

Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit thermophiler und hyperthermophiler Mikroorganismen nach Trocknung und Strahlenexposition

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kristina Beblo aus Rosenheim

April, 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.04.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. R. Rachel

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. S. Schneuwly
	1. Gutachter:	PD Dr. R. Rachel
	2. Gutachter:	Prof. Dr. R. Sterner
	3. Prüfer:	Prof. Dr. R. Wirth

„Erst zweifeln, dann untersuchen, dann entdecken!“

Henry Thomas Buckle (1821-62), engl. Kulturhistoriker

I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	11
1	Bezugsquellen	11
1.1	Chemikalien	11
1.2	pH-Indikator	11
1.3	Gase	11
2	Verwendete Organismen und deren Kultivierungsbedingungen	11
2.1	Standardkultivierungsbedingungen	11
2.2	Kompatible Solute (KS)-induzierende Kultivierungsbedingungen	13
3	Medien	13
3.1	Medienzusammensetzungen für Standardkultivierungen	13
3.1.1	A/1-Medium für <i>H. hirschii</i>	13
3.1.2	Allen-Medien für Sulfolobales-Vertreter und Thermoproteales-Vertreter	13
3.1.3	MGG-Medium für <i>A. fulgidus</i>	14
3.1.4	MJ-Medium (modifiziert) für <i>M. jannaschii</i>	14
3.1.5	MS-Medium (modifiziert) für <i>Methanosarcina</i> -Vertreter und <i>M. thermoautotrophicus</i>	15
3.1.6	Synthetisches Meerwasser (SME) für ½ SME	15
3.1.7	½ SME-Medium für <i>Ignicoccus</i> -Vertreter und <i>I. hospitalis</i> in Cokultur mit <i>N. equitans</i>	15
3.1.8	½ SME für <i>P. occultum</i>	16
3.1.9	SME für <i>Aquifex</i> -Vertreter	16
3.1.10	SME für <i>Tv. ruber</i>	16
3.1.11	SME für <i>P. furiosus</i>	16
3.1.12	Synthetisches OS-Medium für <i>Tc. ruber</i>	17
3.1.13	TK-6-Medium für <i>H. thermophilus</i>	17
3.1.14	VM1 für <i>H. marinus</i>	17
3.2	Spurenelement-, Mineralien- und Vitaminlösungen	18
3.2.1	Spurenelemente für TK-6	18
3.2.2	Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / ohne Titriplex (modifiziert)	18
3.2.3	Wolfe's Mineralien 10 x / pH 6,0 / mit Titriplex	19
3.2.4	Wolfe's Vitamine	19
4	Medienherstellung	20
5	Zusätze	20
6	Sterilisierung	21
6.1	Medien und Zusätze	21
6.2	Gebrauchsgegenstände	21

7	Medienherstellung und Sterilisation des Fermenters für Großanzucht	21
8	Kultivierung	22
8.1	Kultivierung in Serumflaschen	22
8.2	Kultivierung im Fermenter und Zellernte	22
9	Mikroskopie	22
9.1	Phasenkontrastmikroskopie	22
9.2	Gesamtzellzahlbestimmung	23
9.3	Rasterelektronenmikroskopie	23
10	Trocknungsexperimente	23
10.1	Trocknung der Zellen und Trocknungsbedingungen	23
10.2	Periodische Austrocknung	25
11	Bestrahlungsexperimente	25
11.1	Strahlungsquellen und Bestrahlungsversuche	25
11.1.1	UV-Strahlungsquelle und UV-Dosimetrie	25
11.1.2	Photometrische Vermessung der Medien und der bewachsenen Kulturen in Quarzküvetten	27
11.1.3	Bestrahlungsversuche in Flüssigkeit	27
11.1.4	Untersuchung des Teilungsverhaltens nach UV-C-Bestrahlung	28
11.1.5	Bestrahlungsversuche nach Trocknung	28
11.2	Ionisierende Strahlung	28
11.2.1	Röntgenstrahlung	28
11.2.2	^{60}Co -Strahlung	29
12	Wasserstoffperoxidexperimente	29
12.1	H_2O_2 -Exposition	29
12.2	Katalaseaktivitätstest	30
13	Bestimmung der Überlebensraten nach Trocknung, Strahlungsexposition und H_2O_2-Behandlung	30
14	Verdünnungsreihen	31
15	Photoproduktanalysen	32
15.1	Bestrahlung der Kulturen	32
15.2	Puffer	32
15.3	Extraktion genomischer DNA	33
15.4	HPLC-MS/MS-Chromatographie	33
16	Analyse der kompatiblen Solute	34
16.1	NMR-Analysen	34
16.2	HPLC-Analysen	35
16.3	ICP-Analysen	36

17	Genomanalysen	36
III	Ergebnisse	37
1	Trocknungsexperimente	37
1.1	Verdünnungsreihenexperimente	37
1.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen getrockneter Zellen	37
1.3	Überleben nach Trocknung	38
1.3.1	Trocknung unter oxischen und anoxischen Bedingungen	40
1.3.2	Trocknung von <i>H. marinus</i> im Ultrahochvakuum und im Exsikkator	41
1.4	Wiederholte Trocknung von <i>H. marinus</i>	42
1.5	Trocknung von <i>I. pacificus</i> , <i>I. hospitalis</i> und <i>I. hospitalis</i> in Cokultur mit <i>N. equitans</i>	42
1.6	Einfluss kompatibler Solute auf die Trockentoleranz	43
1.6.1	<i>A. pyrophilus</i>	43
1.6.2	<i>A. fulgidus</i>	44
1.6.3	<i>P. furiosus</i>	46
1.6.4	<i>T. tenax</i>	47
1.6.5	Zugabe von DGP vor der Trocknung	47
2	Strahlungsexperimente	47
2.1	UV-C-Strahlung	47
2.1.1	Bestrahlung in Flüssigkeit	48
2.1.1.1	Eigenabsorption der Kultivierungs- und Bestrahlungsmedien	48
2.1.1.2	Überleben der Modellorganismen nach UV-C Bestrahlung	49
2.1.1.3	Teilungsverhalten nach UV-C-Bestrahlung	51
2.1.2	Photoproduktinduktion und Proteinquervernetzung	53
2.1.3	Bestrahlung nach Trocknung	55
2.1.4	Schutzeffekte von Erz	56
2.1.5	Einfluss kompatibler Solute auf die Überlebensrate nach UV-C-Bestrahlung in Flüssigkeit und nach Trocknung	56
2.2	Ionisierende Strahlung	57
2.2.1	Überlebensraten nach Behandlung mit ionisierender Strahlung	58
2.2.2	Einfluss von <i>N. equitans</i> auf die Strahlenresistenz von <i>I. hospitalis</i>	60
2.2.3	Einfluss kompatibler Solute auf die Überlebensrate nach Einwirkung von ionisierender Strahlung	60
3	Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid	62
3.1	Überleben nach H ₂ O ₂ -Behandlung und nach Einwirkung von ionisierender Strahlung	62

3.2	Einfluss kompatibler Solute auf H ₂ O ₂ -Toleranz	63
4	Genomanalysen	64
IV	Diskussion	71
V	Zusammenfassung	87
VI	Literaturverzeichnis	89
VII	Anhang	113
1	Abkürzungsverzeichnis	113
2	Bestrahlungszertifikat	115
3	Danksagung	117
4	Erklärung	119

I Einleitung

Entstehung des Lebens auf der Erde

Es gibt seit langem und immer noch andauernd Spekulationen darüber, ob das Leben von außerhalb auf die Erde gelangt sein könnte (Arrhenius 1903, Mileikowsky *et al.* 2000, Valtonen *et al.* 2009) oder ob das Leben auf der Erde selbst entstanden ist. Bei beiden Hypothesen wird angenommen, dass die Zellvorläufer, beziehungsweise die ersten Zellen auf der frühen Erde (vor ca. 3,8 Milliarden Jahren) gelebt haben. Als Voraussetzungen für die erste Hypothese, die meist als „Lithopanspermie-Theorie“ (Nicholson *et al.* 2000), also die Verbreitung von Leben im Weltraum durch Meteoriten bezeichnet wird, müssten mehrere Grundvoraussetzungen gewährleistet gewesen sein:

- Austausch von Material mittels Meteoriten zwischen Himmelskörpern muss vorhanden gewesen sein
- Zellvorläufer / Zellen überleben den, durch ein großes Einschlagereignis bedingten Auswurf in den Weltraum
- Zellvorläufer / Zellen überleben den lange andauernden interplanetaren Flug auf einem Meteoriten
- Zellvorläufer / Zellen überleben den Einschlag auf der Erdoberfläche
- Zellvorläufer / Zellen konnten sich unter den auf der frühen Erde vorherrschenden Bedingungen vermehren.

Zu jedem der genannten Punkte wurden zum Teil schon weitreichende Untersuchungen durchgeführt, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Es gilt als unumstritten, dass es in der frühen Erdgeschichte zu einem häufigen Austausch von Material zwischen Planeten durch Meteoriten gekommen ist (Melosh 2003) und bis heute treffen große Mengen von Meteoriten jährlich auf der Erdoberfläche auf (Halliday *et al.* 1989). Es ist demnach die Möglichkeit gegeben, dass Mikroorganismen mit Meteoriten zur Erde gekommen sein könnten (Nicholson *et al.* 2000, Horneck *et al.* 2001 b). Dazu müssten die Organismen allerdings fähig sein, den Extrembedingungen des interstellaren Raums zu widerstehen. Die zwei gravierendsten Einflüsse während eines interplanetaren Fluges sind das Vakuum und die hohe Strahlenbelastung. Im interstellaren Raum herrscht ein Vakuum von 10^{-14} Pa. Bedingt durch Ausgasungsprozesse verringert sich das Vakuum in der Nähe von Planeten. Zum Beispiel herrscht im LEO (Low Earth Orbit), dem ernalten Orbitbereich (bis 450 km über der Erdoberfläche) ein Druck von 10^{-7} Pa bis 10^{-4} Pa (Baglioni *et al.* 2007). Bei einem derartig niedrigen Druck wird biologischem Material gebundenes und freies Wasser komplett entzogen und es kommt zu einer extrem starken Trocknung. Des Weiteren

treten im interstellaren Raum zum einen ionisierende galaktisch-kosmische Strahlung und zum anderen ionisierende solar-kosmische Strahlung auf. Die galaktisch-kosmische Strahlung wurde außerhalb unseres Sonnensystems generiert, zum Beispiel bei Supernovaexplosionen, und besteht zu 98 % aus Baryonen (davon 85 % Protonen, 14 % Alpha-Partikel, 1% schwere Ionen) und zu 2 % aus Elektronen (Horneck 1998). Solar-kosmische Strahlung findet ihren Ursprung bei Sonneneruptionen und damit verbundenen Sonnenwinden und besteht aus Protonen. Neben den erwähnten ionisierenden Strahlungsarten tritt auch solare UV-Strahlung über alle Wellenlängenbereiche auf (Abb. 1).

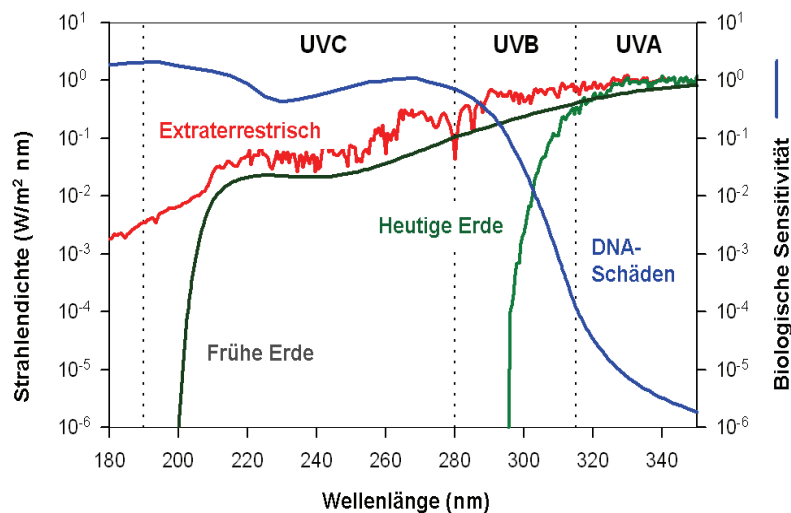


Abb. 1 Spektrum der solaren UV-Strahlung: extraterrestrisch, auf der Oberfläche der frühen Erde, auf der heutigen Erdoberfläche und die spektrale UV-Sensitivität von DNA in einer wellenlängenabhängigen Darstellung. (Diagramm freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerda Horneck, DLR, Köln)

Obwohl der Weltraum als einer der extremsten Orte gilt, den man bisher kennt, konnte in Expositionsexperimenten gezeigt werden, dass Sporen von Mikroorganismen auch nach einer Weltraumexposition keimungsfähig und somit lebensfähig bleiben. Eine Langzeitexposition von *Bacillus subtilis*-Sporen auf der LDEF-Plattform (Long-Duration-Exposure-Facility) zeigte, dass Sporen unter bestimmten Umständen eine sechsjährige Weltraumexposition überleben können. Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass Sporen auch einen längeren Weltraumflug auf oder in einem Meteoriten überleben könnten (Horneck *et al.* 1994, Nicholson 2009). Hier sei erwähnt, dass die Überlebensrate der Sporen deutlich höher wäre, wenn sich die Zellen im Innern eines Meteoriten befinden würden. Schon eine dünne Schicht (~ 1 cm) künstlichen Meteoritenmaterials schützt die Zellen vor den schädlichen Einflüssen des Weltraums und wirkt sich somit positiv auf die Überlebensfähigkeit der Sporen bei einer Weltraumexposition aus (Horneck *et al.* 2001 b, Rettberg *et al.* 2002). Dennoch ist eine sechsjährige Exposition nicht mit einer geschätzten Dauer von 10^5 bis 10^6 Jahren eines natürlichen Meteoritenfluges vom Mars zur Erde zu vergleichen. Bisher wurden alle Expositionsexperimente ausschließlich im LEO durchgeführt. Daher kann über die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen nach einem Aufenthalt im interstellaren Raum nur spekuliert werden. Im Gegensatz zum schädigenden Einfluss der vakuumbedingten Trocknung scheint bei Mikroorganismen eine Veränderung der Gravitation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Brueschke *et al.* 1961). Baker *et al.* (2005) zeigten, dass

Stenotrophomonas paucimobilis und *Acinetobacter radioresistens* von einer verminderten Gravitation in ihrem Wachstum nicht beeinflusst werden. Bei dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 hat sowohl eine reduzierte als auch eine erhöhte Gravitationskraft (200 g) kaum Einflüsse auf den Metabolismus. Erst deutlich höhere Beschleunigungskräfte (40000 g) führen zu metabolischen Veränderungen (Erdmann *et al.* 1997). Die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen während eines Einschlages und des damit verbundenen Auswurfes, beziehungsweise des Einschlages auf einem anderen Planeten, ist aufgrund der enormen Druckbelastungen eng miteinander verbunden. Es wurden schon Experimente mit *B. subtilis*-Sporen durchgeführt, die zeigen, dass Sporen sowohl enorme Beschleunigungskräfte (Mastrapa *et al.* 2001) als auch große Druckwirkungen (5-50 GPa) überleben können (Horneck *et al.* 2008, Fajardo-Cavazos *et al.* 2009). Diese Druckverhältnisse, aber auch äußerst extreme Temperaturunterschiede entstehen sowohl beim Einschlag und dem damit verbundenen Auswurf von Material, als auch beim Eintritt in die Erdatmosphäre (Fajardo-Cavazos *et al.* 2005, Fritz *et al.* 2005) und dem Einschlag des Meteoriten auf die Erdoberfläche (Horneck *et al.* 2001 a). Nach dem Einschlag des Meteoriten auf der Erde müssten die Zellvorläufer, beziehungsweise die Zellen fähig sein, sich unter den vorherrschenden Bedingungen zu vermehren. Vor ca. 3,8 Milliarden Jahren, als das erste Mal Leben auf der Erde auftrat (Mojzsis *et al.* 1996), herrschten deutlich andere Bedingungen als heute. Die Ozeane der frühen Erde waren durch vorangegangene Meteoriten-Bombardements auf über 100 °C aufgeheizt (Nisbet *et al.* 2001), die Atmosphäre bestand, im Gegensatz zu heute, wahrscheinlich aus Methan, Ammoniak, Wasserstoff und Wasser (Sagan 1973, Holland 1983). Über die prozentuale Zusammensetzung der Atmosphärenbestandteile ist man sich aber bis heute uneins (Chyba 2005). Durch die vulkanische Aktivität enthielt die Atmosphäre zudem Kohlenstoffdioxid, Kohlenstoffmonoxid und Schwefelwasserstoff (Stetter 1996 a). Sauerstoff und somit eine UV-absorbierende Ozonschicht (O₃) fehlten nahezu vollständig. Wie in Abb. 1 zu sehen, hatte dies eine deutlich höhere biologische Wirksamkeit der spektralen UV-Bestrahlungsstärke auf der Erdoberfläche zur Folge. So erreichte, im Gegensatz zu heute, das gesamte UV-C-Spektrum, aber auch der kurzwellige Bereich des UV-B-Spektrums die Erdoberfläche (Cockell *et al.* 2001).

Aufgrund der hohen Strahlenbelastung auf der Erdoberfläche könnte sich das Leben in strahlungsgeschützten Habitaten wie zum Beispiel in Hydrothermalsystemen der Tiefsee entwickelt haben (Sagan 1973, Baross *et al.* 1985, Nisbet *et al.* 2001). Für diese Hypothese spricht außerdem, dass der letzte gemeinsame Vorfahre aller Lebensformen thermophil oder hyperthermophil gewesen sein könnte (Stetter 1996 a, DiGiulio 2000, DiGiulio 2003). Archaeen, die sich beispielsweise aufgrund ihrer 16s rRNA-Gensequenz deutlich von den Bakterien und Eukaryoten unterscheiden lassen (Woese *et al.* 1977, Woese *et al.* 1990),

zweigen, wie in Abb. 2 zu erkennen, tief im phylogenetischen Stammbaum ab und könnten unter den rezenten Mikroorganismen den ursprünglichen Lebensformen sehr ähnlich sein (Stetter 1992).

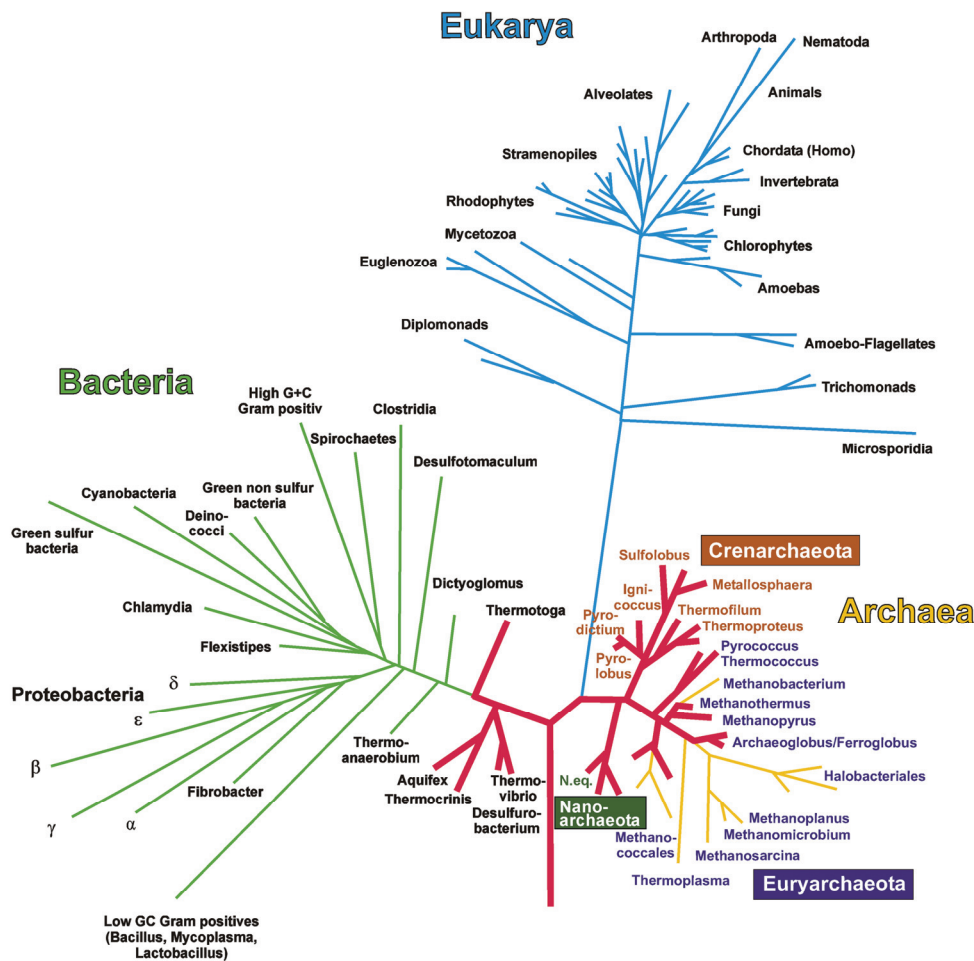


Abb. 2 Auf 16s rRNA-Sequenzvergleichen basierender phylogenetischer Stammbaum. Hyperthermophile Organismen sind rot markiert. (Stammbaum freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Harald Huber, Universität Regensburg).

So leben Hyperthermophile, deren Wachstumsoptimum bei 80 °C und höher liegt (Stetter 1989), noch heute unter Bedingungen, die den Bedingungen der frühen Erde äußerst ähnlich sind. (Hyper-)Thermophile leben zum Beispiel in anoxischen Zonen mit sehr hohen Temperaturen und hohen vulkanischen Aktivitäten (Black-Smoker, Solfatarenfelder, Hydrothermalsysteme, heiße Schlammlöcher). Dabei sind einige Vertreter fakultative oder strikte Anaerobier und gewinnen durch einen strikt oder fakultativ chemolithoautotrophen Stoffwechsel ihre Energie (Stetter 1996 b).

Extreme Bedingungen führen zu DNA-Schädigungen

In der Zelle haben verschiedene Extrembedingungen oft die gleichen Schädigungen zur Folge (Abb. 3). Die Hauptschäden, die durch Hitze, Wasserentzug, Strahlung oder Behandlung

mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) induziert werden, sind oft identisch. So können in allen Fällen DNA-Strangbrüche auftreten (Peak *et al.* 1995, Dose *et al.* 1991, Riley 1994, Mattimore *et al.* 1996).

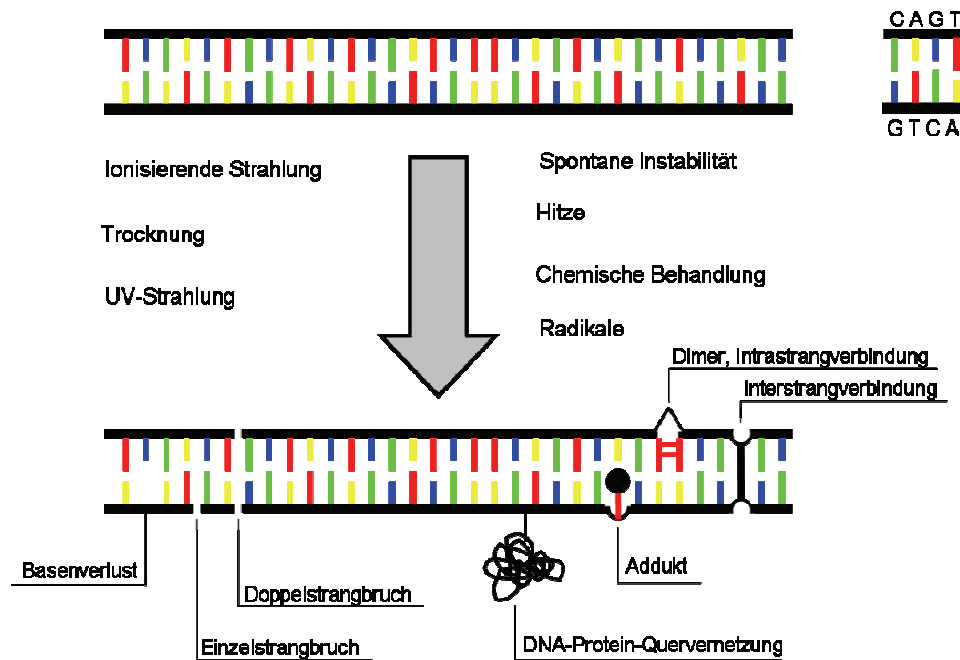


Abb. 3 Übersicht verschiedener DNA-Schäden und deren mögliche Ursachen.

Nach ionisierender Strahlenexposition kommt es bei biologischem Material zu direkten Effekten an zellulären Bestandteilen, wie der DNA, aber auch zu indirekten Effekten. Direkte Effekte in Form von DNA-Strangbrüchen treten bei Trefferereignissen der Strahlung auf die DNA auf. Die indirekten Effekte entstehen durch die strahlenbedingte Radiolyse von Wasser. Dabei können durch Spaltung von H_2O -Molekülen verschiedene Ionen und Radikale, wie H_2O^+ , H^\cdot , OH^\cdot , OH^- , O_2^\cdot entstehen. Diese Ionen und Radikale führen wiederum überwiegend zu den gleichen DNA-Schäden wie die direkten Effekte (Riley 1994). Da vegetative Zellen zu ca. 80 % aus Wasser bestehen und zudem meist in einem wässrigen Milieu leben, kann die bei der Zellschädigung eine erhebliche Rolle spielen (Hutchinson 1985). Radikalbedingte DNA-Schädigungen, durch eine Behandlung mit H_2O_2 , prägen sich sowohl in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Ananthaswamy *et al.* 1977), als auch in Basenveränderungen (Cadet *et al.* 1999) aus.

Durch Trocknung wird der Zelle sowohl gebundenes, als auch freies Wasser entzogen (Potts 1994). Da die meisten zellulären Komponenten hydratisiert vorliegen, kommt es durch den Wasserentzug zu schwerwiegenden Schädigungen. Die DNA geht zum Beispiel von der B-Konformation in die A-Konformation über, wodurch DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche entstehen können (Dose *et al.* 1992), Proteine denaturieren (Prestrelski *et al.* 1993), Lipide werden geschädigt (Cox 1993) und DNA-Protein-Quervernetzungen können auftreten (Bieger-Dose *et al.* 1992). Eine Vakuumexposition stellt eine extreme Form der Trocknung dar.

Beispielsweise hat eine dreiwöchige Vakuumexposition im Genom von *B. subtilis*-Sporen ca. 50 Doppelstrangbrüche zur Folge (Dose *et al.* 1992). Einzel- und Doppelstrangbrüche werden bei Mikroorganismen hauptsächlich durch Rekombinationsreparatursysteme repariert. Dazu gehören sowohl die homologe Rekombination (Kowalczykowski *et al.* 1994), als auch die, unter den Bakterien phylogenetisch weit verbreitete End-zu-End-Verknüpfung (non-homologous end-joining) (Wilson *et al.* 2003, Bowater *et al.* 2006). Auf die grundlegenden Mechanismen der einzelnen Reparaturmechanismen wird in einem späteren Abschnitt noch eingegangen.

Chemische Behandlungen zum Beispiel mit alkylierenden Substanzen können sowohl zu Basenalkylierungen als auch zu Interstrangverbindungen führen (Noll *et al.* 2006). DNA-Interstrangverbindungen werden durch eine Kombination aus Nukleotid-Exzisions-Reparatur und Rekombinationsreparatursystemen erkannt und entfernt (Noll *et al.* 2008). Veränderte Basen aber auch Basenverluste werden während der Basen-Exzisions-Reparatur sowohl bei Prokaryoten (Fleck *et al.* 2004), als auch bei Eukaryoten (Kanno *et al.* 1999) durch Glykosylasen und Endonukleasen, wie zum Beispiel der Flap-Endonuklease FEN-1 (Kim *et al.* 1998), repariert (Krokan *et al.* 1997, David *et al.* 1998).

UV-C-Strahlung mit einer Wellenlänge von 254 nm wird durch viele zelluläre Komponenten, hauptsächlich aber durch die DNA absorbiert. Nukleotide haben bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum und es kommt dadurch zur Bildung verschiedener DNA- und Basen-Photoprodukte. Somit stellt die UV-C-Strahlung, wie schon in Abb. 1 zu sehen, die schädlichste UV-Strahlung dar.

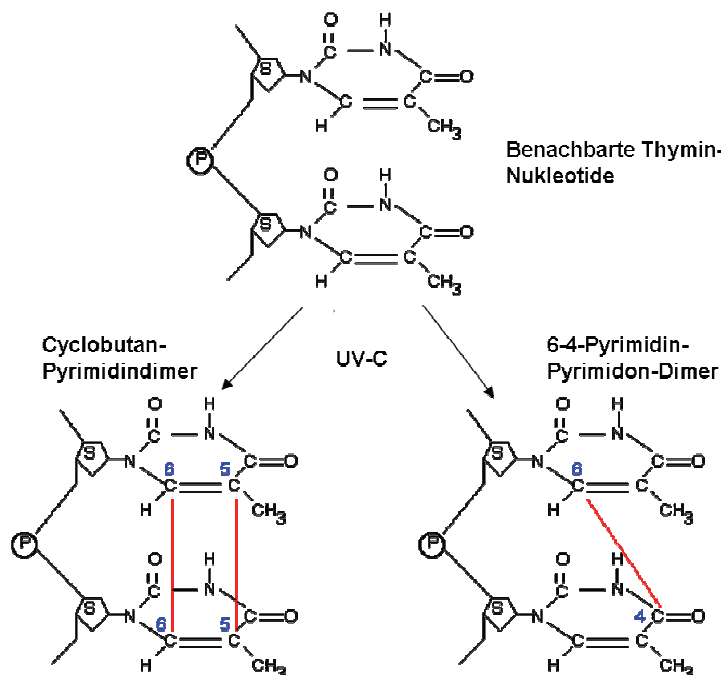


Abb. 4 Strukturformeln der UV-C-induzierten DNA-Hauptphotoprodukte zwischen zwei benachbarten Thymin-Nukleotiden: Cyclobutan-Pyrimidindimer und 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Dimer. Die rote Linie deutet die gebildete Bindung zwischen den jeweiligen C-Atomen der beiden Thymindimeren an.

Das DNA-Hauptphotoprodukt ist das Thymindimer, das aus der Verbindung von zwei benachbarten Thymin-Nukleotiden entsteht (Abb. 4, Mitchell *et al.* 1989). Es treten dabei sowohl Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD), als auch, in einem deutlich geringeren Anteil, nichtzyklische (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Dimere (6-4-PP) und deren Dewar-Valenzisomere auf. Die Valenzisomere entstehen durch eine Photoreversion bei Einwirkung von UV-Strahlung einer Wellenlänge von 313 nm (Douki *et al.* 2003). DNA-Photoprodukte werden meist effizient durch verschiedene Reparaturmechanismen, wie die Photoreaktivierung oder die Nukleotid-Exzision-Reparatur, aus dem Genom entfernt (Sancar *et al.* 1988). Andernfalls wirken DNA-Photoprodukte mutagen und so führen beispielsweise Pyrimidindimere in *Escherichia coli* zu Transitionen bei der Replikation (LeClerc *et al.* 1991). Außer DNA-Photoprodukten treten nach UV-C-Exposition weitere Schäden wie DNA-Protein-Quervernetzungen und andere DNA-Schäden auf. In *B. subtilis*-Sporen konnten sporenspezifische DNA-Photoprodukte sowie UV-induzierte DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden (Slieman *et al.* 2000).

(Hyper-)Thermophile sind in ihrer natürlichen Umgebung permanent mit einer potenziellen hitzebedingten DNA-Instabilität konfrontiert (Grogan 1998). Hohe Temperaturen können zu hydrolytischen Depurinationen, also Basenverlusten, DNA-Strangbrüchen (Peak *et al.* 1994) und zur Aufschmelzung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen führen (Lindahl 1993). Aufgrund dieser Tatsache haben (Hyper-)Thermophile eine Reihe von zellulären Eigenschaften, die ihnen das Leben unter extremen Bedingungen ermöglichen. Hier sei vor allem die reverse Gyrase genannt, die durch das Einfügen positiver Supercoils die DNA vor Hitzeschäden schützen soll (Brochier-Armanet *et al.* 2007). Es gibt zudem Hinweise, dass kompatible Solute, die unter den (Hyper-)Thermophilen weit verbreitet (Martins *et al.* 1997) und an der Osmoprotektion beteiligt sind, auch eine Rolle bei der Hitzeanpassung spielen (Martins *et al.* 1995, Lamosa *et al.* 2000).

Aufgrund der Hitzeadaptation (hyper-)thermophiler Mikroorganismen wurde diskutiert, dass diese Anpassungsmechanismen nicht nur bei der Reparatur von Hitzeschäden eine wichtige Rolle spielen, sondern auch an der Reparatur von anderen Schäden beteiligt sein könnten (Grogan 1998, Grogan 2000).

Reparatursysteme und deren phylogenetische Verbreitung

Jede (hyper-)thermophile Zelle besitzt sowohl Reparatursysteme für die DNA als auch für Proteine. Die Reparatur von Hitzeschäden an Proteinen können zum Beispiel Thermosomen oder Klasse II Chaperonine übernehmen (Phipps *et al.* 1991, Ditzel *et al.* 1998, Young *et al.* 2004). Für die Reparatur von DNA-Schäden besitzen die Organismen eine Vielzahl von Re-

paraturmechanismen, die für verschiedene DNA-Schäden zuständig sind. Auf die Funktionsweise und phylogenetische Verbreitung ausgewählter Reparaturmechanismen (enzymatische Photoreaktivierung (EPR), Nukleotid-Exzision-Reparatur (NER), homologe Rekombination (HR), Mismatch-Reparatur (MMR)) wird im nächsten Abschnitt kurz eingegangen.

Das EPR-System dient der spezifischen Entfernung von CPDs, die nach einer UV-C-Bestrahlung 70 - 90 % der DNA-Photoprodukte ausmachen. Das Hauptenzym, die Photolyase (Phr), monomerisiert dabei lichtabhängig (> 300 nm) die CPDs (Kelner 1949). Bei *E. coli* wurden zwei Gene (*phrA*, *phrB*) identifiziert, die an der Photoreaktivierung beteiligt sind (Dorell *et al.* 2008). Die Photolyase oder zu ihr homologe Proteine konnten bisher bei Vertretern aller drei Domänen des Lebens identifiziert werden. Schon vor langer Zeit wurden Phr-ähnliche Proteine durch Aktivitätstests bei einigen Bakterien, Hefen, höheren Tieren bis hin zum Menschen nachgewiesen (Rupert 1975). Bei Archaeen konnten *phr*-Homologe sowohl bei Cren- als auch Euryarchaeoten nachgewiesen werden (Crowley *et al.* 2006). Zum Beispiel besitzen einige Halophile zwei Homologe (*phr1*, *phr2*) für Photolyasen (Baliga *et al.* 2004). Des Weiteren konnte sowohl bei einigen Methanogenen, wie zum Beispiel *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Kiener *et al.* 1985, Kiener *et al.* 1989), als auch bei Vertretern der Sulfolobales ein aktives Photolyase-Gen identifiziert werden (Grogan 1997).

Das NER-System, bei *E. coli* durch den Hauptenzymkomplex UvrABC gekennzeichnet, entfernt ebenfalls DNA-Photoprodukte. Der Enzymkomplex erkennt die Dimere in der DNA, schneidet die betroffenen Nukleotide inklusive eines 12 bis 13 Nukleotide umfassendes DNA-Stück heraus, füllt die Lücke wieder auf und behebt auf diese Weise den Schaden (Van Houten 1990). Auch dieser Reparaturmechanismus scheint in allen Domänen des Lebens vertreten zu sein. Das eukaryotische NER-System ähnelt dem bakteriellen Prozess mit der Ausnahme, dass ein ca. 30 Nukleotide langes DNA-Stück herausgeschnitten wird und 15 bis 18 Proteine am gesamten Reparaturvorgang beteiligt sind (Salerno *et al.* 2003). Bei Eukaryoten sind verschiedene XP-Gene (unter anderem XPB, XPD, XBF, XPG) am NER beteiligt. XP steht dabei für Xeroderma pigmentosum, einer Hautkrankheit des Menschen, die bei einem Fehlen beziehungsweise einer Fehlfunktion der XP-Gene und somit einer Dysfunktion des NER-Systems auftritt und zu einem frühem Tod der betroffenen Individuen führt (Friedberg 2003). Archaeen besitzen zum Teil eine Kombination des bakteriellen und des eukaryotischen NER-Systems, inklusive der entsprechenden homologen Gene (DiRuggiero 1999). So haben einigen Euryarchaeoten ein aktives, dem bakteriellen System sehr ähnliches NER-System mit dem Enzymkomplex UvrABC (Ögrünç *et al.* 1998, Crowley *et al.* 2006). Archaeen, die kein UvrABC-System besitzen, haben zum Teil homologe Gene zu den Nukleasen XPF und XPG, beziehungsweise den Helikasen XPB und XPD, also dem eukaryotischen NER-System (White 2003). Dennoch treten auch Mischformen auf: bei *Haloferax volcanii* konnten sowohl XPB-, XPD-, XPF- und XPG-homologe Gene, als auch ein

UvrABCD-System nachgewiesen werden (Duan 2009). Dabei zeigen sich zum Beispiel im Falle von XPD 25 % Strukturähnlichkeiten zwischen dem archaeellen und dem eukaryotischen Protein (Liu *et al.* 2008). Bei Archaeen ist XPD an der Entwindung der DNA maßgeblich beteiligt (White 2009, Rudolf *et al.* 2010). Dem XPF-Protein aus *Aeropyrum pernix* konnte eine DNA-Erkennungs- und Bindefunktion mit Endonukleaseaktivität zugeordnet werden. (Newman *et al.* 2005). Newman *et al.* (2005) zeigten des Weiteren, dass entsprechende homologe Proteine / Proteinsequenzen auch in *Pyrococcus furiosus* und *Sulfolobus solfataricus* vorhanden sind. Ebenfalls in *S. solfataricus* wurde die Kristallstruktur von XPB und dessen Funktion, als einzelstrangbindende DNA-Helikase, untersucht (Richards *et al.* 2008).

Das HR-System, bei Bakterien bestehend aus einer Vielzahl von *rec*-Genen, dient hauptsächlich zur Reparatur von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. *E. coli* und andere Bakterien besitzen zwei RecA-abhängige Rekombinationssysteme: das RecBCD-System dient der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, das RecF-System ist zusammen mit einigen Hilfsenzymen, wie zum Beispiel RecO hauptsächlich an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt (Kowalczykowski *et al.* 1994, Xu *et al.* 2008). Bei Eukaryoten, wie zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae*, werden bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch das HR-System eine Reihe von *rad*-Genen benötigt. Hier spielt vor allem die Epistasis-Gruppe RAD52 eine große Rolle. Hierzu gehören unter anderem die Proteine Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11 (Pâques *et al.* 1999, Symington 2002). Obwohl die einzelnen Gene zum Teil weitreichend genetisch und biochemisch untersucht wurden, ist die genaue Funktion von einigen der Proteine, für die sie kodieren, nicht verstanden. Da es sich bei RecA und Rad51 auf struktureller Ebene der DNA um sehr ähnliche Gene handelt (Ogawa *et al.* 1993, Lin *et al.* 2006), ist es nicht verwunderlich, dass manche Archaeen Gene besitzen, die dem bakteriellen RecA ähnlich sind und andere ein Homolog zu Rad51 im Genom aufweisen (DiRuggiero *et al.* 1999).

Das MMR-System besteht bei *E. coli* aus zwei Hauptenzymen MutS und MutL, die für die Reparatur von falsch eingebauten und somit falsch gepaarten Basen zuständig sind (Radman *et al.* 1986). Das eukaryotische MMR-System funktioniert prinzipiell wie bei *E. coli*, wobei sich die beteiligten Proteine von den bakteriellen unterscheiden und es sich um eine Vielzahl von MutS- und MutL-Homologen handelt (Kunkel *et al.* 2005). Bei hyperthermophilen Bakterien, wie *Aquifex pyrophilus* und *Thermotoga maritima* ist ein aktives MMR-System nachgewiesen, jedoch konnte das MMR-System, beziehungsweise einzelne Bestandteile, nur bei wenigen Archaeen identifiziert werden. Bisher konnte dies nur bei den beiden mesophilen *Methanosarcina*-Vertretern (*M. acetivorans*, *M. mazei*) und bei mesophilen Halophilen nachgewiesen werden (Kelman *et al.* 2005). Es scheint, als würde ein MutS / MutL-System bei (hyper-)thermophilen Archaeen komplett fehlen (Grogan 2004, Kelman *et*

al. 2005). Das teilweise Fehlen von bekannten Reparatursystemen in (hyper-)thermophilen Mikroorganismen veranlasst zur Spekulation, ob (Hyper-)Thermophile ein spezielles, bisher noch nicht entdecktes Reparatursystem besitzen könnten (Makarova *et al.* 2002).

Zielsetzung der Arbeit

Weltraumexpositionsexperimente wurden bisher nahezu ausschließlich mit mesophilen Mikroorganismen, namentlich *B. subtilis*-Sporen durchgeführt (Horneck *et al.* 2010). Sollte sowohl die Theorie der „Lithopanspermie“ als auch die Theorie, dass (Hyper-)Thermophile die ersten Zellen der frühen Erde darstellen, der Realität entsprechen, ist davon auszugehen, dass die (Hyper-)Thermophilen ebenfalls Weltraumbedingungen überleben können sollten. Die schwerwiegendsten zellulären Effekte während einer Weltraumexposition werden durch die vakuumbedingte absolute Trockenheit und die auftretende Strahlung verursacht. Obwohl lange davon ausgegangen wurde, dass nur Sporen Perioden der Trockenheit überdauern können, konnte bereits in früheren Arbeiten bei einigen vegetativen Mikroorganismen eine Trockentoleranz nachgewiesen werden (Billi *et al.* 2002, Beblo 2006, Olsson-Francis *et al.* 2010). Ziel dieser Arbeit war daher, eine detaillierte Analyse (hyper-)thermophiler Archaeen und (hyper-)thermophiler, phylogenetisch tief abzweigender Bakterien bezüglich ihrer Toleranz gegenüber verschiedenen Stressoren durchzuführen. Dazu wurden aus nahezu allen Ordnungen der (hyper-)thermophilen Archaeen und der (hyper-) thermophilen Bakterien ein oder mehrere Vertreter auf ihre Toleranz gegenüber verschiedenen Arten der Trocknung und verschiedener Strahlungsarten (monochromatische UV-C-Strahlung; ionisierende Strahlung) getestet. Dabei wurde bei allen Untersuchungen das Hauptaugenmerk auf die Überlebens-rate der einzelnen Organismen nach der jeweiligen Behandlung gelegt. Zusätzlich wurden erste Versuche durchgeführt die zellulären Effekte der einzelnen Behandlungen und die physiologischen Ursachen der einzelnen Toleranzen zu untersuchen.

II Material und Methoden

1 Bezugsquellen

1.1 Chemikalien

1-1'-Diglycerolphosphat (> 93 %) Kaliumsalz	BITOP AG, Witten (Deutschland)
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
L-Cysteinhydrochlorid x H ₂ O	Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen (Deutschland)
L (+) - Laktat (80 %)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumsulfid x 7-9 H ₂ O	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Pepton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Resazurin	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Schwefel	Riedel-de Haën, Seelze (Deutschland)

Alle nicht explizit genannten Chemikalien wurden von der Firma VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Soweit nicht anders angegeben wurden ausschließlich Substanzen mit der Angabe p.A. oder reinst verwendet.

1.2 pH-Indikator

pH-Papierteststreifen (Acilit, Neutralit, Alkalit) wurden von der Firma VWR bezogen.

1.3 Gase

Sowohl die verwendeten Mischgase (N₂/CO₂ und H₂/CO₂; jeweils 80:20 v/v; Reinheit 4.5), als auch Formiergas (95 % N₂, 5 % H₂; Reinheit 5.0) für die Anaerobenkammer (COY Laboratory Products Inc., Arbor, Michigan, USA) wurden von der Firma Praxair (Oevel, Belgien) bezogen.

2 Verwendete Organismen und deren Kultivierungsbedingungen

2.1 Standardkultivierungsbedingungen

Alle Mikroorganismen stammten aus der Bakterienbank der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum). Folgende Rein- und Mischkulturen wurden verwendet:

Organismus	Stamm	T _{opt.} (°C)	pH	Medi- um	Gasphase	Zusätze
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	DSM 4304 ^T (Stetter 1988)	85	6,5	MGG	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % Laktat, 0,05 % YE
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	DSM 18386 ^T (Paper <i>et al.</i> 2007)	90	6,0	½ SME	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % S°
<i>Ignicoccus hospitalis</i> mit <i>Nanoarchaeum</i> <i>equitans</i>	KIN4/M (Huber <i>et al.</i> 2002 a)	90	6,0	½ SME	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % S°
<i>Ignicoccus pacificus</i>	DSM 13166 ^T (Huber <i>et al.</i> 2000)	90	6,0	½ SME	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % S°
<i>Metallosphaera sedula</i>	DSM 5348 ^T (Huber <i>et al.</i> 1989)	65	2,0	Allen	80 % H ₂ , 20 % CO ₂ ; Luft	10 ml Luft; G6; 0,1 % S°, 0,02 % YE
<i>Methanocaldococcus</i> <i>jannaschii</i>	DSM 2661 ^T (Jones <i>et al.</i> 1984)	85	6,0	MJ	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	-
<i>Methanothermobacter</i> <i>thermoautotrophicus</i>	DSM 1053 ^T (Zeikus <i>et al.</i> 1972)	65	7,0	MS	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	-
<i>Methanosarcina barkeri</i>	DSM 800 ^T (Kluyver <i>et al.</i> 1947)	37	7,0	MS	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	0,5 % Acetat
<i>Methanosarcina mazei</i>	DSM 3318 (Barker 1936)	37	7,0	MS	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % Acetat, 0,2 % Methanol
<i>Pyrococcus furiosus</i>	DSM 3638 ^T (Fiala <i>et al.</i> 1986)	95	6,5	SME	80 % N ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % Pepton, 0,1 % YE
<i>Pyrodictium occultum</i>	DSM 2709 ^T (Stetter <i>et al.</i> 1983)	100	5,5	½ SME	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % S°, 0,05 % Pepton
<i>Sulfolobus metallicus</i>	DSM 6482 ^T (Huber <i>et al.</i> 1991)	65	2,0	Allen	Luft	G1N; 0,1 % S°, 0,02 % YE
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Ron 12/III (Zillig <i>et al.</i> 1980)	80	2,0	Allen	80 % H ₂ , 20 % CO ₂ ; Luft	10 ml Luft; 0,1 % S°, 0,02 % YE
<i>Thermophilum pendens</i>	DSM 2475 ^T (Zillig <i>et al.</i> 1983)	85	6,0	Allen	80 % N ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % S°, 0,02 % YE
<i>Thermoproteus tenax</i>	DSM 2978 ^T (Zillig <i>et al.</i> 1981)	85	6,0	Allen	80 % N ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % Thiosulfat, 0,02 % YE
<i>Aquifex aeolicus</i>	VF5 (Deckert <i>et al.</i> 1998)	85	7,0	SME	79 % H ₂ , 20 % CO ₂ , 1 % O ₂	10 ml Luft
<i>Aquifex pyrophilus</i>	DSM 6848 ^T (Huber <i>et al.</i> 1992)	85	7,0	SME	79 % H ₂ , 20 % CO ₂ , 1 % O ₂	10 ml Luft, 0,1 % Thiosulfat
<i>Hydrogenobacter</i> <i>thermophilus</i>	DSM 6534 ^T (Kawasumi <i>et al.</i> 1984)	70	7,0	TK-6	78 % H ₂ , 20 % CO ₂ , 2 % O ₂	10 ml Luft
<i>Hydrogenophilus</i> <i>hirschii</i>	DSM 11420 ^T (Stöhr <i>et al.</i> 2001 a)	60	7,0	A/1	78 % H ₂ , 20 % CO ₂ , 2 % O ₂	10 ml Luft, 0,05 % S°, 0,05 % CaCO ₃
<i>Hydrogenothermus</i> <i>marinus</i>	DSM 12046 ^T (Stöhr <i>et al.</i> 2001 b)	65	7,0	VM1	78 % H ₂ , 20 % CO ₂ , 2 % O ₂	10 ml Luft, 0,05 % S°
<i>Thermocrinis ruber</i> (<i>Tc. ruber</i>)	DSM 12173 ^T (Huber <i>et al.</i> 1998)	85	7,0	Synthe- tic-OS	94 % N ₂ , 3 % O ₂ , 3 % H ₂	0,05 % S°
<i>Thermovibrio ruber</i> (<i>Tv. ruber</i>)	DSM 14644 ^T (Huber <i>et al.</i> 2002 b)	80	6,0	SME	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	0,1 % NaNO ₃

Tab.1 Verwendete Stämme, deren Medien und standardmäßige Kultivierungsbedingungen.

2.2 Kompatible Solute (KS)-induzierende Kultivierungsbedingungen

Organismus	Medium	Natriumchlorid-Konzentration (w/v)	Temperatur (°C)
<i>A. fulgidus</i>	MGG	4,5 % (Martins <i>et al.</i> 1997)	85
<i>A. pyrophilus</i>	SME	4,0 % (Lamosa <i>et al.</i> 2006)	85
<i>P. furiosus</i>	SME	5,0 % (Martins <i>et al.</i> 1995)	95
<i>P. furiosus</i>	SME	2,7 %	100 (Martins <i>et al.</i> 1995)
<i>T. tenax</i>	Allen	0,2 % (Martins <i>et al.</i> 1997)	85

Tab. 2 Zusammenfassung der KS-induzierenden Kultivierungsbedingungen. Änderungen bezüglich der optimalen Kultivierungsbedingungen der jeweiligen Organismen sind grau hinterlegt und bei der angegebenen Referenz beschrieben.

3 Medien

3.1 Medienzusammensetzungen für Standardkultivierungen

3.1.1 A/1-Medium für *H. hirschii* (Huber *et al.* 1992, mod. Stöhr *et al.* 2001 a)

Substanz	Menge
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,00 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,50 g
KCl	0,65 g
NaBr	0,10 g
NaHCO ₃	2,00 g
NH ₄ Cl	0,15 g
K ₂ HPO ₄	0,15 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,50 g
Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / ohne Titriplex	1,00 ml
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.2 Allen-Medien für Sulfolobales-Vertreter und Thermoproteales-Vertreter (Allen 1959, mod. Brock *et al.* 1972)

Substanz	Menge
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,30 g
KH ₂ PO ₄	0,28 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,07 g
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,02 g
Stammlösungen: 100 mg / 100 ml	
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,80 ml
Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	4,50 ml
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,22 ml
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 ml
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 ml

VOSO ₄ x 5 H ₂ O	0,03 ml
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 ml
Resazurin-Lsg., 0,1 %	1,00 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,50 g
H ₂ O	ad 1000,00 ml

Für aerobe Sulfolobales-Vertreter wurde das Medium ohne Resazurin / Natriumsulfid hergestellt und unter oxidischen Bedingungen in Serumflaschen oder in Erlenmeyerkolben abgefüllt. Für anaerobe Thermoproteales-Vertreter wurde das Medium mit Resazurin und Natriumsulfid hergestellt und unter anoxischen Bedingungen in Serumflaschen abgefüllt.

3.1.3 MGG-Medium für *A. fulgidus* (Huber et al. 1982)

Substanz	Menge
NaCl	18,00 g
NaHCO ₃	5,50 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,40 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4,30 g
KCl	0,35 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,14 g
NH ₄ Cl	0,25 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,14 g
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	0,002 g
Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / ohne Titriplex	1,00 ml
Resazurin-Lsg., 0,1 %	1,00 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,50 g
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.4 MJ-Medium (modifiziert) für *M. jannaschii* (Jones et al. 1983)

Substanz	Menge
NaCl	30,00 g
NaHCO ₃	1,00 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4,10 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,40 g
KCl	0,33 g
NH ₄ Cl	0,25 g
K ₂ HPO ₄	0,14 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,14 g
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 mg
Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / ohne Titriplex	1,00 ml
Wolfe's Vitamine 10 x	1,00 ml
Resazurin-Lsg., 0,1 %	1,00 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,50 g
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.5 MS-Medium (modifiziert) für *Methanosarcina*-Vertreter und *M. thermoautotrophicus* (Balch et al. 1979)

Substanz	Menge
NaCl	0,450 g
NaHCO ₃	6,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
KH ₂ PO ₄	0,225 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,30 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,225 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,06 g
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂	0,002 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,002 g
Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / ohne Titriplex	1,00 ml
Wolfe's Vitamine 10 x	1,00 ml
L-Cysteinhydrochlorid x H ₂ O	0,50 g
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.6 Synthetisches Meerwasser (SME) für ½ SME (Stetter et al. 1983, mod. Pley et al. 1991)

Substanz	Menge	Konzentration
NaCl	27,70 g	473,99 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,00 g	28,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,50 g	27,1 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,75 g	5,1 mM
KCl	0,65g	8,7 mM
NaBr	0,10 g	0,97 mM
H ₃ BO ₃	0,03 g	0,49 mM
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,015 g	0,056 mM
KJ-Lsg., 0,1 %	0,10 ml	0,30 µM
H ₂ O	ad 1000,00 ml	

3.1.7 ½ SME-Medium für *Ignicoccus*-Vertreter und *I. hospitalis* in Cokultur mit *N. equitans* (Paper et al. 2007)

Substanz	Menge
SME	500,00 ml
KH ₂ PO ₄	0,50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 g
NaHCO ₃	0,16 g
Resazurin-Lsg., 0,1 %	1,00 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,50 g
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.8 $\frac{1}{2}$ SME für *P. occultum* (Stetter *et al.* 1983, mod. Pley *et al.* 1991, als $\frac{1}{2}$ SME beschrieben durch Blöchl *et al.* 1997)

Substanz	Menge
SME	500,00 ml
KH ₂ PO ₄	0,50 g
NH ₄ Cl	0,50 g
Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / mit Titriplex	1,00 ml
Resazurin-Lsg., 0,1 %	1,00 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,50 g
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.9 SME für *Aquifex*-Vertreter (Huber *et al.* 1992)

Substanz	Menge
NaCl	30,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,00 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,50 g
NaHCO ₃	2,00 g
KCl	0,65 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,50 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,15 g
NH ₄ Cl	0,15 g
NaBr	0,10 g
Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / ohne Titriplex	1,00 ml
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.10 SME für *Tv. ruber* (Huber *et al.* 2006)

Substanz	Menge
SME	1000,00 ml
KH ₂ PO ₄	0,50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 g
Resazurin-Lsg, 0,1 %	1,00 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,50 g

3.1.11 SME für *P. furiosus* (Fiala *et al.* 1986)

Substanz	Menge
NaCl	27,70 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,00 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,50 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,50 g
KCl	0,65 g
NaBr	0,10 g
H ₃ BO ₃	0,03 g

SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,015 g
KJ-Lsg., 0,2 %	25 µl
Resazurin-Lsg., 0,1 %	0,50 ml
Na ₂ S x 7-9 H ₂ O	0,50 g
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.12 Synthetisches OS-Medium für *Tc. ruber* (Brock *et al.* 1978, mod. Huber *et al.* 1998)

Substanz	Menge
NaHCO ₃	1,00 g
NaCl	256,00 mg
Na ₂ SO ₄	23,00 mg
KCl	15,00 mg
H ₃ BO ₃	10,30 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,00 mg
KH ₂ PO ₄	1,70 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,80 mg
NaNO ₃	0,30 mg
FeCl ₃ x 6 H ₂ O-Lsg., 0,05 %	0,20 ml
MnSO ₄ x H ₂ O-Lsg., 0,03 %	0,20 ml
Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / ohne Titriplex	1,00 ml
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.13 TK-6-Medium für *H. thermophilus* (Kawasumi *et al.* 1984)

Substanz	Menge
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	2,00 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g
NaCl	0,25 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,03 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,014 g
Spurenelemente für TK-6	0,50 ml
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.1.14 VM1 für *H. marinus* (ZoBell 1941, mod. Stöhr *et al.* 2001 b)

Substanz	Menge
NaCl	20,00 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	12,60 g
NaHCO ₃	0,16 g
K ₂ HPO ₄	0,20 g
NH ₄ Cl	0,30 g

Na ₂ SO ₄	3,24 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,38 g
KCl	0,56 g
Wolfe's Mineralien 10 x / pH 6,0 / mit Titriplex	1,00 ml
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.2 Spurenelement-, Mineralien- und Vitaminlösungen

3.2.1 Spurenelemente für TK-6 (Kawasumi *et al.* 1984)

Substanz	Menge
MoO ₃	4,00 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	28,00 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	2,00 mg
H ₃ BO ₃	4,00 mg
MnSO ₄ x 5 H ₂ O	4,00 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	4,00 mg
H ₂ O	ad 1000,00 ml

3.2.2 Wolfe's Mineralien 10 x / pH 1,0 / ohne Titriplex (modifiziert) (Balch *et al.* 1979)

Substanz	Menge	Konzentration
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30,00 g	121,70 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	5,00 g	29,60 mM
NaCl	10,00 g	171,10 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g	3,60 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,80 g	7,57 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,00 g	6,80 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,80 g	6,30 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,10 g	0,40 mM
KAl (SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,18 g	0,38 mM
H ₃ BO ₃	0,10 g	1,62 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,10 g	0,41 mM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2,80 g	7,09 mM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,10 g	0,30 mM
Na ₂ SeO ₄	0,10 g	0,53 mM
H ₂ O	ad 1000,00 ml	

Es wurden ca. 800 ml H₂O_{reinst} (GenPure; TKA Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert, Deutschland) vorgelegt, mit H₂SO₄ auf pH 1,0 titriert, die eingewogenen Salze darin gelöst und anschließend auf 1000 ml mit H₂O_{reinst} aufgefüllt. Der pH-Wert wurde überprüft und gegebenenfalls erneut eingestellt. Die sterilfiltrierte Lösung (Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) wurde bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.2.3 Wolfe's Mineralien 10 x / pH 6,0 / mit Titriplex (Balch et al. 1979)

Substanz	Menge	Konzentration
Titriplex 1 (Nitrilotriacetic acid)	15,00 g	78,50 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30,00 g	121,70 mM
MnSO ₄ x H ₂ O	5,00 g	29,60 mM
NaCl	10,00 g	171,10 mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g	3,60 mM
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	1,80 g	6,40 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,00 g	6,80 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,80 g	6,30 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,10 g	0,40 mM
KAl (SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,18 g	0,38 mM
H ₃ BO ₃	0,10 g	1,62 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,10 g	0,41 mM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2,80 g	7,09 mM
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,50 g	1,52 mM
Na ₂ SeO ₄	0,50 g	2,65 mM
H ₂ O	ad 1000,00 ml	

Es wurden ca. 800 ml H₂O_{reinst} vorgelegt, die eingewogenen Salze darin gelöst und mit H₂O_{reinst} auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde überprüft und gegebenenfalls mit H₂SO₄ auf pH 6,0 eingestellt. Die sterilfiltrierte Lösung wurde bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.2.4 Wolfe's Vitamine (Balch et al. 1979)

Substanz	Menge	Konzentration
Biotin	20 mg	81,9 µM
Folsäure	20 mg	45,3 µM
Pyridoxamindihydrochlorid = Vit. B6	100 mg	386,0 µM
Thiamindihydrochlorid = Vit. B1	50 mg	148,0 µM
Riboflavin = Vit. B2	50 mg	133,0 µM
Nikotinsäure	50 mg	406,0 µM
DL-Calciumpantothenat	50 mg	105,0 µM
Cyanocobalamin = Vit. B12	1 mg	0,74 µM
p - Aminobenzoessäure = PABA	50 mg	365,0 µM
Liponsäure	50 mg	242,0 µM
H ₂ O	ad 1000,00 ml	

Es wurden ca. 800 ml H₂O_{reinst} vorgelegt, die eingewogenen Substanzen darin gelöst und mit H₂O_{reinst} auf 1000 ml aufgefüllt. Die sterilfiltrierte Lösung wurde bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

4 Medienherstellung

Zur Herstellung der Medien wurden die entsprechenden Salze in ca. 800 ml vorgelegten $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ in einer 1-Liter-Duranglasflasche (Schott Glas, Mainz, Deutschland) gelöst und anschließend auf 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ aufgefüllt.

Alle oxischen Medien wurden in 30 ml-Portionen in 100 ml Duranglas-Erlenmeyerkolben (Schott Glas, Mainz, Deutschland) abgefüllt und die Erlenmeyerkolben mit Aluminiumfolie verschlossen.

Die mikrooxischen Medien wurden unter oxischen Bedingungen in 20 ml-Portionen Serumflaschen (120 ml; Natronkalksilikatglas, MediPac GmbH, Rheinbreitbach, Deutschland) abgefüllt. Die Serumflaschen wurden mit Butyl-Septen (Glasgerätebau & Laborfachhandel Ochs, Bovenden / Lengeln, Deutschland) verschlossen und mit Aluminiumkappen (Alu-Crimp-Kappen, 10 mm mit Loch; WICOM, Heppenheim, Deutschland) gesichert. Anschließend wurde das gewünschte Gasgemisch (H_2/CO_2 oder N_2/CO_2) mit einem Druck von 1,5 bar, beziehungsweise 2 bar durch dreimaliges Evakuieren und Begasen aufgepresst.

Die Herstellung der anoxischen Medien erfolgte wie bei Hungate (1950), beziehungsweise bei Miller *et al.* (1974) beschrieben. Die 1-Liter-Duranglasflaschen wurden sowohl mit einem Gummistopfen, als auch mit einer durchbohrten Schraubkappe verschlossen. Der im Medium gelöste Sauerstoff wurde durch Durchblubbern (20 min; N_2/CO_2) unter Druckausgleich ausgetrieben, der verbliebene Restsauerstoff wurde durch Zuspritzen von Na_2S (0,5 g gelöst in 1 ml Wasser) entfernt. Dieser Vorgang wurde durch die Reduktion und somit einem Entfärben des Redoxindikators Resazurin optisch kontrolliert. Anschließend wurde der pH-Wert des Mediums durch Zuspritzen von H_2SO_4 oder NaOH eingestellt. Alle anoxischen Medien wurden in der Anaerobenkammer in Serumflaschen (20 ml-Portionen), beziehungsweise das Synthetische OS-Medium in 10 ml-Portionen in Rollrandgefäße (25 ml; Macherey & Nagel GmbH, Düren, Deutschland) abgefüllt, mit Butyl-Septen verschlossen und aus der Kammer ausgefahren. Nachdem die Gummistopfen mit Aluminiumkappen versehen wurden, wurde der Austausch der Gasphase, wie bei den mikrooxischen Medien, mit dem entsprechenden Gasgemisch vorgenommen.

5 Zusätze

Organische und anorganische Zusätze wie Acetat, Carbonat, Hefeextrakt, L-(+)-Laktat, Methanol, Nitrat, Pepton und Thiosulfat wurden je nach Bedarf als 2 % ige (w/v) oder als 10 % ige (w/v) Lösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ hergestellt. Falls es sich um anoxische Zusätze handelte, wurden die Lösungen für 30 min mit Druckausgleich mit N_2/CO_2 durchblubbert. Als weitere Zusätze wurden spezifische Erzmischungen (G1N oder G6) (0,5 g auf 30 ml Medium) oder S° (0,2 g auf 20 ml beziehungsweise 30 ml Medium) verwendet.

6 Sterilisierung

6.1 Medien und Zusätze

Schwefelfreie Medien und hitzestabile Zusätze wurden durch Autoklavieren sterilisiert (20 min, 121 °C, 210 kPa Innendruck; Varioklav, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Hitzelabile Zusätze wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit Porengröße 0,22 µm, Millipore, Bredford, England). Schwefelhaltige Medien wurden für 60 min bei 110 °C im Autoklav sterilisiert. Die verwendeten Erzmischungen wurden über Nacht bei trockener Hitze (140 °C) im Trockenschrank (Heraus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) sterilisiert. Der elementare Schwefel wurde durch dreimaliges Erhitzen auf 105 °C und jeweils anschließender Inkubation über Nacht bei 37 °C tyndallisiert.

6.2 Gebrauchsgegenstände

Sämtliche Gebrauchsgegenstände wie Spritzen (Ersta, Maersk, Dänemark), Kanülen (Terumo, Leuven, Belgien), Einmalpipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Eppendorfreaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Glaswaren und die verwendeten Glasfaserfilter (Rundfilter MN 85/90, Ø 11 cm; Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) wurden für 40 min bei 121 °C (210 kPa Innendruck) autoklaviert und anschließend im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet.

7 Medienherstellung und Sterilisation des Fermenters für Großanzucht

Die Salze des MGG-Mediums für *A. fulgidus* mit KS-induzierenden Bedingungen durch eine erhöhte Salzkonzentration (4,5 % NaCl, siehe auch Tab. 2) wurden in einen 100-Liter Fermenter (HTE, Bioengineering Wald, Schweiz) eingewogen und in der entsprechenden Menge $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst. Nach Durchgasung mit N_2/CO_2 wurde das Medium für 40 min bei 121 °C und 200 kPa Druck im Fermenter sterilisiert. Die entsprechenden Mengen von Na_2S und Hefeextrakt wurden separat eingewogen, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst und zusammen mit einer H_2SO_4 -Lösung im Autoklaven (STM 201, Wolf, Geislingen, Deutschland) für 20 min bei 121 °C und 200 kPa Druck autoklaviert. Vor dem Animpfen wurden Na_2S und Hefeextrakt in den Fermenter überführt und der pH-Wert des Mediums mit steriler H_2SO_4 auf pH 7,0 eingestellt.

8 Kultivierung

8.1 Kultivierung in Serumflaschen

Das Medium in den Serumflaschen, beziehungsweise in den Rollrandgefäßen wurden über eine Spritze mit der entsprechenden Vorkultur beimpft (Animpfdichte ca. 10^5 /ml). Die Inkubation erfolgte zum Teil unter Schütteln (50 UpM), teils stehend bei entsprechender Temperatur in Heißluftinkubationsschränken (Heraus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland).

8.2 Kultivierung im Fermenter und Zellernte

Die Kultivierung im Fermenter fand am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum unter der Anleitung von Thomas Hader an der Universität Regensburg statt.

Zur Großanzucht von *A. fulgidus* im 100-Liter Fermenter wurde der Fermenter mit einem Liter gut bewachsener Kultur angeimpft. Nach dem Animpfen wurde das Medium mit H_2/CO_2 (80:20, v/v) mit einem Druck von 300 kPa überschichtet und mit 150 UpM gerührt. Die Fermentation wurde nach 48 Stunden bei einer Zelldichte von ca. 1×10^8 Zellen/ml beendet und vor der Ernte auf 18 °C abgekühlt. Die Zellernte erfolgte über eine Durchlaufzentrifuge (Typ Z416; Padberg, Lahr, Deutschland) bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 30 l/h. Die geernteten Zellmassen wurden mit dem im Zentrifugenrotor verbliebenen Medienrest suspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Sorvall-Zentrifuge pelletiert (Sorvall Superspeed RC2-B, GSA-Rotor, 9000 UpM, 30 min, 4 °C; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung über flüssigem Stickstoff bei -140 °C aufbewahrt.

9 Mikroskopie

9.1 Phasenkontrastmikroskopie

Zur lichtmikroskopischen Kontrolle der Zellen stand ein Lichtmikroskop (Standard 16 Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung. Das Mikroskop war sowohl mit zwei Luftobjektiven (10 x und 40 x Vergrößerung), als auch einem Immersionsölobjektiv (100 x Vergrößerung) ausgestattet.

9.2 Gesamtzellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte bei 40 x Vergrößerung mit einer Thoma-Zählkammer (Tiefe: 0,02 mm x 0,0025 mm² pro Kleinstquadrat; Brand GmbH, Wertheim, Deutschland). Die Gesamtkeimzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtkeimzahl/ ml} = \text{Anzahl der Zellen pro Kleinstquadrat} \times 2 \times 10^7$$

9.3 Rasterelektronenmikroskopie

Alle rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden unter Anleitung von Andreas Klingl (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg), mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Gottfried Schmalz, in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie am Universitätsklinikum Regensburg erstellt.

Die unfixierten Zellen wurden auf für die Trocknungsversuche verwendeten Glasplättchen (geschnittene Objektträger; Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgetragen und getrocknet (siehe auch II.10.1). Die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte ohne Bedampfung beziehungsweise ohne Kontrastierung der Zellen. Dazu wurden die Glasplättchen mit den getrockneten Zellen mittels doppelseitigen Klebepunkten auf dem Probenhalter befestigt und in das Rasterelektronenmikroskop (FEI QUANTA 400 FEG, FEI Company, Hillsboro, USA) eingespannt. Es wurde bei einer Anregungsspannung von 4,0 kV im Niedrigvakuum, das heißt bei einem Druck von 0,15 Torr [19,99 Pa] bis 0,30 Torr gearbeitet. Der Arbeitsabstand (Working-Distance; WD) war zwischen 7,2 mm und 8,7 mm.

10 Trocknungsexperimente

10.1 Trocknung der Zellen und Trocknungsbedingungen

Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen, die sich in der exponentiellen oder in der frühstationären Phase befanden, auf die Glasplättchen, beziehungsweise auf die Glasfaserfilterstücke möglichst flächig aufgebracht und unter Laborbedingungen bei Raumtemperatur getrocknet (Abb. 5 a; siehe auch Tab. 3).

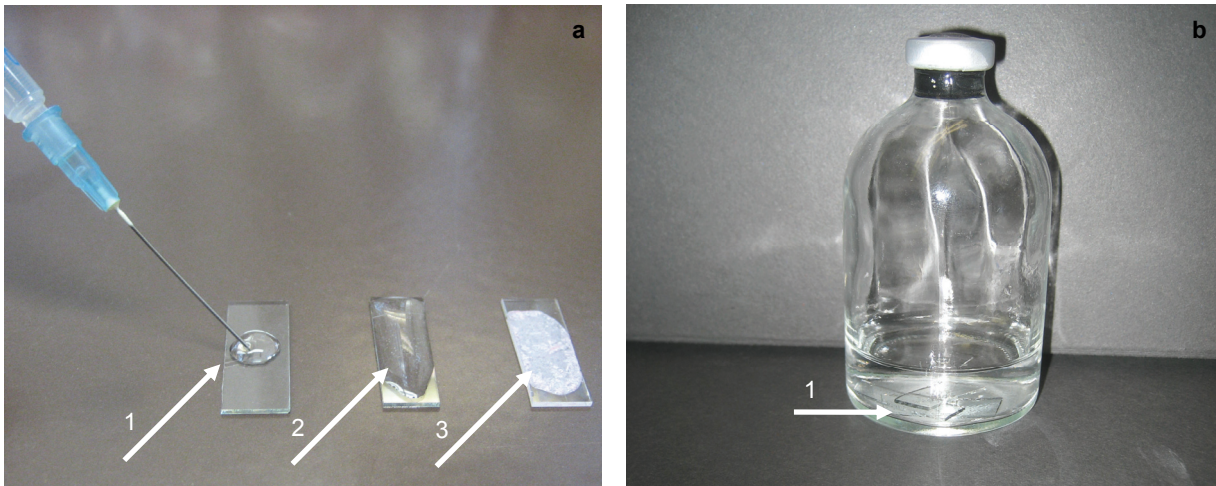


Abb. 5 Trocknung der Zellen und deren Reaktivierung.

(a) Trocknungsprozess: Zellen wurden, mittels einer Spritze, auf geschnittene Glasplättchen aufgetragen (Pfeil 1); vollständig mit Zellen beziehungsweise mit Medium bedecktes Plättchen (Pfeil 2); Zellen nach 24-stündiger Trocknung auf Glasplättchen (Pfeil 3).

(b) Reaktivierungsprozess: auf Glasplättchen getrocknete Zellen (Pfeil 1) wurden in eine Serumflasche, mit entsprechendem Medium überführt.

Nach 24-stündiger Trocknung bei Raumtemperatur wurden die getrockneten Zellen auf den entsprechenden Trägermaterialien bei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur oder $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelagert. Nach der entsprechenden Lagerungszeit wurden die Zellen reaktiviert, also die Glasplättchen mit den getrockneten Zellen in eine Serumflasche mit dem entsprechenden Medium überführt (Abb. 5 b). Dieser Vorgang erfolgte bei aeroben Mikroorganismen unter oxidischen Bedingungen. Bei den anoxischen Trocknungsversuchen wurden die Zellen in der Anaerobenkammer auf die entsprechenden Trägermaterialien aufgebracht, unter anoxischen Bedingungen getrocknet, gelagert und reaktiviert. Des Weiteren wurden anoxische Ansätze bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Dazu wurden die Zellen unter anoxischen Bedingungen auf Filterstücken getrocknet. Nach 24-stündiger Trocknung wurden die Filterstücke in gasdichte PE-Kunststofftüten verpackt und aus der Anaerobenkammer ausgefahren. Anschließend wurden die Tüten in Einschweißfolien verpackt, diese mit N_2 durchgast und zugeschweißt. Die unter sauerstofffreier Atmosphäre stehenden Filter wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Um Luftfeuchtigkeitsschwankungen unter Laborbedingungen auszuschließen, wurden die Zellen zum Teil unter konstanten Feuchtigkeitsbedingungen im Exsikkator über Blaugel (amorphes Silicagel, mit CoCl_2 als Wasserindikator) getrocknet. Die relative Luftfeuchtigkeit unter Laborbedingungen, in der Anaerobenkammer und im verwendeten Exsikkator wurde mit einem Luftfeuchtigkeitsmessgerät verfolgt (Testo 610, Testo AG, Lenzkirch, Deutschland). Die relative Luftfeuchtigkeit bei einer Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde mit einem I-Button® (Modell DS1923, MAXIM Integrated Products, Kalifornien, USA) ermittelt (Tab. 3).

Die Vakuumexpositionsexperimente wurden in den Weltraumsimulationsanlagen am Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR e.V.), Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Abteilung Strahlenbiologie durchgeführt. Für die Simulation von Weltraumvakuum wurde mit Hilfe einer Vakuumvorpumpe (DUO, Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar, Deutschland)

und einer Turbomolekular-Pumpe (TMU 261; Pfeiffer Vacuum GmbH) ein maximales Vakuum von 10^{-5} Pa erreicht und während des Experiments beibehalten.

	Temperatur	Druck	Rel. Luftfeuchtigkeit	Sauerstoff
Laborbedingungen	24 °C ± 4 °C [297 K]	10^5 Pa	33 ± 3,4 %	~ 21 %
	-23 °C ± 0,5 °C [215 K]		33 ± 1,4 %	
Anaerobenkammer	24 °C ± 4 °C [297 K]	10^5 Pa	13 ± 0,3 %	< 4 ppm
	-23 °C ± 0,5 °C [215 K]		13 ± 0,3 %	
Exsikkator über Blaugel	24 °C ± 4 °C [297 K]	10^5 Pa	5 ± 1 %	~ 21 %
Hochvakuum	20 °C ± 2 °C [293 K]	10^{-5} Pa	0,004 %	~ 0 %

Tab. 3 Übersicht der verschiedenen Parameter (Temperatur, Druck, relative Luftfeuchtigkeit, Sauerstoffgehalt) der verwendeten Trocknungs- und Aufbewahrungsbedingungen.

10.2 Periodische Austrocknung

Um einen eventuellen Einfluss von mehreren Trocknungs- und Reaktivierungszyklen auf die Überlebensrate zu untersuchen, wurden *H. marinus*-Zellen unter Laborbedingungen getrocknet (siehe auch Tab. 3) und nach 24 Stunden reaktiviert. Die Zellen, gewachsen in der Flasche mit der höchsten Verdünnung, wurden wieder auf die beschriebene Weise getrocknet. Dieser Trocknungs- und Reaktivierungszyklus wurde fünfmal wiederholt.

11 Bestrahlungsexperimente

11.1 Strahlungsquellen und Bestrahlungsversuche

11.1.1 UV-Strahlungsquelle und UV-Dosimetrie

UV-C-Bestrahlungsexperimente wurden, um Reflexionen zu vermeiden, in einem schwarz gestrichenen Labor, am DLR in Köln, Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Abteilung Strahlenbiologie durchgeführt.

Als monochromatische UV-C-Strahlungsquelle diente eine Quecksilberniederdrucklampe (NN 8/15, Heraeus, Hanau, Deutschland) mit einem Hauptemissionspeak bei 253,7 nm (Abb. 6).

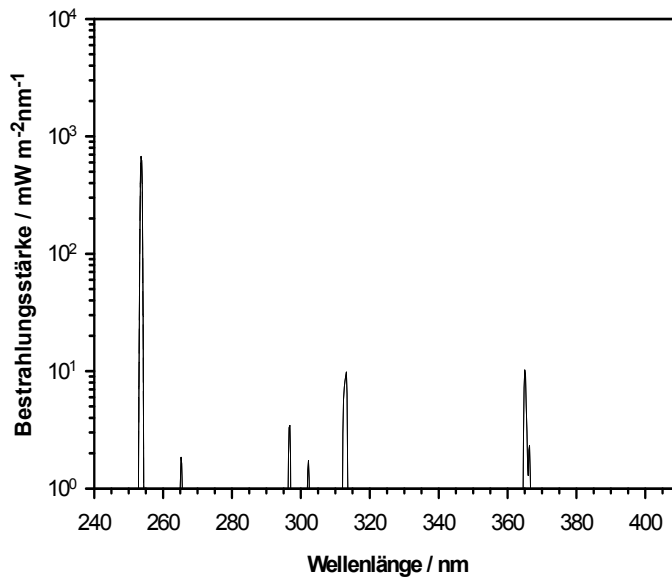


Abb. 6 Hauptemissionslinien der verwendeten Quecksilberniederdrucklampe in logarithmischer Darstellung. Die Lampe befindet sich im UV-Labor am DLR, Köln, Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Abteilung Strahlenbiologie. (Spektrum freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Rainer Facius, DLR, Köln)

Die UV-C-Lampe wurde, um eine konstante Bestrahlungsstärke zu gewährleisten, eine Stunde vor der Bestrahlung der Zellen eingebrannt. Die Strahlungseinheit war in ein höhenverstellbares Gehäuse mit Schieber eingebaut. Der Schieber wurde zur Strahlenexposition für eine bestimmte Zeit geöffnet. Die Strahlungsquelle befand sich bei allen Bestrahlungsexperimenten ca. 50 cm über der Bestrahlungsfläche. Die Homogenität der Fluenz im verwendeten Bestrahlungsfeld (8,6 cm²) betrug 97 %. Die genaue Bestrahlungsstärke am Probenort wurde vor und nach jedem Experiment mit einem UV-Radiometer (UVX-Radiometer, UVP Ultra-Violet-Products, England), ausgestattet mit einem 254 nm Sensorkopf, bestimmt. Die gemessene Bestrahlungsstärke war während aller Experimente in einem Bereich von 100 µW/cm².

Zur Berechnung der benötigten Bestrahlungszeit wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Fluenz (J/m}^2\text{)} = \text{Bestrahlungsstärke (W/m}^2\text{)} \times \text{Bestrahlungszeit (s)}$$

Die Bestrahlungszeit betrug wenige Sekunden bis hin zu 90 Minuten.

Monochromatische UV-C-Bestrahlungen (254 nm) werden in der Photobiologie standardmäßig verwendet und die erhaltenen Ergebnisse können somit direkt mit Literaturwerten verglichen werden.

11.1.2 Photometrische Vermessung der Medien und der bewachsenen Kulturen in Quarzküvetten

Um Absorptionen durch Medienbestandteile oder Zellbeschattungseffekte durch die Zellen selbst auszuschließen, wurden sowohl unbewachsene, als auch mit entsprechenden Zellen bewachsene Medien an einem Spektrophotometer (Hitachi U-3310, Hitachi High Technologies America Inc., Pleasanton, USA) vermessen. Da ausschließlich Bestrahlungsexperimente mit UV-C-Strahlung (254 nm) durchgeführt wurden, wurde der Wellenlängenbereich von 200 nm - 400 nm in UV-C durchlässigen Quarzküvetten (0,5 cm Hellma GmbH & Co. KG, Mülheim, Deutschland) auf die Absorption hin photometrisch vermessen.

11.1.3 Bestrahlungsversuche in Flüssigkeit

Für *Deinococcus radiodurans* ist eine wachstumsphasenabhängige Variation der Strahlenresistenz bekannt und die Zellen reagieren in der exponentiellen Phase der Wachstumskurve radiosensitiver als in der stationären Phase (Keller *et al.* 1984). *Halobacterium* sp. NRC-1 scheint in der stationären Phase radiosensitiver zu sein (Kottemann *et al.* 2005) und für *Thermococcus gammatolerans* konnte eine wachstumsphasenabhängige Variation in der Strahlenresistenz ausgeschlossen werden (Tapias *et al.* 2009). Um dennoch vergleichbare Ausgangsbedingungen, wie gleiche Wachstumsphase und absolut gleiche Zellzahl, zu schaffen, wurde für ein Bestrahlungsexperiment in Flüssigkeit eine einzige Vorkultur verwendet. Für die Bestrahlung wurden die Zellen, die sich in der exponentiellen oder in der frühstationären Phase befanden, in einem entsprechenden organikfreien Medium 1:10 verdünnt. Um einen Einfluss von Sauerstoff während der Bestrahlung auszuschließen, wurden die Quarzküvetten unter anoxischen Bedingungen in der Anaerobenkammer befüllt und dort gasdicht mit Teflonstopfen verschlossen (Abb. 7 a).

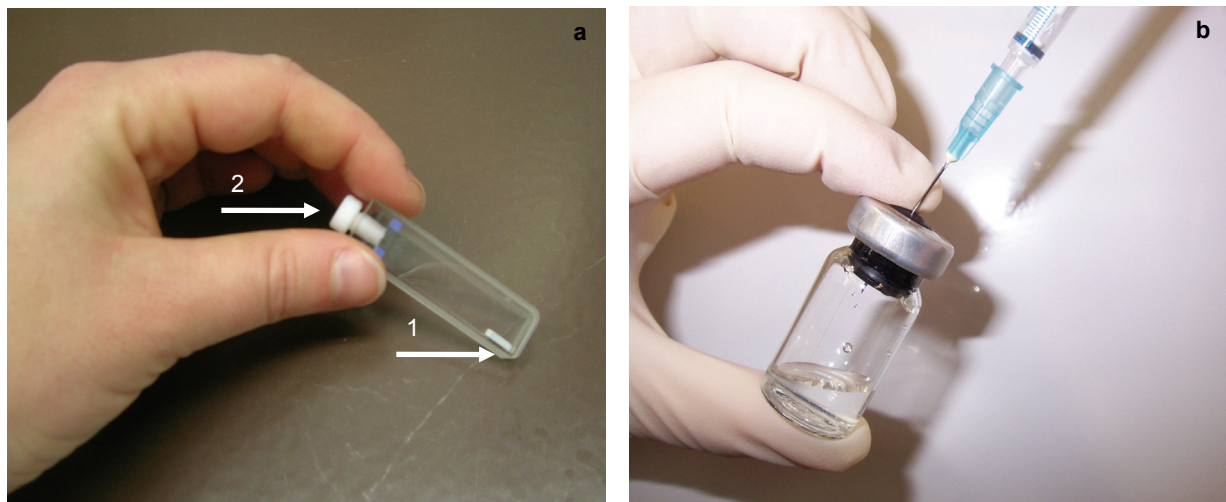


Abb. 7 Bestrahlungsversuche.

(a) Quarzküvette mit kleinem Magnetrührer (Pfeil 1) und passendem, gasdicht verschließendem Teflonstopfen (Pfeil 2) für UV-C-Bestrahlungen.

(b) Befüllung eines anoxischen HPLC-Gefäßes mit einer Spritze für Behandlung mit ionisierender Strahlung.

Die UV-C-Bestrahlung erfolgte unter Rühren bei Raumtemperatur. Um experimentelle Einflüsse, wie den mechanischen Einfluss des Rührens auszuschließen, wurde mit der nicht bestrahlten Dunkelkontrolle genauso verfahren wie mit den bestrahlten Proben. Aus diesem Grund wurde auch die Dunkelkontrolle für die maximale Bestrahlungszeit bei Raumtemperatur gerührt.

11.1.4 Untersuchung des Teilungsverhaltens nach UV-C-Bestrahlung

Um einen Anhaltspunkt über das Teilungsverhalten der Zellen nach UV-C-Exposition zu erhalten, wurden die verdünnten Zellen auf die bereits beschriebene Weise bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen unter anoxischen Bedingungen in ein auf optimale Wachstumstemperatur vorgewärmtes Medium überführt. Durch die Überführung in vorgewärmtes Medium kann eine experimentell bedingte lag-Phase ausgeschlossen werden. Nach bestimmten Zeitabschnitten (0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 14 h, 18 h, 24 h, 48 h) wurde die Lebendkeimzahl mittels Verdünnungsreihen bestimmt.

11.1.5 Bestrahlungsversuche nach Trocknung

Die Zellen wurden, wie unter II.10.1. beschrieben, unter oxischen Bedingungen bei Raumtemperatur getrocknet. Nach 24-stündiger Trocknung erfolgte die UV-C-Bestrahlung ebenfalls unter oxischen Bedingungen.

11.2 Ionisierende Strahlung

Um Einflüsse von Sauerstoff auszuschließen, wurden die Bestrahlungsexperimente mit ionisierender Strahlung unter anoxischen Bedingungen entweder in anoxischen HPLC-Gefäßen (5 ml, 20 mm Rollrand; WICOM, Heppenheim, Deutschland) oder in anoxischen Serumflaschen durchgeführt.

11.2.1 Röntgenstrahlung

Die Applikation der Röntgenstrahlung erfolgte bei Raumtemperatur in anoxischen HPLC-Gefäßen (Abb. 7 b) am DLR in Köln, Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin, Abteilung Strahlenbiologie. Bei der Röntgenstrahlungsquelle handelt es sich um ein vollgeschütztes Gerät der Marke Gulmay (RS 225, Gulmay Medical Limited, Camberley, England). Um ein definiertes Strahlenspektrum, ohne weiche Strahlung, zu erreichen, wurde die emittierte Röntgenstrahlung mit einem 0,1 mm starken Aluminiumfilter gefiltert. Die Bestrahlung erfolgte in einem Abstand von 20 cm zum Röntgenstrahler (THX 225/G, Tungsten-Anode, 0,8 mm

Beryllium Fenster) bei einer Röhrenspannung von 200 kV und einem Röhrenstrom von 15 mA bei Raumtemperatur. Die Röhre wurde vor der Verwendung vorschriftsmäßig hochgefahren und eingebrannt. Dadurch wurde eine Dosisrate von ca. 20 Gray (Gy) pro Minute erreicht. Zur Dosismessung am Probenort wurde das Messgerät UNIDOS^{webline} (PTW Freiburg GmbH, Freiburg, Deutschland) mit der dazugehörigen Messkammer (Ionisationskammer Typ TM30013) benutzt.

Die Röntgenstrahlung wurde im niedrigeren Dosisbereich bis 5 kGy eingesetzt. Für Bestrahlungen mit höheren Dosen (ab 5 kGy) wurde eine ⁶⁰Co-Quelle verwendet.

11.2.2 ⁶⁰Co-Strahlung

Für den Dosisbereich bis 20 kGy wurde als ionisierende Strahlungsquelle eine ⁶⁰Co-Quelle verwendet. Alle Bestrahlungsexperimente wurden von der Firma BGS (Beta Gamma Service GmbH; Wiehl, Deutschland) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum einen wurden bewachsene Kulturen in Serumflaschen bestrahlt und die Zellen nach der Bestrahlung zur Bestimmung der Überlebensrate verdünnt; zum anderen wurden bereits verdünnte Kulturen (1:10-Verdünnungsschritte) bestrahlt. Bei Organismen aus der Ordnung der Sulfolobales wurde zudem ein möglicher Einfluss des Wachstumssubstrates und des pH-Wertes auf die Überlebensfähigkeit untersucht. Dazu wurden die Zellen auf verschiedenen Wachstumssubstraten (Erz / S°) kultiviert und sowohl im sauren Kultivierungsmedium, als auch nach Neutralisation bestrahlt. Die Neutralisation erfolgte wie bei Beblo *et al.* (2009) beschrieben.

Die zertifizierte Bestrahlung mit ⁶⁰Co (nach DIN EN ISO 9001) und die dazugehörige Dosimetrie (nach DIN EN ISO 13485) erfolgte durch die Firma BGS. Bei den Dosimetern handelt es sich um radiachromische Dosimeterfilme (Far West Technology Inc., Goleta, USA). Die Dosimeterfilme befinden sich während der Bestrahlung am äußersten Punkt des zu bestrahlenden Gutes und verfärben sich durch die Absorption der Strahlung bläulich. Die photometrische Auswertung der Dosimeterfilme erfolgte ebenfalls durch die Firma BGS. Für jede Bestrahlung wurde von der Firma BGS ein Bestrahlungszertifikat über die effektiv applizierte Dosis ausgestellt (siehe Anhang).

12 Wasserstoffperoxidexperimente

12.1 H₂O₂-Exposition (nach Arrage *et al.* 1993 und Benaroudj *et al.* 2001)

Um vergleichbare Ausgangsbedingungen, wie gleiche Zellzahl und gleiche Wachstumsphase der Zellen in den Expositionsansätzen, zu schaffen, wurde eine Vorkultur, wie bei den Bestrahlungsversuchen, 1:10 mit organikfreiem Medium verdünnt. Die H₂O₂-Exposition erfolgte

mit diesen verdünnten Kulturen. Es wurde die Toleranz gegenüber Konzentrationen von 0,1 mM bis 1 M H_2O_2 mit einer Einwirkzeit von 15 min getestet. Um die Reaktion abzustoppen, wurden die exponierten Zellen stark verdünnt, indem eine kleine Menge der exponierten Zellen in ein neues, mit Medium gefülltes Kultivierungsgefäß überführt wurde (1:400).

12.2 Katalaseaktivitätstest (nach Gerhardt et al. 1994)

Um die Aktivität einer potenziellen Katalase nachzuweisen, wurden 60 ml gut bewachsene Kulturmedium zentrifugiert (15650 g; 30 min; Z 36 HK, Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland), der Überstand verworfen und das Pellet in 900 µl PBS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und abermals pelletiert (10 min bei 20800 g; Microzentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und ein Teil des Zellpellets wurde mit einer Impföse auf einen Objektträger aufgebracht. Für den Nachweis der Katalaseaktivität wurden die aufgetragenen Zellen ca. 100 µl einer 3 %-igen wässrigen H_2O_2 -Lösung aufgetropft. Aufsteigende Blasen indizieren Katalaseaktivität ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Als Positivkontrolle wurde der katalasepositive Organismus *B. subtilis* verwendet.

13 Bestimmung der Überlebensraten nach Trocknung, Strahlungsexposition und H_2O_2 -Behandlung

Um das Überleben / die Überlebensrate / die Inaktivierung (S) der Zellen nach Trocknung, Strahlenexposition beziehungsweise H_2O_2 -Behandlung zu bestimmen, wurden die Glasplättchen, die Glasfaserfilterstücke oder die Zellen selbst in Serumflaschen mit dem entsprechenden Medium überführt und mittels Verdünnungsreihen, also der MPN (Most Probable Number)-Technik (Franson 1985) das Überleben / die Überlebensrate / die Inaktivierung bestimmt.

$$\text{Überleben (S)} = N/N_0$$

Bei N handelt es sich um die Anzahl der Überlebenden nach Trocknung / Bestrahlung / H_2O_2 -Behandlung und N_0 ist die Anzahl der lebenden Zellen in der nicht getrockneten / nicht bestrahlten / nicht H_2O_2 -behandelten Probe. Um das Überleben der getrockneten / bestrahlten / H_2O_2 -behandelten Mikroorganismen mit Standardabweichungen angeben zu können, wurden die Versuche zum Teil mehrfach wiederholt, der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung angegeben. Da es sich bei den Verdünnungsreihen um Verdünnungsschritte mit Faktor 10 handelt, sind die Ergebnisse mit deutlichen Schwankungen behaftet.

Das Überleben / die Überlebensrate / die Inaktivierung wurde in halblogarithmischer Darstellung gegen die Zeit (Trocknung), Fluenz (UV-C-Strahlung), Dosis (ionisierende Strahlung), beziehungsweise Molarität (H_2O_2 -Exposition) im Diagramm aufgetragen und das Regressionsverhalten betrachtet. Für die Ermittlung der Kenngröße F_{10} / D_{10} , also die Fluenz / Dosis bei der 10 % der Zellen überleben, wurde nur der exponentielle Teil der Überlebenskurve betrachtet. Dazu wurde eine Regressionsgerade durch die einzelnen Werte der Überlebensrate interpoliert. Die Steigung der Regressionsgeraden ist als Maß für die Inaktivierung der Mikroorganismen bei der jeweiligen Fluenz / Dosis, anzusehen (Harm 1980).

Generell gilt, dass es sich bei den Fluenz / Dosis-Effekt-Kurven strahlenresistenter Mikroorganismen um deutlich „geschulterte“ Kurven handelt. Bei diesen Organismen hat die Strahlung im niedrigen Fluenz / Dosisbereich bis zu einer gewissen Fluenz / Dosis keinen Einfluss (Quasischwellenwert) auf die Überlebensrate und die Kurve zeigt eine ausgeprägte Schulter. Bei strahlensensitiven Organismen hingegen ist die anfängliche Schulter in der Fluenz / Dosis-Effekt-Kurve nicht vorhanden und in der halblogarithmischen Darstellung ist eine lineare Abnahme des Überlebens mit zunehmender Fluenz / Dosis von Anfang an zu erkennen (Kiefer 1989).

14 Verdünnungsreihen

Aufgrund von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der verwendeten Glasfaserfilterstücke kann davon ausgegangen werden, dass sich die Zellen nur schlecht nach der Reaktivierung von den Filterstücken ablösen (Beblo 2006). Da es sich bei den Filtern um Tiefenfilter handelt, besteht die Gefahr, dass die Zellen in tiefere Schichten des Filters eindringen und dort vor Strahlung geschützt sein könnten. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit weitestgehend geschnittene Glasplättchen als Trocknungs- und ausschließlich als Bestrahlungsuntergrund verwendet (Abb. 5 a). Um auszuschließen, dass sich nicht alle Zellen bei der Überführung in ein neues Medium vom Glasplättchen ablösen, wurden sowohl Verdünnungsreihen nach der Reaktivierung erstellt, als auch die Zellen vor dem Aufbringen auf die Glasplättchen verdünnt und in der jeweiligen Verdünnung getrocknet. Nach 24-stündiger Trocknung wurde im ersten Fall das Plättchen überführt und eine Verdünnungsreihe erstellt und im zweiten Fall jedes Glasplättchen separat in eine neue Serumflasche überführt, inkubiert, das Wachstum beobachtet und somit die Überlebensrate bestimmt. Die Ablöseversuche wurden sowohl mit *Tv. ruber* als auch mit *A. aeolicus* durchgeführt. Bei den Trocknungsexperimenten mit Glasfaserfilterstücken wurden die Zellen immer vor der Trocknung verdünnt, die entsprechende Menge der jeweiligen Verdünnungen auf die Glasfaserfilterstücke aufgetragen und jedes Filterstück separat bei der Reaktivierung in eine Serumflasche überführt.

Um äußere Einflüsse wie zum Beispiel eindringenden Sauerstoff während des Überimpfungsvorgangs auszuschließen, wurden zwei verschiedene Arten von Verdünnungsreihen getestet. Standardmäßig wurden Verdünnungsreihen mit 1:10-Verdünnungsschritten durchgeführt (Überimpfen von 2 ml in eine Serumflasche mit 20 ml Medium). Als Varianten wurden Verdünnungsreihen mit einem 1:10-, einem 1:100- und einem 1:1000-Verdünnungsschritt (jeweils in eine neue Serumflasche) erstellt. Aus der 1:1000-Verdünnung wurde abermals 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Durch diese Art der Verdünnungsreihen können die gleichen Verdünnungsstufen wie bei den standardmäßig durchgeführten Verdünnungsreihen erreicht werden. Für diese Verdünnungsreihenexperimente wurden *P. furiosus*-Zellen mit bis zu 100 J/m² (UV-C) bestrahlt, anschließend auf die zwei beschriebenen Arten verdünnt, die jeweilige Überlebensrate bestimmt und miteinander verglichen.

15 Photoproduktanalysen

15.1 Bestrahlung der Kulturen

Um ausreichende DNA-Mengen zu erhalten, wurden für die Photoproduktanalysen 40 ml gut bewachsene Kultur offen in einer Glaspetrischale unter Rühren mit einer deutlich inaktivierenden UV-C-Fluenz (100 J/m², 1000 J/m², 5000 J/m²) bei Raumtemperatur bestrahlt. Die nichtbestrahlte Dunkelkontrolle wurde auf die gleiche Weise behandelt und für die maximale Zeit der Bestrahlung (90 Minuten) offen bei Raumtemperatur gerührt.

Es wurden sowohl anaerobe (*A. fulgidus*, *P. furiosus*) als auch mikroaerophile (*A. pyrophilus*, *H. marinus*, *S. solfataricus*) Mikroorganismen bestrahlt und anschließend die entstandenen Photoprodukte analysiert. Aufgrund der Sauerstoffexposition schlägt der Redoxindikator Resazurin während der Bestrahlung nach Rosa um. Im Vorfeld durchgeführte photometrische Messungen zeigten, dass umgeschlagenes Resazurin bei einer Wellenlänge von 254 nm nicht absorbiert und somit ein protektiver Einfluss von Resazurin während der Bestrahlung ausgeschlossen werden kann.

15.2 Puffer

PBS (pH 7,0)

Substanz	Menge
Na ₂ HPO ₄	7,00 g
K ₂ HPO ₄	3,00 g
NaCl	4,00 g
H ₂ O	ad 1000,0 ml

15.3 Extraktion genomischer DNA

Die bestrahlten Kulturen wurden bei 15650 g für 45 min (Z 36 HK) zentrifugiert, die Pellets in 1 ml PBS resuspendiert und in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden bei -80 °C in PBS bis zur DNA-Isolierung gelagert.

Zur Isolierung genomischer DNA wurde das Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, USA) mit nachfolgenden Abänderungen des Standardprotokolls zur Isolierung genomischer DNA verwendet.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und für 15 min bei 20800 g (Microzentrifuge 5417 R) pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 400 µl Cell-Lysis Solution resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lysozym Lösung (6,6 % (w/v) Lysozym in Cell-Lysis Solution vor der DNA-Isolierung frisch zubereitet) wurden die Ansätze stark gemischt und 30 min bei 37 °C im Heizblock (TB1 Thermoblock, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20800 g (15 min), der Überstand wurde verworfen und 600 µl Nuclei-Lysis-Solution jedem Ansatz zugefügt. Zum kompletten Resuspendieren der Zellpellets wurden die Ansätze 40 sec in der FastPrep (FP120, Bio 101, Thermo Savant; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) gerüttelt. Die Ansätze wurden anschließend 5 min bei 80 °C inkubiert, nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 10 µl der RNase Solution zugefügt, gut gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Proteinfällung wurden 200 µl der Protein-Precipitation-Solution zugegeben, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Weiterhin wurden die Ansätze für 2 min bei 14850 g zentrifugiert, der Überstand wurde in 600 µl Isopropanol, vorgelegt in einem 1 ml Eppendorfreaktionsgefäß, überführt, gemischt und damit die DNA gefällt. Nach Zentrifugation bei 20800 g (15 min) wurde der Überstand verworfen, 600 µl 70 % EthanolLösung zum Waschen der DNA zugegeben und abermals zentrifugiert (15 min, 20800 g). Die EthanolLösung wurde dann möglichst komplett abgenommen und die DNA bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in Eppendorfreaktionsgefäßen für die Photoproduktanalysen mittels HPLC-MS/MS-Chromatographie verschickt.

15.4 HPLC-MS/MS-Chromatographie

Die Qualität und Quantität der DNA-Photoprodukte nach UV-C-Exposition wurde durch HPLC-MS/MS-Chromatographie ermittelt. Die Analysen erfolgten wie bei Douki *et al.* (2002) beschrieben und wurden von Dr. Thierry Douki am CEA (Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Abb. 9 zeigt eine detaillierte Übersicht über den Ablauf der Photoproduktidentifizierung.

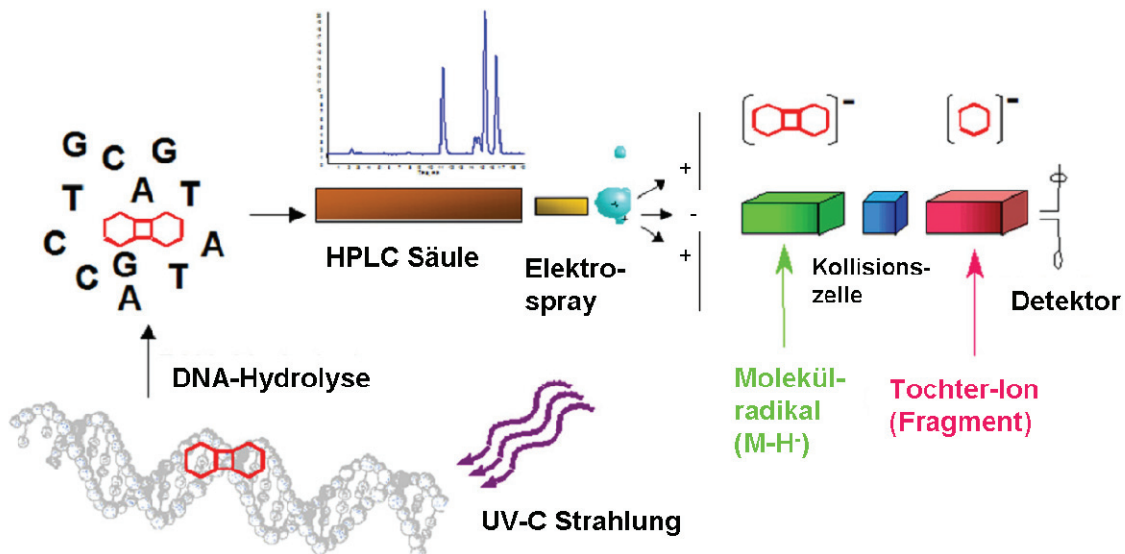


Abb. 8 Aufbau der HPLC-Anlage mit gekoppeltem Tandem-Massenspektrometer (HPLC-MS/MS) und der analytische Prozess zur Identifizierung der UV-induzierten DNA-Photoprodukte. (Schema freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thierry Douki, CEA, Frankreich).

Kurz zusammengefasst wurde dabei die DNA enzymatisch durch Endonukleasen, Exonukleasen und Phosphatasen verdaut. Die Bipyrimidine wurden in Form von Dinukleosid-Monophosphaten auf der HPLC Säule getrennt. Anschließend wurden die DNA-Photoprodukte mittels Massenspektroskopie quantifiziert. Die Daten wurden als Anzahl der Schäden pro 10^4 Basen angegeben.

16 Analyse der kompatiblen Solute

Die Qualifizierung und Quantifizierung der kompatiblen Solute erfolgte durch und in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Erwin Galinski, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Bonn.

Die Bildung kompatibler Solute bei *A. fulgidus* wurde durch eine erhöhte NaCl-Konzentration bei der Kultivierung im Fermenter (siehe auch Tab. 2) induziert. Bei kompatiblen Soluten handelt es sich zum Teil um ein- oder mehrfach geladene Moleküle. Mittels ICP-Messungen sollte das intrazelluläre Gegenion ermittelt werden. Es wurden sowohl Zellen untersucht, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, als auch Zellen, die unter KS-induzierenden Bedingungen im Fermenter kultiviert wurden und die Ergebnisse miteinander verglichen

16.1 NMR-Analysen

Die Analysen der natürlichen ^{13}C -Verteilung in einzelnen zellulären Komponenten, vor allem der kompatiblen Solute und deren Identifizierung wurde mittels NMR durchgeführt.

Die Extraktion polarer Substanzen aus den KS-induzierten gefriergetrockneten *A. fulgidus*-Zellen erfolgte nach Bligh *et al.* (1959) modifiziert durch Galinski (1986). Dazu wurden 2 g Trockenbiomasse mit 15 ml Bligh und Dyer-Lösung (Methanol: Chloroform: Wasser = 10:5:4) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach werden 4 ml Chloroform und 4 ml Wasser zugefügt und weitere 15 min geschüttelt. Die einsetzende Phasentrennung wird durch Zentrifugation unterstützt. Die polare Oberphase (Methanol/ Wasser) wurde abgenommen, im Rotationsverdampfer eingengt und anschließend gefriergetrocknet. Der gefriergetrocknete Zellextrakt (280 mg aus 2 g Trockenbiomasse) wurde in 1 ml D₂O (Deuteriumoxid) aufgenommen und mit 5 mg des internen NMR-Standards Trimethylsilylpropionat (Na-TMSP) versetzt. Als Referenzsubstanzen wurden außerdem je 10 µl Acetonitril und Methanol zugefügt. Die NMR-Messung erfolgte an einem NMR-Spektrometer Bruker Avance 300DPX. Die Messfrequenz betrug 75,46 MHz für den ¹³C-Kanal und 300 MHz für den ¹H-Entkopp-lungskanal. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm WIN-NMR (Bruker).

16.2 HPLC-Analysen

Zur Quantifizierung von DGP wurde die Trennsäule Aminex HPX-87H verwendet, die speziell für die Trennung von organischen Säuren und Kohlenhydraten geeignet ist. Das hydrophobe Säulenmaterial besteht aus einem Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer mit einem Vernetzungsgrad von ca. 8 %, an die Matrix sind H⁺-Ionen gebunden. 0,02 N H₂SO₄ in H₂O_{reinst} diente als Fließmittel. Die Flussrate wurde auf 0,6 ml/min eingestellt und die Elution der Substanzen wurde durch einen Brechungsindex-Detektor verfolgt. Mit Hilfe von Standardsubstanzen konnten die aufgetrennten Substanzen verglichen, zugeordnet und quantifiziert werden. Die HPLC-Apparatur gliederte sich in folgende Bestandteile:

- Pumpe: Spectra System P1000 (Firma Thermo Separation Products; San Jose, Kalifornien, USA)
- Entgaser: SCM Vacuum Membrane Degasser, (Thermo Separation Products, San Jose, Kalifornien, USA))
- Probenaufgabe: Rheodyne Injektor Nr.7125, Probenschleife 20 µl, (Rheodyne Inc. / IDEX Health & Science, Wertheim-Mondfeld, Deutschland)
- Trennsäule: Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm (BioRad, Hercules, USA)
- Detektor: Brechungsindexdetektor refractoMonitor IV (LDC, Milton Roy, Analytical GmbH, Gelnhausen, Deutschland),
- Software: Eurochrom 2000, Version 2.05 (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland)

16.3 ICP-Analysen

Es wurden 250 mg, beziehungsweise 50 mg, nasse *A. fulgidus*-Zellen einer Standardkultivierung und 50 mg, beziehungsweise 10 mg, lyophyllisierter KS-induzierter *A. fulgidus*-Zellen eingesetzt. Eine weitere Probe war ein gefriergetrockneter Zellextrakt (aus 100 mg getrockneter KS-induzierter Zellen). Die Extraktion erfolgte wie unter II.16.2 beschrieben. Die Zellen, beziehungsweise der Zellextrakt, wurden in 10 ml 1 N wässriger HCl gelöst und zum Zellaufschluss, beziehungsweise zum Lösen des Extrakts, ca. eine Stunde mit Ultraschall (Soni-fier 250, Branson, Danbury, USA) und Vortex (Vortex Genie 2 Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA) behandelt.

Die Messung der Standards, des Überstandes der aufgeschlossenen Zellen, beziehungsweise des gelösten Zellextrakts wurden am ICP (JY 70 Plus, Horiba Jobin Yvon GmbH, Unterhaching, Deutschland) unter der Anleitung von Dr. Harald Huber am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Archaeenzentrum an der Universität Regensburg durchgeführt. Die verwendeten Vergleichsstandards und untersuchten Ionen werden in Tab. 4 aufgeführt.

Na ⁺	100 ppm	10 ppm	1 ppm
K ⁺	100 ppm	10 ppm	1 ppm
Mg ²⁺	50 ppm	5 ppm	0,5 ppm
Ca ²⁺	50 ppm	5 ppm	0,5 ppm

Tab. 4 Untersuchte Ionen und verwendete Standards bei den ICP-Messungen.

17 Genomanalysen

Genom-, beziehungsweise Proteinsequenzdaten wurden von National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bezogen. Die Suche nach homologen Genen und Proteinen in den komplett sequenzierten Genomen der verwendeten Mikroorganismen erfolgte, wie bei Klimke *et al.* (2009) beschrieben, durch eine Protein-Cluster-Analyse in der Protein-Cluster-Database.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=proteinclusters&cmd=search>)

III Ergebnisse

1 Trocknungsexperimente

1.1 Verdünnungsreihenexperimente

Die Überlebensraten der verschiedenen Mikroorganismen nach Trocknung wurden mittels Verdünnungsreihen ermittelt. Unabhängig davon ob die Mikroorganismen vor oder nach der Reaktivierung verdünnt wurden, konnte bei *Tc. ruber* und *A. aeolicus* kein Unterschied in den Überlebenswerten der auf Glasplättchen getrockneten Zellen festgestellt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass sich alle Zellen beim Reaktivierungsprozess von den verwendeten Glasplättchen ablösen. Die Zellen befinden sich während der Trocknung bei Raumtemperatur, unter anderem temperaturbedingt wahrscheinlich in einem metabolisch inaktiven Zustand und es ist daher anzunehmen, dass eventuelle Anheftungsprozesse nicht oder nur zu einem geringen Prozentsatz stattfinden konnten. Die Zellen wurden standardmäßig nach dem Reaktivierungsprozess verdünnt.

Eine Ausnahme bildeten die Organismen, die auf Glasfaserfilterstücken getrocknet wurden. Einige der getesteten Organismen zeigten, nur eine Trockentoleranz, wenn sie auf Glasfaserfilterstücken getrocknet wurden: *I. hospitalis* axenisch kultiviert und in Cokultur mit *N. equitans*, *I. pacificus*, *M. barkeri*, *M. mazei*, *M. thermoautotrophicus*. Auf Grund der Tatsache, dass es sich bei den Glasfaserfiltern um Tiefenfilter handelt, muss davon ausgegangen werden, dass sich die Zellen beim Reaktivierungsprozess nicht mehr aus den tieferen Schichten herauslösen lassen. Um dennoch die Überlebensrate nach Trocknung dieser Organismen bestimmen zu können, wurden die Zellen vor dem Aufbringen auf den Filter verdünnt, in den jeweiligen Verdünnungen getrocknet und jedes Filterstück einzeln reaktiviert.

Es war kein Unterschied in der Überlebensrate feststellbar, ob die Zellen auf die standardmäßig verwendeten Weise (1:10-Verdünnungsschritte) verdünnt worden waren oder ob die Zellen zweimal hintereinander 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt worden waren. Ein systematischer Fehler und somit eine Änderung der Überlebensraten durch die Verdünnungsreihen selbst kann somit ausgeschlossen werden. Es wurde daher standardmäßig mit den mehrfachen 1:10-Verdünnungsschritten gearbeitet.

1.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen getrockneter Zellen

Die ultrastrukturelle Beschaffenheit der zur Trocknung verwendeten Glasplättchen wurde im Rasterelektronenmikroskop (SEM) untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Glasplättchen eine, wie erwartet, sehr glatte Oberfläche haben (Abb. 9 a, Pfeil 2). Somit können Beschattungseffekte durch Unebenheiten des Trocknungsuntergrunds ausgeschlossen werden.

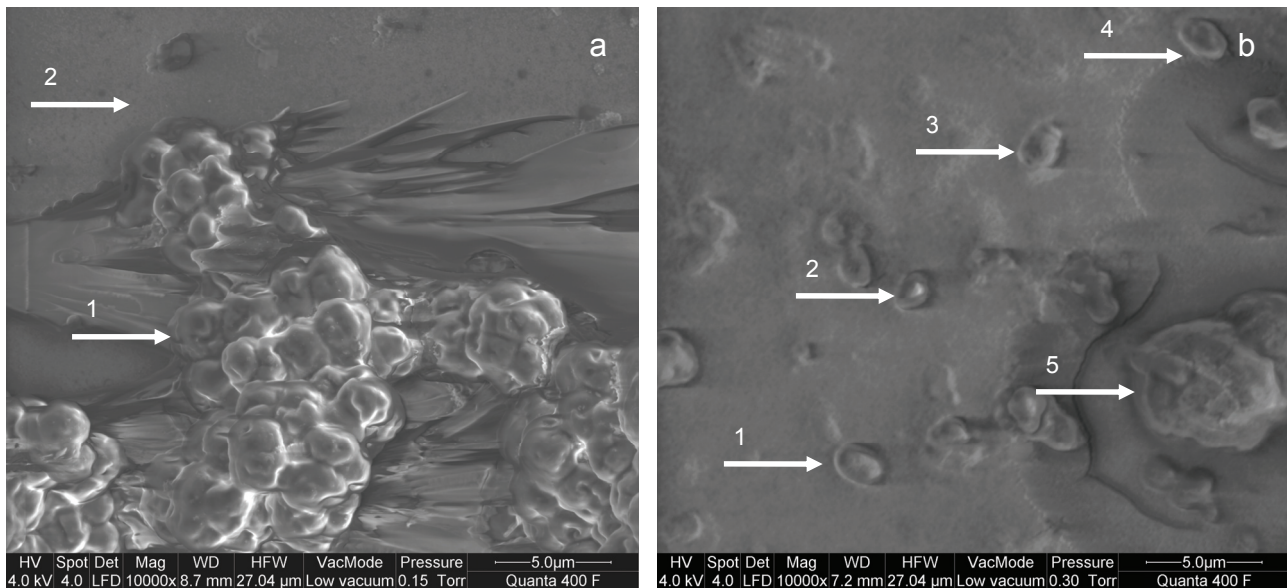


Abb. 9 Rasterelektronenmikroskopische Abbildung getrockneter *M. barkeri*-Zellen (a) und *A. pyrophilus*-Zellen (b) auf Glasplättchen. Dazu wurden die Zellen nicht chemisch fixiert, luftgetrocknet und ohne Metallbedampfung im SEM abgebildet. Pfeil 1 in Abb. 9 a deutet eine sarcina-typische Zellanhäufung an, Pfeil 2 die glatte Oberfläche der Glasplättchen. In Abb. 9 b kennzeichnen die Pfeile 1 bis 4 einzeln liegende Zellen und Pfeil 5 einen Zellklumpen. Detaillierte Erklärungen sind im Text zu finden. Balken (jeweils rechts unten): 5 µm.

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen (Abb. 9 a, b) sind die getrockneten sarcina-typischen Zellanhäufungen von *M. barkeri* (Abb. 9 a, Pfeil 1) und *A. pyrophilus*-Zellen (Abb. 9 b, Pfeil 1 - 5) auf den Glasplättchen zu erkennen. In beiden Fällen sind die chemisch unfixierten Zellen in Medienresten (Schlieren bei *M. barkeri* und Salzkristalle/Salzkruste bei *A. pyrophilus*) auf der sehr glatten Oberfläche der Glasplättchen getrocknet. Die *A. pyrophilus*-Zellen liegen zu ca. 80 % als Einzelzellen vor (Abb. 9 b, Pfeile 1 - 4), zu einem geringen Teil sind die Zellen in „Päckchen“ von Medienresten umgeben, eingetrocknet (Abb. 9 b, Pfeil 5). *A. pyrophilus* wächst in Serumflaschen nur bis zu einer Dichte von ca. 1×10^7 Zellen/ml. Nach dem Aufbringen der Zellen auf die Glasplättchen liegen die Zellen folglich sehr weit voneinander entfernt (pro Glasplättchen werden ca. 250 µl Kultur aufgebracht). Um für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen genügend Zellen auf einem Glasplättchen zu haben, wurden die Zellen mit einem Zentrifugationsschritt (10 min, 20800 g) aufkonzentriert. Daher könnte diese Zentrifugation zu den beobachteten „Päckchenbildungen“ geführt haben könnte, da *A. pyrophilus* in Serumflaschen ausschließlich als Einzelzellen vorlag.

1.3 Überleben nach Trocknung

Es wurden zwanzig Mikroorganismen auf ihre Toleranz gegenüber Trockenheit untersucht. Dabei konnte bei dreizehn eine Toleranz gegenüber Wasserentzug durch Trocknung festge-

stellt werden: *A. fulgidus*, *A. aeolicus*, *A. pyrophilus*, *H. thermophilus*, *H. marinus*, *I. pacificus*, *I. hospitalis*, *M. jannaschii*, *M. barkeri*, *M. thermoautotrophicus*, *T. tenax*, *T. pendens*, *Tv. ruber*. Bei *H. hirschii*, *N. equitans*, *M. mazei*, *P. furiosus*, *P. occultum*, *S. solfataricus* und *Tc. ruber* konnte selbst nach kurzen Trocknungsperioden kein Wachstum nach der Reaktivierung festgestellt werden.

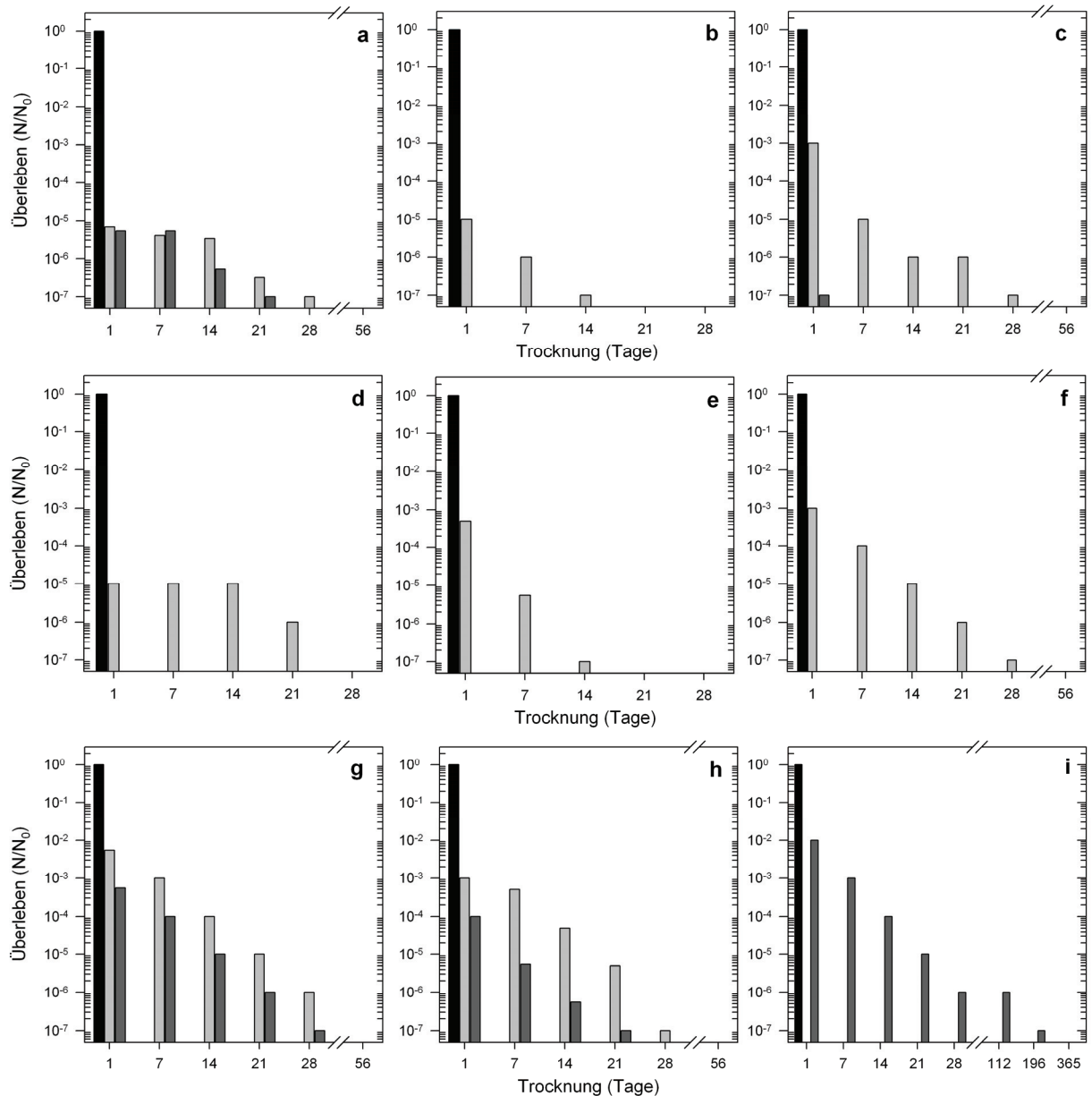


Abb. 10 Überlebensraten von *A. fulgidus* (a), *M. jannaschii* (b), *M. thermoautotrophicus* (c), *T. pendens* (d), *T. tenax* (e), *Tv. ruber* (f), *A. aeolicus* (g), *A. pyrophilus* (h), *H. marinus* (i) nach Trocknung.

Die Organismen wurden unter Standardbedingungen kultiviert (siehe auch Tab. 1). 10^7 Zellen wurden auf die Glasplättchen, beziehungsweise in Verdünnungen auf die Glasfaserfilterstücke aufgetragen und unter oxischen Bedingungen, beziehungsweise anoxischen Bedingungen in der Anaerobenkammer, jeweils bei Raumtemperatur getrocknet (siehe auch Tab. 3).

- Überleben ohne Trocknung
- Überleben nach anoxischer Trocknung und Lagerung
- Überleben nach oxischer Trocknung und Lagerung.

Für die detaillierten Analysen zur Trockentoleranz der getesteten Mikroorganismen wurden die Überlebensraten der meisten Organismen unter oxischen und anoxischen Trocknungsbedingungen ermittelt (Abb. 10 a - i). Es zeigte sich, dass eine deutliche Varianz in der Trockentoleranz der getesteten Spezies, sowohl unter oxischen, als auch unter anoxischen Bedingungen besteht. Diese Varianz lag in einer Größenordnung zwischen einem Tag und 196 Tagen. Bei allen trocken-toleranten Organismen war ein einheitlicher Trend bezüglich der Überlebensraten nach Trocknung zu erkennen. In der ersten Phase des Trocknungsvorgangs kam es zu einem zum Teil sehr starken Absinken der Überlebensrate ($S(1 \text{ Tag}) = 10^{-2}$ bis 10^{-7}). Im weiteren Verlauf der Trocknung nahm die Überlebensrate organismen-abhängig deutlich langsamer ab. Beispielsweise überlebten 1 % der *H. marinus*-Zellen einen Tag Trocknung in Gegenwart von Sauerstoff (*H. marinus* wurde nur unter oxischen Bedingungen getrocknet). Im weiteren Verlauf des Trocknungsexperiments war ein Absinken der Überlebensrate um eine Zehnerpotenz pro Woche zu beobachten. Nach vier Wochen Trocknung überlebten rechnerisch 10 der anfänglich 10^7 Zellen. Überraschenderweise war die Überlebensrate nach 112 Tagen Trockenheit unverändert, nach 196 Tagen Trockenheit lebte noch eine der 10^7 Zellen, nach 365 Tagen konnten keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden (Abb. 10 i).

1.3.1 Trocknung unter oxischen und anoxischen Bedingungen

Die Überlebensrate der getesteten Organismen war stark von der Anwesenheit von Sauerstoff während der Trocknung und der anschließenden Lagerung beeinflusst.

Sowohl die Überlebensraten der mikroaerophilen Organismen, als auch der strikt anaeroben Organismen waren deutlich niedriger, wenn die Zellen während der Trocknung sauerstoffexponiert waren. Die Überlebensrate der beiden mikroaerophilen *Aquifex*-Spezies war unter oxischen Trocknungsbedingungen im Durchschnitt eine Zehnerpotenz niedriger als unter anoxischen Trocknungs- und Lagerungsbedingungen. Dennoch konnte bei beiden Spezies kein Überleben nach 54 Tagen Trocknung festgestellt werden (Abb. 11 g, h). Bei strikt anaeroben Organismen war der Einfluss von Sauerstoff auf die Überlebensrate noch deutlicher. *I. hospitalis*, *I. pacificus*, *M. jannaschii*, *M. thermoautotrophicus*, *T. tenax*, *T. pendens* und *Tv. ruber* waren sehr sensitiv gegenüber Sauerstoffexposition und konnten längere Zeiten der Trockenheit nur unter anoxischen Bedingungen überleben (Abb. 10 b – f, Tab. 5). *M. thermoautotrophicus* überlebte zum Beispiel vier Wochen Trocknung, wenn die Zellen unter anoxischen Bedingungen getrocknet und aufbewahrt wurden, hingegen nur einen Tag in der Gegenwart von Sauerstoff (Abb. 10 c).

Die einzige Ausnahme unter den strikt anaeroben Organismen bildet *M. barkeri*. *M. barkeri* wurde zwar von der Gegenwart des Sauerstoffs in seinem Überleben ähnlich wie die mikro-

aerophilen Mikroorganismen beeinflusst, konnte aber als einziger anaerober Organismus 28 Tage Trockenheit unter oxischen Laborbedingungen überleben (Abb. 11).

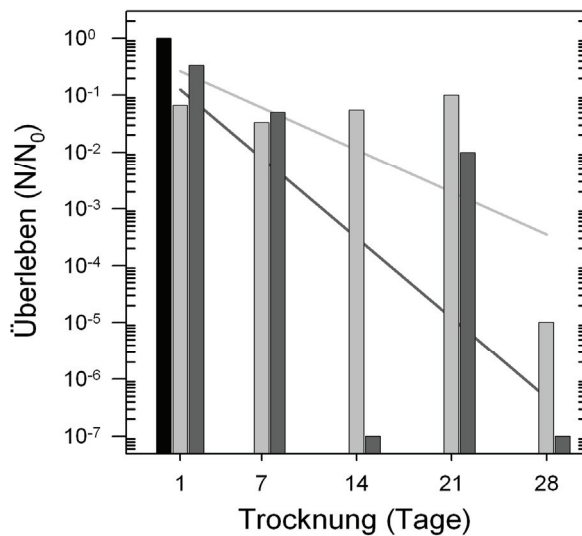


Abb. 11 Überleben von *M. barkeri* getrocknet unter oxischen und unter anoxischen Bedingungen jeweils bei Raumtemperatur (siehe auch Tab. 3).

M. barkeri wurde unter Standardbedingungen kultiviert (siehe auch Tab. 1). 10^7 Zellen wurden auf die Glasfaserfilter aufgetragen.

■ Überleben ohne Trocknung
 □ Überleben nach anoxischer Trocknung und Lagerung
 ■ Überleben nach oxischer Trocknung und Lagerung.

Zur Veranschaulichung der Tendenz der Überlebensraten unter den jeweiligen Bedingungen wurden die Regressionsgeraden in die Abbildung eingefügt.

Nach einem Tag Trocknung ist kein signifikanter Unterschied in den Überlebensraten nach oxischer beziehungsweise anoxischer Trocknung zu sehen. Erst im weiteren Verlauf des Trocknungsexperimentes zeigte sich, veranschaulicht durch die eingefügten Regressionsgeraden, der bereits bekannte Einfluss der Sauerstoffexposition. Zu den starken Schwankungen der Überlebensrate nach oxischer Lagerung sei auf die Diskussion verwiesen.

1.3.2 Trocknung von *H. marinus* im Ultrahochvakuum und im Exsikkator

Da sich *H. marinus* bei den Trocknungsversuchen als sehr trockentolerant herausgestellt hatte, wurde dieser Organismus noch weiteren Trocknungsbedingungen ausgesetzt. Im Hochvakuum wird eine relative Luftfeuchtigkeit von nahezu null erreicht und stellt somit eine extreme Form der Trocknung dar (siehe auch Tab. 3). Im Exsikkator ist die relative Luftfeuchtigkeit sowohl geringer als auch konstanter als unter Laborbedingungen (siehe auch Tab. 3). Die Zellen wurden unter Laborbedingungen getrocknet und anschließend im Exsikkator ($p = 10^5$ Pa) beziehungsweise im Vakuum ($p = 10^{-5}$ Pa) und als Kontrolle unter Laborbedingungen gelagert.

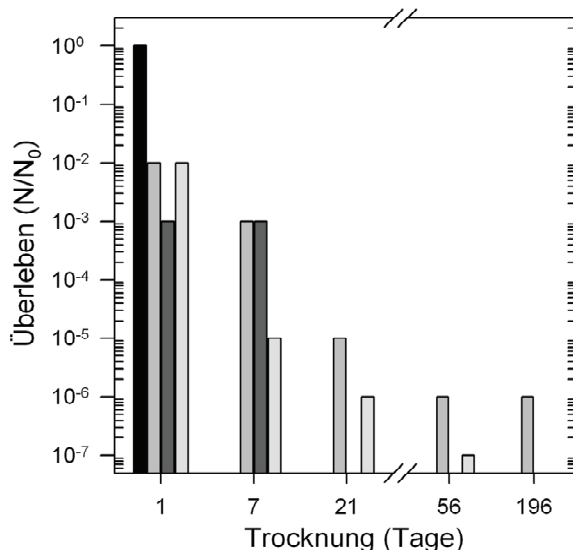


Abb. 12 Überleben von *H. marinus* getrocknet unter Laborbedingungen, im Vakuum und in einem Exsikkator. *H. marinus* wurde unter Standardbedingungen kultiviert (siehe auch Tab. 1). 10^7 Zellen wurden auf die Glasplättchen aufgetragen und bei Raumtemperatur unter oxischen Bedingungen getrocknet (siehe auch Tab. 3).

■ Überleben ohne Trocknung
 □ Überleben nach Trocknung unter Laborbedingungen bei RT
 ■ Überleben nach Trocknung im Vakuum (Vakuumtoleranz wurde nur bis zu sieben Tagen getestet)
 □ Überleben nach Trocknung im Exsikkator.

Die Überlebensrate von *H. marinus* änderte sich nach Lagerung im Ultrahochvakuum, beziehungsweise im Exsikkator, im Vergleich zum Überleben nach Trocknung und Lagerung unter Laborbedingungen kaum. Bei Lagerung in einem Exsikkator war die Überlebensrate durchschnittlich um eine Zehnerpotenz niedriger, verglichen mit der Überlebensrate nach Lagerung unter Laborbedingungen. Die extrem trockene Lagerung von sieben Tagen im Hochvakuum führte im Vergleich zur Lagerung unter Laborbedingungen zu keiner signifikanten Änderung in der Überlebensrate (Abb. 12).

1.4 Wiederholte Trocknung von *H. marinus*

Die Überlebensrate von *H. marinus* änderte sich nach fünf Trocknungs- und Reaktivierungszyklen nicht. Im Durchschnitt überlebte nach jedem Reaktivierungsvorgang 1 % der anfänglichen 10^7 Zellen den ersten Tag der Trocknung. Nach fünf Trocknungs- und Reaktivierungszyklen war die Überlebensrate die gleiche wie am Anfang des Experiments.

1.5 Trocknung von *I. pacificus*, *I. hospitalis* und *I. hospitalis* in Cokultur mit *N. equitans*

Frühere Arbeiten zeigten sowohl einen deutlichen Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Trockentoleranz von *I. hospitalis*, als auch einen leichten Einfluss einer Cokultivierung von *I. hospitalis* mit *N. equitans* (Beblo 2006). Bei *I. pacificus* konnte der Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Trockentoleranz bestätigt werden. Nach Trocknung bei Raumtemperatur und anschließender Lagerung bei -20 °C war die Überlebensrate aller getesteten *Ignicoccus*-Spezies signifikant höher, als bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (Tab. 5). Die Überlebenswerte von *I. hospitalis* und *I. pacificus* ähnelten sich, nach Trocknung unter oxischen und anoxischen Bedingungen, stark (Tab. 5).

		Trocknung (Tage)							
		1	2	3	4	7	14	21	28
<i>I. hospitalis</i>	RT, oxisch	-	-	-	-	-	-	-	-
	-20°C, oxisch	+	-	-	-	-	-	-	-
	RT, anoxisch	+	+	+	+	-	-	-	-
	-20°C, anoxisch	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>I. hospitalis</i> in Cokultur mit <i>N. equitans</i>	RT, oxisch	-	-	-	-	-	-	-	-
	-20°C, oxisch	-	-	-	-	-	-	-	-
	RT, anoxisch	+	+	-	-	-	-	-	-
	-20°C, anoxisch	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>I. pacificus</i>	RT, oxisch	-	-	-	-	-	-	-	-
	-20°C, oxisch	+	-	-	-	-	-	-	-
	RT, anoxisch	+	+	+	-	-	-	-	-

Tab. 5 Überleben von *I. hospitalis*, *I. pacificus* und *I. hospitalis* in Cokultur mit *N. equitans* nach Trocknung.

Die verwendeten Stämme wurden unter Standardbedingungen kultiviert (siehe auch Tab. 1). 10^7 Zellen wurden auf die Glasfaserfilterstücke unter oxischen bzw. anoxischen Bedingungen bei Raumtemperatur aufgetragen und gelagert (siehe auch Tab. 3)

(+) Nach Überführung des Filterstückes in ein neues Medium konnte Wachstum beobachtet werden.

(-) Es konnte kein Wachstum nach Überführung beobachtet werden.

1.6 Einfluss kompatibler Solute auf die Trockentoleranz

Für die Trocknungsexperimente nach KS-Induktion wurden möglichst unterschiedlich trocknungstolerante Organismen ausgewählt: *A. pyrophilus* zeigte eine deutliche Trockentoleranz unter oxischen und anoxischen Bedingungen, *A. fulgidus* zeigte eine weniger ausgeprägte Toleranz gegenüber Trocknung unter oxischen und anoxischen Bedingungen, *T. tenax* war nur nach anoxischer Trocknung und Lagerung trockentolerant und *P. furiosus* überlebte selbst kurze Phasen der Trockenheit nicht.

Um einen eventuellen Einfluss der kompatiblen Solute auf die Trockentoleranz zu untersuchen, wurden die Zellen unter KS-induzierenden Bedingungen kultiviert, getrocknet und die Überlebensrate bestimmt.

1.6.1 *A. pyrophilus*

A. pyrophilus bildet bei einer erhöhten NaCl-Konzentration (4 % NaCl, siehe auch Tab. 2) im Kultivierungsmedium hauptsächlich Glutamatderivate (2,65 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein) und 1-Glycerol-1-*myo*-Inositol-Phosphat (GIP; 1,75 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein) (Lamosa *et al.* 2006). Durch die Induktion und Bildung der für *A. pyrophilus* spezifischen kompatiblen Solute vor der Trocknung kam es im Vergleich zu Zellen, die vor der Trocknung unter Standardbedingungen kultiviert wurden, zu keiner Änderung in der Trockentoleranz. *A. pyrophilus* überlebte mit und ohne kompatible Solute den ersten Tag Trocknung unter oxischen Bedingungen mit einer Überlebensrate $S(1 \text{ Tag}) = 1 \times 10^{-4}$ und unter anoxischen Bedingungen mit einer Überlebensrate von $S(1 \text{ Tag}) = 1 \times 10^{-3}$.

1.6.2 *A. fulgidus*

A. fulgidus bildet bei einer erhöhten NaCl-Konzentration (4,5 % statt 1,8 %, siehe auch Tab. 2) im Kultivierungsmedium 1-1'-Diglycerolphosphat (DGP) ($\sim 1,4 \mu\text{mol}/\text{mg Protein}$) (Martins *et al.* 1997).

Durch die Bildung von DGP kam es bei *A. fulgidus* zu einer signifikanten Änderung der Trockentoleranz. Die Überlebensrate änderte sich nach Bildung von DGP im gesamten Verlauf des Trocknungsexperiments deutlich. Dabei erhöhte sich diese um zwei bis drei Zehnerpotenzen, verglichen mit Zellen, die ohne Induktion von DGP getrocknet wurden (Abb. 13).

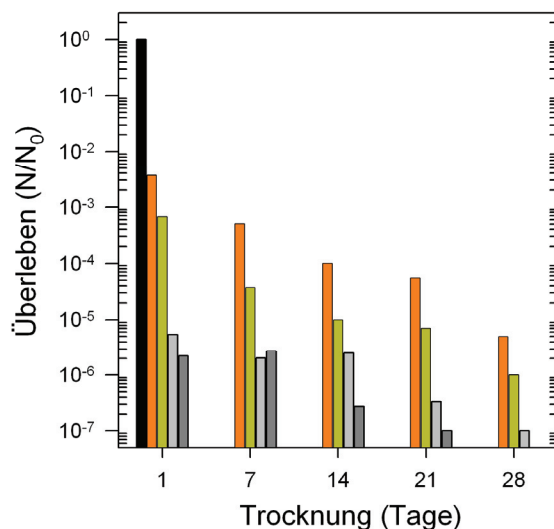


Abb. 13 Einfluss von DGP auf die Trockentoleranz von *A. fulgidus*. Die Zellen wurden entweder unter Standardbedingungen (siehe auch Tab. 1) oder unter hohen Salzbedingungen (siehe auch Tab. 2) vor der Trocknung kultiviert. Es wurden 10^7 Zellen auf die Glasplättchen aufgetragen und bei Raumtemperatur entweder unter oxidischen oder unter anoxischen Bedingungen getrocknet und gelagert (siehe auch Tab. 3).

■ Überleben ohne Trocknung
 ■ Überleben nach anoxischer Trocknung bei 4,5 % NaCl
 ■ Überleben nach oxidischer Trocknung bei 4,5 % NaCl
 ■ Überleben nach anoxischer Trocknung bei 1,8 % NaCl
 ■ Überleben nach oxidischer Trocknung bei 1,8 % NaCl.

Um auszuschließen, dass lediglich die erhöhte Salzmenge im Kultivierungsmedium die Trockentoleranz beeinflussen könnte, wurde einer Kultur, die unter Standardbedingungen kultiviert wurde (1,8 % NaCl), eine entsprechende Menge Natriumchlorid vor der Trocknung zugegeben. Durch die nachträgliche Zugabe von Natriumchlorid kam es zu keiner Änderung der Trockentoleranz im Vergleich zu den Überlebenswerten der Standardkultur. Ein rein physikalischer Schutzeffekt einer dickeren Salzkruste während der Trocknung kann demnach ausgeschlossen werden.

Bei einer erhöhten Kultivierungstemperatur (87 °C) bildet *A. fulgidus* sowohl DGP, als auch Di-*myo*-Inositol-1,1'-(3,3')-Phosphat (DIP) in etwa gleichen Mengen (je $\sim 0,6 \mu\text{mol}/\text{mg Protein}$) (Martins *et al.* 1997). Die Bildung von DGP in Kombination mit DIP führte zu keiner Änderung der Trockentoleranz. Die Überlebensraten lagen, nach Bildung von DGP und DIP, in der gleichen Größenordnung, wie die Überlebenswerte der nicht-induzierten Kontrollen, die unter Standardbedingungen bei 85 °C kultiviert wurden.

Mittels NMR wurden, anhand des natürlichen ^{13}C -Vorkommens, die von *A. fulgidus* gebildeten Komponenten nach Kultivierung in einem Fermenter mit erhöhter NaCl-Konzentration qualifiziert (Abb. 14).

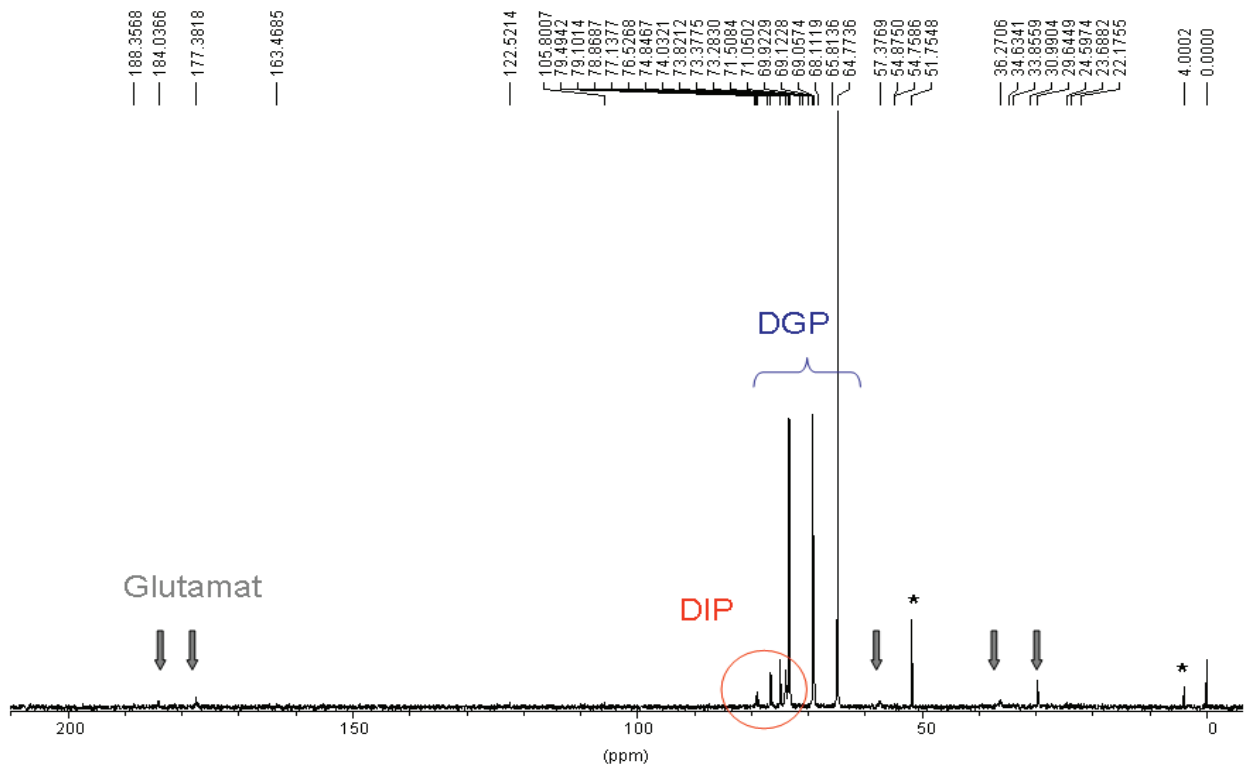


Abb. 14 Natürliche Häufigkeit von ^{13}C (in D_2O) im *A. fulgidus*-Zellextrakt.

Kultivierung erfolgte bei 85 °C unter KS-induzierenden Bedingungen durch eine erhöhte Salzkonzentration im Kultivierungsmedium.

Sterne (*) kennzeichnen den internen Standard. Graue Pfeile deuten das Vorkommen von Glutamat an, Di-*myo*-Inositol-1,1'-(3,3')-Phosphat (DIP) ist durch einen roten Kreis hervorgehoben. Die drei großen Peaks stellen 1-1'-Diglycerolphosphat (DGP) dar.

Im Zellextrakt wurde DGP, wie schon bei Martins *et al.* (1997) beschrieben, als die dominierende Komponente identifiziert. Mengenmäßig absolut untergeordnete Rollen spielen DIP und Glutamat.

Die gleichzeitig durchgeführte Quantifizierung mittels HPLC ergab eine Menge von 688 mM DGP in 280 mg trockenem Extrakt. Dies entspricht einer Menge von 98 mg DGP pro Gramm Trockengewicht.

Bei DGP handelt es sich um ein geladenes Molekül, wobei die Ladung in der Zelle durch die Akkumulation eines Gegenions ausgeglichen wird. Mittels ICP-Messungen einer wässrigen Lösung aufgeschlossener Zellen wurde das entsprechende Gegenion ermittelt.

Wie aus Tab. 6 zu entnehmen, führte die KS-Induktion zu einem leichten Anstieg des Natriums, dabei handelt es sich um einen artifiziellen Effekt, da die KS-Induktion durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration im Kultivierungsmedium vollzogen wird. Bei dem gemessenen Natrium handelt es sich um das Na^+ , das sich im Medium befindet. Bei Kalium war durch die NaCl-bedingte KS-Induktion ein signifikanter Anstieg um fast das Vierfache zu erkennen (Tab. 6). Ein artifizieller Effekt durch das Medium kann, auf Grund der geringen Konzentration an K^+ im Medium, ausgeschlossen werden. Sowohl die Menge an Magnesium,

als auch an Calcium sank nach der KS-Induktion leicht. Die gemessenen Ionen-Mengen im Zellextrakt zeigten eine ähnliche Verteilung, wobei wohl bei der Extraktion ein Teil der Ionen verloren gegangen ist.

	Na ⁺ in ppm	K ⁺ in ppm	Mg ²⁺ in ppm	Ca ²⁺ in ppm
5 g Zellen (trocken) aus Standardkultivierung	143	39	39	21
./.. Medium Standard	100	2	30	1
Ergebnis (netto) Standardkultivierung	43	37	9	20
5 g Zellen (trocken) nach KS-Induktion	180	153	23	8
./.. Medium KS-Induktion	200	2	30	1
Ergebnis (netto) nach KS-Induktion	0	151	0	7
Differenz (= Menge Gegenion zu DGP)	0	114	0	0
pro Gramm Trockengewicht (mg/ g)		23		

Tab. 6 Ergebnisse der ICP-Messungen.

Aus dem Molekulargewicht von DGP⁻ (245,13 g/mol) und K⁺ (39,09 g/mol) ergibt sich ein theoretisches Verhältnis von DGP zu K⁺ von 100:16. Bei den HPLC-Messungen wurde eine Menge von 98 mg/ g TG bestimmt, so ergab sich zusammen mit den ICP-Messungen ein Verhältnis von 100:24. Die von Martins *et al.* (1997) ermittelten Werte (~ 1,45 µmol/ mg Protein entspricht ~ 360 µg/ mg Protein entspricht ~ 180 µg/ mg trockene Zellen) führen zu einem Verhältnis von 100:13. Wie auch in Abb. 15 erkennbar, muss es sich um ein K⁺-Ion pro DGP-Molekül als Gegenion handeln und K⁺ wird zusätzlich in der Zelle akkumuliert.

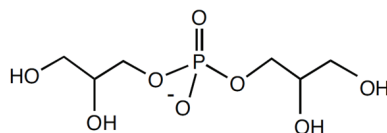


Abb. 15 Strukturformel von einfach negativ geladenem α-Diglycerolphosphat (nach Robert 2005).

1.6.3 *P. furiosus*

P. furiosus bildet bei einer erhöhten Salzkonzentration im Kultivierungsmedium (5,0 % statt 2,7 % NaCl, siehe auch Tab. 2) ungefähr 0,4 µmol/ mg Protein DIP und 1,1 µmol/ mg Protein 2-O-β-Mannosylglycerat. Bei einer erhöhten Wachstumstemperatur wird ausschließlich DIP (2,1 µmol/ mg Protein) gebildet (Martins *et al.* 1995).

Weder die erhöhte NaCl-Konzentration, noch die erhöhte Wachstumstemperatur führten zu einer Änderung der Trockentoleranz. *P. furiosus* zeigte unter keinen Bedingungen Wachstum nach kurzen Trocknungsperioden.

1.6.4 *T. tenax*

T. tenax bildet unter Salzstress (0,2 % statt 0 % NaCl; siehe auch Tab. 2) 0,3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein Trehalose (Martins *et al.* 1997). Durch die Bildung von Trehalose vor der Trocknung änderte sich das Überleben von *T. tenax* nach Trocknung nicht. Mit und ohne kompatiblen Soluten konnte *T. tenax* Perioden der Trockenheit nur unter anoxischen Bedingungen überleben und wurde dabei nach 24-stündiger Trocknung um einen Faktor von ca. $S(1 \text{ Tag}) = 10^{-4}$ inaktiviert (siehe auch Abb. 10).

1.6.5 Zugabe von DGP vor der Trocknung

Das kompatible Solut DGP schien bei *A. fulgidus* eine wichtige Rolle bei der Trockentoleranz zu spielen. Durch eine Zugabe von DGP kam es aber zu keiner Änderung in der Trockentoleranz von *A. fulgidus* im Vergleich zu den Zellen, die ohne Zugabe von DGP getrocknet wurden. Hierzu wurde DGP sowohl vor der Kultivierung, als auch in einem Parallelversuch fünf Stunden vor der Trocknung den Kultivierungsansätzen zugegeben. Dabei wurde DGP im 20-fachen Überschuss, verglichen zur unter Salzstress gebildeten Menge an DGP, zugegeben.

Auch bei *A. pyrophilus*, *T. tenax* und *P. furiosus* führte die Zugabe von DGP zu keiner Änderung der Trockentoleranz im Vergleich zu Zellen die ohne DGP-Zugabe getrocknet wurden.

2 Strahlungsexperimente

2.1 UV-C-Strahlung

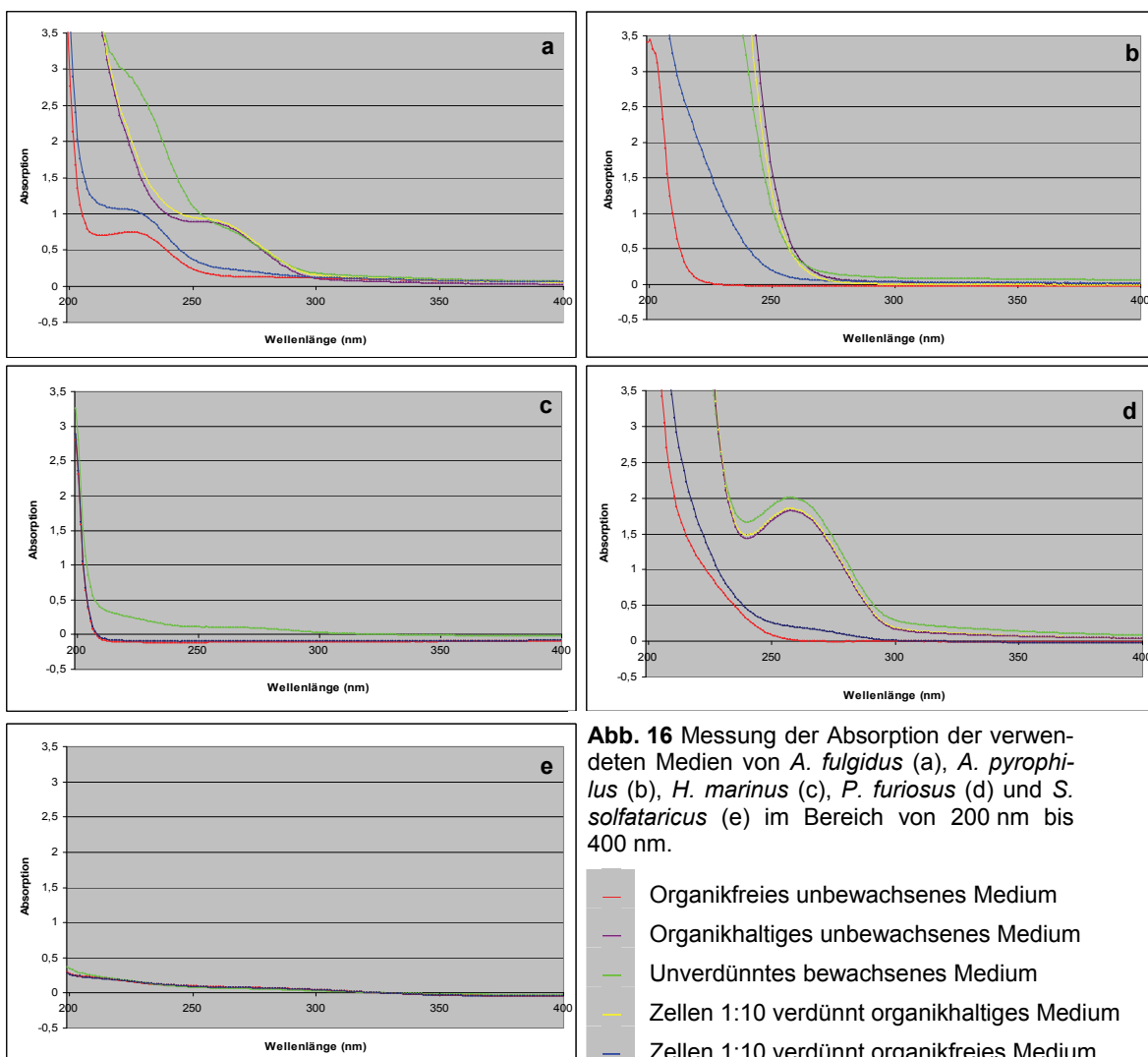
Untersuchungen zur Strahlentoleranz von *D. radiodurans* zeigen einen potenziellen Zusammenhang zwischen der Trockentoleranz und hohen Strahlentoleranz von *D. radiodurans* (Mattimore *et al.* 1996, Pogoda De la Vega 2004). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Trockentoleranz und Strahlentoleranz der hier getesteten Organismen ermitteln zu können, wurden im Folgenden möglichst unterschiedlich trockentolerante Organismen mit monochromatischer UV-C-Strahlung behandelt. Es wurden sowohl Mikroorganismen, die sich als trockentolerant herausgestellt haben (*A. pyrophilus*, *A. aeolicus*, *A. fulgidus*, *H. marinus*, *I. hospitalis*, *I. pacificus*, *M. sedula* (auf S° oder auf Knallgas kultiviert), *M. jannaschii*, *M. barkeri*, *M. thermoautotrophicus*, *S. metallicus*, *T. tenax*, *T. pendens*) mit monochromatischer UV-C-Strahlung behandelt, als auch Organismen, die bereits nach kurzen Perioden der Trockenheit kein Überleben zeigten (*M. mazei*, *N. equitans* in Cokultur mit *I. hospitalis*, *P. furiosus*, *S. solfataricus* (auf S° oder auf Knallgas kultiviert)).

Obwohl das Überleben aller genannten Organismen nach Bestrahlung mit UV-C untersucht wurde, wurden einige, in der Trockentoleranz möglichst unterschiedliche, Modellorganismen aus der Liste aller getesteten Mikroorganismen herausgesucht, anhand derer das Überleben im Detail untersucht werden sollte. Bei diesen Modellorganismen handelt es sich um die bakteriellen Vertreter *A. pyrophilus* und *H. marinus*, beziehungsweise um die archaeellen Vertreter *A. fulgidus*, *P. furiosus* und *S. solfataricus*.

2.1.1 Bestrahlung in Flüssigkeit

2.1.1.1 Eigenabsorption der Kultivierungs- und Bestrahlungsmedien

UV-C-Strahlung wird durch eine Vielzahl von Substanzen, aber auch von biologischem Material absorbiert. Um Absorptionen durch das Medium oder Medienbestandteile auszuschließen, wurden alle unbewachsenen Medien, bewachsene Kulturen und die entsprechenden Verdünnungen der Zellen auf ihre Absorption hin photometrisch in Quarzküvetten untersucht. Beispielhaft sind die Absorptionskurven der Modellorganismen gezeigt (Abb. 16).



Bei der für UV-C-Bestrahlungsexperimente verwendeten Wellenlänge von 254 nm absorbieren alle analysierten organikfreien nicht bewachsenen Medien vernachlässigbar (Abb. 16, jeweils rote Linie). Zur Minimierung von Selbstbeschattungseffekten, bedingt zum Beispiel durch eine hohe Zelldichte, wurden ausschließlich 1:10-Verdünnungen (im jeweiligen organikfreiem Medium) für die Bestrahlungsexperimente verwendet (Abb. 16, jeweils blaue Linie). Es ist demnach davon auszugehen, dass es durch das Medium kaum zur Absorption kommt. Die applizierte, homogene Strahlung sollte nur durch die Zellen selbst absorbiert werden und dort die gewünschten Effekte erzielen.

2.1.1.2 Überleben der Modellorganismen nach UV-C Bestrahlung

Im Folgenden wurde das Überleben der Modellorganismen (*A. pyrophilus*, *A. fulgidus*, *H. marinus*, *P. furiosus*, *S. solfataricus*) nach UV-C-Bestrahlung im jeweiligen nicht absorbierendem organikfreien Medium unter anoxischen Bedingungen in UV-C-durchlässigen Quarzküvetten untersucht.

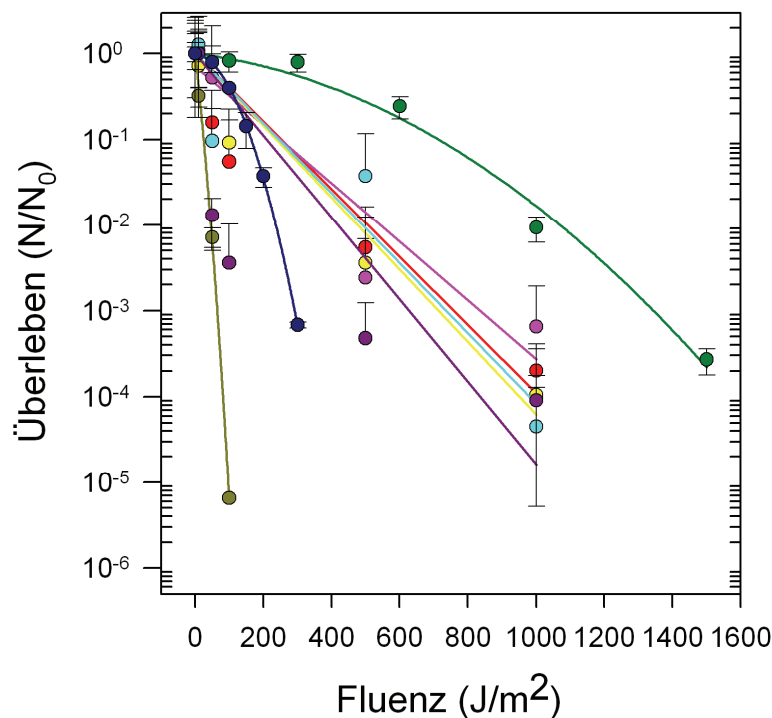


Abb. 17 Übersicht über die Überlebensraten der Modellorganismen im Vergleich mit Überlebensraten von anderen Beispielorganismen im Fluenzbereich bis 1600 J/m² ($n \geq 3$).

● *D. radiodurans*, ● *A. pyrophilus*, ● *P. furiosus*, ● *A. fulgidus*, ● *H. marinus*, ● *S. solfataricus*, ● *B. subtilis* (Sporen), ● *B. subtilis* (vegetative Zellen)

Überlebenswerte von *D. radiodurans* und *B. subtilis* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Anja Bauermeister (DLR, Köln) und Marko Waßmann (DLR, Köln).

Alle getesteten Organismen überlebten mit einer deutlichen Inaktivierung eine UV-C-Exposition im Fluenzbereich bis 1000 J/m² (Abb. 17). Auffällig war dabei, dass sich die

Überlebensraten nach Bestrahlung mit 1000 J/m^2 in einer Größenordnung bei ca. $S(1000 \text{ J/m}^2) = 10^{-3}$ bis 10^{-4} befinden. Dies war nicht nur der Fall für die hier gezeigten Modellorganismen (*A. fulgidus*, *A. pyrophilus*, *H. marinus*, *P. furiosus*, *S. solfataricus*), sondern auch für fast alle anderen getesteten Organismen (*A. aeolicus*, *M. jannaschii*, *M. thermoautotrophicus*, *S. metallicus*, *M. sedula*, *I. hospitalis*, *I. pacificus*, *T. tenax*, *T. pendens*, *M. barkeri*, *M. mazei*). Einzige Ausnahme bildete *N. equitans*: nur im sehr niedrigen Fluenzbereich bis 10 J/m^2 waren nach der Bestrahlung in den niedrigen Verdünnungen an *I. hospitalis* anhaftende *N. equitans*-Zellen vorhanden. Bei höheren Fluenzen ab 50 J/m^2 waren in keinem Ansatz *N. equitans*-Zellen mehr auffindbar. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass sich die Überlebensrate von *I. hospitalis* nach UV-C-Bestrahlung nicht änderte, wenn *I. hospitalis* axenisch oder in Cokultur mit *N. equitans* kultiviert wurde. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich die Modellorganismen im Überleben nach UV-C-Bestrahlung kaum voneinander unterscheiden lassen. Es ist nur ein genereller Unterschied zwischen den getesteten Organismen und dem, im Vergleich zu den untersuchten Mikroorganismen, strahlensensitiven Bakterium *B. subtilis*, sowohl als vegetative Zelle, als auch als Spore und dem strahlenresistenten Bakterium *D. radiodurans* zu sehen (Abb. 17).

Im Folgenden wurde das Überleben der Modellorganismen im niedrigeren Fluenzbereich (bis 100 J/m^2) einer detaillierten Analyse unterzogen.

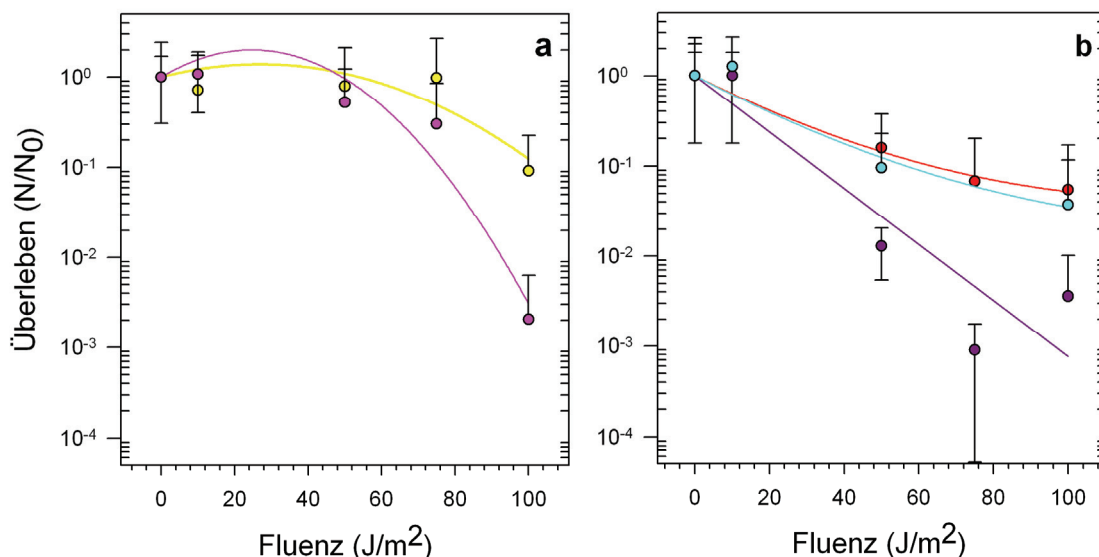


Abb. 18 Überleben der Modellorganismen nach UV-C-Bestrahlung im Fluenzbereich bis 100 J/m^2 ($n \geq 3$).

a: *A. fulgidus* (●), *P. furiosus* (●)

b: *A. pyrophilus* (●), *H. marinus* (●) und *S. solfataricus* (●).

Anhand der Überlebenskurven nach Bestrahlung mit UV-C ließen sich die untersuchten Modellorganismen in zwei deutlich unterscheidbare Gruppen aufspalten: *A. fulgidus* und *P. furiosus* zeigten eine typisch geschulterte Fluenz-Effekt-Kurve (Abb. 18 a). Bei *A. pyrophilus*,

H. marinus und *S. solfataricus* fehlte die Schulter in der Überlebenskurve und es war eine nahezu lineare Abnahme des Überlebens im getesteten Fluenzbereich zu erkennen (Abb. 18 b).

Aus den Überlebenswerten wurden die F_{10} -Werte der Modellorganismen berechnet (Tab. 7).

Organismen	Errechnete F_{10} -Werte (UV-C)
<i>A. fulgidus</i>	108 J/m ²
<i>P. furiosus</i>	64 J/m ²
<i>A. pyrophilus</i>	63 J/m ²
<i>H. marinus</i>	67 J/m ²
<i>S. solfataricus</i>	37 J/m ²

Beispielorganismen	F_{10} -Werte (UV-C)
<i>B. subtilis</i> (vegetativ)	40 J/m ² (Newcombe <i>et al.</i> 2005)
<i>B. subtilis</i> (Spore)	100 J/m ² (Riesenman <i>et al.</i> 2000)
<i>E. coli</i>	40 J/m ² (Arrange <i>et al.</i> 1993)
<i>D. radiodurans</i>	660 J/m ² (Bauermeister <i>et al.</i> 2009)
<i>Halobacterium salinarum</i>	280 J/m ² (Shahmohammadi <i>et al.</i> 1998)
<i>Thermococcus stetteri</i>	30 J/m ² (Kopylov <i>et al.</i> 1993)
<i>Thermotoga maritima</i>	10 J/m ² (Kopylov <i>et al.</i> 1993)

Tab. 7 Errechnete F_{10} -Werte der Modellorganismen nach UV-C-Bestrahlung. Ergänzend Literaturwerte mehrerer Beispielorganismen.

2.1.1.3 Teilungsverhalten nach UV-C-Bestrahlung

Um einen Eindruck darüber zu erlangen, wie lange die Zellen nach einer UV-C-Bestrahlung benötigen, entstandene Schäden zu reparieren, wurden die Organismen mit verschiedenen Fluenzen bestrahlt und im Anschluss das Teilungsverhalten mittels Lebendkeimzahlbestimmung beobachtet.

Es war ein deutlicher Einfluss der UV-C-Bestrahlung, entsprechend der applizierten Fluenz, auf die absolute Lebendkeimzahl von *A. pyrophilus*, *A. fulgidus*, *H. marinus* und *P. furiosus* zu erkennen. Es war zu sehen, dass eine Bestrahlung im niedrigen Fluenzbereich bis 10 J/m² nahezu keinen Einfluss auf die Zellzahl hat. Die braune Kurve (0 J/m², nicht bestrahlte Dunkelkontrolle) und die orange Kurve (10 J/m²) liegen dicht beieinander (Abb. 19 b, c) oder aufeinander (Abb. 19 a, d). Nach den Bestrahlungsexperimenten wurden in allen Fällen 10⁶ Zellen übertragen und diese 10⁶ Zellen blieben im gesamten Verlauf des jeweiligen Experiments teilungsfähig (braune, beziehungsweise orange Kurve bleibt im Bereich der experimentellen Schwankungen auf einem Level). Dennoch ist zu erkennen, dass je nach Bestrahlungsstärke weniger lebende Zellen vorhanden waren. Nach einer Bestrahlung mit 1000 J/m² ist die absolute Zellzahl bei allen vier getesteten Organismen in einem Bereich

von S (1000 J/m^2) = 10^1 bis 10^2 lebenden Zellen. Nach der Bestrahlung fingen die Zellen höchstwahrscheinlich im Laufe der Inkubation an, die entstandenen Schäden zu reparieren. Dabei war eine Vermehrung der Zellen zu beobachten, die sich durch das Ansteigen der absoluten Lebendkeimzahl widerspiegelte (Abb. 19 a - d). Im weiteren Verlauf des Experimentes, also mit steigender Inkubationszeit stieg die absolute Lebendkeimzahl der organismen-spezifischen Verdopplungszeit entsprechend schnell an, bis die stationäre Phase der Wachstumskurve erreicht war (bei *A. pyrophilus*, *H. marinus* und *P. furiosus* nach 12 bis 14 Stunden; bei *A. fulgidus* entsprechend der längeren Verdopplungszeit später nach ca. 30 Stunden).

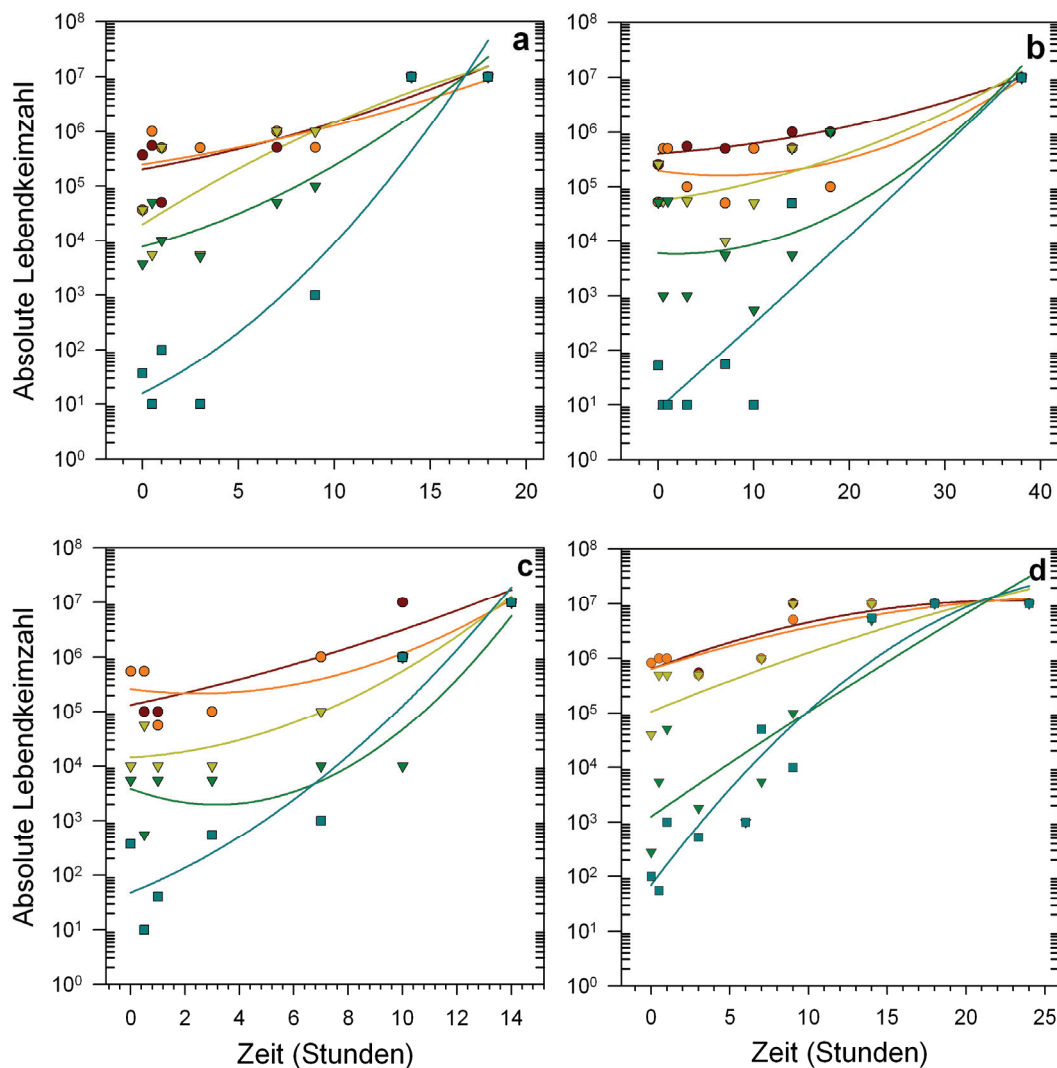


Abb. 19 Absolute Lebendkeimzahl nach UV-C Bestrahlung von *A. pyrophilus* (a), *A. fulgidus* (b), *H. marinus* (c) und *P. furiosus* (d) ($n = 2$).

● 0 J/m^2 (DK), ● 10 J/m^2 , ▼ 50 J/m^2 , ▼ 100 J/m^2 , ■ 1000 J/m^2 .

2.1.2 Photoproduktinduktion und Proteinquervernetzung

Die Qualität und Quantität der DNA-Photoprodukte nach UV-C-Exposition mit variierenden Fluenzen wurde mittels HPLC/MS-MS Analysen untersucht. Es wurden die Photoprodukt-Induktionswerte aller oben erwähnten Modellorganismen, also sowohl die der bakteriellen Vertreter (*A. pyrophilus*, *H. marinus*), als auch der drei Archaeen (*A. fulgidus*, *P. furiosus*, *S. solfataricus*) analysiert.

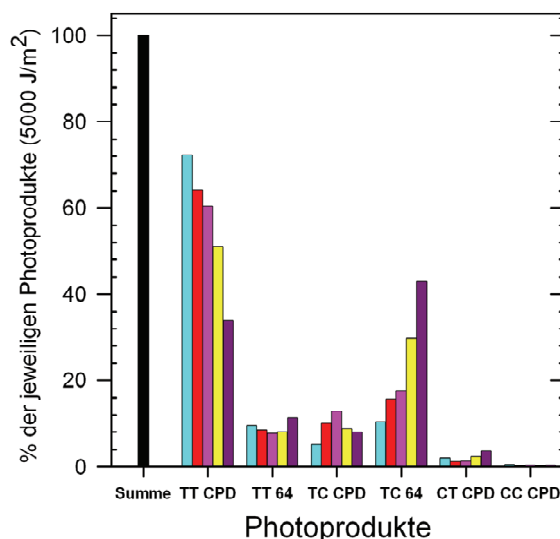


Abb. 20 Qualifizierung und Quantifizierung der DNA-Photoprodukte verschiedener Organismen nach einer Bestrahlung mit 5000 J/m² UV-C.

■ Summe der jeweiligen organismusspezifischen DNA-Photoprodukte nach Bestrahlung mit 5000 J/m²
 ■ *H. marinus*
 ■ *A. pyrophilus*
 ■ *P. furiosus*
 ■ *A. fulgidus*
 ■ *S. solfataricus*

TT CPD: Thymin-Thymin-Cyclobutan-Pyrimidindimer; TT 64: Thymin-Thymin-6-4-Pyrimidinpyrimidondimer; TC CPD: Thymin-Cytosin-Cyclobutan-Pyrimidindimer; TC 64: Thymin-Cytosin-6-4-Pyrimidinpyrimidondimer; CT CPD: Cytosin-Thymin-Cyclobutan-Pyrimidindimer; CC CPD: Cytosin-Cytosin-Cyclobutan-Pyrimidindimer.

Nach UV-C-Bestrahlung mit 5000 J/m² wurden bei allen Organismen zwei Hauptphotoprodukte Thymin-Thymin-Cyclobutan-Pyrimidindimer (TT CPD) und Thymin-Cytosin-6-4-Pyrimidinpyrimidondimer (TC 64) gebildet und konnten mittels HPLC/MS-MS identifiziert werden (Abb. 20). Die jeweilige Menge der Hauptphotoprodukte variiert von Organismus zu Organismus stark. Bei *H. marinus*, *A. pyrophilus*, *P. furiosus* und *A. fulgidus* ist TT CPD das meistgebildete Photoprodukt, gefolgt von TC 64. Bei *S. solfataricus* war das Verhältnis der beiden Hauptphotoprodukte umgekehrt: nach einer Bestrahlung mit 5000 J/m² wurde TC 64 am meisten gebildet und TT CPD stand mengenmäßig an zweiter Stelle. Alle anderen Photoprodukte (Thymin-Cytosin-Cyclobutan-Pyrimidindimer (TC CPD), Thymin-Thymin-6-4-Pyrimidinpyrimidondimer (TT 64), Cytosin-Thymin-Cyclobutan-Pyrimidindimer (CT CPD), Cytosin-Cytosin-Cyclobutan-Pyrimidindimer (CC CPD)) spielten bei allen untersuchten Organismen eine untergeordnete Rolle.

Im Folgenden wurde eine potenzielle Abhängigkeit der Photoprodukt-Verteilung zur applizierten Fluenz untersucht. Dabei wurden die DNA-Photoprodukte nur von *H. marinus* und *S. solfataricus* detailliert analysiert.

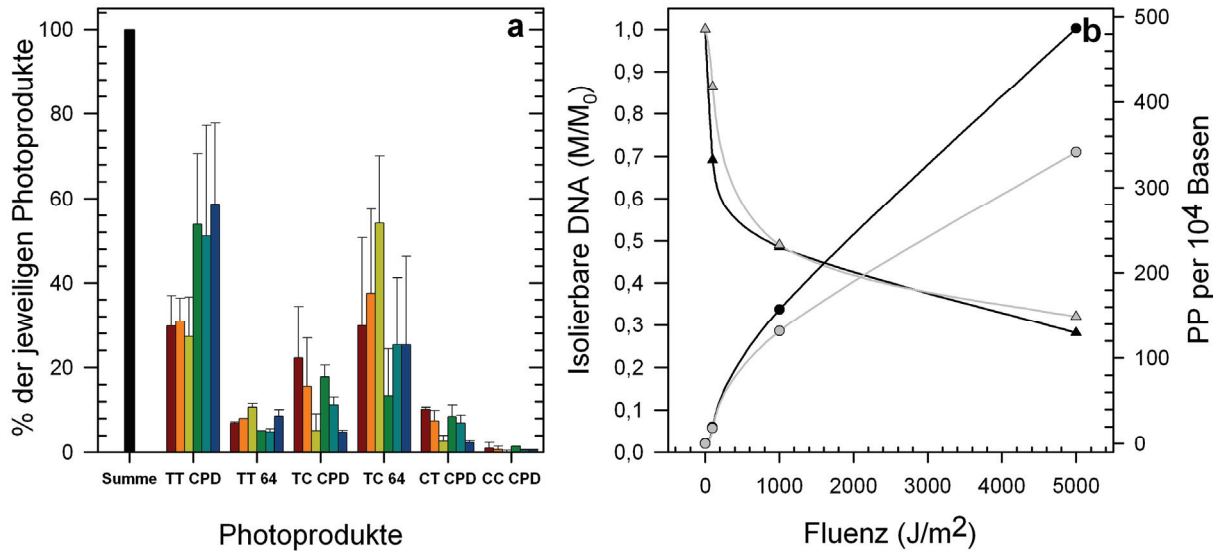


Abb. 21 Qualifizierung und Quantifizierung der DNA-Photoprodukte und der isolierbaren Menge an DNA nach Bestrahlung mit verschiedenen Fluenzen UV-C-Strahlung.

a: Verteilung der DNA-Photoprodukte nach Bestrahlung mit verschiedenen Fluenzen.

■ Summe der gemessenen organismus-spezifischen DNA-Photoprodukte

■ 100 J/m², ■ 1000 J/m², ■ 5000 J/m² (*S. solfataricus*)

■ 100 J/m², ■ 1000 J/m², ■ 5000 J/m² (*H. marinus*)

b: Isolierbarer DNA nach Bestrahlung. M ist die isolierbare Menge an DNA aus 40 ml bestrahlter Kultur, M₀ ist die isolierbare Menge an DNA aus 40 ml Kultur der Dunkelkontrolle. (△ *H. marinus*, ▲ *S. solfataricus*). Absolute Menge an DNA-Photoprodukten nach UV-C-Bestrahlung pro 10⁴ Basen (○ *H. marinus*, ● *S. solfataricus*).

Sowohl bei *H. marinus*, als auch bei *S. solfataricus* waren nach Bestrahlung mit verschiedenen Fluenzen die zwei Hauptphotoprodukte (TT CPD und TC 64) zu finden. Die Menge an gebildeten TT CPD war dabei fluenzunabhängig und blieb über die verschiedenen Fluenzen hin weitestgehend gleich und machte bei *S. solfataricus* ca. 30 % und bei *H. marinus* 55 % aller entstandenen DNA-Photoprodukte aus. Die Bildung von TC 64 scheint hingegen fluenzabhängig zu sein und die gebildete Menge stieg bei beiden Organismen proportional zur applizierten Fluenz an. Das dritthäufigste Photoprodukt bildete bei beiden Organismen TC CPD, das vor allem bei niedrigeren Fluenzen vermehrt gebildet wird. Ungefähr in gleichen Mengen wurde TT 64 und CT CPD bei beiden Organismen nachgewiesen. CC CPD wurde sowohl bei *S. solfataricus*, als auch bei *H. marinus*, fluenzunabhängig nur zu ca. 1 % gebildet (Abb. 21 a).

Neben der Qualität und Quantität der entstandenen DNA-Photoprodukte, wurde bei den HPLC/MS-MS-Analysen auch die DNA-Menge in den jeweiligen Proben untersucht (Abb. 21 b). Auffällig war dabei, dass aus der identischen Menge (40 ml) bestrahlter Kultur mit steigender Fluenz immer weniger DNA isolierbar war. Diese Tatsache spricht dafür, dass durch die Bestrahlung mit UV-C nicht nur die erwähnten DNA-Photoprodukte entstanden sind, sondern, dass die Strahlung auch andere Effekte ausgelöst hat, die zur Verringerung der isolierbaren DNA-Menge führten. Da die absolute Zahl der DNA-Photoprodukte mit der Menge der analysierten DNA korreliert (Photoprodukte pro 10⁴ Basen), ist davon auszuge-

hen, dass die absolute Zahl der DNA-Photoprodukte noch höher liegen müsste, als sie in den vorliegenden Analysen ermittelt wurde. Dadurch wäre ein erwarteter linearer Anstieg zwischen Fluenz und absoluter Anzahl der DNA-Photoprodukte vorhanden (Peak *et al.* 1991). Ob es sich bei dem Unterschied in der absoluten Zahl der DNA-Photoprodukte (*S. solfataricus*: 486 Photoprodukte in 10^4 Basen; *H. marinus*: 342 Photoprodukte pro 10^4 Basen, Abb. 21 b) um eine spezies- oder domänenspezifische Tatsache handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

2.1.3 Bestrahlung nach Trocknung

Im Folgenden wurde das Überleben nach einer Kombination von Trocknung und UV-C-Bestrahlung untersucht. Die Absorptionsmessungen der Kultivierungs- und Bestrahlungsmedien bestätigen, dass die Salze in den Flüssigmedien die Strahlung nicht absorbieren. Bei der Trocknung entsteht, bedingt durch die Salze im Medium, eine Kruste (Abb. 6 a, Pfeil 3), die ebenfalls die Strahlung nicht absorbieren sollte (Dr. Petra Rettberg, DLR Köln, persönliche Mitteilung).

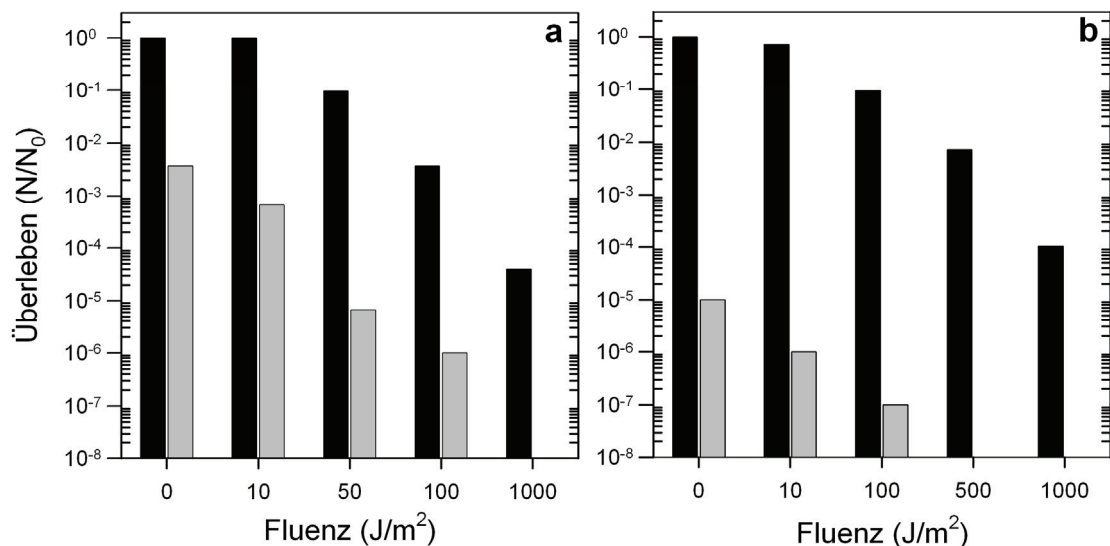


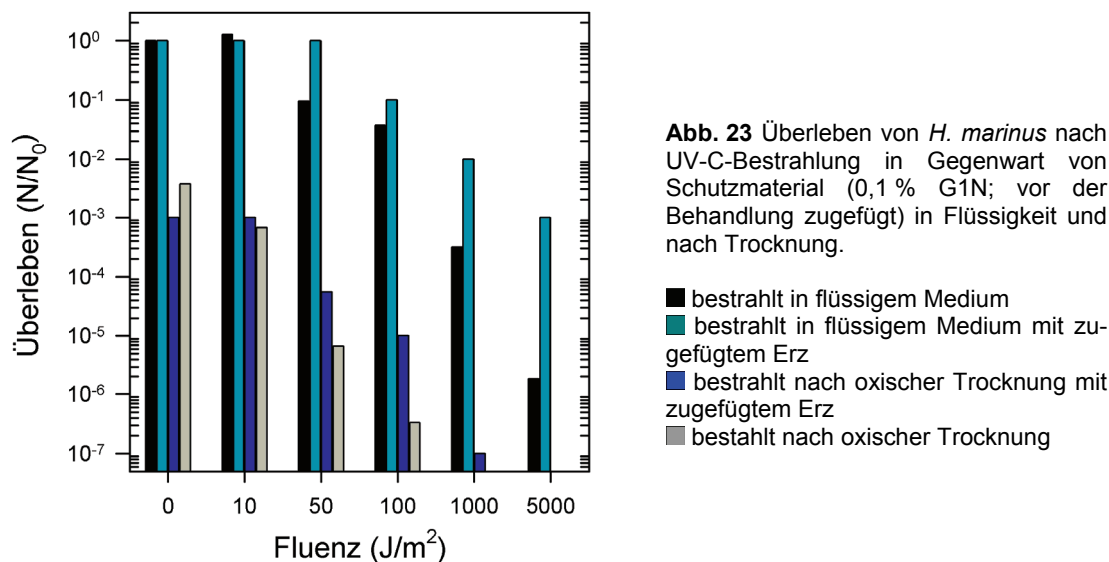
Abb. 22 Überleben von *H. marinus* (a) und *A. fulgidus* (b) nach UV-C-Bestrahlung im jeweiligen flüssigen Medium (■) und nach Trocknung (▒). Bestrahlung und Trocknung fand unter oxidischen Bedingungen bei Raumtemperatur statt (siehe auch Tab. 3).

Es war ein deutlicher Unterschied zwischen den Überlebenswerten nach alleiniger Trocknung (Abb. 22 a, b, 0 J/m^2 , nicht bestrahlte Dunkelkontrolle) und einer Kombination aus Trocknung und UV-C-Bestrahlung im Vergleich zum Überleben nach UV-C-Bestrahlung in Flüssigkeit zu sehen (Abb. 22 a, b). Es muss dennoch klar herausgestellt werden, dass sich diese beiden Stämme vor allem in ihrer Trockentoleranz deutlich unterscheiden. *H. marinus* wird durch Trocknung um gut zwei Zehnerpotenzen (Abb. 22 a, 0 J/m^2 , nicht bestrahlte Dunkelkontrolle), *A. fulgidus* um fünf inaktiviert (Abb. 22 b, 0 J/m^2 , nicht bestrahlte Dunkelkontrolle). Dadurch gelangt man bei *A. fulgidus*, bei einer Kombination von Trocknung und Strah-

lung sehr schnell unter die Nachweisgrenze lebender Zellen ($\sim 10^{-8}$). Beide Stämme scheinen nach Trocknung sensitiver gegenüber UV-C-Strahlung im niedrigeren Fluenzbereich zu sein. In beiden Fällen führte bei den getrockneten Zellen eine Bestrahlung mit 10 J/m^2 zu einer Abnahme der Überlebenswerte um eine Zehnerpotenz. Im Gegensatz dazu änderte sich die Überlebensrate nach einer Bestrahlung mit 10 J/m^2 bei den Flüssigbestrahlungen nicht.

2.1.4 Schutzeffekte von Erz

Es sollte untersucht werden, ob zugefügtes Material *H. marinus*-Zellen während Trocknung und Bestrahlung schützen kann.



Das zugefügte Erz spielte bei der Trockentoleranz von *H. marinus* keine Rolle (Abb. 23, 0 J/m^2 ; nicht bestrahlte Dunkelkontrolle). Das Überleben nach alleiniger Trocknung mit und ohne Erz lag in der gleichen Größenordnung zwischen $S(1 \text{ Tag}) = 10^{-2} - 10^{-3}$. Einen großen Einfluss hatte das Erz jedoch während der UV-C-Bestrahlung und diente dabei als sehr effizientes Protektionsmaterial. Sowohl bei der Bestrahlung im getrockneten Zustand, als auch bei der Bestrahlung in Flüssigkeit war die Überlebensrate mit zugefügtem Erz um bis zu drei Zehnerpotenzen höher, im Vergleich zu Bestrahlungen ohne zugefügtes Erz.

2.1.5 Einfluss kompatibler Solute auf die Überlebensrate nach UV-C-Bestrahlung in Flüssigkeit und nach Trocknung

Bei den Trocknungsexperimenten zeigten sich signifikante Unterschiede im Überleben von *A. fulgidus* mit und ohne kompatible Solute. Daher sollte ein potenzieller Einfluss der kompatiblen Solute auf das Überleben von *A. fulgidus* nach UV-C-Bestrahlung in Flüssigkeit und nach einer Kombination von Strahlung und Trocknung untersucht werden.

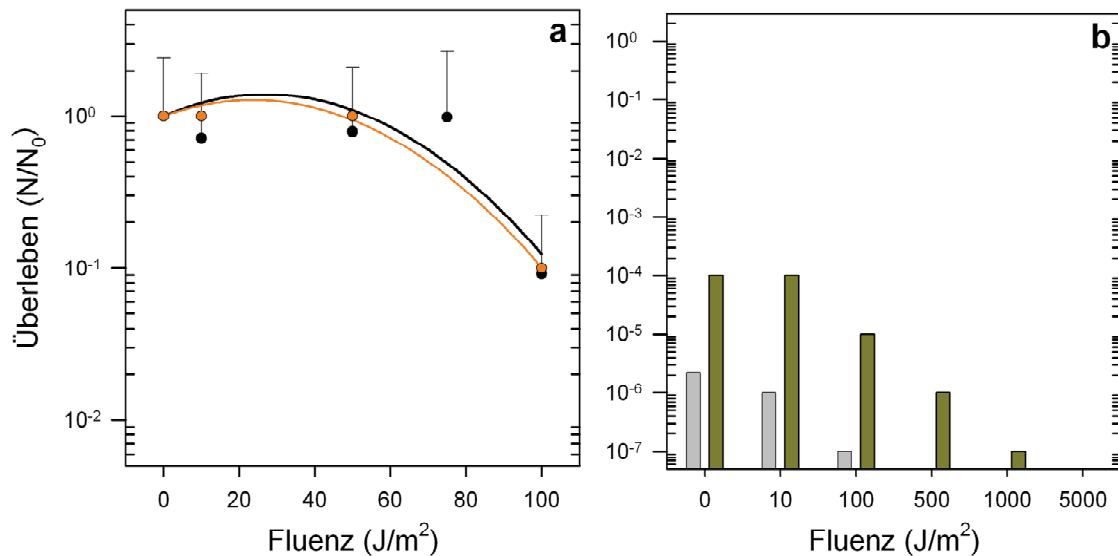


Abb. 24 Überleben von *A. fulgidus* nach UV-C-Bestrahlung im flüssigen (a) und getrockneten Zustand (b) unter Standardkultivierungsbedingungen (●,■) und nach KS-Induktion durch NaCl (○,■) (siehe auch Tab. 2).

Die Reaktivierung fand unter den gleichen Bedingungen statt wie die Vorkultivierung.

Die Anwesenheit von kompatiblen Soluten führte bei der UV-C-Bestrahlung in Flüssigkeit zu keiner Änderung in der Überlebensrate im Vergleich zu Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert und in Flüssigkeit bestrahlt wurden (Abb. 24 a). In beiden Fällen wurden ca. 90 % der Zellen durch eine Bestrahlung mit 100 J/m^2 in Flüssigkeit inaktiviert. Anders verhielt es sich bei der Bestrahlung der getrockneten Zellen (Abb. 24 b). Bei *A. fulgidus*-Zellen mit kompatiblen Soluten lag die Überlebensrate ungefähr zwei Zehnerpotenzen höher als bei Zellen ohne kompatible Solute. Dennoch ist zu beachten, dass die Bildung von kompatiblen Soluten nicht eine höhere Resistenz gegenüber UV-C-Strahlung bedeutet. Die Überlebensrate nach Bildung der kompatiblen Solute, befand sich, auf einem höheren Level. Mit ansteigender Fluenz sank die Überlebensrate genauso ab, wie bei bestrahlten und getrockneten *A. fulgidus*-Zellen ohne kompatible Solute. Durch diese Tatsache erreicht man bei den Bestrahlungsexperimenten nach Trocknung von nicht induzierten *A. fulgidus*-Zellen schnell die Nachweisgrenze. Sowohl bei den Zellen mit als auch ohne kompatible Solute führte die Bestrahlung mit 100 J/m^2 , wie schon bei den Flüssigbestrahlungen, zu einer etwa 90 %-igen Inaktivierung der getrockneten Zellen. Die Bildung von kompatiblen Soluten verhinderte hingegen die Sensibilisierung der getrockneten Zellen im niedrigen Fluenzbereich (10 J/m^2) und es kam zu keiner Änderung in der Überlebensrate (Abb. 24 b).

2.2 Ionisierende Strahlung

Es wurden sowohl Mikroorganismen ionisierender Strahlung ausgesetzt, die sich als trocken-tolerant herausgestellt hatten (*A. pyrophilus*, *A. fulgidus*, *H. marinus*, *M. jannaschii*, *M. thermoautotrophicus*, *S. metallicus*, *M. sedula*, *I. hospitalis*, *T. tenax*, *T. pendens*, *M. barkeri*), als

auch Organismen, die bereits nach kurzen Perioden der Trockenheit kein Überleben zeigten (*P. furiosus*, *S. solfataricus*, *N. equitans*).

Bei den Sulfolobales-Vertretern ist bereits ein Einfluss des pH-Wertes und des Wachstums-substrates auf die Trockentoleranz bekannt (Beblo *et al.* 2009). Die Fähigkeit, Perioden der Trockenheit zu überdauern, ist nach Neutralisierung oder mit Erz als Wachstumssubstrat höher, als unter sauren Bedingungen, beziehungsweise mit elementarem Schwefel als Wachstumssubstrat. Daher wurden bei den Bestrahlungsversuchen mit ionisierender Strahlung verschiedene pH-Werte und Substratbedingungen getestet. Die zwei Vertreter der Ordnung der Sulfolobales, *S. metallicus* und *M. sedula* wurden sowohl auf Schwefel, als auch auf einer spezifischen Erzmischung kultiviert. Des Weiteren wurden diese beiden Organismen jeweils im sauren Kulturansatz als auch nach Neutralisation bestrahlt. *S. solfataricus* wurde sowohl auf Schwefel (sauer beziehungsweise nach Neutralisierung) als auch auf Knallgas vorkultiviert und bestrahlt.

2.2.1 Überlebensraten nach Behandlung mit ionisierender Strahlung

Die Applikation von ionisierender Strahlung erfolgte im Dosisbereich bis 5 kGy mittels Röntgenstrahlung. Im Hochdosisbereich (ab 5 kGy bis 20 kGy) wurde mit einer ^{60}Co -Quelle bestrahlt.

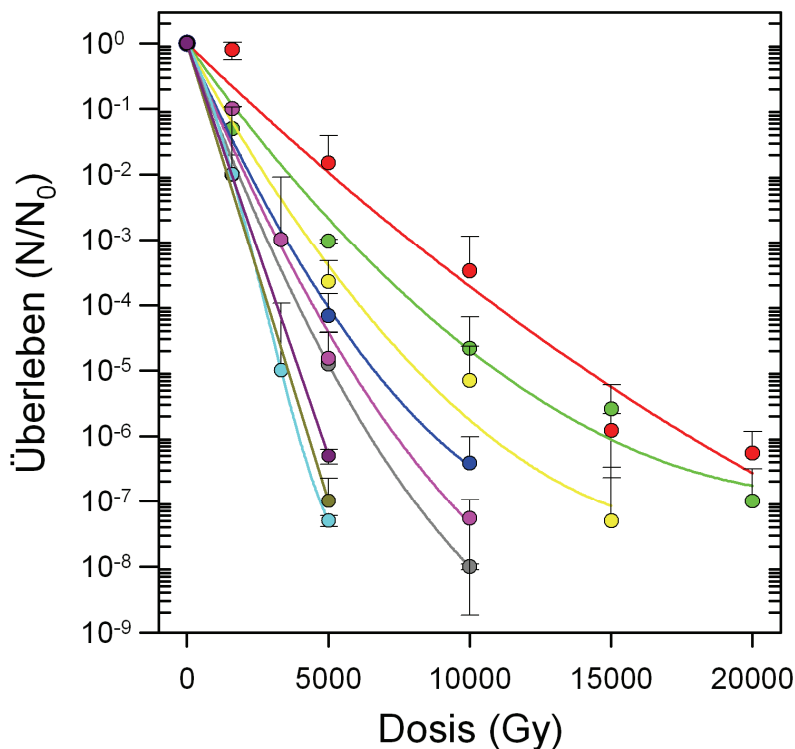


Abb. 25 Übersicht über das Überleben von (hyper-)thermophilen Mikroorganismen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung. Die Kultivierung erfolgte unter den jeweiligen Standardbedingungen (siehe auch Tab. 1) ($n \geq 2$).

● *A. pyrophilus*, ● *I. hospitalis*, ● *A. fulgidus*, ● *M. jannaschii*, ● *P. furiosus*, ● *T. tenax*, ● *S. metallicus* (G1N, sauer), ● *M. sedula* (G6, sauer), ● *H. marinus*

Von den fünfzehn getesteten Organismen überlebten neun eine Bestrahlung mit 5 kGy. Kein Überleben nach 5 kGy zeigte *M. sedula* (auf Erz neutralisiert, sauer, beziehungsweise neutral auf Schwefel, sauer auf Knallgas), *M. barkeri*, *M. thermoautotrophicus*, *N. equitans*, *S. solfataricus* (sauer beziehungsweise neutralisiert auf Schwefel, sauer auf Knallgas), *S. metallicus* (sauer beziehungsweise neutralisiert auf Schwefel, neutralisiert auf Erz) und *T. pendens*.

Die Überlebensrate der einzelnen Mikroorganismen variierte nach einer Bestrahlung mit 5 kGy zwischen $S(5 \text{ kGy}) = 10^{-2}$ bis 10^{-8} . Bei den beiden Sulfolobales-Vertretern (*M. sedula* und *S. metallicus*, beide sauer auf Erz) und *H. marinus* konnte Überleben nur nach maximaler Bestrahlung mit 5 kGy nachgewiesen werden. Eine Bestrahlung von 10 kGy überlebten sechs Organismen mit einer Inaktivierung von ca. $S(10 \text{ kGy}) = 10^{-4}$ bis 10^{-8} . Bei *M. jannaschii*, *P. furiosus* und *T. tenax* konnte Überleben nur nach einer maximalen Bestrahlung mit 10 kGy nachgewiesen werden. *A. fulgidus* überlebte maximal eine Bestrahlung mit 15 kGy. Nach 20 kGy konnten teilungsfähige und somit lebende Zellen bei *A. pyrophilus* und bei *I. hospitalis* nachgewiesen werden. Die Überlebensraten lagen dabei bei $S(20 \text{ kGy}) = 5,5 \times 10^{-7}$ beziehungsweise 1×10^{-7} (Abb. 25).

Aus den Überlebenswerten wurden die D_{10} -Werte der Modellorganismen berechnet (Tab. 8).

Organismen	Errechnete D_{10} -Werte (^{60}Co)
<i>A. pyrophilus</i>	2842 Gy
<i>I. hospitalis</i>	1482 Gy
<i>A. fulgidus</i>	1087 Gy
<i>M. jannaschii</i>	1036 Gy
<i>P. furiosus</i>	1018 Gy
<i>T. tenax</i>	874 Gy
<i>H. marinus</i>	754 Gy
Beispielorganismen	D_{10} -Werte (ionisierende Strahlung)
<i>B. subtilis</i> (Sporen)	838 Gy (Möller <i>et al.</i> 2007 a)
<i>Bacillus pumilus</i> (vegetativ)	210 Gy (Parisi <i>et al.</i> 1974)
<i>E. coli</i>	250 Gy (Clavero <i>et al.</i> 1994)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	3,75 kGy (Billi <i>et al.</i> 2000)
<i>D. radiodurans</i>	10 kGy (Daly 2009)
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	5 kGy (Kottemann <i>et al.</i> 2005)
<i>T. gammatolerans</i>	6 kGy (Jolivet <i>et al.</i> 2003)
<i>T. stetteri</i>	6 kGy (Kopylov <i>et al.</i> 1993)
<i>Thermococcus marinus</i>	4 kGy (Jolivet <i>et al.</i> 2004)

Tab. 8 Errechnete D_{10} -Werte nach ^{60}Co -Bestrahlung der untersuchten Organismen. Die D_{10} -Werte wurden nur für die Organismen berechnet, für die mindestens Überlebenswerte an drei Dosispunkten vorlagen. Ergänzend Literaturwerte verschiedener Beispielorganismen.

2.2.2 Einfluss von *N. equitans* auf die Strahlenresistenz von *I. hospitalis*

Es gibt Unterschiede in den Überlebenswerten nach Trocknung, je nachdem ob *I. hospitalis* axenisch oder in Cokultur mit *N. equitans* kultiviert wird (Beblo *et al.* 2009). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ähnliche Effekte ebenfalls nach Behandlung mit ionisierender Strahlung auftreten.

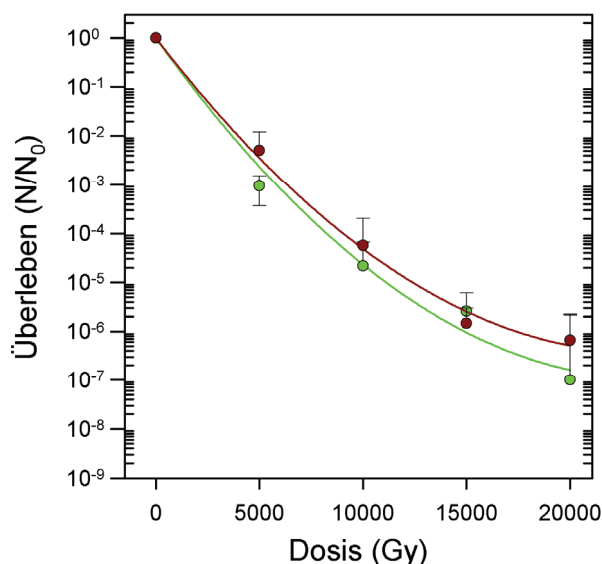


Abb. 26 Einfluss von *N. equitans* auf das Überleben von *I. hospitalis* nach Behandlung mit ionisierender Strahlung. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen (siehe auch Tab. 1) ($n \geq 2$).

● *I. hospitalis* in Cokultur mit *N. equitans*
 ● *I. hospitalis* in Reinkultur

Wie in Abb. 26 zu sehen, hatte es keinen Einfluss auf die Überlebensrate von *I. hospitalis* nach Einwirkung von ionisierender Strahlung, ob *I. hospitalis* vor der Bestrahlung axenisch oder in Cokultur mit *N. equitans* kultiviert wurde. Dies spiegelte sich sowohl in den sehr ähnlichen Überlebensraten von *I. hospitalis* mit beziehungsweise ohne *N. equitans*, als auch in den nahezu identischen D_{10} -Werten wider (Tab. 9).

Organismen	Errechnete D_{10} -Werte (^{60}Co)
<i>I. hospitalis</i>	1482 Gy
<i>I. hospitalis</i> in Cokultur mit <i>N. equitans</i>	1473 Gy

Tab. 9 Errechnete D_{10} -Werte nach ^{60}Co -Bestrahlung.

In keinem Fall waren an *I. hospitalis* anhaftende *N. equitans*-Zellen nach der Einwirkung von ionisierender Strahlung zu finden.

2.2.3 Einfluss kompatibler Solute auf die Überlebensrate nach Einwirkung von ionisierender Strahlung

Unter den Organismen, die nach einer Bestrahlung mit 5 kGy überlebten, befanden sich einige Stämme, die kompatible Solute nachweislich induzieren können (siehe auch Tab. 2). Bei den Trocknungsexperimenten hatte sich bereits ein potenzieller Einfluss von kompatiblen Soluten auf das Überleben unter extremen Bedingungen gezeigt. Daher wurden bei *A. fulgi-*

us, *A. pyrophilus*, *P. furiosus* und *T. tenax* die entsprechenden kompatiblen Solute vor Behandlung mit ionisierender Strahlung induziert (siehe auch Tab. 2).

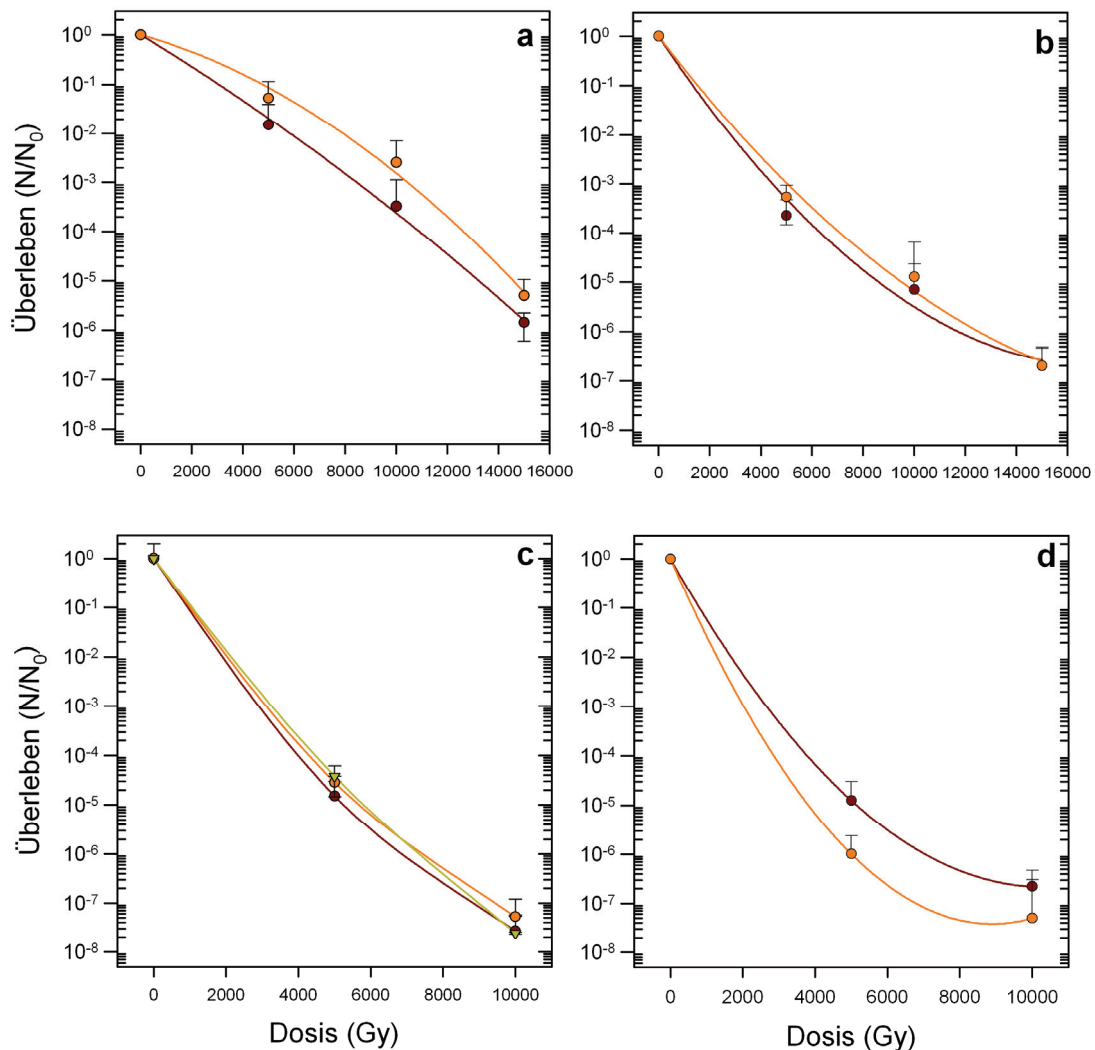


Abb. 27 Einfluss von kompatiblen Soluten auf das Überleben von *A. fulgidus* (a), *A. pyrophilus* (b), *P. furiosus* (c) und *T. tenax* (d) nach Behandlung mit ionisierender Strahlung ($n \geq 2$).

- Kultivierung unter den jeweiligen Standardbedingungen (siehe auch Tab. 1)
- Kultivierung unter KS-induzierenden Bedingungen durch eine erhöhte NaCl-Konzentration (siehe auch Tab. 2)
- ▼ Kultivierung unter KS-induzierenden Bedingungen durch erhöhte Kultivierungstemperatur (siehe auch Tab. 2).

Eine KS-Induktion vor ionisierender Bestrahlung führte bei keinem der getesteten Organismen zu einem signifikanten Unterschied im Überleben, im Vergleich mit Zellen, die unter den jeweiligen Standardbedingungen kultiviert wurden (Abb. 27 a-d). Bei *A. pyrophilus* lag der Überlebenswert nach KS-Induktion leicht über den Überlebenswerten der Standardbedingungen (Abb. 27 a). Dennoch kann man in diesem Fall noch nicht von einem signifikanten Ergebnis sprechen. Bei *A. fulgidus*, *P. furiosus* und *T. tenax* konnte kaum ein Unterschied im Überleben nach Kultivierung bei den verschiedenen Bedingungen und Bestrahlung ausgemacht werden. Die Überlebenswerte dieser Organismen waren nach KS-Induktion gleich (Abb. 27 b, c) oder lagen ein wenig unter den Überlebenswerten der Standardbedingungen (Abb. 27 d).

3 Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid

Zelluläre Schäden nach Behandlung mit ionisierender Strahlung und nach Behandlung mit H_2O_2 ähneln sich stark. Beides führt zu einer Radikalbildung und dadurch unter anderem zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Riley 1994, Ananthaswamy *et al.* 1977). Eine Auswahl von Mikroorganismen, die möglichst unterschiedlich auf eine Behandlung mit ionisierender Strahlung reagierten, wurde auf ihre Toleranz gegenüber einer Behandlung mit H_2O_2 untersucht.

3.1 Überleben nach H_2O_2 -Behandlung und nach Einwirkung von ionisierender Strahlung

A. pyrophilus, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *I. hospitalis* und *H. marinus*, allesamt im Katalaseaktivitätsnachweis negativ, zeigten äußerst unterschiedliche Toleranz gegenüber ionisierender Strahlung und der durchgeführten H_2O_2 -Behandlung (Abb. 28 a, b).

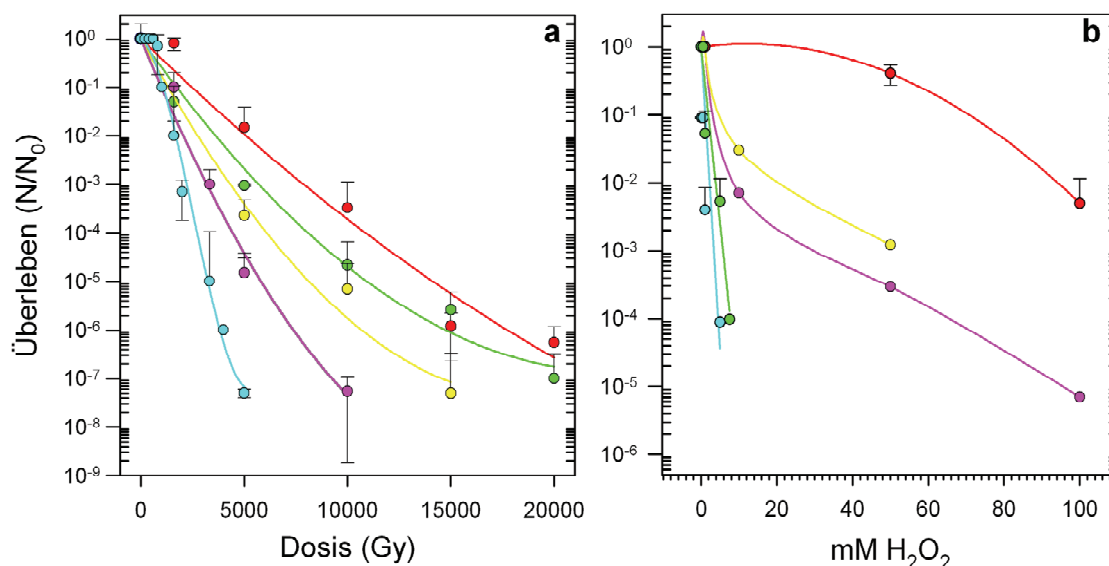


Abb. 28 Überleben von *A. pyrophilus* (●), *I. hospitalis* (●), *A. fulgidus* (●), *P. furiosus* (●) und *H. marinus* (●) nach Behandlung mit ionisierender Strahlung (a) und nach einer 15-minütigen Behandlung mit H_2O_2 (b).

Die Anordnung der Überlebenskurven im Diagramm nach ionisierender Strahlenexposition und nach H_2O_2 -Behandlung ähnelte sich. *A. pyrophilus* ($D_{10} = 55$ mM, siehe auch Tab. 10) hatte die höchsten Überlebensraten nach H_2O_2 -Behandlung, gefolgt *A. fulgidus* ($D_{10} = 6$ mM), *P. furiosus* ($D_{10} = 3$ mM), *I. hospitalis* ($D_{10} = 1,6$ mM) und *H. marinus* ($D_{10} = 0,2$ mM) (Abb. 28 a, b). Es ist wichtig zu erwähnen, dass *A. fulgidus* nach einer Behandlung mit 75 mM H_2O_2 kein Wachstum zeigte. Dies bedeutet, dass die Überlebenskurve nach dem letzten gemessenen Wert (50 mM) sehr stark nach unten unter die Nachweisgrenze von ca. 10^{-8} abknickt und so gegen Ende deutlich unter der Kurve von *P. furiosus* liegen würde. Am sensitivsten war, sowohl bei den Bestrahlungsversuchen als auch bei der Behandlung mit

H₂O₂, *H. marinus* (Abb. 28 a, b). Einzige Ausnahme in der Anordnung der Organismen in beiden Diagrammen bildete *I. hospitalis*: der ausgeprägten Toleranz gegenüber ionisierender Bestrahlung ($S(20 \text{ kGy}) = 10^{-7}$) steht eine hohe Sensitivität zu H₂O₂ gegenüber.

Organismen	Errechnete D ₁₀ -Werte (H ₂ O ₂ , 15 min)
<i>A. pyrophilus</i>	55 mM
<i>A. fulgidus</i>	6 mM
<i>P. furiosus</i>	3 mM
<i>I. hospitalis</i>	1,6 mM
<i>H. marinus</i>	0,2 mM

Beispielorganismen	D ₁₀ -Werte (H ₂ O ₂ , 15 min)
<i>B. subtilis</i> (Spore)	4,9 M (Riesenman <i>et al.</i> 2000)
<i>B. subtilis</i> (vegetativ)	10 mM (Naclerio <i>et al.</i> 1995)
<i>E. coli</i>	13 mM (Arrange <i>et al.</i> 1993)
<i>D. radiodurans</i>	33 mM (Arrange <i>et al.</i> 1993)

Tab. 10 Errechnete D₁₀-Werte nach 15-minütiger H₂O₂-Behandlung der untersuchten Mikroorganismen. Ergänzend Literaturwerte mehrerer Beispielorganismen.

3.2 Einfluss kompatibler Solute auf H₂O₂-Toleranz

Im Falle von *A. fulgidus* zeigte sich bei den Trocknungsexperimenten ein deutlicher Einfluss der gebildeten kompatiblen Solute auf die Überlebensfähigkeit nach Trocknung. Zusätzlich konnte ein radikalabfängende und somit protektive Eigenschaft von DGP bei einer Radikalbehandlung von Plasmid-DNA gezeigt werden (Lentzen *et al.* 2006).

Daher sollte untersucht werden, ob eine KS-Induktion und Bildung kompatibler Solute bei verschiedenen Mikroorganismen einen Einfluss auf die H₂O₂-Toleranz hat.

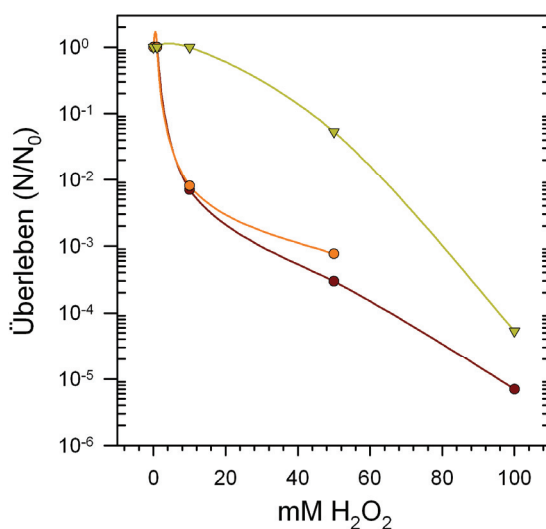


Abb. 29 Einfluss einer KS-Induktion auf das Überleben von *P. furiosus* nach H₂O₂-Behandlung.

- Kultivierung unter den jeweiligen Standardbedingungen (siehe auch Tab. 1)
- Kultivierung unter KS-induzierenden Bedingungen durch eine erhöhte NaCl-Konzentration (siehe auch Tab. 2)
- ▼ Kultivierung unter KS-induzierenden Bedingungen durch eine erhöhte Kultivierungstemperatur (siehe auch Tab. 2).

Bei *P. furiosus* war ein leichter Unterschied im Überleben nach H₂O₂-Behandlung zu sehen, je nachdem ob die Zellen unter Standardbedingungen oder unter KS-induzierenden Bedin-

gungen kultiviert wurden (siehe auch Tab. 2). Dennoch sind die Überlebensraten bei den verschiedenen KS-induzierenden Bedingungen unterschiedlich (Abb. 29). Wenn die Zellen bei einer erhöhten Wachstumstemperatur kultiviert wurden, war das Überleben nach einer H₂O₂-Behandlung deutlich höher, als wenn die Zellen unter einer erhöhten NaCl-Konzentration kultiviert wurden. Es war kein Unterschied im Überleben zu sehen, ob die Zellen mit 2,7 % NaCl oder mit 5,0 % NaCl kultiviert wurden. In keinem Fall konnte bei *P. furiosus*, nach Kultivierung unter KS-induzierenden Bedingungen (siehe auch Tab. 2) nach einer Behandlung mit 75 mM H₂O₂ Wachstum festgestellt werden. Somit wurde der weitere hypothetische Kurvenverlauf unterhalb der Nachweisgrenze (10^{-7}) und daher unter der Kurve von *P. furiosus* unter Standardbedingungen.

Im Gegensatz zum partiellen Einfluss von kompatiblen Soluten bei *P. furiosus* führte die KS-Induktion bei *A. fulgidus* und *A. pyrophilus* zu keiner Änderung in den Überlebenswerten nach H₂O₂-Behandlung.

4 Genomanalysen

In der Literatur existieren diverse Zusammenstellungen archaeeeller, bakterieller und eukaryotischer Reparaturmechanismen und der beteiligten Proteine. Die Proteine wurden zum Teil durch Genomanalysen, aber auch durch Enzymaktivitätstests identifiziert. Diese Daten werden hier tabellarisch zusammengefasst und durch noch nicht gezeigte Proteine und Mikroorganismen ergänzt (Tab. 11). Das Genom von *A. pyrophilus* wurde bisher noch nicht sequenziert. *A. pyrophilus* und *A. aeolicus* verhalten sich sowohl bei der Trockentoleranz (siehe III.1.3), als auch bei der Resistenz gegenüber einer Behandlung mit ionisierender Strahlung (Daten nicht gezeigt) sehr ähnlich und zeigen in ausgewählten Protein-Sequenzen eine große Ähnlichkeit zu einander (Griffiths *et al.* 2004). Daher wurde die Proteinclusteranalyse mit *A. aeolicus* durchgeführt.

Es wurden zusätzlich einige strahlenbiologisch relevante Beispielorganismen (*Halobacterium* sp. NRC-1, *B. subtilis*, *D. radiodurans*) und alle in dieser Arbeit verwendeten und komplett sequenzierten Spezies mit in die Analysen einbezogen.

Reparatursysteme							
Organismus	EPR	Bakt. NER	Eukary. NER	Bakt. HR	Arch. HR	Eukary. HR	Bakt. MMR
<i>A. fulgidus</i>			Rad1 (2) Rad2 (2;18) Rad3 (6) Rad25 (4;49) Rad32	RecJ (2)	RadA (1;27) RadB (1)	Rad51 (2)	MutS-ähnlich (13)
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	Phr1 (6;23) Phr2 (6;23)	UvrA (6;9) UvrB (6;9) UvrC (6;9) UvrD (9)	Rad1 (9) Rad2 (9) Rad3 (9) Rad24 (9) Rad25 (9) Rad32 (43;46)	RecJ (42)	RadA (9) RadB (43)	Rad50 (46) Rad51 (9)	MutS (4) MutL (4)
<i>I. hospitalis</i>			Rad2	RecB-ähnlich	RadA		
<i>M. sedula</i>	Phr (41)		Rad2 Rad25 Rad32		RadA		
<i>M. jannaschii</i>			Rad1 (4) Rad2 (4;17;18) Rad3 (4) Rad25 (6) Rad27 (2) Rad32 (44)	RecJ (2;36)	RadA (1;33) RadB (1)	Rad51 (1)	
<i>M. barkeri</i>	Phr (6)	UvrA (6) UvrB (6) UvrC (6) UvrD (6)	Rad1 (6) Rad2 (6) Rad3 (6) Rad24 Rad25 (6)	RecJ RecQ	RadA RadB RadC	Rad50	MutS (29) MutL (29)
<i>M. mazei</i>	Phr (6)	UvrA (3;12) UvrB (3;12) UvrC (3;12) UvrD (6;12)	Rad1 (6) Rad2 (6) Rad3 (6) Rad24 Rad25 (6)	RecG RecJ RecQ	RadA RadB (28) RadC (12)	Rad50	MutS (5) MutL (5)
<i>M. thermoautotrophicus</i>	Phr (6;21)	UvrA (6;20) UvrB (6;20) UvrC (6;20)	Rad1 (4) Rad2 (4)	RecJ (36)	RadA (1) RadB (1)	Rad51 (2)	MutS-ähnlich (2)
<i>N. equitans</i>			Rad1 (5) Rad2 (5) Rad3 (5) Rad25 (5)		RadA (1)		
<i>P. furiosus</i>			Rad1 (3;24) Rad2 (2;16;18) Rad3 (2) Rad25 (2) Rad32 (15)		RadA (1;25) RadB (1;25)	Rad50 (15) Rad51 (2)	MutS (29)

<i>S. solfataricus</i>	Phr (6)	<u>Rad1</u> (4;26) Rad2 (4) Rad3 (5) <u>Rad25</u> (2;22) Rad32 (14)	<u>RadA</u> (1;19;33;47)	Rad50 (10) Rad54 (10,48)
<i>T. pendens</i>		<u>Rad2</u>		<u>Rad51-ähnlich</u>
<i>A. aeolicus</i>	UvrA (4) UvrB (4) UvrC (4)		RecA (1) RecG (2) <u>RecN</u> RecJ (2) RecR (35)	<u>RadA</u> <u>RadC</u> MutS (4) MutL (4)
<i>B. subtilis</i>	UvrA (4) UvrB (4) UvrC (4)		RecA (1) <u>RecF</u> (7;39) RecG (7) <u>RecN</u> (7;39) <u>RecQ</u> (31;39) RecQ (7) RecR (7) <u>RecU</u> (30)	RadA (7) RadC (7) MutS (4) MutL (4)
<i>D. radiodurans</i>	UvrA (4) UvrB (4) UvrC (4) <u>UvrD</u> (32)	<u>Rad25</u> <u>Rad32</u> (45)	<u>RecA</u> (1;38) <u>RecD</u> (8;38) <u>RecE</u> (8;38) <u>RecG</u> (11) <u>RecJ</u> (8;38;39) <u>RecN</u> (8;34) <u>RecQ</u> (8;37;38) <u>RecQ</u> (8;38) <u>RecR</u> (8;35;38)	RadA (8) <u>Rad54</u> <u>MutS</u> (4;32) <u>MutL</u> (4;32)

Tab. 11 Verteilung homologer Proteine ausgewählter Reparatursysteme in den untersuchten Organismen und drei Beispielorganismen (*Halobacterium* sp. NRC-1, *B. subtilis*, *D. radiodurans*). Die Zahl in Klammern hinter dem Protein gibt eine Erwähnung in der unten aufgeführten Literatur an. Alle aufgeführten Proteine wurden bei der durchgeführten Protein-Cluster-Analyse bestätigt.

PR: Photoreaktivierung, NER: Nukleotid-Exzisions-Reparatur, HR: Homologe Rekombination, MM: Mismatch-Reparatur.

Grau hinterlegt: neu identifiziertes Protein

Ohne Unterstreichung: Identifizierung auf Genomebene

Unterstrichen: Aktivität wurde über Enzymtest oder durch Microarray-Analysen nachgewiesen

Unterpunktet: Gen wurde kloniert und die Funktionalität des Proteins nachgewiesen

Unterstrichelt: Überprüfung der Funktionalität über Knock-out Mutanten

(1) DiRuggiero *et al.* 1999, (2) Grogan 2000, (3) White 2003, (4) Grogan 2004, (5) Kelman *et al.* 2005, (6) Crowley *et al.* 2006, (7) Subtilist World Wide Web Server (<http://genolist.pteur.fr/SubtiList/>), (8) White *et al.* 1999, (9) Ng *et al.* 2000, (10) She *et al.* 2001, (11) Wu *et al.* 2009, (12) Deppenmeier *et al.* 2002, (13) Romano *et al.* 2007, (14) Götz *et al.* 2007, (15) Hopfner *et al.* 2000, (16) Harrington *et al.* 1994, (17) Rao *et al.* 1998, (18) Hosfield *et al.* 1998, (19) Sandler *et*

al. 1996, (20) Ögrünç *et al.* 1998, (21) Kiener *et al.* 1985, (22) Salerno *et al.* 2003, (23) Baliga *et al.* 2004, (24) Komori *et al.* 2002, (25) Komori *et al.* 2000, (26) Roberts *et al.* 2003, (27) McIlwraith *et al.* 2001, (28) Lin *et al.* 2006, (29) Lin *et al.* 2007, (30) Cañas *et al.* 2008, (31) Manfredi *et al.* 2008, (32) Mennecier *et al.* 2004, (33) Reich *et al.* 2001, (34) Funayama *et al.* 1999, (35) Lee *et al.* 2004, (36) Rajman *et al.* 2000, (37) Xu *et al.* 2008, (38) Bentschikou *et al.* 2010, (39) Cao *et al.* 2010, (40) Kidane *et al.* 2004, (41) Goosen *et al.* 2008, (42) McCready *et al.* 2005, (43) DasSarma *et al.* 2001, (44) Constantinesco *et al.* 2004, (45) Bentschikou *et al.* 2007, (46) Kish *et al.* 2008, (47) Seitz *et al.* 1998, (48) Haseltine *et al.* 2009, (49) Fan *et al.* 2006.

Die gefundenen, bereits annotierten Gene und Proteine passen zu vorhandenen Reparaturproteindaten anderer Mikroorganismen. Alle bisher noch nicht oder nur partiell in der Literatur aufgeführten Organismen, wie zum Beispiel *I. hospitalis*, *M. sedula* und *T. pendens* lassen sich sinnvoll in die Tabelle einfügen.

In der Tab. 12 werden die gefundenen Proteine, die entsprechende Bezeichnung der homologen Proteine in Archaeen, Bakterien beziehungsweise Eukaryonten und deren einzelne Funktion während der Reparatur kurz erläutert.

Archaea	Bakteria	Eukaryoten (Mensch)	Funktion	Referenz
Rad1		XPF	DNA-Einzelstrang Endonuclease	Aravind <i>et al.</i> 1999, Eisen <i>et al.</i> 1999
Rad2		FEN-1	3'-Endonuclease	DiRuggiero <i>et al.</i> 1999, Crowley <i>et al.</i> 2006
Rad3	DinG	XPB	5'-3'-Helikase, Erkennung des Schadens	White 2009, Rudolf <i>et al.</i> 2010
Rad24		Rad24	Checkpoint Kontroll-Gen bei Zellzyklus	Bao <i>et al.</i> 1998, Koltovaya <i>et al.</i> 2008
Rad25		XPB	3'-5'-Helicase	Grogan 2004
		XPG	3'-Nuclease bei eukaryotischer NER	Crowley <i>et al.</i> 2006
Rad32	Mre11	MRE11	Exonuklease	Kanaar <i>et al.</i> 1998, Quaiser <i>et al.</i> 2008, Hopkins <i>et al.</i> 2008
Rad50		Rad50	Zusammen mit Rad32/Mre11 Einzelstrang-Endonukleaseaktivität und ATP-abhängige Doppelstrang spezifische 3'-5'-Exonukleaseaktivität.	Constantinesco <i>et al.</i> 2002, Quaiser <i>et al.</i> 2008, Hopkins <i>et al.</i> 2008
RadA	RecA	Rad51	Multifunktionales Rekombinaseenzym der HR	Brendel <i>et al.</i> 1997, DiRuggiero <i>et al.</i> 1999, Komori <i>et al.</i> 2000
RadB		Rad55-57	Rad55 und Rad57 sind Teil der Epistasie Gruppe Rad52 (Rad50-Rad57). Interaktion miteinander bzw. mit Rad51	Kiefer 1989, Komori <i>et al.</i> 2000, Daboussi <i>et al.</i> 2002
Rad54		Rad54	Stimulation von RecA/ RadA/ Rad51	Haseltine <i>et al.</i> 2009
RadC/ RecG	RadC/ RecG		Stimulation von RecA/ RadA/ Rad51	Felzenszwalb <i>et al.</i> 1992, Lombardo <i>et al.</i> 2000

RecB, RecC, RecD	RecB, RecC, RecD		Zusammen mit RecA DNA-Doppelstrang-Reparaturenzymkomplex	Kowalczykowski <i>et al.</i> 1994
RecF, RecO, RecR	RecF, RecO, RecR		Zusammen mit RecA, RecU, RecJ DNA-Einzelstrang-Reparaturenzymkomplex	Kowalczykowski <i>et al.</i> 1994, Xu <i>et al.</i> 2008, Handa <i>et al.</i> 2009
RecJ	RecJ		Exonuklease, katalysiert den Abbau von Einzelstrang-DNA in 5'-3'-Richtung	Rajman <i>et al.</i> 2000
	RecN		Hilfsenzyme bei HR	Funayama <i>et al.</i> 1999
	RecU		Holliday-Junction Resolvase, Bindungsfähigkeit an RecA	Carrasco <i>et al.</i> 2005
RecQ	RecQ	RecQ	ATP-abhängige DNA-Helikase	Umezumi <i>et al.</i> 1990
Phr; Phr1/Phr2	PhrA, PhrB		Lichtabhängige Photolyase bei EPR	Grogan 1997, McCready <i>et al.</i> 2003
UvrA, UvrB, UvrC, UvrD	UvrA, UvrB, UvrC, UvrD		Erkennung (UvrB), Schneiden und Entfernen von geschädigter DNA durch NER	Crowley <i>et al.</i> 2006, Truglio <i>et al.</i> 2004, Truglio <i>et al.</i> 2006
MutS, MutL	MutS, MutL	MSH, MLH	Hauptenzyme der MMR	Grogan 2004, Eisen 1998

Tab. 12 Proteinhomologe ausgewählter Reparaturmechanismen bei Archaeen, bei Bakterien, beziehungsweise bei Eukaryoten (Mensch), deren Funktion und Beschreibung in der Literatur.

In den Genomen aller untersuchten Archaeen und Bakterien waren Gene für ein oder mehrere bekannter Reparatursysteme vorhanden. Beispielsweise konnte bei allen untersuchten Organismen konnte entweder ein Gen für RecA, Rad 51 oder RadA, die alle eine zentrale Rolle bei der homologen Rekombination spielen, nachgewiesen werden. Wie in Abb. 30 zu sehen, handelt es sich bei den erwähnten Genen um Homologe. Dabei besitzt RadA auf der Ebene der Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit von 40% zu Rad51 und eine Ähnlichkeit von 20 % zu RecA (Sandler *et al.* 1996).



Abb. 30 Strukturelle Ähnlichkeit zwischen bakteriellen RecA, dem menschlichen Rad51 und dem archaeellen RadA (nach Lin *et al.* 2006).

In Abb. 30 ist ebenfalls zu erkennen, dass es sich bei RadB und RadA um strukturell hoch konservierte und somit äußerst ähnliche Proteine handelt (35 % Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz), die höchstwahrscheinlich durch eine Genduplikation entstanden sind (DiRuggiero *et al.* 1999).

Zusätzlich sind bei allen Archaeen diverse Rad-Proteine vorhanden. *Rad2*, ein Homolog zu einer eukaryotischen Reparatur-Endo-Exonuklease (5'-Exonuklease/ Flap-Endonuklease FEN-1, DiRuggiero *et al.* 1999), die eine Rolle bei der Nukleotid- und der Basen-Exzisions-Reparatur spielt (Kim *et al.* 1998), war ausnahmslos bei allen untersuchten archaeellen Vertretern zu finden (PRK03980) (Shen *et al.* 1998). Hingegen konnten XPA, XPC und XPG wichtige Bestandteile der eukaryotischen HR, wie zum Beispiel beim Menschen (White 2003), in keinem Organismus identifiziert werden. Bei den meisten untersuchten Archaeen waren diverse andere Gene, die zum eukaryotischen NER-System (*rad1*, *rad3*, *rad25*) homolog sind, zu finden. Es wurden Homologe zu den Genen *rad50*, *rad51*, beziehungsweise *rad52*, alle ebenfalls an der eukaryotischen HR beteiligt, bei *T. pendens*, *M. barkeri*, *M. mazei* und *Halobacterium* sp. NRC-1 nachgewiesen. Auffällig war, dass Homologe zu den erwähnten Rad-Genen bei den bakteriellen Vertretern nahezu komplett fehlten. Dennoch konnten sowohl bei *A. aeolicus*, als auch bei *B. subtilis* RadA- und RadC-Homologe identifiziert werden. Auch im Genom von *D. radiodurans* waren drei Rad-ähnliche Gene (*rad25*, *rad32*, *rad54*) zu finden. Die untersuchten Bakterien, wie zum Beispiel *A. aeolicus* haben anstatt der typischen archaeellen Rad-Proteine die typischen bakteriellen Rec-Gene. Diese Rec-Gene sind an der bakteriellen HR beteiligt. Aber auch in den archaeellen Vertretern konnten Homologien zu Rec-Genen gefunden werden. So ist zum Beispiel *recJ*, konserviert in Euryarchaeota, sowohl bei *A. fulgidus*, *Halobacterium* sp. NRC-1, *M. thermoautotrophicus*, *M. jannaschii*, *M. barkeri* und *M. mazei* (Proteincluster: CLS1071005) zu finden. Das für *D. radiodurans* typische alternative Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem, gekennzeichnet durch das Hauptenzym UvsE (Evans *et al.* 1983, Earl *et al.* 2002), ist nur im Genom von *D. radiodurans* nachzuweisen.

Obwohl das Mismatch-Reparatursystem (MutS / MutL) (hyper-)thermophilen Archaeen nahezu komplett fehlen soll (Grogan 2004), konnte bei *A. fulgidus*, ein *mutS*-ähnliches Gen gezeigt werden. Dieses Gen / Protein ist aber wahrscheinlich lediglich am NER beteiligt (Romano 2007) und stellt kein selbständiges MMR-System dar. Aber auch beim thermophilen *M. thermoautotrophicus* (Locus_Tag MTH1762) und hyperthermophilen *P. furiosus* (Vijayvargia *et al.* 2002) konnten *mutS*-ähnliche Gensequenzen identifiziert werden. Bei den mesophilen *Methanosarcina*-Vertretern und den untersuchten Bakterien bestätigte sich das Vorhandensein der Mismatch-Reparatur-Gene.

Bei einigen methanogenen Archaeen (*M. barkeri*, *M. mazei*, *M. thermoautotrophicus*), bei *Halobacterium* sp. NRC-1 und allen Bakterien (*A. aeolicus*, *D. radiodurans*, *B. subtilis*) konn-

te ein vollständiges bakterielles NER-System (UvrABC) nachgewiesen werden (Crowley *et al.* 2006).

Für mehrere *Sulfolobus*-Spezies ist das Vorhandensein einer UV-induzierbaren lichtabhängigen Photolyase (Phr) beschrieben (Grogan 1997). Diese Tatsache traf auch für *M. sedula* zu, in dessen Genom ebenfalls ein Gen für eine Photolyase identifiziert wurde. Im gleichen Proteincluster (COG0415) konnte das Vorhandensein von Genen, die für eine Photolyase codieren, bei *M. thermoautotrophicus* (Kriener *et al.* 1985) und den beiden *Methanosarcina*-Vertretern (Olson *et al.* 1991, Crowley *et al.* 2006) bestätigt werden.

IV Diskussion

Trockentoleranz vegetativer (hyper-)thermophiler Mikroorganismen

Lange Zeit wurde angenommen, dass hauptsächlich nur Überdauerungsformen wie Sporen, und nur selten vegetative Zellen eine Resistenz gegenüber Wasserentzug durch Trocknung besitzen (Billi *et al.* 2002). *D. radiodurans* war der erste Mikroorganismus, dem als vegetative Zelle eine erhebliche Trockenresistenz zugeschrieben wurde (Mattimore *et al.* 1996). Trockentoleranz vegetativer Zellen scheint aber gerade auch unter den (hyper-)thermophilen Mikroorganismen ein weitverbreitetes Phänomen zu sein. In nahezu allen Ordnungen der (hyper-)thermophilen Archaeen und phylogenetisch tief abzweigenden (hyper-)thermophilen Bakterien waren trockentolerante Vertreter zu finden. So konnte, zusammen mit früheren Arbeiten (Beblo 2006), bisher bei 17 von 31 untersuchten prokaryotischen Stämmen Trockentoleranz festgestellt werden. Dabei zeigten sich neben der bloßen Eigenschaft „Trockenresistenz“ zahlreiche weitere Charakteristika hinsichtlich Verbreitung, Überlebensraten und Verknüpfungen mit anderen Resistenzen / Toleranzen, wie zum Beispiel gegen verschiedene Strahlungsarten. Es scheint aber, dass es sich bei der Trockentoleranz, wie schon zum Teil für höhere Organismen gezeigt (Alpert 2005), um eine äußerst spezies-spezifische Eigenschaft handelt: zum Teil sind große Varianzen in der Trockentoleranz bei Organismen aus verschiedenen Ordnungen, aber auch bei Organismen der gleichen Ordnung und der gleichen Gattung festzustellen. *S. metallicus* zeigte beispielsweise unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen eine hohe Toleranz gegenüber Trockenheit (Beblo *et al.* 2009), wohingegen *S. solfataricus* selbst kurze Perioden der Trockenheit nicht überlebte. Ähnlich gravierende Unterschiede in ihrer Toleranz gegenüber Wasserentzug zeigten die beiden getesteten mesophilen *Methanosarcina*-Vertreter. Dennoch gibt es auch Organismen aus einer Gattung (*Aquifex*, *Ignicoccus*) mit einer sehr ähnlichen Toleranz gegenüber Trockenheit. Auffällig ist, dass die meisten trockentoleranten Organismen aus der Ordnung der Aquificales stammen, beziehungsweise Organismen sind, die die Knallgasreaktion zur Energiegewinnung nutzen. Dies traf sowohl für die beiden *Aquifex*-Vertreter, als auch für *H. marinus* und *H. thermophilus* zu. Dennoch konnte bei *Tc. ruber*, der ebenfalls zur Ordnung der Aquificales gehört, und bei *S. solfataricus* und *H. hirschii*, die beide die Knallgasreaktion zur Energiegewinnung verwenden, keine Toleranz gegenüber Trockenheit festgestellt werden. Somit kann ein genereller Zusammenhang zwischen der (Hyper-)Thermophilie, der phylogenetischen Stellung, der Stoffwechselart und der Trockentoleranz ausgeschlossen werden.

Die Überlebensraten der getesteten Organismen lagen im Vergleich zu den in der Literatur publizierten Überlebensraten mesophiler Mikroorganismen deutlich niedriger. *D. radiodurans* zeigt in den ersten 100 Stunden der Trocknung keine Änderung in der Überlebensrate und nach ca. 16 Tagen leben noch 40 % der Zellen (Rettberg *et al.* 2004). Eine Verringerung der Überlebensrate um 25 % wurde bei *Halobacterium* sp. NRC-1 nach 20 Tagen Trocknung beobachtet (Kottmann *et al.* 2005). Bei *H. marinus*, unter den getesteten Organismen der Organismus mit der höchsten Überlebensrate, überleben 0,001 % der Zellen 16 Tage Trocknung. Die Zellen der hier getesteten Mikroorganismen überlebten mehrheitlich die ersten Stunden des Trocknungsprozesses nicht. Nur eine meist sehr niedrige Anzahl von Zellen konnte lange Zeiten der Trockenheit überdauern. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen, die den anfänglichen Trocknungsprozess überlebt haben, auch längere Zeit ohne die Verfügbarkeit von Wasser überleben können. Diese Zahl (zum Beispiel 1 von 10^7 *H. marinus*-Zellen nach 196 Tagen Trocknung) liegt in der Größenordnung der spontanen Mutationsrate (Drake *et al.* 1998). Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei der Trockentoleranz nicht um eine vererbte Resistenz, sondern um eine zum Teil spontan erworbene Toleranz handelt, sind die Ergebnisse der wiederholten Trocknungs- und Reaktivierungsexperimente mit *H. marinus*. Wenn es sich um eine vererbte Resistenz handeln würde, hätte die Überlebensrate der Tochterkulturen im Laufe des Experiments ansteigen müssen. Es ist daher denkbar, dass zelluläre Protektoren nach einer spontanen Mutation konstitutiv exprimiert werden und so die Zellen zum Teil vor Trocknungsschäden geschützt sind. Durch die Trocknung wird den Zellen intrazellulär gebundenes Wasser entzogen und hydratisierte Zellbestandteile können dadurch verändert und geschädigt werden. Nach Trocknung treten DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche (Dose *et al.*, 1992, Bieger-Dose *et al.*, 1992), Proteindenaturationen auf (Prestrelski *et al.* 1993), zusätzlich sind Veränderungen der Membranlipide zu verzeichnen (Cox 1993). Trocknung ist daher als eine extreme Form von osmotischem Stress zu sehen. Intrazelluläre kompatible Solute spielen bei der mikrobiellen Toleranz gegenüber widrigen Umständen, wie zum Beispiel einem osmotischen Schock, eine wichtige Rolle (Empadinhas *et al.* 2008). Bestimmte kompatible Solute können aber auch während der Trocknung einen positiven Einfluss auf die Membranstabilität haben (Hinch *et al.* 2004). Des Weiteren haben sie, bezogen auf die optimale Wachstumstemperatur, bei hohen und niedrigen Temperaturen einen protektiven Einfluss auf Proteine, vor allem auf Enzyme (Lippert *et al.* 1992). Größtenteils sind nur die Effekte von kompatiblen Soluten auf ganze Zellen und Zellbestandteile bekannt, wobei die molekulare Funktionsweise der kompatiblen Soluten zum Teil noch unverständlich ist. Eine Hypothese ist, dass kompatible Solute anstelle von Wasser an Proteinoberflächen binden und das Protein dadurch stabilisieren. Da somit weniger Wassermoleküle am Protein binden, führt ein Wasserentzug nicht zur Denaturierung (Kurz 2008). In einigen der getesteten Archaeen wie *A. fulgidus*, *M. kandleri*, *P. furiosus*, *T. acidophilum*, *P.*

occultum, *P. aerophilum*, *T. tenax*, *S. solfataricus* und *M. sedula* wurden von Martins *et al.* (1997) unter bestimmten Kultivierungsbedingungen kompatible Solute nachgewiesen. Die Überlebensrate von *A. fulgidus* nach Trocknung änderte sich nach der Kultivierung unter KS-induzierenden Bedingungen gravierend. Die Ladung des, in großen Mengen akkumulierten, *A. fulgidus*-spezifischen kompatiblen Soluts DGP wird mit K^+ als Gegenion ausgeglichen und weiteres K^+ in der Zelle akkumuliert. Eine potenzielle Rolle von intrazellulär akkumuliertem K^+ an der Osmoprotektion wurde bereits für *Halomonas elongata* diskutiert (Kraegeloh *et al.* 2002). *A. fulgidus* könnte für die K^+ -Akkumulation den Kaliumtransporter TrkA / H verwenden (Klenk *et al.* 1997), der aus dem NADH-Bindeprotein TrkA und der membrandurchspannenden Untereinheit TrkH aufgebaut ist (Johnson *et al.* 2009). Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass DGP primär nur bei der Trockentoleranz eine Rolle spielt. Die Überlebensraten nach Strahlenexposition oder Behandlung mit H_2O_2 sind nach Bildung von DGP identisch mit den Überlebensraten unter Standardbedingungen. Diese Tatsache unterstützt die These, dass DGP nur die Proteine von *A. fulgidus* stabilisiert und vor Denaturierung schützt. DGP schützt nicht die DNA vor Trocknungsschäden (wie Einzel- und Doppelstrangbrüchen), da andernfalls nach Strahlenexposition oder H_2O_2 -Behandlung eine positive Veränderung in der Überlebensrate zu sehen sein müsste. Louis *et al.* (1994) konnten bei *E. coli* ebenfalls ein Ansteigen der Überlebensrate nach Trocknung durch die Zugabe und damit verbunden zelluläre Aufnahme von kompatiblen Soluten (Sucrose, Trehalose, Hydroxyectoin) zeigen. Eine Zugabe von DGP zum Medium führte allerdings weder bei *A. fulgidus* noch bei *T. tenax*, *P. furiosus* und *A. pyrophilus* zu einer Veränderung der Überlebensrate nach Trocknung. Gründe hierfür könnten sein, dass die Organismen das zugefügte DGP unter optimalen Kultivierungsbedingungen nicht aufnehmen oder keine spezifischen Membrantransporter für DGP besitzen. Aufgrund von Untersuchungen zur Thermostabilität von DGP kann ausgeschlossen werden, dass das zugegebene DGP durch die Kultivierungstemperatur der jeweiligen Organismen zerstört wird (Lamosa *et al.* 2000). Diese Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass DGP in einer neutralen wässrigen Lösung bei einer Hitzebehandlung bei 95 °C über drei Stunden lang stabil bleibt. Ein positiver Effekt von gebildeten kompatiblen Soluten auf die Trockentoleranz konnte nur bei *A. fulgidus* festgestellt werden. *A. pyrophilus*, *P. furiosus* und *T. tenax* zeigten keine Veränderung in ihrer Überlebensrate, wenn kompatible Solute vor der Trocknung gebildet wurden. Allerdings handelt es sich bei den kompatiblen Solute (hyper-)thermophiler Mikroorganismen um sehr unterschiedliche Substanzen zum Teil aus verschiedenen Substanzklassen (Lamosa *et al.* 2006). Da DGP außerdem ausschließlich von *A. fulgidus* gebildet wird, lassen sich die Ergebnisse nur schwer vergleichen. Somit gibt es wohl keinen genereller Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Synthese von kompatiblen Soluten und einer erhöhten Trockentoleranz.

Trockentoleranz beeinflussende Parameter: die Trockentoleranz aller getesteten Mikroorganismen ist durch die Temperatur und Gegenwart von Sauerstoff während der Lagerung stark beeinflusst. Wenig Einfluss scheinen hingegen niedrige Drücke und die relative Luftfeuchtigkeit zu haben.

Ein positiver Effekt von niedrigen Lagerungstemperaturen ist bereits bekannt: die Gefrier-trocknung ist eine gängige Prozedur zur Langzeitkonservierung von Mikroorganismen (Miyamoto-Shinohara *et al.* 2000, Morgan *et al.* 2006). Bei der Lagerungstemperatur ist es wichtig, dass diese eindeutig die Untergrenze der metabolischen Aktivität unterschreitet (Weigl 2010). Bei getrockneten Zellen ist kein Unterschied in der Überlebensrate zu sehen, ob die Zellen bei -20 °C oder bei -80 °C gelagert werden (Beblo *et al.* 2009). Wie sich bei *I. pacificus* zeigte, kann der Temperaturunterschied bei einer Lagerung bei Raumtemperatur und bei -20 °C dennoch einen großen Unterschied in der Überlebensrate aus machen, obwohl auch Raumtemperatur die Untergrenze der metabolischen Aktivität von *I. pacificus* ($T_{opt.}$: 90 °C, Huber *et al.* 2000) deutlich unterschreiten sollte.

Die meisten Anaeroben, aber auch aerobe Mikroorganismen sind äußerst sensitiv gegenüber Sauerstoff, wenn sie metabolisch inaktiv sind (Grogan 1989). Bei Raumtemperatur, aber vor allem nach Trocknung befinden sich die (hyper-)thermophilen Zellen in einem metabolisch inaktiven Zustand und sauerstoffradikalabfangende Enzyme können in der Zelle reaktive Sauerstoffspezies nicht detoxifizieren. Zum Beispiel besitzt *M. thermoautotrophicus* eine Superoxiddismutase (Takao *et al.* 1990) und *I. hospitalis* ein zytoplasmatisches Peroxi-redoxin-System (Burghardt *et al.* 2008) und dennoch sind beide Organismen äußerst sauerstoffsensitiv und überlebten Trocknung nur unter anoxischen Bedingungen. Obwohl die methanogenen Organismen strikt anaerob sind und zu den sauerstoffsensitivsten Organismen unter den Archaeen zählen (Whitman *et al.* 2006), zeigte *M. barkeri* eine ausgeprägte, bereits bekannte Toleranz gegenüber Trocknung (Morozova *et al.* 2007) und Sauerstoffexposition (Fetzer *et al.* 1993). Bei den Trocknungsversuchen traten bei *M. barkeri* starke Schwankungen auf. Dieses Phänomen könnte mit dem sarcina-typischen Zellagglomeraten erklärt werden (Barker 1936): durch die Zellhaufen kommt es zu einer gewissen Inhomogenität der Kultur, was wiederum zu einer Ungleichverteilung der Zellen beim Aufbringen auf die Filter führen könnte. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht die exakt gewünschte Zellzahl auf den Filtern vorhanden ist und es so zu Schwankungen in der Überlebensrate nach Trocknung kommt. *M. barkeri* besitzt eine Superoxiddismutase, die den Organismus bei metabolischer Aktivität vor Schäden durch oxidativen Stress schützt (Brioukhanov *et al.* 2000). Da es sich bei *M. barkeri* um einen mesophilen Organismus handelt, könnte es sein, dass die Superoxiddismutase noch zum Teil während der Trocknung bei Raumtemperatur aktiv ist und so partiell Radikale abfängt. Unter den mikroaerophilen Mikroorganismen scheint *H. marinus* am wenigsten von der Gegenwart von Sauerstoff beeinflusst

zu sein (Weigl 2010). *H. marinus* verträgt einerseits relativ hohe Sauerstoffkonzentrationen während des Wachstums. So verlängert sich bei 8 % O₂ zwar die Verdopplungszeit, aber dennoch vermehren sich die Zellen (Stöhr *et al.* 2001 b). Demnach ist davon auszugehen, dass *H. marinus* ein vor den Einflüssen von Sauerstoff schützendes System besitzt. Wenn eine *H. marinus*-Kultur mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert wurden, zeigten die Zellen bei lichtmikroskopischen Untersuchungen aktive Bewegung (Daten nicht gezeigt). So kann auch in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, dass das vor Sauerstoffradikale schützende System noch zum Teil bei einer Trocknung bei Raumtemperatur aktiv ist.

Die Trockentoleranz der getesteten Organismen scheint nur gering vom einem niedrigen Druck und der relativen Luftfeuchtigkeit während der Lagerung beeinflusst zu sein. Die Lagerung von bereits getrockneten Zellen im Vakuum führte anfangs zu keiner Veränderung der Überlebensrate. Erst nach mehrtägiger Expositionszeit ist ein geringfügiger negativer Einfluss des Vakuums zu erkennen. Der vergleichsweise geringe Einfluss des Vakuums auf die Überlebensrate konnte bereits bei durchgeführten Weltraumexpositionsexperimenten beobachtet werden: nach 10-tägiger Weltraumvakuumexposition (10⁻⁶ Pa) überlebten 70 % der exponierten *B. subtilis*-Sporen (Horneck 1993). Bei einer 10-tägigen Vakuumexposition in Weltraumsimulationsanlagen (10⁻⁷ Pa) überleben nahezu 100 % der Sporen (Möller *et al.* 2007 a). Anders verhält es sich bei *D. radiodurans*: im Vakuum überlebt *D. radiodurans* zu einem höheren Prozentsatz verglichen zu Zellen, die unter Laborbedingungen trocken gelagert wurden (Anja Bauermeister, DLR, Köln persönliche Mitteilung).

Die relative Luftfeuchtigkeit scheint ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf die Trockentoleranz zu haben. Zellen, die bei geringerer relativer Luftfeuchtigkeit im Exsikkator gelagert wurden, überleben die Trocknung ähnlich wie unter Laborbedingungen. Der geringe Einfluss sowohl des Vakuums, als auch der relativen Luftfeuchtigkeit während der Lagerung konnte im Rahmen dieser Arbeit für *H. marinus*, als auch *A. pyrophilus* und *M. jannaschii* (Weigl 2010) gezeigt werden.

Toleranz (hyper-)thermophiler Mikroorganismen gegenüber Strahlung

Seit der Entdeckung und den ersten Untersuchungen von *D. radiodurans* wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Trockenresistenz und Strahlenresistenz diskutiert. Ähnliche Zusammenhänge wurden vor kurzem auch für Organismen wie *Halobacterium* sp. NRC-1 (Kish *et al.* 2009), *Ustilago maydis* (Holloman *et al.* 2007) und bdelloide Rotiferen (Gladyshev *et al.* 2008) postuliert. Derartige Zusammenhänge zwischen Trockentoleranz und Strahlenresistenz konnten für die hier untersuchten Organismen nicht gezeigt werden.

Zelluläre Effekte einer UV-C-Exposition: die Überlebensraten der untersuchten Organismen lagen nach UV-C-Bestrahlung, unabhängig von der organismenspezifischen Trockentoleranz zwischen denen des strahlenresistenten *D. radiodurans* und denjenigen des strahlensensitiven *B. subtilis*. Dies spiegelte sich sowohl in den Überlebensraten, als auch in den F_{10} -Werten wider. Im Vergleich zu Literaturwerten lagen die Überlebensrate und der F_{10} -Wert von *S. solfataricus* unter den Werten, die von Fröls *et al.* (2007) ermittelt wurden. Fröls *et al.* geben einen F_{10} -Wert von 72 J/m^2 an, somit ist dieser doppelt so hoch, wie der in dieser Arbeit ermittelte F_{10} -Wert ($36,5 \text{ J/m}^2$). Gründe hierfür könnten sein, dass es sich nicht um identische Stämme handelt. In dieser Arbeit wurde mit dem Stamm Ron12/III gearbeitet, Fröls *et al.* arbeiten mit dem Stamm PH1. Ein anderer Grund könnte sein, dass der Stamm PH1 in einer sehr viel dichteren Zellsuspension (fast hundertfach dichter) bestrahlt wurde und somit Selbstbeschattungseffekte nicht ausgeschlossen werden können. Genaue Übereinstimmung in den Überlebenswerten von *P. furiosus* findet man zu Komori *et al.* (2000). Dort werden 35 J/m^2 als Fluenz angegeben, die keinen Einfluss auf die Überlebensrate von *P. furiosus* hat. Dieser Wert konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Bei einer Kombination von Strahlung und Trocknung werden die Zellen sensibler gegenüber UV-C-Strahlung. Niedrige Fluenzen (10 J/m^2), die bei Bestrahlungen in flüssiger Suspension zu keinen Effekten führten, führten im Trocknen zu einer Verringerung der Überlebensrate. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen durch die vorangegangene Trocknung bereits geschädigt sind und somit die anschließende Bestrahlung stärkere Effekte hervorruft. Bei *D. radiodurans* hingegen konnte bisher nur ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden. Getrocknete *D. radiodurans*-Zellen können höhere Fluenzen an UV-C-Strahlung überleben, als Zellen in Flüssigkeit (Anja Bauermeister, DLR, Köln, persönliche Mitteilung). Die Sensibilisierung von *H. marinus* ließ sich durch die Zugabe geringer Mengen an „Protektionsmaterial“ (0,1 % Erz) in die Kulturmedien wieder aufheben. Zudem erhöhte sich die Überlebensrate von *H. marinus* durch diese Zugabe von „Protektionsmaterial“ sowohl bei Bestrahlung von Zellen in Flüssigkeit als auch nach Trocknung um bis zu zwei Zehnerpotenzen. Ähnliche Effekte konnten schon bei mehreren Experimenten erhalten werden. So schützt in Weltraumexpositionsexperimenten sowohl eine dünne Schicht künstlichen Meteoritenmaterials als auch eine dünne Staubschicht exponierte *Bacillus*-Sporen äußerst effektiv und die Überlebensrate erhöhte sich um fünf Zehnerpotenzen (Horneck *et al.* 2001 b). Osman *et al.* (2008) zeigten, dass die Zugabe von Wüstensandpartikel zu verschiedenen sporenbildenden und nicht-sporenbildenden Organismen die Zellen bei einer UV-C-Bestrahlung schützt und sich dadurch die Überlebensrate erhöht.

Bei allen getesteten Organismen konnte bis in einen sehr hohen Fluenzbereich (1000 J/m^2 ; in Flüssigkeit) Überleben nachgewiesen werden. Eine Bestrahlung mit derartig hohen Fluenzen hatte im Genom von *S. solfataricus* ($\sim 3,0 \text{ Mbp}$; She *et al.* 2001) rechnerisch ungefähr

145500 „Schadpunkte“ zur Folge. Trotz der hohen Anzahl an „Schadpunkten“ in Form von DNA-Photoprodukten wird das Genom repariert, da andernfalls kein Überleben zu sehen gewesen wäre. Im Vergleich zu *B. subtilis* brauchen die untersuchten Organismen relativ lange, um die entstandenen Schäden zu reparieren. Vegetative *B. subtilis*-Zellen benötigen nach UV-C-Bestrahlung ca. 60 min, um 50 % der entstandenen DNA-Photoprodukte zu reparieren (Marko Waßmann, DLR, Köln, persönliche Mitteilung). Nach einer Bestrahlung mit 500 J/m^2 liegen bei *D. radiodurans* 1,7 % der Thyminе als Dimere vor und der Organismus benötigt 90 min, um diese Anzahl der Dimere auf 0,3 % zu reduzieren (Varghese *et al.* 1970). Zur archaeellen Reparaturreffizienz sind in der Literatur verschiedene Aussagen zu finden: Romano *et al.* (2007) geben an, dass *S. solfataricus*, bestrahlt mit 500 J/m^2 UV-C, 30 min benötigt, um 20 % der entstandenen CPDs zu reparieren, und nach vier Stunden sind 80 % der DNA-Schäden behoben. Götz *et al.* (2007) konnten experimentell nachweisen, dass *S. solfataricus*, bestrahlt mit 200 J/m^2 UV-C, nach 30 min 80 % der CPDs repariert hat. Da sowohl Romano *et al.* (2007) als auch Götz *et al.* (2007) nicht die absolute Zahl der gebildeten CPDs nennen, sind die beiden Experimente schwer miteinander vergleichbar. Dass bei den in dieser Arbeit untersuchten Organismen auch Reparatur stattfindet, ist unumstritten, dennoch lässt sich über die genaue Dauer beziehungsweise Effizienz dieser Reparatur nur wenig sagen. Experimentbedingt ließen sich die Lebendkeimzahlen nur zu ungenau bestimmen, so dass die Verfolgung der genauen zeitlichen Abfolge der Reparatur nicht möglich war. Dies ließ sich veranschaulichen, indem die Lebendkeimzahl im Verlauf der Wachstumskurve einer definierten, geringen Anzahl (10^2) von *P. furiosus*-Zellen bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Nach einer Bestrahlung von 10^6 *P. furiosus*-Zellen mit 1000 J/m^2 überleben im Durchschnitt ebenfalls 10^2 Zellen. Es war kein Unterschied im Verlauf der Wachstumskurve zu erkennen, obwohl die bestrahlten Zellen, bedingt durch die Reparatur der Strahlenschäden, eine verlängerte Lag-Phase haben sollten. Zukünftig sollte der Reparaturvorgang der hier untersuchten Organismen, wie bei Romano *et al.* (2007) oder bei Götz *et al.* (2007), anhand der Abnahme der Anzahl der entstandenen DNA-Photoprodukte untersucht werden und nicht anhand der Lebendkeimzahl.

CPDs und 6-4-PPs werden in der Literatur als DNA-Hauptphotoprodukte nach UV-C-Bestrahlung beschrieben (Mitchell *et al.* 1989, Douki *et al.* 2001) und entstehen nach Strahlenexposition bei Organismen aus allen drei Domänen des Lebens. Sowohl Halobakterien (McCready *et al.* 2003), als auch Bakterien, wie *B. subtilis* (Möller *et al.* 2007 b) und *D. radiodurans* (Minton 1994) und eukaryotische Vertreter, wie Hefen (McCready *et al.* 1994) zeigen die in dieser Arbeit bestätigte Verteilung der DNA-Photoprodukte. Bei den hier untersuchten Organismen war die absolute Menge der gebildeten Hauptphotoprodukte einerseits fluenzabhängig, andererseits waren die beiden Hauptphotoprodukte untereinander organismus-spezifisch verteilt. Neben den DNA-Photoprodukten treten noch andere Schäden in der Zelle

wie zum Beispiel UV-C-induzierte DNA-Protein-Quervernetzung auf (Peak *et al.* 1991, Barker *et al.* 2005). Dies wäre eine Erklärung für die sinkende Menge an isolierbarer freier DNA. Durch DNA-Protein-Quervernetzungen geht die DNA während der DNA-Isolierung nicht mehr in die lösliche Phase über, sondern fällt mit den Proteinen aus und geht dadurch während der Isolierung verloren (Smith 1962). Archaeelle DNA steht in der Zelle in äußerst engem Kontakt zu histonähnlichen Proteinen, die bei den bakteriellen Vertretern fehlen (Pereira *et al.* 1998). Daher wäre es möglich, dass sich bei *S. solfataricus* zwischen den DNA-Bindeproteinen (Choli *et al.* 1988) und der DNA eine höhere Anzahl an Quervernetzungen ausbilden, als bei Organismen ohne histon-ähnliche DNA-Bindeproteine. Da kein Unterschied in der isolierbaren DNA-Menge nach UV-C-Bestrahlung zwischen Archaeen und Bakterien zu sehen war, ist davon auszugehen, dass sich nicht nur DNA-Protein-Quervernetzung zwischen histon-ähnlichen Proteinen und der DNA bilden, sondern generell zwischen zytoplasmatischen Proteinen beziehungsweise DNA-assoziierten Proteinen und der DNA.

Zelluläre Effekte nach ionisierender Strahlenexposition: In der Literatur sind zum Überleben verschiedener Archaeen nach Einwirken von ionisierender Strahlung nur wenige Daten vorhanden. Die meisten Experimente wurden mit *Halobacterium* sp. NRC-1 (Kotteman *et al.* 2005), verschiedenen *Thermococcus*-Vertretern (Jolivet *et al.* 2003, Jolivet *et al.* 2004) und *P. furiosus* (DiRuggiero *et al.* 1997) durchgeführt. Bei einigen der hier untersuchten Organismen konnte eine außergewöhnlich hoher Toleranz gegenüber ionisierender Strahlung gezeigt werden. Selbst nach einer Bestrahlung mit 20 kGy wurden bei *A. pyrophilus* und *I. hospitalis* lebende Zellen nachgewiesen. Die D_{10} -Werte der genannten Organismen nach Einwirkung von ionisierender Strahlung (2842 Gy beziehungsweise 1482 Gy) liegen unter den D_{10} -Werten, die in der Literatur für andere (Hyper-)Thermophile angegeben wurden (Jolivet *et al.* 2003, Jolivet *et al.* 2004). Anhand des hier ermittelten D_{10} -Wertes war *I. hospitalis* fünf- und *A. pyrophilus* zehnfach so strahlentolerant wie *E. coli*. *H. marinus*, verglichen mit *I. hospitalis* und *A. pyrophilus* ein strahlensensitiver Vertreter, ist dreimal so tolerant gegenüber ionisierender Strahlung wie *E. coli* und ungefähr gleich tolerant wie *B. subtilis*-Sporen. Der hier ermittelte D_{10} -Wert von *P. furiosus* (~ 1 kGy) liegt deutlich unter dem D_{10} -Wert, der von DiRuggiero *et al.* (1997) ermittelt wurde (3 kGy). Gründe hierfür könnten sein, dass *P. furiosus* bei DiRuggiero *et al.* (1997) in kleineren Dosisschritten bestrahlt wurde und sich so eine typisch geschulterte Überlebenskurve aufzeigen lässt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Überleben von *P. furiosus* nach Bestrahlung von 3,3 kGy, 5 kGy und 10 kGy bestimmt, womit man deutlich im exponentiell abfallenden Teil der Überlebenskurve lag, was die Berechnung des D_{10} -Wertes deutlich beeinflusste. Die hier ermittelten Überlebensraten nach

Bestrahlung mit 3,3 kGy beziehungsweise 5 kGy, sind die gleichen wie bei DiRuggiero *et al.* (1997).

Wie erwähnt, ist die Trockentoleranz bestimmter (Hyper-)Thermophiler von verschiedensten Parametern, wie zum Beispiel der Anwesenheit von Sauerstoff, beeinflusst. Zusätzlich spielt bei *I. hospitalis* die Gegenwart von *N. equitans* und bei den Sulfolobales-Vertretern der pH-Wert und das Substrat eine Rolle. Die Überlebensrate einiger Sulfolobales-Vertreter ist deutlich höher, wenn das Kulturmedium vor der Trocknung neutralisiert wird und wenn die Zellen auf Erz kultiviert werden (Beblo *et al.* 2009). Diese Effekte spielen beim Überleben nach Behandlung mit ionisierender Strahlung nur zum Teil eine Rolle. *M. sedula* und *S. metallicus* überlebten 5 kGy nur, wenn die Zellen auf Erz kultiviert und nicht vor der Bestrahlung neutralisiert wurden. Ähnliche Zusammenhänge zwischen pH und der Überlebensrate konnten von Stapleton und Engel (1960) für *E. coli* gezeigt werden. *E. coli*-Zellen überleben in einem Bestrahlungsmedium mit niedrigerem pH (pH 4,8) eine Behandlung mit ionisierender Strahlung zu einem höheren Prozentsatz, als in einem Bestrahlungsmedium mit basischerem pH-Wert (pH 8,4). Nach einer Kultivierung auf Erz, konnte auch bei Trocknungsexperimenten mit Sulfolobales-Vertretern eine höhere Überlebensrate beobachtet werden (Beblo *et al.* 2009). Die angesprochenen Sulfolobales-Vertreter wachsen auf den Erzpartikeln zum Teil in biofilmartigen Strukturen (Zolghadr *et al.* 2010); bei Schwefel- und Knallgaskulturen sind hingegen hauptsächlich Einzelzellen zu finden (Beblo 2006). Zum Einfluss von Biofilmbildung auf die Toleranz gegenüber Strahlung sind in der Literatur verschiedene Thesen zu finden. Bei verschiedenen *Salmonella*-Spezies konnte gezeigt werden, dass Zellen im Biofilm beziehungsweise als planktonisch Zellen gleich stark durch ionisierende Strahlung inaktiviert werden (Niemira *et al.* 2005). Andererseits überleben *Pseudomonas aeruginosa*-Zellen, bedingt durch die schützende Eigenschaft des Biofilms, eine UV-Exposition im Biofilm zu einem höheren Prozentsatz verglichen mit dem Überleben von Einzelzellen (Elasri *et al.* 1999). Dabei ist davon auszugehen, dass es sich bei dem von Elasri *et al.* (1999) beschriebenen Phänomen um Selbstbeschattungseffekte handelt. Eine stressinduzierte Biofilmbildung durch Änderung in der Wachstumstemperatur, dem pH-Wert oder durch eine Sauerstoffexposition wurde schon für mehrere Archaeen wie *A. fulgidus*, *M. thermoautotrophicus* und *M. jannaschii* (LaPaglia *et al.* 1997) und Bakterien beschrieben (Hall-Stoodley *et al.* 2004). LaPaglia *et al.* (1997) zeigten, dass es durch die Biofilmbildung bei *A. fulgidus* zu einer Toleranzerhöhung gegenüber diversen toxischen Umweltbedingungen kommt. In einem Biofilm lebende Zellen könnten untereinander, bedingt durch die räumliche Nähe, genetisches Material austauschen (Davey *et al.* 2000). Bei *S. solfataricus* wurde eine UV-induzierbare temporäre Aggregation nachgewiesen (Fröls *et al.* 2007; Fröls *et al.* 2008; Fröls *et al.* 2009). In diesem Fall ist der Zweck der Aggregation der Zellen weitgehend unbekannt. Durch die Bestrahlung der hier untersuchten Organismen könnte ebenfalls Biofilmbildung durch Aggregation ausge-

löst werden und es kann so zu einem Austausch von genetischem Material kommen, was durch die homologe Rekombination zur Reparatur von Strahlenschäden beitragen könnte. Beim Organismensystem *I. hospitalis* und *N. equitans* ist bis heute unklar, ob es sich um ein parasitäres oder symbiotisches System handelt. Zum Beispiel fehlen im Genom von *N. equitans* grundlegende Biosynthesewege; dadurch ist dieser Organismus von seinem Wirt abhängig (Waters *et al.* 2003). Andererseits ist *I. hospitalis* in seinem Wachstum durch die Anwesenheit von *N. equitans* wenig beeinflusst, was für ein kommensalistisches System spräche (Jahn *et al.* 2008). Die Trockentoleranz von *I. hospitalis* ist hingegen von der Anwesenheit von *N. equitans* beeinflusst. *I. hospitalis* überlebt Trocknung besser, wenn die Zellen vor der Trocknung axenisch kultiviert wurden. Diese Tatsache, die für ein parasitäres Verhältnis der beiden Organismen zueinander sprechen würde, konnte beim Überleben nach ionisierender Strahlung, beziehungsweise UV-C-Strahlung allerdings nicht bestätigt werden. Die Trockentoleranz nahezu aller getesteten Organismen war durch die Gegenwart von Sauerstoff negativ beeinflusst. Daher ist auch eine Rolle des Sauerstoffs bei der Toleranz gegenüber ionisierender Strahlung denkbar. Für eukaryotische und bakterielle Zellen ist seit langem bekannt, dass Sauerstoffabwesenheit beziehungsweise ein verminderter Sauerstoffgehalt im Bestrahlungsmedium zu geringeren Strahlungseffekten / Strahlungsschäden führt (Michaels *et al.* 1978, Howard-Flanders *et al.* 1957). Sauerstoff wird durch Behandlung mit ionisierender Strahlung in reaktive Sauerstoffradikale gespalten, daher spricht man sogar von Sauerstoff als Strahlensensibilisator (Kiefer 1989). Die Organismen mit den höchsten Überlebensraten nach ionisierender Bestrahlung sind entweder mikroaerophil (*A. pyrophilus*) oder strikt anaerob (*I. hospitalis*, *A. fulgidus*) und wurden in ihren entsprechenden Kultivierungsmedien bestrahlt. Dadurch war während der Bestrahlung, im Gegensatz zu den aeroben Organismen (Sulfolobales-Vertreter) nur wenig, oder kein Sauerstoff vorhanden, der zu einem zusätzlichen negativen Effekt hätte führen können. Bei den anaeroben Organismen ist standardmäßig ein Reduktionsmittel (Na_2S) im Kultivierungs- und somit auch im Bestrahlungsmedium vorhanden. Reduzierende Agenzien können direkt oder indirekt mit den entstandenen Schäden reagieren und könnten so zu einer chemischen „Ausheilung“ der entstandenen Schäden durch Übertragung eines H^+ -Atoms beitragen (Kiefer 1989). Inwiefern Na_2S während der hier durchgeführten Bestrahlungsexperimenten eine protektive Rolle spielen könnte, konnte im Rahmen der Arbeit nicht ermittelt werden. *A. pyrophilus* wurde in einem nichtreduzierten Medium mit ca. 1 % Sauerstoff kultiviert und bestrahlt. Da *A. pyrophilus*, trotz der Anwesenheit von geringen Sauerstoffkonzentrationen die höchste Überlebensrate nach Behandlung mit ionisierender Strahlung besitzt, können grundsätzliche negative Effekte durch geringe Sauerstoffkonzentrationen, als auch positive Effekte durch das Reduktionsmittel ausgeschlossen werden.

Toleranz (hyper-)thermophiler Mikroorganismen gegenüber H₂O₂

DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche entstehen nicht nur nach Einwirken von ionisierender Strahlung, sondern werden auch durch eine Behandlung mit H₂O₂ hervorgerufen (Riley 1994). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Überlebensfähigkeit nach ionisierender Bestrahlung und nach einer H₂O₂-Behandlung ist für Eukaryoten schon lange bekannt (Ward *et al.* 1985). Bei Eukaryoten entspricht eine 30-minütige Behandlung mit 50 µM H₂O₂ einer Bestrahlung mit 10 Gy. Da ein linearer Zusammenhang zwischen der Zeit und der errechneten Gray-Zahl besteht (Ward *et al.* 1985), kann gefolgert werden, dass eine 15-minütige Behandlung mit 50 mM H₂O₂ einer Bestrahlung mit 5 kGy entspricht. Dieser Zusammenhang passte näherungsweise zu den hier ermittelten Überlebenswerten nach Applikation von ionisierender Strahlung und H₂O₂-Behandlung von *A. pyrophilus*, *H. marinus*, *A. fulgidus* und *P. furiosus*. Der einzige Organismus, der eindeutig nicht diesem Zusammenhang folgte, ist *I. hospitalis*. Insgesamt liegen die Überlebenswerte beziehungsweise die D₁₀-Werte, im Vergleich zu Literaturwerten verschiedener Beispielorganismen, in der Größenordnung anderer vegetativer Zellen. So wird der D₁₀-Wert nach 15-minütiger H₂O₂-Behandlung für *E. coli* mit 13 mM (Arrange *et al.* 1993) und für vegetative *B. subtilis*-Zellen mit 10 mM angegeben (Naclerio *et al.* 1995). Wie oben erwähnt, können Reduktionsmittel eine protektive Rolle bei der radikalinduzierten Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen haben (Kiefer 1989). Inwiefern das Reduktionsmittel auch bei der H₂O₂-Behandlung eine mögliche protektive Rolle in den anoxischen Medien von *A. fulgidus*, *I. hospitalis* und *P. furiosus* spielte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Da sich aber die strikt anaeroben Organismen (*A. fulgidus*, *I. hospitalis*, *P. furiosus*) nach der H₂O₂-Behandlung nicht gleich verhalten, kann ein gravierender Einfluss durch das Medium ausgeschlossen werden. Bei dem Organismus mit der höchsten Toleranz gegenüber H₂O₂ (*A. pyrophilus*) und dem mit der niedrigsten Toleranz (*H. marinus*) handelt es sich um Organismen mit sehr ähnlichen Medienbedingungen (nicht reduziertes Medium mit 1 - 2 % O₂). Somit ist ein genereller Einfluss des Mediums und von Sauerstoff eher unwahrscheinlich. Die Toleranz gegenüber H₂O₂ sollte daher als eine organismus-spezifische Eigenschaft angesehen werden. *A. pyrophilus* und *H. marinus* gewinnen auf ähnliche Weise (durch die Knallgasreaktion) ihre Energie. Die H₂O₂-Toleranz der beiden Organismen könnte zum Beispiel mit der Anzahl und Lokalisation der Hydrogenasesysteme zusammenhängen. Bei *A. aeolicus*, einem engen Verwandten von *A. pyrophilus*, der sich zudem sehr ähnlich nach Behandlung mit ionisierender Strahlung verhält, konnten bisher drei Hydrogenasesysteme identifiziert und enzymatisch nachgewiesen werden. Zwei Hydrogenasesysteme sind in der Membran und eines im Periplasma von *A. aeolicus* lokalisiert (Brunga-Guiral *et al.* 2003). Man könnte annehmen, dass die membranassoziierten Hydrogenasesysteme bei Radikalbildung im umgebenden Milieu als erstes geschädigt wer-

den, aber dadurch auch Radikale abfangen. So bleibt aber immer noch das dritte System im Periplasma intakt und funktionsfähig. Mangels Genomsequenzen von *H. marinus* kann zur Anzahl und Lokalisation der Hydrogenasesysteme nichts gesagt werden.

Es wurde postuliert, dass intrazelluläre Schutzmechanismen gegen oxidative Schädigungen, die sowohl bei Trocknung als auch nach Bestrahlung auftreten, eine Schlüsselrolle spielen könnten (Daly *et al.* 2007). Ein funktionelles Superoxiddismutase- / Katalasesystem ist ein Beispiel für einen derartigen Schutzmechanismus. Superoxiddismutasen / Superoxidreduktasen erkennen reaktive Sauerstoffspezies, wie Superoxide (O_2^-) und Hydroxylradikale ($\cdot OH$) und wandeln sie zu H_2O_2 um. Anschließend wird H_2O_2 von Katalasen, Peroxidasen oder Hydroperoxidreduktasen entfernt (Seaver *et al.* 2001). Bei *A. aeolicus* sind drei Gene für Superoxiddismutasen im Genom vorhanden, jedoch fehlen Katalasen. Es konnten aber mehrere Peroxidasen, unter anderem eine Cytochrome-c-Peroxidase und eine Hydroperoxidreduktase auf Genomebene identifiziert werden, die die Entfernung von H_2O_2 übernehmen könnten (Deckert *et al.* 1998). Sollten diese Superoxiddismutasen / Peroxidasen auch bei *A. pyrophilus* vorhanden sein, könnten sie an der hohen Toleranz gegenüber Radikalen, entstanden durch Strahlung oder H_2O_2 , beteiligt sein. *A. fulgidus* besitzt ein Katalase- / Peroxidase-System (Klenk *et al.* 1997) und *P. furiosus* ein Superoxidreduktase / Peroxidase-System (Jenney *et al.* 1999), das nachweislich durch eine Behandlung mit ionisierender Strahlung induziert wird (Williams *et al.* 2007). Dennoch reagieren beide Organismen deutlich unterschiedlich auf ionisierende Strahlung, aber ähnlich nach H_2O_2 -Behandlung. *I. hospitalis* besitzt sowohl eine Superoxidreduktase (Podar *et al.* 2008), als auch ist ein zytoplasmatisches Peroxiredoxin-System in den Zellen nachweisbar (Burghardt *et al.* 2008). Entgegen des generellen Zusammenhangs zwischen Toleranz gegenüber Behandlung mit ionisierender Strahlung und Behandlung mit H_2O_2 (Riley 1994) verhielt sich *I. hospitalis* äußerst sensitiv gegenüber H_2O_2 und sehr resistent gegenüber ionisierender Bestrahlung. Auch wenn beide Behandlungen radikalbedingte DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche zur Folge haben, muss zumindest im Falle von *I. hospitalis* zwischen den Ursachen der Radikalbildung durch ionisierende Strahlung beziehungsweise durch H_2O_2 differenziert werden.

Es gibt eine Vielzahl von Genen, die sowohl an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach Strahlung als auch nach H_2O_2 -Behandlung beteiligt sind. So spielt RecG bei *D. radiodurans* eine elementare Rolle bei der Resistenz gegenüber ionisierender Bestrahlung und gegenüber einer H_2O_2 -Exposition (Wu *et al.* 2009). RadA oder das bakterielle Homolog RecA übernehmen sowohl eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Strahlenschäden bei *D. radiodurans* (Zhou *et al.* 2006) als auch bei der Reparatur von H_2O_2 -induzierten Schäden bei *E. coli* (Carlsson *et al.* 1980). Carlsson *et al.* (1980) postulieren, dass das *recA*-Genprodukt bei der H_2O_2 -Resistenz eine wichtigere Rolle spielt als Superoxiddismutasen und Katalasen. Obwohl bei allen untersuchten Organismen ein RecA / RadA-Gen im Genom identifizierbar

war, reagierten die untersuchten Organismen grundlegend unterschiedlich auf eine Behandlung mit ionisierender Strahlung beziehungsweise H_2O_2 . Es sollte somit deutlich werden, dass das Vorhandensein eines bestimmten Genes noch kein Grund für eine bestimmte Toleranz ist.

Reparatursysteme bei (hyper-)thermophilen Mikroorganismen

Im Gegensatz zu Hypothesen, dass (Hyper-)Thermophile in Anpassung an ihr Habitat eine besondere Ausstattung an Reparaturmechanismen besitzen könnten (Makarova *et al.* 2002), haben die hier untersuchten Mikroorganismen zum Teil nur eine minimale Grundausstattung an homologen Genen bekannter Reparaturmechanismen. Hier sei darauf hingewiesen, dass im Normalfall 30 – 50 % der Gene in einem sequenzierten Genom keine Funktion zugewiesen werden kann. Dies wiederum bedeutet, dass eventuelle neue Reparatursysteme nur äußerst schwer auffindbar sind. Die geringe Anzahl identifizierbarer Gene im Genom von *T. pendens* kann zusätzlich an dessen reduziertem Genom liegen (Anderson *et al.* 2008). Auch im Genom von *I. hospitalis* sind nur sehr wenige Homologe der bisher bekannten Reparaturgene zu finden, dennoch zeigt *I. hospitalis* aber eine sehr hohe Toleranz gegenüber Behandlung mit ionisierender Strahlung. Nach einer Bestrahlung mit 5 kGy konnten bei *D. radiodurans* ungefähr 200 Doppelstrangbrüche, entstanden aus direkten und indirekten Effekten der Strahlung nachgewiesen werden (Cox *et al.* 2005). Es wird davon ausgegangen, dass Strahlenexposition auf Genome und DNA im Allgemeinen gleich wirkt (Gerard *et al.* 2001). Daher müsste nach einer Bestrahlung mit 20 kGy das Genom von *I. hospitalis* stark fragmentiert vorliegen. Bei einer Genomgröße von 1,3 Mbp (Podar *et al.* 2008) sind nach der dieser Bestrahlung nur noch ca. 1600 bp lange Bruchstücke vorhanden. Wäre nicht ein äußerst effizientes, scheinbar bisher nicht identifiziertes Reparatursystem vorhanden, wäre eine Vermehrung nach der Bestrahlung nicht möglich. Bei *M. barkeri* und *M. mazei* sind keinerlei Unterschiede bezüglich der hier untersuchten Reparaturmechanismen im Genom zu finden. Dennoch verhalten sich diese beiden Organismen äußerst unterschiedlich nach Trocknung. Ähnliches gilt für die strahlentoleranten und die strahlenresistenten Organismen: es gibt auf genomischer Ebene kaum Unterschiede zwischen den jeweiligen Organismen. Sowohl bei *P. furiosus*, als auch bei einem *Sulfolobus*-Vertreter konnte gezeigt werden, dass RadA konstitutiv exprimiert wird und an der homologen Rekombination im jeweiligen Organismus beteiligt ist (Komori *et al.* 2000, Quaiser *et al.* 2008). Dennoch verhalten sich beide Organismen deutlich unterschiedlich nach Applikation von ionisierender Strahlung. Es gibt demnach keinen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von bestimmten Genen beziehungsweise deren Expression und der Überlebensfähigkeit nach Strahlung.

Bei den Genomanalysen wurde die phylogenetische Stellung der Archaeen zwischen den Bakterien und den Eukaryoten deutlich. So zeigen archaeele Reparaturmechanismen eher Homologien zu den eukaryotischen (Rad-Gene) als zu den bakteriellen Reparatursystemen (Rec-Gene). Dennoch sind auch bei Bakterien Rad-Gene zum Beispiel bei *A. aeolicus* und bei einigen Archaeen bestimmte Rec-Gene (zum Beispiel *recJ*) identifizierbar. Dies könnte mit einem potenziellen horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien und Archaeen in heißen Habitaten erklärt werden (Deppenmeier *et al.* 2002). Ein weiteres Protein, das sich wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer verbreitet hat, ist die reverse Gyrase (Forterre *et al.* 2000). (Hyper-)Thermophile Archaeen, aber auch thermophile Bakterien besitzen eine reverse Gyrase, die die DNA durch das Einfügen positiver Supercoils stark kondensiert und so vor Hitzedenaturierung schützen soll (Kikuchi *et al.* 1984, Brochier-Armanet *et al.* 2007). Dadurch könnten innere DNA-Abschnitte zum Beispiel vor UV-C-Strahlung geschützt sein, oder die reverse Gyrase könnte an Reparaturmechanismen beteiligt sein. Napoli und Kollegen (2004) zeigten, dass die reverse Gyrase nach UV-Behandlung an die geschädigte DNA von *S. solfataricus* bindet und so eine Rolle während der Reparatur spielen könnte.

Die meisten der untersuchten Organismen stammen ursprünglich aus Tiefsee-Habitaten und in dieser natürlichen Umgebung ist zwar zum Teil eine natürliche Radioaktivität vorhanden, aber es kam und kommt nicht zu derartig hohen Strahlenbelastungen (Cherry *et al.* 1992), noch traten und treten Zeiten der Trockenheit auf. Somit sollte eine direkte evolutionäre Ursache für die hohe Trocken- und Strahlentoleranz ausgeschlossen werden. Vielleicht handelt es sich bei diesen Toleranzen, wie auch schon bei *D. radiodurans* vermutet, um Nebeneffekte von anderen Toleranzen. Mattimore *et al.* (1996) nehmen an, dass die Strahlenresistenz von *D. radiodurans* nur ein Nebeneffekt der hohen Trockenresistenz ist. Die vorliegende Arbeit zeigt aber an mehreren Stellen, dass es bei allen untersuchten Mikroorganismen keine generellen Zusammenhänge zwischen der Überlebensfähigkeit nach zellschädigender Behandlung (Trocknung, Strahlung, H₂O₂-Behandlung) und einer zellulären Eigenschaft, wie (Hyper-)Thermophilie, Stoffwechsel, Wachstumstemperatur, Biofilmbildungsfähigkeit, Vorhandensein kompatibler Solute, histon-ähnlicher Proteine, sauerstoffradikalabfangender Systeme, bestimmter Reparaturgene oder einer reversen Gyrase gibt. Vieles spricht dafür, dass es sich bei der Fähigkeit, unter widrigen Umständen zu überleben, um ein spezies-spezifisches Zusammenspiel diverser zellulärer Fähigkeiten und Eigenschaften handelt. Die Strahlen- und die Trockentoleranz ist ein weit verbreitetes, nach heutigem Kenntnisstand nicht generell erklärbares Phänomen unter (hyper-)thermophilen Mikroorganismen zu sein. Selbst bei gut untersuchten Organismen wie *D. radiodurans* sind noch nicht alle zellulären Eigenschaften, die zu der außergewöhnlichen Resistenz gegenüber Trocknung und Strahlung führen bekannt. Beispielsweise wird dem hohen intrazellulären Mangan-(II)-

Konzentration von *D. radiodurans* eine Rolle bei der hohen Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung zugesprochen (Daly *et al.* 2004). Bei Archaeen wurden die zytoplasmatischen Mangan Konzentrationen bisher nicht untersucht; somit kann eine Rolle der Mn-Konzentration bei den hier untersuchten Organismen nicht ausgeschlossen werden. Außerdem liegen in einer einzigen *D. radiodurans*-Zelle je nach Wachstumsphase bis zu zehn Kopien des Genoms vor (Hansen 1978) und somit könnte eine homologe Rekombination nach Strahlenschädigung erleichtert werden (Daly *et al.* 1995, Zahradka *et al.* 2006). Eine Abhängigkeit der DNA-Doppelstrangbruchreparatur nach ionisierender Bestrahlung von der Genomkopienzahl konnten Krasin *et al.* (1977) auch bei *E. coli* feststellen. Unter den untersuchten Archaeen und Bakterien sind auch Vertreter mit mehreren Genomkopien zu finden. Beispielsweise sind bei *M. jannaschii* in der stationären Phase bis zu fünf Genomkopien in einer Zelle vorhanden (Malandrin *et al.* 1999). Sowohl bei *S. solfataricus*, als auch bei *A. fulgidus* wurden in der exponentiellen Phase bis zu zwei Genome und in der stationären Phase lediglich ein Genom identifiziert (Hjort *et al.* 1999, Maisnier-Patin *et al.* 2002). Bei *M. thermotrophicus* sind nahezu permanent zwei Genomkopien vorhanden (Majerník *et al.* 2005). Leider fehlen bis jetzt detaillierte Angaben zu der Genomkopienzahl bei den Organismen, die eine ionisierende Bestrahlung im Hochdosisbereich überleben (*A. pyrophilus*, *I. hospitalis*). Da sowohl eine wachstumsphasenabhängige Varianz in der Genomkopienzahl, als auch in der Resistenz gegenüber Stress zu finden ist (Keller *et al.* 1984, Aldsworth *et al.* 1999), wäre ein Zusammenhang zwischen der Genomkopienzahl und der Strahlentoleranz denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es noch keine endgültige Antwort gibt, warum manche der getesteten Organismen eine derartig hohe Toleranz gegenüber Trocknung und Strahlung besitzen. Bei den Toleranzen der (Hyper-)Thermophilen ist immer noch lediglich eine Beschreibung der einzelnen Phänomene möglich, ein direkter Zusammenhang dieser Fähigkeiten und einer einzelnen zellulären Eigenschaft konnte bis jetzt noch nicht gefunden werden. Eine Möglichkeit dem Zusammenhang auf den Grund zu gehen, wären beispielsweise Gen-Expressions-Analysen, wodurch einzelne bisher nicht annotierte Gene und deren Induktion / Expression identifiziert werden könnten. So könnte im Falle von *I. hospitalis* abgeklärt werden, ob ein bisher unbekannter Reparaturmechanismus vorliegt oder ob, wie im Falle von *P. furiosus* (Williams *et al.* 2007) das Superoxidreduktase- beziehungsweise das Peroxiredoxin-System durch Behandlung mit ionisierender Strahlung induzierbar ist. Des Weiteren wäre die Quantifizierung der entstandenen Schäden, zum Beispiel der DNA-Doppelstrangbrüche mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (DiRuggiero *et al.* 1997), nach einer bestimmten Behandlung von großer Wichtigkeit. Dadurch wäre auch eine detaillierte Verfolgung der Reparaturkinetik möglich.

Die getesteten (Hyper-)Thermophilen zeigten zum Teil unerwartete hohe Toleranzen gegenüber zellschädigender Behandlung. Dennoch lassen diese Behandlungen noch Spielraum für weitere Experimente offen: so ist nicht nur eine Strahlenexposition in noch höheren Dosen denkbar, sondern auch eine Exposition in einer Marssimulationskammer, in der sowohl die Strahlung, als auch Temperatur- / Feuchtigkeitsschwankungen und Atmosphärenbedingungen der Marsoberfläche simuliert werden (Pogoda de la Vega *et al.* 2007). Zukünftig könnten somit (Hyper-)Thermophile, sogar als neue Modellorganismen für Weltraumexpositionsexperimente Verwendung finden.

V Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war eine umfassende Analyse thermophiler und hyperthermophiler Archaeen und (hyper-)thermophiler, phylogenetisch tief abzweigender Bakterien bezüglich ihrer Toleranz gegenüber Trocknung und Strahlung. Dabei zeigten 12 von 18 getesteten Spezies, als vegetative Zellen eine zum Teil hohe Toleranz gegenüber Trockenheit. Es scheint, dass die Fähigkeit, Trocknung zu überdauern, ubiquitär im Stammbaum des Lebens verbreitet ist. Es handelt sich hierbei um ein spezies-spezifisches Merkmal, da unterschiedliche Toleranzlevel sowohl innerhalb einer Ordnung, als auch innerhalb einer Gattung zu finden sind. Die meisten Zellen sterben durch die anfängliche Trocknung und dies ist durch folgende Parameter beeinflusst: Temperatur, Sauerstoff, pH-Wert und Wachstumssubstrat. Anaerobe Organismen sind in ihren Überlebensraten während der Trocknung durch die Gegenwart von Sauerstoff stark beeinflusst. *T. tenax*, *T. pendens*, *M. thermoautotrophicus*, *M. jannaschii* und *Tv. ruber* können nur unter strikt anaeroben Bedingungen Perioden der Trockenheit überdauern. Einen vergleichsweise geringfügigen Einfluss auf die Überlebensrate nach Trocknung hatten die relative Luftfeuchtigkeit und eine Vakuum-Exposition während der Lagerung.

Eine große Rolle bei der Trockentoleranz scheinen die kompatiblen Solute bei *A. fulgidus* zu spielen. Nach Salzstress wird von *A. fulgidus* nahezu ausschließlich das kompatible Solut DGP mit Kalium als Gegenion in großen Mengen (98 mg/g TG) gebildet. Die Bildung von DGP nach Salzstress führte dabei zu einer drastischen Erhöhung der Überlebensrate nach Trocknung unter oxischen und anoxischen Trocknungsbedingungen.

Des Weiteren wurde das Überleben nach UV-C Bestrahlung sowohl in nicht-absorbierender Flüssigkeit als auch bei zwei Organismen nach Trocknung untersucht. Alle getesteten Organismen überlebten Fluenzen bis 1000 J/m² UV-C in Flüssigkeit. Im niedrigeren Fluenzbereich bis 100 J/m² konnte zum Teil eine typisch geschulterte Fluenz-Effekt-Kurve gezeigt werden. Bei einer Kombination von Strahlung und Trocknung kommt es zu einer Sensibilisierung der Zellen. Die Analyse der DNA-Photoprodukte nach UV-C-Bestrahlung zeigte, dass sich sowohl die Menge an DNA-Protein-Quervernetzungen als auch die Menge der entstehenden DNA-Dimere bei Archaeen und Bakterien nicht unterscheiden. Es sind die beiden typischen Hauptphotoprodukte (CPD; 6-4-PP) zu finden. Dabei ist deren prozentuale Verteilung einerseits spezies-spezifisch und andererseits mengenmäßig nur zum Teil fluenzabhängig.

Einige der getesteten Mikroorganismen besitzen eine außergewöhnlich hohe Toleranz gegenüber Einwirkung von ionisierender Strahlung. *A. pyrophilus* und *I. hospitalis* können Bestrahlungen mit einer Dosis von 20 kGy überleben. Bei einer derartig hohen Bestrahlung

liegt das Genom stark fragmentiert vor. Dennoch können diese Organismen ihr Genom reparieren und somit eine derartig hohe Strahlendosis überleben.

Zusätzlich konnte ein direkter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Strahlentoleranz gegenüber ionisierender Strahlung und einer hohen Überlebensrate nach H_2O_2 -Behandlung nachgewiesen werden.

Genomanalysen zeigen, dass alle strahlentoleranten Organismen eine Grundausstattung an Reparaturgenen besitzen; ob es außergewöhnliche Reparatursysteme gibt, die für die Reparatur einer solchen Anzahl von Doppelstrangbrüchen verantwortlich sein könnten ist noch ungeklärt.

Insgesamt scheinen (Hyper-)Thermophile zum Teil sehr hohe Toleranzen gegenüber zellschädigender Behandlung zu haben und könnten in Zukunft als neue Modellorganismen bei Weltraumexpositionsexperimenten dienen.

VI Literaturverzeichnis

- Abreu IA, Saraiva LM, Soares CM, Teixeira M, Cabelli DE (2001)** The mechanism of superoxide scavenging by *Archaeoglobus fulgidus* neelaredoxin. *J Biol Chem* 276:38995–39001
- Aldsworth TG, Sharman RL, Dodd CE (1999)** Bacterial suicide through stress. *Cell Mol Life Sci* 56:378–383
- Allen MB (1959)** Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. *Arch Microbiol* 32:270–277
- Alpert P (2005)** The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr Comp Biol* 45:685–695
- Ananthaswamy HN, Eisenstark A (1977)** Repair of hydrogen peroxide-induced single-strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 130:187–191
- Anderson I, Rodriguez J, Susanti D, Porat I, Reich C, Ulrich LE, Elkins JG, Mavromatis K, Lykidis A, Kim E, Thompson LS, Nolan M, Land M, Copeland A, Lapidus A, Lucas S, Detter C, Zhulin IB, Olsen GJ, Whitman W, Mukhopadhyay B, Bristow J, Kyrpides N (2008)** Genome sequence of *Thermofilum pendens* reveals an exceptional loss of biosynthetic pathways without genome reduction. *J Bacteriol* 190:2957–2965
- Aravind L, Walker DR, Koonin EV (1999)** Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* 27:1223–1242
- Arrage AA, Phelps TJ, Benoit RE, White DC (1993)** Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* 59:3545–3550
- Arrhenius S (1903)** Die Verbreitung des Lebens im Weltenraum. *Die Umschau* 7:481–485
- Baglioni P, Sabbatini M, Horneck G (2007)** Astrobiology experiments in low earth orbit: facilities, instrumentation, and results. In: Horneck G, Rettberg P (eds.) *Complete course in astrobiology*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Baker PW, Leff LG (2005)** Intraspecific differences in bacterial responses to modeled reduced gravity. *J Appl Microbiol* 98:1239–1246
- Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS (1979)** Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* 43:260–296

Baliga NS, Bjork SJ, Bonneau R, Pan M, Iloanusi C, Kottemann MCH, Hood L, DiRuggiero J (2004) Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halo-bacterium* NRC-1. *Genome Res* 14:1025–1035

Bao S, Shen X, Shen K, Liu Y, Wang XF (1998) The mammalian Rad24 homologous to yeast *Saccharomyces cerevisiae* Rad24 and *Schizosaccharomyces pombe* Rad17 is involved in DNA damage checkpoint. *Cell Growth Differ* 9:961–967

Barker HA (1936) Studies upon the methane-producing bacteria. *Arch Microbiol* 7:420–438

Barker S, Weinfeld M, Murray D (2005) DNA–protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutat Res* 589:111–135

Baross JA, Hoffman SE (1985) Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life. *Orig Life Evol Biosph* 15:327–345

Bauermeister A, Bentchikou E, Möller R, Rettberg P (2009) Roles of PprA, IrrE, and RecA in the resistance of *Deinococcus radiodurans* to germicidal and environmentally relevant UV radiation. *Arch Microbiol* 191:913–918

Beblo K (2006) Überleben von hyperthermophilen Mikroorganismen unter simulierten Weltraumbedingungen. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Universität Regensburg

Beblo K, Rabbow E, Rachel R, Huber H, Rettberg P (2009) Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation. *Extremophiles* 13:521–531

Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem* 276:24261–24267

Bentchikou E, Servant P, Coste G, Sommer S (2007) Additive effects of SbcCD and PolX deficiencies in the in vivo repair of DNA double-strand breaks in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 189:4784–4790

Bentchikou E, Servant P, Coste G, Sommer S (2010) A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet* 6:e1000774

Bieger-Dose A, Dose K, Meffert R, Mehler M, Risi S (1992) Extreme dryness and DNA-protein cross-links. *Adv Space Res* 12:265–270

Billi D, Friedmann EI, Hofer KG, Caiola MG, Ocampo-Friedmann R (2000) Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. *Appl Environ Microbiol* 66:1489–1492

Billi D, Potts M (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* 153:7–12

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Physiol Pharmacol* 37:911–917

Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 °C. *Extremophiles* 1:14–21

Bowater R, Doherty AJ (2006) Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet* 2:e8

Brendel V, Brocchieri L, Sandler SJ, Clark AJ, Karlin S (1997) Evolutionary comparisons of RecA-like proteins across all major kingdoms of living organisms. *J Mol Evol* 44:528–541

Brioukhanov A, Netrusov A, Sordel M, Thauer RK, Shima S (2000) Protection of *Methanosarcina barkeri* against oxidative stress: identification and characterization of an iron superoxide dismutase. *Arch Microbiol* 174:213–216

Brochier-Armanet C, Forterre P (2006) Widespread distribution of archaeal reverse gyrase in thermophilic bacteria suggests a complex history of vertical inheritance and lateral gene transfers. *Archaea* 2:83–93

Brock TD, Brock KM, Belly RT, Weiss RL (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Microbiol* 84:54–68

Brueschke EE, Suess RH, Willard M (1961) The viability of microorganisms in ultra-high vacuum. *Planet Space Sci* 8:30–34

Brugna-Guiral M, Tron P, Nitschke W, Stetter KO, Burlat B, Guigliarelli B, Bruschi M, Giudici-Ortoni MT (2003) [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: properties, function, and phylogenetics. *Extremophiles* 7:145–157

Burghardt T, Saller M, Gürster S, Müller D, Meyer C, Jahn U, Hochmuth E, Deutzmann R, Siedler F, Babinger P, Wirth R, Huber H, Rachel R (2008) Insight into the proteome of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*: the major cytosolic and membrane proteins. *Arch Microbiol* 190:379–94

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424:9–21

Cañas C, Carrasco B, Ayora S, Alonso JC (2008) The RecU Holliday junction resolvase acts at early stages of homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 36: 5242–5249

Cao Z, Mueller CW, Julin DA (2010) Analysis of the recJ gene and protein from *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair* 9:66–75

Carlsson J, Carpenter VS (1980) The *recA*⁺ gene product is more important than catalase and superoxide dismutase in protecting *Escherichia coli* against hydrogen peroxide toxicity. *J Bacteriol* 142:319–321

Cherry RD, Desbruyères M, Heyraud M, Nolan C (1992) High levels of natural radioactivity in hydrothermal vent polychaetes. *C R Acad Sci Paris III*, 21–26

Choli T, Henning P, Wittmann-Liebold B, Reinhardt R (1988) Isolation, characterization and microsequence analysis of a small basic methylated DNA-binding protein from the archaebacterium, *Sulfolobus solfataricus*. *Biochim Biophys Acta* 950:193–203

Chyba CF (2005) Rethinking earth's early atmosphere. *Science* 308:962–963

Clavero MRS, Monk JD, Beuchat LR, Doyle MP, Brackett RE (1994) Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonellae*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. *Appl Environ Microbiol* 60:2069–2075

Cockell C, Horneck G (2001) The history of the UV-radiation climate of the earth – theoretical and space-based observations. *Photochem Photobiol* 73:447–451

Constantinesco F, Forterre P, Elie C (2002) NurA, a novel 5'-3' nuclease gene linked to rad50 and mre11 homologs of thermophilic Archaea. *EMBO Rep* 3:537–542

Constantinesco F, Forterre P, Koonin EV, Aravind L, Elie C (2004) A bipolar DNA helicase gene, *herA*, clusters with rad50, mre11 and nurA genes in thermophilic archaea. *Nucleic Acids Res* 32:1439–1447

Cox CS (1993) Roles of water molecules in bacteria and viruses. *Orig Life Evol Biosph* 23:29–36

Cox MM, Battista JR (2005) *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol* 3:882–892

Crowley DJ, Boubriak I, Berquist BR, Clark M, Richard E, Sullivan L, DasSarma S, McCready S (2006) The *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photo-products in *Halobacterium* sp. NRC-1. *Saline Systems* 2:1–13

Daboussi F, Dumay A, Delacôte F, Lopez BS (2002) DNA double-strand break repair signaling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal* 14:969–975

Daly MJ, Minton KW (1995) Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 177:5495–5505

Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Venkateswaran A, Hess M, Omelchenko MV, Kostandarithes HM, Makarova KS, Wackett LP, Fredrickson JK, Ghosal D (2004) Accumulation of Mn (II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306:1025–1028

Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Leapman RD, Lai B, Ravel B, Li SW, Kemner KM, Fredrickson JK (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol* 5:769–779

Daly MJ (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol* 7:237–245

DasSarma S, Kennedy SP, Berquist B, Ng WV, Baliga NS, Spudich JL, Krebs MP, Eisen JA, Johnson CH, Hood L (2001) Genomic perspective on the photobiology of *Halobacterium* species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon. *Photosynth Res* 70:3–17

Davey ME, O'Toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847–867

David SS, Williams SD (1998) Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair. *Chem Rev* 98:1221–1262

Deckert G, Warren PV, Gaasterland T, Young WG, Lenox AL, Graham DE, Overbeek R, Snead MA, Keller M, Aujay M, Huber R, Feldman RA, Short JM, Olsen GJ, Swanson RV (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392:353–358

Deppenmeier U, Johann A, Hartsch T, Merkl R, Schmitz RA, Martinez-Arias R, Henne A, Wiezer A, Bäumer S, Jacobi C, Brüggemann H, Lienard T, Christmann A, Bömeke M, Steckel, Bhattacharyya A, Lykidis A, Overbeek R, Klenk HP, Gunsalus PR, Fritz HJ, Gottschalk G (2002) The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4:453–461

DiGiulio M (2000) The universal ancestor lives in a thermophilic or hyperthermophilic environment. *J Theo Biol* 203:203–213

DiGiulio M (2003) The universal ancestor and the ancestor of bacteria were hyperthermophiles. *J Mol Evol* 57:721–730

DiRuggiero J, Santangelo N, Nackerdien Z, Ravel J, Robb FT (1997) Repair of extensive ionizing-radiation DNA damage at 95°C in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* 179:4643–4645

DiRuggiero J, Brown JR, Bogert AP, Robb FT (1999) DNA repair systems in archaea: mementos from the last universal common ancestor? *J Mol Evol* 49:474–484

Ditzel L, Loewe J, Stock D, Stetter KO, Huber H, Huber R, Steinbacher S (1998) Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* 93:125–138

Dorrell N, Ahmed AH, Moss SH (2008) Photoreactivation in a *phrB* mutant of *Escherichia coli*: evidence for the role of a second protein in photorepair. *Photochem Photobiol* 58:831–835

Dose K, Bieger-Dose A, Kerz O, Gill M (1991) DNA-strand breaks limit survival in extreme dryness. *Origins Life Evol Biosph* 21:177–187

Dose K, Bieger-Dose A, Labusch M, Gill M (1992) Survival in extreme dryness and DNA-single-strand breaks. *Adv Space Res* 12:221–229

Douki T, Cadet J (2001) Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry* 40:2495–501

Douki T, Vadesne-Bauer G, Cadet J (2002) Formation of 2'-deoxyuridine hydrates upon exposure of nucleosides to gamma radiation and UVC-irradiation of isolated and cellular DNA. *Photochem Photobiol Sci* 1:565–569

Douki T, Cadet J (2003) Formation of the spore photoproduct and other dimeric lesions between adjacent pyrimidines in UVC-irradiated dry DNA. *Photochem Photobiol Sci* 2:433–436

Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148:1667–1686

Duan Z (2009) Genetic analysis of two structure-specific endonucleases Hef and Fen1 in archaeon *Haloferax volcanii*. PhD thesis, University of Nottingham

Earl AM, Rankin SK, Kim KP, Lamendola ON, Battista JR (2002) Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *J Bacteriol* 184:1003–1009

Eisen JA (1998) A phylogenomic study of the MutS family of proteins. *Nucleic Acids Res* 26:4291–4300

Eisen JA, Hanawalt PC (1999) A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat Res* 435:171–213

Elasri MO, Miller RV (1999) Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 65: 2025–2031

Empadinhas N, daCosta MS (2008) Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int Microbiol* 11:151–161

- Erdmann N, Effmert U, Fulda S, Oheim S (1997)** Effect of gravity changes on the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr Microbiol* 35:348–355
- Evans DM, Moseley BE (1983)** Roles of the *uvrC*, *uvrD*, *uvrE*, and *mtcA* genes in the two pyrimidine dimer excision repair pathways of *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 156:576–583
- Fan L, Arvai AS, Cooper PK, Iwai S, Hanaoka F, Tainer JA (2006)** Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: implications for pathway selection of transcription or excision repair. *Mol Cell* 22:27–37
- Fajardo-Cavazos P, Link L, Melosh HJ, Nicholson WL (2005)** *Bacillus subtilis* spores on artificial meteorites survive hypervelocity atmospheric entry: implications for lithopanspermia. *Astrobiology* 6:726–736
- Fajardo-Cavazos P, Langenhorst F, Melosh HJ, Nicholson WL (2009)** Bacterial spores in granite survive hypervelocity launch by spallation: implications for lithopanspermia. *Astrobiology* 9:647–657
- Felzenszwalb I, Boiteux S, Laval J (1992)** Molecular cloning and DNA sequencing of the *radC* gene of *Escherichia coli* K-12. *Mutat Res* 273:263–269
- Fetzer S, Bak F, Conrad R (1993)** Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. *FEMS Microbiol Ecol* 12:107–115
- Fiala G, Stetter KO (1986)** *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C. *Arch Microbiol* 145:56–61
- Fleck O, Nielsen O (2004)** DNA repair. *J Cell Sci* 117:515–517
- Forterre P, Bouthier De La Tour C, Philippe H, Duguet M (2000)** Reverse gyrase from hyperthermophiles: probable transfer of a thermoadaptation trait from Archaea to Bacteria. *Trends Genet* 16:152–154
- Franson MAH (ed.) (1985)** Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th edition, American Public Health Association, Washington DC (USA)
- Friedberg EC (2003)** DNA damage and repair. *Nature* 421:436–440
- Fritz J, Artemieva NA, Greshake A (2005)** Ejection of martian meteorites. *Meteorit Planet Sci* 9/10:1393–1412
- Fröls S, Gordon PMK, Panlilio MA, Duggin IG, Bell SD, Sensen CW, Schleper C (2007)** Response of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* to UV damage. *J Bacteriol* 189: 8708–8711

Fröls S, Ajon M, Wagner M, Teichmann D, Zolghadr B, Folea M, Boekema EJ, Driessen AJ, Schleper C, Albers SV (2008) UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Mol Microbiol* 70:938–952

Fröls S, White MF, Schleper C (2009) Reactions to UV damage in the model archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem Soc Trans* 37:36–41

Funayama T, Narumi I, Kikuchi M, Kitayama S, Watanabe H, Yamamoto K. (1999) Identification and disruption analysis of the recN gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat Res* 435:151–161

Galinski EA (1986) Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen phototrophen Bakterien. Dissertation, Universität Bonn

Gérard E, Jolivet E, Prieur D, Forterre P (2001) DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *Mol Genet Genomics* 266:72–78

Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (eds.) (1994) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology (2nd Edition)

Gladyshev E, Meselson M (2008) Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5139–5144

Götz D, Paytubi S, Munro S, Lundgren M, Bernander R, White MF (2007) Responses of hyperthermophilic crenarchaea to UV irradiation. *Genome Biol* 8:R220

Goosen N, Moolenaar GF (2008) Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)* 7:353–379

Griffiths E, Gupta RS (2004) Signature sequences in diverse proteins provide evidence for the late divergence of the Order Aquificales. *Int Microbiol* 7:41–52

Grogan DW (1989) Phenotypic characterization of the archaebacterial genus *Sulfolobus*: Comparison of five wild-type strains. *J Bacteriol* 171:6710–6719

Grogan DW (1997) Photoreactivation in an archaeon from geothermal environments. *Microbiology* 143:1071–1076

Grogan DW (1998) Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Mol Microbiol* 28:1043

Grogan DW (2000) The question of DNA-repair in hyperthermophilic archaea. *Trends Microbiol* 8:180–185

- Grogan DW (2004)** Stability and Repair of DNA in hyperthermophilic Archaea. *Curr Issues Mol Biol* 6:137–144
- Halliday I, Blackwell A, Griffin AA (1989)** The flux of meteorites on the earth's surface. *Meteoritics* 24:173–178
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004)** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95–108
- Handa N, Morimatsu K, Lovett ST, Kowalczykowski SC (2009)** Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes Dev* 23:1234–1245
- Hansen MT (1978)** Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 134:71–75
- Harm W (1980)** Biological effects of ultraviolet radiation. Cambridge University Press, Cambridge
- Haseltine CA, Kowalczykowski SC (2009)** An archaeal Rad54 protein remodels DNA and stimulates DNA strand exchange by RadA. *Nucleic Acids Res* 37:2757–2770
- Harrington JJ, Lieber MR (1994)** Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure-specific endonucleases: Implications for nucleotide excision repair. *Genes Dev* 8:1344–1355
- Hincha DK, Hagemann M (2004)** Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem J* 383:277–283
- Hjort K, Bernander R (1999)** Changes in cell size and DNA content in *Sulfolobus* cultures during dilution and temperature shift experiments. *J Bacteriol* 181: 5669–5675
- Holland HD (1984)** The chemical evolution of the atmosphere and oceans. Princeton University Press, Princeton, New Jersey
- Holloman WK, Schirawski J, Holliday R (2007)** Towards understanding the extreme radiation resistance of *Ustilago maydis*. *Trends Microbiol* 15:525–529
- Hopfner KP, Karcher A, Shin D, Failey C, Tainer JA, Carney JP (2000)** Mre11 and Rad50 from *Pyrococcus furiosus*: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine. *J Bacteriol* 182:6036–6041
- Horneck G (1993)** Responses of *Bacillus subtilis* spores to the space environment: results from experiments in space. *Origins Life Evol Biosph* 23:37–52
- Horneck G, Bücker H, Reitz G (1994)** Long-term survival of bacterial spores in space. *Adv Space Res* 14:1041–1045

- Horneck G (1998)** Exobiological experiments in Earth orbit. *Adv Space Res* 22:317–326
- Horneck G, Stöffler D, Eschweiler U, Hornemann U (2001 a)** Bacterial spores survive simulated meteorite impact. *Icarus* 149:285–290
- Horneck G, Rettberg P, Reitz G, Wehner J, Eschweiler U, Strauch K, Panitz C, Starke V, Baumstark-Khan C (2001 b)** Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on panspermia. *Orig Life Evol Biosph* 31:527–547
- Horneck G, Stöffler D, Ott S, Hornemann U, Cockell CS, Möller R, Meyer C, de Vera JP, Fritz J, Schade S, Artemieva NA (2008)** Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8:17–44
- Horneck G, Klaus DM, Mancinelli RL (2010)** Space microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:121–156
- Hopkins BB, Paull TT (2008)** The *P. furiosus* Mre11/Rad50 complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break. *Cell* 135:250–260
- Hosfield DJ, Frank G, Weng Y, Tainer JA, Shen B (1998)** Newly discovered archaeobacterial flap endonucleases show a structure-specific mechanism for DNA substrate binding and catalysis resembling human flap endonuclease-1. *J Biol Chem* 273:27154–27161
- Howard-Flanders P, Alper T (1957)** The sensitivity of microorganisms to irradiation under controlled gas conditions. *Radiat Res* 7:518–40
- Huber G, Spinnler C, Gambacorta A, Stetter KO (1989)** *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacetophilic archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* 12:38–47
- Huber G, Stetter KO (1991)** *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a novel strictly chemolithotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. *Syst Appl Microbiol* 14:372–378
- Huber H, Thomm M, König H, Thies G, Stetter KO (1982)** *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Arch Microbiol* 132:47–50
- Huber H, Burggraf S, Mayer T, Wyschkony I, Rachel R, Stetter KO (2000)** *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:2093–2100
- Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO (2002 a)** A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417:63–67

Huber H, Diller S, Horn C, Rachel R (2002 b) *Thermovibrio ruber* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-reducing bacterium that forms a deep branch within the phylum Aquificae. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1859–1865

Huber R, Wilharm T, Huber D, Trincone A, Burggraf S, Koenig H, Rachel R, Rockinger I, Fricke H, Stetter KO (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacterium. *Syst Appl Microbiol* 15:340–351

Huber R, Eder W, Heldwein S, Wanner G, Huber H, Rachel R, Stetter KO (1998) *Thermocrinis ruber* gen. nov., sp. nov., a pink-filament-forming hyperthermophilic bacterium isolated from yellow-stone national park. *Appl Environ Microbiol* 64:3576–3583

Huber R, Eder W (2006) Aquificales. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.) *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Springer, New York

Hungate RE (1950) The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev* 14:1–49

Hutchinson F (1985) Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32:115–154

Jahn U, Gallenberger M, Paper W, Junglas B, Eisenreich W, Stetter KO, Rachel R, Huber H (2008) *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: new insights into a unique, intimate association of two Archaea. *J Bacteriol* 190:1743–1750

Jenney Jr. FE, Verhagen MFJM, Cui X, Adams MWW (1999) Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science* 286:306–309

Johnson HA, Hampton E, Lesley SA (2009) The *Thermotoga maritima* Trk potassium transporter – from frameshift to function. *J Bacteriol* 191:2276–2284

Jolivet E, L'Haridon S, Corre E, Forterre P, Prieur D (2003) *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:847–851

Jolivet E, Corre E, L'Haridon S, Forterre P, Prieur D (2004) *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles* 8:219–227

Jones W, Leigh J, Mayer F, Woese C, Wolfe R (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch Microbiol* 136:254–261

Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC (1998) Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* 8:483–489

Kanno S, Iwai S, Takao M, Yasui A (1999) Repair of apurinic/apyrimidinic sites by UV damage endonuclease; a repair protein for UV and oxidative damage. *Nucleic Acids Res* 27:3096–103

Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y (1984) *Hydrogenobacter thermophilus* gen. nov. sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 34:5–10

Keller LC, Maxcy RB (1984) Effect of physiological age on radiation resistance of some bacteria that are highly radiation resistant. *Appl Environ Microbiol* 47:915–918

Kelman Z, White MF (2005) Archaeal DNA replication and repair. *Curr Opin Microbiol* 8:669–676

Kelner A (1949) Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 35:73–79

Kidane D, Sanchez H, Alonso JC, Graumann PL (2004) Visualization of DNA double-strand break repair in live bacteria reveals dynamic recruitment of *Bacillus subtilis* RecF, RecO and RecN proteins to distinct sites on the nucleoids. *Mol Microbiol* 52:1627–1639

Kiefer J (1989) Biologische Strahlenwirkung: eine Einführung in die Grundlagen von Strahlenschutz und Strahlenanwendung. Zweite, durchgesehene und ergänzte Auflage, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin

Kiener A, Gall R, Rechsteiner T, Leisinger T (1985) Photoreactivation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* 143:147–150

Kiener A, Husain I, Sancar A, Walsh C (1989) Purification and properties of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DNA photolyase. *J Mol Biochem* 264:13880–13887

Kikuchi A, Asai K (1984) Reverse gyrase-a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature* 309:677–681

Kim K, Biade S, Matsumoto Y (1998) Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *J Biol Chem* 273:8842–8848

Kish A, DiRuggiero J (2008) Rad50 is not essential for the Mre11-dependent repair of DNA double-strand breaks in *Halobacterium* sp. strain NRC-1. *J Bacteriol* 190:5210–5216

Kish A, Kirkali G, Robinson C, Rosenblatt R, Jaruga P, Dizdaroglu M, DiRuggiero J (2009) Salt shield: intracellular salts provide cellular protection against ionizing radiation in the halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum* NRC-1. *Environ Microbiol* 11:1066–1078

Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA, Dodson RJ, Gwinn M, Hickey EK, Peterson JD, Richardson DL, Kerlavage AR, Graham DE, Kyrpides NC, Fleischmann RD, Quackenbush J, Lee NH, Sutton GG, Gill S, Kirkness EF, Dougherty BA, McKenney K, Adams MD, Loftus B, Peterson S, Reich CI, McNeil LK, Badger JH, Glodek A, Zhou L, Overbeek R, Gocayne JD, Weidman JF, McDonald L, Utterback T, Cotton MD, Spriggs T, Artiach P, Kaine BP, Sykes SM, Sadow PW, D'Andrea KP, Bowman C, Fujii C, Garland SA, Mason TM, Olsen GJ, Fraser CM, Smith HO, Woese CR, Venter CJ (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390:364–370

Klimke W, Agarwala R, Badretdin A, Chetvernin S, Ciufo S, Fedorov B, Kiryutin B, O'Neill K, Resch W, Resenchuk S, Schafer S, Tolstoy I, Tatusova T (2009) The National Center for Biotechnology Information's Protein Clusters Database. *Nucleic Acids Res* 37:216–223

Kluyver AJ, Schnellen GTP (1947) Fermentation of carbon monoxide by pure cultures of methane bacteria. *Arch Biochem* 14:57–70

Koltovaia NA, Nikulushkina YV, Poshchina MP, Devin AB (2008) Interaction between checkpoint genes RAD9, RAD17, RAD24, and RAD53 involved in the determination of yeast *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity to ionizing radiation. *Genetika* 44:1045–1055

Komori K, Miyata T, DiRuggiero J, Holley-Shanks R, Hayashi I, Cann IK, Mayanagi K, Shinagawa H, Ishino Y (2000) Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 275:33782–33790

Komori K, Fujikane R, Shinagawa H, Ishino Y (2002) Novel endonuclease in Archaea cleaving DNA with various branched structure. *Genes Genet Syst* 77:227–241

Kopylov VM, Bonch-Osmolovskaya EA, Svetlichnyi VA, Miroshnichenko ML, Skobkin VS (1993) γ -resistance and UV-sensitivity of extremely thermophilic archaebacteria and eubacteria. *Mikrobiologiya* 62:90–95

Kottemann M, Kish A, Iloanusi C, Bjork S, DiRuggiero J (2005) Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC1 to desiccation and gamma irradiation. *Extremophiles* 9:219–227

Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, Rehrauer WM (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58:401–465

Kraegeloh A, Kunte HJ (2002) Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles* 6:453–462

Krasin F, Hutchinson F (1977) Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*, which requires recA function and the presence of a duplicate genome. *J Mol Biol* 166:81–98

Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325:1–16

Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74:681–710

Kurz M (2008) Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. *Saline Systems* 4:6

Lamosa P, Burke A, Peist R, Huber R, Liu MY, Silva G, Rodrigues-Pousada C, LeGall J, Maycock C, Santos H (2000) Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol* 66:1974–1979

Lamosa P, Gonçalves LG, Rodrigues MV, Martins LO, Raven NDH, Santos H (2006) Occurrence of 1-glyceryl-1-*myo*-inosityl phosphate in hyperthermophiles. *Appl Environ Microbiol* 72:6169–6173

LaPaglia C, Hartzell PL (1997) Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol* 63:3158–3163

LeClerc JE, Borden A, Lawrence CW (1991) The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone (6-4) ultra-violet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transition in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9685–9689

Lee BI, Kim KH, Park SJ, Eom SH, Song HK, Suh SW (2004) Ring-shaped architecture of RecR: implications for its role in homologous recombinational DNA repair. *EMBO J* 23:2029–2038

Lentzen G, Schwarz T (2006) Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:623–634

Lin Z, Kong H, Nei M, Ma H (2006) Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10328–10333

Lin Z, Nei M, Ma H (2007) The origins and early evolution of DNA mismatch repair genes – multiple horizontal gene transfers and co-evolution. *Nucleic Acids Res* 35: 7591–7603

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715

Lippert K, Galinski EA (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* 37:61–65

Lombardo MJ, Rosenberg SM (2000) *RadC102* of *Escherichia coli* is an allele of *recG*. *J Bacteriol* 182:6287–6291

- Louis P, Trüper HG, Galinski EA (1994)** Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:684–688
- Maisnier-Patin S, Malandrin L, Birkeland NK, Bernander R (2002)** Chromosome replication patterns in the hyperthermophilic euryarchaea *Archaeoglobus fulgidus* and *Methanocaldococcus* (*Methanococcus*) *jannaschii*. *Mol Microbiol* 45:1443–1450
- Majernik AI, Lundgren M, McDermott P, Bernander R, Chong JP (2005)** DNA content and nucleoid distribution in *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *J Bacteriol* 187:1856–1858
- Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV (2002)** A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and Bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res* 30:482–496
- Malandrin L, Huber H, Bernander R (1999)** Nucleoid structure and partition in *Methanococcus jannaschii*: an archaeon with multiple copies of the chromosome. *Genetics* 152:1315–1323
- Manfredi C, Carrasco B, Ayora S, Alonso JC (2008)** *Bacillus subtilis* RecO nucleates RecA onto SsbA-coated single-stranded DNA. *J Biol Chem* 283:24837–24847
- Martins LO, Santos H (1995)** Accumulation of mannosylglycerate and di-*myo*-inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Appl Environ Microbiol* 61:3299–3303
- Martins LO, Huber R, Huber H, Stetter KO, Da Costa MS, Santos H (1997)** Organic solutes in hyperthermophilic Archaea. *Appl Environ Microbiol* 63:896–902
- Mastrapa RME, Glanzberg H, Head JN, Melosh HJ, Nicholson WL (2001)** Survival of bacteria exposed to extreme acceleration: implications for panspermia. *Earth Planet Sci Lett* 189:1–8
- Mattimore V, Battista R (1996)** Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bacteriol* 178:633–637
- McCready S, Carr AM, Lehmann AR (1993)** Repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photo-products in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 10:885–890
- McCready S, Marcello L (2003)** Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum*. *Biochem Soc Trans* 31:694–698
- McCready S, Müller JA, Boubriak I, Berquist BR, Ng WL, DasSarma S (2005)** UV irradiation induces homologous recombination genes in the model archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. *Saline Systems* 1:3

Mcllwraith MJ, Hall DR, Stasiak AZ, Stasiak A, Wigley DB, West SC (2001) RadA protein from *Archaeoglobus fulgidus* forms rings, nucleoprotein filaments, and catalyses homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 29:4509–4517

Melosh HJ (2003) Exchange of meteorites (and life?) between stellar systems. *Astrobiology* 3:207–215

Mennecier S, Coste G, Servant P, Bailone A, Sommer S (2004) Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol Gen Genomics* 272:460–469

Michaels HB, Epp ER, Ling CC, Peterson EC (1978) Oxygen sensitization of CHO cells at ultrahigh dose rates: prelude to oxygen diffusion studies. *Radiat Res* 76:510–521

Mileikowsky C, Cucinotta FA, Wilson JW, Gladman B, Horneck G, Lindegren L, Melosh J, Rickman H, Valtonen M, Zheng JQ (2000) Natural transfer of viable microbes in space. *Icarus* 145:391–427

Miller TL, Wolin MJ (1974) A serum bottle modification of the hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27:985–987

Minton KW (1994) DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 13:9–15

Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49:805–819

Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y (2000) Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* 41:251–255

Möller R, Stackebrandt E, Reitz G, Berger T, Rettberg P, Doherty AJ, Horneck G, Nicholson WL (2007 a) Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J Bacteriol* 189:3306–3311

Möller R, Stackebrandt E, Douki T, Cadet J, Rettberg P, Mollenkopf HJ, Reitz G, Horneck G (2007 b) DNA bipyrimidine photoproduct repair and transcriptional response of UV-C irradiated *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* 188:421–431

Mojzsis SJ, Arrhenius G, McKeegan KD, Harrison TM, Nutman AP, Friend CRL (1996) Evidence for Life on earth before 3,800 million years ago. *Nature* 384:55–59

Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods* 66:183–193

- Morozova D, Wagner D (2007)** Stress response of methanogenic archaea from siberian permafrost compared with methanogens from non permafrost habitats. *FEMS Microbiol Ecol* 61:16–25
- Naclerio G, Baccigalupi L, Caruso C, De Felice M, Ricca E (1995)** *Bacillus subtilis* vegetative catalase is an extracellular enzyme. *Appl Environ Microbiol* 61:4471–4473
- Napoli A, Valenti A, Salerno V, Nadal M, Garnier F, Rossi M, Ciaramella M (2004)** Reverse gyrase recruitment to DNA after UV light irradiation in *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* 279: 33192–33198
- Newcombe DA, Schuerger AC, Benardini JN, Dickinson D, Tanner R, Venkateswaran K (2005)** Survival of spacecraft-associated microorganisms under simulated martian UV irradiation. *Appl Environ Microbiol* 71:8147–8156
- Newman M, Murray-Rust J, Lally J, Rudolf J, Fadden A, Knowles PP, White MF, McDonald NQ (2005)** Structure of an XPF endonuclease with and without DNA suggests a model for substrate recognition. *EMBO J* 24:895–905
- Ng WV, Kennedy SP, Mahairas GG, Berquist B, Pan M, Shukla HD, Lasky SR, Baliga NS, Thorsen V, Sbrogna J, Swartzell S, Weir D, Hall J, Dahl TA, Welti R, Goo YA, Leithauser B, Keller K, Cruz R, Danson MJ, Hough DW, Maddocks DG, Jablonski PE, Krebs MP, Angevine CM, Dale H, Isenbarger TA, Peck RF, Pohlschroder M, Spudich JL, Jung HJ, Alam M, Freitas T, Hou S, Daniels CJ, Dennis PP, Omer AD, Ebhardt H, Lowe TM, Liang P, Riley M, Hood L, DasSarma S (2000)** Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12176–12181
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HL, Setlow P (2000)** Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:548–572
- Nicholson WL (2009)** Ancient micronauts: interplanetary transport of microbes by cosmic impacts. *Trends Microbiol* 17:243–250
- Niemira BA, Solomon EB (2005)** Sensitivity of planktonic and biofilm-associated *Salmonella* spp. to ionizing radiation. *Appl Environ Microbiol* 71:2732–2736
- Nisbet EG, Sleep NH (2001)** The habitat and nature of the early life. *Nature* 409:1083–1091
- Noll DM, Mason TM, Miller PS (2006)** Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev* 106:277–301
- Ögrünç M, Becker DF, Ragsdale SW, Sancar A (1998)** Nucleotide excision repair in the third kingdom. *J Bacteriol* 180:5796–5798
- Ogawa T, Yu X, Shinohara A, Egelman EH (1993)** Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science* 259:1896–1899

Olson KD, McMahon CW, Wolfe RS (1991) Light sensitivity of methanogenic archaeobacteria. *Appl Environ Microbiol* 57:2683–2686

Olsson-Francis K, de la Torre R, Cockell CS (2010) Isolation of novel extreme-tolerant cyanobacteria from a rock-dwelling microbial community by using exposure to low earth orbit. *Appl Environ Microbiol* 76:2115–2121

Osman S, Peeters Z, La Duc MT, Mancinelli R, Ehrenfreund P, Venkateswaran K (2008) Effect of shadowing on survival of bacteria under conditions simulating the martian atmosphere and UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 74:959–970

Paper W, Jahn U, Hohn M, Kronner M, Näther D, Burghardt T, Rachel R, Stetter KO, Huber H (2007) *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of '*Nanoarchaeum equitans*'. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:803–808

Pâques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:349–404

Parisi A, Antoine AD (1974) Increased radiation resistance of vegetative *Bacillus pumilus*. *Appl Microbiol* 28:41–46

Peak JG, Peak MJ (1991) Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and single-strand breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and X-rays. *Mutat Res* 246:187–191

Peak MJ, Robb FT, Peak JG (1995) Extreme resistance to thermally induced DNA backbone breaks in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* 177: 6316–6318

Pereira SL, Reeve JN (1998) Histones and nucleosomes in archaea and eukarya: a comparative analysis. *Extremophiles* 2:141–148

Phipps BM, Hoffmann A, Stetter KO, Baumeister W (1991) A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *EMBO J* 10:1711–1722

Pley U, Schipka J, Gambacorta A, Jannasch HW, Fricke H, Rachel R, Stetter KO (1991) *Pyrodictium abyssi*, new species represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110 °C. *Syst Appl Microbiol* 14:245–253

Podar M, Anderson I, Makarova KS, Elkins JG, Ivanova N, Wall MA, Lykidis A, Mavromatis K, Sun H, Hudson ME, Chen W, Deciu C, Hutchison D, Eads JR, Anderson A, Fernandes F, Szeto E, Lapidus A, Kyrpides NC, Saier Jr. MH, Richardson PM, Rachel R, Huber H, Eisen JA, Koonin EV, Keller M, Stetter KO (2008) A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis* *Nanoarchaeum equitans*. *Genome Biol* 9:R158

- Pogoda De la Vega U (2004)** Untersuchungen zur UV-Strahlen- und Trockenresistenz von *Deinococcus radiodurans*. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Pogoda de la Vega U, Rettberg P, Reitz G (2007)** Simulation of the environmental climate conditions on martian surface and its effect on *Deinococcus radiodurans*. *Adv Space Res* 40:1672-1677
- Potts M (1994)** Desiccation tolerance of procaryotes. *Microbiol Rev* 58:755–805
- Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF (1993)** Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal* 65:661–671
- Quaiser A, Constantinesco F, White MF, Forterre P, Elie C (2008)** The Mre11 protein interacts with both Rad50 and the HerA bipolar helicase and is recruited to DNA following gamma irradiation in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *BMC Mol Biol* 9:25
- Radman M, Wagner R (1986)** Mismatch repair in *Escherichia coli*. *Ann Rev Genet* 20:523–538
- Rajman LA, Lovett ST (2000)** A thermostable single-strand DNase from *Methanococcus jannaschii* related to the RecJ recombination and repair exonuclease from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:607–612
- Rao H, Rosenfeld A, Wetmur J (1998)** *Methanococcus jannaschii* Flap endonuclease: expression, purification and substrate requirements. *J Bacteriol* 180:5406–5412
- Reich CI, McNeil LK, Brace JL, Brucker JK, Olsen GJ (2001)** Archaeal RecA homologues: different response to DNA-damaging agents in mesophilic and thermophilic Archaea. *Extremophiles* 5:265–275
- Rettberg P, Eschweiler U, Strauch K, Reitz G, Horneck G, Wänke H, Brack A, Barbier B (2002)** Survival of microorganisms in space protected by meteorite material: results of the experiment 'EXOBIOLOGIE' of the Perseus mission. *Adv Space Res* 30:1539–1545
- Rettberg P, Pogoda de La Vega U, Horneck G (2004)** *Deinococcus radiodurans* - a model organism for life under martian conditions. *Proceedings of the Third European Workshop on Exo-Astrobiology*, 59–62
- Richards JD, Cubeddu L, Roberts J, Liu H, White MF (2008)** The archaeal XPB protein is a ssDNA-dependent ATPase with a novel partner. *J Mol Biol* 376:634–644
- Riesenman PJ, Nicholson WL (2000)** Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 66:620–626
- Riley PA (1994)** Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65:27–33

Roberts JA, Bell SD, White MF (2003) An archaeal XPF repair endonuclease dependent on a heterotrimeric PCNA. *Mol Microbiol* 48:361–371

Roberts MF (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1:5

Romano V, Napoli A, Salerno V, Valenti A, Rossi M, Ciaramella M (2007) Lack of strand-specific repair of UV-induced DNA lesions in three genes of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* *J Mol Biol* 365:921–929

Rudolf J, Rouillon C, Schwarz-Linek U, White MF (2010) The helicase XPD unwinds bubble structures and is not stalled by DNA lesions removed by the nucleotide excision repair pathway. *Nucleic Acids Res* 38:931–41

Rupert CS (1975) Enzymatic photoreactivation: overview. *Basic Life Sci* 5A:73–87

Sagan C (1973) Ultraviolet selection pressure on the earliest organisms. *J Theo Biol* 39:195–200

Salerno V, Napoli A, White MF, Rossi M, Ciaramella M (2003) Transcriptional response to DNA damage in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res* 31:6127–6138

Sancar A, Sancar GB (1988) DNA repair enzymes. *Ann Rev Biochem* 57:29–67

Sandler SJ, Satin LH, Samra HS, Clark AJ (1996) *recA*-like genes from three archaean species with putative protein products similar to Rad51 and Dmc1 proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 24:2125–2132

Seaver LA, Imlay JA (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:7173–7181

Seitz EM, Brockman JP, Sandler SJ, Clark AJ, Kowalczykowski SC (1998) RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. *Genes Dev* 12:1248–1253

Shahmohammadi HR, Asgarani E, Terato H, Saito T, Ohyama Y, Gekko K, Yamamoto O, Ide H (1998) Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarum* against DNA-damaging agents. *J Radiat Res* 39:251–262

She Q, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez MJ, Chan-Weiher CCY, Clausen IG, Curtis BA, De Moors A, Erauso G, Fletcher C, Gordon PMK, Heikamp-de Jong I, Jeffries AC, Kozera CJ, Medina N, Peng X, Thi-Ngoc HP, Redder P, Schenk ME, Theriault C, Tolstrup N, Charlebois RL, Doolittle WF, Duguet M, Gaasterland T, Garrett RA, Ragan MA, Sensen CW, Van der Oost J (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7835–7840

Shen B, Qiu J, Hosfield D, Tainer JA (1998) Flap endonuclease homologs in archaeobacteria exist as independent proteins. *Trends Biochem Sci* 23:171–173

Slieman TA, Nicholson WL (2000) Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. *Appl Environ Microbiol* 66:199–205

Smith KC (1962) Dose dependent decrease of DNA of bacteria following irradiation with ultraviolet light or with visible light and dye. *Biochem Biophys Res Commun* 8:157–163

Stapleton GE, Engel MS (1960) Cultural conditions as determinants of sensitivity of *Escherichia coli* to damaging agents. *J Bacteriol* 80:544–551

Stetter KO, Koenig H, Stackebrandt E (1983) *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulfur reducing archaeobacteria growing optimally at 105 °C. *Syst Appl Microbiol* 4:535–551

Stetter KO (1988) *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* 10:172–173

Stetter KO (1989) Extremely thermophilic chemolithoautotrophic archaeobacteria. In: Schlegel HG, Bowien B (eds.) *Autotrophic Bacteria*. Science Tech. Publishers Madison, WI, and Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo

Stetter KO (1992) Life at the upper temperature boarder. In: Tran Than Van J, Tran Than Van K, Mounolou JC, Schneider J, McKay C (eds.) *Frontiers of Life*. Editions Frontières, Gif-sur-Yvette

Stetter KO (1996 a) Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found Symp* 202:1–18

Stetter KO (1996 b) Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 18:149–158

Stöhr R, Waberski A, Liesack W, Völker H, Wehmeyer U, Thomm M (2001 a) *Hydrogenophilus hirschii* sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing β -proteobacterium isolated from yellowstone national park. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:481–488

Stöhr R, Waberski A, Völker H, Tindall B, Thomm M (2001 b) *Hydrogenothermus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of *Calderobacterium hydrogenophilum* as a member of the genus *Hydrogenobacter* and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobaculum acidophilum* gen. nov., comb. nov., in the phylum 'Hydrogenobacter/ Aquifex'. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1853–1862

Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:630–670

- Takao M, Oikawa A, Yasui A (1990)** Characterization of a superoxide dismutase gene from the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Arch Biochem Biophys 283:210–216
- Tapias A, Leplat C, Confalonieri F (2009)** Recovery of ionizing-radiation damage after high doses of gamma ray in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus gammatolerans*. Extremophiles 13:333–343
- Truglio JJ, Croteau DL, Skorvaga M, DellaVecchia MJ, Theis K, Mandavilli BS, Van Houten B, Kisker C (2004)** Interactions between UvrA and UvrB: the role of UvrB's domain 2 in nucleotide excision repair. EMBO J 23:2498–509
- Truglio JJ, Karakas E, Rhau B, Wang H, DellaVecchia MJ, Van Houten B, Kisker C (2006)** Structural basis for DNA recognition and processing by UvrB. Nat Struct Mol Biol 13:360–364
- Umezu K, Nakayama K, Nakayama H (1990)** *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. Proc Natl Acad Sci USA 87:5363–5367
- Valtonen M, Nurmi P, Zheng JQ, Cucinotta FA, Wilson JW, Horneck G, Lindegren L, Melosh J, Rickman H, Mileikowsky C (2009)** Natural transfer of viable microbes in space from planets in extra-solar systems to a planet in our solar system and vice versa. Astrophys J 690:210–215
- Van Houten B (1990)** Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 54:18–51
- Varghese AJ, Day RS (1970)** Excision of cytosine-thymine adduct from the DNA of the ultraviolet-irradiated *Micrococcus radiodurans*. Photochem Photobiol 11:511–517
- Vijayvargia R, Biswas I (2002)** MutS2 family protein from *Pyrococcus furiosus*. Curr Microbiol 44:224–228
- Ward JF, Blakely WF, Joner EI (1985)** Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. Radiat Res 103:383–392
- Waters E, Hohn MJ, Ahel I, Graham DE, Adams MD, Barnstead M, Beeson KY, Bibbs L, Bolanos R, Keller M, Kretz K, Lin X, Mathur E, Ni J, Podar M, Richardson T, Sutton GG, Simon M, Söll D, Stetter KO, Short JM, Noordewier M (2003)** The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. Proc Natl Acad Sci USA 100:12984–12988
- Weikl F (2010)** Der Einfluss von Trockenheit, Vakuum und Gammastrahlung auf das Überleben thermophiler Mikroorganismen. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Universität Regensburg
- White MF (2003)** Archaeal DNA repair: paradigms and puzzles. Biochem Soc Trans 31:690–693
- White MF (2009)** Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'→3' DNA helicases. Biochem Soc Trans 37:547–551

White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, Moffat KS, Qin H, Jiang L, Pamphile W, Crosby M, Shen M, Vamathevan JJ, Lam P, McDonald L, Utterback T, Zalewski C, Makarova KS, Aravind L, Daly MJ, Minton KW, Fleischmann RD, Ketchum KA, Nelson KE, Salzberg S, Smith HO, Venter JC, Fraser CM (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286:1571–1577

Whitman WB, Bowen TL, Boone DR (2006) The methanogenic Bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E (eds.) *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Springer, New York

Williams E, Lowe TM, Savas J, DiRuggiero J (2007) Microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* exposed to gamma irradiation. *Extremophiles* 11:19–29

Wilson TE, Topper LM, Palmboos PL (2003) Non-homologous end-joining: bacteria join the chromosome breakdance. *Trends Biochem Sci.* 28:62–66

Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Nat Acad Sci USA* 74:5088–5090

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a neutral system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria and eukarya. *Proc Nat Acad Sci USA* 87:4576–4579

Wu Y, Chen W, Zhao Y, Xu H, Hua Y (2009) Involvement of RecG in H₂O₂-induced damage repair in *Deinococcus radiodurans*. *Can J Microbiol* 55:841–848

Xu G, Wang L, Chen H, Lu H, Ying N, Tian B, Hua Y (2008) RecO is essential for DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 190:2624–2628

Yeh AP, Hu Y, Jenney FE Jr., Adams MWW, Rees DC (2000) Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. *Biochemistry* 39:2499–2508

Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:781–791

Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Aeverbeck D, Petranovic M, Lindner AB, Radman M (2006) Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* 443:569–573

Zeikus J, Wolfe R (1972) *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J Bacteriol* 109:707–713

Zhou Q, Zhang XJ, Xu H, Xu BJ, Hua YJ (2006) RadA: A protein involved in DNA damage repair processes of *Deinococcus radiodurans* R1. *Chin Sci Bull* 51:2993–2999

Zillig W, Stetter KO, Wunderl S, Schulz W, Priess H, Scholz J (1980) The Sulfolobus-“Caldariella” group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. Arch Microbiol 125:259–269

Zillig W, Stetter KO, Schaefer W, Janekovic D, Wunderl S, Holz J, Palm P (1981) Thermoproteales: a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaebacteria isolated from icelandic solfataras. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg I Abt C 2:205–227

Zillig W, Gierl A, Schreiber G, Wunderl S, Janekovic D, Stetter KO, Klenk HP (1983) The archaebacterium *Thermofilum pendens* represents a novel genus of the thermophilic, anaerobic sulfur respiring Thermoproteales. Syst Appl Microbiol 4:79–87

ZoBell CE (1941) Studies on marine bacteria. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. J Mar Res 4:42–75

Zolghadr B, Klingl A, Koerdt A, Driessen AJ, Rachel R, Albers SV (2010) Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*. J Bacteriol 192:104–110

Internetseiten

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=proteinclusters&cmd=search>

<http://genolist.pasteur.fr/SubtilList/>

VII Anhang


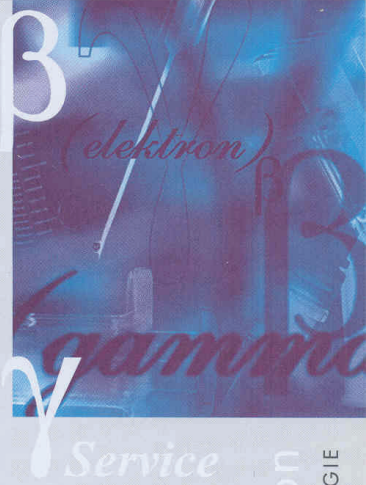
1 Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
CC CPD	Cytosin-Cytosin-Cyclobutan-Pyrimidindimer
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
CT CPD	Cytosin-Thymin-Cyclobutan-Pyrimidindimer
DIP	Di- <i>myo</i> -Inositol-1,1'-(3,3')-Phosphat
DGP	1-1'-Diglycerolphosphat
DK	Dunkelkontrolle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	DSMZ-Nummerierung der hinterlegten Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH
EPR	Reparatur durch enzymatic Photoreactivation
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung (Erdoberfläche: $g = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$)
G1N	Erzmischung: Pyrit, Sphalerit, Chalcopyrit (33 % w/v; Korngröße: < 0,125 mm)
G6	Erzmischung: Pyrit, Sphalerit (50 % w/v; Korngröße: < 0,125 mm)
GIP	1-Glyceryl-1- <i>myo</i> -Inositol-Phosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)-Tandem-Massenspektroskopie (mass spectroscopy)
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasmaanalyseverfahren (inductively coupled plasma)
KS	kompatibles Solut

LEO	Erdnahes Orbit bis in eine Höhe von 450 km (low Earth orbit)
Lsg.	Lösung
M	Molar
MMR	Reparatur durch Mismatch-Repair
mod.	modifiziert
N	Normal
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance)
NER	Reparatur durch Nucleotid-Excisions-Repair
p. A.	pro Analysis
PBS	Phospat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PP	Photoprodukt
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S°	elementarer Schwefel
SEM	Rasterelektronenmikroskop (scanning electron microscopy)
SME	Synthetisches Meerwasser
sp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TC CPD	Thymin-Cytosin-Cyclobutan-Pyrimidindimer
TC 6-4	Thymin-Cytosin-6-4-Pyrimidinpyrimidondimer
TG	Trockengewicht
T _{opt.}	optimale Wachstumstemperatur
TT 6-4	Thymin-Thymin-6-4-Pyrimidinpyrimidondimer
TT CPD	Thymin-Thymin-Cyclobutan-Pyrimidindimer
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
YE	Hefeextrakt (yeast-extract)
64-PP	64-Photoprodukt (Pyrimidin-Pyrimidon-Dimer)

2 Bestrahlungszertifikat

		<h1>Zertifikat</h1>			
EN ISO 9001 EN ISO 13485					
BGS Fritz-Kotz-Str. 16 51674 Wiehl DLR Inst. Luft- und Raumfahrt Abteilung Strahlenbiologie Gebäude 24 Linder Höhe 51147 Köln					
Zertifikats-Nr.: 9114162		Kunden-Nr. : 101235 Datum : 02.11.2009 Seite : 1 von 2			
BGS-Auftrags-Nr.: 291.13132.01 Ihre Best.: Tiefsee...					
Artikel:	Muster	1	Karton(s)	1	Karton(s)
Strahlenart:	Gamma				
Min. Oberflächendosis [kGy]:	5,00				
Bestrahlt am:	01.11.2009				
Die gemessene Oberflächendosis beträgt: 6,2 kGy.					
BGS-Auftrags-Nr.: 291.13132.02 Ihre Best.: Tiefsee...					
Artikel:	Muster	1	Karton(s)	1	Karton(s)
Artikel:	Muster				
Strahlenart:	Gamma				
Min. Oberflächendosis [kGy]:	10,00				
Bestrahlt am:	31.10.2009				
Die gemessene Oberflächendosis beträgt: 13,0 kGy.					
BGS-Auftrags-Nr.: 291.13132.03 Ihre Best.: Tiefsee...					
Artikel:	Muster	1	Karton(s)	1	Karton(s)
Artikel:	Muster				
Strahlenart:	Gamma				
Min. Oberflächendosis [kGy]:	15,00				
Bestrahlt am:	01.11.2009				
Die gemessene Oberflächendosis beträgt: 16,9 kGy.					
BGS Beta-Gamma-Service GmbH & Co. KG · Sitz Wiehl · Registergericht Köln HRA 16938 · USt-IdNr.: DE 122 533 721 PhG BGS Beteiligungs GmbH · Sitz Wiehl · Registergericht Köln HRB 38648 · Geschäftsführer: Dr. Andreas Ostrowski					



EN ISO 9001
EN ISO 13485

Zertifikat

BGS-Auftrags-Nr.: 291.13132.04

Ihre Best.: Tiefsee...

Artikel: Muster

Artikel: Muster

Strahlenart:

Min. Oberflächendosis [kGy]:

Bestrahlt am:

Gamma

20,00

31.10.2009

Zertifikats-Nr.: 9114162

Seite : 2 von 2

1 Karton(s) 1 Karton(s)

Die gemessene Oberflächendosis beträgt: 25,3 kGy.

Bestrahlungszertifikat · Certificate of irradiation · Bestrahlungszertifikat
BGS IDEEN PLUS ENERGIE BGS IDEEN PLUS ENERGIE BGS IDEEN PLUS ENERGIE BGS IDEEN PLUS ENERGIE

3 Danksagung

Bei der Anfertigung meiner Dissertation wurde ich von vielen Menschen unterstützt. Besonders bedanken möchte ich mich auf diesem Wege bei...

... **PD Dr. Reinhard Rachel**, der mich nicht nur hervorragend betreute und mich während meiner Arbeit fachlich begleitete, sondern mich in vielen anregenden Diskussionen immer wieder auch auf neue Ideen gebracht hat.

... **Prof. Dr. Michael Thomm**, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit zum Teil am Lehrstuhl für Mikrobiologie durchzuführen.

... **Dr. Günther Reitz**, der mich in seiner Abteilung freundlich aufgenommen hat. Mich in jeder Situation unterstützt hat und immer mit Interesse den Fortschritt der Arbeit verfolgte.

... in besonderem Maße bei **Dr. Harald Huber** und **Dr. Petra Rettberg**, die Beide maßgeblich, zum Teil durch unermüdlichen Einsatz, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und sowohl bei unseren sehr unterhaltsamen Treffen, als auch sonst immer mit voller Begeisterung an meiner Arbeit beteiligt waren. Ihr habt mein Interesse an der Mikrobiologie im Allgemeinen und an der astrobiologischen Mikrobiologie im Speziellen immer wieder aufs Neue geweckt.

... **Prof. Dr. Reinhard Sterner** für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens.

... **Dr. Thierry Douki** für das Durchführen der Photoproduktanalysen.

... **Prof. Dr. Erwin Galinski** für das Durchführen der kompatiblen Solute Analysen und das geduldige Ertragen meiner unzähligen eMails.

... **Prof. Dr. Gottfried Schmalz**, der es mir ermöglichte am Rasterelektronenmikroskop einige Aufnahmen anzufertigen. Und **Andreas Klingl** für das Anfertigen der rasterelektronenmikroskopischen Bilder.

... **Dr. Patrick Babinger** für die schnelle und kompetente Hilfe bei der Gensuche.

...**Dipl. Ing. Thomas Hader** und **Konrad Eichinger** für die Anleitung und tatkräftige Unterstützung bei der *Archaeoglobus*-Fermentation.

... **Fabian Weigl**, **Anja Bauermeister** und **Marko Waßmann** für die großzügige Überlassung einiger Daten. **Marko Waßmann**, **Dr. Ralf Möller** und **Dr. Patrick Lau** für die vielen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche und Tipps.

... allen Mitarbeitern der Abteilung Strahlenbiologie am DLR in Köln, aber auch beim gesamten Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Uni Regensburg. Egal wo ich war, ich wurde immer mit offenen Armen empfangen.

An letzter Stelle möchte ich mich bei meiner ganzen Familie, besonders bei meinen Eltern **Franz** und **Susanne Beblo**, meiner Schwester **Julia Beblo** (mit ihren Männern) und **Slaven Vranesevic** für die (manchmal sehr nötigen) Aufmunterungen und die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken!

4 Erklärung

Hiermit erkläre ich Kristina Beblo, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet haben.

Diese Arbeit war bisher nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens.

Andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Beblo K, Rabbow E, Rachel R, Huber H, Rettberg P (2009) Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation. *Extremophiles* 13:521-531

Regensburg, April 2010

