur eine Synchronisationsmethode etabliert ist, können zellzyklusabhängige Vorgänge nicht mit einer zweiten Methode überprüft werden.

Insgesamt kann man sagen, dass die Aphidicolin-Methode hoch synchrone *H. salinarum* Kulturen generiert, wie es auch für Pflanzen gezeigt werden konnte. Wichtige Fragestellungen über das Fortschreiten des archaealen Zellzyklusses und über dessen Regulation können somit untersucht werden.

## **5.2. Analyse zellzyklusabhängiger Transkriptomänderungen mit DNA-Mikroarrays**

Die Anwendung von DNA-Mikroarrays zur Identifizierung zellzyklusregulierter Gene hat mehrere Diskussionen hervorgerufen. Hauptsächlich sind zwei Aspekte auffällig: 1) In unabhängigen Studien mit *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurden für beide Organismen eine große Anzahl zellzyklusregulierter Gene identifiziert. Vergleiche zeigten, dass die Überlappung der periodisch regulierten Gene der beiden Hefen gering ist. Drei Analysen mit *S. pombe* identifizierten 407, 747 und 750 Gene als zellzyklusreguliert, wobei nur 171 Gene in allen drei Studien gefunden wurden (Oliva *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2005; Rustici *et al.*, 2004). 2) Nachträgliche bioinformatische Analysen mit den Datensätzen der zellzyklusabhängigen Transkriptomanalysen ergaben abweichende Ergebnisse. Z. B. wurden in *C. crescentus* in der originalen Analyse 553 Gene identifiziert, die eine periodische Expression zeigten (Laub *et al.*, 2000). In den Re-Analysen von Wichert (Wichert *et al.*, 2004) und Chen (Chen, 2005) wurden nur 44 bzw. 43 Gene als reguliert erachtet. In beiden Re-Analysen wurden einzig die

Periodizitäten der Transkriptmengen in die Untersuchungen einbezogen, ohne den Grad der Regulation mit in Betracht zu ziehen. Beide Diskussionen unterstreichen, dass eine qualitativ hochwertige Methode zur Analyse von Mikroarray Datensätzen von entscheidender Bedeutung ist. In einer Meta-Analyse wurde die Qualität von sechs verschiedenen Mikroarray Analyse-Methoden verglichen (de Lichtenberg *et al.*, 2005). Drei nicht überlappende Datensätze zellzyklusregulierte Gene von *S. cerevisiae* wurden verwendet: 1) periodisch exprimierte Gene einer Studie, welche in einem kleinen Maßstab durchgeführt wurde, 2) Gene, deren Promotoren mit bekannten Transkriptionsfaktoren Coimmuno-präzipitiert werden konnten, 3) Gene, die in der MIPS Datenbank (<http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast>) als „Zellzyklusgene“ annotiert sind. Untersucht wurde, wie gut sich die sechs veröffentlichten Methoden und eine weitere neue eignen, um regulierte Gene aus den öffentlichen Mikroarray Datensätzen von *S. cerevisiae* zu identifizieren (Cho *et al.*, 1998; Spellman *et al.*, 1998). Die Methoden, die sich nur auf die Periodizität beziehen und die Höhe der Expressionsänderungen außer Acht lassen, liefern keine guten Ergebnisse. Es zeigte sich, dass die visuelle Inspektion der Daten, nach dem Entfernen der nicht regulierten Gene durch bioinformatische Analysen, zu besseren Ergebnissen führte als fünf Computer-gestützte Analysen. Bei zwei der visuellen Untersuchungen waren die potentiellen Genfunktionen sichtbar, was zu einer Beeinflussung der Ergebnisse geführt haben könnte. Die dritte Analyse wurde „blind“ durchgeführt, d. h. dass weder die Namen der Gene noch deren Funktionen bei der Analyse zu sehen waren. Das Ergebnis war vergleichbar mit hochwertigen computergestützten Analysen, wenn nicht sogar besser (de Lichtenberg *et al.*, 2005).

Die Auswertung der *H. salinarum* Zellzyklusdaten wurde anfangs mit einer kommerziellen DNA-Mikroarray Analyse Software durchgeführt (*Genespring, Silicon Genetics*), die in mehreren vorangegangenen Studien zu guten Ergebnissen geführt hatte (Zaigler *et al.*, 2003; Zaparty *et al.*, 2008). Mehrere unterschiedliche Algorithmen zum Clustern der regulierten Gene wurden angewandt, doch die Ergebnisse erschienen nicht zufriedenstellend. Während der visuellen Inspektion der Daten zeigte sich, dass die einzelnen Cluster falsch Positive enthielten. Z. B. wurden solche Transkripte als reguliert angezeigt, die nur zu einem Zeitpunkt hoch- oder herunterreguliert waren und dabei eine hohe Varianz aufwiesen. Zur Identifizierung zellzyklusregulierter Gene wurden daher nach Ausschluss der nicht regulierten Gene mittels *Genespring*, alle übrigen

Transkriptprofile visuell inspiziert. Transkripte wurden als reguliert erachtet, wenn sie zu einem oder mehreren Zeitpunkten wenigstens eine 2fache signifikante Änderung vom durchschnittlichen Level (= 1) zeigten.

### **5.3. Vergleich der Transkriptomänderungen von *H. salinarum* mit Eukarya, *Caulobacter* und *Sulfolobus***

Diese Studie zeigt, dass die relativen mRNA-Mengen von 3 % der *H. salinarum* Gene zellzyklusreguliert sind. Dies ist wenig im Vergleich zu allen anderen Organismen, deren Transkriptome untersucht wurden, wie z. B. *S. cerevisiae* (ca. 8 %) (de Lichtenberg *et al.*, 2005), *S. pombe* (ca. 10 %) (Marguerat *et al.*, 2006), *A. thaliana* (ca. 6 %) (Menges *et al.*, 2002), *Homo sapiens* (ca. 18 % bis 28 %) (Cho *et al.*, 2001; Whitfield *et al.*, 2002), *C. crescentus* (ca. 19 %) (Laub *et al.*, 2000) und *S. acidocaldarius* (8,5 %) (Lundgren & Bernander, 2007). Zusätzlich zu den quantitativen Unterschieden bestehen auch qualitative Unterschiede zwischen dem zellzyklusabhängigen Transkriptom von *H. salinarum* und denen der anderen untersuchten Spezies. Die Transkripte vieler wichtiger Zellzyklusproteine sind in den vier Eukaryoten periodisch reguliert. Darunter sind z. B. Cycline und Kinasen, die Funktionen an den Kontrollpunkten haben. Regulatoren, Enzyme des Nukleotidmetabolismus, Histone, Myosine und Kinesine konnten ebenfalls als zellzyklusreguliert identifiziert werden. Die Anzahl an konservierten Genen, die sich in mehreren Organismen zyklisch verhält, ist sehr gering. Die Regulation des Zellzyklusses und die Ebenen, auf denen die Regulation stattfindet, sind in Eukaryoten wenig konserviert. Selbst die zwei Hefestämme *S. cerevisiae* und *S. pombe* zeigen deutliche Unterschiede (de Lichtenberg *et al.*, 2005; Marguerat *et al.*, 2006). Wie bereits erwähnt ist die Regulation einiger Gene, die Zellzyklusproteine kodieren, von Hefe bis zum Menschen konserviert. Darunter finden sich Histone, Cdc6 (involviert in die Initiation der Replikation), DNA-Polymerasen und Proteine der SMC-Familie. Bis auf zwei Ausnahmen sind diese Gene in *H. salinarum* nicht zellzyklusreguliert. Dies unterstreicht, dass die Konservierung des Regulations-Mechanismus viel geringer ist als die Konservierung der Proteine und deren Funktion. Nur vierzehn Gene mit zellzyklusspezifischer Funktion sind in *H. salinarum* auf der Ebene der Transkription reguliert: ein Paralog der *cdc6* Gene (acht Paraloge sind nicht reguliert), ein Mitglied der SMC-Proteinfamilie (drei sind nicht reguliert), neun Gene der Purinbiosynthese (die Gene der Pyrimidinbiosynthese sind nicht

reguliert) und drei zusätzliche Gene, die für Enzyme des Nukleotidmetabolismus kodieren. Das ist nicht nur viel weniger als in den vier Eukaryoten, sondern auch als in dem einzigen bisher charakterisierten Bakterium *C. crescentus*. In *C. crescentus* sind rund 40 Gene, die für Responseregulatoren, Histidinkinasen und Sigma-Faktoren kodieren und fast 50 Gene, die für Proteine kodieren, die in die DNA-Replikation, Nukleotidsynthese, DNA-Reparatur, Chromosomen-Segregation und Zellteilung involviert sind, transkriptionsreguliert (Laub *et al.*, 2000).

Vor kurzem wurden die zellzyklusabhängigen Transkriptomänderungen von *Sulfolobus acidocaldarius* charakterisiert (Lundgren & Bernander, 2007). Es wurde berichtet, dass 346 Transkripte reguliert sind. Bei genauerer Betrachtung der Daten zeigt sich, dass die Transkriptprofile der meisten als „zyklisch“ angesehenen Gene nach kurzfristiger Induktion nicht auf ihr Ausgangslevel zurückgingen. Einige der Transkripte zeigten keine 2fache Induktion, was mit der 50%igen Synchronität der Zellen erklärt wird. Bei keinem Transkriptprofil ist die Standardabweichung gezeigt. Die Induktion vieler Gene erfolgte 75 Minuten nach Beginn des synchronen Wachstums, trotzdem wurden diese Gene nicht in ein gemeinsames Cluster gruppiert, sondern aufgrund der Funktion hin in getrennte. Aus diesen Gründen scheint die tatsächliche Anzahl regulierter Gene in *Sulfolobus* vermutlich geringer zu sein als in der Veröffentlichung beschrieben. Die Hälfte der in *S. acidocaldarius* regulierten Gene kodiert für „hypothetische“ Proteine, womit deren Anzahl höher ist als in *H. salinarum*. Wie bei *H. salinarum* sind die Gene der Purinbiosynthese transkriptionsreguliert, und die der Pyrimidinbiosynthese nicht. Rund 30 Gene, die für Zellzyklusproteine kodieren, sind in *S. acidocaldarius* transkriptionsreguliert. Hierunter finden sich 14 Enzyme des Nukleotidmetabolismus, drei Cdc6 Homologe, fünf an der Replikation beteiligte Proteine und vier Enzyme, die an DNA-Reparaturprozessen teilhaben. Ein weiteres während des S/G<sub>2</sub>-Überganges induziertes Gen, kodiert für ein Protein, das Ähnlichkeit mit Proteinen der SMC Familie aufweist.

Zusammenfassend kann man folgern, dass *H. salinarum* wahrscheinlich eine andere Regulationsstrategie hat als alle anderen Organismen, die bisher untersucht wurden. Es gibt Zellzykluskontrollen, aber es scheinen Transkriptionskontrollen für die meisten Zellzyklusproteinen zu fehlen. Eine Studie der wachstumsphasenabhängigen Genexpression von *H. salinarum* zeigte, dass 17 % aller Gene in der exponentiellen und der stationären Phase verschiedene relative mRNA-Mengen aufweisen (Lange *et al.*, 2007). Die Mehrzahl dieser Gene

(11,5 %) hat in der exponentiellen Wachstumsphase erhöhte Transkriptmengen. Dazu gehören Gene, die an Translation und Transkription beteiligte Proteine kodieren. Interessanterweise werden einige der Zellzyklusgene in der stationären Phase besser transkribiert als in der exponentiellen, z. B. ein *cdc6* Paralog und das *smc* Gen. Im Zuge der Untersuchung der zellzyklusabhängigen Transkription wurde in der vorliegenden Arbeit versucht die Transkriptmengen des *smc* Genes in exponentiellen/synchronen Kulturen mittels Northern Blot Analysen zu charakterisieren. Trotz der Erstellung mehrerer verschiedener Sonden konnte das Transkript nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit könnte zum einen die Transkriptmenge unterhalb der Nachweisgrenze liegen, oder wofür auch die Daten von Lange *et al.* sprechen, die Transkription erst in der stationären Wachstumsphase stattfinden. Es stellt sich die Frage, ob alle als Zellzyklusgene annotierten Gene, tatsächlich wie ihre eukaryotischen und bakteriellen Homologe eine Funktion im Zellzyklus ausüben. Darüber hinaus kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass in dieser Studie einige Gene als falsch Negativ identifiziert wurden. Um solche zu identifizieren, müsste eine höhere zeitliche Auflösung, z. B. alle 10 Minuten, dargestellt werden. Hierbei könnten auch Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten detektiert werden. In *H. salinarum* beträgt die durchschnittliche Halbwertszeit von Transkripten 8 Minuten (Hundt *et al.*, 2007). Dies ist im Vergleich zur Bäckerhefe kurz. Deren Transkripte haben durchschnittliche Halbwertszeiten von ca. 20 Minuten (Herrick *et al.*, 1990). In der Studie von S. Hundt konnte gezeigt werden, dass das *orc7* Transkript eine überdurchschnittliche Halbwertszeit von 17 Minuten aufweist. Die Transkripte der anderen *cdc6/orc* Paraloge haben durchschnittliche Halbwertszeiten. Von den angesprochenen Genen konnte in der vorliegenden Arbeit nur eine zellzyklusabhängige Transkriptregulation für *orc7* gezeigt werden. Bei den anderen erfolgt die Transkription konstitutiv. Falls z. B. ein Gen sehr kurz zum Zeitpunkt 1 h 10 Minuten induziert werden würde und eine kurze Halbwertszeit von 5 Minuten hätte, würde es als nicht reguliert erscheinen (Probenentnahme war alle 30 Minuten). Zudem wäre es vorteilhaft, zwei Zellzyklen in die Studie mit einzubeziehen. Damit könnten auch falsch positive Gene identifiziert werden.

#### 5.4. Promotorstruktur zellzyklusregulierter Gene

Gleiche Transkriptprofile von Genen lassen darauf schließen, dass sie ein gemeinsames Regulon bilden und dass sie von einem Transkriptionsregulator reguliert werden. Vergleiche stromaufwärts liegenden Sequenzen (in Bezug auf den Translationsstartpunkt) von coregulierten Genen der Hefe führten zur Detektion von Konsensussequenzen. Es handelt sich dabei um Sequenzen, an die bekannte zellzyklusspezifische Transkriptionsfaktoren binden und um neue Konsensussequenzen für bisher unbekannte Faktoren (Spellman *et al.*, 1998). Die Motive kommen stromaufwärts vom Translationsstart in einem Bereich zwischen einem bis 700 Nukleotiden vor. In der vorliegenden Arbeit stellte sich bei der Analyse von Sequenzen stromaufwärts und stromabwärts des Transkriptions- bzw. Translationsstarts heraus, dass in den zellzyklusregulierten Genen von *H. salinarum* konservierte clusterspezifische Sequenzmotive vorkommen. Diese zeigen einen hohen Grad der Konservierung, obwohl größtenteils nur drei bis sieben Sequenzen in die Analyse einbezogen wurden. Der Grund für die geringe Anzahl an Sequenzen war, dass die meisten regulierten Gene in Operons angeordnet sind. Da die Motive stromaufwärts und stromabwärts vom Startkodon gefunden wurden, könnten sie sowohl in Initiations- als auch in Elongationsprozesse involviert sein. UAS (*upstream activating sequences*)-Elemente wurden in *H. salinarum* in räumlicher Nähe zur TATA-Box gefunden (Baliga *et al.*, 2001). In den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Sequenzen waren die Bereiche -70 bis +40 frei von Motiven. Somit scheinen auch distalere Sequenzen eine Rolle für die Transkriptionsregulation zu spielen. Dies könnte eine für Archaea völlig neuartige Regulation der Transkription darstellen. Der Mechanismus der Elongationskontrolle ist in den Archaea weitgehend unbekannt. In Eukarya gibt es einen Mechanismus, bei dem die mRNA-Synthese zu Beginn der Elongation pausiert. Beteiligt sind hierbei Regulatoren, die Sequenzen im offenen Leserahmen binden und die RNAP anhalten (Übersichtsartikel in (Price, 2008)). Für den Übergang zur produktiven Elongation werden dann weitere Regulatoren benötigt. Ob dieser Mechanismus auch in Archaea existiert ist unklar. Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, wurden bisher weder in *H. salinarum* noch in anderen Archaea identifiziert. Die konservierten clusterspezifischen Sequenzmotive könnten bei der Suche von regulatorischen Proteinen eine Rolle spielen. Sie könnten helfen, den Mechanismus der zellzyklusspezifischen Kontrolle der Transkription in dem

---

Modell-Archäon *H. salinarum* aufzuklären.

### 5.5. Die Proteinexpression von *H. salinarum*

Das Cytosolische- (Klein *et al.*, 2007; Tebbe *et al.*, 2005) und das Membranproteom (Bisle *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2005) von *H. salinarum* konnten zum großen Teil charakterisiert werden. Die Mehrheit aller Proteine (80 % der 2784 offenen Leserahmen) besitzen theoretische isoelektrische Punkte (pI) zwischen 3,5 und 5 (Tebbe *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen intrazellulären Salzkonzentration von *H. salinarum* haben dessen Proteine eine hohe Anzahl saurer Aminosäuren, wodurch deren Löslichkeit erhöht wird. Daraus folgt, dass die charakteristischen pH-Werte der Proteine, bei welchen sie keine Nettoladung aufweisen, sehr ähnlich sind. Tebbe *et al.* konnten 40 % der löslichen Proteinfraction mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF MS PMF (MALDI = *matrix assisted laser desorption/ionization*; TOF = *time of flight*; MS = *mass spectrometry*; PMF = *peptide mass fingerprinting*) identifizieren. Wenn davon ausgegangen wird, dass unter den vorhergesagten offenen Leserahmen falsch Positive existieren und eine theoretische Analyse ca. 1600 cytosolische Proteine vorschlägt, wären es sogar 50 %. 200 der Proteine konnten erst charakterisiert werden, nachdem eine Gesamtkonzentration von 800 µg Protein verwendet wurde. Die Hälfte aller gefundenen Proteine wird von chromosomalen Genen kodiert. Für 50 % der Proteine war die Zuordnung in eine funktionelle Klasse nicht möglich. Sie wurden daher als (konservierte) hypothetische Proteine bezeichnet. Bei der Aufreinigung von Zellextrakten passiert es häufig, dass Proteine unter 20 kDa verlorengehen. Bei diesen „kleinen“ Proteinen handelt es sich oft um Regulatoren oder Proteine, die in Signaltransduktionsprozesse involviert sind. Z. B. fallen fünf der in *H. salinarum* an der Chemotaxis beteiligten Proteine in diese Kategorie ([www.halolex.mpg.de](http://www.halolex.mpg.de)). Der wachstumsphasenabhängig translationsregulierte Initiationsfaktor aIF-1a von *H. salinarum* (Lange *et al.*, 2007) besitzt ein Molekulargewicht von 9,8 kDa ([www.halolex.mpg.de](http://www.halolex.mpg.de)). Durch Optimierungen der herkömmlichen Methoden konnte ein Teil des *low molecular weight* Proteomes identifiziert werden (Klein *et al.*, 2007). 60 % der 380 detektierten Proteine konnte keine Funktion zugeordnet werden. Die anderen sind in unterschiedliche Prozesse, wie z. B. die Translation (hauptsächlich ribosomale Proteine) und die Transkription (Regulatoren) involviert. Zudem konnte das archaeeale Histon identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten ca. 1200 Proteine eines pH-Bereiches zwischen 4,0 und 4,7 reproduzierbar detektiert werden (siehe unten). Dies entspricht einem Großteil des theoretischen cytosolischen Proteomes dieses pH-Bereiches und unterstreicht die Qualität des Experimentes.

Eine spezielle Analyse des Membranproteomes von *H. salinarum* führte zur Identifizierung von 155 Proteinen (Bisle *et al.*, 2006). Bisle *et al.* untersuchte zudem die Konzentrationsänderungen der Membranproteine bei aerobem und anaerobem Wachstum. Hierfür wurden 2D-Gele anfangs silbergefärbt. Mit dieser Methode konnten keine Unterschiede festgestellt werden, da zum einen die Korrelation von Proteinen auf verschiedenen Gelen sehr schwierig ist und zum anderen die Silberfärbung einen niedrigen dynamischen Bereich hat. Darüber hinaus ist die Reproduzierbarkeit der Färbung auf unterschiedlichen Gelen ungenügend. Dies wurde auch bei der Untersuchung der zellzyklusabhängigen Proteomanalyse von *H. salinarum* festgestellt. Aufgrund der gleichen Schwierigkeiten konnten mit silbergefärbten 2D-Gelen keine zellzyklusabhängigen Expressionsänderungen detektiert werden.

### **5.6. Zellzyklusabhängige differentielle Proteinexpression**

Während eine Vielzahl von zellzyklusabhängigen Transkriptomanalysen durchgeführt wurde, ist die Anzahl der Experimente, in denen zellzyklusspezifische Proteinänderungen analysiert wurden, gering. Für nur zwei Organismen konnten Änderungen der Proteinkonzentrationen, basierend auf einzelnen Zellzyklusphasen, detektiert werden: 1) *Caulobacter crescentus* (Grunenfelder *et al.*, 2001) und 2) *Saccharomyces cerevisiae* (Flory *et al.*, 2006). In dem Bakterium erfolgte die Proteinmarkierung mit radioaktiv markierten Aminosäuren, während in dem Eukaryoten die ICAT (*isotope-coded affinity tag*)-Methode verwendet wurde (Gygi *et al.*, 1999a). Die Proteine der zwei zu vergleichenden Zellsate, werden hierbei an ihren Cysteinresten mit zwei unterschiedlich „schweren“ Kohlenstoffisotopen markiert. Die Proben werden vermischt, enzymatisch gespalten und die markierten Peptide mittels Affinitäts-Chromatographie isoliert und anschließend identifiziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass auch Proteine, die in der Zelle in nur geringen Mengen vorkommen, markiert werden können. Für *S. cerevisiae* werden ca. 5800 offene Leserahmen angenommen, von denen etwa 80 % unter „normalen“ Wachstumsbedingungen exprimiert werden (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Flory *et al.* (2006) konnten 60 %

der Proteine reproduzierbar detektieren. Darunter fanden sich auch viele Zellzyklusproteine, wie z. B. Untereinheiten des Replikationskomplexes und Cycline. Synchrone Hefekulturen wurden zu fünf Zeitpunkten analysiert, um Änderungen von Proteinkonzentrationen zu detektieren. Es wurden 300 Proteine gefunden, deren Signalverhältnisse signifikant vom Durchschnitt abwichen. Die Menge von 76 dieser Proteine stieg nur zu einem Zeitpunkt an. Die Proteine sind in unterschiedliche Prozesse, wie z. B. RNA-Prozessierung oder Ribosomenbiogenese, involviert. Zellzyklusproteine, von denen angenommen wird, dass nur wenige Moleküle exprimiert werden (Futcher *et al.*, 1999), konnten nicht reproduzierbar detektiert werden, und somit konnte für sie auch keine zellzyklusabhängige Variation vorhergesagt werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass mit der ICAT-Methode zwar alle Proteine markiert werden können, aber geringe Peptidkonzentrationen mit einfacher Massenspektroskopie nicht zur Proteinidentifizierung führen. Flory *et al.* erstellte einen Vergleich der Proteomdaten mit den Transkriptomdaten von Spellman (Spellman *et al.*, 1998). Die Korrelation stellte sich als nicht signifikant heraus, was die Wichtigkeit von Transkriptom- und Proteomdaten zur vollständigen Beschreibung eines Zellzyklusses hervorhebt. Die Unstimmigkeiten könnten zum Teil durch posttranskriptionelle Mechanismen und Proteinabbau erklärt werden. Andererseits werden häufig nur geringe Korrelationen zwischen den oben erwähnten Daten gefunden (Futcher *et al.*, 1999; Gygi *et al.*, 1999b; Newman *et al.*, 2006).

In *C. crescentus* konnten mittels 2D-Gelelektrophorese etwa 35 % (979 Proteine) der cytosolischen Proteine reproduzierbar detektiert werden (Grunenfelder *et al.*, 2001). Davon zeigten 144 Proteine (15 %) signifikante zellzyklusabhängige Konzentrationsänderungen. 81 Proteine wurden charakterisiert. Einer großen Anzahl der Proteine konnte keine Funktion zugeordnet werden. Die anderen sind in verschiedene Prozesse involviert, wie z. B. Transkription und Proteinfaltung. Es konnten nur zwei Zellzyklusproteine (FtsZ und ein Transkriptionsregulator) als reguliert identifiziert werden. Auch hier zeigte sich, dass 33 % der Proteine in der Massenspektroskopie aufgrund der geringen Anzahl an Peptiden nicht bestimmt werden konnten. Der Vergleich mit den Transkriptomdaten (Laub *et al.*, 2000) zeigte, dass etwa 60 % der 81 Proteine auch auf der Ebene der Transkription reguliert sind.

Archaeale Proteome wurden bisher nicht in Bezug auf den Zellzyklus

charakterisiert. Differentielle Genexpression wurde jedoch in *H. salinarum* und *H. volcanii* analysiert. Z. B. wurde die wachstumsphasenabhängige Translationsregulation (Lange *et al.*, 2007) und die Proteomänderung in Bezug auf unterschiedlichen Sauerstoffgehalt und Lichtintensitäten (Baliga *et al.*, 2002) analysiert. Lange *et al.* (2007) konnten zeigen, dass 20 % der Transkripte wachstumsphasenabhängig translatiert werden. Hierbei wurden freie und Polysomen-gebundene mRNAs mittels Dichtezentrifugation separiert.

Für *H. volcanii* wurde eine neue Methode zur Aufarbeitung von halophilen Zellextrakten für 2D-Gele etabliert (Kirkland *et al.*, 2006). Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu anderen ist, dass der Verlust von Proteinen während der Aufreinigung geringer ist. Die Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Dies ist die erste quantitative zellzyklusabhängige Proteomstudie in Archaea. Es konnten ca. 1200 Proteine, mit relativen molaren Massen zwischen 100kDa und 25kDa,  $pI = 4 - 4,7$ , reproduzierbar detektiert werden. Dies ist vergleichbar mit den bisherigen Proteomstudien. Mathematisch konnte für 270 der Proteine eine mindestens 2fache Änderung zu einem oder mehreren Zeitpunkten ermittelt werden. Hierbei blieben die Standardabweichungen zunächst unberücksichtigt. Die visuelle Analyse ergab, dass es sich bei 240 Proteinen um falsch Positive handelte. Diese Proteine wurden nur zu einem Zeitpunkt induziert oder reprimiert und das mit einer hohen Varianz. Für 30 Proteine konnte eine zellzyklusabhängige Regulation gezeigt und unterschiedliche Regulationsprofile gefunden werden. Viele der zellzyklusabhängig regulierten Proteine werden vor der Zellteilung kurzfristig reprimiert. Es konnten fünf Proteine detektiert werden, die nur zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert werden. Die meisten regulierten Proteine werden längerfristig induziert oder reprimiert. Die Proteine müssen nun mittels einer geeigneten Massenspektrometrie identifiziert werden. Es wird sich zeigen, ob unter den regulierten Proteinen auch solche zu finden sind, die als Zellzyklusproteine annotiert sind. Theoretische Analysen mit den Transkriptomdaten von *H. salinarum* zeigten, dass 55 % der zellzyklusabhängig regulierten Gene für Proteine kodieren, die aufgrund ihrer relativen molaren Masse und ihres  $pI$  auf den Proteingelen zu finden sein sollten. Falls die zellzyklusabhängige Regulation der Genexpression dieser Kandidaten auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene stattfindet, sollten die identifizierten Proteine sich mit den Transkriptomdaten decken. Dies ist möglich, da sich 50 % der Expressionsprofile der regulierten Proteine mit den

Transkriptprofilen der regulierten Gene decken. Eine Ausnahme stellen die Proteine dar, die zu Beginn der Zellteilung kurzfristig reprimiert werden. Solche Transkriptprofile wurden nicht gefunden. Andersherum wurden keine Proteine gefunden, die im Laufe des Experimentes kontinuierlich reprimiert werden. Dies war für die Transkripte des 7. Clusters der Fall.

Einige Proteine werden wahrscheinlich mehrfach aufgrund posttranslationaler Modifizierungen identifiziert werden. Somit könnte sich die Anzahl an reproduzierbar detektierten Proteinen verringern.

Die zellzyklusabhängigen Proteomuntersuchungen von *C. crescentus*, *S. cerevisiae* und *H. salinarum* zeigen die noch bestehenden Schwierigkeiten der verwendeten Methoden. Um eine vollständige Aussage über zellzyklusabhängig regulierte Proteine in *H. salinarum* zu treffen, müsste folgende Versuchsansätze durchgeführt werden: 1) Für jeden Zeitpunkt, der untersucht wird, sollten ca. drei unterschiedliche pH-Bereiche für die isoelektrische Fokussierungen der Proteinextrakte verwendet werden (Tebbe *et al.*, 2005), 2) Die Gesamtprotein-Konzentration müsste deutlich erhöht werden, um auch die Proteine, von denen nur eine geringe Molekülzahl vorhanden ist, zu detektieren, 3) Proteingele mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen sollten zu jedem Zeitpunkt verwendet werden, um die Proteine über 55 kDa besser aufzutrennen und um auch die kleineren unter 20 kDa zu detektieren, 4) Die Markierung der Proteine müsste so gewählt werden, dass zu deren Identifizierung genug Peptide vorhanden sind, 5) Geeignete Programme für die Analyse der 2D-Gele sollten gewählt werden und 6) Die Methode zur Identifizierung der Proteine sollte so gewählt werden, dass auch einzelne Peptide identifiziert werden können (Schmelzle & White, 2006).

Zusammenfassend gibt es in *H. salinarum* auf den verschiedenen Ebenen der Genexpression nur wenig zellzyklusabhängige Regulation. Nur 3 % aller Gene sind transkriptionsreguliert. 2,5 % der reproduzierbar detektierten Proteine zeigen schwache Expressionsänderungen. Die Mehrheit aller Gene und Proteine wird bereits unter Standardbedingungen exprimiert (Bisle *et al.*, 2006; Tebbe *et al.*, 2005; Twellmeyer *et al.*, 2007). Möglicherweise ist es für das halophile Archaeon aufgrund der sich schnell ändernden Umweltbedingungen (Sonne, Trockenheit) sinnvoller nahezu alle Gene, bzw. am Zellzyklus beteiligte Proteine, konstitutiv zu exprimieren.

### 5.7. Zellzyklusabhängige Phosphorylierung von Proteinen

Die posttranslationale Modifizierung von Proteinen stellt eine wichtige Möglichkeit zur Regulation von Protein-Aktivitäten und -Stabilitäten dar. Moleküle (z. B. Sulfate, Acetylreste oder Saccharide) können kovalent auf Proteine übertragen und es können intramolekulare Verbindungen (Disulfidbrücken) hergestellt werden. Proteine können für den Abbau markiert werden (ubiquitiniert) oder die Aktivität kann durch posttranslationale Modifizierung geregelt werden. Das erste prokaryotische Glykoprotein wurde in *H. salinarum* identifiziert (Mescher & Strominger, 1976). Neben einmaligen Modifizierungen von Proteinen kommen auch reversible Ereignisse vor. Einige Aminosäurereste wie z. B. Serin, Histidin und Tyrosin können reversibel phosphoryliert werden. Das erste archaeale Phosphoprotein wurde in *H. salinarum* identifiziert (Spudich & Stoeckenius, 1980). Mittlerweile ist bekannt, dass die Protein-Phosphorylierung in vielen Archaea vorkommt (Skorko, 1984; Smith *et al.*, 1997), wobei diese Domäne im Vergleich zu Eukaryoten und Bakterien wenige Gene besitzt, die für Signaltransduktionsproteine kodieren (Galperin, 2005). Die Analyse von sogenannten Phosphoproteomen hat in den letzten Jahren drastisch zugenommen (Eymann *et al.*, 2007; Macek *et al.*, 2007; Macek *et al.*, 2008; Ptacek *et al.*, 2005; Voisin *et al.*, 2007). Interessanterweise scheint die Phosphorylierung von Tyrosinresten bei *Campylobacter jejuni* (Voisin *et al.*, 2007), *B. subtilis* (Macek *et al.*, 2007) und *E. coli* (Macek *et al.*, 2008) viel seltener vorzukommen als die von Serin- und Threoninresten. In *B. subtilis* konnten nur acht Phosphotyrosin-Proteine identifiziert werden, im Gegensatz zu 54 Phosphoserinen. In *H. salinarum* konnten in der vorliegenden Arbeit fünf Proteine mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden, die an Tyrosinresten phosphoryliert sind. Mit einem Phosphothreonin spezifischen Antikörper konnten keine Proteine detektiert werden.

In Eukarya spielen Protein-Phosphorylierungen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklusses. Cdks aktivieren und deaktivieren hierbei wichtige Proteine. In Archaea zeigen Cdc6 Proteine Auto-Phosphorylierungen (De Felice *et al.*, 2003; Grabowski & Kelman, 2001; Shin *et al.*, 2003) und es wird vermutet, dass dies im direkten Zusammenhang mit der Initiation der Replikation steht. In dem Bakterium *C. crescentus* konnte gezeigt werden, dass der Regulator CtrA durch Phosphorylierung aktiviert wird. Dieses Enzym ist in das Fortschreiten des Zellzyklusses und in die Zellteilung involviert (Kelly *et al.*, 1998).

Zellzyklusabhängige Phosphoproteom-Analysen wurden z. B. in *S. cerevisiae* mittels 2D-Gelelektrophorese durchgeführt (Futcher *et al.*, 1999), doch es konnten keine regulierten Proteine identifiziert werden. Die Autoren schlossen, dass die Menge der Proteine zu gering war. Mit den mittlerweile vorhandenen neuen Techniken (Eymann *et al.*, 2007; Macek *et al.*, 2007; Macek *et al.*, 2008; Ptacek *et al.*, 2005; Schmelzle & White, 2006; Voisin *et al.*, 2007) dürfte die Charakterisierung von zellzyklusabhängigen Phosphoproteomen in nächster Zeit an Bedeutung gewinnen.

Eine zellzyklusabhängige Phosphorylierung der fünf Proteine, die in *H. salinarum* an Tyrosinresten phosphoryliert wurden, konnte ausgeschlossen werden. Nachfolgende Untersuchungen mit weiteren Phosphoprotein-spezifischen Antikörpern müssen klären ob Proteinphosphorylierungen eine Rolle im Zellzyklus von *H. salinarum* spielen. In vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde eine Vielzahl verschiedener Phosphoprotein Antikörper eingesetzt, doch die Signale lagen unterhalb der Nachweisgrenze. In einer Studie aus 2007 konnte in eukaryotischen Zellen die spezifische Phosphorylierung von Proteinen gezeigt werden (Pope *et al.*, 2007). Die Autoren verwendeten Antikörper, die auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Mit dem gegen phosphorylierte Threoninreste gerichteten Antikörper konnten in der vorliegenden Arbeit keine Proteine nachgewiesen werden. Mit dem Phosphotyrosin Antikörper konnten fünf Proteine detektiert werden. Somit konnte ein spezifischer Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosinreste für *H. salinarum* identifiziert werden.

#### **5.8. Das Signalmolekül cAMP und dessen zellzyklusspezifische Konzentrationsänderungen**

Seit langem ist bekannt, dass cAMP eine wichtige Rolle als Signalmolekül in Bacteria und Eukarya einnimmt. Eine frühe Veröffentlichung zeigt, dass cAMP auch in drei archaealen Organismen vorkommt (Leichtling *et al.*, 1986). Es wurde vermutet, dass es ein Signal für einen Mangel an Kohlenstoff sein könnte, wie es in *E. coli* der Fall ist. Diese Hypothese wurde nicht weiter untersucht und das Vorkommen von cAMP in anderen Archaea und dessen Funktion blieb unklar. In einer bioinformatischen Analyse wurde festgestellt, dass ein für eine putative Adenylatcyclase kodierendes Gen in 16 von 20 archaealen Genomen, die 2005 bekannt waren, vorkommt (Galperin, 2005). Kein Homolog einer Adenylatcyclase besitzen *Nanoarchaeum equitans*, *Picrophilus torridus* und zwei Spezies der

*Thermoplasma.*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *H. salinarum* pro Zelle durchschnittlich  $1 - 2 \times 10^5$  cAMP-Moleküle besitzt. Die Menge steht im Einklang mit rund  $5 \times 10^6$  ATP-Molekülen pro Zelle und zeigt, dass 2 - 4 % des ATPs zu cAMP umgewandelt werden. Das Genom von *H. salinarum* enthält ein Gen das für ein Enzym kodiert, welches diese Umwandlung katalysiert: eine Adenylatcyclase (OE2856F; *cyaB*). Ein Sequenzvergleich identifizierte 28 archaeale Orthologe und unterstreicht, dass dieses Enzym in Archaea weit verbreitet ist (Daten nicht gezeigt). Somit scheint cAMP in den meisten archaealen Organismen eine wichtige Rolle als Signalmolekül zu spielen. Ein Gen, das für eine cAMP Phosphodiesterase kodiert, konnte durch Sequenzvergleiche mit bekannten Genen in dem Genom von *H. salinarum* nicht identifiziert werden. Die Identität des am cAMP-Abbau beteiligten Enzyms konnte daher noch nicht geklärt werden.

Eine *H. salinarum* Zelle einer exponentiell wachsenden Flüssigkultur hat eine zylindrische Form. Die durchschnittliche Länge beträgt etwa 4  $\mu\text{m}$  und der Durchmesser ist etwa 0,5  $\mu\text{m}$ . Die Menge von  $1 - 2 \times 10^5$  cAMP-Molekülen pro Zelle ist equivalent zu einer intrazellulären Konzentration von ca. 200  $\mu\text{M}$ . Diese Konzentration ist viel höher als die für *S. cerevisiae* bestimmte. Das Volumen einer typischen Hefezelle ist ca. 100 fl. Die beschriebenen cAMP-Konzentrationen (Muller *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1990; Watson & Berry, 1977) entsprechen daher intrazellulären Konzentrationen von 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 6  $\mu\text{M}$ . In drei unabhängigen Studien wurden die cAMP-Konzentrationen von synchronisierten Hefekulturen analysiert (Muller *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1990; Watson & Berry, 1977). Die Autoren stimmen überein, dass es zu zellzyklusabhängigen Konzentrationsänderungen kommt. Müller *et al.* (Muller *et al.*, 2003) berichteten, dass es abhängig von der Glukosekonzentration zu unterschiedlichen Zeiten im Zellzyklus zu einem starken Anstieg der cAMP-Konzentration kommt. Die Autoren vermuteten, dass cAMP ein Bindeglied zwischen dem Energiemetabolismus und der Zellzykluskontrolle darstellen könnte. Für einen anderen Eukaryoten, *Tetrahymena pyriformis*, wurde gezeigt, dass die cAMP-Konzentration sich einmal während der Zellteilung signifikant erhöht (Dickinson *et al.*, 1976). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass die cAMP-Konzentration in *H. salinarum* zweimal für kurze Zeit ansteigt; einmal kurz vor und einmal kurz nach der Zellteilung. Während der Teilungsphase sinkt die Konzentration an cAMP auf das durchschnittliche Level. Dieses Muster unterscheidet sich deutlich von den

Konzentrationsänderungen, die für Eukarya berichtet wurden. Für alle analysierten Organismen gleich ist, dass die Konzentrationsänderungen in einer sehr kurzen Zeitspanne erfolgen.

Es müsste weiter untersucht werden, ob die cAMP-Konzentrationsänderungen in *H. salinarum* essentiell für das Fortschreiten des Zellzyklusses sind und ob cAMP in metabolische Prozesse involviert ist. Darüber hinaus könnten zellzyklusabhängige Aktivitätsbestimmungen der Adenylatcyclase klären, ob das Protein kurz vor den cAMP-Konzentrationserhöhungen aktiver ist. Dies konnte für den einzelligen Eukaryoten *T. pyriformis* gezeigt werden (Dickinson *et al.*, 1976). In dem Bakterium *E. coli* ist die Transkription des für die Adenylatcyclase kodierenden Gens *cya* reguliert. Z. B. erfolgt unter hohen cAMP-Konzentrationen eine Repression der Transkription (Aiba, 1985; Mori & Aiba, 1985). Das *cyaB* Gen von *H. salinarum* zeigte keine zellzyklusabhängige Transkriptionsregulation zu den untersuchten Zeitabständen. Eine Regulation der Genexpression erfolgt wahrscheinlich (wie es auch für andere Organismen gezeigt werden konnte) eher posttranslational, da schnelle Änderungen der Proteinaktivität benötigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass die cAMP-Konzentration kurz und reversibel zu zwei Zeitpunkten eines archaealen Zellzyklus ansteigt und damit eine ähnliche Rolle, wie für mehrere Eukaryoten vorgeschlagen, spielen könnte. Wenn zellzyklusabhängige Oszillationen in weiteren archaealen und eukaryotischen Organismen festgestellt würden, könnte dies auf eine frühe evolutionäre Rolle für cAMP im Zellzyklus hindeuten. cAMP könnte ein evolutionär „altes“ Signal für die Kopplung des Energiestatuses mit dem Fortschreiten des Zellzyklusses darstellen.

### **5.9. Untersuchung der Replikationsphase in *H. salinarum***

Die Bestimmung der Replikationsphase erfolgte in den bisher charakterisierten Organismen mit unterschiedlichen Methoden. Zum einen kann sie über die zellzyklusabhängige Induktion von Genen, die an der Replikation beteiligte Proteine kodieren, abgeschätzt werden. Zum anderen kann der Einbau von radioaktiv markierten Basen oder Basenanaloga untersucht werden. Darüber hinaus können mikroskopische Analysen mit fluoreszenzmarkierten Proteinen durchgeführt werden. Hierbei geben Coimmuno-Lokalisationsstudien mit markierter DNA und markierten Proteinen einen Einblick in den Vorgang der Replikation (Adachi *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2001;

Lengronne *et al.*, 2001; Lewis & Errington, 1997). Die Markierung von Proteinen mit GFP wurde in Archaea bisher kaum angewandt (Nomura & Harada, 1998; Reuter & Maupin-Furlow, 2004). Sie wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht, um zellzyklusabhängige Lokalisationsstudien durchführen zu können (siehe Abschnitt 5.12.).

Die globale Transkriptomanalyse von *H. salinarum* lieferte mit wenigen Ausnahmen keinen Hinweis auf die genaue Replikationsphase. Eine Ausnahme war die zellzyklische Transkriptregulation der Gene, die für Enzyme der Purinbiosynthese kodieren. Diese Gene zeigen 2 h vor der ersten Zellteilung eine kurzfristige starke Induktion. Während der Zellteilung werden sie erneut induziert. Der höchste Grad dieser Induktion erfolgt zweieinhalb Stunden vor der zweiten Zellteilung. Dieses zyklische Profil schien den ersten Hinweis auf eine distinkte S-Phase im Zellzyklus von *H. salinarum* zu liefern. Es wurde vermutet, dass die Replikation in einem Zeitraum von etwa einer bis eineinhalb Stunden vor der Teilung der Zellen beginnt und zur Teilungsphase abgeschlossen ist. Einen weiteren Hinweis auf die Initiation der Replikation liefert das transkriptionsregulierte Gen *orc7*. Dieses Gen befindet sich in räumlicher Nähe zu dem *ori* von *H. salinarum*. Die Induktion des Transkriptes erfolgt eine Stunde vor der ersten Zellteilung. Die archaealen Cdc/Orc Proteine zeigen Homologien zu dem Replikationsinitiator DnaA von *E. coli* (Erzberger *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000). Die Funktion des *H. salinarum* Proteins wurde bisher nicht charakterisiert. Um den Zeitraum der Synthese-Phase in *H. salinarum* zu bestimmen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert, mit welcher der Einbau des Basenanalogs BrdU in replizierenden Zellen nachgewiesen werden konnte. Die Analyse des BrdU-Einbaues in synchrone Zellen zeigte zunächst, dass die Replikation 75 Minuten vor Beginn der Zellteilungsphase begann. Sie schien 45 bis 60 Minuten zu dauern. 15 bis 30 Minuten vor Beginn der Zellteilungsphase konnte keine Zunahme der Signalintensitäten beobachtet werden. Es schien, dass die Replikation bis dahin abgeschlossen war. Da die Unterschiede zwischen den synchronen Kulturen und den Kontrollkulturen nur gering waren und lange Inkubationszeiten mit BrdU die Synchronität der Zellen herabsetzten wurde die Durchführung des Experimentes geändert. Mit dem modifizierten Versuch mit kürzeren Inkubationsphasen mit dem Basenanalogon konnte das vorherige Ergebnis nicht verifiziert werden. Die angenommene Dauer der Synthese wurde dadurch widerlegt, dass in Zellen Replikation stattfand, zu denen erst während der

Teilung BrdU gegeben wurde.

Die Transkriptionsregulation der Purinbiosynthesegene steht somit nicht im direkten Zusammenhang mit der Replikation. Es wäre möglich, dass die Syntheserate der Proteine nicht einheitlich ist.

Die Analyse des BrdU-Einbaus in synchronen *H. salinarum* Kulturen zeigte ein völlig unerwartetes Ergebnis: Die Zellen scheinen nahezu während des gesamten Zellzyklusses ihr Genom zu replizieren. Dies lässt zwei Schlussfolgerungen zu: 1) Die Zellen replizieren kontinuierlich und der verspätete Synthesebeginn in den synchronen Zellen kam aufgrund der Aphidicolin-Behandlung zustande oder 2) Die Replikation wird nur für einen kurzen Zeitraum eingestellt.

*H. salinarum* ist ein polyploider Organismus, der in der exponentiellen Wachstumsphase rund 25 Genomkopien enthält (Breuert *et al.*, 2006). Wie diese vielen Kopien an die Tochterzellen weitergegeben werden, ist bisher unklar. Eine kontinuierliche Replikation würde einen biologischen Sinn ergeben. Auch eine kurze Replikationspause von 15 bis 20 Minuten ist nicht auszuschließen. Die durch den ersten Versuch angenommene S-Phase würde während eines Zeitraumes von einer Stunde vor der Zellteilung erfolgen. Während des modifizierten Versuches erfolgte die Inkubation mit BrdU jeweils für 50 Minuten und in vier synchronen Kulturen um 50 Minuten versetzt. In der Kultur zu der das Basenanalogen erst kurz vor der Zellteilung zugesetzt wurde, hätte theoretisch nur wenig BrdU eingebaut werden sollen. Da vier Kulturen auf einmal synchronisiert wurden, könnten sich die Zellzyklusphasen etwas verschieben (z. B. hat es länger gedauert die Zellen zu resuspendieren). Nachfolgende Studien müssten klären, ob die Replikation während des gesamten Zellzyklusses stattfindet oder ob es zu einer kurzen Pause kommt. Hierbei könnten z. B. Untereinheiten von Replikationsproteinen mit GFP markiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden.

Insgesamt zeigt sich, dass *H. salinarum* für die DNA-Synthese während des Zellzyklusses eine völlig andere Strategie entwickelt hat, als alle anderen bisher analysierten Organismen. Die Replikation erfolgt (fast) während des gesamten Zellzyklusses, auch während der Zellteilung. Scheinbar gibt es keine distinkte S-Phase. Wie diese kontinuierliche Replikation mit dem geregelten Ablauf eines Zellzyklusses abgestimmt ist, ist unklar.

### 5.10. Der Zellzyklus von *H. salinarum*

Eine Vielzahl unterschiedlicher Aspekte des Zellzyklusses konnte mit den synchronen haloarchaeale Zellen aufgeklärt werden: a) die Bildung der Zellteilungsebene und die Zellteilung, b) die Transkriptlevel von sieben Clustern coregulierter Gene mit unterschiedlichen Transkriptlevel-Profilen, c) das Sph1 Proteinlevel (Herrmann & Soppa, 2002), d) die Proteinleveländerungen von 30 unbekanntenen Proteinen, e) die cAMP-Konzentrationsänderungen und f) die DNA-Synthesephase.

Der Zellzyklus von *H. salinarum* unterscheidet sich deutlich von dem anderer Organismen. Es findet wenig Regulation auf Ebene der Genexpression statt. Die cAMP-Konzentration erhöht sich zweimal signifikant während des Zellzyklusses. Die DNA-Synthese erfolgt scheinbar während des gesamten Zellzyklusses. Abb. 27 fasst schematisch diese verschiedenen Ereignisse zusammen.

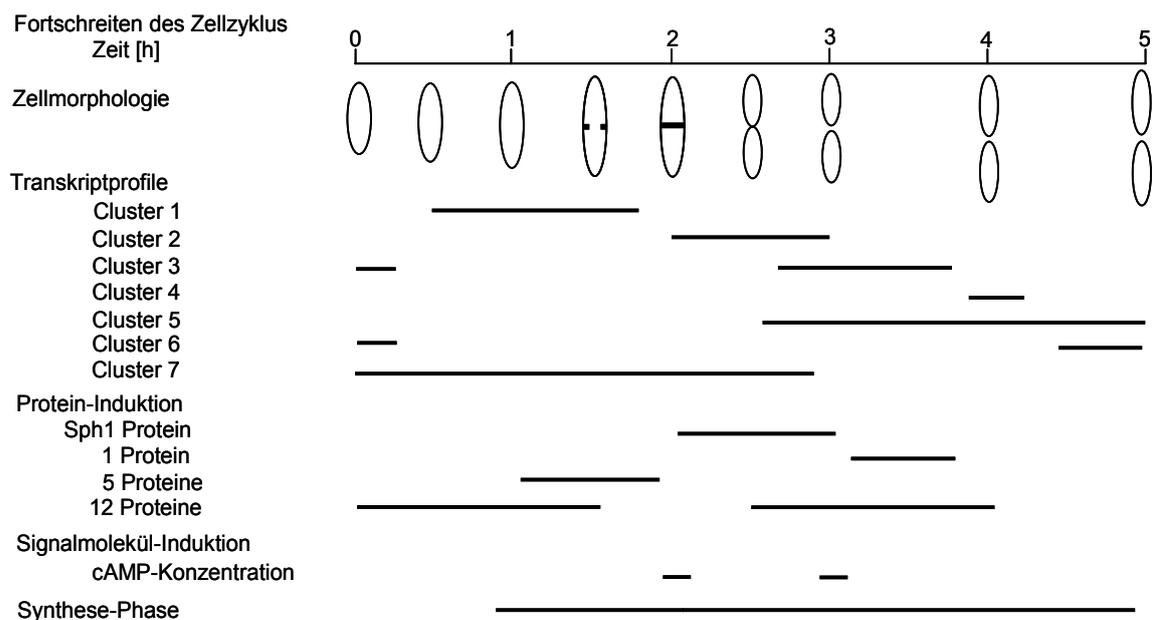


Abb. 27: **Übersicht der Charakterisierung von zellzyklusabhängigen Prozessen in *H. salinarum*.** Die Abbildung fasst schematisch die Ergebnisse dieser Studie und einer vorherigen (Herrmann & Soppa, 2002) zusammen. Die schwarzen Striche repräsentieren die Zeiten, in denen die Transkripte, die Proteine und das Signalmolekül cAMP induziert werden. Von den 30 regulierten Proteinen sind beispielhaft 18 gezeigt, eine(s) (weiteres) wurde in einer Studie von U. Herrmann bereits charakterisiert. Die Synthese der DNA scheint nahezu während des gesamten Zellzyklusses stattzufinden.

### 5.11. Untersuchung putativ-induzierbarer Promotoren

Die kontrollierte Induktion eines Promotors und die Überproduktion eines Proteins zu einem gewünschten Zeitpunkt sind nützliche Hilfsmittel zur Charakterisierung von Genexpression in einem Organismus. Für das halophile Archaeon *H. volcanii*

konnte bereits ein Tryptophan-induzierbarer Promotor identifiziert werden (Large *et al.*, 2007). Für *H. salinarum* steht bisher kein induzierbarer Promotor zu Verfügung. Regulierte Genexpression konnte *in vivo* z. B. für das Arginin-Gencluster und den Bacterio-Opsin Promotor gezeigt werden (Ruepp & Soppa, 1996; Shand & Betlach, 1991; Sumper *et al.*, 1976). Zwei der Strukturgene des Arginindeiminaseweges (*arcB* und *arcC*) werden unter fermentativen Bedingungen stark induziert. In der Doktorarbeit von U. Herrmann (Herrmann, 2002) wurde der *arcB* Promotor analysiert. Er stellte sich als putativ-induzierbarer Kandidat heraus. Eine vollständige Charakterisierung des Promotors in der vorliegenden Arbeit mittels Northern Blot Analysen zeigte, dass sich der Promotor konstitutiv verhält und die Zugabe von Arginin nicht zu einer Steigerung der Transkription führt. Es wurde ein Kontrollplasmid welches nur den Promotor enthielt erstellt, in *H. salinarum* transformiert und Wachstumsversuche in Minimalmedium mit 50 mM Arginin (wie von U. Herrmann verwendet) durchgeführt. Es zeigte sich, dass beide Stämme nach ca. 4 Stunden ihr Wachstum einstellen (Daten nicht gezeigt). Somit sind die zuvor beschriebenen Effekte (Inhibierung des Wachstums von *H. salinarum* transformiert mit pUH6) auf die hohe Argininkonzentration zurückzuführen. Auch der putative *tnaA* Promotor von *H. salinarum* wurde auf seine Induzierbarkeit hin untersucht und zeigte eine konstitutive Expression. Als Promotor wurde in diesem Fall der Bereich stromaufwärts des putativen *tryptophanase* Gens bis zum nächsten offenen Leserahmen definiert. Da dies nur 89 Nukleotiden entsprach, wurden weitere 60 nt des offenen Leserahmens des vorherigen Gens mit eingeschlossen. Es wäre möglich, dass ein größerer Bereich zur kontrollierten Genexpression nötig ist. Somit steht weiterhin kein induzierbarer Promotor für *H. salinarum* zur Verfügung.

## **5.12. Analyse der Purpurmembran-Entstehung in lebenden *H. salinarum***

### **Zellen mit einer Bacterio-Opsin-GFP-Fusion**

Dieser Modellversuch sollte klären, ob sich der Einsatz von GFP-Fusionen zur Untersuchung zellzyklusabhängiger Protein-Lokalisationen eignet. In zwei Studien konnte bereits gezeigt werden, dass GFP-Fusionen zum Nachweis differentieller Genexpression in Haloarchaea angewandt werden können: 1) in dem moderat halophilen Archaea *H. volcanii* (Reuter & Maupin-Furlow, 2004) und 2) in dem extrem halophilen Archaea *H. salinarum* (Nomura & Harada, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnten mittels einer GFP-Fusion zum ersten Mal drei neue

Aspekte in Haloarchaea untersucht werden. Zum einen wurde die spezifische zelluläre Lokalisation eines Proteins analysiert. Zum anderen konnte die zeitabhängige Entstehung der Purpurmembra in einzelnen lebenden Zellen charakterisiert werden. Des Weiteren konnte die Heterogenität einer Zellkultur erfasst werden. Als Modellprotein wurde Bacterio-Opsin (Bop) verwendet, da seit langem bekannt ist, dass Bacteriorhodopsin (BR) in speziellen Regionen der Cytoplasmamembra lokalisiert ist. Diese Bereiche werden als Purpurmembra bezeichnet. Mittels Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Oberfläche von Zellen der stationären Wachstumsphase, zu 50 % mit BR bedeckt ist (Oesterhelt & Stoeckenius, 1973). Die Verteilung der Purpurmembra auf der Zelloberfläche erschien dabei homogen. In der vorliegenden Arbeit konnte in lebenden Zellen die hohe Bedeckung der Oberfläche und die Verteilung der Purpurmembra-„Patches“ mit einer Bop-GFP-Fusion verifiziert werden. Die Zunahme der Größe der BR-Areale von früh- zu spätstationären Zellen und die Existenz von Arealen unterschiedlicher Größe steht mit der Vermutung im Einklang, dass einzelne kleine Areale zu größeren fusionieren können (Neugebauer *et al.*, 1978). Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie ermöglicht die Fluoreszenzmikroskopie die Analyse von vielen Zellen. Sie erlaubt zudem die zeitabhängige Untersuchung der Entwicklung der Purpurmembra.

Es stellte sich in der vorliegenden Arbeit heraus, dass eine *H. salinarum* Zellpopulation sehr heterogen in Bezug auf den Beginn der Bildung der Purpurmembra war. Anfangs konnte die Bildung in 10 % der Zellen beobachtet werden. Sieben Stunden später hatten alle Zellen der Population mindestens ein BR-Areal. Diese Heterogenität der Population kann nur mit einer Methode untersucht werden die es erlaubt, einzelne Zellen zu beobachten. Obwohl die Regulation der *bop* Genexpression (Baliga & Dassarma, 2000; Shand & Betlach, 1991; Sumper *et al.*, 1976) und die Bildung der Purpurmembra (Neugebauer *et al.*, 1978; Oesterhelt & Stoeckenius, 1973; Sumper *et al.*, 1976) in der Vergangenheit intensiv studiert wurden, ist diese Beobachtung völlig neu. Frühere Untersuchungen konzentrierten sich auf Techniken, die einen Durchschnitt der Zellpopulation vermitteln, z. B. biochemische Isolation der Purpurmembra oder Western und Northern Blot Analysen (Shand & Betlach, 1991; Sumper *et al.*, 1976). BR wird sehr stark exprimiert, stationäre *H. salinarum* Zellen enthalten rund 400000 BR-Moleküle. Falls die Proteinmengen des chromosomalen *bop* und des plasmidkodierten *bop-gfp* Transkriptes gleich wären und eine Zelle acht BR-Areale

enthält, würde ein „Patch“ einer Zelle in der späten stationären Phase aus 20000 BR-Moleküle bestehen. Da zu Beginn der Bildung der Purpurchromatophore auch kleine Fluoreszenzsignale visualisiert werden konnten und die Menge des *bop-gfp* Transkriptes deutlich geringer ist als die des *bop* Transkriptes, ist die Nachweisgrenze weitaus geringer. In *B. subtilis* war es möglich, ein Protein mit einem geringen Expressionslevel zu sehen. Dabei handelt es sich um die DNA-Polymerase, von der es schätzungsweise 40 Kopien pro Zelle gibt (Lemon & Grossman, 1998). In Zellen, bei denen keine Replikation stattfand, gab es keine fluoreszierenden Signale. Vermutlich kann man mit der Methode keine Einzelmoleküle detektieren. In replizierenden Zellen, bei denen sich viele DNAP Moleküle in der Nähe der Replikationsgabel befinden, kann man ein bis drei Fluoreszenzsignale beobachten. Folglich scheint die Nachweisgrenze bei 10 Molekülen zu liegen. Ob das auch für *H. salinarum* zutrifft, muß noch analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass man mit GFP-Fusionsproteinen wichtige zellbiologische Fragestellungen in Haloarchaea klären kann. Mit der Technik könnten z. B. zellzyklusabhängige Proteinlokalisations-Studien betrieben werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adachi, S., Kohiyama, M., Onogi, T. & Hiraga, S. (2005).** Localization of replication forks in wild-type and mukB mutant cells of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* **274**, 264-271.
- Adachi, S., Fukushima, T. & Hiraga, S. (2008).** Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes Cells* **13**, 181-197.
- Aiba, H. (1985).** Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein. *J Biol Chem* **260**, 3063-3070.
- Allers, T. & Mevarech, M. (2005).** Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet* **6**, 58-73.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Arents, G. & Moudrianakis, E. N. (1995).** The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11170-11174.
- Bailey, T. L. & Elkan, C. (1994).** Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**, 28-36.
- Bailey, T. L. & Elkan, C. (1995).** The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 21-29.
- Bailey, T. L. & Gribskov, M. (1998).** Methods and statistics for combining motif match scores. *J Comput Biol* **5**, 211-221.
- Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C. & Li, W. W. (2006).** MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* **34**, W369-373.
- Baliga, N. S. & Dassarma, S. (2000).** Saturation mutagenesis of the haloarchaeal bop gene promoter: identification of DNA supercoiling sensitivity sites and absence of TFB recognition element and UAS enhancer activity. *Mol Microbiol* **36**, 1175-1183.
- Baliga, N. S., Goo, Y. A., Ng, W. V., Hood, L., Daniels, C. J. & DasSarma, S. (2000).** Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Mol Microbiol* **36**, 1184-1185.
- Baliga, N. S., Kennedy, S. P., Ng, W. V., Hood, L. & DasSarma, S. (2001).** Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2521-2525.
- Baliga, N. S., Pan, M., Goo, Y. A., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Dimitrov, K., Shannon, P., Aebersold, R., Ng, W. V. & Hood, L. (2002).** Coordinate regulation of energy transduction modules in *Halobacterium* sp. analyzed by a global systems approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14913-14918.
- Baliga, N. S., Bjork, S. J., Bonneau, R., Pan, M., Iloanusi, C., Kottemann, M. C., Hood, L. & DiRuggiero, J. (2004).** Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1. *Genome Res* **14**, 1025-1035.

- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. & Pace, N. R. (1996).** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9188-9193.
- Baroni, M. D., Monti, P. & Alberghina, L. (1994).** Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. *Nature* **371**, 339-342.
- Barry, E. R. & Bell, S. D. (2006).** DNA replication in the archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 876-887.
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe, K. L. & Sonnhammer, E. L. (2000).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **28**, 263-266.
- Bates, D., Epstein, J., Boye, E., Fahrner, K., Berg, H. & Kleckner, N. (2005).** The *Escherichia coli* baby cell column: a novel cell synchronization method provides new insight into the bacterial cell cycle. *Mol Microbiol* **57**, 380-391.
- Baumann, A., Lange, C. & Soppa, J. (2007).** Transcriptome changes and cAMP oscillations in an archaeal cell cycle. *BMC Cell Biol* **8**, 21.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (1998).** Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol* **6**, 222-228.
- Bell, S. D., Botting, C. H., Wardleworth, B. N., Jackson, S. P. & White, M. F. (2002).** The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science* **296**, 148-151.
- Bernander, R. & Poplawski, A. (1997).** Cell cycle characteristics of thermophilic archaea. *J Bacteriol* **179**, 4963-4969.
- Berquist, B. R. & DasSarma, S. (2003).** An archaeal chromosomal autonomously replicating sequence element from an extreme halophile, *Halobacterium* sp. strain NRC-1. *J Bacteriol* **185**, 5959-5966.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bisle, B., Schmidt, A., Scheibe, B., Klein, C., Tebbe, A., Kellermann, J., Siedler, F., Pfeiffer, F., Lottspeich, F. & Oesterhelt, D. (2006).** Quantitative profiling of the membrane proteome in a halophilic archaeon. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1543-1558.
- Blaurock, A. E. & StoECKenius, W. (1971).** Structure of the purple membrane. *Nat New Biol* **233**, 152-155.
- Brenneis, M., Hering, O., Lange, C. & Soppa, J. (2007).** Experimental Characterization of Cis-Acting Elements Important for Translation and Transcription in Halophilic Archaea. *PLoS Genet* **3**, e229.
- Breuert, S., Allers, T., Spohn, G. & Soppa, J. (2006).** Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PLoS ONE* **1**, e92.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987).** *XL1-blue a high efficiency plasmid transforming recA Echerichia coli strain with beta galactosidase selection.* Stratagene, Leiden, NL.
- Cassler, M. R., Grimwade, J. E. & Leonard, A. C. (1995).** Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. *Embo J* **14**, 5833-5841.

**Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

**Chen, J. (2005).** Identification of significant periodic genes in microarray gene expression data. *BMC Bioinformatics* **6**, 286.

**Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G., Gabrielian, A. E., Landsman, D., Lockhart, D. J. & Davis, R. W. (1998).** A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* **2**, 65-73.

**Cho, R. J., Huang, M., Campbell, M. J., Dong, H., Steinmetz, L., Sapinoso, L., Hampton, G., Elledge, S. J., Davis, R. W. & Lockhart, D. J. (2001).** Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nat Genet* **27**, 48-54.

**Chomczynski, P. & 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. & Doolittle, W. F. (1989a).** Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can J Microbiol* **35**, 148-152.

**Cline, S. W., Schalkwyk, L. C. & Doolittle, W. F. (1989b).** Transformation of the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *J Bacteriol* **171**, 4987-4991.

**Cooper, S. & Shedden, K. (2003).** Microarray analysis of gene expression during the cell cycle. *Cell Chromosome* **2**, 1.

**Cooper, S. (2005).** Comment on and reply to "Analysis of variation of amplitudes in cell cycle gene expression" by Liu, Gaido and Wolfinger: on the analysis of gene expression during the normal, eukaryotic, cell cycle. *Theor Biol Med Model* **2**, 47.

**Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. & Stemmer, W. P. (1996).** Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* **14**, 315-319.

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

**Davis, S. J. & Vierstra, R. D. (1998).** Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* **36**, 521-528.

**De Felice, M., Esposito, L., Pucci, B., Carpentieri, F., De Falco, M., Rossi, M. & Pisani, F. M. (2003).** Biochemical characterization of a CDC6-like protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* **278**, 46424-46431.

**de Lichtenberg, U., Jensen, L. J., Fausboll, A., Jensen, T. S., Bork, P. & Brunak, S. (2005).** Comparison of computational methods for the identification of cell cycle-regulated genes. *Bioinformatics* **21**, 1164-1171.

**Dennis, P. P. (1997).** Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**, 1007-1010.

**Dennis, P. P. & Shimmin, L. C. (1997).** Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 90-104.

**Dickinson, J. R., Graves, M. G. & Swoboda, B. E. (1976).** Cyclic AMP metabolism in the cell cycle of *Tetrahymena pyriformis*. *FEBS Lett* **65**, 152-154.

**Dinger, M. E., Baillie, G. J. & Musgrave, D. R. (2000).** Growth phase-dependent expression and degradation of histones in the thermophilic archaeon *Thermococcus zilligii*. *Mol Microbiol* **36**, 876-885.

**Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.

**Dwek, R. D., Kobrin, L. H., Grossman, N. & Ron, E. Z. (1980).** Synchronization of cell division in microorganisms by percoll gradients. *J Bacteriol* **144**, 17-21.

**Edman, K., Nollert, P., Royant, A., Belrhali, H., Pebay-Peyroula, E., Hajdu, J., Neutze, R. & Landau, E. M. (1999).** High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle. *Nature* **401**, 822-826.

**Edmonds, B. W. & Luecke, H. (2004).** Atomic resolution structures and the mechanism of ion pumping in bacteriorhodopsin. *Front Biosci* **9**, 1556-1566.

**Erzberger, J. P., Pirruccello, M. M. & Berger, J. M. (2002).** The structure of bacterial DnaA: implications for general mechanisms underlying DNA replication initiation. *Embo J* **21**, 4763-4773.

**Evinger, M. & Agabian, N. (1977).** Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol* **132**, 294-301.

**Eymann, C., Becher, D., Bernhardt, J., Gronau, K., Klutzny, A. & Hecker, M. (2007).** Dynamics of protein phosphorylation on Ser/Thr/Tyr in *Bacillus subtilis*. *Proteomics* **7**, 3509-3526.

**Facciotti, M. T., Reiss, D. J., Pan, M., Kaur, A., Vuthoori, M., Bonneau, R., Shannon, P., Srivastava, A., Donohoe, S. M., Hood, L. E. & Baliga, N. S. (2007).** General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4630-4635.

**Flory, M. R., Lee, H., Bonneau, R., Mallick, P., Serikawa, K., Morris, D. R. & Aebersold, R. (2006).** Quantitative proteomic analysis of the budding yeast cell cycle using acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagents. *Proteomics* **6**, 6146-6157.

**Forbes, A. J., Patrie, S. M., Taylor, G. K., Kim, Y. B., Jiang, L. & Kelleher, N. L. (2004).** Targeted analysis and discovery of posttranslational modifications in proteins from methanogenic archaea by top-down MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2678-2683.

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

**Futcher, B., Latter, G. I., Monardo, P., McLaughlin, C. S. & Garrels, J. I. (1999).** A sampling of the yeast proteome. *Mol Cell Biol* **19**, 7357-7368.

**Galperin, M. Y. (2005).** A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* **5**, 35.

**Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K. & Weissman, J. S. (2003).** Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737-741.

- Gorodkin, J., Heyer, L. J., Brunak, S. & Stormo, G. D. (1997).** Displaying the information contents of structural RNA alignments: the structure logos. *Comput Appl Biosci* **13**, 583-586.
- Grabowski, B. & Kelman, Z. (2001).** Autophosphorylation of archaeal Cdc6 homologues is regulated by DNA. *J Bacteriol* **183**, 5459-5464.
- Graumann, P. L. (2007).** Cytoskeletal elements in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**, 589-618.
- Grey, V. L. & Fitt, P. S. (1976).** An improved synthetic growth medium for *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Microbiol* **22**, 440-442.
- Grunberg, S., Bartlett, M. S., Naji, S. & Thomm, M. (2007).** Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. *J Biol Chem* **282**, 35482-35490.
- Grunenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Roder, D., Langen, H. & Jenal, U. (2001).** Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4681-4686.
- Gygi, S. P. & Aebersold, R. (1999).** Absolute quantitation of 2-D protein spots. *Methods Mol Biol* **112**, 417-421.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. & Aebersold, R. (1999a).** Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-999.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. (1999b).** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 1720-1730.
- Hanahan, D. (1985).** *Techniques for transformation of E. coli. In: DNA cloning-A practical approach, Band 1, 109-135.*: Glover, D. M. IRL Press, Oxford, Washington D. C.
- Hanzelka, B. L., Darcy, T. J. & Reeve, J. N. (2001).** TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIIEalpha. *J Bacteriol* **183**, 1813-1818.
- Hara, F., Yamashiro, K., Nemoto, N., Ohta, Y., Yokobori, S., Yasunaga, T., Hisanaga, S. & Yamagishi, A. (2007).** An actin homolog of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* that retains the ancient characteristics of eukaryotic actin. *J Bacteriol* **189**, 2039-2045.
- Haupts, U., Tittor, J. & Oesterhelt, D. (1999).** Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 367-399.
- Heim, R., Cubitt, A. B. & Tsien, R. Y. (1995).** Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Helmstetter, C. E., Eenhuis, C., Theisen, P., Grimwade, J. & Leonard, A. C. (1992).** Improved bacterial baby machine: application to *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **174**, 3445-3449.
- Henderson, R. & Unwin, P. N. (1975).** Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**, 28-32.

- Herrick, D., Parker, R. & Jacobson, A. (1990).** Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 2269-2284.
- Herrmann, U. (2002).** Untersuchung des Zellzyklusses von *Halobacterium salinarum* unter besonderer Berücksichtigung des SMC-Proteins Sph1. <http://publikationenubuni-frankfurt.de/volltexte/2003/236/>.
- Herrmann, U. & Soppa, J. (2002).** Cell cycle-dependent expression of an essential SMC-like protein and dynamic chromosome localization in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **46**, 395-409.
- Hjort, K. & 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. & Bernander, R. (2001).** Cell cycle regulation in the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Mol Microbiol* **40**, 225-234.
- Hofacker, A., Schmitz, K. M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2004).** GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* **150**, 1829-1838.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. & Stetter, K. O. (2002).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63-67.
- Huberman, J. A. (1981).** New views of the biochemistry of eucaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase alpha. *Cell* **23**, 647-648.
- Hughes, J. D., Estep, P. W., Tavazoie, S. & Church, G. M. (2000).** Computational identification of cis-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **296**, 1205-1214.
- Hundt, S., Zaigler, A., Lange, C., Soppa, J. & Klug, G. (2007).** Global analysis of mRNA decay in *Halobacterium salinarum* NRC-1 at single-gene resolution using DNA microarrays. *J Bacteriol* **189**, 6936-6944.
- Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J., Jr., Boguski, M. S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D. & Brown, P. O. (1999).** The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* **283**, 83-87.
- Jansson, B. P., Malandrin, L. & 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. & Shapiro, L. (1999).** Chromosome segregation during the prokaryotic cell division cycle. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 726-731.
- Jensen, R. B., Wang, S. C. & Shapiro, L. (2001).** A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus*. *Embo J* **20**, 4952-4963.
- Kelly, A. J., Sackett, M. J., Din, N., Quardokus, E. & Brun, Y. V. (1998).** Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*. *Genes Dev* **12**, 880-893.
- Kirkland, P. A., Busby, J., Stevens, S., Jr. & Maupin-Furlow, J. A. (2006).** Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins. *Anal Biochem* **351**, 254-259.

**Klein, C., Garcia-Rizo, C., Bisle, B., Scheffer, B., Zischka, H., Pfeiffer, F., Siedler, F. & Oesterhelt, D. (2005).** The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics* **5**, 180-197.

**Klein, C., Aivaliotis, M., Olsen, J. V., Falb, M., Besir, H., Scheffer, B., Bisle, B., Tebbe, A., Konstantinidis, K., Siedler, F., Pfeiffer, F., Mann, M. & Oesterhelt, D. (2007).** The low molecular weight proteome of *Halobacterium salinarum*. *J Proteome Res* **6**, 1510-1518.

**Kurose, A., Tanaka, T., Huang, X., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. (2006).** Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage. *Cell Prolif* **39**, 231-240.

**La Teana, A., Brandi, A., O'Connor, M., Freddi, S. & Pon, C. L. (2000).** Translation during cold adaptation does not involve mRNA-rRNA base pairing through the downstream box. *Rna* **6**, 1393-1402.

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

**Lange, C., Zaigler, A., Hammelmann, M., Twellmeyer, J., Raddatz, G., Schuster, S. C., Oesterhelt, D. & Soppa, J. (2007).** Genome-wide analysis of growth phase-dependent translational and transcriptional regulation in halophilic archaea. *BMC Genomics* **8**, 415.

**Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. & Zillig, W. (1995).** Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5768-5772.

**Lanyi, J. K. (2004).** X-ray diffraction of bacteriorhodopsin photocycle intermediates. *Mol Membr Biol* **21**, 143-150.

**Lanyi, J. K. (2006).** Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1012-1018.

**Large, A., Stamme, C., Lange, C., Duan, Z., Allers, T., Soppa, J. & Lund, P. A. (2007).** Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene. *Mol Microbiol* **66**, 1092-1106.

**Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M. & Shapiro, L. (2000).** Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**, 2144-2148.

**Leichtling, B. H., Rickenberg, H. V., Seely, R. J., Fahrney, D. E. & Pace, N. R. (1986).** The occurrence of cyclic AMP in archaebacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **136**, 1078-1082.

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

**Lengronne, A., Pasero, P., Bensimon, A. & Schwob, E. (2001).** Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK(+) yeast strains. *Nucleic Acids Res* **29**, 1433-1442.

- Lewis, P. J. & Errington, J. (1997).** Direct evidence for active segregation of oriC regions of the *Bacillus subtilis* chromosome and co-localization with the SpoOJ partitioning protein. *Mol Microbiol* **25**, 945-954.
- Littlefield, O., Korkhin, Y. & Sigler, P. B. (1999).** The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13668-13673.
- Liu, J., Smith, C. L., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G. S. & Berger, J. M. (2000).** Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol Cell* **6**, 637-648.
- Low, R. & Rausch, T. (1994).** Sensitive, nonradioactive northern blots using alkaline transfer of total RNA and PCR-amplified biotinylated probes. *Biotechniques* **17**, 1026-1028, 1030.
- Lundgren, M., Andersson, A., Chen, L., Nilsson, P. & Bernander, R. (2004).** Three replication origins in *Sulfolobus* species: synchronous initiation of chromosome replication and asynchronous termination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7046-7051.
- Lundgren, M. & Bernander, R. (2007).** Genome-wide transcription map of an archaeal cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2939-2944.
- Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J. V., Gnad, F., Kumar, C., Jensen, P. R. & Mann, M. (2007).** The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* **6**, 697-707.
- Macek, B., Gnad, F., Soufi, B., Kumar, C., Olsen, J. V., Mijakovic, I. & Mann, M. (2008).** Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* **7**, 299-307.
- Margolin, W. (2000).** Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells. *Methods* **20**, 62-72.
- Marguerat, S., Jensen, T. S., de Lichtenberg, U., Wilhelm, B. T., Jensen, L. J. & Bahler, J. (2006).** The more the merrier: comparative analysis of microarray studies on cell cycle-regulated genes in fission yeast. *Yeast* **23**, 261-277.
- McCready, S. & Marcello, L. (2003).** Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum*. *Biochem Soc Trans* **31**, 694-698.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W. & Murray, J. A. (2002).** Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 41987-42002.
- Menges, M. & Murray, J. A. (2002).** Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J* **30**, 203-212.
- Mescher, M. F. & Strominger, J. L. (1976).** Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarum*. *J Biol Chem* **251**, 2005-2014.
- Ming, Y. Z., Di, X., Gomez-Sanchez, E. P. & Gomez-Sanchez, C. E. (1994).** Improved downward capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Biotechniques* **16**, 58-59.
- Mori, K. & Aiba, H. (1985).** Evidence for negative control of *cya* transcription by cAMP and cAMP receptor protein in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **260**, 14838-14843.

- Muller, D., Exler, S., Aguilera-Vazquez, L., Guerrero-Martin, E. & Reuss, M. (2003).** Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**, 351-367.
- Myung, K., Chen, C. & Kolodner, R. D. (2001).** Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **411**, 1073-1076.
- Neugebauer, D. C., Zingsheim, H. P. & Oesterhelt, D. (1978).** Recrystallization of the purple membrane in vivo and in vitro. *J Mol Biol* **123**, 247-257.
- Newman, J. R., Ghaemmaghami, S., Ihmels, J., Breslow, D. K., Noble, M., DeRisi, J. L. & Weissman, J. S. (2006).** Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature* **441**, 840-846.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welte, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K. W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Eberhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L. & DasSarma, S. (2000).** Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12176-12181.
- Nomura, S. & Harada, Y. (1998).** Functional expression of green fluorescent protein derivatives in *Halobacterium salinarum*. *FEMS Microbiol Lett* **167**, 287-293.
- Norais, C., Hawkins, M., Hartman, A. L., Eisen, J. A., Myllykallio, H. & Allers, T. (2007).** Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloferax volcanii*. *PLoS Genet* **3**, e77.
- O'Connor, M., Asai, T., Squires, C. L. & Dahlberg, A. E. (1999).** Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8973-8978.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1971).** Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* **233**, 149-152.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1973).** Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 2853-2857.
- Oliva, A., Rosebrock, A., Ferrezuelo, F., Pyne, S., Chen, H., Skiena, S., Futcher, B. & Leatherwood, J. (2005).** The cell cycle-regulated genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Biol* **3**, e225.
- Pearson, W. R. (1990).** Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol* **183**, 63-98.
- Peng, X., Karuturi, R. K., Miller, L. D., Lin, K., Jia, Y., Kondu, P., Wang, L., Wong, L. S., Liu, E. T., Balasubramanian, M. K. & Liu, J. (2005).** Identification of cell cycle-regulated genes in fission yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 1026-1042.
- Pfeifer, F., Weidinger, G. & Goebel, W. (1981).** Genetic variability in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* **145**, 375-381.
- Pfeiffer, F., Schuster, S. C., Broicher, A., Falb, M., Palm, P., Rodewald, K., Ruepp, A., Soppa, J., Tittor, J. & Oesterhelt, D. (2008).** Evolution in the laboratory: The genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1. *Genomics*.

- Phillips, G. J. (2001).** Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 9-18.
- Plaga, W., Lottspeich, F. & Oesterhelt, D. (1992).** Improved purification, crystallization and primary structure of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from Halobacterium halobium. *Eur J Biochem* **205**, 391-397.
- Poppe, M., Feller, S. M., Romer, G. & Wessler, S. (2007).** Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* **26**, 3462-3472.
- Preston, C. M., Wu, K. Y., Molinski, T. F. & DeLong, E. F. (1996).** A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: Cenarchaeum symbiosum gen. nov., sp. nov. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6241-6246.
- Price, D. H. (2008).** Poised polymerases: on your mark.get set.go! *Mol Cell* **30**, 7-10.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Bretkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R. R., Schmidt, M. C., Rachidi, N., Lee, S. J., Mah, A. S., Meng, L., Stark, M. J., Stern, D. F., De Virgilio, C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, P. F. & Snyder, M. (2005).** Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**, 679-684.
- Qureshi, S. A. & Jackson, S. P. (1998).** Sequence-specific DNA binding by the S. shibatae TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol Cell* **1**, 389-400.
- Raghuraman, M. K., Winzeler, E. A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D. J., Davis, R. W., Brewer, B. J. & Fangman, W. L. (2001).** Replication dynamics of the yeast genome. *Science* **294**, 115-121.
- Reuter, C. J. & Maupin-Furlow, J. A. (2004).** Analysis of proteasome-dependent proteolysis in Haloferax volcanii cells, using short-lived green fluorescent proteins. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7530-7538.
- Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E. & Lake, J. A. (1998).** Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6239-6244.
- Rudolph, J. & Oesterhelt, D. (1995).** Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon Halobacterium salinarium. *Embo J* **14**, 667-673.
- Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S. C. & Oesterhelt, D. (1995).** Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *Embo J* **14**, 4249-4257.
- Ruepp, A. & Soppa, J. (1996).** Fermentative arginine degradation in Halobacterium salinarium (formerly Halobacterium halobium): genes, gene products, and transcripts of the arcRACB gene cluster. *J Bacteriol* **178**, 4942-4947.
- Ruepp, A., Wanner, G. & Soppa, J. (1998).** A 71-kDa protein from Halobacterium salinarium belongs to a ubiquitous P-loop ATPase superfamily with head-rod-tail structure. *Arch Microbiol* **169**, 1-9.
- Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lio, P., Penkett, C. J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P. & Bahler, J. (2004).** Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* **36**, 809-817.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1992).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-108.

- Santangelo, T. J. & Reeve, J. N. (2006).** Archaeal RNA polymerase is sensitive to intrinsic termination directed by transcribed and remote sequences. *J Mol Biol* **355**, 196-210.
- Sauer, G., Korner, R., Hanisch, A., Ries, A., Nigg, E. A. & Sillje, H. H. (2005).** Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics* **4**, 35-43.
- Schmelzle, K. & White, F. M. (2006).** Phosphoproteomic approaches to elucidate cellular signaling networks. *Curr Opin Biotechnol* **17**, 406-414.
- Schneider, T. D. & Stephens, R. M. (1990).** Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* **18**, 6097-6100.
- Schwob, E. & Nasmyth, K. (1993).** CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**, 1160-1175.
- Shand, R. F. & Betlach, M. C. (1991).** Expression of the bop gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light. *J Bacteriol* **173**, 4692-4699.
- Shin, J. H., Grabowski, B., Kasiviswanathan, R., Bell, S. D. & Kelman, Z. (2003).** Regulation of minichromosome maintenance helicase activity by Cdc6. *J Biol Chem* **278**, 38059-38067.
- Siccardi, A. G., Galizzi, A., Mazza, G., Clivio, A. & Albertini, A. M. (1975).** Synchronous germination and outgrowth of fractionated *Bacillus subtilis* spores: tool for the analysis of differentiation and division of bacterial cells. *J Bacteriol* **121**, 13-19.
- Skorko, R. (1984).** Protein phosphorylation in the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem* **145**, 617-622.
- Smith, M. E., Dickinson, J. R. & Wheals, A. E. (1990).** Intracellular and extracellular levels of cyclic AMP during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**, 53-60.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Smith, S. C., Kennelly, P. J. & Potts, M. (1997).** Protein-tyrosine phosphorylation in the Archaea. *J Bacteriol* **179**, 2418-2420.
- Soppa, J. & Oesterhelt, D. (1989).** Bacteriorhodopsin mutants of *Halobacterium* sp. GRB. I. The 5-bromo-2'-deoxyuridine selection as a method to isolate point mutants in halobacteria. *J Biol Chem* **264**, 13043-13048.
- 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., Kobayashi, K., Noirot-Gros, M. F., Oesterhelt, D., Ehrlich, S. D., Dervyn, E., Ogasawara, N. & Moriya, S. (2002).** Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. *Mol Microbiol* **45**, 59-71.
- Soppa, J. (2006).** From genomes to function: haloarchaea as model organisms. *Microbiology* **152**, 585-590.

- Soppa, J., Baumann, A., Brenneis, M., Dambeck, M., Hering, O. & Lange, C. (2008).** Genomics and functional genomics with haloarchaea. *Arch Microbiol*.
- Sorrell, D. A., Menges, M., Healy, J. M., Deveaux, Y., Amano, C., Su, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A., Doonan, J. H., Sekine, M. & Murray, J. A. (2001).** Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol* **126**, 1214-1223.
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D. & Futcher, B. (1998).** Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**, 3273-3297.
- Spudich, J. L. & Stoeckenius, W. (1980).** Light-regulated retinal-dependent reversible phosphorylation of *Halobacterium* proteins. *J Biol Chem* **255**, 5501-5503.
- Sumper, M., Reitmeier, H. & Oesterhelt, D. (1976).** Biosynthesis of the purple membrane of halobacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* **15**, 187-194.
- 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. & Koonin, E. V. (2001).** The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* **29**, 22-28.
- Tebbe, A., Klein, C., Bisle, B., Siedler, F., Scheffer, B., Garcia-Rizo, C., Wolfertz, J., Hickmann, V., Pfeiffer, F. & Oesterhelt, D. (2005).** Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation. *Proteomics* **5**, 168-179.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Tokiwa, G., Tyers, M., Volpe, T. & Futcher, B. (1994).** Inhibition of G1 cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. *Nature* **371**, 342-345.
- Trent, J. D., Kagawa, H. K., Yaoi, T., Olle, E. & Zaluzec, N. J. (1997).** Chaperonin filaments: the archaeal cytoskeleton? *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5383-5388.
- Twilmeyer, J., Wende, A., Wolfertz, J., Pfeiffer, F., Panhuysen, M., Zaigler, A., Soppa, J., Welzl, G. & Oesterhelt, D. (2007).** Microarray Analysis in the Archaeon *Halobacterium salinarum* Strain R1. *PLoS ONE* **2**, e1064.
- Unlu, M., Morgan, M. E. & Minden, J. S. (1997).** Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-2077.
- Vogel, W., Autenrieth, M. & Speit, G. (1986).** Detection of bromodeoxyuridine-incorporation in mammalian chromosomes by a bromodeoxyuridine-antibody. I. Demonstration of replication patterns. *Hum Genet* **72**, 129-132.
- Voisin, S., Watson, D. C., Tessier, L., Ding, W., Foote, S., Bhatia, S., Kelly, J. F. & Young, N. M. (2007).** The cytoplasmic phosphoproteome of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*: evidence for modification by unidentified protein kinases. *Proteomics* **7**, 4338-4348.

**Waters, E., Hohn, M. J., Ahel, I., Graham, D. E., Adams, M. D., Barnstead, M., Beeson, K. Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., Kretz, K., Lin, X., Mathur, E., Ni, J., Podar, M., Richardson, T., Sutton, G. G., Simon, M., Soll, D., Stetter, K. O., Short, J. M. & Noordewier, M. (2003).** The genome of Nanoarchaeum equitans: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12984-12988.

**Watson, D. C. & Berry, D. R. (1977).** Fluctuations in cAMP levels during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **1**, 175 - 178.

**Whitfield, M. L., Sherlock, G., Saldanha, A. J., Murray, J. I., Ball, C. A., Alexander, K. E., Matese, J. C., Perou, C. M., Hurt, M. M., Brown, P. O. & Botstein, D. (2002).** Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* **13**, 1977-2000.

**Wichert, S., Fokianos, K. & Strimmer, K. (2004).** Identifying periodically expressed transcripts in microarray time series data. *Bioinformatics* **20**, 5-20.

**Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088-5090.

**Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-4579.

**Xie, Y. & Reeve, J. N. (2004).** Transcription by an archaeal RNA polymerase is slowed but not blocked by an archaeal nucleosome. *J Bacteriol* **186**, 3492-3498.

**Yabuki, N., Terashima, H. & Kitada, K. (2002).** Mapping of early firing origins on a replication profile of budding yeast. *Genes Cells* **7**, 781-789.

**Yan, J. X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R. A., Westbrook, J. A., Wheeler, C. H. & Dunn, M. J. (2000).** A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**, 3666-3672.

**Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N., Jr. (1996).** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**, 1246-1251.

**Zaigler, A., Schuster, S. C. & Soppa, J. (2003).** Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* **48**, 1089-1105.

**Zaparty, M., Zaigler, A., Stamme, C., Soppa, J., Hensel, R. & Siebers, B. (2008).** DNA microarray analysis of central carbohydrate metabolism: glycolytic/gluconeogenic carbon switch in the hyperthermophilic crenarchaeum *Thermoproteus tenax*. *J Bacteriol* **190**, 2231-2238.

**Zhang, R. & Zhang, C. T. (2003).** Multiple replication origins of the archaeon *Halobacterium* species NRC-1. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 728-734.

**Zhang, R. & Zhang, C. T. (2005).** Identification of replication origins in archaeal genomes based on the Z-curve method. *Archaea* **1**, 335-346.

---

## 7. Abkürzungsverzeichnis

|         |  |
|---------|--|
| °C      | Grad Celsius   |
| Abb.    | Abbildung  |
| APS     | Ammoniumperoxodisulfat                               |
| ATP     | Adenosintriphosphat                                  |
| bidest  | bidestilliert  |
| bp      | Basenpaare   |
| Bop     | Bacterio-Opsin                                       |
| BR      | Bacteriorhodopsin                                    |
| BrdU    | 5'-Brom-2-deoxyuridin                                |
| BSA     | Rinderserumalbumin                                   |
| ca.     | zirka  |
| cAMP    | zyklisches Adenosinmonophosphat                      |
| cDNA    | <i>complementary</i> DNA                             |
| CTP     | Cytosintriphosphat                                   |
| DIG     | Digoxigenin  |
| DMPC    | Dimyristoylphosphatidylcholine                       |
| DMSO    | Dimethylsulfoxid                                     |
| DNA     | Desoxyribonukleinsäure                               |
| DNAP    | DNA-Polymerase                                       |
| DNase   | DNA-Nuklease   |
| dNTP    | Desoxyribonukleintriphosphat                         |
| EDTA    | Ethylendiamintetraessigsäure                         |
| G-Phase | <i>gap</i> -Phase                                    |
| g       | Gramm  |
| x g     | Erdbeschleunigung                                    |
| GFP     | <i>green fluorescent protein</i>                     |
| GTP     | Guanosintriphosphat                                  |
| h       | Stunden  |
| HeLa    | menschliche Epithelzellen ( <b>Henrietta Lacks</b> ) |
| l       | Liter  |
| kDa     | Kilodalton   |
| min     | Minuten  |
| M       | Molar  |
| μ       | mikro  |
| ml      | Milliliter   |

---

|       |  |
|-------|--|
| MOPS  | Morpholinopropansulfonsäure            |
| mRNA  | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure      |
| nm    | Nanometer                              |
| nt    | Nukleotide                             |
| OD    | Optische Dichte                        |
| orf   | <i>open reading frame</i>              |
| ori   | <i>origin of replication</i>           |
| PCR   | <i>polymerase chain reaction</i>       |
| Prom  | Promotor                               |
| RNA   | Ribonukleinsäure                       |
| RNAP  | RNA-Polymerase                         |
| RNase | RNA-Nuklease                           |
| SD    | <i>Shine-Dalgarno</i>                  |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat                   |
| sec   | Sekunden                               |
| Tbl.  | Tabelle                                |
| TBP   | TATA-Box <i>binding protein</i>        |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin            |
| TFB   | <i>transcription factor B</i>          |
| Tris  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan        |
| tRNA  | <i>transfer</i> RNA                    |
| TTP   | Tyrosintriphosphat                     |
| Tween | Polyoxyethylenglyolsorbitolmonolaureat |
| U     | <i>units</i> (Aktivitätseinheit)       |
| u.a.  | und andere/unter anderem               |
| v/v   | Volumen/Volumen                        |
| w/v   | Masse/Volumen                          |
| z. B. | zum Beispiel                           |
| 2D    | zweidimensional                        |