

**Chlorid, ein neues Signalmolekül für Bakterien:
Identifizierung und molekulare Charakterisierung
Cl⁻-regulierter Prozesse in dem moderat halophilen
Bakterium *Halobacillus halophilus***

**Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von
Markus Roeßler
aus der Hansestadt Lübeck

Dezember 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Wanner

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 2002

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die Bedeutung von Cl ⁻ in Eukaryonten	7
1.2	Die Bedeutung von Cl ⁻ in Prokaryonten	10
1.3	Die Cl ⁻ -Abhängigkeit von <i>H. halophilus</i>	15
1.4	Fragestellung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Organismen, Plasmide und Oligonukleotide	17
2.2	Zellanzucht	21
2.2.1	Nährmedien	21
2.2.2	Anzucht von <i>H. halophilus</i>	22
2.2.3	Anzucht von <i>E. coli</i>	23
2.2.4	Wachstumsversuche	23
2.3	Versuche mit Zellsuspensionen	23
2.3.1	Herstellung von Zellsuspensionen	23
2.3.2	Silikonölzentrifugation nach BLAUT (1984)	24
2.3.3	Bestimmung des elektrischen Membranpotentials ($\Delta\psi$)	25
2.3.4	Bestimmung des ATP-Gehaltes ganzer Zellen	26
2.3.5	Versuche zum Betain-Transport	26
2.3.6	Bestimmung der Radioaktivität	27
2.4	Molekularbiologische Methoden	27
2.4.1	Standardmethoden zur Analyse und Modifikation von DNA	27
2.4.2	Isolierung von Nukleinsäuren	28
2.4.2.1	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>H. halophilus</i>	28
2.4.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>H. halophilus</i>	29
2.4.3	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	30
2.4.4	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	30

2.4.5	Generierung von DNA-Fragmenten durch reverse Transkriptase	31
2.4.6	Übertragung von Nukleinsäuren auf Membranen	31
2.4.6.1	Southern-Blots (SOUTHERN, 1975)	31
2.4.6.2	Northern-Blots (modifiziert nach ALWINE <i>et al.</i> [1977])	32
2.4.6.3	Herstellung von Filtern für die Koloniehybridisierung	32
2.4.7	Hybridisierung	32
2.4.7.1	Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	32
2.4.7.2	Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	33
2.4.7.3	Autoradiographie	34
2.5	Biochemische Methoden	34
2.5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	34
2.5.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.5.3	2D-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
2.5.4	Herstellung von Antiseren	36
2.5.5	Western-Blot	37
2.6	Reinigung von Flagellin	38
2.7	Elektronenmikroskopie	38
2.8	Chemikalien und Enzyme	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Cl ⁻ ist nicht in die primäre Bioenergetik von <i>H. halophilus</i> involviert	41
3.1.1	Einfluß von Cl ⁻ auf das Membranpotential von <i>H. halophilus</i>	41
3.1.2	Ist Cl ⁻ für die ATP-Synthese in <i>H. halophilus</i> notwendig?	43
3.1.3	Zusammenfassung der bioenergetischen Studien an <i>H. halophilus</i>	44
3.2	Der Cl ⁻ -abhängige Betain-Transport in <i>H. halophilus</i>	46

3.2.1	Die Akkumulation von Betain in <i>H. halophilus</i> ist salzabhängig	46
3.2.2	Wirkung von Anionen auf den Betain-Transport	48
3.2.3	Betain-Transport nach hyperosmotischem Schock	53
3.2.4	Charakterisierung des Cl ⁻ -abhängigen Betain-Transports in <i>H. halophilus</i>	56
3.2.4.1	Energetik des Transports	56
3.2.4.2	Untersuchungen zur Spezifität des Betain-Transports	57
3.2.4.3	Kinetische Studien zum Cl ⁻ -abhängigen Betain-Transport	58
3.2.5	Versuche zur Klonierung der für den Betain-Transporter kodierenden Gene	59
3.2.6	Untersuchungen zur Substitution von Cl ⁻ durch kompatible Solute	62
3.3	Die Cl ⁻ -abhängige Motilität von <i>H. halophilus</i>	64
3.3.1	Die chemotaktische Motilität von <i>H. halophilus</i> ist Cl ⁻ -abhängig	64
3.3.2	Cl ⁻ ist nicht am Antrieb des Flagellums beteiligt	66
3.3.3	Nachweis der Flagellen von <i>H. halophilus</i> durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	67
3.3.4	Reinigung des Flagellins und Generierung eines spezifischen Antiserums gegen das Flagellin von <i>H. halophilus</i>	68
3.3.5	Die Flagellinproduktion in <i>H. halophilus</i> ist Cl ⁻ -abhängig	70
3.3.6	Untersuchungen zur Stabilität des Flagellins von <i>H. halophilus</i>	77
3.3.7	Untersuchungen zur Substitution von Cl ⁻ durch kompatible Solute	79
3.3.8	Klonierung des für das Flagellin kodierenden Gens <i>fliC</i>	82
3.3.9	Klonierung des für die β-Untereinheit der ATP-Synthase kodierenden Gens <i>atpD</i>	87
3.3.10	Untersuchungen zur Cl ⁻ -abhängigen Expression von <i>fliC</i>	92
3.4	Identifizierung weiterer Cl ⁻ -abhängig synthetisierter Proteine in <i>H. halophilus</i>	96

3.4.1	Klonierung der Gene, die für die Cl ⁻ -abhängig synthetisierten Proteine YvyD und LuxS kodieren	99
3.5	Die Cl ⁻ -abhängige Osmotoleranz weiterer Bakterien	102
4	Diskussion	105
4.1	Cl ⁻ als alternatives Kopplungssion	105
4.2	Cl ⁻ -abhängige Transportsysteme	108
4.3	Der bakterielle Flagellenapparat	111
4.3.1	Struktur des Flagellums	111
4.3.2	Die genetische Organisation und Expression der Flagellengene	114
4.4	Die bakterielle Stressantwort	117
4.5	Die Funktion von Cl ⁻ in <i>H. halophilus</i>	123
4.6	Ausblick	129
5	Zusammenfassung	131
6	Literaturverzeichnis	135
7	Anhang	167

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
DCCD	N,N'-Dicyclohexyldiimid
dest.	destilliert
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
Hrsg.	Herausgeber
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
OD _x	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBST	Phosphat gepufferte Saline mit Tween 20
SF6847	2-(3,5-di-tert-Butyl-4-Hydroxy-Benzyliden)-Malononitril
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
TCS	4,5,4',5'-Tetrachlorsalicylanilid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl-)methyl-2-aminomethansulfonsäure
TPP ⁺	Tetraphenylphosphonium-Ion
x g	x-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

1 Einleitung

Unter allen anorganischen Anionen auf dem Planeten Erde ist Chlorid (Cl^-) das mit Abstand häufigste. In den oberen Schichten nicht saliner Böden macht Cl^- 75% der dort vorhandenen anorganischen Anionen aus (BRINKMANN, 1964), an salzhaltigeren Standorten wie marinen Habitaten steigt dieser Anteil auf bis zu 90% (OTT, 1996). Aufgrund der ubiquitären Verbreitung verwundert es nicht, daß Cl^- ein wichtiges Bioelement ist. Während jedoch in Eukaryonten mehrere Prozesse beschrieben wurden, für die Cl^- essentiell ist (s. 1.1), ist eine Bedeutung von Cl^- als Bioelement in Prokaryonten seit langer Zeit umstritten.

1.1 Die Bedeutung von Cl^- in Eukaryonten

Es ist bekannt, daß Cl^- zur Aufrechterhaltung der körperlichen Gesundheit essentiell ist, auch wenn konkrete Mangelercheinungen nicht beschrieben wurden, was in erster Linie dadurch zu erklären ist, daß eine Unterversorgung mit Cl^- aufgrund seines ubiquitären Vorkommens (s. o.) nahezu unmöglich ist. Die optimale Tagesdosis an Cl^- , die ein erwachsener Mensch mit der Nahrung zu sich nehmen sollte, beträgt 3,5 g (RICHTER, 1991). Im Körper kommt Cl^- im Blutplasma und der interstitiellen Gewebsflüssigkeit in Konzentrationen bis zu 120 mM vor und macht dort 77% der gelösten Anionen aus (SCHMIDT *et al.*, 2000). Intrazellulär dagegen sind die Cl^- -Konzentrationen gering (< 5 mM), da es keine aktiven Transportmechanismen gibt und Cl^- aufgrund der Polarisierung der Membran nicht passiv in die Zelle gelangen kann. Die Resorption von Cl^- in den Körper erfolgt im Dünndarm passiv und parazellulär durch sogenannten "solvent drag", d. h. gelöste Stoffe wie Cl^- werden mit dem einströmenden Wasser mitgerissen, während die Resorption im Kolon aktiv über einen $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Antiport-Mechanismus erfolgt (SCHMIDT *et al.*, 2000). Die Rückresorption in den Nieren erfolgt in erster Linie über Na^+/Cl^- -Symport-Mechanismen.

Die Bedeutung von Cl^- ist vielfältig und einige der wichtigsten Funktionen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. So ist Cl^- in Säugern am effektiven

Transport von CO_2 beteiligt. CO_2 ist nur schwach wasserlöslich und wird deshalb mittels einer von einer Carboanhydrase katalysierten Reaktion zu wasserlöslichem HCO_3^- umgesetzt. In der Lunge wird HCO_3^- letztendlich über einen elektro-neutralen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiport aus den Erythrocyten transportiert.

Bei der Reizleitung kommt Cl^- eine weitere entscheidende Rolle zu. Das Ruhepotential in Nervenzellen entspricht in erster Linie dem K^+ -Diffusionspotential, da die Cytoplasmamembran im Ruhezustand für Cl^- und Na^+ nahezu impermeabel ist. Kommt es zu einem Reiz an dieser Nervenzelle, öffnen sich Na^+ -Kanäle, die Membran wird depolarisiert und es entsteht ein Aktionspotential. Durch die Veränderung der Ladungsverhältnisse kommt es zu Ausgleichsströmen, an denen Cl^- als Gegenion beteiligt ist. Hierdurch werden andere Regionen der Membran depolarisiert, und das Aktionspotential pflanzt sich fort.

Des Weiteren wurden glycinergene Rezeptoren beschrieben, die als Cl^- -Kanäle fungieren und sich bei Kontakt mit Glycin öffnen, wodurch es zu einem Cl^- -Einstrom kommt, der seinerseits die Hyperpolarisation der Membran bedingt (SCHMIDT *et al.*, 2000).

Die wesentliche Funktion von Cl^- im menschlichen Körper liegt jedoch in seiner Beteiligung am Wasserhaushalt, da es essentiell an der Osmoregulation und damit zusammenhängenden Vorgängen wie der Regulation des Zellvolumens beteiligt ist. Dementsprechend können Störungen des Cl^- -Haushaltes folgenschwere Defekte nach sich ziehen. Eine der schwerwiegendsten Erkrankungen in diesem Zusammenhang ist die Mukoviszidose (zystische Fibrose). Sie wird autosomal-rezessiv vererbt und durch eine Mutation im Chromosom 7 verursacht (RIORDAN *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989). Betroffen ist dabei das 1480 Aminosäuren große CFTR- ("Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"-) Protein, welches bei gesunden Personen als cAMP-reguliertes, in erster Linie in respiratorischen Flimmerepithelzellen vorkommendes Cl^- -Kanal fungiert (DÖRK und STUHRMANN, 2000; ENGELHARDT *et al.*, 1992). Bei betroffenen Personen kommt es durch diesen Defekt zu einer verminderten Cl^- -Sekretion und daraus resultierend zu einer verstärkten Na^+ -Reabsorption, wodurch der Wassergehalt des Bronchialsekrets drastisch abnimmt. Der Schleim wird

dementsprechend hochviskos, was einerseits den Abtransport erschwert und andererseits die Zellen zu weiterer verstärkter Schleimsekretion reizt. Dieser hochviskose, schwer abzutransportierende Schleim ist in der Folge ein idealer Nährboden für chronische bakterielle Infektionen, besonders durch *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* (DÖRK und STUHRMANN, 2000). In der weiteren Folge kommt es bei betroffenen Personen zu Bronchiektasen, Pankreasinsuffizienz und Darmverschuß (Mekoniumileus).

Neben den beschriebenen Funktionen kommt Cl^- außerdem eine wesentliche Rolle beim Aminosäuretransport im Dünndarmgewebe und beim Transport von Neurotransmittern im Hirn von Säugetieren zu (s. 4.2).

Auch in eukaryontischen Mikroorganismen wurden Vorgänge gezeigt, an denen Cl^- essentiell beteiligt ist. So wirkt Cl^- als Attraktant auf die Sporen des Pilzes *Actinoplanes brasiliensis* (PALLERONI, 1976). Des weiteren findet sich in der einzelligen marinen Alge *Acetabularia acetabulum* eine membrangebundene Cl^- -translozierende ATPase, die in ihrer Struktur den chloroplastären F-Typ-ATPasen höherer Pflanzen ähnelt (IKEDA und OESTERHELT, 1990) und deren Cl^- -Bindestelle in der Untereinheit a vermutet wird (MORITANI *et al.*, 1997). Dieses Enzym katalysiert in *A. acetabulum* einen ATP-abhängigen Cl^- -Import, wodurch das Membranpotential im Dunkeln bei -170 mV gehalten werden kann. Eine andere Alge, für die ein Cl^- -Transporter beschrieben wurde, ist die marine Riesenalge *Valonia utricularis*. Hier konnte gezeigt werden, daß das im Plasmalemma lokalisierte Cl^- -translozierende System das Sensorsystem für die Turgorregulation darstellt (SPIESS *et al.*, 1993).

Auch in höheren Pflanzen findet sich Cl^- als essentielles Bioelement und kommt in diesen in Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 mM vor. Grundsätzlich ist Cl^- in höheren Pflanzen an der Aufrechterhaltung der Ionengleichgewichte und dem damit verbundenen Turgordruck beteiligt, wobei seine Bedeutung in erster Linie in seiner Funktion als Gegenion zum K^+ liegt. Ein Spezialfall dieser Turgordruckregulation ist der Spaltöffnungsmechanismus höherer Pflanzen, an dem ebenfalls K^+ - und Cl^- -Ströme beteiligt sind.

Des Weiteren ist Cl^- für alle Pflanzen lebensnotwendig, da gezeigt werden konnte, daß es neben Mn^{2+} essentiell für die Reaktionen am Sauerstoff entwickelnden Zentrum des Photosystems II ist (CRITCHLEY, 1985). Cl^- scheint das Photosystem II zu stabilisieren, wenngleich der Mechanismus noch unbekannt ist. Einerseits besteht die Vermutung, daß Cl^- als Ligand zwischen einzelnen Mangan-Atomen zur Stabilisierung des Mangan-Clusters im Photosystem II beiträgt (DISMUKES *et al.*, 1994; SHEN und INOUE, 1993). Andere Arbeiten gehen dagegen davon aus, daß die Bindung von Cl^- an Proteine des Mangan-Clusters bei diesen eine Konformationsänderung herbeiführt und so indirekt eine Stabilisierung des Photosystems II bewirkt (HOMANN, 1987; HADDY *et al.*, 1999).

Eine besondere Rolle kommt Cl^- in fleischfressenden Pflanzen zu. Hier wird durch Cl^- -Einstrom die Sekretion von Verdauungsenzymen ausgelöst, sobald ein Beutetier Kontakt mit den entsprechenden Drüsen hat.

Sämtliche hier angeführten Funktionen und Vorgänge verdeutlichen eindrucksvoll die essentielle Bedeutung von Cl^- für Eukaryonten und werfen die Frage nach der Bedeutung von Cl^- für Prokaryonten und der Natur dieser Vorgänge auf.

1.2 Die Bedeutung von Cl^- in Prokaryonten

In Prokaryonten ist die Funktion von Cl^- weitaus weniger klar bekannt und es liegen nur vereinzelte Arbeiten vor, die auf eine Bedeutung von Cl^- als Bioelement hindeuten.

Bereits 1956 isolierten MacLeod und Onofrey einen marinen prokaryontischen Organismus, dessen Wachstum als strikt Cl^- -abhängig beschrieben wurde (MACLEOD und ONOFREY, 1956). Spätere Studien ergaben dann, daß zahlreiche marine Isolate ein Cl^- -abhängiges oder zumindest durch Cl^- stimuliertes Wachstum zeigen (MACLEOD und ONOFREY, 1957). Unglücklicherweise wurden im Anschluß daran keine weitergehenden physiologische Studien durchgeführt, und die entsprechenden Isolate stehen zum heutigen Zeitpunkt nicht mehr zur Verfügung.

Auch für obligat acidophile Bakterien ist Cl^- essentiell. Diese Organismen, die bei extrem niedrigen externen pH-Werten wachsen, halten den internen pH-Wert nahezu neutral (COBLY und COX, 1983). Um einen ausgleichenden Ladungsstrom von Protonen in das Cytoplasma zu verhindern, der eine Ansäuerung des Cytoplasmas zur Folge hätte, liegt in acidophilen Bakterien ein positives $\Delta\psi$ vor (GOULBOURNE *et al.*, 1986). Da Cl^- sich unter diesen Bedingungen intrazellulär anreichern würde, wird für *Bacillus coagulans* postuliert, daß in dessen Membran spezifische Cl^- -Exporter vorhanden sind, die einer Akkumulation entgegenwirken und so das positive $\Delta\psi$ aufrechterhalten (MCLAGGAN *et al.*, 1990).

Unter den kleinsten prokaryontischen Organismen, den Mycoplasmen, wurde mit *Acholeplasma laidlawii* ein Vertreter ausgemacht, der über Cl^- -Kanäle verfügt, die eine passive Diffusion von Cl^- über die Cytoplasmamembran ermöglichen (SCHUMMER und SCHIEFER, 1991). Über die Funktion von Cl^- in diesen Organismen ist jedoch nichts bekannt.

Aufgrund seiner Bedeutung für die Stabilität des Photosystems II ist Cl^- auch für photosynthetisch aktive, oxygene Cyanobakterien essentiell. *Anacystis nidulans* (*Synechococcus* PCC6301) katalysiert eine aktive, ATP-abhängige Akkumulation von Cl^- über ein primäres Transportsystem (RITCHIE, 1992a; RITCHIE, 1992b; ZDROU und TROMBALLA, 1981). Auch im Genom von *Synechocystis* PCC 6803 finden sich Gene, deren abgeleitete Proteine ABC-Transporter darstellen, die potentiell Cl^- transportieren können (KANEKO *et al.*, 1996).

Eine Bedeutung von Cl^- als Signalmolekül wurde in Milchsäurebakterien beschrieben. In *Lactococcus lactis* wurde ein Cl^- -induzierbarer Promotor identifiziert (SANDERS *et al.*, 1997), unter dessen Kontrolle die Gene *gadB* und *gadC* liegen. Diese Gene kodieren für eine Glutamat-Decarboxylase bzw. einen Glutamat/ γ -Aminobutyrat-Antiporter und sind an der Säuretoleranz von *L. lactis* beteiligt (SANDERS *et al.*, 1998).

Letztendlich wurde auch eine *E. coli*-Mutante isoliert, die eine Cl^- -Sensitivität bei neutralen und alkalischen pH-Werten aufweist (MACHIDA *et al.*, 1999). Über

die Natur des betroffenen Proteins oder die molekularen Grundlagen dieses Phänotyps ist jedoch nichts bekannt.

Neben den hier beschriebenen Arbeiten zur Bedeutung von Cl^- in Bakterien, sind auch Vorgänge aus Archäen bekannt, an denen Cl^- essentiell beteiligt ist. So wird für das haloalkalophile Archäon *Natronobacterium pharaonis* eine Cl^- -abhängige ATP-Synthese postuliert (AVETISYAN *et al.*, 1998). Des Weiteren findet sich in der Domäne der *Archaea* auch die bei weitem am besten charakterisierte Funktion von Cl^- in Prokaryonten, nämlich die als Osmolyt in Halobakterien, auf die im Folgenden detailliert eingegangen werden soll.

Jede lebende Zelle, die von einer semipermeablen Cytoplasmamembran umgeben ist, unterliegt der Gefahr eines drastischen Wasserverlustes, sobald die Zelle in ein umgebendes Medium gelangt, in dem eine höhere Salzkonzentration vorliegt als im Cytoplasma der Zelle. Es kommt in diesem Fall zu einer Differenz zwischen den Wasseraktivitäten in der Zelle und dem umgebenden Medium, was zu einem Wasserverlust aus den Zellen führt, der schwerwiegende negative Folgen für die Zellen haben kann. Zum einen nimmt der für die Zellteilung essentielle Turgordruck in den Zellen ab, und zum anderen ist die Verfügbarkeit von Wasser eine der grundsätzlichen Voraussetzungen für jegliche biochemische Vorgänge.

Grundsätzlich reagieren Prokaryonten auf hyperosmotische Bedingungen derart, daß sie versuchen die Wasseraktivität ihres Cytoplasmas zu erniedrigen, um so isoosmotische Bedingungen zu schaffen. Halobakterien erreichen dies durch die intrazelluläre Akkumulation von anorganischen Ionen, die sogenannte „Salz-in-Cytoplasma“-Strategie. Die „Salz-in-Cytoplasma“-Strategie findet sich vor allem in aeroben, extrem halophilen Archäen (*Halobacteriales*) (GALINSKI und TRÜPER, 1994; OREN, 1999) und in anaeroben, halophilen Bakterien (*Haloanaerobiales*) (OREN, 1992). Diese Organismen reichern anorganische Ionen an, bis die intrazelluläre Ionenkonzentration der im Medium annähernd entspricht (LANYI, 1974). Obwohl hyperosmotischer Stress in den meisten Fällen durch hohe NaCl -Konzentrationen hervorgerufen wird, werden in erster Linie K^+

und Cl⁻ intrazellulär angehäuft (OREN, 1986). Die Organismen besitzen extrem angepasste, salztolerante oder sogar salzabhängige Enzyme, die einen großen Anteil an sauren Aminosäuren und wenige hydrophobe Aminosäuren aufweisen (EISENBERG und WACHTEL, 1987; LANYI, 1974). Die korrekte Faltung und Aktivität dieser Proteine ist in vielen Fällen von hohen intrazellulären Salzkonzentrationen abhängig (OREN, 1999), weshalb diese Organismen meist an ein sehr spezifisches Habitat gebunden sind (GALINSKI und TRÜPER, 1994).

Über die Mechanismen des K⁺- und Cl⁻-Transports in den anaeroben, halophilen Bakterien ist nichts bekannt. Demgegenüber ist der Ionentransport in *Haloarchaea*, den Halobakterien, gut untersucht. K⁺ gelangt über diverse Transportsysteme in die Zelle (WAGNER *et al.*, 1978) und wird dort hoch angereichert. Für Cl⁻ kennt man in Halobakterien zwei Transportmechanismen. Einen lichtgetriebenen über das Membranprotein Halorhodopsin (SCHOBERT und LANYI, 1982) und einen Na⁺/Cl⁻-Symport (DUSCHL und WAGNER, 1986).

Halorhodopsin ist ein Retinalprotein mit einer molekularen Masse von 20 kDa und weist wie das nahe verwandte Bacteriorhodopsin sieben transmembrane α -Helices auf (BLANCK *et al.*, 1989; SCHEGK und OESTERHELT, 1988). Diese umschließen einen nicht durchgängigen Kanal, der in einen extrazellulären und einen cytoplasmatischen Abschnitt unterteilt werden kann, wobei der N-Terminus des Halorhodopsins in den extrazellulären Bereich ragt, während der C-Terminus zum Cytoplasma weist (SCHOBERT *et al.*, 1988; MAY *et al.*, 1988). Retinalproteine zeichnen sich dadurch aus, daß das Kohlenstoffgerüst des Retinals über eine Schiff-Basen-Bindung mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Proteins verknüpft ist. Im Falle des Halorhodopsins liegt das Retinal in seiner all-*trans*-Form vor. Wird Cl⁻ gebunden und das Retinal durch Licht mit einer Wellenlänge von 578 nm angeregt, kommt es zu einer *cis-trans*-Photoisomerisierung (Abb. 1), sehr ähnlich einer Retinal-Reaktion, wie sie beim Sehen im Säugerauge

stattfindet. Durch diese Konformationsänderung des Retinals zur 13-*cis*-Form, kommt es zu Verschiebungen in der Proteinstruktur des Halorhodopsins, wodurch wiederum das gebundene Cl⁻ von außen nach innen in das Cytoplasma transportiert wird (OESTERHELT, 1995) und dort seinen Beitrag zur Osmoregulation leisten kann. Bemerkenswerterweise transportiert Halorhodopsin neben Cl⁻ auch Br⁻, I⁻ und NO₃⁻ (SCHOBERT *et al.*, 1983).

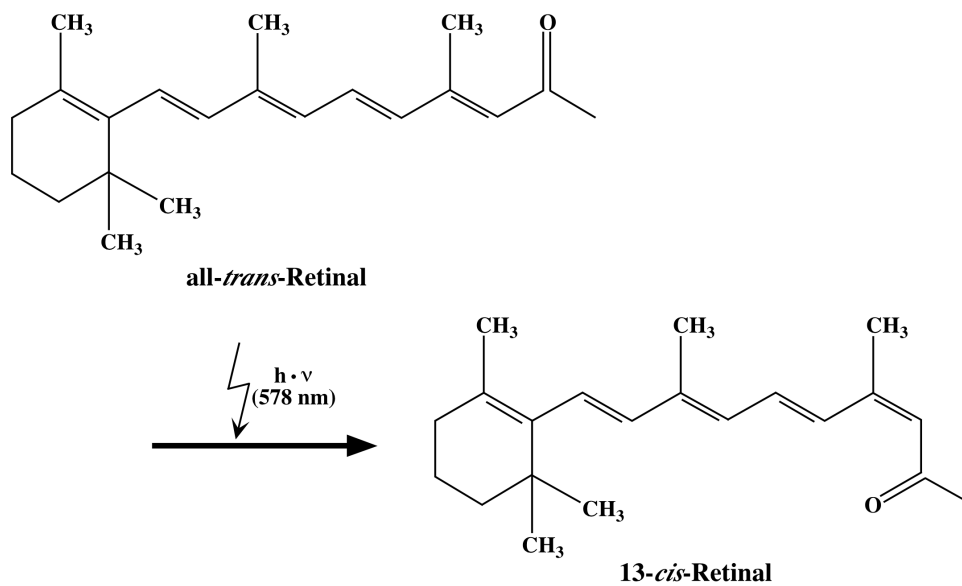


Abb. 1: Die Photoisomerisierung des Retinals im Halorhodopsin (nach OESTERHELT, [1995])

Neben diesem lichtgetriebenen Cl⁻-Import findet sich in Halobakterien außerdem ein lichtunabhängiger Na⁺/Cl⁻-Symporter, der es den Halobakterien unter Nutzung des Membranpotentials ermöglicht, auch in der Dunkelheit eine effektive Osmoregulation zu betreiben (DUSCHL und WAGNER, 1986).

Dieser „Salz-in-Cytoplasma“-Strategie der Osmoregulation steht die intrazelluläre Akkumulation von kompatiblen Soluten gegenüber. Die betreffenden Organismen akkumulieren kleine, organische Moleküle, die auch in hohen Konzentration löslich sind und den Stoffwechsel von Zellen aufgrund ihrer chemischen Natur nicht beeinflussen (BROWN, 1976). Darüber hinaus sind kompatible Solute nicht nur rein physikalisch Moleküle, die angehäuft werden können, um die intrazelluläre Wasseraktivität zu erniedrigen, ohne dabei den Stoffwechsel

zu behindern, sondern es wurde gezeigt, daß verschiedene kompatible Solute zusätzlich Proteine stabilisieren und deren Löslichkeit erhöhen (BOLEN, 2001; CAYLEY *et al.*, 1992). Grundsätzlich lassen sich kompatible Solute in zwei Klassen einteilen: 1. Zucker und mehrwertige Alkohole, wie Trehalose und Glycerin, sowie 2. Aminosäuren und deren Derivate, einschließlich Methylamine, wie Glycinbetain und Glutamat. Diese Strategie ist weit verbreitet und findet sich nicht nur in den prokaryontischen Domänen (KEMPF und BREMER, 1998; ROBERTS, 2000), sondern auch in Eukaryonten (BOHNERT, 1995).

1.3 Die Cl⁻-Abhängigkeit von *H. halophilus*

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht das moderat halophile, aerobe, endosporenbildende Bakterium *Halobacillus halophilus*. Dieser Organismus wurde 1983 aus Salzmarschboden der deutschen Nordseeküste isoliert und zum damaligen Zeitpunkt als *Sporosarcina halophila* klassifiziert (CLAUS *et al.*, 1983). Spätere physiologische, chemotaxonomische und phylogenetische Studien führten zu einer Reklassifizierung in die neue Gattung *Halobacillus*, zu der außerdem noch *Halobacillus trueperi*, *Halobacillus litoralis* (SPRING *et al.*, 1996) sowie *Halobacillus thailandensis* gehören (CHAIYANAN *et al.*, 1999). *H. halophilus* ist obligat chemoorganotroph; optimales Wachstum erfolgt bei 30°C und pH 7,4. *H. halophilus* hat ein breites Salz-Optimum von 0,8-2 M NaCl und ist damit als moderat halophil einzustufen. Zur Aufrechterhaltung des Turgors akkumuliert *H. halophilus* ein Gemisch an kompatiblen Soluten. Beim Wachstum in Komplexmedium sind dies Glycinbetain, N^ε-Acetyl-β-Lysin, N^δ-Acetyl-Ornithin, Alanin, Ectoin, Glutamat, Glutamin und Prolin, wobei Glycinbetain, N^ε-Acetyl-β-Lysin und Glutamat mit einem Anteil von 66% den Hauptbestandteil darstellen (SEVERIN, 1993).

Interessanterweise wurde in der Erstbeschreibung berichtet, daß *H. halophilus* nicht in Gegenwart von Na₂SO₄, aber von NaCl, wächst. Dies wurde als ein Hinweis auf eine Cl⁻-Abhängigkeit des Wachstums gewertet. Weitergehende, quantitative Untersuchungen ergaben, daß dieser Befund auf eine essentielle

Abhängigkeit von Cl^- zurückzuführen ist und der Organismus nur dann optimales Wachstumsraten zeigt, wenn das Medium zwischen 0,7 und 2 M Cl^- enthält (ROEBLER und MÜLLER, 1998). Bemerkenswerterweise ist ausschließlich Br^- in der Lage, Cl^- effektiv zu substituieren, sowie nach einer längeren Adaptationszeit auch NO_3^- . In diesen Arbeiten wurde auch gezeigt, daß *H. halophilus* Cl^- aktiv in die Zelle aufnimmt und dementsprechend ein transmembranes elektrochemisches Cl^- -Potential ($\Delta\tilde{\mu}_{\text{Cl}^-}$) vorliegen muß. Weitere Studien ergaben, daß neben dem Wachstum auch die Keimung der von *H. halophilus* gebildeten Endosporen Cl^- -abhängig ist (DOHRMANN und MÜLLER, 1999; FAHMY *et al.*, 1985).

1.4 Fragestellung der Arbeit

H. halophilus ist der erste Prokaryont, für den eine essentielle Rolle von Cl^- als Bioelement beschrieben wurde. Die physiologische Basis dieser Abhängigkeit und deren molekulare Grundlagen sind aber vollkommen unklar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten weitere Cl^- -abhängige Vorgänge in *H. halophilus* identifiziert und charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten Studien durchgeführt werden, die Einblicke in die molekulare Grundlage der essentiellen Cl^- -Abhängigkeit von *H. halophilus* geben, um so Rückschlüsse auf die Bedeutung von Cl^- als Bioelement ziehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen der Experimente dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tab. 1 und Tab. 2 zusammengefaßt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Halobacillus halophilus</i> DSMZ 2266	Wildtyp	(CLAUS <i>et al.</i> , 1983)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F Φ 80, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA</i> ; <i>argF</i>)U169	(HANAHAN, 1983; RALEIGH <i>et al.</i> , 1988)
<i>Escherichia coli</i> MKH13	MC4100, Δ (<i>putPA</i>) 101, Δ (<i>proP</i>)2, Δ (<i>proU</i>) 608	(HAARDT <i>et al.</i> , 1995)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Wildtyp	DSMZ 30189
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Wildtyp	DSMZ 5172
<i>Bacillus megaterium</i>	Wildtyp	DSMZ 90
<i>Bacillus subtilis</i>	Wildtyp	DSMZ 10
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Wildtyp	DSMZ 350
<i>Burkholderia cepacia</i>	Wildtyp	DSMZ 50180
<i>Cellulomonas flavigena</i>	Wildtyp	DSMZ 20109
<i>Citrobacter freundii</i>	Wildtyp	DSMZ 30039
<i>Comamonas acidovorans</i>	Wildtyp	DSMZ 39
<i>Comamonas testosteroni</i>	Wildtyp	DSMZ 50244
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Wildtyp	DSMZ 20300
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Wildtyp	DSMZ 30053
<i>Enterobacter cloacae</i>	Wildtyp	DSMZ 30054
<i>Enterococcus faecium</i>	Wildtyp	DSMZ 2146
<i>Escherichia coli</i>	Wildtyp	DSMZ 30083
<i>Hydrogenophaga palleronii</i>	Wildtyp	DSMZ 63
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Wildtyp	DSMZ 5175
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Wildtyp	DSMZ 20010
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Wildtyp	DSMZ 20174

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme (Fortsetzung)

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Listeria grayi</i>	Wildtyp	DSMZ 20601
<i>Micrococcus lylae</i>	Wildtyp	DSMZ 20315
<i>Mycobacterium phlei</i>	Wildtyp	DSMZ 43239
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Wildtyp	DSMZ 413
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Wildtyp	DSMZ 20206
<i>Proteus mirabilis</i>	Wildtyp	DSMZ 4479
<i>Proteus vulgaris</i>	Wildtyp	DSMZ 30118
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Wildtyp	DSMZ 50071
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Wildtyp	DSMZ 50090
<i>Pseudomonas putida</i>	Wildtyp	DSMZ 291
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Wildtyp	DSMZ 5190
<i>Pseudomonas syringae</i>	Wildtyp	DSMZ 6693
<i>Ralstonia eutropha</i>	Wildtyp	DSMZ 428
<i>Salmonella typhimurium</i>	Wildtyp	DSMZ 554
<i>Serratia marcescens</i>	Wildtyp	DSMZ 30121
<i>Sporosarcina ureae</i>	Wildtyp	DSMZ 317
<i>Staphylococcus aureus</i>	Wildtyp	DSMZ 20231
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Wildtyp	DSMZ 20501
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Wildtyp	DSMZ 20044
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Wildtyp	DSMZ 20229
<i>Staphylococcus xylosum</i>	Wildtyp	DSMZ 20266
<i>Thermus thermophilus</i>	Wildtyp	DSMZ 579
<i>Vibrio fischeri</i>	Wildtyp	DSMZ 507
<i>Xanthomonas campestris</i>	Wildtyp	DSMZ 3586
<i>Zoogloea ramigera</i>	Wildtyp	DSMZ 287

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
pUC18 ⁺	Ap ^r , lacZ ['] , colE1, oriR	(VIEIRA und MESSING, 1982)
pAF1	pUC18::4,5 kBp <i>Eco</i> RI-Fragment aus <i>A. woodii</i>	(FORSTER <i>et al.</i> , 1995)
pDM67	p620INT:: <i>hag</i> (<i>B. subtilis</i>)	(MIREL und CHAMBERLIN, 1989)

Die im Rahmen der Experimente dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Plasmidkonstrukte

Bezeichnung	Insert	Insertionsgröße (Bp)	Vektor
pMR102	<i>Mbo</i> I-Fragment chrom. DNA aus <i>H. halophilus</i> inkl. <i>fliC</i>	5600	pUC18 ⁺
pMR1021	<i>Hind</i> III-Fragment von <i>fliC_{Hh}</i>	420	pUC18 ⁺
pMR111	<i>Mbo</i> I-Fragment chrom. DNA aus <i>H. halophilus</i> inkl. <i>fliC</i>	11600	pUC18 ⁺
pMR202.2	<i>Mbo</i> I-Fragment chrom. DNA aus <i>H. halophilus</i> inkl. <i>atpD</i>	8200	pUC18 ⁺
pMR212	<i>Mbo</i> I-Fragment chrom. DNA aus <i>H. halophilus</i> inkl. <i>atpD</i>	2200	pUC18 ⁺
pMR2121	<i>Pst</i> I-Fragment von <i>atpD_{Hh}</i>	514	pUC18 ⁺
pMR401	<i>Hind</i> III-Fragment von <i>yvyD_{Hh}</i>	239	pUC18 ⁺
pMR501	<i>Hind</i> III-Fragment von <i>luxS_{Hh}</i>	357	pUC18 ⁺
pMR601	<i>atpD</i> aus <i>A. woodii</i>	1398	pUC18 ⁺

Tab. 4 faßt die in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide zusammen.

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Bindungsort	Sequenz (5'→3') ¹
OS1	<i>fliC</i> von <i>B. subtilis</i>	CGGAATTCATHAAYCAYAAAYATHGC
OS14	<i>fliC</i> von <i>B. subtilis</i>	CGGAATTCGGYTG YTGRTTNGCYTG
Fla2.2	<i>fliC</i> von <i>H. halophilus</i>	TTTTTTAAGCTTGARAARATGMGNG GNCA
Fla1.2d	<i>fliC</i> von <i>H. halophilus</i>	TTTTTTAAGCTTTCNARYCTRTTYTG NAC
PatpD1	<i>atpD</i> von <i>A. woodii</i>	GGTTAGTGGAATTCGCCC
PatpD2	<i>atpD</i> von <i>A. woodii</i>	TCTGAAAGCTGCAGCCATTA
RTFla11	<i>fliC</i> von <i>H. halophilus</i>	TCACTAGTTGCTACAGTCCA
RTFla21	<i>fliC</i> von <i>H. halophilus</i>	TGCAGAAGGAGCGTTGAATG
PCip4.1	<i>yvyD</i> von <i>H. halophilus</i>	AAAAAAAAGCTTTAYGTNGARAARA ARGT
pCip4.2c	<i>yvyD</i> von <i>H. halophilus</i>	TTTCCCAAGCTTACYTTNGTYTTRTG YTT
PCip5.1	<i>luxS</i> von <i>H. halophilus</i>	AAAAAAAAGCTTATGCARATGAAYG TNGA
PCip5.2b	<i>luxS</i> von <i>H. halophilus</i>	TTTTTTAAGCTTCCRCAYTGR TAYTC RTT

¹: Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt. Für degenerierte Basen wurden die folgenden Abkürzungen gewählt: H = A, T, C; M = A, C; N = A, T, C, G; R = A, G; Y = C, T.

2.2 Zellanzucht

2.2.1 Nährmedien

Die Anzucht von *H. halophilus* erfolgte in einem Komplexmedium (NB-Medium) der folgenden Zusammensetzung:

NB-Medium

NB (Fa. Becton-Dickinson, Sparks, USA)	8 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	12,32 g
pH	7,5
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

NaCl, NaNO₃, NaBr bzw. Na₂SO₄ wurden wie bei den einzelnen Experimenten angegeben hinzugefügt.

Anzuchten zur Plasmidisolierung aus *E. coli* wurden stets in einem Komplexmedium der folgenden Zusammensetzung durchgeführt:

LB-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Für die Komplementationsexperimente mit *E. coli* MKH13 wurde folgendes mineralische Medium eingesetzt:

MMA-Medium (MAY *et al.*, 1986)

K ₂ HPO ₄	10,5 g
KH ₂ PO ₄	4,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Na ₃ -Citrat	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
Glukose	0,2% (w/v)
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Zur Selektion auf salztolerante Transformanden wurde dem Medium 46,8 g NaCl (0,8 M) sowie gegebenenfalls 135 mg Betain (1 mM) hinzugegeben.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien Japanagar (Fa. W. Behrens & Co., Hamburg, Deutschland) zu einer Endkonzentration von 1,5% (w/v) hinzugefügt. Weichagarplatten enthielten 0,3% (w/v) Bacto-Agar (Fa. Becton-Dickinson, Sparks, USA).

2.2.2 Anzucht von *H. halophilus*

Die Anzucht von *H. halophilus* erfolgte aerob unter Schütteln bei 30°C in NB-Medium. Als Kulturgefäße dienten für Kulturvolumina bis 5 ml Reagenzgläser, größere Volumina wurden in Erlenmeyerkolben entsprechender Größe angezogen. Über kürzere Zeiträume konnte *H. halophilus* auf festem NB-Medium bei 4°C gehalten werden. Zur dauerhaften Konservierung wurden 0,5 ml einer Kultur aus der exponentiellen Wachstumsphase mit 0,5 ml Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren.

Zur Selektion und Kultivierung von beweglichen Zellen, wurden Weichagarplatten mit *H. halophilus* beimpft und bei 30°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

2.2.3 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte ausschließlich aerob unter Schütteln bei 37°C in LB- oder MMA-Medium. Als Kulturgefäße dienten für Kulturvolumina bis 5 ml Reagenzgläser, größere Volumina wurden in Erlenmeyerkolben entsprechender Größe angezogen. Über kürzere Zeiträume konnte *E. coli* auf festem Medium bei 4°C gehalten werden. Zur dauerhaften Konservierung wurden 0,5 ml einer Kultur aus der exponentiellen Wachstumsphase mit 0,5 ml Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren.

Den Medien wurden bei Bedarf Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml) oder Spectinomycin (100 µg/ml) zugegeben. Zur Selektion auf rekombinante Klone wurde das Medium mit 48 µg/ml IPTG und 40 µg/ml X-Gal supplementiert.

2.2.4 Wachstumsversuche

Alle Wachstumsversuche wurden in 15-ml-Reagenzgläsern in einem Kulturvolumen von 5 ml durchgeführt. Es wurde von einer Platte inokuliert, und das Wachstum wurde anhand der Trübungszunahme bei 600 nm gegen das entsprechende unbeimpfte Medium verfolgt. Die OD-Messung erfolgte direkt in den Kulturgefäßen in einem Eppendorf-Photometer Typ 1101 M (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

2.3 Versuche mit Zellsuspensionen

2.3.1 Herstellung von Zellsuspensionen

Zur Herstellung von Zellsuspensionen wurde *H. halophilus* in der Regel in 200 ml NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, in der spätlogarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, das Sediment wurde zweimal in Tris-Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgSO₄ und Salz entsprechend des Versuchsansatzes) gewaschen, und die Zellen wurden dann in 1

ml Tris-Puffer resuspendiert. Die daraus resultierenden Zellsuspensionen hatten eine Proteinkonzentration von 12-18 mg Protein/ml.

2.3.2 Silikonölzentrifugation nach BLAUT (1984)

Zur schnellen Trennung von Zellen und Medium wurde eine Silikonölzentrifugation verwendet. Dabei macht man sich zunutze, daß Zellen, jedoch nicht das Medium das Öl durchdringen können. Die Dichte des Silikonöls wurde durch Mischen von Silikonöl DC 710 ($\rho=1,103$ mg/ml, Fa. Fluka, Deisenhofen, Deutschland) und Hexadekan ($\rho=0,773$) so eingestellt, daß nach der Zentrifugation ein klarer Überstand verblieb, in dem sich mikroskopisch keine Zellen mehr nachweisen ließen. Die benötigte Dichte des Silikonöls ist abhängig von der Dichte des eingesetzten Puffers, welche in Abhängigkeit der Konzentration und der Natur des entsprechenden Salzes stark schwankt. In den Versuchen dieser Arbeit wurden Silikonöle mit Dichten von 1,065 mg/ml für Tris-Puffer mit 1 M NaCl und 1,095 mg/ml für Tris-Puffer mit 0,66 M Na_2SO_4 verwendet. 0,2 ml des Silikonöls wurde in 1,5-ml-Eppendorfgefäße vorgelegt. Während des Versuchs wurden 0,5-ml-Proben der Zellsuspensionen in die vorbereiteten Eppendorfgefäße gegeben und 15 s in einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert. 30 μl des Überstandes wurden dann in ein 15-ml-Szintillationsgefäß (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben, das zuvor mit 0,5 ml 3 M NaOH gefüllt worden war. Der Rest des Überstands und das Silikonöl wurden vorsichtig abgesaugt. Die Spitze des Eppendorfgefäßes mit dem Sediment wurde mit Hilfe eines Skalpells mit Rasierklinge abgeschnitten und ebenfalls in ein 15-ml-Szintillationsgefäß, das 0,5 ml 3 M NaOH enthielt, überführt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurden die Szintillationsgefäße über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml Rotiszint ecoplus (Fa. Roth, Karlsruhe) wurde die Radioaktivität der Proben in einem Szintillationszähler bestimmt.

2.3.3 Bestimmung des elektrischen Membranpotentials ($\Delta\psi$)

Das Membranpotential $\Delta\psi$ wurde aus der Verteilung des membrangängigen Kations Tetraphenylphosphonium (TPP^+) zwischen Cytoplasma und Medium bestimmt. Zellen und Medium wurden mit Hilfe der in 2.3.2 beschriebenen Silikonölzentrifugation voneinander getrennt. Aus der relativen Verteilung des TPP^+ läßt sich dann unter Verwendung der Nernst'schen Gleichung das elektrische Potential wie folgt berechnen:

$$\Delta\psi = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{[{}^3\text{H}]\text{TPP}_e^+ - [{}^3\text{H}]\text{TPP}_d^+}{[{}^3\text{H}]\text{TPP}_s^+ \cdot V_i} \cdot \frac{V_s}{p}$$

wobei gilt: $[{}^3\text{H}]\text{-TPP}_e^+$ = Radioaktivität energetisierter Zellen im Sediment

$[{}^3\text{H}]\text{-TPP}_d^+$ = Radioaktivität deenergetisierter
Zellen im Sediment

$[{}^3\text{H}]\text{-TPP}_s^+$ = Radioaktivität im Überstand

V_i = internes Volumen der Zellen [μl]

V_s = Volumen des Aliquots des Überstands [μl]

p = Proteinmenge im Sediment [mg]

Da TPP^+ in seiner Eigenschaft als lipophiles Kation auch unspezifisch an die Cytoplasmamembran bindet und diese unspezifische Bindung die Ergebnisse verfälscht, muß eine entsprechende Korrektur vorgenommen werden. Hierzu wurden die Zellen 30 min Gegenwart von 4% (v/v) Butanol deenergetisiert, und anschließend wurde die Menge an gebundenem TPP^+ bestimmt. Dieser Wert wurde als unspezifisches Binden angenommen und in die Berechnung mit einbezogen.

Zur Bestimmung von $\Delta\psi$ wurden 0,5 ml der wie unter 2.3.1 beschrieben hergestellten Zellsuspension in 9,5 ml des entsprechenden Puffers verdünnt und mit 1 μCi TPP^+ (spez. Aktivität: 31 mCi/mmol , Endkonzentration: 3,2 μM) versetzt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 0,5-ml-Proben entnommen und wie unter 2.3.2 beschrieben aufgearbeitet.

2.3.4 Bestimmung des ATP-Gehaltes ganzer Zellen

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes ganzer Zellen erfolgte unter Verwendung eines Luciferin-Luciferase-Ansatzes nach den Prinzipien von KIMMICH *et al.* (1975). Hierzu wurden 0,5 ml der wie unter 2.3.1 beschrieben hergestellten Zellsuspension in 9,5 ml des entsprechenden Puffers verdünnt und bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 0,5-ml-Proben entnommen und in 1,5-ml-Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt, die 0,2 ml eiskalte Perchlorsäure enthielten. Die Proben wurden zum Zellaufschluß 90 min auf Eis inkubiert und währenddessen mehrfach kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 30-40 μ l gesättigter K_2CO_3 -Lösung und 0,1 ml TES-Puffer (50 mM, pH 7,4) neutralisiert. Das dabei entstandene $KClO_3$ wurde durch nachfolgende Zentrifugation entfernt. 10-20 μ l des Überstands wurden in „Lumacuvettes“ (Fa. Celsis Lumac, Landgraaf, Niederlande) überführt, die 250 μ l des Bestimmungspuffers (5 mM Na_2HAsO_4 , 4 mM $MgSO_4$, 20 mM Glycylglycin, pH 8) enthielten. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μ l einer Luciferin-Luciferase-Präparation (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Sofort nach dem Start der Reaktion wurde die ATP-abhängige Lichtemission in einem „M1500 light biocounter“-Luminometer (Fa. Celsis Lumac, Landgraaf, Niederlande) bestimmt. Anhand einer Eichkurve, die zwischen 0-40 nmol ATP/Ansatz erstellt wurde, ließ sich so der ATP-Gehalt der Proben bestimmen.

2.3.5 Versuche zum Betain-Transport

Versuche zum Betain-Transport in *H. halophilus* wurden mit Hilfe einer Filtrationstechnik durchgeführt. Hierzu wurden Zellsuspensionen wie unter 2.3.1 hergestellt, die Zellen aus 100 μ l dieser Zellsuspension wurden durch Zentrifugation sedimentiert und in 1 ml Puffer, welcher Salze in der entsprechenden Konzentration, 1 mM unmarkiertes Betain bzw. im Falle der kinetischen Studien unmarkiertes Betain in der angegebenen Konzentration sowie 0,5 μ Ci [^{14}C]-Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μ M)

enthielt, resuspendiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 50- μ l-Proben entnommen und mit Hilfe von Membranfiltern (Cellulosenitrat, \varnothing 25mm, Porengröße 0,45 μ m, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland) abfiltriert. Die Proben und Waschflüssigkeiten wurden mittels Unterdruck, der durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt wurde, durch die Filter gesaugt, während die Zellen auf den Filtern festgehalten wurden. Die Proben wurden dreimal mit dem 10-fachen Probevolumen (0,5 ml) gewaschen, um unspezifisch am Filter gebundenes und den Zellen äußerlich anhaftendes [14 C]-Betain abzuspülen. Als Waschflüssigkeit wurde stets ein Puffer verwendet, der in seiner Zusammensetzung mit dem im Versuch verwendeten identisch war. Die Trennung der Zellen vom Medium sowie der anschließende Waschvorgang erfolgte innerhalb von 15 s. Nach dem Waschen wurden die Filter auf saugfähigem Papier getrocknet und anschließend in 15-ml-Szintillationsgefäße überführt. Nachfolgend wurden 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) in die Szintillationsgefäße gegeben, und die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte wie unter 2.3.6 beschrieben.

2.3.6 Bestimmung der Radioaktivität

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler Typ Tri-Carb 2100 TR (Fa. Packard, Dreieich, Deutschland). Die Meßzeit betrug 4 min, für 3 H war das Energiefenster zwischen 0 und 12 keV und für 14 C zwischen 12 und 156 keV eingestellt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Standardmethoden zur Analyse und Modifikation von DNA

Die Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA erfolgte ebenso wie das Fällern, die Konzentrationsbestimmung und die Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren in aller Regel nach Standardmethoden (SAMBROOK *et al.*, 1989). Bei Bedarf wurden Enzyme der Firmen MBI-Fermentas (St. Leon-Rot,

Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte entweder nach der Methode von HOLMES und QUIGLEY (1981) oder, sofern sich weitere Klonierungsschritte anschlossen, mittels des Qiagen „MiniPrep“-Kits (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Zur Isolierung von Plasmiden aus größeren Kulturvolumina wurde der „NucleoBond® PC500“-Kit (Fa. Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) eingesetzt.

Die Analyse von DNA erfolgte durch Elektrophorese in 0,8%igen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1% Essigsäure, pH 8). Eine sich gegebenenfalls anschließende Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des „QiaexII Gel Extraction“-Kits (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Die Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen zur Transformation erfolgte durch die CaCl₂-Methode von COHEN *et al.* (1972) und INOUE *et al.* (1990), anschließend wurde die Transformation nach HANAHAH (1983) durchgeführt. Die Transformation durch Elektroporation erfolgte nach DOWER *et al.* (1988) mit *E. coli*-Zellen, die zuvor dreimal in 10%igen Glyzerin gewaschen worden waren, in einem „Gene Pulser™“ (Fa. Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland).

Die Ermittlung von DNA-Sequenzen erfolgte mit fluoreszenzmarkierter DNA an einem „ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer“ (Fa. Applied Biosystems GmbH/Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland).

2.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. halophilus*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *H. halophilus* wurde entsprechend einem Protokoll für *B. subtilis* nach ERRINGTON (1984) durchgeführt. *H. halophilus* wurde in 200 ml NB-Medium mit 1 M NaCl bis zur spät-logarithmischen Wachstumsphase angezogen, die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in 20 mM TES-Puffer gewaschen und anschließend in 15 ml

TES-Puffer, der Lysozym (100 $\mu\text{g/ml}$) und RNase (20 $\mu\text{g/ml}$) enthielt, resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden 15 ml frischer TES-Puffer sowie 20 mg Pronase E und 1,2 ml Sarkosyl hinzugegeben, und der Ansatz wurde erneut 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion, die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.4.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. halophilus*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. halophilus* erfolgte unter Verwendung des „RNeasy MiniPrep“-Kits (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierzu wurden Zellen in NB-Medium mit Salzen in der jeweils angegebenen Konzentration angezogen, und die Zellen aus 1 bis 5 ml der Kultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Zum Zellaufschluß wurde anschließend das Sediment in 100 μl TE-Puffer resuspendiert, 300 μg Lysozym wurden hinzugegeben, und der Ansatz wurde für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Gesamt-RNA wurde mit 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ eluiert und bei -30°C gelagert.

Um Kontaminationen von chromosomaler DNA, die bei der Präparation von Gesamt-RNA unvermeidbar sind, aus den RNA-Präparationen zu entfernen, schloß sich eine Behandlung mit RNase-freier DNaseI (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) an. Hierzu wurde den RNA-Präparationen 1/10 Volumen DNase-Puffer (1 M Na-Acetat, 50 mM MgSO_4 , pH 5,0) und 100 U DNaseI zugegeben und der Ansatz für 4-8 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der RNA durch eine erneute RNA-Isolierung unter Verwendung des „RNeasy MiniPrep“-Kits (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland). Der Erfolg der Behandlung wurde mit Hilfe einer PCR (s. 2.4.4) überprüft.

2.4.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Um RNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe voneinander zu trennen, wurde eine Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 g Agarose in 108 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ autoklaviert, und nach Abkühlung auf 60°C wurden 27 ml Formaldehyd (37%, v/v) sowie 15 ml 10x Laufpuffer (200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,0) hinzugegeben. Nach Erkalten des Gels wurde die Gelkammer mit 1x Laufpuffer, der zusätzlich 0,22 M Formaldehyd enthielt, gefüllt, der Kamm gezogen und das Gel für mindestens 30 min äquilibriert. Die RNA-Proben (0,5-1 μg RNA) wurden ebenso wie 5 μg des RNA-Längenstandards im Verhältnis 4 : 1 mit 5x RNA-Auftragspuffer gemischt, für 15 min bei 60°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Dem RNA-Längenstandard wurde 1 μl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) hinzugefügt, und anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Nach Einlaufen der Proben bei einer Spannung von 40 V wurde die Elektrophorese für weitere 4 h bei einer konstanten Spannung von 80 V fortgeführt. Nach Abschluß der Elektrophorese konnte das Gel direkt für einen Kapillarblot (s. 2.4.6.2) eingesetzt werden.

2.4.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (MULLIS *et al.*, 1986) wurde in 100- μl -Ansätzen in einem „Minicycler MJ“ der Fa. Biometra (Göttingen, Deutschland) mit den Komponenten des „*Taq*-PCR Core Kits“ der Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Programme umfaßten 5 min Denaturierung der DNA bei 95°C, gefolgt von einer Inkubation bei 85°C für 2 min zur Zugabe der *Taq*-Polymerase und 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C, 30 s), Anlagerung (35-60°C, 1 min) und Synthese (72°C). Das Programm wurde von einer Inkubation bei 72°C für 10 min abgeschlossen, in der Abbruchfragmente aufgefüllt wurden. Bei Verwendung homologer Oligonukleotide wurde mit Anlagerungstemperaturen von 50 und 60°C gearbeitet. Bei Verwendung degenerierter Oligonukleotide wurde die Anlagerungstemperatur mit 35°C

beginnend sukzessive erhöht, bis ein Produkt der gewünschten Größe erhalten wurde. Die Länge der Syntheszeit stützte sich auf die Angabe des Herstellers der *Taq*-Polymerase, daß diese ca. 1000 Bp pro min amplifiziert.

2.4.5 Generierung von DNA-Fragmenten durch reverse Transkriptase

Von Gesamt-RNA-Präparationen wurden zur Transkriptanalyse bestimmter Gene reverse Transkriptase-Reaktionen unter Verwendung des „Omniscript RT“-Kits (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA und das jeweils angegebene Oligonukleotid eingesetzt. Nach Zugabe der weiteren Komponenten nach Angaben des Herstellers wurde der Ansatz anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 93°C für 5 min gestoppt.

2.4.6 Übertragung von Nukleinsäuren auf Membranen

2.4.6.1 Southern-Blots (SOUTHERN, 1975)

Zur Übertragung von in Agarosegelen aufgetrennten DNA-Fragmenten auf „Hybond N“-Nylonmembranen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) wurde die Kapillarblot-Methode nach SOUTHERN (1975) verwendet. Dazu wurde die DNA zunächst in einem 0,8%igen Agarosegel mit den Maßen 14,5 cm x 11,5 cm x 1 cm (Breite x Länge x Höhe) aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel zweimal 10 min in 0,25 HCl, zweimal 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und 30 min in Neutralisierungspuffer (3 M NaCl, 1 M Tris, pH 7) geschwenkt. Eine auf Gelgröße geschnittene Nylonmembran wurde mit H₂O_{dest.} befeuchtet und anschließend für 15 min in 10 x SSC (1,5 M NaCl, 150 mM Na₃-Citrat) äquilibriert. Zum Transfer wurden vier Lagen „Whatman“-Papier (Fa. Whatman, Maldstone, UK), das Agarosegel, die Nylonmembran, weitere vier Lagen Whatman-Papier sowie ca. 10 cm Zellstoffpapier in dieser Reihenfolge übereinander geschichtet und beschwert. Die unterste Lage des „Whatman“-Papiers war mit einem Pufferreservoir verbunden, das 10 x

SSC (1,5 M NaCl, 150 mM Na₃-Citrat) enthielt. Der Transfer erfolgte für 16-20 h und wurde anschließend durch Färbung des Agarosegels überprüft. Zur Fixierung der DNA auf der Nylonmembran wurde diese nach Abschluß des Transfers für 2 h bei 80°C inkubiert.

2.4.6.2 Northern-Blots (modifiziert nach ALWINE *et al.* [1977])

Die Übertragung von RNA auf „Hybond N“-Nylonmembranen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) erfolgte im wesentlichen nach der Methode von ALWINE *et al.* (1977). Hierzu wurde isolierte Gesamt-RNA (s. 2.4.2.2) zunächst einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese (s. 2.4.3) unterzogen. Das Gel wurde anschließend ohne weitere Behandlung wie unter 2.4.6.1 beschrieben auf eine Nylonmembran übertragen, wobei der SSC-Puffer ebenso wie das Whatman-Papier zuvor autoklaviert worden waren. Zur Fixierung der RNA auf der Nylonmembran wurde diese nach Abschluß des Transfers für 2 h bei 80°C inkubiert.

2.4.6.3 Herstellung von Filtern für die Koloniehybridisierung

Zur Analyse großer Mengen rekombinanter Klone wurden diese nach der Methode von BULUWELA *et al.* (1989) auf runde Nylonmembranen (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) übertragen. Die anschließende Analyse erfolgte durch Hybridisierung der Membranen mit einem [α -³²P]-dATP-markiertem DNA-Fragment (s. 2.4.7.1).

2.4.7 Hybridisierung

2.4.7.1 Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur DNA-DNA-Hybridisierung wurden DNA-Fragmente eingesetzt, die nach VOGELSTEIN und GILLESPIE (1979) mit [α -³²P]-dATP unter Verwendung des „random primed labeling“-Kits der Fa. Life Technologies GmbH (Karlsruhe, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers markiert worden waren. Überschüssiges, freies [α -³²P]-dATP wurde durch Einsatz des „Nucleotide

Removal“-Kits (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) entfernt. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungsröhrchen (Länge 30 cm, Durchmesser 4 cm, Fa. Ochs, Bovenden-Lenglern, Deutschland) in einem Hybaid-Minihybridisierungssofen (Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 60°C. Die Hybridisierungslösung setzte sich aus 20% Hybridisierungspuffer (250 mM Tris, 22,5 mM Na₂-pyrophosphat, 25 µM Ficoll 400, 28 µM Polyvinylpyrrolidon 40, 1% BSA), 20% Dextransulfat (50%), 10% SDS (10%) und 1 M NaCl zusammen. Die Membranen wurden zunächst für mindestens 2 h bei 60°C in 20 ml Hybridisierungslösung ohne Sonde prähybridisiert. Die markierte DNA-Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe der Sonde erfolgte die Hybridisierung für 16-20 h. Abschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 10 min bei 50°C in 2x SSC (0,3 M NaCl, 50 mM Na₃-Acetat) gewaschen, und die Signale wurden per Autoradiographie (s. 2.4.7.3) sichtbar gemacht.

2.4.7.2 Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

RNA-DNA-Hybridisierungen wurden im wesentlichen wie unter 2.4.7.1 beschrieben durchgeführt, jedoch erfolgten die Hybridisierungen in Anwesenheit 50% Formamid, da bei dieser Formamid-Konzentration keine RNase-Aktivität zu verzeichnen ist. Die Membran wurde zunächst für mindestens 2 h in 20 ml Formamid-Hybridisierungslösung bei 42°C prähybridisiert, die denaturierte (5 min, 95°C) Sonde wurde hinzugegeben, und die Hybridisierung erfolgte für 16-20 h bei 42°C. Anschließend wurde die Membran zweimal 5 min mit 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na₃-Citrat) gewaschen, dann zweimal 30 min mit 2 x SSC/1% SDS (0,3 M NaCl, 30 mM Na₃-Citrat, 1% SDS) und abschließend zweimal 30 min mit 0,1 x SSC (15 mM NaCl, 1,5 mM Na₃-Citrat) gespült. Die noch feuchte Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und die Signale wurden per Autoradiographie (s. 2.4.7.3) sichtbar gemacht.

Formamid-Hybridisierungslösung

Formamid	10 ml
Dextransulfat (50% [w/v])	4 ml
20x SSC	3 ml
SDS (10% [w/v])	2 ml
Denhardt'sche Lösung	1 ml

Denhardt'sche Lösung

Ficoll 400	2% (w/v)
Polyvinylpyrrolidon 40	2% (w/v)
BSA	2% (w/v)

2.4.7.3 Autoradiographie

Signale von Nylonmembran, die mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP-markierten DNA-Sonden hybridisiert worden waren, wurden mit Hilfe von Kodak „Storage Phosphor Screens“ (Fa. Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) per Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Autoradiogramme wurden mittels eines „Storm 860 Laser Scanners“ (Fa. Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) digitalisiert und mit der Bildbearbeitungssoftware „ImageQuant“ (Fa. Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) visualisiert.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in zellfreien Extrakten erfolgte nach LOWRY *et al.* (1951) in der von KRESZE (1983) modifizierten Form. Sollten die Proteinkonzentrationen von Zellsuspensionen bestimmt werden, geschah dies nach der Methode von SCHMIDT *et al.* (1963).

2.5.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen durch denaturierende Polyacrylamid-elektrophorese erfolgte nach SCHÄGGER und VON JAGOW (1987). Um die Proteine nach der Trennung im Gel sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung nach BLUM *et al.* (1987) oder alternativ eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 (WEBER und OSBORNE, 1969) durchgeführt.

2.5.3 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse von Zellextrakten erfolgte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese, welche im wesentlichen nach den von O'FARRELL (1975) vorgestellten Grundprinzipien durchgeführt wurde. Hierzu wurde *H. halophilus* in 50 ml NB-Medium mit 1 M NaCl bzw. 1 M NaNO₃ angezogen, und die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspendieren in 100 µl Denaturierungspuffer (9 M Harnstoff, 2% Triton X-100, 130 mM DTT, 20 µl/ml Servalyte 3-10 Iso-Dalt [Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland], 8 mM PMSF) und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h. Verbleibende Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt, und der Überstand wurde zur 2D-Gelelektrophorese eingesetzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt mittels isoelektrischer Fokussierung in einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) in Verbindung mit dem „Immobiline Dry Strip“-Kit (Fa. Pharmacia, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), wobei im wesentlichen die Angaben des Herstellers und einige von GÖRG *et al.* (1995) erarbeitete Verbesserungen Beachtung fanden. 180 mm lange „Immobiline Dry Strips“ mit einem linearen pH-Gradienten von 4-7 (Fa. Pharmacia, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) wurden für 16-20 h in Rehydrierungslösung (8 M Harnstoff, 0,5% Triton X-100, 5,2 µl/ml Servalyte 3-10 Iso-Dalt [Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland], 13 mM DTT) rehydriert und in der Elektrophoreseeinheit mit einer EPS 3500 Hochspannungsquelle (Fa. Amersham Pharmacia

Biotech AB, Uppsala, Schweden) 30 min bei 150 V vorfokussiert. Danach wurde die Probe an der kathodischen (sauren) Seite aufgetragen. Nach einem Vorlauf von 1 h bei einer Spannung von 500 V, erfolgte die eigentliche Fokussierung in einem steigendem Gradienten bis 3500 V (1 mA, 1 W) über etwa 16 h, bis 55-60 kVh erreicht waren. Während der gesamten isoelektrischen Fokussierung wurde die Elektrophoreseeinheit mit einem Kryostaten auf 18°C temperiert.

In der zweiten Dimension wurden die Proteine in 18 cm x 18 cm großen SDS-Polyacryamidgelen (12,5% nach SCHÄGGER und VON JAGOW [1987]; s. 2.5.2) nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurden die Streifen an beiden Enden leicht gekürzt und je 20 min in Äquilibrationpuffer 1 (6 M Harnstoff, 50 mM Tris/Cl pH 6,8, 30% Glycerin, 2% SDS, 10 mg/ml DTT) und in Äquilibrationpuffer 2 (6 M Harnstoff, 50 mM Tris/Cl pH 6,8, 30% Glycerin, 2% SDS, 45 mg/ml Iodacetamid) äquilibriert. Nach der Äquilibration wurden die Streifen direkt auf das Trenngel gelegt und durch Übersichten mit 1% Agarose und 0,0002% Bromphenolblau in Kathodenpuffer fixiert. Nachdem die Proteine bei 60 V in das Gel eingelaufen waren, wurde die Elektrophorese für 12 h bei konstant 100 V fortgeführt, und anschließend wurden die Proteine per Silber- bzw. Coomassiefärbung sichtbar gemacht (s. 2.5.2). Abschließend wurde die Intensität der Signale der einzelnen Proteine unter Verwendung der Programme „ImageQuant“ (Fa. Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) und „ImageMaster 2D“ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) quantifiziert.

2.5.4 Herstellung von Antiseren

Die Herstellung von Antiseren erfolgte durch Immunisierung von Kaninchen durch die Fa. Bioscience (Göttingen, Deutschland). Für die erste Immunisierung wurden 200 µg des gereinigten Proteins eingesetzt, nach einem Monat erfolgte die zweite Immunisierung mit 100 µg des Proteins. Nach weiteren zwei Monaten wurde das Antiserum gewonnen, welches in entsprechender Verdünnung im Western-Blot eingesetzt werden konnte.

2.5.5 Western-Blot

Zur immunologischen Analyse von Proteinen mit spezifischen Antisera wurden die Proteine nach einer SDS-PAGE (s. 2.5.2) unter Verwendung einer „Semi dry transfer cell Transblot SD“-Transferkammer (Fa. BioRad Laboratories, Hercules, USA) nach dem „Semidry“-Verfahren bei 15 V für 30 min auf eine ProtranBA 85-Nirocellulosemembran (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen. Als Transferpuffer, mit dem die Membran, das Gel und das Filterpapier (Fa. Whatman, Maldstone, UK) angefeuchtet wurden, diente 100 mM Tris, 100 mM Glycin, 20% Methanol, pH 7.

Nach erfolgtem Transfer wurden die Membranen für 5 min in Amidoschwarz (0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert, wodurch die Proteine visualisiert wurden. Nach Markierung des Proteinstandards wurde die Membran durch mehrfaches Waschen in PBST (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0,05% Tween 20) entfärbt. Zur Absättigung der Membran mit Protein wurde diese 1 h mit Magermilchpulver (0,1% in PBST) bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min in PBST gewaschen, das entsprechende Antiserum wurde in einer Konzentration von 4-20 µg/ml PBST hinzugegeben und die Membran für 1-16 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 30 min gewaschen, 1 h bei Raumtemperatur mit Protein A-Konjugat (6 µl/20 ml PBST, Fa. ICN, Aurora, USA) inkubiert und dann erneut dreimal 10 min mit PBST gewaschen. Die Detektion von Kreuzreaktionen erfolgte nach 1 min Inkubation der Membran in Detektionslösung (0,03% H₂O₂, 1,2 mM Luminol, 0,2 mM p-Coumarsiure, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0). Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (X-OMAT-AR, Fa. Kodak AG, Stuttgart, Deutschland).

Gegebenenfalls wurde die Signalintensität durch Auswertung in einem Densitometer (Fa. Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) und Analyse mit der „ImageQuant“-Software (Fa. Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) quantifiziert.

2.6 Reinigung von Flagellin

Zur Reinigung von Flagellin wurde *H. halophilus* in 6 x 2 l-Kulturen in NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 200 ml Tris-Puffer (50 mM Tris, 50 mM MgSO₄, pH 7,4) mit 1 M NaCl resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 90 s in einem Standmixer (Fa. Bauknecht, Schorndorf, Deutschland) stark gemixt, wodurch die Flagellen von den Zellen abgeschert wurden. Es folgten 3-5 niedertourige Zentrifugationsschritte, um die intakten Zellen zu sedimentieren, solange bis kein sichtbares Sediment mehr auszumachen war. Der klare Überstand wurde einer Ultrazentrifugation im Ti 70.1-Rotor (Fa. DuPont, Newton, USA) für 1 h bei 100.000 x g unterzogen, wodurch die Flagellen sedimentiert werden konnten. Das Sediment wurde in 500 µl Tris-Puffer resuspendiert, und der Erfolg der Präparation wurde durch SDS-PAGE und Silberfärbung (s. 2.5.2) überprüft. Zur Reinigung von Flagellin, welches zur Herstellung von Antisera eingesetzt werden sollte, wurde eine präparative SDS-PAGE durchgeführt. Das Flagellin wurde anschließend durch Elektroelution aus dem Gel eluiert. Zur Elektroelution wurde eine „S&S Biotrap“-Kammer (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Elution erfolgte für 12 h bei 100 V, und als Elutionspuffer diente 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,025% SDS.

2.7 Elektronenmikroskopie

Für rasterelektronenmikroskopische Studien wurde *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaCl bzw. 1 M NaNO₃ angezogen, und die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Phase durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden in Fixativ-Puffer (2,5% Glutaraldehyd, 75 mM Na-Cacodylat, 1 mM MgCl₂, pH 7,2), der zusätzlich 1 M NaCl bzw. 1 M NaNO₃ enthielt, um Veränderungen der Zellen aufgrund von hypoosmotischen Effekten auszuschließen, fixiert. Im Folgenden wurden die Zellen wie beschrieben behandelt (WANNER *et al.*, 1989). Alle rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop Typ S-4100 (Fa. Hitachi, Tokio,

Japan) und wurden freundlicherweise von Prof. G. Wanner, Botanisches Institut der LMU München, durchgeführt.

2.8 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), ICN Biomedicals (Aurora, USA) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Enzyme für die Molekularbiologie stammten von MBI Fermentas Deutschland GmbH (St. Leon Rot, Deutschland) und Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland). Standards für die Protein-Polyacrylamid- bzw. Agarosegelelektrophoresen wurden von der Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland), Amersham Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) und Promega (Mannheim, Deutschland) sowie das Acrylamid von Gerbu (Gaiberg, Deutschland) erworben. Die verwendeten Inhibitoren (SF6847, TCS, DCCD) stammten ebenfalls von der Sigma Chemie GmbH. Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Cl⁻ ist nicht in die primäre Bioenergetik von *H. halophilus* involviert

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die physiologische Basis der Cl⁻-Abhängigkeit des Wachstums von *H. halophilus* zu ermitteln. Da *H. halophilus* moderat halophil und zudem alkalitolerant ist, bestand die Vermutung, daß nicht Protonen, sondern alternative Ionen als primäre Kopplungionen fungieren. Eine denkbare Möglichkeit hierfür stellt ein primärer Cl⁻-Kreislauf über der Cytoplasmamembran von *H. halophilus* dar. Daher wurde in ersten Experimenten eine mögliche Rolle von Cl⁻ in der primären Bioenergetik von *H. halophilus* überprüft.

3.1.1 Einfluß von Cl⁻ auf das Membranpotential von *H. halophilus*

Zunächst wurde untersucht, ob Cl⁻ an der Generierung des Membranpotentials ($\Delta\psi$) beteiligt ist. Dazu wurden Zellsuspensionen in Gegenwart von NaCl oder Na₂SO₄ inkubiert und $\Delta\psi$ wurde im Gleichgewicht der endogenen Atmung durch die Verteilung des lipophilen Kations TPP⁺ bestimmt (s. 2.3.3). In Vorversuchen wurden Zellen durch 30 min Inkubation in 4% (v/v) Butanol deenergetisiert. Die Menge an TPP⁺, die an diese Zellen band (4% der energetisierten Zellen) wurde als unspezifisches Binden definiert und von allen anderen Werten abgezogen. Die Versuche zur Bestimmung von $\Delta\psi$ wurden bei Raumtemperatur zunächst unter optimalen Bedingungen bei pH 7,4 durchgeführt. Auf die Zugabe eines zusätzlichen Substrats wurde verzichtet, da *H. halophilus* eine ausreichend hohe endogene Atmung aufweist (ROEBLER, 1997).

In Cl⁻-haltigem Puffer betrug $\Delta\psi$ im Mittel -201 ± 9 mV, in SO₄²⁻-haltigem Puffer dagegen -221 ± 8 mV (s. Tab. 5). Auch bei Variation des pH-Werts von pH 6,6 auf pH 8,9 wurde derselbe Effekt beobachtet. In jedem Fall wurde ein $\Delta\psi$ zwischen -188 und -229 mV bestimmt. Gleichzeitig zeigte sich, daß es unter keiner der getesteten Bedingungen ein erhöhtes Membranpotential in Cl⁻-haltigem Puffer gab (Tab. 5).

Hemmstoffstudien sollten Hinweise auf den Mechanismus der $\Delta\psi$ -Generierung in *H. halophilus* erbringen. Wie aus Abb. 2 deutlich wird, ließ sich das Membranpotential sowohl durch die Zugabe des Protonophors 2-(3,5-di-tert-Butyl-4-Hydroxy-Benzyliden)-Malononitril (SF6847) als auch durch eine Kombination aus dem Kalium-Ionophor Valinomycin und K^+ komplett dissipieren, während das Cl^- -Ionophor (ROTHMAIER und SIMON, 1993) keinen Effekt zeigte (Abb. 2). Die Wirkung der Ionophore war unabhängig von den im Puffer verwendeten Anionen. Diese Ergebnisse bestätigen, daß Cl^- für den Aufbau des Membranpotentials entbehrlich ist. Vielmehr zeigte sich, daß das $\Delta\psi$ in Cl^- -haltigen Puffern reproduzierbar um ca. 10% geringer war als in SO_4^{2-} -haltigen Puffern (Tab. 5).

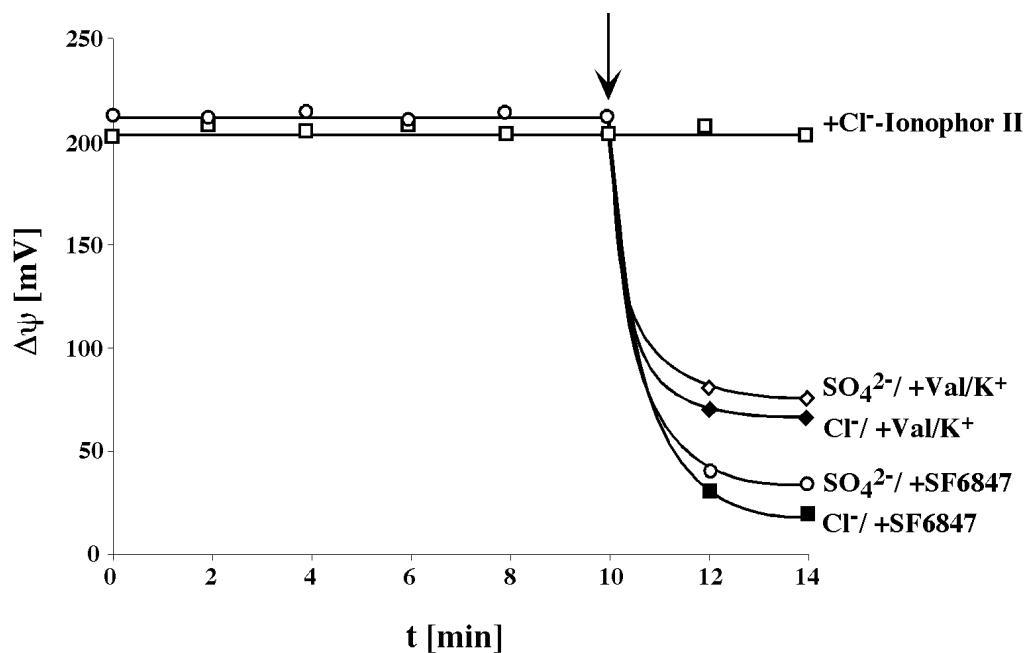


Abb. 2: Wirkung von Ionophoren auf $\Delta\psi$ von *H. halophilus*. Das Membranpotential ($\Delta\psi$) wurde in Zellsuspensionen von *H. halophilus* (1,2-1,8 mg Protein/ml) bei Raumtemperatur im Gleichgewicht der endogenen Atmung in 10 ml Tris-Puffer (pH 7,4), der 1 M NaCl bzw. 0,66 M Na_2SO_4 enthielt, bestimmt (s. 2.3.3). Der Versuch wurde durch Zugabe von 1 μCi TPP⁺ (spez. Aktivität: 31mCi/mmol; Endkonzentration: 3,2 μM) gestartet, und nach 10 min Vorinkubation wurde die erste Probe entnommen. Zum Zeitpunkt, der durch den Pfeil markiert ist, wurden SF6847 oder das Cl^- -Ionophor II zu einer Endkonzentration von jeweils 20 μM oder Valinomycin + KCl zu einer Endkonzentration von 100 μM + 250 mM zugegeben.

3.1.2 Ist Cl⁻ für die ATP-Synthese in *H. halophilus* notwendig?

Um festzustellen, ob Cl⁻ einen Einfluß auf die ATP-Synthese hat, wurde *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, und das Sediment wurde in Tris-Puffer (pH 7,4) mit 1 M NaCl bzw. 0,66 M Na₂SO₄ resuspendiert. Der intrazelluläre ATP-Gehalt im Gleichgewicht der endogenen Atmung wurde wie unter 2.3.4 beschrieben bestimmt. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß ruhende Zellen von *H. halophilus* bei pH 7,4 im Gleichgewicht der endogenen Atmung einen intrazellulären ATP-Gehalt von ca. 3,7 nmol ATP/mg Protein aufwiesen. Wie ebenfalls deutlich wird, war der intrazelluläre ATP-Gehalt im physiologischen Gleichgewicht unabhängig von den verwendeten Anionen Cl⁻ oder SO₄²⁻ im Puffer. Die Zugabe des Protonophors SF6847 bewirkte eine effektive Hemmung der ATP-Synthese, deren Ausmaß ebenfalls unabhängig von den verwendeten Anionen war. Gleiches gilt für die Wirkung des spezifischen ATP-Synthase-Inhibitors N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) (LINNETT und BEECHEY, 1979), der sowohl in Gegenwart von Cl⁻ als auch von SO₄²⁻ eine effektive Hemmung der ATP-Synthase von *H. halophilus* bewirkte.

Analog zu den Experimenten zur Bestimmung von $\Delta\psi$ wurde auch der intrazelluläre ATP-Gehalt bei verschiedenen externen pH-Werten von pH 6,6 bis pH 8,9 bestimmt. Dabei zeigte sich, daß der ATP-Gehalt bei extremen pH-Werten auf ca. 40% des ATP-Gehalts unter optimalen Bedingungen zurückging (Tab. 5). Es war jedoch kein Unterschied im ATP-Gehalt der Zellen zwischen Cl⁻- oder SO₄²⁻-haltigem Puffer zu beobachten (Tab. 5). Aus den Ergebnissen dieser Experimente läßt sich folglich schließen, daß Cl⁻ keinen Einfluß auf die ATP-Synthese in *H. halophilus* hat.

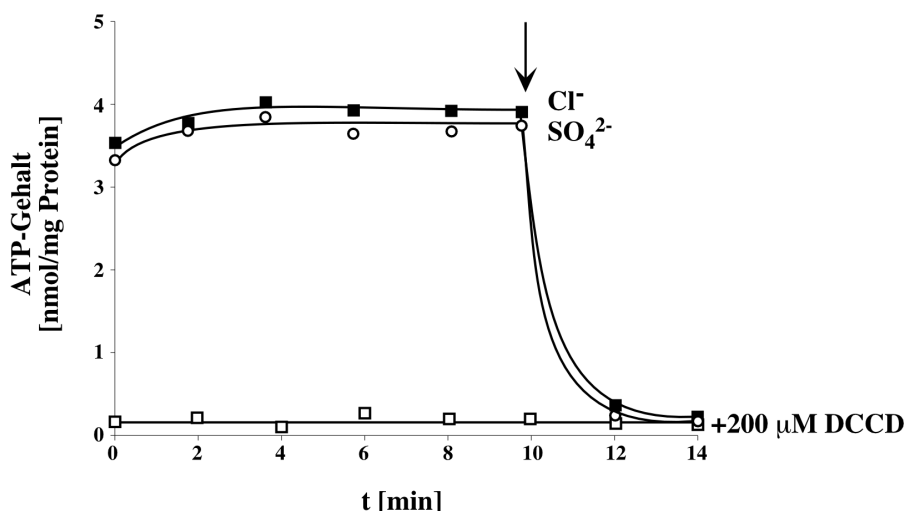


Abb. 3: Wirkung von Anionen, SF6847 und DCCD auf den intrazellulären ATP-Gehalt von *H. halophilus*. Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde in Zellsuspensionen von *H. halophilus* (1,2-1,8 mg Protein/ml) bei Raumtemperatur im Gleichgewicht der endogenen Atmung in Tris-Puffer (pH7,4), der 1 M NaCl bzw. 0,66 M Na₂SO₄ enthielt, bestimmt (s. 2.3.4). Der Versuch wurde durch Zugabe von 0,5 ml Zellsuspension zu 9,5 ml Tris-Puffer gestartet, und nach 10 min Vorinkubation wurde die erste Probe genommen. Zum gegebenen Zeitpunkt (Pfeil) wurde SF6847 zu einer Endkonzentration von 20 μM zugegeben. Für Versuche zur Wirkung von DCCD wurden die Zellen im Testansatz 30 min vor der ersten Probenahme mit 200 μM DCCD vorinkubiert.

3.1.3 Zusammenfassung der bioenergetischen Studien an *H. halophilus*

Faßt man alle in dieser Arbeit zur Bioenergetik von *H. halophilus* erhaltenen Ergebnisse sowie die Ergebnisse vorangegangener Studien zusammen, so ergibt sich ein umfassendes Bild der bioenergetischen Parameter in *H. halophilus* (Tab. 5). Der interne pH-Wert (pH_i) und ΔpH (ROEBLER, 1997) sowie Δψ und der intrazelluläre ATP-Gehalt wurden unter verschiedenen Bedingungen, von leicht sauer (pH 6,6) bis stark alkalisch (pH 8,9) in Gegenwart oder Abwesenheit von Cl⁻ bestimmt. Keiner der untersuchten Parameter zeigte unter den getesteten Bedingungen eine spezifische Cl⁻-Abhängigkeit. Betrachtet man zunächst den internen pH-Wert von *H. halophilus*, so fällt auf, daß *H. halophilus* im alkalischen eine effektive pH-Regulation betreibt und den internen pH-Wert im Bereich zwischen 7-8 konstant hält, woraus sich ein negatives ΔpH ergibt. Diese pH-Regulation ist zwar Na⁺-abhängig (ROEBLER, 1997), wie aus Tab. 5 jedoch deutlich wird unabhängig von Cl⁻. Das gleiche gilt für das elektrische Membranpotential Δψ (s. 3.1.1). Unter allen getesteten Bedingungen war dieses in SO₄²⁻-

haltigem Puffer größer als in Cl⁻-haltigem Puffer, was eine Cl⁻-Abhängigkeit der $\Delta\psi$ -Generierung ausschließt. Der intrazelluläre ATP-Gehalt als Indikator für die ATP-Synthese fällt zwar unter sauren bzw. extrem alkalischen Bedingungen auf 40 bzw. 35% des unter optimalen Bedingungen gemessenen zurück, zeigt jedoch ebenfalls unter allen getesteten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in Cl⁻- oder SO₄²⁻-haltigen Puffern. Die in diesen Experimenten zusammengetragenen Daten zeigen eindeutig, daß Cl⁻ weder bei der pH-Regulation noch bei der Generierung von $\Delta\psi$, noch bei der ATP-Synthese in *H. halophilus* eine essentielle Bedeutung hat, die primären bioenergetischen Vorgänge in *H. halophilus* also Cl⁻-unabhängig stattfinden.

Tab. 5: Zusammenfassung der bioenergetischen Daten von *H. halophilus*. pH_i, Δ pH, $\Delta\psi$ und der intrazelluläre ATP-Gehalt wurden experimentell bestimmt, angegeben ist jeweils der Mittelwert aus mindestens 5 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten sowie die Standardabweichung. Die Daten wurden teilweise aus ROEBLER (1997) übernommen.

pH _a ¹	Anion	pH _i ²	Δ pH ³	$\Delta\psi$ [mV]	$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ [mV] ⁴	ATP [nmol/ mg Protein]	$\Delta\tilde{\mu}_{Cl^-}$ [mV] ⁵
6,6	1 M Cl ⁻	6,521 ± 0,07	-0,079 ± 0,07	-194 ± 9	-190 ± 13	1,5 ± 0,1	n. b. ⁶
	0,66 M SO ₄ ²⁻	6,481 ± 0,07	-0,119 ± 0,07	-215 ± 8	-222 ± 10	1,4 ± 0,2	---
7,4	1 M Cl ⁻	7,240 ± 0,06	-0,190 ± 0,06	-201 ± 9	-190 ± 13	3,8 ± 0,2	-178 ± 9
	0,66 M SO ₄ ²⁻	7,257 ± 0,09	-0,173 ± 0,09	-221 ± 8	-211 ± 13	3,5 ± 0,2	---
8,0	1 M Cl ⁻	7,409 ± 0,12	-0,591 ± 0,12	-218 ± 4	-183 ± 11	3,2 ± 0,3	-195 ± 9
	0,66 M SO ₄ ²⁻	7,372 ± 0,19	-0,628 ± 0,19	-227 ± 6	-190 ± 17	3,0 ± 0,2	---
8,5	1 M Cl ⁻	7,858 ± 0,08	-0,642 ± 0,08	-220 ± 5	-182 ± 10	2,8 ± 0,2	n. b. ⁶
	0,66 M SO ₄ ²⁻	7,832 ± 0,11	-0,668 ± 0,11	-229 ± 8	-190 ± 14	2,5 ± 0,4	---
8,9	1 M Cl ⁻	7,975 ± 0,02	-0,925 ± 0,02	-188 ± 9	-133 ± 13	1,3 ± 0,3	n. b. ⁶
	0,66 M SO ₄ ²⁻	7,916 ± 0,05	-0,984 ± 0,05	-217 ± 8	-159 ± 11	1,2 ± 0,2	---

¹pH_a: pH-Wert im Puffer. ²pH_i: intrazellulärer pH-Wert. ³ Δ pH = pH_i - pH_a

⁴ $\Delta\tilde{\mu}_{H^+} / F = \Delta\psi - 2,3 R \times T / nF \times \Delta$ pH. ⁵ $\Delta\tilde{\mu}_{Cl^-} = \Delta\psi - 2,3 R \times T / F \times \Delta$ pCl ; Δ pCl = log [Cl⁻]_a / [Cl⁻]_i;

[Cl⁻]_i: intrazelluläre Cl⁻-Konzentration; [Cl⁻]_a: extrazelluläre Cl⁻-Konzentration. ⁶n. b.: nicht bestimmt.

3.2 Der Cl⁻-abhängige Betain-Transport in *H. halophilus*

H. halophilus ist, wie alle anderen halotoleranten bzw. halophilen Mikroorganismen, mit dem grundsätzlichen Problem der Osmoregulation konfrontiert. Da die Cytoplasmamembran für Wasser durchlässig, dahingegen für die meisten anderen Substanzen, wie u.a. auch Salze, undurchlässig ist, besteht unter hyperosmotischen Bedingungen, wenn die intrazelluläre Wasseraktivität deutlich unter der des Mediums liegt, die Gefahr eines drastischen Wasserverlustes mit allen damit verbundenen negativen Konsequenzen für die Zelle. Eine der Strategien von Mikroorganismen dem vorzubeugen, ist die intrazelluläre Akkumulation von kompatiblen Soluten (s. 1.2). Diese Strategie wird auch von *H. halophilus* angewandt, der Glycinbetain, N^ε-Acetyl-β-Lysin, N^δ-Acetyl-Ornithin, Alanin, Ectoin, Glutamat, Glutamin und Prolin akkumuliert (SEVERIN, 1993). Liegen diese kompatible Solute im Medium vor, werden sie von der Zelle aufgenommen, und die entsprechenden Biosynthesewege werden reprimiert.

3.2.1 Die Akkumulation von Betain in *H. halophilus* ist salzabhängig

Aus Arbeiten anderer Arbeitsgruppen war bekannt, daß Glycinbetain (kurz: Betain) von *H. halophilus* akkumuliert wird (SEVERIN, 1993). Abb. 4A zeigt den zeitlichen Verlauf der Betain-Aufnahme in *H. halophilus* in Tris-Puffer (pH 7,4) bei einer NaCl-Konzentration von 1 M. Die Zellen häuften Betain in den ersten zehn Minuten nach Versuchsbeginn mit einer hohen Aufnahmerate von 10-14 nmol Betain/min x mg Protein an. Diese Aufnahmeraten gingen mit zunehmender Versuchsdauer zurück, und nach 75 min erreichte die intrazelluläre Betainkonzentration ein Plateau. Aus diesem Grund erfolgte die Probennahme zur Bestimmung der intrazellulären Betainkonzentration im isoosmotischen Gleichgewicht stets nach 75 min. Um zu überprüfen, ob diese Betain-Akkumulation durch Hochsalzbedingungen induziert wird, wurden Transportuntersuchungen mit radioaktiv markiertem [¹⁴C]-Betain durchgeführt (s. 2.3.5). Dazu wurden Zellen in NB-Medium in Gegenwart von 0,25 M NaCl oder 1 M

NaCl angezogen und anschließend wurde die intrazelluläre Betainkonzentration im isoosmotischen Gleichgewicht in NB-Medium mit 0,25 M NaCl oder 1 M NaCl bestimmt. Abb. 4B zeigt, daß in NB-Medium resuspendierte Zellen, die bei einer Salzkonzentration von 1 M NaCl gewachsen waren, eine 4,2 mal höhere intrazelluläre Betainkonzentration aufwiesen, als Zellen, die mit 0,25 M NaCl gewachsen waren. Eine Berechnung der tatsächlichen internen Betainkonzentration war unter diesen Versuchsbedingungen nicht möglich, da sich die spezifische Aktivität vom Betain im Komplexmedium nicht bestimmen läßt. Um die absolute intrazelluläre Betainkonzentration bestimmen zu können, wurden Zellen nach der Zentrifugation in isoosmotischem Tris-Puffer resuspendiert, es wurden Betain-Aufnahmestudien durchgeführt, und nach 75 min wurde die intrazelluläre Betainkonzentration im isoosmotischen Gleichgewicht bestimmt. Abb. 4C zeigt, daß die intrazelluläre Betainkonzentration auch unter definierten Bedingungen direkt von der externen Salzkonzentration abhängig war. Bei 0,25 M NaCl betrug die intrazelluläre Betainkonzentration nur 60 mM, bei 1 M NaCl dagegen 365 mM, was einer Erhöhung um den Faktor 6 entspricht. Die intrazelluläre Betainkonzentration wurde dabei anhand des bereits in vorangegangenen Arbeiten bestimmten intrazellulären Volumens von 2,51 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Protein für 0,25 M NaCl und 1,94 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Protein für 1 M NaCl berechnet (ROEBLER und MÜLLER, 1998). Die ermittelte intrazelluläre Betainkonzentration ist offensichtlich nicht ausreichend, um allein eine effektive Osmoregulation zu gewährleisten. Da Betain jedoch nur eine Komponente des Solutegemisches in *H. halophilus* ist (SEVERIN, 1993), entspricht dieser Befund den zu erwartenden Ergebnissen. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen eindeutig, daß die Akkumulation des Betains in *H. halophilus* strikt von der Salzkonzentration des Mediums abhängig ist.

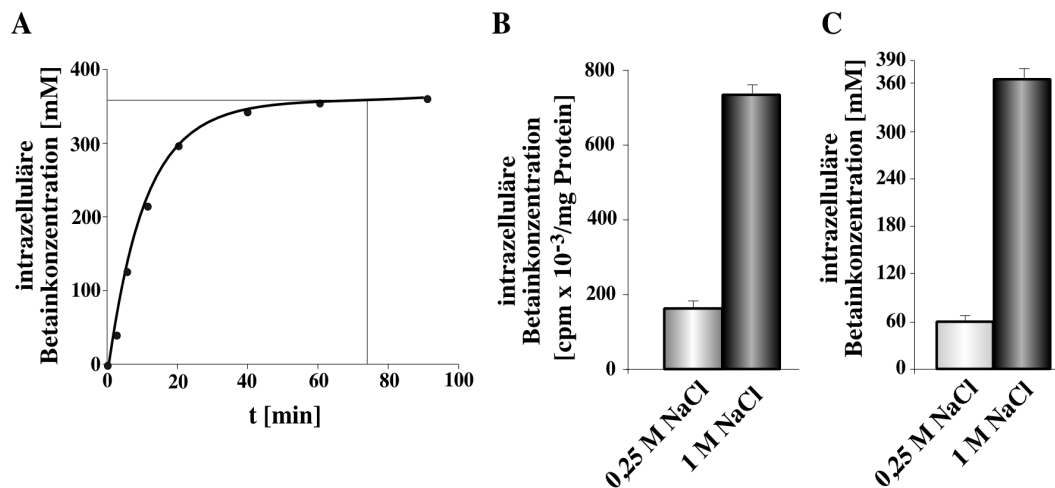


Abb. 4: Die Akkumulation von Betain in *H. halophilus* ist salzabhängig. 100 μ l einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert, und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml NB-Medium (pH 7,4) bzw. Tris-Puffer (pH 7,4) gestartet. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 50- μ l-Aliquots entnommen, und die intrazelluläre Betainkonzentration wurde bestimmt (s. 2.3.5). Das NB-Medium bzw. der Tris-Puffer enthielten 0,25 M bzw. 1 M NaCl wie angegeben, 1 mM Betain, sowie 0,5 μ Ci [¹⁴C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μ M). A. zeitlicher Ablauf der Betain-Aufnahme in *H. halophilus* in Tris-Puffer. B. intrazelluläre Betainkonzentration von *H. halophilus* in NB-Medium mit 0,25 bzw. 1 M NaCl. C. intrazelluläre Betainkonzentration von *H. halophilus* in Tris-Puffer mit 0,25 bzw. 1 M NaCl.

3.2.2 Wirkung von Anionen auf den Betain-Transport

Um festzustellen, ob die salzabhängige Betain-Aufnahme ein spezifisches Bedürfnis für Cl⁻ aufweist, wurden Aufnahmestudien mit markiertem [¹⁴C]-Betain in Gegenwart verschiedener Osmolyte durchgeführt (s. 2.3.5). Die Zellen wurden hierzu in NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, durch Zentrifugation geerntet, und anschließend wurde das Sediment in Tris-Puffer mit verschiedenen ionischen und nicht-ionischen Osmolyten resuspendiert. Die Konzentration der Osmolyte betrug dabei für Na₂SO₄, MgCl₂ und CaCl₂ 0,66 M, während alle anderen Osmolyte in einer Konzentration von 1 M eingesetzt wurden. Abb. 5 zeigt, daß die initialen Aufnahmeraten für Betain vom jeweils eingesetzten Osmolyt abhängig waren. Während mit NaCl, NaBr und NaNO₃ optimale Aufnahmeraten von 10-14 nmol Betain/min x mg Protein erreicht wurden, gingen diese mit MgCl₂ und CaCl₂ auf ca. 80%, mit Na-Glukonat, KCl und Saccharose auf ca. 55% sowie mit Na₂SO₄ und Sorbit auf weniger als 25% der optimalen Aufnahmeraten zurück.

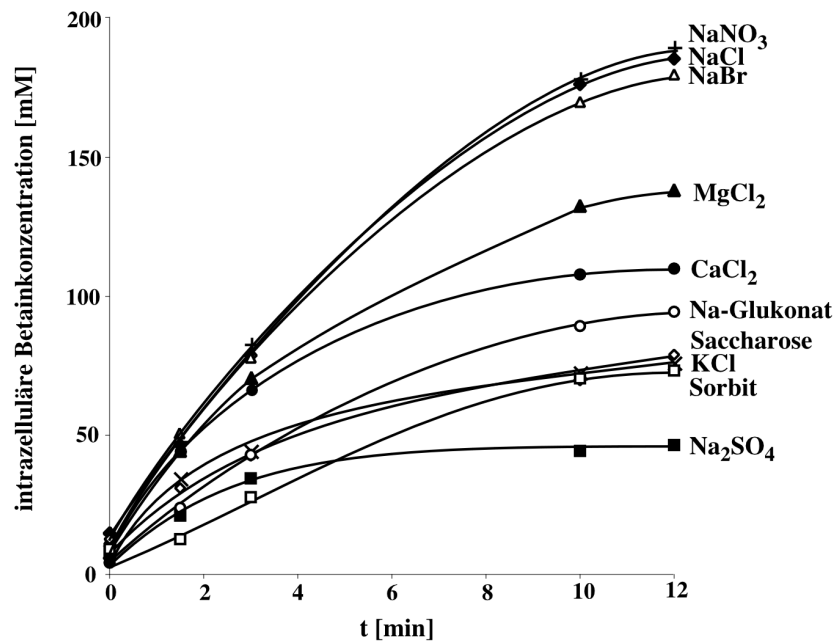


Abb. 5: Die Betain-Aufnahme in *H. halophilus* in Gegenwart unterschiedlicher Osmolyte. 100 μ l einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert, und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml Tris-Puffer (pH 7,4) gestartet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Tris-Puffer enthielt die Osmolyte jeweils in einer Konzentration von 1 M, bis auf Na₂SO₄, MgCl₂ und CaCl₂, die in einer Konzentration von 0,66 M eingesetzt wurden. Die Betainkonzentration im Puffer betrug 1 mM, und es wurden 0,5 μ Ci [¹⁴C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μ M) eingesetzt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 50- μ l-Aliquots entnommen, und die intrazelluläre Betainkonzentration wurde bestimmt (s. 2.3.5).

Nicht nur die Aufnahmeraten, sondern auch die intrazelluläre Betainkonzentrationen im isoosmotischen Gleichgewicht waren abhängig von der Natur der Osmolyte (Abb. 6). In Gegenwart von NaCl, NaBr bzw. NaNO₃ war die intrazelluläre Betainkonzentration maximal. Dagegen entsprach die intrazelluläre Betainkonzentration mit den nicht-ionischen Osmolyten Saccharose und Sorbit sowie KCl und Na-Glukonat jeweils nur ca. 40% der optimalen Konzentration, während in Gegenwart von MgCl₂ bzw. CaCl₂ ca. 60% der maximalen intrazellulären Betainkonzentration erreicht wurden.

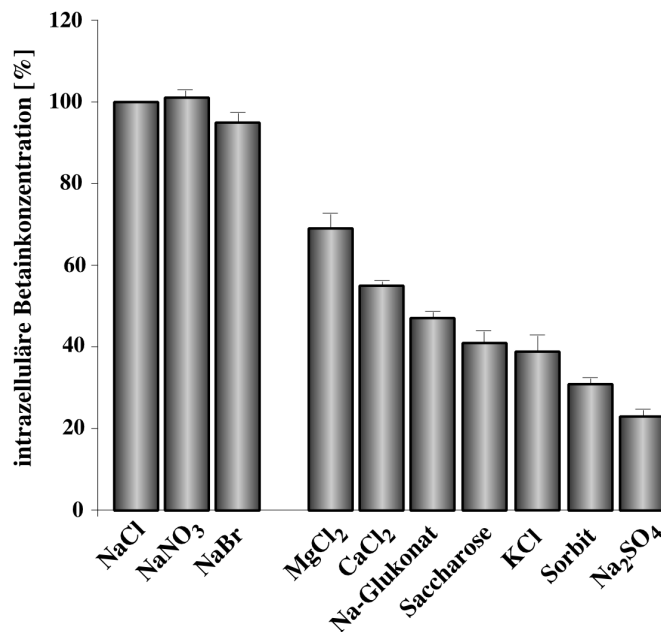


Abb. 6: Die finale Akkumulation von Betain im isoosmotischen Gleichgewicht ist abhängig von der Natur des Osmolyts. 100 μ l einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert, und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml Tris-Puffer (pH 7,4) gestartet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Tris-Puffer enthielt die Osmolyte jeweils in einer Konzentration von 1 M, bis auf Na₂SO₄, MgCl₂ und CaCl₂, die in einer Konzentration von 0,66 M eingesetzt wurden. Die Betainkonzentration im Puffer betrug 1 mM, und es wurden 0,5 μ Ci [14C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μ M) eingesetzt. Nachdem sich das isoosmotische Gleichgewicht der endogenen Atmung eingestellt hatte (75 min nach Versuchsstart), wurden 50- μ l-Aliquots entnommen und die intrazelluläre Betainkonzentration wurde bestimmt (s. 2.3.5). Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus fünf voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Balken geben die Standardabweichung an.

Die Ergebnisse dieser Versuche belegen deutlich, daß die Betain-Aufnahme in *H. halophilus* nur in Gegenwart NaCl, NaNO₃ bzw. NaBr optimal ist. Bemerkenswerterweise sind gerade NaBr und nach einer längeren Adaptationszeit NaNO₃ diejenigen Osmolyte, die NaCl auch im Wachstumsversuch effizient substituieren können (ROEBLER und MÜLLER, 1998). Alle anderen untersuchten Osmolyte stimulieren die Betain-Aufnahme nicht, wie Na₂SO₄, oder nur in reduziertem Maße. Interessant ist dabei die Wirkung von MgCl₂ und CaCl₂. Mit diesen beiden Salzen ist keine optimale Betain-Aufnahme zu verzeichnen, obwohl Cl⁻ im Tris-Puffer vorliegt. Daher ist davon auszugehen, daß die Betain-Aufnahme in *H. halophilus* ein spezifisches Bedürfnis sowohl für Cl⁻ als auch für Na⁺ aufweist. Dieses Phänomen der Stimulierung des Transports durch Na⁺ und

Cl⁻ findet sich ebenfalls bei verschiedenen Aminosäure- und Betain-Transportern aus Eukaryonten (MUNCK, 1995; YAMAUCHI *et al.*, 1992).

Um die Stimulierung des Betain-Transports durch Cl⁻ unabhängig von der Na⁺-Konzentration zu untersuchen, wurden Zellen in NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, durch Zentrifugation geerntet, und das Sediment wurde in Tris-Puffer mit 1 M NaCl resuspendiert. Danach wurden Betain-Aufnahmestudien wie unter 2.3.5 beschrieben durchgeführt, wobei die Cl⁻-Konzentration im Puffer sukzessive gesteigert wurde. Dabei wurde jedoch die Osmolarität im Tris-Puffer konstant gehalten (entsprechend 1 M NaCl), indem Na₂SO₄ zugegeben wurde. Wie bereits gezeigt wurde, hat Na₂SO₄ keinen stimulierenden Einfluß auf die Betain-Aufnahme in *H. halophilus* und konnte somit optimal als substituierendes Agens eingesetzt werden. Abb. 7 zeigt den zeitlichen Verlauf der Betain-Aufnahme bei verschiedenen Cl⁻-Konzentrationen.

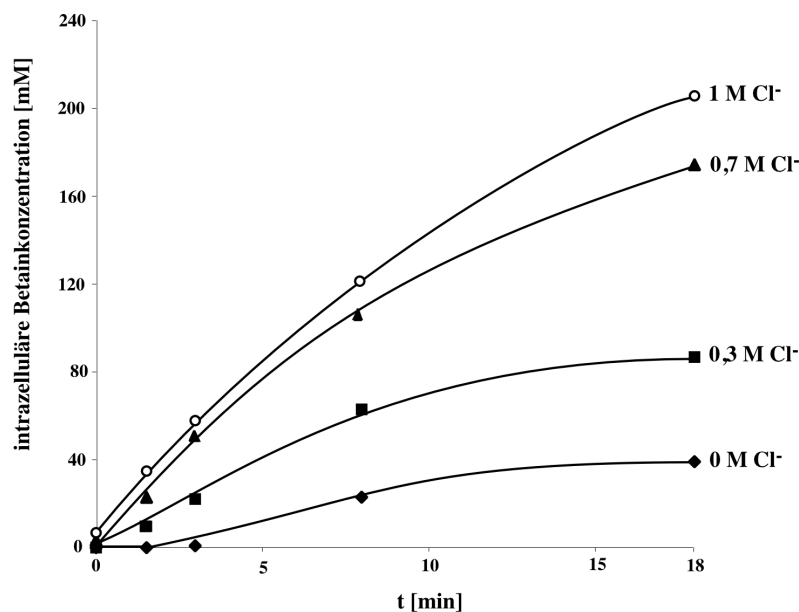


Abb. 7: Die Betain-Aufnahme im isoosmotischen Gleichgewicht ist Cl⁻-abhängig. 100 µl einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert, und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml Tris-Puffer (pH 7,4) gestartet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Osmolarität im Tris-Puffer wurde durch Zugabe von Na₂SO₄ entsprechend 1 M NaCl eingestellt. 0 M Cl⁻ = 0 M NaCl + 0,66 M Na₂SO₄; 0,3 M Cl⁻ = 0,3 M NaCl + 0,46 M Na₂SO₄; 0,7 M Cl⁻ = 0,7 M NaCl + 0,2 M Na₂SO₄; 1 M Cl⁻ = 1 M NaCl. Die Betainkonzentration im Puffer betrug 1 mM, und es wurden 0,5 µCi [¹⁴C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 µM) eingesetzt. Aufgrund der ausreichend hohen endogenen Atmung von *H. halophilus* wurde auf den Zusatz eines Substrats verzichtet. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 50-µl-Aliquots entnommen und die intrazelluläre Betainkonzentration wurde bestimmt (s. 2.3.5).

In Abwesenheit von Cl^- war die Transportrate nur 2,0 nmol Betain/min x mg Protein. Die sukzessive Erhöhung der Cl^- -Konzentration führte zu einer sukzessiven Erhöhung der Transportraten. Bei 0,3 M Cl^- betrug diese 6,0, bei 0,7 M Cl^- 10,1 und bei 1 M Cl^- 10,5 nmol Betain/min x mg Protein. Ab einer Cl^- -Konzentration von 0,7 M wurde ein Plateau erreicht (Abb. 8A), was bemerkenswerterweise der Cl^- -Konzentration entspricht, ab der optimales Wachstum zu verzeichnen ist (ROEBLER und MÜLLER, 1998). Die Aufnahmeraten ließen sich also in Abhängigkeit von der Cl^- -Konzentration maximal um das 5,2-fache stimulieren.

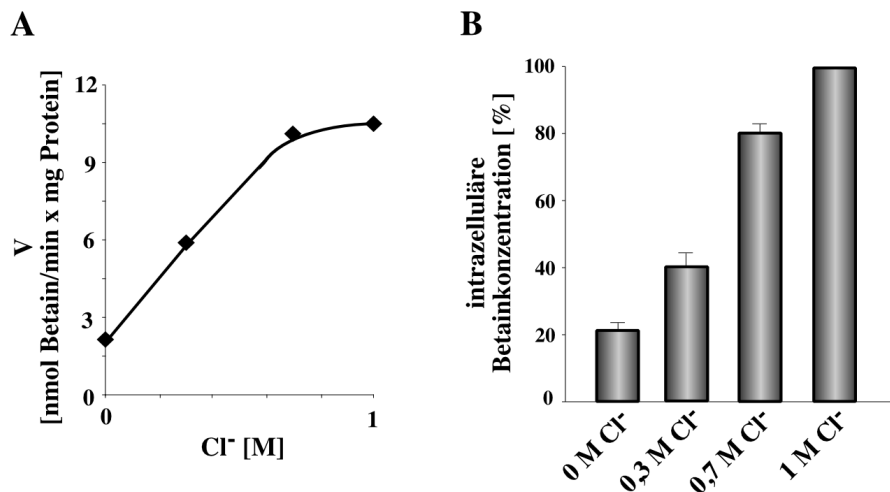


Abb. 8: Die Geschwindigkeit des Transports und die finale Akkumulation von Betain in *H. halophilus* sind Cl^- -abhängig. A. Initiale Aufnahmeraten. Die Daten sind Abb. 7 entnommen. B. finale Betain-Akkumulation. 100 μl einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert, und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml Tris-Puffer (pH 7,4) gestartet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Osmolarität im Tris-Puffer wurde durch Zugabe von Na_2SO_4 entsprechend 1 M NaCl eingestellt. 0 M Cl^- = 0 M NaCl + 0,66 M Na_2SO_4 ; 0,3 M Cl^- = 0,3 M NaCl + 0,46 M Na_2SO_4 ; 0,7 M Cl^- = 0,7 M NaCl + 0,2 M Na_2SO_4 ; 1 M Cl^- = 1 M NaCl. Die Betainkonzentration im Puffer betrug 1 mM, und es wurden 0,5 μCi [^{14}C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μM) eingesetzt. Aufgrund der ausreichend hohen endogenen Atmung von *H. halophilus* wurde auf den Zusatz eines Substrats verzichtet. Nachdem sich das isoosmotische Gleichgewicht der endogenen Atmung eingestellt hatte (75 min nach Versuchsstart), wurden 50- μl -Aliquots entnommen, und die intrazelluläre Betainkonzentration wurde bestimmt (s. 2.3.5). Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus fünf voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Balken geben die Standardabweichung an.

Nicht nur die Transportraten, sondern auch die intrazelluläre Betainkonzentrationen im isoosmotischen Gleichgewicht waren Cl^- -abhängig. In Abwesenheit von Cl^- betrug diese nur 20% der maximalen Akkumulation, während in Gegenwart von 0,3 M Cl^- 40% erreicht wurden (Abb. 8B). Bei einer Cl^- -Konzentration von 0,7 M entsprach die intrazelluläre Betainkonzentration 75% der maximalen Konzentration. Die intrazelluläre Betainkonzentration im isoosmotischen Gleichgewicht ließ sich also in Abhängigkeit der Cl^- -Konzentration maximal um das 4,5-fache stimulieren. Mit diesen Experimenten konnte eindeutig eine Cl^- -Abhängigkeit des Betain-Transports in *H. halophilus* unter isoosmotischen Bedingungen gezeigt werden.

3.2.3 Betain-Transport nach hyperosmotischem Schock

In den vorangegangenen Experimenten wurde der Betain-Transport in *H. halophilus* unter isoosmotischen Bedingungen untersucht. Eine effiziente Osmoregulation erfordert jedoch unbedingt die Möglichkeit, augenblicklich auf eine Erhöhung der extrazellulären Osmolarität zu reagieren, um einen drastischen Wasserverlust für die Zelle zu vermeiden. Um den Einfluß von Cl^- auf den Betain-Transport nach einem hyperosmotischen Schock zu untersuchen, wurden Zellen in NB-Medium in Gegenwart von 0,5 M NaCl angezogen, in der spät-logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, und das Sediment wurde in Tris-Puffer mit 0,5 M NaCl resuspendiert. Danach wurden Betain-Aufnahmestudien wie unter 2.3.5 beschrieben durchgeführt, wobei die NaCl-Konzentration im Tris-Puffer 0,5 M betrug. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Osmolarität des Puffers schlagartig auf eine Osmolarität entsprechend 1 M NaCl erhöht. Der hyperosmotische Schock erfolgte durch Zugabe von 0,5 M NaCl bzw. 1 M Saccharose aus entsprechend konzentrierten Stammlösungen. Wie aus Abb. 9 deutlich wird, reagierte *H. halophilus* auf einen solchen hyperosmotischen Schock in beiden Fällen mit der Akkumulation von Betain. Nach Zugabe von Saccharose war die Betain-Akkumulation allerdings minimal. Wurde dieser Schock jedoch mit NaCl ausgeübt, so erfolgte eine 4-fach höhere Anreicherung von Betain als mit

Saccharose. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, daß sich die Betain-Aufnahme nach einem hyperosmotischen in *H. halophilus* durch NaCl stärker stimulieren läßt als durch Saccharose.

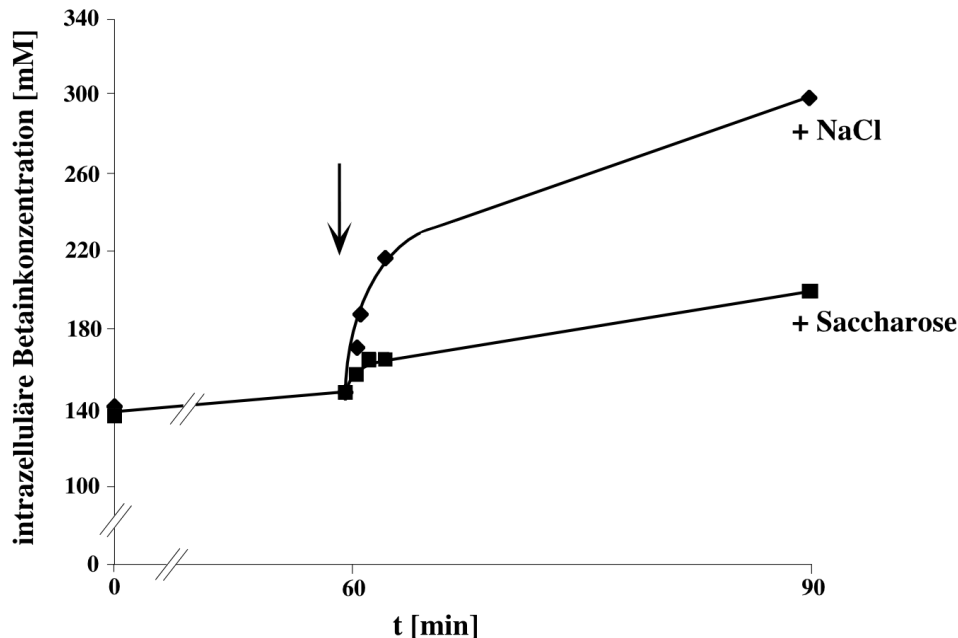


Abb. 9: Betain-Aufnahme in *H. halophilus* nach hyperosmotischem Schock. 100 μ l einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert, und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml Tris-Puffer (pH 7,4), der 0,5 M NaCl enthielt, gestartet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Einstellung des isoosmotischen Gleichgewichts wurde zum angegebenen Zeitpunkt (Pfeil) durch Zugabe von 0,5 M NaCl bzw. 1 M Saccharose ein hyperosmotischer Schock ausgeübt. Die Betainkonzentration im Puffer betrug 1 mM, es wurden 0,5 μ Ci [14 C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μ M) eingesetzt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 50- μ l-Aliquots entnommen, und die intrazelluläre Betainkonzentration wurde bestimmt (s. 2.3.5).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Cl^- einen Einfluß auf diesen Schock-induzierten Betain-Transport hat. Dazu wurden Zellen in NB-Medium in Gegenwart von 0,5 M NaCl angezogen, in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, und das Sediment wurde in Tris-Puffer mit 0,5 M NaCl resuspendiert. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur hatte sich ein isoosmotisches Gleichgewicht eingestellt, die intrazelluläre Betainkonzentration betrug 140 mM. Danach wurde die Osmolarität im Puffer durch Zugabe eines Gemisches aus NaCl und Na_2SO_4 erhöht. Dabei wurde die Cl^- -Konzentration im Gemisch gesteigert, die Osmolarität jedoch durch

entsprechende Zugabe von Na_2SO_4 konstant (entsprechend 1 M NaCl) gehalten. In Abb. 10 ist zu erkennen, daß auch die Schock-induzierte Betain-Aufnahme von *H. halophilus* strikt von der Cl^- -Konzentration abhängig war. Während bei einem Schock ohne Cl^- die Betain-Aufnahme nur in einem vernachlässigbaren Ausmaß stattfand, ließ sich diese bei 1 M Cl^- um das 7-fache steigern. Aus diesen Experimenten wird deutlich, daß der Betain-Transport in *H. halophilus* neben der bereits gezeigten Cl^- -Abhängigkeit unter isoosmotischen Bedingungen auch nach einem hyperosmotischen Schock Cl^- -abhängig ist.

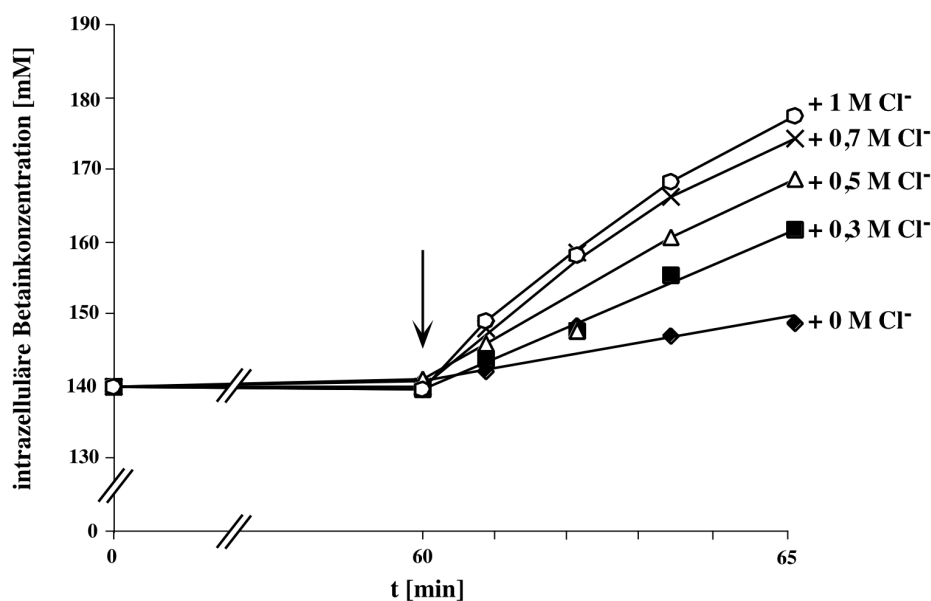


Abb. 10: Chlorid-Abhängigkeit der Betain-Aufnahme nach einem hyperosmotischen Schock. 100 μl einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert, und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml Tris-Puffer (pH 7,4), der 0,5 M NaCl enthielt, gestartet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Einstellung des isoosmotischen Gleichgewichts wurde zum gegebenen Zeitpunkt (Pfeil) durch Zugabe eines Gemischs aus NaCl und Na_2SO_4 ein hyperosmotischer Schock ausgeübt. Die Osmolarität in diesem Gemisch wurde durch entsprechende Zugabe von Na_2SO_4 konstant gehalten. 0 M Cl^- = 0 M NaCl + 0,66 M Na_2SO_4 ; 0,3 M Cl^- = 0,3 M NaCl + 0,46 M Na_2SO_4 ; 0,5 M Cl^- = 0,5 M NaCl + 0,33 M Na_2SO_4 ; 0,7 M Cl^- = 0,7 M NaCl + 0,2 M Na_2SO_4 ; 1 M Cl^- = 1 M NaCl. Die Betainkonzentration im Puffer betrug 1 mM, es wurden 0,5 μCi [^{14}C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μM) eingesetzt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 50- μl -Aliquots entnommen, und die intrazelluläre Betainkonzentration wurde bestimmt (s. 2.3.5).

3.2.4 Charakterisierung des Cl⁻-abhängigen Betain-Transports in *H. halophilus*

In den unter 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß *H. halophilus* ein Cl⁻-abhängiges Transportsystem für das kompatible Solut Betain besitzt. Im Folgenden sollte dieser Transport kinetisch und energetisch detailliert charakterisiert werden.

3.2.4.1 Energetik des Transports

Die für einen aktiven Transport erforderliche Energie kann auf zwei verschiedene Arten zur Verfügung gestellt werden. Ist der Transport direkt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt, spricht man von einem primären Transportvorgang. Wenn jedoch der Transport einer Substanz an den Sym- oder Antiport einer anderen Substanz (z. B. H⁺ oder Na⁺) gekoppelt ist, wobei der über der Membran anliegende Konzentrationsgradient dieser Substanz als Antriebskraft genutzt wird, spricht man von einem sekundären Transportmechanismus. Die Art und Weise der energetischen Kopplung ist eine der grundlegenden Eigenschaften eines Transportvorgangs und sollte daher auch für den Cl⁻-abhängigen Betain-Transport in *H. halophilus* charakterisiert werden. Zur Identifizierung der Triebkraft des Transports kommen Inhibitoren zur Anwendung, die jeweils spezifisch die eine oder andere Triebkraft ausschalten. Für *H. halophilus* wurde gezeigt, daß Protonophore wie 4,5,4',5'-Tetrachlorsalicylanlid (TCS) oder SF6847 $\Delta\psi$ effektiv dissipieren und daß der ATP-Synthase-Inhibitor DCCD die ATP-Synthese zum Erliegen bringt (s. 3.1, Abb. 2 und 3). Abb. 11 zeigt, daß unter Standardbedingungen der bereits beschriebene Cl⁻-abhängige Betain-Transport stattfindet. Gibt man jedoch 10 μ M TCS bzw. 20 μ M SF6847 hinzu, stoppt die weitere Aufnahme des Betains sofort und die intrazelluläre Betainkonzentration verbleibt für den Rest des Experiments auf dem gleichen Niveau. Dies ist ein erster Hinweis dafür, daß die Betain-Aufnahme in *H. halophilus* primärer Natur ist, da sekundäre Transporter meist reversibel sind, und man in diesem Falle erwarten müßte, daß das Betain wieder aus der Zelle herausströmt und sich ein Gleichgewicht auf dem Niveau der Ausgangsbedingungen einstellt. Die

Vermutung, daß der Cl⁻-abhängige Betain-Transport in *H. halophilus* primärer Natur, d. h. direkt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist, wird durch weitere Hemmstoffstudien untermauert. Wurden die Zellen vor Beginn des Versuchs für 30 min mit 200 µM DCCD bei Raumtemperatur inkubiert, war im Folgenden keinerlei Transport-Aktivität zu beobachten (Abb. 11). Da in Vorversuchen bereits gezeigt wurde, daß DCCD nur den ATP-Gehalt, nicht aber $\Delta\psi$ dissipiert, kann vermutet werden, daß ATP-Hydrolyse die Triebkraft des Betain-Transports ist.

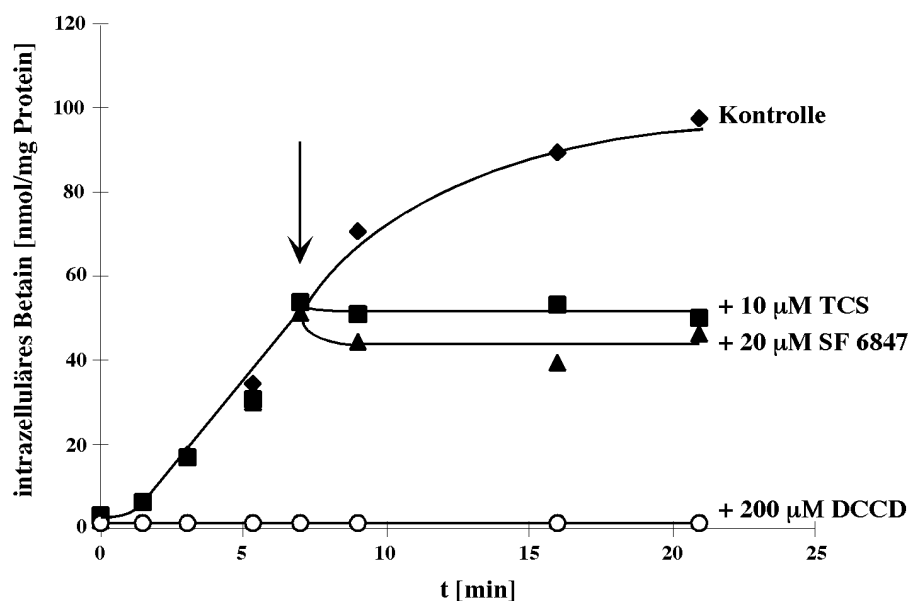


Abb. 11: Einfluß von Hemmstoffen auf die Cl⁻-abhängige Betain-Aufnahme in *H. halophilus*. 100 µl einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml Tris-Puffer, der 1 M NaCl enthielt, gestartet. Zum Zeitpunkt der durch den Pfeil markiert ist, wurde 10 µM TCS bzw. 20 µM SF6847 zugegeben. Zur Untersuchung der Wirkung von DCCD wurden Zellen vor Versuchsbeginn 30 min mit 200 µM DCCD bei Raumtemperatur inkubiert. Die Betainkonzentration im Puffer betrug 1 mM, es wurden 0,5 µCi [¹⁴C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 µM) eingesetzt.

3.2.4.2 Untersuchungen zur Spezifität des Betain-Transports

Aus anderen Prokaryonten ist bekannt, daß Betain-Transporter häufig die Eigenschaft besitzen, neben Betain auch andere kompatible Solute oder deren Vorstufen wie Prolin oder Cholin zu transportieren, wenn auch meist mit niedrigeren Affinitäten. So transportiert der primäre Transporter OpuC aus *B. subtilis* neben Betain u.a. auch Ectoin, Carnitin und Cholin (KEMPF und BREMER,

1998). Cholin und Prolin in Konzentrationen von 40 mM, was einem 400fachen Überschuß gegenüber Betain entspricht, inhibierten die Betain-Aufnahme nicht. Daher liegt der Schluß nahe, daß *H. halophilus* über (einen) hochspezifische(n) Betain-Transporter verfügt.

3.2.4.3 Kinetische Studien zum Cl⁻-abhängigen Betain-Transport

Im Folgenden wurde die Kinetik des Betain-Transports untersucht. Dazu wurden Zellen in NB-Medium in Gegenwart von 1 M NaCl angezogen, in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, und das Sediment wurde in Tris-Puffer mit 1 M NaCl resuspendiert. Danach wurden Betain-Aufnahmestudien durchgeführt, wobei die NaCl-Konzentration im Tris-Puffer 1 M betrug. Abb. 12A zeigt, daß die Betain-Aufnahme in *H. halophilus* einer klaren Michaelis-Menten-Kinetik folgt, und aus einer Auftragung nach Lineweaver-Burk lassen sich K_m und V_{max} ermitteln (Abb. 12B). Als Mittelwert aus 5 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten ergibt sich für K_m $72,8 \pm 10,4 \mu\text{M}$ und für V_{max} $14,0 \pm 0,2 \text{ nmol/min} \times \text{mg Protein}$. *H. halophilus* transportiert Betain also mit einer relativ geringen Affinität und einer relativ geringen Geschwindigkeit.

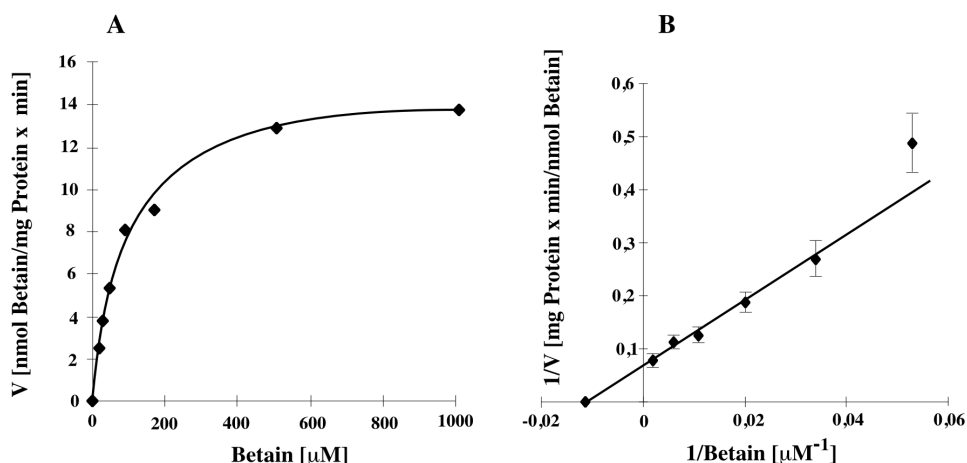


Abb. 12: Kinetische Parameter der Cl⁻-abhängigen Betain-Aufnahme in *H. halophilus*. Die initialen Raten der Betain-Aufnahme wurden in Zellsuspensionen von *H. halophilus* (1,2-1,8 mg Protein/ml) bestimmt. Der Testpuffer enthielt 1 M NaCl sowie 9-1009 μM Betain. Es wurden 0,5 μCi [¹⁴C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μM) eingesetzt. A. Michaelis-Menten-Diagramm; B. Lineweaver-Burk-Diagramm.

Eine weitere Auftragung der in den beschriebenen Experimenten erhaltenen Daten nach Eadie-Hofstee gibt Hinweise auf die Anzahl unterschiedlicher Transporter, die die untersuchte Substanz transportieren, zumindest dann, wenn diese die Substanz mit verschiedenen Affinitäten transportieren. Sind mehr als ein Transporter an dem Transport beteiligt, so ergeben sich in einem Eadie-Hofstee-Diagramm zwei oder mehr Geraden mit unterschiedlichen Steigungen. Wie aus Abb. 13 deutlich wird, ergibt sich für den Betain-Transport in *H. halophilus* in einer solchen Auftragung jedoch nur eine Gerade, woraus sich schließen läßt, daß in *H. halophilus* nur ein Transporter für Betain zur Verfügung steht. Sollten allerdings zwei oder mehr Betain-Transporter in *H. halophilus* vorhanden sein, die eine vergleichbare Affinität für Betain aufweisen, so ließen sich diese mit diesem Verfahren nicht identifizieren.

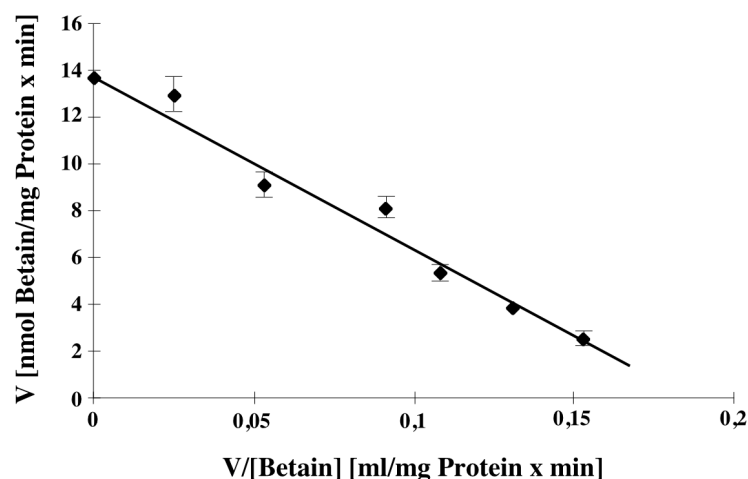


Abb. 13: Eadie-Hofstee-Diagramm der Cl^- -abhängigen Betain-Aufnahme in *H. halophilus*. Die initialen Raten der Betain-Aufnahme wurden in Zellsuspensionen von *H. halophilus* (1,2-1,8 mg Protein/ml) bestimmt. Der Testpuffer enthielt 1 M NaCl sowie 9-1009 μM Betain. Es wurden 0,5 μCi [^{14}C]-markiertes Betain (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol; Endkonzentration: 9 μM) eingesetzt.

3.2.5 Versuche zur Klonierung der für den Betain-Transporter kodierenden Gene

In den vorangegangenen Experimenten wurde ein für Prokaryonten einzigartiger, Cl^- -abhängiger Betain-Transport nachgewiesen. Es ist daher von elementarem Interesse, detaillierte Studien zur Struktur und Funktion des entsprechenden Transporters durchzuführen. Da die Isolation des Transporters aus

H. halophilus mittels einer Proteinreinigung aufgrund methodischer Probleme ein nahezu unmögliches Unterfangen darstellt, wurde der Weg gewählt, über die Transportergene zum Protein zu gelangen. In einem ersten Schritt sollte daher versucht werden, die Gene, welche für den Betain-Transporter in *H. halophilus* kodieren, durch funktionelle Komplementation einer Mutante zu klonieren. Die dafür verwendete Mutante war *E. coli* MKH13, die freundlicherweise von Prof. E. Bremer zur Verfügung gestellt worden war. Dieser Stamm ist ein Derivat von *E. coli* MC4100, dem durch Deletionen in den Genen *proP* und *proU* die Fähigkeit genommen wurde, Betain aufzunehmen (HAARDT *et al.*, 1995). Ohne die Produkte dieser beiden Gene ist die Osmoregulation in *E. coli* schwerwiegend gestört, und der Organismus ist nur noch sehr eingeschränkt in der Lage, in mineralischem Medium (MAY *et al.*, 1986) mit 0,8 M NaCl zu wachsen, auch dann, wenn das Medium mit 1 mM Betain supplementiert ist.

Für die angestrebten Komplementationsstudien war es zunächst notwendig, eine Genbank von chromosomaler DNA von *H. halophilus* zu erstellen. Hierzu wurde chromosomale DNA nach ERRINGTON (1984) isoliert (s. 2.4.2.1) und für 30 min einer Restriktion mit *MboI* unterzogen. Durch die kurze Inkubationszeit erfolgte die Restriktion nicht vollständig, sondern nur partiell. Die DNA-Fragmente des gesamten Restriktionsansatzes wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, und die Fragmente, die größer als 3 kBp waren, wurden durch eine „QiaexII“-Reinigung isoliert. Die Größe von 3 kBp wurde aufgrund der ermittelten Daten (s. 3.2.3.1) unter der Annahme gewählt, daß es sich bei dem Betain-Transporter aus *H. halophilus* um einen primären Transporter handelt und die Gene für primäre Transporter in anderen Prokaryonten meist in Operonen vorliegen, die 3 kBp oder weniger umfassen (KEMPF und BREMER, 1998). Die so erhaltene, fragmentierte chromosomale DNA aus *H. halophilus* wurde anschließend in pUC18 ligiert, der zuvor mit *BamHI* linearisiert worden war. Die Plasmide wurden dann in *E. coli* DH5 α transformiert. Jeweils 10 Transformanden wurden in 100 μ l LB-Medium in einem Reaktionsraum einer Mikrotiterplatte resuspendiert, es wurde jeweils mit 100 μ l Glycerin aufgefüllt, und die Mikrotiterplatten wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren. Auf diese

Weise wurden insgesamt 5807 Transformanden erhalten. Stichprobenartig wurden insgesamt 60 dieser Transformanden auf die Größe des integrierten DNA-Fragments untersucht. Die durchschnittliche Fragmentgröße war 4415 Bp und 56% aller Transformanden hatten ein Fragment von 3 kBp oder mehr. 43% der Transformanden hatten ein kleineres Insert und der Anteil der Religanden ohne Insert betrug 1%. Daraus ergibt sich für diese Genbank unter der Annahme, daß das Genom von *H. halophilus* annähernd so groß ist wie das von *B. subtilis* (4,2 x 10⁶ Bp, KUNST *et al.* [1997]) nach:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln\left(1 - \frac{F}{G}\right)}$$

N = Anzahl der Transformanden

P = Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein jedes beliebigen Genomabschnitts

F = durchschnittliche Größe der integrierten Fragmente

G = Größe des gesamten Genoms

eine Wahrscheinlichkeit von 99,8%, daß jeder Abschnitt des Genoms von *H. halophilus* mindestens einmal kloniert worden ist.

Im nächsten Schritt wurde *E. coli* MKH13 mit der Genbank transformiert. Danach wurden Aliquots der Transformationsansätze auf MMA-Platten mit Spectinomycin (100 µg/ml), die entweder kein NaCl und kein Betain, 0,8 M NaCl und kein Betain oder 0,8 M NaCl und 1 mM Betain enthielten, ausplattiert. Auf den Kontrollplatten ohne NaCl wuchsen in allen Fällen zahlreiche Transformanden, auf den MMA-Platten mit 0,8 M NaCl ohne Zusatz von Betain zeigten sich wie erwartet keine Kolonien. Auf den Platten, die sowohl NaCl als auch Betain enthielten, sollten jene *E. coli* MKH13-Zellen in der Lage sein zu wachsen, die durch Komplementation mit den entsprechenden Genen aus *H. halophilus* die Fähigkeit zur Aufnahme von Betain wiedererlangt hätten. Trotz

zahlreicher Wiederholungen dieser Versuche wurde in keinem Fall eine Komplementation beobachtet.

3.2.6 Untersuchungen zur Substitution von Cl⁻ durch compatible Solute

Die beschriebenen Experimente belegen eindeutig, daß die Akkumulation von Betain in *H. halophilus* Cl⁻-abhängig ist. Daran anschließend stellt sich die Frage, ob sich die Cl⁻-Abhängigkeit des Wachstum von *H. halophilus* aufheben läßt, wenn zum Betain alternative compatible Solute oder deren Vorläufer dem Medium in hohen Konzentrationen zugegeben werden. Um dies zu überprüfen, wurden Wachstumsversuche in 15-ml-Kulturröhrchen in 5 ml NB-Medium durchgeführt, dem die getesteten Substanzen in einer Konzentration von 1 M zugefügt wurden. Wenn möglich, wurden die Komponenten als Natriumsalze eingesetzt, war dies aber aufgrund der Natur des eingesetzten Substituenten nicht möglich, wie bei den meisten Aminosäuren, wurde 200 mM NaNO₃ zusätzlich zugegeben, um das Na⁺-Bedürfnis von *H. halophilus* zu befriedigen. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß Cl⁻ von Glukonat, α-Ketoglutarat, Glukose, Fruktose, sowie sämtlichen natürlichen Aminosäuren bis auf Glutamat nicht substituiert werden kann. Bemerkenswerterweise zeigte sich jedoch in NB-Medium mit 1 M Na-Glutamat, Na₂-Succinat bzw. Na₂-Fumarat Wachstum, obwohl kein Cl⁻ im Medium vorlag, was die oben formulierte These zur Substitution des Betains als dominantes kompatibles Solut stützt. Dieser Effekt der Substitution von Cl⁻ war nur dann zu beobachten, wenn die entsprechende Substanzen in hohen Konzentrationen eingesetzt wurden. So erfolgte mit Na-Glutamat erst ab einer Konzentration von 0,8 M Wachstum. Wie aus Abb. 14 deutlich wird, waren die Länge der lag-Phase und die End-OD bei Wachstum mit 1 M Na-Glutamat unverändert im Vergleich zu 1 M NaCl. Allerdings betrug die Wachstumsrate mit 0,28 h⁻¹ nur ca. 53% der optimalen Wachstumsrate.

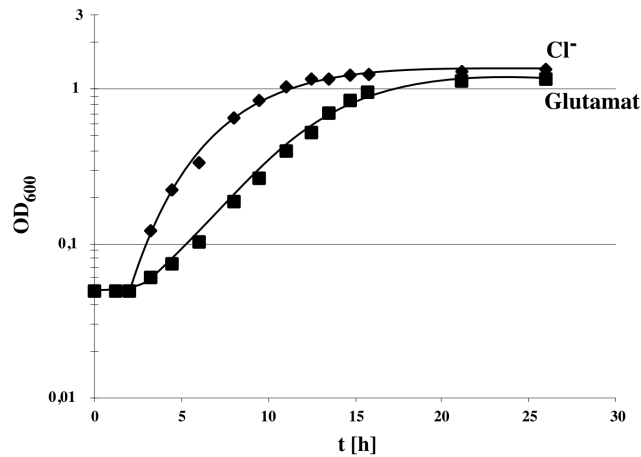


Abb. 14: Substitution von Cl⁻ durch Glutamat. 5 ml NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M Na-Glutamat wurden aus einer Vorkultur 2%ig angeimpft, und das Wachstum wurde direkt im Reagenzglas anhand der optischen Dichte (OD₆₀₀) verfolgt.

Um diesen Befund weiter zu untermauern, sollte untersucht werden, ob die Aufnahme der oben identifizierten Komponenten Cl⁻-unabhängig erfolgt. Hierfür wurden exemplarisch Aufnahmestudien mit [¹⁴C]-markiertem Glutamat, analog zu den bereits beschriebenen Studien zur Aufnahme von Betain durchgeführt. Im Gegensatz zur Aufnahme von Betain wurde Glutamat Cl⁻-unabhängig aufgenommen (Abb. 15). Aus dem Diagramm wird deutlich, daß die initialen Raten der Glutamat-Aufnahme in Cl⁻- oder SO₄²⁻-haltigem Puffer identisch waren. In beiden Fällen betragen die Transportraten 14,6 nmol/min x mg Protein.

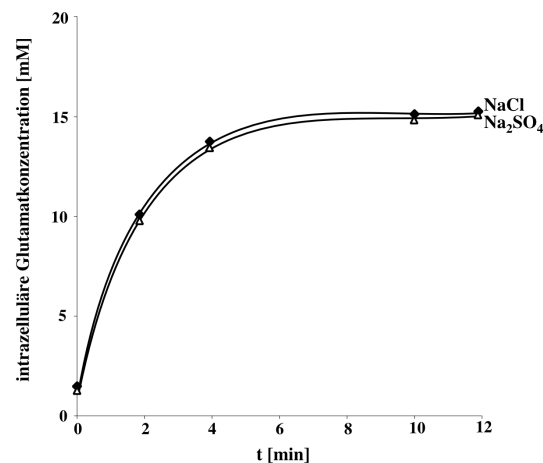


Abb. 15: Glutamat-Aufnahme in *H. halophilus*. 100 μ l einer Zellsuspension von *H. halophilus* (12-18 mg Protein/ml) wurden abzentrifugiert, und der Versuch wurde durch Resuspendierung in 1 ml Tris-Puffer (pH 7,4) gestartet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Glutamatkonzentration im Puffer betrug 1 mM, und es wurden 0,5 μ Ci [¹⁴C]-markiertes Glutamat eingesetzt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden 50- μ l-Aliquots entnommen und die intrazelluläre Glutamatkonzentration wurde bestimmt wie unter 2.3.5 beschrieben.

3.3 Die Cl⁻-abhängige Motilität von *H. halophilus*

H. halophilus ist ein durch ein Flagellum bewegliches Bakterium. Die Rotation des bakteriellen Flagellums wird durch einen Ionenstrom angetrieben, wobei das Kopplungsign H⁺, aber auch Na⁺ sein kann. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Cl⁻ für die Beweglichkeit von *H. halophilus* notwendig ist.

3.3.1 Die chemotaktische Motilität von *H. halophilus* ist Cl⁻-abhängig

In einem ersten Schritt sollte zunächst untersucht werden, ob Cl⁻ einen Effekt auf die Beweglichkeit von *H. halophilus* hat. Zu diesem Zweck wurden Weichagarplatten mit 0,3% Agar hergestellt; diese enthielten 1 M NaCl, 1 M NaBr oder 1 M NaNO₃ bzw. 0,66 M Na₂SO₄. Kolonien von *H. halophilus*, die auf NB-Medium mit 1 M NaCl gewachsen waren, wurden mit sterilen Zahnstochern parallel auf jeweils eine dieser Weichagarplatten überführt, und die Platten wurden bei 30°C in einer feuchten Kammer inkubiert. *H. halophilus* zeigte eine eindeutige Motilität, die sich an der kreisförmigen Trübung des Agars rund um die ursprünglich aufgesetzten Kolonien erkennen läßt (Abb. 16). Die Geschwindigkeit, mit der sich die Zellen ausbreiteten, war mit 0,02 cm/h allerdings recht gering. Es ist zu betonen, daß die Kulturen auf allen Medien wuchsen, jedoch war eine Beweglichkeit ausschließlich in Gegenwart von NaCl zu beobachten.

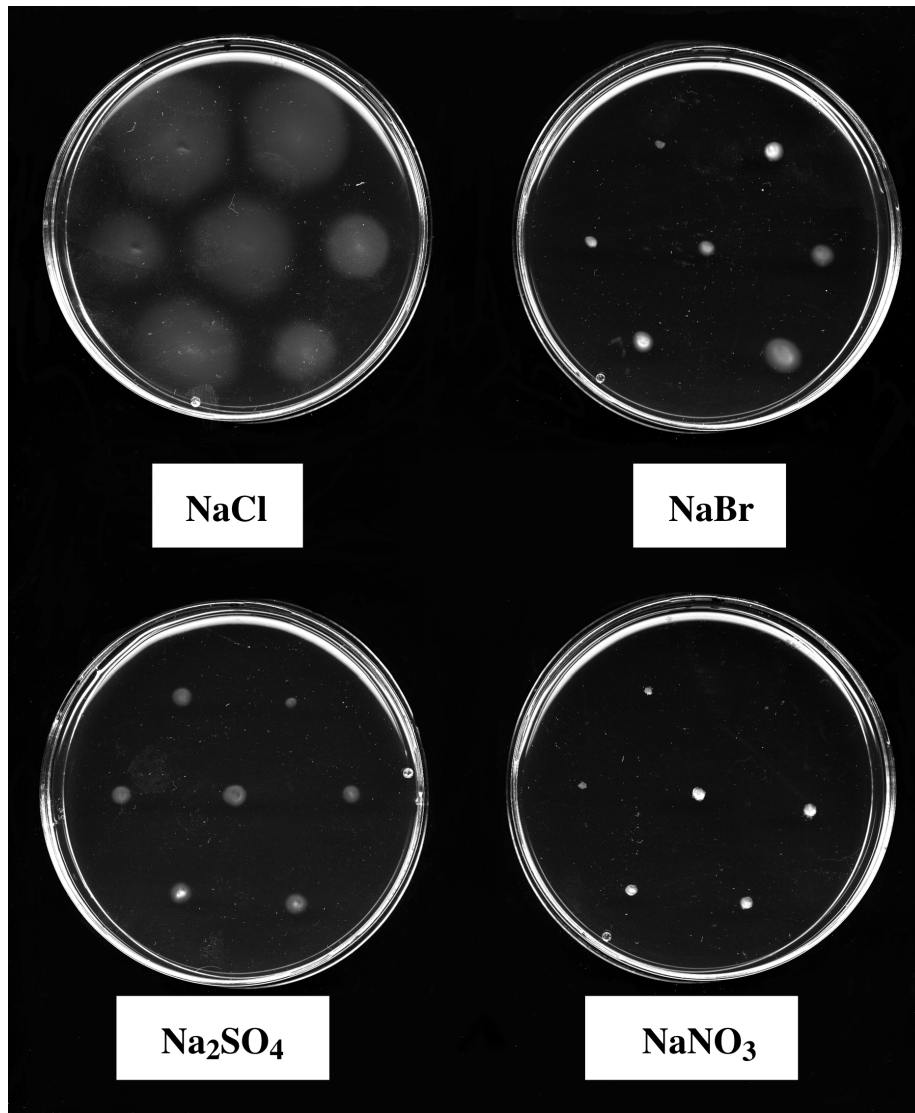


Abb. 16: Die Cl⁻-abhängige Beweglichkeit von *H. halophilus*. Kolonien von *H. halophilus* wurden parallel auf die vier Platten aufgebracht, und die Platten wurden bei 30°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Foto zeigt die Platten nach einer Inkubation von 48 h. Die gezeigten Weichagarplatten enthielten NB-Medium mit 1 M NaCl, 1 M NaBr, 1 M NaNO₃, bzw. 0,66 M Na₂SO₄.

Um die Beweglichkeit von *H. halophilus* auf Weichagarplatten zu quantifizieren, wurden Experimente durchgeführt, in denen die Cl⁻-Konzentration variiert, die Salzkonzentration aber durch entsprechende Zugabe von NaNO₃ konstant bei 1 M gehalten wurde. Durch diese Vorgehensweise ließen sich gegebenenfalls auftretende Effekte der Osmolarität oder der Na⁺-Konzentration ausschließen. Abb. 17 zeigt, daß die chemotaktische Motilität direkt von der Cl⁻-Konzentration auf den Platten abhängig war. Während in Abwesenheit von Cl⁻ keine Beweglichkeit zu verzeichnen war, stieg diese mit zunehmender Cl⁻

Konzentration stetig an und erreichte ab 0,8 M Cl^- ein Optimum, was der optimalen Cl^- -Konzentration für das Wachstum von *H. halophilus* entspricht.

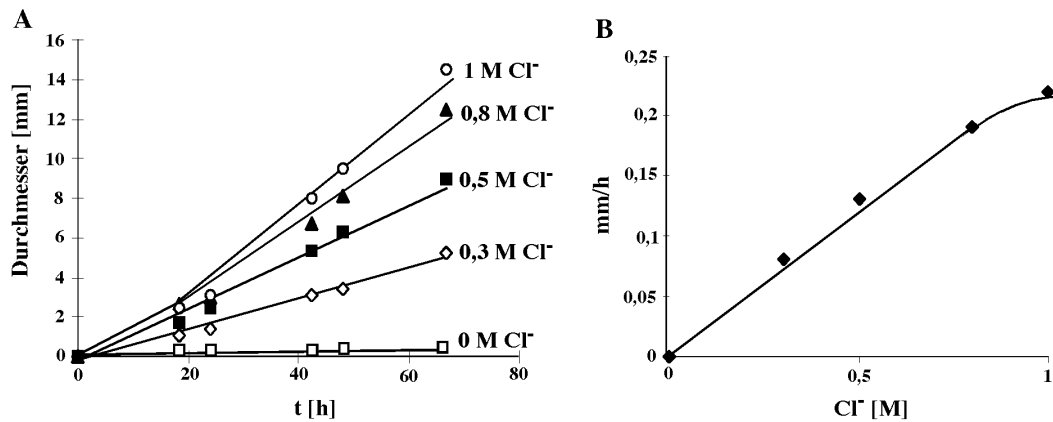


Abb. 17: Quantifizierung der Cl^- -abhängigen chemotaktischen Motilität von *H. halophilus*. Kolonien von *H. halophilus* wurden parallel auf Platten mit 1 M NaNO_3 (□), 0,3 M NaCl + 0,7 M NaNO_3 (◇), 0,5 M NaCl + 0,5 M NaNO_3 (■), 0,8 M NaCl + 0,2 M NaNO_3 (▲) oder 1 M Cl^- (○) aufgebracht. Die Platten wurden bei 30°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde der Durchmesser des chemotaktischen Hofes gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (A). Abb. 16B zeigt die Schwimmgeschwindigkeit als Funktion der Cl^- -Konzentration.

3.3.2 Cl^- ist nicht am Antrieb des Flagellums beteiligt

Die Cl^- -Abhängigkeit der Beweglichkeit könnte eine Beteiligung von Cl^- oder $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Cl}^-}$ am Antrieb des Flagellums reflektieren. Um dies zu überprüfen, wurde der Effekt von Cl^- auf die Beweglichkeit der Zellen in flüssigen Medien lichtmikroskopisch untersucht. In NO_3^- -haltigem Medium gezogene Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt des Wachstums Beweglichkeit. Dieser Kultur wurde dann NaCl aus einer entsprechenden Stammlösung zu einer Endkonzentration von 1 M zugegeben, und anschließend wurden Proben aus dieser Kultur mikroskopiert. Wäre Cl^- direkt am Antrieb des Flagellums beteiligt, hätte man unmittelbar nach Zugabe oder nach kurzzeitiger Inkubation mit NaCl eine Beweglichkeit der Zellen erwartet. Dies war jedoch nicht der Fall, die Zellen verharrten in ihrer Unbeweglichkeit, und erst nach einer Inkubation von 3-5 h in Cl^- -haltigem Medium war wieder Motilität zu beobachten.

3.3.3 Nachweis der Flagellen von *H. halophilus* durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Nachdem in den oben beschriebenen Experimenten eine direkte Beteiligung von Cl^- am Antrieb des Flagellums ausgeschlossen werden konnte, sollte in den folgenden Untersuchungen festgestellt werden, ob Cl^- einen Einfluß auf die Morphologie, insbesondere die Begeißelung von *H. halophilus* hat. Zu diesem Zweck wurden von Prof. G. Wanner vom Institut für Botanik der LMU München freundlicherweise rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaCl bzw. 1 M NaNO_3 angezogen, die Zellen wurden wie unter 2.7 beschrieben fixiert, und die Proben wurden im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Abb. 18 zeigt typische Zellen von *H. halophilus*, die entweder in NB-Medium mit 1 M NaCl (A) oder in NB-Medium mit 1 M NaNO_3 (B) angezogen worden waren. Es wird deutlich, daß die Zellen in NO_3^- -haltigem Medium zur Aggregatbildung neigten und die einzelnen Zellen im Vergleich leicht angeschwollen waren. Entscheidend war jedoch der Befund, daß keine der Zellen, die in NO_3^- -haltigem Medium gewachsen waren, ein Flagellum besaß, während die in Cl^- -haltigem Medium gezogenen Zellen Flagellen aufwiesen (Abb. 18). Die von den NO_3^- -gezogenen Zellen ausgehenden fadenartigen Strukturen waren keine Flagellen. Sie waren unregelmäßiger geformt, deutlich dicker (40-60 nm im Vergleich zu 25 nm für die Flagellen) und liefen am Ende spitz zu. Diese fadenartigen Strukturen sind wahrscheinlich auf eine verstärkte Schleimbildung von *H. halophilus* in der Abwesenheit von Cl^- zurückzuführen. Diese verstärkte Schleimbildung ist auch die Ursache für die Neigung zur Aggregation der Zellen in Abwesenheit von Cl^- . Die Ursache für die beobachtete Cl^- -Abhängigkeit der Beweglichkeit von *H. halophilus* ist folglich, daß Zellen, die in der Abwesenheit von Cl^- gewachsen sind, kein Flagellum besitzen. Die Ergebnisse dieser rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen eindeutig, daß die Synthese funktionsfähiger Flagellen in *H. halophilus* Cl^- abhängig ist.

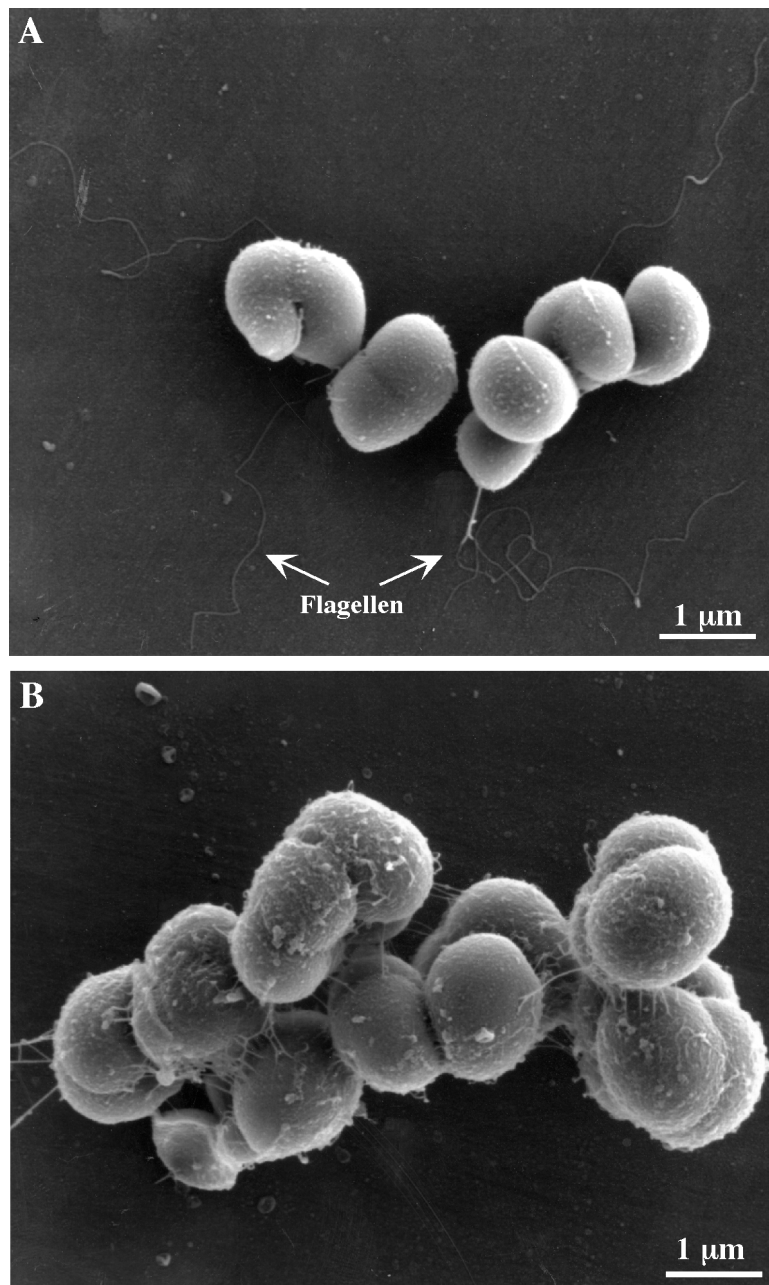


Abb. 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *H. halophilus*. *H. halophilus* wurde in NB-Medium mit 1 M NaCl (A) bzw. 1 M NaNO₃ (B) angezogen, die Zellen wurden in 2,5% Glutaraldehyd fixiert, und diese Präparate wurden im Rasterelektronenmikroskop untersucht (s. 2.7). Die Pfeile weisen auf die Cl⁻-abhängig gebildeten Flagellen hin, welche in Abb. 17B nicht zu beobachten sind (Aufnahmen: G. Wanner).

3.3.4 Reinigung des Flagellins und Generierung eines spezifischen Antiserums gegen das Flagellin von *H. halophilus*

Die Cl⁻-Abhängigkeit der Flagellenbildung in *H. halophilus* sollte durch immunologische Studien auf Proteinebene untersucht werden. In einem ersten Schritt war es daher notwendig, ein gegen das Flagellin von *H. halophilus*

gerichtetes spezifisches Antiserum zu generieren. Um ein spezifisches Antiserum gegen das Flagellin von *H. halophilus* zu erhalten, wurde zunächst das Flagellin von *H. halophilus* gereinigt und anschließend zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Zur Reinigung des Flagellins wurde *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, und die Flagellen wurden vom Zellkörper abgeschert. Anschließend wurden ganze Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt, und der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation unterzogen. Das Sediment wurde in 1 ml Tris-Puffer mit 1 M NaCl resuspendiert. Wurde ein Aliquot einer solchen Flagellenpräparation in der SDS-PAGE analysiert, zeigte sich hauptsächlich ein Polypeptid mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 47 kDa (Abb. 19, Spur 1). Dieses Protein wurde durch Elektroelution aus dem Gel isoliert. Eine aminoterminal Sequenzierung dieses Polypeptids ergab die Sequenz: MRINHNI AALNT, welche zu der aminoterminalen Sequenz des Flagellins aus *B. subtilis* 100% identisch ist. Dadurch ist eindeutig gezeigt, daß es sich bei dem 47 kDa-Protein um das Flagellin von *H. halophilus* handelt.

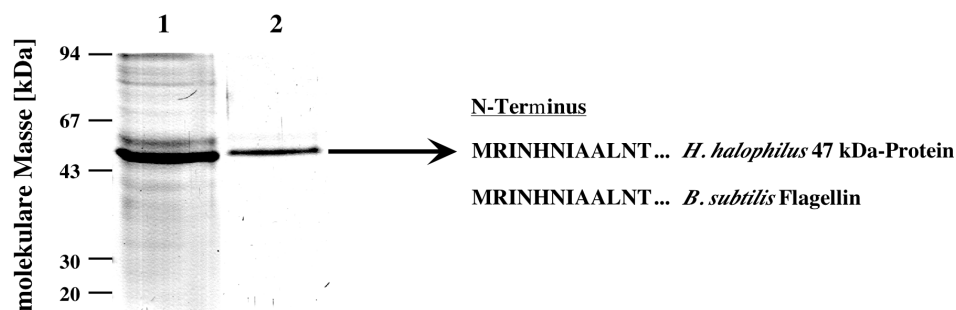


Abb. 19: Reinigung des Flagellins von *H. halophilus*. SDS-PAGE einer Flagellenpräparation (s. 2.6) vor (Spur 1) und nach einer Elektroelution (Spur 2). Die N-terminale Sequenz des gereinigten Proteins wurde bestimmt. Diese ist in den ersten 12 Aminosäuren 100% identisch mit dem Flagellin aus *B. subtilis*.

Das gereinigte Flagellin wurde lyophilisiert, und 300 μ g des gereinigten Flagellins wurden zur Immunisierung eingesetzt. Nach Erhalt des Antiserums sollte zunächst die Spezifität überprüft werden. Dazu wurde *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, die Zellen wurden in der spätlogarithmischen

Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, und anschließend wurde ein Rohextrakt hergestellt. Nur ein Polypeptid des Rohextrakts reagierte mit dem Antiserum, wobei die apparente molekulare Masse von 47 kDa der des Flagellins entsprach (Abb. 20). Diese Ergebnisse belegen, daß das generierte Antiserum eine hohe Spezifität für das Flagellin von *H. halophilus* besitzt und somit für die weiteren Untersuchungen eingesetzt werden konnte.

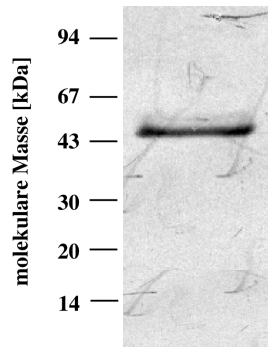


Abb. 20: Spezifität des anti-Flagellin Antiserums. Zellen wurden in NB-Medium in Gegenwart von 1 M NaCl angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Durch Resuspendierung in Denaturierungspuffer und 10 min Kochen wurde ein Rohextrakt hergestellt, und anschließend wurden 25 μg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Western-Blot mit 7 μl Antiserum.

3.3.5 Die Flagellinproduktion in *H. halophilus* ist Cl^- -abhängig

Nachdem in den unter 3.3.3 beschriebenen Experimenten gezeigt wurde, daß Zellen von *H. halophilus*, die in Abwesenheit von Cl^- gewachsen waren, keine Flagellen besitzen, stellte sich die Frage nach der Ursache für diesen Befund. Grundsätzlich kamen dafür mehrere Möglichkeiten in Frage. Einerseits wäre es denkbar, daß die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Flagellinmolekülen in 1 M NaNO_3 gestört ist, und die Flagellen folglich nicht korrekt assembliert werden können. Die Cl^- -Abhängigkeit der Flagellenbildung wäre in diesem Fall sekundär und unspezifisch. Andererseits bestand aber auch die Möglichkeit, daß die Synthese von Proteinen des Flagellenapparats einschließlich des Flagellins spezifisch durch Cl^- induziert wird. Diese beiden Möglichkeiten sollten durch Western-Blot-Analysen mit dem gegen das Flagellin von *H. halophilus* spezifischen Antiserum überprüft werden. Dazu wurde *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M NaNO_3 angezogen, und die Zellen wurden in der

spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet. Es wurden Rohextrakte hergestellt, und diese wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot konnte in den Cl⁻-gezogenen Zellen eindeutig das Flagellin nachgewiesen werden, während es in den NO₃⁻-gezogenen Zellen nicht nachweisbar war (Abb. 21). Diese Ergebnisse zeigen, daß zur Synthese von Flagellin in *H. halophilus* die Gegenwart von Cl⁻ im Medium essentiell ist, die Flagellinbildung also Cl⁻-abhängig ist.

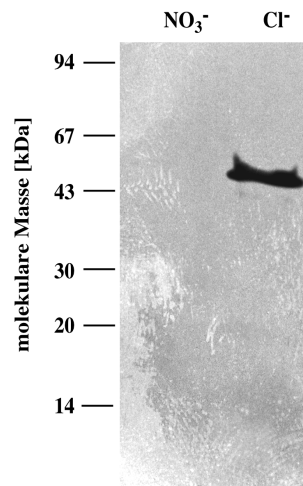


Abb. 21: Die Synthese von Flagellin in *H. halophilus* ist Cl⁻-abhängig. Zellen wurden in NB-Medium in Gegenwart von 1 M NaNO₃ oder 1 M NaCl angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Durch Resuspendierung in Denaturierungspuffer und 10 min Kochen wurde ein Rohextrakt hergestellt, und anschließend wurden 25 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Western-Blot mit 7 µl anti-Flagellin Antiserum.

Zur detaillierten Charakterisierung der Cl⁻-abhängigen Flagellinproduktion sollte diese im Verlauf eines Wachstumsversuchs in NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M NaNO₃ untersucht werden. Hierzu wurden Zellen von *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaNO₃ vorkultiviert, d. h. die Zellen aus der Vorkultur besaßen kein Flagellin und waren unbeweglich. Aus dieser Vorkultur wurde NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M NaNO₃ 10%ig angeimpft, das Wachstum der Zellen wurde anhand der optischen Dichte verfolgt, zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Beweglichkeit der Zellen im Lichtmikroskop beobachtet bzw. die Flagellinmenge im Western-Blot überprüft (Abb. 22). In den Kulturen, die in Gegenwart von NaNO₃ wuchsen, konnte im gesamten Verlauf des Wachstums weder Beweglichkeit noch Flagellin nachgewiesen werden, was im

Einklang mit den bisherigen Ergebnissen steht. In Cl^- -haltigem Medium dagegen war bereits 3 h nach dem Transfer der Zellen in frisches Medium Flagellin nachzuweisen (1). In lichtmikroskopischen Untersuchungen waren zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keine beweglichen Zellen zu beobachten, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die Zellen zwar Flagellin synthetisieren, jedoch noch keine funktionellen Flagellen assembliert haben und dementsprechend auch noch keine Beweglichkeit zeigen. Nach 5 h Inkubation in Cl^- -haltigem Medium war die Flagellinmenge erhöht, und im lichtmikroskopischen Bild waren diese Zellen auch deutlich beweglich (2). Das gleiche Bild ergab sich nach 14 h, zu Beginn der stationären Wachstumsphase (3). In der stationären Wachstumsphase war die Flagellinkonzentration verringert und in lichtmikroskopischen Untersuchungen waren nur vereinzelte, schwach bewegliche Zellen zu beobachten (4). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegen eindeutig, daß die Synthese von Flagellin in *H. halophilus* Cl^- -abhängig ist und unmittelbar nach dem Transfer in frisches Cl^- -haltiges Medium stimuliert wird.

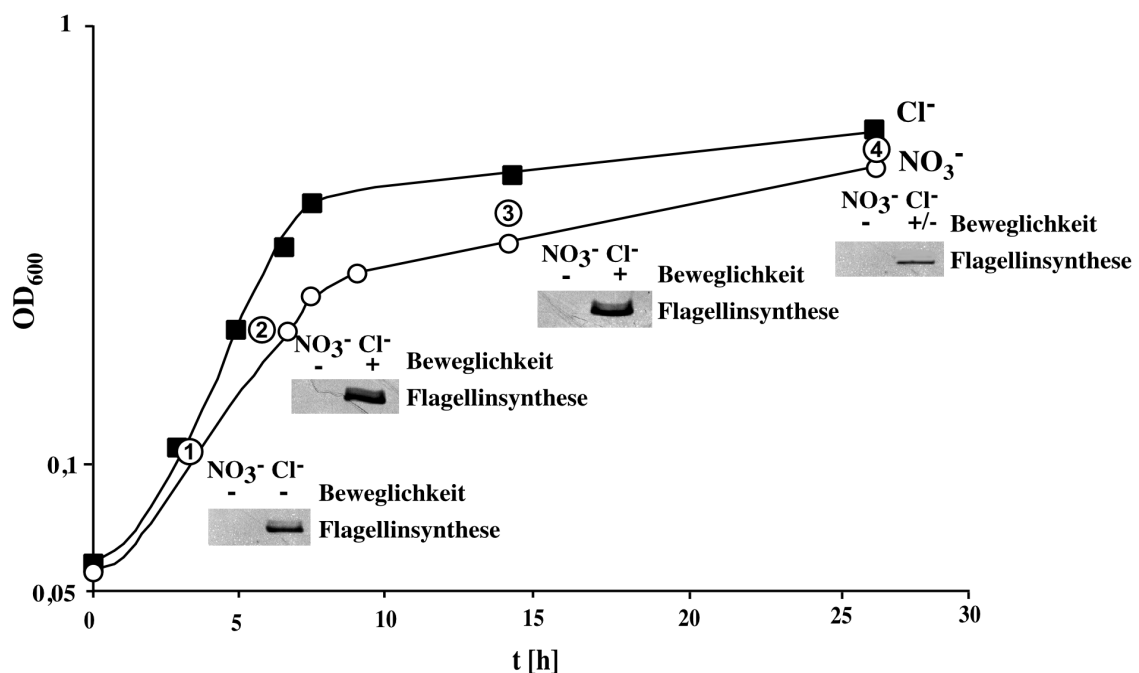


Abb. 22: Die Cl^- -abhängige Flagellinsynthese im Verlauf des Wachstums. *H. halophilus* wurde aus einer NO_3^- -haltigen Vorkultur in NB-Medium mit 1 M NaNO_3 oder 1 M NaCl überimpft, bei 30°C unter Schütteln inkubiert, und das Wachstum der Zellen wurde anhand der optischen Dichte (OD_{600}) der Kultur verfolgt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde die Beweglichkeit der Zellen im Lichtmikroskop beurteilt, und die Flagellinkonzentration wurde im Western-Blot mit $7 \mu\text{l}$ Antiserum quantifiziert.

In den beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß ursprünglich unbewegliche Zellen, die kein Flagellin synthetisieren, durch den Transfer in Cl^- -haltiges Medium zur Flagellinsynthese und zur Beweglichkeit stimuliert wurden. In den folgenden Untersuchungen sollte nun umgekehrt untersucht werden, inwieweit bereits bewegliche Zellen, die Flagellin synthetisieren, durch die Abwesenheit von Cl^- in ihrer Flagellinsynthese gehemmt werden. Hierzu wurde *H. halophilus* in 50 ml NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, und das Sediment wurde in 1 ml Tris-Puffer mit 1 M NaCl resuspendiert. Danach wurde diese Zellsuspension 20 mal durch eine sterile Kanüle (26 G) passagiert, wodurch die Flagellen von den Zellen abgeschert werden, ohne daß die Zellen dabei zerstört werden. In Abb. 23 wird deutlich, daß in einem Rohextrakt solcher Zellen kein Flagellin mehr nachweisbar war (VK). Zudem waren diese Zellen in lichtmikroskopischen Untersuchungen unbeweglich, was das erfolgreiche Abscheren der Flagellen dokumentiert. Aus dieser „flagellenfreien“ Zellsuspension wurden nun Zellen in frisches NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M NaNO_3 überimpft. Im Verlauf des Wachstums wurde dann die Beweglichkeit und die Flagellinkonzentration überprüft. In Zellen, die in Cl^- -haltiges Medium transferiert worden waren, wurde bereits nach 3 h wieder Flagellin nachgewiesen. Diese Zellen zeigten auch sehr schnell wieder Beweglichkeit (Abb. 23). Auch nach längerer Inkubationszeit blieb die Flagellinkonzentration konstant, und die Zellen blieben gut beweglich. Demgegenüber war in den Zellen, die in NO_3^- -haltiges Medium überführt worden waren, über den gesamten Verlauf des Versuchs kein Flagellin nachweisbar, und die Zellen zeigten in lichtmikroskopischen Untersuchungen keine Beweglichkeit. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, daß die Flagellinsynthese in *H. halophilus* nicht nur durch die Anwesenheit von Cl^- stimuliert wird, sondern daß umgekehrt genauso eine funktionierende Flagellinsynthese durch den Austausch von Cl^- gegen NO_3^- gehemmt wird.

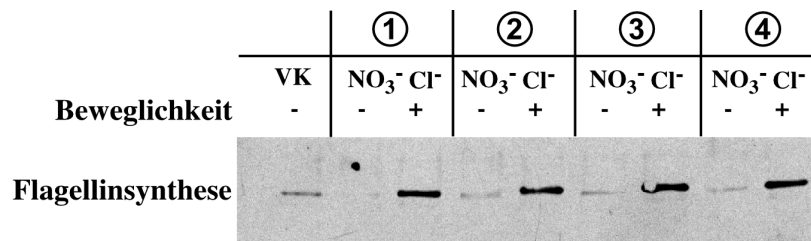


Abb. 23: Die Flagellinsynthese wird in Abwesenheit von Cl⁻ gehemmt. Aus einer „flagellenfreien“ Vorkultur (VK) wurden Zellen in NB-Medium mit 1 M NaNO₃ oder 1 M NaCl überimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde die Beweglichkeit der Zellen im Lichtmikroskop beurteilt, und die Flagellinkonzentration wurde im Western-Blot mit 7 µl Antiserum quantifiziert.

In den folgenden Untersuchungen sollte nun festgestellt werden, ob zwischen der Cl⁻-Konzentration im Medium, der Morphologie der Zelle und der Flagellinsynthese ein quantitativer Zusammenhang besteht. Hierzu wurde *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, und aus dieser Vorkultur wurden jeweils 5 ml NB-Medium angeimpft. Die Cl⁻-Konzentration im NB-Medium wurde variiert, die Salzkonzentration aber durch entsprechende Zugabe von NaNO₃ konstant bei 1 M gehalten. Durch diese Vorgehensweise ließen sich gegebenenfalls auftretende Effekte der Osmolarität oder der Na⁺-Konzentration ausschließen. Tab. 6 faßt die morphologischen Veränderungen der Zellen bei steigenden Cl⁻-Konzentrationen zusammen. In Abwesenheit von Cl⁻ neigten die Zellen wie bereits beobachtet zur Aggregatbildung, diese Aggregate umfaßten in Abwesenheit von Cl⁻ bis zu 20 Zellen. Bewegliche Zellen waren unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten. Mit zunehmender Salzkonzentration wurden die gebildeten Aggregate kleiner, umfaßten bei 0,2-0,3 M Cl⁻ nur noch jeweils 4-8 Zellen, vereinzelt traten bewegliche Zellen auf. Von 0,4-0,6 M Cl⁻ zeigten sich typische Sarcinen mit jeweils 4 Zellen. In diesen Kulturen waren zahlreiche Zellen langsam beweglich. Unter optimalen Wachstumsbedingungen ab 0,8 M Cl⁻ liegen die Zellen in Zweieraggregaten oder einzeln vor und zeigen zu 95% eine lebhaft bewegliche Beweglichkeit.

Tab. 6: Der Einfluß von Cl⁻ auf die Morphologie und die Beweglichkeit von *H. halophilus*. Aus einer Cl⁻-haltigen Vorkultur wurden Zellen in NB-Medium überimpft. Das Medium enthielt die angegebenen Cl⁻-Konzentrationen; die Salzkonzentration wurde durch entsprechende Zugabe von NaNO₃ auf eine konstante Salzkonzentration von 1 M eingestellt. Morphologie und Beweglichkeit der Zellen wurden durch lichtmikroskopische Untersuchungen beurteilt.

Cl ⁻ [M]	Morphologie	Beweglichkeit ¹
0	große Zellaggregate (> 8 Zellen)	-
0,1	große Zellaggregate (> 8 Zellen)	-
0,2	kleine Zellaggregate (4-8 Zellen)	+/-
0,3	kleine Zellaggregate (4-8 Zellen)	+/-
0,4	Sarcinen (4 Zellen)	+
0,5	Sarcinen (4 Zellen)	+
0,6	Sarcinen (4 Zellen)	+
0,8	einzelne Zellen und Diplokokken	++
1	einzelne Zellen und Diplokokken	++

¹:- keine beweglichen Zellen; +/-: einzelne Zellen (< 20%) sind sehr langsam beweglich; + : zahlreiche Zellen (> 80%) bewegen sich langsam; ++: alle Zellen zeigen eine lebhaftige Beweglichkeit.

Parallel zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde der Flagellin-gehalt überprüft. Abb. 24A zeigt, daß die Menge an Flagellin mit steigender Cl⁻-Konzentration zunimmt, was in Übereinstimmung mit der in lichtmikroskopischen Untersuchungen beobachteten Beweglichkeit steht. Quantifiziert man die Intensität des Signals durch densitometrische Analyse und trägt die erhaltenen Daten gegen die Cl⁻-Konzentration im Medium auf, so ergibt sich eine typische Sättigungskurve mit einem Maximum der Intensität bei 0,8-1 M Cl⁻ (Abb. 24B). Bei diesen Konzentrationen ist auch das Wachstum von *H. halophilus* optimal (ROEBLER und MÜLLER, 1998). Die Ergebnisse dieser Experimente belegen, daß die Flagellinkonzentration eine Funktion der Cl⁻-Konzentration im Medium ist.

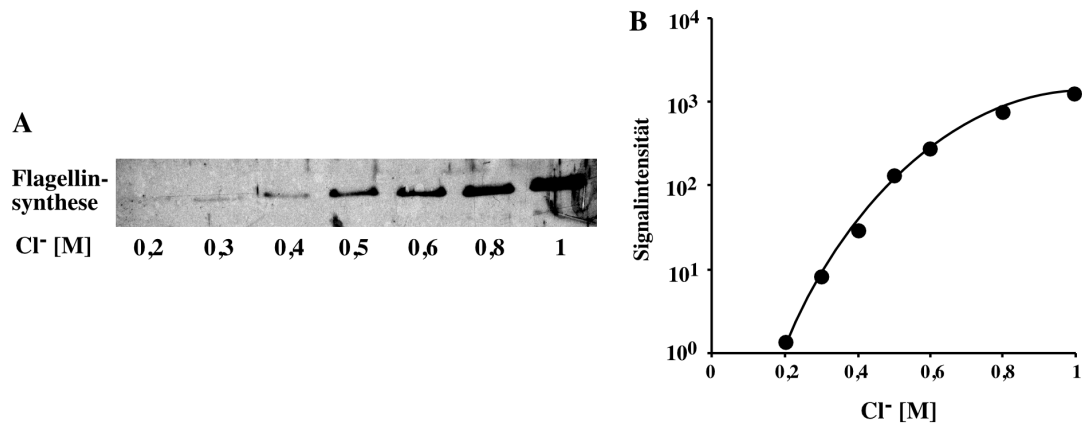


Abb. 24: Quantifizierung der Cl⁻-abhängigen Flagellinsynthese in *H. halophilus*. A. Western-Blot, B. Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen. Aus einer Cl⁻-haltigen Vorkultur wurden Zellen in NB-Medium überimpft. Das Medium enthielt die angegebenen Cl⁻-Konzentrationen; die Salzkonzentration wurde durch entsprechende Zugabe von NaNO₃ auf eine konstante Salzkonzentration von 1 M eingestellt. In der spätlogarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,4-0,7) wurde 1 ml der Kultur geerntet, und durch Resuspendierung in Denaturierungspuffer und 10 min. Kochen wurde ein Rohextrakt hergestellt. Anschließend wurden 25 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Western-Blot mit 7 µl anti-Flagellin Antiserum.

Um zu untersuchen, ob die Flagellinsynthese in *H. halophilus* in Abwesenheit von Cl⁻ stark eingeschränkt oder aber vollständig gestoppt wird, wurden Zellen in NB-Medium mit 1 M NaNO₃ angezogen, und es wurden Rohextrakte hergestellt. Von diesen Rohextrakten wurden steigende Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot mit dem anti-Flagellin Antiserum analysiert. Abb. 25 zeigt, daß sich auch in Zellen, die in NO₃⁻-haltigem Medium gewachsen waren, Flagellin nachweisen ließ, jedoch nur dann, wenn extrem große Mengen an Protein für die SDS-PAGE eingesetzt wurden. Es wird deutlich, daß selbst bei der fünffachen Proteinmenge (150 µg) nicht annähernd soviel Flagellin nachzuweisen war, wie in Zellen, die in Gegenwart von Cl⁻ gewachsen waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß die Synthese von Flagellin in Zellen, die in Gegenwart von Cl⁻ wachsen, um ein Vielfaches stimuliert wird, diese jedoch in Zellen, die Gegenwart von NO₃⁻ wachsen, nicht vollständig zum Erliegen kommt.

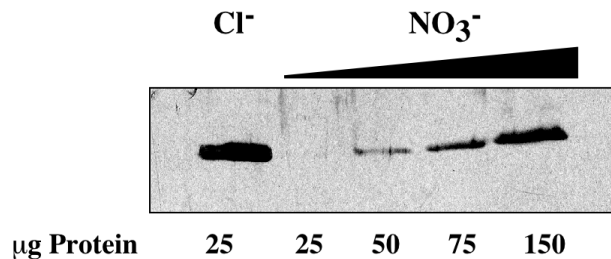


Abb. 25: Die Flagellinsynthese findet in Gegenwart von NO_3^- in reduziertem Maße statt. Zellen wurden in NB-Medium in Gegenwart von 1 M NaNO_3 oder 1 M NaCl angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Durch Resuspendierung in Denaturierungspuffer und 10 min Kochen wurde ein Rohextrakt hergestellt, und anschließend wurden 25-150 μg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Western-Blot mit 7 μl anti-Flagellin Antiserum.

3.3.6 Untersuchungen zur Stabilität des Flagellins von *H. halophilus*

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Experimente zeigten zusammen genommen deutlich, daß die Flagellinsynthese in *H. halophilus* Cl^- -abhängig ist. Um festzustellen, ob diese Cl^- -Abhängigkeit spezifisch auf die Synthese des Flagellins wirkt und nicht auf eine mangelnde Stabilität des Flagellums und/oder des Flagellins in NO_3^- -haltigem Medium zurückzuführen ist, wurden Experimente zur Stabilität des Flagellins in Cl^- - oder- NO_3^- -haltigem Medium durchgeführt. Hierzu wurde *H. halophilus* in 500 ml NB-Medium mit 1 M NaCl angezogen, und die Flagellen der Zellen wurden präpariert (s. 2.6). Jeweils die Hälfte dieser Flagellenpräparationen wurde anschließend einer Ultrazentrifugation (100.000 x g) unterzogen, und die sedimentierten Flagellen wurden in 1 ml Tris-Puffer mit 1 M NaCl oder 1 M NaNO_3 resuspendiert. Danach wurde die Flagellinkonzentration im Immunoblot bestimmt (t = 0 h). Anschließend wurden die Flagellenpräparationen bei 30°C inkubiert. Nach 24 bzw. 48 h wurde erneut jeweils eine Ultrazentrifugation durchgeführt, und die sedimentierten Flagellen wurden in Tris-Puffer mit 1 M NaCl oder 1 M NaNO_3 resuspendiert. Jeweils ein Aliquot dieser Flagellenpräparation wurde einer SDS-PAGE unterzogen, und anschließend erfolgte eine Immunoblot-Analyse mit dem anti-Flagellin Antiserum. Wäre das Flagellin von *H. halophilus* aus unbekanntem Gründen in der Abwesenheit von Cl^- destabilisiert, so müßten die hochmolekularen Strukturen der Flagellen bei Inkubation in Tris-Puffer mit 1 M NaNO_3 zerfallen, was wiederum

zur Folge hätte, daß diese nicht mehr durch Ultrazentrifugation zu sedimentieren wären. In diesem Fall müßte die nachweisbare Flagellinmenge abnehmen. Abb. 26 verdeutlicht jedoch, daß die Flagellinkonzentration nach 24 und nach 48 h Inkubation in NO_3^- - und Cl^- -haltigem Puffer gleich stark ist.

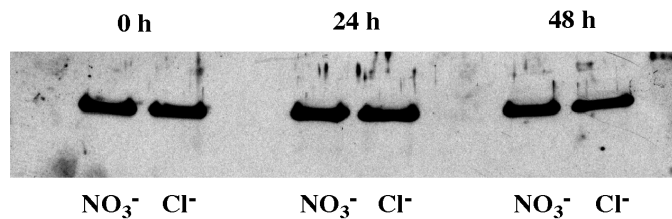


Abb. 26: Die Stabilität der Flagellen von *H. halophilus*. Eine Flagellenpräparation (s. 2.6) von *H. halophilus* wurde in Tris-Puffer mit 1 M NaNO_3 bzw. 1 M NaCl bei 30°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt, das Sediment wurde erneut in dem entsprechenden Tris-Puffer resuspendiert und ein Aliquot wurde entnommen. Jeweils $10\ \mu\text{g}$ Protein wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, und anschließend erfolgte eine Western-Blot-Analyse mit $7\ \mu\text{l}$ des anti-Flagellin Antiserums.

Diese Befunde sollten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Hierfür wurden Flagellen von *H. halophilus* präpariert und in Tris-Puffer in Gegenwart von 1 M NaCl oder 1 M NaNO_3 bei 30°C inkubiert. Nach 24 h wurden diesen Flagellensuspensionen Aliquots entnommen, und nach einer Negativkontrastierung wurden die Flagellen im Elektronenmikroskop untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Flagellen zwar durch die Präparation in Fragmente einer Länge zwischen 1 und bis zu $10\ \mu\text{m}$ fragmentiert wurden (Abb. 27). Gleichfalls wird jedoch deutlich, daß die Stabilität der Flagellen nicht Cl^- -abhängig war. Abb. 27 zeigt, daß sich weder die Anzahl noch die Länge der Flagellen unterscheidet, unabhängig davon, ob Cl^- (A+B) im Puffer vorlag oder NO_3^- (C+D). Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde der Immunoblot-Analysen und belegen, daß die Stabilität der Flagellen nicht Cl^- -abhängig ist. Nach den Ergebnissen der Untersuchungen zur Stabilität der Flagellen muß postuliert werden, daß die Flagellinsynthese in *H. halophilus* Cl^- -abhängig ist.

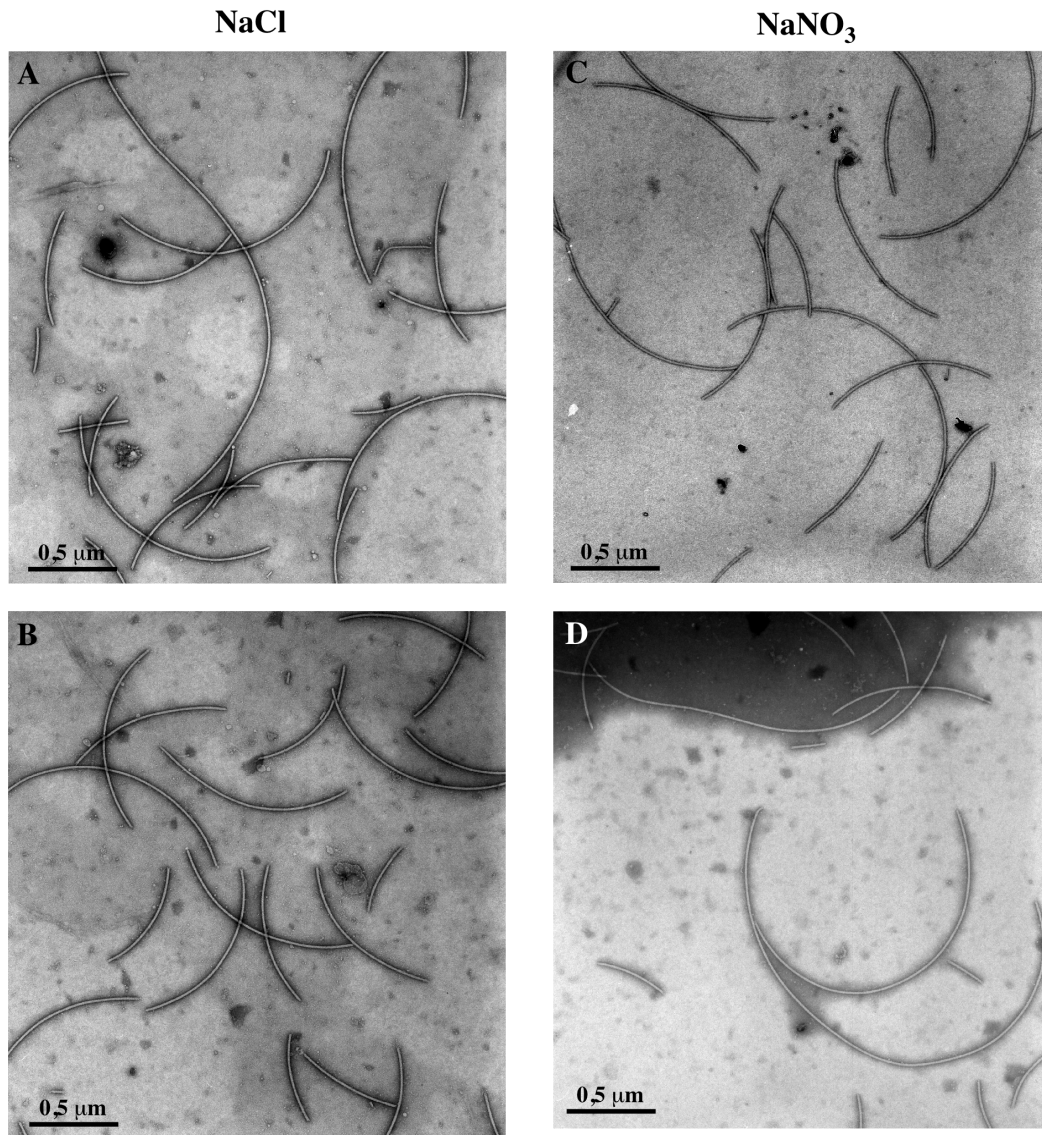


Abb. 27: Die Stabilität der Flagellen von *H. halophilus* ist nicht Cl⁻-abhängig. Es wurden Flagellen von *H. halophilus* präpariert und für 24 h bei 30°C in Tris-Puffer mit 1 M NaCl (A+B) oder 1 M NaNO₃ (C+D) inkubiert. Die Flagellen wurden unfixiert einer Negativkontrastierung unterzogen und im Elektronenmikroskop untersucht (Aufnahmen: G. Wanner).

3.3.7 Untersuchungen zur Substitution von Cl⁻ durch kompatible Solute

Nachdem gezeigt wurde, daß kompatible Solute wie Glutamat Cl⁻ beim Wachstum von *H. halophilus* substituieren können, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auch in bezug auf die Motilität und die Flagellensynthese zu beobachten war. Daher wurden Weichagarplatten hergestellt, die 1 M NaCl oder 1 M Na-Glutamat enthielten. Kolonien von *H. halophilus* wurden parallel auf diese Platten überführt, und anschließend wurden diese Platten bei 30°C in einer

feuchten Kammer inkubiert. Auf beiden Platten zeigte sich Wachstum, jedoch ließ sich eine Beweglichkeit bemerkenswerterweise nur auf den Platten beobachten, die Cl^- enthielten (Abb. 28). Die Cl^- -Abhängigkeit der Motilität ließ sich folglich durch Glutamat nicht aufheben.

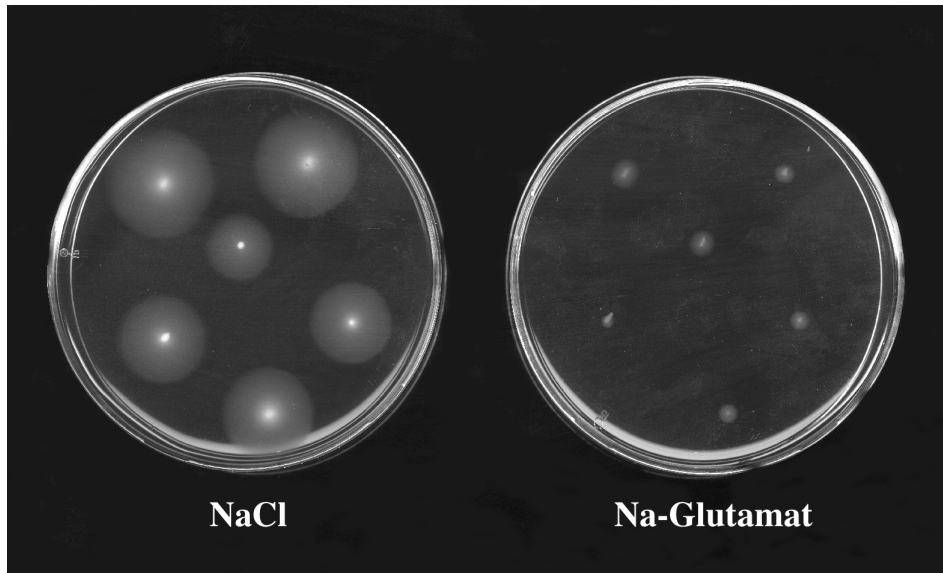


Abb. 28: Die Cl^- -abhängige Beweglichkeit von *H. halophilus*. Kolonien von *H. halophilus* wurden parallel auf die Platten aufgebracht, und die Platten wurden bei 30°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Foto zeigt die Platten nach einer Inkubation von 48 h. Die gezeigten Weichagarplatten enthielten NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M Na-Glutamat.

In rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen sollte nun festgestellt werden, ob Zellen, die in Gegenwart von Glutamat gewachsen waren Flagellen besitzen. Hierfür wurde *H. halophilus* in NB-Medium in Gegenwart von 1 M Na-Glutamat angezogen, die Zellen wurden geerntet und 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Abb. 29 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen, die in Gegenwart von Glutamat gewachsen waren. Es wird deutlich, daß die Zellen in ihrer Morphologie solchen, die in Gegenwart von Cl^- gewachsen waren, entsprachen (s. Abb. 18). Allerdings zeigte sich ebenfalls deutlich, daß keine dieser Zellen ein Flagellum besaß. Diese Ergebnisse belegen, daß die Flagellensynthese in *H. halophilus* Cl^- -abhängig ist und Cl^- diesbezüglich nicht durch Glutamat substituiert werden kann.

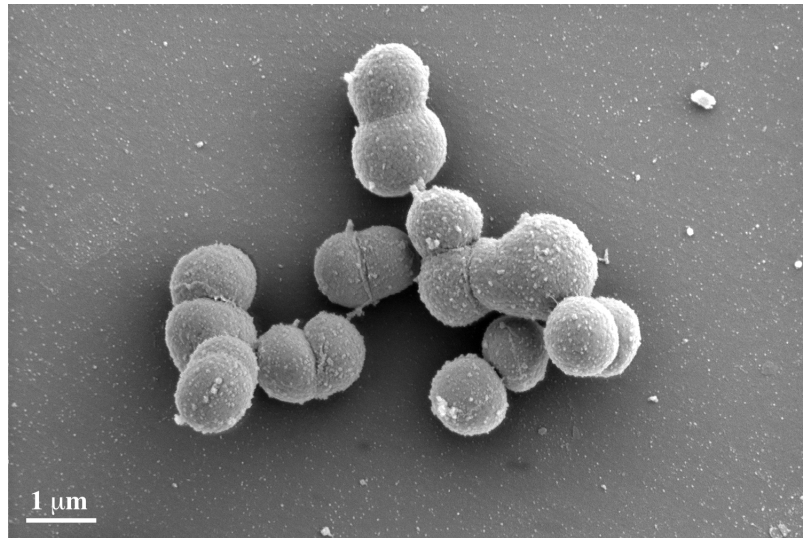


Abb. 29: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *H. halophilus*. *H. halophilus* wurde in NB-Medium mit 1 M Na-Glutamat angezogen, die Zellen wurden in 2,5% Glutaraldehyd fixiert, und diese Präparate wurden im Rasterelektronenmikroskop untersucht (s. 2.7) (Aufnahmen: G. Wanner).

Da bereits gezeigt wurde, daß die Flagellinsynthese in *H. halophilus* Cl^- -abhängig ist, sollte nun untersucht werden, ob der Mangel an Flagellen in Zellen, die in Gegenwart von Glutamat gewachsen waren, darauf zurückzuführen ist, daß in diesen Zellen kein Flagellin synthetisiert wird. Dafür wurden Zellen in NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M Na-Glutamat angezogen, es wurden Zellextrakte angefertigt und Immunoblot-Analysen mit dem anti-Flagellin Antiserum durchgeführt. Abb. 30 zeigt, daß in Gegenwart von Cl^- Flagellin produziert wird, dies jedoch in Gegenwart von Glutamat nicht der Fall ist.

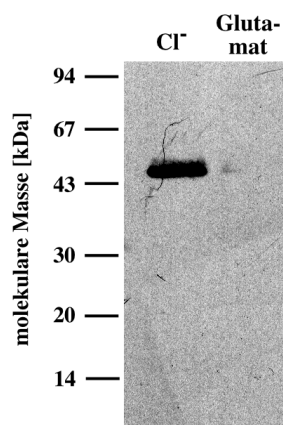


Abb. 30: Die Flagellinsynthese kann nicht durch Glutamat stimuliert werden. Zellen wurden in NB-Medium in Gegenwart von 1 M NaNO_3 oder 1 M NaCl angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Durch Resuspendierung in Denaturierungspuffer und 10 min Kochen wurde ein Rohextrakt hergestellt, und anschließend wurden 25 μg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Western-Blot mit 7 μl anti-Flagellin Antiserum.

Alle unter 3.3.6 vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß Glutamat Cl⁻ zwar im Wachstum von *H. halophilus* substituieren kann, dieses jedoch bemerkenswerterweise bezüglich der Flagellinsynthese und damit der Beweglichkeit nicht möglich ist.

3.3.8 Klonierung des für das Flagellin kodierenden Gens *fliC*

Nachdem in den unter 3.3.5 beschriebenen Experimenten gezeigt wurde, daß die Flagellinsynthese in *H. halophilus* Cl⁻-abhängig ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob dieser Effekt auf eine Transkriptionsaktivierung zurückzuführen war. Voraussetzung dafür ist, daß das entsprechende Gen bekannt ist. In einem ersten Schritt mußte daher zunächst das Gen, welches in *H. halophilus* das Flagellin kodiert (*fliC_{Hh}*), kloniert werden. Als Sonde wurde *fliC* aus *B. subtilis* (*fliC_{Bs}*) verwendet (Abb. 31). Letzteres wurde aus pDM67 (MIREL und CHAMBERLIN, 1989), welches *fliC_{Bs}* enthält, per PCR amplifiziert. Da prokaryotische Flagelline in den N- und C-terminalen Bereichen zwar hochkonserviert sind (JOYS, 1988), der dazwischenliegende Bereich jedoch in Größe und Sequenz stark variabel ist, sollte als heterologe Sonde nur der DNA-Abschnitt eingesetzt werden, der für den konservierten N-Terminus des Proteins kodiert. Dazu wurde das erhaltene PCR-Produkt einer Restriktion mit *Cla*I unterzogen, welches *fliC_{Bs}* in zwei Fragmente spaltet. Der 5'-Abschnitt, welcher für den N-terminalen Bereich des Flagellins kodiert, hatte dabei eine Länge von 367 Bp. Abschließend wurden die beiden durch Restriktion mit *Cla*I erhaltenen Fragmente einer präparativen Agarosegelelektrophorese unterzogen, und das 367 Bp-Fragment wurde gereinigt. Nachfolgend konnte dieses Fragment radioaktiv markiert und als heterologe Sonde in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden.

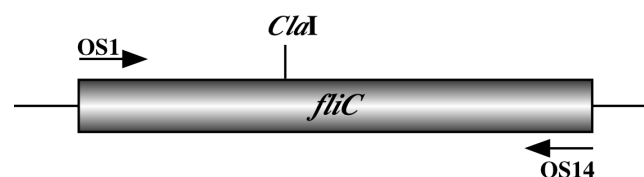


Abb. 31: *fliC* aus *B. subtilis* in pDM67 (MIREL und CHAMBERLIN, 1989). Gezeigt ist *fliC_{Bs}* mit den Bindestellen für die Oligonukleotide OS1 und OS14 sowie die Lage der für die Konstruktion der heterologen Sonde essentiellen *Cla*I-Restriktionsschnittstelle.

Um die Anzahl der durch Koloniehybridisierung zu analysierenden rekombinanten Klone möglichst gering zu halten, wurde die unter 3.2.5 konstruierte Genbank verwendet. Die insgesamt ca. 6000 erhaltenen Transformanden wurden gleichmäßig verteilt, so daß 8 x 750 Transformanden in jeweils 150 ml LB-Medium angezogen wurden. Anschließend wurden präparative Plasmid-isolierungen (s. 2.4.1) durchgeführt. Mit diesen so erhaltenen 8 Plasmidpräparationen wurde ein Southern-Blot mit der radioaktiv markierten *fliC_{Bs}*-Sonde durchgeführt. Abb. 32 zeigt, daß in sechs der acht Fraktionen der Genbank von *H. halophilus* mindestens ein Signal auftritt. Fraktion 2 wurde als diejenige ausgewählt, mit der in den sich anschließenden Koloniehybridisierungsexperimenten weitergearbeitet werden sollte.

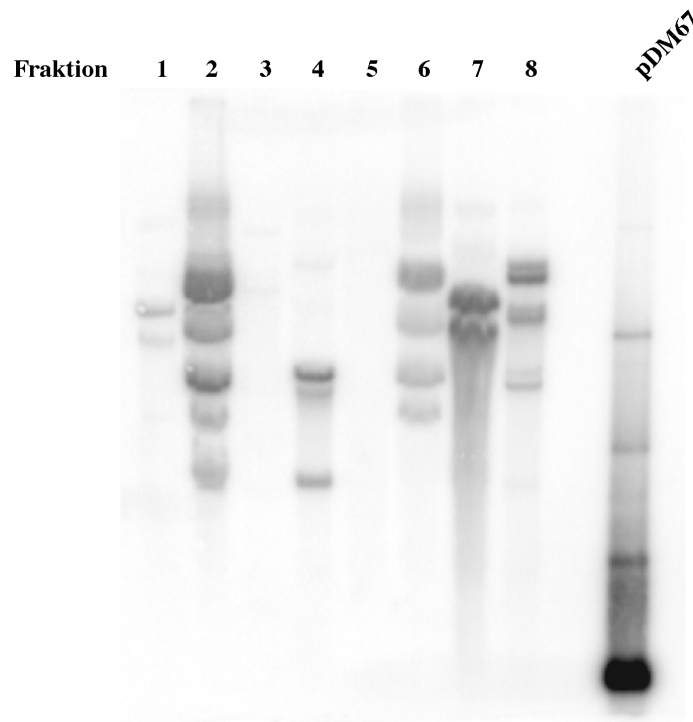


Abb. 32: Southern-Hybridisierung der Genbank aus *H. halophilus* mit einer heterologen Sonde gegen *fliC*. Es wurden jeweils 15 μ g DNA aus den 8 Fraktionen (Spur 1-8) der Genbank aufgetragen, die Membran wurde mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Als Positivkontrolle wurden 15 μ g von pDM67 aufgetragen.

Aliquots der Fraktion 2 wurden in *E. coli* DH5 α transformiert, rekombinante Klone wurden auf LB-Platten ausgestrichen und einer Koloniehybridisierung nach BULUWELA *et al.*, (1989) unterzogen. In 1200 analysierten Klonen wurden

insgesamt 10 positive gefunden. Abb. 33 zeigt repräsentativ einen Filter mit einem positiven Klon.

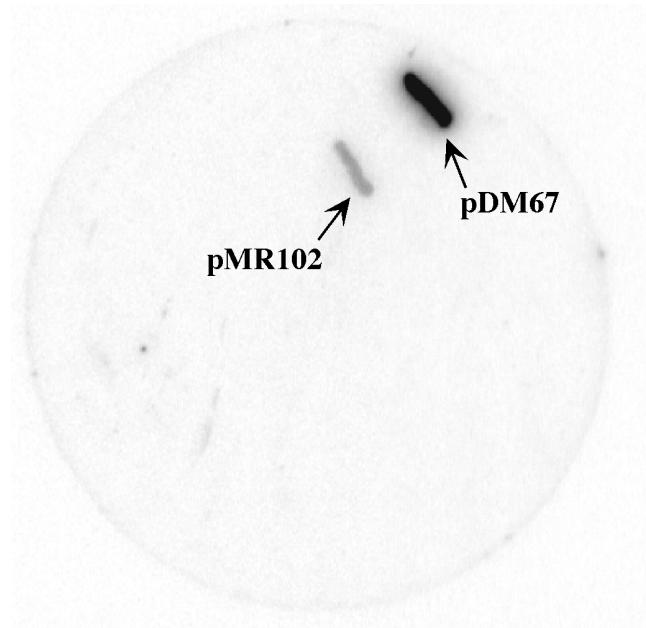


Abb. 33: Identifizierung der *fliC_{Hh}*-enthaltenden Klone. Gezeigt ist eine Nylonmembran mit einem als positiv identifizierten Klon (pMR102) und der Positivkontrolle (pDM67) nach einer Koloniehybridisierung mit der *fliC_{Bs}*-Sonde.

Aus den 10 positiven Klonen wurden die Plasmide isoliert und mit den Restriktionsenzymen *Xba*I, *Hind*III, und *Eco*RI gespalten. Bei diesen Restriktionsanalysen zeigte sich, daß 7 der 10 positiven Klone das gleiche Restriktionsmuster ergaben, folglich identisch waren (pMR102). Alle trugen ein DNA-Fragment aus der chromosomalen DNA von *H. halophilus* mit einer Größe von ca. 5,6 kBp. Ein weiterer Klon (pMR111) zeigte ebenfalls das entsprechende Restriktionsmuster jedoch mit zusätzlichen Banden, woraus sich schließen läßt, das hier das gleiche Fragment wie zuvor enthalten war, aber zusätzlich ca. weitere 6 kBp. Zwei der als positiv identifizierten Klone (pMR115 und pMR124) ließen sich nicht sinnvoll in das beobachtete Restriktionsmuster einordnen und wurden im weiteren Vorgehen außer acht gelassen.

pMR102 enthielt somit *fliC_{Hh}* oder zumindest Teile davon auf einem Insert von ca. 5,6 kBp. Für die DNA-Sequenzierung wurden Subklone hergestellt. Dazu wurde eine PCR mit den degenerierten Oligonukleotiden Fla2.2 und Fla1.2d, welche aus der Sequenz von *fliC_{Bs}* abgeleitet worden waren und eine *Hind*III-Schnittstelle enthielten, mit pMR102 als Matrize durchgeführt (Abb. 34). Dabei

konnte ein DNA-Fragment mit ca. 700 Bp amplifiziert werden. Anschließend wurde eine Restriktion mit *Hind*III durchgeführt, um die in den Oligonukleotiden vorhandene Restriktionsschnittstelle zugänglich zu machen. Das dabei erhaltene 420 Bp-Fragment wurde in pUC18 kloniert und sequenziert.

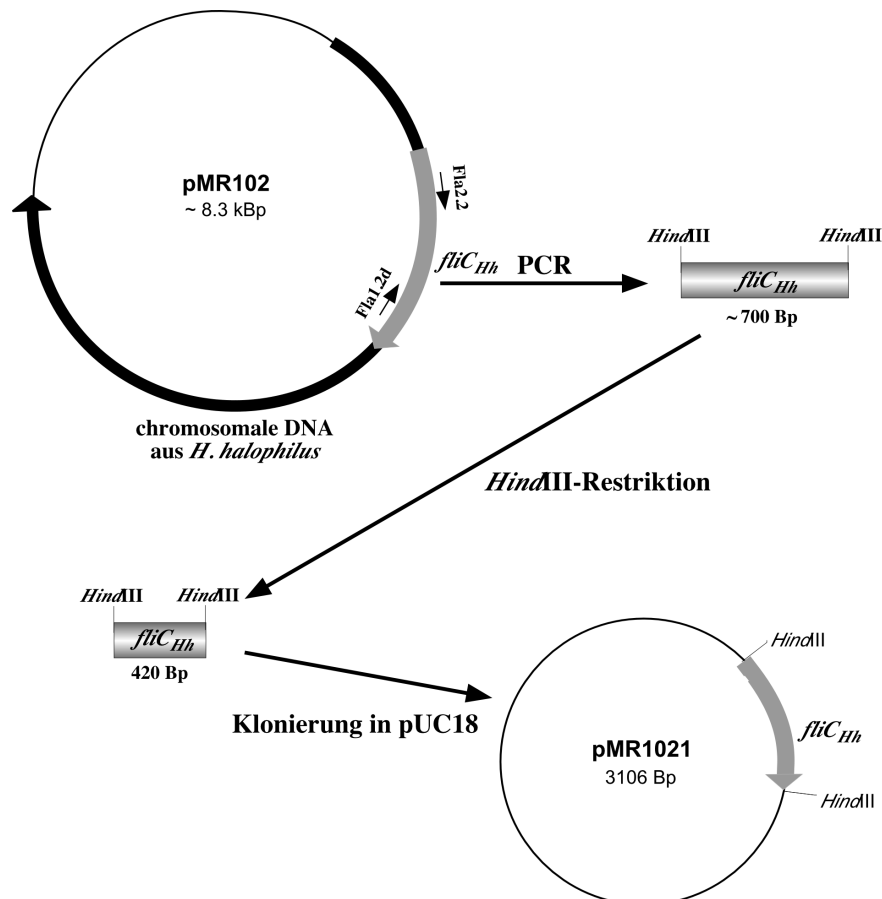


Abb. 34: Klonierung von pMR1021. Ein Fragment von *fliC_{Hh}* wurde per PCR amplifiziert, mit *Hind*III gespalten und in pUC18 kloniert. Die Pfeile kennzeichnen die Bindestellen der Oligonukleotide Fla2.2 und Fla1.2d.

Abb. 35 zeigt die Sequenz des in pMR1021 enthaltenen *fliC_{Hh}*-Fragments. Die für die Klonierung in pUC18 verwendeten *Hind*III-Schnittstellen sind fett gedruckt dargestellt. Wie aus Abb. 35 deutlich wird, ist für keines der beiden verwendeten Oligonukleotide eine Bindestelle auszumachen. Dies ist nur dadurch zu erklären, daß in dem ursprünglich amplifizierten 700 Bp-Fragment zwei weitere *Hind*III-Schnittstellen vorlagen und so nach der Restriktion das später sequenzierte 420 Bp-Fragment erhalten wurde.

<i>Hind</i> III		
<u>GTAAAAACGACGGCCAGTGCC</u> AAGCTT GC		50
pUC18-Sequenz		
CAATTGTAAAATTAGAACCATCACTAGTTGCTACAGTCCAGGTACCTGTA		100
TCACCAGTAAAAGAAGATGCATCCGTAATTGTAATATTACCGCTACTACC		150
ATTAGTTTGTGTTGAGCTAGCTGAAGCAGGGGTAGTAGTTGTGCTACCAG		200
CAGTAACTTCTCCAGCAGTAGCATTCAATAGTTTTTGATTGTTAAATTCA		250
GTAGTATTTCCCTATGCGATTTATTTTCAGAAGTCAATTGATTCATTTCTTT		300
CTGGATTTCCCCACGGTCAGTTGAAGTATTTGTATCGTTACCAGATTGTA		350
CAGCTAATTCACGCATCCGCTGAAGAATGCTATGGGTTTCATTCAACGCT		400
CCTTCTGCAGTTTGAATCATAGAAATGGAATCTTGAGAGTTTCTT AAGC	<i>Hind</i> III	450
TTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCC		482
<i>Pae</i> I <i>Ps</i> I <i>Sa</i> I <i>Xba</i> I <i>Bam</i> HI		

Abb. 35: DNA-Sequenz des *fliC_{Hh}*-Fragments. Gezeigt ist die Sequenz des Fragments aus *fliC_{Hh}*. Die zur Klonierung verwendeten *Hind*III-Schnittstellen sind fett gedruckt dargestellt. Die flankierenden Sequenzen aus pUC18 sind unterstrichen dargestellt und die Restriktions-schnittstellen aus der multiplen Klonierungsstelle sind angegeben.

Eine Analyse der erhaltenen Sequenz ergab, daß das analysierte DNA-Fragment zu Sequenzen aus den N-terminalen Bereichen bekannter Flagelline sehr ähnlich ist (Abb. 36). Es zeigte sich, daß am 5'-Ende ca. 190 Bp von *fliC_{Hh}* fehlten. Danach war die Ähnlichkeit zum Flagellin aus *B. subtilis* mit 56% am größten, aber auch zu den Flagellinen von *Bacillus halodurans*, *Clostridium acetobutylicum* und *Acetobacterium woodii* ergaben sich jeweils ca. 50% Ähnlichkeit. Dabei war die Übereinstimmung im konservierten N-terminalen Bereich (bis Aminosäure 74) noch höher, während im variablen Bereich der Flagelline dagegen wie erwartet keine Ähnlichkeiten auftraten. Am 3'-Ende des analysierten Fragments fehlen ca. 600 Bp von *fliC_{Hh}*.

<i>H. halophilus</i>	1	---RNSQDSISMIQTAEGALNETHSILQRMRELAVQSGNDT--NTSTDRGEIQKEMNQLT	55
<i>C. acetobutylicum</i>	61	QSTRNAQDGISLVQTAEGNLNESQAILQRMRELAVQSATGT--NTSTDRANLELEFKOLO	118
<i>B. subtilis</i>	61	MASKNSQDGISLIQTAEGALTETHAILQRVRELVVQAGNTGTQDKATDLQSIQDEISALT	120
<i>B. halodurans</i>	61	QASRNSQDGISLIQTAEGALDEVHSILQRMRELAVQSSNET--NVEQDQAAALNDEFQQLV	118
<i>A. woodii</i>	61	TASTNANDSISLIQTAEGALNETHSILQRMRELAVQSSNDT--NTDADRGEIQKEINQLT	118
<i>H. halophilus</i>	56	SEINRIGNTTEFNNQKLLNATAGEVNTAGSTTTTPASASSTQTNQSSGNITITDASSFTGD	115
<i>C. acetobutylicum</i>	119	SEVTRIAVQSEFNTKLLD-----GSLTGTA-----QMTFQIGANS-	155
<i>B. subtilis</i>	121	DEIDGISNRTEFNGKLLD-----GTYKVDATPANQKNLVFQIGANA-	163
<i>B. halodurans</i>	119	EEIERIKDITQFNTQKLLD-----DTVDT-----VQLQVGANS-	152
<i>A. woodii</i>	119	KEIDRISNDTEFNTQKLLNGYKAIKTEAVSGLSSGGISVEAGVAGGTYHVKTTVTAAAI	178
<i>H. halophilus</i>	116	TGTWTVATSDGSNFTIDKGDGSGA	139
<i>C. acetobutylicum</i>	155	-----	155
<i>B. subtilis</i>	163	-----	163
<i>B. halodurans</i>	152	-----	152
<i>A. woodii</i>	179	SVFNRRQEQMAVFLVSHMVESAQQ	202

Abb. 36: Vergleich der Sequenz von FliC_{Hh} mit den N-terminalen Regionen anderer Flagelline. Die Aminosäuresequenz von FliC_{Hh} wurde aus pMR1021 (Abb. 35) abgeleitet und mit der N-terminalen Region von Flagellinen aus Gram-positiven Bakterien verglichen. Identische Aminosäuren sind schattiert dargestellt.

3.3.9 Klonierung des für die β -Untereinheit der ATP-Synthase kodierenden Gens *atpD*

Um quantitative Studien zur Cl⁻-abhängigen Expression des Flagellins in *H. halophilus* durchführen zu können, war es unerlässlich zur internen Kontrolle zusätzlich die Expression eines Gens zu untersuchen, welches durch die An- bzw. Abwesenheit von Cl⁻ voraussichtlich unbeeinflusst ist. In diesem Fall wurde *atpD* als konstitutiv exprimiertes Gen ausgewählt, welches für die β -Untereinheit der ATP-Synthase kodiert, da diese über weite Bereiche hochkonserviert ist (ABRAHAMS *et al.*, 1994; SHIRAKIHARA *et al.*, 1997) und daher ein Einsatz einer heterologen Sonde in Koloniehybridisierungsexperimenten mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Erfolg führt.

AtpD aus *Acetobacterium woodii* (*atpD*_{Aw}) wurde mittels PCR mit Hilfe der Oligonukleotide *PatpD1* und *PatpD2* von pAF1 (FORSTER *et al.*, 1995) amplifiziert und in pUC18 kloniert (pMR601). Anschließend wurde *atpD* mit *Bam*HI aus diesem Konstrukt herausgeschnitten, radioaktiv markiert und als Sonde eingesetzt. Analog zur Klonierung von *fliC* (s. 3.3.6) wurde die unter 3.2.5 konstruierte Genbank in 8 Fraktionen aufgeteilt und in Fraktion 6 wurden Fragmente identifiziert, die mit der *atpD*_{Aw}-Sonde reagierten (Abb. 37).

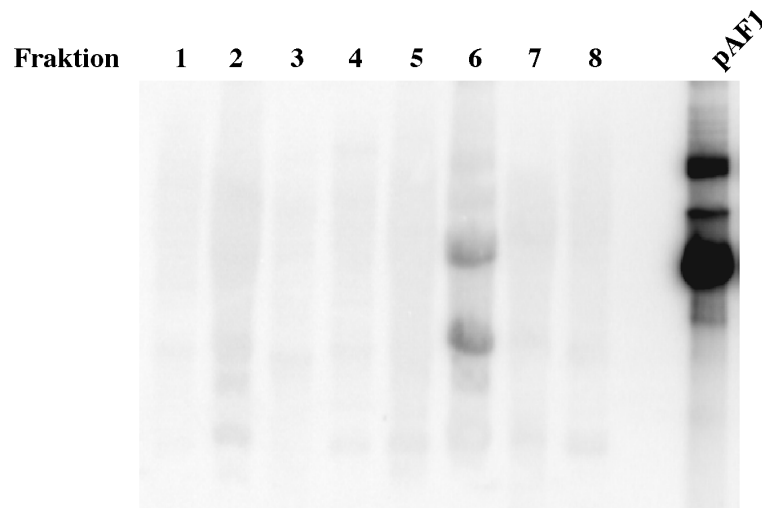


Abb. 37: Southern-Hybridisierung der Genbank aus *H. halophilus* mit einer heterologen Sonde gegen *atpD_{Aw}*. Jeweils 15 μ g DNA aus den 8 Fraktionen (Spur 1-8) der Genbank wurden im Southern-Blot eingesetzt, und die Membran wurde mit der *atpD_{Aw}*-Sonde hybridisiert. Als Positivkontrolle wurden 10 μ g vom Plasmid pAF1 aufgetragen.

Im Folgenden wurden Aliquots der Fraktion 6 in *E. coli* DH5 α transformiert. Rekombinante Klone wurden auf LB-Platten ausgestrichen und einer Koloniehybridisierung nach BULUWELA *et al.* (1989) unterzogen. In 1200 analysierten Klonen wurden insgesamt 24 positive gefunden. Abb. 38 zeigt repräsentativ einen Filter mit einem positiven Klon.

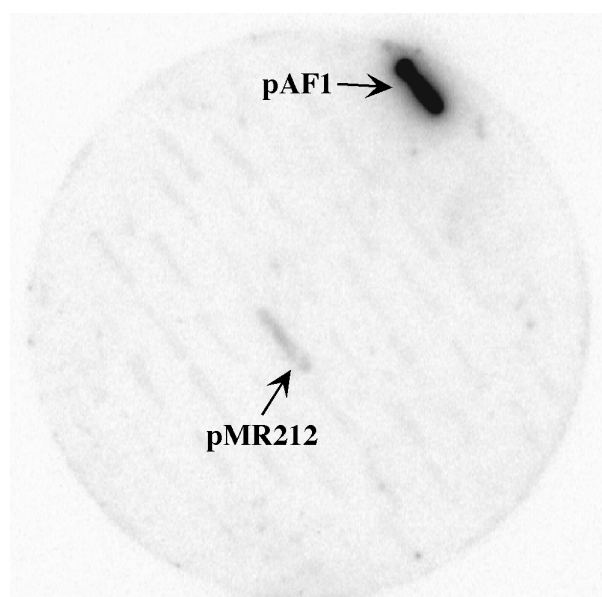


Abb. 38: Identifizierung der *atpD_{Hh}*-enthaltenden Klone. Gezeigt ist eine Nylonmembran mit einem als positiv identifizierten Klon (pMR212) und der Positivkontrolle (pAF1) nach einer Koloniehybridisierung mit der *atpD_{Aw}*-Sonde.

Bei diesen Restriktionsanalysen zeigte sich, daß 20 der 24 positiven Klone das gleiche Restriktionsmuster ergaben, folglich identisch waren (pMR212). Alle trugen ein Plasmid mit einem DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 2,2 kBp. Ein weiterer Klon (pMR202.2) zeigte zusätzlich Fragmente von ca. 6 kBp. Drei der als positiv identifizierten Klone (pMR213, pMR214.3 und pMR220.2) ließen sich nicht sinnvoll in das beobachtete Restriktionsmuster einordnen und wurden im weiteren Vorgehen außer acht gelassen.

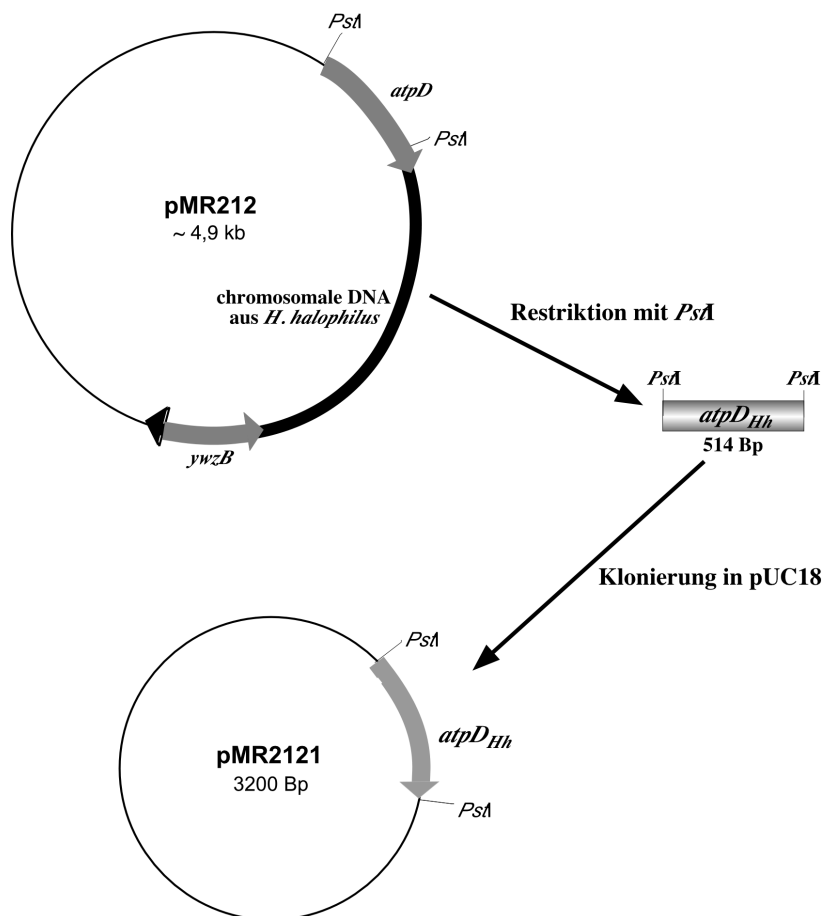


Abb. 39: Klonierung von pMR2121. pMR212 wurde mit *Pst*I geschnitten und das resultierende 514-Bp-Fragment wurde in pUC18 kloniert.

Das Insert von pMR212 wurde vom 5'- und vom 3'-Ende her sequenziert, wobei sich zeigte, daß *atpD_{Hh}* im 5'-Bereich des enthaltenen Fragments liegt (Abb. 39).


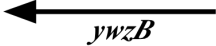
GCATGC CTGCAG GTCGACTCTAGAGGATCCAATCCACCGGAAGCACCAG	50
<i>PaeI</i> <i>PstI</i> <i>SaI</i> <i>XbaI</i> <i>BamHI</i>  <i>atpD</i>	
TCTTTGAAAACCTAGCTACAGAACTGAAATCTGGAACTGGAATAAA	100
GTTGTAGACCTTTTAGCTCCATATGTAAAAGGTGGTAAAATTGGATTGTT	150
TGGTGGCGCCGGAGTAGGTAAGACCGTACTCATCCAGGAATTAATTAACA	200
ACATCGCCAGGAACACGGTGGTATCTCTGTATTTGCCGGAGTGGGTGAG	250
CGTACACGTGAAGGTAACGACCTTTATTGGGAAATGACCGATTCAGGTGT	300
TATTAAGAAAACAGCTATGGTGTGGACAAATGAACGAACCGCCTGGTG	350
CTCGTATGCGCGTAGCTCTGTCTGGTTTAAACAATGGCAGAATATTTCCGT	400
GATGAGCAAGGACAGGACGTATTGTTCTTCATAGACAACATCTTCCGTTT	450
CACCCAGGGCGGTCTTGAAGTATCTGCCCTTCTTGACGTATGCCTCAGC	500
CGTTGGTTCACCACCTTAGCACTGAATGGGAC CTGCAG AGCAATACAT	550
<i>PstI</i>	
CTCTGCAGGTCAGTT - - - - -	565
unsequenzierter Bereich	
- - - - - TGAGATGATGTCTAAAATAGGCG	551
von pMR212 (~1100Bp)	
AAAAGAGGAGTTAGTAGGATCAATATTTTGCTGAAGAGCCATCTGAGTA	501
TGACCTCACACATTATCTTCATTATCATAACGTGGAGAGTCCTTCAGTCA	451
GTCAACTTCGATGCGTTTTTCAGGAAACATCGTGTTTTTGAAGCAAGAGT	401
TTTACTCATATTTATTACCATTGCAATTGGAACAACGGTCAGCCGATTTT	351
TTCTTGATTTTATTGCATGGTCTAATAGTCTGGTCTACTTATTTTAAACG	301
TAAATCCATGAACTATGAATAAATGAATAGTTTGTGAGAAAATGTCCAG	251
TATGATTGTTGTCTTCTCCGGTCAGACTTATAGTAAGTCTATGCTCGGGG	201
AGGCATCAGAAAATGAAAAGTTTACTAGCAGGGATTACGGTATTGATTAT	151
GGTATGTACAGGTGCTTATTCACAGGAACGACTGCGGAGACACCTATTG	101
AAAATTTTGCAGCATTTGCTGAGAATGAGCAGCTGGACGTCAAGGAAGGT	51
CGATCACCTCAAAGAGACGATATCGAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTC	1
 <i>ywzB</i> <i>BamHI</i> <i>SmaI</i> <i>KpnI</i> <i>SacI</i>	

Abb. 40: Partielle DNA-Sequenz des Inserts von pMR212. Die Restriktionsschnittstellen aus der multiplen Klonierungsstelle von pUC18 sind angegeben. Die zur Subklonierung verwendeten *PstI*-Schnittstellen sind fett gedruckt.

Am 3'-Ende der klonierten chromosomalen DNA finden sich Ähnlichkeiten zu *ywzB*, einem Gen mit unbekannter Funktion aus *B. subtilis*. Interessanterweise liegt *ywzB* auch auf dem *B. subtilis*-Chromosom ca. 1000 Bp von *atpD* entfernt (KUNST *et al.*, 1997), so daß davon ausgegangen werden kann, daß das *H. halophilus*-Chromosom in diesem Bereich sehr ähnlich aufgebaut ist. In *B. subtilis* liegen *ywmA* und *atpC* in dem Bereich zwischen *atpD* und *ywzB*. Abb. 40 zeigt die Sequenzen des 5'- und des 3'-Bereichs des Inserts von pMR212.

Abb. 41 zeigt einen Sequenzvergleich von AtpD_{Hh} mit β -Untereinheiten von ATP-Synthasen aus anderen Gram-positiven Organismen. Es wird deutlich, daß am 5'-Ende ca. 350 Bp von *atpD*_{Hh} fehlten. Im darauffolgenden Bereich beträgt die Ähnlichkeit zu den anderen β -Untereinheiten ca. 95%. Außerdem zeigte sich, daß der klonierte Bereich für Teile der ATP-bindenden Domäne kodiert, da die zur ATP-Bindung essentiellen Walker-Motive A und B (WALKER *et al.*, 1982) gefunden wurden. Am 3'-Ende fehlen ca. 900 Bp von *atpD*_{Hh}.

<i>H. halophilus</i>	1	-----PI	2
<i>B. subtilis</i>	59	VRTIAMASTDGVQRGMEAVDTGAPISVPGVDVTLGRVFNVLGENIDLNEPVPADAKKDP	118
<i>B. halodurans</i>	59	VRTIAMGSTDGLVRGTEVVDTGAAISVPGVEVTLGRVFNVLGESIDLDEPIPADAERSPI	118
<i>S. aureus</i>	56	VRTIAMDSTDGVQRGMDVKDTGKEISVPGDETLGRVFNVLGETIDLKEEISDSVRRDPI	115
<i>A. woodii</i>	54	VRCIAMDSTDGLMRNQEAVDTGSAIQVPVGKATLGRMFNVLGEPIDGKPFDTKDVVMHPI	113
<i>H. halophilus</i>	3	HREAPVFENLATETEILETGIKVVDLLAPYVKGKIGLFGGAGVGKTVLIQELINNIAQE	62
<i>B. subtilis</i>	119	HRQAPSFQDLSTVEILETGIKVVDLLAPYIKGGKIGLFGGAGVGKTVLIQELINNIAQE	178
<i>B. halodurans</i>	119	HREAPKFEELSTKTEILETGIKVVDLLAPYIKGGKIGLFGGAGVGKTVLIQELINNIAQE	178
<i>S. aureus</i>	116	HRQAPAFDELSTEVQILETGIKVVDLLAPYIKGGKIGLFGGAGVGKTVLIQELINNIAQE	175
<i>A. woodii</i>	114	HRHPPSFEEQQTQPEMFETGIKVVDLICPYVRGGKIGLFGGAGVGKTVLIQELINNIATQ	173
<i>H. halophilus</i>	63	HGGISVFAGVGERTREGNDLYWEMTDSGVIKKTAMVFGQMNEPPGARMRVALSGLTMAEY	122
<i>B. subtilis</i>	179	HGGISVFAGVGERTREGNDLYFEMSDSGVINKTAMVFGQMNEPPGARMRVALTGLTMAEH	238
<i>B. halodurans</i>	179	HGGISVFAGVGERTREGNDLYHEMSDSGVIKKTAMVFGQMNEPPGARMRVALSGLTMAEY	238
<i>S. aureus</i>	176	HGGISVFAGVGERTREGNDLYFEMSDSGVIKKTAMVFGQMNEPPGARMRVALSGLTMAEY	235
<i>A. woodii</i>	174	HGGLSVFAGVGERTREGNDLYEMMESGVINKTALCFQMNEPPGARMRIALAGLTMAEY	233
<i>H. halophilus</i>	123	FRDEQGQDVLLFFIDNIFRFTQGGLEVSALLGRMP-----	157
<i>B. subtilis</i>	239	FRDVQGQDVLLFFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGQLQERITSTNVG	298
<i>B. halodurans</i>	239	FRDKQGQDVLLFFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGQLQERITSTKVG	298
<i>S. aureus</i>	236	FRDEQGQDVLLFFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGQLQERITSTTKG	295
<i>A. woodii</i>	234	FRDDEQGQDVLLFFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGALQERITSTSKG	293

Abb. 41: Vergleich der Sequenz von AtpD_{Hh} mit den Sequenzen anderer ATP-Synthase β -Untereinheiten. Die Aminosäuresequenz von AtpD_{Hh} wurde aus pMR212 (Abb. 40) abgeleitet und mit den Sequenzen von β -Untereinheiten aus Gram-positiven Bakterien verglichen. Identische Aminosäuren sind schattiert dargestellt, und die Walker-Motive A und B sind fett gedruckt.

Um eine *atpD_{hh}*-Sonde zu konstruieren, wurde das entsprechende Fragment aus pMR212 mit *Pst*I ausgeschnitten und in pUC18 kloniert, woraus pMR2121 resultierte (Abb. 39). Dieses *Pst*I-Fragment wurde im Folgenden als Sonde eingesetzt.

3.3.10 Untersuchungen zur Cl⁻-abhängigen Expression von *fliC*

Nachdem homologe Sonden sowohl gegen den N-terminalen Bereich des Flagellins (s. 3.3.6) als auch gegen die β -Untereinheit des ATP-Synthase aus *H. halophilus* (s. 3.3.7) konstruiert worden waren, sollten nun Studien zur Cl⁻-abhängigen Expression von *fliC* durchgeführt werden. In den unter 3.3.5 beschriebenen Experimenten war gezeigt worden, daß die Ausbildung eines funktionellen Flagellums sowie die Synthese des Flagellins in *H. halophilus* von der Cl⁻-Konzentration abhängig sind. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Transkription von *fliC* Cl⁻-abhängig ist.

Voraussetzung für die Transkriptanalysen ist eine unbedingte Spezifität der Sonden. Um diese zu überprüfen, wurde chromosomale DNA von *H. halophilus* einer Restriktion mit *Bam*HI, *Sac*I bzw. *Xho*I unterzogen. 15 μ g der geschnittenen DNA wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und einer Southern-Hybridisierung mit der radioaktiv markierten *fliC*-Sonde unterzogen. Abb. 42 zeigt das Ergebnis der anschließend durchgeführten Autoradiographie. Es zeigt sich, daß jeweils nur ein einzelnes Signal auftrat, wobei sich die Größe der markierten Fragmente abhängig vom eingesetzten Restriktionsenzym unterschied. Bei einer Restriktion mit *Bam*HI war ein Fragment mit einer Größe von ca. 4,9 kBp markiert, mit *Sac*I war es 6,0 kBp und mit *Xho*I 14,0 kBp. Aus den Ergebnissen dieser Experimente läßt sich folglich schließen, daß die konstruierte Sonde spezifisch für *fliC* ist.

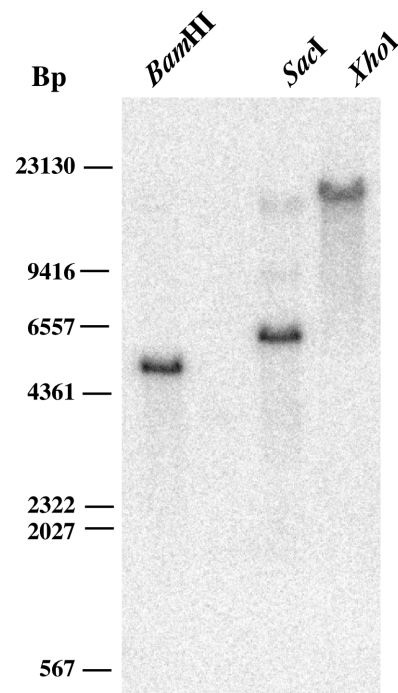


Abb. 42: Southern-Hybridisierung chromosomaler DNA von *H. halophilus* mit der *fliC*-Sonde. Chromosomale DNA von *H. halophilus* wurde einer Restriktion mit *Bam*HI, *Sac*I bzw. *Xho*I unterzogen. 15 µg der geschnittenen DNA wurden in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und gegen die radioaktiv markierte *fliC*-Sonde hybridisiert.

Um nun zu untersuchen, ob die Transkription des für das Flagellin kodierenden Gens *fliC* Cl⁻-abhängig ist, wurden Transkriptanalysen durchgeführt. Zuvor wurden Zellen in NB-Medium in Anwesenheit von 1 M NaNO₃ angezogen, und aus dieser Vorkultur (VK) wurde *H. halophilus* in NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M NaNO₃ überimpft. Im Verlauf des Wachstums wurde zu verschiedenen Zeitpunkten 1 ml Kultur durch Zentrifugation geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Abb. 43 zeigt das Ergebnis der durchgeführten Transkriptanalysen. Die Transkriptmenge von *atpD* blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant. Wie erwartet, wurde auch kein Unterschied zwischen Cl⁻- und NO₃⁻-gezogenen Zellen gefunden. Weiterhin wird deutlich, daß die Transkription von *fliC* unabhängig von der Wachstumsphase war. Lediglich in der stationären Phase zeigte sich, daß die Transkription von *fliC* zurückging, was mit den Ergebnissen der Immunoblot-Analysen übereinstimmt (s. 3.3.5). Die *fliC*-Sonde reagierte mit nur einem Transkript von ca. 1500 Bp. Diese Größe korreliert sehr gut mit der zu erwartenden Größe der mRNA von *fliC*, da das gereinigte Flagellin eine abgeleitete molekulare Masse von 47 kDa aufweist (s. 3.3.4). In Gegenwart von

Cl⁻ war die Transkriptmenge in jedem Fall erhöht. Eine densitometrische Analyse zeigte eine Stimulierung um den Faktor 2.

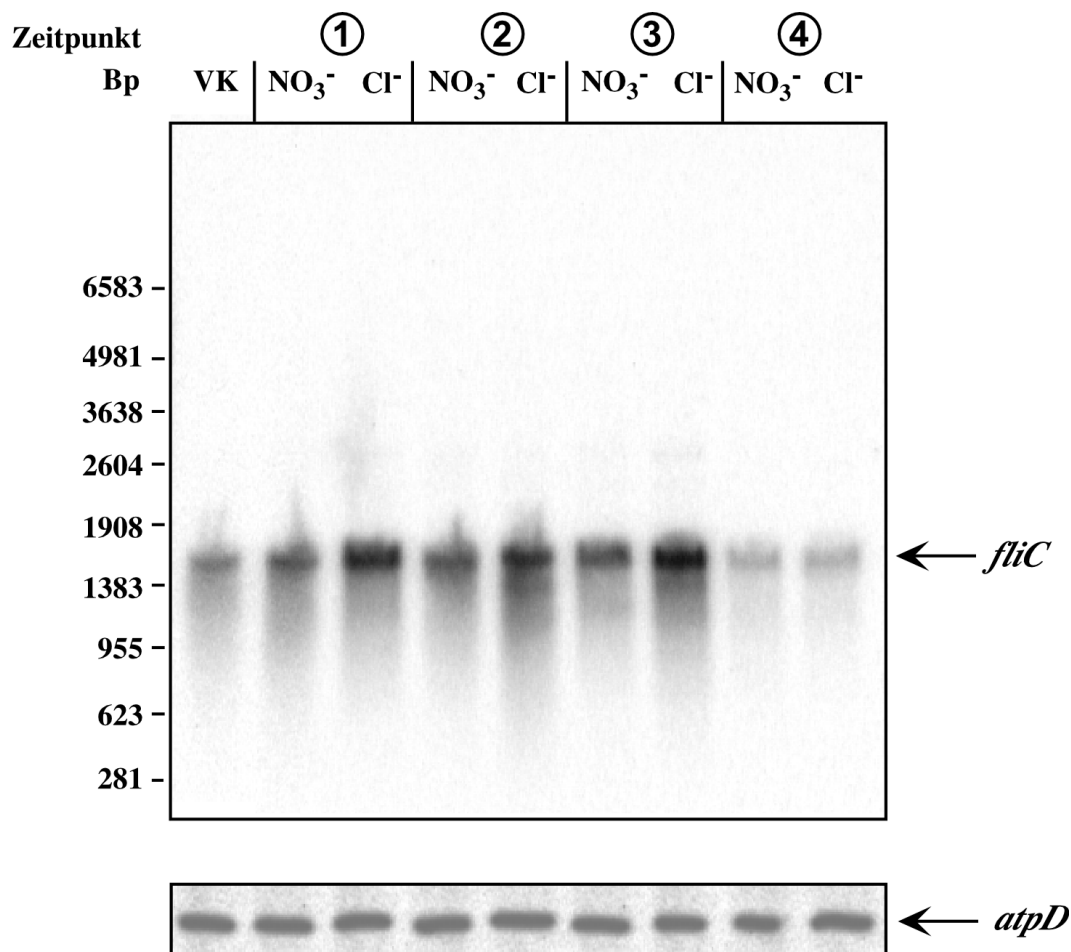


Abb. 43: Hybridisierung von Gesamt-RNA aus *H. halophilus* gegen die *fliC*- oder *atpD*-Sonde. *H. halophilus* wurde in NB-Medium mit 1 M NaNO₃ (NO₃⁻) oder 1 M NaCl (Cl⁻) angezogen, und Gesamt-RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstum isoliert. Die Zeitpunkte 1-4 entsprechen denen der Western-Blot-Analysen (s. 3.3.5, Abb. 22). 2 µg der Gesamt-RNA wurden einer Northern-Hybridisierung gegen die *fliC*- bzw. *atpD*-Sonde unterzogen. Positive Signale wurden durch eine Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die in den Northern-Blots erzielten Ergebnisse sollten durch eine weitere Methode zur Transkriptanalyse verifiziert werden. Als Methode der Wahl kam hierzu die RT-PCR zum Einsatz. Da eine Kontamination mit chromosomaler DNA das Ergebnis der RT-PCR verfälschen würde, wurde zunächst geprüft, ob sich in den RNA-Präparationen nach der DNaseI-Behandlung noch chromosomale DNA befand. Dafür wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden RTFla11 und RTFla21 durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur betrug 50°C und die

Elongationszeit 30 s. Unter diesen Bedingungen wurden 30 Zyklen durchgeführt. Ließ sich nach dieser PCR in einer Agarosegelelektrophorese kein Amplifikat nachweisen, wurde davon ausgegangen, daß die getestete RNA-Präparation keine verunreinigende chromosomale DNA mehr enthielt. Es wurde eine RT-Reaktion mit 1 µg der entsprechenden RNA als Matrize und dem Oligonukleotid RTFla11 eingesetzt wurde. Anschließend erfolgte eine PCR mit den Oligonukleotiden RTFla11 und RTFla21 unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Abb. 44 zeigt die Amplifikate dieser PCR. Mit der RT-PCR wurde in den Cl⁻-gezogenen Zellen ein Amplifikat erhalten, dessen Größe mit 390 Bp der zu erwartenden Fragmentgröße für ein *fliC*-Amplifikat entspricht. Auch mit dieser Methode ließ sich in den NO₃⁻-gezogenen Zellen ein *fliC*-Transkript nachweisen. Analog zu den Ergebnissen der Northern-Blots war die Transkriptmenge jedoch gegenüber Cl⁻-gezogenen Zellen reduziert. Zwar lassen sich mit der RT-PCR ohne interne Eichung keine Aussagen über absolute Zahlen treffen, jedoch ergeben die hier erhaltenen Ergebnisse mit den Northern-Blots ein übereinstimmendes Bild, so daß festzuhalten bleibt, daß die Transkriptmenge in Cl⁻-gezogenen Zellen deutlich erhöht ist. Allerdings ist auch in NO₃⁻-gezogenen Zellen ein *fliC*-Transkript nachzuweisen.

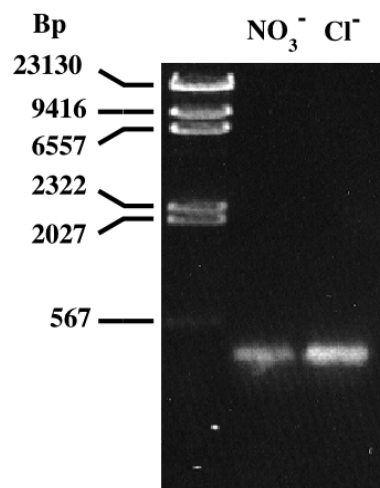


Abb. 44: Amplifikate einer RT-PCR mit Oligonukleotiden gerichtet gegen *fliC*. *H. halophilus* wurde in NB-Medium mit 1 M NaNO₃ (NO₃⁻) oder 1 M NaCl (Cl⁻) angezogen, Gesamt-RNA wurde isoliert, und 1 µg der RNA wurde einer RT-Reaktion mit dem Oligonukleotid RTFla11 unterzogen. Anschließend wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden RTFla11 und RTFla21 durchgeführt.

3.4 Identifizierung weiterer Cl⁻-abhängig synthetisierter Proteine in *H. halophilus*

H. halophilus zeigt eine Reihe von Cl⁻-abhängigen, physiologischen Prozessen wie den Betain-Transport, die Beweglichkeit und die Flagellinsynthese, deren Untersuchung bereits detailliert dargelegt wurden (s. 3.2 und 3.3). Eine Erklärung für die essentielle Bedeutung von Cl⁻ für das Wachstum von *H. halophilus* kann allerdings durch keinen der oben geschilderten Prozesse gegeben werden, der Effekt des Cl⁻ geht offensichtlich weit über diese Prozesse hinaus und scheint globaler Natur zu sein. Um weitere Anhaltspunkte für die Funktion von Cl⁻ in *H. halophilus* zu gewinnen, wurden daher Proteomanalysen mit Hilfe von 2D-gelelektrophoretischen Studien durchgeführt, um Cl⁻-induzierte Proteine zu identifizieren.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurde *H. halophilus* in 5 ml NB-Medium mit 1 M NaCl oder 1 M NaNO₃ angezogen, die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, und das Sediment wurde in 100 µl Denaturierungspuffer resuspendiert. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert, und der Überstand wurde zur isoelektrischen Fokussierung eingesetzt. Anschließend wurden die Proteine in der zweiten Dimension nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Nach Abschluß der SDS-PAGE wurden die Proteine durch Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue sichtbar gemacht. Insgesamt wurden acht Paare von Gelen, wie sie in Abb. 45 zu sehen sind, angefertigt und mit Hilfe der „2D-Master“ Software (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) analysiert. Es wurden sechs Proteine identifiziert, die in allen acht Wiederholungen in den Cl⁻ gewachsenen Zellen mindestens zweimal stärker auftraten als in Zellen, die in Gegenwart von NO₃⁻ gewachsen waren. Im Mittel traten diese Proteine in Zellen, die in Medium mit Cl⁻ gewachsen waren, zwischen 2,5 mal und 25 mal stärker auf als in Zellen, die in Gegenwart von NO₃⁻ gewachsen waren.

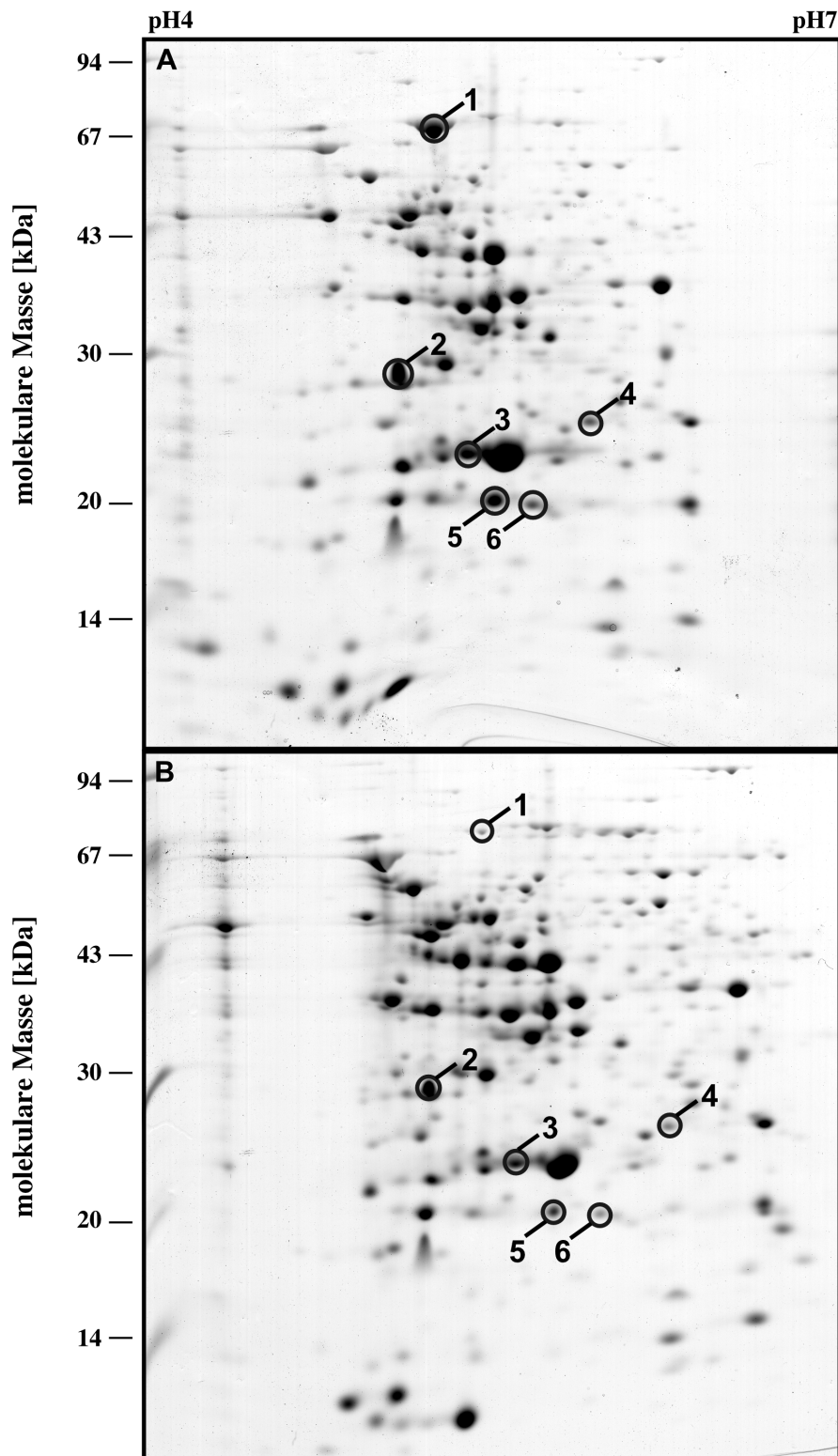


Abb. 45: Cl⁻-abhängig synthetisierte Proteine in *H. halophilus*. *H. halophilus* wurde in NB-Medium mit 1 M NaCl (A) oder 1 M NaNO₃ (B) angezogen und in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet. 120 µg Protein wurden anschließend in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 2.5.3). Markiert und nummeriert sind diejenigen Proteine, die in 8 Wiederholungen in Cl⁻-gezogenen Zellen stets mindestens 2-fach induziert waren.

In Tab. 7 sind die abgeleiteten molekularen Massen und isoelektrischen Punkte der Proteine sowie der Grad ihrer Induktion zusammengefaßt.

Tab. 7: Eigenschaften der Cl⁻-abhängig synthetisierten Proteine in *H. halophilus*. Die Daten für die molekulare Masse und den isoelektrischen Punkt wurden Abb. 38 entnommen.

Nr.	mol. Masse	IEP ¹	Induktion ²
1	73 kDa	5,2	25-fach
2	28 kDa	5,1	2,5-fach
3	21 kDa	5,4	10-fach
4	23 kDa	5,9	6-fach
5	17 kDa	5,5	3,3-fach
6	17 kDa	5,7	5-fach

¹IEP: isoelektrischer Punkt.

²angegeben ist jeweils der Mittelwert aus 8 unabhängigen Wiederholungen. Die Analyse der Gele erfolgte mit der „2D-Master“-Software.

Die N-terminale Sequenzierung der sechs zu untersuchenden Proteine wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Kellermann im MPI für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Nach Erhalt der N-terminalen Sequenzen wurde in Datenbanken nach ähnlichen Proteinen gefahndet (Tab. 8). Protein 1 ist einem abgeleiteten Protein aus *Streptomyces coelicolor* ähnlich und konnte so als Untereinheit eines ABC- (ATP-binding cassette-) Transporters identifiziert werden (REDENBACH *et al.*, 1996). Für das Protein 2 findet sich eine Übereinstimmung mit dem Protein YhfK unbekannter Funktion aus *B. subtilis*. Sequenzanalysen ergaben jedoch, daß YhfK ähnlich zur NAD-bindenden Domäne von Aspartat- und Glutamat-Semialdehyd Dehydrogenasen ist (HADFIELD *et al.*, 1999; KUNST *et al.*, 1997). Protein 3 konnte aufgrund seiner Ähnlichkeit zu SodA aus *B. subtilis* als Superoxid-Dismutase identifiziert werden (KUNST *et al.*, 1997). Die Proteine 4 und 5 zeigen beide Ähnlichkeiten zu regulatorisch aktiven Proteinen. Protein 4 ist ähnlich zu YvyD, einem Protein aus *B. subtilis*, das die Aktivität des alternativen Transkriptionsfaktors σ^L moduliert (DRZEWIECKI *et al.*,

1998). Protein 5 ist ähnlich zu LuxS aus *Helicobacter pylori*, einem Protein, das an der Biosynthese eines Autoinduktors beteiligt ist (SCHAUDER *et al.*, 2001). Die N-terminale Sequenz des Protein 6 konnte leider nicht bestimmt werden.

Tab. 8: Identifizierung der Cl-abhängig synthetisierten Proteine.

Protein	N-Terminus	ähnlich zu ¹	Organismus	Funktion
1	...ALSDIPDKYASEI...	abg. Protein	<i>S. coelicolor</i>	ABC-Transporter: ATP-bindende UE
2	MKVLVVGANGQIGKHL- VSTIQESNKLEAKAMI...	YhfK	<i>B. subtilis</i>	unbekannt
3	...AKFELPELPYAYDALE- PTIDKETM...	SodA	<i>B. subtilis</i>	Superoxid- Dismutase
4	MLQYTIRGENLEVTDSEIK- DYVEKKVVGK...	YvyD	<i>B. subtilis</i>	σ^L Modulator
5	MQMNVEVFNLDHTKVKAP...	LuxS	<i>H. pylori</i>	Autoinduktor- synthese
6	n. b.	---	---	---

¹: angegeben ist jeweils das Protein, das bei einem BLAST-Vergleich die höchste Ähnlichkeit ergab.

3.4.1 Klonierung der Gene, die für die Cl-abhängig synthetisierten Proteine YvyD und LuxS kodieren

In den vorangegangenen Experimenten konnten insgesamt 5 Cl-abhängig synthetisierte Proteine anhand ihrer N-terminalen Sequenzen und anschließenden Datenbankanalysen identifiziert werden. Zwei davon, das YvyD- und das LuxS-ähnliche Protein, waren aufgrund ihrer abgeleiteten regulatorischen Funktion von besonderem Interesse, weshalb versucht werden sollte, die für diese Proteine kodierenden Gene zu klonieren, um daran anschließend Transkriptanalysen durchführen zu können. Daher wurden aus den ermittelten N-terminalen Sequenzen und konservierten Regionen mehrerer ähnlicher Proteine degenerierte Oligonukleotide abgeleitet. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide konnten *yvyD* und *luxS* aus chromosomaler DNA aus *H. halophilus* amplifiziert werden. Das *yvyD*-Amplifikat hatte eine Größe von 239 Bp. Das Fragment wurde in pUC18 kloniert

(pMR401) und sequenziert. Abb. 46 zeigt die DNA-Sequenz des Fragments sowie die Bindestellen der eingesetzten Oligonukleotide PCip4.1 und PCip4.2c.

<u>AAGCTTTATGTAGAAAAAAGGTGGGCAAAC</u>TGGAGCGCTACTTTGATAA	50
PCip4.1	
TCCACCATCTTCTGAGGTTACGTAACCTTAAGTGTCTATAATGATGAGC	100
AGACAATCGAGGTCACAATCCAATGAAGAACCTGCTTCTTCGTGCGGAG	150
GAACACAGTACAGATTTATATGCTGCCATCGACCTTGTGGTTGATAAATT	200
GGAACGACAAATTCGTAAGCACAAAGACTAAGGT <u>AAGCTT</u>	239
PCip4.2c	

Abb. 46: DNA-Sequenz des *yvyD*-Fragments aus *H. halophilus*. Gezeigt ist die Sequenz des *Hind*III-Fragments aus pMR401. Die Bindestellen für die Oligonukleotide PCip4.1 und PCip4.2c sind unterstrichen dargestellt, die *Hind*III-Schnittstellen sind fett gedruckt.

Ein Vergleich der aus dieser Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der Sequenz von YvyD aus *B. subtilis* identifizierte das klonierte Fragment eindeutig als Teil von *yvyD* (Abb. 47).

<i>H. halophilus</i>	1	-----KLYVEKVGKLERYFDNPPSSEVHVNLSVYNDEQT-IEVTIPMK	43
<i>B. subtilis</i>	1	MNYNIRGENIEVTPALKDHVERKIGKLERYFDHSDADVNVNLFYNDKESKVEVTIPMT	60
<i>H. halophilus</i>	44	NLLLRAEHSTDLAAIDLVDKLERQIRKHKTKVS-----	79
<i>B. subtilis</i>	61	DLALRSEVHNEDMYNAIDLATNKLERQIRKHKTKVNRKRFREQGSPKYLLANGLGSDTDIA	120
<i>H. halophilus</i>	79	-----	79
<i>B. subtilis</i>	121	VQDDIEEEESLDIVRQKRFNLKPMDSSEAILQMNMLGHNFFVFTNAETNLTNVVYRRNDG	180
<i>H. halophilus</i>	79	-----	79
<i>B. subtilis</i>	181	KYGLIEPTE	189

Abb. 47: Vergleich von YvyD aus *B. subtilis* und dem YvyD-ähnlichen Protein 4 aus *H. halophilus*. YvyD_{BS} hat eine Länge von 189 Aminosäuren. Identische Aminosäuren sind schattiert dargestellt.

Für *luxS* hatte das erhaltene Amplifikat eine Größe von 357 Bp. Auch dieses Fragment wurde in pUC18 kloniert (pMR501) und sequenziert. Die dabei erhaltene Sequenz ist in Abb. 48 dargestellt. Aus der Sequenz wird deutlich, daß das Oligonukleotid pCip5.1 nicht auf seiner ganzen Länge gebunden hat. Lediglich die mit einem Punkt markierten Nukleotide stimmen mit der Sequenz von PCip5.1 überein.

<u>AAGCTT</u> TAACCTGGATCATACGAAAGTCAAAGCTCCTTATATCCGCCTTG	50
.....	
PCip5.1	
TCGGTGTAAACCGAAGGAGATAAAGGTGACAAGATCTACAAATATGATATC	100
CGTGTGGAACAGCCTAACCAGGAGCATATGGATATGCCGGCTCTTCATTC	150
CCTTGAACACCTGATGGCTGAAAACAGCCGTAATCATCACGACCGTATTA	200
TCGATATCGGTCCAATGGGCTGCCAGACAGGATTTTATCTTGCTGTATTA	250
AATGATGACAGTTATGAAAATATCTTTCAGGTTGTAGAGAACACACTGAA	300
AGACGTACTAAATGCTACAGAAGTTCAGCCTGCAACGAATACCAGTGCG	350
PCip5.2b	
<u>GAAGCTT</u>	357

Abb. 48: DNA-Sequenz des *luxS_{Hh}*-Fragments. Gezeigt ist die Sequenz des *HindIII*-Fragments aus pMR501. Die Bindestellen für die Oligonukleotide PCip5.1 und PCip5.2b sind unterstrichen dargestellt. Mit Punkten markiert sind die Nukleotide, die mit der Sequenz von PCip5.1 übereinstimmen. *HindIII*-Schnittstellen sind fett gedruckt.

Trotz dieses unspezifischen Bindens von PCip5.1 ergab ein Vergleich der aus pMR501 ableiteten Aminosäuresequenz mit LuxS aus *H. pylori*, daß das klonierte Fragment ein Teil von *luxS* aus *H. halophilus* ist (Abb. 49).

<i>H. halophilus</i>	1	-----SFNLDHTKVKAPYIRLVGVTEGDKGDKIYKYDIRVEQPNQEHMDMPALHSL	51
<i>H. pylori</i>	1	MKTPKMNVESFNLDHTKVKAPYVRVADRKKGVNGDLIVKYDVRFKQPNQDHMDMPSLHSL	60
<i>H. halophilus</i>	52	EHLMAENSRNHHDRIIDIGPMGCQTGFYLAVLNDDSYENILQVVENTLKDVLNATEVPAC	111
<i>H. pylori</i>	61	EHLVAEII RNHASVVDWSPMGCQTGFYLTVLNHDNYTEILEVLEKTMQDVLKATEVPAS	120
<i>H. halophilus</i>	112	NEYQCGS-----	118
<i>H. pylori</i>	121	NEKQCGWAANHTLEGAKDLARAFLDKRAEWSEVGV	135

Abb. 49: Vergleich von LuxS aus *H. pylori* und dem LuxS-ähnlichen Protein 5 aus *H. halophilus*. Die Aminosäuresequenz von LuxS_{Hh} wurde aus pMR501 (Abb. 41) abgeleitet. LuxS_{Hp} hat eine Länge von 135 Aminosäuren. Identische Aminosäuren sind schattiert dargestellt.

Mit den konstruierten degenerierten Oligonukleotiden PCip4.1 und PCip4.2c, bzw. PCip5.1 und PCip5.2b ist es folglich gelungen, Bereiche aus den Genen zu klonieren, die für Cl⁻-abhängig synthetisierte Proteine kodieren. Die klonierten Gene *yvyD* und *luxS* können in weitergehenden Studien als Werkzeuge eingesetzt werden.

3.5 Die Cl⁻-abhängige Osmotoleranz weiterer Bakterien

In abschließenden Untersuchungen sollte die Verbreitung einer Cl⁻-Abhängigkeit des Wachstums von Bakterien untersucht werden. Dazu wurden insgesamt 44 verschiedene, willkürlich ausgewählte Bakterienstämme, die nicht halophil sind, dahingehend untersucht. Dazu wurden Wachstumsversuche in 15-ml-Kulturröhrchen mit 5 ml LB-Medium durchgeführt (s. 2.2.4), wobei die Salzkonzentration durch entsprechende Zugabe von NaCl, Na₂SO₄ bzw. Na-Glukonat zwischen 0 und 1,5 M variiert wurde. Die Kulturen wurden von Agarplatten angeimpft und das Wachstum wurde nach 15 h Inkubation unter Schütteln bei der optimalen Wachstumstemperatur (30 bzw. 37°C) anhand der optischen Dichte beurteilt. Dabei zeigte sich, dass 25% (11 von 44) der getesteten Stämme in Cl⁻-haltigem Medium eine deutlich höhere Osmotoleranz als in SO₄²⁻- bzw. in Glukonat-haltigem Medium zeigen. Als deutlich höhere Osmotoleranz wurde bewertet, wenn die Stämme bei der angegebenen Salzkonzentration mit Cl⁻ nach 15 h eine OD₆₀₀ von über 1 erreicht hatten, während mit den beiden anderen getesteten Anionen kein Wachstum zu verzeichnen war. Tab. 9 faßt die identifizierten Stämme zusammen und listet die Salzkonzentrationen auf, ab denen der entsprechende Stamm ausschließlich in Gegenwart von Cl⁻ zum Wachstum kommt. Die entsprechenden Wachstumskurven sind im Anhang gezeigt. Die Ergebnisse dieser Experimente belegen eindeutig, daß die Osmotoleranz von Bakterien in einem Viertel der daraufhin untersuchten Stämme eine Cl⁻-Abhängigkeit zeigt, Cl⁻ folglich eine essentielle Funktion bei der Reaktion auf hyperosmotische Bedingungen zugesprochen werden muß.

Tab. 9: Die Cl⁻-abhängige Osmotoleranz verschiedener Bakterien. Angegeben ist jeweils die Art und die Salzkonzentration, ab der Wachstum ausschließlich in Cl⁻-haltigem Medium zu beobachten war, während mit SO₄²⁻ bzw. Glukonat kein Wachstum mehr stattfindet sowie die maximal tolerierte NaCl-Konzentration.

Art ¹	lim. Salzkonz. [M] ²	max. NaCl-Konz. [M] ³
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,5	1,5
<i>Bacillus megaterium</i>	1,2	1,2
<i>Bacillus subtilis</i>	1,2	1,2
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1,2	1,5
<i>Escherichia coli</i>	1,2	1,2
<i>Paracoccus denitrificans</i>	0,4	0,8
<i>Proteus mirabilis</i>	1,5	1,5
<i>Proteus vulgaris</i>	1,2	1,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5	1,5
<i>Thermus thermophilus</i>	0,4	0,4
<i>Vibrio fischeri</i>	0,8	1,5

¹bei folgenden Arten wurde keine Cl⁻-Abhängigkeit festgestellt: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Burkholderia cepacia*, *Cellulomonas flavigena*, *Citrobacter freundii*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Hydrogenophaga palleronii*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria grayi*, *Micrococcus lylae*, *Mycobacterium phlei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia eutropha*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosum*, *Xanthomonas campestris*, *Zoogloea ramigera*.

²lim. Salzkonz.: limitierende Salzkonzentration, ab der Wachstum ausschließlich in Cl⁻-haltigem Medium auftritt.

³max. NaCl-Konz.: maximale NaCl-Konzentration, bei der der jeweils angegebene Stamm Wachstum zeigt.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Cl^- im Stoffwechsel von *H. halophilus* detailliert untersucht. Während eine Funktion von Cl^- in der primären Bioenergetik ausgeschlossen werden konnte, wurde mit dem Transport von Betain ein weiterer Cl^- -abhängiger, physiologischer Vorgang in *H. halophilus* entdeckt. Des weiteren wurde gezeigt, daß die Synthese des Flagellins (und damit die Beweglichkeit) sowie weiterer Proteine Cl^- -abhängig ist. Damit drängt sich die Vermutung auf, daß Cl^- an globalen Regulationen, die mit der Wahrnehmung der Osmolarität in Zusammenhang stehen, beteiligt ist. Im Folgenden sollen mögliche Funktionen von Cl^- bei den identifizierten spezifischen physiologischen Vorgängen diskutiert werden. Diese Diskussion kulminiert dann in einem Vorschlag zur molekularen Basis der Cl^- -Abhängigkeit von *H. halophilus*.

4.1 Cl^- als alternatives Kopplungsign

Nach der chemiosmotischen Theorie (MITCHELL, 1961) wird die bei einer chemischen Reaktion freiwerdende Energie zum Transport von Ionen über die Cytoplasmamembran der Bakterien genutzt. Klassischerweise wird dadurch ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut, welcher sich aus einer elektrischen Komponente einerseits und einer chemischen Komponente andererseits zusammensetzt und sich mit folgender Gleichung beschreiben läßt:

$$\frac{\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}}{F} = \Delta\psi - 2,3 \frac{R \times T}{F} \times \Delta\text{pH}$$

Die energieliefernde chemische Reaktion kann eine Redoxreaktion, eine Decarboxylierung, ein Methylgruppen-Transfer oder ATP-Hydrolyse sein. Das zu transportierende Ion ist dabei das Proton, aber in der letzten Dekade wurde gezeigt, daß eine Reihe von Bakterien auch Na^+ als Kopplungsign nutzen, und kürzlich gab es die Vermutung, daß auch Cl^- als primäres Kopplungsign genutzt werden kann. In jedem Fall wird der elektrochemische Gradient des

Kopplungsions als Triebkraft für endergone chemische (ATP-Synthese), osmotische (Stofftransport) und mechanische Arbeit (Flagellenrotation) genutzt.

Unter bestimmten Bedingungen kann es für Prokaryonten vorteilhaft sein, nicht Protonen als Kopplungsion zu verwenden. Dies kann u. a. bei erhöhten Temperaturen, bei denen die Permeabilität der Membran für Protonen erhöht ist, unter alkalischen Bedingungen oder an energiearmen, säurereichen, anaeroben Standorten der Fall sein (SKULACHEV, 1994). Am häufigsten findet sich in diesen Fällen Na^+ als alternatives Kopplungsion. So haben *Propionigenium modestum* und *Acetobacterium woodii* ihre primäre Bioenergetik komplett auf Na^+ umgestellt. *P. modestum* wächst mit Succinat als einziger C- und Energiequelle und scheidet dabei Propionat und CO_2 als Endprodukte aus. Im Rahmen dieses Stoffwechselwegs kann keine Substratkettenphosphorylierung stattfinden, so daß der Aufbau eines primären Na^+ -Gradienten durch die Methylmalonyl-CoA Decarboxylase der einzige energiekonservierende Schritt ist (HILPERT *et al.*, 1984). *A. woodii* ist bei autotrophem Wachstum auf $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ strikt Na^+ -abhängig (HEISE *et al.*, 1989), und detaillierte Untersuchungen zur Na^+ -Translokation führten zu der Vermutung, daß diese durch die Methyl-THF:Co/FeS-P-Methyltransferase katalysiert wird (HEISE *et al.*, 1993; HEISE *et al.*, 1989). Auch wenn ein direkter Nachweis hierfür bisher fehlt, wird diese Annahme durch den Befund gestützt, daß in methanogenen *Archaea* Na^+ -translozierende Methyltransferasen nachgewiesen wurden (MÜLLER *et al.*, 1988; BECHER *et al.*, 1992a; BECHER *et al.*, 1992b). Genutzt wird dieser Na^+ -Gradient über Na^+ -abhängige ATP-Synthasen (HEISE *et al.*, 1993; LAUBINGER und DIMROTH, 1988; REIDLINGER und MÜLLER, 1994) sowie für den Antrieb der Flagellenrotation (MÜLLER und BOWIEN, 1995).

Methanogene Archäen wachsen strikt anaerob auf einer Reihe von Substraten wie Methanol, Acetat, Methylamin und auch $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ und produzieren dabei Methan. Im Rahmen der Methanogenese ist keine der stattfindenden Reaktionen an eine Substratkettenphosphorylierung gekoppelt, was bedeutet, daß ATP über einen chemiosmotischen Mechanismus generiert werden muß (BLAUT und GOTTSCHALK, 1984). Der dafür benötigte Gradient wird einerseits durch die

Translokation von Protonen durch die Heterodisulfidreduktase (DEPPENMEIER *et al.*, 1990; DEPPENMEIER *et al.*, 1991; DEPPENMEIER *et al.*, 1996), aber auch durch eine Methyltransferase, die Na⁺ transloziert (BECHER *et al.*, 1992a; BECHER *et al.*, 1992b; MÜLLER *et al.*, 1988) generiert. Ob dieser primäre Na⁺-Gradient direkt zur ATP-Synthese genutzt oder über einen Na⁺/H⁺-Antiporter in einen Protonengradienten umgewandelt wird, ist nach dem heutigen Kenntnisstand noch nicht geklärt.

Weiterhin finden sich primäre Na⁺-Gradienten in marinen *Vibrio*-Arten, in denen bei aerobem Wachstum der primäre Na⁺-Gradient durch die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase generiert wird (TOKUDA und UNEMOTO, 1981; TOKUDA und UNEMOTO, 1984). Hier, wie auch in alkaliphilen *Bacilli*, wird der Na⁺-Gradient zum Antrieb des Flagellums genutzt (ATSUMI *et al.*, 1992; DIBROV *et al.*, 1986; HIROTA *et al.*, 1981; KAWAGISHI *et al.*, 1996; KOJIMA *et al.*, 1999).

Neben diesen ausführlich dargestellten Na⁺-abhängigen Prozessen finden sich zudem ein Serin/Threonin-Transporter in *E. coli* (HAMA *et al.*, 1987) und ein Citrat-Transporter in *Klebsiella pneumoniae* (VANDERREST *et al.*, 1992), die mit Na⁺ als Kopplungsignale arbeiten, und eine vollständige Auflistung aller Prozesse würde den Rahmen dieser Diskussion bei weitem überschreiten, was deutlich macht, daß die Nutzung von Na⁺ als Kopplungsignale keineswegs eine spezielle Besonderheit einer kleinen Gruppe von Organismen ist.

Neben Na⁺ wird im Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* eine Rolle von Ca²⁺ als bioenergetisches Kopplungssignal diskutiert (SKULACHEV, 1999), wobei detaillierte Untersuchungen zu diesem Befund noch ausstehen.

Analog zu den beschriebenen Mechanismen der Nutzung eines transmembranen elektrochemischen Protonen- oder Na⁺-Gradienten ist es ebenfalls denkbar, daß ein Cl⁻-Gradient für bioenergetische Vorgänge genutzt wird. Aufgrund der Polarisierung der Membran ergibt sich für ein Anion dabei ein reziprokes Bild, d.h. der Gradient würde durch den energieaufwendigen Transport von Cl⁻ ins Cytoplasma generiert und eine ATP-Synthese müßte in diesem Fall an einen Cl⁻-Efflux gekoppelt sein. Ein derartiger Mechanismus wurde für *Natronobacterium pharaonis* postuliert. Dabei wird Lichtenergie genutzt, um *via*

Halorhodopsin Cl^- im Cytoplasma zu akkumulieren (BIVIN und STOECKENIUS, 1986) (s. 1.2.1) und damit ein $\Delta\psi$ zu generieren. In *N. pharaonis* wurde eine Cl^- -abhängige ATP-Synthese nachgewiesen (AVETISYAN *et al.*, 1998). Da auch für *H. halophilus* gezeigt wurde, daß Cl^- über einen bislang unbekanntem Mechanismus akkumuliert wird und der Organismus zudem Cl^- -abhängig wächst (ROEBLER und MÜLLER, 1998), war es denkbar, daß auch in diesem Organismus Cl^- als alternatives Kopplungsign genutzt wird. Als potentieller Mechanismus zur intrazellulären Akkumulation wäre in diesem Fall ein Cl^- -abhängiger Elektronentransport denkbar. Des weiteren wurde kürzlich in zahlreichen, nicht kultivierbaren marinen Organismen aus der Gruppe der γ -Proteobakterien ein Protein nachgewiesen, das große Ähnlichkeiten zu archaischen Rhodopsinen hat und als Proteorhodopsin bezeichnet wurde (BEJA *et al.*, 2000). Da heterolog produziertes Proteorhodopsin einen lichtgetriebenen Protonentransport katalysiert, wird für Bakterien, die dieses sogenannte Proteorhodopsin besitzen, die Fähigkeit zu photoheterotrophem oder sogar bisher unbekanntem photoautotrophen Wachstum postuliert. Auch *H. halophilus* stammt aus einem marinen Habitat und ist zudem charakteristisch orange pigmentiert, so daß ein lichtgetriebener Cl^- -Import *via* einem rhodopsinähnlichen Protein denkbar wäre. Alle im Rahmen dieser und vorausgegangener Arbeiten (ROEBLER, 1997) durchgeführten Experimente lieferten jedoch weder Hinweise darauf, daß Cl^- an der Generierung von $\Delta\psi$ oder ΔpH , noch an der ATP-Synthese beteiligt ist. Damit kann eine Rolle von Cl^- als alternatives Kopplungsign in *H. halophilus* ausgeschlossen werden.

4.2 Cl^- -abhängige Transportsysteme

In Eukaryonten wurde eine Reihe von Transportern beschrieben, für die Cl^- essentiell ist (s. 1.1). Schon 1972 konnte eine Cl^- -Abhängigkeit des Glycin-Transports in Erythrocyten gezeigt werden (IMLER und VIDAVER, 1972), und weiterführende Studien zeigten, daß dieser Effekt auf einen Cotransport von Na^+ , Cl^- und Glycin zurückzuführen ist (KING und GUNN, 1989). Auch in Zellen des zentralen Nervensystems (KANNER und SCHULDINER, 1987; KEYNAN und

KANNER, 1988) und in Nierenepithelzellen (TURNER, 1986) wurde ein Cl⁻-abhängiger Transport von Aminosäuren beschrieben. Besonders gut charakterisiert sind Cl⁻-abhängige Transportvorgänge im Dünndarmgewebe verschiedener Säuger. So findet sich ein Na⁺- und Cl⁻-abhängiger Transporter mit einer hohen Affinität für Taurin und β-Alanin im Dünndarmgewebe von Meerschweinchen, Kaninchen, Schwein, Ratte und auch des Menschen (MUNCK, 1997), so daß davon ausgegangen werden kann, daß es sich hierbei um ein allgemeingültiges Prinzip handelt. Des weiteren findet sich im Dünndarmgewebe von Kaninchen und Mensch ein ebenfalls Na⁺- und Cl⁻-abhängiges Transportsystem, das spezifisch für β-Alanin, Lysin sowie kationische und bipolare Aminosäuren ist (MUNCK, 1985; MUNCK, 1995). Für den 2-Methyl-Aminoisobutyrat- (MeAIB-) Transport im Rattendünndarm wurde gezeigt, daß sich die Transportraten sowohl durch Na⁺ bei konstanter Cl⁻-Konzentration als auch durch Cl⁻ bei konstanter Na⁺-Konzentration stimulieren lassen (MUNCK und MUNCK, 1990). Die Stöchiometrie dieses Transports wurde mit 2 Na⁺ : 1 Cl⁻ : 1 MeAIB bestimmt (MUNCK, 1993).

Ähnliche Beobachtungen eines Na⁺- und Cl⁻-abhängigen Transports wurden für Neurotransmitter wie γ-Aminobutyrat (GABA) gemacht. Der GABA-Transporter aus dem Rattenhirn gilt als Prototyp der wachsenden Familie von Na⁺/Cl⁻-Neurotransmitter-Transportern (GUASTELLA *et al.*, 1990; NELSON, 1998). Zu dieser Familie gehört auch ein Betain-Transporter, der in verschiedenen Geweben von Hunden gefunden wurde (YAMAUCHI *et al.*, 1992), ein Glycin-Transporter aus Maus (LIU *et al.*, 1992) und Ratte (LIU *et al.*, 1993) und sogar in den Genomen von Prokaryonten wie *Methanococcus jannaschii* (BULT *et al.*, 1996) und *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN *et al.*, 1995) finden sich ähnliche Gene.

In *H. halophilus* wurde ebenfalls ein Transportsystem für Betain detektiert, welches neben Cl⁻ auch durch Na⁺ in seiner Aktivität stimuliert wird. Dieser Befund ist für Prokaryonten bisher einzigartig. Ein denkbarer Mechanismus für diesen Transport wäre ein Na⁺/Cl⁻/Betain-Symport, wie er ähnlich für MeAIB beschrieben wurde. Bei diesem Transporter geht man davon aus, daß Cl⁻ als erstes

an das Protein bindet, dadurch die Affinität für Na^+ erhöht wird (KING und GUNN, 1989) und letztendlich das Substrat gebunden wird. Es wird daher vermutet, daß die Cl^- -Abhängigkeit auf diese regulatorische Funktion zurückzuführen ist und nicht auf einen Effekt von Cl^- auf $\Delta\psi$, auch wenn Cl^- bei diesem Transport als Co-Substrat fungiert (MUNCK, 1995). In *H. halophilus* kann über die Stöchiometrie des Transports bisher keine Aussage getroffen werden. Einerseits wäre es denkbar, daß 2 Na^+ und 1 Cl^- pro Betain transportiert werden, wobei der Na^+ -Gradient die Triebkraft darstellen würde. Bei einem elektroneutralen 1 Na^+ /1 Cl^- /Betain-Symport müßte ATP-Hydrolyse als Triebkraft postuliert werden. Dies würde zum einen die kinetischen Daten zum Betain-Transport erklären, die auf einen primären Transporter hindeuten, und zum anderen einen möglichen Mechanismus für die Cl^- -Akkumulation in *H. halophilus* darstellen.

Festzuhalten bleibt in jedem Fall, daß Cl^- den Betain-Transport in *H. halophilus* stimuliert. Ob die Funktion von Cl^- dabei rein regulatorisch ist oder ob Cl^- zusätzlich als Co-Substrat fungiert, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Weiterführende Studien zur Charakterisierung des Cl^- -abhängigen Betain-Transports in *H. halophilus* werden zum Ziel haben, die molekulare Grundlage der Stimulierung der Transportaktivität durch Cl^- zu ergründen und festzustellen, ob das entsprechende Transportsystem in die oben beschriebene Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Transporter gehört. Zur detaillierten Untersuchung dieser Fragestellung sollte(n) im Rahmen dieser Arbeit das Gen (die Gene) für das Cl^- -abhängige Betain-Transportsystem aus *H. halophilus* kloniert werden. Leider ist es jedoch nicht gelungen, *E. coli* MKH13 mit den für den Betain-Transporter kodierenden Genen aus *H. halophilus* zu komplementieren. Dafür kann es mehrere Ursachen geben. Eine davon wäre, daß in keinem Fall das komplette Operon, das für den Betain-Transporter aus *H. halophilus* kodiert, kloniert und anschließend transformiert wurde. Des weiteren ist es denkbar, daß eines der konstruierten Plasmide aus der Genbank zwar das komplette Operon trägt, dieses jedoch in bezug auf den Promotor in der falschen Orientierung vorliegt. Sollte das gesuchte Operon auf einem großem DNA-Fragment vorliegen, bestünde die

Möglichkeit, daß die Transkription der entsprechenden Gene nicht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors von pUC18 liegt, sondern unter der Kontrolle des nativen Promotors. In diesem Fall wäre es denkbar, daß das Operon in *E. coli* MKH13 z. B. aufgrund eines nicht vorhandenen spezifischen Transkriptionsfaktor nicht transkribiert wird. Da davon auszugehen ist, daß die Gene für den unter Hochsalzbedingungen induzierten Betain-Transporter ebenfalls unter der Kontrolle einer Cl⁻-abhängigen Stressantwort in *H. halophilus* liegen (s. u.), ist diese Hypothese als am wahrscheinlichsten anzusehen. Allerdings können auch auf der Proteinebene Probleme aufgetreten sein, die eine erfolgreiche Komplementation verhindert haben. So kann nicht ausgeschlossen werden, daß zwar das Operon in *E. coli* MKH13 korrekt transkribiert wird, das komplette Protein jedoch nicht funktionell assembliert werden kann. Auch in dem Fall, daß die Transportaktivität des Proteins durch die Cl⁻ stimuliert wird, ist es denkbar, daß diese Aktivierung im heterologen System nicht stattfinden kann und deshalb kein Betain-Transport stattfindet.

4.3 Der bakterielle Flagellenapparat

Da an natürlichen Standorten das Vorkommen an Nährstoffen begrenzt ist, haben sich verschiedenste Arten von Bakterien gegenüber konkurrierenden Organismen einen Vorteil verschafft, indem sie die Fähigkeit entwickelt haben, sich auf festen und in flüssigen Medien zu bewegen. Diese Beweglichkeit erfolgt durch einen Taxis genannten Vorgang gerichtet auf einen Attraktanten (z. B. Nährstoffe) zu oder von einem Repellent (z. B. toxische Substanzen) fort (BERG und BROWN, 1972; LARSEN *et al.*, 1974a; LARSEN *et al.*, 1974b; MACNAB und KOSHLAND, 1972). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Cl⁻-Abhängigkeit der Beweglichkeit eines Prokaryonten gezeigt. Diese Abhängigkeit war auf eine Cl⁻-Abhängigkeit der Flagellinsynthese zurückzuführen.

4.3.1 Struktur des Flagellums

Bakterien können sich durch Gleiten, Schwärmen, Schnappen oder Schwimmen bewegen. Am besten charakterisiert ist die Schwimmbewegung in *E.*

coli oder *Salmonella typhimurium*. Hierbei läßt sich im Lichtmikroskop beobachten, daß die Bakterien eine geradlinige Schwimmbewegung zeigen, die von taumelnden Phasen unterbrochen wird. Vermittelt wird diese Beweglichkeit durch ein membranintegriertes Organell, das Flagellum, welches aus einem extrazellulären Filament besteht, das über einen Basalkörper in der Membran integriert ist (MACNAB, 1992). Dieses Filament hat einen Durchmesser von ca. 20 nm und eine Länge, die die Zellen um ein Vielfaches übertrifft (5 bis 10 μm). Grundsätzlich läßt sich das bakterielle Flagellum grob in drei Elemente gliedern (Abb. 50): Das Filament, den Haken und den Basalkörper, wobei letzterer die gesamte Zellhülle durchspannt und die komplexeste der drei Strukturen darstellt. Der Basalkörper besteht aus einem Stab, der sich aus vier verschiedenen Proteinen zusammensetzt (FlgB, FlgC, FlgF und FlgG) (AIZAWA *et al.*, 1985) und um den bei *E. coli* 3 Ringstrukturen gruppiert sind. Der MS-Ring, der 2 elektronenmikroskopisch unterscheidbare Strukturen bildet (früher M- und S-Ring) ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert, der P-Ring im Peptidoglycan und der L-Ring in der Lipopolysaccharidschicht (DEPAMPHILIS und ADLER, 1971a; DEPAMPHILIS und ADLER, 1971b). Der MS-Ring wird aus einem einzigen Protein, FliF, aufgebaut und umschließt einen Hohlraum, der Komponenten des Export- und Assemblierungsapparats beinhaltet (FAN *et al.*, 1997; MINAMINO und MACNAB, 1999). Der P- und der L-Ring bestehen aus zwei Proteinen, FlaY und FlaM (JONES *et al.*, 1987). Jenseits der äußeren Membran beginnt der Haken, bestehend aus FlgE, der die Verbindung zwischen Basalkörper und Filament herstellt. Zwischen Haken und Filament sowie an der Spitze des Filaments finden sich außerdem die sogenannten Haken-assoziierten Proteine (HAP1-3). Das Filament selbst setzt sich in aller Regel nur aus einem einzelnen Protein (FliC) zusammen, welches auch als Flagellin bezeichnet wird, wenn auch in einzelnen Bakterien mehrere unterschiedliche Flagelline nachgewiesen wurden (JOYS, 1988).

An der cytoplasmatischen Seite schließt sich an den MS-Ring der sogenannte C-Ring (DRIKS und DEROSIER, 1990; KHAN *et al.*, 1992; KHAN *et al.*, 1991) an, bestehend aus FliG, FliM und FliN (FRANCIS *et al.*, 1992; FRANCIS *et al.*, 1994; LUX *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 1996a; ZHAO *et al.*, 1996b). Der C-Ring ist am

Flagellenantrieb und am Export von Proteinen beteiligt. Des Weiteren stellt er die Verbindung zur Signaltransduktionskette der Chemotaxis dar (IRIKURA *et al.*, 1993; SOCKETT *et al.*, 1992). In der Cytoplasmamembran befinden sich außerdem die sogenannten Mot-Komplexe, die sich aus MotA und MotB zusammensetzen und die den MS- sowie den C-Ring umschließen (KHAN *et al.*, 1988; STOLZ und BERG, 1991).

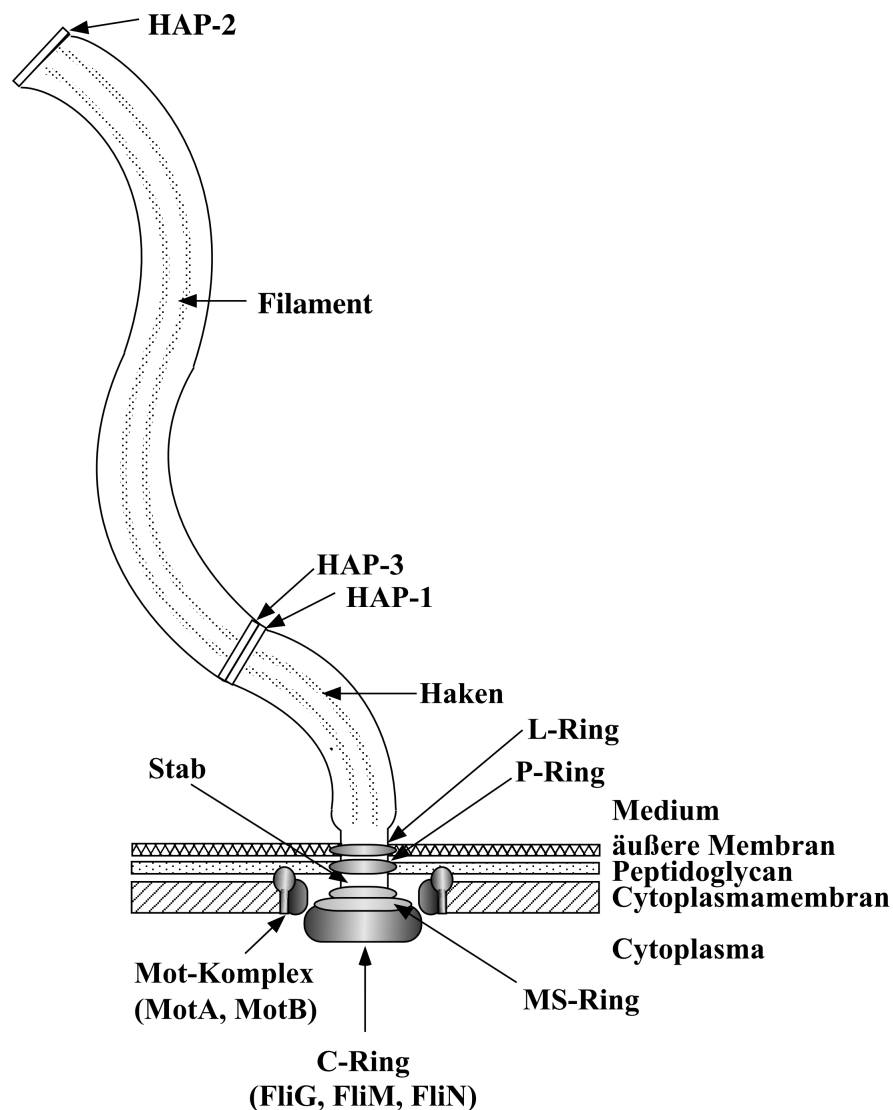


Abb. 50: Schematische Darstellung des Flagellums aus *E. coli* (modifiziert nach MACNAB, [1992]).

4.3.2 Die genetische Organisation und Expression der Flagellengene

Bereits aus dieser stark vereinfachten Darstellung des bakteriellen Flagellenapparats wird deutlich, daß es sich beim Flagellum um eine hochkomplexe Struktur handelt, dessen Synthese einer strikten und gut kontrollierten Regulation unterliegen muß. Detaillierte Studien wurden bisher in erster Linie in den Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *S. typhimurium* sowie in Gram-positiven bei *B. subtilis* durchgeführt. In *E. coli* liegen die beteiligten Gene in vier chromosomalen Regionen (SILVERMAN und SIMON, 1973) und 15 Operonen (BERRY und ARMITAGE, 1999) vor. Während Region I Gene umfaßt, die für strukturelle Komponenten des Flagellums kodieren, beinhaltet Region II Gene, die Proteine des Chemotaxis-Apparats, des Mot-Komplexes und regulatorische Proteine kodieren. In den Regionen IIIa und IIIb finden sich Gene für die Strukturproteine des Filaments einerseits sowie regulatorische Proteine andererseits (MACNAB, 1992). In *B. subtilis* finden sich die entsprechenden Gene dagegen in fünf chromosomalen Regionen. Dabei umfaßt die *fla/che*-Region (ORDAL *et al.*, 1983) die Gene für die regulatorischen Komponenten, für die Chemotaxis-Proteine sowie für verschiedene strukturelle Komponenten, welche alle in einem einzigen Operon liegen (ZUBERI *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu *E. coli* existiert in *B. subtilis* eine eigenständige *mot*-Region für die Gene des Mot-Komplexes (MIREL *et al.*, 1992). Die *cheR*- und die *sin*-Region umfassen jeweils einzelne Gene, die für Komponenten des Chemotaxis-Systems kodieren (ORDAL *et al.*, 1993). In der *hag*-Region liegen die Gene für das Flagellin und die Haken-assoziierten Proteine, wobei das Gen für das Flagellin (*fliC*) als monocistronische mRNA transkribiert wird (MIREL und CHAMBERLIN, 1989).

Die Expression der Gene, die in *E. coli* für den Flagellenapparat kodieren, unterliegt einer strengen Hierarchie, und die entsprechenden Operone lassen sich in vier Klassen einteilen (Klasse 1, 2, 3a und 3b). Das einzige Klasse 1-Operon ist das sogenannte „Master-Operon“ bestehend aus den Genen *flhC* und *flhD*, das sich in der Region II befindet. Die Produkte dieser beiden Gene sind absolut essentiell für die Expression aller anderen Gene des Flagellen-Regulons (BARTLETT *et al.*, 1988). Die Transkription von *flhC* und *flhD* wird unabhängig

voneinander sowohl durch zyklisches AMP (cAMP) über das cAMP/CAP-System (SILVERMAN und SIMON, 1974), als auch durch das „histone-like-nucleoid-structuring“-Protein (H-NS) (BERTIN *et al.*, 1994) stimuliert. Beide Systeme dienen dazu, Umweltreize wie Nährstoffmangel, Salz-, pH- oder Temperaturstress zu integrieren und die Transkription der entsprechenden Gene zu regulieren (ATLUNG und INGMER, 1997; BUSBY, 1996). In anderen Organismen wird die Expression der Gene zur Flagellumsynthese durch diverse andere Effektoren induziert. So ist bekannt, daß in *Serratia liquefaciens* die Induktion des Schwärmens, welches durch eine Hyperflagellierung hervorgerufen wird, über einen „Quorum sensing“-Mechanismus erfolgt (EBERL, 1999; LINDUM *et al.*, 1998). Des weiteren wurde gezeigt, daß auch spezifische Moleküle die Synthese von Flagellen auslösen können, wie z.B. Nikotinsäure in dem pathogenen Organismus *Bordetella bronchiseptica* (AKERLEY *et al.*, 1992).

Die Transkription aller Klasse 2-Operone wird durch FlhC und FlhD positiv reguliert, wobei der Mechanismus der Aktivierung noch ungeklärt ist. Sequenzähnlichkeiten zu alternativen σ -Faktoren, insbesondere zum Flagellum-spezifischen σ^D aus *B. subtilis*, legen die Vermutung nahe, daß FlhD in Kombination mit FlhC ebenfalls als alternativer σ -Faktor wirkt (HELMANN *et al.*, 1988). Für diese Hypothese liegen jedoch bisher keine experimentellen Evidenzen vor.

Zu einem Klasse 2-Operon gehört auch *fliA*, welches für einen Flagellum-spezifischen alternativen σ -Faktor kodiert, unter dessen Kontrolle die Transkription der Klasse 3a- und 3b-Operone liegt (ARNOSTI und CHAMBERLIN, 1989; Ohnishi *et al.*, 1990). Zusätzlich kann die Transkription der Klasse 3a-Operone in der Abwesenheit von FliA durch FlhC und FlhD stimuliert werden (Iino, 1985), was sie von den Klasse 3b-Operonen unterscheidet. Auch das Gen für das Flagellin (*fliC*) ist ein Klasse 3b-Gen, welches FliA-abhängig als letztes der Flagellengene transkribiert wird.

Die Aktivität des Flagellum-spezifischen σ -Faktors FliA wird von dem anti- σ -Faktor FlgM negativ reguliert (GILLEN und HUGHES, 1991; OHNISHI *et al.*, 1992). Die Kontrolle des intrazellulären FlgM-Gehalts erfolgt bemerkenswerterweise

über den Fortschritt der Assemblierung, da FlgM über den funktionell assemblierten Haken-Basalkörper-Komplex exportiert wird (HUGHES *et al.*, 1993). Durch diesen Mechanismus wird gewährleistet, daß die Gene für die später assemblierten strukturellen Komponenten des Flagellums, insbesondere für das Flagellin (*fliC*), erst transkribiert werden, wenn der Haken-Basalkörper-Komplex funktionell assembliert wurde.

In *B. subtilis* findet sich eine ähnliche Hierarchie der Expression der Flagellengene, wobei allerdings anders als in Enterobakterien kein „Master-Operon“ nachgewiesen werden konnte. Statt dessen steht die Transkription der Flagellengene unter der Kontrolle des alternativen σ -Faktors σ^D (FREDRICK und HELMANN, 1994; MIREL und CHAMBERLIN, 1989; MIREL *et al.*, 1992). Ebenso wie in Enterobakterien findet sich ein anti- σ -Faktor, FlgM, dessen Transkription unter der Kontrolle von σ^D steht und der ebenfalls über den Haken-Basalkörper-Komplex sekretiert wird (MIREL *et al.*, 1994).

Von besonderem Interesse ist die Transkription und Expression des Flagellins. In *B. subtilis* wurde gezeigt, daß die σ^D -abhängige Transkription von *fliC* gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase in Komplexmedium zunimmt und ihren Höhepunkt beim Eintritt in die stationäre Phase erreicht (MIREL und CHAMBERLIN, 1989). Weiterführende Studien legten den Schluß nahe, daß der Mangel an einer oder mehrerer Aminosäuren das Signal für dieses Transkriptionsmuster darstellt (MIREL *et al.*, 2000) und daß die Transduktion des Signals über CodY, einem Protein, das an der Reaktion auf Nährstoffmangel beteiligt ist (FERSON *et al.*, 1996; FISHER *et al.*, 1996), erfolgt.

Für *H. halophilus* wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß die Expression des Flagellins Cl⁻-abhängig ist. Die Transkription von *fliC* war in Gegenwart von Cl⁻ deutlich stimuliert, aber in dessen Abwesenheit nicht vollkommen abgeschaltet. Gleichzeitig wurde die Produktion des Flagellins durch Cl⁻ drastisch induziert. Kürzlich durchgeführte Studien mit *E. coli*-Mutanten könnten diesen Effekt erklären (SOUTOURINA *et al.*, 1999). Diese Mutanten wiesen Deletionen im *hns*- oder im *crp*-Gen auf. Das bedeutet, daß den Zellen entweder das H-NS-Protein oder das CAP („catabolite activator protein“) fehlt. Beide Moleküle sind jeweils

zentral an der Signaltransduktion in *E. coli* beteiligt. H-NS reguliert die Expression einer Reihe von Genen als Reaktion auf Umweltbedingungen wie pH-Wert oder Temperatur (ATLUNG und INGMER, 1997). CAP gehört zum cAMP/CAP-Komplex, welcher an der Signaltransduktion als Reaktion auf Nährstoffmangel beteiligt ist (BUSBY, 1996). *hns*- und *crp*-Mutanten sind vollkommen unbeweglich (BERTIN *et al.*, 1994; SILVERMAN und SIMON, 1974). Molekulare Analysen dieses Phänotyps ergaben, daß in den entsprechenden Mutanten im Zellextrakt kein FliC nachzuweisen sowie die Transkriptmenge für *fliC* drastisch reduziert war, die Transkription von *fliC* jedoch nicht vollkommen gestoppt wurde (SOUTOURINA *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse sind den in dieser Arbeit gemachten Befunden zur Cl⁻-abhängigen Flagellensynthese in *H. halophilus* sehr ähnlich, was darauf hindeutet, daß der Mangel an Cl⁻ möglicherweise die Unterbrechung der entsprechenden Signaltransduktionskette bewirkt. Die Ergebnisse der Studien zur Beweglichkeit von *H. halophilus* legen folglich den Schluß nahe, daß Cl⁻ in einer bisher noch nicht bekannten Form als Signalmolekül fungiert.

4.4 Die bakterielle Stressantwort

Alle Organismen sind an ihrem natürlichen Standort mit ständig wechselnden Umweltbedingungen konfrontiert, wobei Nährstoffmangel, schwankende Temperaturen und pH-Werte sowie hohe Salzkonzentrationen einen fortwährenden Stress für die Zelle bedeuten. Aus diesem Grund existieren in jedem Organismus eine ganze Reihe von signaltransduzierenden und regulatorischen Mechanismen, die es ermöglichen, sich schnell und effektiv auf die sich verändernden Umweltbedingungen einzustellen. Bemerkenswerterweise deuten alle bisher durchgeführten Studien zur Reaktion von Prokaryonten auf Umweltstress darauf hin, daß auf die unterschiedlichen Formen von Stress nicht ausschließlich mit einem jeweils spezifischen System reagiert wird, sondern daß die verschiedenen Stressbedingungen und damit notwendigerweise ebenfalls verschiedenen primären Signale eine generelle Stressantwort auslösen, die den

Zellen eine umfangreiche Stressresistenz verleiht. Grundsätzlich gilt, daß die spezifische Stressantwort die Reparatur von durch den Stress hervorgerufenen Schäden bewirkt, während die generelle Stressantwort bevorzugt die präventive Protektion vor weiteren Schäden herbeiführt.

In *E. coli* ist diese generelle Stressantwort besonders gut untersucht, und die molekularen Mechanismen sind bereits zum Teil bekannt. Im Mittelpunkt der generellen Stressantwort von *E. coli* steht der globale Regulator RpoS. Dieses Protein wird durch das *rpoS*-Gen kodiert und ist ein alternativer σ -Faktor, der auch als σ^s bezeichnet wird. Ursprünglich wurde σ^s als Regulator für die Gene, die in der stationären Wachstumsphase induziert werden, identifiziert (LANGE und HENGGE-ARONIS, 1991a; LANGE und HENGGE-ARONIS, 1991b). Inzwischen wurde jedoch nachgewiesen, daß bis zu 70 Gene zum σ^s -Regulon gehören und die Induktion auch durch osmotischen Stress erfolgen kann (HENGGE-ARONIS, 1996). Dazu gehören unter anderem *otsB*, *otsA* und *treA* (GIAEVER *et al.*, 1988; GUTIERREZ *et al.*, 1989; HENGGE-ARONIS *et al.*, 1991; KAASEN *et al.*, 1992; REPOILA und GUTIERREZ, 1991), die an der Synthese von Trehalose, einem kompatiblen Solut von *E. coli*, beteiligt sind, oder auch *proP*, welches für einen Transporter für Prolin und Betain kodiert (MELLIES *et al.*, 1995). Da σ^s die Transkription von derartig vielen verschiedenen Genen kontrolliert, bezeichnet man dieses Protein auch als den „Master-Regulator“ der generellen Stressantwort. σ^s weist extrem hohe Sequenzähnlichkeiten zum konstitutiven σ -Faktor σ^{70} auf (MULVEY und LOEWEN, 1989) und konkurriert mit diesem um die Bindung an der RNA-Polymerase. Um eine induzierbare Regulation zu gewährleisten, ist es folglich notwendig, den σ^s -Gehalt in der Zelle streng regulieren zu können. Dafür stehen in *E. coli* eine ganze Reihe von Mechanismen zur Verfügung, von denen die wesentlichen im Folgenden kurz dargestellt werden sollen (Abb. 51). Dabei ist die Regulation keineswegs ausschließlich auf die Transkription beschränkt, sondern die Regulation erfolgt in weitem Ausmaß posttranskriptional auf der Ebene der Translation oder der Stabilität des Proteins. Erstens ist die Transkription von einem der Promotoren von *rpoS* selbst σ^s -abhängig, was unter induzierenden Bedingungen zu einer Autoinduktion führt (GOODRICH-BLAIR *et*

al., 1996). Dem *rpoS*-Gen geht jedoch auch ein σ^{70} -abhängiger Promotor voran, was dazu führt, daß auch unter optimalen Wachstumsbedingungen σ^S in der Zelle vorliegt, der Gehalt der Zellen an σ^S jedoch extrem gering ist.

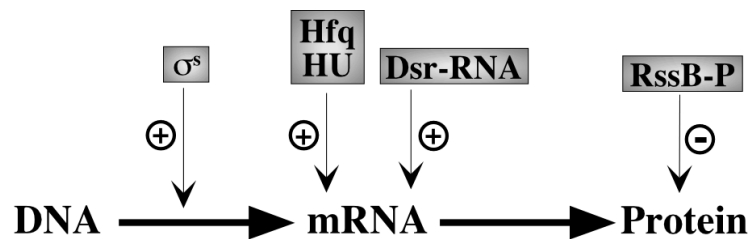


Abb. 51: Regulation des σ^S -Gehalts in *E. coli*. Für Erläuterungen siehe Text.

Werden die Zellen dann Stressbedingungen ausgesetzt, steigt der intrazelluläre σ^S -Gehalt schlagartig an. Dies ist hauptsächlich auf eine Steigerung der Translationseffektivität zurückzuführen. So binden die Proteine Hfq und HU an die *rpoS*-mRNA und stabilisieren diese (MUFFLER *et al.*, 1996b; MUFFLER *et al.*, 1997). Interessanterweise wird die σ^S -Translation auch durch einen weiteren Regulationsmechanismus über nicht-translatierte, kurze RNA-Moleküle, die man auch als Riboregulatoren bezeichnet, beeinflußt. Durch die Ausbildung einer Sekundärstruktur der *rpoS*-mRNA sind die Ribosomenbindestelle und das Startkodon im nativen Zustand blockiert. Die nicht-translatierte *dsrA*-RNA bindet nun entsprechend einem „anti-sense“-Mechanismus den komplementären Strang der *rpoS*-mRNA, und die Ribosomenbindestelle sowie das Startkodon werden freigegeben, was die Translation fördert (LEASE *et al.*, 1998; MAJDALANI *et al.*, 1998). Neueste Studien postulieren einen ähnlichen Mechanismus für die *rprR*-RNA (MAJDALANI *et al.*, 2001). Des weiteren wurde gezeigt, daß es eine Interaktion zwischen Hfq und der *dsrA*-RNA geben muß und letztere nur dann effektiv ist, wenn Hfq in der Zelle vorliegt (SLEDJESKI *et al.*, 2001). Eine weitere regulatorische, nicht-translatierte RNA wirkt unter optimalen Wachstumsbedingungen negativ auf die σ^S -Translation. Die *oxyS*-RNA bindet an Hfq und verhindert so die stimulierende Wirkung dieses Proteins auf die σ^S -Translation (ZHANG *et al.*, 1998).

Neben dieser Regulation auf der Ebene der Translationseffektivität findet auch eine posttranslationale Kontrolle des σ^S -Gehalts statt. Unter optimalen Bedingungen unterliegt σ^S einer schnellen Proteolyse durch die ClpXP-Protease (SCHWEDER *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde gefunden, daß das „Response regulator“-Protein RssB essentiell für eine effiziente Proteolyse ist (MUFFLER *et al.*, 1996a; PRATT und SILHAVY, 1996) und daß RssB σ^S für die ClpXP-Protease sozusagen „markiert“. In Zellen, die einem Stress ausgesetzt sind, ist σ^S dagegen stabil. Es wird vermutet, daß der Phosphorylierungszustand von RssB für diese differentielle Kontrolle der Proteolyse verantwortlich ist (BECKER *et al.*, 1999; KLAUCK *et al.*, 2001). Da bisher im Genom von *E. coli* keine zu RssB korrespondierende Sensor kinase nachgewiesen wurde, besteht die Vermutung, daß die Phosphorylierung von RssB unspezifisch über eine Wechselwirkung mit anderen Sensor kinasen erfolgt. Andererseits wurde in weiteren Studien gezeigt, daß die Phosphorylierung von RssB *in vivo* durch Acetyl-Phosphat erfolgt, was eine spezifische Sensor kinase überflüssig machen würde (BOUCHÉ *et al.*, 1998). Neben den hier angeführten Mechanismen unterliegt die generelle Stressantwort in *E. coli* noch einer Reihe von weiteren Kontrollen auf die im Rahmen dieser Diskussion nicht detailliert eingegangen werden kann.

Auch in Gram-positiven Organismen ist das Phänomen der generellen Stressantwort gut untersucht. Im Mittelpunkt dieser generellen Stressantwort von *B. subtilis* steht der alternative σ -Faktor σ^B , unter dessen Kontrolle in *B. subtilis* 125-127 Gene stehen (PETERSOHN *et al.*, 2001; PRICE *et al.*, 2001). Alle diese Gene werden von σ^B -abhängigen Promotoren aus transkribiert, wenn das Wachstum des Organismus in die stationäre Phase übergeht oder wenn die Zelle Stress in Form von Hitze, Salz oder Säure ausgesetzt wird. Da die Aktivität von σ^B grundsätzlich stressabhängig ist, stellt sich die Frage nach der Regulation dieser Aktivität. Eine schematische Darstellung dieses regulatorischen Netzwerks ist in Abb. 52 gezeigt.

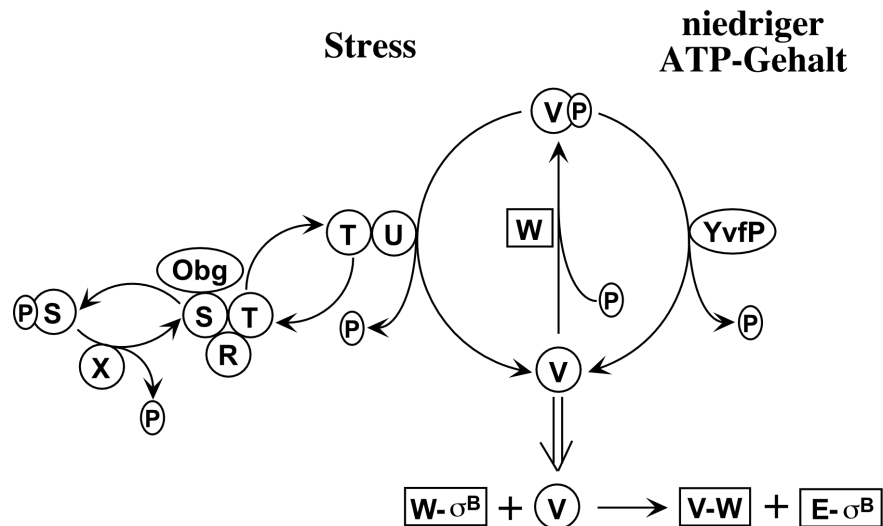


Abb. 52: Modell der σ^B -Regulation in *B. subtilis* (modifiziert nach SCOTT und HALDENWANG [1999]). E: RNA-Polymerase. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Im Mittelpunkt dieser komplexen Regulationskaskade steht der Anti- σ -Faktor RsbW („W“ in Abb. 52) sowie dessen Antagonist RsbV („V“ in Abb. 52), deren kodierende Gene gemeinsam mit den Genen für σ^B (*sigB*) und einem weiteren regulatorischen Protein (RsbX) in einem σ^B -abhängigen Operon lokalisiert sind (KALMAN *et al.*, 1990). Unter optimalen Wachstumsbedingungen ist σ^B inaktiv, da es von RsbW gebunden wird und so kein aktives σ^B -Holoenzym gebildet werden kann (BENSON und HALDENWANG, 1993). Dieser RsbW- σ^B -Komplex kann durch nicht phosphoryliertes RsbV aufgehoben werden, da dieses seinerseits an RsbW bindet und σ^B so freigesetzt wird (BENSON und HALDENWANG, 1993; DUFOUR und HALDENWANG, 1994). In wachsenden Zellen wird RsbV jedoch durch die Kinase-Aktivität von RsbW phosphoryliert und so in einem inaktiven Zustand gehalten (DUFOUR und HALDENWANG, 1994; VOELKER *et al.*, 1995). Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase reichert sich nun unphosphoryliertes RsbV an und zwar einerseits deshalb, weil der fallende ATP-Gehalt die Phosphorylierung durch RsbW einschränkt und andererseits durch die Phosphatase-Aktivität von YvfP (ALPER *et al.*, 1996; VIJAY *et al.*, 2000; VOELKER *et al.*, 1996). Dies führt dazu, daß RsbV aktiv vorliegt und als Antagonist von RsbW wirken kann, wodurch die Wachstumsphasen-abhängige Stressantwort induziert wird.

Auch Umweltstress aktiviert σ^B , jedoch über ein gänzlich anderes regulatorisches Netzwerk, das mindestens sieben weitere Proteine umfaßt. Hier wird RsbV-P durch RsbU („U“ in Abb. 52) dephosphoryliert und damit aktiviert, wenn Stressbedingungen auftreten (YANG *et al.*, 1996). Unter optimalen Wachstumsbedingungen jedoch ist RsbU inaktiv und kann nur dann von RsbT („T“ in Abb. 52) aktiviert werden, wenn dieses aus dem Komplex von RsbS („S“ in Abb. 52) und RsbR („R“ in Abb. 52) herausgelöst wird. Diese Freisetzung von RsbT erfolgt durch Phosphorylierung von RsbS durch RsbT (YANG *et al.*, 1996) unter essentieller Mitwirkung des GTP-bindenden Proteins Ogb (SCOTT und HALDENWANG, 1999), wobei dessen Funktion bisher noch ungeklärt ist. Eine negative Kontrolle dieser Aktivität wird dadurch erreicht, daß RsbX („X“ in Abb. 52) RsbS-P dephosphoryliert und so die erneute Inaktivierung von RsbT einleitet (YANG *et al.*, 1996). Obwohl RsbX in einem σ^B -abhängigen Operon kodiert ist und so eine Autoregulation gewährleisten würde, konnte gezeigt werden, daß RsbX zwar essentiell zur Limitierung der σ^B -abhängigen Stressantwort nötig, jedoch allein nicht dafür ausreichend ist (VOELKER *et al.*, 1997).

Trotz der Vielzahl an Studien bezüglich der Regulation des σ^S -Gehalts in *E. coli* und der generellen Stressantwort in *B. subtilis* ist es bis zum heutigen Zeitpunkt vollkommen ungeklärt, wie die Organismen die primären Umweltsignale wie pH-Wert oder Salzkonzentration wahrnehmen und wie die Systeme aussehen, die die wahrgenommenen Signale weiterleiten.

Zum σ^B -Regulon gehören 125-127 Gene, die für Proteine kodieren, denen aufgrund von Sequenzanalysen teilweise eine Funktion zugewiesen werden konnte. So finden sich unter den σ^B -abhängig transkribierten Genen die Gene für Transporter von kompatiblen Soluten (*opuE*, *opuBB* und *opuBC*) zur Reaktion auf Salzstress genauso wie die Gene für Katalasen (*katB*, *katX*) zum Schutz vor oxidativem Stress (PETERSOHN *et al.*, 2001; PRICE *et al.*, 2001). Bemerkenswerterweise gehören auch zwei der fünf als CI-abhängig synthetisierten identifizierten Proteine aus *H. halophilus* zur generellen Stressantwort in *B. subtilis* (s. 3.4). Zum einen findet sich unter den σ^B -abhängig synthetisierten Proteinen SodA, eine Superoxid-Dismutase, und des weiteren gehört YvyD in *B.*

subtilis zu den Stress-induzierten Proteinen (PETERSOHN *et al.*, 2001; PRICE *et al.*, 2001). Dieser Befund läßt über ein attraktives Szenario spekulieren, in dem Cl⁻ in *H. halophilus* als primäres Signal für Salzstress wirkt und welches im Folgenden detailliert dargelegt werden soll.

4.5 Die Funktion von Cl⁻ in *H. halophilus*

Am natürlichen Standort von *H. halophilus* finden sich Bedingungen, die aus verschiedener Hinsicht als extrem zu bezeichnen sind. Einerseits sind die Böden in diesem Habitat saliner Natur, d.h. die dort lebenden Organismen müssen halophil oder zumindest halotolerant sein, und zweitens unterliegen diese Salzmarschböden einer unregelmäßigen Überflutung durch Meerwasser. Durch ihre im Vergleich zum Meeresspiegel geringfügig höhere Lage werden diese Bereiche nur etwa 100-200 Mal pro Jahr überflutet, was dazu führt, daß die Salzkonzentration in diesen Böden extremen und schnellen Schwankungen unterliegt. Nach einer Überflutung mit Seewasser kommt es durch Sonneneinstrahlung zu einer Verdunstung des Wassers, wodurch die Salzkonzentration von der durchschnittlichen Seewasserkonzentration (3,5%) bis hinauf zu 10% ansteigen kann. Durch eine erneute Überflutung oder Regenfälle kann die Salzkonzentration andererseits binnen weniger Minuten bis zu Süßwasserbedingungen abfallen. Hieraus wird deutlich, daß die an diesem Standort lebenden Organismen über ausgeklügelte und schnell reagierende Mechanismen verfügen müssen, die es ihnen ermöglichen, auf die ständigen, drastischen Wechsel in der Salzkonzentration zu reagieren.

Wie unter 4.4 dargelegt, beinhaltet die Anpassung von *B. subtilis* an Salzstress die Aktivierung des σ^B -Regulons, wobei die auslösenden primären Signale hierfür noch unbekannt sind. An marinen Standorten wie dem natürlichen Habitat

von *H. halophilus* ist eine Veränderung der Salzkonzentration stets mit einer dazu proportionalen Veränderung der Cl⁻-Konzentration verbunden, da für Meerwasser folgende Gleichung gilt (OTT, 1996):

$$\text{Salz [mM]} = 0,03 + 1,805 \text{ Cl}^- \text{ [mM]}$$

Dieser Zusammenhang zwischen Salz- und Cl⁻-Gehalt macht Cl⁻ zu einem idealen Signalmolekül für die Salzkonzentration im umgebenden Medium. Betrachtet man die in dieser Arbeit in *H. halophilus* identifizierten und charakterisierten Cl⁻-abhängigen Vorgänge, so fügen sich die erhaltenen Ergebnisse zu einem einheitlichen Bild zusammen (Abb. 53). Erstens wurde gezeigt, daß Cl⁻ keine Funktion in der primären Bioenergetik des Organismus hat, was für ein potentiell Signal-molekül nachteilig wäre. Zweitens wurde ein Betain-Aufnahmesystem identifiziert und charakterisiert, dessen Expression unter Hochsalzbedingungen induziert wird. Die Aktivität dieses Betain-Transporters wird unmittelbar durch Cl⁻ stimuliert, was vor dem Hintergrund der Funktion von Betain als kompatibles Solut in der Reaktion auf Salzstress ein physiologisch sinnvoller Vorgang ist. Drittens wurde die Beweglichkeit und die Synthese von Flagellin sowie die Transkription des korrespondierenden Gens als Cl⁻-abhängig identifiziert. Die Induktion der Beweglichkeit ist sowohl in Enterobakterien als auch in *B. subtilis* stets eine Reaktion auf Stress im weitesten Sinne und soll den Organismen die Möglichkeit verschaffen, den Ort, an dem dieser Stress wirkt, zu verlassen. Dies wird vor allem dadurch deutlich, daß die Signal-integrierenden Systeme (cAMP/CAP, H-NS und CodY), die die Expression der Flagellengene aktivieren, in allen Fällen auch an der generellen Stressantwort der Mikroorganismen beteiligt sind. Sollte folglich Cl⁻ als Signalmolekül für Salzstress in *H. halophilus* dienen, wäre notwendigerweise auch die Induktion der Beweglichkeit Cl⁻-abhängig. Viertens finden sich unter den als Cl⁻-abhängig synthetisierten Proteinen wenigstens zwei (SodA und YvyD), die auch in *B. subtilis* durch die generelle Stressantwort induziert werden. Besonders interessant ist hier das Auftreten von YvyD, von dem gezeigt werden konnte, daß es in *B.*

subtilis die Aktivität eines alternativen σ -Faktors moduliert (DRZEWIECKI *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft von YvyD legt die Vermutung nahe, daß dieses Protein unmittelbar an der Signaltransduktionskaskade beteiligt ist, die in *H. halophilus* durch Cl^- induziert wird. Möglicherweise bindet YvyD intrazelluläres Cl^- und aktiviert anschließend den korrespondierenden σ -Faktor, was zur Transkription der entsprechenden Gene führt. Durch das grundsätzliche Prinzip der generellen Stressantwort über zentrale Regulatorsysteme (s. 4.4) wird klar, warum auch SodA, welches in seiner Funktion als Superoxid-Dismutase nicht mit Salzstress in Verbindung gebracht werden kann, durch Cl^- induziert wird. Das Cl^- -abhängig synthetisierte Protein 2, YhfK, wurde in *B. subtilis* zwar nicht im σ^B -Regulon gefunden, aufgrund der Ähnlichkeit zu Aspartat- und Glutamat-Semialdehyd-Dehydrogenasen ist es aber denkbar, daß auch diesem Protein eine wichtige Rolle in der Anpassung von *H. halophilus* an Salzstress zukommt. Aspartat- bzw. Glutamat-Semialdehyd sind zentrale Moleküle innerhalb der Biosynthese der kompatiblen Solute N^ε-Acetyl- β -Lysin, Prolin und N^δ-Acetyl-Ornithin, welche alle bei Wachstum von *H. halophilus* in Komplexmedium als kompatibles Solut detektiert worden sind (SEVERIN, 1993). Dementsprechend wäre eine Cl^- -abhängig stimulierte Synthese eines Proteins, welches einen Schritt dieser Biosynthese katalysiert, als Reaktion auf Salzstress für den Organismus physiologisch äußerst sinnvoll. Über die Funktion des als Untereinheit eines ABC-Transporters identifizierten Cl^- -abhängig synthetisierten Proteins läßt sich nur spekulieren, da die Natur der potentiell transportierten Substanz unbekannt ist. Denkbar ist in jedem Fall, daß durch Cl^- die Synthese eines Transporters für kompatible Solute stimuliert wird, wie es auch für das σ^B -Regulon von *B. subtilis* gefunden wurde (PETERSOHN *et al.*, 2001; PRICE *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang läßt sich auch darüber spekulieren, ob diese identifizierte ABC-Transporter-Untereinheit möglicherweise zu dem in dieser Arbeit charakterisierten Cl^- -abhängigen Betain-Transporter gehört. Die Bedeutung des LuxS-ähnlichen Proteins bleibt unklar, wobei jedoch offensichtlich ist, daß es potentiell in regulatorische Vorgänge involviert sein kann. Letztendlich konnte gezeigt werden, daß auch andere Organismen eine Cl^- -abhängige Osmotoleranz aufweisen, was dafür spricht, daß

dieses Phänomen möglicherweise weit verbreitet ist und einem grundsätzlichen Prinzip folgt. *H. halophilus* stellt in diesem Zusammenhang einen Organismus dar, der durch die ununterbrochene Konfrontation mit Salzstress eine langfristige Anpassung durchlaufen hat und dadurch die Fähigkeit verloren hat, unter nicht-induzierenden Bedingungen zu wachsen.

Vor dem Hintergrund der Hypothese, daß Cl^- in *H. halophilus* als Signalmolekül fungiert, sind die Ergebnisse der Studien zur Substitution von Cl^- durch Glutamat besonders interessant. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß Glutamat Cl^- beim Wachstum effektiv substituieren kann und daß die Glutamat-Aufnahme in *H. halophilus* Cl^- -unabhängig ist. Andererseits kann Glutamat Cl^- jedoch nicht substituieren, was die Flagellinsynthese und damit die Beweglichkeit betrifft. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Cl^- -Abhängigkeit des Wachstums durch Glutamat aufgehoben werden kann, weil in Form von Glutamat genügend alternative kompatible Solute vorliegen und die Cl^- -abhängige Betain-Aufnahme durch die Aufnahme von Glutamat ersetzt wird. Die Funktion als Signalmolekül, welches die Expression von *fliC* und der anderen Cl^- -abhängigen Gene auslöst, kann dagegen von Glutamat nicht übernommen werden, was aufgrund der grundsätzlich verschiedenen chemischen Natur der Substanzen nicht verwundert.

Sollte Cl^- in *H. halophilus* als Signalmolekül fungieren, setzt dies selbstverständlich das Vorhandensein eines Systems zur Cl^- -Wahrnehmung voraus. Dies könnte einerseits ein membranständiger Cl^- -Sensor sein, der die extrazelluläre Cl^- -Konzentration wahrnimmt und ein entsprechendes Signal in die Zelle transduziert. Da jedoch andererseits bereits gezeigt wurde, daß Cl^- von *H. halophilus* aufgenommen wird und optimales Wachstum erst ab einer intrazellulären Cl^- -Konzentration von ca. 400 mM stattfindet (ROEBLER und MÜLLER, 1998), ist es ebenfalls denkbar, daß ein Cl^- -spezifisches Transportsystem aktiv ist. Ein weiterer Mechanismus zur Cl^- -Akkumulation wäre der Co-Transport von Cl^- über das Cl^- -abhängige Betain-Transportsystem. Intrazellulär würde Cl^- dann von einem Rezeptormolekül gebunden, welches das entsprechende Signal weiterleitet. Derartige Rezeptormoleküle weisen in der Regel einen niedrigen K_m -Wert im mikromolaren Bereich für ihr korrespondierendes Signalmolekül auf. Für NhaR,

den positiven Regulator der Transkription der Gene für NhaA (RAHAV-MANOR *et al.*, 1992), einen Na⁺/H⁺-Antiporter aus *E. coli*, wurde am gereinigten Protein jedoch gezeigt, daß maximale Induktion bei einer Na⁺-Konzentration von 20 mM stattfindet (CARMEL *et al.*, 1997; DOVER und PADAN, 2001; PADAN *et al.*, 2001). Dieser Befund zeigt, daß dieser transkriptionelle Regulator NhaR einen K_m-Wert im millimolaren Bereich hat, also durchaus derartige Rezeptorproteine in Bakterien nachgewiesen wurden, die eine niedrige Affinität aufweisen. Selbiges müßte für einen postulierten Cl⁻-bindenden Regulator auch der Fall sein. Der Grund dafür, daß der K_m-Wert für Cl⁻ hier noch höher liegt, könnte in der Tatsache bestehen, daß *H. halophilus* im Gegensatz zu *E. coli* halophil ist und dementsprechend stets von hohen Cl⁻-Konzentrationen umgeben ist.

Faßt man abschließend die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen, so wird deutlich, daß mit dem Betain-Transport, der Beweglichkeit, der Flagellinsynthese und der Synthese diverser Stress-abhängiger Proteine, zahlreiche Cl⁻-abhängige Vorgänge in *H. halophilus* identifiziert und charakterisiert wurden, die in ihrer Gesamtheit den Schluß zulassen, daß Cl⁻ in *H. halophilus* als Signalmolekül zur Auslösung der Stressantwort fungiert. Mit diesem Befund wurde erstmalig eine Bedeutung von Cl⁻ als Bioelement in Prokaryonten nachgewiesen.

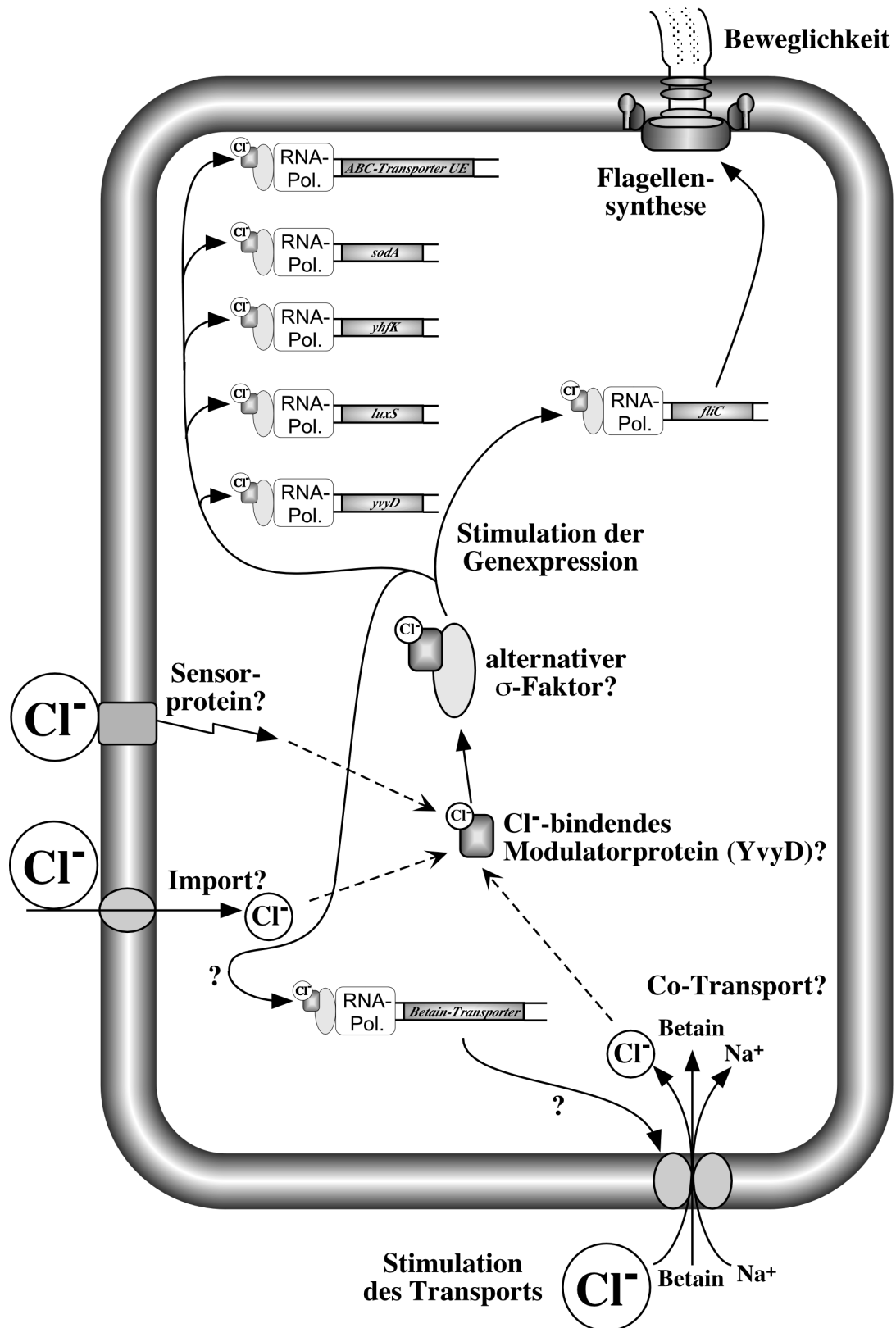


Abb. 53: Hypothetisches Modell zur Funktion von Cl⁻ in *H. halophilus*. Für Erläuterungen siehe Text.

4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere verschiedene Cl⁻-abhängige Vorgänge in *H. halophilus* identifiziert und charakterisiert werden, die zusammengenommen ein Bild ergeben, nach dem Cl⁻ in diesem Organismus als Signalmolekül für Salzstress fungiert. Die weiterführenden Studien werden zum Ziel haben, das oben vorgestellte Modell zu verifizieren. Durch die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide pMR102, pMR111, pMR401 und pMR501 wird es zunächst möglich sein, stromaufwärts zu sequenzieren und Promotorbereiche zu identifizieren, die, sollten die entsprechenden Gene zu einem Regulon gehören, Sequenzübereinstimmungen aufweisen sollten. Darüber hinaus sind weitere Proteom-Analysen mittels 2D-PAGE notwendig, um möglicherweise weitere Cl⁻-abhängig synthetisierte Proteine zu identifizieren. Eine Erhöhung der Sensitivität für dementsprechende Proteine könnte zum einen durch „Immobiline DryStrips“ mit einem geringeren pH-Gradienten, woraus sich eine verbesserte Auflösung ergeben würde, erreicht werden. Des weiteren könnte eine Markierung der Proteine mit ³⁵S-Methionin genutzt werden, um auch Proteine, die nur in geringen Mengen vorhanden sind, sichtbar zu machen. Zusätzlich zu Proteomanalysen könnten zudem auf der Transkriptebene molekularbiologische Methoden wie „Differential display“-PCR eingesetzt werden, um weitere Cl⁻-abhängig transkribierte Gene zu identifizieren. Versuche zur Verifizierung der Hypothese, daß YvyD das Cl⁻-bindende Modulatorprotein darstellt, könnten mit ³⁶Cl⁻ durchgeführt werden. Gleichfalls könnten in einem solchen Versuchsansatz andere Cl⁻-bindende Proteine identifiziert werden, die potentiell zusätzlich an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten. Des weiteren sollte der Cl⁻-Import in *H. halophilus* detailliert charakterisiert werden. Letztendlich werden weiterführende Untersuchungen bezüglich der beobachteten Cl⁻-abhängigen Osmotoleranz in anderen Bakterien zeigen, ob die an *H. halophilus* gemachten Befunde auf andere Systeme übertragen werden können und ob möglicherweise Cl⁻ eines der primären Signale zur Einleitung der generellen Stressantwort in moderat halophilen Mikroorganismen darstellt.

5 Zusammenfassung

1. Der Aufbau des Membranpotentials und die ATP-Synthese in *H. halophilus* wurden durch Cl^- nicht beeinflusst. Zusammen mit den Ergebnisse früherer Studien gibt es keinen Hinweis darauf, daß Cl^- an der primären Bioenergetik von *H. halophilus* beteiligt ist.

2. Es wurde ein unter Hochsalzbedingungen induziertes, Cl^- -abhängiges Transportsystem für das kompatible Solut Betain identifiziert und charakterisiert. Dieses System transportiert Betain mit einer maximalen Geschwindigkeit von $V_{\text{max.}} = 14,0 \pm 0,2 \text{ nmol/min} \times \text{mg Protein}$ und hat einen K_m -Wert für Betain von $72,8 \pm 10,4 \text{ } \mu\text{M}$. Die Ergebnisse der durchgeführten Hemmstoffstudien deuten darauf hin, daß die Betain-Aufnahme in *H. halophilus* über einen primären Transportmechanismus erfolgt.

3. Die Beweglichkeit von *H. halophilus* auf Weichagarplatten zeigt eine klare Cl^- -Abhängigkeit. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Flagellenbildung in *H. halophilus* Cl^- -abhängig ist. Das Flagellin wurde gereinigt, und es wurde ein spezifisches Antiserum dagegen hergestellt.

4. Immunologische Analysen ergaben, daß die Synthese des Flagellins Wachstumsphasen-abhängig war. In der log-Phase und in der frühen stationären Phase wurden große Mengen an Flagellin nachgewiesen, während die Flagellinkonzentration in der späten stationären Phase zurückging. Interessanterweise war die Flagellinsynthese zu jedem Zeitpunkt des Wachstums Cl^- -abhängig; in Abwesenheit von Cl^- war kein Flagellin nachzuweisen. Dies ist der erste Nachweis einer Cl^- -abhängigen Proteinproduktion in einem Prokaryonten.

5. Es wurde eine Plasmid-Genbank aus chromosomaler DNA von *H. halophilus* generiert, die 5807 Klone mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 4415 Bp enthält. Dies entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 99,8%, daß

sämtliche Bereiche des Genoms von *H. halophilus* abgedeckt wurden. Die für das Flagellin (*fliC*) und die β -Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthase (*atpD*) aus *H. halophilus* kodierenden Gene wurden mit Hilfe von Koloniehybridisierungen in der Genbank identifiziert. Anschließend wurden Teile dieser Gene kloniert und sequenziert.

6. Northern-Blot- und RT-PCR-Analysen zeigten, daß die Transkription von *fliC* durch Cl^- um den Faktor 2 stimuliert wird. Dies ist der erste Nachweis einer durch Cl^- stimulierten Transkription eines Gens mit bekannter Funktion.

7. Versuche zur Substitution von Cl^- durch kompatible Solute ergaben, daß Glutamat, Succinat und Fumarat die Cl^- -Abhängigkeit des Wachstums von *H. halophilus* aufheben können. Für Glutamat wurde gezeigt, daß dies auf die nicht Cl^- -abhängige Aufnahme von Glutamat zurückzuführen ist. Für die Beweglichkeit und die Flagellinsynthese wurde gezeigt, daß Glutamat Cl^- nicht effektiv substituieren kann.

8. Mit Hilfe von 2D-gelelektrophoretischen Studien konnten 5 weitere Cl^- -abhängig synthetisierte Proteine in *H. halophilus* nachgewiesen werden. Die Identifizierung dieser Proteine erfolgte durch N-terminale Sequenzierung und nachfolgender Suche nach ähnlichen Proteinen in Datenbanken. Zwei davon, YvyD und SodA, gehören zum σ^B -Regulon von *B. subtilis*. YvyD ist von besonderem Interesse, da es als σ -Faktor modulierendes Protein an der Cl^- -abhängigen Signaltransduktionskette, die von der Wahrnehmung des Reizes zur Genexpression führt, beteiligt sein könnte. Ein drittes Protein (YhfK) ist Aspartat- und Glutamat-Semialdehyd-Dehydrogenasen sehr ähnlich. Das vierte Protein ist der ATP-bindenden Untereinheit verschiedener ABC-Transporter sehr ähnlich. Das fünfte identifizierte Protein, LuxS, ist in Gram-negativen an der Biosynthese von Autoinduktoren beteiligt.

9. Teile der Gene, die in *H. halophilus* für YvyD bzw. LuxS kodieren, wurden mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden per PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert.

10. In Wachstumsversuchen konnte gezeigt werden, daß 11 von 44 darauf untersuchten Arten Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien eine Cl⁻-abhängige Osmotoleranz aufweisen. Dies waren: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Paracoccus denitrificans*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Thermus thermophilus* und *Vibrio fischeri*.

6 Literaturverzeichnis

Abrahams, J. P., A. G. W. Leslie, R. Lutter und J. E. Walker (1994). Structure at 2.8 Ångstrom resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628.

Aizawa, S. I., G. E. Dean, C. J. Jones, R. M. Macnab und S. Yamaguchi (1985). Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **161**, 836-849.

Akerley, B. J., D. M. Monack, S. Falkow und J. F. Miller (1992). The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* **174**, 980-990.

Alper, S., A. Dufour, D. A. Garsin, L. Duncan und R. Losick (1996). Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **260**, 165-177.

Alwine, J. C., D. J. Kemp und G. R. Stark (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5350-5354.

Arnosti, D. N. und M. J. Chamberlin (1989). Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 830-834.

Atlung, T. und H. Ingmer (1997). H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**, 7-17.

Atsumi, T., Y. Maekawa, H. Tokuda und Y. Imae (1992). Amiloride at pH 7.0 inhibits the Na⁺-driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* but allows cell growth. *FEBS Lett.* **314**, 114-116.

- Avetisyan, A. V., A. D. Kaulen, V. P. Skulachev und B. A. Feniouk (1998).** Photophosphorylation in alkalophilic halobacterial cells containing halorhodopsin: chloride-ion cycle? *Biochemistry (Mosc)* **63**, 625-628.
- Bartlett, D. H., B. B. Frantz und P. Matsumura (1988).** Flagellar transcriptional activators FlbB and FlaI: gene sequences and 5' consensus sequences of operons under FlbB and FlaI control. *J. Bacteriol.* **170**, 1575-1581.
- Becher, B., V. Müller und G. Gottschalk (1992a).** The methyl-tetrahydro-methanopterin-coenzyme-M methyltransferase of *Methanosarcina* Strain Gö1 is a primary sodium pump. *FEMS Microbiol Lett.* **91**, 239-244.
- Becher, B., V. Müller und G. Gottschalk (1992b).** N^5 -methyl-tetrahydro-methanopterin:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is a Na^+ translocating membrane protein. *J. Bacteriol.* **174**, 7656-7660.
- Becker, G., E. Klauck und R. Hengge-Aronis (1999).** Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6439-6444.
- Beja, O., L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich und E. F. DeLong (2000).** Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**, 1902-1906.
- Benson, A. K. und W. G. Haldenwang (1993).** *Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2330-2334.

Berg, H. C. und D. A. Brown (1972). Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* **239**, 500-504.

Berry, R. M. und J. P. Armitage (1999). The bacterial flagella motor. *Adv. Microb. Physiol.* **41**, 291-337.

Bertin, P., E. Terao, E. H. Lee, P. Lejeune, C. Colson, A. Danchin und E. Collatz (1994). The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 5537-5540.

Bivin, D. B. und W. Stoeckenius (1986). Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2167-2177.

Blanck, A., D. Oesterhelt, E. Ferrando, E. S. Schegk und F. Lottspeich (1989). Primary structure of sensory rhodopsin I, a prokaryotic photoreceptor. *EMBO J.* **8**, 3963-3971.

Blaut, M. (1984). Mechanismus der Energiekonservierung in *Methanosarcina barkeri*. Dissertation, Universität Göttingen.

Blaut, M. und G. Gottschalk (1984). Protonmotive force-driven synthesis of ATP during methane formation from molecular hydrogen and formaldehyde or carbon dioxide in *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**, 103-107.

Blum, H., H. Beier und H. J. Gross (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-98.

Bohnert, H. J. (1995). Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* **7**, 1099-1111.

- Bolen, D. W. (2001).** Protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Methods Mol. Biol.* **168**, 17-36.
- Bouché, S., E. Klauck, D. Fischer, M. Lucassen, K. Jung und R. Hengge-Aronis (1998).** Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process. *Mol. Microbiol.* **27**, 787-795.
- Brinkmann, R. (1964).** *Lehrbuch der allgemeinen Geologie*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Brown, A. D. (1976).** Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**, 803-846.
- Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. X. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. Fitzgerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. M. Geoghagen, J. F. Weidman, J. L. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, J. M. Kelley, J. D. Peterson, P. W. Sadow, M. C. Hanna, M. D. Cotton, K. M. Roberts, M. A. Hurst, B. P. Kaine, M. Borodovsky, H. P. Klenk, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese und J. G. Venter (1996).** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-1073.
- Buluwela, L., A. Forster, T. Boehm und T. H. Rabbitts (1989).** A rapid procedure for colony screening using nylon filters. *Nucleic Acids Res.* **17**, 452.
- Busby, S. (1996).** The CAP modulon. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli* E. C. C. Lin und A. S. Lynch (Hrsg). R.G. Landes Company, New York.

- Carmel, O., O. Rahav-Manor, N. Dover, B. Shaanan und E. Padan (1997).** The Na⁺-specific interaction between the LysR-type regulator, NhaR, and the *nhaA* gene encoding the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **16**, 5922-5929.
- Cayley, S., B. A. Lewis und M. T. Record, Jr. (1992).** Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**, 1586-1595.
- Chaiyanan, S., T. Maugel, A. Huq, F. T. Robb und R. R. Colwell (1999).** Polyphasic taxonomy of a novel *Halobacillus*: *Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from fish sauce. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 360-365.
- Claus, D., F. Fahmy, H. J. Rolf und N. Tosunoglu (1983).** *Sporosarcina halophila* sp. nov., an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soils. *System. Appl. Microbiol.* **4**, 496-506.
- Cobly, J. G. und J. C. Cox (1983).** Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**, 579-595.
- Cohen, S. N., A. C. Chang und L. Hsu (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114.
- Critchley, C. (1985).** The role of chloride in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **811**, 33-46.
- DePamphilis, M. L. und J. Adler (1971a).** Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **105**, 396-407.

- DePamphilis, M. L. und J. Adler (1971b).** Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **105**, 384-395.
- Deppenmeier, U., M. Blaut und G. Gottschalk (1991).** H₂:heterodisulfide oxidoreductase, a second energy-conserving system in the methanogenic strain Gö1. *Arch. Microbiol.* **155**, 272-277.
- Deppenmeier, U., M. Blaut, A. Mahlmann und G. Gottschalk (1990).** Reduced coenzyme F₄₂₀:heterodisulfide oxidoreductase, a proton-translocating redox system in methanogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9449-9453.
- Deppenmeier, U., V. Müller und G. Gottschalk (1996).** Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* **165**, 149-163.
- Dibrov, P. A., V. A. Kostyrko, R. L. Lazarova, V. P. Skulachev und I. A. Smirnova (1986).** The sodium cycle. I. Na⁺-dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **850**, 449-457.
- Dismukes, G. C., M. Zheng, R. Hutchins und J. S. Philo (1994).** The inorganic biochemistry of photosynthetic water oxidation. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 323-327.
- Dohrmann, A. B. und V. Müller (1999).** Chloride dependence of endospore germination in *Halobacillus halophilus*. *Arch. Microbiol.* **172**, 264-267.
- Dörk, T. und M. Stuhmann (2000).** Mukoviszidose (Zystische Fibrose, CF). In *Handbuch der Molekularen Medizin* D. Ganten und K. Ruckpaul (Hrsg.). Springer-Verlag, Heidelberg.

Dover, N. und E. Padan (2001). Transcription of *nhaA*, the main Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*, is regulated by Na⁺ and growth phase. *J. Bacteriol.* **183**, 644-653.

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

Driks, A. und D. J. DeRosier (1990). Additional structures associated with bacterial flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **211**, 669-672.

Drzewiecki, K., C. Eymann, G. Mittenhuber und M. Hecker (1998). The *yvyD* gene of *Bacillus subtilis* is under dual control of sigma B and sigma H. *J. Bacteriol.* **180**, 6674-6680.

Dufour, A. und W. G. Haldenwang (1994). Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* **176**, 1813-1820.

Duschl, A. und G. Wagner (1986). Primary and secondary chloride transport in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **168**, 548-552.

Eberl, L. (1999). N-acyl-homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 493-506.

Eisenberg, H. und E. J. Wachtel (1987). Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 69-92.

Engelhardt, J. F., J. R. Yankaskas, S. A. Ernst, Y. Yang, C. R. Marino, R. C. Boucher, J. A. Cohn und J. M. Wilson (1992). Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat. Genet.* **2**, 240-248.

Errington, J. (1984). Efficient *Bacillus subtilis* cloning system using bacteriophage vector ϕ 105J9. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2615-2628.

Fahmy, F., F. Mayer und D. Claus (1985). Endospores of *Sporosarcina halophila*: characteristics and ultrastructure. *Arch. Microbiol.* **140**, 338-342.

Fan, F., K. Ohnishi, N. R. Francis und R. M. Macnab (1997). The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. *Mol. Microbiol.* **26**, 1035-1046.

Ferson, A. E., L. V. Wray Jr. und S. H. Fisher (1996). Expression of the *Bacillus subtilis gabP* gene is regulated independently in response to nitrogen and amino acid availability. *Mol. Microbiol.* **22**, 693-701.

Fisher, S. H., K. Rohrer und A. E. Ferson (1996). Role of CodY in regulation of the *Bacillus subtilis hut* operon. *J. Bacteriol.* **178**, 3779-3784.

Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.

Forster, A., R. Daniel und V. Müller (1995). The Na⁺-translocating ATPase of *Acetobacterium woodii* is a F₁F₀-type enzyme as deduced from the primary structure of its β -, γ - and ϵ -subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **1229**, 393-397.

Francis, N. R., V. M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier und R. M. Macnab (1992). Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6304-6308.

Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas und D. J. DeRosier (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235**, 1261-1270.

Fredrick, K. L. und J. D. Helmann (1994). Dual chemotaxis signaling pathways in *Bacillus subtilis*: a sigma D-dependent gene encodes a novel protein with both CheW and CheY homologous domains. *J. Bacteriol.* **176**, 2727-2735.

Galinski, E. A. und H. G. Trüper (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 95-108.

Giaever, H. M., O. B. Styrvold, I. Kaasen und A. R. Strom (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 2841-2849.

Gillen, K. L. und K. T. Hughes (1991). Molecular characterization of *flgM*, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**, 6453-6459.

Goodrich-Blair, H., M. Urfa-Nickelsen und R. Kolter (1996). Regulation of gene expression in stationary phase. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. E. C. C. Lin und A. S. Lynch (Hrsg.). R.G. Landes Company, New York.

Görg, A., G. Boguth, C. Obermaier, A. Posch und W. Weiss (1995). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16**, 1079-1086.

Goulbourne, E., Jr., M. Matin, E. Zychlinsky und A. Matin (1986). Mechanism of delta pH maintenance in active and inactive cells of an obligately acidophilic bacterium. *J. Bacteriol.* **166**, 59-65.

Guastella, J., N. Nelson, H. Nelson, L. Czyzyk, S. Keynan, M. C. Miedel, N. Davidson, H. A. Lester und B. I. Kanner (1990). Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* **249**, 1303-1306.

Gutierrez, C., M. Ardourel, E. Bremer, A. Middendorf, W. Boos und U. Ehmman (1989). Analysis and DNA sequence of the osmoregulated *treA* gene encoding the periplasmic trehalase of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 347-354.

Haardt, M., B. Kempf, E. Faatz und E. Bremer (1995). The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 783-786.

Haddy, A., J. A. Hatchell, R. A. Kimel und R. Thomas (1999). Azide as a competitor of chloride in oxygen evolution by photosystem II. *Biochemistry* **38**, 6104-6110.

Hadfield, A., G. Kryger, J. Ouyang, G. A. Petsko, D. Ringe und R. Viola (1999). Structure of aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*, a key enzyme in the aspartate family of amino acid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **289**, 991-1002.

Hama, H., T. Shimamoto, M. Tsuda und T. Tsuchiya (1987). Properties of a Na⁺-coupled serine-threonine transport system in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **905**, 231-239.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557 - 580.

Heise, R., V. Müller und G. Gottschalk (1993). Acetogenesis and ATP synthesis in *Acetobacterium woodii* are coupled via a transmembrane primary sodium ion gradient. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**, 261-268.

Heise, R., V. Müller und G. Gottschalk (1989). Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* **171**, 5473-5478.

Helmann, J. D., F. R. Masiarz und M. J. Chamberlin (1988). Isolation and characterization of the *Bacillus subtilis* sigma 28 factor. *J. Bacteriol.* **170**, 1560-1567.

Hengge-Aronis, R. (1996). Back to log-phase: σ^S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**, 887-893.

Hengge-Aronis, R., W. Klein, R. Lange, M. Rimmele und W. Boos (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 7918-7924.

Hilpert, W., B. Schink und P. Dimroth (1984). Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with Na⁺ as coupling ion. *EMBO J.* **3**, 1665-1670.

- Hirota, N., M. Kitada und Y. Imae (1981).** Flagellar motors of alcalophilic bacillus are powered by an electrochemical potential gradient of Na⁺. *FEBS Lett.* **132**, 278-280.
- Homann, P. H. (1987).** The relations between the chloride, calcium, and polypeptide requirements of photosynthetic water oxidation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**, 105-123.
- Holmes, D. S. und M. Quigley (1981).** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Hughes, K. T., K. L. Gillen, M. J. Semon und J. E. Karlinsey (1993).** Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**, 1277-1280.
- Iino, T. (1985).** Genetic control of flagellar morphogenesis in *Salmonella*. In *Sensing and response in microorganisms*. M. Eisenbach und M. Balaban (Hrsg.). Elsevier Science, Amsterdam.
- Ikeda, M. und D. Oesterhelt (1990).** A Cl⁻-translocating adenosinetriphosphatase in *Acetabularia acetabulum*. 2. Reconstitution of the enzyme into liposomes and effect of net charges of liposomes on chloride permeability and reconstitution. *Biochemistry* **29**, 2065-2070.
- Imler, J. R. und G. A. Vidaver (1972).** Anion effects on glycine entry into pigeon red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **288**, 153-165.
- Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

- Irikura, V. M., M. Kihara, S. Yamaguchi, H. Sockett und R. M. Macnab (1993).** *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J. Bacteriol.* **175**, 802-810.
- Jones, C. J., M. Homma und R. M. Macnab (1987).** Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 1489-1492.
- Joys, T. M. (1988).** The flagellar filament protein. *Can. J. Microbiol.* **34**, 452-458.
- Kaasen, I., P. Falkenberg, O. B. Styrvold und A. R. Strom (1992).** Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *J. Bacteriol.* **174**, 889-898.
- Kalman, S., M. L. Duncan, S. M. Thomas und C. W. Price (1990).** Similar organization of the *sigB* and *spoIIA* operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **172**, 5575-5585.
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda und S. Tabata (1996).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
- Kanner, B. I. und S. Schuldiner (1987).** Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**, 1-38.

- Kawagishi, I., M. Imagawa, Y. Imae, L. Mccarter und M. Homma (1996).** The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression. *Mol. Microbiol.* **20**, 693-699.
- Kempf, B. und E. Bremer (1995).** OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 16701-16713.
- Kempf, B. und E. Bremer (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**, 319-330.
- Keynan, S. und B. I. Kanner (1988).** γ -aminobutyric acid transport in reconstituted preparations from rat brain: coupled sodium and chloride fluxes. *Biochemistry* **27**, 12-17.
- Khan, S., M. Dapice und T. S. Reese (1988).** Effects of *mot* gene expression on the structure of the flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **202**, 575-584.
- Khan, S., D. M. Ivey und T. A. Krulwich (1992).** Membrane ultrastructure of alkaliphilic *Bacillus* species studied by rapid-freeze electron microscopy. *J. Bacteriol.* **174**, 5123-5126.
- Khan, S., I. H. Khan und T. S. Reese (1991).** New structural features of the flagellar base in *Salmonella typhimurium* revealed by rapid-freeze electron microscopy. *J. Bacteriol.* **173**, 2888-2896.
- Kimmich, G. A., J. Randles und J. S. Brand (1975).** Assay of picomole amounts of ATP, ADP and AMP using the luciferase enzyme system. *J. Bacteriol.* **158**, 844-848.

King, P. A. und R. B. Gunn (1989). Na⁺- and Cl⁻-dependent glycine transport in human red blood cells and ghosts. A study of the binding of substrates to the outward-facing carrier. *J. Gen. Physiol.* **93**, 321-342.

Klauck, E., M. Lingnau und R. Hengge-Aronis (2001). Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma B proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**, 1381-1390.

Kojima, S., K. Yamamoto, I. Kawagishi und M. Homma (1999). The polar flagellar motor of *Vibrio cholerae* is driven by an Na⁺ motive force. *J. Bacteriol.* **181**, 1927-1930.

Kresze, G.-B. (1983). Methods for protein determination. In *Methods of enzymatic analysis*. H. U. Bergmeyer (Hrsg.). Verlag Chemie, Weinheim.

Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin et al. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.

Lange, R. und R. Hengge-Aronis (1991a). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J. Bacteriol.* **173**, 4474-4481.

Lange, R. und R. Hengge-Aronis (1991b). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 49-59.

Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**, 272-290.

- Larsen, S. H., J. Adler, J. J. Gargus und R. W. Hogg (1974a).**
Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1239-1243.
- Larsen, S. H., R. W. Reader, E. N. Kort, W. W. Tso und J. Adler (1974b).**
Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature* **249**, 74-77.
- Laubinger, W. und P. Dimroth (1988).** Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry* **27**, 7531-7537.
- Lease, R. A., M. E. Cusick und M. Belfort (1998).** Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12456-12461.
- Lindum, P. W., U. Anthoni, C. Christophersen, L. Eberl, S. Molin und M. Givskov (1998).** N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **180**, 6384-6388.
- Linnett, P. E. und R. B. Beechey (1979).** Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods Enzymol.* **55**, 472-518.
- Liu, Q. R., B. Lopez-Corcuera, S. Mandiyan, H. Nelson und N. Nelson (1993).**
Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J. Biol. Chem.* **268**, 22802-22808.
- Liu, Q. R., B. Lopez-Corcuera, H. Nelson, S. Mandiyan und N. Nelson (1992).**
Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and β -alanine in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 12145-12149.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Lux, R., N. Kar und S. Khan (2000). Overproduced *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch complexes. *J. Mol. Biol.* **298**, 577-583.

Machida, K., H. Saito, T. Kakegawa und H. Kobayashi (1999). An *Escherichia coli* mutant sensitive to chloride ions at high pH. In *Abstracts of the 99th general meeting of the American Society for Microbiology*. ASM Press, Washington.

MacLeod, R. A. und E. Onofrey (1956). Nutrition and metabolism of marine bacteria II. Observations on the relation of sea water to the growth of marine bacteria. *J. Bacteriol.* **71**, 661-667.

MacLeod, R. A. und E. Onofrey (1957). Nutrition and metabolism of marine bacteria VI. Quantitative requirements for halides, magnesium, calcium, and iron. *Can. J. Microbiol.* **3**, 753 - 759.

Macnab, R. M. (1992). Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 131-158.

Macnab, R. M. und D. E. Koshland, Jr. (1972). The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2509-2512.

Majdalani, N., S. Chen, J. Murrow, K. St John und S. Gottesman (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol. Microbiol.* **39**, 1382-1394.

- Majdalani, N., C. Cunning, D. Sledjeski, T. Elliott und S. Gottesman (1998).** DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12462-12467.
- May, G., E. Faatz, M. Villarejo und E. Bremer (1986).** Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **205**, 225-233.
- May, K. M., F. A. Jay und D. Oesterhelt (1988).** The orientation of halorhodopsin in the cell membrane of halobacteria. *J. Biol. Chem.* **263**, 13623-13625.
- McLaggan, D., M. Keyhan und A. Matin (1990).** Chloride transport pathways and their bioenergetic implications in the obligate acidophilic *Bacillus coagulans*. *J. Bacteriol.* **172**, 1485-1490.
- Mellies, J., A. Wise und M. Villarejo (1995).** Two different *Escherichia coli* *proP* promoters respond to osmotic and growth phase signals. *J. Bacteriol.* **177**, 144-151.
- Minamino, T. und R. M. Macnab (1999).** Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* **181**, 1388-1394.
- Mirel, D. B. und M. J. Chamberlin (1989).** The *Bacillus subtilis* flagellin gene (*hag*) is transcribed by the sigma 28 form of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **171**, 3095-3101.

Mirel, D. B., W. F. Estacio, M. Mathieu, E. Olmsted, J. Ramirez und L. M. Marquez-Magana (2000). Environmental regulation of *Bacillus subtilis* sigma D-dependent gene expression. *J. Bacteriol.* **182**, 3055-3062.

Mirel, D. B., P. Lauer und M. J. Chamberlin (1994). Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a sigma D-dependent operon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**, 4492-4500.

Mirel, D. B., V. M. Lustre und M. J. Chamberlin (1992). An operon of *Bacillus subtilis* motility genes transcribed by the sigma D form of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **174**, 4197-4204.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic mechanism. *Nature* **191**, 144-148.

Moritani, C., T. Ohhashi, H. Kadowaki, M. Tagaya, T. Fukui, F. Lottspeich, D. Oesterhelt und M. Ikeda (1997). The primary structure of the Cl⁻ translocating ATPase, b subunit of *Acetabularia acetabulum*, which belongs to the F-type ATPase family. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**, 115-124.

Muffler, A., D. Fischer, S. Altuvia, G. Storz und R. Hengge-Aronis (1996a). The response regulator RssB controls stability of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**, 1333-1339.

Muffler, A., D. Fischer und R. Hengge-Aronis (1996b). The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q β RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **10**, 1143-1151.

Muffler, A., D. D. Traulsen, D. Fischer, R. Lange und R. Hengge-Aronis (1997). The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 297-300.

Müller, V. und S. Bowien (1995). Differential effects of sodium ions on motility in the homoacetogenic bacteria *Acetobacterium woodii* and *Sporomusa sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* **164**, 363-369.

Müller, V., C. Winner und G. Gottschalk (1988). Electron transport-driven sodium extrusion during methanogenesis from formaldehyde + H₂ by *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **178**, 519-525.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.

Mulvey, M. R. und P. C. Loewen (1989). Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests KatF protein is a novel sigma transcription factor. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9979-9991.

Munck, B. G. (1985). Transport of neutral and cationic amino acids across the brush-border membrane of the rabbit ileum. *J. Membr. Biol.* **83**, 1-13.

Munck, L. K. (1993). Cotransport of 2-methyl-aminoisobutyric acid and chloride in rabbit small intestine. *Am. J. Physiol.* **265**, G979-986.

Munck, L. K. (1995). Chloride-dependent amino acid transport in the small intestine: occurrence and significance. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 195-213.

Munck, L. K. (1997). Comparative aspects of chloride-dependent amino acid transport across the brush-border membrane of mammalian small intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **118**, 229-231.

Munck, L. K. und B. G. Munck (1990). Chloride-dependence of amino acid transport in rabbit ileum. *Biochim. Biophys. Acta* **1027**, 17-20.

Nelson, N. (1998). The family of Na⁺/Cl⁻-neurotransmitter transporters. *J. Neurochem.* **71**, 1785-1803.

O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

Oesterhelt, D. (1995). Structure and function of halorhodopsin. *Isr. J. of Chem.* **35**, 475 - 494.

Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki und T. Iino (1990). Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **221**, 139-147.

Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki und T. Lino (1992). A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. *Mol. Microbiol.* **6**, 3149-3157.

Ordal, G. W., L. Marquez-Magaña und M. J. Chamberlin (1993). Motility and chemotaxis. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch und R. Losick (Hrsg.). ASM Press, Washington.

- Ordal, G. W., D. O. Nettleton und J. A. Hoch (1983).** Genetics of *Bacillus subtilis* chemotaxis: isolation and mapping of mutations and cloning of chemotaxis genes. *J. Bacteriol.* **154**, 1088-1097.
- Oren, A. (1986).** Intracellular salt concentrations of the halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 4-9.
- Oren, A. (1992).** The genera *Haloanaerobium*, *Halobacteroides* and *Sporohalobacter*. In *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (Hrsg.). Springer-Verlag, New York.
- Oren, A. (1999).** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 334-348.
- Ott, J. (1996).** *Meereskunde*, 2. Aufl. Ulmer Tachschenbuch Verlag, Stuttgart.
- Padan, E., M. Venturi, Y. Gerchman und N. Dover (2001).** Na⁺/H⁺-antiporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 144-157.
- Palleroni, N. J. (1976).** Chemotaxis in *Actinoplanes*. *Arch. Microbiol.* **110**, 13-18.
- Petersohn, A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Voelker und M. Hecker (2001).** Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**, 5617-5631.
- Pratt, L. A. und T. J. Silhavy (1996).** The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2488-2492.

- Price, C. W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C. K. Murphy und P. Youngman (2001).** Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **41**, 757-774.
- Rahav-Manor, O., O. Carmel, R. Karpel, D. Taglicht, G. Glaser, S. Schuldiner und E. Padan (1992).** NhaR, a protein homologous to a family of bacterial regulatory proteins (LysR), regulates *nhaA*, the sodium proton antiporter gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 10433-10438.
- Raleigh, E. A., N. E. Murray, H. Revel, R. M. Blumenthal, D. Westaway, A. D. Reith, P. W. Rigby, J. Elhai und D. Hanahan (1988).** McrA and McrB restriction phenotypes of some *Escherichia coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1563-1575.
- Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi und D. A. Hopwood (1996).** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**, 77-96.
- Reidlinger, J. und V. Müller (1994).** Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na⁺-translocating F₁F₀-type enzyme. *Eur. J. Biochem.* **223**, 275-283.
- Repoila, F. und C. Gutierrez (1991).** Osmotic induction of the periplasmic trehalase in *Escherichia coli* K12: characterization of the *treA* gene promoter. *Mol. Microbiol.* **5**, 747-755.
- Richter, B. (1991).** *Ernährungsbericht 1991*. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (Hrsg.). Henrich-Verlag, Frankfurt/Main.

- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou und et al. (1989).** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.
- Ritchie, R. J. (1992a).** The cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (*Anacystis nidulans*, *S. leopoliensis*) PCC 7942 has a sodium-dependent chloride transporter. *Pl. Cell Env.* **15**, 163-177.
- Ritchie, R. J. (1992b).** Kinetics of chloride transport in the cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (*Anacystis nidulans*, *S. leopoliensis*) PCC 7942. *Pl. Cell Env.* **15**, 179-184.
- Roberts, M. F. (2000).** Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front. Biosci.* **5**, D796-812.
- Roebler, M. (1997).** Wachstumsphysiologische Untersuchungen an *Halobacillus halophilus*. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- Roebler, M. und V. Müller (1998).** Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of *Halobacillus halophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3813-3817.
- Rommens, J. M., M. C. Iannuzzi, B. Kerem, M. L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J. L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka et al. (1989).** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**, 1059-1065.
- Rothmaier, M. und W. Simon (1993).** Ionophore employed in solvent polymeric membrane electrodes for the assay of Cl⁻ activity. *Anal. Chim. Acta* **271**, 135-138.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanders, J. W., K. Leenhouts, J. Burghoorn, J. R. Brands, G. Venema und J. Kok (1998).** A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol. Microbiol.* **27**, 299 - 310.
- Sanders, J. W., G. Venema und J. Kok (1997).** A chloride-inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4877 - 4882.
- Schägger, H. und G. von Jagow (1987).** Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 369-379.
- Schauder, S., K. Shokat, M. G. Surette und B. L. Bassler (2001).** The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* **41**, 463-476.
- Schegk, E. S. und D. Oesterhelt (1988).** Isolation of a prokaryotic photoreceptor: sensory rhodopsin from *Halobacteria*. *EMBO J.* **7**, 2925-2933.
- Schmidt, K., S. Liaanen-Jensen und H. G. Schlegel (1963).** Die Carotinoide der *Thiorodaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **46**, 117-126.
- Schmidt, R. F., G. Thews und F. Lang (2000).** *Physiologie des Menschen*, 28. Aufl.. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Schobert, B. und J. K. Lanyi (1982).** Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* **257**, 10306-10313.

- Schobert, B., J. K. Lanyi und E. J. Cragoe, Jr. (1983).** Evidence for a halide-binding site in halorhodopsin. *J. Biol. Chem.* **258**, 15158-15164.
- Schobert, B., J. K. Lanyi und D. Oesterhelt (1988).** Structure and orientation of halorhodopsin in the membrane: a proteolytic fragmentation study. *EMBO J.* **7**, 905-911.
- Schummer, U. und H. G. Schiefer (1991).** Chloride fluxes across *Acholeplasma laidlawii* membranes. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**, 109-114.
- Schweder, T., K. H. Lee, O. Lomovskaya und A. Matin (1996).** Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor sigma S by ClpXP protease. *J. Bacteriol.* **178**, 470-476.
- Scott, J. M. und W. G. Haldenwang (1999).** Obg, an essential GTP binding protein of *Bacillus subtilis*, is necessary for stress activation of transcription factor sigma B. *J. Bacteriol.* **181**, 4653-4660.
- Severin, J. (1993).** Kompatible Solute und Wachstumskinetik bei halophilen aeroben heterotrophen Eubakterien. Dissertation, Universität Bonn.
- Shen, J. R. und Y. Inoue (1993).** Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome c-550 and a 12-kDa protein, in cyanobacterial photosystem II. *Biochemistry* **32**, 1825-1832.
- Shirakihara, Y., A. G. W. Leslie, J. P. Abrahams, J. E. Walker, T. Ueda, Y. Sekimoto, M. Kambara, K. Saika, Y. Kagawa und M. Yoshida (1997).** The crystal structure of the nucleotide-free $\alpha_3\beta_3$ subcomplex of F_1 -ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* is a symmetric trimer. *Structure* **5**, 825-836.

- Silverman, M. und M. Simon (1973).** Genetic analysis of flagellar mutants in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **113**, 105-113.
- Silverman, M. und M. Simon (1974).** Characterization of *Escherichia coli* flagellar mutants that are insensitive to catabolite repression. *J. Bacteriol.* **120**, 1196-1203.
- Skulachev, V. P. (1994).** Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 271-284.
- Skulachev, V. P. (1999).** Bacterial energetics at high pH: what happens to the H⁺ cycle when extracellular H⁺ concentration decreases? *Novartis Found. Symp.* 213-217.
- Sledjeski, D. D., C. Whitman und A. Zhang (2001).** Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J. Bacteriol.* **183**, 1997-2005.
- Sockett, H., S. Yamaguchi, M. Kihara, V. M. Irikura und R. M. Macnab (1992).** Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **174**, 793-806.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Soutourina, O., A. Kolb, E. Krin, C. Laurent-Winter, S. Rimsky, A. Danchin und P. Bertin (1999).** Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol.* **181**, 7500-7508.

- Spiess, I., J. N. Wang, R. Benz und U. Zimmermann (1993).** Characterization of the chloride carrier in the plasmalemma of the alga *Valonia utricularis* - the inhibition by 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-Disulfonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, 93-101.
- Spring, S., W. Ludwig, M. C. Marquez, A. Ventosa und K.-H. Schleifer (1996).** *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 492-496.
- Stolz, B. und H. C. Berg (1991).** Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 7033-7037.
- Tokuda, H. und T. Unemoto (1981).** A respiration-dependent primary sodium extrusion system functioning at alkaline pH in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 265-271.
- Tokuda, H. und T. Unemoto (1984).** Na⁺ is translocated at NADH:quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* **259**, 7785-7790.
- Turner, R. J. (1986).** β-amino acid transport across the renal brush-border membrane is coupled to both Na⁺ and Cl⁻. *J. Biol. Chem.* **261**, 16060-16066.
- Vanderrest, M. E., D. Molenaar und W. N. Konings (1992).** Mechanism of Na⁺-dependent citrate transport in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **174**, 4893-4898.

Vieira, J. und J. Messing (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.

Vijay, K., M. S. Brody, E. Fredlund und C. W. Price (2000). A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **35**, 180-188.

Voelker, U., T. Luo, N. Smirnova und W. Haldenwang (1997). Stress activation of *Bacillus subtilis* sigma B can occur in the absence of the sigma B negative regulator RsbX. *J. Bacteriol.* **179**, 1980-1984.

Voelker, U., A. Voelker und W. G. Haldenwang (1996). Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti-sigma B antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities. *J. Bacteriol.* **178**, 5456-5463.

Voelker, U., A. Voelker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour und W. G. Haldenwang (1995). Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J. Bacteriol.* **177**, 3771-3780.

Vogelstein, B. und D. Gillespie (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615-619.

Wagner, G., R. Hartmann und D. Oesterhelt (1978). Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.* **89**, 169-179.

Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick und N. J. Gay (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.

Wanner, G., H. Formanek, D. Galli und R. Wirth (1989). Localization of aggregation substances of *Enterococcus faecalis* after induction by sex pheromones. An ultrastructural comparison using immuno labelling, transmission and high resolution scanning electron microscopic techniques. *Arch. Microbiol.* **151**, 491-497.

Weber, K. und M. Osborne (1969). The reliability of the molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.

Yamauchi, A., S. Uchida, H. M. Kwon, A. S. Preston, R. B. Robey, A. Garcia-Perez, M. B. Burg und J. S. Handler (1992). Cloning of a Na⁺- and Cl⁻-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J. Biol. Chem.* **267**, 649-652.

Yang, X., C. M. Kang, M. S. Brody und C. W. Price (1996). Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev.* **10**, 2265-2275.

Zdrou, I. und H. W. Tromballa (1981). Active transport of chloride by *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* **129**, 325-330.

Zhang, A., S. Altuvia, A. Tiwari, L. Argaman, R. Hengge-Aronis und G. Storz (1998). The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J.* **17**, 6061-6068.

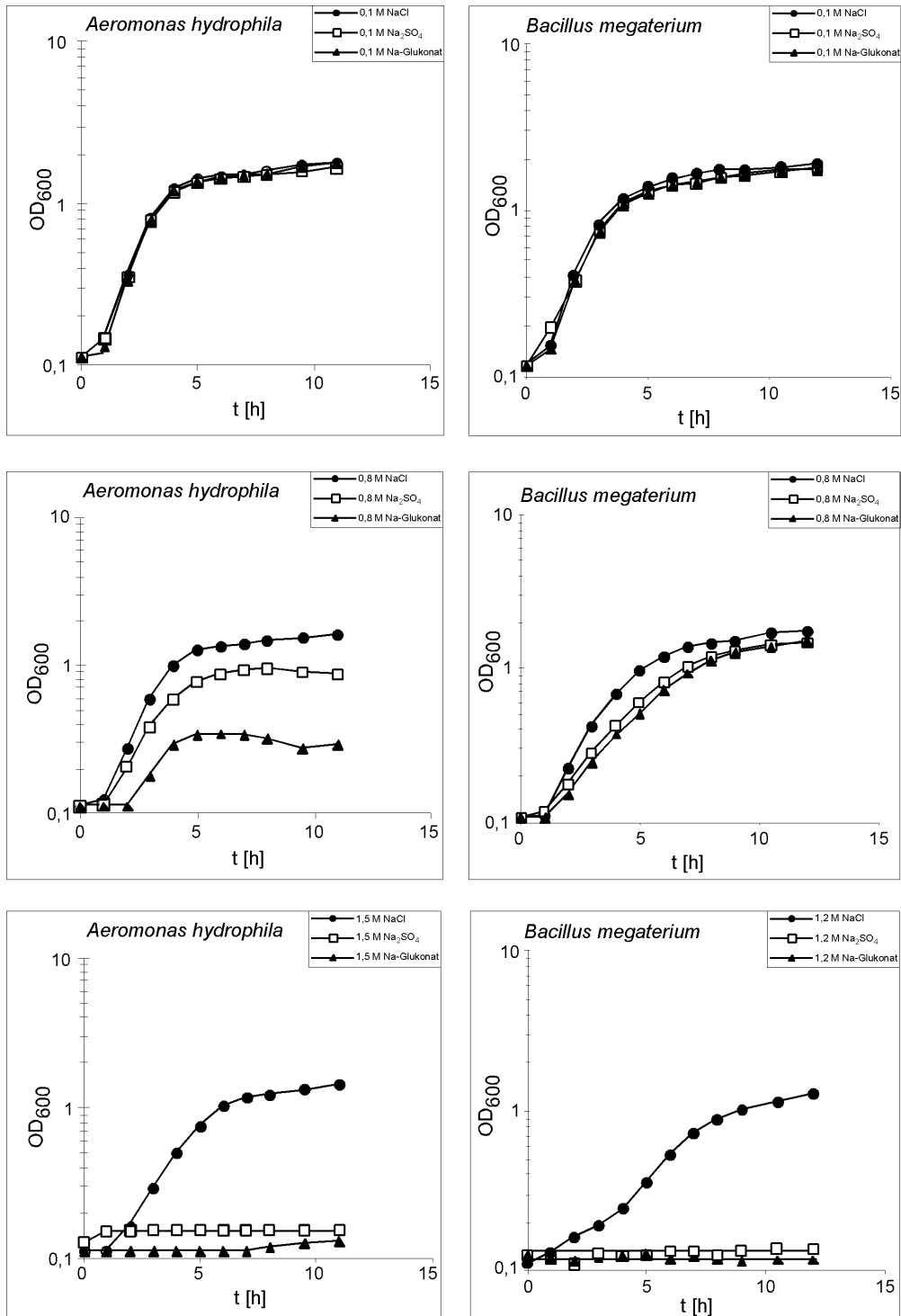
Zhao, R., C. D. Amsler, P. Matsumura und S. Khan (1996a). FliG and FliM distribution in the *Salmonella typhimurium* cell and flagellar basal bodies. *J. Bacteriol.* **178**, 258-265.

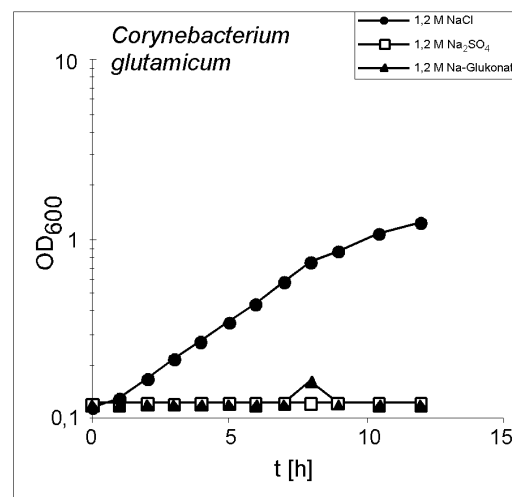
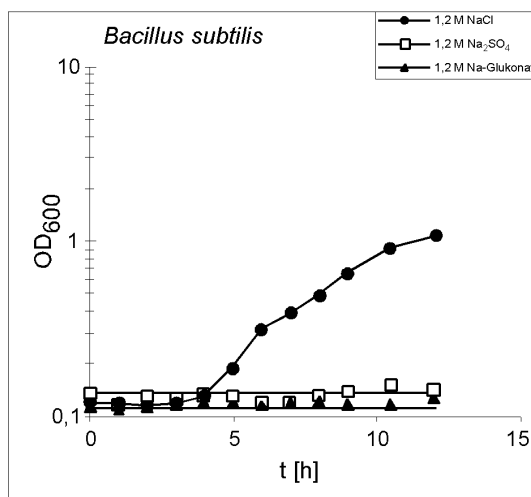
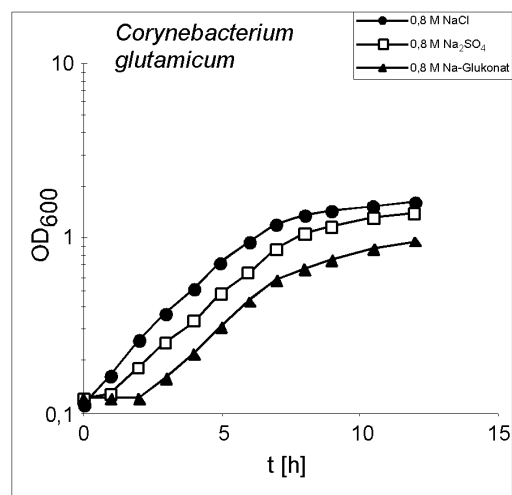
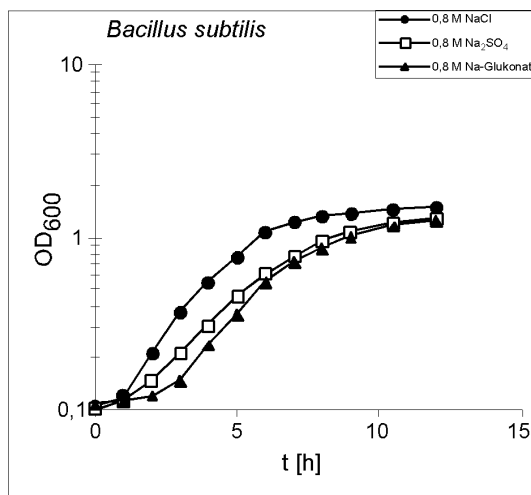
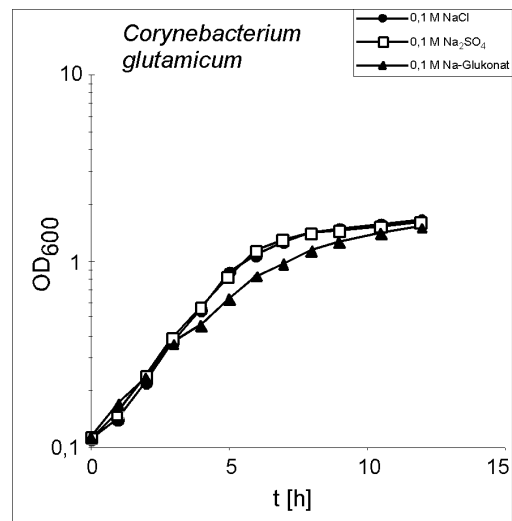
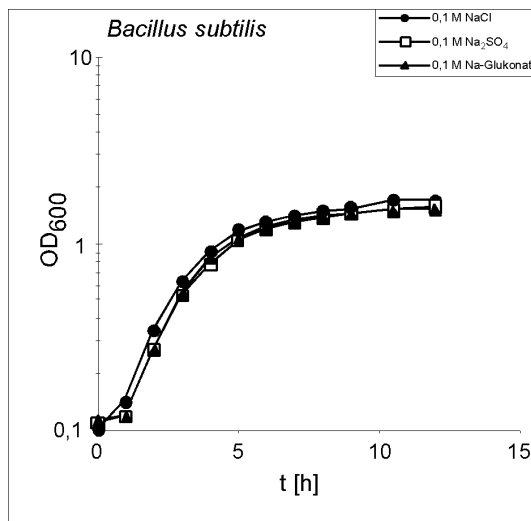
Zhao, R., N. Pathak, H. Jaffe, T. S. Reese und S. Khan (1996b). FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **261**, 195-208.

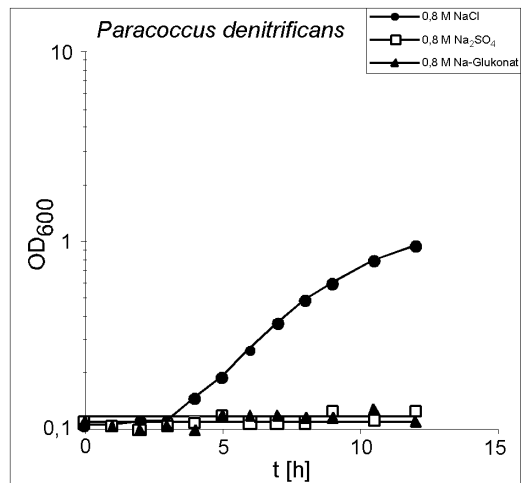
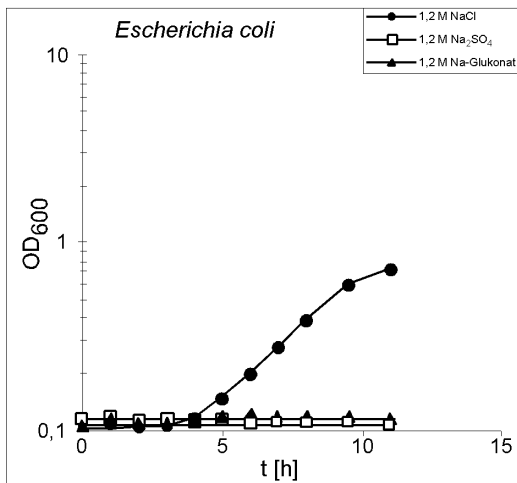
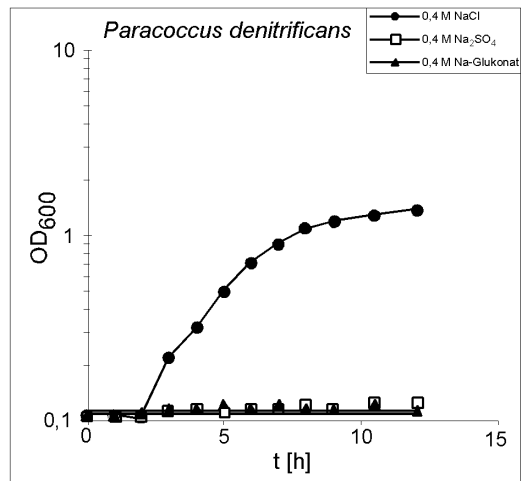
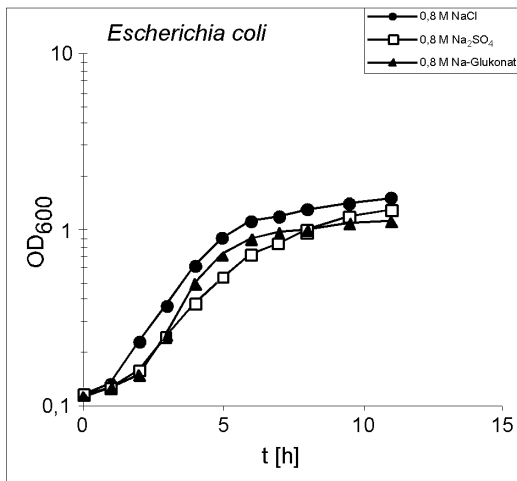
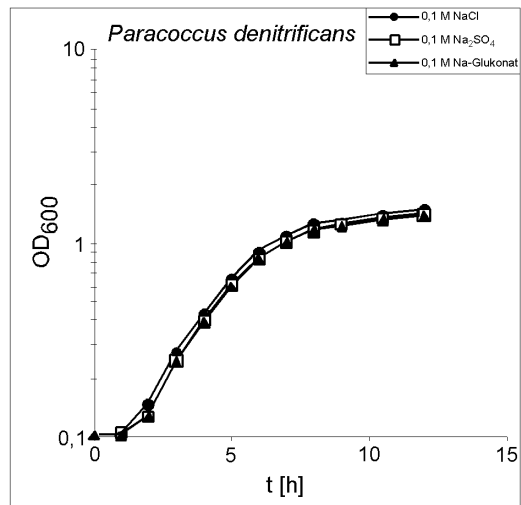
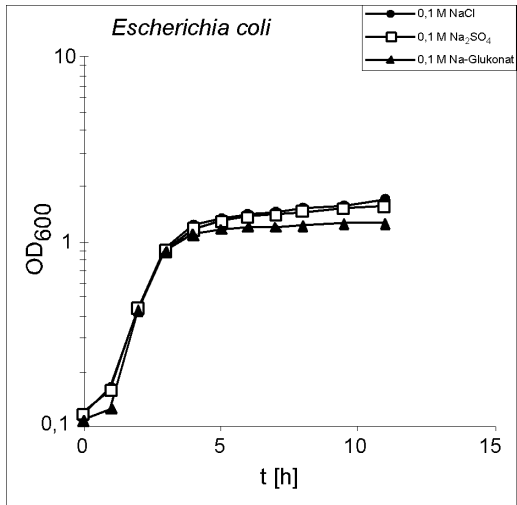
Zuberi, A. R., C. W. Ying, M. R. Weinreich und G. W. Ordal (1990). Transcriptional organization of a cloned chemotaxis locus of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**, 1870-1876.

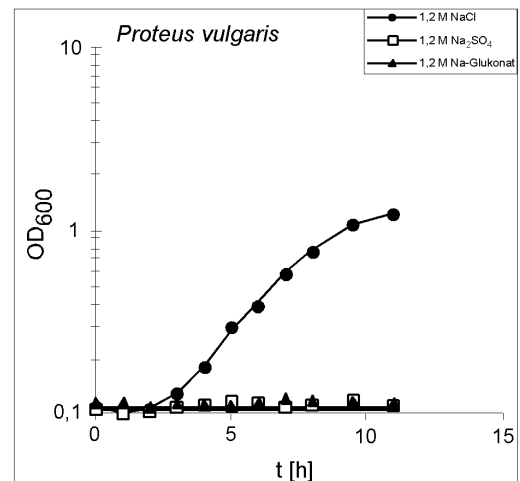
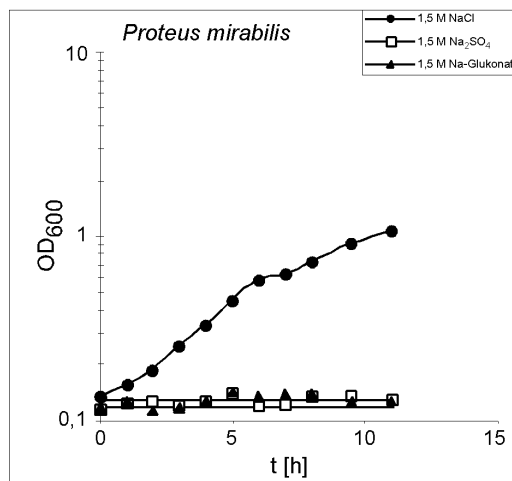
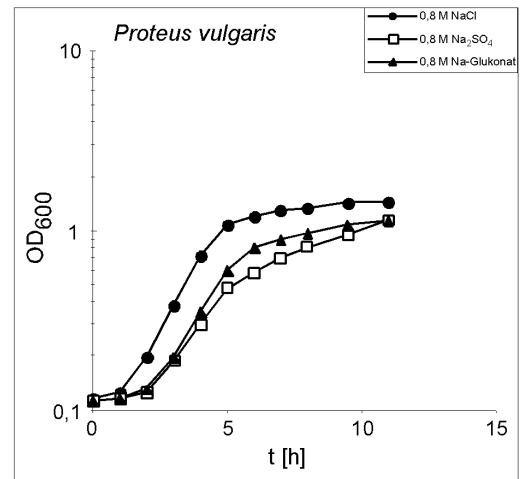
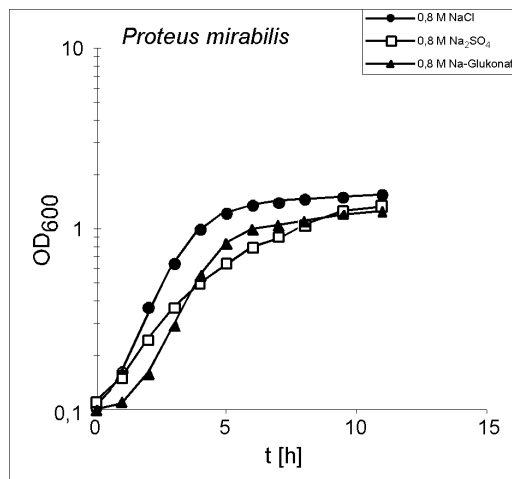
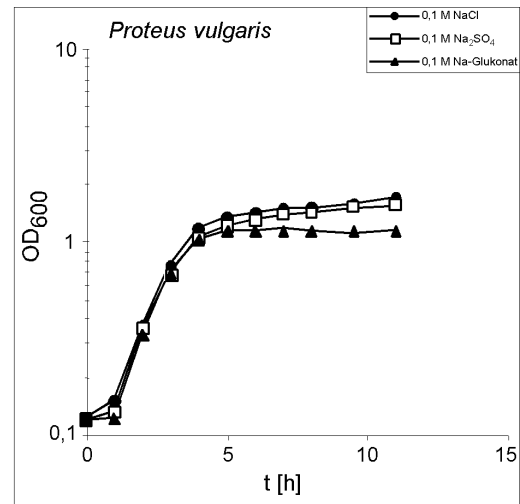
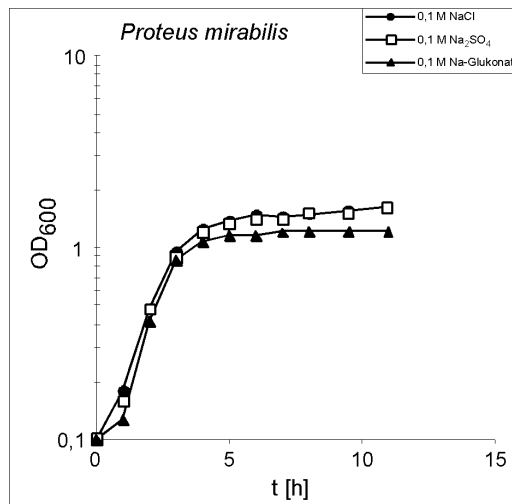
7 Anhang

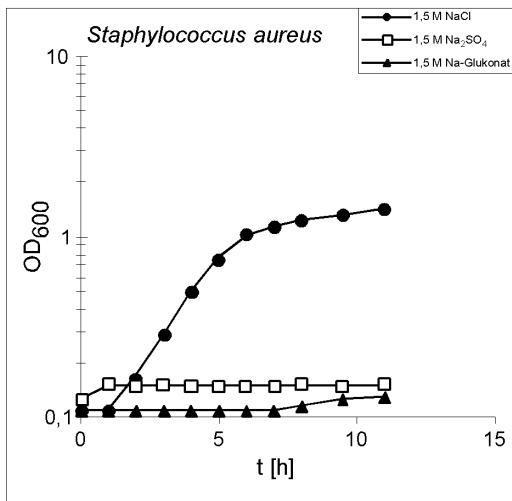
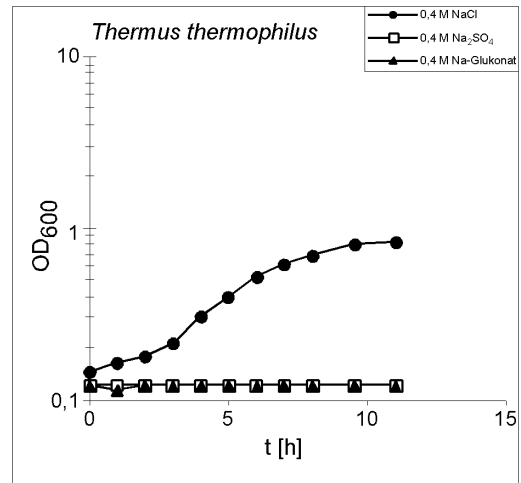
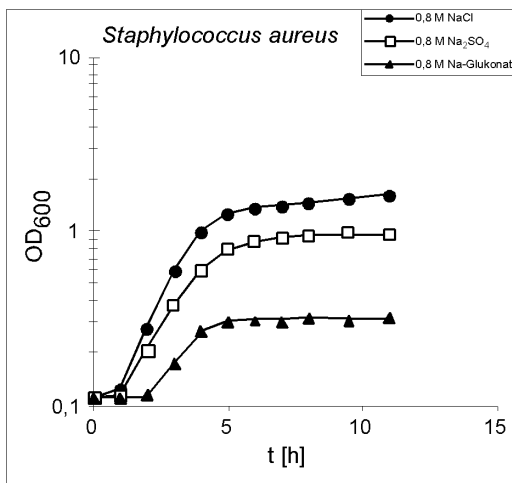
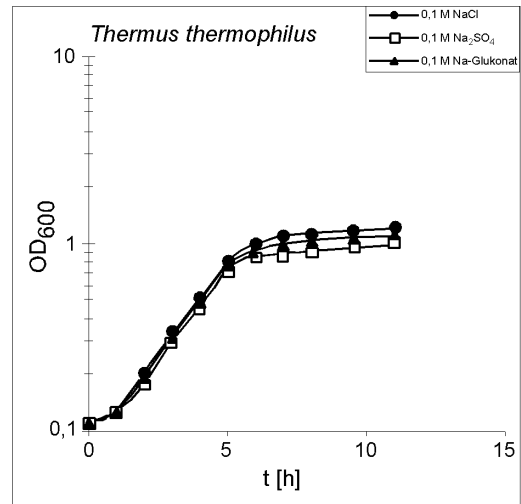
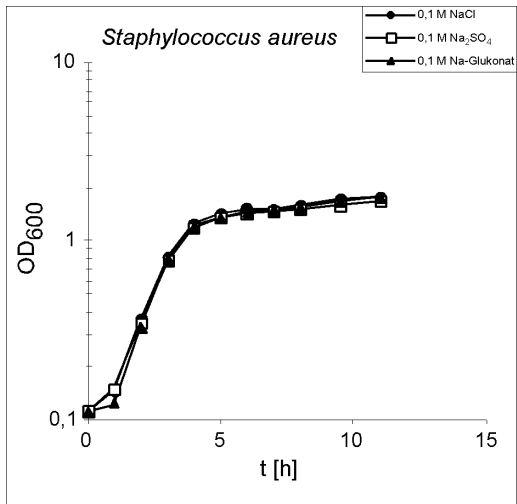
In diesem Anhang sind die Wachstumskurven der Versuche zur Cl^- -abhängigen Osmotoleranz weiterer Gram-positiver und -negativer Bakterien dargestellt. Gezeigt sind jeweils die getesteten Konzentrationen an NaCl , Na_2SO_4 oder Na-Glukonat wie bei den einzelnen Kurven angegeben.

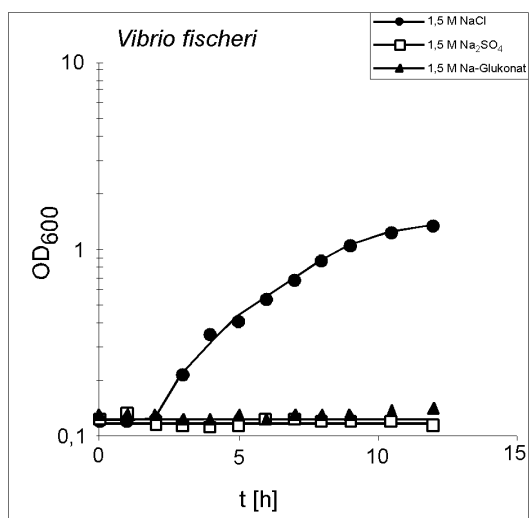
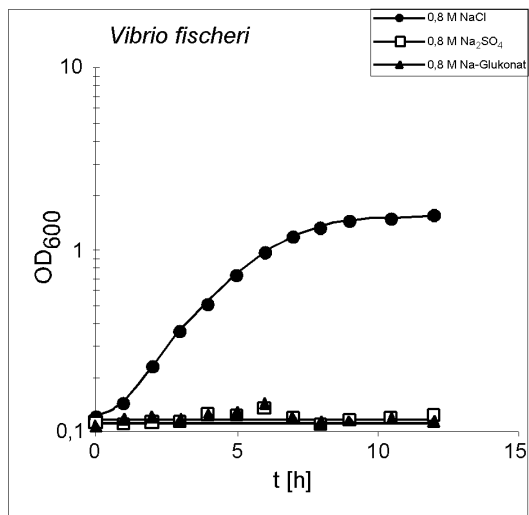
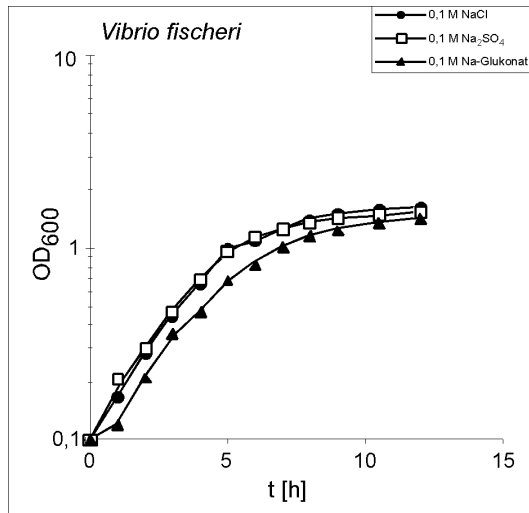












Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Volker Müller für die Anregung zur Bearbeitung dieses interessanten Themas. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für das immerwährende Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die ständige Bereitschaft zu stimulierenden Diskussionen bedanken.

Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Gerhard Wanner und seinem Team. Xaver Sewald gilt mein Dank für die Hilfe bei der Durchführung der Wachstumsversuche.

Bei den „alten Göttingern“ Claudia, Thorsten und Sascha möchte ich mich ganz besonders bedanken. Bei Sascha für die wertvollen Tips im Labor, und ohne Thorsten wäre wohl so manches Computerproblem ungelöst geblieben. Da ich bei Claudia gar nicht weiß, wo ich mit dem „Danke“ sagen anfangen soll, danke ich ihr ganz herzlich für einfach alles.

Allen anderen Mitarbeitern der AG Müller, die im Laufe der Jahre kamen und gingen, sowie den weiteren Mitarbeitern am Institut danke ich für die gewährte Unterstützung bei Problemen jeglicher Art. Aus diesem Kreise gilt mein besonderer Dank Mike für aufschlußreiche wissenschaftliche und private Diskussionen.

Mein persönlicher Dank an meine Freunde und meine Schwestern nebst deren Familien, die die Höhen und Tiefen meiner Arbeit aus nächster Nähe miterlebt haben. Mein herzlichster Dank gilt dabei Holger, der mir in fachlichen und privaten Gesprächen immer mit seinem Rat zur Seite stand, sowie meinem kühnen Ratgeber Kord.

Tief verbunden bin ich letztendlich meinen Eltern, die das alles hier überhaupt erst möglich gemacht haben.

Danke!

16. März 1972 geboren in der Hansestadt Lübeck
- 1978 bis 1982 Besuch der Anna-Siemsen-Grundschule in Lübeck
- 1982 bis 1991 Besuch des Thomas-Mann-Gymnasiums in Lübeck,
Abschluß Abitur
- 09/1991 bis 10/1992 Zivildienst an der Medizinischen Universität zu
Lübeck
- 10/1992 bis 12/1997 Studium der Biologie an der Georg-August-
Universität zu Göttingen
- 10/1994 Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Physika-
lische Chemie, Anorganische Chemie und Zoologie
- 10/1996 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie,
Biochemie und Chemie
- 12/1996 bis 12/1997 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der
Georg-August-Universität zu Göttingen unter
Leitung von Prof. V. Müller mit dem Titel „Wachs-
tumsphysiologische Untersuchungen an *Halo-
bacillus halophilus*“
- 01/1998 Beginn der experimentellen Arbeiten zur
vorliegenden Dissertation

