

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für  
Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Signaltransduktion durch Zwei-Komponenten  
Systeme in dem halophilen Archaeon  
*Halobacterium salinarum*

**Andy Wende**  
aus Guben

2006



## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 20. Juli 2006

.....

Andy Wende

Dissertation eingereicht am: 28.04.2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
2. Gutachter: Prof. Dr. Kirsten Jung

Mündliche Prüfung am: 19.07.2006



*für Marcella*

Wissenschaft

Einem ist sie die hohe, himmlische Göttin, dem anderen  
Eine tüchtige Kuh, die ihn mit Butter versorgt.

Johann Wolfgang von Goethe



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Der archaeale Einzeller <i>Halobacterium salinarum</i> . . . . .	3
2.2	Regulation durch Zwei-Komponenten Systeme . . . . .	5
2.3	Zwei-Komponenten Systeme in <i>H. salinarum</i> . . . . .	9
2.4	Zielsetzung . . . . .	10
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>11</b>
3.1	Bioinformatische Analyse der ZKS von <i>H. salinarum</i> . . . . .	11
3.1.1	Die halobakteriellen Kandidatengene bzw. -proteine . . . . .	15
3.1.2	Homologien der Sensorbereiche der Histidinkinasen . . . . .	18
3.1.3	Verwandschaftsanalyse der Histidinkinasen . . . . .	22
3.1.4	Analyse der Effektorbereiche der Antwortregulatoren . . . . .	23
3.1.5	Verwandschaftsanalyse der Empfängerdomänen . . . . .	25
3.1.6	Zusammenfassung der bioinformatischen Analyse . . . . .	26
3.2	Phosphatabhängiges Verhalten von <i>H. salinarum</i> . . . . .	28
3.2.1	Phosphatabhängige Genregulation in Bakterien . . . . .	28
3.2.2	Anhaltspunkte im Genom von <i>H. salinarum</i> . . . . .	29
3.2.3	Phosphatabhängigkeit der Zelldichten . . . . .	30
3.2.4	Expression von Alkalischer Phosphatase in <i>H. salinarum</i> . . . . .	31
3.2.5	Phosphatmangel induzierte Dynamik des Transkriptoms . . . . .	32
3.2.6	Validierung und Quantifizierung der Geninduktionen . . . . .	48
3.2.7	Analyse der intrazellulären Phosphatkonzentration . . . . .	51
3.2.8	Eruierung des Signalwegs zum Pho-Regulon . . . . .	54

3.2.9	Phosphatabhängige Taxis von <i>H. salinarum</i> . . . . .	55
3.2.10	Zusammenfassung des phosphatabhängigen Verhaltens . . . . .	64
3.3	Die PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R . . . . .	66
3.3.1	Heterologe Expression von PAS3855 in <i>E. coli</i> . . . . .	69
3.3.2	Kofaktor und Rekonstitution von PAS3855 . . . . .	71
3.3.3	Größenbestimmung von PAS3855 durch Gelfiltration . . . . .	72
3.3.4	Optische Eigenschaften der PAS3855-Holodomäne . . . . .	73
3.3.5	Gelfiltration von deoxy-PAS3855 . . . . .	76
3.3.6	Phänotyp der Deletionsmutante $\Delta$ OE3855R . . . . .	77
3.3.7	Zusammenfassung für PAS3855 . . . . .	78
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
4.1	Bioinformatische Analyse der halobakteriellen ZKS . . . . .	81
4.1.1	Die Verbreitung der ZKS in den drei Reichen . . . . .	81
4.1.2	Die halobakteriellen HK und RR . . . . .	82
4.2	Phosphatabhängiges Verhalten auf Ebene der Genregulation . . . . .	85
4.2.1	Kritische Phosphatkonzentration . . . . .	86
4.2.2	Alkalische Phosphatase als Messgröße des Phosphatstress . . . . .	86
4.2.3	Transkriptomanalyse der Phosphatstressantwort . . . . .	87
4.2.4	Der Phosphatspeicher und seine Bedeutung . . . . .	93
4.2.5	Der Weg vom auslösenden Signal bis zur zellulären Reaktion . . . . .	96
4.3	Die Phosphattaxis von <i>H. salinarum</i> . . . . .	100
4.3.1	Phosphattaxis im Prokaryotenreich . . . . .	100
4.3.2	Auslöser und Sensoren der halobakteriellen Phosphattaxis . . . . .	100
4.3.3	Transkriptomanalyse und Ringwanderung . . . . .	102
4.4	Die PAS-Domäne von OE3855R . . . . .	103
4.4.1	PAS-Domänen allgemein und in <i>H. salinarum</i> . . . . .	103
4.4.2	Die Expression von PAS3855 . . . . .	104
4.4.3	Die Oligomerisierung von PAS3855 . . . . .	105
4.4.4	Die Wechselwirkungen zwischen Häm B und PAS3855 . . . . .	107
4.4.5	Die physiologische Bedeutung von OE3855R . . . . .	108

<b>5</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>111</b>
5.1	Materialien . . . . .	111
5.1.1	Stämme . . . . .	111
5.1.2	Plasmide . . . . .	111
5.1.3	Oligonukleotide . . . . .	113
5.1.4	Antikörper . . . . .	114
5.1.5	Chemikalien . . . . .	114
5.1.6	Enzyme, Proteine, Marker . . . . .	115
5.1.7	Kommerzielle Kits . . . . .	115
5.1.8	Sonstige Materialien . . . . .	115
5.1.9	Geräte . . . . .	115
5.1.10	Computerprogramme, Datenbanken etc. . . . .	117
5.2	Allgemeine Methoden . . . . .	117
5.2.1	Absorptionsmessungen . . . . .	117
5.2.2	Antibiotika . . . . .	117
5.3	Mikrobiologische Methoden . . . . .	118
5.3.1	Propagierung und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> . . . . .	118
5.3.2	Propagierung und Aufbewahrung von <i>H. salinarum</i> . . . . .	118
5.3.3	„Chemical-in-cuvette“-Test . . . . .	119
5.4	Molekularbiologische Methoden . . . . .	120
5.4.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>H. salinarum</i> . . . . .	120
5.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	120
5.4.3	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA . . . . .	120
5.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	121
5.4.5	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	121
5.4.6	Transformation von <i>H. salinarum</i> -Zellen . . . . .	122
5.4.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen . . . . .	123
5.4.8	Polymerasekettenreaktionen . . . . .	124
5.4.9	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Lösungen . . . . .	125
5.4.10	Reinigung von DNA-Fragmenten . . . . .	126
5.4.11	Southern Blot und Hybridisierung von DNA . . . . .	126
5.4.12	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>H. salinarum</i> . . . . .	128

5.4.13	DNase-Behandlung der Gesamt-RNA . . . . .	128
5.4.14	Synthese von cDNA . . . . .	128
5.4.15	Herstellung von Mikroarrays . . . . .	129
5.4.16	Prähybridisierung eines Mikroarrays . . . . .	130
5.4.17	Hybridisierung der cDNA auf dem Mikroarray . . . . .	130
5.5	Biochemische Methoden . . . . .	131
5.5.1	Heterologe Expression von 6xHis-OE3855R-PAS . . . . .	131
5.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	132
5.5.3	Detektion von Proteinen nach PAGE . . . . .	133
5.5.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen . . . . .	133
5.5.5	Gelfiltration von PAS3855 . . . . .	134
5.5.6	MS-Analyse von Proteinen und Kofaktoren . . . . .	134
5.5.7	Phosphatase-Aktivitätsmessungen . . . . .	134
5.5.8	Messung intrazellulärer Phosphatkonzentrationen . . . . .	135
5.6	Bioinformatische Methoden . . . . .	136
5.6.1	Sequenzvergleiche, Ähnlichkeitsanalysen, Klonierungen . . . . .	136
5.6.2	Sekundärstrukturvorhersage und Modellierung . . . . .	136
5.6.3	Phylogenetische Analysen . . . . .	136
5.6.4	Programme zur RT-qPCR-Analyse . . . . .	136
5.6.5	Array-Auswertung . . . . .	137
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>141</b>
7.1	Gennummern der Transkriptomanalyse . . . . .	141
7.2	Verwendete Abkürzungen von Speziesnamen . . . . .	142
7.3	Aminosäuresequenzen für phylogenetische Analysen . . . . .	143
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>157</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>159</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Phylogenetischer Stammbaum nach Woese . . . . .	4
2.2	Salzsee mit Halobakterien . . . . .	5
2.3	Schema eines Zwei-Komponenten Systems . . . . .	7
2.4	Systematik von HK und RR . . . . .	8
3.1	Sequenzvergleich von Histidinkinasedomänen . . . . .	12
3.2	Strukturen der Histidinkinase EnvZ . . . . .	13
3.3	Sequenzvergleich von Empfängerdomänen . . . . .	14
3.4	Strukturen der Antwortregulatoren CheY und OmpR . . . . .	14
3.5	PAS-Domäne von HERG . . . . .	21
3.6	Verwandschaftsanalyse der Histidinkinasen . . . . .	22
3.7	Analyse der Effektorbereiche von Antwortregulatoren . . . . .	24
3.8	Verwandschaftsanalyse der Empfängerdomänen . . . . .	25
3.9	Erkenntnisse bezüglich der Wechselwirkungen der HK und RR . . . . .	27
3.10	Pho-Repressorkomplex in <i>E. coli</i> . . . . .	28
3.11	Phosphatabhängige Wachstumsdichten . . . . .	30
3.12	Charakteristika der Alkalischen Phosphatase von <i>H. salinarum</i> . . . . .	32
3.13	Aph-Expression während des Wachstums . . . . .	33
3.14	Schema der Induktion des Phosphatmangels . . . . .	34
3.15	Schemata des Arrays und des Farbstoffwechsels . . . . .	34
3.16	Flussdiagramm der Verarbeitungsschritte der Arraydaten . . . . .	35
3.17	Vulkan-Diagramm der 2h-Mikroarrays . . . . .	36
3.18	Phosphat-Mikroarrays - Phosphatrelevante Gene . . . . .	37
3.19	Phosphat-Mikroarrays - Gene der Atmungskette . . . . .	39

3.20	Biosynthese von funktionellem Bacteriorhodopsin . . . . .	41
3.21	Phosphat-Mikroarrays - Gene für die lichtgetriebene Energiegewinnung .	42
3.22	Phosphat-Mikroarrays - Arginin- u. CarbP-Metabolismus . . . . .	43
3.23	Veränderung des Arginin- und Carbamoylphosphatstoffwechsels . . . . .	43
3.24	Phosphat-Mikroarrays - Stressaktivierte Gene . . . . .	44
3.25	Phosphat-Mikroarrays - Fla / Htr . . . . .	45
3.26	Phosphat-Mikroarrays - Gene der Gasvesikel . . . . .	46
3.27	Phosphat-Mikroarrays - Gene der Transkription und Translation . . . . .	47
3.28	Nachweis von Effizienz und Spezifität der qPCR . . . . .	49
3.29	Anwendung der $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode . . . . .	50
3.30	Abhängigkeit der <i>aph</i> -Induktion von $[P_{intra}]$ . . . . .	53
3.31	Schematische Darstellung des CIC-Tests . . . . .	56
3.32	Chemotaktische Wirkung von Phosphat im CIC-Test . . . . .	57
3.33	Zeitlicher Verlauf der chemotaktischen Reaktion auf Phosphat . . . . .	58
3.34	Beschreibung des Phänotyps der Phosphattaxis . . . . .	59
3.35	Quantitative Bestimmung der pNp-Absorptionen . . . . .	60
3.36	Bestimmung der pNp-Konzentrationen an den Zellringen . . . . .	60
3.37	Phosphattaxis von <i>H. salinarum</i> Flx15 $\Delta cheY$ . . . . .	62
3.38	Phosphattaxis und Wachstum von <i>H. salinarum</i> R1 $\Delta aph$ . . . . .	63
3.39	Zusammenfassung des phosphatabhängigen Verhaltens . . . . .	65
3.40	Sequenzvergleich von PAS-Domänen . . . . .	66
3.41	Phylogenetische Analyse von PAS-Domänen . . . . .	67
3.42	Ähnlichkeit von Häm-PAS-Domänen . . . . .	68
3.43	Modellierte 3D-Struktur und Homologie von PAS3855 . . . . .	69
3.44	Heterolog exprimiertes Polypeptid von OE3855R . . . . .	70
3.45	Gelbilder der Reinigung von PAS3855 . . . . .	70
3.46	Absorptionsspektren von PAS3855-Domäne . . . . .	71
3.47	Gelfiltration von PAS3855 mit und ohne Kofaktor . . . . .	72
3.48	Größenbestimmung der Gelfiltrationsversuche . . . . .	73
3.49	Absorptionsspektren von rekonstituierter PAS3855 . . . . .	74
3.50	Absorptionsspektren von EcDos und SmFixL . . . . .	75
3.51	Gelfiltration von deoxy-PAS3855 . . . . .	77

3.52	Wachstumskurven von R1 $\Delta$ OE3855R vs. wildtyp . . . . .	78
4.1	Bioinformatische Analyse von PhoU-Homologen . . . . .	98
5.1	Herstellung von Deletionsplasmiden . . . . .	112



# Tabellenverzeichnis

3.1	Histidinkinasen und Antwortregulatoren aus <i>H. salinarum</i> . . . . .	16
3.2	BLAST von Sensorbereichen der Histidinkinasen . . . . .	18
3.3	SMART von Sensorbereichen der Histidinkinasen . . . . .	20
3.4	Relevante Gene für die Phosphataufnahme durch <i>H. salinarum</i> . . . . .	29
3.5	Zusammenfassung der Phosphat-Mikroarrays . . . . .	37
3.6	RT-qPCR-Daten phosphatrelevanter Gene . . . . .	50
3.7	Höhe von $[P_{\text{intra}}]$ nach 24h Hunger . . . . .	52
3.8	Aph-Tests von Deletionsstämmen . . . . .	55
3.9	Höhe von $[P_{\text{intra}}]$ nach 24h in BS mit verschiedenen P-Quellen . . . . .	64



# 1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit diente der funktionellen Charakterisierung der Zwei-Komponenten Systeme (ZKS) des halophilen Archaeons *Halobacterium salinarum*. Von der Existenz mehrerer Histidinkinasen (HK) und Antwortregulatoren (RR) neben dem Chemotaxis-ZKS CheA/CheY weiss man nur aufgrund der Sequenzierung des Genoms. Folglich fehlten bislang funktionelle Beschreibungen dieser Proteine. Die vorgelegte Dissertation begann, diesen Mangel zu beheben. Den Laborversuchen war eine bioinformatische Bestandsaufnahme vorgeschaltet, welche die Sensordomänen der HK, die Effektdomänen der RR und die konservierten ZKS-Domänen beider Proteinklassen nach greifbaren Anhaltspunkten durchforstete. Diese Rasterfahndung vermochte jedoch nur bescheidene Hinweise auf die Funktionen und Wechselwirkungen der HK und RR zu erbringen.

Die praktischen Arbeiten zur funktionellen Charakterisierung der halobakteriellen ZKS basierten auf zwei unterschiedlichen Strategien. Der erste Ansatz bestand in dem Versuch einer Funktionszuordnung über die Applikation eines Phosphatmangels, dem alle bislang daraufhin untersuchten Prokaryoten durch eine exklusiv ZKS gesteuerte, differentielle Genexpression entgegenwirken. Im zweiten Ansatz wurde mit OE3855R eine der wenigen HK, deren Primärsequenz einen Hinweis auf die Proteinfunktion lieferte, eingehend biochemisch analysiert.

Für die Phosphatmangelversuche musste zunächst geprüft werden, bei welchem Nährstoffangebot *H. salinarum* in eine Unterversorgung gerät. Den Experimenten zufolge limitiert ein Phosphatgehalt von weniger als 0,5mM im Medium die finale Wachstumsdichte. Die mangelhafte Phosphatversorgung induziert das Gen *aph*, was zu einer verstärkten Produktion und Sekretion des Enzyms Alkalische Phosphatase führt. Mikroarray-Analysen und RT-qPCR-Experimente deckten auf, dass das halobakterielle Pho-Regulon mehrere ABC-Transportsysteme und verschiedene sekretierte Enzyme umfasst. Über die somit stark verbesserten Phosphataufnahmefähigkeiten hinaus ändert

sich die Transkription einer Vielzahl weiterer Gene, wobei es sich wahrscheinlich um sekundäre Effekte handelt. Während der Hungerphase verbraucht *H. salinarum* drei Viertel seines intrazellulären Phosphatspeichers. Die massive Abnahme des Phosphatvorrats ist nicht nur die Folge der Mangelversorgung, sondern gleichzeitig verantwortlich für die Induktion des Pho-Regulons. Das zuständige Regulatorprotein wurde bislang nicht enttarnt. Durch Konstruktion mehrerer Deletionsstämme konnten klassische ZKS als Signaltransduktoren überraschenderweise ausgeschlossen werden. Die Induktion von Proteinen mit Homologien zu DNA bindenden Bereichen von Transkriptionsfaktoren und zu dem regulatorischen Mediatorprotein PhoU deutet auf einen alternativen Regelkreis hin. Dieser wäre exklusiv für Archaea, da solche PhoU-Chimären ausschließlich in archaealen Genomen zu finden sind. Von der Anpassung des Proteininventars abgesehen orientieren *H. salinarum*-Zellen ihre Bewegungen an einem Phosphatgradienten. Diese Chemotaxis wird durch Phosphatmangel induziert und durch das Zwei-Komponenten System CheA-CheY vermittelt. Diese erstmalig in einem Archaeon nachgewiesene Phosphattaxis ist ausschließlich auf anorganisches Phosphat gerichtet.

Laut Primärsequenzanalyse besitzt die Histidinkinase OE3855R eine Häm bindende PAS-Domäne (PAS3855) und könnte daher einen Sauerstoffsensor darstellen. Eine heterologe Expression von PAS3855 sollte dieser Hypothese Substanz verleihen. Das exprimierte Polypeptid enthielt geringe Mengen eines Kofaktors, der mittels Absorptionsspektroskopie und LC-MS-Analyse als Häm des Typs B identifiziert wurde. Auf Basis dieses Wissens erfolgte die Rekonstitution der Domäne mit Häm<sub>B</sub>, was die Bildung eines PAS-Tetramers induzierte. Die spektroskopische Analyse entlarvte große Ähnlichkeiten zwischen den elektronischen Zuständen der zentralen Häm-Eisenionen von PAS3855 und dem Häm bindenden Redoxsensorprotein Dos aus *E. coli*. Da die Reduktion von Fe<sup>III</sup>- zu Fe<sup>II</sup>-PAS3855 die Oligomerisierung der Domäne von einem Tetramer zu einem Dimer veränderte, lag eine redoxabhängige Signalfunktion der Histidinkinase OE3855R nahe. Die Deletion des kodierenden Gens führte zu keinem erkennbaren Phänotyp, weshalb zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden kann, ob diese HK *in vivo* tatsächlich als Redox- oder auch Sauerstoffsensor fungiert.

## 2 Einleitung

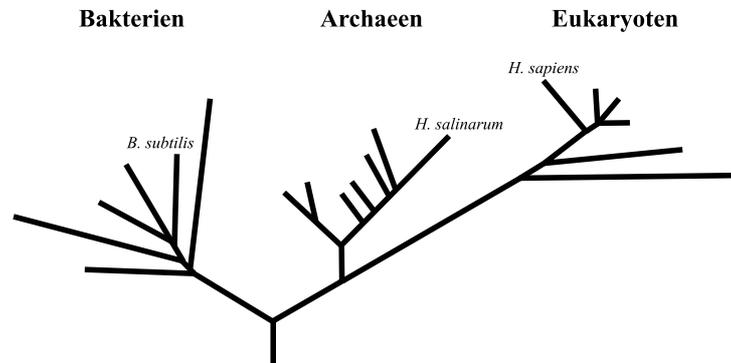
### 2.1 Der archaeale Einzeller *Halobacterium salinarum*

Als das Leben vor etwa 4 Mrd. Jahren begann die Erde zu erobern, bestand es zunächst aus einfach organisierten Zellen. Es dauerte 2,5 Mrd. Jahre, bis Organismen entstanden, die eine stärkere Kompartimentierung inklusive einem Zellkern aufwiesen, und erst nach weiteren 600 Mio. Jahren traten zunehmend mehrzellige Lebewesen auf den Plan der Evolution.

Die heute auf unserer Erde lebenden Spezies werden in drei Domänen unterteilt: Bakterien, Archaeen und Eukaryoten [149]. Die eukaryotische Domäne besteht sowohl aus makroskopischen, mit dem bloßen Auge sichtbaren Vertretern wie Tiere und Pflanzen, als auch aus winzig kleinen Einzellern. Die Vielfalt an Bakterien- und Archaeenarten hingegen offenbart sich nur unter dem Mikroskop, wobei die biochemische Variabilität die morphologische noch weit übertrifft. Abgesehen von einigen filamentösen Spezies wie Streptomyceten und manchen Cyanobakterien, welche sogar eine primitive Form der Differenzierung zeigen, sind alle Bakterien und Archaeen einzellige Organismen. Schätzungen zufolge kennen wir lediglich 1% der bakteriellen und archaealen Vertreter, da nur eine kleine Zahl von ca. 5000 Arten überhaupt kultiviert werden kann [95].

Abbildung 2.1 zeigt einen anhand von rRNA-Sequenzen erstellten phylogenetischen Stammbaum der einzelnen Domänen. Die Abbildung veranschaulicht die verwandtschaftliche Nähe der archaealen ribosomalen RNA zu der rRNA der Eukaryoten. Entsprechend zeigen die Promotorstruktur, der Transkriptionsapparat und Teile der Proteinbiosynthesemaschinerie deutliche Homologien zu denen der Eukaryoten. Morphologisch ähneln Archaeen wiederum den Bakterien, da sie einzellig, kernlos und etwa gleichgroß sind wie diese. Darüber hinaus weisen sie eine ähnliche Stoffwechselvielfalt auf wie Bakterien und organisieren ihre Gene oftmals in polycistronischen Operons.

Neben diesen Ähnlichkeiten zu anderen Domänen besitzen Archaeen auch einige Al-



**Abbildung 2.1:** Phylogenetischer Stammbaum nach Woese *et al.* [149]. Der anhand von rRNA-Sequenzen erstellte Stammbaum zeigt die Verwandtschaftsgrade der drei Domänen des Lebens zueinander. Für jede Domäne ist ein Organismus namentlich aufgeführt.

leinstellungsmerkmale. Eines davon ist die Konstruktion der Zellhülle. Während sich die Zellmembran bei allen bekannten Archaeen aus Etherlipiden aufbaut, unterscheidet man Arten, deren Zellwände aus Pseudomurein, Glykolipid bzw. Glykoprotein bestehen und solchen, die überhaupt keine Zellwand besitzen.

Bis vor kurzem glaubte man, Archaeen spezialisierten sich im Laufe der Evolution ausschließlich auf extreme Habitate wie beispielsweise kochend heiße Quellen, stark alkalische Laugen oder bis zur Sättigung eingedampfte Salzseen. Aufgrund neuerer Untersuchungen weiss man heute jedoch, dass sie in moderaten Umgebungen genauso häufig und artenreich anzutreffen sind wie Bakterien [27].

*Halobacterium salinarum* ist ein Mitglied der archaealen Familie Halobacteriaceae. Es lebt in Salzseen, Wadis oder auch Salzgewinnungsanlagen (Abbildung 2.2). Die hier vorherrschenden, für die meisten Organismen tödlichen Salzkonzentrationen sind für *H. salinarum* essentiell, denn bei Konzentrationen von weniger als 18% NaCl verliert dieses Archaeon seine Wachstumsfähigkeit. Die stäbchenförmigen, polar begeißelten Zellen umgibt eine Zellwand aus Glykoprotein, dem sogenannten S-Layer. Als C-Quelle sowie zur Energiegewinnung dienen ihnen hauptsächlich Aminosäuren [123]. Unter anaeroben Bedingungen können DMSO bzw. TMAO an die Stelle des Sauerstoffs als terminalen Elektronenakzeptor treten [87]. Außerdem ist *H. salinarum* in der Lage, Sonnenenergie mit Hilfe des Bacteriorhodopsins zu nutzen, um unabhängig von Atmungs- und Gärungsprozessen einen Protonengradienten über die Zellmembran aufzubauen, mit dem ATP-Synthese betrieben werden kann [90].



Abbildung 2.2: Durch Halobakterien rosa gefärbter Salzsee.

## 2.2 Regulation durch Zwei-Komponenten Systeme

Die Interaktion mit ihrer Umwelt und die Reaktion auf veränderte Umweltreize ist für alle Organismen lebenswichtig. Die Weiterleitung und Umwandlung eines Umweltreizes in eine zelluläre Antwort wird allgemein als Signaltransduktion bezeichnet. Die so ausgelösten Reaktionsstrategien einzelliger Organismen lassen sich grob in zwei Bereiche gliedern. Der erste besteht in der Anpassung der Proteinausstattung an auftretende Umweltveränderungen. Beispiele aus *H. salinarum* sind die Induktion von Genen zur Argininfermentation durch den Transkriptionsfaktor ArgR [109], die Induktion der Synthese der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bacteriorhodopsin durch den Regulator Bat [41] sowie die durch GvpD und GvpE gesteuerte Produktion von Gasvesikeln [50]. Die gerichtete Veränderung des eigenen Standorts hin zu einer vorteilhafteren Umgebung stellt die zweite Strategie dar und firmiert unter dem Begriff Taxie. *H. salinarum* kann sowohl Licht, Sauerstoff als auch verschiedenste Chemikalien detektieren und seine Schwimmrichtung entsprechend adaptieren. Dazu verfügt es über ein Sensorenspektrum und Signaltransduktionssystem, das starke strukturelle und funktionelle Homologien zu entsprechenden bakteriellen Systemen aufweist [107].

Die beiden wichtigsten Komponenten der Taxie vermittelnden Signaltransduktionskette sind die Histidinkinase CheA und der Antwortregulator CheY. Mittels dieser beiden Moleküle erfolgt die Weiterleitung des vom Sensorprotein aufgefangenen Signals zum Flagellarmotor. Aktiviertes CheA phosphoryliert CheY, die Bindung von CheY~P an den Flagellarmotor lässt diesen seine Drehrichtung häufiger ändern. CheA und CheY zählen zu den weit verbreiteten Zwei-Komponenten-Systemen (ZKS).

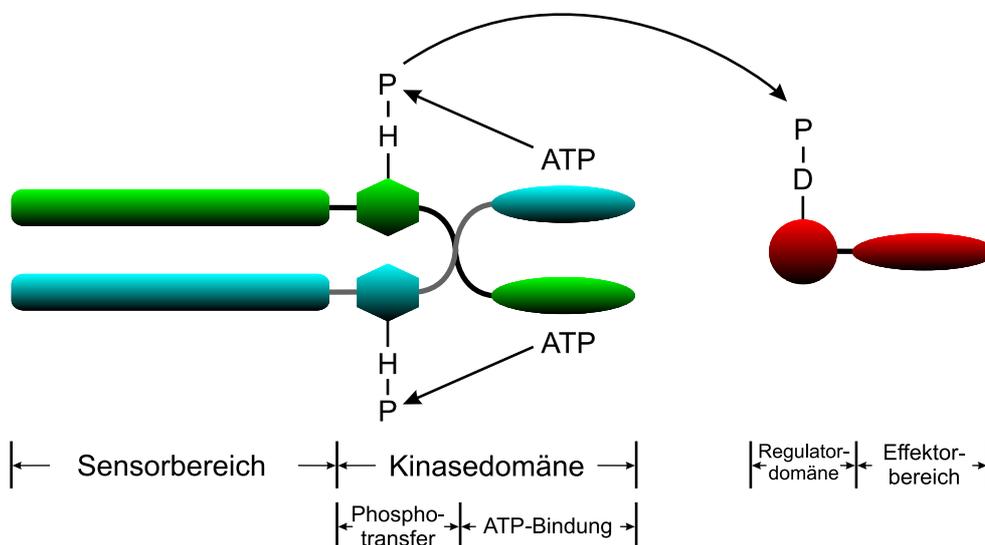
Die große Bedeutung der Zwei-Komponenten Systeme für die Signalweiterleitung in Bakterien wurde vor knapp 20 Jahren erkannt [88]. Seitdem fand man in Organismen der drei Domänen des Lebens viele hundert Proteine dieser Klasse. Neben der Vermittlung von gerichteten Zellbewegungen kennt man auch Systeme, die die Transkription von einzelnen Genen oder ganzen Operons kontrollieren. Taxievermittelnde und transkriptionsregulierende Systeme unterscheiden sich unter anderem auch dadurch, dass sich die Rezeptordomäne bei letzteren auf dem gleichen Polypeptidstrang befindet wie die Kinasedomäne. Im Folgenden richtet sich der Fokus auf solche ZKS, die die Transkription bestimmter Zielgene kontrollieren.

Einen kleinen Einblick in die mannigfaltigen Umweltreize und zellulären Abläufe, die von Zwei-Komponenten Systemen detektiert bzw. dirigiert werden, sollen die folgenden Beispiele gewähren. *Escherichia coli*, eines der bestuntersuchten Bakterien überhaupt, besitzt etwa 30 solcher Systeme. Hier steuern sie u.a. die Regulation des osmotischen Drucks sowie die Aufnahme von Nitrat, Phosphat und verschiedenen Metallionen [156]. All diese Funktionen erfüllen sie durch die Aktivierung der Transkription entsprechender Enzyme und Transporter. Sehr viele Bakterien nutzen ZKS zur Zelldichte abhängigen Aktivierung von physiologischen Vorgängen („quorum sensing“). Pathogene wie *Staphylococcus aureus* steuern so ihre Virulenz und *Bacillus subtilis* induziert die Sporulation wie auch die Produktion von antimikrobiellen Peptiden abhängig von der Populationsdichte [62]. Die Differenzierung von *Caulobacter crescentus* und *Mycococcus xanthus* wird entsprechend der Zelldichte eingeleitet [125]. Bei *Rhodobacter capsulatus* findet man eine durch ZKS vermittelte anaerobe De-Repression von Genen für Photosynthese, Stickstoff- und Kohlenstofffixierung, Respiration und Elektronentransport [12]. Vancomycin-Resistenzen in *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen hängen mit Mutationen in einem Zwei-Komponenten System zusammen [89]. *Arabidopsis thaliana* steuert seine Cytokinin abhängige Entwicklung, die Blütenbildung und wahrscheinlich auch den osmotischen Druck einiger seiner Zellen mit Hilfe von ZKS [40]. In Pilzen wie *Candida albicans* und *Neurospora crassa* sind sie in die Hyphenbildung und Osmoregulation involviert [125].

In der dritten, noch am wenigsten erforschten Domäne des Lebens, den Archaeen, weiß man aus Genomsequenzierungen von der Existenz einiger Histidinkinase- und Antwortregulator-Gene. Jedoch liegen hier lediglich für die Taxis vermittelnden Che-

Systeme funktionelle Daten vor [108, 130].

Trotz der Vielzahl an Stimuli, die durch Zwei-Komponenten Systeme verarbeitet werden, kennzeichnet diese ein einfacher, modularer Aufbau. Die erste Komponente ist die Histidinkinase (HK). Sie besteht aus einem Rezeptorbereich und der Kinasedomäne. Die sehr divergenten Rezeptorbereiche der verschiedenen Histidinkinasen zeigen nur geringe Homologien in der Primärsequenz. Im Fall der HK CheA bestätigt sich einmal mehr die faszinierende Effizienz der Evolution. Durch das immergleiche Ziel, die Rotation des Flagellarmotors zu beeinflussen, lagerte die Natur den Rezeptorbereich von CheA auf separate Proteine aus. Damit eignet sich CheA für die Transduktion der unterschiedlichsten Signale. Die Kinasedomänen von Histidinkinasen hingegen sind gut konserviert und umfassen eine ATP-Bindetasche, eine ATPase-Aktivität und ein Phosphorylierungsmotiv mit einem hochkonservierten Histidin. Die zweite Komponente des Transduktionssystems bildet der Antwortregulator (RR, engl.: „response regulator“). Er setzt sich zusammen aus der Empfängerdomäne, welche ein konserviertes Aspartat enthält, und einem zumeist DNA bindenden Effektorbereich, der durch Interaktion mit der RNA-Polymerase die Transkriptionsstärke der Zielgene beeinflusst.

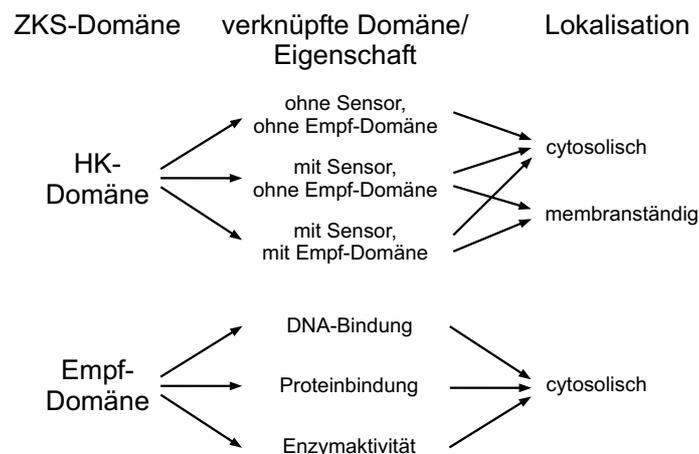


**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung eines Zwei-Komponenten Systems nach Hoch [49]. Durch Hydrolyse von ATP wird ein Histidin in der HK phosphoryliert. Der Phosphatrest wird auf ein Aspartat des RR übertragen, wodurch sich dessen Bindungsaffinität zu seiner DNA-Erkennungssequenz ändert.

Die einfachste Anordnung funktioneller Zwei-Komponenten Systeme besteht in der Kopplung einer Histidinkinase mit einem Antwortregulator, woraus sich auch der Name

ableitet (Abbildung 2.3). Die Detektion eines adäquaten Reizes im Rezeptorbereich der Histidinkinase führt unter ATP-Hydrolyse zu einer Phosphorylierung zweier Kinasen *in trans* an deren konservierten Histidinresten. Durch Interaktion einer HK mit der Empfängerdomäne ihres spezifischen Antwortregulators überträgt die Kinase den Phosphatrest vom Histidin auf das konservierte Aspartat des Antwortregulators. Die Phosphorylierung verändert die Konformation der Empfängerdomäne, sodass der DNA bindende Bereich nicht mehr sterisch abgeschirmt wird und an seine Erkennungssequenz auf der DNA andocken kann [49]. Nach erfolgter DNA-Bindung moduliert der RR durch Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase die Transkriptionsstärke bestimmter Gene.

Neben diesem einfachen und in Bakterien häufigsten Motiv kennt man noch komplexere Verschaltungen von ZKS-Proteinen. So findet man in Eukaryoten fast ausschließlich hybride Histidinkinasen [40]. Diese tragen neben den bereits besprochenen HK-typischen Domänen noch eine Empfängerdomäne. Weiterhin wirken die meisten eukaryotischen ZKS nur mittelbar auf die Transkription von Zielgenen, indem sie andere die Genexpression regulierende Systeme aktivieren [125]. Die Sporulation von *B. subtilis* wird durch ein sogenanntes Phosphorelais reguliert. Dabei läuft die Phosphorylierungskaskade über vier Stationen bevor eine DNA-Bindung durch den RR stattfindet. Hier sind also quasi zwei ZKS in Reihe geschaltet [49]. Die Vielfalt der Eigenschaften, die mit Histidinkinase- und Empfängerdomänen verknüpft sein können, lässt sich entsprechend Abbildung 2.4 kategorisieren.



**Abbildung 2.4:** Systematische Übersicht von Eigenschaften, die mit den namensgebenden Domänen verknüpft sein können sowie mögliche Lokalisationen der Proteine. Empf-Domäne: Empfängerdomäne

## 2.3 Zwei-Komponenten Systeme in *H. salinarum*

Wie bereits erwähnt, ist *H. salinarum* ein Salz liebender, ja Hochsalz brauchender Organismus. Dies bedeutet, dass seinen Lebensraum relativ wenige Variablen kennzeichnen. Dennoch muss auch *H. salinarum* auf Umweltveränderungen reagieren können. Zu dem Repertoire an wahrgenommenen Reizen gehören neben den oben besprochenen wie Licht und verschiedenste Aminosäuren auch Sauerstoff und kompatible Osmolyte [52, 64].

Das mit 68% sehr GC-reiche Genom von *H. salinarum* R1 besteht aus einem ca. 2 Mbp großen Chromosom und vier Megaplasmiden mit einer Länge von je 40 bis 284 kbp [133]. Unter den ca. 2800 annotierten Genen befinden sich auch 19 ORFs, die für Proteine mit Sequenzhomologien zu Zwei-Komponenten Systemen kodieren. Die Homologien deuten auf einfache Histidinkinasen, Antwortregulatoren und Hybridkinasen hin, darunter auch das CheA-CheY-System, welches Signale zwischen den halobakteriellen Transducern und dem Motor der polaren Geißeln vermittelt [105]. Die Funktion der übrigen Kinasen und Regulatoren ist bis jetzt ungeklärt. Möglicherweise steuern sie die Transkription verschiedener Gene. Das eingangs angesprochene archaeale Informationsdefizit bezüglich transkriptionsaktiver ZKS gilt somit auch für *H. salinarum*.

## 2.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den bislang nicht untersuchten Histidinkinasen und Antwortregulatoren von *Halobacterium salinarum* diskrete Funktionen zuzuordnen.

Vor dem Beginn der experimentellen Arbeiten erfolgte eine umfangreiche bioinformatische Analyse der Kandidatengene. Dabei wurde deren Zahl und Anordnung bewertet und die Primärsequenzen sowohl der konservierten als auch variablen Proteinbereiche untersucht. In den variablen Sensorbereichen der Histidinkinasen wurde zusätzlich nach Proteindomänen mit bekannten sensorischen Funktionen gefahndet.

Die molekularbiologische und biochemische Analyse beruhte auf zwei Strategien:

1. Untersuchung der Reaktion von *H. salinarum* auf einen Umweltreiz, der in Bakterien von Zwei-Komponenten Systemen detektiert und sowohl zum Genom als auch zum Flagellarmotor transduziert werden kann. Die Wahl fiel auf den Phosphatmangel und das Verhalten von *H. salinarum* unter entsprechenden Bedingungen.
2. Analyse von Proteindomänen innerhalb der Sensorbereiche der halobakteriellen Histidinkinasen. Die biochemischen Arbeiten hierzu konzentrierten sich auf die PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R.

## 3 Ergebnisse

Der dreigliedrige Ergebnisteil beginnt mit einer *in silico* Analyse der halobakteriellen Histidinkinase- und Antwortregulatorgene sowie ihrer Translationsprodukte. Aufbauend auf den Daten dieser Untersuchung erfolgte die experimentelle Bearbeitung von zwei Strategien, um einigen dieser Proteine diskrete Funktionen zuzuordnen.

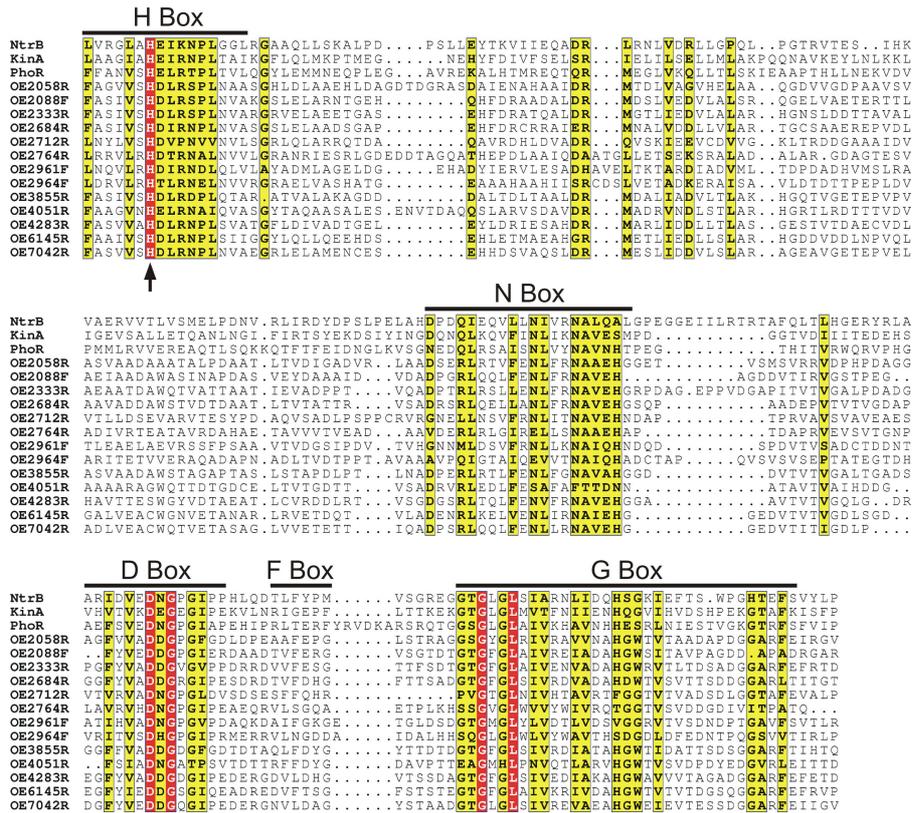
### 3.1 Bioinformatische Analyse der halobakteriellen Zwei-Komponenten Systeme (ZKS)

Die Sequenzierung und Annotation des Genoms deckte die Existenz von weiteren Histidinkinasen (HK) und Antwortregulatoren (RR, engl.: „response regulator“) neben CheA und CheY in *H. salinarum* auf [133]. Die entsprechenden Gene wurden anhand der für Zwei-Komponenten Systeme (ZKS) typischen Motive identifiziert. Dazu genügte die Durchführung eines einfachen Sequenzvergleichs mit ZKS-Proteinen anderer Organismen mittels BLAST [3], wie in den Abbildungen 3.1 und 3.3 dargestellt.

Die typische Länge des Kinasekerns, bestehend aus der Dimerisierungsdomäne (H Box) und der katalytischen Domäne (N, D, F und G Box), beträgt ca. 200 Aminosäuren. Die Bezeichnung einzelner Bereiche des Kinasekerns als Boxen geht auf Parkinson und Kofoed zurück [97]. Namensgebend waren dabei die besonders hoch konservierten Aminosäuren in den jeweiligen Bereichen.

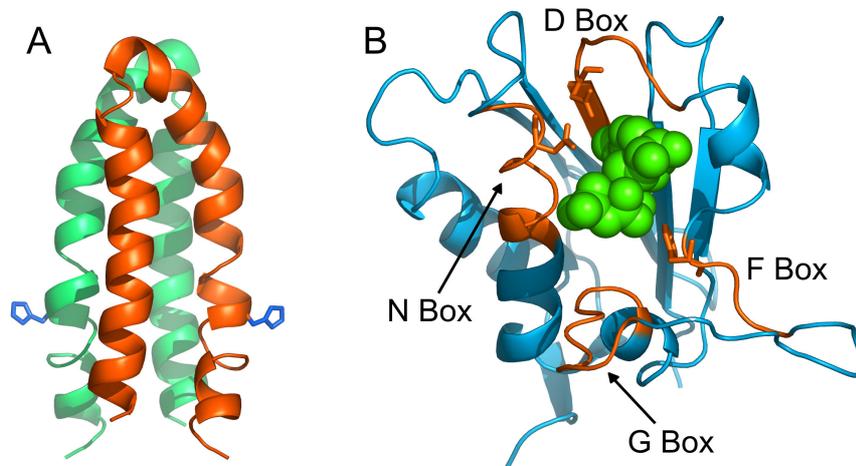
Grebe und Stock teilten die Histidinkinasen anhand der Homologien in den Kinasedomänen vor einigen Jahren in verschiedene Familien ein [39] (siehe auch Abschnitt 3.1.3 ab S. 22). Die Phosphorylierung des Histidins in HK der Familie 10, welche allesamt 5 bis 7 membrandurchspannende Helices aufweisen, geschieht ohne Dimerbildung. In den anderen 12 Familien hängt die Kinaseaktivität jedoch generell von der Dimerisierung zweier Histidinkinasen ab [150]. Das Dimerisierungsmotiv ist dabei die H Box. Sie besteht aus zwei um sich geschlungenen  $\alpha$ -Helices („coiled-coil“), welche nach der Dime-

risierung ein 4-Helix-Bündel bilden (Abbildung 3.2A). In diesem Homodimer werden die Histidinreste von der jeweils anderen Kinase phosphoryliert. Eine Modifikation dieses Prinzips ist in den CheA-Proteinen (HK-Familie 9) zu finden. Das Dimerisierungsmotiv liegt hier nicht unmittelbar N-terminal von der katalytischen Domäne, sondern am N-Terminus des Polypeptidstrangs als sogenannte Hpt-Domäne vor [150].



**Abbildung 3.1:** Sequenzvergleich der Kinasekernbereiche von Histidinkinase aus *H. salinarum*, *E. coli* und *B. subtilis*. Die Phosphorylierungsstelle (Histidinrest) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Rot: 100% Sequenzidentität innerhalb des vorliegenden Sequenzvergleichs. Gelb: konservierte aber nicht vollständig identische Aminosäuren.

Die flexible ATP-Bindetasche der katalytischen Domäne, dargestellt in Abbildung 3.2B, wird durch die N, D, F und G Boxen gebildet und weist Homologien zu den ATP-Bindedomänen von Typ II-Topoisomerasen, dem „mismatch repair protein“ MutL und Hitzeschockproteinen der Hsp90-Klasse auf. Das Aspartat der D Box bildet eine Wasserstoffbrücke zum Adenin aus, ein Magnesiumion verbindet die ATP-Phosphate mit Resten in der N Box. Schließlich hält ein Deckel, den der Bereich um die F Box bildet und dessen Scharnier die G Box darstellt, das ATP in der Bindetasche zurück [150].



**Abbildung 3.2:** NMR-Strukturen des Dimerisierungsmotivs (1JOY) und der katalytischen Domäne (1BXD) der HK EnvZ. A: Dimer aus zwei H Boxen; das Phosphorylierungsmotiv His243 ist als Stäbchenmodell in blau hervorgehoben. B: Katalytische Domäne; die N, D, F und G Boxen sind farblich abgesetzt und deren namensgebende Reste als Stäbchenmodell hervorgehoben; in der ATP-Bindetasche befindet sich das ATP-Analogon ANPPNP (grünes Kalottenmodell).

Die zweite Komponente der ZKS sind die Antwortregulatoren. Diese enthalten eine Empfängerdomäne (engl.: „receiver domain“) und eine Effektor-domäne. Eine der wenigen Ausnahmen von diesem Schema bildet CheY, das nur aus einer Empfängerdomäne besteht, die gleichzeitig eine Effektorfunktion erfüllt. Empfängerdomänen können aber auch mit Sensor- und HK-Domänen verknüpft sein. Diese Proteine bezeichnet man als Hybridkinasen (Hybrid-HK).

Kristallstrukturen von Empfängerdomänen, deren typische Länge etwa 120 Aminosäuren beträgt, zeigen ein fünfsträngiges paralleles  $\beta$ -Faltblatt umgeben von fünf  $\alpha$ -Helices (Abbildung 3.4A). Die mittlere Sequenzidentität von Empfängerdomänen liegt bei ca. 20% (siehe auch Abbildung 3.3). Die wenigen hochkonservierten Aminosäuren D57, D12 und D13 (Nummerierung des *E. coli* CheY, hervorgehoben in Abb. 3.4A) befinden sich alle im aktiven Zentrum. D12 und D13 koordinieren ein für die Phosphorylierung/Dephosphorylierung des D57 wichtiges  $Mg^{2+}$ -Ion. Zwei weitere konservierte Aminosäuren sind T87 und K109, die eine große Rolle bei den Konformationsänderungen spielen, welche die Aspartatphosphorylierung verursacht. Neben der biologisch wohl bedeutenderen Phosphatübertragung durch Histidinkinase, können RR übrigens auch mit Hilfe von Donormolekülen wie Acetyl-, Carbamoyl- oder Imidazol-Phosphat phosphoryliert werden [125].

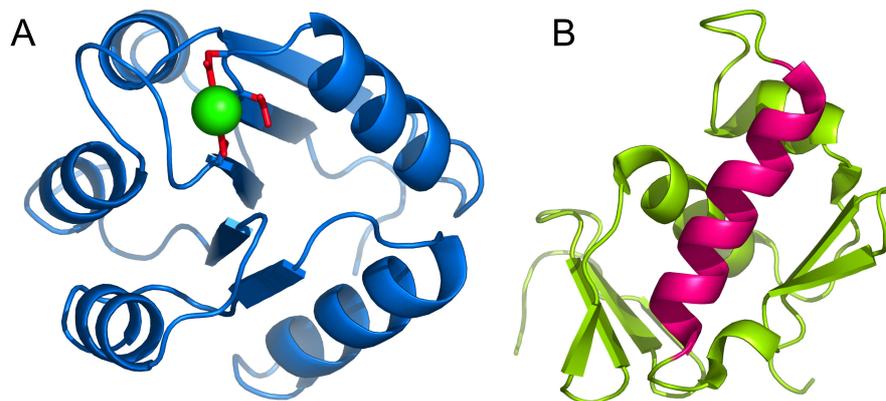
OmpR	QENYK	I	V	D	D	M	R	L	R	A	L	L	E	R	V	L	T	E	Q	G	.	.	F	V	R	S	V	A	N	A	E	O	M	D	R	L	L	T	R	E	S	F	H	L	M	V	L	D	L	M	P	G	E	D	G	L	S	I	C	R	R	L	R	.	S	Q	S	N	P	M	P			
Spo0F	MMNEK	I	V	D	D	Y	G	I	R	I	L	L	N	E	V	F	N	K	E	G	.	.	Y	O	T	F	O	A	N	G	L	C	A	L	D	I	V	T	K	E	R	P	D	I	V	L	L	D	M	K	I	P	G	M	D	G	T	E	I	L	K	R	M	K	.	V	I	D	E	N	I	R		
ResD	TNETK	I	V	D	D	E	A	R	I	R	L	R	M	Y	L	E	R	E	N	.	.	Y	A	I	D	E	A	E	N	G	D	E	A	I	A	K	G	L	E	A	N	Y	D	L	L	L	D	L	M	P	G	T	D	G	E	V	C	R	O	I	R	.	E	K	K	A	.	T	P					
OE2086F	SQAGT	V	I	V	D	D	A	A	L	T	D	V	Y	A	A	W	L	A	D	.	.	Y	P	V	E	T	A	T	S	G	A	A	L	D	V	I	D	.	H	V	D	I	V	L	L	D	R	R	M	P	G	L	S	G	D	V	L	A	E	I	R	.	A	D	G	H	D	C	R					
OE2416R	. .MTEA	V	I	V	D	D	S	H	F	M	R	T	V	I	S	D	I	L	E	D	G	.	.	V	D	V	V	G	T	A	E	N	G	A	R	A	L	D	A	V	T	D	V	Q	P	D	V	I	T	M	D	V	E	M	P	E	M	D	G	E	A	T	A	E	I	M	R	E	Q	P	T	P	I	L
OE2417R	.MAKQ	V	L	V	D	D	S	F	M	R	N	L	L	R	E	L	E	E	E	F	.	.	E	I	A	D	E	A	E	N	G	V	E	A	V	E	M	Y	K	E	Y	D	P	D	L	M	M	D	I	V	M	P	I	R	D	G	E	A	T	S	E	K	.	E	F	D	A	G	A	H				
OE2334R	EHD	T	V	V	D	D	E	R	G	L	A	D	L	T	I	M	L	E	D	.	.	Y	D	V	K	T	A	S	G	T	A	I	D	A	I	D	.	T	D	V	A	L	L	D	R	O	M	P	D	V	S	G	D	V	L	D	E	R	.	E	R	G	T	E	C	R								
OE3854R	STP	V	V	V	D	D	E	R	V	A	E	A	F	A	L	L	E	D	.	.	Y	E	V	R	T	A	T	S	G	A	A	L	E	A	A	D	.	D	V	S	A	L	L	D	R	O	M	P	T	M	G	E	D	V	L	A	R	.	E	R	A	L	D	I	R									
OE4283R	ASPVH	V	V	V	D	D	F	A	E	L	T	R	R	L	Q	S	A	P	A	S	F	T	V	T	V	G	T	A	D	A	L	A	R	L	D	E	S	A	I	D	C	V	V	T	S	Y	S	L	P	D	T	C	D	D	L	L	E	R	I	H	.	D	T	D	H	D	P	P						
OE7042R	GGSIQ	V	L	H	V	D	D	E	P	D	F	A	D	M	A	E	F	L	E	R	E	D	R	L	T	V	E	S	A	T	S	A	S	E	G	L	D	R	L	D	E	H	D	Y	C	I	V	S	D	Y	D	M	P	G	M	D	G	V	E	F	L	E	T	V	R	.	K	A	Y	P	N	L	P	



OmpR	I	I	M	V	T	A	K	G	E	E	V	D	R	I	V	G	L	E	I	G	A	D	D	Y	T	P	K	F	F	N	P		
Spo0F	V	I	L	M	T	A	K	G	E	L	D	M	I	Q	E	S	K	E	L	G	A	L	T	H	F	A	K	P	F	D	I		
ResD	I	I	M	T	A	K	G	E	E	A	N	R	V	Q	G	F	R	A	G	T	D	D	Y	V	K	F	F	S	P				
OE2086F	V	A	M	V	T	G	.	.	V	E	P	T	D	V	I	A	G	F	D	E	Y	L	V	K	P	V	D	S					
OE2416R	M	V	S	A	L	T	T	E	D	A	D	A	T	L	E	A	M	E	K	G	A	I	D	T	F	A	K	P	G	G	T		
OE2417R	I	I	M	C	T	S	I	G	Q	E	E	K	M	K	K	A	V	K	A	G	A	D	G	Y	T	K	F	Q	K				
OE2334R	V	A	M	V	T	A	.	.	V	E	P	E	L	D	I	I	G	L	F	D	E	Y	L	V	K	P	V	D	R				
OE3854R	V	A	M	V	T	G	.	.	I	D	P	D	F	D	I	V	E	M	P	F	D	E	Y	L	V	K	P	V	D	G			
OE4283R	T	I	L	F	T	G	R	G	S	E	R	I	A	S	E	A	T	R	A	G	V	S	D	Y	L	V	K	P	V	D	G		
OE7042R	F	I	L	F	T	G	K	G	S	E	Q	V	A	S	E	A	I	A	A	G	V	N	D	Y	L	V	K	P	V	D	G	S	S

**Abbildung 3.3:** Sequenzvergleich von Empfängerdomänen aus *H. salinarum*, *E. coli* und *B. subtilis*. Die Phosphorylierungsstelle (Aspartatrest) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Rot: 100% Sequenzidentität innerhalb des vorliegenden Sequenzvergleichs. Gelb: konservierte aber nicht vollständig identische Aminosäuren.

Die Effektor-domäne des Antwortregulators CheB enthält eine Methylsteraseaktivität und in RegA aus *Dictyostelium discoideum* beherrscht sie eine cAMP-abhängige Phosphodiesterase-Aktivität. Am häufigsten findet man jedoch die Kopplung mit in sieben Familien aufgeteilten DNA bindenden Domänen [39] (siehe Abbildung 3.7A, S. 24). Diese Antwortregulatoren bezeichnet man auch als „orthodox“, wohingegen alle zuvor aufgeführten Beispiele zu den „unorthodoxen“ RR zählen. Abbildung 3.4B zeigt die DNA bindende Domäne des „orthodoxen“ Antwortregulators OmpR aus *E. coli*.



**Abbildung 3.4:** Kristall- bzw. NMR-Strukturen der RR CheY (2CHE) und OmpR (1QQI). A: CheY aus *S. typhimurium*; die drei wichtigen Reste D12, D13 und D57 (rote Stäbchenmodelle) sind um ein  $Mg^{2+}$ -Ion (grün) gruppiert. B: DNA bindende Domäne von *E. coli* OmpR; die Erkennungshelix ist violett hervorgehoben.

Die oben erwähnten Konformationsänderungen der phosphorylierten Empfängerdomäne beeinflussen die Funktion des gesamten Antwortregulators an mehreren möglichen Punkten. Die Empfängerdomäne von NarL blockt im nicht phosphorylierten Zustand

die zur DNA-Bindung notwendige Erkennungshelix, bei CheB wird das aktive Zentrum der Esteraseaktivität bis zur Phosphorylierung verstellt [125]. Regulatoren wie CheY und Spo0F, die nur aus der Empfängerdomäne bestehen, zeigen nach Phosphorylierung eine Veränderung ihrer Interaktionsstellen mit CheA/FliM bzw. KinA/Spo0B. Es sind auch Fälle untersucht, in denen die Aspartat-Phosphorylierung die Dimerisierung des Antwortregulators unterstützt [125].

Natürlich spielen auch Phosphataseaktivitäten eine wichtige Rolle für die Regulation des Phosphorylierungszustands eines RR. Diese Aktivitäten können auf Histidinkinasen, Antwortregulatoren oder zusätzlichen Proteinen lokalisiert sein. Im Falle der Histidinkinasen ist eine solche Aktivität auch bei Kinase-defizienten HK-Mutanten zu beobachten, deren H Box kein Histidin mehr enthält. Es handelt sich demnach nicht um eine bloße Umkehrung der Kinasefunktion. Der experimentelle Nachweis spezifischer Phosphatasen wurde für Spo0A und Spo0F sowie CheY geführt, dort sorgen sie für eine schnelle Dephosphorylierung der aktivierten Antwortregulatoren [39].

Die *in silico* Analyse der Histidinkinasen und Antwortregulatoren von *H. salinarum* beleuchtete folgende Kriterien: Operonstruktur der ZKS-Gene, Lokalisation der Proteine in der Zelle und Vorhandensein von Ähnlichkeiten in den Sensorbereichen der HK zu Proteinen mit bekannter Funktion in anderen Organismen. Weiterhin wurden die halobakteriellen ZKS-Kandidaten entsprechend den allgemeingültigen HK- bzw. RR-Familien kategorisiert.

### 3.1.1 Die halobakteriellen Kandidatengene bzw. -proteine

In den aktuellen Genomdatenbanken finden sich weit über eintausend Gene, die für Histidinkinasen oder Antwortregulatoren kodieren. Der dabei überproportionale bakterielle Anteil ist einer der Gründe für die Hypothese, dass Archaeen und niedere Eukaryoten Zwei-Komponenten Systeme durch lateralen Gentransfer von Bakterien übernommen haben [65]. Generell zeigt sich weiterhin, dass Bakterien, die mit stärker variierenden Umweltbedingungen leben, eine größere Zahl von Zwei-Komponenten Systemen besitzen, als beispielsweise parasitäre, auf bestimmte Habitate spezialisierte Prokaryoten.

Im halophilen Euryarchaeon *Halobacterium salinarum* finden sich 14 Histidinkinasen, darunter 2 Hybridkinasen, und 5 Antwortregulatoren. Die Grundlage dieser Katego-

risierung sind die schon eingehend besprochenen konservierten Abschnitte beider Proteinklassen. Die Abbildungen 3.1 und 3.3 zeigen alle gefundenen halobakteriellen HK- und Empfängerdomänen im Vergleich mit jeweils drei bakteriellen Vertretern. Tabelle 3.1 fasst neben den Kandidatengenomen bzw. -proteinen auch Informationen über deren Lage im Genom bzw. deren Lokalisation in der Zelle zusammen. Die fünfte Spalte gibt Auskunft darüber, ob das entsprechende Genprodukt bei den in dieser Abteilung durchgeführten massenspektrometrischen Analysen des halobakteriellen Proteoms gefunden wurde.

Gen	Proteinname	Region	Zellort	MS
OE2058R	sigtrans HK homolog	0530686-0532314/R (Chr)	cytopl	-
OE2086F	probable RR	0545978-0546565/F (Chr)	cytopl	-
OE2088F	sigtrans HK homolog	0546569-0548482/F (Chr)	cytopl	insecure
OE2333R	sigtrans HK homolog	0685342-0687639/R (Chr)	cytopl	question.
OE2334R	probable RR	0687629-0688243/R (Chr)	cytopl	-
OE2415R	Taxissensor HK CheA	0730100-0732106/R (Chr)	cytopl	trusted
OE2416R	Glutamat-Methylesterase CheB	0732108-7330151/R (Chr)	cytopl	trusted
OE2417R	RR CheY	0733148-0733510/R (Chr)	cytopl	trusted
OE2684R	sigtrans HK homolog	0876955-0878781/R (Chr)	cytopl	-
OE2712R	sigtrans HK weak homolog	0890142-0891386/R (Chr)	membr	insecure
OE2764R	sigtrans HK homolog	0920153-0921523/R (Chr)	membr	trusted
OE2961F	sigtrans HK homolog	1016189-1018009/F (Chr)	cytopl	-
OE2964F	sigtrans HK homolog	1018324-1019658/F (Chr)	membr	trusted
OE3854R	probable RR	1491335-1491904/R (Chr)	cytopl	-
OE3855R	probable sigtrans HK	1491931-1493451/R (Chr)	cytopl	-
OE4051R	probable sigtrans HK	1599807-1600976/R (Chr)	membr	trusted
OE4283R	probable sigtrans HK (Hybkin)	1729115-1733020/R (Chr)	cytopl	trusted
OE6145R	sigtrans HK homolog	0069994-0071478/R (Pl2)	cytopl	-
OE7042R	probable sigtrans HK (Hybkin)	0028076-0030829/R (Pl1)	cytopl	-

**Tabelle 3.1:** Liste aller Histidinkinasen sowie aller Antwortregulatoren von *H. salinarum*. sigtrans: „signal transduction“, HK: Histidinkinase, RR: Antwortregulator, Hybkin: Hybridkinase; Chr: Chromosom, Pl1/2: halobakterielle Plasmide; cytopl: cytoplasmatisch, membr: membranständig; MS: Ergebnisse der Peptide Mass Fingerprint Analyse, question.: MS-Status „questionable“ (zur näheren Erläuterung siehe <http://www.halolex.mpg.de>).

Der überwiegende Teil der Zwei-Komponenten Proteine ist auf dem Chromosom kodiert. Die Inventur der Histidinkinasen und Antwortregulatoren förderte drei für die Taxis unverzichtbare Proteine zu Tage. Dabei handelt es sich um OE2415R, OE2416R und OE2417R, die entsprechend ihren Funktionen die Namen CheA, CheB und CheY tragen. Jede bis heute untersuchte Stimulus gerichtete Bewegung halobakterieller Zellen erfordert das Zwei-Komponenten System CheA-CheY und einen entsprechenden Sensor,

den sogenannten Htr („Halobacterial transducer“) [107, 108]. Darüber hinaus gibt es aber auch Hinweise, dass Fumarat als „Schaltfaktor“ ebenfalls in die Drehrichtungswechsel des Flagellarmotors eingreift [80].

Lediglich OE2088F-OE2086F, OE2333R-OE2334R und OE3855R-OE3854R bilden in bicistronischen Operons organisierte HK-RR-Paare. Der Erfahrung nach entsprechen solche Paare auch funktionellen Einheiten. In Bakterien finden sich 75% aller HK in genetischer Nachbarschaft zu einem RR [60], mit dem sie dann auch fast immer interagieren. Interessanterweise überwiegen in den bisher sequenzierten archaealen Genomen die monocistronischen HK, womit dies vielleicht ein allgemeines Merkmal von Archaeen darstellt [60].

Von den zwei vorhandenen Hybridkinasen OE7042R und OE4283R fehlt der Empfängerdomäne der letzteren das Phosphorylierungsmotiv. Anstelle des sonst hochkonservierten Aspartats befindet sich ein Serin (Abbildung 3.3). Bei CheY- und OmpR-Mutanten, denen das Phosphorylierungsmotiv Aspartat entfernt wurde, konnte *in vitro* eine Phosphorylierung von Serin- bzw. Threoninresten in der Nachbarschaft des deletierten Aspartats durch deren Histidinkinasen CheA bzw. EnvZ nachgewiesen werden [44]. Es bleibt offen, ob dieser Phosphorylierungsmechanismus *in vivo* im Falle der Empfängerdomäne von OE4283R relevant ist.

Ebenfalls ungewöhnlich sind die N-terminal gelegenen Empfängerdomänen beider Hybridkinasen. Diese Domänenanordnung kommt SMART (technische Details dazu auf S. 19) zufolge nicht sehr oft vor. Das häufigste Hybridkinase-Arrangement ist eine HK-Domäne C-terminal gefolgt von einer Empfängerdomäne. Weiterhin besitzen beide Hybrid-HK keine sogenannte HPt-Domäne, deren zentrales Histidin den Phosphatrest des Aspartats der Empfängerdomäne aufnehmen und an eine weitere Empfängerdomäne weiterleiten würde. Der letzte Punkt ist die hohe Zahl von cytoplasmatisch lokalisierten im Vergleich zu membranständigen Nicht-CheA-Histidinkinasen. Bakterielle HK sind hingegen fast ausschließlich membrangebunden und mit extrazellulären Sensorbereichen ausgestattet [150].

### 3.1.2 Homologien der Sensorbereiche der Histidinkinasen

Um aus den schlecht konservierten Aminosäuresequenzen N-terminal des Kinasekernbereichs funktionsspezifische Anhaltspunkte zu erhalten, wurden diese Abschnitte einer BLAST-Analyse unterzogen. Bei den beiden Hybridkinasen OE4283R und OE7042R beschränkte sich die Suche auf den Bereich zwischen Empfänger- und HK-Domäne. Zum Einsatz kam hier das Protein-Protein-BLAST des NCBI. Die Suche erfolgte mit einer Ausschlussgrenze von  $E = 1 \cdot 10^{-10}$  gegen die SwissProt-Datenbank.

Protein	gefundene Ähnlichkeiten	Score [bit]	E-Wert
OE2058R	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE2088F	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE2333R	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE2684R	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE2712R	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE2764R	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE2961F	YDAM_ECOLI Hypothetical protein	72	$2 \cdot 10^{-12}$
OE2964F	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE3855R	FIXL_RHIME Sensor protein FixL	65	$2 \cdot 10^{-10}$
OE4051R	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE4283R	NODV_BRAJA Nodulation protein V	80	$4 \cdot 10^{-14}$
OE6145R	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-
OE7042R	keine Ähnlichkeit gefunden	-	-

**Tabelle 3.2:** Protein-Protein-BLAST der Sensorbereiche der Histidinkinasen (ohne CheA) gegen SwissProt mit  $E = 1 \cdot 10^{-10}$  als Ausschlussgrenze. Verwendete Ähnlichkeitsmatrix: BLOSUM62

Die Ergebnisse fasst Tabelle 3.2 zusammen. Führt man sich folgendes Beispiel vor Augen, verwundert es nicht, dass lediglich 3 der 13 untersuchten Sequenzen Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen aufweisen: Trotz einer Sequenzidentität von 14% (Matrix: BLOSUM62) zwischen den Sensorbereichen der beiden durch Phosphatmangel aktivierten HK *B. subtilis*-PhoR (Sensor = 345 Aminosäuren) und *E. coli*-PhoR (Sensor = 200 Aminosäuren), ergibt ein Protein-Protein-BLAST mit einer Ausschlussgrenze von  $E = 1 \cdot 10^{-10}$  gegen SwissProt keinen einzigen Treffer für den Sensorbereich von *B. subtilis*-PhoR. Die Sequenzidentität der Histidinkinasedomänen der beiden genannten Proteine beträgt immerhin 36% und unter den BLAST-Treffern befinden sich sehr viele HK verschiedenster Spezies. Aus der Primärsequenz lässt sich folglich für *B. subtilis*-PhoR nur

vorhersagen, dass es sich um eine Histidinkinase handelt, jedoch nicht welchen Stimulus diese detektiert. Dieses Phänomen kennt man auch von Transportern und manchen Enzymen, denen lediglich grob eine Transport- bzw. Katalysefunktion, jedoch keine Substratspezifität zugeordnet werden kann.

Von den als hinreichend ähnlich befundenen Proteinen sind zweifellos diejenigen mit einer experimentell nachgewiesenen Funktion die interessanteren. Dazu gehören FixL aus *Sinorhizobium meliloti* und NodV aus *Bradyrhizobium japonicum*, für Ydam aus *E. coli* existieren hingegen keine funktionellen Anhaltspunkte. FixL ist eine Sauerstoff detektierende Histidinkinase in Rhizobien, wo sie die Expression von Proteinen zur Stickstofffixierung reguliert [103]. Für die Histidinkinase NodV wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, dass sie in Anwesenheit von Flavonoiden den Antwortregulator NodW phosphoryliert. Dieser induziert wiederum mehrere Gene zur Synthese von Nod Faktoren (substituierte Chitin-Oligomere), welche die charakteristische Knöllchenbildung an den Wurzeln von Leguminosen einleiten [76].

Eine zweite Möglichkeit der Spurensuche bieten Programme, die nicht pauschale Ähnlichkeiten gesamter Proteinabschnitte bewerten, sondern in diesen nach kleineren Bruchstücken mit charakteristischen Sequenzen fahnden. Dazu bot sich das Programm SMART an, da es auf Signaldomänen spezialisiert ist. Es basiert auf Sequenzvergleichen von Domänen aus SwissProt-Einträgen, die in einem iterativen Verfahren auf ihre statistische Signifikanz überprüft und zu Saat-Sequenzvergleichen zusammengefasst bzw. gekürzt wurden. Aus diesen Sequenzvergleichen erstellten Schultz *et al.* Profile und „Hidden Markov Modelle“ (HMM) für derzeit knapp 700 verschiedene Signaldomänen [117, 74].

Mit Hilfe dieses Programms wurden die putativen Sensorbereiche der HK erneut nach interessanten Mustern durchforstet. Von der Untersuchung ausgeschlossen war CheA, da hier bereits eine eindeutige Funktionszuordnung existiert. Tabelle 3.3 fasst die erhaltenen Suchergebnisse zusammen.

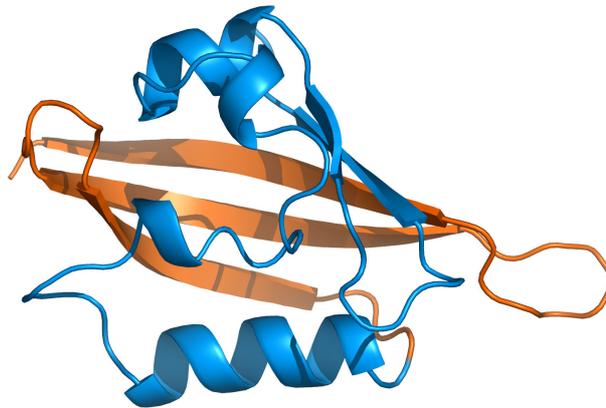
Die Treffer beschränken sich im Wesentlichen auf die drei Domänen GAF, PAS und HAMP. Diese Namen stellen Akronyme von Proteinen dar, die diese Domänen enthalten. Um Missverständnissen vorzubeugen, sei hier klar gestellt, dass die SMART-Annotationen PAS und PAC eine funktionelle Einheit bilden. Beide Motive formen eine wie in Abbildung 3.5 dargestellte PAS-Domäne, wobei der PAC-Anteil dem orange

Protein/Bereich	gefundene Domänen	Bereich
OE2058R AS1-320	PAS	AS20-86
	GAF	AS171-317
OE2088F AS1-430	GAF	AS166-306
	PAS/PAC	AS306-371/377-417
OE2333R AS1-540	PAS	AS142-212
	GAF	AS269-405
	PAS	AS416-485
OE2684R AS1-400	PAS	AS4-69
	PAS	AS108-178
	GAF	AS244-395
OE2712R AS1-200	HAMP	AS91-146
OE2764R AS1-245	sigpep	AS1-29
	PAS	AS134-199
OE2961F AS1-390	PAS	AS26-89
	PAS/PAC	143-212/215-255
	PAS	AS267-336
OE2964F AS1-230	HAMP	AS164-216
OE3855R AS1-305	PAS	AS22-88
OE4051R AS1-175	keine	
OE4283R AS130-1100	PAS	AS146-212
	PAS	AS260-327
	GAF	AS412-558
	PAS/PAC	AS562-629/635-677
	PAS	AS689-762
	PAS/PAC	AS820-885/846-933
OE6145R AS1-290	PAS/PAC	AS8-74/83-123
	GAF	AS145-286
OE7042R AS210-715	PAS	AS223-289
	PAS	AS344-409
	PAS	AS464-533
	PAS/PAC	AS589-655/662-703

**Tabelle 3.3:** Signaldomänen-Analyse der Sensorbereiche der Histidinkinasen (ohne CheA) durch SMART. AS: Aminosäuren, sigpep: Signalpeptid.

eingefärbten dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt entspricht. Da dessen Primärsequenz nur wenig konserviert ist, findet SMART auch nicht bei jedem PAS-Motiv ein entsprechendes PAC-Motiv. Den PAS-Domänen, gemeint sind die physiologisch aktiven SMART-Bereiche PAS/PAC, konnten experimentell Funktionen als Sauerstoff-, Licht- aber auch Redoxsensor zugewiesen werden. Um diese Aufgaben zu erfüllen, binden manche PAS-Domänen Kofaktoren wie FAD, Häm oder 4-OH-Zimtsäure [132]. In *H. salinarum* befinden sich 21 von 29 durch SMART gefundene PAS-Domänen in Histidinkinasen. Überdies liegen alle in Tabelle 3.2 gelisteten, relevanten Sequenzähnlichkeiten im Bereich von PAS-Domänen.

GAF-Domänen sind bekannt dafür, die Aktivität von Phosphodiesterasen und Ade-



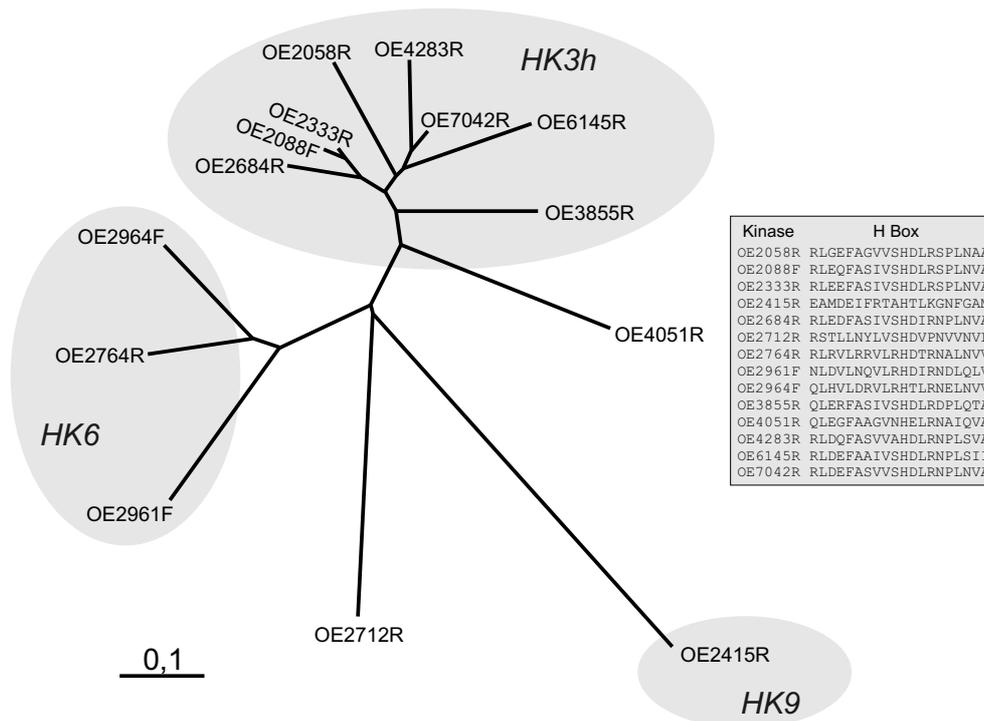
**Abbildung 3.5:** Kristallstruktur der PAS-Domäne des humanen Erg Kaliumkanals (1BYW). Die Färbung entspricht der SMART-Nomenklatur der PAS/PAC-Motive, wobei das PAC-Motiv orange eingefärbt wurde.

nylatcyclasen abhängig von cGMP- bzw. cAMP-Bindung zu steuern. Es gibt ebenfalls experimentelle Hinweise auf Tetrapyrrol und Formiat bindende GAF-Domänen [157]. In *Azotobacter vinelandii* reguliert das „Enhancer binding protein“ NifA die Expression des Nitrogenasekomplexes durch Bildung eines offenen Transkriptionskomplexes. Die Bindung des Antiaktivators NifL an NifA verhindert dies. Ist jedoch  $\alpha$ -Ketoglutarat an die NifA-GAF-Domäne gebunden, so kann NifL die AAA-ATPase-Domäne von NifA nicht blockieren und die transkriptionsaktivierende Wirkung bleibt bestehen [79]. Sieben der neun halobakteriellen GAF-Domänen werden von HK-Genen kodiert.

In OE2712R und OE2964F finden sich sogenannte HAMP-Domänen, deren Funktionsweise noch unklar ist. Jüngste Arbeiten deuten aber daraufhin, dass HAMP-Domänen ihre Signalfunktion durch eine Rotation ihrer coiled-coil-Bereiche erfüllen (Prof. Joachim Schultz (Universität Tübingen), persönliche Mitteilung). HAMP-Domänen haben zweifelsfrei einen Einfluss auf benachbarte Domänen. Die FAD-Bindung der PAS-Domäne von Aer aus *E. coli* beispielsweise wird durch die nebenliegende HAMP-Domäne stabilisiert [78]. In Adenylylzyklen von *Mycobacterium tuberculosis* modulieren die vorhandenen HAMP-Domänen die Enzymaktivität [75]. In *H. salinarum* befinden sich mit den beiden Ausnahmen in OE2712R und OE2964F alle HAMP-Domänen in Transducerproteinen. Hier sind sie wahrscheinlich in die Signalkette eingebunden, welche im Sensorbereich der Transducer beginnt und am Flagellarmotor endet.

### 3.1.3 Verwandtschaftsanalyse der Histidinkinasen

Den ersten Versuch einer Einteilung aller Histidinkinasen unternahmen Grebe und Stock vor etwa sechs Jahren. 90% der damals 348 bekannten HK wurden in 11 Familien mit teilweise verschwimmenden Grenzen aufgeschlüsselt [39]. Inzwischen sind noch zwei weitere Familien beschrieben [58]. Obwohl diese Aufteilung auf der Sequenzbewertung des gesamten Kinasekerns mit allen konservierten Bereichen basiert, stützt sich die vorliegende, in Abbildung 3.6 visualisierte Verwandtschaftsanalyse nur auf die Bereiche um die H Boxen. Die Unterschiede der Konsensussequenzen der einzelnen Familien sind in diesem Bereich hinreichend groß, um eine zuverlässige Einteilung zu gewährleisten. Der phylogenetische Baum in Abbildung 3.6 entstand mit Hilfe der Programme ClustalX [136] und TreeView [96].



**Abbildung 3.6:** Verwandtschaftsanalyse der Histidinkinasen. Sowohl der phylogenetische Baum als auch die Zuordnung zu den einzelnen HK-Familien basieren ausschließlich auf den H Boxen der Kinasen. Die grau unterlegten, beschrifteten Bereiche zeigen die Familienzugehörigkeit.

Die überwiegende Zahl der Histidinkinasen lässt sich einer diskreten Familie zuordnen. Erwartungsgemäß befindet sich CheA in der Familie 9, welche alle bekannten Chemotaxis-Histidinkinasen in sich vereint. Drei HK, die keinen benachbarten Antwortregulator besitzen, sind Mitglieder der Familie 6. In der Arbeit von Grebe und

Stock besteht diese Familie fast ausschließlich aus verwaisten Histidinkinasen ohne benachbarte Antwortregulatoren des Archaeons *Archaeoglobus fulgidus* [39].

Mehr als die Hälfte der HK konnte der Familie 3h zugeordnet werden. Unter ihnen befinden sich sowohl die einzigen Vertreter mit einem benachbarten Antwortregulator (OE2088F, OE2333R, OE3855R), als auch beide Hybridkinasen (OE4283R, OE7042R). Es muss nicht verwundern, dass zwei Proteine nicht einzuordnen waren, da schon bei dem Erstellen der Familien 10% der Histidinkinasen nicht eingeteilt wurden. Dies entspricht in etwa der hier vorliegenden Quote von 14%.

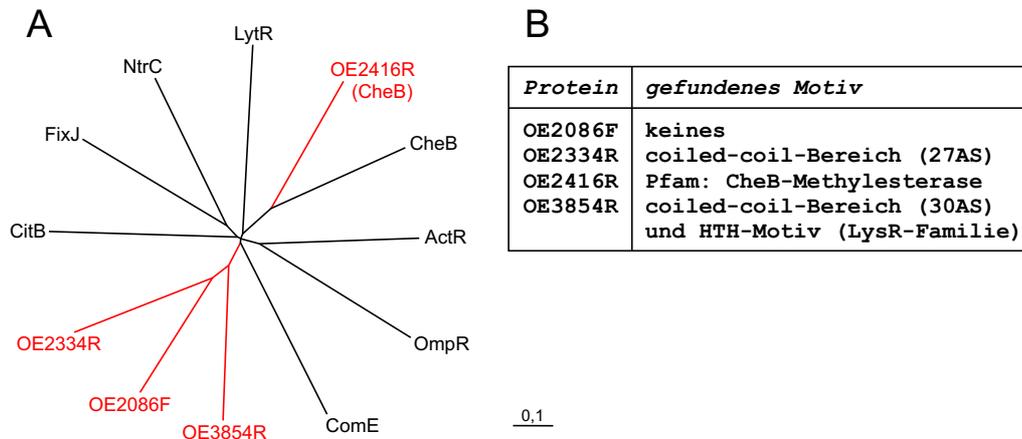
Die Klassifizierung hilft unter Umständen bei der Abschätzung, welche Histidinkinase mit welchem Antwortregulator wechselwirkt. Grebe und Stock zeigten, dass die Nachbar-RR von HK einzelner Familien zu etwa zwei Dritteln ebenfalls einer einzigen Familie angehören. Kennt man also die Familienzugehörigkeiten der halobakteriellen HK und RR, so kann man abschätzen, ob die verwaisten Histidinkinasen, sprich solche ohne benachbarten Antwortregulator, einen der drei „orthodoxen“ RR OE2086F, OE2334R und OE3854R phosphorylieren könnten.

### 3.1.4 Verwandtschaftsanalyse von und Motivsuche in den Effektorbereichen der Antwortregulatoren

Die Analyse der mit den Empfängerdomänen verknüpften Aminosäuresequenzen ist notwendig, um die Antwortregulatoren grob nach deren putativen Funktionen zu ordnen. OE2417R, das CheY von *H. salinarum*, enthält keinen Effektorbereich im eigentlichen Sinn, da hier die Empfängerdomäne die Effektorfunktion selbst erfüllt, und wurde demnach nicht betrachtet. Ebenso wenig waren die Hybridkinasen OE7042R und OE4283R Teil dieser Untersuchung, denn deren Sequenzen beinhalten neben den Empfängerdomänen lediglich bereits untersuchte HK-Domänen und Sensorbereiche (Abbildung 3.6 bzw. Tabellen 3.2 und 3.3).

Der phylogenetische Baum in Abbildung 3.7A zeigt das Ergebnis der Verwandtschaftsanalyse der Effektorbereiche der „orthodoxen“ Antwortregulatoren OE2086F, OE2334R, OE3854R und des halobakteriellen CheB-Homologs OE2416R. Dieselben Proteinabschnitte wurden auch mit SMART auf das Vorhandensein kleinerer Motive und Domänen überprüft (Abbildung 3.7B).

Für die Generierung des Verwandtschaftsbaums dienten Sequenzen der namensgeben-



**Abbildung 3.7:** Analyse der Effektorbereiche ausgewählter Antwortregulatoren. A: Phylogenetischer Baum, B: Motivsuche mit SMART. AS: Aminosäuren, HTH: Helix-Turn-Helix.

den Vertreter aller Familien von RR-Effektorbereichen sowie Sequenzabschnitte der genannten halobakteriellen Antwortregulatoren. Bei OE2416R ist die Zugehörigkeit zur CheB-Familie klar erkennbar. Die Effektorbereiche der anderen RR konnten hingegen nicht zugeordnet werden und bilden darüber hinaus einen eigenständigen Zweig des Stammbaums. Zur Eruiierung der möglichen Funktionen dieser RR bleibt somit nur die Motivsuche.

Den Effektorbereich von OE2416R erkannte SMART als Methylesterase, was der Funktion von CheB als Transducer demethylierendes Enzym entspricht. In den Effektorbereichen der drei verbleibenden Antwortregulatoren befindet sich dagegen keine bekannte Enzymaktivität. Die vorhergesagten Coiled-Coil-Abschnitte könnten als Interaktionsflächen für eine Dimerisierung wirken, die bei den meisten Transkriptionsfaktoren der DNA-Bindung mit nachfolgender Transkriptionsregulation vorausgeht [13].

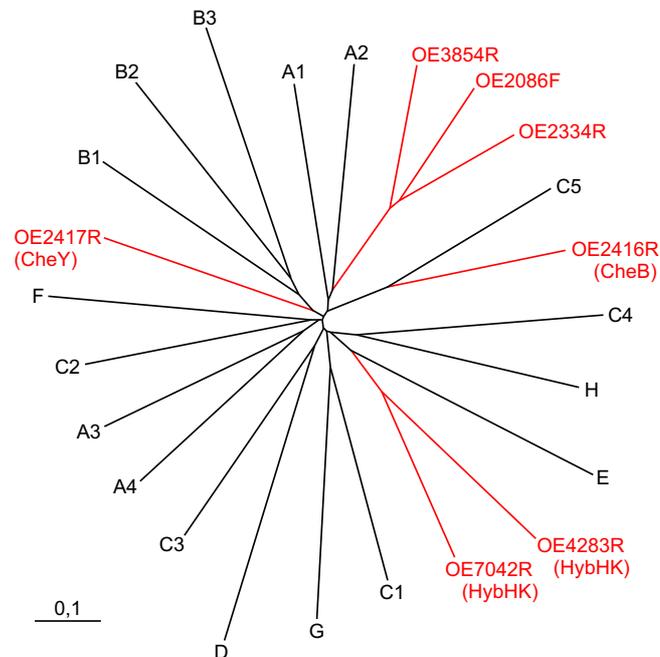
In OE3854R fand SMART zudem eine schwache Ähnlichkeit zu dem Helix-Turn-Helix (HTH) Motiv der LysR-Familie und damit ein weiteres Indiz für DNA-Bindeeigenschaften. Dies bedeutet jedoch im Umkehrschluss keinesfalls, dass OE2086F und OE2334R, nur weil SMART kein HTH-Motiv findet, nicht DNA bindend sein können. Antwortregulatoren der OmpR-Klasse weisen beispielsweise ein DNA bindendes geflügeltes HTH-Motiv auf (siehe auch Abbildung 3.4B, S. 14), welches nicht von SMART erkannt wird.

Mit der Analyse der Effektorbereiche konnte allerdings aufgrund fehlender AAA-ATPase Domänen ausgeschlossen werden, dass einer der Antwortregulatoren der NtrC-Klasse angehört. Alle RR dieser Klasse fördern den Übergang vom geschlossenen in den

offenen Initiationskomplex. Die Energie hierzu stammt aus der ATP-Hydrolyse durch die AAA-Domäne [125].

### 3.1.5 Verwandtschaftsanalyse der Empfängerdomänen

Zum Erstellen der Familien wurden von Grebe und Stock die Sequenzen von 298 Empfängerdomänen benutzt, welche sich entweder in Hybridkinasen oder in mit HK assoziierten Antwortregulatoren befanden [39]. Die Klassifizierung der sieben halobakteriellen Empfängerdomänen (in 5 Antwortregulatoren (inkl. CheY, CheB) und 2 Hybridkinasen) erfolgte, wiederum unter Verwendung der Programme ClustalX und TreeView, durch Vergleich mit je einem Vertreter der einzelnen Familien (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Verwandtschaftsanalyse der Empfängerdomänen. Die Berechnung des phylogenetischen Baums erfolgte auf Grundlage der vollständigen Empfängerdomänen (typische Länge ca. 120 Aminosäuren). HybHK: Empfängerdomäne enthaltende Hybrid-Histidinkinase

Zurückzuführen auf die Verwendung des gesamten Domänenbereichs und die wenigen hochkonservierten Aminosäuren in den Empfängerdomänen (siehe Abbildung 3.3, S. 14), sind die Sequenzunterschiede zwischen den Familien ähnlich groß wie bei den Familien der Effektorbereiche. Dies äußert sich in den langen Ästen und den relativ gleichmäßigen Abständen der Familien untereinander.

Während OE2416R erwartungsgemäß in die CheB-typische Familie C5 fällt, entzieht

sich OE2417R (CheY) einer verlässlichen Zuordnung. Auf den zweiten Blick verwundert dies jedoch nicht, da sich auch die CheY-Proteine anderer Organismen auf mehrere Familien verteilen [39]. Des Weiteren bilden die Empfängerdomänen der Hybridkinasen OE4283R und OE7042R sowie jene der „orthodoxen“ Antwortregulatoren OE2086F, OE2334R und OE3854R voneinander gut unterscheidbare Gruppen. Ist der Abstand der erstgenannten zu der Familie E am kleinsten, so heissen die unmittelbaren Nachbarn der letztgenannten A1 und A2.

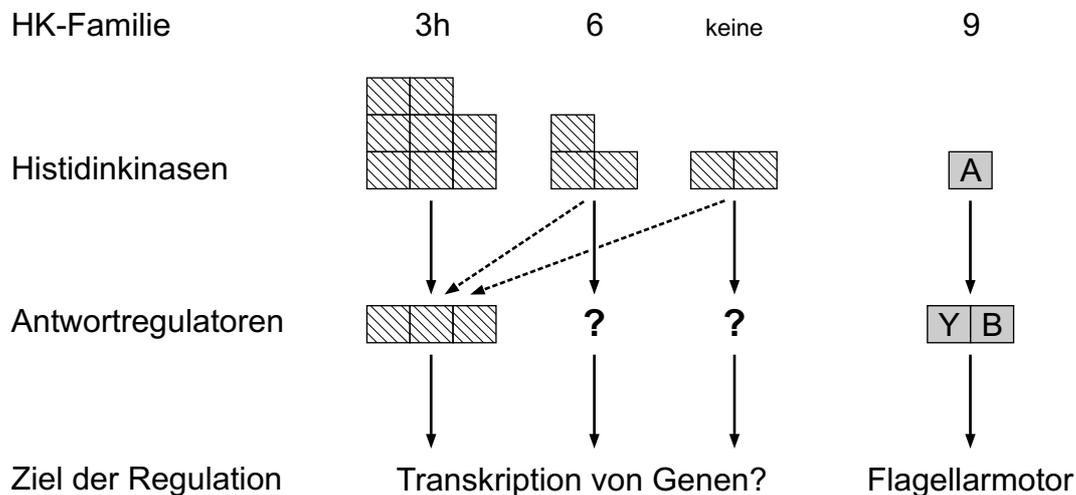
Laut der Arbeit von Grebe und Stock ordnen sich die Empfängerdomänen der Antwortregulatoren, welche zu Histidinkinasen der Familie 3h benachbart sind, ausschließlich in die Familie H ein. Abbildung 3.8 zeigt, dass *H. salinarum* mit diesem Schema bricht, da die orthodoxen RR OE2086F, OE2334R und OE3854R (benachbart zu den Familie 3h-HK OE2088F, OE2333R und OE3855R) eher den Familien A1/A2 nahe stehen. Weiterhin besteht die HK-Familie 6, zu der immerhin 3 Histidinkinasen aus *H. salinarum* gehören, in der Publikation von Grebe und Stock nur aus verwaisten HK, sodass hier keine Aussagen über wechselwirkende Antwortregulatoren getroffen werden können [39].

Letztendlich passen die erhaltenen bioinformatischen Daten nicht in das vielleicht auch schon überholte Schema der Publikation von Grebe und Stock. Daher wurde hier auch von einer näheren Betrachtung der Familien der Empfängerdomänen abgesehen.

### 3.1.6 Zusammenfassung der bioinformatischen Analyse

Die Erkenntnisse der bioinformatischen Analyse bezüglich der möglichen Wechselwirkungen der HK und RR fasst Abbildung 3.9 zusammen. *Halobacterium salinarum* enthält wesentlich mehr Histidinkinasen als Antwortregulatoren. Über die Hälfte der Histidinkinasen gehört zur Familie 3h. Darunter befinden sich auch die HK mit benachbarten RR sowie beide Hybridkinasen. Dies lässt Raum für die Vermutung, dass die drei „verwaisten“ HK dieser Familie mit den „nicht verwaisten“ Antwortregulatoren oder den Empfängerdomänen der Hybridkinasen wechselwirken. Die Interaktionspartner der Histidinkinasen der Familie 6 und der beiden nicht zu kategorisierenden HK bleiben jedoch völlig im Dunkeln, da auch der Vergleich mit einzelnen HK-/RR-Familien keinerlei Anhaltspunkte brachte. So wäre es möglich, dass die HK der Familie 6 (i) einen der drei

„orthodoxen“ RR phosphorylieren, (ii) noch unbekannte Interaktionspartner besitzen, die ihrerseits Gentranskriptionen beeinflussen oder (iii) funktionslos sind.



**Abbildung 3.9:** Zusammenfassung der bioinformatischen Erkenntnisse bezüglich der möglichen Wechselwirkungen der HK und RR. graue Kästen: Proteine mit bekannter Funktion; schraffierte Kästen: Proteine mit unbekannter Funktion; A,Y,B: CheA, CheY, CheB.

Ebenso ungeklärt bleibt die Frage, ob die Antwortregulatoren OE2086F und OE2334R überhaupt transkriptionsregulierend wirken. Ihre Effektorbereiche schließen zwar eine Enzymaktivität aus, enthalten aber zu wenig eindeutige Merkmale für DNA bindende Eigenschaften. OE3854R hingegen besitzt ein für Transkriptionsfaktoren typisches Helix-Turn-Helix Motiv. Der Empfängerdomäne der Hybridkinase OE4283R fehlt der essentielle Aspartatrest zur Phosphorylierung, weshalb diese Domäne wahrscheinlich funktionslos ist.

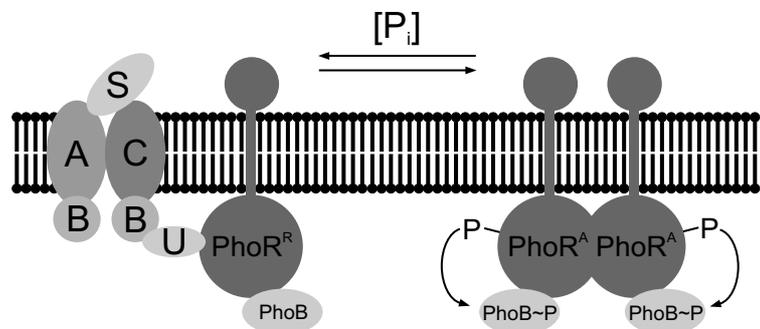
Das einzige halobakterielle ZKS, dessen Funktion bisher aufgeklärt werden konnte, bleibt CheA-CheY. Dieses sehr wahrscheinlich von einem Bakterium erworbene System dient jedoch bekanntlich nicht der Genregulation, sondern vielmehr der Vermittlung der taktischen Bewegungen von *H. salinarum* [107].

Auffällig ist weiterhin der ungewöhnlich hohe Anteil cytoplasmatisch lokalisierter HK, die meist PAS- oder GAF-Domänen enthalten. Am interessantesten sind hier die HK OE3855R und OE4283R, deren PAS-Domänen starke Ähnlichkeiten zu der Häm bindenden PAS-Domäne von FixL bzw. der Flavin bindenden PAS-Domäne von NodV aufweisen.

## 3.2 Phosphatabhängiges Verhalten von *H. salinarum*

### 3.2.1 Phosphatabhängige Genregulation in Bakterien

In der Literatur finden sich etwa 30 Bakterienarten mit mehr oder weniger tiefgreifend untersuchter phosphatabhängiger Genexpression [145, 138, 84, 55, 47, 120, 119, 137]. In 22 Fällen kennt man auch die Regulatoren dieser Genexpression. Es handelt sich ausnahmslos um Zwei-Komponenten Systeme (ZKS). Aus diesem Grund schien Phosphatmangel als physiologischer Stress optimal geeignet, um den Histidinkinasen und Antwortregulatoren aus *H. salinarum* eine Funktion zuzuordnen. Anhand der Regulationsmechanismen in *E. coli* und *B. subtilis* sei die Funktionsweise der beteiligten ZKS kurz erklärt. Die Phosphat detektierenden HK beider Bakterien sind membranständig. In *E. coli* bildet sich bei Phosphatüberschuss ein Repressorkomplex aus PhoR, dem Phosphat-spezifischen ABC-Transporter Pst und dem Mediatorprotein PhoU. Dieser verhindert dann die Dimerisierung von PhoR zur aktiven, signalübertragenden Spezies (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10:** Postulierter Repressorkomplex in *E. coli*, welcher verhindert, dass PhoR bei Phosphatüberschuss durch Phosphorylierung aktiviert wird (nach Wanner [148]). A,B,C,S: Komponenten des ABC-Transporters Pst; U: Mediatorprotein PhoU.

Für *B. subtilis* PhoR hingegen ist keine derartige Interaktion beschrieben [54]. In beiden Organismen bindet der phosphorylierte Antwortregulator PhoB~P an spezifische, „Pho-Boxen“ genannte DNA-Sequenzen. Diese Pho-Boxen liegen 35 Basenpaare stromaufwärts der Stelle der Transkriptionsinitiation. Damit ersetzen sie eine der beiden Bindestellen des Sigmafaktors. Dies erklärt, warum sich die Transkription der Gene des Pho-Regulons durch die Interaktion des gebundenen RR mit der RNA-Polymerase signifikant erhöht [145].

Die Gene der Pho-Regulons kodieren für mehrere Phosphatasen sowie für anorganisches Phosphat ( $P_i$ , engl.: „inorganic phosphate“) spezifische ABC-Transporter. *E. coli* besitzt noch ein Glycerin-3-phosphat spezifisches ABC-Transportsystem, ein Porin der äußeren Membran und Proteine zur Aufnahme und Degradation von Phosphonaten. Charakteristisch für *B. subtilis* hingegen ist die verstärkte Produktion von phosphatfreien Teichuronsäuren und die gleichzeitige Drosselung der Herstellung von phosphatreichen Teichonsäuren für die Zellwandsynthese [148, 54].

### 3.2.2 Anhaltspunkte im Genom von *H. salinarum*

Das Genom von *H. salinarum* enthält mehrere Operons, deren Translationsprodukte laut Homologieanalyse entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit zur Aufnahme von Phosphat aus diversen Quellen und in verschiedenen Konzentrationsbereichen haben (Tabelle 3.4).

Operon	Vorhergesagte Funktion der kodierten Proteine
<i>phoX<sub>1</sub>-pstC<sub>1</sub>A<sub>1</sub>B<sub>1</sub></i>	ABC-Transporter für $P_i$ (Pst1)
<i>phoX<sub>2</sub>-pstC<sub>2</sub>A<sub>2</sub>B<sub>2</sub></i>	ABC-Transporter für $P_i$ (Pst2)
<i>ugpBAEC</i>	ABC-Transporter für Glycerin-3-phosphat (Ugp)
<i>aph</i>	Alkalische Phosphatase
<i>ugpQ</i>	Glycerophosphoryl phosphodiesterase
<i>ipp</i>	Anorganische Pyrophosphatase
<i>pho2</i>	homolog zu p-Nitrophenylphosphatase
<i>phoT2</i>	Natrium-abhängiges $P_i$ -Transportprotein
<i>phoT3</i> , OE4236F	$P_i$ -Transportproteine
OE2113R	$P_i$ -Permease

**Tabelle 3.4:** Wichtige Gene für die Phosphataufnahme durch *H. salinarum*.  $P_i$ : anorganisches Phosphat. Siehe Tab. 3.6 (S. 50) für die Induktionsraten der per RT-qPCR untersuchten Gene.

Die meisten der aufgelisteten ABC-Transporter und Enzyme sind Homologe von phosphatabhängig regulierten Proteinen vieler Bakterien. Somit könnte auch *H. salinarum* Mechanismen zur phosphatabhängigen Genexpression besitzen.

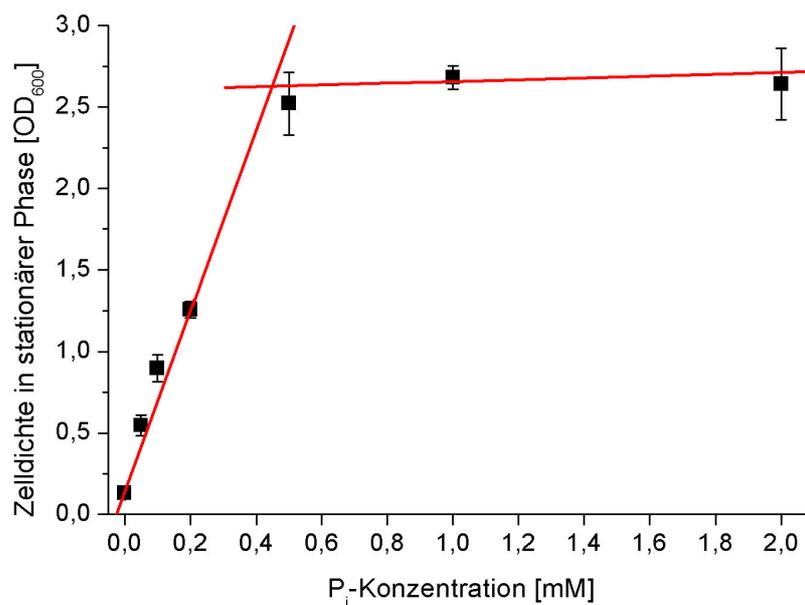
Nach der Überprüfung der Expression dieser Proteine abhängig von der Verfügbarkeit phosphathaltiger Substanzen, folgten Verhaltensstudien von Deletionsmutanten um herauszufinden, ob Zwei-Komponenten Systeme diese Regulation steuern. Darüber hinaus

wurde versucht, den Stimulus für die phosphatabhängige Expression zu identifizieren.

Die Chemotaxis enthält als zentrales Element das Zwei-Komponenten System CheA-CheY. Aus diesem Grund war auch das Schwimmverhalten von *H. salinarum* bei unterschiedlicher Phosphatversorgung Gegenstand der Untersuchungen.

### 3.2.3 Phosphatabhängigkeit der Zelldichten

Um die Reaktion von *H. salinarum* auf Phosphatmangelbedingungen testen zu können, musste zunächst festgestellt werden, ab welcher Konzentration das Wachstum nicht mehr durch den  $P_i$ -Vorrat des Mediums begrenzt ist. Die im Rahmen dieses Experiments erhobenen Daten veranschaulicht Abbildung 3.11.



**Abbildung 3.11:** Abhängigkeit der Zelldichte stationärer *H. salinarum*-Kulturen von der Phosphatkonzentration des Mediums.

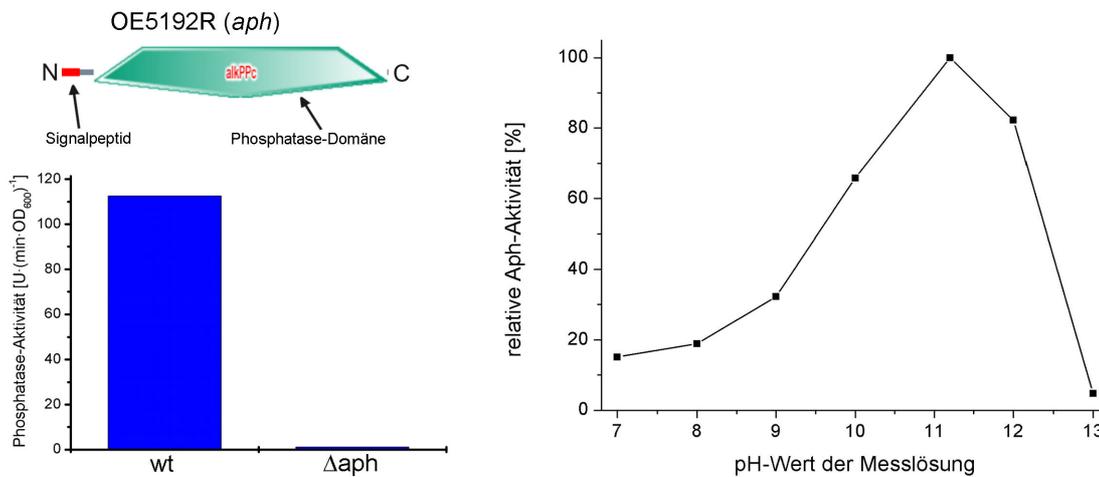
Aus ihr geht eine direkte Proportionalität der Zelldichte stationärer *H. salinarum*-Kulturen zu der  $P_i$ -Konzentration des Mediums unterhalb von etwa 0,5mM hervor. Darüber begrenzen andere, hier nicht spezifizierte Faktoren die Zelldichte auf 2,5 bis 2,8 OD<sub>600</sub>. Folglich mussten alle Untersuchungen des phosphatabhängigen Verhaltens genauso wie dieses erste Experiment in synthetischem Medium (SM) durchgeführt werden, da das peptonhaltige Halomedium ca. 4mM Phosphat enthält.

### 3.2.4 Expression von Alkalischer Phosphatase in *H. salinarum*

Von den im Abschnitt 3.2.1 bereits erwähnten ca. 30 Bakterienspezies mit bekannter phosphatabhängiger Genexpression wurden 19 auch auf die Expression des Enzyms Alkalische Phosphatase (Aph) getestet. In allen Fällen zeigte Aph ein phosphatabhängiges Expressionsprofil. Jedoch kennt man daneben auch Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Bacteroides ruminicola*, die dieses Enzym konstitutiv exprimieren [69, 22].

Die Messung der Phosphataseaktivität in *H. salinarum* musste den spezifischen Eigenschaften der halobakteriellen Aph angepasst werden. Entscheidend sind hier sowohl die Lokalisation des Enzyms als auch dessen pH-Optimum. Aufgrund des N-terminalen Signalpeptids verlässt das Protein die Zelle in gefaltetem Zustand über den Tat („**T**win-**a**rginine **t**ranslocation“)-Weg [104]. Da Aph nicht über Transmembranbereiche verfügt und der S-Layer auch nicht engmaschig genug ist, um dieses Protein unter seinen Kuppeln zurückzuhalten, wird es in das Medium sekretiert. Dies äußert sich darin, dass zwar das Cytoplasma eines  $\Delta$ OE5192R-Stamms eine ebenso große Phosphataseaktivität besitzt wie das Cytoplasma des Wildtyps (Daten nicht gezeigt), aber der Zellüberstand nahezu keine Aktivität mehr aufweist (Abbildung 3.12 links, Messung bei pH11). Aufgrund dieser Beobachtung konnte die sekretierte, im Medium befindliche Phosphataseaktivität dem von OE5192R kodierten Enzym zugeordnet werden. Die Messung der Enzymaktivität in einem relativ weiten pH-Bereich zeigte eindrucksvoll, dass die Alkalische Phosphatase (pI-Wert 4,4) ihrem Namen mit einem Aktivitätsoptimum von pH11 alle Ehre macht (Abbildung 3.12 rechts). Daneben existiert aber scheinbar eine weitere Phosphataseaktivität im neutralen pH-Bereich, da die Zellüberstände bei pH7 noch etwa 15% der maximalen Aktivität bei pH11 besitzen.

Die Frage, ob Phosphatlimitierung in *Halobacterium salinarum* zu einer gesteigerten Expression der Alkalischen Phosphatase führt, beantwortete der Vergleich der Phosphataseaktivitäten zweier Zellkulturen. Diese enthielten 0,1mM bzw. 1mM  $P_i$  im Medium und wurden über die gesamte Wachstumskurve hinweg beobachtet. Aufgrund der beschriebenen Besonderheiten dienten die Zellüberstände der Kulturen zur Aktivitätsbestimmung durch Spaltung von p-Nitrophenylphosphat (pNpp) bei pH 11. Die Enzymaktivität kann durch die starke Absorption des entstehenden p-Nitrophenolats bei 405nm photometrisch quantifiziert werden.

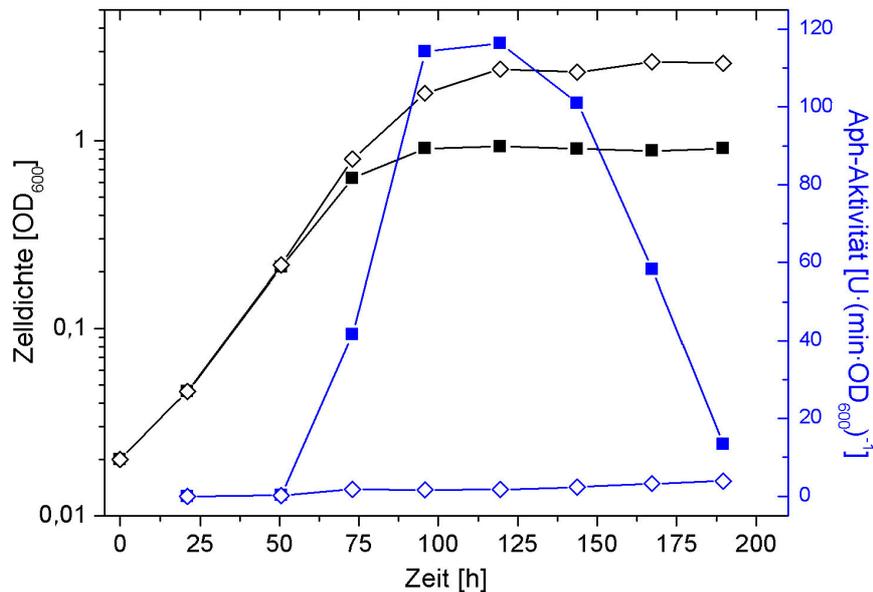


**Abbildung 3.12:** Charakteristika der Alkalischen Phosphatase von *H. salinarum*. Neben der SMART-Analyse von Aph ist die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität dieses Proteins sowie die Auswirkungen der Deletion des kodierenden Gens (OE5192R) auf die Phosphataseaktivität von Zellüberständen dargestellt.

Beide Kulturen wuchsen erwartungsgemäß gleich an, wobei sich der Dichtezuwachs der Kultur mit 0,1mM  $P_i$  im Medium bereits nach 72h verringerte und danach schnell zum Stillstand kam (Abbildung 3.13). Während die 0,1mM-Kultur schließlich mit einer  $OD_{600}$  von 0,9 in der stationären Phase endete, wuchs die 1mM-Kultur bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600} = 2,6$ . Die 0,1mM-Kultur sekretierte große Mengen Alkalischer Phosphatase, wohingegen die Zellüberstände der 1mM-Kultur bis in die stationäre Phase hinein nahezu frei von Aph-Aktivität blieben. Dieser Versuch wies somit die streng regulierte, von der Phosphatversorgung abhängige Expression des Enzyms Alkalische Phosphatase in *H. salinarum* nach.

### 3.2.5 Phosphatmangel induzierte Dynamik des Transkriptoms

Die Regulation der Aph-Expression genügte als Anfangsverdacht, um das Verhalten der restlichen mehr als 2500 Gene zu untersuchen. Dazu wurde eine Transkriptomanalyse mit Hilfe von Mikroarrays durchgeführt. Diese versetzen den Forscher in die Lage, die mRNA-Mengen nahezu aller Gene eines Organismus in einem einzigen Experiment zu bestimmen. Als Ergebnis erhält man typischerweise die Aussage, wieviel mRNA von Gen X zum Zeitpunkt Y oder nach Behandlung Y relativ zum Zeitpunkt Z bzw. nach Behandlung Z vorhanden ist. Zu dieser Aussage gelangt man durch Umschreiben der

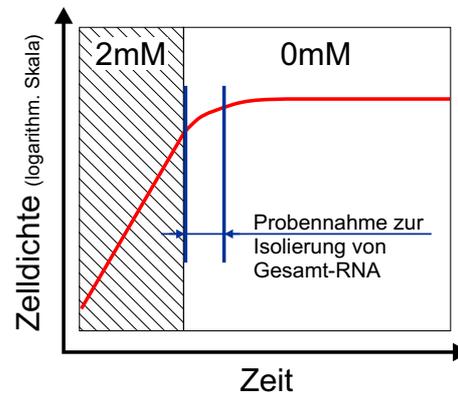


**Abbildung 3.13:** Vergleich der Aph-Expression zwischen einer mit Phosphat gesättigten Kultur (1mM P<sub>i</sub>, offene Diamanten) und einer im Wachstumsverlauf hungernden Kultur (0,1mM P<sub>i</sub>, gefüllte Quadrate). Schwarze Kurven: Zelldichte, blaue Kurven: Phosphataseaktivität.

zu vergleichenden Gesamt-RNAs in cDNAs. Die hergestellten, mit zwei verschiedenen Farbstoffen markierten cDNAs können sodann gemischt und mit Sonden auf einem Mikroarray hybridisiert werden [116].

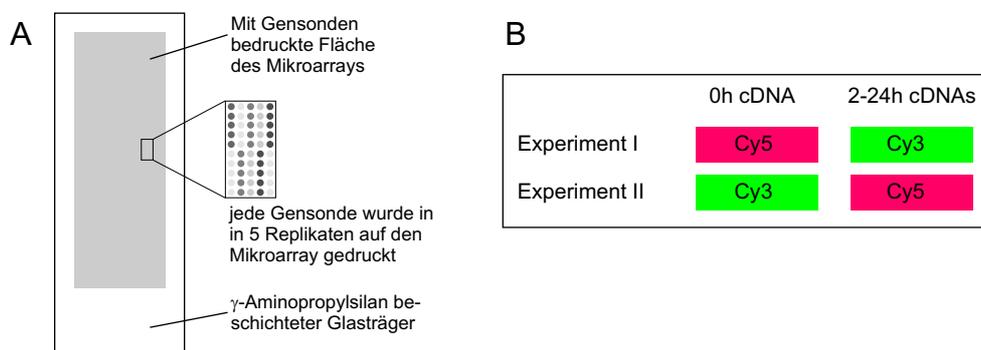
Die Mikroarray-Analyse ermöglicht folglich, ein umfassendes Bild der zellulären Antwort auf den einsetzenden Phosphatmangel zu zeichnen. Da in *E. coli* und *B. subtilis* die durch Phosphatmangel aktivierten Zwei-Komponenten Systeme einer transkriptionellen Autoregulation unterliegen, könnte das Mikroarray-Experiment neben verschiedenen Phosphatase- und Transportergenen auch das für die Regulation verantwortliche ZKS enthüllen.

Die genaue, reproduzierbare Beschreibung der Phosphatmangelantwort von *H. salinarum* erforderte die Analyse von Zellen, die zu einem definierten Zeitpunkt einer Phosphat depletierten Situation ausgesetzt sind. Dies erfolgte durch Zentrifugation von Kulturen, die in synthetischem Medium (SM) mit 2mM P<sub>i</sub> im Licht unter aeroben Bedingungen bis OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 heranwuchsen. Die in SM mit 0mM P<sub>i</sub> resuspendierten Zellen wurden anschließend unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Die unmittelbar nach dem Transfer sowie 2, 4, 10 und 24 Stunden später aus dieser Kultur entnommenen Proben dienten der RNA-Isolierung (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14:** Schematische Darstellung der Applikation eines zeitlich genau definierten Phosphatmangels einer *H. salinarum*-Kultur mit nachfolgender Entnahme von Proben zur Isolierung von Gesamt-RNA.

Die benutzten Mikroarrays enthalten je 5 Replikate der Sonden für 2699 Gene des *H. salinarum*-Genoms (Schema in Abbildung 3.15A), was die Robustheit der aufgezeichneten Arraydaten enorm verstärkt [139]. Auf diesen Arrays wurden jeweils die cDNAs der 2h-, 4h-, 10h- und 24h-Proben mit den 0h-cDNAs verglichen.

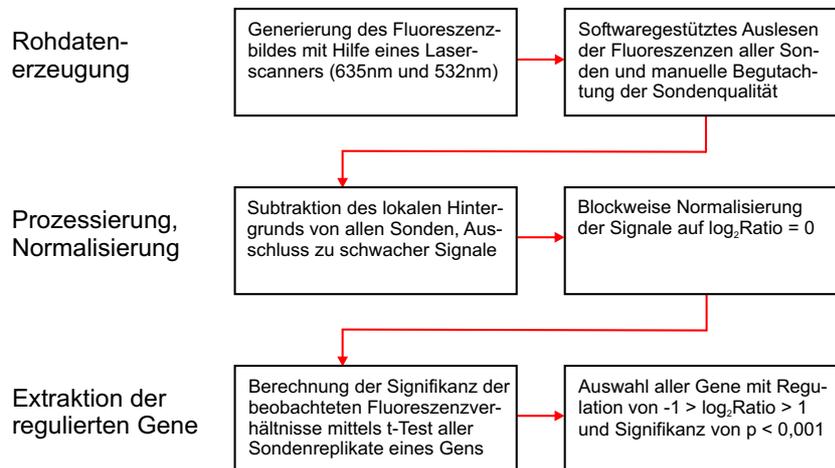


**Abbildung 3.15:** Schemata des Mikroarrays und des Farbstoffwechsels. A: Darstellung des verwendeten Mikroarrays, die Replikatpakete sind durch unterschiedliche Schattierungen symbolisiert; B: Übersicht des angewendeten Farbstoffwechsels bei der cDNA-Synthese, die Farbstoffe Cy5 und Cy3 sind mit ihren Fluoreszenzfarben dargestellt.

Die Markierung der cDNAs bei der Wiederholung des Phosphatmangel-Schocks mit den jeweils umgekehrten Farbstoffen des initialen Versuchs erhöhte nochmals die Verlässlichkeit des Gesamtdatensatzes (Abbildung 3.15B). Dieses Vorgehen nennt sich Farbstoffwechsel (engl.: „dye swap“). Man blendet damit Gene aus, die nicht aufgrund verschiedener mRNA-Mengen sondern wegen des bevorzugten Einbaus eines der verwendeten Farbstoffe als reguliert identifiziert würden [139].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mikroarray-Experimente wurden alle

nach den gleichen Arbeitsvorschriften analysiert (Abbildung 3.16). Aus dem Bild eines Mikroarrays extrahierte das Programm GenePix Pro 6 (Molecular Devices) die Fluoreszenzintensitäten aller Gensonden nach Anregung bei 532nm (grün) und 635nm (rot).

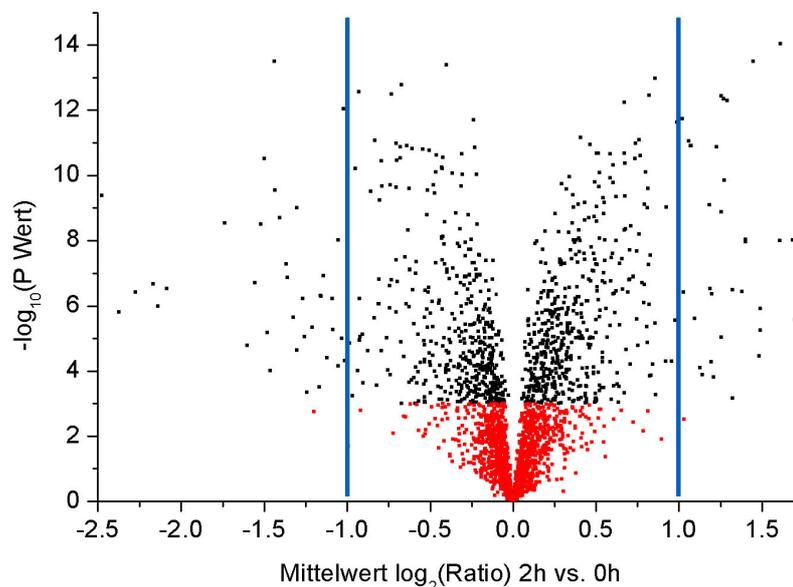


**Abbildung 3.16:** Flussdiagramm der Verarbeitungsschritte der Arraydaten.  $\log_2\text{Ratio}$ : Logarithmus zur Basis 2 des Verhältnisses von roter (635nm) zu grüner (532nm) Signalintensität;  $p$ : P-Wert (Maß für die Signifikanz der beobachteten Regulation eines Gens).

Die Subtraktion des lokalen Hintergrunds, der Ausschluss zu schwacher Signale sowie die blockweise Normalisierung der Fluoreszenzverhältnisse (Ratios) erfolgte mit Hilfe von Algorithmen, die Dr. Gerhard Welzl (Institut für Biomathematik und Biometrie (GSF), Neuherberg) entwickelte und als anwendungsbereite Programme in der Mathematik-Metasprache R bereitstellte. Bei der blockweisen Normalisierung betrachtet man alle mit der gleichen Nadel gedruckten Sonden. Im vorliegenden Fall ergeben sich dadurch 48 Blöcke. Der mittlere  $\log_2\text{Ratio}$ -Wert (Median) aller Sonden eines solchen Blocks wird auf Null justiert. Der dabei entstehende Justierungsfaktor dient nun der Normalisierung der Ratios der einzelnen Gensonden dieses Blocks. Diese Methode ist der globalen Normalisierung über alle Sonden eines Arrays überlegen [101].

Gene mit nur 1-2 auswertbaren von den 5 gedruckten Sondenreplikaten wurden nicht weiter analysiert. Bei Genen mit 3-4 auswertbaren Sonden ersetzte der Median dieser Sonden die verworfenen 1-2 Replikate. Die Berechnung von P-Werten für alle Gene durch einen t-Test erfolgte mit Hilfe des MultipleExperimentViewer (MEV) von TIGR [110] und diente der Abschätzung der Schwankungen bzw. Streuungen der Regulationsdaten der einzelnen Gene. Für Gene mit einem P-Wert von kleiner gleich  $1 \cdot 10^{-3}$  galt das erhaltene Verhältnis zwischen den beiden analysierten Fluoreszenzen als signifikant.

Für die Bewertung der temporalen Transkriptomveränderungen nach Phosphatlimitierung wurden nur solche Gene betrachtet, die wenigstens zu einem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante zweifache Induktion bzw. Repression gegenüber dem 0h-Zeitpunkt aufwiesen. Abbildung 3.17 visualisiert diese Genauswahl beispielhaft für die Daten des 2h-Zeitpunktes mit Hilfe eines Vulkan-Diagramms [56]. Die für die Bewertung benutzten Gene sind schwarz (hinreichende Signifikanz der Genregulation) und befinden sich ausserhalb der beiden eingezeichneten blauen Balken (Stärke der Genregulation mindestens zweifach).



**Abbildung 3.17:** Vulkan-Diagramm der 2h-Mikroarrays. Alle rot dargestellten Gene erfüllen nicht das Signifikanzkriterium  $p \leq 0,001$ . Die blauen Balken markieren die zweifache Induktion bzw. Repression von Genen.

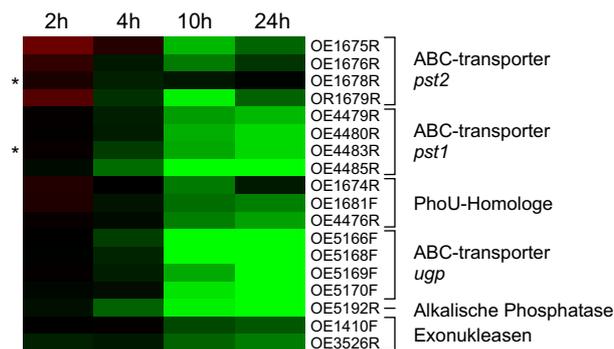
Innerhalb des beobachteten Zeitraums ließen sich 274 Gene identifizieren, die zu wenigstens einem Zeitpunkt nach den besprochenen Parametern als reguliert gelten. Eine Übersicht des Umfangs der transkriptionellen Änderungen gibt Tabelle 3.5. Bei einem Drittel davon handelt es sich um Gene ohne vorhersagbare Funktion („hypothetical proteins“). Um einen Eindruck von den zellulären Veränderungen zu erhalten, die in den *H. salinarum*-Zellen während des einsetzenden Phosphatmangels stattfinden, folgt nun die Evaluation der Gene mit bekannten sowie neuzugeordneten biologischen Funktionen.

Zeitpunkt	induzierte Gene	herabregulierte Gene
2h	35	44
4h	39	56
10h	60	46
24h	87	52
<b>Insgesamt</b>	274 Gene mit mindestens zweifacher Induktion bzw. Repression zu wenigstens einem Zeitpunkt	

**Tabelle 3.5:** Umfang der Dynamik des Transkriptomts von *H. salinarum* nach Umsetzen in phosphatfreies Medium.

### Gene zur Phosphataufnahme

Tabelle 3.4 (S. 29) zeigt die in *H. salinarum* per Homologiesuche gefundenen Gene zur Phosphataufnahme. Mehrere dieser Gene werden von dem durchgeführten Mikroarray-Experiment als reguliert klassifiziert. So zeigen die Operons *aph*, *phoX<sub>1</sub>-pstC<sub>1</sub>A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>* und *ugpBAEC* eine ab 4h kontinuierlich zunehmende Induktion (Abbildung 3.18). Das Operon des zweiten P<sub>i</sub>-ABC-Transporters (*phoX<sub>2</sub>-pstA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>*) zeigt hingegen nur eine vorübergehende Induktion mit einem Maximum im Bereich von 10h nach Setzen der Phosphatlimitierung. Die Induktion all dieser Gene deutet daraufhin, dass *H. salinarum* die darin kodierten Proteine (Alkalische Phosphatase bzw. P<sub>i</sub>-/Gly3P-ABC-Transporter) zur Bekämpfung des einsetzenden Phosphatmangels nutzt.



**Abbildung 3.18:** Transkriptionsprofile von Genen, die für die Phosphataufnahme relevant sind. Rot: Repression, Grün: Induktion.

Der laut Homologie als Glycerin-3-phosphat-Transporter annotierte Ugp-Komplex ist sehr wahrscheinlich auch für die Fähigkeit des  $\Delta aph$ -Deletionsstamms verantwortlich, auf Glycerin-3-phosphat als einziger Phosphatquelle zu wachsen (siehe Abb. 3.38B, S. 63). Die P<sub>i</sub>-ABC-Transporter sind wohl die Ursache für die extrem starke Anreicherung

rung von cytoplasmatischem anorganischen Phosphat nach Applikation einer kleinen Phosphatdosis, der eine Phosphatmangelperiode vorausging (siehe Tab. 3.7, S. 52). Den möglichen Grund für die unterschiedlichen mRNA-Kinetiken der beiden  $P_i$ -ABC-Transporter diskutiert Abschnitt 4.2.3 auf S. 88.

Der in *E. coli* belegte Repressorkomplex, welcher die Phosphorylierung von PhoB durch die Histidinkinase PhoR verhindert (siehe Abb. 3.10 auf S. 28), besteht neben dem  $P_i$ -spezifischen ABC-Transportsystem Pst noch aus dem Mediatorprotein PhoU. Dieses PhoU ist entbehrlich für den Substrattransport durch Pst, jedoch essentiell für einen funktionellen Repressorkomplex [124]. *H. salinarum* besitzt eine ganze Batterie an PhoU-Homologen. Das Genom kodiert insgesamt vier verschiedene PhoU-Proteine, zwei in den *pst*-Operons (OE4476R und OE1674R) und zwei in monocistronischen Operons mit eigenen Promotoren (OE1681F und OE2128F). Die *phoU*-Gene in den polycistronischen *pst*-Operons zeigen die gleichen Induktionskinetiken, wie die restlichen Gene der entsprechenden Operons. Von den beiden separaten *phoU* war leider nur eines (OE1681F) auswertbar, da die Sondenqualität auf dem Mikroarray die Auswertung des anderen Gens (OE2128F) nicht zuließ. Interessanterweise ähnelt das Induktionsverhalten von OE1681F nicht dem des benachbarten Pst2-Transporters, sondern dem des weit entfernt kodierten Pst1-Transporters.

Die zwei Exonukleasen in Abbildung 3.18 werden von den Genen OE1410F und OE3526R kodiert und nach der Translation wahrscheinlich sekretiert. Die Proteine besitzen deutliche Nukleasemotive und Signalsequenzen zum Export durch das Sec-System (OE1410F) bzw. Tat-System (OE3526R). Die Funktion dieser Exonukleasen ist vermutlich die Degradation von im Habitat diffundierenden Nucleinsäuren zu einzelnen Nucleotiden, denen die Alkalische Phosphatase anschließend die Phosphatreste entfernt. Das freigesetzte anorganische Phosphat bildet das Substrat der  $P_i$ -ABC-Transporter.

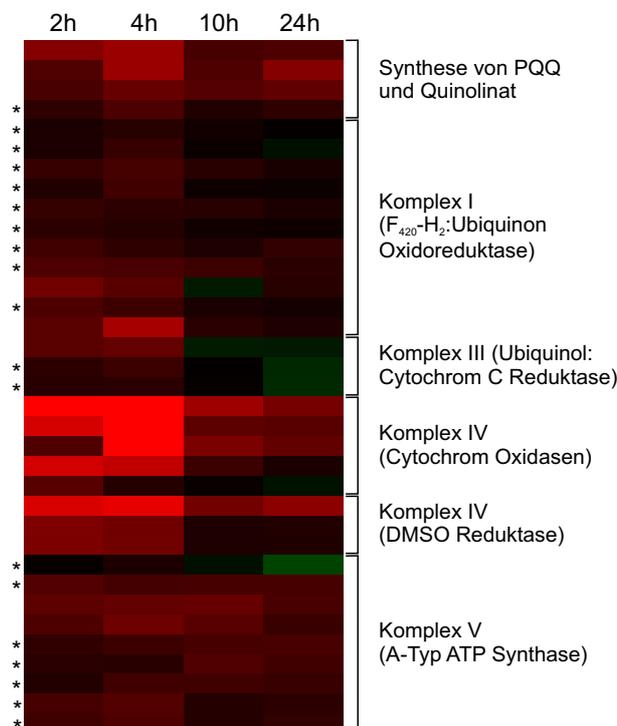
Im Fall des Gens *aph* konnte nachgewiesen werden, dass die während des Phosphatmangels beobachtete Erhöhung der Enzymaktivität von Aph in ursächlichem Zusammenhang mit einer gesteigerten mRNA-Menge steht. Dieses Postulat gilt für die meisten Formen bakterieller Proteinregulation. Für Archaeen ist eine generelle Aussage darüber jedoch aufgrund der dünnen Datenlage noch nicht möglich.

In den Abbildungen 3.18-3.27 finden sich auch mit einem Stern gekennzeichnete Transkriptionsverläufe. Diese stellen solche Gene dar, die die geforderten Signifikanzkriterien

(visualisiert in Abb. 3.17) nicht erfüllen, aber zusammen mit anderen, signifikant regulierten Genen einen funktionellen Komplex bilden. Diese zusätzlichen, gekennzeichneten Gene erscheinen nur in den Abbildungen, wenn sie den gleichen Regulationstrend zeigten, wie ihre signifikanten „Geschwister“.

### Gene zur respirativen Energiegewinnung

*H. salinarum* besitzt eine vollständige Atmungskette [122]. Die Funktion der Cytochrome als Elektronenüberträger wird dabei teilweise durch sogenannte Halocyanine übernommen. Die Zellatmung findet sich den gesamten Untersuchungszeitraum hindurch herunterreguliert. Abbildung 3.19 verdeutlicht, dass dies kein sporadisches Phänomen einzelner Gene der Atmungskette ist. Die vermindert transkribierten Gene verteilen sich auf alle Komplexe der respiratorischen Energiegewinnung bis hin zur ATP-Synthase (Komplex V). Das Bild komplettiert sich durch die Darstellung der restlichen, nicht signifikanten Gene der einzelnen Komplexe.



**Abbildung 3.19:** Transkriptionsprofile von Genen, die Proteinkomplexe der Atmungskette von *H. salinarum* kodieren. Die Gene wurden nach ihrer Zugehörigkeit zu den einzelnen Komplexen der Atmungskette gruppiert. Rot: Repression, Grün: Induktion.

Die einzige Ausnahme bildet die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), die nicht es-

sentiell ist für den Elektronenfluss in der Atmungskette. Sie katalysiert die Umsetzung von Succinat zu Fumarat und überträgt dabei die anfallenden Reduktionsäquivalente über FAD auf Ubiquinol, wodurch diese der Atmungskette zugeführt werden.

Besonders stark ausgeprägt ist die Regulation des Komplex IV. Das Genom von *H. salinarum* enthält in vier weit voneinander entfernten Loci die Informationen zur Herstellung von Terminalen Oxidasen zur aeroben Respiration. Zwei der daraus herstellbaren Komplexe sind wahrscheinlich Cytochrom C- bzw. Halocyanin-Oxidasen (TermOx-1 und TermOx-2). Da *H. salinarum* kein Cytochrom C besitzt, ist noch unklar, ob sogenannte Halocyanine dessen Funktion wahrnehmen. Die zwei anderen Komplexe wurden als Cytochrom D-Oxidasen annotiert und gingen offensichtlich auseinander hervor (TermOx-3 und TermOx-4). Dies lässt sich aus der Tatsache schlussfolgern, dass sie innerhalb der Duplikate eines 60kB langen DNA-Abschnitts liegen. Leider waren nur die Sonden von TermOx-2 und TermOx-4 auswertbar. Diese zeigen jedoch in den ersten vier Stunden der Untersuchung eine konsistente, bis zu 16fache Repression.

An dieser Stelle sei auch gleich der alternative Komplex IV erwähnt, welcher die terminalen Elektronenakzeptoren DMSO und TMAO reduzieren kann [87]. Diese DMSO Reduktase weist innerhalb des Untersuchungszeitraums den gleichen Verlauf auf, wie die bereits besprochenen TermOx-Komplexe.

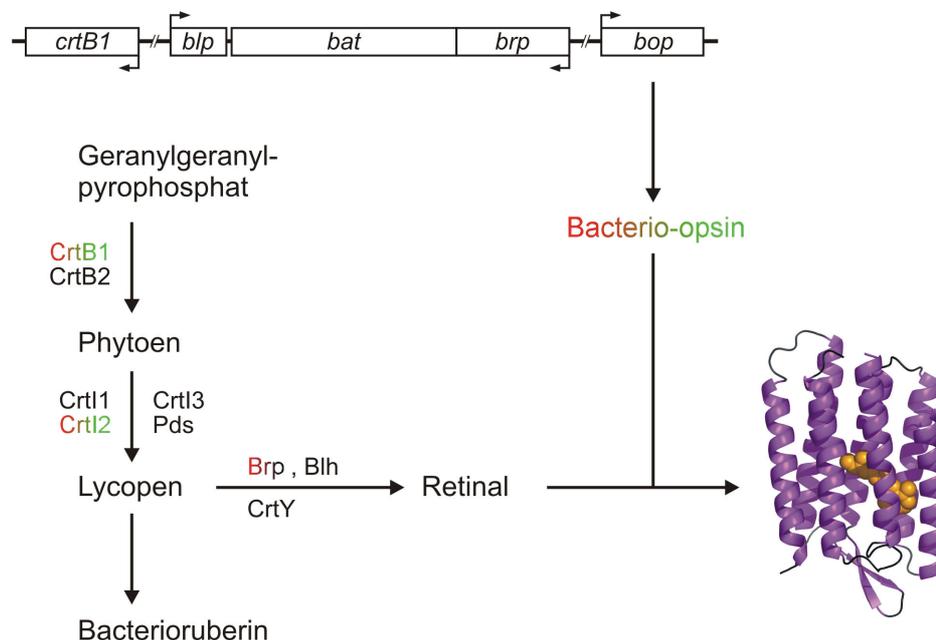
Für die Komplexe I und III schwächt sich die Repression im weiteren Verlauf des Experiments bis zum 24h-Messpunkt wieder ab. Interessanterweise sind auch Gene für die Synthese von mobilen Energieüberträgern wie Pyrroloquinolinquinon (PQQ) und Ubiquinol herunterreguliert. PQQ kommt als Kofaktor unterschiedlichster Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen vor, die ihre Elektronen an Cytochrom C, Ubiquinol und andere mobile Elektronenträger weitergeben [81]. Die Funktion von PQQ ist somit äquivalent zu NAD und FAD.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die stärkste Repression der Atmungskette vor der Induktion der Gene des Phosphatregulons auftritt, jedoch bis zum Ende des Versuchszeitraums bestehen bleibt. Die Repression der Atmungskettengene korreliert grundsätzlich mit der Verringerung des Zellwachstums, hat ihren Höhepunkt aber bereits 4h nach Beginn des Experiments. Die Zellen gehen allerdings auch frühzeitig innerhalb des 24stündigen Beobachtungszeitraums fließend in die stationäre Phase über.

### Gene der lichtgetriebenen Energiegewinnung

*Halobacterium salinarum* verfügt über die Möglichkeit, aus Lichtenergie einen Protonengradienten zu erzeugen, welcher unter anderem der ATP-Synthase zur Generierung von ATP dient [82]. Die Nutzung des Sonnenlichts geht im Wesentlichen auf die Wirkung der im sogenannten „*bop*-cluster“ kodierten Proteine zurück. Diese Gengruppe umfasst *crtB1* und *brp* (kodieren Enzyme der Kofaktorsynthese), *bop* (Strukturgen des Bacterio-opsins), *bat* (kodiert den Regulator des „*bop*-clusters“ [73]) und *blp* (kodiert für ein Protein mit unbekannter Funktion [41, 9]). All diese Gene kennzeichnet eine stromaufwärts des Promotors gelegene Aktivatorsequenz.

Über die in diesen Genen kodierten Proteine hinaus sind noch eine ganze Reihe weiterer Enzyme für die Biosynthese des Retinals verantwortlich. Jedoch stützt man sich hier hauptsächlich auf Homologieuntersuchungen, aus denen für die meisten Katalyseschritte mehrere Kandidaten hervorgehen. Bis zum Lycopon gleichen die Reaktionsschritte denen der Bacterioruberin-Biosynthese (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** Biosynthese von funktionellem Bacteriorhodopsin.

Die Enzyme CrtY, Brp und Blh sorgen wahrscheinlich für die Synthese von Retinal aus Lycopon. Im Gegensatz zu Brp sind CrtY und Blh, genauso wie alle weiteren Enzyme der Kofaktorsynthese in weit über das Genom verstreuten Genen kodiert. Abbildung 3.20

zeigt im oberen Bereich den „*bop*-cluster“ und darunter schematisch die Retinalsynthese ausgehend von Geranylgeranyl-pyrophosphat. An den Reaktionspfeilen befinden sich die Namen der diese Schritte katalysierenden Enzyme. Die Farbmarkierungen der Proteine entsprechen dem Transkriptionsverhalten ihrer Gene (siehe Abbildung 3.21).

Abbildung 3.21 enthält neben den Genen des „*bop*-clusters“ (*blp* war aufgrund der schlechten Sondenqualität nicht auswertbar) noch *crtI2*. Die Transkription all dieser Gene schwächte bei den 2h- und 4h-Zeitpunkten ab. Nach 10h erreichten die mRNA-Mengen wieder das Ausgangsniveau und lagen nach 24h leicht darüber (Ausnahmen *bat* und *brp*). Im Gegensatz zu Brp zeigen die anderen beiden Retinalsynthese-Enzyme CrtY und Blh keine signifikanten Änderungen während des Versuchs.



**Abbildung 3.21:** Transkriptionsprofile von Genen für die lichtgetriebene Energiegewinnung. Rot: Repression, Grün: Induktion.

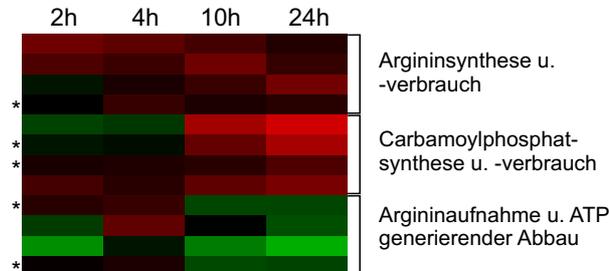
Die Regulation des Strukturgens der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin zeigt nach 24h Phosphatmangel nach oben, wobei die Zellen gleichzeitig in die stationäre Phase übergehen. Diese Korrelation ist seit langem bekannt [91]. Da das von Bacteriorhodopsin erzeugte Membranpotential nur zum Teil für die ATP-Synthese genutzt wird, steht die Repression der ATP-Synthese nicht im Gegensatz zu der Induktion des „*bop*-clusters“.

Ob die Expressionen der anderen Enzyme der Kofaktorsynthese vielleicht posttranskriptionell reguliert sind, wie eine Veröffentlichung von Baliga *et al.* nahelegt [10], bleibt hier ungewiss. Diese Frage könnte mit Untersuchungen auf Proteomebene geklärt werden, doch würde dies weit über die eigentliche Fragestellung des Versuchs hinaus-schießen.

### Gene des Arginin- und Carbamoylphosphatmetabolismus

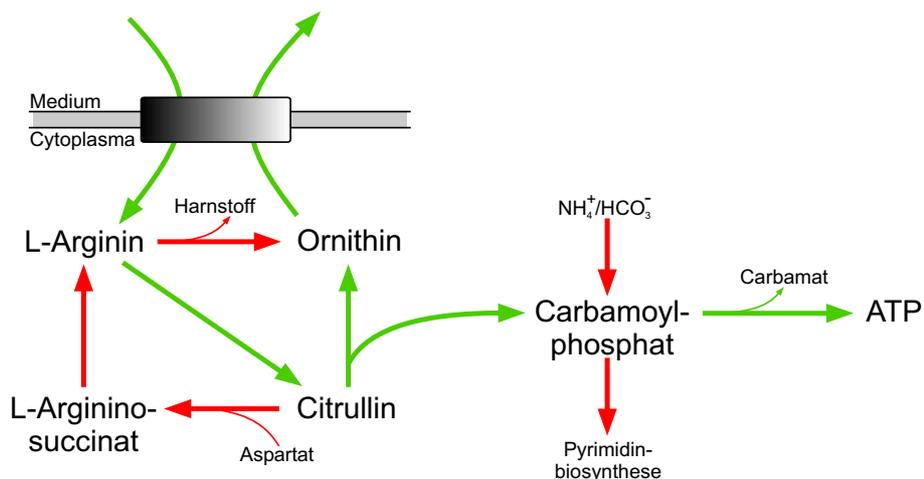
Arginin nimmt für *H. salinarum* eine Sonderstellung unter den Aminosäuren ein. Über den sogenannten „Arginin-Deiminase-Weg“ (ADI-Weg) kann es zu Citrullin umgewandelt und dieses in Ornithin und Carbamoylphosphat gespalten werden [109]. Das Endprodukt Ornithin entsorgt *H. salinarum* durch einen Antiporter, der im Gegenzug neues

Arginin importiert. Durch Spaltung des Carbamoylphosphats entsteht schlussendlich ATP. Dieser „Arginin-Fermentation“ genannte Prozess stellt mithin eine vom Komplex V autarke Form der ATP-Synthese dar.



**Abbildung 3.22:** Transkriptionsprofile der Gene des Arginin- u. Carbamoylphosphatmetabolismus. Rot: Repression, Grün: Induktion.

In den ersten vier Stunden des Untersuchungszeitraums ist der Verlauf der für den Arginin- und Carbamoylphosphatmetabolismus relevanten Gene heterogen (Abbildung 3.22). Die Argininsynthese und der nicht fermentative Verbrauch erscheint in diesem Zeitraum, wie auch während der gesamten Untersuchung, heruntergefahren. Die Carbamoylphosphatsynthese erhöht sich leicht, wobei der Abfluss zur Nucleinsäuresynthese über Carbamoylaspartat wiederum nicht induziert wird. Nach 2h zeigt sich eine deutliche Induktion der Gene der Arginin-Fermentation, wobei sie nach 4h wieder leicht unter dem Ausgangsniveau liegen.

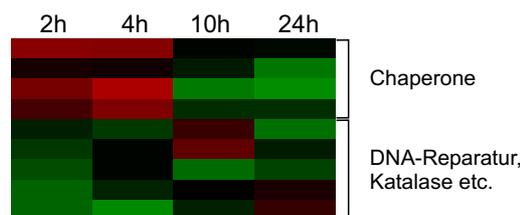


**Abbildung 3.23:** Veränderung des Arginin- und Carbamoylphosphatstoffwechsels bei Phosphatmangel. Die grünen und roten Pfeile symbolisieren die Induktion bzw. Repression der Enzyme der entsprechenden Reaktionen 10h und 24h nach Applikation der Phosphatlimitierung.

Ab dem 10h-Messpunkt kehrt sich dieser heterogene Phänotyp in einen klaren homogenen Trend um. Die Neusynthese von Arginin und Carbamoylphosphat sowie der Verbrauch beider Spezies ausserhalb der Arginin-Fermentation ist deutlich zurückgeschraubt. Die Enzyme für die ATP-Synthese aus Arginin und der Arginin-Ornithin-Antiporter zeigen eine klare Induktion (Abbildung 3.23).

### Oxidativer und genereller Stress

In den ersten vier Stunden des Experiments zeigt der Trend für einige Gene, welche Chaperone kodieren (HSP20-Homologe und beide Untereinheiten des Thermosoms), nach unten (Abbildung 3.24). Nach 10h dreht dieser Trend allerdings wieder in Richtung Induktion.



**Abbildung 3.24:** Transkriptionsprofile stressaktivierter Gene. Rot: Repression, Grün: Induktion.

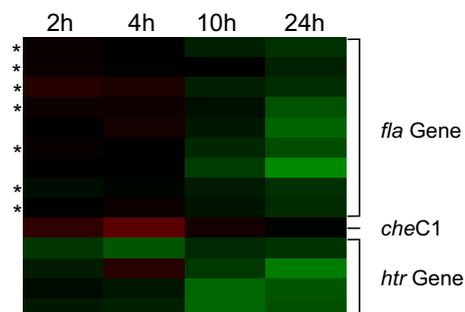
Sowohl ein Superoxid-Dismutase-Gen (es war nur *sod2* auswertbar, da die *sod1*-Sonden zu viele Ausfälle hatten) als auch das Katalase-Gen *perA* sind, vom 10h-Zeitpunkt abgesehen, durchweg induziert. Eine ähnliche Kinetik zeigen weitere Gene, deren Translationsprodukte mit der Reparatur von oxidativen Schäden in Verbindung gebracht werden können.

Von *E. coli* weiss man, dass Phosphatmangel einen oxidativen Stress erzeugt. Dieser geht hauptsächlich auf die Zellatmung und die damit verbundene Produktion von „reactive oxygen species“ (ROS) zurück [68, 31]. Andere Arbeitsgruppen wiesen in aeroben *H. salinarum*-Zellen bereits höhere Transkriptmengen der Thermosom- und Superoxid-Dismutase-Gene im Vergleich zu anaeroben Zellen nach [87]. Da auch der Phosphatmangel diese Gene induziert, kann für *H. salinarum* ein gewisser oxidativer Stress unter diesen Bedingungen angenommen werden.

### Gene zur aktiven Lageänderung

In Abbildung 3.25 sind die Regulationsprofile der *fla*- und *htr*-Gene zusammengefasst. Diese korrelieren mit dem Zeitverlauf des Phosphatstresses der Zellen. Obwohl viele der *fla*-Gene die vorgegebenen Signifikanzkriterien nicht erfüllen, ist der Trend einer leichten Induktion nach 24h nicht zu übersehen. Genauso verhält es sich mit den *htr*-Funktionspaaren *htrI/sopI* und *basT/basB*. Einzig *htrXIII* zeigt in den ersten vier Stunden des Experiments eine stärkere Induktion. Die Regulationsprofile aller weiteren halobakteriellen Transducer folgten keinem Trend und waren darüberhinaus durchweg nicht signifikant, weshalb sie nicht in Abbildung 3.25 aufgeführt sind.

Zu den *fla*-Genen liegen keine Funktionsdaten vor. Die induzierten halobakteriellen Transducer (Htr) könnten auf eine aktive Suche nach Nährstoffen hindeuten. Der Verlauf des Paares *htrI/sopI* entspricht relativ gut dem des „*bop*-Clusters“ (siehe Abbildung 3.21, S. 42). Dies erscheint logisch, da sich durch aktive Suche nach helleren Regionen die Wirkung des angeschalteten Bacteriorhodopsins potenziert.



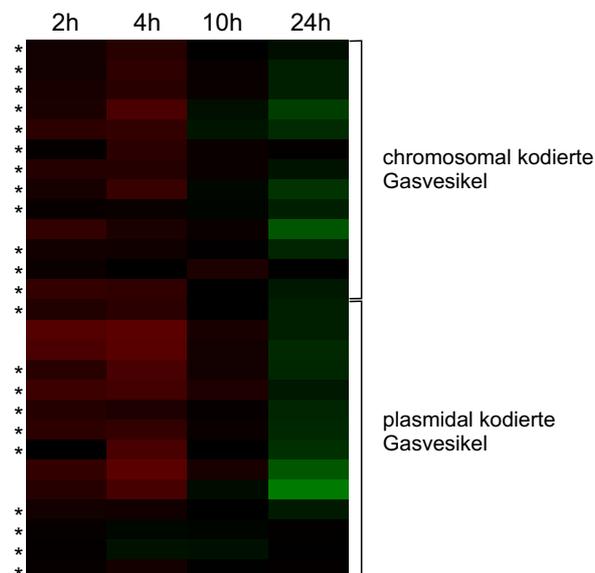
**Abbildung 3.25:** Transkriptionsprofile der *fla*- und *htr*-Gene. Rot: Repression, Grün: Induktion.

Das einzige, in Abbildung 3.25 dargestellte *che*-Gen ist *cheC1*, welches nach 4h am stärksten zurückgefahren wird. Die anderen *che*-Gene wiesen keine Regulation auf und fehlen folglich in der Abbildung. Möglicherweise handelt es sich bei *cheC1* auch um ein falschpositives, also fälschlicherweise als reguliert eingestuftes Gen.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm *H. salinarum* R1 (DSM 671) unterscheidet sich von seinem Mutterstamm (DSM 670) unter anderem durch die fehlende Gasvesikelproduktion in der exponentiellen Wachstumsphase. Selbst im stationären Zustand ist die Produktion so gering, dass man kaum Vesikel erkennen kann [126]. Im Stamm R1 ist eines der beiden plasmidal kodierten Gasvesikel-Operons durch ein Inserti-

onselement inaktiviert (siehe dazu auch [www.halolex.mpg.de](http://www.halolex.mpg.de)). Da sich in genau diesem Operon beide Strukturgene (*gvpA1*, *gvpC1*) der halobakteriellen Gasvesikel befinden, verwundert der beobachtete Phänotyp nicht im geringsten. Neben diesem „Gasvesikel-Cluster“ auf dem Plasmid pHS1 existiert zwar noch ein weiterer auf dem Chromosom von *H. salinarum* R1, die von ihm ausgehende Vesikelproduktion ist jedoch sehr schwach.

Auf den ersten Blick weisen beide Genhorte eine erstaunlich kohärente Transkription auf. Sowohl die wenigen signifikanten Gene als auch alle anderen für die Gasvesikelproduktion zuständigen Gene werden in den ersten vier Stunden des Experiments vermindert transkribiert. Nach 24h erreicht die Induktion dann ihren Höhepunkt (Abbildung 3.26).



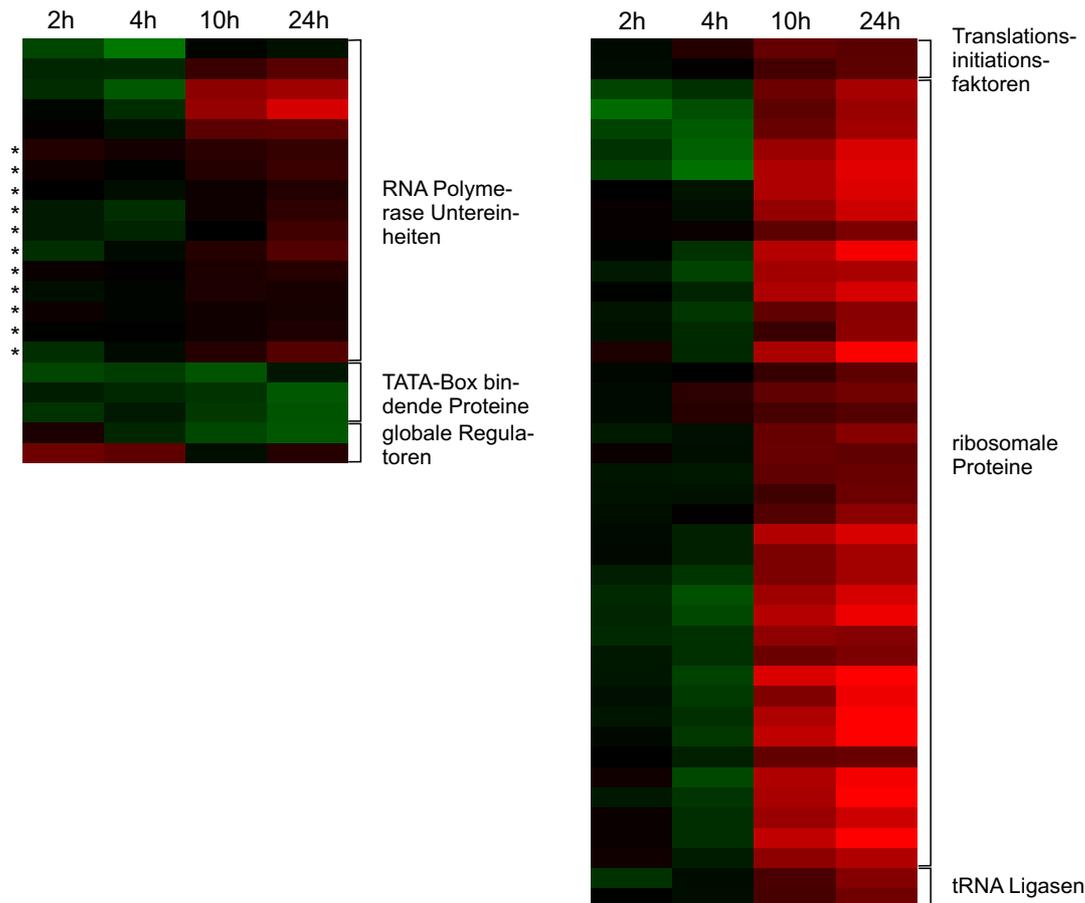
**Abbildung 3.26:** Transkriptionsprofile der Gene der Gasvesikelproteine. Rot: Repression, Grün: Induktion.

Auf den zweiten Blick offenbart sich jedoch ein interessantes Phänomen. Die letzten vier Gene in Abbildung 3.26 zeigen über den gesamten Versuch hinweg keine Veränderungen. Eben jene vier plasmidalen Gene sind durch das oben erwähnte Insertionselement inaktiviert.

### Gene der Transkription und Translation

Dem geltenden Paradigma zufolge sind Transkription und Translation in Prokaryoten eng miteinander verbunden. Im vorliegenden Transkriptomexperiment des Phosphat-

mangelschocks bestätigt sich dieser Zusammenhang eindrucksvoll. Sowohl die Untereinheiten der RNA-Polymerase (RNAPol) als auch 74% der für ribosomale Proteine kodierenden Gene (Abbildung 3.27) werden zu den Messpunkten 2h und 4h leicht induziert. Nach 10-24h vermindert sich die Transkription wiederum beider Gruppen dagegen sehr stark.



**Abbildung 3.27:** Transkriptionsprofile von Genen der Transkription bzw. Translation. Rot: Repression, Grün: Induktion.

Abbildung 3.27 stellt neben den RNAPol-Untereinheiten auch drei Gene dar, die für TATA-Box bindende Proteine (TBP) kodieren (*tbpB1b*, *tbpC1*, *tbpD1*). Es ist vorstellbar, dass sich die TBP ähnlich auf die Transkription verschiedenster Gene auswirken, wie die Sigmafaktoren der Bakterien [85]. Zwei globale Regulatoren weisen ebenfalls eine signifikante Regulation auf. So wird *lrp* in den ersten 4h des Experiment vermindert und *sirR* besonders im Zeitraum ab 10h verstärkt transkribiert.

Während Lrp nur in seinem DNA-Bindebereich Homologien zu der AsnC/Lrp-Re-

gulatorfamilie besitzt, erstrecken sich die Homologien von SirR zu eisenabhängigen Regulatoren über die gesamte Aminosäuresequenz (siehe [www.halolex.mpg.de](http://www.halolex.mpg.de)). Erste Mikroarray-Analysen dieser Arbeitsgruppe scheinen ebenfalls die Involvierung von SirR in die eisenabhängige Genregulation zu bestätigen (Rita Schwaiger, persönliche Mitteilung).

Weiterhin beinhaltet Abbildung 3.27 die Transkriptionsprofile der Translationsinitiationsfaktoren *eif2a* und *eif2b* sowie der tRNA-Ligasen *aspS* und *valS*. Deren Transkriptionskinetiken ähneln denen der Gene der ribosomalen Proteine.

Die Regulation all dieser für die Proteinproduktion essentiellen Gene korreliert gut mit dem Wachstumsverlauf der Zellen während des Versuchs. Zellen, welche von phosphathaltigem Medium in phosphatfreies Medium umgesetzt werden, verdoppeln sich noch einmal und gehen bereits nach 24h Inkubation in einen stationären Zustand über. Solch eine Korrelation zwischen Wachstumsphase und Expression ribosomaler Proteine kennt man von mehreren Bakterien [55].

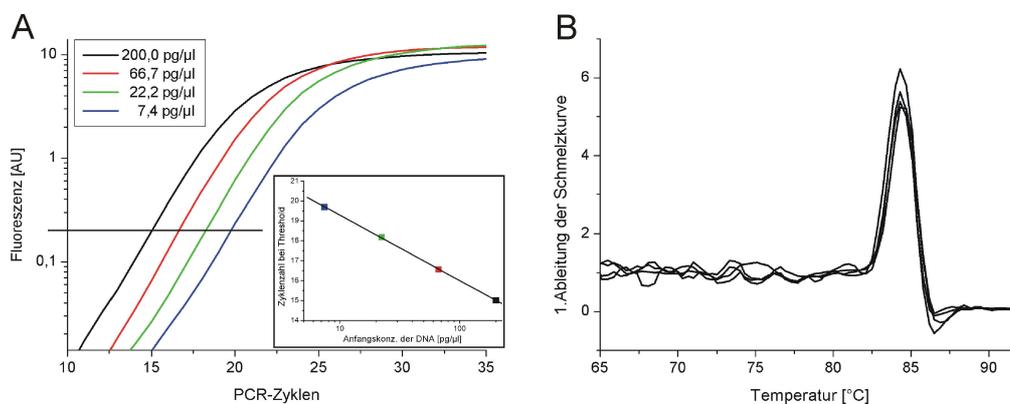
### 3.2.6 Validierung der Transkriptomanalyse und Quantifizierung der Geninduktionen

Ergebnisse aus Transkriptomanalysen unter Verwendung der Mikroarray-Technologie sind stichprobenartig durch eine unabhängige Methode zu validieren [23]. Im vorliegenden Fall diente dazu die quantitative PCR (qPCR) nach unspezifischer reverser Transkription (RT). Diese Methode erlaubt die echte Quantifizierung von mRNA-Mengenverhältnissen [19]. Mikroarrays eignen sich dafür nur beschränkt. Zum einen ist deren dynamischer Bereich oftmals unbekannt und zum anderen müssen die Experimentbedingungen so gewählt sein, dass möglichst alle Gensonden (im vorliegenden Fall mehr als 2500) mit ihrer Ziel-cDNA hybridisieren, was eine exakte Quantifizierung aller betrachteten mRNA-Mengenverhältnisse unmöglich macht.

Zur Validierung der erhobenen Arraydaten des Phosphatmangelschocks wurden die bereits vorhandenen RNA-Proben (0-24h) beider biologischen Replikate mit unspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Daran schloss sich eine qPCR unter Verwendung der Reportersubstanz SYBRGreen an [86]. Die daraus gewonnenen Daten dienten nach Verrechnung mit dem internen Standard *fdx* der verlässlichen relativen Quantifizierung der Transkriptmengen ausgewählter Gene. Das Gen *fdx* kodiert für das relativ

gleichbleibend exprimierte Haushaltsprotein Ferredoxin [83].

SYBRGreen interkaliert unspezifisch in DNA-Doppelstränge. Bei dessen Verwendung ist also unbedingt darauf zu achten, dass die detektierten Fluoreszenzsignale einer qPCR von einem einzigen Amplikon stammen. Daher überprüft man direkt nach Beendigung der PCR die Schmelzkurve der amplifizierten DNA. Enthält diese nur einen Wendepunkt, stammt die zuvor beobachtete Fluoreszenz der Reaktion von einem einzelnen, spezifischen PCR-Produkt (Abbildung 3.28B).

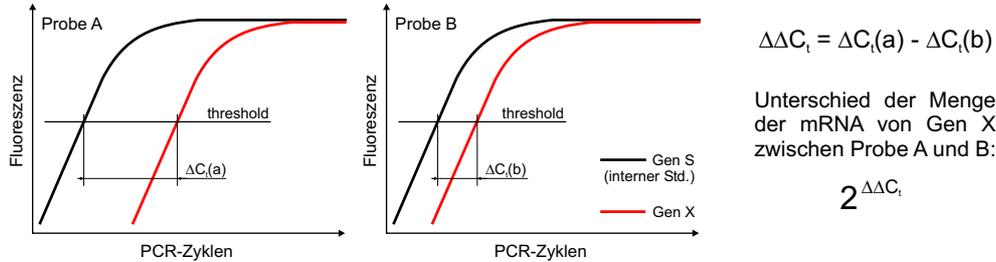


**Abbildung 3.28:** Nachweis von Effizienz und Spezifität der qPCR. A: qPCR einer Verdünnungsreihe von genomischer DNA als Kopiervorlage am Beispiel der *pstC2*-Primer. B: 1. Ableitungen der Schmelzkurven von Amplifikaten nach Beendigung der qPCR am Beispiel der *pstC2*-Primer.

Die relative Quantifizierung erfolgte nach der  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode, welche neben der besprochenen Spezifität der PCR-Primer noch weitere Voraussetzungen erfordert. Eine davon ist die Verdopplung der DNA bei jedem PCR-Zyklus (100% Effizienz). Dies lässt sich leicht mit Hilfe von qPCR-Ansätzen überprüfen, die verschiedene Anfangsmengen an DNA enthalten. Aus dem verzögerten Anstieg der Fluoreszenzkurven kann die Effizienz der Reaktionen errechnet werden (Abbildung 3.28A).

Bei der angewandten relativen Quantifizierung benötigt man ein konstitutiv exprimiertes Gen als internen Standard. Wie schon erwähnt diente dazu das Gen *fdx*. Zur Quantifizierung der Unterschiede in den Transkriptmengen eines Gens in verschiedenen Proben vergleicht man, wann die PCR-Reaktionen des Standardgens und des interessierenden Gens eine zuvorgewählte Fluoreszenzstärke überschreiten. Nun bildet man die Differenz aus diesen sogenannten  $C_t$ -Werten (engl.: „cycle threshold“). Die so erhaltenen  $\Delta C_t$ -Werte des interessierenden Gens in den untersuchten Proben werden wiederum von einander abgezogen, man erhält den  $\Delta\Delta C_t$ -Wert. Unter der zuvor überprüften Vorr-

aussetzung, dass die PCR-Reaktionen mit nahezu 100%iger Effizienz ablaufen, ergibt  $2^{\Delta\Delta C_t}$  den Unterschied der mRNA-Mengen des interessierenden Gens in den beiden untersuchten Proben (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29:** Berechnung von Transkriptmengenunterschieden aus RT-qPCR-Daten nach der  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

Auf diese Weise wurden, mit Ausnahme von OE3526R, die relativen Transkriptmengen aller phosphatrelevanten Systeme aus Tabelle 3.4 (siehe S. 29) über den Verlauf des einsetzenden Phosphatmangels hinweg bestimmt. Der aus den Triplikaten jeder PCR errechnete  $C_t$ -Mittelwert diente als Ausgangsgröße für die relativen Mengenbestimmung, die in Tabelle 3.6 zusammengefasst ist.

Gen	Funktion	2h	4h	10h	24h
<i>phoX<sub>1</sub></i>	Bindeprotein des P <sub>i</sub> -ABC-Transporters 1	1,4	7,7	74,6	130,8
<i>pstC<sub>1</sub></i>	Permease des P <sub>i</sub> -ABC-Transporters 1	0,9	10,0	235,2	408,2
<i>pstC<sub>2</sub></i>	Permease des P <sub>i</sub> -ABC-Transporters 2	0,5	3,1	14,1	7,0
<i>ugpB</i>	Bindeprotein des Gly3P-ABC-Transporters	1,7	51,3	457,4	514,9
<i>ugpA</i>	Permease des Gly3P-ABC-Transporters	2,9	35,1	588,5	900,8
<i>aph</i>	Alkalische Phosphatase	1,3	8,9	124,4	177,0
<i>ugpQ</i>	Glycerophosphoryl phosphodiesterase	2,8	2,1	3,0	0,8
<i>ipp</i>	Anorganische Pyrophosphatase	1,3	0,7	0,6	0,5
OE1410F	Homolog zu Exonuklease	1,2	1,9	1,8	2,4
<i>pho2</i>	homolog zu p-Nitrophenylphosphatase	2,3	3,3	1,6	1,4
<i>phoT2</i>	Na-abhängiges P <sub>i</sub> -Transportprotein	1,3	1,9	3,0	1,3
<i>phoT3</i>	P <sub>i</sub> -Transportprotein	1,7	1,7	1,8	0,6
OE4236F	P <sub>i</sub> -Transportprotein	2,2	2,7	1,8	1,0
OE2113R	P <sub>i</sub> -Permease	1,6	1,9	0,8	0,5

**Tabelle 3.6:** Zusammenfassung der Induktionen bzw. Repressionen der Transkription phosphatrelevanter Gene während des Phosphatmangelschocks laut RT-qPCR. P<sub>i</sub>: anorganisches Phosphat, Gly3P: Glycerin-3-phosphat.

Der Vergleich von Tabelle 3.6 mit den Transkriptomdaten im Abschnitt 3.2.5 ergibt ein komplexes Bild. Für die sehr stark regulierten Gene *phoX*<sub>1</sub> bis *aph* sowie für *ipp* und OE1410F erhält man mit beiden Methoden die gleichen Induktionskinetiken. Einzig in der Regulationsstärke ergeben sich erhebliche Unterschiede. Während die Arraydaten maximale Induktionen von 35fach (*ugpB*) ermitteln, zeigen sich bei der quantitativen RT-qPCR Unterschiede von bis zu 900fach.

Die Gene *ugpQ* und *pho2* bis OE2213R sind laut RT-qPCR zeitweise schwach reguliert, überschreiten aber überwiegend nicht einmal die Grenze der zweifachen Regulation. Mit der Mikroarray-Analyse erhält man für diese Gene keine auch nur ansatzweise signifikanten Daten.

Zusammenfassend kann man zwei Aussagen treffen. Für stark regulierte Gene korrelieren die mit der Mikroarray-Analyse und der RT-qPCR gemessenen Regulationstrends sehr gut. Wobei der dynamische Bereich der angewendeten Mikroarray-Technologie nur etwa eine Zehnerpotenz beträgt. Für schwach regulierte Gene ergibt sich ein gemischtes Bild. OE1410F und *ipp*, obwohl nur schwache Änderungen zeigend, wurden mit beiden Methoden ähnlich bewertet. Alle anderen Gene aus Tabelle 3.6 mit schwach ausgeprägten Regulationen fielen bei der Mikroarray-Analyse durch das aufgelegte Raster. Vermutlich verbergen sich in dem aufgezeichneten Datensatz noch weitere falschnegative, da sehr schwach regulierte Gene.

### 3.2.7 Analyse der intrazellulären Phosphatkonzentration

So weit überhaupt bekannt, regulieren alle bislang daraufhin untersuchten Bakterien die Expression ihrer Pho-Regulons abhängig von der Verfügbarkeit von Phosphat im Wachstumsmedium [145, 138, 84, 55, 47, 120, 119, 137]. Einzig bei *Synechocystis* sp. PCC6803 vermutet man intrazelluläres Phosphat als Signal, da die verantwortliche Histidinkinase cytoplasmatisch lokalisiert ist [129]. Für Archaeen liegen bislang keine Informationen über den Auslöser phosphatabhängiger Genexpression vor.

Die meisten Organismen besitzen mehr oder weniger große Depots an Polyphosphat [66]. *Halobacterium salinarum* hingegen akkumuliert aufgenommenes Phosphat hauptsächlich in Form von Magnesiumphosphat  $Mg_3(PO_4)_2$ . Polyphosphat spielt hier mit ca. 5% des zellulären Phosphatvorrats nur eine untergeordnete Rolle [121]. Darüber hinaus

führen anaerobe phototrophe Bedingungen in Gegenwart von Glycerin im Wachstumsmedium zur Veresterung des anorganischen Phosphats zu Glycerin-3-phosphat [36].

Bei der Erarbeitung der experimentellen Daten aus Abschnitt 3.2.5 ab Seite 32 fiel auf, dass die phosphatmangelbedingte Steigerung der Expression des Pho-Regulons größeren Schwankungen unterlag. Dabei schien die Induktionshöhe von der Wachstumsgeschwindigkeit der untersuchten Kultur abzuhängen. Dies deutete daraufhin, dass der Schalter des Pho-Regulons, im Gegensatz zu allen daraufhin untersuchten Bakterien, nicht die Phosphatkonzentration im Medium ist.

Da schnelles Zellwachstum mit einem hohen Phosphatverbrauch korreliert, wurde zunächst geprüft, ob der intrazelluläre Phosphatvorrat stärkere Fluktuationen zeigt. Der Phosphatgehalt von *E. coli*-Zellen bleibt beispielsweise relativ konstant. Der Normalwert von 10mM sinkt auch bei Phosphatmangel nicht unter 7mM [145].

Die Messungen mit *H. salinarum* förderten erstaunlich starke Schwankungen des intrazellulären Phosphatspiegels ( $[P_{\text{intra}}]$ ) zu Tage. Unter Bedingungen ausreichender Phosphatversorgung enthalten *H. salinarum*-Zellen etwa 42mM anorganisches Phosphat (Tabelle 3.7). Damit bestätigten sich frühere Messungen, welche einen Phosphatgehalt von 36mM ergaben [36]. Nach 24h Wachstum in phosphatfreiem Medium schrumpft  $[P_{\text{intra}}]$  auf etwa 10mM zusammen. Dieser Wert bleibt auch bei längerer Inkubation der Zellen in phosphatfreiem Medium erhalten und stellt somit die untere physiologische Grenze für *H. salinarum* dar.

Bedingung	$[P_{\text{intra}}]$ [mM]
Halomedium (4mM $P_i$ )	41,5 ± 10,4
24h synth. Medium (0mM $P_i$ )	10,2 ± 3,8
24h BS (1mM $P_i$ ) nach 24h in SM (0mM $P_i$ )	171,8 ± 86,3

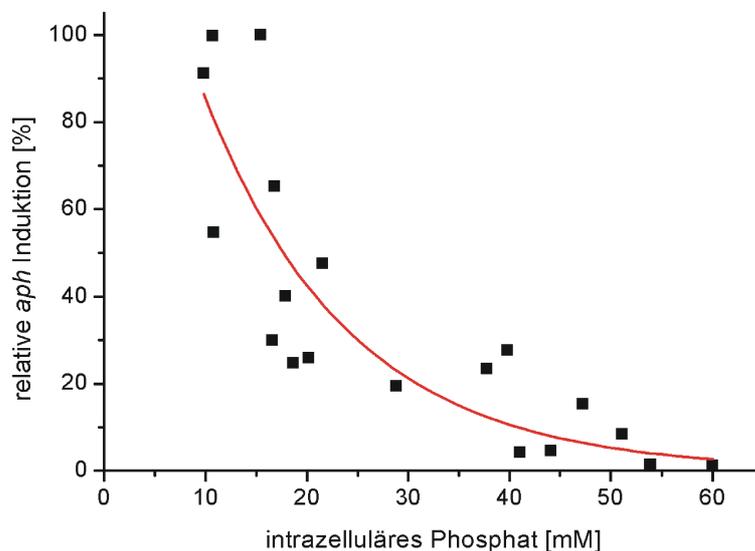
**Tabelle 3.7:** Höhe der intrazellulären Phosphatkonzentration ( $[P_{\text{intra}}]$ ) von *H. salinarum*-Kulturen unter verschiedenen Bedingungen. Die Daten beruhen auf mindestens 5 unabhängigen Wiederholungen. BS: Basalsalz, SM: synthetisches Medium.

Der Phosphatgehalt der Zellen kann nach einer solchen Hungerphase sehr leicht wieder angehoben werden. Dazu resuspendiert man die hungernden Zellen in Basalsalz, welches mit 1mM  $\text{NaP}_i$  supplementiert ist. Dadurch schnellte der Phosphatgehalt der Zellen innerhalb von 24h auf 172mM hoch und damit auf das vierfache des Normalniveaus (Tabelle 3.7).

Überführt man die Zellen statt in Basalsalz in synthetisches Medium (SM) mit 1mM  $\text{NaP}_i$ , so steigt  $[\text{P}_{\text{intra}}]$  nur vorübergehend an. Aufgrund des starken Zellwachstums pendelt er sich aber im weiteren Verlauf wieder auf Normalwerte ein (Daten nicht gezeigt).

Bislang ist unbekannt, ob das Abschmelzen der intrazellulären Phosphatkonzentration einfach nur die Folge der fehlenden Versorgung mit Phosphatquellen ist oder vielleicht sogar die Induktion des Pho-Regulons auslöst.

Um dies zu klären, wurden *H. salinarum*-Kulturen in verschiedenen Medien (komplexes Halomedium und synthetisches Medium) angeimpft und aerob inkubiert. Die so herangezogenen Zellkulturen besaßen verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten und intrazelluläre Phosphatkonzentrationen. Die in unterschiedlichen Wachstumsphasen befindlichen Zellkulturen wurden alle einem 7,5stündigen Phosphatmangel in SM bei 100rpm bzw. 250rpm ausgesetzt. Nach dieser Inkubationszeit folgte sowohl die Messung von  $[\text{P}_{\text{intra}}]$  als auch die Isolierung von Gesamt-RNA. Aus den einzelnen RNAs wurden mittels RT-qPCR die relativen Mengen an *aph*-mRNA bestimmt. Da das Gen für die Alkalische Phosphatase ein Teil des Pho-Regulons ist, diente dessen Transkriptionsstärke als Indikator für die Höhe der Induktion des gesamten Pho-Regulons.



**Abbildung 3.30:** Abhängigkeit der Induktion des Gens *aph* von der intrazellulären Phosphatkonzentration. Alle der Messung zu Grunde liegenden RNA-Proben stammen aus Kulturen, die 7,5h in phosphatfreiem synthetischem Medium inkubiert wurden.

Trotz der unterschiedlichen Vorbehandlungen war der einzige Parameter, mit dem die mRNA-Mengen des *aph*-Gens korrelierten, die intrazelluläre Phosphatkonzentration.

Abbildung 3.30 verdeutlicht diesen Zusammenhang. Obwohl in diesem Experiment alle Kulturen 7,5h Phosphathunger litten, unterschieden sich die mRNA-Mengen des Gens *aph* in erheblichem Maße. Statt von der Inkubationszeit in phosphatfreiem Medium, hing die Transkriptionsstärke von der zum Zeitpunkt der Probennahme vorliegenden Phosphatkonzentration in den Zellen ab.

### 3.2.8 Eruierung des Signalwegs zum Pho-Regulon

Für die Regulation der Transkription der bakteriellen Pho-Regulons sind, so weit wie bekannt, ausnahmslos Histidinkinasen (HK) und Antwortregulatoren (RR) verantwortlich. Auch *H. salinarum* verfügt über ein großes Spektrum von HK und RR. Aus Kapitel 3.1 geht hervor, dass mit Ausnahme von CheA, CheY und CheB weder den Histidinkinasen noch den Antwortregulatoren durch bioinformatische Analysen *per se* eine Funktion zuordenbar wäre.

Zwei Fakten legten also nahe, die Zwei-Komponenten Systeme (ZKS) von *H. salinarum* daraufhin zu testen, ob sie für die phosphatabhängige Genregulation verantwortlich zeichnen: (i) alle bakteriellen Pho-Regulons werden von ZKS kontrolliert und (ii) *H. salinarum* enthält Homologe von *E. coli*-PhoU, einem Protein mit einer Schlüsselfunktion in der phosphatabhängigen Genexpression.

Die Untersuchung der halobakteriellen Zwei-Komponenten Systeme erfolgte durch Erzeugung entsprechender Deletionsstämme mittels homologer Rekombination unter Verwendung einer Blau-Weiss-Selektionsstrategie [63]. Alle Untersuchungen in Bakterien besagen, dass HK einen bestimmten RR phosphorylieren, welcher wiederum an bestimmte Zielpromotoren bindet. Mitunter sprechen auch mehrere HK den gleichen RR an [44]. *H. salinarum* besitzt deutlich mehr HK als RR, womit das Szenario der RR-Phosphorylierung durch mehr als eine HK nicht unwahrscheinlich ist. Darum fiel die Wahl der zu deletierenden Komponenten auf die Antwortregulatoren.

Die Prüfung der sechs Deletionsstämme (4 RR mit Effektor-domäne, 1 RR ohne Effektor-domäne, 1 Hybridkinase mit funktioneller Empfänger-domäne) erfolgte mittels des Aph-Tests (siehe S. 31). Dazu folgte auf eine Wachstumsphase bis  $OD_{600} \approx 0,5$  die Messung der Aph-Aktivität und eine 48stündige Phosphathungerphase mit anschließender erneuter Aph-Messung. Über die Deletion von Genen mit Empfänger-domänen

hinaus wurde damit begonnen, alle Histidinkinasen auszuschalten und diese Stämme dem Aph-Test zu unterziehen. Bislang konnten neben der Hybridkinase OE7042R noch vier weitere HK-Gene deletiert und geprüft werden.

Deletionsstamm	Genfunktion	spez. Aph-Aktivität [ $\text{U} \cdot (\text{min} \cdot \text{OD}_{600})^{-1}$ ]	
		HM (4mM $\text{P}_i$ )	48h SM 0mM $\text{P}_i$
wildtyp	-	1,4	112,5
$\Delta\text{OE2086F}$	RR, Transkription?	1,2	60,5
$\Delta\text{OE2334R}$	RR, Transkription?	1,1	105,9
$\Delta\text{OE3854R}$	RR, Transkription?	1,3	88,4
$\Delta\text{cheY}$	RR, Chemotaxis	1,1	113,4
$\Delta\text{cheB}$	RR, Chemotaxis	1,2	138,8
$\Delta\text{OE7042R}$	HybHK, Transkr.?	1,4	108,8
$\Delta\text{OE2088F}$	HK, Transkription?	1,0	82,0
$\Delta\text{OE2333R}$	HK, Transkription?	1,8	163,0
$\Delta\text{OE2712R}$	HK, Transkription?	2,5	81,7
$\Delta\text{OE3855R}$	HK, Transkription?	1,1	108,4

**Tabelle 3.8:** Spezifische Aph-Aktivitäten [ $\text{U} \cdot (\text{min} \cdot \text{OD}_{600})^{-1}$ ] von *H. salinarum*-Stämmen mit Deletionen von Genen, die funktionelle Empfängerdomänen enthalten oder Histidinkinasen sind im Vergleich zum R1 wildtyp. HM: Halomedium, SM: synthetisches Medium, RR: Antwortregulator, HK: Histidinkinase, HybHK: Hybridkinase

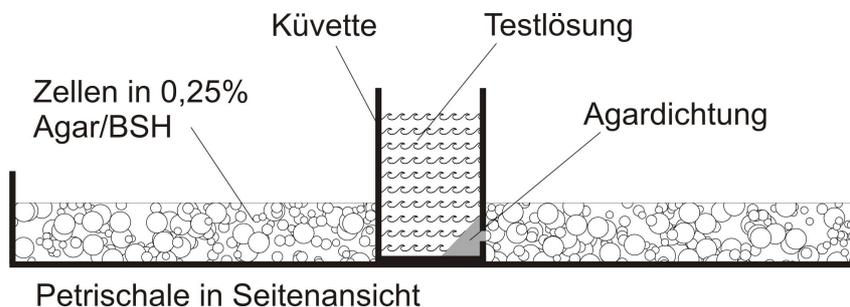
Alle Deletionsstämme zeigten einen dem R1 wildtyp vergleichbaren Phänotyp (Tabelle 3.8). Daraus folgt, dass die Steuerung des Pho-Regulons ohne klassische ZKS funktioniert. Da bislang nicht alle Histidinkinasen deletiert und getestet wurden, bleibt noch die Möglichkeit offen, dass eine von ihnen einen anderen, von den Antwortregulatoren verschiedenen Transkriptionsfaktor aktiviert. Dieser könnte dann ohne Beteiligung der RR die Transkription des Pho-Regulons beeinflussen. Ebenfalls unklar bleibt in diesem Kontext, warum *H. salinarum* so viele PhoU-Homologe besitzt. Interagieren diese vielleicht trotzdem mit einem Regulatorprotein, auch wenn es sich dabei nicht um eine Histidinkinase handelt? Diese und weitergehende Fragen werden in Abschnitt 4.2.5 (S. 97) ausführlich diskutiert.

### 3.2.9 Phosphatabhängige Taxis von *H. salinarum*

Das Prinzip der stimulusgerichteten Bewegung von *H. salinarum* ähnelt dem vieler Bakterien und hängt von einer ganzen Reihe von Proteinen ab [147]. Der Stimulus

wird direkt von den halobakteriellen Transducern (Htr) oder von speziellen, mit den Htr wechselwirkenden Bindeproteinen detektiert. Die aktivierten Htr interagieren nachfolgend mit der Histidinkinase CheA, welche sich daraufhin phosphoryliert. CheA~P phosphoryliert seinerseits den Antwortregulator CheY, was diesen befähigt, auf bislang ungeklärte Weise an den halobakteriellen Flagellarmotor zu binden und die Frequenz der Drehrichtungsänderung zu beeinflussen. Dank dieser Signalkette ist *H. salinarum* in der Lage, seine Position stets im Bereich vorteilhafter Umweltbedingungen zu halten [106].

Zur Zeit kennt man nur zwei Organismen, die eine phosphatgerichtete Chemotaxis aufweisen. Dabei handelt es sich um *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter cloacae* [59, 71]. *P. aeruginosa* besitzt dazu zwei verschiedene Phosphatsensoren, von denen CtpH konstitutiv transkribiert und CtpL unter Phosphatmangel induziert wird [151]. Für beide Bakterien stellt Phosphat jedoch erst in einem Phosphatmangelzustand ein Attraktant dar.

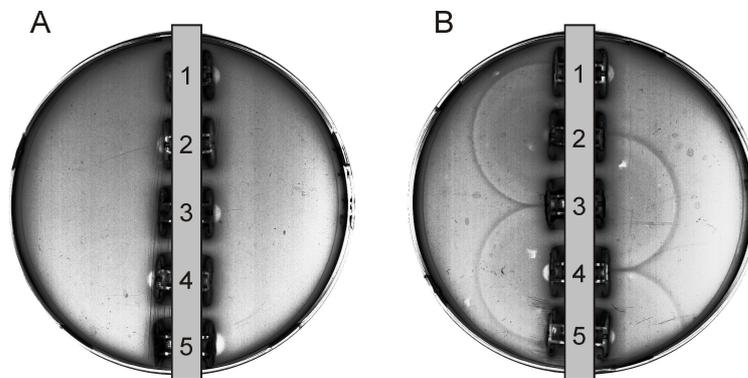


**Abbildung 3.31:** Schematische Darstellung des CIC-Tests. Gezeigt ist die Seitenansicht einer Petrischale mit angebohrter und eingeklebter Küvette.

Für die Untersuchung der phosphatgerichteten Chemotaxis von *H. salinarum* kam der sogenannte CIC-Test zum Einsatz. CIC steht dabei für „Chemical in cuvette“. Dieser Test stellt eine bisher unveröffentlichte Weiterentwicklung des „Chemical in plug“-Tests [140] durch M. Koch (MPI für Biochemie, Abt. Membranbiochemie) dar. Die seitlich angebohrten und mit Agar abgedichteten Küvetten befinden sich in der Mitte einer Petrischale. Um die mit Chemikalien befüllten Küvetten herum (fünf Stück pro Petrischale) gießt man 0,25%igen Agar in HEPES-gepuffertem Basalsalz (BSH), der Zellen der Dichte  $OD_{600}=1$  (Abbildung 3.31) enthält. Nach Erstarren des abgekühlten Agars, lässt sich die chemotaktische Wirkung der untersuchten Chemikalien per Auge beobachten

und mit einem handelsüblichen Durchlichtscanner dokumentieren [128].

Zunächst wurde getestet, ob *H. salinarum* bei ausreichender Phosphatversorgung chemotaktisch auf Phosphate reagiert. Zellen, welche in synthetischem Medium mit 2mM Phosphatgehalt heranwuchsen, zeigten auf die phosphathaltigen Substanzen Natriumphosphat ( $\text{NaP}_i$ ), Glycerin-3-phosphat (Gly3P), Glucose-1-phosphat (Glc1P) sowie Glucose-6-phosphat (Glc6P) keinerlei Reaktion (Abbildung 3.32A). Man sieht hier eine von unten gescannte, wie in Abbildung 3.31 präparierte Petrischale. Alle auf diese Weise visualisierten CIC-Tests wurden in Corel PhotoPaint mit der Funktion „Tonbalance“ behandelt, was der Kontrastierung der Schwarmringe diente.

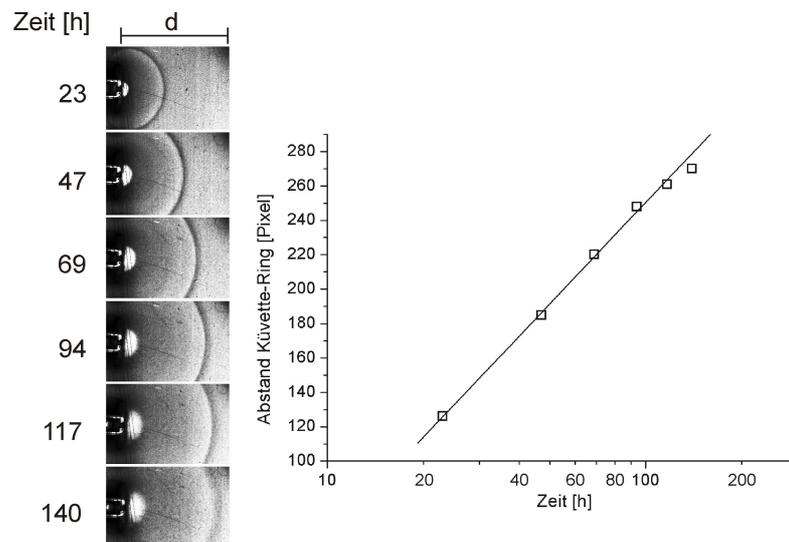


**Abbildung 3.32:** Chemotaktische Wirkung von Phosphat auf *H. salinarum*-Zellen im CIC-Test. A: in phosphathaltigem Medium (2mM) gewachsene Zellen. B: 24h in phosphatfreiem Medium gehungerte Zellen. In den Küvetten befanden sich BSH (1) bzw. jeweils 26mM  $\text{NaP}_i$  (2), Glycerin-3-phosphat (3), Glucose-1-phosphat (4) und Glucose-6-phosphat (5). Beide CIC-Tests wurden 71h nach der Präparation mit einem Durchlichtscanner eingelesen.

Im Gegensatz zu den hinreichend mit Phosphat versorgten Zellen zeigen solche, die 24h in phosphatfreiem Medium hungerten, im CIC-Test gegen die gleichen Substanzen eine deutliche Reaktion (Abbildung 3.32B). Hieraus folgt, dass *H. salinarum* eine durch Phosphatmangel induzierte Phosphattaxis besitzt.

Außergewöhnlich ist auch der Phänotyp der Phosphattaxis. Die Schwarmringe wandern nicht zur Küvettenöffnung hin, wie beispielsweise im Falle von Leucin, sondern von der Öffnung weg, bis sie am Rand der Petrischale wieder verschwinden (Abbildung 3.33). Die Zellen flüchten jedoch nicht vor dem auf sie zurollenden Phosphatgradienten. Dies würde sich in einer deutlichen Verringerung der Zelldichte innerhalb der Schwarmringe äußern, was jedoch nicht beobachtet werden konnte.

Um das Wanderungsphänomen genauer zu untersuchen, wurde die Ausbreitung des

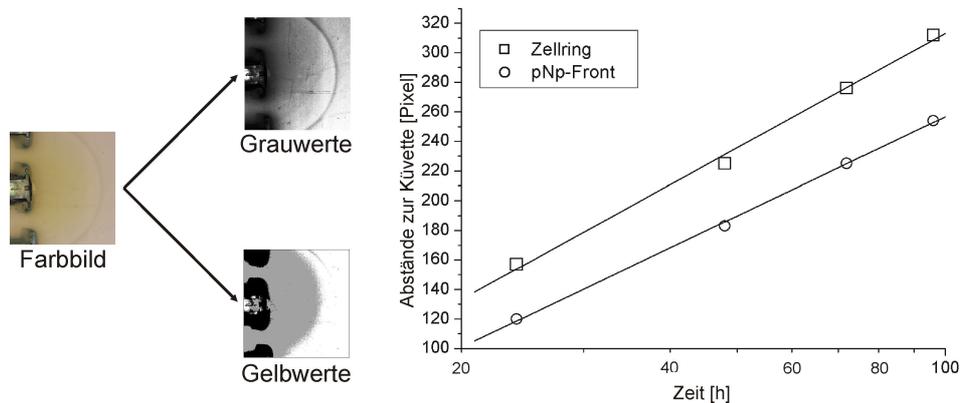


**Abbildung 3.33:** Detaildarstellung des zeitlichen Verlaufs der chemotaktischen Reaktion auf 14mM Natriumphosphat.

Phosphatgradienten während des Beobachtungszeitraums mit Hilfe der Substanz para-Nitrophenylphosphat (pNpp) sichtbar gemacht. Das Enzym Alkalische Phosphatase, welches die Zellen während des CIC-Tests aufgrund des Phosphatmangels sekretieren, zersetzt das pNpp in anorganisches Phosphat und p-Nitrophenol (pNp). Die anionische Form von pNp besitzt eine intensiv gelbe Farbe (Absorptionsmaximum bei 405nm).

Die als Farbbild gescannte Petrischale (Ausschnitt links in Abb. 3.34) diente als Vorlage für folgende *in silico* Operationen: (i) Umrechnen in ein Grauwertbild mit nachfolgender Kontrastverstärkung durch „Tonbalance“ und (ii) Extraktion des Gelbanteils durch die Funktion „Transform-Abstufen (Parameter:2)“, Umrechnung in Grauwerte und Kontrastierung mit „Tonbalance“ (alle Operationen wurden mit Corel PhotoPaint durchgeführt). Auf diese Weise konnten Informationen über Zelldichte und Verlauf der Phosphat-Front über einen längeren Zeitraum gesammelt werden. Aus dem Diagramm in Abbildung 3.34 geht hervor, dass sich der Ring aus Zellen stets in gleichem Abstand zur fortschreitenden pNp-Front und damit zum fortschreitenden Phosphatgradienten befindet. Dies erklärt auch die nichtlineare Ausbreitungsgeschwindigkeit der Zellringe (siehe Abb. 3.33).

Als nächstes lag es nahe, die Absorption des p-Nitrophenolats quantitativ zu bestimmen. Diese Information ermöglicht es, den Konzentrationsbereich zu berechnen, innerhalb dessen die *H. salinarum*-Zellen mit einer chemotaktischen Reaktion auf Phosphat

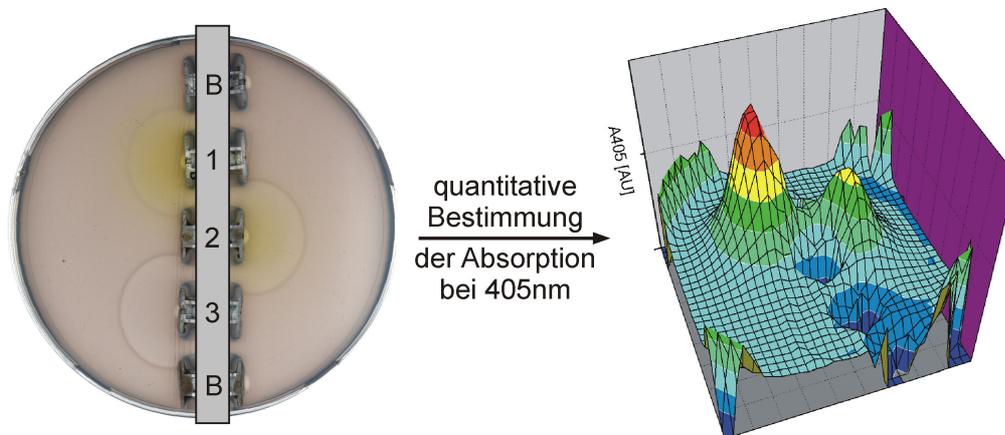


**Abbildung 3.34:** Beschreibung des Phänotyps der Phosphattaxis. Die beobachtete Küvette enthielt 20mM  $\text{NaP}_i$  und 20mM  $\text{pNpp}$ .

reagieren. Dazu wurde die Petrischale (Abbildung 3.35 links) in ein Mikrotiterplatten (MTP)-Lesegerät überführt, was die Entfernung der eingeklebten Küvetten erforderte. Die Aufgabe des Geräts bestand darin, die Absorptionen einer MTP mit 1536 Vertiefungen bei 405nm zu bestimmen. Daraus resultiert die dreidimensionale Absorptionslandschaft des CIC-Tests rechts in Abbildung 3.35, welche ca. 1000 Bildpunkte besitzt und deren dritte Dimension der Absorptionsstärke entspricht. An den Stellen, wo die Küvetten herausgebrochen und mit ihnen ein wenig Agar entfernt wurde, sinkt die  $A_{405}$  auf ein Minimum ab. Daher konnten die  $\text{pNp}$ -Gradienten auch nicht bis unmittelbar vor die Küvettenöffnung verfolgt werden.

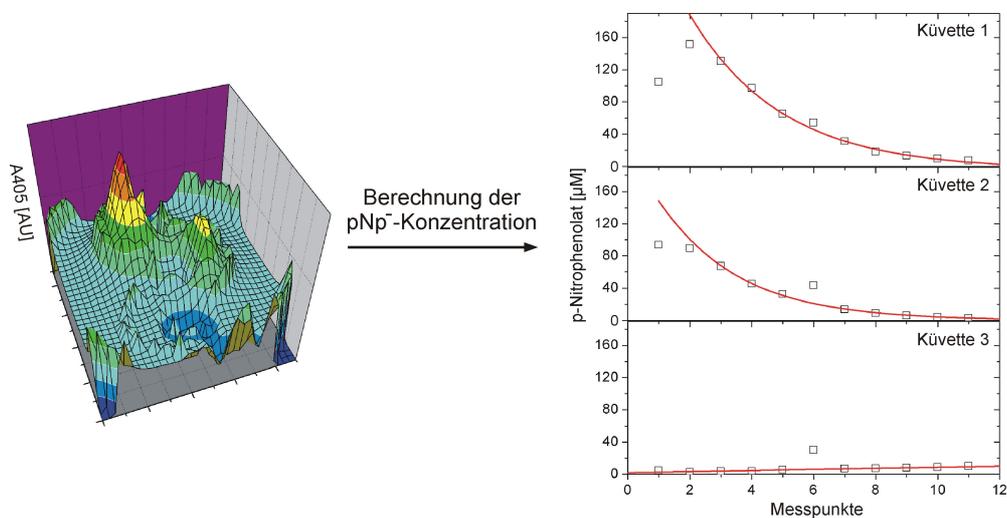
Die Küvetten 1 bis 3 des CIC-Tests in Abbildung 3.35 enthielten 20mM  $\text{pNpp}$  (1), je 10mM  $\text{pNpp}$  und  $\text{NaP}_i$  (2) sowie 20mM  $\text{NaP}_i$  (3). Besitzen  $\text{P}_i$  und  $\text{pNpp}$  ähnliche Diffusionskoeffizienten, sollte die Sekretion von Alkalischer Phosphatase aus den im Agar verteilten Zellen an allen drei Küvetten im Laufe der Diffusion sich gleichschnell ausbreitende Phosphatgradienten erzeugen. Und in der Tat entfernen sich die drei Zellringe mit gleicher Geschwindigkeit von den Küvetten (sichtbar durch den gleichen Abstand der drei Zellringe zu den Küvettenöffnungen in Abb. 3.35).

In der Absorptionslandschaft in Abbildung 3.35 sind die Zellringe nur sehr schlecht zu erkennen. Aus diesem Grund war es erforderlich, sie mit einem schwarzen Stift nachzuzeichnen und die CIC-Platte erneut einzulesen. Das Ergebnis liefert Abbildung 3.36. Folgt man nun dem Verlauf der  $\text{pNp}$ -Gradienten von dem Bereich vor der Küvette bis zum Plattenrand, so ergeben sich die in Abbildung 3.36 rechts dargestellten Kurven. Diese weisen auch den für Diffusionsprozesse typischen exponentiellen Abfall auf. Die



**Abbildung 3.35:** Quantitative Bestimmung der pNp-Absorptionen. Füllungen der Küvetten: B: BSH, 1: 20mM pNpp, 2: je 10mM pNpp und  $\text{NaP}_i$ , 3: 20mM  $\text{NaP}_i$ . Die CIC-Platte wurde nach 46h Inkubationszeit gescannt und anschließend in einem MTP-Lesegerät vermessen.

Berechnung der pNp-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe von Gleichung 3.1 und den angegebenen Parametern. Die roten Regressionskurven in Abbildung 3.36 wurden auf Basis folgender Annahmen mit dem Programm Origin berechnet: exponentieller Abfall 1. Ordnung (Küvetten 1,2) bzw. linearer Verlauf (Küvette 3).



**Abbildung 3.36:** Bestimmung der pNp-Konzentrationen an den Zellringen. Die Vermessung der links dargestellten Absorptionslandschaft erfolgte nach dem Einzeichnen der Zellringe. Die rechts gezeigten Kurven wurden aus dem Verlauf der  $A_{405}$  vor den Küvetten in Richtung Plattenrand berechnet. Der Abstand der Messpunkte beträgt gerätebedingt 0,25cm. Die Bezeichnungen „Küvette 1-3“ entsprechen der Nummerierung der Küvetten in Abbildung 3.35.

$$\text{p-Nitrophenolat } [\mu\text{M}] = \frac{A_{405} - A_{405}(\text{Hintergrund})}{\epsilon_{\text{pNp}} [\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] \cdot \text{Schichtdicke } [\text{cm}]} \quad (3.1)$$

$$\begin{aligned}
A_{405}(\text{Hintergrund}) &= 0,47 \\
\varepsilon_{\text{pNp}} &= 0,0183 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \\
\text{Schichtdicke} &= 0,45 \text{ cm}
\end{aligned}$$

Die p-Nitrophenolatkonzentration, bei der sich die Zellringe befinden, beträgt nach obiger Rechnung  $46\mu\text{M}$  für Küvette 1 (20mM pNpp) und  $21\mu\text{M}$  für Küvette 2 (je 10mM pNpp und  $\text{NaP}_i$ ). Diese Werte passen sehr gut zueinander, wenn man bedenkt, dass der pNp-Wert für Küvette 2 (Kü2) nur halb so hoch sein sollte wie für Küvette 1 (Kü1), da in Kü2 die Hälfte der pNpp-Menge durch  $\text{NaP}_i$  ersetzt wurde.

Doch Gleichung 3.1 erfasst nur die Konzentration des gelben, anionischen para-Nitrophenolats. Kennt man den pH-Wert der Messlösung, so lässt sich leicht die Konzentration des farblosen nichtionischen p-Nitrophenols nach Henderson und Hasselbalch berechnen (Gleichung 3.2).

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\text{B}^-}{\text{HB}} \quad (3.2)$$

$$\text{pK}_a (\text{pNp}) = 7,15$$

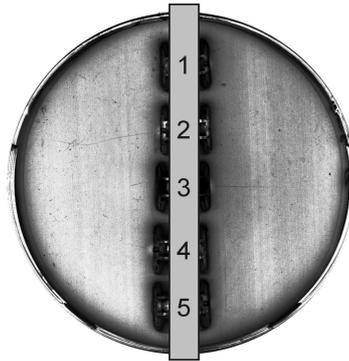
$$\text{pH} (\text{BSH}) = 6,8$$

$$[\text{p-Nitrophenolat}] = 45,5 \mu\text{M} (\text{Kü1}) \text{ bzw. } 20,8 \mu\text{M} (\text{Kü2})$$

Für die gegebenen Parameter ergibt sich eine Konzentration des farblosen p-Nitrophenols von  $102\mu\text{M}$  (Kü1) bzw.  $47\mu\text{M}$  (Kü2). Die Summe der sauren und basischen Form von p-Nitrophenol ist äquivalent zu der Konzentration des bei der Spaltung freigesetzten Phosphats, welche an der Position der Zellringe  $147\mu\text{M}$  (Kü1) bzw.  $67\mu\text{M}$  (Kü2) beträgt. Für die Berechnung der Gesamt- $\text{P}_i$ -Konzentration vor Küvette 2 war der Messwert aufgrund des äquimolar eingesetzten  $\text{NaP}_i$  zu verdoppeln. Anhand dieser Berechnungen konnte festgestellt werden, dass Phosphathunger leidende *H. salinarum*-Zellen im CIC-Test auf Phosphatkonzentrationen bis ca.  $140\mu\text{M}$  ( $\pm 30\mu\text{M}$  für Fehler bei der Messung des pH-Werts und der  $A_{405}$ ) mit einer gerichteten Bewegung reagieren.

Die bislang ungeklärte Frage, ob das Zwei-Komponenten System CheA-CheY die phosphatgerichtete Chemotaxis vermittelt, beantwortete die Untersuchung des Stammes *H. salinarum* Flx15  $\Delta\text{cheY}$ . Aus Abbildung 3.37 geht hervor, dass diese Mutante keinerlei

Phosphattaxis mehr zeigt. Erwartungsgemäß bleibt hier auch die anziehende Wirkung der Positivkontrolle Leucin (Küvette 1) aus. Dieses Experiment belegt, dass die Signaltransduktion von einem nicht näher spezifizierten Sensor zu dem Flagellarmotor von CheA-CheY abhängt.

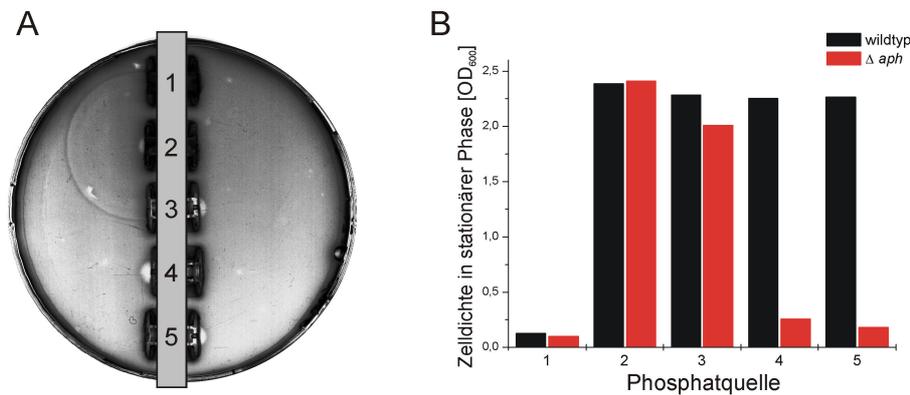


**Abbildung 3.37:** Chemotaktische Reaktion von *H. salinarum* Flx15  $\Delta cheY$  auf Phosphate im CIC-Test. Die Zellen wurden 24h in phosphatfreiem Medium gehungert. In den Küvetten befanden sich jeweils 10mM Leucin (1),  $NaP_i$  (2), Glycerin-3-phosphat (3), Glucose-1-phosphat (4) und Glucose-6-phosphat (5). Die Aufnahme des Bildes erfolgte nach 45h Inkubationszeit.

Eine weitere in diesem Zusammenhang zu stellende Frage lautet: erfolgt die Phosphattaxis von *H. salinarum* in Reaktion auf extrazellulär vorliegende phosphathaltige Chemikalien und wenn ja auf welche? Oder wird das Signal möglicherweise intrazellulär gemessen? Ein Beispiel für eine solche metabolische Detektion ist der cytoplasmatische Htr Car, welcher die Arginintaxis von *H. salinarum* steuert [128].

Dieser Fragestellung wurde unter Verwendung des Deletionstamms *H. salinarum* R1  $\Delta aph$  auf den Grund gegangen. Wachstumsexperimente zeigten, dass dieser Stamm in synthetischem Medium lediglich mit anorganischem Phosphat und mit Glycerin-3-phosphat als Phosphatquelle wächst (Abbildung 3.38B). Daraus lassen sich zwei Fakten ableiten: (1) aufgrund der fehlenden Phosphataseaktivität kann dieser Stamm keine Organophosphate spalten und das freiwerdende  $P_i$  über Phosphattransporter aufnehmen, (2) einzige Ausnahme ist Gly3P, wofür im Gegensatz zu Glc1P und Glc6P ein Aufnahmesystem zu existieren scheint (wahrscheinlich der ABC-Transportkomplex Ugp, siehe Tabelle 3.4 auf Seite 29).

Untersucht man die chemotaktischen Reaktionen von phosphatgehungerten  $\Delta aph$ -Zellen im CIC-Test, so ergibt sich ein interessantes Muster (Abbildung 3.38A). Die aus dem Wildtyp bekannten, nach aussen wandernden Ringe zeigen sich nur noch in Re-



**Abbildung 3.38:** Chemotaktische Reaktion von *H. salinarum* R1  $\Delta aph$  gegen bzw. dessen Wachstum auf verschiedenen Phosphatquellen. A: Die Zellen hungerten 24h in phosphatfreiem Medium, das Bild der CIC-Platte entstand nach 71h Inkubationszeit. B: Wachstum von *H. salinarum* R1  $\Delta aph$  auf verschiedenen Phosphatquellen. Verwendete Chemikalien: kein Phosphat (1), jeweils 26mM (CIC-Test) bzw. 2mM (Wachstumstest)  $\text{NaP}_i$  (2), Glycerin-3-phosphat (3), Glucose-1-phosphat (4) und Glucose-6-phosphat (5).

aktion auf  $\text{NaP}_i$ . Nachweislich aufnehmbares Glycerin-3-phosphat verursacht hingegen keine Ringbildung.

Gleichzeitig wurden auch die Veränderungen des Phosphatgehalts von wildtyp- und  $\Delta aph$ -Zellen bei Gabe von 1mM  $\text{NaP}_i$ , Gly3P bzw. Glc6P in Basalsalz verfolgt. Aus Tabelle 3.9 geht hervor, dass  $\text{NaP}_i$  in beiden Stämmen zu einem starken Anstieg des zellulären Phosphatgehaltes auf 170-180mM führt. Nach Zugabe von Gly3P und Glc6P zeigten sich allerdings erhebliche Unterschiede bei den intrazellulären Phosphatgehalten zwischen Wildtyp- und Deletionsstamm. Der Wildtyp ist, vermutlich aufgrund der Wirkung der Alkalischen Phosphatase, in Anwesenheit beider Organophosphate zu einer signifikanten Erhöhung von  $[\text{P}_{\text{intra}}]$  auf ca. 90mM fähig. Dies erreicht er vermutlich, indem er diese Stoffe extrazellulär spaltet und das erzeugte anorganische Phosphat importiert.

Im Gegensatz dazu erhöht sich der intrazelluläre  $\text{P}_i$ -Gehalt im Deletionsstamm mit Gly3P und Glc6P nur auf 22mM bzw. 17mM. Daraus folgt, dass ein  $\Delta aph$ -Stamm zwar Gly3P importiert und verstoffwechselt (Wachstum siehe Abb. 3.38B), es jedoch intrazellulär nicht quantitativ in  $\text{P}_i$  umsetzt. Der leichte  $[\text{P}_{\text{intra}}]$ -Anstieg bei Zugabe von Glc6P irritiert ein wenig, da die Wachstumstests die fehlende Aufnahmefähigkeit dieses Organophosphats attestierten. Während der Phosphataufnahmetests in Basalsalz war eine geringe Abnahme der Zelldichte nach 24h Inkubationszeit zu beobachten. Vielleicht

liefert diese Beobachtung, die eine begrenzte Zelllyse indiziert, eine Erklärung für den leichten Anstieg des intrazellulären  $P_i$  im Deletionsstamm bei Anwesenheit von Glc6P. Trotz allem bleiben die gemessenen Konzentrationen weit unter dem Niveau vor dem Hungerstress (ca. 40mM).

Phosphatquelle	[ $P_{\text{intra}}$ ] [mM]	
	R1 wildtyp	R1 $\Delta aph$
1mM $\text{NaP}_i$	171,8 $\pm$ 86,3	180,2 $\pm$ 41,5
1mM Gly3P	94,0 $\pm$ 41,3	21,7 $\pm$ 9,0
1mM Glc6P	89,7 $\pm$ 46,9	16,9 $\pm$ 11,9

**Tabelle 3.9:** Höhe der intrazellulären Phosphatkonzentration ( $[P_{\text{intra}}]$ ) von *H. salinarum*-Kulturen nach 24h in Basalsalz mit verschiedenen Phosphatquellen (je 1mM) im Anschluss an eine 24stündige Phosphathungerphase. Die Daten beruhen auf mindestens 3 unabhängigen Messungen.  $\Delta aph$ : Deletion des Gens *aph* (OE5192R),  $\text{NaP}_i$ : Natriumphosphat, Gly3P: Glycerin-3-phosphat, Glc6P: Glucose-6-phosphat.

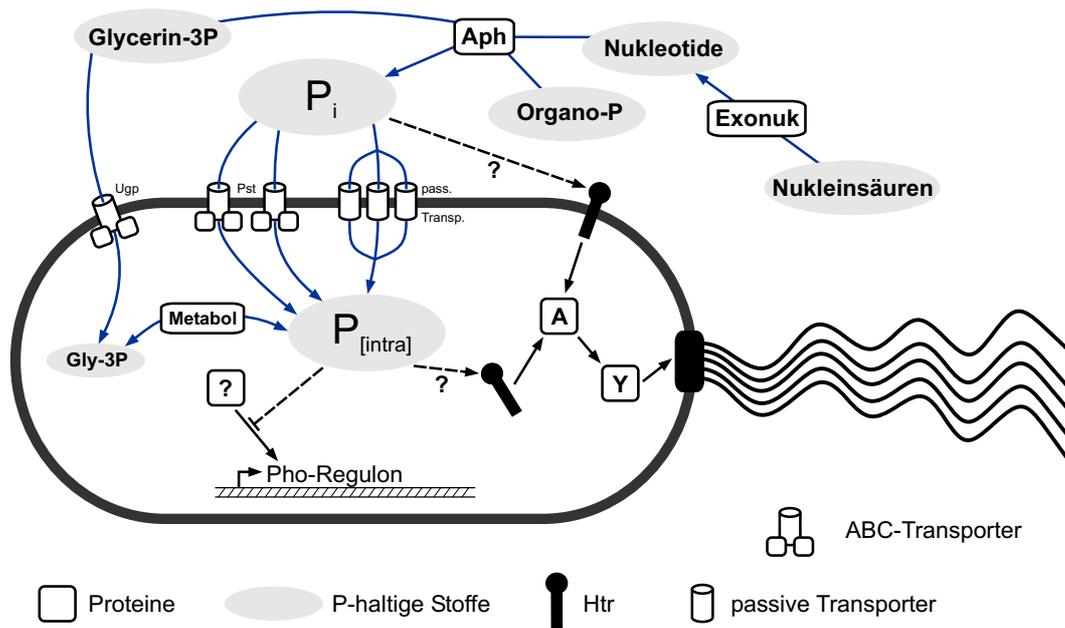
Die experimentellen Daten zur Bestimmung des Taxisstimulus sind folglich nicht eindeutig interpretierbar. Möglicherweise dient extrazellulär vorliegendes  $P_i$  als Attraktant der Phosphattaxis ( $\Delta aph$ -Zellen zeigen keine Ringe gegen Organophosphate, die sie nicht spalten können). Vielleicht überwacht *H. salinarum* aber auch den intrazellulären Phosphatspeicher ( $\Delta aph$ -Zellen zeigen keinen Ring gegen Gly3P, welches sie zwar aufnehmen aber nicht in  $P_i$  umwandeln). Gegenwärtig erfolgt die Untersuchung von Deletionsmutanten [63] der 18 halobakteriellen Taxissensoren. Dies gestaltet sich jedoch nicht einfach, da die Deletionsmutanten zum Teil geringe Motilitäten besitzen.

### 3.2.10 Zusammenfassung des phosphatabhängigen Verhaltens

Bei der Untersuchung phosphatabhängiger Vorgänge in *H. salinarum*-Zellen konnten verschiedene Prozesse aufgeklärt werden. Am Beginn der Untersuchungen stand die Bestimmung, bei welchem Nährstoffangebot der Organismus in Phosphatmangel gerät. Die Experimente ergaben, dass Medien mit weniger als 0,5mM Phosphatgehalt die finale Wachstumsdichte begrenzen. Die mangelhafte Phosphatversorgung induziert das Gen *aph*. Dies führt zu verstärkter Produktion und Sekretion des Enzyms Alkalische Phosphatase.

Aufgrund der phosphatabhängigen Regulation dieses Gens wurden weiterführende Mikroarray-Analysen und RT-qPCR-Experimente durchgeführt. Diese deckten auf, dass

ein Großteil der Gene mit für die Phosphataufnahme relevanten Funktionen eine von der Phosphatversorgung abhängige Expression zeigt. Die Gene dieses sogenannten Pho-Regulons kodieren für die ABC-Transportsysteme Ugp, Pst1 und Pst2, für die Enzyme Alkalische Phosphatase und zwei Exonukleasen sowie mehrere PhoU-Homologe, deren Funktion unklar bleibt (Abbildung 3.39).



**Abbildung 3.39:** Zusammenfassung des phosphatabhängigen Verhaltens. Blaue Pfeile symbolisieren Stoffflüsse und schwarze Pfeile symbolisieren Signalwege. Gestrichelte, von  $P_i$  und  $P_{[intra]}$  ausgehende gestrichelte Linien deuten hemmende (Querbalken) bzw. aktivierende (Pfeile) Wirkungen der P-Vorräte an. Aph: Alkalische Phosphatase, Exonuk: Exonukleasen, Metabol: nicht näher spezifizierter Kinasen/Phosphatase-Reaktionen, A, Y: CheA, CheY,  $P_i$ : anorganisches Phosphat,  $P_{[intra]}$ : intrazelluläres  $P_i$ , Organo-P: Organophosphate, Gly-3P: Glycerin-3-phosphat, ?: unbekanntes Regulatorprotein.

Darüber hinaus veränderte sich jedoch auch die Transkription einer Vielzahl weiterer Gene. Bei diesen Änderungen handelt es sich wahrscheinlich um sekundäre Effekte, die auf den einsetzenden Wachstumsstillstand während des Experiments zurückzuführen sind. So erhöhen sich die Transkriptmengen von Genen zur aktiven Lageveränderung (*fla*-Cluster, *htr*-Gene). Die mRNA-Mengen von Genen der Atmungskette hingegen vermindern sich ebenso wie die der Gene für ribosomale Proteine.

Zusammenfassend betrachtet, reagiert *H. salinarum* auf eine Phosphatmangel-Situation mit der Expression des Pho-Regulons und einem Wachstumsstopp. Dieser wird begleitet von einer Verringerung der Atmungsaktivität, dem vermehrten Abbau von Arginin zu ATP, Ornithin und Carbamat und der Erhaltung des Membranpotentials

mit Hilfe von Bacteriorhodopsin.

Während der Hungerphase verbraucht *H. salinarum* ca. 75% seines intrazellulären Phosphatspeichers. Die massive Abnahme des  $P_i$ -Vorrats ist nicht nur eine Folge der Mangelversorgung, sondern gleichzeitig verantwortlich für die Induktion des Pho-Regulons (Abbildung 3.39). Das zuständige Regulatorprotein konnte bislang nicht enttarnt werden. Aufgrund der vorliegenden Daten kommen ZKS allerdings nicht in Frage. Dieser Befund steht im Gegensatz zu allen anderen daraufhin untersuchten prokaryotischen Pho-Regulons.

Von der Anpassung des Proteininventars abgesehen orientieren *H. salinarum*-Zellen auch ihre Bewegungen an einem Phosphatgradienten. Diese Chemotaxis wird durch Phosphatmangel induziert und durch das Zwei-Komponenten System CheA-CheY vermittelt. Der adäquate Reiz jedoch bleibt verborgen. Die durchgeführten Experimente schließen keine der beiden Regelgrößen „intrazellulärer Phosphatvorrat“ bzw. „extrazelluläre Phosphatkonzentration“ aus (Abbildung 3.39).

### 3.3 Die PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R

Der zweite Abschnitt der experimentellen Arbeit bezog sich auf die Untersuchung von PAS-Domänen in Sensorbereichen der halobakteriellen Histidinkinasen. Die Bezeichnung PAS ist ein Akronym aus den Namen von drei Proteinen (Per, ARNT und Sim), in denen diese Faltung zuerst gefunden wurde.

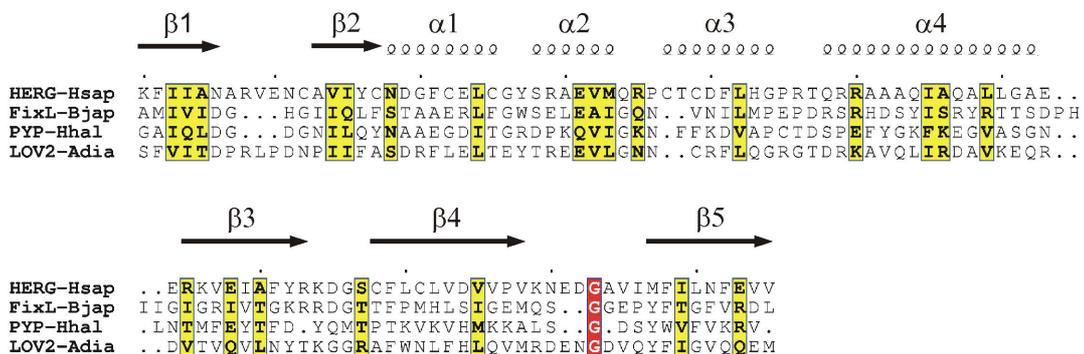
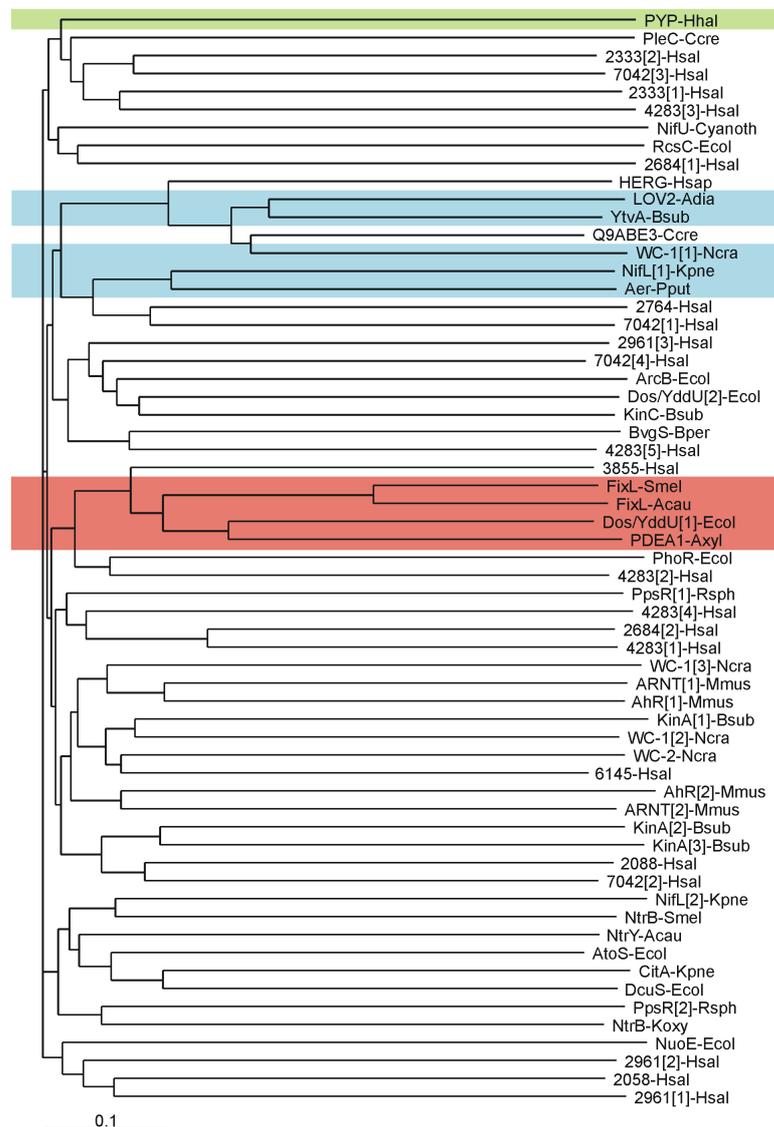


Abbildung 3.40: Sequenzvergleich von PAS-Domänen mit bekannter Raumstruktur.

Die Sekundärstruktur aller bekannten PAS-Domänen besteht aus vier  $\alpha$ -Helices und fünf  $\beta$ -Strängen, welche ein kompaktes Gebilde formen (Abbildung 3.40 sowie Abbildung

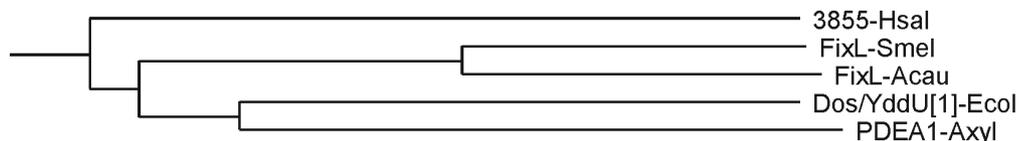
3.5 auf S. 21). PAS-Domänen sind relativ weit verbreitet (5402 Einträge in SMART), sie dienen als Sensoren und Dimerisierungsflächen [132]. Die verarbeiteten Signale reichen von elektrischen Spannungen und Redoxpotentialen über Licht bis hin zu Sauerstoff. Je nach Funktion beherbergen einige PAS-Domänen bestimmte Kofaktoren, z.B. 4-OH-Zimtsäure, Flavine oder Häm. Die überwiegende Zahl der Domänen jedoch erfüllt ihre Aufgabe ohne Kofaktoren.



**Abbildung 3.41:** Phylogenetische Analyse von 21 halobakteriellen und 40 bakteriellen bzw. eukaryotischen PAS-Domänen. Domänen mit bekannten Kofaktoren wurden farblich hervorgehoben. Grün: 4-OH-Zimtsäure, Blau: FMN/FAD, Rot: Häm. Bei Proteinen mit mehreren PAS-Domänen sind diese vom N-Terminus beginnend nummeriert (Zahl in den eckigen Klammern). Die Namen der Organismen, welche sich hinter den Vierbuchstaben-Abkürzungen verbergen, sind im Anhang unter 7.2 auf S. 142 nachzuschlagen.

Das Proteom von *H. salinarum* enthält 29 PAS-Domänen, wovon 21 in Sensorbereichen von Histidinkinasen liegen (vgl. Tab. 3.3, S. 20). Da man nur schwer die PAS-Domänen aller Histidinkinasen auf einmal untersuchen kann, wurden mittels einer phylogenetischen Analyse interessante Kandidaten herausgepickt. Anhand der mit SSSPro [100] berechneten Sekundärstrukturen erfolgte die Bestimmung der Kernbereiche der einzelnen PAS-Domänen. Aus diesen Kernbereichen ( $2\beta$ - $4\alpha$ - $3\beta$ ) der halobakteriellen sowie 40 weiterer PAS-Domänen aus Eukaryoten und Bakterien berechnete die Software ClustalX nach der Neighbour-Joining Methode von Saitou & Nei [112] den Stammbaum in Abbildung 3.41.

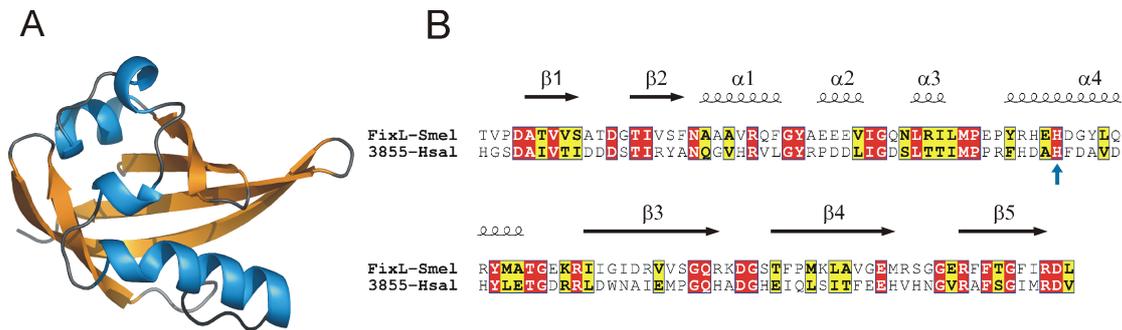
Durch das Einfärben der PAS-Domänen mit Kofaktoren, fallen deren große Sequenzähnlichkeiten untereinander sofort auf. Bei näherer Betrachtung erregte die PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R (PAS3855) die Aufmerksamkeit des Experimentators. Diese befand sich von allen halobakteriellen Domänen am nächsten zu der Gruppe der Häm bindenden PAS-Domänen (Abbildung 3.42), was auch zu dem Ergebnis aus Tabelle 3.2 (S. 18) passt. Darüber hinaus bildet OE3855R zusammen mit dem Antwortregulator OE3854R ein bicistronisches Operon, womit dieses HK/RR-Paar mit hoher Wahrscheinlichkeit ein funktionelles Zwei-Komponenten System (ZKS) darstellt.



**Abbildung 3.42:** Ausschnitt des phylogenetischen Baums in Abb. 3.41. Dargestellt sind alle PAS-Domänen mit nachgewiesener Hämbindung und die am nächsten verwandte halobakterielle PAS-Domäne.

Mit Hilfe der Kristallstruktur der Häm-PAS-Domäne des Sauerstoffsensors FixL aus *Sinorhizobium meliloti* (Struktur 1EW0) konnte mit SwissModel [118] ein dreidimensionales Abbild von PAS3855 errechnet werden (Abbildung 3.43A). Der direkte Sequenzvergleich mit *S. meliloti* FixL belegt, dass der zur Hämbindung essentielle Histidinrest auch in PAS3855 vorliegt (Abbildung 3.43B).

Aus diesem Anfangsverdacht heraus wurde versucht, einen experimentellen Beweis für die Häm bindenden Eigenschaften von PAS3855 zu erbringen. Bei einem Gelingen spräche einiges dafür, dass das Zwei-Komponenten System OE3855R-OE3854R, vergleichbar mit FixL/FixJ in *S. meliloti*, bestimmte Gene in Abhängigkeit von Sauerstoff



**Abbildung 3.43:** Bioinformatische Informationen zu der PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R. A: Modellierter 3D-Struktur von PAS3855. B: Sequenzvergleich und Sekundärstruktur der PAS-Domänen von FixL und OE3855R. Das proximale Histidin, welches den Häm-Kofaktor festhält, ist mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet.

reguliert. Unter anaeroben Bedingungen phosphoryliert sich die Histidinkinase FixL zunächst selbst, um den Phosphatrest an ihren Antwortregulator FixJ weiterzugeben. Phosphoryliertes FixJ aktiviert sodann die Transkription von Genen, die für eine hoch-affine  $O_2$ -abhängige Terminale Oxidase und Proteine zur Stickstofffixierung kodieren. Diese Signalkette wird durch Sauerstoffbindung an den Häm-Kofaktor von FixL lahmgelegt, weil oxy-FixL keine Kinaseaktivität mehr aufweist [32].

### 3.3.1 Heterologe Expression von PAS3855 in *E. coli*

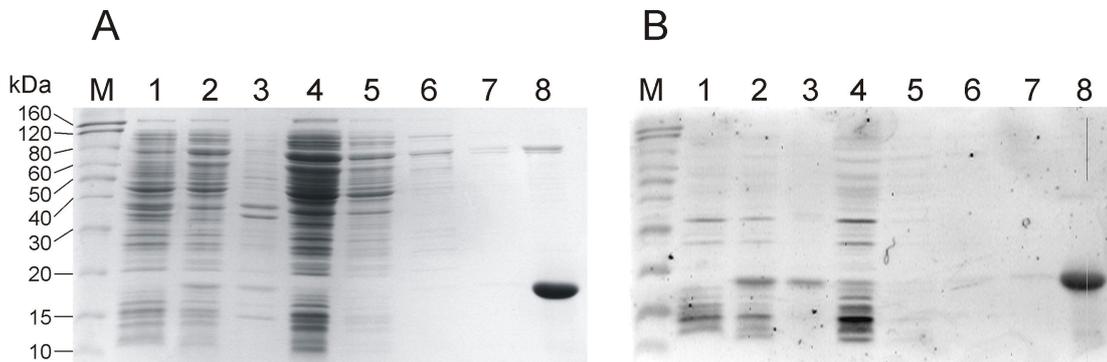
Zur genaueren Charakterisierung der Bindungseigenschaften von PAS3855 erfolgte dessen heterologe Expression in *E. coli* M15 pREP4. Das auf Basis des Expressionvektors pQE30 hergestellte Konstrukt umfasste die Aminosäuren 5 bis 150 des Proteins OE3855R (Abbildung 3.44). Dieser Bereich entspricht der PAS-Domäne plus jeweils 10 Aminosäuren N- bzw. C-terminal davon. Auf S. 19 wurde bereits erklärt, dass SMART die physiologische Proteindomäne „PAS“ in die zwei bioinformatisch erfassbaren Bereiche PAS und PAC unterteilt. Im vorliegenden Fall waren dem Programm die Anhaltspunkte für ein Vorhandensein der drei  $\beta$ -Faltblätter, die dem PAC-Abschnitt entsprechen, wohl nicht groß genug. Bei der Konstruktion des Translationsprodukts wurde jedoch darauf geachtet, dass dieses den gesamten in Abbildung 3.43B dargestellten Aminosäurebereich enthält. Die Reinigung der exprimierten Domäne mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie erforderte noch eine Hexahistidin-Markierung, die sich am N-Terminus des Translationsproduktes befand.

Nach dem Zellaufschluss wurde die lösliche Fraktion mit einer Ni-NTA-Matrix in-



**Abbildung 3.44:** Darstellung aller Domänen der Histidinkinase OE3855R mit dem Programm SMART sowie eine schematische Darstellung des heterolog in *E. coli* exprimierten Teils des Proteins.

kubiert, worauf mehrere Waschschrte folgten. An die Elution mit 200mM Imidazol schloss sich eine Dialyse gegen Tris-Puffer mit 0,1M NaCl, 0,1M KCl und 50mM MgCl<sub>2</sub> bei neutralem pH-Wert (7,5) an. Die auf diese Weise unter nativen Bedingungen gereinigte Domäne wies eine Reinheit von 90% auf (Abbildung 3.45). Interessanterweise befand sich bei allen durchgeführten Reinigungen immer das Chaperon DnaK unter den koeluierenden Proteinen (Bande bei ca. 70kDa, per MS-Analyse identifiziert).



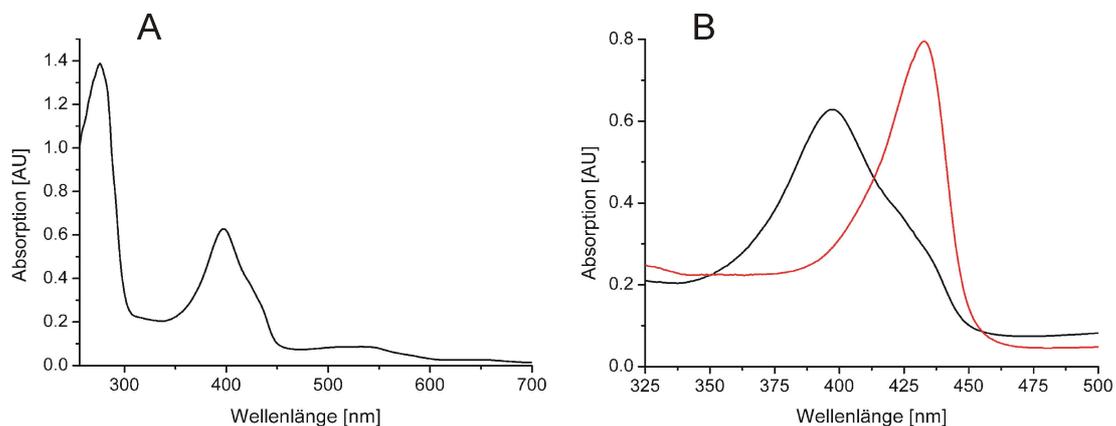
**Abbildung 3.45:** PAGE der Arbeitsschritte zur Reinigung heterolog exprimierter PAS3855. A: Coomassiefärbung. B: spezifische Färbung His-markierter Proteine (InVision His-Staining). (M) Benchmark His-tagged Proteinstandard, (1) Zellen vor Induktion, (2) Überstand der lysierten Zellen nach Induktion, (3) Pellet der lysierten Zellen nach Induktion, (4) Durchfluss der Ni-NTA-Säule, (5) Waschvorgang A, (6) Waschvorgang B, (7) Waschvorgang C, (8) Elution.

Das Absorptionsspektrum der gereinigten PAS-Domäne besitzt neben der Tryptophan- und Tyrosinabsorption noch eine Bande im sichtbaren Licht mit einem Maximum bei 397nm (Abbildung 3.46A). Dies deutete daraufhin, dass während der heterologen Expression in *E. coli* ein Kofaktor mit der PAS-Domäne assembliert. Das Verhältnis von Protein zu Kofaktor variierte jedoch bei den durchgeführten Expressionen, wobei Abbildung 3.46 ein Beispiel mit sehr hohem Kofaktoranteil zeigt.

### 3.3.2 Identifizierung des Kofaktors von PAS3855 und Rekonstitution der Holodomäne

An diesem Punkt lag die Natur des während der heterologen Expression eingebauten Kofaktors im Dunkeln. Aufgrund des Absorptionsbereiches ließ sich jedoch Häm oder ein Flavin vermuten.

Zur Unterscheidung zwischen den genannten Kandidaten wurde der Kofaktor mit Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) behandelt. Im Falle von Häm reduziert diese Prozedur das zentrale dreiwertige Eisen zu  $\text{Fe}^{2+}$ , was zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums führt. In der Tat verschob sich das Maximum durch Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  längerwellig auf 433nm (Abbildung 3.46B).



**Abbildung 3.46:** A: Absorptionsspektrum heterolog exprimierter PAS3855-Domäne. B: Verschiebung des Absorptionsmaximums von PAS3855 durch Zugabe von Natriumdithionit (rote Linie: Spektrum nach Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ).

Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Kofaktor um ein Häm handelt. Eine LC-MS-Analyse sollte nun klären, welcher der in *E. coli* vorkommenden Hämtypen sich in der PAS-Domäne befindet. Die Analyse ergab eine molare Masse des Kofaktors von  $616,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , was exakt der Molmasse von Häm<sub>B</sub> (Protoporphyrin IX) entspricht.

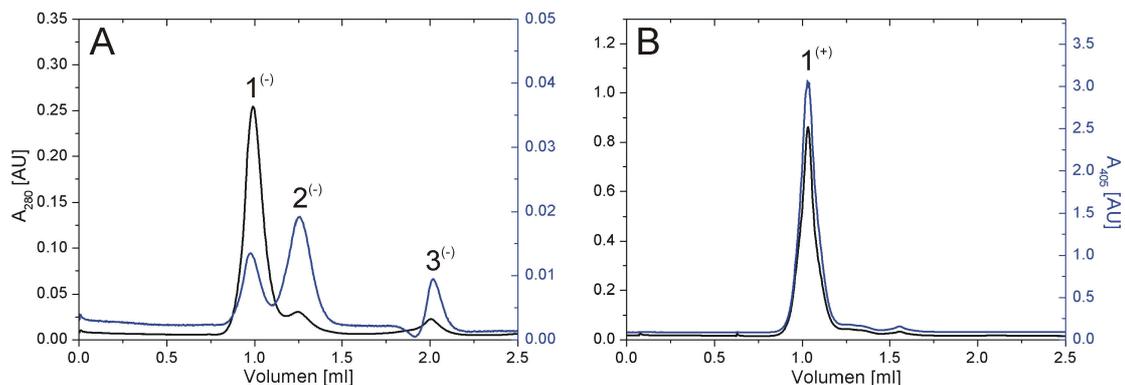
In *H. salinarum* fand man bereits B-Typ Cytochrome und ein Häm<sub>B</sub> enthaltendes Transducerprotein [46, 52]. Deshalb erfolgte die Rekonstitution der Holodomäne durch Zugabe von Hämin (Häm<sub>B</sub> mit Chlorid als Gegenion). Dazu diente eine Proteincharge, die weit weniger Häm aus der Expression in *E. coli* mitbrachte, als die in Abbildung 3.46 gezeigte. Die PAS3855-Domäne, in einem Puffer mit 0,5M NaCl, 0,5M KCl, 2mM  $\text{MgCl}_2$  und 50mM Tris/HCl pH 7,5 vorliegend, wurde zunächst mit einem mehrfachen

molaren Überschuss an Häm<sub>B</sub> inkubiert und anschließend über Nacht gegen hämfreien Puffer dialysiert.

### 3.3.3 Größenbestimmung von PAS3855 durch Gelfiltration

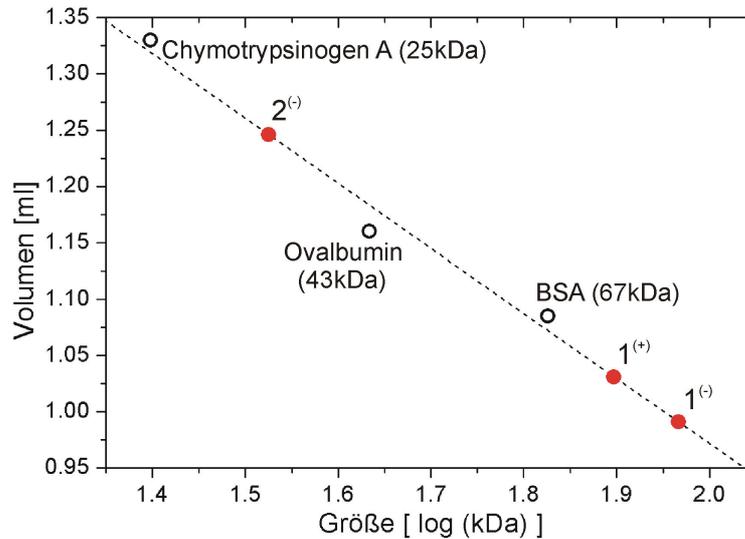
Exprimiert man halophile Proteine in einem nicht halophilen Organismus wie *E. coli*, so kann man nicht *per se* sicher sein, dass die Translationsprodukte korrekt gefaltet sind. Mitunter induziert dabei die Gegenwart eines Kofaktors die richtige Faltung [17, 29]. Um diesen Effekt zu studieren, wurden Gelfiltrationen mit PAS3855 vor und nach der Rekonstitution mit Häm<sub>B</sub> an einer Sephadex 75-Säule durchgeführt.

Die Gelfiltration der PAS-Domäne ohne Kofaktor liefert ein heterogenes Erscheinungsbild. Man findet drei Absorptionsmaxima, die von dem Protein (280nm) und dem in Spuren enthaltenen Kofaktor (405nm) stammen (Abbildung 3.47A). Der gleiche Versuch mit der rekonstituierten PAS-Domäne zeigt hingegen eine einzige Elutionsfraktion, in der sowohl die Absorption bei 280nm als auch bei 405nm maximal ist (Abbildung 3.47B). Anhand der ebenfalls analysierten Standardproteine Chymotrypsinogen A (25kDa), Ovalbumin (43kDa) und BSA (67kDa) konnten die Größen der PAS-Multimere in den einzelnen Elutionsfraktionen bestimmt werden (Abbildung 3.48).



**Abbildung 3.47:** Gelfiltration von PAS3855 an einer Sephadex 75-Säule. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 280nm (schwarze Kurven) und 405nm (blaue Kurven). A: PAS3855-Apodomäne, B: mit Häm<sub>B</sub> rekonstituierte PAS3855-Holodomäne.

Die Berechnungen ergeben Größen von 92,6 kDa (Maximum 1<sup>(-)</sup> in Abb. 3.47A) bzw. 33,5kDa (Maximum 2<sup>(-)</sup>) für die PAS-Domäne vor der Rekonstitution. Das Maximum 3<sup>(-)</sup> entspräche einer Größe von 1,6kDa, womit die Natur dieser Elutionsfraktion rätselhaft bleibt. Die Fraktionen 1<sup>(-)</sup> und 2<sup>(-)</sup> jedoch entsprechen der fünffachen (exakter



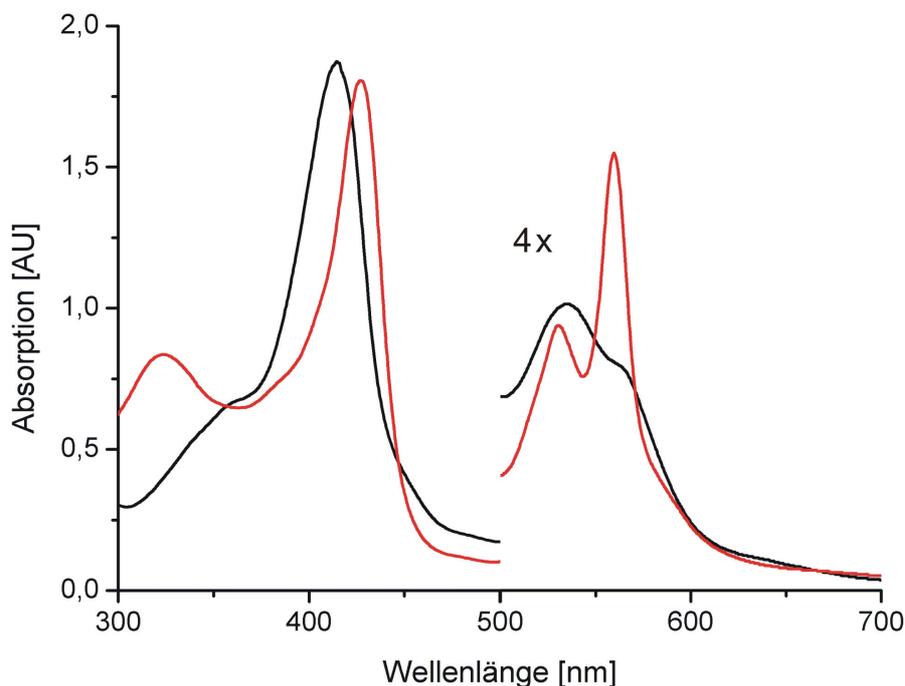
**Abbildung 3.48:** Größenbestimmung der detektierten Domänen-Multimere aus Abb. 3.47.

Faktor: 5,1) bzw. zweifachen (exakter Faktor: 1,9) Größe eines PAS-Monomers. Die Elutionsfraktion 1<sup>(+)</sup> der rekonstituierten Domäne enthält eine Proteinansammlung, die mit 78,9kDa die vierfache Größe (exakter Faktor: 4,2) einer einzelnen PAS3855-Domäne besitzt. Dies zeigt, dass PAS3855 nach Zugabe von Häm<sub>B</sub> in einen geordneten Zustand übergeht, der zur Bildung eines Tetramers aus Häm-PAS3855-Domänen führt.

### 3.3.4 Optische Eigenschaften der PAS3855-Holodomäne

Eine absorptionsspektroskopische Untersuchung sollte die Wechselwirkungen zwischen dem Kofaktor und der Proteindomäne näher beleuchten. Das Spektrum von PAS3855 mit Fe<sup>3+</sup> im Zentrum des Häms (met-PAS3855) enthält zwei Maxima: die  $\gamma$ -Bande (Soretbande) bei 414nm und die  $\beta$ -Bande bei 535nm. Die Schulter bei 561nm kann als schwach ausgeprägte  $\alpha$ -Bande interpretiert werden (Abbildung 3.49, schwarzes Spektrum).

Die Reduktion von met-PAS3855 zu deoxy-PAS3855 mittels Dithionitzugabe bewirkt eine bathochrome Verschiebung der Soretbande auf 427nm. Die  $\alpha/\beta$ -Banden trennen sich klarer auf und sind mit 559nm bzw. 531nm leicht hypsochrom verschoben (Abbildung 3.49, rotes Spektrum). Gleichzeitig kehrt sich ihr Intensitätsverhältnis im Vergleich zu met-PAS3855 um. Die Absorption bei ca. 325nm, die nach der Reduktion erscheint, resultiert aus dem zugegebenen Dithionit, welches in diesem Bereich stark absorbiert.



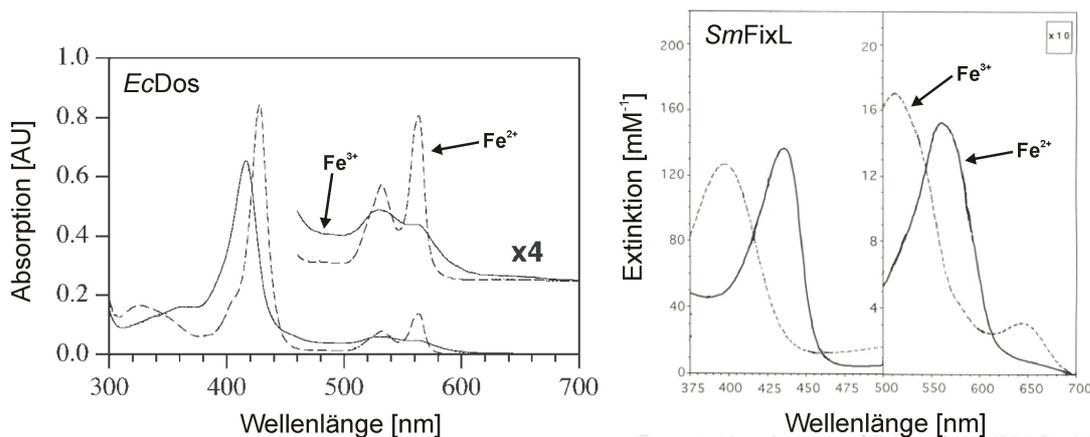
**Abbildung 3.49:** Absorptionsspektren der rekonstituierten PAS3855-Domäne. schwarzes Spektrum: met-PAS3855 ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Häm), rote Spektrum: deoxy-PAS3855 ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Häm) (erhalten durch Zugabe von Natriumdithionit).

Es war im übrigen nicht möglich, das Spektrum einer oxy-Form der  $\text{Fe}^{2+}$ -Domäne aufzunehmen. Durch Belüften der Dithionit haltigen Lösung wandelte sich das Absorptionsspektrum der PAS-Domäne, nach vollständiger Oxidation des Dithionits, wieder in das Ausgangsspektrum aus Abbildung 3.49 um. Der Beweis, dass es sich dabei tatsächlich um die  $\text{Fe}^{3+}$ -Form von PAS3855 handelt, wurde mit Rotem Blutlaugensalz ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) geführt. Die Zugabe dieses milden Oxidationsmittels bewirkte keine Verschiebung der Absorptionsmaxima des schwarz gezeichneten Spektrums in Abbildung 3.49. Das Absorptionsspektrum zwischen 500 und 600 nm gibt Aufschluss über den elektronischen Zustand des Fe-Ions im Zentrum des Häms bzw. über die es umgebenden Liganden. Die Spektren von met- und deoxy-PAS3855 zeigen demnach low-spin Eisenionen. Daher muss sich das zentrale Fe-Ion unabhängig von seinem Oxidationszustand in einem hexakoordinierten oktaedrischen Ligandenfeld befinden.

Bei der low-spin Elektronenkonfiguration erfolgt die Besetzung der Orbitale des Zentralatoms mit Elektronen nicht nach der Hundschen Regel. Dazu bedarf es starker Liganden wie Cyanid oder des Porphyrin-Ringsystems. Diese Liganden „drücken“ die Elektronen der äußeren Schale des Zentralatoms zusammen, sodass wesentlich mehr

gepaarte als ungepaarte Elektronen vorliegen. Die dadurch geleerten Orbitale werden sodann von den Elektronenpaaren der Liganden besetzt. Auf diese Weise bildet sich ein sogenannter Durchdringungskomplex aus. Die Art und Zahl der Liganden eines solchermaßen komplexierten Übergangsmetallions beeinflusst auch das Redoxpotential des selbigen.

Aus der permanenten hexakoordinierten low-spin Konfiguration des Fe-Ions in der PAS3855-Holodomäne folgt, dass neben dem proximalen Histidin, welches das Protoporphyrin IX festhält, ein weiterer distaler axialer Ligand den Oktaeder des Ligandenfelds um das Eisenion herum komplettiert. Solch eine Anordnung findet man zum Beispiel auch in dem Hämprotein Dos aus *E. coli*. Bei diesem bilden je nach Oxidationszustand des Eisenions Wasser ( $\text{Fe}^{3+}$ ) bzw. die Aminosäure Methionin 95 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) den sechsten Liganden [70].



**Abbildung 3.50:** Absorptionsspektren der Häm bindenden Proteine Dos und FixL. Das links abgebildete Dos aus *E. coli* stammt von Sasakura *et al.* [113]. Das rechte Diagramm zeigt *S. meliloti* FixL, entnommen aus Gilles-Gonzalez *et al.* [34].

Abbildung 3.50 stellt die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ - und  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Spektren von *E. coli* Dos und *S. meliloti* FixL dar. Die Spektren wurden den Originalpublikationen von Sasakura *et al.* [113] bzw. Gilles-Gonzalez *et al.* [34] entnommen und neu beschriftet. Der Unterschied zwischen beiden Proteinen offenbart sich im Bereich der  $\alpha/\beta$ -Banden. Während met- und deoxy-Dos hier 2 unterscheidbare Absorptionsbanden besitzen (low-spin Komplexe), zeigen die Spektren von met-/deoxy-FixL nur jeweils 1 Maximum im Bereich von 500-600nm (high-spin Komplexe). Aus dem Vergleich dieser Spektren erkennt man sehr schön die große Ähnlichkeit von PAS3855 zu *E. coli*-Dos.

### 3.3.5 Gelfiltration von deoxy-PAS3855

Nach der Belüftung der reduzierten PAS-Domäne konnte kein anderes Spektrum als das von met-PAS3855 detektiert werden. Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich folgende Frage: Ist vielleicht nicht die Sauerstoffbindung sondern der Redoxzustand des Häms der Schalter der Kinaseaktivität von OE3855R? Wie in Abbildung 3.47 gezeigt, assembliert met-PAS3855 zu einem Tetramer. Histidinkinasen sind aber als Dimere aktiv, wobei sie sich gegenseitig phosphorylieren [150]. Daher kann man auch für PAS3855 unter bestimmten Umständen eine Dimerisierung annehmen. Ob die Reduktion von met-PAS3855 zu deoxy-PAS3855 mit einer Veränderung der Multimerisierung verbunden ist, sollte eine Gelfiltration zeigen.

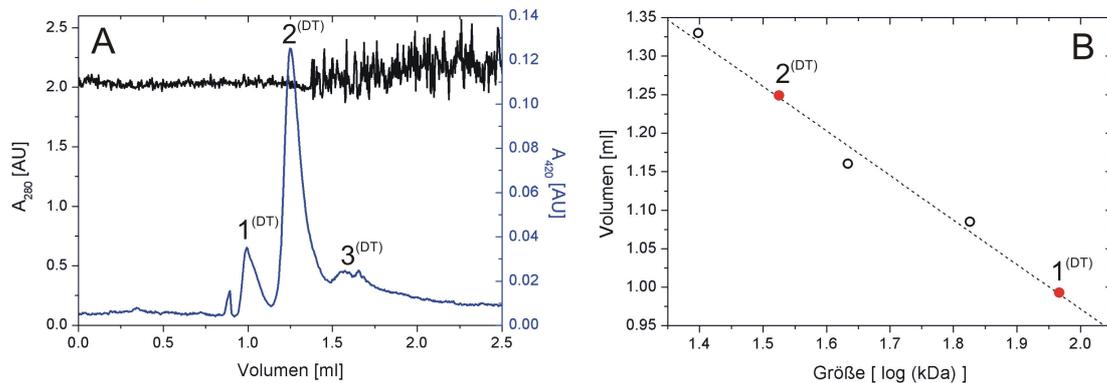
Diese erfolgte wiederum an einer Sephadex 75-Säule, die mit dem gleichen Puffer wie im oben gezeigten Filtrationsexperiment äquilibriert wurde. Der einzige Unterschied bestand darin, dass der Puffer auch 20mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  enthielt, wodurch der Versuch praktisch unter Sauerstoffabschluss durchgeführt werden konnte. Gleichzeitig sicherte dieser Zusatz das Vorliegen von PAS3855 in seiner reduzierten deoxy-Form.

Die Absorption bei 280nm war in diesem Versuch nicht zur Detektion der Elutionsfraktionen nutzbar. Sie diente jedoch als Indikator des anaeroben Zustands der Säule, da  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  im Wellenlängenbereich bis 350nm sehr stark absorbiert. Stattdessen wurde das Elutionsverhalten der PAS-Domäne, bedingt durch die langwellige Verschiebung des Absorptionsmaximums von deoxy-PAS3855, bei 420nm verfolgt.

Abbildung 3.51A zeigt das Diagramm der anaeroben Gelfiltration. Sofort fällt die relativ inhomogene Elution von PAS3855 auf. Es sind drei Hauptfraktionen erkennbar, deren Größen bei 91,7kDa (Maximum 1<sup>(DT)</sup>, siehe auch Abb. 3.51B), 33,1kDa (Maximum 2<sup>(DT)</sup>) bzw. ca. 9kDa (Maximum 3<sup>(DT)</sup>) lagen. Fraktion 3<sup>(DT)</sup> entspricht lediglich der halben Molmasse der PAS-Domäne und besitzt kein scharfes Maximum. Worauf diese Absorption zurückgeht ist unklar.

Fraktion 2<sup>(DT)</sup> enthält den bei weitem größten Anteil der gemessenen  $A_{420}$  und entspricht der doppelten Masse von PAS3855 (exakter Faktor: 1,8). Das kleinere Maximum 1<sup>(DT)</sup> entspricht, ähnlich der Fraktion 1<sup>(-)</sup> der Apodomäne (Abb. 3.47A, S. 72), der fünf-fachen PAS3855-Masse (exakter Faktor: 4,9).

Diese verstärkte Dimerbildung durch Reduktion der Holodomäne untermauert den



**Abbildung 3.51:** Größenbestimmung von rekonstituierter PAS3855 unter anaeroben Bedingungen. A: Gelfiltration der deoxy-PAS3855-Holodomäne. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 280nm (schwarze Kurve) und 420nm (blaue Kurve). B: Größenbestimmung der detektierten Domänen-Multimere.

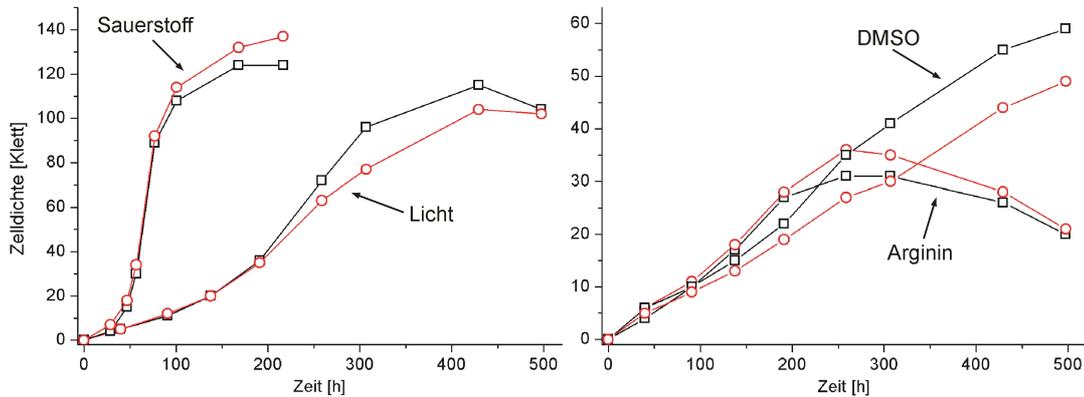
Verdacht, dass die PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R nicht als Sauerstoff- sondern als Redoxsensor dienen könnte.

### 3.3.6 Phänotyp der Deletionsmutante $\Delta$ OE3855R

Die Herstellung der Deletionsmutante des Gens OE3855R sollte die These der sauerstoff- bzw. redoxdetektierenden Funktion dieser Histidinkinase erhärten. Dazu diente der Vergleich von *H. salinarum* R1  $\Delta$ OE3855R mit dem wildtyp-Stamm unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Folgende Parameter wurden getestet: Wachstum unter aeroben Bedingungen bzw. unter anaeroben Bedingungen mit Licht, Arginin oder DMSO als „Energieträger“. Alle Wachstumsversuche erfolgten in synthetischem Medium, welches kein Peptongemisch oder andere komplexe Nahrungsquellen enthält. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, wandelt Bacteriorhodopsin Licht in einen Protonengradienten um [90]. Arginin wird von den Zellen aufgenommen und in Ornithin und Carbamoylphosphat gespalten, aus letzterem kann *H. salinarum* ATP generieren [109]. DMSO hingegen dient unter anaeroben Bedingungen als terminaler Elektronenakzeptor und hält somit die oxidative Phosphorylierung in Gang [87].

Unglücklicherweise unterschied sich die Deletionsmutante unter keiner der getesteten Wachstumsbedingungen vom Wildtyp (Abbildung 3.52). Sie ist offensichtlich fähig, ihre Energieversorgung unter allen geprüften Umständen sicherzustellen. Diese Beobachtung läßt mehrere Interpretationen zu: (i) OE3855R reguliert nur Gene, deren Ausfall nicht



**Abbildung 3.52:** Wachstumskurven der Stämme *H. salinarum* R1 wildtyp (schwarze Quadrate) und  $\Delta$ OE3855R (rote Kreise). Die Kurven sind mit den jeweiligen Wachstumsbedingungen beschriftet.

das Wachstum beeinträchtigt, (ii) diese Histidinkinase übt eine negative Regulation auf andere Gene aus, was im Falle der Deletion zu einer konstitutiven Expression führen würde, (iii) die Wachstumsbedingung, unter der funktionelles OE3855R essentiell für die Zellen ist, wurde nicht getroffen oder (iv) diese HK hat schlicht nicht die Funktion eines Sauerstoff- oder Redoxsensors. Hier können nur weiterführende Experimente im Bereich der Transkriptomanalyse Aufklärung bringen.

### 3.3.7 Zusammenfassung für PAS3855

Die Analyse der Aminosäuresequenz der PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R zeigte ihre große Ähnlichkeit mit Häm bindenden PAS-Domänen anderer Proteine. Darüber hinaus trägt sie einen Histidinrest an der richtigen Position, um den potentiellen Häm-Kofaktor in der Raumstruktur korrekt zu koordinieren.

Die heterolog in *E. coli* exprimierte Domäne enthält geringe Mengen eines Kofaktors, der mittels Absorptionsspektroskopie und LC-MS-Analyse als Häm des Typs B identifiziert werden konnte.

Auf Basis dieses Wissens erfolgte die Rekonstitution der Domäne mit Häm<sub>B</sub>, was die Bildung eines Tetramers induzierte. Die Analyse des Absorptionsspektrums ergab, dass das zentrale Eisenion des Häm-Kofaktors unabhängig von seinem Oxidationszustand von sechs Liganden umgeben sein muss und deshalb in einem permanenten low-spin Zustand vorliegt. Die Reduktion von met-PAS3855 zu deoxy-PAS3855 führte zu einer Änderung des Oligomerisierungsgrades, denn es findet die Umwandlung des Tetramers

in einen Dimer statt.

Die Deletion des Gens OE3855R führt zu keinem erkennbaren Phänotyp. Aus diesem Grund kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden, ob die Häm bindende Histidinkinase OE3855R *in vivo* tatsächlich als Redox- oder Sauerstoffsensor fungiert.



# 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Licht in die dunklen Hallen des Wissens über die weitgehend unerforschten Zwei-Komponenten Systeme (ZKS) des Archaeons *Halobacterium salinarum* zu bringen. Eine vorangestellte bioinformatische Analyse vermochte kaum Erkenntnisse über die Funktionen zu erbringen, lieferte aber einige Hinweise zur Evolution der ZKS von *H. salinarum*. In der nachfolgenden praktischen Analyse wurde das phosphatabhängige Verhalten dieses salzliebenden Organismus sowohl auf Ebene der Genregulation als auch im Bereich der Chemotaxis untersucht. Der zweite praktische Teilbereich der Arbeit widmete sich einer Histidinkinase, die eine Häm bindende PAS-Domäne enthält.

## 4.1 Bioinformatische Analyse der halobakteriellen Zwei-Komponenten Systeme (ZKS)

### 4.1.1 Die Verbreitung der ZKS in den drei Reichen

Nach aktuellem Stand des Wissens gelten Zwei-Komponenten Systeme als Erfindung der Bakterien. So verwundert es auch nicht, dass nahezu alle heute beschriebenen Bakterienarten solche Signaltransduktionsmechanismen besitzen. Da Histidinkinasen (HK) und Antwortregulatoren (RR) funktionelle Einheiten bilden, kodieren die Genome der meisten Bakterien auch etwa ebensoviele HK wie RR, überwiegend sogar in bicistronischen Operons.

Aus dem Bakterienreich wurden die ZKS durch horizontalen Gentransfer in das Eukaryoten- bzw. Archaeenreich „exportiert“ [65]. Folgende Beobachtungen stützen diese These: (i) bei weitem nicht alle Spezies dieser beiden Reiche enthalten Zwei-Komponenten Systeme und (ii) lassen sich die Histidinkinasen oft nur einer oder wenigen Familien zuordnen [150].

Innerhalb des Eukaryotenreiches findet man ZKS in niederen Organismen wie Bierhefen und Schleimpilzen aber auch in Pflanzen wie der Ackerschmalwand und dem Reis [77, 40]. Nahezu alle bislang beschriebenen eukaryotischen HK sind Hybridkinasen (HybHK) [77, 57] und lassen sich laut Grebe und Stock in die Familien 1a bis 1c einordnen [39]. Aufgrund dieser engen Verwandtschaft geht man auch davon aus, dass alle eukaryotischen HK von einem einzelnen lateralen Gentransfer abstammen. Während fast alle bakteriellen „Nicht-Chemotaxis“-ZKS durch DNA-Bindung direkt in die Gentranskription eingreifen, trifft man in Eukarya auf ein weit heterogeneres Bild. Neben der direkten Transkriptionsregulation gibt es auch Systeme, die in den MAPK-Weg münden aber auch solche, die den cAMP-Gehalt der Zelle modulieren [77].

Wie bereits beschrieben, besitzen auch nicht alle Archaeen Zwei-Komponenten Systeme. Lediglich 13 der aktuell 25 sequenzierten Arten enthalten Gene für ZKS (analysiert mit SMART [74]). Da aber drei davon nur mit dem Chemotaxis-ZKS CheA-CheY ausgestattet sind, gibt es in nicht einmal der Hälfte der sequenzierten Archaeen Hinweise auf transkriptionsregulierende ZKS. Darüber hinaus findet man in Archaeen mehr HK- als RR-Gene. Wie in Eukaryoten lassen sich die HK der einzelnen archaealen Spezies wenigen Familien zuordnen. Im Gegensatz zu den Eukaryoten variieren hier die Familienzuordnungen jedoch von Art zu Art, was für einen unabhängigen Erwerb der ZKS durch die einzelnen Spezies spricht.

#### 4.1.2 Die halobakteriellen Histidinkinasen und Antwortregulatoren

*H. salinarum* ist eine der zehn Archaeenspezies, die neben dem Chemotaxis-ZKS CheA-CheY noch weitere, bislang nicht charakterisierte HK und RR enthält. Die insgesamt 14 Histidinkinasen können in vier Gruppen eingeteilt werden. Drei dieser Gruppen entsprechen jeweils einer bekannten HK-Familie (Abb. 3.9, S. 27). Diese Konfiguration legt vier unabhängige Gentransfers nahe, die zu einer stabilen Integration von ZKS-Genen in das *H. salinarum*-Genom führten. Im Laufe der Evolution entstanden daraus wohl durch Duplikationen und nachfolgende Sequenzmodifikationen die anderen, zu diesen „Urgenen“ paralogen, Kinasen der einzelnen Gruppen.

Abgesehen von CheA besitzen nur einige HK aus der Klasse 3h benachbarte RR. Für die restlichen, verwaisten Histidinkinasen muss man sich die Frage stellen, ob und wenn

ja, wie diese HK regulierend in die Transkription von bestimmten Genen eingreifen. Die naheliegendste Antwort lautet: über die Phosphorylierung, quasi Mitbenutzung, eines der vorhandenen Antwortregulatoren. Die Einteilung in bzw. der Vergleich mit bekannten HK- und RR-Familien erzielte nicht den erhofften Erkenntnisgewinn bezüglich des Zusammenwirkens von HK und RR. Dies liegt unter anderem daran, dass mehrere HK keiner Familie zugeordnet werden konnten oder einer Familie angehören, für die keine RR-Wechselwirkungen beschrieben sind. Ein weiterer Grund ist die Inkompatibilität der Familien-Zugehörigkeit der drei biscistronischen HK-RR-Genpaare. Laut Grebe und Stock arbeiten Familie 3h-Histidinkinasen immer mit Familie H-Empfängerdomänen zusammen. Die Empfängerdomänen der Antwortregulatoren OE2086F, OE2334R und OE3854R ähneln aber den Familien A1/A2 (Abbildung 3.8, S. 25).

Ein bekanntes bakterielles Beispiel für Kreuzaktivitäten ist die Histidinkinase CreC. Diese phosphoryliert in einer Nebenaktivität den Antwortregulator PhoB, der ein bicistronisches Operon mit der Histidinkinase PhoR bildet [4]. Wohlgermerkt, die Hauptaufgabe von CreC besteht in der Phosphorylierung seines eigenen RR CreB. *B. subtilis* unterhält sogar ein ganzes Netzwerk aus Histidinkinasen (PhoR, ResE) und Antwortregulatoren (PhoB, ResD, SpoA) für die phosphatabhängige Genexpression [15]. Daher kann ein ähnliches Szenario in *H. salinarum* nicht von vornherein ausgeschlossen werden.

Bislang zeigten  $\Delta phoB$ -Mutanten aber in allen untersuchten Bakterienspezies keinerlei Phosphatmangel-Induktion mehr. Dies unterstreicht die zentrale Bedeutung des Antwortregulators PhoB als ausführende Instanz im Sinne der Transkription des Pho-Regulons. Deshalb wurden in *H. salinarum* auch die RR deletiert, um zu prüfen, ob ein Zwei-Komponenten System die phosphatabhängige Genexpression steuert.

Mehr als zwei Drittel der halobakteriellen Histidinkinasen befinden sich den Vorhersagen zufolge frei diffundierend im Cytoplasma (Tab. 3.1, S. 16). Dieser Anteil ist, verglichen mit der Situation in Bakterien, sehr hoch. Die Lokalisation der Kinasen korreliert gleichzeitig mit der Zahl an PAS- und GAF-Domänen. Drei der vier membrangebundenen HK besitzen weder PAS- noch GAF-Domänen (Tab. 3.3, S. 20). Im Gegenzug enthalten zwei von ihnen eine HAMP-Domäne, die man auch in allen membranständigen Chemotaxis-Transducerproteinen antrifft. Der Mangel an PAS/GAF-Domänen lässt sich leicht damit erklären, dass diese als intrazelluläre Signalsensoren gelten. Demnach observieren die membranständigen HK wohl hauptsächlich extrazelluläre Stimuli.

*H. salinarum* legt offensichtlich viel Wert auf die Überwachung intrazellulärer Parameter, was sich eben in der Überzahl der cytoplasmatischen HK widerspiegelt. Jede von ihnen trägt mindestens eine PAS-Domäne, oftmals zusätzlich auch noch eine GAF-Domäne. Es erscheint unwahrscheinlich, dass alle gefundenen Domänen die gleichen Funktionen haben bzw. den gleichen Stimulus überwachen. Falls dem aber teilweise so wäre, handelt es sich um redundante oder zumindest funktionell überlappende Systeme. Dies gäbe *H. salinarum* die Möglichkeit, bei Ausfall eines der Systeme, z.B. durch die destruktive Wirkung eines der zahlreichen Insertionselemente, auf einen intakten Zweitsensor zurückzugreifen. Für die wissenschaftliche Analyse der Funktionen der einzelnen HK wäre diese Konfiguration allerdings der „worst case“. Denn als Konsequenz daraus müsste man Vielfachmutanten herstellen, um einen Phänotyp beobachten zu können.

PAS- und GAF-Domänen weisen nur geringe Sequenzähnlichkeiten auf, zeigen aber strukturelle Ähnlichkeiten [48]. Man ordnet den GAF-Domänen recht verschiedene Funktionen zu, in jedem Fall aber beeinflussen sie die Wirkungsweise ihrer Trägerproteine abhängig von der Bindung kleiner Moleküle. Dies können cGMP oder cAMP sein, aber auch Metabolite wie Formiat oder  $\alpha$ -Ketoglutarat [5, 79]. Laut aktuellem Wissensstand induziert die Molekülbindung die Dimerisierung der GAF-Domänen, wodurch sich die Effektor-domänen des gleichen Polypeptidstranges näher kommen und aktiv werden [18]. Bei den meisten PAS-Domänen geht man davon aus, dass sie ohne Kofaktoren arbeiten, einige wenige benötigen aber Flavine oder Häm zur Funktionstüchtigkeit. Weiterhin erfüllt die PAS-Domäne des Dioxin-Rezeptors AHR ihre Sensorwirkung wahrscheinlich über die Bindung des aromatischen Agens [43].

Nicht im Ergebnisteil dokumentiert sind die experimentellen Versuche, den GAF-Domänen der Histidinkinasen OE2333R und OE4283R eine dimerisierende Wirkung zu attestieren. Hierzu wurden Chimären aus den entsprechenden GAF-Domänen und dem enzymatisch aktiven Kern (Aminosäuren 204-443) der Adenylylcyclase Rv1625 aus *Mycobacterium tuberculosis* [42] konstruiert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Die aus den Untersuchungen dieser Fusionsproteine gewonnenen Daten waren jedoch nicht aussagekräftig und darüberhinaus nur schlecht interpretierbar, sodass diese Arbeiten (in Kollaboration mit Prof. Joachim Schultz (Universität Tübingen) durchgeführt) nicht weiterverfolgt wurden. Im Bereich der PAS-Domänen trug die Analyse wesentlich mehr

Früchte. Die Ergebnisse dieser Versuche diskutiert dann ausführlich Abschnitt 4.4.1 ab Seite 103.

Von den ohnehin dünn gesäten Empfängerdomänen liegen nur drei in Antwortregulatoren, die das Potenzial besitzen, direkt durch DNA-Bindung transkriptionelle Veränderungen zu verursachen. Einen Wermutstropfen stellen aber die potentiellen DNA-Bindbereiche dieser Proteine dar, welche nur wenig Anhaltspunkte wie Homologien zu Helix-Turn-Helix Motiven aufweisen. Dieses Problem findet man auch bei funktionell untersuchten Transkriptionsfaktoren von *H. salinarum*. GvpE, der Aktivator des Gasvesikeloperons, zeigt nur schwache Homologien zu dem Transkriptionsfaktor PadR. ArcR, der Regulator des Operons für Argininimport und -fermentation, besitzt zwar starke Homologie zu IclR, jedoch nur zu dessen C-terminalen Substratbindebereich (beide Erkenntnisse basieren auf einer SMART-Analyse der Primärsequenzen).

Das Fazit der bioinformatischen Analyse ist die Erkenntnis, dass den halobakteriellen Zwei-Komponenten Systemen ihre Geheimnisse nur durch umfangreiche praktische Experimente entlockt werden können. Die Mittel der bioinformatischen Vorauswahl sind einfach zu beschränkt. Eines der wenigen Beispiele, bei denen die Primärsequenzanalyse einen interessanten Hinweis auf die Funktion des ganzen Proteins lieferte, ist die Histidinkinase OE3855R. Daher erfolgten hier auch biochemische Arbeiten, um der tatsächlichen Funktion der Kinase auf die Spur zu kommen.

## 4.2 Phosphatabhängiges Verhalten auf Ebene der Genregulation

Die Reaktionen von Modellorganismen wie den Bakterien *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* sowie des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* auf Phosphatlimitierung sind intensiv studiert und bis ins Detail bekannt [148, 54, 99]. Bisher existiert jedoch keine tiefgreifende Untersuchung des phosphatabhängigen Verhaltens von *H. salinarum* oder das irgendeines anderen Archaeons. Lediglich *Sulfolobus acidocaldarius*, ein Vertreter aus der Abteilung der Crenarchaeota, unterwarfen Osorio und Jerez vor einem Jahrzehnt einem Phosphatstress [94]. Bei dem Versuch konnte per 2D-Gelelektrophorese festgestellt werden, dass einige Proteine erst während des Stresses auftauchen. Darüber hinaus erfolgte aber nie eine Identifikation, um welche Proteine es sich handelt und

welcher Mechanismus zu der Expression führt.

### 4.2.1 Kritische Phosphatkonzentration

Die vorliegende Arbeit erbrachte eine kritische Phosphatkonzentration im Medium von etwa 0,5mM. Unterhalb dieser limitiert der Phosphatgehalt des Mediums die maximal erreichbare Zelldichte von *H. salinarum*-Kulturen (Abb. 3.11, S. 30). Solche kritischen Phosphatkonzentrationen sollten alle Organismen in ihren jeweiligen Habitaten kennen. Wo diese liegen, hängt von der maximal erreichbaren Zelldichte, der Genom- und Zellgröße sowie der RNA-Menge pro Zelle ab.

Während *H. salinarum* bis maximal  $OD_{600}=2-3$  wächst, können beispielsweise *Corynebacterium glutamicum*-Kulturen Zelldichten bis  $OD_{600}=60$  erreichen, wozu sie aber auch 13mM Phosphat benötigen [55]. Des Weiteren gilt, je kleiner Zellen sind, desto größer ist ihr Verbrauch an Phospholipiden im Verhältnis zu ihrem Volumen und damit zur Zelldichte der jeweiligen Kultur. Für ihr kleines Genom (etwa 500kbp) wiederum verbraucht eine *Mycoplasma genitalium*-Zelle nur rund ein Fünftel des Phosphats, das eine *H. salinarum*-Zelle für ihr etwa 2,6Mbp großes Genom benötigt.

Neben dieser theoretischen Betrachtung brachte die Untersuchung der kritischen Phosphatkonzentration für *H. salinarum* auch einen unmittelbar praktischen Nutzen. Nach der Analyse war klar, dass das phosphatabhängige Verhalten dieses Organismus keinesfalls in dem üblicherweise genutzten Halomedium durchgeführt werden konnte. Allein das in diesem enthaltene Pepton führt zu einem Phosphatgehalt von 4mM. Daher erfolgten sämtliche Experimente zum phosphatabhängigen Verhalten in synthetischem Medium.

### 4.2.2 Alkalische Phosphatase als Messgröße des Phosphatstresses

Wann eine *H. salinarum*-Kultur unter einer aufgezwungenen Phosphatlimitierung leidet, war leicht anhand der Enzymaktivität der sogenannten Alkalischen Phosphatase (Aph) zu beurteilen. Dieses Enzym findet sich in nahezu allen auf Phosphatstress untersuchten Organismen. Glücklicherweise exprimiert *H. salinarum* die Phosphatase nicht konstitutiv wie beispielsweise *S. aureus* und *B. ruminicola* [69, 22], sondern sekretiert sie nur bei Phosphatmangel.

In vielen Bakterien verbleibt das Enzym dann im periplasmatischen Raum. Die halobakterielle Aph verteilt sich jedoch im Medium, da sie weder Transmembrandomänen besitzt noch irgendeinen anderen lipophilen Anker. So konnten die Zellüberstände zur einfachen und schnellen Bestimmung des „gefühlten“ Phosphatstress herangezogen werden (Abb. 3.13, S. 33). Im weiteren Verlauf der Untersuchung sollte sich herausstellen, dass die erhöhte Enzymaktivität bei Phosphatmangel auf eine erheblich verstärkte Transkription von *aph*-mRNA zurückgeht. Erstaunlich an diesem Enzym ist sein ungewöhnlich hohes pH-Optimum (Abb. 3.12, S. 32). Aph anderer Organismen benötigen etwa die zehn- bis hundertfache Protonenkonzentration für optimale Aktivitäten.

*H. salinarum* lebt z.B. auf gesalzenem Fisch oder auch auf in Salzwässern verwesenen Fisch. Die bei der Zersetzung freiwerdenden Amine beeinflussen den lokalen pH-Wert beträchtlich. Vielleicht liegt hier der Grund für das hohe pH-Optimum der halobakteriellen Alkalischen Phosphatase.

### 4.2.3 Transkriptomanalyse der Phosphatstressantwort

Die Analyse der transkriptionellen Veränderungen, die ein Phosphatmangel in *H. salinarum* auslöst, erfolgte mit Hilfe in dieser Abteilung hergestellter Mikroarrays. Die Entwicklung bzw. Etablierung dieser Technologie ging den hier vorgestellten Analysen voraus und wurde in Zusammenarbeit mit Jens Twellmeyer, einem anderen Doktoranden dieser Abteilung, durchgeführt.

Die Entwicklungsarbeit mündete in ein hochwertiges Werkzeug zur „whole-genome“-Analyse mit ausgezeichneter Reproduzierbarkeit. Diese Eigenschaften beeinflusst aber nicht nur der Mikroarray an sich, sondern auch die zur Rohdatenauswertung verwendeten Methoden. Die eingesetzten R-Programme basieren auf anerkannten Algorithmen und wurden von Dr. Gerhard Welzl (Institut für Biomathematik und Biometrie (GSF), Neuherberg) geschrieben. Alles in allem braucht die hier etablierte Mikroarray-Plattform den Vergleich mit anderen Arrays nicht zu scheuen.

In den letzten drei Jahren publizierten zwei Gruppen Transkriptomanalysen von bakteriellen Pho-Regulons [55, 68]. Zum einen besaßen die dort verwendeten Mikroarrays weniger Replikate pro Gensonde (1-3), zum anderen lag die Signifikanzgrenze der betrachteten Messwerte bei  $p=0,05$ . Im Gegenzug legten beide Arbeitsgruppen einen hö-

heren Regulationsfaktor fest (3-4), ab dem ein Gen überhaupt erst als reguliert galt. Zudem basierten die Ergebnisse auf der Analyse von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Die Vielzahl der nach den angelegten Maßstäben als reguliert angesehenen Gene erforderte eine genaue manuelle Begutachtung. Diese bestand vordergründig in einer Ordnung nach Funktionsklassen. Bei Genen mit unbekannter Funktion wurden Proteinmotiv-Suchmaschinen wie SMART und Pfam [117, 11] eingesetzt, um Anhaltspunkte zu den möglichen Funktionen zu erhalten.

Mikroarrays zeigen nicht nur Regulationen einer kleinen Zielgruppe von Genen, sondern naturgemäß die Regulationen möglichst vieler Gene eines Organismus. Aus diesem Grund war es auch unerlässlich, aus der Vielzahl der regulierten Gene diejenigen herauszusuchen, die für die Phosphatversorgung von *H. salinarum* wichtig sind. Während der manuellen Begutachtung des Gesamtdatensatzes kristallisierten sich 18 nach Phosphatstress induzierte Gene heraus, deren Translationsprodukte entweder der Aufnahme oder Mobilisierung von Phosphat dienen (Abb. 3.18, S. 37).

Die Funktionen der in den Pho-Regulons verschiedenster Organismen vereinten Gene sind äußerst mannigfaltig und haben nicht immer einen direkten Bezug zu dem Phosphatmetabolismus der Zelle [143, 93, 6, 55, 68]. Den harten Kern aller Pho-Regulons kann man aber eingrenzen auf Phosphatasen, gleich ob mit alkalischem oder saurem pH-Optimum, und phosphatspezifische Transportsysteme. Während sich Bakterien zum Zweck des Phosphatimports sogenannter ABC-Transporter bedienen, nutzt *S. cerevisiae* Na<sup>+</sup>- und H<sup>+</sup>-Symporter [99].

*H. salinarum* besitzt zwei phosphatspezifische ABC-Transporter, Pst1 und Pst2. Dieser Umstand geht sehr wahrscheinlich auf eine Genduplikation zurück. Beide Operons werden als Teil des Pho-Regulons verhältnismäßig stark induziert, wenn auch mit merklich unterschiedlichen Kinetiken. Die vorübergehende Induktion des Pst2-Transporters lässt sich mit einer niedrigeren Substrataffinität dieses P<sub>i</sub>-Transporters deuten. Mithin wäre eine starke Induktion dieses Transporters unter Bedingungen kleinster Phosphatkonzentrationen nicht hilfreich für *H. salinarum*. Die Transkriptmengen des vermutlich höheraffinen Pst1-Transporters nehmen dagegen im Verlauf des Experiments kontinuierlich zu bzw. verbleiben auch nach 24h auf einem hohen Niveau. Bei den RT-qPCR-Experimenten in Kapitel 3.2.6 ab S. 48 stellte sich heraus, dass von dem P<sub>i</sub>-Transporter

2 in Zellen ohne Phosphathunger wesentlich mehr Transkripte vorhanden sind, als von dem  $P_i$ -Transporter 1 (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Hypothese der verschiedenen Substrataffinitäten.

Tabelle 3.4 (S. 29) listet ausser den beiden  $P_i$ -ABC-Transportern noch vier weitere, als Phosphat-Transportsysteme klassifizierte Proteine auf. In der Mikroarray-Analyse wurde keines von ihnen als reguliert identifiziert. Die unabhängige Überprüfung mittels RT-qPCR zeigte aber für die Gene *phoT2* und OE4236F eine schwache Induktion, die zu den Zeitpunkten 2-4h (*phoT2*) bzw. 10h (OE4236F) den arbiträren Grenzwert der „zweifachen Regulation“ überschritt (Tab. 3.6, S. 50). Laut Pfam besitzen die in den beiden ORFs kodierten Proteine Homologien zu einem  $Na^+$ - $P_i$ -Symporter aus *N. crassa* [144]. Da auch *S. cerevisiae* solche Systeme bei Phosphatmangel induziert, zeigen sich hier gewisse Parallelen. Es muss jedoch daraufhin gewiesen werden, dass die „salt-in“-Strategie, welche *H. salinarum* zur Wahrung des osmotischen Gleichgewichts nutzt, die Funktionalität dieses Transporters beeinträchtigen dürfte. In jedem Fall aber ist klar, dass die Bedeutung der vier  $P_i$ -Transporter PhoT2, OE4236F, PhoT3 und OE2113R in „Friedenszeiten“, also bei ausreichender Phosphatversorgung, größer sein dürfte als bei akutem Phosphatmangel.

Der in das Medium sekretierten Alkalischen Phosphatase (Aph), zu der die umfangreichsten Induktionsdaten vorliegen, obliegt die Mobilisierung von *ortho*-Phosphat aus Phosphatestern. Neben dieser im Mikroarray-Experiment eindeutig als induziert erkannten Phosphatase, findet sich noch die als „Homolog der p-Nitrophenylphosphatase“ benannte Pho2. Sie überschreitet in den ersten vier Stunden des Phosphatmangelstresses, nur per RT-qPCR nachweisbar, die Grenze der zweifachen Induktion. Das Protein besitzt aber keine Exportsequenz und verbleibt somit vermutlich im Cytoplasma. Weiterhin beruht die Bezeichnung „Homolog zu p-Nitrophenylphosphatase“ auf unsicheren Vergleichsdaten, denn viele laut BLAST homologe Proteine anderer Organismen liegen in „Arabinose-Operons“. Daher wäre eine Funktion von Pho2 im Zuckerstoffwechsel sehr gut denkbar. Aufgrund dieser Hintergrundfakten ist ein Mitwirken von Pho2 bei der Bekämpfung von Phosphatmangel unwahrscheinlich.

Über die beiden diskutierten Minimalfunktionen hinaus (Phosphatasen und  $P_i$ -Transporter), verfügt jeder Organismus noch über eine ganze Reihe weiterer Proteine, deren Produktion er im Falle eines Phosphatmangels hochfährt. Dazu gehören bei *H. salina-*

*rum* ein Glycerin-3-phosphat-Transporter und zwei Exonukleasen (sowohl per Mikroarray als auch per RT-qPCR nachweisbar), beide sind auch Teil der Pho-Regulons von *E. coli* bzw. *C. glutamicum* [148, 55].

Die beiden Exonukleasen werden von den Genen OE1410F und OE3526R kodiert und nach der Translation wahrscheinlich sekretiert. Die Proteine besitzen deutliche Nukleasemotive und Signalsequenzen zum Export durch das Sec-System (OE1410F) bzw. Tat-System (OE3526R). Exonukleasen degradieren im Medium schwimmende Nucleinsäuren zu einzelnen Nucleotiden, von welchen dann der Phosphatrest durch die Alkalische Phosphatase abgespalten werden kann. Das freigesetzte anorganische Phosphat bildet sodann das Substrat der  $P_i$ -ABC-Transporter. Der ABC-Transportkomplex UgpBAEC hingegen dient der Phosphataufnahme aus der speziellen Quelle Glycerin-3-phosphat ohne den Umweg über die Esterspaltung durch Aph. Interessanterweise wandelt *H. salinarum* die importierte Phosphatquelle im Cytoplasma aber nicht sofort quantitativ zu anorganischem Phosphat um (Tab. 3.9, S. 64).

Die Induktion des Gens der cytoplasmatisch lokalisierten Glycerophosphoryl-phosphodiesterase UgpQ ist zwischen 2h und 10h am stärksten, jedoch nur per RT-qPCR nachweisbar. Danach sinkt die mRNA-Menge von UgpQ wieder auf das Ausgangsniveau. Möglicherweise erklärt die Funktion des Enzyms dieses Verhalten. Seine Aufgabe besteht in der Freisetzung von Glycerin-3-phosphat aus Phospholipiden auf Glycerinbasis, deren Isoprenoidanteile zuvor bereits von anderen Enzymen abgespalten wurden. Da *H. salinarum*-Zellen nach 24h Phosphatmangel kaum noch wachsen, verringert sich auch die Biosynthese von Zellmembranen. Demnach sinkt auch der Umsatz an Membranlipiden, die eventuell wiederverwertet werden müssten. Auch wenn das UgpQ-Homolog GlpQ in *B. subtilis* ebenfalls Mitglied des dortigen Pho-Regulons ist [6], so scheint es in *H. salinarum* auch noch über einen anderen Regulationsmechanismus an das Zellwachstum gekoppelt zu sein.

Weitere interessante Strategien zur Bekämpfung von Phosphatmangel sind die Umstellung der Synthese der Zellwand und -membran aus phosphatfreien Komponenten. So induziert *B. subtilis* Enzyme zur Teichuronsäuresynthese und unterdrückt die Enzyme der Teichonsäureherstellung [54]. *R. sphaeroides* aber auch *A. thaliana* ersetzen Phospho- durch Sulfolipide als Membranbausteine [14, 154]. Des Weiteren produziert *E. coli* Transporter und Enzyme zur Aufnahme bzw. Degradation von Phosphona-

ten, Substanzen mit stabilen Kohlenstoff-Phosphor-Bindungen [148]. Die vorliegende Untersuchung lieferte jedoch keinerlei Hinweise darauf, dass *H. salinarum* eine dieser Strategien anwendet.

In den bislang per Transkriptom- bzw. Proteomanalyse untersuchten Bakterien- und Hefe-Pho-Regulons fand man immer auch die regulierenden Elemente, sprich Zwei-Komponenten Systeme bzw. Cyclin-abhängige Kinasen [143, 93, 6, 55, 68]. Die Mikroarray-Analyse konnte jedoch keine autoregulierten ZKS enttarnen, in der Retrospektive zurückzuführen auf den Umstand, dass kein ZKS an der Phosphatregulation beteiligt ist. Neben den auf Seite 47 erwähnten Regulatoren Lrp und SirR fanden sich unter den signifikant regulierten Genen noch weitere Kandidaten mit schwachen Homologien zu Transkriptionsfaktoren. Ob einer von ihnen vielleicht für die phosphatabhängige Transkription des Pho-Regulons verantwortlich zeichnet, kann wohl nur mit Hilfe einer umfangreichen Konstruktion und Analyse von Deletionsmutanten der entsprechenden Gene geklärt werden.

Trotzdem sich die Biosynthese der zwei  $P_i$ -Transporter PhoT2 und OE4236F sowie der Glycerophosphoryl-phosphodiesterase UgpQ durch Phosphatmangel leicht erhöht, sollten zunächst nur die in Abbildung 3.18 auf S. 37 aufgeführten Gene zum halobakteriellen Pho-Regulon gezählt werden. Zwar weist das so gezeichnete Bild sicher noch einige Lücken auf, für detailliertere Aussagen bedarf es aber eingehenderer praktischer Untersuchungen.

Bislang nicht besprochen wurden die Gene, welche für PhoU-Homologe kodieren und ebenfalls durch Phosphatmangel induziert werden. Die Bedeutung dieser verstärkten Transkription und die mögliche physiologische Relevanz der Proteine diskutiert später der Abschnitt 4.2.5 ab S. 97 sehr intensiv.

Das Enzym Ipp, die „Anorganische Pyrophosphatase“ von *H. salinarum*, wird bei Mangelbedingungen nicht induziert, sondern eher heruntergefahren. Ihr kommt eine große Bedeutung bei der Nukleotidsynthese zu, wo sie Pyrophosphat in *ortho*-Phosphat spaltet und so das Gleichgewicht der Synthese in Richtung Produkt verschiebt. Daher verwundern auch die relativ großen mRNA-Mengen dieses Gens in nicht gestressten Zellen keineswegs (nicht gezeigte Daten der RT-qPCR-Experimente). Ebenso logisch erscheint die Reduktion der Expression unter Hungerbedingungen, welche die Zellen ja in einen stationären Zustand zwingen. Dies verringert den Umfang von Replikation und

Transkription und damit automatisch den Bedarf an Pyrophosphatspaltungen.

Technisch gesehen, zeigen die Unterschiede zwischen den Mikroarray- und RT-qPCR-Daten von *phoT2*, OE4236F, *ugpQ* und *pho2*, dass die Mikroarray-Technik schwache Regulationen eventuell nur unzureichend wiedergibt. Daher liegt die Menge der Falschnegativen, also die Zahl der fälschlicherweise als nicht reguliert identifizierten Gene, im niedrigen Regulationsbereich sicherlich höher als bei stark regulierten Genen. Die Identifikationsrate von Genen mit schwachen Änderungen ließe sich erhöhen, indem man die Grenze der Mindestregulation heruntersetzt. Das setzt aber im Gegenzug die Analyse von mehr als nur zwei biologischen Replikaten mit einer noch höheren Zahl von Arrays voraus.

Weiterhin können, bedingt durch den Hochdurchsatz-Anspruch der Mikroarray-Technik, Regulationsraten nicht über mehrere Größenordnungen hinweg wiedergegeben werden. Ein gutes Beispiel dafür liefern die extrem stark regulierten Operons der drei ABC-Transporter und der Alkalischen Phosphatase. Während die höchste Induktion laut Mikroarray bei 35fach liegt, sieht man mit der für diesen Zweck sehr viel besser geeigneten RT-qPCR Induktionen von bis zu 900fach. Dies liegt mehr als eine Größenordnung über der „Array“-Induktion. Deshalb muss dem Anwender von vornherein klar sein, dass ein Mikroarray-Experiment nicht dazu geeignet ist, die Regulationen von tausenden Genen bis auf das Komma genau zu bestimmen. Vielmehr dient diese Hochdurchsatz-Technik dem Erkennen von Trends in der Genregulation [2]. Deswegen wurde auch darauf verzichtet, die genauen Regulationswerte laut Mikroarray für jedes einzelne Gen anzugeben.

Abgesehen von dem momentan als Pho-Regulon definierten Satz von Genen, zeigt die Transkriptomanalyse noch eine Vielzahl weiterer transkriptioneller Änderungen. Es bleibt ungewiss, welche davon durch das noch unbekanntes Signaltransduktionssystem spezifisch aufgrund des Mangels an Phosphat ausgelöst werden. Man kann aber mit großer Sicherheit sagen, dass der überwiegende Teil unspezifische Reaktionen auf die Stresssituation sind, in der sich die Zellen befinden. *B. subtilis* schaltet beispielsweise sein generelles  $\sigma^b$ -Stressregulon bei Phosphatmangel an. Diese Reaktion hängt nicht von dem PhoR-PhoP Zwei-Komponenten System ab, das die spezifische Phosphatmangelantwort vermittelt [1]. So stellt die Expression mehrerer Chaperone möglicherweise eine Antwort von *H. salinarum* auf allgemeinen Zellstress dar. Wie bereits im Ergebnis-

teil erwähnt, spricht weiterhin die Induktion von Enzymen zur Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und von DNA-Reparaturgenen für einen Zustand erhöhten „allgemeinen Unbehagens“ der *H. salinarum*-Zellen.

Genauso hängt die starke Repression der ribosomalen Proteine sehr wahrscheinlich mit dem einsetzenden Wachstumsstopp zusammen und wird nicht durch das phosphatspezifische Sensorsystem beeinflusst. So beschrieben VanBogelen und Neidhardt vor über 15 Jahren die Veränderung der Expression ribosomaler Proteine in *E. coli*-Kulturen, nach Hitze- und Kältebehandlung [143]. Genauso fanden Ishige *et al.* und Krol *et al.* bei ihren Mikroarray-Analysen der Phosphatmangelantworten von *C. glutamicum* bzw. *S. meliloti* eine deutliche Verringerung der Transkriptionsstärke der Gene der ribosomalen Proteine [55, 68].

Auch die Repression der Gene der Atmungskette (Abb. 3.19, S. 39) kann auf das verlangsamte Wachstum zurückgeführt werden. Vielleicht handelt es sich aber auch um eine Reaktion auf das Umsetzen in phosphatfreies, unverbrauchtes Medium durch das ja der Phosphatmangelschock gesetzt wurde. Sicher war das neue Medium nicht sauerstoffärmer, was die Respiration beeinträchtigt hätte. Die Zellen wurden vor und nach dem Umsetzen der gleichen Lichtquelle ausgesetzt. Somit scheidet die seit langem bekannte Lichthemmung der Atmung in *H. salinarum* ebenfalls aus. Ausserdem ist der „*bop*-Cluster“ in den ersten vier Stunden leicht heruntergefahren (Abb. 3.21, S. 42). Interessanterweise zeigen die Gene der ATP-generierenden Argininfermentation eine leichte Erhöhung über den Beobachtungszeitraum hinweg (Abb. 3.22, S. 43), möglicherweise ein Hinweis auf die Nutzung des Arginins des frischen Mediums für die ATP-Produktion. Dies bleibt jedoch reine Spekulation, da die Argininfermentation unter aeroben Bedingungen erfahrungsgemäß keinen nennenswerten Beitrag zur Energieversorgung leistet.

#### 4.2.4 Der Phosphatspeicher und seine Bedeutung

*H. salinarum* enthält relativ große Mengen Phosphat in seinem Cytoplasma. 95% der ca. 40mM liegen als anorganisches *ortho*-Phosphat ( $P_i$ ) komplexiert mit Magnesiumionen vor. Die restlichen 5% sind als Polyphosphat (PolyP) und Glycerol-3-phosphat (G3P) gebunden [121, 36]. Im Vergleich dazu akkumuliert das Standardbakterium *E. coli* lediglich 10mM anorganisches Phosphat und nur 200 $\mu$ M PolyP [148]. Andere Bakterien

wie *Acinetobacter johnsonii* aber auch *S. cerevisiae* nutzen wiederum PolyP als Hauptspeicherform und reichern es mit ca. 200mM sehr stark an [66, 7]. *C. glutamicum*-Zellen können unter bestimmten Umständen sogar unglaubliche 600mM PolyP enthalten [72].

Für *H. salinarum* konnte gezeigt werden, dass im Licht und unter Sauerstoffausschluss eine Konvertierung von  $P_i$  zu Glycerin-3-phosphat stattfindet, die durch Sauerstoffzugabe und Lichtdämpfung vollständig reversibel ist [36]. Die in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsbedingungen stellen jedoch sicher, dass nahezu der gesamte Phosphatvorrat als  $P_i$  vorliegt.

Der relativ kleine Phosphatvorrat von *E. coli*-Zellen verringert sich bei Phosphathunger nur sehr wenig (7mM) [145]. Die Verteidigungslinie der Zellen gegen Phosphatmangel befindet sich aber auch ausserhalb der Zellen. Erkennen sie einen Versorgungsengpass, induzieren sie als Gegenmaßnahme sofort das Pho-Regulon [148]. Hefezellen wiederum enthalten neben den 230mM PolyP noch ca. 20mM  $P_i$ , das bei Unterversorgung auf 8mM schrumpft [7]. Anhand dieser beiden Beispielorganismen und *H. salinarum* kann man schon erkennen, dass im Bereich von etwa 10mM  $P_i$  eine kritische Grenze unterschritten wird. Eine weitere Verringerung des Phosphatgehalts verhindern die Organismen dann durch simplen Wachstumsstopp. Während also *E. coli* bereits agiert, wenn die medialen Phosphatvorräte zur Neige gehen, warten *S. cerevisiae* und *H. salinarum* darauf, dass sich ihre internen, im Vergleich zu *E. coli* wesentlich größeren Speicher zu leeren beginnen.

Die Identifikation von internem Phosphat als Messgröße für den Status des Phosphatmangels war eine große Überraschung. Nicht nur *E. coli*, sondern alle bisher daraufhin untersuchten Prokaryoten induzieren ihre Pho-Regulons in Abhängigkeit von der Konzentration anorganischen Phosphats im Medium. Zwar vermutet man für *Synechocystis* sp. PCC6803 ebenfalls eine interne Phosphatmessung, da die regulierende Histidinkinase keine Transmembranbereiche besitzt [129], doch bislang fehlen entsprechende experimentelle Daten.

*Saccharomyces cerevisiae* nutzt den internen  $P_i$ -Speicher als Indikator für den Phosphatmangel, wobei es seinen PolyP-Vorrat sehr effektiv als Puffer einsetzt [134]. Der Transkriptionsfaktor Pho4 wird bei normalen Phosphatkonzentrationen von dem Cyclin-abhängigen Kinasekomplex Pho80/ Pho85 phosphoryliert, was zum Kernexport von Pho4 führt. Dies verhindert zwangsläufig die Transkription der Gene des Pho-Regulons.

Bei Phosphatmangel inaktiviert der CDK-Inhibitor Pho81 den Pho80/Pho85-Komplex und Pho4 kann an seinen Zielpromotoren wirken [7]. Bislang fehlt jedoch noch das Bindeglied zwischen der internen Phosphatkonzentration und dem aktiven CDK-Inhibitor Pho81.

Die Pufferwirkung von PolyP funktioniert folgendermaßen: sinkt der  $P_i$ -Gehalt der Zellen, führt dies zur Mobilisierung, sprich Hydrolyse, des Polyphosphats in der Vakuole. Da Hefe etwa zehnmal mehr Polyphosphat als  $P_i$  speichert, bedeutet ein niedriger  $P_i$ -Gehalt nicht sofort den Stopp des phosphatabhängigen Anabolismus. In der Anfangsphase des Phosphatmangels werden, noch vor dem vollständigen Verbrauch des PolyP, hochaffine  $P_i$ -Transporter verstärkt exprimiert. Zu einem späteren, bedrohlicheren Zeitpunkt des Phosphatmangels erhöht sich dann auch die Expression der Sauren Phosphatase Pho5 [134].

Nun kann *H. salinarum* nicht auf einen PolyP-Vorrat zurückgreifen. Die Zellen enthalten zwar mehr  $P_i$  als Hefezellen, dennoch liegt der Gesamtphosphatvorrat weit unter dem der Hefe. Warum also wartet der Organismus erst auf das Absinken seiner internen Vorräte, anstatt mit Hilfe externer Detektion viel schneller auf einen bevorstehenden Phosphatmangel zu reagieren? Wahrscheinlich ist eine schnellere Reaktion schlichtweg nicht nötig. Immerhin gehen die Zellen im durchgeführten Phosphatmangelversuch erst im Laufe der etwa 24h in den stationären Zustand über. Das Pho-Regulon hingegen wird „bereits“ nach wenigen Stunden angeschaltet.

Im übrigen erklärt sich auch die verhältnismäßig lange Ansprechzeit des Pho-Regulons nach Applikation des Phosphatmangels durch die interne Zustandsmessung. Bakterien mit „Aussenmessung“ erkennen den gesetzten Phosphatmangel sehr schnell und transkribieren schon nach 30min große Mengen mRNA der Gene des Pho-Regulons [51]. *H. salinarum* reagiert dagegen erst nach mehreren Stunden, weil (i) der interne  $P_i$ -Speicher zunächst spürbar verbraucht werden muss und (ii) die Geschwindigkeit des  $P_i$ -Verbrauchs von der Wachstumsrate abhängt.

Die Generationszeit von *H. salinarum* beträgt unter Laborbedingungen bestenfalls fünf Stunden, kann sich aber in freier Wildbahn auf mehrere Monate verlängern. Damit vergeht wesentlich mehr Zeit, bevor der Sensor Alarm schlägt. Und bei mehreren Monaten Generationszeit ist es effizienter, auf Fluktuationen des Phosphatgehalts des Habitats zu spekulieren, als sofort nach dem Eintritt einer temporären Unterversorgung

energieintensive Genexpression zu betreiben.

Hat *H. salinarum* den Phosphatmangel aber erst einmal erkannt, reagiert es genauso energisch wie viele Bakterien. Dort wurden Induktionsraten von eintausendfach für einige Gene des Pho-Regulons gemessen [148, 68]. Mit einer 400-900fachen Induktion der ABC-Transportsysteme steht *H. salinarum* diesen Raten kaum nach (Tab. 3.6, S. 50).

Setzt man Phosphathunger leidenden Zellen wieder geringe Mengen Phosphat zu (1mM im Medium), so füllen sie ihren internen Speicher bis auf unglaubliche 170mM anorganisches Phosphat auf (Tab. 3.7, S. 52). Dieses Verhalten, vermutlich zurückzuführen auf die Aktivität der stark exprimierten ABC-Transporter Pst1 und Pst2, erhöht automatisch die Toleranz gegenüber erneutem Phosphatmangel. Denn mit dem Vierfachen des normalen intrazellulären Phosphatvorrats sind die Zellen natürlich viel länger in der Lage, ihren normalen „Geschäften“ nachzugehen.

#### 4.2.5 Der Weg vom auslösenden Signal bis zur zellulären Reaktion

Die zweite große Überraschung war die Feststellung, dass *H. salinarum* für seine phosphatabhängige Genregulation keines seiner Zwei-Komponenten Systeme benötigt. Der Beweis dafür wurde mit Hilfe von Deletionsmutanten geführt, denen jeweils eines der 6 Gene fehlt, die eine funktionelle Empfängerdomäne kodieren. Die Überprüfung der Phosphatmangelantwort der Mutanten erfolgte mittels Phosphatase-Tests. Alle Stämme zeigten ein ähnliches Induktionsverhalten wie der wildtyp-Stamm (Tab. 3.8, S. 55). Trotz der bekannten Vernetzungen zwischen Signalwegen der Phosphatregulation, genügte bislang in allen untersuchten Bakterien die Deletion eines einzelnen Antwortregulators, um den Signalfuss zum Erliegen zu bringen. Daher kann man davon ausgehen, dass die phosphatabhängige Genexpression in *H. salinarum* nicht von einem klassischen Zwei-Komponenten System gesteuert wird.

Gleichwohl ist eine funktionelle Redundanz der Antwortregulatoren von *H. salinarum* nicht grundsätzlich auszuschließen. Sie wäre sehr wahrscheinlich das Resultat einer Genduplikation und würde als solche auf Sequenzähnlichkeiten mindestens in den Effektorbereichen der RR beruhen. Diese Abschnitte der RR zeigen dafür aber zu geringe Homologien untereinander, womit eine befürchtete funktionelle Redundanz sehr unwahr-

scheinlich wird. Laut dieser Kausalkette sollten Mehrfachdeletionen von halobakteriellen Antwortregulatoren zu dem gleichen, bereits vorliegenden Ergebnis kommen, dass sich der Schalter des Pho-Regulons nicht in den Reihen der Zwei-Komponenten Systeme versteckt.

Grundsätzlich kann man sich zwei Möglichkeiten vorstellen, wie dieser Schalter funktioniert. Zum Einen könnte der Regulator selbst ein Phosphat bindendes Protein sein, das entweder bei Substratsättigung negativ oder in phosphatfreiem Zustand positiv auf die Promotoren des Pho-Regulons wirkt. Dieses Funktionsprinzip erfordert nicht mehr als eine Proteinkomponente. Die zweite Möglichkeit des Schaltens besteht in einer posttranslationalen Modifikation, vorzugsweise einer Phosphorylierung. Ein solches System müsste wiederum aus mindestens zwei Komponenten bestehen, von denen die eine das Signal „niedriger Phosphatvorrat in der Zelle“ wahrnimmt und eine zweite Komponente modifiziert. Der zweiten Komponente obläge dann die Steuerung der Transkription. Natürlich können beide funktionellen Komponenten in einem Protein fusioniert sein. Ein Szenario, mit dem sich das Zwei-Komponenten Schema umgehen lässt, bestünde darin, die Phosphorylierung des Regulators direkt an den Spiegel von ATP oder eines anderen energiereichen Phosphatdonors wie Acetyl- oder Carbamoylphosphat zu koppeln. Abhängig von der Höhe des Spiegels wird der Regulator phosphoryliert, was seine regulativen Eigenschaften bezüglich der Zielgene ändert.

An dieser Stelle kommen die PhoU-Homologen von *H. salinarum* ins Spiel. PhoU-Homologe finden sich nur in Bakterien und Archaeen. Von Studien in *E. coli* weiss man, dass PhoU für die Regulation der phosphatabhängigen Genexpression im Zusammenspiel mit Pst und PhoR essentiell ist (siehe auch Abb. 3.10, S. 28). Bei dem Transportvorgang des P<sub>i</sub>-ABC-Transporters Pst hingegen spielt dieses Protein keine Rolle [124]. Der genaue molekulare Mechanismus der Mediatorfunktion von PhoU bleibt allerdings bis heute ein Mysterium. Daneben gibt es auch Bakterien wie *B. subtilis*, an deren Pst-Transportern kein PhoU assoziiert und deren Phosphatregulation ohne dieses Mediatorprotein arbeitet [54].

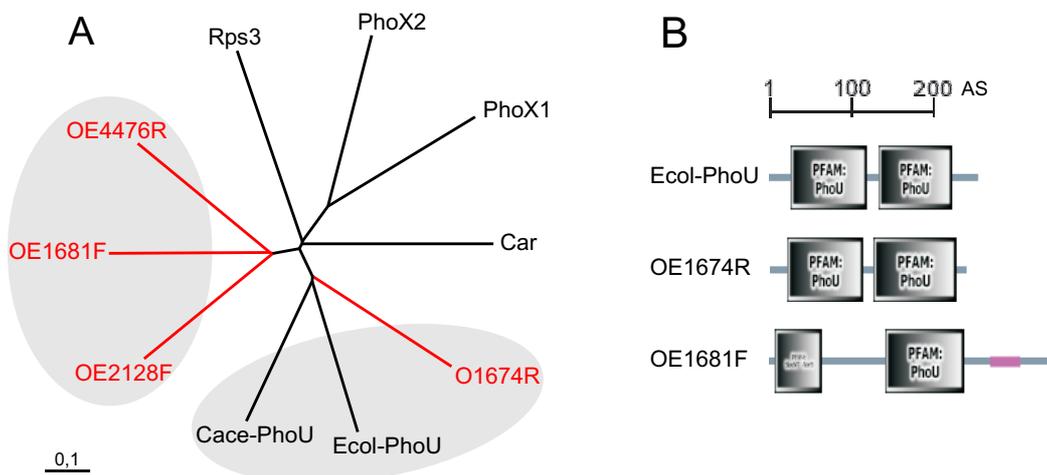
Der aufmerksame Leser\* stellt sich in diesem Zusammenhang sicher sofort die Frage, wozu *H. salinarum* überhaupt PhoU-Proteine braucht? Schliesslich benutzt der Orga-

---

\*Aus Gründen der Leserlichkeit wird nur die maskuline Form benutzt, obwohl natürlich beide Geschlechter angesprochen sind.

nismus ja auch keine Zwei-Komponenten Systeme zur Phosphatregulation. Nun, die Möglichkeit der Regulation über eine Histidinkinase und eine weitere „Nicht-Antwortregulator“-Komponente kann bislang nicht völlig ausgeschlossen werden. Folgerichtig wäre auch ein Zusammenspiel einer solchen HK mit dem Pst-Transporter über PhoU denkbar.

*H. salinarum* leistet sich den Luxus, gleich vier zu *E. coli*-PhoU homologe Proteine zu kodieren. Zwei davon befinden sich am Ende der polycistronischen Operons der Pst-Transporter (OE1674R nach *phoX*<sub>2</sub>-*pstC*<sub>2</sub>A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> und OE4476R nach *phoX*<sub>1</sub>-*pstC*<sub>1</sub>A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>), die anderen zwei sind in monocistronischen Operons kodiert (OE1681F und OE2128F). Die genauere Betrachtung dieser vier Proteine offenbart einige bemerkenswerte Unterschiede. Die Analyse der Primärsequenz ergab eine Aufspaltung in zwei Lager (Abbildung 4.1A). OE1674R (229 Aminosäuren) bildet eine Gruppe mit den Vergleichssequenzen der PhoU-Proteine von *E. coli* (241AS) und *Clostridium acetobutylicum* (219AS). Die drei anderen PhoU-Homologen OE4476R (372AS), OE1681F (334AS) und OE2128F (342AS) versammeln sich in einer zweiten Gruppe. Als Vergleichssequenzen für den Verwandtschaftsbaum in Abbildung 4.1A dienen ein ribosomales Protein (Rps3, 302AS), ein halobakterieller Transducer (Car, 452AS) sowie die beiden Phosphatbindepoteine von *H. salinarum* (PhoX1, 379AS und PhoX2, 344AS).



**Abbildung 4.1:** Bioinformatische Analyse von PhoU-Homologen. A: Verwandtschaftsbaum. Die beiden Gruppen mit PhoU-Proteinen sind mit grauen Ellipsen hervorgehoben. Darüber hinaus enthält der Baum noch die Vergleichsproteine Rps3, Car, PhoX1 und PhoX2. B: SMART-Darstellung von ausgewählten PhoU-Homologen. Die Vierbuchstaben-Abkürzungen der Organismennamen sind im Anhang auf S. 142 nachzuschlagen.

Eine SMART-Analyse offenbart nur bei OE1674R zwei Pfam-PhoU-Bereiche, wie man

sie auch in *E. coli*- und *C. acetobutylicum*-PhoU findet (Abbildung 4.1B). Damit handelt es sich bei OE1674R um das einzige „echte“ PhoU von *H. salinarum*. Die anderen drei PhoUs sind ca. 100 Aminosäuren länger und enthalten nur einen, bei OE4476R und OE2128F kaum detektierbaren Pfam-PhoU-Bereich. Am N-Terminus dieser drei „unechten“ PhoU-Homologen befindet sich aber ein etwa 60 AS langer Bereich, der Homologien zu den Transkriptionsfaktoren AbrB bzw. SpoVT besitzt (in Abbildung 4.1B anhand von OE1681F beispielhaft dargestellt). Beide Faktoren regulieren in *B. subtilis* ein Vielzahl von Genen und spielen eine wichtige Rolle bei dem Eintritt in die stationäre Phase bzw. der Sporenbildung [30, 8]. Daneben verringert sich die Induktion des Pho-Regulons bei einem *B. subtilis*  $\Delta$ *abrB*-Stamm um 80% [54]. Weiterhin wurde die DNA-Bindeaktivität von AbrB auf die ersten 55 Aminosäuren eingegrenzt [152], eben jenen Bereich, zu dem die drei AbrB-PhoU-Chimären homolog sind.

Diese Verschmelzung von Ähnlichkeiten mit DNA bindenden Bereichen (AbrB) und irgendwie in die Phosphatregulation involvierten Bereichen (PhoU) findet sich ausschließlich in archaealen Genomen (SMART-Suche mit der OE1681F-Sequenz nach Proteinen mit ähnlicher Domänen-Organisation bzw. -Zusammensetzung).

Die Mikroarray-Analyse zeigte für drei PhoU-Homologe eine phosphatabhängig variierende Genexpression. Das vierte, nicht regulierte PhoU-Homolog OE2128F ist gleichzeitig das Protein mit der schwächsten Konservierung des PhoU-Motivs. OE1681F sitzt genau am anderen Ende der Skala. Unter den AbrB-PhoU-Chimären besitzt es die stärkste Konservierung sowohl des AbrB/SpoVT-Bereichs als auch des PhoU-Teils. Ausserdem zeigt dieses Gen eine ähnliche Kinetik wie der stark induzierte Pst1-Transporter.

Zusammengefasst: (i) die phosphatabhängige Genexpression benötigt keine klassischen Zwei-Komponenten Systeme, (ii) in *H. salinarum* existieren mehrere AbrB-PhoU-Chimären mit wahrscheinlich DNA bindenden Bereichen und (iii) einige davon sind selbst phosphatabhängig reguliert. Die Hinweise verdichten sich also, dass eines der AbrB-PhoU-Homologen der Schalter des Pho-Regulons von *H. salinarum* darstellt. Aufgrund der Sequenz- und Regulationsähnlichkeit von OE1681F und OE4476R ist eine funktionelle Redundanz hier eher wahrscheinlich als auszuschließen. Sollte sich die Hypothese der Phosphatregulation über diese Chimären bestätigen, würde dies eine für Archaeen exklusive Steuerung des Pho-Regulons darstellen.

## 4.3 Die Phosphattaxis von *H. salinarum*

### 4.3.1 Phosphattaxis im Prokaryotenreich

*H. salinarum* ist nicht nur der dritte Prokaryot, bei dem eine phosphatabhängige Chemotaxis gefunden wurde, sondern gleichzeitig das erste Archaeon überhaupt mit dieser Fähigkeit. Damit reiht es sich neben den beiden Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter cloacae* ein [59, 71]. Deren Taxien werden erst durch Phosphatmangel induziert und von dem Zwei-Komponenten System CheA-CheY vermittelt, was mit der vorliegenden Arbeit auch für *H. salinarum* bestätigt werden konnte.

Während die Sensoren in *E. cloacae* bislang unentdeckt blieben, identifizierten Wu *et al.* gleich zwei Transducerproteine in *P. aeruginosa* [151]. Das konstitutiv transkribierte CtpH erkennt dabei Phosphatquellen mit 5mM oder höheren Konzentrationen. CtpL hingegen kann nur Phosphatquellen von etwa 10-100 $\mu$ M lokalisieren, zudem wird seine Biosynthese erst durch Phosphatmangel induziert.

Die Sensorbereiche dieser Proteine besitzen keine nennenswerten Homologien zueinander, geschweige denn zu einem der halobakteriellen Transducerproteine. Damit handelt es sich wahrscheinlich um analoge, also unabhängig voneinander hervorgegangene, chemotaktische Sensoren.

In *E. cloacae* funktioniert die Phosphattaxis nur mit einem intakten Phosphat-ABC-Transportsystem (Pst) [71]. Diese Beobachtung spricht dafür, dass das hochspezifische Phosphatbindeprotein des Pst-Transporters in einer zweiten Funktion mit dem Taxisensor wechselwirkt. Ein seit langem bekanntes Beispiel solch einer Doppelfunktion ist das Maltosebindeprotein in *E. coli* [155]. Weiterhin wird für den konstitutiv transkribierten Sensor CtpH ein posttranskriptioneller Mechanismus angenommen, durch den das Pst-System die Translation unter phosphatgesättigten Bedingungen verhindert, da  $\Delta$ Pst-Mutanten auch ohne Phosphathunger eine Taxis auf 10mM anorganisches Phosphat zeigen [151].

### 4.3.2 Auslöser und Sensoren der halobakteriellen Phosphattaxis

Aus der Untersuchung von *H. salinarum*  $\Delta$ *aph* geht zweifellos hervor, dass anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) der Auslöser der Phosphattaxis ist. Denn gleichgültig wo es detektiert wird, nur  $P_i$  erhöht in diesem Stamm sowohl die extra- als auch intrazelluläre Phos-

phatkonzentration und löst damit eine Taxis aus (Abb. 3.38, S. 63 und Tab. 3.9, S. 64).

Die sich daraus unmittelbar ergebende Frage lautet, ob ein Transducerprotein dieses winzige Molekül selbst bindet oder dazu die Hilfe eines zusätzlichen Bindeproteins (BP) in Anspruch nimmt. Beispiele eines solchen Zusammenspiels finden sich gleich zwei in *H. salinarum*, BasB und CosB. Diese BPs binden verzweigte Aminosäuren bzw. kompatible Osmolyte und wechselwirken anschließend mit ihrem jeweiligen Transducer [64]. Die bisher vorliegenden Kristallstrukturen von Bindeproteinen zeigen zwei aneinander gelagerte globuläre Domänen, in deren Kluft sich die Ligandenbindetasche befindet [102].

Abgesehen von der  $P_i$ -Spezifität der Taxis ist nicht zweifelsfrei festzustellen, wo die Überwachung der Phosphatkonzentration stattfindet. Die konstante Orientierung innerhalb des Phosphatgradienten (Abb. 3.34, S. 59) bei 100-200  $\mu$ M spricht auf den ersten Blick für die Messung extrazellulären Phosphats. Diese Schlussfolgerung stützt sich auf die Beobachtung, dass die  $\Delta aph$ -Mutante, welche Organophosphate nicht zu  $P_i$  degradieren kann, nur noch bei  $P_i$  Taxisringe zeigt (Abb. 3.38, S. 63).

Der Vorteil der Observation des externen Phosphats liegt in der kurzen Ansprechzeit des Systems auf Veränderungen. Fluktuationen der Konzentration können unmittelbar erkannt und in eine gerichtete Zellbewegung umgesetzt werden, wohingegen die interne Detektion zunächst den Import des Phosphats erfordert. Weiterhin bliebe die intrazelluläre Konzentration trotz des Imports zunächst niedrig, da in hungernden Zellen anabolische Prozesse „frisches“ Phosphat sofort verbrauchen würden.

*H. salinarum* besitzt zwei extrazelluläre  $P_i$ -Bindeproteine, die jeweils Teil der  $P_i$ -spezifischen ABC-Transportsysteme Pst1 und Pst2 sind. Wie bereits für *E. cloacae* und *P. aeruginosa* vermutet, könnte eines der beiden BPs in zweiter Instanz mit einem Transducer interagieren. Zu dieser Idee passt, dass alle bekannten Bindeproteine ihre Liganden im mikromolaren Bereich binden [102]. Zur Erinnerung, die Taxisringe von *H. salinarum* treten ebenfalls im mikromolaren Bereich der Phosphatkonzentration auf.

Die Suche nach weiteren potentiellen  $P_i$ -BPs anhand konservierter Sequenzmotive der  $P_i$ -Bindetasche war leider erfolglos, da nur eine Hand voll Aminosäurereste das Phosphatmolekül koordiniert [146]. Zu allem Überfluß verteilen sich diese wenigen Reste auch noch über einen breiten Bereich des Proteins, sodass mit Hilfe bioinformatischer Methoden kein Informationsgewinn möglich ist.

Trotz der oben aufgeführten Bedenken gegen die Perzeption des intrazellulären anorganischen Phosphats, schließen die experimentellen Daten diese Möglichkeit nicht grundsätzlich aus.  $\Delta aph$ -Zellen wandeln aufgenommenes Glycerin-3-phosphat nicht quantitativ in  $P_i$  um, sondern akkumulieren es offensichtlich. Der Beweis für die Aufnahmefähigkeit ist dabei das Wachstum auf Glycerin-3-phosphat (Abb. 3.38, S. 63). Doch trotz der Aufnahme steigt der interne  $P_i$ -Vorrat nicht signifikant an (Tab. 3.9, S. 64) und die Zellen zeigen auch keine Taxis gegenüber Glycerin-3-phosphat.

Als Beispiel für die Steuerung der Chemotaxis über intrazelluläre Substratmengen sei hier die Arginintaxis genannt [128]. Im Hinblick auf das Phosphat wäre die interne Messung vielleicht auch von Vorteil, da sie den Verbrauch durch anabolische Prozesse berücksichtigt. Demnach sollte die Adaptation und damit die Verringerung der gerichteten Bewegung später einsetzen als bei externer Messung. Letztendlich ist auch unbekannt, wie schnell die Pst-Transporter verglichen mit der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Zellen das Phosphat in die Zelle pumpen. Man muss hier bedenken, dass Halobakterien etwa zehnmal langsamer schwimmen als Eubakterien. Pumpen die halobakteriellen  $P_i$ -Transporter also genauso schnell wie ihre bakteriellen Verwandten, füllt sich das Gesamtsystem *H. salinarum*-Zelle im Vergleich zu einer Bakterienzelle mit der zehnfachen Menge Phosphat pro zurückgelegter Wegstrecke.

### 4.3.3 Vereinbarkeit mit der Transkriptomanalyse und Erklärung der Ringwanderung

Der Umstand, dass die Phosphattaxis nur bei Zellen im Hungerzustand auftritt, aber bei der Transkriptomanalyse kein interessanter Transducer reguliert gefunden wurde, lässt sich mit interner wie externer Signaldetektion erklären. Ein membrangebundener, extern detektierender Transducer benötigt wahrscheinlich ein Bindeprotein. Die dazu geeigneten  $P_i$ -Bindeproteine der ABC-Transporter Pst1 und Pst2 werden durch Phosphatmangel induziert und können somit auch erst bei Phosphatmangel für die Chemotaxis zur Verfügung stehen. Ein cytoplasmatischer Transducer, der die interne Phosphatkonzentration misst, könnte bei normalen intrazellulären Phosphatkonzentrationen von 40mM gesättigt sein und würde erst durch das Absinken auf 10mM „aktiviert“.

Auch der ungewöhnliche Phänotyp der wandernden Ringe kann sowohl mit der Detektion von internem als auch von externem Phosphat erklärt werden. Bei der internen

Messung verhindert die erwähnte Sättigungsgrenze des Sensors eine Taxis nach dem Auffüllen des Phosphatvorrats. Die potentiellen, für die externe Messung benötigten Bindeproteine besitzen sicherlich ebenfalls eine Sättigungsgrenze, beispielsweise von einigen hundert Mikromolar, oberhalb derer keine Unterschiede mehr in den Phosphatkonzentrationen eines Gradienten wahrnehmbar wären.

## 4.4 Die PAS-Domäne von OE3855R

### 4.4.1 PAS-Domänen allgemein und in *H. salinarum*

PAS-Domänen sind überaus zahlreich und ubiquitär auf Spezies aller Reiche verteilt. SMART zählt gegenwärtig ca. 5400 von ihnen. *H. salinarum* enthält 29 PAS-Domänen, 72% davon in Histidinkinasegenen. Die restlichen 8 PAS-Domänen befinden sich in Transkriptionsfaktoren und Chemotaxissensoren. Warum sich die PAS-Domänen ausschließlich auf Proteine verteilen, die der Signaltransduktion zugeordnet werden können, geht aus ihrer Funktion hervor. Sie dienen als Sensoren für so unterschiedliche Signale wie Licht, Änderungen von Redoxpotentialen, Sauerstoff oder Spannungsschwankungen [132]. Die Detektion der Signale verändert die Protein-Protein-Wechselwirkungen der PAS-Domänen, was zu Konformationsänderungen bis hin zu Änderungen der Oligomerisierung führt. Möglicherweise erklärt diese Eigenschaft, warum in den 18 halobakteriellen Sensoren der Chemotaxis (Htr) nur 4 PAS-Domänen anzutreffen sind. Kristallstrukturen haben gezeigt, dass diese Proteine auch ohne Ligandenbindung als Dimere vorliegen [61]. Somit benötigen sie auch nicht die oligomerisierende Wirkung der PAS-Domänen. Vielleicht ist der Grund für die geringe Zahl von PAS-Domänen in den Htr aber auch viel trivialer. Die meisten bisher funktionell charakterisierten Htr erkennen kleine Biomoleküle wie Aminosäuren oder Glycin-Betain, doch für diese Aufgabe hat die Natur die PAS-Domänen einfach nicht geschaffen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit PAS-Domänen, um den funktionell nicht charakterisierten Histidinkinasen (HK) von *H. salinarum* Funktionen zuzuordnen. Die Arbeit konzentrierte sich auf Häm bindende PAS-Domänen. Dies geschah aus mehreren praktischen Erwägungen heraus: (i) die Fähigkeit zur Hämbindung ist experimentell leicht nachweisbar, (ii) die nachgewiesene Hämbindung engt das Spektrum der Stimuli, die die entsprechende PAS-Domäne detektiert, stark ein und (iii) nur eine einzelne halo-

bakterielle PAS-Domäne ähnelt den wenigen biochemisch charakterisierten bakteriellen Häm-PAS-Domänen (Abb. 3.43, S. 69). Dabei handelt es sich um die PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R (PAS3855), die etwa gleiche Abstände zu allen untersuchten Häm-PAS-Domänen aufweist. Sie enthält einen Histidinrest an der gleichen Position, wo auch in FixL der Häm-Kofaktor bindet. Damit besitzt PAS3855 sehr gute Voraussetzungen, um tatsächlich Häm binden und koordinieren zu können. Darüber hinaus kennt man in *H. salinarum* bereits einen Häm bindenden Htr und weiss von der Existenz von Cytochrom B [52, 46]. Der Htr HemAT enthält ein Häm des Typs B in einer globinähnlichen Faltung und vermittelt das aerophobe Schwimmverhalten von *H. salinarum*.

#### 4.4.2 Die Expression von PAS3855

PAS3855 wurde mit einer Hexahistidinmarkierung (Histag) versehen und heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Untersuchung dieses Polypeptids sollte klären, ob die PAS-Domäne von OE3855R den Vorhersagen entsprechend tatsächlich einen Häm-Kofaktor aufnehmen kann. Die Expression erbrachte zum großen Teil lösliches PAS3855 und nur geringe Mengen unlöslicher „inclusion bodies“ (Abb. 3.44, S. 70). Weiterhin zeigte die Abundanz des Faltungshelfers DnaK, dass selbst die lösliche PAS3855-Form wahrscheinlich nicht korrekt gefaltet ist. Dies verwundert nicht sehr, da *H. salinarum* die „salt-in“-Strategie anwendet, um dem enormen osmotischen Druck seines Habitats standzuhalten. Die intrazellulären Salzkonzentrationen in *E. coli* liegen deshalb weit unter den molaren Konzentrationen in *H. salinarum*.

Dazu passt auch die Beobachtung, dass die gereinigte PAS-Domäne nur sehr wenig Häm enthält. Nun kann man argumentieren, die zur Reinigung verwendete Histidinmarkierung (Histag) beeinflusst das Bindevverhalten von Häm an den Histidinrest in der vorgesehenen Bindetasche. Wäre der Histag aber *per se* in der Lage Häm zu binden, müssten alle damit exprimierten Proteine Hämverunreinigungen mitschleppen, was *de facto* nicht zu beobachten ist. Neben dieser grundlegenden Überlegung beschrieben aber auch mehrere Gruppen, dass die von ihnen verwendeten Histags keinen Einfluss auf die Eigenschaften der Hämbindung der untersuchten Proteine haben [153, 52].

Daher geht der in Spuren enthaltene Kofaktor von PAS3855 auf eine spezifische Wech-

selwirkung zwischen dem Faktor und der Domäne zurück. Photometrische und massenspektroskopische Untersuchungen identifizierten den Kofaktor als Häm<sub>B</sub>. Die genaue Kenntnis des Hämtyps erlaubte überhaupt erst die Rekonstitution der Holodomäne. Auch die Phosphodiesterase 1 aus *Acetobacter xylinum* (AxpDEA1) sowie die PAS-B-Domäne des eukaryotischen neuronalen PAS protein 2 (NPAS2) bauen nur geringe Mengen Häm ein, wenn man sie in *E. coli* exprimiert. Diese Proteine wurden daher ebenso durch nachträgliche Zugabe von Häm rekonstituiert [20, 67].

Laut den durchgeführten Gelfiltrationen lagert sich das Apo-Polypeptid PAS3855 überwiegend zu Multimeren von je fünf Domänen zusammen. Daneben existiert noch eine kleine Menge von ca. 11% (Berechnung anhand der A<sub>280</sub>) in dimerer Form (Abb. 3.47, S. 72). Die Pentamerbildung stimmt mit der bereits geäußerten Schlussfolgerung überein, dass heterolog exprimiertes Apo-PAS3855 nicht korrekt faltet. Auch für die oben erwähnte PAS-B-Domäne von NPAS2 wurde eine hohe Multimerisierung beobachtet. Die Apodomäne liegt hier in einer Form größer als ein Hexamer vor. Diese Konfiguration ändert sich allerdings auch nach der Rekonstitution mit Häm nicht [67]. Die Autoren halten dieses Verhalten für ein Artefakt der Expression der PAS-B-Domäne ohne weitere angrenzende Aminosäuren. Diese Schlussfolgerung lässt sich allerdings nur schwer nachvollziehen, da das exprimierte PAS-Polypeptid eine Länge von 175 Aminosäuren (AS) besitzt und damit ca. 40 AS länger als eine komplette PAS-Domäne ist.

#### 4.4.3 Die Oligomerisierung von PAS3855

Im vorliegenden Fall verursacht die Zugabe des Häm-Kofaktors jedoch eine Änderung der Domänen-Multimerisierung. Die rekonstituierte, in der Fe<sup>3+</sup>-Form vorliegende PAS3855-Holodomäne (met-PAS3855) bildet Tetramere. Diese Änderung der Größe von PAS3855-Komplexen nach Hämzugabe spricht für eine Kofaktor induzierte Faltung von PAS3855 in eine andere, vermutlich korrekte Konformation. Beispiele für solche Kofaktor induzierten Faltungen sind Flavodoxin und Cytochrom C, welche sich erst in Anwesenheit ihrer Kofaktoren FMN bzw. Häm<sub>C</sub> korrekt falten [17, 29].

Der gängigen Lehrmeinung zufolge, erfüllen PAS-Domänen ihre Funktion durch gegenseitige Wechselwirkungen. Wirft man einen Blick in die Literatur, so stößt man auf

unterschiedlichste Befunde bezüglich der Oligomereigenschaften weiterer Häm bindender PAS-Domänen. NPAS2-PAS-B bildet, wie bereits erwähnt, Strukturen größer als ein Hexamer. *E. coli* Dos (EcDos) enthält zwei PAS-Domänen, von denen nur PAS-A Häm bindet. Isoliert exprimiertes EcDos-PAS-A liegt in der met-Form als Dimer vor [26, 113]. Vollängen-EcDos bildet hingegen Tetramere, unabhängig von der Oxidationszahl des Häm-Eisenions [153]. Die persistente Tetramerisierung von EcDos beisst sich im übrigen nicht mit der Beobachtung, dass Histidinkinasen nur als Dimere funktionieren. EcDos ist nämlich keine HK, sondern besitzt eine Phosphodiesterasedomäne C-terminal von seinen beiden PAS-Domänen. Für FixL aus *Sinorhizobium meliloti* sieht die Lage schon wieder völlig anders aus. Die isolierte PAS-Domäne liegt monomer vor, wohingegen das Protein inklusive der HK-Domäne dimerisiert (in beiden Fällen wurden nur die Fe<sup>3+</sup>-Formen untersucht) [33, 34].

Den Tetramer von met-PAS3855 könnte man auch als Dimer von Dimeren bezeichnen. Die Reduktion des Häms unterbindet demnach die „zweite“ Dimerisierung. Nach Zugabe von Natriumdithionit geht PAS3855 in eine dimere (76%) sowie pentamere (10%) Form über (Abb. 3.51, S. 77). Daneben liegen aber noch 14% des detektierten Häms in einer nicht identifizierten Spezies mit kleiner gleich 9kDa Größe vor. Betrachtet man nur die Dimere und Pentamere, so beträgt deren Verhältnis etwa 9 zu 1. Diese starke Dimerbildung nach Zugabe von Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> legt eine Änderung der Tertiärstruktur von PAS3855 abhängig von dem Oxidationszustand des Häm-Kofaktors nahe. Da Histidinkinasen als Dimere aktiv sind, darf man auf eine redoxabhängige Kinaseaktivität von OE3855R spekulieren.

Generell zeigt die isoliert exprimierte PAS-Domäne von OE3855R eine zügige Veränderung der Quartärstruktur. Zwar ändert sich das Spektrum der Holodomäne auch nach mehreren Wochen Inkubation bei 4°C nicht. Die Multimerisierung von Holo-PAS3855 ändert sich hingegen bereits 24h nach dem Abschluss der Rekonstitution (also 24h nach Abschluss der Übernachtdialyse) von dem Tetramer in Richtung Pentamer (Daten nicht gezeigt). Diese Instabilität der Multimerisierung könnte erklären, warum bislang alle Versuche, die Domäne zu kristallisieren, erfolglos blieben.

#### 4.4.4 Die Wechselwirkungen zwischen Häm<sub>B</sub> und PAS3855

Die Auswertung der Absorptionsspektren der PAS3855-Domäne ergab eine sechsfach koordinierte low-spin Konfiguration für met- und deoxy-PAS3855 (Abb. 3.49, S. 74). Aus diesem Befund lässt sich auf ein oktaedrisches Ligandenfeld schließen, welches das Häm-Eisenion in den Oxidationszuständen II und III umgibt. Damit zeigt PAS3855 große Ähnlichkeit zu EcDos (Abbildung 3.50, S. 75). SmFixL scheidet dagegen als Vorlage zur Abschätzung der Funktionsweise aus, denn hier liegen die zentralen Fe-Ionen der met- und deoxy-Formen in high-spin Zuständen vor.

Der physiologische Zweck der Phosphodiesterase (PDE)-Aktivität von EcDos ist noch völlig unerforscht. Anfänglich von Delgado-Nixon *et al.* als Sauerstoffsensor (*Direct oxygen sensor*) beschrieben [26], legte inzwischen eine Konkurrenzgruppe um Toru Shimizu Daten vor, die EcDos eine redoxabhängige Funktion zuordnen. Die oxy-Form ist instabil und geht relativ schnell in die met-Form über [113]. Sowohl oxy- als auch met-EcDos besitzen nur einen Bruchteil der PDE-Aktivität von deoxy-EcDos.

Der permanente low-spin Zustand des Eisenions geht auf das mehrfach beschriebene oktaedrische Ligandenfeld zurück. Kristallstrukturen zeigen in met-EcDos ein Wassermolekül als distalen axialen Liganden. Die Reduktion zu deoxy-EcDos führt zu einer Verdrängung des Wassers durch Methionin-95. Diese Veränderungen lösen eine scherenartige Bewegung des PAS-Dimers aus, welche den Abstand der PDE-Domänen zweier EcDos-Proteine und somit die PDE-Aktivität kontrolliert [70]. Bei genauer Betrachtung der Aminosäuresequenz von PAS3855 stellt man fest, dass in der gleichen Region, in der sich das Met95 von EcDos befindet, auch in PAS3855 ein Methionin liegt (Met101). Die Konstruktion und spektroskopische Untersuchung einer Met101Ala-Mutante sollte es erlauben, die Wechselwirkung dieser Aminosäure mit dem Häm-Eisenion zu beweisen oder zu widerlegen.

Ein weiterer Anhaltspunkt für die mögliche Redoxsensorfunktion von PAS3855 ist das Fehlen eines oxy-Spektrums. Nach Belüftung der mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> reduzierten Lösung geht das deoxy-Spektrum sofort in das met-Spektrum über. Sollte PAS3855 ein Sauerstoffsensor sein, würde man jedoch eine höhere Stabilität von oxy-PAS3855 erwarten. Den Beweis für die sofortige Bildung von met-PAS3855 nach Belüftung liefert die Zugabe der Oxidationsmittel K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> bzw. K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, da sich das Spektrum der belüfteten

PAS-Domäne dadurch nicht verändert.

Sicher ist dem Leser nicht entgangen, dass die Soretbande des Häms direkt nach der Expression und Proteinreinigung ein anderes Maximum besitzt (397nm), als die Soretbande der rekonstituierten Holodomäne (414nm). Diese Beobachtung kann wiederum mit der unvollständigen Faltung der Apo-PAS-Domäne erklärt werden. Zur Wiederholung, bei der Reinigung bleibt DnaK abundant und Apo-PAS3855 bildet Pentamere. Während die Zugabe von milden Oxidationsmitteln zu Holo-PAS3855 keinen Effekt hat, führt die Behandlung mit  $H_2O_2$  zu einer sehr starken Abnahme der Absorption, verbunden mit der Verschiebung der Soretbande zu 397nm (Daten nicht gezeigt). Das applizierte  $H_2O_2$  denaturiert offensichtlich das Polypeptid, was die elektronische Umgebung des Häms verändert. Diese Änderung bezieht sich im Wesentlichen auf die Wechselwirkung des Eisenions mit den axialen Liganden.

#### 4.4.5 Die physiologische Bedeutung von OE3855R

Besitzt OE3855R tatsächlich eine redoxgesteuerte Signalfunktion, so erweitert sich das Spektrum der Redoxmediatoren weit über den Sauerstoff hinaus. Denn im Gegensatz zu FixL, wo die Sauerstoffbindung den Schalter darstellt, würde der Sauerstoff hier nur als eines von vielen oxidierenden bzw. reduzierenden Agenzien der Zelle die Signalfunktion beeinflussen. Der unter aeroben Bedingungen vorhandene Sauerstoff beeinflusst zwar das Redoxpotential einer Zelle in nicht unerheblichem Maße, doch andere oxidierende Agenzien können auch unter anaeroben Bedingungen das zelluläre Potential verändern.

Mit der Konstruktion des Deletionsstamms sollte der Histidinkinase OE3855R eine Funktion in der Physiologie von *H. salinarum* zugeordnet werden. Es erfolgte eine phänotypische Beschreibung des Wachstums unter vier verschiedenen Bedingungen im Vergleich zu dem Wildtyp. Doch weder bei der aeroben noch einer der drei anaeroben Wachstumsbedingungen (mit Licht, DMSO bzw. Arginin als Energieträger) unterschied sich der  $\Delta$ OE3855R-Stamm von dem wt-Stamm. Die Wachstumsbedingungen waren dabei so gewählt, dass ein möglichst großer Bereich von oxidierenden bis hin zu reduzierenden Bedingungen abgedeckt wurde, der auch in der natürlichen Umgebung des Organismus herrschen kann. Das Überleben von *H. salinarum* hängt unter diesen Bedingungen von speziellen Energiekonvertern ab: Bacteriorhodopsin, DMSO-Reduktase

bzw. Arginintransporter und -deiminase. Für alle drei Systeme sind die regulierenden Transkriptionsfaktoren bereits bekannt und offensichtlich unabhängig von OE3855R [41, 87, 109]. So verwundert es auch nicht mehr, dass der  $\Delta$ OE3855R-Stamm zumindest noch seine grundlegende Energieversorgung aufrecht erhalten kann.

Das Ausbleiben eines Phänotyps mag mehrere, bereits im Ergebnisteil besprochene Ursachen haben: die Regulation nichtessentieller Gene, die De-Repression von Genen, ungünstig gewählte Wachstumsbedingungen oder die Funktionslosigkeit von OE3855R. Ein Blick in die Literatur offenbart, dass nahezu alle funktionell untersuchten HK nichtessentielle Zielgene regulieren. Eine der wenigen Ausnahmen ist das ZKS YycFG aus *B. subtilis*, welches wichtige Gene für die Zellteilung und die Zellwandsynthese reguliert [53]. Mehrere ZKS, beispielsweise ArcAB und NarLX aus *E. coli*, besitzen neben einem Satz an aktivierten Genen noch einen weiteren Satz an Genen, dessen Transkription sie hemmen [115, 141]. Man findet aber auch Zwei-Komponenten Systeme, die ihre Zielgene ausschliesslich negativ regulieren. Genannt seien hier CutRS aus *Streptomyces lividans* (Repression der Synthese eines Polyketid-Antibiotikums) und CovRS aus *Streptococcus pyogenes* (Repression mehrerer Virulenzfaktoren) [21, 38].

Vielleicht blieb die Suche nach einem Phänotyp deshalb erfolglos, weil bislang am falschen Ende des Redoxbereichs gesucht wurde. Physiologisch betrachtet kann nur spekuliert werden, ob PAS3855 im lebenden Halobakterium überwiegend in der  $\text{Fe}^{2+}$ - oder  $\text{Fe}^{3+}$ -Form vorliegt. Das Habitat von *H. salinarum*, 4M NaCl und 40°C Wassertemperatur, besitzt zumindest eine geringe Sauerstofflöslichkeit. Darüber hinaus wird in die Zelle gelangener Sauerstoff schnell veratmet. Daran sieht man schon, dass der Redoxbereich durch anaerobe Wachstumsbedingungen zum negativen Ende hin ausgereizt ist. Bei aerobem Wachstum dürfte jedoch die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{KMnO}_4$  den Oxidationsstress für *H. salinarum* enorm verstärken. In jedem Falle entlocken wohl erst zukünftige Mikroarray-Analysen dem Zwei-Komponenten System OE3854R-OE3855R seine Geheimnisse.



## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Stämme

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>E.c.</i> DH5 $\alpha$	-	Invitrogen
<i>E.c.</i> TOP10 OneShot	-	Invitrogen
<i>E.c.</i> M15 pREP4	-	Qiagen
<i>E.c.</i> M15 His-PAS3855	<i>E.c.</i> M15 pREP4 mit pQE30-PAS3855	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE2088F	Deletion durch pAW- $\Delta$ 2088	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE2086F	Deletion durch pAW- $\Delta$ 2086	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE2333R	Deletion durch pAW- $\Delta$ 2333	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE2334R	Deletion durch pAW- $\Delta$ 2334	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE3855R	Deletion durch pAW- $\Delta$ 3855	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE3854R	Deletion durch pAW- $\Delta$ 3854	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE7042R	Deletion durch pAW- $\Delta$ 7042	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE2712R	Deletion durch pAW- $\Delta$ 2712	diese Arbeit
<i>H.s.</i> R1 $\Delta$ OE5192R	Deletion durch pAW- $\Delta$ 5192	diese Arbeit
<i>H.s.</i> Flx15 $\Delta$ cheY	-	[108]
<i>H.s.</i> S9 $\Delta$ cheB	-	Wilfried Staudinger (unveröffentlicht)

#### 5.1.2 Plasmide

##### Herstellung von Deletionsplasmiden für *H. salinarum*

Die Strategie zur Herstellung von halobakteriellen Deletionsstämmen ist in Abb. 5.1 skizziert. Zunächst wurden 300 bis 500bp lange DNA-Fragmente der unmittelbar stromauf- und stromabwärts liegenden Bereiche des entsprechenden Gens per PCR amplifiziert und jeweils mit einer (BamHI- o. NheI-) bzw. XbaI-Schnittstelle versehen. Weiterhin fügten die Primer den beiden PCR-Fragmenten 10bp des jeweils anderen Fragmentes an, so dass durch eine zweite PCR ein zusammenhängendes DNA-Fragment erzeugt werden konnte. Dieses wurde mit (BamHI o. NheI) und XbaI inkubiert. Die so geschnittene DNA konnte dann mit pMKK100 (ebenfalls (BamHI o. NheI) und XbaI inkubiert) ligiert und in *E. coli* transformiert werden.

Zur heterologen Expression in *E. coli* wurden folgende Plasmide benutzt:

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pQE30	-	Qiagen
pQE30-PAS3855	pQE30 mit aa5-150 von OE3855R	diese Arbeit

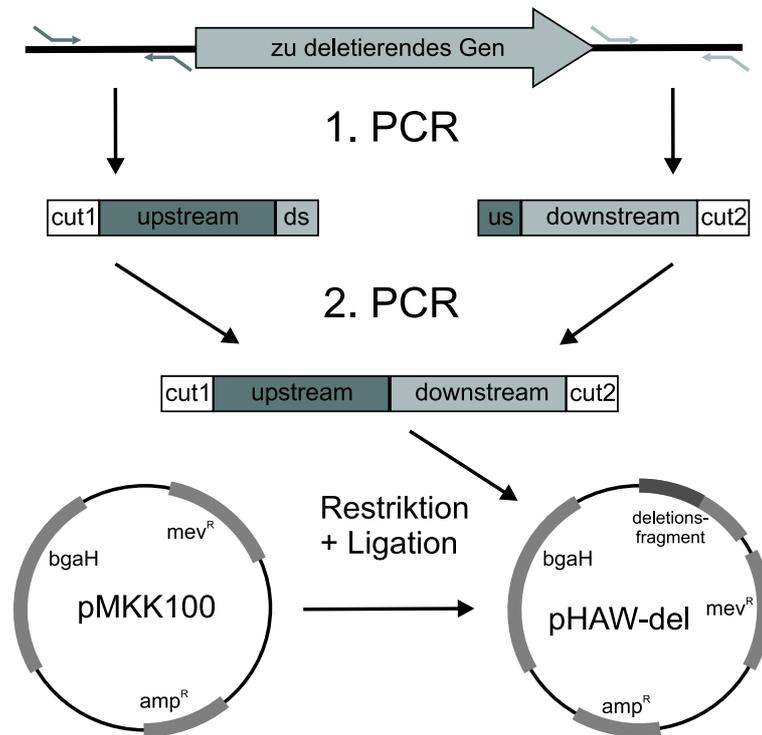


Abbildung 5.1: Herstellung von Plasmiden zur Deletion von Genen in *H. salinarum*.

Zur Herstellung von Deletionsmutanten in *H. salinarum* wurden folgende Plasmide benutzt:

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pMKK100	-	[63]
pHAW- $\Delta$ 2088	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE2088F	diese Arbeit
pHAW- $\Delta$ 2086	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE2086F	diese Arbeit
pHAW- $\Delta$ 2333	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE2333R	diese Arbeit
pHAW- $\Delta$ 2334	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE2334R	diese Arbeit
pHAW- $\Delta$ 3855	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE3855R	diese Arbeit
pHAW- $\Delta$ 3854	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE3854R	diese Arbeit
pHAW- $\Delta$ 7042	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE7042R	diese Arbeit
pHAW- $\Delta$ 2712	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE2712R	diese Arbeit
pHAW- $\Delta$ 5192	pMKK100 mit Fragmenten vor/hinter OE5192R	diese Arbeit

Das Fragment für die Ligation in den pQE30-Vektor wurde durch PCR von genomischer DNA aus *H. salinarum* mit den Primern AviN-3855PAS-for und AviN-3855PAS-rev hergestellt. Nach anschließender Restriktion mit SacI und PstI erfolgte die Ligation in das identisch behandelte Plasmid pQE30. pQE30-PAS3855 wurde in *E. coli* M15 pREP4 transformiert. Somit exprimiert dieser Stamm nach IPTG-Zugabe ein N-terminal 6xHis-markiertes Polyprotein mit den Aminosäuren 5-150 des Gens OE3855R.

### 5.1.3 Oligonukleotide

Zur Konstruktion und Sequenzierung von Plasmiden zur Herstellung von Deletionsmutanten in *H. salinarum* wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

<i>Oligonukleotid</i>	<i>5'- Sequenz -3'</i>
3854-front5'	GCTAGGATCCGACGACGACGCGCTGACGGATC
3854-front3'	GTCCGCGGCTCGGACTGGTCCGGGTGTGTCTCG
3854-back5'	CGACCAGTCCGAGCCGCGACAGCAGATCCTCG
3854-back3'	GCGCTCTAGAGCCAGGTATCGAGCGCTGAATCG
2086-front5'	GCTGGATCCCGTCTTTCTCCGTGGAGTTGAACG
2086-front3'	CATTCGTCAGACTGGCCGTTCTGTGCTACGTTGG
2086-back5'	AACGGCCAGTCTGACGAATGCACGTTACCCGGA
2086-back3'	GCGCTCTAGACGATCATCTGTGCGGCGATGCTG
2334-front5'	GCGCGGATCCTCTGCGTCCAGTTCGATGGCGTCCG
2334-front3'	CCGTCGGGCGGTGATGGGAGTGAACGTATTTATGG
2334-back5'	CCATCACCCGCCGACGCGGACACTGATGACG
2334-back3'	CGCTCTAGAGGCGTCGAGGCGCTGGATCCG
2333-front-5'	GCTAGGATCCGACATCTCCGCGCCGCGCGCG
2333-front-3'	TCACCACCGCTCGAGTTCCGACCCGACGCGC
2333-back-5'	CGGAACTCGAGCGGTGGTGATTGCGGCCGC
2333-back-3'	GCGCTCTAGAGACGTCAAAACGGCGTACAGCGG
2088-front5'	GCGCGGATCCCATCAGGGGCTGCTGCCCTCG
2088-front3'	ACCGGGACGCGGATGGCCGACCCGAGGTCC
2088-back5'	TCGGCCATCCGCGTCCCGGTGCTAGCTTAGGC
2088-back3'	GCGTCTAGACTCACTGTGGATGGGACCCGCGAGC
3855-front-for	GATCGCTAGCTGGCTGTACATTAACGATCGCCCACCAAG
3855-front-rev	GTGAATCGCGCGTTCGAGACCCGGTATCAGTGTCGG
3855-back-for	GGTCTCGACGCGCGATTACAGATCCACACACAATGAC
3855-back-rev	CGTATCTAGAGACGGGCTTCTGGATGTACTCGTCCG
7042-front-for	CGTAGCTAGCGCGTACGCGGCCATCCTGTGGGCC
7042-front-rev	CCCCAACAAGGCGGTTCGAACACGGCGGGGAGG
7042-back-for	GTTCGACCGCCTTGTTCCGGCCATACGCCATACCAGG
7042-back-rev	CGTATCTAGACTCGTACTCGACCAATAGCCATGCTTCCG
4283-front-for3	GATCGCTAGCGTGGGTGACACGGGAGGGCGTC
4283-front-rev3	ACACGGCACCGATCCCTGACCCGCGGTGCTAGTCCG
4283-back-for3	GTCAGGGATCGGTGCCGTGTGACTGAACTGCTATCC
4283-back-rev2	CGTATCTAGACCGTTCTGTATCGTAGGAATTGGTTATGGC
5192-front5'	GCGCGGATCCACGTGCAACAGGGTCACGATCC
5192-front3'	GCGCCGACGCGTACTCTGTGGTGTGCGGTG
5192-back5'	ACAGAGTCACGCTGCGGCGCTCGGTGTGT
5192-back3'	GCGCTCTAGAGTGTGTCTGTGACCCAGCTC
2712-front-for2	CGATGCTAGCGGACCGAAGTCACCCGCCAGACCG
2712-front-rev2	CACGGTGGGCGCAGTACGTCCGAGGTGGTGGTGGG
2712-back-for2	GACGTAAGTCCGCCCACCGTGAGCGACTGACCACAC
2712-back-rev2	GTACTCTAGACGAGCAGTTCCGGCCAGCCCGTCCG
pHAW01-seq2-for	GTCTGAGCACCGATTGATATC
pHAW01-seq2-rev	CGCGGAAACGATGAAAATGCCG

Zur heterologen Expression von halobakteriellen Proteindomänen wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

<i>Oligonukleotid</i>	<i>5'- Sequenz -3'</i>
AviN-3855PAS-for	CGCTTAATTAACATATGACCCGAGCTCGGGCCGTCCGCCGACACTG
AviN-3855PAS-rev	TTAGTTAGTTACCGGATCCCCTGCAGTTAGTCTTGGAGCGATTCCGAGCG TGG

Zur Durchführung von RT-qPCR-Experimenten wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

<i>Oligonukleotid</i>	<i>5'- Sequenz -3'</i>
ugpA-qRT-for	CCTCTACTATCCGGGCCTCG
ugpA-qRT-rev	TTGAGGTCAGCAGCTGAACG
ugpB-qRT-for	TCACTCGTGGATGCAGATCG
ugpB-qRT-rev	AAGTTAGTCTCCGTGGGTCGG
ugpQ-qRT-for	CGTCGAACTCAAATCCCCC
ugpQ-qRT-rev	ACGACGAGAACATCACGGG
phoX1-qRT-for	CAGCCGTGAGATCGTTGACA
phoX1-qRT-rev	CCGACCAAGTTTCGTGATCTCC
pstC1-qRT-for	AAGGCGGTGACGTTTCTGAT
pstC1-qRT-rev	CGCACGAGTAAGAACGCAAC
pstC2-qRT-for	GGGCATCGTGGAGTTCCTTA
pstC2-qRT-rev	GATCATCACCATCAGCGTCG
aph-qRT-for	TGTTCAAGCCAGGAGAGCCAC
aph-qRT-rev	AGGTTGGGTTGTGTGTTCTCG
qRT-ipp-for	AAAGGCGAGCGGAACAAATA
qRT-ipp-rev	CCGACGGGTAATGGACGTT
qRT-1410F-for	TCTGTGACCTCTGCGAAGAATG
qRT-1410F-rev	TGCAGAAGGCTTTGGCGT
qRT-2299F-for	TGTTCCCTGACGAACAACCCC
qRT-2299F-rev	GGATCGCTGGAGGTACGTGA
qRT-5078F-for	GTACTCTCGACGACCCCTCGC
qRT-5078F-rev	GGTGTCTCGGATTCGAAAC
qRT-5132F-for	TCCCGGCGTTTCTGACC
qRT-5132F-rev	CCGCTCCACCGACGAG
qRT-4236F-for	TCATCCCGAGTTTCGCCAT
qRT-4236F-rev	GTACCCCGAGCCGATGATC
qRT-2113R-for	GAAACGATGGGCAGCGATAT
qRT-2113R-rev	GACAGGAAGATCACCGCGTC
RT-3855-for	CGAGATCCAGCTGTCCATCAC
RT-3855-rev	GTAGGCTTTCTGGCGGGAG
RT-3854-for	CGTAGTCGTCTTCGAGCCAGA
RT-3854-rev	CGCGATTCACGATCCACAC
fdx-qRT-for	GAGTACATCCTCGAAGCCCGC
fdx-qRT-rev	TGAGGATCTGCTGCATGTCC

Alle für diese Arbeit benutzten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Weiterhin kamen zur unspezifischen cDNA-Synthese Random Hexamer Primer (Promega) bzw. Random Nonamer Primer (CyScribe-Kit, Amersham Biosciences) zum Einsatz.

### 5.1.4 Antikörper

Zur Detektion von immobilisierten DNA-Fragmenten durch Southern Blot (siehe Abschnitt 5.4.11) wurden Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments von Roche Diagnostics verwendet.

### 5.1.5 Chemikalien

Agarose SeaKem LE (BioWhittaker)	Ampicillin (Roth)
Bacto Agar (Difco Laboratories)	Bacto Trypton (Difco Laboratories)
Bäckerhefe t-RNA (Roche Diagnostics)	Desoxynukleosidtriphosphate (Peqlab)
Dig Easy Hyb (Roche Diagnostics)	1-Methylimidazol (Fluka)
peqGOLD RNAPure (Peqlab)	RNaseZap (Ambion)
Triton-X100 (Carl Roth)	Protogel-Lösung (National Diagnostics)
TEMED (Biorad)	IPTG (Gerbu)
Bromphenolblau (Serva)	Coomassie R-250 (Serva)

Ethidiumbromid (Boehringer Mannheim) Blocking Reagent (Roche Diagnostics)

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Merck, Sigma oder ICN bezogen.

### 5.1.6 Enzyme, Proteine, Marker

BSA Fraktion V (Serva)	TaKaRa LaTaq (BioWhittaker)
Hot-Star Taq DNA-Polymerase (Qiagen)	Phusion DNA-Polymerase (Biometra)
CIP (New England Biolabs)	T4 DNA Ligase (Gibco BRL)
Thrombin (Pharmacia Biotech)	Superscript III (Invitrogen)
Superscript II (Invitrogen)	Restriktionsendonukleasen (NEB)
RNA 6000 Leiter (Ambion)	1kb DNA-Leiter (Gibco BRL)
100bp DNA-Leiter (MBI Fermentas)	1kb DNA-Leiter (MBI Fermentas)
DNA Molecular-Weight Marker VII, DIG-labeled (Roche Diagnostics)	
Benchmark His-tagged Protein Standard (Invitrogen)	
Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs)	

### 5.1.7 Kommerzielle Kits

CyScribe First-strand cDNA labeling kit (Amersham Biosciences)  
 Cy5-dUTP und Cy3-dUTP (Amersham Biosciences)  
 TURBO DNafree (Ambion) RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent)  
 DNafree (Ambion) QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)  
 BCA Protein Assay (Pierce) InVision His-tag In-gel stain (Invitrogen)  
 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)  
 CDPStar detection reagent (Amersham Biosciences)  
 LMW Gelfiltration Calibration Kit (Amersham Biosciences)  
 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

### 5.1.8 Sonstige Materialien

CMT-GAPS II Coated Slides (Corning)	Färbekästen mit Einsatz (Roth)
Hybri-Slip HS (Sigma)	Hybridisierungskammern (Corning)
MicroCon YM 30 (Millipore)	MultiScreen 96 PCR (Millipore)
Hybond N+ (Pharmacia Biotech)	Filterpapiere (Whatman)

### 5.1.9 Geräte

Zentrifugen: Tischzentrifuge Centrifuge 5415C (Eppendorf)  
 Tischzentrifuge Centrifuge 5417R (Eppendorf)  
 Sorvall RC 5C Plus Centrifuge (SS34) (Beckmann)  
 Optima LE-80K Ultracentrifuge (Ti60) (Beckmann)  
 Roto Silenta / RP (Hettich)  
 Rotixa 120R (Hettich)  
 Rotixa / KS (Hettich)

Photometer: Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter (Klett Manufacturing)  
 Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences)  
 Pharmaspec UV-1700 (Shimadzu)  
 Victor3 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer)

Gelsysteme: Agarosegel-Elektrophoresekammern (Werkstatt, MPIBC)

	Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent) XCell SureLock (Invitrogen) MightySmall SE250 (Hoefer) MightySmall Dual Gel Caster SE245 (Hoefer)
Waagen:	Analysenwaage HL52 (Mettler-Toledo) Laborwaage PB1502 (Mettler-Toledo)
Inkubatoren:	Brutschränke (Mettler) Multitron HT (Infors) Labshaker (Kühner) + MPI-Aufsatz Shaker 3033 (GFL) Wasserbad (GFL) Minifridge II (Boekel) Hybridisierungsöfen OV5 (Biometra) Heizblock BT3 (Grant) Thermostat 5320 (Eppendorf)
Rührer/Schüttler:	Vortex Genie 2 (Scientific Industries) Magnetrührer RO & RCT (Ikamag) Wipptisch WT16 (Biometra) 3D rocking plattform STR9 (Stuart Scientific)
Thermocycler:	GeneAmp PCR-System 9700 (Perkin Elmer) GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) Multi Cycler PTC-200 (MJ Research) Thermocycler T3 (Biometra)
Zellaufschluß:	Sonifier 450 (Branson) Sonifier Celldisrupter B15 (Branson)
FPLC:	SMART System (Pharmacia Biotech)
Chromatographie:	Superdex 75 (Pharmacia Biotech) Ni-NTA Superflow Agarose (Qiagen)
Autoklaven:	Varioklav (H+T Labortechnik) Autoklav 23 (Melag)
Elektroporationsgerät:	GenePulser (Biorad)
Videodokumentation:	Bio-Print Photodoc mit BIO-CAPT V.97 (Vilber Lourmat) Video Copy Processor (Mitsubishi)
Sonstige Geräte:	Gilson Pipetten 2-1000µl (Abimed) Pipetus Akku FIREBOY plus (INTEGRA Biosciences) Mikrowelle NN-5556/5506 (Panasonic) MultiScreen Vakuum Manifold (Millipore) Reinstwasseranlage MilliQPLUS (Millipore) SpeedVac Concentrator (Bachhofer) Vakuumpumpe RP12C (Vakubrand) Sterilbank HA 2448 GS (Heraeus) pH-Meter pH 525 (WTW) Durchlichtscanner SnapScan 600 (Agfa) -80°C-Truhe UF80-450S (Colora) handelsübliche Kühl- und Gefrierschränke Eismaschine Scotman AF10 Scanner GenePix 4000B (Axon)

ChipWriter Pro (Virtek)  
Kaffeautomat Magic de luxe (Saeco)

### 5.1.10 Computerprogramme, Datenbanken etc.

AISMIG	<a href="http://aismig.dkfz.de/service.php">http://aismig.dkfz.de/service.php</a> [16]
Bioedit 7.0.1	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a> [45]
Clonemanager 7	Sci Ed Central
ClustalX	<a href="ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/">ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/</a> [136]
Corel Graphics Suite 11	Corel
ESPrript	<a href="http://esprript.ibcp.fr/ESPrript/ESPrript/">http://esprript.ibcp.fr/ESPrript/ESPrript/</a> [37]
GeneAmp 5700 Manager	Perkin-Elmer
GenePix Pro 6	Axon Instruments
Halolex	<a href="https://edman.rzg.mpg.de">https://edman.rzg.mpg.de</a> (externe Version: <a href="http://www.halolex.mpg.de">http://www.halolex.mpg.de</a> )
miktex	<a href="http://www.miktex.org/">http://www.miktex.org/</a>
MS Office 2002	Microsoft
Oligonucleotide Properties Calculator	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>
Origin 6.1G	Origin Lab
Primer Express 2.0	Applied Biosystems
Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed&amp;itool=toolbar">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed&amp;itool=toolbar</a>
R-Programme von Dr. G. Welzl	Twelmeyer <i>et al.</i> , in preparation
RasTop	<a href="http://www.geneinfinity.org/rastop/download.htm">www.geneinfinity.org/rastop/download.htm</a>
SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
SSPro-Sekundärstrukturvorhersage	<a href="http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/">http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/</a> [100]
Statistik-Umgebung R	<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>
SwissModel	<a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a> [118]
TexnicCenter	<a href="http://www.toolscenter.org/front_content.php?idcat=26">http://www.toolscenter.org/front_content.php?idcat=26</a>
TIGR Mev	<a href="http://www.tm4.org/mev.html">http://www.tm4.org/mev.html</a> [110]
Treeview	<a href="http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm">http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm</a> [96]
Web of Science	

## 5.2 Allgemeine Methoden

### 5.2.1 Absorptionsmessungen

Abhängig vom Gegenstand der Messungen kamen verschiedene Photometer zum Einsatz. Zur Bestimmung der Zelldichte von aerob wachsenden *H. salinarum*-Zellen und *E. coli*-Zellen, zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA sowie für Enzymtests wurde ein UltroSpec 3000-Spektrometer (Amersham Biosciences) benutzt. Die Zelldichte von anaerob wachsenden *H. salinarum*-Zellen wurde mit Hilfe eines Klett-Photometers (Klett Manufacturing Co.) in speziellen sog. Klettkolben gemessen. Diese Klettkolben besitzen einen seitlich angebrachten Reagenzglasfortsatz und einen Schliff. Für photometrische Messungen an heterolog exprimierten Proteindomänen wurde ein PharmaSpec UV-1700 (Shimadzu Corp.) verwendet.

### 5.2.2 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden wie folgt eingesetzt:

<i>E. coli</i> :	Ampicillin 100 $\mu$ g/ml (100mg/ml Stammlösung)
	Kanamycin 20 $\mu$ g/ml (20mg/ml Stammlösung)
	Chloramphenicol 50 $\mu$ g/ml (100mg/ml Stammlösung)

*H. salinarum*: Mevinolin 25 $\mu$ M (25mM Stammlösung)  
 Novobiocin 1-2 $\mu$ g/ml (5mg/ml Stammlösung)

## 5.3 Mikrobiologische Methoden

### 5.3.1 Propagierung und Aufbewahrung von *E. coli*

*E. coli* Zellen wurden in Luria-Bertani-Medium (LB) inokuliert. Für Übernachtskulturen (ÜNK) wurden 5ml Medium angeimpft und bei 37°C mit 250rpm geschüttelt. Für die Stammsammlung wurden jeweils 1ml ÜNK mit derselben Menge Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

LB-Medium: Bacto Trypton 10g  
 Bacto Hefeextrakt 5g  
 NaCl 10g  
 ad 1l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 mit NaOH auf pH 7,0-7,2 einstellen und autoklavieren

### 5.3.2 Propagierung und Aufbewahrung von *H. salinarum*

Für die Anzucht von *Halobacterium salinarum* wurden 35ml Halomedium (HM) [92] bzw. synthetisches Medium (SM) entweder von Agarplatten oder mit 1ml Flüssigkultur angeimpft und bei 40°C mit 100rpm geschüttelt. Für das anaerobe Wachstum dienten Seitenarmkolben (Klettkolben) mit Schliff, welche mit einem Silikonseptum luftdicht verschlossen wurden. Für die Stammsammlung wurden die Zellen in HM luftdicht verschlossen bei Raumtemperatur gelagert.

Halomedium: 4,3M NaCl 250g  
 80mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20g  
 27mM KCl 2g  
 10mM Na<sub>3</sub>Citrat·2H<sub>2</sub>O 3g  
 Bacto Pepton 10g  
 ad 1l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 mit NaOH auf pH 7,2 einstellen und autoklavieren

Haloplatten: 1l HSM + 15g Bacto Agar

Synthetisches Medium: Lösung 1 800ml  
 Lösung 3 1ml  
 Lösung 4 150ml  
 Lösung 5 50ml  
 mit NaOH auf pH7,2 einstellen, steril  
 filtrieren und bei 4°C lagern.

Bei der Abfüllung in Kolben für *H. salinarum*-Wachstum wurde noch 0,05% Lösung 6 hinzugefügt und auf 2% Glycerin eingestellt. Der Phosphatgehalt wurde durch Zugabe von 0,5M Na-Phosphat eingestellt.

Lösung 1: 4mol NaCl 235g  
 40mmol  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10g  
 27mmol KCl 2,44g  
 1mmol  $KNO_3$  0,1g  
 1,7mmol  $Na_3Citrat \cdot 2H_2O$  0,5g  
 in 800ml  $H_2O_{bidest}$  lösen

Lösung 3:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  5mg  
 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  230mg  
 $MnSO_4 \cdot H_2O$  30mg  
 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  44mg  
 Ascorbinsäure 2g  
 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  241mg  
 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  237mg  
 in 100ml  $H_2O_{bidest}$  lösen und bei 4°C im Dunkeln lagern

Lösung 4: L-Arginin 2g  
 L-Isoleucin 2,2g  
 L-Leucin 4g  
 L-Lysin· $H_2O$  1,12g  
 L-Methionin 1g  
 L-Threonin 2,5g  
 L-Valin 1,25g  
 L-Serin 3,05g  
 L-Phenylalanin 0,5g  
 in 750ml  $H_2O_{bidest}$  lösen, auf pH7,0 einstellen, steril filtrieren und bei -20°C lagern

Lösung 5: L-Tyrosin 0,2g  
 in 20ml 1M HCl lösen, mit  $H_2O_{bidest}$  auf 50ml verdünnen und bei -20°C lagern

Lösung 6: Thiamin 0,1g  
 Folsäure 0,1g  
 Biotin 0,01g  
 in 10ml  $H_2O_{bidest}$  lösen und bei -20°C lagern

### 5.3.3 „Chemical-in-cuvette“-Test (CIC-Test)

Der CIC-Test dient der Begutachtung von chemotaktischem Verhalten von *H. salinarum*-Zellen. Die Zellen werden in Hepes-gepuffertem Basalsalz (BSH) mit 0,25% Agar in Petrischalen gegossen, die verschiedene Chemikalien in seitlich angebohrten (1mm

Lochdurchmesser) Küvetten enthalten.

Die Zellsuspension setzt sich aus folgenden Teilen zusammen: 12,5ml BSH mit 0,5% Agar (vorgewärmt bei 55°C) und 12,5ml BSH mit Zellen der Dichte  $OD_{600}=2$ . Dazu wird ein entsprechendes Volumen *H. salinarum*-Kultur bei 5500g für 25min abzentrifugiert und in 12,5ml BSH aufgenommen. Die Zellsuspension wird auf 37°C vorgewärmt. Die seitlich angebohrten, in der Plattenmitte befindlichen Küvetten werden mit 0,5% Agar/BSH abgedichtet und mit den in BSH gelösten Chemikalien befüllt. Die vorgewärmten Teile der zu gießenden Suspension werden vermischt und in der Petrischale ausgegossen. Nach dem Aushärten der Plattenfüllung bei Raumtemperatur werden die Platten in einem Plastikbehälter auf Lichtkästen für mehrere Tage inkubiert. Im Abstand von ca. 24h werden die Platten so gescannt (300dpi, Durchlicht), dass auf beiden Seiten der Küvetten keine Schatten die Sicht auf die Hof- bzw. Ringbildung behindern.

Hepes-gepuffertes Basalsalz: 25% (w/v) NaCl 250g  
 2% (w/v)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  20g  
 0,3% (w/v)  $Na_3Citrat \cdot 2H_2O$  3g  
 0,2% (w/v) KCl 2g  
 20mM Hepes 20ml 1M Hepes (pH7,0)  
 ad 1l  $H_2O_{bidest}$

## 5.4 Molekularbiologische Methoden

### 5.4.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *H. salinarum*

Die Isolierung erfolgte nach der „Schnelle Lyse“-Methode. Dazu wurde 1ml logarithmisch wachsender Zellen 2min bei 12000rpm zentrifugiert und das Pellet in 400 $\mu$ l  $H_2O$  resuspendiert. Dabei lysierten die Zellen sofort. Um die im Lysat enthaltenen Proteine zu denaturieren, erfolgte anschließend eine 15-minütige Inkubation bei 70°C. Dieses DNA-Protein-Gemisch ist geeignet zur unmittelbaren Verwendung für PCR-Reaktionen und präparative DNA-Restriktionen für Southern Blots.

### 5.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 3ml ÜNK in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C und 250rpm angezogen. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid-Mini-Kit der Firma Qiagen, bei dem die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen wurden und die Plasmid-DNA mittels hydrophober Interaktionschromatographie von der genomischen DNA und den übrigen Zellbestandteilen getrennt wurde.

### 5.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Ein Aliquot der Lösung mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) bzw. einsträngiger RNA (ssRNA) wurde mit  $H_2O$  verdünnt und die Absorbtion bei 260 und 280 nm gemessen. In

proteinfreien Proben sollte das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  ca. 2 (dsDNA) bzw. 1,8 (ssRNA) betragen. Die Konzentration der Ausgangslösung berechnet sich nach folgender Formel:

$$c(\text{dsDNA}) = 50 \cdot A_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g/ml}]$$

$$c(\text{ssRNA}) = 40 \cdot A_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g/ml}]$$

#### 5.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligrationsreaktionen wurden mit T4-DNA-Ligase (Invitrogen) durchgeführt. Je Ansatz wurden ca. 100ng DNA (linearisierter Vektor und zu klonierendes Fragment) mit kompatiblen Enden in einem molaren Verhältnis von 3:1 üN bei 12°C inkubiert.

#### 5.4.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation von Plasmiden in *E. coli* wurde entweder mit chemisch- oder elektrokompetenten Zellen durchgeführt. Nachfolgend sind beide Methoden näher erläutert.

##### Herstellung RbCl-kompetenter *E. coli*-Zellen

Diese Methode stellt eine leichte Abwandlung der Standardmethode nach Cohen *et al.* [24] dar. Vom gewünschten, zu transformierenden *E. coli*-Stamm wurde eine 3ml ÜNK erstellt. Mit 1ml dieser ÜNK wurden 50ml LB-Medium (evtl. mit Antibiotikum) in einem Erlenmeyerkolben inokuliert und bis zu einer  $OD_{600}$  von etwa 0,8 bei 37°C geschüttelt (ca. 3h). Nach der anschließenden 15-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine 10-minütige Zentrifugation der Zellen bei 3500rpm und 4°C. Das Pellet wurde in 16ml RF1-Lösung resuspendiert, 1h auf Eis inkubiert und dann erneut 10min bei 3500rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4ml RF2-Lösung aufgenommen. Diese Suspension wurde für 15min auf Eis gestellt, à 200µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefren. Die kompetenten Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

RF1-Lösung: RbCl            1,2g  
 MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O    0,99g  
 K<sub>2</sub>Acetat        3ml einer 1M Lösung  
 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O    0,15g  
 Glycerin        15g  
 ad 100ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 mit 0,2M Essigsäure pH 5,8 einstellen und steril filtrieren

RF2-Lösung: MOPS            2ml einer 0,5M Lösung  
 RbCl            0,12g  
 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O    1,1g  
 Glycerin        15g  
 ad 100ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 mit NaOH pH 6,8 einstellen und steril filtrieren

### Transformation RbCl-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurde die benötigte Anzahl an Aliquots kompetenter Zellen 30min auf Eis aufgetaut (100 $\mu$ l je Ligationsansatz). Anschließend erfolgte die Zugabe der zu transformierenden DNA (ca. 100ng Plasmid oder 20 $\mu$ l Ligationsansatz). Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen 2min in ein 42°C-Wasserbad überführt. Pro Ansatz wurde nun je 1ml LB-Medium zugegeben, dann für mindestens 1h bei 37°C und 250rpm inkubiert. Während dieser sogenannten Genexpressionsphase erfolgt die Ausbildung plasmidal kodierter Resistenzen; sofortiges Ausplattieren auf antibiotikahaltige Platten würde alle Transformanten abtöten, da die die Antibiotika inaktivierenden Enzyme erst synthetisiert werden müssen. Schließlich wurden die Bakterien für 2min bei 12000rpm abzentrifugiert. Bei Antibiotika-Resistenzen, die durch periplasmatische Enzyme vermittelt werden, wie z.B. Ampicillinresistenz durch  $\beta$ -Lactamase, wurden die Zellen zwecks Vermeidung von Mikrokolonien aufgrund spontaner Zellyse noch zweimal mit antibiotikahaltigem Medium gewaschen. Dann wurde der größte Teil des Überstandes verworfen, das Zellpellet im Restvolumen resuspendiert und vollständig oder in Form verschiedener Verdünnungen auf antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert.

### Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Hierfür wurden „One Shot TOP10“-Zellen (Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden 20min auf Eis aufgetaut. Je Aliquot (50 $\mu$ l) wurden 0,1-2 $\mu$ l Ligationsansatz zugegeben und nochmals 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine Elektroporationsküvette (Biorad) überführt und mit 2,5kV, 25 $\mu$ F und 400 $\Omega$  elektroporiert. Unmittelbar danach erfolgte die Zugabe von 500 $\mu$ l SOC-Medium und eine ca. 1-stündige Inkubation bei 37°C und 250rpm. Abschließend wurden Aliquots von 50-200 $\mu$ l des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

### 5.4.6 Transformation von *H. salinarum*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *H. salinarum*-Zellen wurde 35ml Halomedium mit Zellen angeimpft und bei 37°C mit 250rpm geschüttelt. Erreichten die Zellen eine Dichte von 60-80 Klett, so wurden 1ml Zellen in weitere 35ml Halomedium überimpft und diese unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Erreichte die dritte Kultur eine Zelldichte von 60-80 Klett, wurden 2ml Kultur abgenommen, 7min bei 4000rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 200 $\mu$ l SPH-Puffer durch leichtes Schwenken des Eppendorfgefäßes resuspendiert. Durch Zugabe von 10 $\mu$ l 250mM EDTA in SPH-Puffer wurden Sphäroplasten erzeugt und deren Ausbildung im Mikroskop verfolgt. Nun wurden 5 $\mu$ g Plasmid-DNA zu der Sphäroplastenlösung gegeben, der Transformationsansatz vorsichtig gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 $\mu$ l 60% PEG600 in Sphäroplastenpräparations-Puffer (SPH) in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert und nach dem Schließen des Deckels durch Schwenken mit dem Reaktionsansatz gemischt. Nach 20min wurden der verklumpenden Zellsuspension 1,5ml Sphäroplastenverdünnungs-Puffer (SV) zugegeben und der Ansatz

nach 5min Inkubationszeit für 5min bei 4000rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3ml Halomedium aufgenommen und üN bei 37°C und 100rpm in einem schräggestellten RG inkubiert. Von der transformierten Halokultur wurden Aliquots von 50-200µl auf Mevinolin- und X-Gal-haltige Haloplaten ausplattiert und solange bei 40°C inkubiert bis Einzelkolonien zu sehen waren. Die Blaufärbung einer Kolonie deutet daraufhin, dass diese das Plasmid aufgenommen hat, da nur eine exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase das X-Gal zu einem blauen Farbstoff zersetzen kann. Die blauen Kolonien wurden also gepickt und in Halomedium zweimal bis zur stationären Phase geschüttelt. Von dieser Kultur wurden Verdünnungen ausplattiert, von denen nach 1 Woche rote Kolonien gepickt und per Colony-PCR und Southern Blot überprüft wurden, ob sie Deletionsmutanten oder revertierte Wildtyp-Kolonien waren [63].

SPH-Puffer:	2M	NaCl	11,7g
	25mM	KCl	186mg
	50mM	Tris	606mg
	15% (w/v)	Sucrose	15,0g
	ad 100ml H <sub>2</sub> O <sub>bideest</sub> mit Salzsäure pH 8,75 einstellen und steril filtrieren		
SV-Puffer:	4,3M	NaCl	25,1g
	80mM	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,97g
	27mM	KCl	201mg
	1,4mM	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20,6mg
	10mM	Na <sub>3</sub> Citrat·2H <sub>2</sub> O	294mg
	50mM	Tris	606mg
	15% (w/v)	Sucrose	15,0g
ad 100ml H <sub>2</sub> O <sub>bideest</sub> mit Salzsäure pH 7,4 einstellen und steril filtrieren			
PEG-SPH-Puffer:	60% (v/v)	Polyethylenglycol 600	33,8g
ad 50ml SPH-Puffer			
EDTA-SPH-Puffer:	250mM	EDTA	3,65g
	ad 50ml H <sub>2</sub> O		

### 5.4.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für Kontrollspaltungen wurde 1µl Vektor-DNA mit 0,5µl je Restriktionsenzym in 10µl Endvolumen bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur und Zeit inkubiert (meist 1h bei 37°C). Präparative Spaltungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurden mit mehreren µg DNA in 80-100µl Endvolumen mit je 5µl Enzym in den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Für Southern Blots wurden 20µl chromosomaler DNA (siehe Abschnitt 5.4.1) mit 5µl je Restriktionsenzym in 100µl Endvolumen 3-5h bei 37°C inkubiert. Durch anschließende 15-minütige Inkubation bei 70°C wurden die Enzyme hitzeinaktiviert.

### 5.4.8 Polymerasekettenreaktionen

Die Amplifikation von kurzen DNA-Strängen erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion, kurz PCR [111]. Für die Amplifikationen wurden verschiedene PCR Kits benutzt. Alle PCRs, bei denen eine möglichst geringe Fehlerrate wichtig war, wurden mit Polymerasen mit einer „Proofreading“-Aktivität durchgeführt (Phusion, Biometra; VentR, New England Biolabs; Takara LATaq, BioWhittaker). Handelte es sich lediglich um Kontroll-PCRs, bspw. zur Überprüfung von RNA auf DNA-Kontaminationen, so wurde die Polymerase HotStar-Taq (Qiagen) benutzt. Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer,  $0,5\mu\text{M}$  Primern, je  $0,1\text{mM}$  dATP, dTTP, dCTP bzw. dGTP und der empfohlenen Menge Enzym durchgeführt. Zur Unterdrückung von Sekundärstrukturen aufgrund hoher GC-Gehalte wurde den Reaktionsansätzen in Einzelfällen noch 3-4% (v/v) DMSO zugesetzt. Das Temperaturprofil einer PCR folgte diesem Prinzip:

94 – 98°C	30s – 15min	}	30 – 40x
94 – 98°C	15 – 30s		
55 – 72°C	15 – 30s		
72°C	30s – 1min pro 1kb		
4°C	$\infty$		

#### Quantitative PCR

Diese Methode dient der Quantifizierung von RNA-Mengen in Zellproben. Die Reaktionen wurden mit Hilfe des SYBR Green PCR Master Mix Kits (Applied Biosystems) in einem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Sowohl Reaktionsgemisch als auch Temperaturprofil entsprachen den Angaben des Herstellers. Die einzelnen Quantifizierungsreaktionen erfolgten als 3-4fache Replikate in jeweils  $25\mu\text{l}$  Reaktionsansatz. Die Endkonzentration der Primer betrug  $0,2\mu\text{M}$ . Als Vorlage für die PCR dienten  $0,5\text{-}1\mu\text{l}$  der cDNA-Synthese (siehe Abschnitt 5.4.14, S. 129). Die PCR-Primer wurden mit dem Programm Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) nach den Standardvorgaben für eine RTPCR selektiert und nochmals mit dem „Oligonucleotide Properties Calculator“ auf Sekundärstrukturen überprüft.

#### Kolonie-PCR

Zur Vorauswahl von erfolgreich transformierten *E. coli*-Klonen, die kein religiertes Plasmid tragen und von *H. salinarum* Deletionsmutanten, wurden sogenannte Kolonie-PCRs durchgeführt. Die Rezeptur entsprach dabei einer Standard-PCR mit Hotstar-Taq (Qiagen). Als Primer wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet, die auch zur Herstellung des transformierten Plasmids zum Einsatz kamen. Zu einem gebrauchsfertigen PCR-Ansatz wurden durch Eintauchen eines Zahnstochers einige Zellen des fraglichen Klons hinzugefügt. Ergab die Reaktion ein spezifisches Produkt mit der richtigen Größe, so war es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem transformierten Plasmid nicht um eine Religation handelte.

### DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten erfolgte nach der Kettenabbruchmethode durch PCR mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden unter Gebrauch des ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems). Der Reaktionsmix wurde gebrauchsfertig geliefert und besteht aus Puffer, dNTP, basenspezifischen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Für eine Sequenzierung wurden 0,5-1  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA bzw. 0,2-0,5  $\mu\text{g}$  eines gereinigten PCR-Produkts eingesetzt. Eine typische Sequenzierung hatte folgende Zusammensetzung:

DNA	1 $\mu\text{l}$
Primer [10 $\mu\text{M}$ ]	1 $\mu\text{l}$
BigDye Reaktionsmix	2 $\mu\text{l}$
BigDye Puffer	1 $\mu\text{l}$
5M Betain	2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	3 $\mu\text{l}$

Temperaturprofil einer typischen Sequenzierungsreaktion:

94°C	30s	} 30x
60°C	4min	
4°C	$\infty$	

Der Sequenzierungsansatz wurde über MicroSpin G50 Gelfiltrationssäulen von Amersham Biosciences nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac-Concentrator) zur Trockne eingengt. Die Sequenzierung erfolgte per Gelelektrophorese in einem DNA-Sequenzierer (Modell 373A von Applied Biosystem).

#### 5.4.9 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Lösungen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Flachbettgelelektrophorese in TAE-Puffer bei 60-80V durchgeführt. Die Agarosegele enthielten 0,8-2% Agarose in TAE-Puffer und wurden nach abgeschlossener Elektrophorese 10-20min in einer Ethidiumbromid-Lösung [0,1mg/l] inkubiert und 10-20 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde das Geldokumentationssystem TFFM/WL VilberLourmat (LTF Labortechnik) benutzt.

50x TAE-Puffer:	2M Tris	242g
	Eisessig	57,1ml
	50mM EDTA	37,2g
	ad 1l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
	mit Essigsäure pH 8,5 einstellen	
5x Auftragspuffer:	50% Saccharose	50g

0,1mM EDTA	100 $\mu$ l 0,1M Lsg.
0,1% Bromphenolblau	100mg
0,1% SDS	500 $\mu$ l 20% SDS-Lsg.
ad 100ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> und auf pH7 einstellen	

### 5.4.10 Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA in Form von PCR-Produkten oder Restriktionsfragmenten wurde entweder direkt aus dem Reaktionsansatz heraus oder in Form von Gelstücken nach erfolgter Gelelektrophorese gereinigt. Für beide Methoden wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega benutzt. Alle Arbeitsschritte folgten der Anleitung des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde jeweils mit 50 $\mu$ l heissem Wasser eluiert.

### 5.4.11 Southern Blot und Hybridisierung von DNA

Diese Techniken wurden angewendet, um den Genotyp von transformierten *H. salinarum*-Kulturen zu bestimmen. Dazu wurde zunächst genomische DNA isoliert, mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der nachfolgende Transfer der DNA aus der Gelmatrix auf eine Nylon-Membran wird nach seinem Erfinder als Southern Blot bezeichnet. Nun wurde die Membran mit Digoxigenin(DIG)-markierten PCR-Fragmenten hybridisiert und gewaschen. Abschließend wurde die Lage der hybridisierten DIG-Sonden mittels Chemilumineszenz detektiert.

#### Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

DIG-markierte DNA-Sonden für eine Southern-Hybridisierung wurden mittels PCR hergestellt, wobei dem Standard-Reaktionsansatz zusätzlich 1 $\mu$ l DIG-markiertes dUTP beigefügt wurde. Die Sonde wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion gereinigt.

#### Fixierung der DNA auf Membranen

Die analysierten DNAs stammten aus *H. salinarum* und wurden mit der „Schnelle Lyse“-Methode (siehe Abschnitt 5.4.1) hergestellt. Anschließend folgte eine präparative Restriktionsreaktion wie unter Abschnitt 5.4.7 beschrieben. 20 $\mu$ l der erhaltenen DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel separiert und mittels Vakuumblot auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Biosciences) übertragen. Als Größenstandard diente der DNA molecular-weight marker VII, DIG-labeled von Roche. Nach der Elektrophorese wurde das Gel durch 5min 0,25M HCl, 30min Alkalilösung und 30min Neutralisierungslösung (bei 4°C) für den Transfer vorbereitet.

Die Vakuum-Blot-Apparatur wurde mit einer Gummimaske abgedichtet, sodass eine Fläche wenig kleiner als das Gel offen blieb. Darauf wurden 2 mittelstarke, in 10xSSC-Puffer getränkte Whatman-Papiere und die Nylon-Membran gelegt, die etwas größer sein

sollte als das Gel. Darauf wurde das Gel gelegt, ohne Luftblasen einzuschliessen. Nun wurde für 2h ein Vakuum von ca. 50mbar angelegt, danach die Nylon-Membran abgenommen und die DNA in einem UV-Crosslinker (auto-crosslink, 1200x 100 $\mu$ J) kovalent auf der Membran fixiert.

Alkalilösung:	1M NaCl	23,37g
	0,5M NaOH	8g
	ad 400ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
Neutralisierungslösung:	3M NaCl	70,11g
	0,5M Tris	24,23g
	ad 400ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
	mit HCl pH7,5 einstellen	
20xSSC-Puffer:	3M NaCl	175,32g
	0,3M Na <sub>3</sub> Citrat·2H <sub>2</sub> O	88,23g
	ad 1l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
	mit HCl pH7,0 einstellen, autoklavieren	

### Hybridisierung DIG-markierter DNA-Sonden

Nach der Fixierung der DNA wurde die Membran mit etwa 10-15ml DIG Easy Hyb Lösung (Roche) in einer Rollerflasche im Hybridisierungssofen bei 42°C 30min prähybridisiert. Während dessen wurden 5-15 $\mu$ l der DIG-Sonde in 3-4ml DIG Easy Hyb Lösung 10min in kochendem H<sub>2</sub>O erhitzt und 5min in Eis schockgekühlt. Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und die denaturierte DIG-Sonde zu der Membran gegeben und üN bei 42°C unter Drehen inkubiert. Am nächsten Tag folgten mehrere Waschstritte: 2x 15min bei RT in 50ml Waschlösung I und 2x 30min bei 68°C in 50ml Waschlösung II. Beide Schritte wurden in der Rollerflasche durchgeführt.

Waschlösung I:	2x SSC-Puffer	100ml 20xSSC-Puffer
	0,1% (v/v) SDS	10ml 10% SDS-Lösung
	ad 1l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
Waschlösung II:	0,1x SSC-Puffer	5ml 20xSSC-Puffer
	0,1% (v/v) SDS	10 ml 10% SDS-Lösung
	ad 1l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
10% (w/v) SDS-Lösung:	40g SDS	
	ad 400ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

### Detektion der hybridisierten DNA

Nach der Hybridisierung wurde die Membran 5min in 50ml Waschpuffer und 30min in 30ml Puffer II inkubiert. Es folgte eine immunologische Detektion durch das Anti-Digoxygenin Alkalische Phosphatase Fab-Fragment (Roche) gegen die DIG-Reste der DNA-Sonde. Die Membran wurde 30min mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 (in 20 ml Puffer II) bei RT inkubiert. Nach 2x 45min Waschen mit 50ml

Waschpuffer wurde 1ml gebrauchsfertiger CDP-Star Detektionslösung (Amersham Biosciences) auf der Membran verteilt und für 5min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Detektionslösung von der zwischen zwei Folien liegenden Membran gewischt und diese möglichst falten- und luftblasenfrei eingeschweißt. In einer Expositionskassette wurde ein Röntgenfilm (Curix HC1.00G, AGFA) auf die Membran gelegt und dieser je nach Intensität der Lumineszenz exponiert und entwickelt.

Waschpuffer: 0,3% (v/v) Tween20 3ml  
ad 1l Puffer I

Puffer II: 1% Blocking Lösung 10ml 10% Blocking Lösung  
ad 100ml Puffer I

Puffer I: 0,1M Maleinsäure 11,7g  
0,15M NaCl 8,8g  
ad 1l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
mit NaOH pH7,5 einstellen und autoklavieren

Blocking Lösung: 10% (w/v) Blocking Reagent 25g  
ad 250ml Puffer I, autoklavieren und bei 4°C lagern

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

Zur Isolierung halobakterieller Gesamt-RNA wurde ein kommerzielles Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Gemisch verwendet (peqGOLD RNAPure, peqLab). Die zur Isolierung bestimmten Zellen wurden 5min bei 12000g im SS34-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde, je nach Zelldichte und -menge, mit 3-6ml peqGOLD RNAPure Lösung versetzt und so lang gemischt (durch pipettieren und vortexen), bis eine homogene Lösung entstand. Diese Proben wurden in der Regel bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Alle weiteren Isolierungsschritte wurden nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Nach dem zweiten EtOH-Waschschritt folgte eine Lufttrocknung des RNA-Pellets. Das glasige Pellet wurde dann in 50-80µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> durch pipettieren resuspendiert.

#### 5.4.13 DNase-Behandlung der Gesamt-RNA

DNA-Kontaminationen der Gesamt-RNA wurden mit DNaseI (DNA free, Ambion) beseitigt. Alle Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend folgte die Bestimmung der Konzentration und die Kontrolle der Unversehrtheit der RNA mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer und des RNA6000-Nano-LabChip-Kits (Agilent) entsprechend den Angaben des Herstellers. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -70°C gelagert.

#### 5.4.14 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA war für zwei verschiedene Methoden notwendig, die quantitative PCR und die Mikroarray-Analyse. Im Folgenden werden die Herstellungsverfahren

beider cDNA-Typen beschrieben.

### Synthese von cDNA für quantitative PCR

Die Synthese erfolgte unter Verwendung der Reversen Transcriptase SuperScriptII (Invitrogen). Als Vorlage dienten 2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, welche mit 500ng Random Hexamer-Primer (Promega) den Herstellerangaben folgend in cDNA umgeschrieben wurde.

### Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA für Mikroarray-Analysen

Hier war darauf zu achten, dass die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe so wenig wie möglich Licht ausgesetzt wurden. Nur so konnte ein vorzeitiges Ausbleichen, welches mit einem Informationsverlust der hybridisierten Mikroarrays einhergeht, verhindert werden.

Zur Herstellung der fluoreszenten cDNA wurde das CyScribe First-Strand cDNA Labeling Kit (Amersham Biosciences) verwendet. Als Primer diente das mitgelieferte Random Nonamer Primer-Gemisch. Die Farbmarkierung wurde durch Einbau von Cy3-dUTP und Cy5-dUTP (Amersham Biosciences) in die cDNA erreicht. Die gesamte Synthese folgte den Herstellerangaben unter Verwendung von 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.

Nach 90minütiger Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA pH8 gestoppt und die RNA durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  1M NaOH und 30min Inkubation bei 65°C hydrolysiert. Abschließend wurde die Hydrolyse durch Zugabe von 12,5  $\mu\text{l}$  1M Tris/HCl pH7,5 beendet.

Bevor die cDNA-Ansätze zu der Hybridisierungslösung gegeben werden können, müssen diese noch von überschüssigen Primern, RNA-Bruchstücken und nicht eingebauten Farbstoffen befreit werden. Dazu wurden die beiden farbmarkierten cDNA-Ansätze vereinigt, mit 420  $\mu\text{l}$  TE-Puffer aufgefüllt und mit 1  $\mu\text{l}$  Bierhefe-tRNA (4mg/ml, Roche) versetzt. Durch Ultrafiltration mit MicroCon YM-30 Säulen (Millipore) wurde die cDNA auf ein Endvolumen von maximal 17  $\mu\text{l}$  eingeengt.

TE-Puffer: 10mM Tris 1,2g  
1mM EDTA 0,37g  
ad 1l H<sub>2</sub>O bidest  
mit Salzsäure pH8,0 einstellen und autoklavieren

#### 5.4.15 Herstellung von Mikroarrays

Zur Herstellung des Genom-Mikroarrays von *H. salinarum* wurden PCR-Produkte benutzt, die mit Hilfe des Array-Druckers ChipWriter Pro (Virtek) in einem klimatisierten Raum auf CMT-GAPS II Coated Slides (Corning) gedruckt wurden (Kollaboration mit Dr. Markus Panhuysen, MPI für Psychiatrie). Die DNA-Sonden wurden in jeweils fünf Replikaten pro Mikroarray aufgebracht. Die Reinigung der PCR-Produkte, die alle per Agarosegel-Elektrophorese und stichprobenartige Sequenzierungen untersucht wurden, erfolgte mit Hilfe von MultiScreen PCR 96well Platten (Millipore). Die gereinigten

DNAs wurden nach der Methode von Diehl *et al.* [28] resuspendiert, gedruckt und die Mikroarrays entsprechend nachbehandelt.

#### 5.4.16 Prähybridisierung eines Mikroarrays

Die Mikroarrays wurden in einem Glasbehälter in 250ml vorgewärmtem Prähybridisierungspuffer (PH-Puffer) 30min bei 50°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Zum Waschen wurden die prähybridisierten Arrays bei RT unter Rühren jeweils 30s in 250ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 250ml anschließend in Isopropanol getaucht und danach unverzüglich durch Zentrifugation für 5min bei 1500rpm in 50ml Reaktionsgefäßen getrocknet.

PH-Puffer:	3,5x	SSC-Puffer	43,75ml	20x SSC-Puffer
	0,1% (v/v)	SDS	2,5ml	10% SDS-Lösung
	1% (w/v)	BSA Fraktion V	2,5g	
	ad 250ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>			

#### 5.4.17 Hybridisierung der cDNA auf dem Mikroarray

Zur Hybridisierung wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 30µl aus den fluoreszenzmarkierten und gereinigten cDNAs, 3,75µl 20x SSC-Puffer und 1,25µl 50x Denhardtslösung hergestellt. Die Hybridisierungsansätze wurden 2min auf 98°C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2µl einer 1%-igen SDS-Lösung versetzt. Diese Mischung wurde in die Mitte eines Deckgläschens der passenden Größe pipettiert. Darauf wurde der prähybridisierte Mikroarray so platziert, dass sich der Hybridisierungsansatz zwischen Array und Deckgläschen auf dem mit Sonden bedruckten Bereich möglichst blasenfrei verteilt. Ein Vorteil der Hybridisierung mit Deckgläschen ist, dass geringe Volumina verwendet werden können, was die Konzentration der markierten cDNA erheblich vergrößert. Abschließend wurde jedes Mikroarray in eine Hybridisierungskammer (Corning) gelegt, diese festverschlossen, mit Aluminiumfolie umwickelt und üN bei 64°C inkubiert.

Nicht oder nur unspezifisch gebundene cDNA wurde entfernt, indem der Array mit Waschlösung gespült wurde. Durch diese Prozedur wird die Signalintensität in den nicht mit Sonden bedruckten Bereichen entscheidend verringert und somit der Signal-Rausch-Abstand erhöht. Dabei ist darauf zu achten, dass die Mikroarrays während des gesamten Waschvorgangs nicht trocknen. Nach der Hybridisierung wurden die Hybridisierungskammern auseinander genommen und die Arrays in Waschlösung I getaucht. Die Deckgläschen wurden durch leichtes Rühren der Waschlösung von den Arrays entfernt und diese jeweils zweimal 5min in den Waschlösungen I und II gespült. Abschließend wurden die Arrays durch Zentrifugation für 5min bei 1500rpm in 50ml Reaktionsgefäßen getrocknet. Bis zur Detektion wurden die Mikroarrays bei Raumtemperatur in lichtgeschützten Objektträgerkästen gelagert.

50x Denhardts-Lösung:	2% (w/v)	Ficoll 400	10g
	2% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon	10g
	2% (w/v)	BSA Fraktion V	10g

	ad 500ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> mit Salzsäure pH7,0 einstellen, autoklavieren und Aliquots bei -20°C lagern
Waschlösung I:	0,5x SSC-Puffer 12,5ml 20x SSC-Puffer 0,01% (v/v) SDS 500µl 10%-iger SDS-Lösung ad 500ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Waschlösung II:	0,06x SSC-Puffer 1,5ml 20x SSC-Puffer 0,01% (v/v) SDS 500µl 10%-iger SDS-Lösung ad 500ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

## 5.5 Biochemische Methoden

### 5.5.1 Heterologe Expression von 6xHis-OE3855R-PAS

Die His-markierte PAS-Domäne der Histidinkinase OE3855R wurde in *E. coli* M15 pREP4 überexprimiert und anschließend nativ über eine NiNTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurden 1l LB-Medium (mit Ampicillin und Kanamycin) mit einer ÜNK auf OD<sub>600</sub>=0,05 angeimpft und mit 220rpm bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,4 geschüttelt. Jetzt erfolgte die Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1mM. Die Kultur wurde weitere 3h bei 220rpm und 37°C geschüttelt. Dann wurden die Zellen durch 40minütige Zentrifugation bei 4°C und 5000g geerntet. Das Pellet wurde bis zum Zellaufschluss bei -70°C gelagert.

Zur Reinigung wurde das Zellpellet in 80ml Lysepuffer resuspendiert und dreimal 1min mit Ultraschall behandelt. Dazu wurde eine dicke Spitze mit ca. 1cm Durchmesser benutzt, es wurde 50% der Zeit beschallt und die Energie auf das Maximale gestellt, ohne Schaum zu erzeugen. Zur Kühlung wurde die Zellsuspension während des Aufschlusses in Eiswasser gelagert. Um die Zelltrümmer vom Cytoplasma zu trennen, wurde eine Ultrazentrifugation für 30min bei 4°C und 48000g durchgeführt. Der Überstand wurde mit 4ml NiNTA-Suspension versetzt und langsam 2h bei 4°C rotiert. Danach wurde die Suspension in eine Kartusche gefüllt, um die nicht gebundenen Bestandteile des Zelllysates abzutrennen. Die so entstandene NiNTA-Säule wurde nun mit jeweils 10ml Waschlösung 1-3 langsam gewaschen. Das in den 4ml Elutionslösung enthaltene Imidazol verdrängte abschließend das His-markierte PAS-Polypeptid von der Säulenmatrix. Zur Entfernung der großen Menge Imidazol wurde die Elutionslösung über Nacht bei 4°C gegen 4l Dialysepuffer dialysiert.

Lysepuffer:	50mM Tris/HCl pH8	4ml 1M Lsg.
	100mM NaCl	1,6ml 5M Lsg.
	10mM β-Mercaptoethanol	56µl
	ad 80ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
Waschlösung 1:	50mM Tris/HCl pH8	0,5ml 1M Lsg.
	500mM NaCl	1ml 5M Lsg.
	2mM MgCl <sub>2</sub>	20µl 1M Lsg.

	5mM Imidazol ad 10ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100µl 0,5M Lsg.
Waschlösung 2:	50mM Tris/HCl pH8 500mM NaCl 200mM KCl 2mM MgCl <sub>2</sub> 10mM Imidazol 7mM Na <sub>2</sub> ATP ad 10ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	0,5ml 1M Lsg. 1ml 5M Lsg. 0,67ml 3M Lsg. 20µl 1M Lsg. 200µl 0,5M Lsg. 38,5mg
Waschlösung 3:	50mM Tris/HCl pH8 200mM KCl 2mM MgCl <sub>2</sub> 10mM Imidazol 10mM Na <sub>2</sub> ATP ad 10ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	0,5ml 1M Lsg. 0,67ml 3M Lsg. 20µl 1M Lsg. 200µl 0,5M Lsg. 55mg
Elutionslösung:	50mM Tris/HCl pH8 200mM KCl 2mM MgCl <sub>2</sub> 100mM Imidazol ad 10ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	0,5ml 1M Lsg. 0,67ml 3M Lsg. 20µl 1M Lsg. 2ml 0,5M Lsg.
Dialysepuffer:	50mM Tris 0,5M NaCl 0,5M KCl 2mM MgCl <sub>2</sub> ad 1l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> mit HCl auf pH7,5 einstellen	6,06g 37,25g 1,626g 1ml 1M Lsg.

### 5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Auftrennung von Proteingemischen wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt. Diese erfolgte entweder mit selbst gegossenen PA-Gelen oder mit kommerziellen Tris-Glycin-PA-Gelen (Anamed) in 1x SDS-Laufpuffer bei 80-120V. Das Gießen eigener Gele erfolgte in Mighty Small SE245 Dual Gel Caster Apparaturen (Hoefer). Dazu wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Anschließend wurde das H<sub>2</sub>O entfernt und das Sammelgel gegossen. In dieses wurden sofort die Teflonkämme eingesteckt. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren der Gele wurden diese in feuchte Papiertücher und Haushaltsfolie gewickelt und bei 4°C aufbewahrt.

Trenngel (10%ig): 6,2ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
5ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid  
3,8ml 1,5M Tris/HCl pH8,8  
7,5µl TEMED  
150µl APS

Sammelgel (5%ig): 2,78ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

0,67ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid  
0,5ml 1M Tris/HCl pH6,8  
4 $\mu$ l TEMED  
40 $\mu$ l APS

10x SDS-Laufpuffer: 1% SDS            10g  
                          1,92M Glycin 144g  
                          0,25M Tris        30g  
                          ad 1l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
                          mit HCl auf pH8,8 einstellen

### 5.5.3 Detektion von Proteinen nach PAGE

#### Detektion von His-markierten Proteinen

In PA-Gelen aufgetrennte His-markierte Proteine wurden zunächst spezifisch mit dem InVision His-tag In-gel Stain (Invitrogen) gefärbt. Dazu wurden die Fixierungs- und Entfärbelösungen entsprechend den Herstellerangaben für Tris-Glycin-Gele angesetzt. Die Färbeprozedur folgte ebenfalls den Angaben des Herstellers. Zur Detektion wurde das Geldokumentationssystem TFPM/WL von VilberLourmat (LTF Labortechnik) benutzt. Die Aufnahmezeit unter UV-Licht betrug 5-10s. Zur Verstärkung des Kontrastes wurde ein SYBR safe photographic filter (Molecular Probes) vor dem Kameraobjekt platziert.

#### Detektion von Proteinen im Allgemeinen

Alle Proteine können unabhängig von einer speziellen Markierung mit Hilfe von Coomassie-Blau gefärbt werden. Dazu wurde das PA-Gel 45min in Färbelösung und mehrmals für 20min in Entfärbelösung geschwenkt.

Färbelösung:        40% Ethanol  
                          10% Essigsäure  
                          0,4% Coomassie R250  
                          ad 1l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Entfärbelösung:    40% Ethanol  
                          10% Essigsäure  
                          ad 1l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

### 5.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration jeglicher Proteingemische unbekannter Zusammensetzung kann mit der Bicinchonsäure(BCA)-Methode bestimmt werden. Liegt ein Protein mit bekannter Aminosäuresequenz sehr rein vor, kann dessen Konzentration auch durch die Absorbtion

von Licht der Wellenlänge 280nm (hervorgerufen durch Tryptophane und Tyrosine) bestimmt werden.

### Konzentrationsmessung mittels BCA-Assay

Hierzu wurde der BCA Protein Assay Kit (Pierce) eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung folgte den Angaben des Herstellers.

### Konzentrationsmessung mittels Lichtabsorbtion

Die Lichtabsorbtion der Aminosäuren Tryptophan ( $\epsilon_{280\text{nm}}=5700 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und Tyrosin ( $\epsilon_{280\text{nm}}=1470 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) ermöglicht die photometrische Konzentrationsbestimmung sehr reiner Proteinlösungen mit bekannter Aminosäurezusammensetzung. Diese Absorptionskoeffizienten gelten allerdings nur für das denaturierte Protein. Daher wird je eine Messung mit denaturiertem und nativem Protein durchgeführt. Der theoretische Extinktionskoeffizient des denaturierten Proteins kann dann an die Bedingungen des nativen Proteins angepasst werden. So berechnet sich  $\epsilon_{280\text{nm},\text{nativ}}$  folgendermaßen:

$$\epsilon_{280\text{nm},\text{nativ}} = \frac{(\epsilon_{280\text{nm},\text{denaturiert}} \cdot A_{280\text{nm},\text{nativ}})}{A_{280\text{nm},\text{denaturiert}}}$$

### 5.5.5 Gelfiltration von PAS3855

Zur Größenbestimmung von PAS3855-Multimeren unter nativen Bedingungen wurde eine Sephadex 75-Säule benutzt. Zur Analyse wurde die Säule in ein SMART-System (Pharmacia) eingebaut und mit dem Puffer äquilibriert, in dem sich auch die exprimierte Domäne befand (Dialysepuffer aus Abschnitt 5.5.2, +/- 20mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Nach dem Einspritzen einer kleinen Menge PAS3855 (20-40 $\mu\text{l}$  der Proteinlösung) in eine Sammelschleife (100 $\mu\text{l}$  Volumen) wurde diese vom SMART-System auf die Säule geladen. Während des anschließenden Beschickens mit 3ml Puffer (60 $\mu\text{l}/\text{min}$ ) wurde der Inhalt des Säulendurchflusses bei den Wellenlängen 280nm und 405nm/420nm überwacht.

### 5.5.6 MS-Analyse von Proteinen und Kofaktoren

Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) kann die Identität von Proteinen und deren eventuellen Kofaktoren aufgedeckt werden. Zur Bestimmung von Proteinidentitäten wurden die interessanten Banden eines PA-Gels ausgeschnitten, mit Trypsin in mehrere Fragmente gespalten und im Massenspektrometer analysiert. Die Molekülmasse von exprimierter PAS-Domäne und deren gebundenem Kofaktor wurde mittels LC-MS bestimmt. Beide Analysen wurden vom „Massen“-Service des MPI für Biochemie durchgeführt.

### 5.5.7 Phosphatase-Aktivitätsmessungen

Die Phosphatase-Aktivitäten von Proben (Zelllysate, Zellüberständen etc.) wurden durch Spaltung von para-Nitrophenylphosphat (pNpp) bei pH11 gemessen, um dem

Aktivitätsoptimum der Alkalischen Phosphatase aus *H. salinarum* Rechnung zu tragen. Die Reaktion setzt den gelben Farbstoff p-Nitrophenolat frei, dessen Konzentration durch Absorptionsmessung bei 405nm bestimmt werden kann. Es wurden pro Ansatz 100 $\mu$ l Probe mit 500 $\mu$ l Messpuffer gemischt und wurde bis zu einer sichtbaren Gelbfärbung bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 $\mu$ l Stopplösung abgebrochen, die Zeit notiert und die Absorption des Gemisches nach Zentrifugation (1,5min bei 12000rpm) bei 405nm gemessen.

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\text{Aktivität [U/min]} = \frac{A_{405} \cdot \text{Messvolumen [ml]} \cdot 1000}{\text{Inkubationszeit[min]} \cdot 18,5 \cdot \text{Probenvolumen [ml]}}$$

Messpuffer: 0,1M Glycin 1,5014g  
 0,1M NaCl 1,1688g  
 5mM pNpp 0,371g  
 ad 200ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 mit NaOH auf pH11 einstellen, steril filtrieren und  
 bei 4°C aufbewahren

Stopplösung: 0,5M NaOH 2g  
 ad 100ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 steril filtrieren

### 5.5.8 Messung intrazellulärer Phosphatkonzentrationen

Die intrazellulären Phosphatkonzentrationen von *H. salinarum*-Zellen wurden komplexometrisch bestimmt. Man nutzt dazu die Eigenschaft von Molybdänionen aus, im Säuern unter reduzierenden Bedingungen mit Phosphationen einen intensiv blauen Komplex zu bilden.

Eine bestimmte Menge von Zellen (0,2-1ml, die genaue Menge variierte je nach Zelldichte und geschätztem Phosphatgehalt der Zellen) wird zunächst durch Zentrifugation pelletiert, mit 0,5ml Basalsalz (BS) gewaschen und abschließend in 0,25ml BS aufgenommen. Diese Suspension spritzt man in eine Mischung aus 0,5ml kaltem Stopmix + 0,25ml BS und zentrifugiert sie 5min bei 13000rpm. Von dem Überstand werden 0,5ml in 0,25ml Messlösung gegeben und gemischt. Nach 10min Inkubation bei RT erfolgt die Messung der Absorption bei 691nm.

Anhand einer zuvor aufgenommenen Standardkurve mit bekannten Phosphatkonzentrationen kann die Phosphatkonzentration der gemessenen Gesamtlösung bestimmt werden. Sind Zelldichte (OD<sub>600</sub>) und eingesetztes Volumen bekannt, lässt sich daraus die Phosphatmenge pro Zellvolumen bestimmen. Die Berechnung des Zellvolumens erfolgt nach Koch und Oesterhelt [63].

$$\text{Zell-Phosphat [mM]} = \frac{\text{Phosphat in Gesamtlg. [mM]} \cdot 6 \cdot 250\mu\text{l}}{\text{Zellvolumen } [\mu\text{l}]}$$

$$\text{Zellvolumen } [\mu\text{l}] = \text{OD}_{600} \cdot \text{Probenmenge [ml]} \cdot 1,4$$

Stopmix: 15% Trichloressigsäure  
 5% Ascorbinsäure  
 ad 100ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 steril filtrieren und bei 4°C aufbewahren

Messlösung: 1% Ammoniummolybdat  
 ad 100ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
 steril filtrieren

## 5.6 Bioinformatische Methoden

### 5.6.1 Sequenzvergleiche, Ähnlichkeitsanalysen, Klonierungen

Für Sequenzvergleiche aller Art (Auswertung von Sequenzierungen, manuelle Vergleiche von Gen-/Proteinsequenzen etc.) war das Programm Bioedit 7.0.1 [45] die erste Wahl. In diesem ist auch ClustalW [135] implementiert. Für Vergleiche von Genen oder Proteinen mit solchen aus *H. salinarum* wurde die in Halolex integrierte BLAST-Funktionalität [3] eingesetzt. Das Programm Clonemanager 7 (Sci Ed Central) diente zur Planung und *in silico* Herstellung aller Vektorkonstrukte. Die Sequenzvergleiche in den Abbildungen 3.1, 3.3, 3.40 und 3.43 wurden mit ESPript visualisiert [37].

### 5.6.2 Sekundärstrukturvorhersage und Modellierung

Für die Bestimmung der Kernbereiche der PAS-Domänen mussten die Sekundärstrukturen der analysierten Kandidaten vorhergesagt werden. Dies geschah mittels des Online-Werkzeugs SSPro (<http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/>) [100].

Die Modellierung der Tertiärstruktur der PAS-Domäne von OE3855R erfolgte mit SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/>) [118]. Alle Proteinstrukturbilder wurden mit dem AISMIG-Server (<http://aismig.dkfz.de/service.php>) [16] visualisiert.

### 5.6.3 Phylogenetische Analysen

Die phylogenetischen Analysen der Histidinkinasen, Antwortregulatoren, PAS-Domänen und PhoU-Homologen wurden mit Hilfe der Programme Bioedit, ClustalX [136] und Treeview 1.6.6 [96] durchgeführt.

### 5.6.4 Programme zur RT-qPCR-Analyse

Zur Durchführung und Auswertung der RT-qPCR-Experimente waren die Programme Primer Express 2.0 (Auswahl der optimalen Primer), Oligonucleotide Properties Calcul-

lator (Online-Interface, Prüfung von Sekundärstrukturen der Primer) sowie GeneAmp 5700 SDS (Steuerung der Maschine und Extraktion der Rohdaten) von Nöten. Die Berechnungen der Genregulationen nach der  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode erfolgten mit MS Excel.

### **5.6.5 Array-Auswertung**

Die Auswertung der Fluoreszenzdaten der einzelnen Mikroarrays erforderte einen ganzen Strauss an Software. Die Fluoreszenzen der Sonden auf den Arrays wurden mit einem Laserscanner, der mit Genepix Pro V4 gesteuert wurde, eingelesen und mit der wesentlich verbesserten V6 aus den Bildern extrahiert. Aus den Rohdaten wurden mit MS Excel die relevanten Datenkolonnen selektiert, neu angeordnet und als Textdatei gespeichert. Eine solche Datei enthielt neben der Gen-ID die genauen Koordinaten der Sonden (Reihe/Spalte innerhalb des Druckkopf-Blocks und Reihe/Spalte des Blocks selbst) sowie die Fluoreszenzen (Sonden- und Hintergrundwerte beider Anregungswellenlängen (532nm u. 635nm)) jedes Gens von allen, zu dem jeweiligen Experiment gehörenden Mikroarrays. Diese Datensammlung wurde mit R-Routinen von Dr. G. Welzl (GSF, Neuherberg) bearbeitet. Am Ende der Bearbeitungsschritte stehen die normierten, Hintergrund bereinigten Rohwerte. Danach mussten die Daten zunächst in MS Excel neu arrangiert werden um mit TIGR-MEV die Signifikanzanalyse (ttest) durchführen zu können.



## 6 Abkürzungsverzeichnis

ADI-Weg	Arginin-Deiminase-Weg
APS	Ammoniumpersulfat
Aph	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
Attraktant	Lockstoff
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSH	Hepes-gepuffertes Basalsalz
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CarbP	Carbamoylphosphat
CIC	„Chemical in cuvette“
CIP	Calf Intestine Phosphatase
COX	Cytochrom C Oxidase
Ct	Cycle threshold, PCR-Zyklus in dem ein bestimmter Fluoreszenzwert überschritten wird
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Mischung aus den 4 Desoxynukleotiden dATP, dTTP, dCTP, dGTP
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
$\epsilon_{pNp}$	molarer Extinktionskoeffizient von para-Nitrophenol
EtOH	Ethanol
GAF	Acronym aus <b>c</b> GMP bindende Phosphodiesterasen, <b>A</b> denylatcyclasen in <i>Anabaena</i> und Transkr.faktor <b>F</b> h1A von <i>E. coli</i>
Gly3P	Glycerin-3-phosphat
Glc1P	Glucose-1-phosphat
Glc6P	Glucose-6-phosphat
HAMP	Acronym aus <b>H</b> istidine kinase, <b>A</b> denylyl cyclase, <b>M</b> ethyl-accepting chemotaxis protein und <b>P</b> hosphatase
HK	Histidinkinase
HM	Halomedium

Htr	Halobakterieller Transducer
HybHK	Hybridkinase
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
Lsg.	Lösung
Mbp	Megabasenpaare
MS	Massenspektrometrie / Massenspektroskopie
MTP	Mikrotiterplatte
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphat
Ni-NTA	Ni-Nitriloacetic acid
OD	optische Dichte bei bestimmter Wellenlänge
ONPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid
ORF	open reading frame
PA	Polyacrylamid
PAC	„PAS associated domain“, funktioneller Teil von PAS-Domänen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Acronym der Vertreter Per, ARNT und Sim
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	umgekehrter dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
P <sub>intra</sub>	intrazelluläre Phosphatkonzentration
pNp	para-Nitrophenol
pNpp	para-Nitrophenylphosphat
qPCR	quantitative PCR
Repellent	Schreckstoff
RG	Reagenzglas
rpm	rounds per minute
RR	Antwortregulator (engl. „response regulator“)
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription (je nach Kontext)
SM	synthetisches Medium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sigpep	Signalpeptid
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
SuccDH	Succinat-Dehydrogenase
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin
TMAO	N,N,N-Trimethylamin-N-oxid
üN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
vgl	vergleiche
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZKS	Zwei-Komponenten Systeme

# 7 Anhang

## 7.1 Gennummern der Transkriptomanalyse

Abschnitt 3.2.5 ab S. 32 zeigt mehrere Abbildungen zur Transkriptomanalyse. In den meisten Abbildungen sind die Gene entsprechend ihren biologischen Funktionen zusammengefasst und nicht namentlich genannt. Daher können hier im Anhang die Nummern aller besprochenen Gene nachgeschlagen werden. Mit Hilfe der Halolex-Datenbank (<http://www.halolex.mpg.de>) sind somit die Eigenschaften jedes regulierten Gens einzusehen. Gene, die in den Abbildungen 3.18-3.27 mit einem Stern gekennzeichnet sind (nicht hinreichend signifikant oder nicht mindestens zweifach reguliert), erscheinen in den folgenden Listen *kursiv*.

### Abbildung 3.18 (S. 37)

OE1675R  
OE1676R  
*OE1678R*  
OE1679R  
OE4479R  
OE4480R  
*OE4483R*  
OE4485R  
OE1674R  
OE1681F  
OE4476R  
OE5166F  
OE5168F  
OE5169F  
OE5170F  
OE5192R  
OE1410F  
OE3526R

### Abbildung 3.21 (S. 42)

OE3106F  
OE3102R  
OE3101R  
OE3093R  
OE3468R

### Abbildung 3.24 (S. 44)

OE3541R  
OE5083R  
OE3925R  
OE4122R  
OE2906R  
OE5186R  
OE3899R  
OE3579F  
OE4677F

### Abbildung 3.19 (S. 39)

OE2697R  
OE3644F  
OE3646F  
*OE3648F*  
*OE1954F*  
*OE1956F*  
*OE1957F*  
*OE1958F*  
*OE1959F*  
*OE1960F*  
*OE1963F*  
*OE1964F*  
OE1965F  
*OE1967F*  
OE3349F  
OE1872R  
*OE1874R*  
*OE1876R*  
OE4070R  
OE4073R  
OE4077F  
OE7065F  
OE7066F  
OE2220F  
OE2222F  
OE2223F  
*OE3978R*  
*OE3984R*  
OE3985R  
OE3986R  
*OE3987R*  
*OE3988R*  
*OE3989R*  
*OE3991R*  
*OE3992R*

### Abbildung 3.22 (S. 43)

OE4419R  
OE4420R  
OE3486R  
*OE5203F*  
OE3556R  
*OE3554F*  
*OE5201F*  
OE5202F  
*OE5204R*  
OE5205R  
OE5206R  
*OE5208R*

### Abbildung 3.25 (S. 45)

*OE2378R*  
*OE2379R*  
*OE2380R-2*  
*OE2381R*  
OE2383R  
*OE2385R*  
OE2386R-2  
*OE2390R*  
*OE2392R*  
OE2414R  
OE2474R-2  
OE3347F-2  
OE3611R  
OE3612R

## Abbildung 3.26 (S. 46)

OE5113R  
 OE5114R  
 OE5116R  
 OE5118R  
 OE5119R  
 OE5121R  
 OE5122R  
 OE5123R  
 OE5124R  
 OE5125F  
 OE5127F  
 OE5128F  
 OE5129F  
 OE7022R  
 OE7023R  
 OE7024R  
 OE7026R  
 OE7027R  
 OE7028R  
 OE7030R  
 OE7031R  
 OE7032R  
 OE7033R  
 OE7034F  
 OE7036F  
 OE7037F  
 OE7038F

## Abbildung 3.27links (S. 47)

OE1279R  
 OE1637R  
 OE2631F  
 OE2637F  
 OE2638F  
 OE4739R  
 OE4740R  
 OE4741R  
 OE4742R  
 OE4743R  
 OE1372R  
 OE2267F  
 OE2678R  
 OE3872R  
 OE3874R  
 OE1372R  
 OE7059R-2  
 OE7186F  
 OE7214R-2  
 OE1797R  
 OE3923F

## Abbildung 3.27rechts (S. 47)

OE1818R  
 OE2809R  
 OE2159R  
 OE2165R  
 OE2627F  
 OE2628F  
 OE2629F  
 OE2635F  
 OE2641F  
 OE3062F  
 OE3395F  
 OE3400F  
 OE3405F  
 OE3408F  
 OE3410F  
 OE3415F  
 OE4532F  
 OE4735R  
 OE4736R  
 OE1294R  
 OE2600R  
 OE2601R  
 OE2602R  
 OE2603R  
 OE2632F  
 OE2633F  
 OE2662F  
 OE3388F  
 OE3389F  
 OE3390F  
 OE3392F  
 OE3394F  
 OE3402F  
 OE3404F  
 OE3407F  
 OE3411F  
 OE3412F  
 OE3413F  
 OE3414F  
 OE3416F  
 OE3417F  
 OE1687F  
 OE4572R

Für einige Gene wurden im Laufe der Chipentwicklung mehrere Sonden hergestellt und auf dem Microarray platziert. Sonden solcher Gene enthalten neben dem Gennamen (OE1234F) noch die Kennung „-2“ oder auch „-3“.

## 7.2 Verwendete Abkürzungen von Speziesnamen

Acau	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Adia	<i>Adiantum</i> sp.
Axyl	<i>Acetobacter xylinum</i>	Bjap	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Bper	<i>Bordetella pertussis</i>	Bsub	<i>Bacillus subtilis</i>
Cace	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Ccre	<i>Caulobacter crescentus</i>
Ecol	<i>Escherichia coli</i>	Hhal	<i>Halorhodospira halophila</i>
Hsal	<i>Halobacterium salinarum</i>	Hsap	<i>Homo sapiens</i>
Koxy	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kpne	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Mmus	<i>Mus musculus</i>	Ncra	<i>Neurospora crassa</i>
Pput	<i>Pseudomonas putida</i>	Rsph	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
Smel	<i>Sinorhizobium meliloti</i>		

## 7.3 Für phylogenetische Analysen verwendete Aminosäuresequenzen

Sequenzen für die phylogenetische Analyse in Abbildung 3.7 (S. 24):

```
>ActR(rme) IQRPERVEPPENPMSADRVWEHIQRVYEMCERNVSETARRLNMHRRTLQRILAKRAPK
>OE2086F TVETLRDRLAYSDDLQELYALLSKRALLETNPDAADTDAYDDDDRIDALRADLTDTVSEFSDHDFRAAFHDLTPQDPEGGANAN
>FixJ(bja) ESAIRQAEPAKSEAVAQDI AARVASLSPRERQVMEGLIAGLSNKLIAREYDISPRTIEVYRANVMTKMQANLSSELVRLAMRAGMLND
>OE2334R TVGRLQRRSTYDDTVAEFAAARKQALLSESDPTITDSAEFSALESDLASLRDLDVVDADFDADYEVLFRQLSGPDGDTDDG
>LytR(sau) NKVRATKAKDDNNASAIANDMSANFDQSLPVEIDDKIHMLKQNNIIIGITHNGITTIHTNTHKYETTEPLNRNRYEKLNPTYFIRIHRSYIINTKHIKEVQQWFNYTYMVILTNGVKMQ
VGRSFMKDFKASIGLL
>NtrC(eco) ERAISHYEQQQPRNVQLNGPTTDII CEAPAMQDVFR IIGRLSRSSISVLINGESGTGKELVAHALHRHSAPRAKPFIALNMAAIPKDLIESELFGHEKGAFTGANTIRQGRFEQADG
GTLFLDEIGDMPLDVQTRLLRVLADGGFYRVGGYAPVKVDVRIIAATHQNLEQRVQEGKFREDLPHRLNVRVHLPLRERREDIPRLARHFLQVAARELGVAKLLHPETEAAALTRL
AWPGNVRQLENTCRWLTVMAAGQEVLIQDLPGLFESTVAESTSQMQPDSWATLLAQWADRALRSRGHQLLSEAQPELERTLLTTALRHTQGHKQEAARLLGWGRNTLTRKLELGME
>OE2416R LSCHEELVAVERVASADPTAGHDVEMEPASPPDATTSEYADNPTLLIGASTGCPNVVESILASLPAEADFVRLIVQHMPDQFTSRFADRLDAASQYDITEADGSRIGGEGELVAR
GDYHMRVSGYSGNGLRVRLDQSERLHSVPAIDVTFKSAERVTDLVSVVLTGMGSDGADGVRVAVKDAGGATLAQNEATSAVFGIPERA IETGCVDDVLVDQLTEAIAIDSRRTT
>OmpR(eco) RAVLRRQANELPGAPSQEEAVIAFGKFKLNLGTREMFREDEPMLTSGEFAVLKALVSHPREPLSRDKLMNLARGREYSAMERSIDVQISRLRRVVEEDPAHPRYIQTVWGLGYVFP
DGSKA
>CheB(bsu) IKEQLVERVVAAGLSGKRKRPVQTVRPEPIVRAVVKPELSKPKPGTGRQIVICIGTSTGGPRALQKVPKLPKDLNAPVVVVQHMPGEGTASLADRLNHLSDIQVKEAKDGEAALNGC
VYIAPGKKNISVIKNSEGLQVLDNHDTPSRHKPSADYLFRSVGLKTDYEKVAVIMTGMGSDGTAGLKDMLTAGNVKAI AESEESCVVYGMKAAVKAGLIEHKHVEDIAASITSCV
KKERV
>OE3854R VVARLRTLNQYDSDIDELRYVTQKATLEAQLSERALADNDEYQRLRERKATLSEAADAALDAAGTSTDALGDEFARLF
>CitB(kpn) ERFARYRSSLRSSEQAQLHVDALFNIAQRETEPASAAPLRGIDESTFQRVLQFADPTVHTADSLARILGSSKTTARRYLEQGVKNDFLEAEISYGVKGRPERIYHGKQTYPEQR
>ComE(spn) EQNIFYTKSMLENEVDVDFYNYKGNLKIPIYHDILYIETTGVSHKLRIGKFNFAKEFYGMTDIQEKDKHTQRFYSPHKSFLVNIIGNIREIDRKNLEIVFYEDHRCISRLKIRK
LKDILEKSKS
```

Sequenzen für die phylogenetische Analyse in Abbildung 3.8 (S. 25):

```
>DcuR(eco) INVLIIDDDAMVAELNRRYVAIPGFQCCGTASTLEKAKEIIFNSDTPIDLILLDIYMQKENGLDLLPVLHNRACKSDVIVISSAADAATIKDLSHYGVVDYLKPPQASRFEE
AL
>ComE(spn) MKVLILEDVIEHQVRLERILDEISKESNIPISYKTTGKVRFEFEYIENDEVNQLYFLDIDIHGIEKKGFVAQLIRHYNPYAIVFITSRSFATLTYKYQSALDFVKDIND
EMFKKRI
>DegU(bsu) NVIVIDDQHLFREGVKRILDFEPTFEVVAEGDDGDEAARIVEHYHPDVMIDNMPNVNGVEATKQLVELYPESKVILSIHDDENYVTHALTKARGYLLKEMDADTLIEAV
>FixJ(bja) GHYIVIDDDAMRDSNLFLLDSAGFVTLFDDAQFLDALPLSGFCVSDVRMPGLDGIELKRMKAQQSPPFILMTGHGDVPLAVEAMKLGAVDFLEKPFEDDR
>ArcB_RR(eco) LNVLLVEDIELNVIVARSVLEKLGNSVDVAMTGKAALEMFKPGEYDLVLLDIQLPDMTGLDISRELTKRYPRDLPLVALTANVLKDKQEYLNAGMDDVLSKPLSVPALTAMI
>LytR(sau) MKALIIDDEPLARNELTYLNEIGGFEEINEAENVKETLEALLINQYDIIIFLDVNLMDENGIELGAKIQMKPEPAIIFATAHDQYAVQAFELNATDYILKPPGQKRIEQAV
>CheY(eco) LKFLVDDFSTMRIRVRLNKLKELGFNNVEEAEDGDVALNKLQAGGYFVSIWDMNMPMDGLELLKTIRADGAMSALPVMVMTAEAKKENIIAAAAGASGVYVPPFTAATLEEKL
>SpoF(bsu) EKILIVDDYIGIRILLNEVFNKEGYQTFQAANGLQALDIVTKERPDVLLDMKIPGMDGIEILKRMKVIDENIRVIMTAYGELDMIQESKELGALTHFAKPPDIDEIRDAV
>PhoB(kpn) RIRLIVDEEAPIREMFCVLEQNGFQVEAEDYSAVNQLNEPWPDLILLDWMPLGGSGLQFIKLLKREAMTRDIPVVMLTARGEEDRVRGLETGADDYITKPFSPKELVARI
>Slr2099(syn) ATVLIVDDSPDTLMTSLGLKDHYRIKIASKGEQALAAIASMPPDDLILLDIMPEIDGYEVCTKADTQTKNIPVIFLTAKTQVADQHGFLGAVDYITKIPISPPILLARV
>CheB(rme) ARVLVDDSATMRGLISAVLNADPDI TVVGQAADALEARQA IKQLDPPVVTLDIEMPNNGLEFLDKIMRLRPMVIMVSTLTHRGAETIAALEI GAFDCVKGKPPQGDTHPFRD
>MoxX(pde) LQILIVDDHPVVAEGWGRIRTRKTACEIASAPSASEGWRAWRQARPDLMVVDLSIGRNKIAGIRLIERLRVDPDPLILVFTMHRSPVLARRALMFGANGI IKDSSPPAEICAA
FTEVARG
>FixL_RR(rle) VLVVEDDARVRRVAVARLASMGYTVREAENGRHALDLLKENPDVALLFTDIVMPGGMTGDELAKEVIRLIPDIAVLFSTYSYSEPLAGNDTVPGAQLRKPPTAKELALRVRELL
DAK
>CorR(psy) SSILLIDHDHALFRSSVALMELMRLPRTTVSERSRIEESAQAACRPPDLILLDLQMKGTNGLETIALLQERWSSARVVIVSAFDRDQVCEATQRGAVEFHSAKCEPEHLLQRIQAL
LS
>MTH445(mth) dadillvednptdaeltiralknmlanklhvwkdgaeadyifasgysdrdenplkllldlrmkpvqglevlqeikrkdskpipvvtlsskeddrivesykgvnsyvs
kpvefdefisav
>CKI1(ath) krvlvddnfisrkvatgkllkmgvseveqcdsgkealrlvttegltrreeqsgvdklpfydfimdcqmpemdyeatreirkvekygvrtpiiavsgdhgpeearetiagmd
afldkslnqlanvireieskrh
>Slr1759_RR1(syn) KQVLIVDDNETNRRILQDQCQAWLVCHCFTSGESALDWFARCPDLDAAILDLQMPNMDGITLAHHLRQFAQCKDPLIILLSSGLVAGADELSVFTVLNKPVRQSLIFDLSLVNI
FQGS
```

>OE4283R (REC: 12-133aa) VHVLYVNDHDDFAELTRKRLQSPASFTVTTVGTAAADALARLDESADCVVTSYSLPDTTGGIDLLERIHDTDHPPTILFTGRGSRERASEATRAGVSDYLPPIHAGQ  
RSFEL  
>OE2086F (REC: 1-120aa) MSSQAGTVLIVDDDAALTDVYAAWLADDYVPVETATSGAAALVDIDDHVDIVLLDRRMPGLSGDDVLAERADGHDCRVAMVTGVEPTTDVIAIMGFDEYLVKPVSDSD  
LHR  
>OE2334R (REC: 15-129) TVLVVDDERGLADLYTIWLEDDYDVKTAYSGETEIDAIDPTIDVALLDRQMPDVSGDDVLDLREGRGIECRVAMVTAPELDDIGLGFDDYLVKPVDRDITLLE  
>OE2416R (REC: 2-132aa) TEALVDDSHFMRTVISEDILEGGVDVVGTAENGARALDAVTDVQPDVITMDVEMPMDGIEATAEIMREQPTILMVSALTTEDADATLEAMEKGAIDTFAKPGGT  
ISTE  
>OE7042R (REC: 93-213aa) IQVLHVDDPEDFADMAAEFLEREDDRLTVESATSASEGLDRLDEHDYDCIVSDYMPGMDGVEFLVTRKAYPNLPIFLTGKGSEQVASEAIAAGVNDYLQKSGSG  
EYVELLGNRITNHV  
>OE3854R (REC: 6-120aa) VVLVVDDEPRVAEAFALWLEDDYEVRTATSGAAALEADDVSVALLDRQMPMTGDEVLAALRERALDIRVAMVTGIDPDFDIVEMPFDEYIKQPVGDITLHD  
>OE2417R (REC: 3-120aa) KQVLLVDDSEFMNLLREILEEEFEIADAENGEVAEMVKEYEDPDLVMMDIVMPIRDGIEATSEIKFEDAGAHIMCTSIGQEEKMKAVKAGADGYLTKPFKQPSV

Sequenzen für die phylogenetische Analyse in Abbildung 3.41 (S. 67):

>PYP-Hhal DGLFAGAIQLDGDGNILQYNAEEDITGRDPKQVIGKNFFKDVAPCTDSPEFYGKFKEGVASGNLNTMFEYTFDYQMTPTKVKVHMKKALSOGSVYVFKRV  
>LOV2-Adia RIGKSFVITDRPLDPNP IIFASDRFLELETYTREELVGNCRFLQGRGTDRKAVQLIRDAVKEQRDVTVQVLYNYTKGGRAFVNLFLHQLVMDRENGDQVYFVIGVQEMV  
>HERG-Hsap GQSRKFIIANARVENCAVICYNDGFCELCGYSRAEVMQRPCDFLHGPRTRQRAAAQIAQALLGAEERKVEIAFYRKGSCFLCLVDVVPVKNEDGAVIMFILNFVEMV  
>FixL-Smel DTVPDATVVSATDGTIVSFNAAAVRQFYAAEEVIGQLRILMPEPYRHEHDGVLQRYMATGEKRIIGIDRVVSGQRKDGSTFPMKLVAGEMRSGGERFFTFPIRDL  
>FixL-Acau DTVPDAMIVIDERGIMQFSFITAERLFGYSPSEVIGRNVSMMPNHRDQHDLYSRYLTTGERRIIGIRVVTGERKDGATFPMELAVGEMHSVSRGFFTFPIRDL  
>Dos/YddU[1]-Ecol QNMMGAVLINENDEVMFFNPAEKLWGYKREEVIGNNIDMLIPRDLRPAHPEYIRHNREGGKARVEGMSRELQLEKKDGSKIWTRFALSKVSAEGKVYYLALVRDA  
>Dos/YddU[2]-Ecol HLDLDPVILDRPERHIVQCNRAFTEMFGYCISEASGMQPDTLNIEFPADNRIRLQLLWKTARDQDEFLLTRTGEKIWIKASISPVYDLAHLQNLVMTFSDITEERQIRQL  
>NifL[1]-Kpne EQASVAISLTDARANITYANPACRQTGYSLAQLLNQNPRLASSQTPREIYQEMWQTLRQRPWRQLINQARDGGLYLVLDITDITVLPNQQEHEHYLAMQRDI  
>NifL[2]-Kpne NNIPAAVVVDEQDRVMDNLAYKTFCADCGKELLVELQVSPRKMGPAGEQILPVVVRGAVRWLSVTCWALPGVSEASRYFVDSAPARTLMVIADCTQQRQQEQGR  
>Aer-Pput RFPSSGRLISATDTASLITYCNPEFAAISGYSDAELIGSPHNLVRHPDMPAVYELMWRYLKAGKSMGIVKNRCRNGDYVYVNAVYVTPILEGGRVGVYESVRVCP  
>ArcB-Ecol DASPDLVFRYNEDEKFEFGCNRAMELLTGKSEKQLVHLKPADVYSPEAAKVIETDEKVFRRHNSLTYEQWLDYDGRKACFEIRKVPYVYDRVGRHGLMGFGRDI  
>PpsR[1]-RspH EMETRYRVLVDSRDPVLMVSMSTGRIVDLNSAAGLLGGVRQDLGAIAQEFEGRRRGEFMETMNLAAATESAAPVEVLSRRSQKLLVVPVRAAGERLLCQID  
>PpsR[2]-RspH HEGVDGIVFSDADGTIRGANEAFNMTDSSSLAARIGRSIADFLARGSVLRLVLDIVSVRRGTQLRLYATRLTTDFAGQIAAEISATWLDLDRERPLLVVDRDTS  
>YtvA-Bsub DHVRVGVVITDPALEDNPIVYVYVQGFVQMTGYETEELIGKNCRFLQKQHTDPAEVDNIRALQNKQEPVTVQIQNYKQDGMFWELNIDNPEIEDKTYFVIGQNDI  
>QABE3-Ccre SATRMAMIVADATQDPIIFANDAFLRLTGYARDEVIGRNCRFLQGGPDTDKAIQAVRDALAAGEDVAVDLLNRYKDGSPFWALNMSVPRMDAGGLVYFSGQVVDV  
>AtoS-Ecol ENAADGVIAIDRQGDVTTMNPAAEVIITGYQRHELVGQPSYMLFDNTFYFSPVLDLLEHGTEHVALEISPPGRDRIELSVTTSRIHNTHEMIGALVIFSDS  
>CitA-Kpne ESVFEGLIAIDSDYKITAINQATRRLLNLSQPEPTLIGKRISSVISQEVFFYDAPQTNKDEIVTFNQKVIASRMVILNNEPQGWISFRS  
>DcuS-Ecol QSIKEGVAVDRGEVTLINDAAQELLNRYKSQDDEKLSLSSHWSQVVDVSEVLRDGTPRRDEEITIKDRLLINTVPRVNSGVIIIGAISTFRD  
>RcsC-Ecol ASAPVGCILRTADGVNLSNLAHTYLNMLTHEDRQLTQIIICGQVNFVDVLTNSNNTLQISFVHSRYRNVNAICVLVDVSS  
>NtrB-Koxy NSLINSILLVDDLAHVYANPAAQQLLAQSSRKLFGTLPPELLSYFSLNIGLQMSELAAGQGFDTNEVTLVIDGRSHLSLTAQRLEPEGYILLEMALP  
>NtrB-Smel NAIQNPVILVDENGVFANWEAEEFFGASANHLRHADISAFIPFGSPLTLTIEQVRRERRAAVNEYRVDLSPRLGADKLVLDVYAPVLSQPGSVVVFQE  
>NifU-Cyanoth KIHLKIDEATQIILDARFQFPGCASAIASSALTELVGKTLDEALSNTREIAEPLGGLPEEKMHCSVMGQEALEAAIFNRYRGIPLDHHEDEGALICKCFGV  
>ARNT[1]-Mmus LEAADGFLFVVAETGRVYVSDSVTPVLPNQPSQEWGFTLIEYQVHPDVEKLEQLCTSENSITGRILDKGTVYKKEGQSSMRMCMGSRFSICRMRGNA  
>AbR[1]-Mmus LQALNGFVLVVTADALVYASSTIQDYLGFQSDVYIHSVYELIHTEDRAEFQRQLHWALNPDSAQGVDEAHGPPQAAVYVYTPDQLPENASFMERCFCRCLRCLLNSGFL  
AMNFQGRKLYLHG  
>AbR[2]-Mmus EIRTKNFIFRTHKHLDFPTICGDAKQGLILGYTEVELCTRGSQYGFIAHADMLHCAESHIRMIKTESGSMVFRFLFAKHSRWRVQSNARLIYRNGRPDIYIATQRPLTD  
>ARNT[2]-Mmus MSVTEFLSRNSDGIITFDVPRCISVIGYQDQLLKGDIELFCHPEDQSHLRESFQQVVKLGGVLSVMYFRTRKNREWLLIRTSSFTQNPYDEIYVICTNTNVKQL  
>KinA[1]-Bsub QTKTDIHAVLASNGRIIYISANSKHLGGLYQEMIGSFLKTLFHEEDQLVESYFYNEHMLPCTFRFRIKDKHTIIVVEAAVEIVTTRATEREIIILKMKVLETY  
>KinA[2]-Bsub NLPSPLCISVKGKIVYVNSAMLSMLGAKSKDAIIGKSSYEFIEEYHDIIVKNRIIRMQKGMVEGMIETWKRDLGTPVHLEVKASPTVYKQAEALLLIDI  
>KinA[3]-Bsub SIDTIAVHNGKWFVFNESGISLFEAATYEDLIGKNYDQLHPDCHEDVKERIQNIAEQKTESEIVKQSWFTQNRNIYTEMVCIPTTFPGEAQVQVILRDISE  
>BvgS-Bper TPNPYVVRKKEGRMLLNDAYLDFTVGTADAVLGKTIPEANVVGDPALAREMHEFLTRVAAEREPFEDRDVTLHGRTHRVYQWTPYDGSGLGKGIIGGWID  
>PDEA1-Axyl ATVIIGQENIIFYNQAAESLWGIIPRADVIGRNVDCVPLRTRHEHDYRDRNRETGHNRIVGTSREVEFTRADGEYICGELSLSKVICIGQDRLTYVMGMKNVTEE  
>PhoR-Ecol DAVVLTTEEGIFWCNGLAQQLGLRWPEDNGQNLNLRYPEFTQYLKTRDFSRPLNLVNTGRHLEIRVMPYTHKQLLMVARDVTQMHLLEGARRNFANVSHLRTPLT  
>NtrY-Acau SGVGAGVIGLDSQERITILNRSARLLGLSEVALHRLHAEVVPETAGLLEEAHARQSRVQGNITLTRDGRERVFAVRVTTQESPEAHEGWVVLDDITELISAQ  
>PleC-Ccre EAARCGIWEWDLNGDQVYLSVDTGAMFGWGGGVVSGDQLLERISIDHREVRVQALANAAMYGAFDVSFRVASEQARSWLDARQGQFGKPGSEGHARIIGVALDVT  
>KinC-Bsub LQEIIVFQTKNAKEITYLNQAWASITGFSISECMGTMYNDYFIEKEKHADVHINTQIQNKASSGMFTAKYVTKNGTIFWGEVHYKLYDRDDQFTGSLGMSDITE  
>NuoE-Ecol EGVATFYSQIFRQPVGRHVIRYCDVCHINGYQGIQAELKLNKPKGQTTDFDGRFTLLPTCCLGNDKGNMIMDEDTHAHLTPEAIPPELLERYK  
>WC-1[1]-Ncra DMSCAFVCDVTLNDQPIIYVSDNFQNLTYGSRHEIVGRNCRFLQAPDQNGVEAGTKREFVENNAVYTLKKTIAEGQEIQLSLINRYKGGKPLNLLMIPIDWTEIRYFIGF  
QIDLVE  
>WC-1[2]-Ncra ADDVVHVLSLKFLFLYSPACKVLEYDASDLVGTSLSSICHPSDIVPVTRELKQAQHTPVNIVFRIRRNKSGYTFWESHGTLFNEQKGRKCIILVGRKRPVFLHRK  
>WC-1[3]-Ncra DSEIWTKVSTSGMFLFVSSNVRSLDLLPENLQGTSMQDLMRKESRAEFGRTIEKARKGKIASCKHEVQNKRGVLAQYTTFFYDGGGQGRPTFLLAQTKLKASSRT  
>WC-2-Ncra QDEWHILDANGRIKHVSFSVEPLTGYKYPPEIDFLRDLIHPDDVGVFTAELNEAATGSQLRFLYFRFRKDKGNWTFIFETVGHAGHIAAKFANPNQNSPFCQAVFMM  
>3855-Hsa1 EHGSDAIVTIDDDSTIRYANQGVHRVLGYRPDDLIGDSLTTIMPPRFHDAHFDVHDYLETGDRRLDWAIEMPGQHADGHEILQISLTFEEHVHNGVRAFSGIMRDV  
>2088-Hsa1 EQSHDAVTHTRDGFVFNPEATELFRDESTLLDAAASDLVHPDDHALTPTDDAVPGDDHDTDFARVQRPDGTIRQCEVSTTTITYEGDPAVLASIRD  
>2333[2]-Hsa1 VPSPTASFVIEDGAPIVQSVNNAFETVFGWTEADLAGENIDEYIVPNDTRGDAAAYNRMMKAGETVNVVEVQRRTDQGRDFLLDVPRLADPVSVHGFAVYDIT  
>2333[1]-Hsa1 LFEAADALVLYGIEDGTPTAITHANESANALFELPAPGLCGHRLPTLVDAADAFAPGNSRRITTTVATDVTVTIVVHPLPADGDVDAFELRDVTEHVERERAL

>2058 -Hsa1 RRLVREFAALLYRQPSWYAGVVGPDGRIEYANEAAARDVIGADARDLVGTFWFQAPWFTHQDQVAAVREQVAAAQVGEASQFTATHRTSGGCTATVELELQPMAPAVDGIIDDH  
DHAFVAVVGR

>2684 [1] -Hsa1 DRAHTTSDPQVSLVCDRDGTIRNWNAAVAAAAAGDHPDGTDLADVLSIDDPQSLIEAAQTHGTATAEGGFAPHAPTTYDFHASRLVDRITIHGTATTPDIRQ

>2684 [2] -Hsa1 VDRVTDFAVVDNDARITYVNAEAESELLSAESATPDTLLGCLWEVLPASVGPFRFRDAYRTAVDSQDAVSFTGHYDPADAVIEARLFPSSSGVSVYLQDI

>2764 -Hsa1 DSAMDGIAIMDDAEQTVQYANASFTGGTDAERVRGQSWQSLYPSSEHGPIADALVALDDGQDQWQGI V TACGADGTTYPQELTMTAVADGVVWCRDV

>2961 [1] -Hsa1 LAAVTPVPPVQHGTVTFANPAFSELTVGADVPVGAIRSFAPQDASDLDRFCDAVAAGNATRTHARVVLGADTDRLVTVDAITRLNAAHQDAPATALVVAAPESGM

>2961 [2] -Hsa1 HERILDALPVGSRFRRLGDLVGNDELVAFADAPSKAALRGRPAEFYATPAAREEIVATLRADGVVTELELELETLAGNTVWGTLTAVTVTHDGTTVVDGA

>2961 [3] -Hsa1 MFKHSAFMLLDIPDSGGIQNANDAAAAYGYYSVSELTGMTVTDLNTLPSGALDTHRGQAEGERNHVFHELEADGERRTVEIHSSPIELDTDTLVLSIVVDVTE

>4283 [1] -Hsa1 LERSTDAVYAVDEWRIEYMNETHMADRDRDRAVGVTVWEEFPLVGTPLLEEQYRTAMETGESVSSEQLGAPFDYVWVRAFPDDDLTVFSQEI TD

>4283 [2] -Hsa1 LRHIHDVVFVDDAGVVEFANAAQRVIGGTQSAPLVGHHLPTIIEDRGSADATSVSDAIDSTLAELESDDGTAGFYDNLPIIDFDAGTDTRTLDRVRFPTAADRQVLVVG  
RDITE

>4283 [3] -Hsa1 TANVGVFEYAPSTGSELEWSDGVRRIHGVDPGYEPSFDDAIDAYHPDDRETIAAAADRALDEGEPYDLDRIVRPDGVVDRVRAWGERVDSFQHGARTLRGVIQDI

>4283 [4] -Hsa1 LETSGDAIFLLDVTDTGDEPRFEARLSPGYEAQTGLETA AVKGTPREVFGDEQGESEVAAVNRRCVDEGAPISYREELDVGDFARFWDGLAPVVDGEIVRVIARNV

>4283 [5] -Hsa1 SLIEATPLAVMEIDPDGIVTRNDEAESMFQWTRREEVVGEPNVPVDSQDEFEDHRQVLRGGERIRGMELRRTKSGGDLVLLSAPVPGADGETTSL

>6145 -Hsa1 MLTVVDESQVYKYNPTIEEYLGYTSEVLIGDITVFDYIHPDDQRHVADTFSEIVDGTGTYTTSVVELRFRHADGSSWVLEAQMNSKKATEIAGYVSSSHDI

>7042 [1] -Hsa1 TAQEGISILDEDEHFVRYNQSFADLYGYEPAEMIEGHWELIYDPEEVQAINEEVLSIVEETGYWRGETTGLRADDSTFIEAHTLSQTDEGGLICTA

>7042 [2] -Hsa1 QSRAGIRIVQDGTVKFVNDRLAEMLGYPKHELLGAPAEIITSETEDIVRRHHAATRMQCEPAPDRYEVEVDEAGDRLCVELSVARIQYAGKPAASLSIRDI

>7042 [3] -Hsa1 DNAPDATALVEYRDETP IIRNDANFAEALFAGGDDGIVGQDIDGVVASSDQVAEARTISQQVQEGEP IQKELTRETADGLRTDFRSVPVEDRETGEIESAFVIYP

>7042 [4] -Hsa1 EATADPMYMLDEEGRFTYVDDAMVETTYGSEETLLGEHVSVMEEHDHVERGEQLIESLSSGKRGTFEMVETIAGGERFSTENHISLLDGDGEPHGTAGVLRDI

Sequenzen für die phylogenetische Analyse in Abbildung 4.1 (S. 98):

>OE1674R MIRMARDSYQEKLDLTDVDDVLYMSEVVTDRRLMALEAMAQKDDAAWEVDIGDDEINQLYLDLEDDCIDLLALQPPVAGDLRLIASSFKIITDLERIGDLAANAEYTLADDRDM  
PFEVDVQAIIGDRTIEMVTDMAAAYASADVEACYIAERDDIDERCRSASQTVIRDLIETEDAATDDAEI EALMQDVSRLLLTVRDLERVGDHVNISARTVYVMDNDEL IY

>OE1681F MERRKVVQVGGSTPTVSI PKDWARDHVSVEAGDEVGHPDSSGSLLTPIIDTDTDKGTLTI TDMHGEELMRAVMTMYVSGFDVLALEAESIDPDQRVIRDATQCLVGLVLEETS  
QRVVIQDLSSELSIHNVRMHLIAVSMLEDAVTLATRPDIARDVTRDDVDRLVVYVSRIFRGLARSPVAQEI GITREVAFDYHSSARQLERVADHAKIATATHDLN  
DDIPEDVVDALLETQADATDIETAMDALFADTADEATALATQARAQVRDIDQQRADVDRHLGLTAHHAQHLGLVVDLSRSADYGGNI AETALQKAAPTNP

>OE2128F MGTRKVVQVGGSTPTVSI PKDWARDHVSVEAGDEVGHPDSSGSLLTPIIDTDTDKGTLTI TDMHGEELMRAVMTMYVSGFDVLALEAESIDPDQRVIRDATQCLVGLVLEETS  
ETPARTIRCSVDPADFDLNNLERLENTGSTRGEAVKALAHGNPDLAQRALNRERQANKIFVLLRLIFTAYHDPGLARTVGLDEGFPVLYGRVSAKINLELVDNAEDIAEIV  
MATDGHLDVQATMRRRIREFTDVDDVAASAVSAAVNRDYDATVAVREQFSAIEDREADILADLPENNNADLLEAREVLVSLQSSAQYSMRNAEIAANLALNEQSAHTT

>OE4476R METRKIQVGGSTPTVSI PKDWARDHVSVEAGDEVGHPDSSGSLLTPIIDTDTDKGTLTI TDMHGEELMRAVMTMYVSGFDVLALEAESIDPDQRVIRDATQCLVGLVLEETS  
CSGTAAQPTAAQRDAVIDRARTLPGVDVAASSADHVAVRGLFDAADVSIIRSLMRLRNLAAHEAIDA V TASC GGCVVERVEDRCHTADRTRVRIERYGNRLAQRSTLDALAVS  
RPQVAGCVAAARALERATARAAGDVAAVGERAAGSLDDVAVRVLRGVSEADACASVDAATDALVEAVGGSSRVPSAHDARRQCARVRRVADCVERAALDDDAAMRTPSTA AVRA  
IDGLVGTADCGAATAAVLRMVAQAQR

>Ecol -PhoU MDSLNLNKHISGQFNALLESIRTQVMTMGVMEQQLSDAITAMHNQSDLAKRVI EGDKNVNMMEVAIDEACVRI IAKRQPTASDLRLVMVISKITIAELERIGDVADKICRTALE  
KFSQQHQPLLVSLESLGRHTIQLHDLVDAFARMIDEAVRIYREKDKVQDEYEGIVRQLMTYMMEDSRTIPSVLTALFCARSIERIGDRQCNI CEFIYVYKQDPRHVGDDDEL  
DKLLAGKDSK

>Cace -PhoU MTRKIFESDLEELHSELLRMGSMAEKQIYDCMEALEKQENMAEVI I KKKDIIDDMQKEIENKIVRLIAMQQPIVAEDLRI NIFTVVIKIVTDLERLGHADV IAKAIKRLNGEKHH  
DIVKEIWMGNKVKSMIKDSLDAYVERNLDKAYEVCKRDDVDLSYKRIFNELLNIMSEDKSKVNQLTQFLVCKYLERIGDRRTNVCSTIYITGKQVDLND

>PhoX2 (OE1679R) MPADDAERTTRTRRQVLAGMGATGAALACGQSTSSSEDPADDSLSGTVDVFA GSSVFPPLATMSEAFRGGDTEAHPDVFNFNPKSTGTGGGFANHFCTGNADLNNASREVRDAEA  
QQCTDNDIEPVEFTVADALTVIVNTDLIDSIITVDLRSIWSAERDTEQWSDVNPDPDEPLELYGPSASGTYDYFIESILHGGDTLTHISSGSGTYGTEQRTIIQGVGEGST  
NAMGYLGYAYKSDRRVKALAVDDGDGEPVKSLETARSGAYTPLSRPLFTYAAKSSLAEPAAVAFRLFWEHATSEAI VADQVGYVLSQEAQREQLDALTEAIDAAGSADE

>PhoX1 (OE4485R) MHSDDPDGASGVPVSRRAVFAATGTAGVAAALACANSTDCSGGGDTEAASQDQDETASQSSQLDTSVLTGDCSSTVFPITNEGSSYWNNSPEAGDEDYWEPEWANEYDTEMLADY  
FASEYGEAGGERSPPFRVSIALSHSGTIEGVMEDRVIDGASASAADELDPADSDTLDFVDHVVVDGQPIVASREIVDSGVETITIEELRGIYRQEI TNWSELGGPDRDI  
LALGRAQSGTDSFRANVFGDPEAAISPQQRQYQQQLQAIQGDNAIGYIALAFVQPDGTPPLDLEIDGTTYAYGENLGAEEYPLSRDLHAYTQDTSRKEAFAINFLLSE  
FQKQFVTSNDYFALPESRLSTEREKVAASNYQT

>Rps3 (OE3395F) MADELEFIEQQLRSQIDEFFAEELARAGYGMELAPTPMGQVILKAEKPGMVIKGGKNIKRIITQLEERFDLEDPQIDVQVEEPLDNLQIVADRLANALERGWYFRKAGHT  
TIDRIMESGALGAEIVLSCKVTGNRGRVEKFNRYIKHNGEPAEEIVDHKGVAVMKLTIGVNVKIIPNPAELPDDFEIQEDADIEDLVVDEAEAGDELEELLEGEDADAEDAD  
ADAAAPESEPADFEDEEVIETDDDVEELEDLADAVEGEDEDEDFSDVDEADTAEDLLEDDEDDGEGAE

>Car (OE5243F) MPASSDMMGGEATGELHDELCEAYLGDNEDDGGDELQRLSRERDFWKHMFNQLVAEYPEGILITAA DGTVTHWNERFSDHMKMARSALDGEDASDFVSTAESETLPEAVVRTG  
DTVEEPEPHVPTDSLQYHGVPLRAPTDGVVSGFVVPDISEKVNQRELHDLHETVSSNVGHELSSESIDEVGSAEETAFAGEEIERMEGVADVEVSNQSAITIEEIASA  
EEVVSQASQRAQDRATEGEQTAETAIDRMGAVQESAERVNDTIDGLTSQADEMSEIIDAINDIADQTNMLALNASI EAA RAGEKGGFAVVADEVKSLAESQERADEIEQMIVEM  
VETTDQADRI GQTTTIEEAI TAVRETLDSLQEI RKAQVDEATGKVEVAGATDDHAASTEQVAATDEAVDKLTELEDRLNLSQIASEQHDRVAEI EDMVDELVE



# Literaturverzeichnis

- [1] Allenby NE, O'Connor N, Pragai Z, Ward AC, Wipat A, Harwood CR. Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2005 Dec;187(23):8063-80.
- [2] Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus.
- [3] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- [4] Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by PhoM protein: PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2. *J Bacteriol.* 1990 Nov;172(11):6300-7.
- [5] Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J Mol Biol.* 2001 Apr 13;307(5):1271-92.
- [6] Antelmann H, Scharf C, Hecker M. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol.* 2000 Aug;182(16):4478-90.
- [7] Auesukaree C, Homma T, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y, Harashima S. Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):17289-94. Epub 2004 Feb 13.
- [8] Bagyan I, Hobot J, Cutting S. A compartmentalized regulator of developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1996 Aug;178(15):4500-7.
- [9] Baliga NS, Kennedy SP, Ng WV, Hood L, DasSarma S. Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 27;98(5):2521-5. Epub 2001 Feb 20.
- [10] Baliga NS, Pan M, Goo YA, Yi EC, Goodlett DR, Dimitrov K, Shannon P, Aebersold R, Ng WV, Hood L. Coordinate regulation of energy transduction modules in *Halobacterium* sp. analyzed by a global systems approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 12;99(23):14913-8. Epub 2002 Oct 28.
- [11] Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL, Sonnhammer EL. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):263-6.
- [12] Bauer C, Elsen S, Swem LR, Swem DL, Masuda S. Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003 Jan 29;358(1429):147-53; discussion 153-4.
- [13] Beckett D. Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *J Mol Biol.* 2001 Nov 30;314(3):335-52.
- [14] Benning C, Beatty JT, Prince RC, Somerville CR. The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Feb 15;90(4):1561-5.

- [15] Birkey SM, Liu W, Zhang X, Duggan MF, Hulett FM. Pho signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD. *Mol Microbiol.* 1998 Dec;30(5):943-53.
- [16] Bohne-Lang A, Groch WD, Ranzinger R. AISMIG—an interactive server-side molecule image generator. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W705-9.
- [17] Bollen YJ, Nabuurs SM, van Berkel WJ, van Mierlo CP. Last in, first out: the role of cofactor binding in flavodoxin folding. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4;280(9):7836-44. Epub 2005 Jan 4.
- [18] Bruder S, Linder JU, Martinez SE, Zheng N, Beavo JA, Schultz JE. The cyanobacterial tandem GAF domains from the *cyaB2* adenylyl cyclase signal via both cAMP-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 22;102(8):3088-92. Epub 2005 Feb 11.
- [19] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.
- [20] Chang AL, Tuckerman JR, Gonzalez G, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M, Gilles-Gonzalez MA. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry.* 2001 Mar 27;40(12):3420-6.
- [21] Chang HM, Chen MY, Shieh YT, Bibb MJ, Chen CW. The cutRS signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol.* 1996 Sep;21(5):1075-85.
- [22] Cheng KJ, Costerton JW. Localization of alkaline phosphatase in three gram-negative rumen bacteria. *J Bacteriol.* 1973 Oct;116(1):424-40.
- [23] Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V, Emmert-Buck MR. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet.* 2002 Dec;32 Suppl:509-14.
- [24] Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Aug;69(8):2110-4.
- [25] David HL. Alkaline phosphatases from *Mycobacterium smegmatis*. *J Gen Microbiol* 1977 Jul;101:99-102
- [26] Delgado-Nixon VM, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA. Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry.* 2000 Mar 14;39(10):2685-91.
- [27] DeLong EF, Pace NR. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol.* 2001 Aug;50(4):470-8.
- [28] Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD. Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res.* 2001 Apr 1;29(7):E38.
- [29] Fisher WR, Taniuchi H, Anfinsen CB. On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c. *J Biol Chem.* 1973 May 10;248(9):3188-95.
- [30] Furbass R, Marahiel MA. Mutant analysis of interaction of the *Bacillus subtilis* transcription regulator AbrB with the antibiotic biosynthesis gene *tycA*. *FEBS Lett.* 1991 Aug 5;287(1-2):153-6.
- [31] Gerard F, Dri AM, Moreau PL. Role of *Escherichia coli* RpoS, LexA and H-NS global regulators in metabolism and survival under aerobic, phosphate-starvation conditions. *Microbiology.* 1999 Jul;145 ( Pt 7):1547-62.
- [32] Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G. Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J Inorg Biochem.* 2005 Jan;99(1):1-22.
- [33] Gilles-Gonzalez MA, Ditta GS, Helinski DR. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature.* 1991 Mar 14;350(6314):170-2.

- [34] Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G, Perutz MF, Kiger L, Marden MC, Poyart C. Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry*. 1994 Jul 5;33(26):8067-73.
- [35] Gonzalez G, Dioum EM, Bertolucci CM, Tomita T, Ikeda-Saito M, Cheesman MR, Watmough NJ, Gilles-Gonzalez MA. Nature of the displaceable heme-axial residue in the EcDos protein, a heme-based sensor from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 2002 Jul 2;41(26):8414-21.
- [36] Gottschlich R. Der Einfluss von Licht und Sauerstoff auf den Energiegehalt des Adenylatsystems sowie auf den Phosphat Spiegel von *Halobacterium halobium*. Diplomarbeit, Universität Würzburg, 1976.
- [37] Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*. 1999 Apr;15(4):305-8.
- [38] Graham MR, Smoot LM, Migliaccio CA, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, Federle MJ, Adams GJ, Scott JR, Musser JM. Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15;99(21):13855-60. Epub 2002 Oct 7.
- [39] Grebe TW, Stock JB. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol*. 1999;41:139-227.
- [40] Grefen C, Harter K. Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta*. 2004 Sep;219(5):733-42. Epub 2004 Jul 01.
- [41] Gropp F, Betlach MC. The bat gene of *Halobacterium halobium* encodes a trans-acting oxygen inducibility factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Jun 7;91(12):5475-9.
- [42] Guo YL, Seebacher T, Kurz U, Linder JU, Schultz JE. Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *EMBO J*. 2001 Jul 16;20(14):3667-75.
- [43] Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*. 2002 Sep 20;141(1-2):131-60.
- [44] Hakenbeck R, Stock JB. Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol*. 1996;273:281-300.
- [45] Hall, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999 41:95-98.
- [46] Hallberg Gradin C, Colmsjo A. Four different b-type cytochromes in the halophilic archaeobacterium, *Halobacterium halobium*. *Arch Biochem Biophys*. 1989 Jul;272(1):130-6.
- [47] Hirani TA, Suzuki I, Murata N, Hayashi H, Eaton-Rye JJ. Characterization of a two-component signal transduction system involved in the induction of alkaline phosphatase under phosphate-limiting conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol*. 2001 Jan;45(2):133-44.
- [48] Ho YS, Burden LM, Hurley JH. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J*. 2000 Oct 16;19(20):5288-99.
- [49] Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol*. 2000 Apr;3(2):165-70.
- [50] Hofacker A, Schmitz KM, Cichonczyk A, Sartorius-Neef S, Pfeifer F. GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology*. 2004 Jun;150(Pt 6):1829-38.
- [51] Hoffer SM, Westerhoff HV, Hellingwerf KJ, Postma PW, Tommassen J. Autoamplification of a two-component regulatory system results in "learning" behavior. *J Bacteriol*. 2001 Aug;183(16):4914-7.
- [52] Hou S, Larsen RW, Boudko D, Riley CW, Karatan E, Zimmer M, Ordal GW, Alam M. Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):540-4.

- [53] Howell A, Dubrac S, Andersen KK, Noone D, Fert J, Msadek T, Devine K. Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Mol Microbiol.* 2003 Sep;49(6):1639-55.
- [54] Hulett FM. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 1996 Mar;19(5):933-9.
- [55] Ishige T, Krause M, Bott M, Wendisch VF, Sahm H. The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *J Bacteriol.* 2003 Aug;185(15):4519-29.
- [56] Jin W, Riley RM, Wolfinger RD, White KP, Passador-Gurgel G, Gibson G. The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 2001 Dec;29(4):389-95.
- [57] Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol.* 2003;54:605-27.
- [58] Karniol B, Vierstra RD. The HWE histidine kinases, a new family of bacterial two-component sensor kinases with potentially diverse roles in environmental signaling. *J Bacteriol.* 2004 Jan;186(2):445-53.
- [59] Kato J, Ito A, Nikata T, Ohtake H. Phosphate taxis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1992 Aug;174(15):5149-51.
- [60] Kim D, Forst S. Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology.* 2001 May;147(Pt 5):1197-212.
- [61] Kim KK, Yokota H, Kim SH. Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature.* 1999 Aug 19;400(6746):787-92.
- [62] Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 1997 Jun;24(5):895-904.
- [63] Koch MK, Oesterhelt D. MpcT is the transducer for membrane potential changes in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol.* 2005 Mar;55(6):1681-94.
- [64] Kokoeva MV, Storch KF, Klein C, Oesterhelt D. A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids. *EMBO J.* 2002 May 15;21(10):2312-22.
- [65] Koretke KK, Lupas AN, Warren PV, Rosenberg M, Brown JR. Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol.* 2000 Dec;17(12):1956-70.
- [66] Kornberg A, Rao NN, Ault-Riche D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:89-125.
- [67] Koudo R, Kurokawa H, Sato E, Igarashi J, Uchida T, Sagami I, Kitagawa T, Shimizu T. Spectroscopic characterization of the isolated heme-bound PAS-B domain of neuronal PAS domain protein 2 associated with circadian rhythms. *FEBS J.* 2005 Aug;272(16):4153-62.
- [68] Krol E, Becker A. Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol Genet Genomics.* 2004 Aug;272(1):1-17.
- [69] Kuo MH, Blumenthal HJ. Absence of phosphatase repression by inorganic phosphate in some micro-organisms. *Nature.* 1961 Apr 1;190:29-31.
- [70] Kurokawa H, Lee DS, Watanabe M, Sagami I, Mikami B, Raman CS, Shimizu T. A redox-controlled molecular switch revealed by the crystal structure of a bacterial heme PAS sensor. *J Biol Chem.* 2004 May 7;279(19):20186-93. Epub 2004 Feb 23.

- [71] Kusaka K, Shibata K, Kuroda A, Kato J, Ohtake H. Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* mutants which are defective in chemotaxis toward inorganic phosphate. *J Bacteriol.* 1997 Oct;179(19):6192-5.
- [72] Lambert C, Weuster-Botz D, Weichenhain R, Kreutz EW, De Graaf AA, Schoberth SM. Monitoring of inorganic polyphosphate dynamics in *Corynebacterium glutamicum* using a novel oxygen sparger for real time P-31 in vivo NMR. *Acta Biotechnol* 2002;22(3-4):245-260.
- [73] Leong D, Pfeifer F, Boyer H, Betlach M. Characterization of a second gene involved in bacterio-opsin gene expression in a halophilic archaeobacterium. *J Bacteriol.* 1988 Oct;170(10):4903-9.
- [74] Letunic I, Copley RR, Schmidt S, Ciccarelli FD, Doerks T, Schultz J, Ponting CP, Bork P. SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 1;32(Database issue):D142-4.
- [75] Linder JU, Hammer A, Schultz JE. The effect of HAMP domains on class IIIb adenylyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem.* 2004 Jun;271(12):2446-51.
- [76] Loh J, Stacey G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jan;69(1):10-7.
- [77] Loomis WF, Kuspa A, Shaulsky G. Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol.* 1998 Dec;1(6):643-8.
- [78] Ma Q, Johnson MS, Taylor BL. Genetic analysis of the HAMP domain of the Aer aerotaxis sensor localizes flavin adenine dinucleotide-binding determinants to the AS-2 helix. *J Bacteriol.* 2005 Jan;187(1):193-201.
- [79] Martinez-Argudo I, Little R, Dixon R. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL. *Mol Microbiol.* 2004 Jun;52(6):1731-44.
- [80] Marwan W, Schafer W, Oesterhelt D. Signal transduction in *Halobacterium* depends on fumarate. *EMBO J.* 1990 Feb;9(2):355-62.
- [81] Matsushita K, Toyama H, Yamada M, Adachi O. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Jan;58(1):13-22.
- [82] Michel H, Oesterhelt D. Electrochemical proton gradient across the cell membrane of *Halobacterium halobium*: comparison of the light-induced increase with the increase of intracellular adenosine triphosphate under steady-state illumination. *Biochemistry.* 1980 Sep 30;19(20):4615-19.
- [83] Mirjam Aregger. Charakterisierung von cheW-Deletionsmutanten in *Halobacterium salinarum*. Dissertation (2003) LMU München
- [84] Monds RD, Silby MW, Mahanty HK. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol.* 2001 Oct;42(2):415-26.
- [85] Mooney RA, Darst SA, Landick R. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol Cell.* 2005 Nov 11;20(3):335-45.
- [86] Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998 Jun;24(6):954-8, 960, 962.
- [87] Muller JA, Dassarma S. Genomic Analysis of Anaerobic Respiration in the Archaeon *Halobacterium* sp. Strain NRC-1: Dimethyl Sulfoxide and Trimethylamine N-Oxide as Terminal Electron Acceptors. *J Bacteriol.* 2005 Mar;187(5):1659-67.
- [88] Nixon BT, Ronson CW, Ausubel FM. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 Oct;83(20):7850-4.
- [89] Novak R, Henriques B, Charpentier E, Normark S, Tuomanen E. Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature.* 1999 Jun 10;399(6736):590-3.

- [90] Oesterhelt D, Meentzen M, Schuhmann L. Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores. *Eur J Biochem.* 1973 Dec 17;40(2):453-63.
- [91] Oesterhelt D, Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol.* 1974;31(Pt A):667-78.
- [92] Oesterhelt D, Krippahl G. Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants. *Ann Microbiol (Paris).* 1983 Jul-Aug;134B(1):137-50.
- [93] Ogawa N, DeRisi J, Brown PO. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell.* 2000 Dec;11(12):4309-21.
- [94] Osorio G, Jerez CA. Adaptive response of the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 to phosphate starvation. *Microbiology.* 1996 Jun;142 ( Pt 6):1531-6.
- [95] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 1997 May 2;276(5313):734-40.
- [96] Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* 1996 Aug;12(4):357-8.
- [97] Parkinson JS, Kofoed EC. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 1992;26:71-112.
- [98] Peck RF, Echavarri-Erasun C, Johnson EA, Ng WV, Kennedy SP, Hood L, DasSarma S, Krebs MP. *brp* and *blh* are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum*. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23;276(8):5739-44. Epub 2000 Nov 22.
- [99] Persson BL, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh S, Lundh F. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 2003 Jul;43(4):225-44. Epub 2003 May 10.
- [100] Pollastri G, Przybylski D, Rost B, Baldi P. Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. *Proteins.* 2002 May 1;47(2):228-35.
- [101] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet.* 2002 Dec;32 Suppl:496-501.
- [102] Quioco FA, Ledvina PS. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol.* 1996 Apr;20(1):17-25.
- [103] Rodgers KR, Lukat-Rodgers GS. Insights into heme-based O<sub>2</sub> sensing from structure-function relationships in the FixL proteins. *J Inorg Biochem.* 2005 Apr;99(4):963-77.
- [104] Rose RW, Bruser T, Kissinger JC, Pohlschroder M. Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol.* 2002 Aug;45(4):943-50.
- [105] Rudolph J, Tolliday N, Schmitt C, Schuster SC, Oesterhelt D. Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J.* 1995 Sep 1;14(17):4249-57.
- [106] Rudolph J, Oesterhelt D. Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.* 1995 Feb 15;14(4):667-73.
- [107] Rudolph J, Nordmann B, Storch KF, Gruenberg H, Rodewald K, Oesterhelt D. A family of halobacterial transducer proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 1996 Jun 1;139(2-3):161-8.
- [108] Rudolph J, Oesterhelt D. Deletion analysis of the *che* operon in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *J Mol Biol.* 1996 May 17;258(4):548-54.

- [109] Ruepp A, Soppa J. Fermentative Arginine Degradation in *Halobacterium salinarium* (Formerly *Halobacterium halobium*): Genes, Gene Products, and Transcripts of the *arcRACB* Gene Cluster. *J Bacteriol.* 1996 Aug;178(16):4942-7.
- [110] Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 2003 Feb;34(2):374-8.
- [111] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- [112] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987 Jul;4(4):406-25.
- [113] Sasakura Y, Hirata S, Sugiyama S, Suzuki S, Taguchi S, Watanabe M, Matsui T, Sagami I, Shimizu T. Characterization of a direct oxygen sensor heme protein from *Escherichia coli*. Effects of the heme redox states and mutations at the heme-binding site on catalysis and structure. *J Biol Chem.* 2002 Jun 28;277(26):23821-7. Epub 2002 Apr 22.
- [114] Sato A, Sasakura Y, Sugiyama S, Sagami I, Shimizu T, Mizutani Y, Kitagawa T. Stationary and time-resolved resonance Raman spectra of His77 and Met95 mutants of the isolated heme domain of a direct oxygen sensor from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):32650-8. Epub 2002 Jun 21.
- [115] Sawers G. The aerobic/anaerobic interface. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Apr;2(2):181-7.
- [116] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995 Oct 20;270(5235):467-70.
- [117] Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):5857-64.
- [118] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3381-5.
- [119] Seeger M, Jerez CA. Phosphate-starvation induced changes in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1993 Mar 15;108(1):35-41.
- [120] Slater H, Crow M, Everson L, Salmond GP. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol Microbiol.* 2003 Jan;47(2):303-20.
- [121] Smirnov AV, Suzina NE, Kulakovskaia TV, Kulaev IS. Magnesium orthophosphate, a new form of reserve phosphates in the halophilic archaeon *Halobacterium salinarium*. *Microbiology.* 2002 Nov-Dec;71(6):677-683.
- [122] Sreeramulu K, Schmidt CL, Schafer G, Anemuller S. Studies of the electron transport chain of the euryarchaeon *Halobacterium salinarum*: indications for a type II NADH dehydrogenase and a complex III analog. *J Bioenerg Biomembr.* 1998 Oct;30(5):443-53.
- [123] Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt HG. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 3, S.2218-23, Williams&Wilkins, 1989
- [124] Steed PM, Wanner BL. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol.* 1993 Nov;175(21):6797-809.
- [125] Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:183-215.

- [126] Stoeckenius W, Kunau WH. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *J Cell Biol.* 1968 Aug;38(2):337-57.
- [127] Stoeckenius W, Lozier RH, Bogomolni RA. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1979 Mar 14;505(3-4):215-78.
- [128] Storch KF, Rudolph J, Oesterhelt D. Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *EMBO J.* 1999 Mar 1;18(5):1146-58.
- [129] Suzuki S, Ferjani A, Suzuki I, Murata N. The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *synechocystis*. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):13234-40. Epub 2004 Jan 5.
- [130] Szurmant H, Ordal GW. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Jun;68(2):301-19.
- [131] Taguchi S, Matsui T, Igarashi J, Sasakura Y, Araki Y, Ito O, Sugiyama S, Sagami I, Shimizu T. Binding of oxygen and carbon monoxide to a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. Kinetics and infrared spectra of the full-length wild-type enzyme, isolated PAS domain, and Met-95 mutants. *J Biol Chem.* 2004 Jan 30;279(5):3340-7. Epub 2003 Nov 11.
- [132] Taylor BL, Zhulin IB. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999 Jun;63(2):479-506.
- [133] Tebbe A, Klein C, Bisle B, Siedler F, Scheffer B, Garcia-Rizo C, Wolfertz J, Hickmann V, Pfeiffer F, Oesterhelt D. Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation. *Proteomics.* 2005 Jan;5(1):168-79.
- [134] Thomas MR, O'Shea EK. An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 5;102(27):9565-70. Epub 2005 Jun 22.
- [135] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
- [136] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec 15;25(24):4876-82.
- [137] von Tigerstrom RG. Production of two phosphatases by *Lysobacter enzymogenes* and purification and characterization of the extracellular enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 1984 Apr;47(4):693-8.
- [138] Torres A, Juarez MD, Cervantes R, Espitia C. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microb Pathog.* 2001 May;30(5):289-97.
- [139] Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC, Wong WH. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jun 15;29(12):2549-57.
- [140] Tso WW, Adler J. Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1974 May;118(2):560-76.
- [141] Unden G, Bongaerts J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Jul 4;1320(3):217-34.
- [142] van Berkel WJ, Benen JA, Snoek MC. On the FAD-induced dimerization of apo-lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* and *Pseudomonas fluorescens*. Kinetics of reconstitution. *Eur J Biochem.* 1991 May 8;197(3):769-79.

- [143] VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt FC. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996 Aug;178(15):4344-66.
- [144] Versaw WK, Metzberg RL. Repressible cation-phosphate symporters in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 25;92(9):3884-7.
- [145] Vershinina OA, Znamenskaia LV. The Pho regulons of bacteria. *Mikrobiologiya.* 2002 Sep-Oct;71(5):581-95.
- [146] Vyas NK, Vyas MN, Quijcho FA. Crystal structure of M tuberculosis ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure.* 2003 Jul;11(7):765-74.
- [147] Wadhams GH, Armitage JP. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Dec;5(12):1024-37.
- [148] Wanner, B. L. 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon, p. 1357-1381. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- [149] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 Jun;87(12):4576-9.
- [150] Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 2002 Sep 25;3(10):REVIEWS3013. Epub 2002 Sep 25.
- [151] Wu H, Kato J, Kuroda A, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H. Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(12):3400-4.
- [152] Xu K, Strauch MA. DNA-binding activity of amino-terminal domains of the *Bacillus subtilis* AbrB protein. *J Bacteriol.* 2001 Jul;183(13):4094-8.
- [153] Yoshimura T, Sagami I, Sasakura Y, Shimizu T. Relationships between heme incorporation, tetramer formation, and catalysis of a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*: a study of deletion and site-directed mutants. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):53105-11. Epub 2003 Oct 9.
- [154] Yu B, Xu C, Benning C. Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 16;99(8):5732-7.
- [155] Zhang Y, Mannering DE, Davidson AL, Yao N, Manson MD. Maltose-binding protein containing an interdomain disulfide bridge confers a dominant-negative phenotype for transport and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996 Jul 26;271(30):17881-9.
- [156] Zhou L, Lei XH, Bochner BR, Wanner BL. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol.* 2003 Aug;185(16):4956-72.
- [157] Zoraghi R, Corbin JD, Francis SH. Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol Pharmacol.* 2004 Feb;65(2):267-78.



# Danksagung

Mein Dank gilt...

meinem Doktorvater Dieter Oesterhelt für das spannende Thema, welches genau meinem Interessengebiet entsprach, als ich mich damals bei ihm um eine Doktorandenstelle bewarb, sowie für sein andauerndes Interesse an dem Fortgang der Arbeit. Ich danke ihm für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, die für diese Arbeit richtungsweisenden Hinweise und Ratschläge, das Erschließen von neuen Sichtweisen und seine große Geduld in den Phasen, in denen ich mit dem Halobakterium auf Kriegsfuß stand und sich dieses seine Geheimnisse nicht sehr bereitwillig entlocken ließ.

Prof. Dr. Kirsten Jung für die schnelle und unbürokratische Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten und dafür einen Teil ihrer Zeit zu opfern.

Jörg, Frau Haack und Walter, ohne die ein Funktionieren der Abteilung nicht denkbar wäre.

Bettina, Brigitte, Florian, Jens und allen anderen momentanen und ehemaligen „Mitbewohnern“ des Oe-Labors für die lockere Arbeitsatmosphäre, die netten Kaffeepausen, so manchen Tollwood-Besuch und natürlich das Aushelfen mit Laborsachen, die ich gerade mal wieder nicht vorrätig hatte.

Markus Panhuysen, Gerhard Welzl, Jobst Landgrebe und Alexander Zaigler für die erfolgreichen Kooperationen zur Herstellung der Mikroarrays und zur Programmierung der Auswerteprogramme für die Datenanalyse der Fluoreszenzdaten

Kiki, Karin und Snezan Marinkovic für die Sequenzierung unzähliger Plasmide.

Lissy Weyher-Stingl, Siggy und Frank für die massenspektrometrischen Analysen.

Kornelius und Ursel für einige PAS3855-Expressionen und die Bemühungen um deren (leider erfolglose) Kristallisation.

Gilbert Nöll für die (leider nicht von Erfolg gekrönten) Bemühungen um die Redox-titration der PAS3855-Domäne

Florian Wimmer für die Übernahme des Computerjobs (was er wahrscheinlich für den Rest seiner Promotionszeit verfluchen wird).

Kati für die Entscheidung, das halobakterielle Pho-Regulon weiter zu erforschen. Bleib dran, toi toi toi!

Hüseyin, Matthias S., Matthias K., Christoph S. für so manche Diskussion über Gott und die Welt.

allen Mitgliedern der Abteilung Membranbiochemie für die angenehme Zeit, insbesondere Jörg, Bea, Katrin und Flo für die vielen Squashpartien.

meinem Bruder Henrik für die Programmierung einiger Excel-Macros zur vorläufigen Auswertung der Mikroarray-Experimente

meinen Eltern für ihr fortwährendes Interesse an meiner Arbeit. Ohne ihren Rückhalt und finanzielle Unterstützung hätte ich wohl nie Biochemie studiert und folglich auch nicht diese Dissertation vorgelegt.

meiner Frau Marcella für so viele Dinge, dass ich nicht weiss, wo ich anfangen soll. Besonders wichtig für mich war die Freiheit, meinem zeitintensiven Forscherdrang nachzugehen, dem ich nicht wenige Wochenenden opferte. Ebenfalls danke ich ihr für das offene Ohr, wenn sich meine sonst überwiegend verborgene Gedankenwelt während Durststrecken wegen verschiedenster Ursachen den Weg nach draussen bahnte.

# Lebenslauf

## Andy Wende (Dipl.-Biochem.)

Geburtsdatum: 18.2.76  
Geburtsort: Guben, Deutschland  
Adresse: Julius-Haerlin-Straße 9  
82131 Gauting  
Nationalität: Deutsch  
Familienstatus: verheiratet, keine Kinder

### Schulausbildung

09/1990 - 07/1995 Pestalozzi-Gymnasium, Guben  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,6)

### Wehrdienst

10/1995 - 09/1996 5. Kompanie Panzerbataillon 373, Doberlug-Kirchhain

### Studium und Promotion

10/1996 - 06/2001 Diplomstudiengang Biochemie, Universität Bayreuth  
Abschluss: Diplom-Biochemiker (Note: 1,46)  
Thema: Regulation des *htpG* Gens von *Bacillus subtilis*  
Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Schumann

seit 11/2001 Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried  
Thema: Signaltransduktion durch Zwei-Komponenten Systeme  
in dem halophilen Archaeon *Halobacterium salinarum*  
Betreuer: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

### Mitgliedschaften

Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)  
Budo Akademie Europa (BAE)

### Interessen und Hobbies

Geschichte der japanischen Kampfkünste  
praktizieren von Ju Jutsu, Aiki Budo und ATK