

## Halobacterium salinarum – Mikrobe des Jahres 2017

# Rote Überlebenskünstler in Salzlagenen

FELICITAS PFEIFER

MIKROBIOLOGIE UND ARCHAEA, FACHBEREICH BIOLOGIE, TU DARMSTADT

**Halobacterium is adapted to high salt concentrations of 5 M NaCl and even survives in salt crystals for hundreds of years. Bacteriorhodopsin, gas vesicles, and halophilic enzymes are specific traits used for biotechnological purposes. As archaeon, Halobacterium shows eukaryotic features in transcription, translation and replication. The microbe gained more than 1.000 metabolic genes from bacteria enabling heterotrophic growth in oxygen containing environments.**

DOI: 10.1007/s12268-017-0757-9

© Springer-Verlag 2017

■ Halobakterien sind salzliebende Archaea (Haloarchaea), die bereits Anfang des 20. Jahrhunderts studiert wurden. Sie sind halophil und brauchen ein Medium mit einer mindestens 20-prozentigen NaCl-Lösung, um nicht zu lysieren. Das Erstisolat *Halobacterium salinarum* wurde als Bakterium klassifiziert; seit 1978 ist aber klar, dass es ein Archaeon ist. Carl Woese hatte erstmals aufgrund seiner rRNA-Studien Archaea als dritte Domäne des Lebens neben Bakterien und Eukaryoten definiert. Archaea enthalten neben den charakteristischen rRNA-Sequenzen auch typische Membranen aus Phytanylätherlipiden und zeigen vor allem im Informationstransfer Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Zellen.

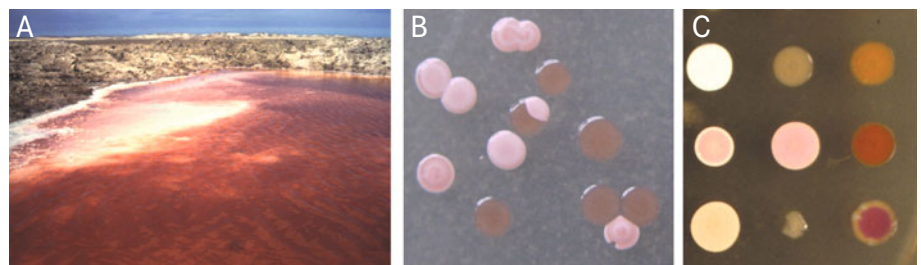
### Leben am Limit

Ursprünglich isoliert wurde *Halobacterium* als Kontamination von gesalzenem Fisch. Da Meersalzsalinen zu seinen natürlichen Standorten zählen, gelangte es darüber in das Lebensmittel. Ab etwa 20 Prozent NaCl wächst *Halobacterium* gut und färbt die Salzseen rot durch seine in die Membran eingelagerten roten Carotinoide, die Bacterioruberine (Abb. 1A). Auch auf Festmedien sind *Halobacterium*-Kolonien rot gefärbt (Abb. 1B). Die Bacterioruberine schützen vor oxidativen Schäden und UV-Strahlung; auch die Gasvesikel tragen dazu bei. An hohe Salzkonzentrationen passen sie sich durch eine ähnlich hohe intrazelluläre KCl-Konzentration an, und selbst in Salzkristalle eingeschlossen überleben sie Hunderte von Jahren [1]. Dagegen sind Salzkonzentrationen unter einem Mol für sie tödlich, und bei Regen lässt das eindringende Wasser die Zellen schnell platzen. *Halobacterium* ist zudem extrem resistent gegenüber energiereicher, ionisierender Strahlung ( $D_{10}$ -Wert: 10.000 Gray) und überstand 2012 problemlos einen mehrmonatigen Flug um die Erde im Außenbereich der internationalen Raumstation ISS. Die Resistenz beruht unter anderem auf multiplen DNA-Reparatursystemen und einer hohen Kopienzahl des Chromosoms (bis zu 20). Eine Vorliebe für hohe Salzkonzentrationen zeigen

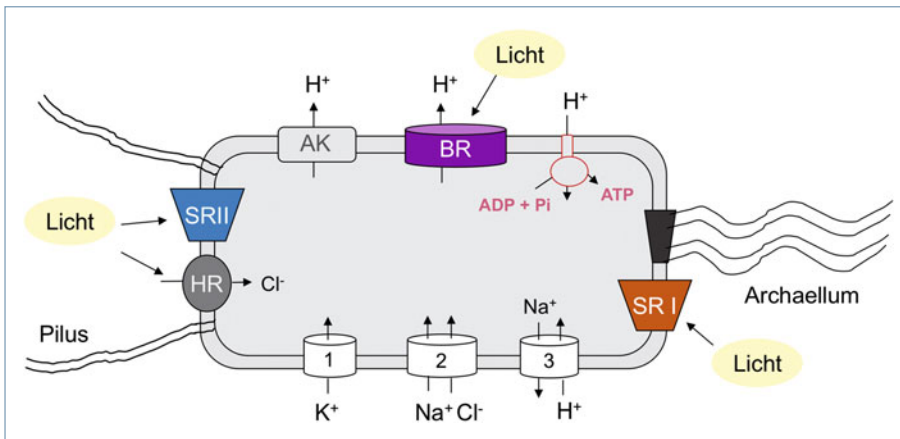
auch die meisten seiner Enzyme. Hydrolasen, Proteasen und Lipasen sind deshalb für die Biotechnologie interessant. Unter mikroaeroben Bedingungen produziert *Halobacterium* große Mengen des violetten Retinalproteins Bacteriorhodopsin, das als lichtgetriebene Protonenpumpe fungiert (Abb. 2, siehe auch den Artikel von H. Engelhardt auf S. 101 in dieser Ausgabe). Es wandelt damit Sonnenlicht in einen Protonengradienten um und nutzt diesen zur ATP-Produktion. Bacteriorhodopsin wird unter anderem zur Herstellung lichtsensitiver Filme verwendet, wo der lichtinduzierte Farbwechsel von violett nach gelb genutzt wird.

### Bewegung mit Flagellen und Gasvesikeln

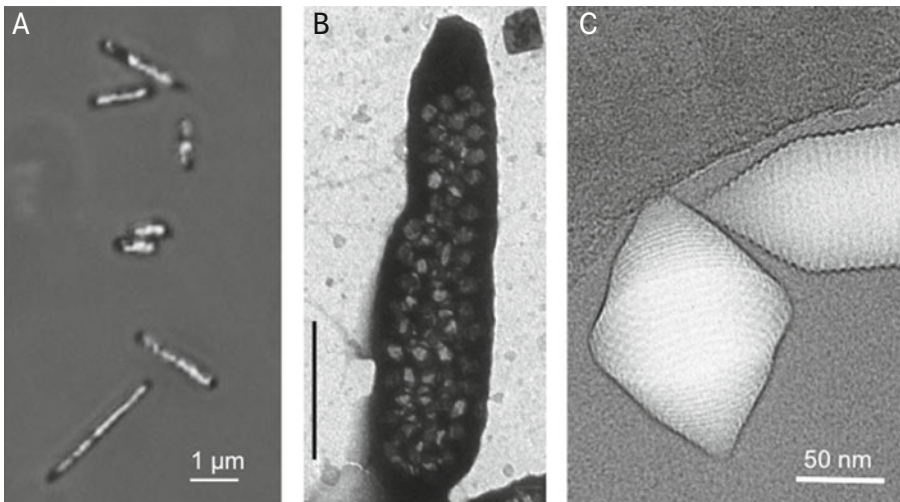
Zur Orientierung im Licht nutzt *Halobacterium* zwei Sensorrhodopsine, SRI und SRII (Abb. 2). Orangefarbenes Licht (580 nm) zieht *Halobacterium* an, da es dem Absorptionsmaximum von Bacteriorhodopsin entspricht, während sie kurzwelliges UV-Licht meiden, weil es die DNA schädigt. Ein Chemotaxisystem leitet die Informationen zur Lichtqualität an die Flagelle weiter. Dieses archaeale Bewegungsorganell unterscheidet sich vom Flagellum der Bakterien und wird deshalb als Archaeellum bezeichnet [2]. Sein Filament besteht aus Piliinen und wird von der Basis aus synthetisiert – ähnlich wie Typ-IV-Pili der Bakterien. Die Energie für die Rotation



▲ **Abb. 1:** Typischer Standort und Kolonien von *Halobacterium salinarum*. **A**, Salzsee mit Haloarchaea. **B**, Rosa Kolonien (Wildtyp) enthalten Gasvesikel (Vac), Bacterioruberine (Rub) und Bacteriorhodopsin (BR); Vac-negative, Rub-, BR-positive Kolonien sind rot transparent. **C**, Weiße Mutante: Rub-, BR-negativ und Vac-positiv; gelblich: weniger Rub; rosa: Wildtyp; Violett im Zentrum mit Ring aus orangen und weißen Zellen: Vac-negativer Überproduzent von BR mit BR-negativen (orange) bzw. BR, Rub-negativen Zellen (weiß) am Rand.



▲ **Abb. 2:** Schematische Darstellung einer *Halobacterium salinarum*-Zelle. AK, Atmungskette; BR, Bakteriorhodopsin, daneben ATP-Synthase; HR, Halorhodopsin; SR I/SR II, Sensorrhodopsine; 1–3, Ionenpumpen. BR, HR und SR I, SR II sind lichtinduzierbare Retinalproteine unterschiedlicher Funktion. Weitere Erläuterungen im Text.



▲ **Abb. 3:** *Halobacterium*-Zellen im Lichtmikroskop (A) und im Transmissionselektronenmikroskop (TEM, B). Die Gasvesikel sind als helle Bereiche in den Zellen zu erkennen (Maßstab in B: 1 µm). C, TEM-Aufnahme isolierter, vitrifizierter (gefroren-hydratisierter) Gasvesikel mit der typischen Spindel- bzw. Zylinderform (Bild freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Bollschweiler und H. Engelhardt, Martinsried).

des Archaellums kommt aber aus der ATP-Hydrolyse und nicht über den Protonengradienten wie beim Bakterienflagellum.

In der Vertikalen bewegt sich *Halobacterium* passiv mithilfe von Gasvesikeln. Diese intrazellulären, spindel- oder zylinderförmigen „Gasblasen“ sind von einer Proteinhülle (ohne Lipide) umgeben [3]. Sie haben einen Durchmesser von 0,2 Mikrometer und eine Länge von 0,3–1 Mikrometer. Bis zu 70 Gasvesikel können in einer Zelle vorhanden sein, die im Mikroskop als weiße Einschlüsse gut erkennbar sind (**Abb. 3A, B**). Die Hülle besteht aus dem hydrophoben Protein GvpA, das als Polymer die rippenartige Struktur aufbaut, an die GvpC zur Verstärkung außen bindet (**Abb. 3C**). Gase diffundieren frei durch die

Proteinmembran. Aufgrund der hydrophoben inneren Oberfläche kann sich innen keine Flüssigkeit bilden. Gentechnisch modifizierte Gasvesikel finden beispielsweise Anwendung bei der Herstellung von Antisera. Hierzu wird das GvpC-Protein mit dem gewünschten Epitop fusioniert, das anschließend auf Gasvesikeln präsentiert wird [4]. Modifizierte Gasvesikel können auch zum Nachweis von Antikörpern gegen Viren oder Bakterien verwendet werden. Des Weiteren werden Gasvesikel als Kontrastverstärker bei Ultraschalluntersuchungen in der biomedizinischen Forschung oder klinischen Diagnostik eingesetzt. Auch hier können die Gasvesikel mit an GvpC fusionierten Proteinen auf der Oberfläche dekoriert werden, die sie zur spe-

zifischen Anheftung an Tumorzellen befähigen. Im Mausmodell konnten so bereits gesuchte Zellen detektiert werden [5].

### Haloarchaea leben im Biofilm

Neben der planktonischen Lebensweise bildet *Halobacterium* auch Biofilme. Dazu haftet es über spezielle Pili an einer Oberfläche fest und bildet Mikrokolonien. Die Zellen werden dann mit exopolymeren Substanzen wie Polysacchariden, Proteinen und extrazellulärer DNA umgeben [6]. Diese Matrix bietet Schutz vor toxischen Einflüssen oder Austrocknung, und die Zellen überstehen auch Nahrungsmangel gut. Im Biofilm ist der Stoffumsatz der Zellen reduziert und es dominieren anaerobe Energiesysteme; Archaeellen fehlen [7].

### Variable Genome und genetische Instabilität

Bereits 1980 beobachteten wir bei *Halobacterium salinarum* eine hohe genetische Instabilität in den Phänotypen Gasvesikel (Vac), Bakterioruberine (Rub) und Bakteriorhodopsin [8]. Diese Eigenschaften gehen mit einer Häufigkeit von 1:100 (Vac) bzw. 1:10.000 (Rub, Bakteriorhodopsin) spontan verloren. Am Aussehen einer Kolonie ist das Fehlen dieser Eigenschaften gut zu erkennen (**Abb. 1C**). Auslöser der Mutationen sind mobile DNA-Elemente (Insertionselemente, ISH-Elemente), die Kopien an anderen Stellen ins Genom integrieren und hierdurch funktionelle Gene zerstören. Über 20 verschiedene ISH-Elemente sind in *H. salinarum* bekannt; einige davon springen relativ häufig. Betroffen sind besonders die beiden Megaplasmide mit jeweils einem vollen Satz an Gasvesikelgenen. Die Laborstämme NRC-1, PHH1 und R1 unterscheiden sich insbesondere in den Integrationsstellen der ISH-Elemente und in der daraus resultierenden Genomvarianz [9]. So ist der Verlust der Biofilmbildung von PHH1 und NRC-1 auf eine Insertion in einem Gen für die Pilibildung zurückzuführen, ebenso der Verlust der Gasvesikel in *H. salinarum* R1, wo ein ISH-Element vor dem *gvpA*-Gen inseriert vorliegt und die Transkription blockiert.

### Archaea als Ursprung der Eukaryoten

Haloarchaea sind in der Replikation, Transkription und Translation näher mit den Eukaryoten verwandt als mit Bakterien. Die zur Transkription benötigte RNA-Polymerase hat wie das eukaryotische Pendant zwölf Untereinheiten, und auch die Promotoren für

die Transkription sind mit TATA-Box und TFB-Bindeelement typisch eukaryotisch. Der Transkriptionsfaktor TFB ist dem eukaryotischen TFIIB sehr ähnlich, und auch TBP ist mit dem eukaryotischen TATA-Box-Bindeprotein verwandt [8]. Ähnliche Verwandtschaften gibt es auch bei der Replikation und Translation, was einen gemeinsamen Ursprung von Archaea und Eukaryoten nahelegt. Die in einer heißen Tiefseequelle entdeckten Lokiarchaeota zeigen zudem, dass diese Archaeen bereits Gene für ein Zytoskelett, GTPasen, Phagozytose und Ubiquitinierung tragen [10]. Dies unterstreicht den Ursprung der Eukaryoten bei den Archaea.

Im Stammbaum gehören Haloarchaea zu den Euryarchaeota und sind aus Methanogenen hervorgegangen, die strikt anaerob von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> leben. Im Unterschied dazu gewinnen alle Haloarchaea ihre Energie aber über Sauerstoffatmung und ernähren sich heterotroph. Diese Fähigkeiten müssen sie daher im Laufe der Evolution erworben haben. Genomvergleiche zeigen, dass Haloarchaea über 1.000 bakterielle Gene und damit etwa ein Drittel ihres Genoms über lateralen Gentransfer von Bakterien erhalten haben [11]. Darunter sind Gene für Sauerstoffatmung, Transporter und viele Abbauenzyme. Das „Gründerhaloarchaeon“ konnte damit sauerstoffhaltige Habitats erobern und organische Kohlenstoffquellen verwerten.

### Besonderheiten der Haloarchaea

Haloarchaea sind optimal an eine extrem salzhaltige Umgebung angepasst. Einige ihrer Eigenschaften werden biotechnologisch genutzt, darunter ihre Enzyme, Bakteriorhodopsin und Gasvesikel. Phylogenetisch gehören sie zu den Archaea, die im Gegensatz zu Bakterien einige Eigenschaften mit Eukaryoten teilen. Ihre nächsten Verwandten sind die Methanbildner, und eine Aufrüstung der Halo-

archaea mit Bakteriengenom führte dazu, dass sie Lebensräume eroberten, die ertragreichere Energiequellen bieten. ■

### Literatur

- [1] Fendrihan S, Legat A, Pfaffenhuemer M et al. (2006) Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Rev Environ Sci Biotechnol* 5:203–218
- [2] Albers S, Jarell K (2015) The archaeellum: how archaea swim. *Front Microbiol* 6:23
- [3] Pfeifer F (2012) Distribution, formation and regulation of gas vesicles. *Nat Rev Microbiol* 10:705–715
- [4] Sremac M, Stuart E (2008) Recombinant gas vesicles from *Halobacterium* sp. displaying SIV peptides demonstrate biotechnology potential as a pathogen peptide delivery vehicle. *BMC Biotechnol* 8, doi: 10.1186/1472-6750-8-9
- [5] Shapiro M, Goodwill P, Neogy A et al. (2014) Biogenic gas nanostructures as ultrasonic molecular reporters. *Nat Nanotechnol* 9:311–316
- [6] Losensky G, Vidacovic L, Klingl A et al. (2015) Novel pili-like structures of *Halobacterium salinarum* R1 are crucial for surface adhesion. *Front Microbiol* 5:755
- [7] Losensky G, Jung K, Urlaub H et al. (2016) Shedding light on biofilm formation of *Halobacterium salinarum* R1 by SWATH-LC/MS/MS analysis of planktonic and sessile cells. *Proteomics*, doi: 10.1002/pmic.20160011
- [8] Pfeifer F (2015) Haloarchaea and the formation of gas vesicles. *Life* 5:385–402
- [9] Pfeiffer F, Schuster S, Broicher A et al. (2008) Evolution in the laboratory: the genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1. *Genomics* 91:335–346
- [10] Spang A, Saw J, Jørgensen S et al. (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521:173–179
- [11] Nelson-Sathi S, Dagan T, Landan G et al. (2012) Acquisition of 1000 eubacterial genes physiologically transformed a methanogen at the origin of haloarchaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:20537–20542

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Felicitas Pfeifer  
 Fachbereich Biologie  
 Technische Universität Darmstadt  
 Schnittspahnstraße 10  
 D-64287 Darmstadt  
 Tel.: 06151-16-23670  
 pfeifer@bio.tu-darmstadt.de

### AUTORIN



#### Felicitas Pfeifer

1981 Promotion an der Universität Würzburg. 1982–1985 Postdoktorandin an der University of California, San Francisco (UCSF), USA. 1985–1994 Gruppenleiterin am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Seit 1994 Professorin für Mikrobiologie und Archaea an der TU Darmstadt.