

Detektion von UV-B-Strahlung durch *Halobacterium halobium*

Bernhard Traulich* und Gottfried Wagner

Einleitung

Die archaebakteriellen Halobakterien haben bis zum heutigen Tage überlebt in ökologischen Nischen nahezu gesättigter Salzkonzentration; ihre Standorte in Äquatornähe sind außerdem durch extreme Sonneneinstrahlung gekennzeichnet. Die hier typische geringe Sauerstoffkonzentration in den aufgeheizten Salzlaugen dürfte bei *Halobacterium halobium* und verwandten Arten die Ausbildung außergewöhnlicher Mechanismen der Lichtenergie-Wandlung gefördert haben, basierend auf der Quanten-Absorption durch die membrangebundenen Retinalproteine Bacteriorhodopsin (BR) (OESTERHELT und STOECKENIUS, 1971, 1973) und Halorhodopsin (HR) (MUKOHATA et al., 1980; LANYI und OESTERHELT, 1982).

Die energetische Nutzung des Sonnenlichtes in den offenen Salzlaugen beinhaltet grundsätzlich die Problematik einer gleichzeitigen Exposition gegenüber kurzweiliger ultravioletter Strahlung, die auch für Halobakterien eine nicht zu tolerierende Belastung darstellt (WAGNER, 1985); mithilfe eines hochempfindlichen Detektor-Systems suchen sie dieser Strahlung offenbar durch Abtauchen in günstiges Lichtmilieu zu entfliehen: Nach den vorliegenden Labordaten (HILDEBRAND und DENCHER, 1975; WAGNER et al., 1987; siehe auch Abb. 1) sollte die Flucht in Tauchtiefen führen, in denen die ultraviolette Strahlung durch Rückstreuung

und Beschattung unter den Schwellenwert von 0.02 W m^{-2} gesenkt ist, während der weniger ausgefilterte Spektralanteil des sichtbaren Lichtes die gewünschte Lichtenergieumwandlung erlaubt.

Das halobakterielle Detektor-System für ultraviolette Strahlung scheint somit ein nahezu ideales Modellsystem zu sein, fortentwicklungsfähig zur Überwachung und Prognose zunehmender UV-B-Belastung in der Biosphäre; dieses hochempfindliche Detektor-System sicherte Halobakterien ein Überleben seit Urzeiten der Evolution. Quantitative Daten zur Aktionsspektroskopie des halobakteriellen UV-B-Rezeptors werden hier vorgestellt.

Material und Methode

Die verwendeten Pigment-Mutanten von *Halobacterium halobium* waren positiv (+) bzw. negativ (-) in der Synthese der Holopigmente Bacteriorhodopsin (BR), Halorhodopsin (HR), Sensorhodopsin (SR), Pigment-480 (P-480): Flx-03 l.c. BR⁻, HR⁻, SR⁺, P-480⁺ (SPUDICH und BOGOMOLNI, 1983; TAKAHASHI et al., 1985; WOLFF et al., 1986; MARWAN und OESTERHELT, 1987); L-07 phänotypisch BR⁻, HR⁻, SR⁻, P-480⁻ aufgrund fehlender Synthese des Chromophors Retinal (WAGNER et al., 1981). Die Anzucht erfolgte in 100 ml Erlenmeyer-Kolben auf Inkubationsschüttlern (Braun Melsungen BRD; 100 Upm) semianerob in 40 ml Pepton-Medium (WAGNER und HOPE, 1976) bei 40° C unter grün-gelbem Dauerlicht (Osram L 20/W 63, 7 W m⁻²). Die Zellen wurden 72 h nach Inokkulation, d.h. in der späten exponentiellen Wachstumsphase, abgeerntet und in die Versuche übernommen.

Nach Geißelkürzung durch Scherkräfte, Waschen und Überführen in peptonfreies Schwimmmedium wurden die Halobakterien zur Anheftung über Einzelfilamente ihrer gekürzten Geißel in gasdichte Mikroschwimmkammern einpipettiert (10 µl) und mit einem Quarzdeckglas abgedeckt (TRAULICH und WAGNER, 1986).

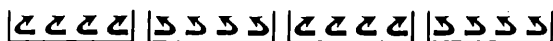
Zur Beobachtung und Reizlichtapplikation diente ein UV-B tüchtiges inverses Mikroskop ICM 405 (Zeiss, Oberkochen, BRD) mit Quarz-Optik im Anregungsstrahlengang (Abb. 2.).

Als UV-B Strahlungsquelle war ein UV-optimierter 500 W Xenon Brenner Cermax (ILC, Sunnyvale, Ca., USA) im Einsatz. Als UV-A-Strahlungsquelle diente ein 75 W Xenon Brenner (Osram GmbH, Berlin-München, BRD) im Lampenhaus XBO 75 W/2 (Zeiss, Oberkochen, BRD).

Das kontinuierlich applizierte Hintergrundlicht, verwendet auch als Beobachtungslicht, wurde von einer Glühlampe (12 V; 60 W) erzeugt und durch den Interferenzfilter FIL 589 (Schott, Mainz, BRD), den Infrarot-Bandpassfilter BuW 093 (B&W, Wiesbaden, BRD) oder das Farbglas BG 24 bzw. das Kantenglas OG 530 (Schott, Mainz, BRD; Abb. 3a) spektral zerlegt.

* Diese Publikation enthält Teile der Dissertation von B. Traulich zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der Justus-Liebig-Universität.

SPONTANVERHALTEN



FLUCHTREIZ DURCH UV-PULS

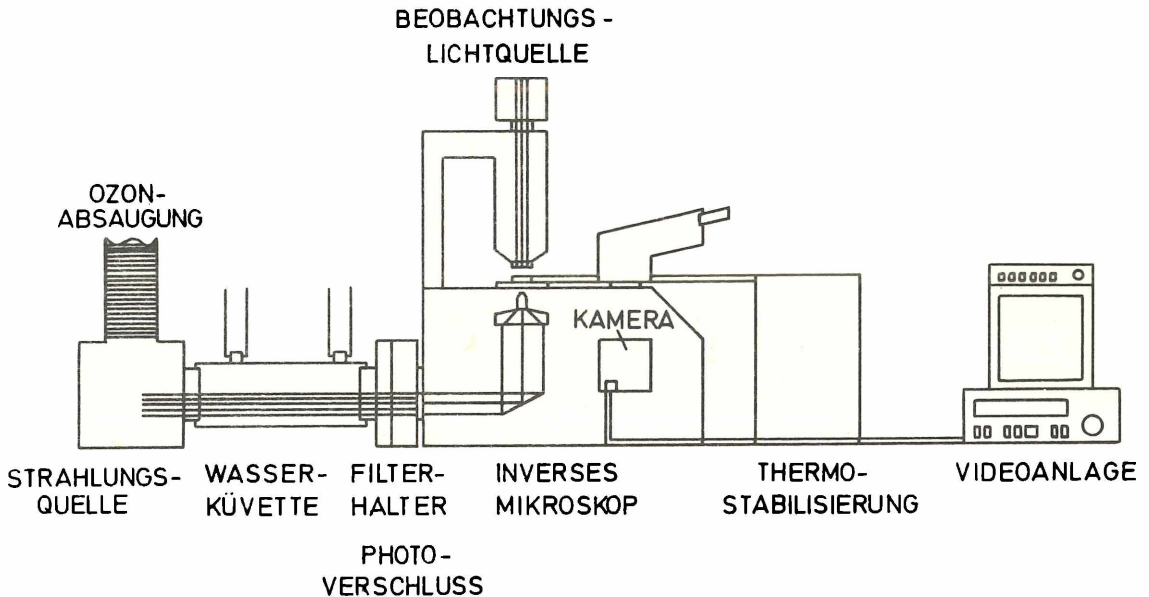


Abbildung 1

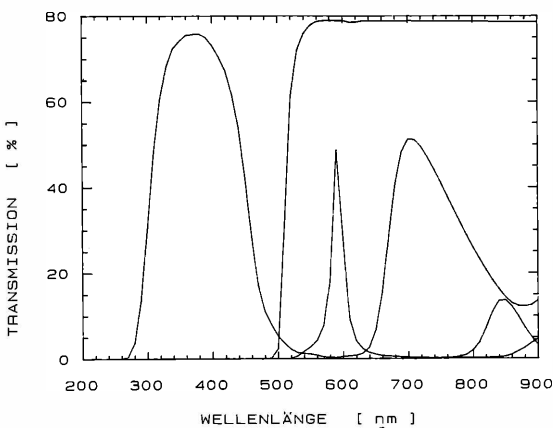
Rotationsverhalten experimentell angehefteter Einzelzellen von *Halobacterium halobium*.

Spontanverhalten: Die links geschwungenen Pfeilgruppen symbolisieren eine Rotationsperiode des Zellkörpers im Uhrzeigersinn, gefolgt von der gegen den Uhrzeigersinn; die Rotationsachse ist das angeheftete Einzelfilament einer gekürzten Geißel an der Deckglas-Oberfläche.

Fluchtreiz durch UV-Puls: Ein Fluchtreiz wird mit Verkürzung der Rotationsperiode beantwortet und ist eine störungsfreie Wiedergabe des Bewegungsverhaltens freischwimmender Zellen (siehe Material und Methode).

**Abbildung 2**

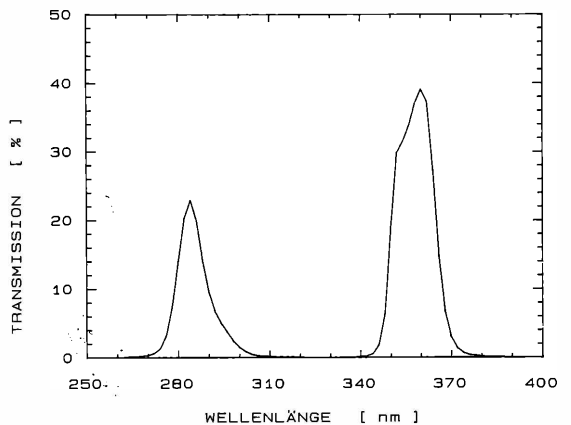
Versuchsaufbau zur Aktionsspektroskopie des UV-abhängigen Rotationsverhaltens angehefteter Einzelzellen von *Halobacterium halobium*.

**Abbildung 3a**

Transmissionsspektren der verwendeten Filter zur kontinuierlichen Hintergrundbelichtung von *Halobacterium halobium* im sichtbaren und infraroten Spektralbereich; „blau“: Farbglas BG 24 mit Haupttransmission bei 375,5 nm und Nebengipfel bei 702,3 nm; „gelb“: Kantenglas OG 530 mit Öffnung oberhalb 500 nm; „orange“: Interferenzfilter FIL 589 mit der Zentralwellenlänge bei 592,8 nm.; „infrarot“: Schwarzglas BuW 093 mit Haupttransmission bei 846 nm.

Die Quantenflüsse wurden am Expositionsort der Zellen gemessen mit Hilfe des kalibrierten Detektors AUV 222 (UDT, Hawthorne, Ca., USA). Rechteckreizung über 67 bis 2000 ms im UV-B bzw. UV-A Spektralbereich erfolgte durch die Interferenzfilter UV-M-IL 282 bzw. UV-PAL 362 (Schott, Mainz, BRD; Abb. 3b) und einen Photoverschluss (Melles Griot, Rochester, NY., USA).

Zur Direktbeobachtung und zur Dokumentation auf 3/4-Zoll-Video-System U-Matic VO-5800P (Sony, Japan) mit zeitlicher Auflösung von 20 ms diente eine Video-Kamera mit Infrarot-sensitiver Bildröhre IR-Newikon (Heimann, Wiesbaden, BRD). Der Zeitpunkt der Pulsapplikation wurde über eine elektronische Koppelung des Photoverschlusses mit dem Video-Zeitgeber VTG-33 (For. A, Japan) dokumentiert.

**Abbildung 3b**

Transmissionsspektren der verwendeten Filter zur Bestrahlung von *Halobacterium halobium* durch Pulse von UV-B bzw. UV-A;

UV-B: Interferenzfilter UV-M-IL 282 mit der Zentralwellenlänge 282,3 nm; UV-A: Interferenzfilter UV-PAL 362 mit der Zentralwellenlänge 361,6 nm.

Die Methode der Zellanheftung erlaubt eine Unterscheidung der beiden möglichen Geißelrotationsrichtungen (im Uhrzeigersinn bzw. entgegen dem Uhrzeigersinn), sichtbar gemacht durch die entsprechende Rotationsrichtung des Zellkörpers. Da die Bevorzugung einer Rotationsrichtung individuell unterschiedlich aber pro Individuum konstant ist, erlaubt eine nach Drehrichtung getrennte Auswertung, verbunden mit Reizgabe ausschließlich in einer Drehrichtung, eine scharfe Abtrennung von Reizantwort gegenüber Spontanverhalten.

Die Quantifizierung der Reizantwort in relativen Einheiten erfolgte über die Verhältnissbildung von Rotationsperiode bei Reizung (Reizverhalten), verglichen mit der zugehörigen Rotationsperiode ohne Reizung (Spontanverhalten). Da sich Fluchtverhalten widerspiegelt in einer Verkürzung der

Rotationsperiode (s. Abb. 1) und eine Verhältnisbildung von Spontanverhalten zu Reizverhalten gewählt wurde, dokumentieren bei der „An-Reaktion“ von UV-Strahlung Quotienten über 1,0 Fluchtreaktionen. Um Lockreaktionen im gleichen Rastermaß wie Fluchtreaktionen abbilden zu können, wurde hier das Invers-Verhältnis, d.h. Reizverhalten zu Spontanverhalten, mit negativem Vorzeichen eingeführt. Aus graphischen Gründen wurde der Quotient $\pm 1,0$ gleich Null gesetzt (vgl. Abb. 4-10).

Die Klassenverteilung der Primärdaten ist linkschief, jedoch nach logarithmischer Transformation normal, so daß für die Mittelwertsbildung der Primärdaten das geometrische Mittel aus 20-120 Einzelereignissen verwendet wurde.

Ergebnisse

Die Erkennung von UV-B-Strahlung durch *Halobacterium halobium* ab einem Schwellenwert um $0,02 \text{ W m}^{-2}$ ist abhängig von einem physiologisch aktiven Sensorpigment, beschrieben für den längerwelligen Bereich als Sensorhodopsin (HILDEBRAND und DENCHER, 1975; SPUDICH und BOGOMOLNI, 1984) mit seinen Komponenten Opsin als Protein-Anteil und Retinal als Chromophor. Die Applikation eines UV-B-Pulses ($0,09 \text{ W m}^{-2} \times 250 \text{ msec}$; Abb. 4) führt bei der Retinal-positiven Mutante Flx-03 l.c. zu einer deutlichen Fluchtreaktion, während die gleiche Pulsdosis bei der Retinal-negativen Mutante L-07 wirkungslos bleibt. Erst nach Rekonstitution durch externe Zugabe von Retinal (WAGNER et al., 1981) kehrt bei der Mutante L-07 die photosensorische Reaktionsfähigkeit zurück, verfolgt im sichtbaren Spektralbereich (A. WEISERT, Giessen, unveröffentlicht).

Vergleichbar mit der hier gefundenen Retinal-Abhängigkeit der UV-B-Antwort ist die beschriebene Retinal-Abhängigkeit sowohl für die Antwort auf UV-A Reizung als auch auf Reizung durch längerwelliges sichtbares Licht (DENCHER und HILDEBRAND, 1979; TOMIOKA et al., 1986). Diese Übereinstimmung ist überraschend, da Retinal im UV-B-Bereich praktisch nicht absorbiert, spürbar jedoch im UV-A-Bereich und durch seine Kopplung an Opsin auch im sichtbaren Spektralbereich (DENCHER und HILDEBRAND, 1979).

Ähnlich überraschend ist die Beobachtung einer strengen Abhängigkeit der UV-B-Antwort von der Qualität des kontinuierlich applizierten Hintergrundlichtes im sichtbaren Spektralbereich (Abb. 5). Diese Daten stützen das Modell von TRAU-LICH und WAGNER (1986) mit der Schlußfolgerung eines photochromen UV-B-Rezeptors, kompatibel mit Sensorhodopsin (WAGNER, 1981; SPUDICH und BOGOMOLNI, 1984). Während Wellenlängen des Hintergrundlichtes, die vom Grundzustand des SR mit Hauptabsorption bei 587 nm absorbierbar sind (orange, gelb) und Photokonversion zum Zwischenzustand SR_{373} bewirken, UV-B-Bestrahlung als Fluchtlicht definieren, läßt nicht absorbierbares Hintergrundlicht (infrarot, blau) UV-B als Locklicht erscheinen (Abb. 5). Die Gleichsinnigkeit der Hintergrundlicht-abhängigen UV-B-Antwort mit der entsprechenden UV-A-Antwort (SPUDICH und BOGOMOLNI, 1984) legt den Schluß nahe, daß auch die UV-B-Antwort über den Zwischenzustand SR_{373} vermittelt wird.

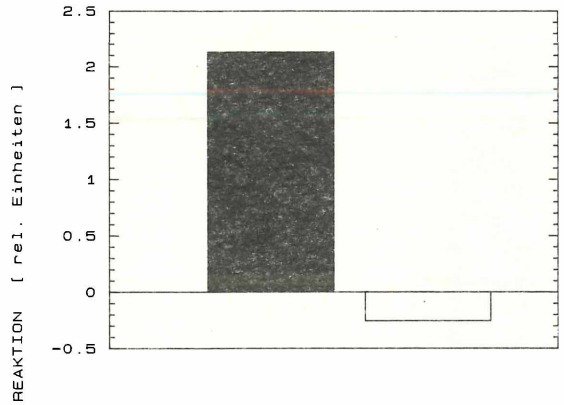


Abbildung 4

Retinal-Abhängigkeit der UV-B-induzierten Fluchtantwort von *Halobacterium halobium*, untersucht an zwei Mutanten mit intakter bzw. blockierter Retinal-Synthese. Die schwarze Säule repräsentiert in rel. Einheiten mit positivem Vorzeichen die Fluchtantwort der Retinal-positiven Mutante Flx-03 l.c., die weiße Säule die fehlende Antwort der Retinal-negativen Mutante L-07.

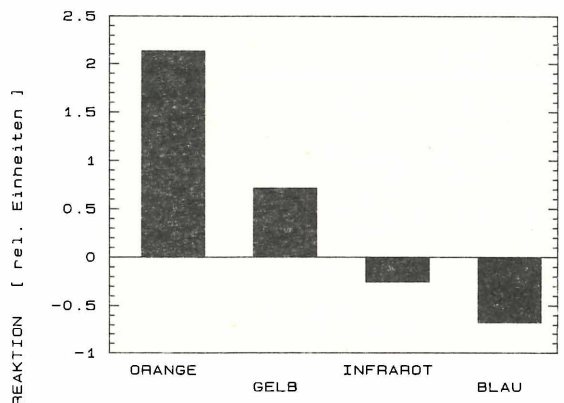


Abbildung 5

Abhängigkeit der UV-B-Flucht-Antwort durch *Halobacterium halobium*, Mutante Flx-03 l.c., von der Qualität des Hintergrundlichtes im Spektralbereich „orange“ ($0,7 \text{ W m}^{-2}$), „gelb“ ($6,3 \text{ W m}^{-2}$), „infrarot“ ($0,7 \text{ W m}^{-2}$) und „blau“ ($5,0 \text{ W m}^{-2}$; vgl. Abb. 3a). Reaktion: in rel. Einheiten mit positivem Vorzeichen = Fluchtantwort, mit negativem Vorzeichen = Lockantwort.

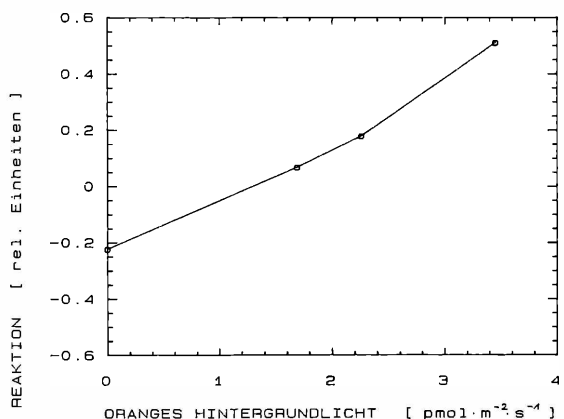


Abbildung 6

Lineare Abhängigkeit der UV-B-Fluchtantwort von *Halobacterium halobium*, Mutante Flx-03 l.c., vom Photonenfluß des orangen Hintergrundlichtes. Reaktion: siehe Abb. 5.

Diese Deutung wird weiter ergänzt durch die im Detail untersuchte lineare Abhängigkeit der UV-B-Fluchtantwort vom Photonenfluß [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] des orangen Hintergrundlichtes (Abb. 6), mit zunehmender Photokonversion des Grundzustandes SR_{587} in den Zwischenzustand SR_{373} .

Wird das Hintergrundlicht konstant gehalten, die Dosis des UV-B-Pulses jedoch durch Erhöhung des Quantenflusses bei gleich gehaltener oder verlängerter Pulsdauer um mehr als den Faktor 10 gesteigert, zeigt sich ein weiteres Phänomen: während eine geringe UV-B-Dosis zur Fluchtreaktion von *Halobacterium halobium* wie gewöhnlich führt, lösen höhere UV-B-Dosen zunehmend Lockantwort aus (Abb. 7). Vergleichbare Ergebnisse, jedoch mit steilerer Dosis-Abhängigkeit der UV-B-Pulse zeigen sich in Abwesenheit von orangem Hintergrundlicht (Abb. 8). Ob diese physiologisch widersinnige, durch ultraviolette Strahlung erzeugte Lockantwort bei *Halobacterium halobium* auf Eigenschaften des Sensorpigmentes SR_{587} beruht, oder auf erhöhter UV-B-Anfälligkeit nachgeschalteter Prozesse der

Fluchtantwort gegenüber der widerstandsfähigeren Lockantwort, wird gegenwärtig untersucht. Kontrollmessungen mit physiologisch äquivalenten UV-A-Pulsen zeigen diese dosisabhängige Inversion der Reizantwort nicht (vgl. Abb. 9a mit Abb. 9b).

Danksagung

Wir danken Prof. Dr. John L. Spudich (New York), der uns freundlicherweise die *Halobacterium halobium* Mutante Flx-03 l.c. zur Verfügung gestellt hat. Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch den Minister für Forschung und Technologie der Bundesrepublik Deutschland (Projekt 0745719).

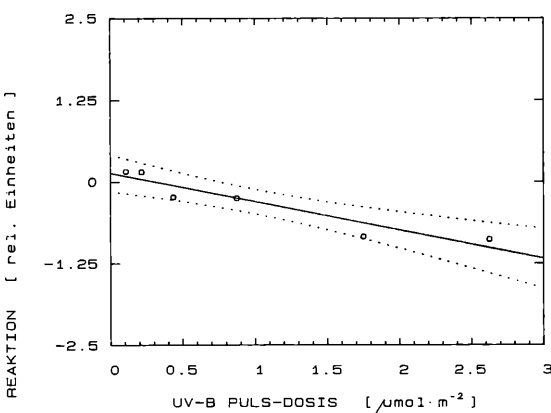


Abbildung 7

Invertierende UV-B-Fluchtreaktion durch *Halobacterium halobium*, Mutante Flx-03 l.c., in Abhängigkeit von steigender Dosis des UV-B-Einzelpulses [$\mu\text{mol m}^{-2}$], bei konstantem orangen Hintergrundlicht ($0,7 \text{ W m}^{-2}$). Reaktion: siehe Abb. 5. Die durchgezogene Verbindung der Meßdaten stellt die Regressionsgerade dar, die gestrichelten Linien die $\pm 95\%$ Vertrauensgrenzen.

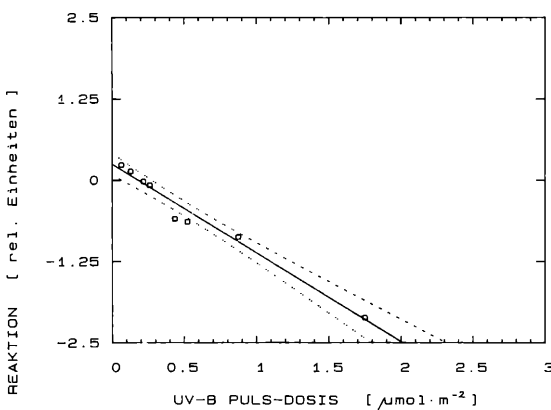


Abbildung 8

Invertierende UV-B-Fluchtreaktion durch *Halobacterium halobium*, Mutante Flx-03 l.c., in Abhängigkeit von steigender Dosis des UV-B-Einzelpulses [$\mu\text{mol m}^{-2}$], bei konstanter infraroter Hintergrundstrahlung ($0,7 \text{ W m}^{-2}$). Reaktion: siehe Abb. 5. Die durchgezogene Verbindung der Meßdaten stellt die Regressionsgerade dar, die gestrichelten Linien die $\pm 95\%$ Vertrauensgrenzen.

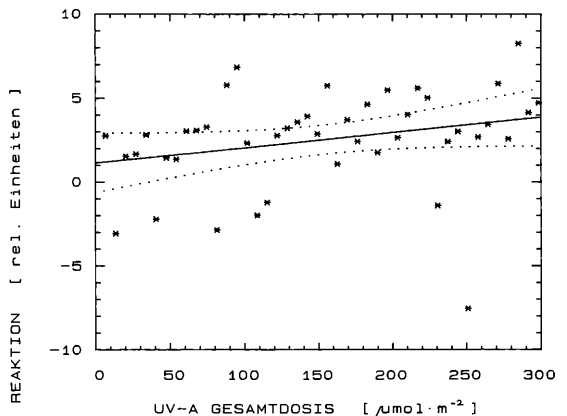
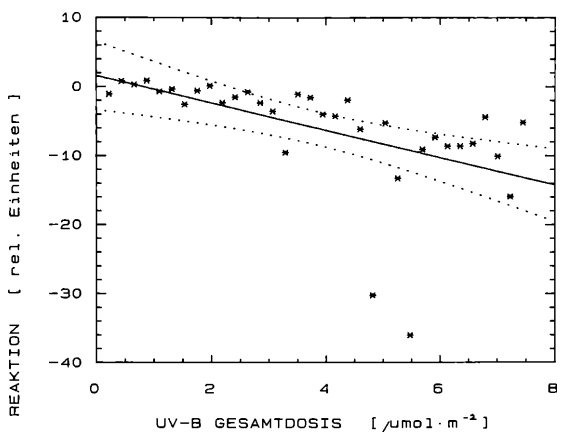


Abbildung 9

a) Konstantes Fluchtverhalten einer angehefteten Einzelzelle von *Halobacterium halobium*, Mutante Flx-03 l.c., auf wiederholte UV-A-Pulse von jeweils $6,8 \mu\text{mol m}^{-2}$ addiert zu einer Gesamtdosis von $298 \mu\text{mol m}^{-2}$; konstante infrarote Hintergrundstrahlung = $0,7 \text{ W m}^{-2}$. Reaktion: siehe Abb. 5. Die durchgezogene Verbindung der Meßdaten stellt die Regressionsgerade dar, die gestrichelten Linien die $\pm 95\%$ Vertrauensgrenzen.



b) Invertierende UV-B-Fluchtreaktion einer angehefteten Einzelzelle von *Halobacterium halobium*, Mutante Flx-03 l.c., auf wiederholte UV-B-Pulse von jeweils $0,22 \mu\text{mol m}^{-2}$ addiert zu einer Gesamtdosis von $7,5 \mu\text{mol m}^{-2}$; konstante infrarote Hintergrundstrahlung = $0,7 \text{ W m}^{-2}$. Reaktion: siehe Abb. 5. Die durchgezogene Verbindung der Meßdaten stellt die Regressionsgerade dar, die gestrichelten Linien die $\pm 95\%$ Vertrauensgrenzen.

Literatur

- DENCHER, N.A. and E. HILDEBRAND (1979): Sensory transduction in *Halobacterium halobium*: Retinal protein pigment controls UV-induced behavioral response. – Z. Naturforsch. 34c, 841-847.
- HILDEBRAND, E. and N. DENCHER (1975): Two photosystems controlling behavioural responses of *Halobacterium halobium*. – Nature 257, 46-48.
- LANYI, J.K. and D. OESTERHELT (1982): Identification of the retinal-binding protein in halorhodopsin – J Biol. Chem., 257, 2674-2677.
- MARWAN, W. and D. OESTERHELT (1987): Signal formation in the halobacterial photophobic response mediated by a fourth retinal protein (P₄₈₀). – J. Mol. Biol. 195, 333-342.
- MUKOHATA, Y., A. MATSUNO-YAGI and Y. KAJI (1980): Light-induced proton uptake and ATP synthesis by bacteriorhodopsin-depleted *Halobacterium*. In: Saline Environment (Edited by H. MORISHITA and M. MASUI), pp. 31-37, B.C. Acad. Soc. Japan, Osaka.
- OESTERHELT, D. and W. STOECKENIUS (1971): Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. – Nature (New Biol.) 233, 149-152.
- OESTERHELT, D. and W. STOECKENIUS (1973): Functions of a new photoreceptor membrane. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2853-2857.
- SPUDICH, J.L. and R.A. BOGOMOLNI (1983): Spectroscopic discrimination of the three rhodopsin-like pigments in *Halobacterium halobium* membranes. – Biophys. J. 43, 243-246.
- SPUDICH, J.L. and R.A. BOGOMOLNI (1984): Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. – Nature 312, 509-513.
- TAKAHASHI, T., H. TOMIOKA, N. KAMO and Y. KOBATAKE (1985): A photosystem other than PS 370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*. – FEMS Microbiol. Lett. 28, 161-164.
- TOMIOKA, H., T. TAKAHASHI, N. KAMO and Y. KOBATAKE (1986): Action spectrum of the photoattractant response of *Halobacterium halobium* in early logarithmic growth phase and the role of sensory rhodopsin. – Biochim. Biophys. Acta 884, 578-584.
- TRAULICH, B. and G. WAGNER (1986): Photochromic properties of the UV-B sensory pigment in *Halobacterium halobium*. In: Biological Effects of UV-B-Radiation, Proc. Workshop, Freiburg/Br., FRG, March 24th and 25th, 1986.
- WAGNER, G. (1981): Action spectra of ATP synthesis in the halobacterial mutants M-1 and L-33: Photoenergetic and photosensory implications. Discussion paper: EMBO Workshop on Halophilic Microorganisms, Ischia, Italy.
- WAGNER, G. (1985): Halobakterien – Lebenskünstler unter glühender Sonne. – Umschau 8, 476-478.
- WAGNER, G. and A.B. HOPE (1976): Proton Transport in *Halobacterium halobium*. – Aust. J. Plant. Physiol. 3, 665-676.
- WAGNER, G., D. OESTERHELT, G. KRIPPAHL and J.K. LANYI (1981): Bioenergetic role of halorhodopsin in *Halobacterium halobium* cells. – FEBS Lett. 131, 341-345.
- WAGNER, G., B. TRAULICH and K.M. HARTMANN (1987): Bacteriorhodopsin-specific ultraviolet quantum yields of photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. – Photochem. Photobiol., 45, 299-303.
- WOLFF, E.K., R.A. BOGOMOLNI, P. SCHERRER, B. HESS and W. STOECKENIUS (1986): Color discrimination in halobacteria: Spectroscopic characterization of a second sensory receptor covering the blue-green region of the spectrum. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7272-7276.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Bernhard Traulich
Prof. Dr. Gottfried Wagner
Botanisches Institut 1
der Univ. Gießen
Senckenbergstr. 17-25
6300 Gießen

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Laufener Spezialbeiträge und Laufener Seminarbeiträge \(LSB\)](#)

Jahr/Year: 1988

Band/Volume: [3_1988](#)

Autor(en)/Author(s): Traulich Bernhard, Wagner Gottfried

Artikel/Article: [Detektion von UV-B-Strahlung durch Halobacterium halobium 62-66](#)